(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4100712号
(P4100712)
(45)発行日　平成20年6月11日(2008.6.11)　(24)登録日　平成20年3月28日(2008.3.28)

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N	5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B
C12Q	1/02	(2006.01)	C12Q	1/02	
C12Q	1/25	(2006.01)	C12Q	1/25	

請求項の数 12　(全 21 頁)

(21)出願番号　特願平10-514516
(86)(22)出願日　平成9年9月18日(1997.9.18)
(86)国際出願番号　PCT/JP1997/003303
(87)国際公開番号　WO1998/012313
(87)国際公開日　平成10年3月26日(1998.3.26)
審査請求日　平成16年9月1日(2004.9.1)
(31)優先権主張番号　特願平8-250697
(32)優先日　平成8年9月20日(1996.9.20)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者
アスビオファーマ株式会社
東京都港区赤坂２丁目９番１１号
(74)代理人
弁理士　清水　初志
(74)代理人
弁理士　橋本　一憲
(72)発明者　布川　陽一
大阪府豊中市刀根山３―６―１―４０３
(72)発明者　及川　信三
京都府京都市西京区大原野東境谷町１―１―８―７０３
(72)発明者　田中　正治
兵庫県芦屋市潮見町４―９―１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト誘導型一酸化窒素合成酵素の発現を制御する化合物のスクリーニング方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】
ヒト誘導型一酸化窒素合成酵素（hiNOS）遺伝子の配列番号１６の塩基配列からなる3’-フランキング領域を含む発現制御機能を有することを特徴とするＤＮＡ。

【請求項２】
１）請求項１記載のＤＮＡ、及び
２）ヒト誘導型一酸化窒素合成酵素（hiNOS）遺伝子の3’-UTR、
を含む発現制御配列。

【請求項３】
請求項２記載の発現制御配列を含む、発現ベクター。

【請求項４】
レポーター遺伝子を更に含む、請求項３記載の発現ベクター。

【請求項５】
プロモーターを含むヒト誘導型一酸化窒素合成酵素（hiNOS）遺伝子の5’-フランキング領域、レポーター遺伝子、請求項２記載の発現制御配列を、5’側からこの順序で含む、発現ベクター。

【請求項６】
請求項４または５記載の発現ベクターで形質転換された細胞。

【請求項７】
請求項２記載の発現制御配列を有する細胞を被験物質で処理し、レポーター遺伝子の発現

量の変化を観察することを特徴とする、hiNOS遺伝子の発現量に影響を与える物質のスクリーニング方法。
【請求項８】
発現制御配列を有する細胞が請求項６記載の細胞である、請求項７記載のスクリーニング方法。
【請求項９】
請求項２記載の発現制御配列を有する細胞を、ヒト誘導型一酸化窒素合成酵素（hiNOS）遺伝子の発現量に影響を与える特定の物質と被験物質とで処理し、レポーター遺伝子の発現量の変化を観察することを特徴とする、該ヒト誘導型一酸化窒素合成酵素（hiNOS）遺伝子の発現量に影響を与える特定の物質の活性を変化させる物質のスクリーニング方法。
【請求項１０】
発現制御配列を有する細胞が請求項６記載の細胞である、請求項９記載のスクリーニング方法。
【請求項１１】
被験物質が混合物である、請求項７または９記載のスクリーニング方法。
【請求項１２】
請求項６記載の細胞を含む、ヒト誘導型一酸化窒素合成酵素（hiNOS）遺伝子の発現量に影響を与える物質、またはヒト誘導型一酸化窒素合成酵素（hiNOS）遺伝子の発現量に影響を与える特定の物質の活性を変化させる物質のスクリーニングするためのキット。
【発明の詳細な説明】
技術分野
本発明は、ヒト誘導型一酸化窒素合成酵素の発現量に影響を与える化合物、より具体的には該酵素の発現を制御する化合物のスクリーニング方法に関する。
背景技術
一酸化窒素（NO）は、血管弛緩因子として同定されたことを契機として、生体機能の調節に重要な働きを持つ生理活性物質であることが明らかとなってきた。それ以外にも血小板凝集の抑制作用、神経伝達物質の遊離作用、マクロファージの抗腫瘍、殺菌作用を有していることが報告されている（Moncada, S., and Higgs, A. (1993)N. Engl. J. Med. 329, 2002-2012）。
NOは、NO合成酵素（NOS）によってL-アルギニンを基質として生合成されるが、現在３種類のアイソザイム（脳型、血管内皮型、誘導型）の存在が確認されており、その染色体上の位置も明らかとなっている（Knowles, R. G., and Moncada, S. (1994)Biochem. J. 298, 249-258）。
そのうち、誘導型NOS（iNOS）は、マクロファージや血管平滑筋細胞（VSMC）、肝細胞、軟骨細胞、神経膠細胞などにエンドトキシンやサイトカインを作用させることにより、遺伝子転写が誘導されその発現が認められる。近年その遺伝子欠失（ノックアウト）マウスが作製され、感染防御が弱まる一方、炎症や敗血症の症状が野生型に比べ緩和されることが報告された（Wei, X.,et al.,(1995)Nature,375,408-411;MacMicking,J.D.,et al.,(1995)Cell, 81,641-650）。iNOSは、種を越えて炎症状態によって誘導されることが報告されており、その酵素活性及び発現の抑制は症状緩和に効果があることが示されている（Moncada, S., and Higgs, E. A. (1995)FASEB J. 9, 1319-1330）。また、敗血症モデルにおいてもiNOS酵素阻害剤の投与は効果が認められている（Kerwin, J. F.,et al., (1995)J.Med. Chem. 38, 4343-4362）。
一方、内皮型NOS（eNOS）は恒常維持、特に血圧の上昇の抑制に関与していることが指摘されており、生体機能に重要な役割を担っていると考えられる。そこで、eNOSの活性には影響せず、iNOSを特異的に阻害する化合物が求められている。しかし、それらのアイソザイムの酵素活性を制御する蛋白質の一次構造上の領域が酷似しているため、NOS酵素阻害剤は特異性の点で十分なものは見いだされていないのが現状である。
一方、NOを放出する物質が、血管肥厚を抑制し、動脈硬化及び血管形成術後の血管再狭窄を抑制することが動物モデルで確認されている（Garg, U. C., and Hassid, A. J. (1989

)J. Clin. Invest. 83,1774-1777. Cooke, J. P.,et al., (1992)J. Clin. Invest. 90, 1168-1172）。また、NOS遺伝子をVSMCにおいて強制発現すると、NOの産生増加とともに、VSMCの内膜肥厚が抑制されることも報告されている（von der Leyen, H. E.,et al.,(1995)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92,1137-1141）。このことから、NOを血管肥厚部位に発生させることによる血管肥厚に対する治療または予防効果が期待できる。

上記事実は、iNOSアイソザイム特異的な遺伝子発現調節化合物を見いだし、阻害薬は抗炎症剤として、また一方誘導薬は循環器領域において有用であることを示唆するものである。

ところで、ある遺伝子の発現を簡便かつ高感度に知る方法として、レポーター遺伝子が利用されている（横田崇、新井賢一、(1993)バイオマニュアルシリーズ4、羊土社）。レポーター遺伝子は、テストを行う遺伝子を直接検出する代わりに用いられるもので、現在、その発現産物量のアッセイが簡便である、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、β-ガラクトシダーゼ（β-Gal）、ルシフェラーゼなどが汎用されている。レポーター遺伝子の翻訳領域の上流または下流に発現調節活性を調べたいＤＮＡを挿入したプラスミドを作製し、その被験ＤＮＡの活性を高感度に検出することができる。

マウスのiNOS（miNOS）遺伝子の発現調節を知る目的で、レポーター遺伝子を用いた実験結果が示されている。例えば、miNOSの転写開始部位上流域（以下「5’-フランキング（flanking）領域」と称する）中、該転写開始部位から約1.7-kb上流にリポ多糖（LPS）やIFN-γに反応してmiNOS遺伝子の誘導に関与する領域があることが見い出され、さらに転写因子NF-kBおよびIRF-1が結合すると考えられているコンセンサス配列部分が、誘導発現に必須であることが示されている（Xie, Q.,et al., (1993)J. Exp. Med. 177,1779-178412. Vodovotz, Y.,et al.,(1993)J. Exp. Med. 178, 605-61313. Martin, E.,et al.,(1994)J. Exp. Med. 180,977-984. Xie, Q.,et al.,(1994)J. Biol. Chem.269, 4705-470815）。また、別の報告によれば、miNOSの転写開始部位約1.6-kb上流に該領域が見い出されている（Lowenstein, C. J.,et al.,(1993)Proc.Natl. Acad. Sci. USA 90, 9730-9734. Kamijo, R.,et al., (1994)Science263, 1612-1615）。しかし、いずれの報告も誘導を示す倍率は50倍以下であり、実際のiNOS誘導を高感度には示すことができないと考えられる。

一方、ヒトのiNOS（hiNOS）遺伝子に関しては、そのcDNAの存在を示すことが困難であった。その理由の一つとして、マウスマクロファージやラットVSMCの場合と異なり、単一もしくは２種類のサイトカインなどで誘導が認められる細胞が発見されなかったことがあげられる。ヒトのマクロファージは、３種類以上のサイトカインで刺激してもhiNOSの誘導を認めることができないとの報告もある（Weinberg, J. B.,et al.,(1995)Blood 86, 1184-1195）。しかし、ヒト肝細胞を３種類以上のサイトカインなどで刺激することでその誘導を確認し、初めてhiNOSのcDNAをクローニングすることに成功したという報告（Geller, D. A.,et al.,(1993)Proc. Natl. Acad. Sci.USA 90, 3491-349519.）の後、hiNOS cDNAのクローニングが多数報告されたが、誘導調節機構は明確になっていない（Sherman,P. A.,et al.,(1993)Biochemistry 32, 11600-11605. Charles, I. G.,et al.,(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11419-11423. Hokari, A.,et al.,(1994)J. Biochem. 116,575-58122.）。また、hiNOS構造遺伝子の全構造（図１）、及び該遺伝子の5’-フランキング領域約0.4-kbの配列が明らかにされた（Chartrain, N. A.,et al.,(1994)J. Biol. Chem. 269, 6765-6772）。

一方、本発明者らは、ラット血管平滑筋からiNOS遺伝子をクローニングすることに成功し、そのcDNAは組織及び種を越えて一種類であることを示唆する報告を行った（Nunokawa, Y.,et al.,(1993)Biochem. Biophys.Res. Commun. 191, 89-94）。更に、ヒトの遺伝子ライブラリーから、iNOS遺伝子のプロモーター領域を含むと推定される遺伝子を3.2-kb以上に渡ってクローニングし、5’-フランキング領域約1.5-kbの配列を明らかにし、該配列中に、miNOS遺伝子の配列と同様に、インターフェロン（IFN）－γや転写因子NF-kBによって遺伝子発現が制御されると推定される転写因子のコンセンサス配列が見いだされることを報告した（Nunokawa, Y.,et al.,(1994)Biochem. Biophys.Res. Commun. 200, 802-807）。

その後、5’-フランキング領域16-kbとレポーター遺伝子を用いた研究の結果、転写開始部位上流3.8-kb～16-kbにhiNOS誘導発現に必要な領域があることが報告された（de Vera, M. E.,et al.,(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1054-1059）。しかし、この報告でも誘導を示す倍率は約10倍程度であり、しかも非刺激時の発現が非常に強いことが示され、iNOSの強力な誘導を説明するには不十分であった。また、hiNOS遺伝子の転写開始部位からその上流約3.7-kbの領域は誘導発現に関与しないことが示された（Laubach, V. E.,et al.,(1994)Abstract Book of the lst International Conference of Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide (UCLA Sunset Village, LosAngeles, CA, USA), A1627. Kleinert, H.,et al.,(1996)Mol. Pharmacol. 49, 15-2128.）。

本発明者らは、クローニングを行なったhiNOS遺伝子の5’-フランキング領域約3.2-kbとレポーター遺伝子を連結したプラスミドを細胞に導入したが、miNOSプロモーター領域を用いて報告されている実験結果とは異なり、他グループのhiNOS遺伝子を用いた結果と同様に、5’-フランキング領域約3.2-kbを用いるだけでは非誘導条件下においてすでにレポーター遺伝子の発現が認められ、サイトカインによる誘導は認められないか、もしくは非常に弱いことを見いだした（Nunokawa, Y.,et al.,(1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 223, 347-352）。しかも種々のサイトカインによってhiNOSの誘導を確認できない細胞を用いても、このような構築を行ったプラスミドを導入するとレポーター遺伝子の発現が認められてしまうことがわかった（Nunokawa, Y.,et al.,(1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 223, 347-352）。すなわち、hiNOS遺伝子においては、miNOS遺伝子での報告結果を基に推察できるプロモーター領域だけでは、サイトカインなどの誘導因子による発現の制御を説明できないことが判明したが、その理由は全く明らかにされていないのが現状である。

発明の開示

本発明は、hiNOS遺伝子における、誘導因子による発現の制御に必要な領域を見いだし、該領域を含む発現ベクターを構築し、該発現ベクターを利用して、hiNOS遺伝子の発現を抑制または誘導する物質をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

前述のように、hiNOS遺伝子の転写開始点上流域、即ちhiNOS遺伝子の5’-フランキング領域をレポーター領域の上流に挿入すると、非誘導条件において本来認められることがないはずのレポーター遺伝子の発現が認められる。そのことから、本発明者らは、hiNOS遺伝子の発現が5’-フランキング領域以外で制御されている可能性があると推定し、実験を進めた。

hiNOS遺伝子3’-非翻訳領域（UTR）の配列（配列番号：１）を調べると、hiNOS遺伝子の3’-UTRにはそのmRNAの不安定化に関与すると報告されている「AUUUA配列」が4ヶ所認められた（図２の下線部）。そこで、本発明者らはhiNOS遺伝子の発現において、遺伝子の転写産物を不安定にする要素が誘導を支配している可能性があると考えた。

現在汎用されているレポーター遺伝子は、成熟mRNAを発現させる目的で、SV40由来のポリA付加を示す領域を加えて構築されているものが多い。従来、hiNOS遺伝子の発現の確認に用いられたプラスミド、及び本発明者らが過去の報告に用いた「pGL3 basicプラスミド」も、SV40由来のポリA付加を示す領域（配列番号：２）をレポーター遺伝子の下流に加えて構築されている（図３）。そのため、テスト遺伝子の誘導が転写の活性化によるものだけでなく、産生されたmRNAの不安定さにも起因する場合には、レポーター遺伝子を含む発現ベクターに、産生されたmRNAの不安定さに寄与する部位を組み込む必要がある。

本発明者らは、本来認められるはずの高い誘導倍率は、プロモーターを含む5’-フランキング領域だけを用いたレポーター遺伝子の構築系を導入したのでは引き出せないと考え、レポーター遺伝子の下流にさらにhiNOS遺伝子の3’-UTRと3’-フランキング領域を含む約1-kbの遺伝子断片を挿入した。その結果、その領域がプロモーター領域と協調して強い発現誘導に関与することを見いだした。即ち、該領域を挿入することで、非誘導条件下でのレポーター遺伝子の発現は消失し、サイトカインを作用させることではじめて活性が認められるようになることを見いだした。このことから、今まで知られていなかったサイトカインによるhiNOSの誘導に必要な遺伝子の領域が明らかにされた。

また、本発明者らは、hiNOS遺伝子のオープンリーディングフレーム領域（ORF）のみをレポーター遺伝子のORFに置き換えた遺伝子、即ち、レポーター遺伝子の上流にhiNOS遺伝子のプロモーター領域を、下流にhiNOS遺伝子の3’-UTRと3’-フランキング領域を含む約1-kbを挿入したプラスミドを作製し、該プラスミドを導入したヒト細胞株を用いて、hiNOS遺伝子の発現を制御する化合物を高感度、迅速にスクリーニングする方法を開発し、本発明を完成した。

具体的には本発明は、本明細書特許請求の範囲に記載された各発明からなる。

本発明に用いられるhiNOS遺伝子の5’-フランキング領域、5’-UTR、3’-UTR及び3’-フランキング領域を構成するＤＮＡには、ヒト細胞から単離されたもののみならず、合成によって製造されたものも含まれる。また、これらのＤＮＡに化学的修飾を加えたものや、これらのＤＮＡの塩基に、置換、欠失、付加等の改変が加えられたＤＮＡも、発現制御機能が維持される限り用いられる。なお、本発明に好適に用いられるhiNOS遺伝子の3’-フランキング領域を構成するＤＮＡとしては、例えば、配列番号：１６（図７の枠外の配列）に記載の塩基配列を有するものがあげられる。

本発明のレポーター遺伝子としては、その発現産物の活性又は生産量（mRNAの生産量も含まれる）を当業者が測定可能なものであれば、いかなるペプチド、タンパク質をコードする遺伝子も用いられる。例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、β-ガラクトシダーゼ（β-Gal）、ルシフェラーゼなどが、酵素活性を測定することで利用できる。また、分泌型成長ホルモンなどは、免疫抗体反応法などでその生産量を測定することで利用できる。

また、本発明において、hiNOS遺伝子の発現制御配列を含むベクターは、該発現制御配列を複製可能なベクター中に挿入することによって得ることができる。該複製可能なベクターとしては、例えば大腸菌内で複製可能なものとして、pUC18、pGEM-3Zなどがあげられる。

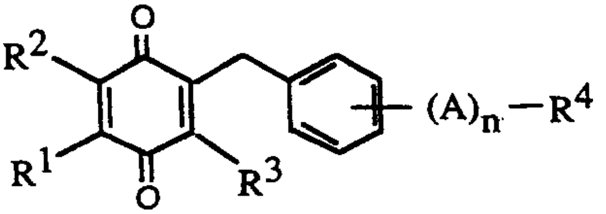
本発明において、hiNOS遺伝子の発現量に影響を与える物質をスクリーニングする際には、本発明のhiNOS遺伝子の発現制御配列を含むベクターで形質転換された細胞、又は天然の細胞であっても本発明で示された発現制御配列を有しhiNOSの発現制御が行われ得る細胞を用いることができる。該細胞としては、哺乳動物細胞が好適に用いられる。形質転換は、通常の方法によって行うことができる。また、本発明に用いられる形質転換細胞としては、ベクターが定常的（パーマネント）に宿主染色体に組み込まれたものの他、ベクターが一時的（トランジエント）に宿主に導入されたものが用いられる。ベクターが定常的に宿主染色体に組み込まれたものの選択は、導入したいベクター内に選択マーカー遺伝子を組み込んだベクター、または、導入したいベクターと同時に選択マーカーを含むベクター、で宿主細胞を形質転換し、該選択マーカーを有しているものだけが生存できる培地で該形質転換された細胞を培養することによって行うことができる。

本発明における、hiNOS遺伝子の発現量に影響を与える物質のスクリーニングは、具体的には、例えば、一定時間培養した形質転換細胞に、被験物質の任意の量を添加し、一定時間後の該細胞が発現するレポーターの量を酵素活性として、または発現タンパク質の量として測定することによって行うことができる。スクリーニングの被験物質は、天然物でも合成物でもよい。また、単一物質でも、混合物でもよい。例えば、候補となる単一物質を独立して試験してもよく、いくつかの候補となる物質を混合したものについて試験をしてもよい。更に、コンビナトリアルライブラリーについて試験することも可能である。また、細胞抽出物のような混合物を分画したものについて試験を行い、分画を重ねて、最終的に、hiNOS遺伝子の発現量に影響を与える物質を単離することも可能である。

更に、本発明における、hiNOS遺伝子の発現量に影響を与える特定の物質の活性を変化させる物質のスクリーニングは、具体的には、例えば、一定時間培養した形質転換細胞に、候補物質の任意の量を添加し、一定時間後の該細胞におけるレポーター遺伝子の発現量の変化を、酵素活性の変化として、または発現タンパク質の量の変化として測定することによって行うことができる。スクリーニングの候補物質については、hiNOS遺伝子の発現量に影響を与える物質のスクリーニングと同様である。

本発明に係るhiNOSの発現を抑制する物質、またはhiNOS遺伝子の発現を誘導する化合物の活性を抑制する化合物の効力については、哺乳動物に係るiNOSを発現しうる細胞又はその生体組織がNOを産生しうる条件下で、当該物質の添加又は投与によって培養液、血液、尿などに放出されるNOの産生量の低下の程度を調べることにより測定することができる。NOの生成量の測定自体は、実施例５の５）に記載されているグリース法（Green, L. C.,et al.,a(1982) Anal. Biochem. 126, 131-138）に代表される公知の方法により行うことができる。

上記のような、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物は、hiNOS遺伝子の発現量に影響を与える化合物、例えば、hiNOS遺伝子の発現を抑制する化合物、またはhiNOS遺伝子の発現量に影響を与える特定の化合物の活性を変化させる化合物、例えば、hiNOS遺伝子の発現を誘導する化合物の活性を抑制する化合物である。hiNOS遺伝子の発現を誘導する化合物の活性を抑制する化合物の具体例としては、以下の一般構造式で表される化合物が挙げられ、



［式中Ｒ^{1}、Ｒ^{2}およびＲ^{3}はそれぞれ独立に水素原子、メチル基又はメトキシ基を表し、Ａはエチレン基又はビニレン基を表し、ｎは０又は１を表し、Ｒ^{4}は水素原子、ヒドロキシメチル基、エステル化又はアミド化されていてもよいカルボキシシル基を表す。］

また、より具体的な例としては、本明細書の実施例7において得られた、図17に示す化学構造式で表される化合物（3-［4-（3,4-ジメトキシ-6-メチル-2,5-ベンゾキノニルメチル）フェニル］-1-チオモルホリノ-1-オキソプロパン）をはじめ、3-［3-（2,5-ベンゾキノニルメチル）フェニル］アクリル酸エチルエステル、3-（2,5-ベンゾキノニルメチル）ベンジルアルコール、3-（2,5-ベンゾキノニルメチル）安息香酸、3-［3-（2,5-ベンゾキノニルメチル）フェニル］プロピオン酸、3-［3-（2,5-ベンゾキノニルメチル）フェニル］プロピルアルコール、3-［3-（2,5-ベンゾキノニルメチル）フェニル］アクリル酸、3-［4-（3,4-ジメトキシ-6-メチル-2,5-ベンゾキノニルメチル）フェニル］プロピオン酸、2,3-ジメトキシ-5-ベンジル-6-メチル-1,4-ベンゾキノン、3-［4-（3,4-ジメトキシ-6-メチル-2,5-ベンゾキノニルメチル）フェニル］プロパノール、及び3-［3-（3,4-ジメトキシ-6-メチル-2,5-ベンゾキノニルメチル）フェニル］プロピオン酸エチルエステル等が挙げられる。

本発明に係る化合物は、直接的または間接的にhiNOS遺伝子の発現を抑制することができるため、hiNOSの発現の異常に関わる病理学的状況または疾患、好ましくはhiNOS遺伝子の発現過剰を伴う病理学的状況または疾患を治療するための医薬組成物として有用である。例えば、心臓及び脳血管障害、虚血性心疾患、敗血症ショック、疼痛、リウマチ、関節炎、喘息、免疫不全、ウイルス性もしくは非ウイルス性の感染症、自己免疫疾患、痴呆、および癌（Cattell, V. and Jensen, A., Histochem. J., Vol.27, p777-784, 1995; Ogden, J. E., and Moore, P. K., TIBTECH Vol.13, p70-78, 1995）などに対する治療薬として有用である。

本発明の化合物を医薬組成物として使用する場合、例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などの剤形で経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物と、生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、安定剤、などとを、一般に認められた形態で混和することによって製造することができる。錠剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチンのような結合剤、コーンスターチのような膨化剤、結晶性セルロースのような賦形剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤などを用いることができる。カプセルの剤形である場合には、前記の組成物にさらに液状担

体を含有することができる。注射のための無菌組成物も、通常の処方を適用することができる。

注射用の水性液としてはブドウ糖などを含む等張液などがあげられ、ポリエチレングリコールのような適当な溶解補助剤などと併用してもよい。また、緩衝剤、安定剤、保存剤、酸化防止剤、無痛化剤、などと配合してもよい。このようにして得られる製剤は、例えばヒトをはじめとする哺乳動物に対して投与することができる。投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人においては、一日につき約0.01～100mg、好ましくは約0.1～50mg、より好ましくは約1.0～25mgである。非経口的に投与する場合は、たとえば注射剤の形では通常成人においては、一日につき約0.001～50mg程度、好ましくは約0.01～25mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好ましい。

【図面の簡単な説明】

図１は、hiNOS構造遺伝子の全構造を示す図である。

図２は、hiNOS遺伝子第２６エキソンに存在する、3’-非翻訳領域（UTR）の塩基配列を示す図である。左端の数字は翻訳領域開始の塩基を１としたときの番号を表す。ATTTA配列は下線を施し、想定されるポリA付加部位は↑で示した。太字はhiNOS翻訳領域における翻訳停止配列を示す。また、用いたプライマーの基となる塩基配列を記号と共に矢印で示した。

図３は、pGL3 basicプラスミドの構造と、SV40由来のポリA付加を示す領域の塩基配列を示す図である。ポリA付加に関与する「PolyAシグナル」と「G/Tクラスター」には下線を施した。

図４は、プラスミドの構築に用いたプライマーの塩基配列を示す図である。

図５は、hiNOS遺伝子の5’-フランキング領域のDNAを含む精製ファージゲノムの制限酵素分解断片（EcoRI、HindIII、XhoIで消化）のサザンブロットを示す写真である。

図６は、hiNOS遺伝子の5’-フランキング領域のDNAにNcoI認識部位を導入するために用いた塩基配列置換を示す図である。太字で示した塩基TをCAに置換し、変異体プラスミドを構築した。

図７は、hiNOS遺伝子の3’-非翻訳領域（UTR）と5’-フランキング領域の塩基配列を示す図である。左端の数字は翻訳領域開始の塩基を１としたときの番号を表す。枠内はエキソン26の3’-UTRを示す。3’-フランキング領域内のポリA付加のためのコンセンサス配列（YGTGTTYY）を下線で示した。太字はhiNOS翻訳領域における翻訳停止配列を示す。また、用いたプライマーの基となる塩基配列を記号と共に矢印で示した。

図８は、hiNOS遺伝子の非構造領域を含む発現ベクターの構造を示す図である。

図９は、発現ベクターが一過性導入されたA549細胞のサイトカイン刺激に対する反応を示す図である。

図１０は、A549細胞をサイトカイン刺激したときの核抽出物のゲルシフトアッセイを示す写真である。

図１１は、hiNOSLucが安定に導入されたA549細胞のサイトカイン刺激に対する反応を示す図である。

図１２は、グリース発色法による、A549細胞のサイトカイン刺激に対する反応を示す図である。

図１３は、LPS、IL-6、cAMP、TPAの、hiNOSLucが安定に導入されたA549細胞のサイトカイン刺激に対する反応に与える影響を示す図である。

図１４は、蛋白質燐酸化酵素阻害剤スタウロスポリンの、サイトカインによるhiNOS遺伝子の発現誘導に与える影響を示す図である。

図１５は、デキサメサゾンの、サイトカインによるhiNOS遺伝子の発現誘導に与える影響を示す図である。

図１６は、蛋白質分解酵素阻害剤TLCKの、サイトカインによるhiNOS遺伝子の発現誘導に与える影響を示す図である。

図１７は、本発明のスクリーニング系を用いて見いだされた化合物Iの構造式を示す図で

ある。
図１８は、化合物Iが、本発明のスクリーニング系に与える影響を示す図である。
図１９は、化合物Iが、hiNOSの発現をmRNAレベルで抑制していることを示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明の内容は、以下の実施例に制限されるものではない。

［実施例１］発現ベクターの構築

１）hiNOS 5’-フランキング領域のクローニング

2.5x10^{6}個からなるヒトゲノムライブラリー（クロンテック社、アメリカ、EMBL3ベクターに組み込まれたファージライブラリー）から、プラークハイブリダイゼーションによって、hiNOS 5’-フランキング領域DNAを含むクローンのスクリーニングを行うためのプローブを作製した。
プローブは、本発明者らが既に単離したラット由来iNOS cDNA(VSM-NOS)（Nunokawa, Y.,et al.,(1993)Biochem. Biophys.Res. Commun. 191, 89-94）を鋳型にし、SU802プライマー（ラットVSM-NOS cDNAの-138番～-117番に相当／配列番号：３、図４）およびMI103プライマー（同168番～188番に相当／配列番号：４、図４）を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅したcDNAを用いた。PCRは、Taqポリメラーゼ（宝酒造社）とその添付緩衝液を用いて行なった。このcDNAは、hiNOS構造遺伝子の5’末端の塩基配列と相同性が高いことが明らかである。プラークハイブリダイゼーションは、ECLダイレクトDNAラベリング検出システム（アマシャム社、英国）を用いて添付の実験手順書に従って行なった。
陽性プラークをキアゲンラムダキット（キアゲン社、ドイツ）を用いて精製した後、EcoRIで消化し、このプローブを用いたサザンブロット解析によって約5-kbのDNAがハイブリダイズすることを確認した（図５）。
EcoRIで消化された約5-kbのDNAをpUC118プラスミド（宝酒造社）のEcoRI部位にサブクローニングした後、NcoI認識部位作製のため、図６（配列番号：１３）で示したように塩基配列を置換した変異体プラスミドを作製した。作製はクロンテック社のサイトダイレクテッド・ミュータジェネシスキットを用いて添付の実験手順書に従った。作成後、KpnIおよびNcoIで消化しそのDNA断片を下記３）の実験で用いた。

２）hiNOS 3’-UTR及び該領域を含む下流約1-kbの遺伝子断片のクローニング

１）で用いたヒトゲノムライブラリーを60のサブプール（１プールあたり約４万クローン）に分け、hiNOS cDNA 3’-UTR（図１のエキソン26の3’側、図７の枠内）の配列を基に２種のフォワード（SA101／配列番号：５、SA102／配列番号：７）およびリバースプライマー（KI101／配列番号：６、KI102／配列番号：８）を作成し（図４）、PCRによって3’-UTRを含むプールを同定した。さらにその陽性プールを30のサブプールに分け、同様のPCRをおこなって陽性クローンが含まれるプールを同定した。この時点で、プールの中には計算上約1000以上のクローンが含まれていると思われたが、同定したサブプールの全クローンを含むファージを培養し、キアゲンラムダキット（キアゲン社）を用いてファージDNAを精製した後、SA101とKI101を用いるPCRによってDNAの増幅が認められたことから、hiNOSの3’-UTRが含まれていることを確認した。PCRの確認は、１）と同じ方法で行なった。
次に、精製DNAを鋳型にしてフォワードプライマー（SA101）とファージベクター上のEMBL3右アームSP6プロモーター部分の塩基配列を基に作成したリバースプライマー（KI103／配列番号；９、図４）を用いてPCRによって3’-UTRを含むその下流部分のDNAを増幅した。増幅されたDNAの塩基配列をダイデオキシターミネーターキット（アプライドバイオシステムズ社、アメリカ）を用いて、アプライドバイオシステムズ社A373蛍光シークエンサーによる直接塩基配列決定法によって決定した。結果を、配列番号：１４および図７に示す。
増幅されたDNAは、hiNOS 3’-UTRを含む領域であることが確認されたので、その情報を基にポリA付加部位を決定し、3’-UTRの末端を含むリバースプライマーを作製した（KI104／配列番号：１１、図４）。また、3’-フランキング領域の塩基配列を基にKI105リバー

スプライマー（配列番号：１２）を作製した（図４、図７）。精製DNAを鋳型にしてSA103（配列番号：１０）とKI104を用いたPCRによって、３’-UTR約0.5-kbのDNAを増幅した。SA103は5’末端にNheI認識部位を、KI104は5’末端にSalI認識部位を導入してあるので、SalIおよびNheIで消化しそのDNA断片（３’-UTR）を下記３）の実験で用いた。
精製DNAを鋳型にしてSA103とKI105とを用いたPCRによって、３’-UTRおよび3’-フランキング領域を含む約1-kbのDNAを増幅した。SA103は、５’末端にNheI認識部位を、KI105は5’末端にBamHI認識部位を導入してあるので、BamHIおよびNheIで消化しそのDNA断片（３’-UTR及び3’-フランキング領域を含む）を下記３）の実験で用いた。

３）hiNOS遺伝子の非構造領域を含む発現ベクターの構築

（3-A）5’-フランキング領域及び5’-UTRをpGL3 basicプラスミドのルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入したプラスミド（pGLNOS5+SV3）の構築
pGL3 basicプラスミド（プロメガ社、アメリカ）を制限酵素KpnIおよびNcoIで消化し、前記１）で作製したDNA断片を挿入した（図８A）。
（3-B）pGL3 basicプラスミドに含まれるルシフェラーゼ遺伝子の終止コドン直下からSV40由来ポリA付加シグナルの領域までを除去し、その代わりhiNOS遺伝子の3’-UTRと3’-フランキング領域を含む約1-kbの断片をpGL3 basic中のルシフェラーゼ遺伝子の直下に挿入したプラスミド（pGLNOS3A）の構築
pGL3 basicプラスミドをBamHI及びXbaIで消化し、２）で作製したDNA断片（3’-フランキング領域）を挿入した（図８B）。
（3-C）pGL3 basicルシフェラーゼ遺伝子の上流にhiNOS遺伝子の5’-フランキング領域及び5’-UTRを、ルシフェラーゼ遺伝子の終止コドン直下からSV40由来ポリA付加シグナルの領域までを除去し、その代わりにhiNOS遺伝子の3’-UTR及び3’-フランキング領域を含む約1-kbの断片を挿入したプラスミド（pGLNOS53A）の構築
pGL3 basicプラスミドをBamHIおよびXbaIで消化し、前記２）で作製したDNA断片（3’-UTR及び3’-フランキング領域を含む）を挿入した。該プラスミドを制限酵素KpnIおよびNarIで消化し、前記１）で作製したDNA断片を挿入した（図８C）。
（3-D）（3-A）のpGLNOS5+SV3プラスミドに含まれるルシフェラーゼ遺伝子の終止コドン直下からSV40由来ポリA付加シグナルの領域までを除き、その代わりにhiNOS遺伝子の3’-UTRをルシフェラーゼ遺伝子の下流に挿入したプラスミド（pGLNOS53-SV3）の構築
pGL3 basicプラスミドを制限酵素XbaI及びSalIで消化し、DNA断片（3’-UTR）を挿入した後、XpnIおよびNarIで消化した。そのプラスミドにpGLNOS5+SV3をKpnI及びNarIで消化したDNA断片を挿入した（図８D）。
（3-E）hiNOS遺伝子の3’-UTRを（3-A）のpGLNOS5+SV3プラスミドのルシフェラーゼ遺伝子の直下に挿入したプラスミド（pGLNOS53+SV3）の構築
（3-Dの）pGLNOS53-SV3プラスミドを制限酵素SalIで消化し、DNA平滑末端キット（宝酒造）を用いて平滑末端にした後、NarIで消化した。そのプラスミドにpGLNOS5+SV3プラスミドをXhaIで消化し、DNA断片をDNA平滑末端キットを用いて平滑末端にした後、NarIで消化したDNAを挿入した（図８E）。
［実施例２］発現ベクターが一過性導入されたA549細胞のサイトカイン刺激に対する反応
サイトカイン刺激によってhiNOSを発現することが知られているヒト肺癌由来株細胞A549をATCCから入手し（カタログ番号「CCL185」）、5% CO_2インキュベーター内でGIT培地（和光純薬）で培養した。図８に示された発現ベクターをそれぞれA549細胞にリポフェクトアミン（ライフテックオリエンタル社、アメリカ）を用いて一過性に導入し、ヒトIL-1β（1ng/ml）またはヒトIL-1β（1ng/ml）+ヒトIFN-γ（1000U/ml）+ヒトTNF-α（500ng/ml）（この混合物を以下「CM」と称することがある）を添加した６時間後の反応を調べた（図９）。ルシフェラーゼ活性測定は、ルシフェラーゼアッセイシステム（プロメガ社）のプロトコールに従って行った。検出には、アルガス-50-ルミノメーター（浜松ホトニクス社）を用いた。ヒトIL-1βは、ジェンザイム社（アメリカ）より購入した。ヒトIFN-γおよびヒトTNF-αは、サントリー生物医学研究所で通常の方法により製造したものを使用した。この実験の場合、アッセイの標準化を行なうため、対照ベクターとしてβ-gal発現べ

クター（pSV-β-gal、プロメガ社）を同時に導入し、結果を補正した。
pGLNOS5+SV3を導入した場合、非刺激時の高い発現が認められ、サイトカインによる強い誘導は認められなかった。またpGLNOS53+SV3を導入した場合も、pGLNOS5+SV3を導入した場合と同様であった。更にpGLNOS53-SV3プラスミドを用いた場合、非刺激時の発現だけでなくサイトカインによる刺激によっても発現の誘導はみられなかった。一方、pGLNOS53A（hiNOS遺伝子の3’-UTR及び3’-フランキング領域を含むプラスミド）を用いた場合、非刺激時にはルシフェラーゼの発現が殆ど認められず、IL-1βの添加ではじめて高い発現を認められるようになり、さらに３種のサイトカインの添加によって非常に強い発現を示すようになった。すなわち、hiNOS遺伝子は、3’-UTR及び3’-フランキング領域の両者が存在して、発現制御が行なわれることが判明した。
［実施例３］　hiNOS発現誘導に関与すると考えられる遺伝子配列
ゲルシフト法によって、hiNOS遺伝子の転写開始点の上流131塩基～97塩基（-131～-97）に相当する２本鎖ＤＮＡ（5’-AACTGTACACAAGCTGGGGACACTCCCTTTGGAAA-3’／配列番号：１５）に対する蛋白質の結合を、サイトカイン刺激によって認めることができる。本DNA配列には、NF-κBが結合することが予想されるコンセンサス配列が含まれている。ゲルシフト法は、前記２本鎖ＤＮＡをディゴキシゲニン（DIG）化し（ゲルシフトアッセイキットを使用、ベーリンガーマンハイム社、ドイツ）、A549細胞から抽出した核画分とインキュベートし、7.5%ポリアクリルアミドゲル（バイオラッド社、アメリカ）を用いて４℃で電気泳動することによって行なった。また、細胞の核画分は、IL-1β（1ng/ml）またはCMで４時間刺激した細胞、および無刺激の細胞をシュライバーらの方法（Schreiber, E., et al.,(1989)Nucleic Acids Res. 17, 641930）で抽出した。電気泳動の終わったゲル中のDNAを電気転写法（アトー社の装置を使用）を用いてゼータープローブナイロン膜（バイオラッド社）に移し替え、化学発光するDIG認識抗体でDIG化されたDNAを検出した。
図10にその結果を示した。本配列には、非刺激時においても、A549核画分中に存在する蛋白質(A)が結合するが（図１０のバンドＡに対応）、IL-1βやCM刺激によって、A549核画分中に存在する別の結合蛋白質(B)が結合するようになることが判明した（図１０のバンドＢに対応）。このことから、本発明に用いるhiNOS遺伝子の5’-フランキング領域にもｍiNOSと同様に、サイトカインなどの刺激によってNF-κBが結合する領域があることが明らかになった。
［実施例４］発現ベクターが安定導入されたA549細胞（A549/hiNOSLuc）の作製とサイトカイン刺激に対する反応
A549細胞にリポフェクトアミン（ライフテックオリエンタル社、アメリカ）を用いて、pGLNOS53AとpSV2neo（クロンテック社）を同時にトランスフェクションし、G418硫酸塩（1mg/ml、ライフテックオリエンタル社）を培地に添加することでpGLNOS53Aが安定導入された細胞（A549/hiNOSLuc）を選択した。
G418耐性となった複数個の細胞株より任意に6クローンを選び出し、IL-1β（1ng/ml）およびCMを添加し、24時間後の反応を無刺激の場合と比較した。その結果、６クローンの全てが、サイトカイン刺激の場合のみルシフェラーゼの発現を認められる結果となった。このことから、発現の誘導には、導入されるプラスミドの構造が重要であり、遺伝子の導入された染色体上の位置は影響を与えないことが判明した。
［実施例５］A549/hiNOSLucのサイトカイン刺激に対する反応と、hiNOS発現のパターンとの比較
実施例４で取得したG418耐性細胞から１クローン（A5）を選択し、以下に列挙する種々の物質によるルシフェラーゼ発現の誘導を調べた。（A5を選択した根拠は存在しない。）実験は、96穴プレートに１ウェル当たり約１万個／100μlとなるようにA5細胞を播き、24時間培養した後、以下の物質を添加し、6時間または24時間後の細胞内のルシフェラーゼ活性を、ルシフェラーゼアッセイシステム（プロメガ社）のプロトコールに従って測定した。検出には、アルガス-50-ルミノメーター（浜松ホトニクス社）を用いた。
１）IL-1β
IL-1β（1ng/ml）の刺激によって、少なくとも６時間以内にルシフェラーゼの発現が認め

られた。しかし、同用量のIL-1β単独では24時間後でも６時間作用させた場合と発現量に変化はなかった（図11）。

２）IF-γ

IFN-γ（1000U/ml）の刺激では発現誘導は認められなかった（図11）。

３）TNF-α

TNF-α（500ng/ml）の刺激では発現誘導は認められなかった（図11）。

４）サイトカインの組み合わせ

１）～３）で実施した３種類のサイトカインを同時添加（CM）すると、６時間以内では発現誘導は弱いが、24時間後では非常に強い発現を認めることができる（図11）。そのレベルはバックグラウンド値（約100～200カウント）の約500倍以上の発現をしているものと考えられ、CMによってhiNOSが強力に誘導される報告と合致する。その他、IL-1β（1ng/ml）+IFN-γ（1000U/ml）の添加によっても強い発現誘導が認められ、両者の共存下で24時間培養すると、IL-1β（1ng/ml）の刺激よりも著しい発現誘導が認められた（図11）。また、IL-1β非存在下であってもIFN-γとTNF-αの刺激によって24時間後に誘導が認められた。

５）グリース発色法を用いた場合との比較

細胞が実際に、NOを産生していることを間接的に知る方法として、ジアゾ化反応を利用したグリース法が知られている（Green, L. C.,et al.,a(1982)Anal. Biochem. 126, 131-138）。グリース法は、ナフチルエチレンジアミン（関東化学、東京）とスルファニル酸（ナカライテスク）を混合したグリース試薬と培養液中のNO_2^-イオンを反応させてその発色をマルチタイタープレートリーダー（モレキュラーデバイス社）による540nmの吸収で測定する。この方法によって、サイトカイン刺激48時間後のA549細胞培養液中に蓄積されたNO量を測定した結果、IL-1β（1ng/ml）やCMでNOの産生が認められた（図12）。

これらの結果は、１）～４）のルシフェラーゼの発現によるアッセイ結果と整合性があり、ルシフェラーゼの発現を検出することによって、簡便にhiNOS由来のNO産生量を算定することが可能であることが確認された。（ルシフェラーゼの発現による方法の感度は、グリース法よりも100倍以上敏感であった。）

［実施例６］iNOSの発現に影響を及ぼすと考えられる化合物の、本発明のアッセイ系に対する影響

１）LPS（lipopolysaccharide;リポ多糖）、IL-6、cAMP、TPA（tetradecanoylphobol acetate；ホルボールエステル）、および蛋白質燐酸化酵素阻害剤の影響

LPS（シグマ社、アメリカ）、IL-6（ジェンザイム社）、cAMP（ジブチリル体を使用、シグマ社）及びTPA（ナカライテスク社）は、マウスおよびラットの細胞を用いた系において、iNOSを誘導することが報告されている。これらの化合物の存在下で、実施例５と同様なルシフェラーゼの発現量の測定を行った。その結果、これらの物質は、コントロールレベルのみならず、サイトカインによる活性化に対してもほとんど影響を与えなかった（図１３）。このことから、実施例５記載のアッセイ系はこれら物質による影響を受けにくいことがわかった。なお、蛋白質燐酸化酵素阻害剤スタウロスポリン（和光純薬社）は、１μM以下の濃度で、IL-1β（1ng/ml）およびCM刺激による発現の活性化を抑制することが判明した（図14）。

２）糖質ステロイドの影響

デキサメサゾン（Dex）（和光純薬）は強力な抗炎症作用を有しており、その作用メカニズムの一つは、転写因子NF-kBの活性化の抑制であることが知られている（Ray, A., and Prefontaine, K. E. (1994)Proc. NatI. Acad. Sci. USA 91,752-756）。また、iNOSの発現も抑制することが報告されている（Radomski, M.W.,et al.,(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 10043-10047）。デキサメサゾン存在下で、実施例５と同様なルシフェラーゼの発現量の測定を行ったところ、10μM以下の濃度で、IL-1β（1ng/ml）またはCMによる発現の誘導が抑制された（図15）。また、その抑制効果はサイトカイン刺激１時間後に添加した場合に消失した。

３）蛋白質分解酵素阻害剤の影響

蛋白質分解酵素はI-kB（NF-kBの活性化を細胞質内で抑制しているタンパク質／Verma,I.M.et al.,(1995)Genes & Dev.,9,2723-2735を参照）の分解を介して、NF-kBの活性化に関与すると考えられている。蛋白質分解酵素阻害剤の一つであるTLCX（ナカライテスク）はNF-kBの活性化を阻害すると共に、iNOSの誘導を阻害することが知られている（Griscavage, J. M.,et al.,(1995)Biochem. Biophys. Res. Commun. 215, 721-729）。TLCK存在下において、実施例５と同様なルシフェラーゼの発現量の測定を行ったところ、TLCKは、IL-1β（1ng/ml）またはCMによる発現の誘導を約10μMで抑制することが示された（図16）。

これらの実験結果からも、hiNOSの発現制御に関与する化合物を、実施例５に記載されたような系を用いて見出すことができることが示された。

［実施例７］　hiNOS遺伝子の発現に影響を与える化合物のスクリーニング

実施例５と同様に、96穴プレートに１ウェル当たり約１万個／100μlとなるようにA5細胞を入れ、24時間培養した。その後、hiNOS遺伝子の発現に影響を与えるか否か未知である特定の化合物または複数の特定の化合物の混合物を添加し、更に１時間培養した。その後、IL-1bおよびTNF-aを添加し、実施例６と同様な方法で、IL-1bおよびTNF-a添加24時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。多数の化合物または化合物の混合物をスクリーニングした結果、図17に示す化合物Iが濃度依存的にルシフェラーゼ活性を抑制することが明らかとなった（図18）。

また、更に、このスクリーニングによって、hiNOS遺伝子の発現を抑制する作用が確認された化合物I（20μg/ml）が、野生型のA549細胞をCMで刺激した場合のhiNOS mRNAの発現を抑制していることを確かめた（図19）。一方同濃度の化合物Iは、野生型のA549細胞において構成的に発現しているβ-アクチンのmRNAの発現には影響を与えなかった（図19）。

なお、hiNOS遺伝子の発現を誘導する化合物のスクリーニングは、本実施例７と同様の方法、例えば、A5細胞に被験化合物を添加し、ルシフェラーゼ活性が上昇する化合物を選択するなどの方法により行うことができる。

このように、本発明のスクリーニング系を用いて、hiNOS遺伝子の発現に影響を与える化合物を見いだすことが可能であることが示された。

産業上の利用の可能性

本発明によって、ヒト誘導型一酸化窒素（NO）合成酵素（hiNOS）の発現を制御する化合物を、簡便かつ高感度にスクリーニングする方法が提供された。本発明の方法によって、hiNOSの発現を抑制することで炎症や敗血症治療に有用であると考えられる化合物を、またその発現を誘導することで抗腫瘍、抗ウイルス、血管再狭窄阻害治療に有用であると考えられる化合物を簡便、高感度にスクリーニングすることができるようになった。

配列表

配列番号：1
配列の長さ：604
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Genomic DNA
配列

AGCCAGAAGC GCTATCACGA AGATATCTTC GGTGCTGTAT TTCCTTACGA GGCGAAGAAG 60

GACAGGGTGG CGGTGCAGCC CAGCAGCCTG GAGATGTCAG CGCTCTGAGG GCCTACAGGA 120

GGGGTTAAAG CTGCCGGCAC AGAACTTAAG GATGGAGCCA GCTCTGCATT ATCTGAGGTC 180

ACAGGGCCTG GGGAGATGGA GGAAAGTGAT ATCCCCCAGC CTCAAGTCTT ATTTCCTCAA 240

CGTTGCTCCC CATCAAGCCC TTTACTTGAC CTCCTAACAA GTAGCACCCT GGATTGATCG 300

GAGCCTCCTC TCTCAAACTG GGGCCTCCCT GGTCCCTTGG AGACAAAATC TTAAATGCCA 360

GGCCTGGCGA GTGGGTGAAA GATGGAACTT GCTGCTGAGT GCACCACTTC AAGTGACCAC 420

CAGGAGGTGC TATCGCACCA CTGTGTATTT AACTGCCTTG TGTACAGTTA TTTATGCCTC 480

TGTATTTAAA AAACTAACAC CCAGTCTGTT CCCCATGGCC ACTTGGGTCT TCCCTGTATG 540

ATTCCTTGAT GGAGATATTT ACATGAATTG CATTTTACTT TAATCACAAA AAAAAAAAAA 600

AAAA 604

配列番号：2
配列の長さ：296
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Genomic DNA
配列

CTAGAGTCGG GGCGGCCGGC CGCTTCGAGC AGACATGATA AGATACATTG ATGAGTTTGG 60

ACAAACCACA ACTAGAATGC AGTGAAAAAA ATGCTTTATT TGTGAAATTT GTGATGCTAT 120

TGCTTTATTT GTAACCATTA TAAGCTGCAA TAAACAAGTT AACAACAACA ATTGCATTCA 180

TTTTATGTTT CAGGTTCAGG GGGAGGTGTG GGAGGTTTTT TAAAGCAAGT AAAACCTCTA 240

CAAATGTGGT AAAATCGATA AGGATCCGTC GACCGATGCC CTTGAGAGCC TTCAAC 296

配列番号：3
配列の長さ：22
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
配列

CTTCTCAGCC ACCTTGGTGA GG 22

配列番号：4
配列の長さ：21
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
配列

TTCTGTGCAG TCCCAGTGAG G 21

配列番号：5

配列の長さ：19
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
配列
AGCCAGAAGC GCTATCACG 19
配列番号：6
配列の長さ：27
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
配列
TGTGATTAAA GTAAAATGCA ATTCATG 27
配列番号：7
配列の長さ：22
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
配列
GCCTGGAGAT GTCAGCGCTC TG 22
配列番号：8
配列の長さ：21
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
配列
GGGGAACAGA CTGGGTGTTA G 21
配列番号：9
配列の長さ：19
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
配列
CATTTAGGTG ACACTATAG 19
配列番号：10
配列の長さ：29
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
配列
GGCGCTAGCC TACAGGAGGG GTTAAAGCT 29
配列番号：11
配列の長さ：39
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
配列
GCGGCCGCGT CGACGATTAA AGTAAAATGC AATTCATGT 39
配列番号：12
配列の長さ：26
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
配列
GCGCGGATCC GGCCCACTCT CCTAAG 26
配列番号：13
配列の長さ：27
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
配列
ATGGCCTGTC CCATGGAAAT TTCTGTT 27
配列番号：14
配列の長さ：1026
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Genomic DNA
配列

TGAGGGCCTA CAGGAGGGGT TAAAGCTGCC GGCACAGAAC TTAAGGATGG AGCCAGCTCT 60

GCATTATCTG AGGTCACAGG GCCTGGGGAG ATGGAGGAAA GTGATATCCC CCAGCCTCAA 120

GTCTTATTTC CTCAACGTTG CTCCCCATCA AGCCCTTTAC TTGACCTCCT AACAAGTAGC 180

ACCCTGGATT GATCGGAGCC TCCTCTCTCA AACTGGGGCC TCCCTGGTCC CTTGGAGACA 240

AAATCTTAAA TGCCAGGCCT GGCGAGTGGG TGAAAGATGG AACTTGCTGC TGAGTGCACC 300

ACTTCAAGTG ACCACCAGGA GGTGCTATCG CACCACTGTG TATTTAACTG CCTTGTGTAC 360

AGTTATTTAT GCCTCTGTAT TTAAAAAACT AACACCCAGT CTGTTCCCCA TGGCCACTTG 420

GGTCTTCCCT GTATGATTCC TTGATGGAGA TATTTACATG AATTGCATTT TACTTTAATC 480

ACACTGTATG CGTGTGTGGG TGTTTTGTAG GGAAAGCTCT TCTCAGAGTG GGGAGCTGGT 540

GGGTGTCACA GCCTGGACAG ATCCCCGACA GAGGGACACC CCAGCCAGTC CATGGCTCCT 600

CTGAAATGGC TGCCAGGTGT GCCAGCAGCA GATGGAGCTT CGTGCTGGTC CAAAGACCTG 660

TGGTAGGGCA GGGGGCGCAG GCCTGCCTCC CACACAAAGT ATCTGAAACG GGGTCTGGTG 720

AGGGTGGGAT TGTCGCATAA GGCCAGTGTT TCGAGGAAGG CCTTGAGCTT CTTCTTGGAC 780

ACTGTCTTAG AAAGCGTTTT GCTCTGGGGC CACCAGTCTC ATGCGAGACT GTGTGCCTTG 840

GCCAGTACGG ATGTGGTCCC TGGGAAGGCA GCGTGTCGAG GCGAGTGTGG GCCACAACAT 900

CCTCGCCTGA GGGACTGGGG ACCCTCTTGG GTTTGGAGCA GGCCAAGGAA TCCTTCTTAG 960

GAGAGTGGGC CCCGTTTCCT TCTCCTGGTC AGAACCCAAA AAGGAGCTCA GCGGCGGCCA 1020

CTGGGG 1026

配列番号：15

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

AACTGTACAC AAGCTGGGGA CACTCCCTTT GGAAA 25

配列番号：16

配列の長さ：544

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

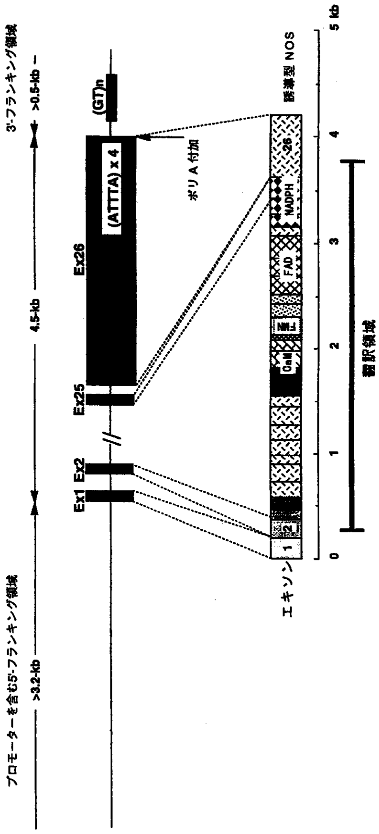
トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

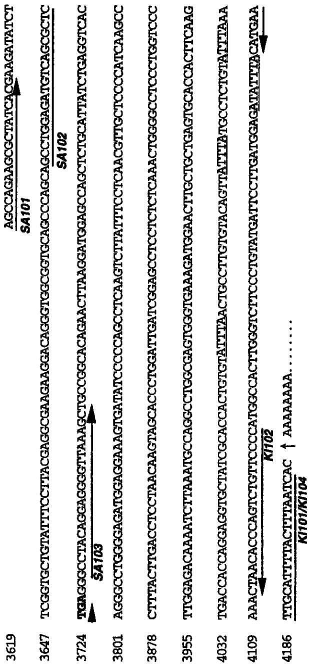
配列

```
ACTGTATGCG TGTGTGGGTG TTTTGTAGGG AAAGCTCTTC TCAGAGTGGG GAGCTGGTGG    60
GTGTCACAGC CTGGACAGAT CCCCGACAGA GGGACACCCC AGCCAGTCCA TGGCTCCTCT   120
GAAATGGCTG CCAGGTGTGC CAGCAGCAGA TGGAGCTTCG TGCTGGTCCA AAGACCTGTG   180
GTAGGGCAGG GGGCGCAGGC CTGCCTCCCA CACAAAGTAT CTGAAACGGG GTCTGGTGAG   240
GGTGGGATTG TCGCATAAGG CCAGTGTTTC GAGGAAGGCC TTGAGCTTCT TCTTGGACAC   300
TGTCTTAGAA AGCGTTTTGC TCTGGGGCCA CCAGTCTCAT GCGAGACTGT GTGCCTTGGC   360
CAGTACGGAT GTGGTCCCTG GGAAGGCAGC GTGTCGAGGC GAGTGTGGGC CACAACATCC   420
TCGCCTGAGG GACTGGGGAC CCTCTTGGGT TTGGAGCAGG CCAAGGAATC CTTCTTAGGA   480
GAGTGGGCCC CGTTTCCTTC TCCTGGTCAG AACCCAAAAA GGAGCTCAGC GGCGGCCACT   540
GGGG                                                                544
```

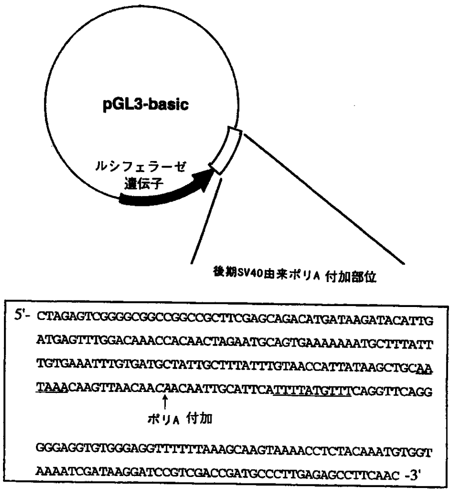
【図１】



【図２】



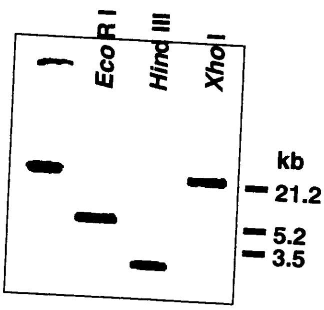
【図３】



【図４】

SU802 5'-CTTCTCAGCCACCTTGGTGAGG-3'
MI103 5'-TTCTGTGCAGTCCCAGTGAGG-3'
SA101 5'-AGCCAGAAGCGCTATCACG-3'
KI101 5'-TGTGATTAAAGTAAAATGCAATTCATG-3'
SA102 5'-GCCTGGAGATGTCAGCGCTCTG-3'
KI102 5'-GGGGAACAGACTGGGTGTTAG-3'
KI103 5'-CATTTAGGTGACACTATAG-3'
SA103 5'-GGCGCTAGCCTACAGGAGGGGTTAAAGCT-3'
KI104 5'-GCGGCCGCGTCGACGATTAAAGTAAAATGCAATTCATGT-3'
KI105 5'-GCGCGGATCCGGCCCACTCTCCTAAG-3'

【図５】

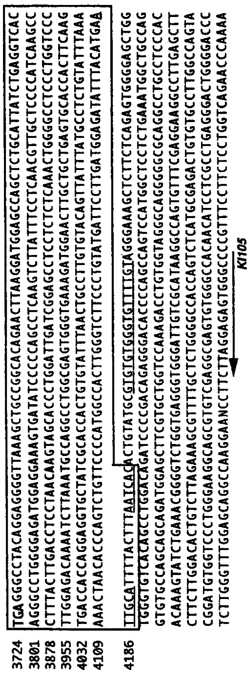


【図６】

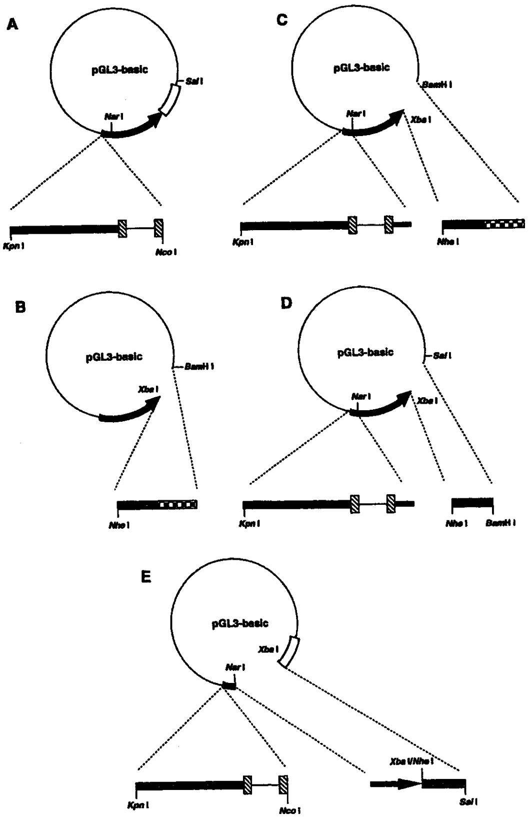
野生型の hiNOS cDNA 配列 5'-ATGGCCTGTCCTTGGAAATTTCTGTT-3'

変異体配列 5'-ATGGCCTGTCCCATGGAAATTTCTGTT-3'

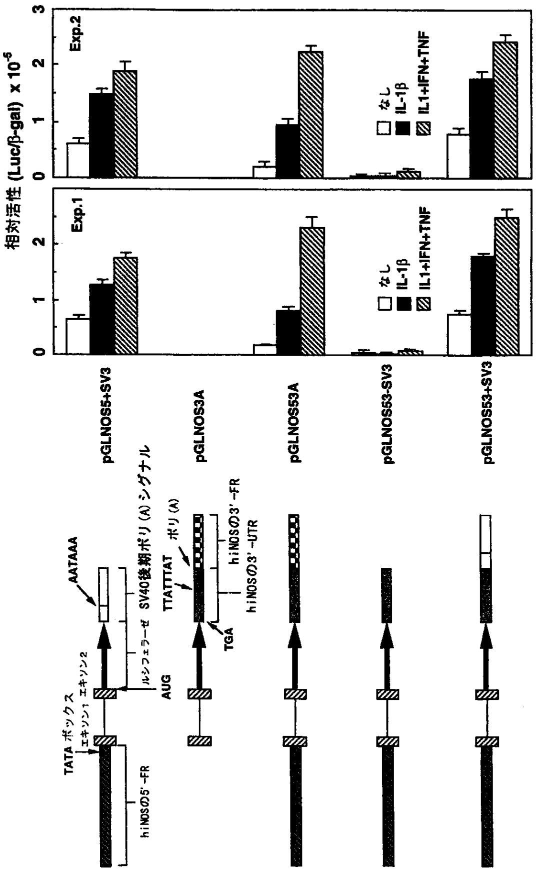
【図７】



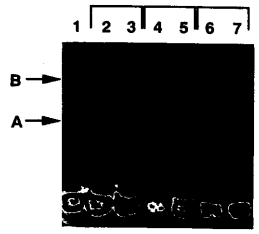
【図８】



【図９】



【図１０】

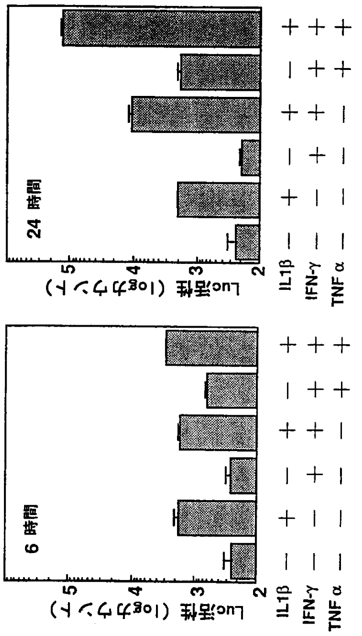


A549 細胞をサイトカイン刺激したときの
核抽出物のゲルシフトアッセイ

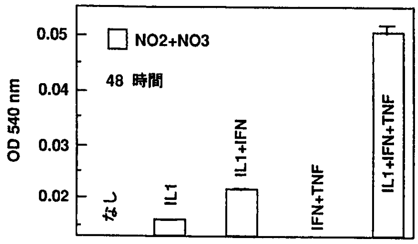
1 ； 抽出物無し
2, 3 ； サイトカイン刺激無し
4, 5 ； IL-1β 3時間刺激
6, 7 ； CM 3時間刺激

3, 5, 7 は 20 倍濃度の DIG-フリープローブを添加した

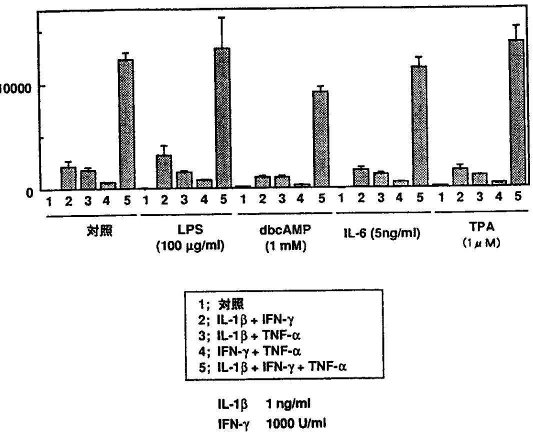
【図１１】



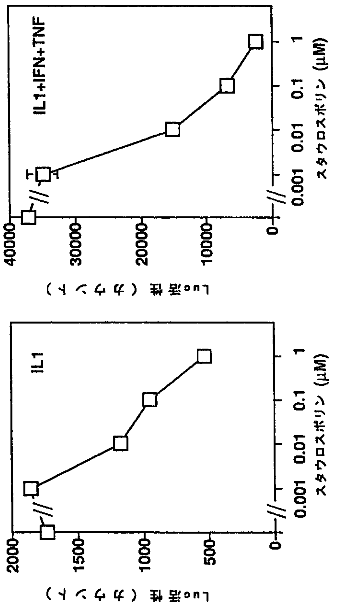
【図１２】



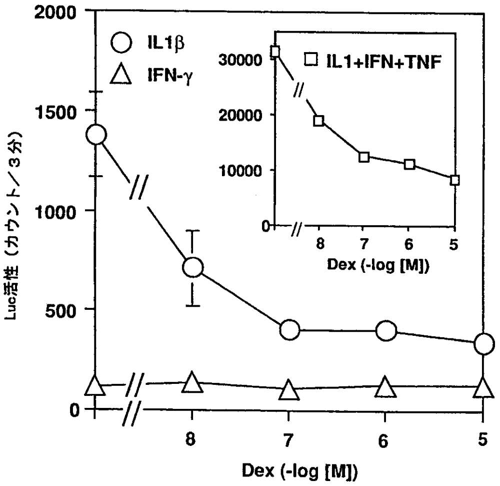
【図１３】



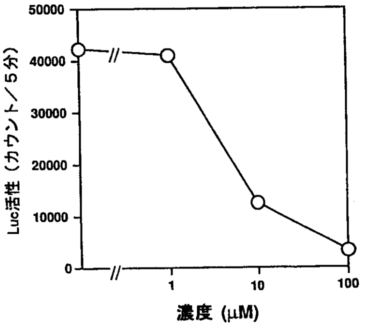
【図１４】



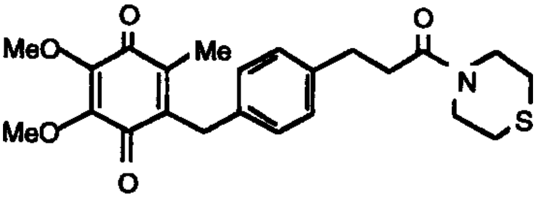
【図１５】



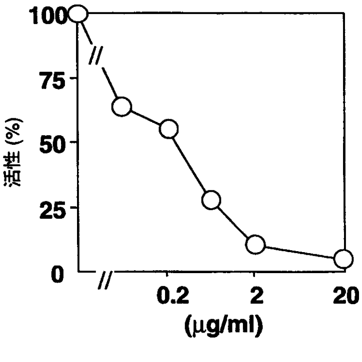
【図１６】



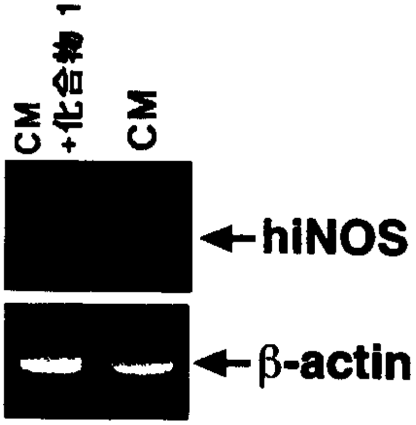
【図１７】



【図１８】



【図１９】



フロントページの続き

審査官　福間　信子

(56)参考文献　特開昭６２－２８６９４９（ＪＰ，Ａ）
Biochem. Biophys. Res. Commun.，１９９６年　6月１４日，vol.223，no.2，p.347-352

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/00 - 90
CA/BIOSIS/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq
PubMed
JMEDPlus(JDream2)
JSTPlus(JDream2)