

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3794697号

(P3794697)

(45) 発行日 平成18年7月5日(2006.7.5)

(24) 登録日 平成18年4月21日(2006.4.21)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 5 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願平7-509015	(73) 特許権者	503025247
(86) (22) 出願日	平成6年5月9日(1994.5.9)		ローン・ブーラン・ロレ・ソシエテ・アノ
(65) 公表番号	特表平9-502357		ニム
(43) 公表日	平成9年3月11日(1997.3.11)		フランス国92160アントニイ・アベニ
(86) 国際出願番号	PCT/FR1994/000542		ユーレイモンド・アロン20
(87) 国際公開番号	W01995/007981	(74) 代理人	100060782
(87) 国際公開日	平成7年3月23日(1995.3.23)		弁理士 小田島 平吉
審査請求日	平成13年3月8日(2001.3.8)	(72) 発明者	シュバイグホフアー、フアビヤン
(31) 優先権主張番号	93/10971		フランス国エフー94300バンセヌ・ブ
(32) 優先日	平成5年9月15日(1993.9.15)		ールバールドラリベラシヨン53
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(72) 発明者	トク、ブルノ
			フランス国エフー75017パリ・プール
			バールペレール259
		審査官	田中 晴絵
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GRB 3-3 遺伝子、その変異体およびそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 の配列に示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含んで成るベクター。

【請求項 3】

ウイルスベクターであることを特徴とする、請求項 2 に記載のベクター。

【請求項 4】

アデノウイルス、レトロウイルス、AAV、HSVウイルス、CMVまたはワクシニアウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項 3 に記載のベクター。

【請求項 5】

複製しないウイルスであることを特徴とする請求項 4 に記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

本発明は Grb 3-3 と呼ばれる新規遺伝子、その変異体および特に抗癌遺伝子治療におけるそれらの使用に関する。

癌遺伝子およびサプレッサー遺伝子と呼ばれる様々な遺伝子が、細胞分裂の制御に関与している。その中でも、ras 遺伝子および一般的に p21 タンパク質と呼ばれるその産物は、調査されたすべての真核生物中で細胞増殖の制御において鍵となる役割を果たす。特に、これらのタンパク質のある特別な修飾がそれらに正常な制御を失わせ、そしてそれらを発癌性にする。このように多くのヒトの腫瘍は修飾された ras 遺伝子の存在と関連し

ている。同様に、これら p 2 1 タンパク質の過剰発現は細胞増殖の調節解除を導く。したがって、細胞中でのこれら p 2 1 タンパク質の正確な役割、それらの操作様式および特徴を理解することは、発癌現象の解明および治療的研究の支柱を構成するだろう。

r a s - 依存性発信経路に関与する種々の因子が同定された。それらの中には、S H 3 - S H 2 - S H 3 構造を有する 23 - 25kDa のタンパク質をコードする G r b - 2 遺伝子がある (Lowensteinら、Cell 70(1992) 431; マツオカら、PNAS 89(1992)9015)。G r b - 2 遺伝子産物はチロシン リン酸化タンパク質とその S H 2 ドメインを介して相互反応し、そしてその S H 3 ドメインを介して S O S クラスの G D P の交換因子と相互反応するようである (Eganら、Nature 363(1993) 45)。したがってこれは r a s 遺伝子産物の形質転換活性成分の 1 つであろう。本発明は G r b 3 - 3 と命名された、S H 2 ドメインに欠失を持つ G r b - 2 遺伝子のアイソフォームのクローニングおよび特徴決定の実証から得られたものである。この遺伝子は成人組織で発現し、対応する m R N A が 1.5kb の単一バンド状態で存在し、そして 19kDa タンパク質に翻訳される。その S H 2 ドメイン中の欠失のために、G r b 3 - 3 遺伝子産物は、もはやチロシン リン酸化タンパク質 (リン酸化 E G F レセプター) とは相互反応することができないが、S O S タンパク質のプロリン - リッチドメインと相互反応する能力を保持している。従ってその欠失のために、G r b 3 - 3 遺伝子産物は G r b 2 遺伝子産物の細胞効果を防ぐことができる。それ故にインビボでのこの遺伝子またはその変異体 (アンチセンス配列を含む) の移入は、増殖、分化および / または細胞死の過程を妨害することを可能にする。

従って本発明の第一の主題は、G r b 3 - 3 遺伝子 (配列番号 1 の配列) の全部または一部を含んで成るヌクレオチド配列に関する。

本発明の別の主題は、配列番号 1 の配列に由来し、かつ G r b 2 または G r b 3 - 3 タンパク質の発現を少なくとも部分的に抑制することができるヌクレオチド配列に関する。特に本発明は、標的細胞中での発現により細胞性 m R N A の転写を制御することができるアンチセンス配列に関する。そのような配列は、欧州特許出願公開第 140 308 号明細書に記載されている技術に従い、例えば標的細胞中で細胞性 m R N A G r b 2 または G r b 3 - 3 に相補的な R N A に転写され、そしてこれらがそれらのタンパク質への翻訳を遮断する。そのような配列は逆方向に転写された配列番号 1 の配列の全部または一部の核酸配列から成ることができる。

上記に示したように、G r b 2 は少なくとも二官能性のタンパク質であり、そしてその S H 2 ドメインを介して、チロシンでリン酸化された特異的な配列と連結し、かつ 2 つの S H 3 ドメインを介して S O S 族の交換因子と連結する。G r b 3 - 3 はチロシンでリン酸化されたタンパク質と結合する能力を失っているので、S O S タンパク質とのみ複合体を形成することができる。したがって G r b 3 - 3 は、自己リン酸化増殖因子のレセプターにより、あるいは S H C または I R S 1 のようなチロシンでリン酸化される関連タンパク質により、G r b 2 - S O S 複合体の補充を防ぐことができる。G r b 3 - 3 はこの補充を遮断することができるので、分裂促進経路を遮断し、そして細胞死を誘導することができる。出願人はまさに G r b 3 - 3 タンパク質が、例えばラット胸腺の成熟のような特定の生理学的過程中に発現したことを示した。出願人は、G r b 3 - 3 が様々な種類の細胞のアポトーシスにより細胞死を誘導できることも示した。これらの完全に有利な特性は ( i ) 組換えタンパク質を 3 T 3 繊維芽細胞に注入することにより、および ( ii ) G r b 3 - 3 をコードする配列を 3 T 3 細胞に移入させることにより検出することができた (実施例 4)。したがって G r b 3 - 3 は不滅化された癌または胚細胞のような生存能力のある細胞の細胞死を誘導することができる。実施例に示すように、G r b 2 は G r b 3 - 3 の効果を妨害することができる。

さらに、H I V ウイルスのリンパ球細胞の感染中に起こる G r b 3 - 3 発現に関する研究で、感染細胞による感染 7 日後に観察される大規模なウイルス生産が、G r b 3 - 3 m R N A の過剰発現と相関することを示すことができた (実施例 5)。この実験では G r b 3 - 3 の細胞効果の排除または遮断で、特に H I V に感染した生存細胞を維持することを可能にし、そしてこれにより T 4 リンパ球が防御免疫の役割を果たし続けるようになること

10

20

30

40

50

を示している。またこの点に関して、本発明はAIDS治療を目的とした医薬組成物の調製用にGrb3-3の細胞効果を少なくとも部分的に排除または遮断することができる化合物を使用することに関する。より詳細には、使用する化合物は：

- 上記定義のような遺伝的アンチセンス配列、
- Grb3-3に特異的なオリゴヌクレオチドであり、修飾されているか、あるいはよりよい安定性またはバイオアベイラビリティ（ホスホロチオエート、挿入剤等）のものであってよい。それらは好ましくはN-末端SH3ドメインと残存SH2ドメインとの間に位置できるコーディング配列を網羅するオリゴヌクレオチドであることができ、
- 感染した細胞への移入がGrb2の過剰発現を誘導する任意の配列であることができる。

10

本発明の核酸配列は、例えばヒトまたは動物に注射した後に、癌の予防または治療を誘導するように使用できる。特にそれらは国際公開第90/11092号明細書に記載された技術に従い、裸のDNA状態で注射することができる。それらはまた、例えばDEAE-デキストラン（Paganoら、J.Virol.1(1967)891）と、核タンパク質（カネダら、Science 243(1989) 375）と、脂質（Felgnerら、PNAS 84(1987) 7413）との複合体の状態で、リボソーム（Fraleyら、J.Biol.Chem.255(1980)10431）の状態等で投与されることもできる。

好ましくは本発明の核酸はベクターの部分形成する。そのようなベクターの使用は、まさに処理すべき細胞中への核酸の投与を向上させることができ、そしてまた該細胞中での核酸の安定性を増大させることができ、これにより持続性の治療効果を得ることが可能になる。さらに、同じベクター中に数種の核酸配列を導入することもでき、これにより治療効力も増す。

20

使用するベクターは、動物細胞、好ましくはヒト腫瘍細胞を形質転換することができるかぎり、様々な起源であってよい。本発明の好適な態様では、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ-伴生ウイルス(AAV)、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、ワクシニアウイルス等から選択できるウイルスベクターが使用される。ヘテロガスな核酸配列を組み込んだアデノウイルス、レトロウイルスまたはAAVに由来するベクターは、文献に記載されている[Akliら、Nature Genetics 3(1993) 224; Stratford-Perricaudetら、Human Gene Therapy 1(1990) 241; 欧州特許出願公開第185 573号明細書、Le vereorら、Gene 101(1991) 195; Le Gal la Salleら、Science 259(1993) 988; RoemerおよびFriedmann, Eur.J.Biochem.208(1992)211; Dobsonら、Neuron 5(1990)353; Chiocciら、New Biol.2(1990) 739; ミヤノハラら、New Biol.4(1992) 238; 国際公開第91/18088号明細書]。

30

したがって本発明は、ゲノム中に挿入した上記定義の核酸配列を含んで成る任意の組換えウイルスにも関する。

有利には、本発明の組換えウイルスは欠陥ウイルスである。“欠陥ウイルス”という用語は、標的細胞中で複製できないウイルスを言う。したがって一般的に、本発明の範囲内で使用される欠陥ウイルスのゲノムは、感染細胞中で少なくとも該ウイルスの複製に必要な配列が欠けている。これらの領域は除去されるか（完全に、または部分的に）、あるいは非機能的にされるか、あるいは他の配列、特に本発明の核酸に置き換えられることができる。これにもかかわらず欠陥ウイルスは好ましくはそのゲノム中にウイルス粒子の夾膜化に必要な配列を保存している。

40

本発明の核酸配列をアデノウイルス、AAVまたは欠陥組換えレトロウイルスに組み込んだ状態で使用することが特に有利である。

アデノウイルスに関して、構造および特性がかなり変化した様々な血清型が存在するが、これらはヒト、そして特に非免疫抑制個体に対して病原性ではない。さらに、これらのウイルスは感染した細胞のゲノムを組み込まず、そして外因DNAの巨大な断片を組み込むことができる。様々な血清型の中でも、2または5型アデノウイルス(Ad2またはAd5)が、本発明の枠内で好ましい。Ad5アデノウイルスの場合には、複製に必要な配列はE1AおよびE1B領域である。

本発明の欠陥組換えウイルスは、欠陥ウイルスと、とりわけ上記定義のヌクレオチド配列

50

を持つプラスミドとの間の相同組換えにより調製できる (Levreroら、Gene 101(1991) 195; Graham EMBO J.3(12)(1984) 2917)。相同組換えは、該ウイルスおよびプラスミドを適当な細胞系中に同時 - トランスフェクションした後に生成される。使用する細胞系は組換えの危険性を回避するように、好ましくは組換え状態で (i) 該要素により形質転換できるべきであり、そして (ii) 欠陥ウイルスのゲノムの部分を相補できる配列を含むべきである。欠陥組換えアデノウイルスの調製に使用できる系の例として、特にそのゲノム中 Ad 5 アデノウイルスのゲノムの左部を組み込んだ (12%)、ヒト胚腎臓系 293 (Grahamら、J.Gen.Virol.36(1977) 59) を挙げることができる。欠陥組換えレトロウイルスの調製に使用できる系の例として、C R I P 系を挙げることができる (DanosおよびMulligan,PNAS 85(1988) 6460)。

10

次に操作したウイルスを従来の分子生物学的技術により回収し、そして精製する。

また本発明の主題は、少なくとも 1 つの上記定義の組換えウイルスまたはヌクレオチド配列を含む医薬組成物に関する。

本発明の医薬組成物は局所、経口、非経口、鼻内、静脈内、筋肉内、皮下または眼内投与等のために配合できる。

好ましくは医薬組成物は、場合によっては治療される腫瘍に直接注射することができる配合物として、医薬的に許容できる賦形剤を含む。これらは等張の滅菌された塩溶液 (リン酸 1 ナトリウムまたは 2 ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウムまたはマグネシウム等、あるいはそのような塩の混合物)、または乾燥、特に凍結乾燥した組成物であってよく、これらは場合に応じて滅菌水または生理塩溶液の添加時に、注射溶剤を構成

20

投与に使用される核酸 (配列またはベクター) の投与量は、様々なパラメーターの関数として、そして特に使用する投与様式、関連する病因、発現する核酸に関連して、あるいは所望する治療期間に関連して調整することができる。一般的に本発明の組換えウイルスに関して、後者は  $10^4$  から  $10^{14}$  pfu/ml、好ましくは  $10^6$  から  $10^{10}$  pfu/ml の間の投与量の状態で配合され、そして投与される。pfu という用語は ( " plaque forming unit : プラーク形成単位 " ) は、ウイルス溶液の感染力に相当し、そして適当な細胞カルチャーを感染させ、そして一般的に 48 時間後に感染細胞のプラーク数を測定することにより決定される。ウイルス溶液の pfu 力価を決定するための技術は文献に詳細に記載されている。

そのような医薬組成物は、特に癌の治療および / または予防のためにヒトに使用できる。

30

特に、本発明の生成物は r a s タンパク質の活性をモジュレートでき、それらは発癌過程に介入することが可能であり、そして特に形質転換体活性が p 2 1 - 機能的 G A P 相互作用に依存する癌遺伝子の活性を抑制することができる。実に多くの癌が発癌性 r a s タンパク質と関係してきた。突然変異した r a s 遺伝子を最もよく含む癌の中でも、特に膵臓の腺癌を挙げることができるが、この 90% が第 12 番目のコドンが突然変異した K i - r a s 癌遺伝子を有し (Almoguera et coll 53(1988) 549)、結腸の腺癌および甲状腺癌 (50%)、あるいは肺の癌腫および骨髄白血病 (30%、Bos,J.L. Cancer Res.49(1989)4682) である。さらに一般的には本発明の組成物は、細胞の異常な増殖が観察される任意の種類の病因の治療にアポトーシスを誘導することにより、ならびにアポトーシスによる細胞死が特徴である任意の病因 (A I D S、ハンチントン コレラ、パーキンソン) に G r b 3

40

- 3 の効果を遮断する化合物により (特にアンチセンス) 使用できる。  
本発明は以下の説明をするものであって制限するものではない実施例により、より完全に記載されている。

#### 図の説明

図 1 : G r b 2 および G r b 3 - 3 の構造ドメインの図解を表す。

図 2 : G r b 3 - 3 の E G F レセプター (図 2 a) およびプロリン - リッチペプチド (図 2 b) への結合実験。

図 3 : ポリオーマウイルスエンハンサー由来 R R E の r a s によるトランス活性化に対する、G r b 3 - 3 の効果。

図 4 : 3 T 3 繊維芽細胞について、G r b 3 - 3 - 誘導細胞死の実証。

50

図5：HIVウイルスに感染した細胞中のGrb3-3発現の実証。

#### 一般的な分子生物学技法

プラスミドDNAの調製、抽出、プラスミドDNAの塩化セシウム勾配遠心、アガロースまたはアクリルアミドゲル電気泳動、電気溶出によるDNA断片の精製、タンパク質のフェノールまたはフェノール-クロロホルム抽出、塩媒質中でのDNAのエタノールまたはイソプロパノール沈殿、大腸菌の形質転換等の分子生物学で従来使用されている方法は、当業者は周知であり、文献に豊富に記載されている[Maniatisら、“モレキュラークローニング、ア ラボラトリーマニュアル：Molecular Cloning, a Laboratory Manual” コールドスプリングハーバー ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、コールドスプリングハーバー、N.Y., 1982; Ausubel F.M.ら、(編集)、“分子生物学の最新の方法：Current Protocols in Molecular Biology”、ジョン ウィリー アンド サンズ (John Wiley & Sons)、ニューヨーク、1987]。

10

pBR322およびpUC型のプラスミドならびにM13シリーズのファージは、市販されているものである(ベセスダリサーチラボラトリーズ：Bethesda Research Laboratories)。

ライゲーションのために、DNA断片をその大きさに従いアガロースまたはアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、フェノールまたはフェノール-クロロホルム混合物で抽出し、エタノールで沈殿させ、そしてファージT4 DNAリガーゼ(バイオラボズ：BioLabs)の存在下で、供給元の推薦に従いインキュベーションすることができる。

5'突出末端のフィリングは、大腸菌DNAポリメラーゼI(バイオラボズ)のクレノー断片で、供給元の仕様に従い行うことができる。3'突出末端の破壊は、ファージT4 DNAポリメラーゼ(バイオラボズ)の存在下で、製造元の推薦に従い行う。5'突出末端の破壊は、S1ヌクレアーゼで制御された処理により行う。

20

合成オリゴデオキシヌクレオチドによるin vitro部位特異的突然変異誘発法は、Taylorらによる方法[Nucleic Acids Res. 13(1985)8749-8764]に従い、アマシャム(Amersham)により販売されているキットを使用して行うことができる。

いわゆるPCR法[Polymerase-catalysed Chain Reaction：ポリメラーゼ-触媒連鎖反応、Saiki R.K.ら、Science 230(1985)1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155(1987)335-350]によるDNA断片の酵素的増幅法は、“DNAサーマルサイクラー”(パーキンエルマーシートス：Perkin Elmer Cetus)を使用して、製造元の仕様に

30

ヌクレオチド配列の確認はSangerらにより開発された方法[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74(1977)5463-5467]により、アマシャムが市販しているキットを使用して行うことができる。

#### 実施例

##### 1. Grb3-3 遺伝子の単離

Grb3-3 遺伝子はヒトDNAライブラリーを、Grb2 遺伝子の配列に由来するプローブでスクリーニングすることにより単離した。

ヒト胎盤ライブラリー(クローンテック：Clontech)由来のDNA断片を有する500,000のラムダgt11組換えファージを、Grb2 遺伝子の配列に由来するプローブでスクリー

40

ングした。使用したプローブはGrb2 タンパク質の初めの8アミノ酸に相当し、以下の配列を有する：ATGGAAGCCATCGCCAAATATGAC(配列番号2) 10個の陽性クローンがこのようにして同定された。これらの10クローンの挿入物は、EcoRI断片の状態に単離され、プラスミドM13mp18にクローン化され、そして配列決定された。10個のクローンの中で、9個がGrb2 配列と同一の挿入物を持っていた。その中の1つがSH2ドメイン中の欠失のためにGrb2 遺伝子よりも小さいサイズの挿入物を持っていた(図1)。残りの配列の分析では、非コーディング5'および3'領域を含むGrb2の対応する領域と完全に同一であることが明らかとなった。このクローンのオープンリーディングフレームは177アミノ酸(配列番号1)のタンパク質をコードし、不完全なSH2ドメインを境界とするSH3ドメインを含む(図1)。SH2ドメイン中の欠失し

50

たアミノ酸 ( G r b 2 タンパク質の60から100残基 ) は、 G r b 2 がリン酸化チロシンを含むペプチドに結合するのに関与する残基に対応する。

## 2. G r b 3 - 3 タンパク質の結合活性

上記に示したように、 G r b 2 タンパク質はリン酸化増殖因子レセプターと S O S 因子との間の相互反応のメディエーターである。この実施例では、 G r b 3 - 3 タンパク質がリン酸化 E G F レセプターとは相互反応できないが、ヒト S O S 1 因子の配列に由来するプロリン - リッチペプチドとは相互反応する能力を保持していることを実証する。

G r b 3 - 3 の結合能は、ビオチン化グルタチオン - S - トランスフェラーゼ ( G S T ) 融合タンパク質を使用して研究した。この種の融合物は組換え生成物の迅速かつ効率的な精製を可能にする。そのために、本発明の配列は、SmithおよびJohnson [ Gene 67(1988) 31 ] により記載された技法に従い、 G S T との融合タンパク質状態で大腸菌 ( *E. coli* ) TG 1株中で発現させた。簡単に述べると、 G r b 2 および G r b 3 - 3 遺伝子を、始めに開始および終止コドンの何れか側の BamHI 部位に導入することにより修飾した。そのために、これら遺伝子のオープンリーディングフレームを以下のオリゴヌクレオチドを使用して P C R により増幅した：

オリゴヌクレオチド I ( 5' ) ( 配列番号 3 ) :

GAATTCGGATCCATGGAAGCCATCGCCAAATATGACTTC

オリゴヌクレオチド II ( 3' ) ( 配列番号 4 ) :

GAATTCGGATCCTTAGACGTTCCGGTTCACGGGGGTGAC

下線部は、開始および終止コドンの後または前に作成された BamHI 部位に対応する。

このように増幅した遺伝子を、次に同じ酵素で直線化したベクター pGEX 2T ( ファルマシア : Pharmacia ) 中に BamHI 断片の状態で、 G S T をコードする c D N A の 3' および枠内にクローン化した。このようにして得たベクターを大腸菌 TG1 株を形質転換するために使用した。このように形質転換した細胞を 37 ° で一晩前培養し、 1/10 に L B 培地で希釈し、発現を誘導するために IPTG を補充し ( 2 時間 25 ° )、そして約 21 時間、 25 ° で培養した。次に細胞を溶解し、そして生成した融合タンパク質をアガロース - G S H カラムでアフィニティー精製した。このために細菌溶解物をゲル ( 溶解緩衝液で準備および平衡化した ) の存在下で 15 分間、 4 ° にてインキュベーションする。Tris-HCl 緩衝液、pH7.4 で 3 回洗浄した後、タンパク質を過剰量の G S T を含有する Tris-HCl 緩衝液、pH7.7 の存在下で溶出する。上清を回収し、そして遠心する。

グリシン 203 がアルギニンに置換された G r b 2 の突然変異体 ( Grb2G203R )、およびグリシンの 162 がアルギニンに置換された G r b 3 - 3 の突然変異体 ( Grb3-3G162R ) を調製するために、同じ手順を使用した。Grb2G203R 突然変異体はもはや D N A 合成の再開始の試験で活性を持たないと記載されている ( Lowenstein ら、同上 )。Grb3-3G162R 突然変異体は同じ位置に同じ突然変異を持ち、したがって不活性なはずである。

これらの突然変異体を、 5' では上記のオリゴヌクレオチド I を、 3' では以下のオリゴヌクレオチド III ( その突然変異コドンに下線を付した ) を使用して、 G r b 2 および G r b 3 - 3 遺伝子について PCR により、突然変異誘発法で調製した：

オリゴヌクレオチド III ( 3' ) ( 配列番号 5 ) :

GACGTTCCGGTTCACGGGGGTGACATAATTGCGGGGAAACATGCGGGTC

このように増幅した断片を次に溶出し、オリゴヌクレオチド I および II により PCR で再増幅し、そしてベクター pGEX 2T にクローン化した。次に突然変異体を上記のように作成した。

G S T 融合タンパク質 ( GST-Grb2、GST-Grb3-3、GST-Grb3-3G162R および GST ) を、当業者に周知の従来法によりビオチン化し ( 一般的な分子生物学的手法ならびに Mayer ら、PNAS 88(1991)627 に注意されたい )、そして固定化リン酸化 E G F レセプター ( 2 . 1 . ) お

10

20

30

40

50

よび次に h S O S 1 に由来するペプチド ( 2 . 2 . ) への結合を測定するプローブとして使用した。

### 2 . 1 . リン酸化 E G F レセプターへの結合

方法：使用する E G F レセプターを、Duchesneら ( Science 259(1993)525 ) に記載された方法に従い、A431細胞からWGA-Sepharoseの固定化により精製した。このレセプター 2 μ g を始めに 1 μ M の E G F で 10 分間、22 で刺激し、そして次に冷 A T P ( 10 μ M ) の有無で、2.5mM MnCl<sub>2</sub>の存在下で H N T G 緩衝液 ( 20mM Hepes、150mM NaCl、0.1% Triton、10% グリセロール、pH = 7.5 ) 中で 4 にて 2 分間インキュベーションした。このレセプターのリン酸化を次に分解緩衝液を加えて停止させる。試料を 4-20% SDS-PAGEゲルで処理し、そして次にポリビニリデン ジフルオリド膜 ( PVDF ) に移す。次にプロットを様々なビオチン化 G S T 融合物 ( 2 μ g / ml ) の存在下でインキュベーションし、そして次にアルカリ - ホスファターゼ結合ストレプトアビジン ( プロメガ : Promega ) により視覚化した。E G F レセプターもレセプターが確実にリン酸化されたことを確認するために、抗 - ホスホチロシン抗体 ( 抗 - P Y ) の存在下でイムノプロットングに供した。

結果：得られた結果を図 2 a に示す。それらは予想通り、G r b 2 タンパク質が E G F レセプターとリン酸化状態でのみ相互反応することを示している。それらは G r b 3 - 3 タンパク質がリン酸化の程度にかかわらず E G F レセプターに結合しないことも示している。

### 2 . 2 . h S O S 1 に由来するペプチドへの結合

方法：以下の 2 つのプロリン - リッチペプチドを合成した：

h S O S 1 ペプチド：G T P E V P V P P P V P P R R R P E S A：このペプチドは h S O S 1 タンパク質の 1143 から 1162 残基に対応し ( Li ら、Nature 363(1993) 83 )、G r b 2 と h S O S 1 の間の相互作用の原因である ( 配列番号 6 )。

3 B P 1 ペプチド：P P P L P P L V：このペプチドは 3 B P 1 タンパク質に由来し、A b 1 および S r c の S H 3 ドメインに効率的に結合すると知られている ( Cicchetti ら、Science 257(1992) 803 ) ( 配列番号 7 )。

これら各々のペプチド ( 1 μ l、10mg/ml ) をニトロセルロース膜に固定化した。この膜を次にブロッキング緩衝液中 ( 20mM Tris、pH = 7.6、150mM NaCl、0.1% Tween、3% ウシ血清アルブミン ) でインキュベーションした。膜を次に 4 で一晩、様々なビオチン化 G S T 融合物 ( 4 μ g / ml ) が存在する中でインキュベーションし、そして次にアルカリ - ホスファターゼ - 結合ストレプトアビジン ( プロメガ ) で視覚化した。結果：得られた結果を図 2 b に示す。それらは G r b 3 - 3 が G r b 2 と同様に、h S O S 1 ペプチドに結合できることを示している。これらは、この結合が 3 B P 1 ペプチドでは観察されないもので、この相互作用が特異的であることも示す。さらに、この結果は Grb3-3G162R 突然変異体がもはや h S O S 1 ペプチドに結合できないことを示しており、このことはこの残基およびこの相互作用の機能的役割の重要性を確認するものである。

### 3 . G r b 3 - 3 タンパク質の活性

この実施例では、S H 2 ドメイン中の欠失にもかかわらず、G r b 3 - 3 タンパク質が機能的効果を有することを実証する。

G r b 3 - 3 タンパク質の活性は、r a s 反応要素 ( R R E ) を有し、かつレポーター遺伝子の発現を支配するプロモーターのトランス活性化のために、r a s と協同する能力を測定することにより調査した。

使用した手法は、例えば Schweighoffer ら、Science 256(1992) 825 に記載されている。簡単に述べると、使用したプロモーターはチミジンキナーゼ遺伝子のネズミプロモーターおよびポリオーマエンハンサー由来の 4 つの反復 P E A 1 要素から成る合成プロモーター ( Wasylyk ら、EMBO J. 7(1988) 2475 ) : P y - T K プロモーターである。このプロモーターは細菌遺伝子の場合にはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ ( C A T ) のレポーター遺伝子の発現を支配する : P y - T K - C A T ベクター。試験遺伝子の発現用のベクターを、該遺伝子を BamH I 断片の状態プラスミド pSV2 の Bga1 I I 部位に挿入することにより構築した。この部位は遺伝子を初期 SV40 プロモーターの制御下に位置させること

10

20

30

40

50

が可能である。

40%の集密度のER22細胞を、0.5 $\mu$ gのベクターPy-TK-CAT単独(Py)、あるいは初期SV40プロモーターの制御下に遺伝子(Grb2、2 $\mu$ g、GRb3、2 $\mu$ g、Grb2(G203R)、2 $\mu$ g、Grb3-3(G162R)、2 $\mu$ gまたはGrb3、2 $\mu$ g+Grb2、2 $\mu$ g)を有する発現ベクターの存在下でトランスフェクトした。各々の場合に、DNAの全量は、挿入物無しの発現ベクターと一緒に5 $\mu$ gに調整した。トランスフェクションはリポスペルミン(トランスフェクタム：Transfectam、IBF-Sepractor)の存在下で行った。細胞を48時間、0.5%のウシ胎児血清を補充したDMEM培地中の培養物で維持した。次にCAT活性(RREのトランス活性化)は、Wasylykら、(PNAS 85 (1988) 7952)により記載されているように測定した。

得られた結果を図3に示す。それらはGrb3-3タンパク質の発現が、増殖因子レセプターの活性化効果を防ぐことを明らかに示している。それらは過剰なGRb2が、Grb3-3の増殖因子への反応に対する効果を防ぐことも示す。

#### 4. Grb3-3は細胞枯死を誘導する

この実施例は細胞アポトーシスにおけるGrb3-3の直接的関与を実証する。この特性は、細胞増殖(癌、再狭窄等)が原因の病気を治療するために特に有利な応用を提供する。

Grb3-3による細胞アポトーシスの誘導は、(i)組換えタンパク質を3T3繊維芽細胞に注入することにより、そして(ii)Grb3-3コーディング配列を3T3細胞に移入することにより示される。

##### (i) 組換えタンパク質の注入

組換えGrb3-3タンパク質はGSTとの融合タンパク質状態で、実施例2に記載された方法に従い調製した。次にGST部分を分離するために、この融合タンパク質をトロンピン(0.25%、シグマ：Sigma)で処理し、そして次にmonoQカラムでイオン-交換クロマトグラフィーにより精製した。組換えタンパク質を含有する画分を次に100mMのNaClを含有する20mMリン酸緩衝液(pH7)中でMicrosep微量濃縮器(フィルترون：Filtron)により濃縮した。このようにして得た精製タンパク質を培養した3T3細胞に自動エッペンドルフ(Eppendorf)マイクロインジェクターにより注入した(1から3mg/ml)。細胞を次に34

でインキューベーションし、そして形態的形質転換を追うために定期的間隔で写真を取った。得られた結果は、Grb3-3の注入5時間後に、ほとんどの細胞が死んだが、同条件下のGrb2またはGrb3-3突然変異体(G162R)の注入は、細胞の生存能力に影響を及ぼさないことを示している。

##### (ii) 組換えタンパク質をコードする配列の移入

SV40ウイルスの初期プロモーターの制御下に、Grb3-3タンパク質をコードする配列番号1の配列を含んで成るプラスミドを構築した。

40%の集密度の3T3繊維芽細胞を、リポスペルミン(トランスフェクタム、IBF-Sepractor)の存在下で、0.5または2 $\mu$ gのこの発現プラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、50%のこの細胞が培地に懸濁しており、ならびに壁に付いている残りの細胞が大変実質的な形態的变化を表した(図4)。アガロースゲル電気泳動による分析ではさらに、死細胞に特徴的なオリゴ-ヌクレオソーム性DNA断片化を示した(図4)。これとは対照的に、同条件下でGrb2、Grb3-3(G162R)またはGrb2(G203R)発現プラスミドでトランスフェクトした細胞は、正常な形態を維持し、常に生存しており、そしてDNAの断片化を示していない。図4に示すように、Grb2の同時発現(co-expression)で、Grb3-3の影響を防止することが可能となる。

したがってこれらの結果は、Grb3-3が細胞アポトーシスを誘導できるキラー遺伝子を構成していることを明らかに示している。上記に示したように、これらの特性は特に癌、再狭窄のような細胞増殖が原因の病気を治療するために、特に有利な応用を提供する。

#### 5. HIVウイルスに感染したリンパ球中でのGrb3-3発現の実証

この実施例は、HIVウイルスにTリンパ球が感染する周期中に、Grb2およびGrb3-3 mRNAの相対的比率が変化し、そしてGrb3-3メッセンジャーが、大量の

10

20

30

40

50



ウイルス生産および細胞死亡時に過剰発現することを示している。

末梢血リンパ球をHIV-1ウイルスで2種の希釈度(1/10および1/100)で、1、4または7日間感染させた。Grb2およびGrb3-3メッセンジャーの相対的比率を測定するために、Grb2およびGrb3-3に特異的なオリゴヌクレオチドで、逆-PCRにより細胞由来のmRNAを分析した。使用したGrb3-3特異的オリゴヌクレオチドは次のとおりである：

オリゴヌクレオチド IV (3') : ATCGTTTCCAAACGGATGTGGTTT

### (配列番号8)

オリゴヌクレオチド V (5') : ATAGAAATGAAACCACATCCGTTT

10

### (配列番号9)

得られた結果を図5に示す。それらはHIVウイルスによる感染7日後に、Grb3-3 mRNAが過剰に発現していることを明らかに示している。p24タンパク質およびウイルス逆転写酵素をアッセイすることにより示すように、7日も大量のウイルス生産が観察される期間中に相当する。

#### 配列表

(1) 一般情報：

(i) 出願人：

(A) 名前：ローヌ・プーラン ローラー エス・エー・

(B) 通り：20、レイモンド アーロン通り

(C) 市：アントニー

(E) 国：仏国

(F) 郵便番号：92165

(ii) 発明の名称：Grb3-3遺伝子、その変異体およびそれらの使用

(iii) 配列の数：9

(iv) コンピューター読み取り先：

(A) 媒体の種類：フロッピーディスク

(B) コンピューター：IBM PC互換型

(C) 操作システム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェアシステム：パテントイン リリース

#1.0、バージョン#1.25(EPO)

(2) 配列番号1の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：933塩基対

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直線

(ii) 分子型：cDNA

(iii) 仮定：無し

(iii) アンチ-センス：無し

(iv) 起源：

(A) 生物：ホモサピエンス

(ix) 特徴

(A) 名前/キー：CDS

(B) 位置：37...567

(D) 他の情報：/生成物="Grb3-3"

(xi) 配列の記載：配列番号1：

20

30

40

GAATTCGGGG CTGCTGAGCA CTGAGCAGGG CTCAGA ATG GAA GCC ATC GCC AAA	54	
Met Glu Ala Ile Ala Lys		
1 5		
TAT GAC TTC AAA GCT ACT GCA GAC GAC GAC CTG AGC TTC AAA AGG GGG	102	
Tyr Asp Phe Lys Ala Thr Ala Asp Asp Asp Leu Ser Phe Lys Arg Gly		
10 15 20		
GAC ATC CTC AAG GTT TTG AAC GAA GAA TGT GAT CAG AAC TGG TAC AAG	150	
Asp Ile Leu Lys Val Leu Asn Glu Glu Cys Asp Gln Asn Trp Tyr Lys		
25 30 35		
GCA GAG CTT AAT GGA AAA GAC GGC TTC ATT CCC AAG AAC TAC ATA GAA	198	
Ala Glu Leu Asn Gly Lys Asp Gly Phe Ile Pro Lys Asn Tyr Ile Glu		
40 45 50		
ATG AAA CCA CAT CCG TTT GGA AAC GAT GTG CAG CAC TTC AAG GTG CTC	246	10
Met Lys Pro His Pro Phe Gly Asn Asp Val Gln His Phe Lys Val Leu		
55 60 65 70		
CGA GAT GGA GCC GGG AAG TAC TTC CTC TGG GTG GTG AAG TTC AAT TCT	294	
Arg Asp Gly Ala Gly Lys Tyr Phe Leu Trp Val Val Lys Phe Asn Ser		
75 80 85		
TTG AAT GAG CTG GTG GAT TAT CAC AGA TCT ACA TCT GTC TCC AGA AAC	342	
Leu Asn Glu Leu Val Asp Tyr His Arg Ser Thr Ser Val Ser Arg Asn		
90 95 100		
CAG CAG ATA TTC CTG CGG GAC ATA GAA CAG GTG CCA CAG CAG CCG ACA	390	
Gln Gln Ile Phe Leu Arg Asp Ile Glu Gln Val Pro Gln Gln Pro Thr		
105 110 115		
TAC GTC CAG GCC CTC TTT GAC TTT GAT CCC CAG GAG GAT GGA GAG CTG	438	20
Tyr Val Gln Ala Leu Phe Asp Phe Asp Pro Gln Glu Asp Gly Glu Leu		
120 125 130		
GGC TTC CGC CGG GGA GAT TTT ATC CAT GTC ATG GAT AAC TCA GAC CCC	486	
Gly Phe Arg Arg Gly Asp Phe Ile His Val Met Asp Asn Ser Asp Pro		
135 140 145 150		
AAC TGG TGG AAA GGA GCT TGC CAC GGG CAG ACC GGC ATG TTT CCC CGC	534	
Asn Trp Trp Lys Gly Ala Cys His Gly Gln Thr Gly Met Phe Pro Arg		
155 160 165		
AAT TAT GTC ACC CCC GTG AAC CGG AAC GTC TAAGAGTCAA GAAGCAATTA	584	
Asn Tyr Val Thr Pro Val Asn Arg Asn Val		
170 175		
TTTAAAGAAA GTGAAAAATG TAAAACACAT ACAAAGAAT TAAACCCACA AGCTGCCTCT	644	
GACAGCAGCC TGTGAGGGAG TGCAGAACAC CTGCCGGGTC ACCCTGTGAC CCTCTCACTT	704	30
TGGTTGGAAC TTTAGGGGGT GGGAGGGGGC GTTGGATTTA AAAATGCCAA AACTTACCTA	764	
TAAATTAAGA AGAGTTTTTA TTACAAATTT TCACTGCTGC TCCTCTTTCC CCTCCTTTGT	824	
CTTTTTTTTC TTCCTTTTTT CTCTTCTGTC CATCAGTGCA TGACGTTTAA GGCCACGTAT	884	
AGTCCTAGCT GACGCCAATA AAAACAAGA AACCAAAAAA CCCGAATTC	933	

## ( 2 ) 配列番号 2 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 2 4 塩基対

( B ) 種類 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直線

( ii ) 分子型 : c D N A

( iv ) 起源 :

( A ) 生物 : オリゴヌクレオチド

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 2 :

ATGGAAGCCA TCGCCAAATA TGAC

24

## ( 2 ) 配列番号 3 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 3 9 塩基対

( B ) 種類 : 核酸

40

50

(C) 鎖の数：一本鎖  
 (D) トポロジー：直線  
 (ii) 分子型：cDNA  
 (iv) 起源：  
 (A) 生物：オリゴヌクレオチド I

(xi) 配列の記載：配列番号 3：

GAATTCGGAT CCATGGAAGC CATCGCCAAA TATGACTTC 39

(2) 配列番号 4 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：39 塩基対

10

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直線

(ii) 分子型：cDNA

(iv) 起源：

(A) 生物：オリゴヌクレオチド II

(xi) 配列の記載：配列番号 4：

GAATTCGGAT CCTTAGACGT TCCGGTTCAC GGGGGTGAC 39

(2) 配列番号 5 の情報：

(i) 配列の特徴：

20

(A) 長さ：49 塩基対

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直線

(ii) 分子型：cDNA

(iv) 起源：

(A) 生物：オリゴヌクレオチド III

(xi) 配列の記載：配列番号 5：

GACGTTCCGG TTCACGGGGG TGACATAATT GCGGGGAAAC ATGCGGGTC 49

30

(2) 配列番号 6 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20 アミノ酸

(B) 種類：アミノ酸

(D) トポロジー：直線

(ii) 分子型：タンパク質

(iv) 起源：

(A) 生物：hSOS1 ペプチド (1143 - 1162 残基)

(xi) 配列の記載：配列番号 6：

Gly Thr Pro Glu Val Pro Val Pro Pro Pro Val Pro Pro Arg Arg Arg

40

1

5

10

15

Pro Glu Ser Ala

20

(2) 配列番号 7 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：8 アミノ酸

(B) 種類：アミノ酸

50

( D ) トポロジー : 直線  
( ii ) 分子型 : タンパク質  
( iv ) 起源 :  
( A ) 生物 : ペプチド 3 B P 1  
( xi ) 配列の記載 : 配列番号 7 :  
Pro Pro Pro Leu Pro Pro Leu Val

1

5

( 2 ) 配列番号 8 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :  
( A ) 長さ : 2 4 塩基対  
( B ) 種類 : 核酸  
( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
( D ) トポロジー : 直線  
( ii ) 分子型 : c D N A  
( iv ) 起源 :  
( A ) 生物 : オリゴヌクレオチド IV  
( xi ) 配列の記載 : 配列番号 8 :

ATCGTTTCCA AACGGATGTG GTTT

24

( 2 ) 配列番号 9 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :  
( A ) 長さ : 2 4 塩基対  
( B ) 種類 : 核酸  
( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
( D ) トポロジー : 直線  
( ii ) 分子型 : c D N A  
( iv ) 起源 :  
( A ) 生物 : オリゴヌクレオチド V  
( xi ) 配列の記載 : 配列番号 9 :

ATAGAAATGA AACCATATCC GTTT

24

10

20

30

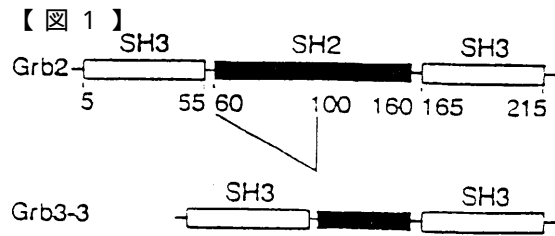


Figure 1

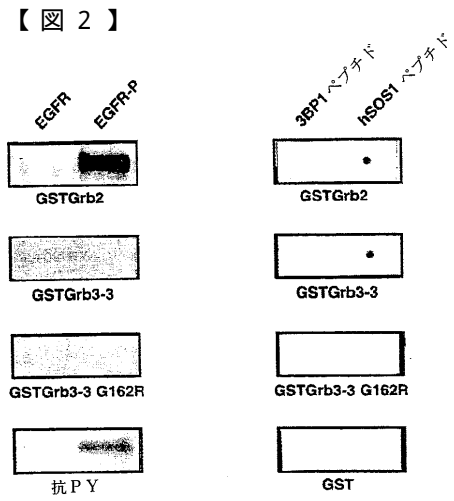


Figure 2

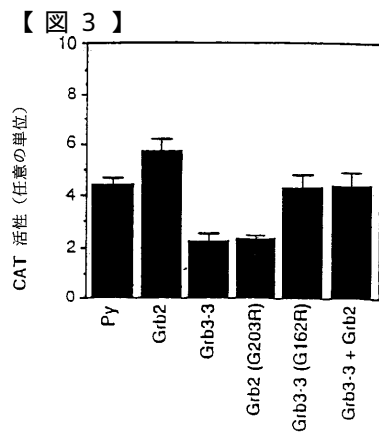


Figure 3

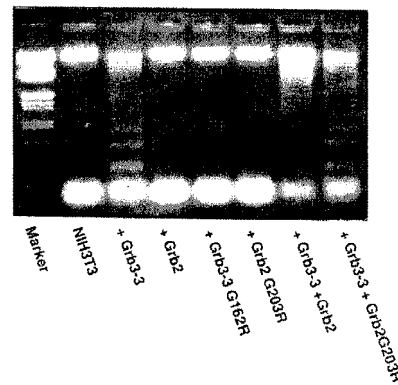
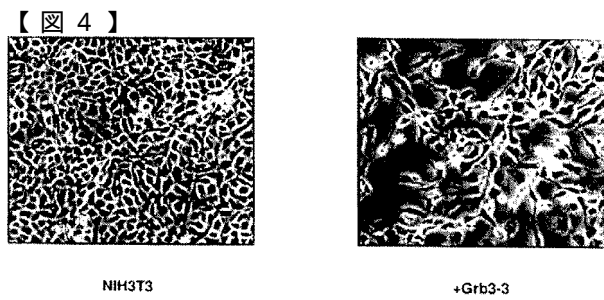


Figure 4

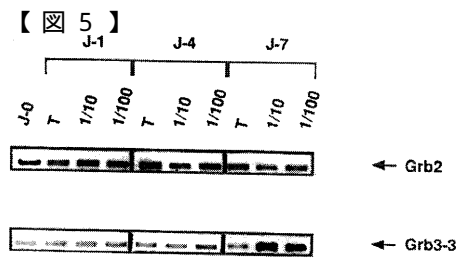


Figure 5

---

フロントページの続き

(56)参考文献 特開昭60-232092(JP,A)

Cell,1992,Vol.70,p.431-442

Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1992,Vol.89,p.9015-9019

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 15/00 - 15/90

A61K 48/00

WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq