

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3663211号

(P3663211)

(45) 発行日 平成17年6月22日(2005.6.22)

(24) 登録日 平成17年4月1日(2005.4.1)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 3 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願平7-529747	(73) 特許権者	イエダ リサーチ アンド ディベロッ メント カンパニー リミテッド
(86) (22) 出願日	平成7年5月11日(1995.5.11)		イスラエル国、76100 レホボト、ピ ーオー ボックス 95、アット ザ ワ イズマン インスティテュート オブ サ イエンス (番地なし)
(65) 公表番号	特表平10-500304	(74) 代理人	弁理士 朝日奈 宗太
(43) 公表日	平成10年1月13日(1998.1.13)	(74) 代理人	弁理士 佐木 啓二
(86) 国際出願番号	PCT/US1995/005853	(72) 発明者	ワラック、デイビッド
(87) 国際公開番号	W01995/031206		イスラエル国、76406 レホボト、ボ ロチョフ ストリート 24
(87) 国際公開日	平成7年11月23日(1995.11.23)		
審査請求日	平成14年5月10日(2002.5.10)		
(31) 優先権主張番号	109633		
(32) 優先日	平成6年5月11日(1994.5.11)		
(33) 優先権主張国	イスラエル(IL)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 p 7 5 T N F 受容体プロモーター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

図 2 A に記載のヌクレオチド配列の少なくともヌクレオチド 1 3 3 5 から 1 5 2 7 にわたる配列からなるヒト p 7 5 T N F - R 遺伝子のプロモーター配列。 __

【請求項 2】

図 2 B に記載の配列の少なくともヌクレオチド 1 5 6 9 から 1 7 6 8 にわたる配列からなるヒト p 7 5 T N F - R 遺伝子のプロモーター配列。 __

【請求項 3】

図 2 B に記載の配列のヌクレオチド 1 から 1 5 6 9 にわたる配列からなる転写抑制領域。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、p 7 5 腫瘍壊死因子受容体 (T N F - R) のプロモーター配列、その製造法および用途に関する。

背景技術

T N F は、広範囲の細胞機能に影響を及ぼす多機能な前炎症性 (pro-inflammatory) サイトカインである。T N F は、一方では生物の防御に関与するが、他方では、過剰に産生されると、いくつかの疾患においておもな病原体の役割を果たすことがある。T N F は、炎症のプロセスに関与し、敗血症性ショック (1)、移植片対宿主反応 (2) およびリウマチ性疾患 (3) における組織損傷のメディエーターであることが知られている。

T N F は、2 つの個別の細胞表面受容体に結合することによりこれらの効果を及ぼす。こ

これらの2つの細胞表面受容体は、大きさが異なり(約55および75 kDa)、かつ構造的に異なる細胞内ドメインを有する。このことはそれらが別々にシグナルを示すことを示唆している(4~11)。この2つの受容体の量および相対比は異なる種類の細胞において変化するものの、ほとんど全ての細胞はTNF受容体(TNF-R)を発現する。これらの変動は、部分的には発生上制御され、それらは細胞の表現型およびその分化の状態に関与し、部分的には、サイトカインおよび病原の免疫促進成分によって一時的に誘導されることもできる(12~22)。この2つのTNF-Rの機能の研究は、それらが異なっているが相互に作用する活性を有し(23~28)、かつそれらの活性レベルが細胞によるそれらの発現の程度に相関する可能性があることを示している(29、30)。これらの発見は、2つのTNF-Rの量および相対比に影響を及ぼす機構がTNFに対する細胞応答の特性および程度の両者に多大な影響を及ぼし、したがって、このサイトカインの病理学的な機能の発現に加えて生理学的な機能の発現に対して重要な決定をすることを暗示する。

10

TNFの有害な効果を抑制するために、TNFがその受容体に結合するのを妨げる方法が探求された。こうして、TNFに対する中和抗体が作製された(EP 186 833)。TNFの作用を抑制する別のアプローチは、細胞表面TNF-RとTNFの結合を競合する可溶性TNF受容体を提供することであった(EP 308 378およびEP 398 327)。

TNFにとっては、その作用を及ぼすためにはその受容体に結合することが必要であるため、発現する細胞表面受容体が少ないか、もしくは全く発現しなければ、TNFの有害効果を減少させるかまたは阻害することが可能になるはずである。同様に、特定の場合にTNFの有益な作用を増大させることが望ましいことがあり、そのような場合には発現する細胞表面受容体の量を増大させることによりこれを達成することが可能となるであろう。

20

発明の開示

本発明は、ヒトp75 TNF-R遺伝子のプロモーター配列であって、前記遺伝子の5'末端の上流に位置する配列および前記遺伝子の第1イントロンに位置する配列から選択されるプロモーター配列を提供する。5'上流プロモーター配列(5'領域プロモーター配列という)は2.1 kbp配列に含まれ、イントロンプロモーター配列は1.9 kbp配列に含まれる。5'領域プロモーター配列は、ネイティブ(native)のp75 TNF-R遺伝子産生物の発現を制御することが可能であるのに対して、イントロン領域プロモーター配列は、不完全な(truncated) p75 TNF-R遺伝子産生物の発現を制御することが可能である。さらに、イントロン領域プロモーターは、p75 TNF-R遺伝子の転写に関するエンハンサー要素としても機能するかもしれない。さらにまた、イントロン領域プロモーターは、イントロンプロモーターの上流に、不完全なp75 TNF-R遺伝子産生物の発現に関するモジュレーターとして役立つかもしれない転写抑制領域を有する。

30

本発明は、好ましい態様において、5'領域プロモーター配列をコードする2.18 kbpのNcoIフラグメント、およびイントロンプロモーター配列をコードする1.8 kbpのSmaIフラグメントであって、いずれの配列もヒトp75 TNF-Rを含むゲノムライブラリーに由来する配列を提供する。本発明によって提供されるほかの好ましい態様は、本質的なプロモーター活性を有し、かつ図2Aに示される配列の少なくともヌクレオチド1335から1527にわたる5'領域プロモーター配列部分、本質的なプロモーター活性を有し、かつ図2Bに示される配列の少なくともヌクレオチド1569から1768または少なくともヌクレオチド1569から1827にわたるイントロンプロモーター配列部分ならびに転写抑制領域を有し、かつ図2Bに示される配列のヌクレオチド1から1569にわたるイントロンプロモーター領域配列部分である。

40

別の側面において、本発明は、イントロン領域の転写抑制領域に加えて5'上流およびイントロン領域のプロモーターを含む、前述のプロモーター配列中に存在する配列モチーフを提供する。このようなモチーフは、プロモーター活性に必要である可能性があり、かつこのプロモーターの調節に関与するであろう特定の転写因子に結合することが示されていた。

50

このモチーフは、全配列における所望のモチーフの上流および/または下流の望ましくない配列を欠失させることにより、すなわち、全プロモーター配列の切断に制限酵素を用いて所望のモチーフに到達することにより製造することが可能であり、ついで、適切な原核生物株に挿入し、この株を培養すると前記所望のモチーフを発現することが可能なベクターをえるために必要な適切な制御配列およびほかの通常的手段と共にえられたモチーフをベクターに挿入することができる。

このようにしてえられたモチーフは、それらに結合する因子、たとえば転写因子をヒトゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーからスクリーニングするために用いることができる。一度これらの因子が通常的手段で単離され、精製され、かつ同定されると、それらを抑制することによりTNF-Rの形成は抑制されるべきであり一方、それらの産生を増大することにより所望の効果、すなわち、TNFのその受容体への結合の抑制または増強を導くTNF-Rの発現が増大されるべきである。

生体内に存在する特定の転写因子の量は無制限ではないため、ゆえに、TNF-R発現の抑制および有害なTNF効果の抑制もまた、多数のモチーフまたはモチーフ領域の発現によっても達成することが可能であろう。これらはこのようなモチーフまたはモチーフ領域を含むプロモーターと転写因子の結合を競合する。「モチーフ領域」は、モチーフそれ自体をその両側に並列する配列と共に、または全プロモーター配列の一部によって連結され、配列の一部によってその両側に並列する数種のモチーフを含む。前述のように、また以下に説明するように、本発明のモチーフまたはモチーフ領域は、本発明の活性プロモーター領域および転写抑制領域の両者に存在するものを含むと理解される。同様に、本発明の転写因子は、活性プロモーター領域に結合するものおよび転写抑制領域に結合するものを含む。

また、本発明は、本発明の配列モチーフを含有する医薬組成物を提供する。

別の側面において、本発明は、本発明のモチーフ領域を含有する医薬組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

図1は、実施例1に記述したように5'上流領域、第1エキソン、第1イントロンおよび第2エキソンを含む、ヒトp75TNF-R遺伝子の5'領域の部分的な制限酵素地図および様々なpBluescriptサブクローンを模式的に示す。

図2(AおよびB)は、実施例2に記述したように、5'上流プロモーター領域(図2A)およびイントロンプロモーター領域(図2B)のヌクレオチド配列を模式的に示す。

図3は、実施例3に記述したように5'上流およびイントロンプロモーター領域の活性の測定結果であって、これらのプロモーター領域が、ルシフェラーゼをコードする発現ベクターにおけるルシフェラーゼ遺伝子の発現(相対光単位-RLUで与えられる)の制御に用いられたアッセイでの測定結果を図式的に示す。

発明を実施するための最良の形態

ヒトp75TNF-Rを含むヒトゲノムライブラリーはストラタジーン(Stratagene)からえた。このライブラリーはファージライブラリーであり、そこから8つのファージがヒトp75TNF-R遺伝子を担持するものとしてポジティブに同定され、これらのファージのうち6つは異なるものであった。これらのポジティブなファージから様々なフラグメントを単離し、クローン化し、シークエンスした。

以下に実施例に詳述したように、我々はヒトp75TNF受容体遺伝子の5'領域の配列を決定した。我々は、第1イントロンの3'部分における領域に加えて、公表されているcDNAの5'上流の2kb領域がプロモーター活性を有することを示す。p75-Rのための異なるmRNAの大きさについての報告があり、これは異なる3'末端だけではなく異なる5'末端にも起因するものであると思われる。我々がシークエンスした遺伝子領域にプロモーター活性を見出したことは、我々がヒトp75TNF受容体遺伝子のプロモーターの少なくとも1つをクローン化した強力な証拠である。プライマー伸長分析およびRACEにより、遺伝子の5'末端がどこにあり、p75TNF-R遺伝子の発現が異なるプロモーター領域によって制御されるばあいはこの遺伝子のどのような産物がえられるかがわかるであろう。(実施例1および2に記載したように)全5'上流プロモーター

10

20

30

40

50

領域もしくはそれらの一部分、または全イントロンプロモーター領域もしくはそれらの一部分をコードする、多数のクローンが誘導された。5'上流およびイントロンプロモーター領域の活性は、これらの領域をルシフェラーゼをコードするベクターに挿入し、続いてこれらがルシフェラーゼ遺伝子の発現をポジティブに制御することが可能であることを示すことにより証明された(実施例3)。

p75TNF-R遺伝子の5'上流領域および第1イントロン領域に位置するプロモーター配列の検討(以下の実施例2参照)により、たとえば、TATAボックス、CAP部位ならびにAP-2およびNF-κBのコンセンサス配列を含む、誘導剤の影響を受ける転写因子に応答させるかもしれない様々な配列モチーフを明らかにする(図2Aおよび2Bも参照)。これらの調節要素は、炎症部位で形成される特定のサイトカイン類の効果によっておそらく、受容体の構成的発現のパターンに重ね合わされた、誘導された一時的変化を可能にするかもしれない。

プロモーター領域(5'上流および第1イントロン領域)内に認められた推定モチーフのうち、つぎのもの、すなわち5'上流プロモーター領域に存在する3つの規定(canonical)TATAボックス、そのうちの2つにはきわめて接近してCAP部位が続く、3つの、接近して位置し、かつ等間隔に位置するカップ-E2モチーフ、4つの隣接するGCボックス、ならびにNF-κB、サイトカイン-2モチーフおよびAP-2を含む、p75TNF-R発現を増強することが知られているいくつかの誘導因子の効果を媒介するいくつかの転写因子の結合モチーフは、とくに興味深いものであると思われる。第1イントロンプロモーター領域とくに第1イントロンの3'末端に、ほかのものに囲まれてTATAボックスが存在し、25bp下流のCAP部位およびp55TNF-Rプロモーター領域に2回現れるTCC繰り返しモチーフが3回これに続く。

したがって、p75TNF-R遺伝子の5'上流プロモーター領域は、p75TNF-R遺伝子のプロモーター活性、すなわち、最終的に正常なp75TNF-R受容体産物を産生する結果となるような遺伝子の発現の制御、に必要な領域であり、一方、第1イントロンのプロモーター領域は、p75TNF-R遺伝子が別の形態の受容体をコードすることを示している。さらにまた、第1イントロンのプロモーター領域はp75TNF-R遺伝子の転写に関するエンハンサー要素としても機能する。さらに、第1イントロンのプロモーター領域は活性イントロンプロモーター領域の上流に転写抑制領域をも含み、この抑制領域は別の形態のp75TNF-Rの発現の調節に関与する可能性がある。

また、本発明は、薬学的に許容しうる担体ならびに本発明の配列モチーフもしくはモチーフ領域を含有する医薬組成物にも関する。これらの組成物は、内在的に存在するか、あるいは外因的に投与されたかのいずれかの過剰のTNFによって引き起こされるいかなる疾患に対しても用いることができる。疾患の例は、敗血症性ショック、移植片対宿主反応、リウマチ性疾患およびほかの自己免疫疾患である。

投与方法は、類似薬剤の許容しうる投与様式のいかなるものであってもよく、治療しようとする状態に依存し、必要に応じて、たとえば、静脈内、筋肉内、皮下、局所注射または局所適用である。

本発明の医薬組成物は、活性成分、すなわちモチーフ配列、を選択された標的細胞、すなわちp75TNF-Rを発現する細胞、に導入するために設計されたものである。ここで、p75TNF-Rの発現はそのプロモーターの制御によって制御されることが望ましく、その制御はプロモーター活性の増強であっても抑制であってもよい。そのようなモチーフ配列を細胞に導入するための多くの操作が公知である。たとえば、

(i)標準的な操作により組換え動物ウイルスベクター(たとえば、ワクチニア由来)を構築することが可能である。ここで、前記ウイルスのDNAには2つの遺伝子が導入され、その1つは標的細胞が特異的に発現する細胞表面タンパク質に結合するリガンドをコードし(たとえば、CD4リンパ球および関連白血病のばあい、AIDS gp120タンパク質がこれらの細胞に特異的に結合する)、したがって、この遺伝子の発現により前記ウイルスが特異的に所望の細胞を標的とする。2つ目はモチーフ配列をコードし、この遺伝子はウイルスを介してこれらの細胞内に導入され、続いて発現する。

10

20

30

40

50

(ii)細胞に導入することが可能なモチーフ配列をコードするオリゴヌクレオチド配列を軟膏の形態で調製することが可能である(たとえば、イボ誘導因子、パピロウイルスをブロックするオリゴヌクレオチド配列が軟膏製剤を用いて皮膚細胞に導入されるイボ治療に用いられるように)。前記オリゴヌクレオチド配列を前記組換え動物ウイルスを用いて細胞に導入することが可能であり、ここで、このウイルスによって担持される第2配列がオリゴヌクレオチド配列となる。

(iii)近年開発されたリボザイムアプローチを用いることが可能である。リボザイムはRNAを特異的に切断する触媒性RNA分子である。リボザイムは、選択した標的RNA、たとえば、本発明の新規なタンパク質および因子をコードするmRNAまたは本発明のモチーフ配列をコードするmRNA、を切断するように工作されてもよい。このようなリボザイムは、選択したmRNAまたはモチーフ配列に特異的な配列を有し、それらと相互作用(相補的結合)したのちそのmRNAまたはモチーフ配列を切断し、その結果抑制することが望ましいタンパク質または抑制することが望ましいモチーフ配列の発現を低下(または完全に消失)させる。ここで、発現の低下のレベルは標的細胞中におけるリボザイム発現のレベルに依存する。選択した細胞(たとえば、p75TNF-Rを担持するもの)にリボザイムを医薬組成物の形態で導入するために、この目的に通常用いられる適切なベクター、たとえば、プラスミド、動物ウイルス(レトロウイルス)ベクター、のいかなるものを用いてもよい(ウイルスが、選択したリボザイム配列をコードするcDNAを第2配列として有するばあいには、前記(i)も参照)。さらに、たとえば、1またはそれより多くのタンパク質または本発明の配列モチーフの発現の抑制に用いることが可能な、複数の標的を有するリボザイム(多標的リボザイム)を構築することができる(リボザイムに関する方法などの再検討には、65~73を参照)。

このように、この医薬組成物は前記組換え動物ウイルスを活性成分として含有するものでもよく、あるいは、モチーフ配列をコードするオリゴヌクレオチドを含有する軟膏であってもよい。投与される活性化合物の量は、投与経路、治療しようとする疾患および患者の状態に依存する。

本発明をつぎの実施例により説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

細胞系および培養条件:

ベビーハムスターの腎臓(BHK)細胞を成長させ、標準BHK細胞培養条件(DMEM + 10% FCS + 2 mM グルタミン)中に維持した。

実施例 1

p75TNF-R 遺伝子の5'領域を含むクローンのクローニングおよび分析

2つのヒトゲノムライブラリーをヒトp75TNF-R(TNF-RIIとしても知られる)をコードする全長cDNAを用いて(標準のハイブリダイゼーション法を用いて)スクリーニングした。このcDNAはスミス(Smith)ら(10)の配列のうち塩基90~1475の配列を含んでいた。組換えファージライブラリーの形態のつぎのヒトゲノムライブラリー、すなわちヒト染色体1に特異的なATCCライブラリー(ATCC番号57738)およびストラタジーンヒトリンパ球ライブラリー(ストラタジーン番号943202)を用いた。ATCCライブラリーの数回のスクリーニングでは、ポジティブのファージは見られなかった。すなわち、p75TNF-R cDNAプローブとハイブリダイズしている配列を含むファージはそのライブラリーには含まれていなかった。ストラタジーンライブラリーのスクリーニングでは8つのポジティブファージが示され、そのうちの6つは、制限酵素比較分析によって示されるように、互いに異なっていた(結果は示さず)。

前記の異なるポジティブファージのうちの2つ、UおよびHという、をp75TNF-R cDNAの異なるフラグメントに対するハイブリダイゼーションによりさらに検討した。UおよびHの両者とも、非翻訳領域(UTR)を含むcDNA 5'末端の250 bp フラグメントにハイブリダイズしたが、前記250 bp フラグメント内のその5'末端の先端に含まれるやや短い160 bp フラグメントcDNAにはハイブリダイズしなかった。前記の異なるファージのうち3番目のファージ、Gという、は前述のcDNA 5'領域の

160bpフラグメントを用いて単離された。したがって、Gもまたp75TNF-R遺伝子の5'領域をコードしている。

5' cDNAフラグメント(プローブ)に対するハイブリダイゼーションによる3つのファージ(U、H、G)のさらなる特徴付けによって、(i)UおよびHについては、大きさが1.9および3.6kbのこれらファージに含まれるp75TNF-R配列からえられる2つのSmaI制限フラグメントが前述の250bpのcDNAプローブにハイブリダイズし、(ii)Gについては、ファージGに含まれるp75TNF-R配列からNcoI、EcoRIおよびPstIフラグメントのすべてをえたとき、前記160bpのcDNAプローブが大きさが2および1.1kbの2つのNcoIフラグメントにハイブリダイズし、2.4kbのEcoRIフラグメントおよび1.5kbのPstIフラグメントにもハイブリダイズする、ということが明らかになった。そのうち、250または160bpのcDNAプローブにハイブリダイズする、ファージU、HおよびGからえられる前述のすべてのフラグメントをプラスミドにサブクローン化した。サブクローニングは、プラスミドpBluescript(ストラタジーン)を用いて、標準の操作からなる方法により行った。サブクローニングに続いて、ファージU、HおよびGのサブクローン化された種々のフラグメントを制限酵素分析により分析し、制限酵素地図をえた。ヒトp75TNF-R遺伝子の5'領域を含むプラスミドクローンの制限酵素地図(一部)を模式的に図1に示す。図1に示したプラスミドはファージG由来のものであった(gNco1、gNco2、gPst、gEco、およびgNco2の下に示されているgNco2の種々のサブクローン類)が、SmaIクローン(USm1)はファージU由来であったことに注目すべきである。図1において、黒の縦線は現在シーケンスした領域(すなわち、サブクローンgNco2、gNco1およびUSm1から、以下の実施例2を参照)を示し、囲みはスミスら(10)の既知のcDNA配列領域を示し、そしてエキソン/イントロンの境界は「GT」(イントロンIの始まり/エキソンIの終わり)および「AG」(エキソンIIの始まり/イントロンIの終わり)により示されている。

前記ストラタジーンライブラリーのファージがp75遺伝子のゲノム構成(organization)に相当し、組換えの結果ではないことを確かめるために、つぎのテスト(または「縦点検(check-ups)」)を行った。

(i) 1.9kbのSmaIフラグメントがゲノムSmaIフラグメントに相当するということは、2種の独立したファージ(UおよびH)が250bpのcDNAプローブにハイブリダイズする同一のフラグメントを含む、という事実から間接的に示しうる。

(ii) 唯一単離されたファージGのまさに(the very)5'領域(すなわち、p75TNF-R遺伝子5'末端の先端)がゲノム構成に相当するかどうかをテストするために、このファージの制限パターンとU937細胞由来のネイティブのゲノムDNAのパターンとの比較を、BamHI、EcoRIおよびPstIを用いて前記ファージおよびゲノムDNAを消化し、続いて2kbのNcoIフラグメント(サブクローンgNco2由来)とのハイブリダイゼーションにより行った。ゲノムとファージの制限酵素パターンならびに2kbのNcoIフラグメントプローブに対する制限酵素フラグメントのハイブリダイゼーションとを比較することにより、ファージDNAとゲノムDNAの両者はこのプローブにハイブリダイズする同一のフラグメントと同一の制限酵素パターンを有することが示された(結果は示さず)。したがって、唯一単離されたファージGはp75TNF-R遺伝子5'領域の実際のゲノム構成に相当する。

さらに、前記クローニング、ハイブリダイゼーションおよび制限酵素分析から、つぎの事実が明らかになった。a) 公表されたcDNAの初めの部分(90~1475bp)をプローブとして用いることにより、約15~20kbpのインサートをそれぞれ有する8つの独立したファージ(そのうち6つは互いに異なっている)をストラタジーンライブラリーから単離することができ、このことにより、p75TNF-R遺伝子はかなり大きく、数ダースkbpにわたって広がっていることが暗示され、そしてb) ファージUおよびHは、独立する一方、p75TNF-R遺伝子のまさに5'領域を含まなかったという事実からみて、第1イントロン(イントロンI)もまたかなり長い(>10kb)。

実施例 2

p 7 5 T N F - R 遺伝子 5' 領域のシーケンスおよびキャラクタリゼーション

p 7 5 T N F - R 遺伝子 5' 領域の構造、すなわちプロモーター領域の位置および特性を解明するために、種々のクローン (pBluescriptにおけるサブクローン、前記実施例 1 参照) を部分的にまたは完全にシーケンスした (図 1 の黒い縦線を参照)。とりわけ、クローン g N c o 2 および U S m 1 を完全にシーケンスし、一方クローン g N c o 1、g P s t および g E c o を部分的にシーケンスした。図 2 (A および B) に、十分にシーケンスされた p 7 5 T N F - R 遺伝子 5' 領域の 2 カ所の配列を模式的に示す。シーケンスは標準の操作で行われ、前記 pBluescript 中のクローンはシークエナーゼ・バージョン 2.0・キット (Sequenase Version 2.0 kit、ユー・エス・ビー (U S B)) を用

いるかまたはアプライド・バイオシステムズ・自動シーケンサ (Applied Biosystems Automated Sequencer)、(Model 737A DNAシーケンサ (Model 737A DNA Sequencer)、アプライド・バイオシステムズ、米国) を用いて自動的かのかのいずれかにより両方向からシーケンスした。シーケンスに続いて、一般的なシーケンス分析を G C G (ジェネティクス・コンピュータ・グループ (Genetics Computer Group)、マディソン (Madison)、米国、標準コンピュータソフトウェアパッケージ (Standard computer software package)) パッケージを用いて行い、特定のシーケンス分析、すなわち転写因子結合モチーフの同定を、前記標準ソフトウェアパッケージの FINDPATTERNS オプションを用いて行った。図 2 A に、第 1 エキソンおよびエキソン/イントロン境界 (スミスらの c D N A 配列 (10)) を考慮することにより決定された第 1 エキソン配列およびエキソン/イントロン境界) を含

む p 7 5 T N F - R 遺伝子のまさに 5' 領域配列を示す。c D N A のアミノ酸配列はヌクレオチド配列の上に示す。ほかの転写因子結合部位 (たとえば、カップ - E 2 部位および G C - ボックス) と同様に規定の 4 つの T A T A - ボックスに下線をひく。アスタリスク (*) はスミスら (10) の c D N A の開始点を示す。図 2 B に、第 1 イントロン末端および第 2 エキシソンの一部の配列 (これもまた、スミスら (10) の c D N A 配列からの情報にもとづく) を示す。推定の T A T A - ボックス、T C C 繰り返しである S 1 ヌクレアーゼ高感受性部位 (S 1 - H S)、C A P - 部位、および種々のほかの推定の転移因子結合部位に下線をひく。c D N A のアミノ酸配列はヌクレオチド配列の上に示す (すなわち、これは第 2 エキシソンの開始点である)。

シーケンス分析により p 7 5 - T N F - R 遺伝子 5' 領域のつぎの特有の特徴がわかった。

(i) p 7 5 - T N F - R 遺伝子 5' 末端の先端 (すなわち、図 2 A の配列および図 1 に示し、かつ実施例 1 に記載したファージ G の種々のサブクローンのシーケンスされた領域) において、この領域における c D N A 配列と我々のゲノム 5' 領域クローンとの比較により、c D N A 配列の塩基 1 ~ 166 は同一の領域、すなわちアミノ酸 1 ~ 26 のコード配列を含むこの領域の 3' 末端において我々の配列と一致し、そして、イントロンの 5' 境界で特有の G T ジヌクレオチドコンセンサスプライス部位を有するイントロン配列が連続的に続くことがわかった。前述の配列の前には、公表された c D N A 配列 (10) の 89 ヌクレオチドの 5' 非翻訳領域 (U T R) がある。p 7 5 - R c D N A について同様の U T R 長が別のグループによって記載されている (35) ので、p 7 5 T N F - R メッセージ (message) の真正 (genuine) サイズに相当するであろう。転写開始部位であるかもしれないこの U T R 配列における 1 番目のヌクレオチドをアスタリスクで示す。その上流の配列は 3 つの規定の T A T A - ボックスを含み (図 2 A の配列の 1139 位、1183 位および 1431 位) さらに 1318 位に従来とは異なる T A T A - ボックスを含む。前記 T A T A - ボックスのうち、1318 位および 1431 位の 2 つのあとに C A P - 部位が続く。しかしながら、両者のばあいにおいて、C A P - 部位と T A T A - ボックスとの間の距離は異常に小さい (5 b p)。1 つ (またはすべて) の前記 T A T A ボックスが機能的に活性であることは、標準の分析により決定することができる。この配列には C C A A T - モチーフは存在しない。転写開始部位の定義に関連すると示されたイニシエーターモチーフ (36) に類似の配列は、1918 位に位置している (Y Y 1)。2 つの重な

10

20

30

40

50

っているGC - ボックスは、図2Aの配列の1938位および1943位に存在し、ほかの2つは2082位および2164位に存在する。前記2つの重なっているGC - ボックスは、22bpのGC - ストレッチ内に存在する。そのような長さのGC配列は転写因子ETFの結合部位として提案されている(37、38)。1566位では、HMG I - 結合モチーフとして働くことのできる31bpのAT - リッチの配列がある。あるプロモーターでは、そのようなモチーフがプロモーター効力に寄与することが示されている(39)。イムノグロブリンカッパL鎖遺伝子のエンハンサーの一部を構成(40)する、カップE2モチーフの3回の繰り返しが図2Aの配列の1732位、1747位および1762位にみられる。3回の繰り返しはきわめて接近し、同一の2つのヘキサヌクレオチド(AGGCCG)によって等距離に位置する。

10

5'フランキング配列における推定の転写因子結合モチーフ間では、p75 - Rの発現に影響を与えると示される試薬に対する応答を与えることのできる数種が存在する。図2Aの配列の130位(リバーズ)、194位(リバーズ)および577位にNF - κBモチーフ(32)をならびに194位でNK - κBモチーフに重なるサイトカイン - 1モチーフと相同な部位(41)をこれらは含む。NF - κB部位がTNFおよびIL - 1に対する応答性を与うる(42)一方で、サイトカイン - 1モチーフはTNF誘導因子と結合する。TNFおよびIL - 1の両者は、ある細胞でp75 - Rの発現を促進することが示されている(43、44)。反復の形態でインターフェロン応答モチーフを構成するヘキサヌクレオチド、AAGTGA(45)が、599位(リバーズ)、1356位(リバーズ)および1616位にある。最近定義されたコンセンサス配列であり、インターフェロン誘導転写因子、IRF - 1と結合する、F6コンセンサスG A / G A A G C N G A A A G(46)は、1982位(リバーズ)に位置する。AP - 2のコンセンサス部位、T / C C G / C C C A / C N G / C G / C G / C(47)は、潜在的な(potential)ETF部位と重なる1938位でみられ、このエレメントのリバーズコピーは、図2Aの配列の269位、874位および1904位に位置する。しかしながら、このコンセンサス配列は、ほぼ完全に縮重した塩基からなっているので、その大きさは不確かである。AP - 2はcAMPに対するのと同様にPMAに対する応答に関係している(33)。両試薬はp75TNF - Rメッセンジャーを誘導することがわかっている(48、49、50)。cAMP応答エレメント、TGAGTCA(51)に類似の配列が、2カ所の不適合(ミスマッチ)があるが、1242位に見出される。p75メッセンジャーもまた、TおよびB細胞活性化を誘導することが報告されている。この過程では、8量体結合因子(BおよびT細胞用)(52、53)およびIL - 4プロモーター、CGA A A A T T T C CのP配列に結合する因子(T細胞用)(54)が役割を果たすことがわかっている。8量体 - モチーフに類似の配列ATGTA A A Tが図2Aの配列の918位に見出され、Pコア配列、A A A T T T T Tが1222位に見出される。

20

30

(ii)イントロン配列：第1イントロンのみが部分的にシークエンスされた(図1の黒い縦線参照、図2Aの配列の末端、すなわちGTジヌクレオチドから始まり、そしてシークエンスされていない長い(約10kb)ストレッチののち離れて図2Bの完全な配列まで、示されている翻訳された配列のすぐ直前のAGジヌクレオチドを含む)。

cDNAとクローン化された1,828bpのゲノムSma Iフラグメント(図2B)の配列との比較により、それはそのまさに3'末端にcDNAの延長を含み、イントロンの3'境界、すなわち3'コンセンサスプライス部位：(C/U)₁₁NCAG(5)に特有のAGジヌクレオチドを再び有する。それはp75TNF - Rのリーダーにおいて、Val27に始まる、図2Bの配列の1795位のコード配列の前にある。したがって、この配列はp75TNF - R遺伝子の第1イントロンの一部であると考えられる。驚くべきことに、このイントロン配列内(図2Bの下線部参照)に、プロモーターおよびサイトカイン誘導性の特徴である数カ所の部位または領域を定義することができであろう。630位に規定のTATA - ボックスがあり、その26bp下流にイニシエーター結合部位YY1(36)に類似の配列が続いている。TATA - ボックスの上流にCCAAAT - モチーフは認められないが、そのエレメントの逆方向のコピーが、イニシエーターモチーフの

40

50

下流のちょうど668位に見出される。様々なプロトオンコジーンおよびハウスキーピングプロモーターに見られる、TCC繰り返しモチーフが、p55TNF-Rプロモーターで2回繰り返される(56)と同様に、図2Bの配列の238位および1310位(逆方向)に見出される。

イントロン配列はまた、p75-R発現の調節に加わるかもしれない転写因子のコンセンサス部位を含む。これらは、255位にNF-Bコンセンサス配列を(32)、288位と422位にヒトGM-CSFプロモーターに見出されるようにサイトカイン-1モチーフ(これもTNFに対して応答すると報告された)の形態の2つのコピーを(41)、388位、567位(リバース)および757位にインターフェロン-応答配列、AAGTGA(45)(前記参照)を、709位にサイトカイン-2エレメントを(57)、そして359位、406位および774位にAP-2コンセンサス配列の3つの逆方向のコピーGGG/CCTA/TG/CG/CCを(47)含む。グルココルチコイドレセプターのコンセンサス部位、AGAWCAGW(58)は1025位に認めることができる。この部位はグルコステロイド類によってU937細胞におけるp75-R mRNAについて報告されているアップレギュレーション(upregulation)(59)に寄与しているかもしれない。cAMP-応答エレメントTGACGTCA(51)に類似するが、2カ所不適合がある配列を、381位および530位にみることができる。

p75TNF-R遺伝子のイントロンに意外にもプロモーター活性が見出されたことは、この既知のレセプターのほかに、この遺伝子にさらなる翻訳産物が存在する可能性があることを示している。この配列には推定のイニシエーション結合モチーフの下流に多数のATGが存在している。最も長いORF(150bp)の前の874位に見出される1つは、最も完全なコザック-ボックス内に位置している。この点から始まる、推定の50アミノ酸配列は、スイス-プロテイン・データベース(Swiss-Protein data base)の中のいかなるタンパク質とも類似性を示さなかった(FASTAプログラムを用いてチェックした(GCG、1991、参考文献番号60参照)。イントロンの3'末端に接近する1768位に、レセプターのコード配列を有するフレームの状態、ATG開始コドンがある。このATGを囲む配列は、コザックによって提案されたコンセンサス配列(61)とうまく一致しない、というのもそれは、コザックにより分析された699配列のうちたった1%だけ見出される、-3位のTを有するからである。しかしながら、p75TNF-Rの翻訳開始点もまた、この配列の3%だけその-3位にCが見出されるので、コンセンサス配列と正確には一致しない。この「イントロンの」ATGで翻訳が開始されることは、記載されたTNF-Rのリーダー配列の主な部分を構成する26のN末アミノ酸がほかの9残基によって置換されている、不完全な形態のレセプターが生じることになり、その結果、このタンパク質産物は細胞内タンパク質となるかもしれない。分泌されることがわかっているタンパク質もまた、IL-1レセプターアンタゴニストについて示されたように、細胞内の形態で存在することも注意すべきである。さらにほかの可能性は、リーダー配列ばかりではなく、細胞外ドメインも欠いているレセプターをコードするmRNAの翻訳がSmaクローンのcDNA下流部内のMetで開始されるということである。

いずれにしても、前述の分析から、p75TNF-R遺伝子のイントロン配列内のプロモーター領域は2つの新規タンパク質すなわち、新規なタンパク質および新規なリーダー、をコードするように思える。しかしながら、クローン化された第1イントロン領域、とくにクローン化された約1.9kbのイントロン領域(つぎの実施例3参照)についての我々の最近の欠失分析では、提案されている新規なタンパク質の上流に、活性プロモーターはなく、したがってその新規なタンパク質がどのようにして発現されるかということとは明らかではない。よって、p75-TNF-R遺伝子の第1イントロン内の配列(観察されたORF)によってコードされる、そのような新規なタンパク質はおそらく発現されないであろう。しかしながら、新規なリーダー配列は、ストロングなプロモーターがそのリーダーの開始点のちょうど上流に存在することを示す、この最近の欠失分析を考慮すれば、きわめて可能性があると考えられる。

つぎの配列は、この新規なリーダーの配列であり、ヌクレオチドの番号付けは図2Bに示

10

20

30

40

50

したものに対応する。

新規なリーダー
1768/1

ATG GCA GTC TTC CCT TCT TCC TTC CAG GTG GCA TTT ACA CCC TAC
Met ala val phe pro ser ser phe gln val ala phe thr pro tyr
GCC CCG GAG CCC GGG
ala pro glu pro gly

前記配列では配列の番号付けが図2Bのようにヌクレオチド配列で始まり、続いてアミノ酸配列の番号が付く、たとえば初めの配列（新規リーダー）ではヌクレオチド配列は1768～1827であり、アミノ酸配列は1～20である、ことに注意すべきである。

10

さらに、前述の新規なリーダー産物の発現を調節する能力を有するほかに、プロモーター配列のイントロン領域がp75TNF-R遺伝子の転写のためのエンハンサーエレメントとして機能するかもしれない、という可能性もある。

また、イントロンプロモーター領域が活性なイントロンプロモーターの上流に転写抑制領域を含み、この抑制領域がp75TNF-R遺伝子の発現、とくに前記新規なリーダーから始まる新規なp75TNF-R産物の発現、すなわち本来のp75TNF-Rの不完全な形態のモジュレーションに関係していることが今見出された（つぎの実施例3参照）。

p75TNF-R遺伝子の2カ所のプロモーター領域（5'上流のプロモーターおよびイントロンのプロモーター）の前述の配列分析をさらに明確にするために、クローンGからの配列（5'上流プロモーター領域）およびクローンUからの配列（イントロンプロモーター領域）ならびに「ref」として示される既知の配列モチーフの比較についての概要をつぎに記す。

20

モチーフは2つのグループに存在する、すなわちそれらはほかの人によって報告された正確な形態にみられる（「不適合（ミスマッチ）なし」）とわずかに異なる形態にみられる（「不適合（ミスマッチ）」）。したがって、各モチーフに対してつぎの情報が与えられる、すなわちモチーフの名称およびその報告されたヌクレオチド配列ならびに本発明のp75-Rプロモーター配列に見出される関連配列である。

前記情報はつぎの方法で表される、すなわち、

30

(i)関連するモチーフを我々が観察したファージ。Gは、5'上流プロモーター配列が見出されたファージクローンを表す。Uは、イントロン内にプロモーター配列が見出されたファージクローンを表す。

(ii)我々がモチーフとモチーフの正確な配列を観察した、図2A（クローンG）および2B（クローンU）に関する配列内の位置ならびに

(iii)ref、すなわちモチーフが定義された（その正確な配列を含む）文献に関する。

つぎにあげたモチーフのいくつかは、前記に記載されておらず、5'上流および第1イントロンプロモーター類の追加の推定モチーフであることに注意すべきである。

不適合なし

インスリン

インスリン

GTGGAAA

G 537 : AACAT GTGGAAA CCAGG

ref :

インスリン 0 GTGGAAA セル(Cell) 45 : 35-44 (1986)

10

AP-2

G :

AP-2_CS4

YCSCCMNSSS

1,938 : TGGCC CCGCCCCGCC CCGCC

1,943 : CCGCC CCGCCCCGCC GCCTG

20

AP-2_CS4 / Rev

SSSNKGGSGR

269 : GTTGA GGGTTGGGGG TGCAG

874 : AAGTG GGGATGGGGG GACAG

1,904 : GGAGG GCGGTGGGGG AGGCG

1,905 : GAGGG GCGTGGGGGA GCGGT

AP-2_CS5

GSSWGSCC

840 : CGCAG GGCTGGCC CTGTA

1,335 : ACCTT GGGAGGCC AGAGG

1,930 : AGGCC GGCTGGCC CCGCC

1,953 : CCGCC GCCTGGCC TCTGG

AP-2_CS5 / Rev

GGSCWSSC

839 : CCGCA GGGCTGGC CCTGT

856 : TATTA GGGCTGGC ACTCA

30

U :

AP-2_CS4 / Rev

SSSNKGGSGR

1,691 : AGACT GGCAGGGGGA GGGCC

40

AP-2_CS5 / Rev

GGSCWSSC

359 : TTGTT GGCCAGGC TGGTC
 406 : GCTTC GGCCTCCC AAAGT
 774 : AGGGA GGGCTCCC AGGAG

ref :

AP-2_CS4 0 YCSCCMNSSS (33)

AP-2_CS5 0 GSSWGSCC (47)

AP-3

G:

AP-3_CS TGTGGWWW

536 : AAACA TGTGGAAA CCAGG

ref :

AP-3_CS 0 TGTGGWWW ヌクレイック・アシッズ・レス 20 : 3-26 (1992)
(Nucleic Acids Res.)

NF-kB

G :

NFkB_CS1 GGGRHYYHC

577 : GAGGT GGGGTTTTCC ATCCC

NFkB_CS1 /Rev GDRRADYCCC

130 : AAGGG GAGAAGCCCC ATGTT

194 : CCTGG GAGGATCCCC ACCTT

NFkB_CS4 GGGRNYYC

577 : GAGGT GGGGTTTTCC CATCC

U :

NFkB_CS1 GGGRHYYHC

255 : GTTCA GGGGATTCTC CTGCC

256 : TTCAG GGGATTCTCC TGCCT

NFkB_CS4 GGGRNYYC

256 : TTCAG GGGATTCTC CTGCC

NFkB_CS4 /Rev GRRANYCCC

1,460 : GTGCT GAGAACCCC CGTTC

ref :

NFkB_CS1 0 GGGRHYYHC (32)

10

20

30

40

NFkB_CS4 0 GGGRNTYYC ヘマトール・ブラットトランスファス 32:411-415
(1989) (Hematol Bluttransfus)

CK-2 (サイトカイン -2)

U :

CK-2 TCAGGTA
709 : CTGTC TCAGGTA GGGTC

ref :

CK-2 0 TCAGGTA (57)

10

INF

G :

INF.1 AAGTGA
1,616 : TAAAT AAGTGA ATGAT

INF.1 /Rev TCACTT

599 : GGGAG TCACTT CCCAG
1,356 : GAAGA TCACTT GAGGG

20

U :

INF.1 AAGTGA
388 : ACCTC AAGTGA TCCAC
757 : TGTGA AAGTGA TTTGC

INF.1 /Rev TCACTT

567 : CTCTG TCACTT ACCAG

30

ref :

INF.1 0 AAGTGA (45)

SP-1

G :

Sp1-ras1.3 /Rev GCGGCGCGGCG
1,935 : GGCTG GCGGCGCGGCG GCGGCG
1,940 : GCGGCG GCGGCGCGGCG GCGGCG

ref :

Sp1-ras1.3 0 GCGGCGCGGCG サイエンス 232 : 1410-3 (1986)
(Science)

40

IL-6

G :

F6_CS /Rev STTTCNTTYC
 18 : GTGCC CTTTCCTTCC CAAAC

IL-6_RE1 /Rev TTCCCAG
 169 : ATTCG TTCCCAG GATGG
 553 : GTGAT TTCCCAG CCTCC
 603 : GTCAC TTCCCAG TTTCT

U :

IL-6_RE1 CTGGGAA
 11 : GGGTC CTGGGAA GGCAC

10

IL-6_RE1 /Rev TTCCCAG
 1,357 : AGGGC TTCCCAG AGGAG

;IL-6_RE1 0 CTGGGAA エム・シー・ビー (MCB) 13, 1183 (93/2月)

ref :

F6_CS 0 GRAANGAAAS (46)

;IL-6_RE1 0 CTGGGAA エム・シー・ビー (MCB) 13, 1183 (93/2月)

20

oct2 (B 細胞 ディペロブメント)

OCT 2 ATGYAAAW
 918 : TCATG ATGTAAAT CCTGG

ref :

OCT 2 0 ATGYAAAW (52)

30

GCRE (グルココルチコイド レセプター)

GCRE /Rev GAGTCA
 56 : CCCTG GAGTCA AGAAC
 596 : CCAGG GAGTCA CTTCC

U :

GCRE /Rev GAGTCA
 1,553 : CAGCA GAGTCA GTGCT

40

ref :

GCRE 0 TGA CTC セル 43 : 177-88 (1985)

不適合

cAMP

1 TGACGTCA
 1,242 : TCCTA tgaggtca GTTCA mis=1

U :

1 TGACGTCA
 381 : ACTCT tgacctca AGTGA mis=1
 530 : AGCTG tgaagtca GACAG mis=1

ref :

cAMP_RE 0 TGACGTCA (51)

NF-P (T 細胞 ディペロブメント)

T-ACT /Rev AAATTTTcc
 1,222 : TCTTT AAATTTT TAGAA

ref :

T-ACT 0 AAAATTTCC (54)

ビタミン D (VDRE)

gnco2.seq x vdre April 10, 1994 17:54.....

1536 GCTATGGGTGAAAGAG 1551
 1 GCACTGGGTGAATGAG 16

ref :

VDRE 0 GCACTGGGTGAATGAGGACATTACTGAC J Cell

バイオケム(Biochem) 49 :37

P53

p53_RS AGGCATGCCT
 G 1,708 : GGGAC aggggaagcct GTGGG mis=2

p53_RS AGGCATGCCT
 U 1,573 : CCTGC agacatgact AGGGT mis=2
 U 1,736 : GCATC aggcattggca GAACC mis=2

ref :

p53_RS 0 AGGCATGCCT ネイチャー・ジェネット 1 : 45-9 (1992)
 (Nature Genet)

YY1 (イニシエーター)

G : gtctccannnnnnnnng
 YY1 1,918 : GAGGC gtgtccaaggccggctg GCCCC mis=1

10

20

30

40

CK-1 0 GAGATTCCAC (57)

機能分析 - p75TNF-R 遺伝子の 5' 領域および第 1 イントロン領域のプロモーター活性

p75 レセプター遺伝子のいくつかの5'領域について機能的な重要性への最初の洞察を与えるために、ルシフェラーゼリポーター遺伝子を担持するベクターに数種の領域をクローン化した。構築物をBHK細胞にトランスフェクトした。これはプロモーター活性について最初の着想を与えるためには最も好都合な系であることを我々の手によって証明した。我々のおもな興味はp75-TNF-R遺伝子のまさに5'部であったが、イントロンに推定のTATA-ボックスおよびCAP-部位を見出したことによりこの領域も機能的アクセシビリティでテストすることになった。

p75TNF-R 遺伝子のプロモーター（類）の機能的アッセイのために、つぎの操作を行った。すなわち、サムロック(Sambrook)ら（31）にしたがい、カルシウム-リン酸法によって、BHK細胞をトランスフェクトした。各実験において、10gのプラスミドDNAをセミ-コンフルエントな6cm皿にトランスフェクトした。一晚（8～12時間）インキュベーションしたのち、PBSで細胞を3回洗浄し、新鮮な培地で補足した。さらに24時間インキュベーションしたのち、細胞を採取し、ルミトロン・ルミノメータ・セット(Lumitron Luminometer set)を用いて、10秒のインテグレーション(integration)で溶菌液の上清におけるルシフェラーゼ活性を測定した（62）。値は相対光単位(RLU)として計算した。ルシフェラーゼ遺伝子をコードする種々のベクターは、異なるプロモーターをそれらにクローン化し、つぎのようにしてルシフェラーゼ遺伝子の発現を制御した。すなわち、

i) CMV: ポジティブ・コントロール (CMV - プロモーターの制御下のルシフェラーゼ遺伝子)、LUC - 0: ネガティブ・コントロール (配列を調節することのないルシフェラーゼ遺伝子)、gBX: 「センス」オリエンテーション (orientation) に ATG がない p75 - TNF - R 遺伝子の 5' 領域 (図 2A の nt 1 ~ 2089)、gBS: 「アンチセンス」オリエンテーションに ATG がない 5' 領域 (図 2A のヌクレオチド 1 ~ 2089)、UsBX: 「センス」オリエンテーションにおけるイントロンフラグメント (図 2B の nt 1 ~ 1827)、UsBH: 「アンチセンス」オリエンテーションにおけるイントロンフラグメント (図 2B の nt 1 ~ 1827)、UBX: 「センス」オリエンテーションに ATG がないイントロンフラグメント (図 2B の nt 1 ~ 869)、UBS: 「アンチセンス」オリエンテーションに ATG がないイントロンフラグメント (図

2 B の nt 1 ~ 869)。

前述のように、様々の推定プロモーター担持フラグメント（およびコントロールプロモーターおよびフラグメント）は、プロモーターのない、発現ベクター p B L C A T 6 (6 4) で C A T 遺伝子と置換されるルシフェラーゼ遺伝子を含む (6 3) ルシフェラーゼベクター L U C O にクローン化されたことに注意すべきである。

3つの独立したトランスフェクションおよびそれに続くルシフェラーゼアッセイの平均的な結果（標準偏差）を図3に示す。まさに5'領域（g B X）はポジティブコントロール（C M Vプロモーター）と比べてきわめて高い活性を示す。シャープな活性の低下が観察されるアンチセンスオリエンテーション（g B S）における同一のフラグメントで示されることができるよう、この領域のプロモーター活性はオリエンテーション依存である。興味深いことに、イントロン領域（U s B X）もまた著しいプロモーター活性を示し、ここでもまたアンチセンスオリエンテーション（U s B H）での内部制御はかなり低い活性を示す。観察されたプロモーター活性は下流部（すなわち、U s B Xの適当な「センス」オリエンテーション）によっておもに決まることが示されているので、イントロンプロモーターのこの活性は、第1のA T Gの上流部（U B XまたはU B S）のみがルシフェラーゼ遺伝子に連結するばあいには、もはや検出することはできない。これらの2つの推定プロモーターを標準的な操作によりさらに分析する。

p 7 5 T N F - R 遺伝子の5'プロモーター領域および第1イントロンプロモーター領域の欠失分析

5'上流のプロモーターおよびイントロンプロモーターを含むプロモーター領域の欠失分析を活性プロモーターを決める配列領域をより正確に確かめることにより行った。この目的で、追加の構築物を前述のように作製した。ここでは5'上流プロモーター領域の様々な欠失フラグメントおよび第1イントロンプロモーター領域3'末端の様々な欠失フラグメントを、ルシフェラーゼリポーター遺伝子を担持する発現ベクターに挿入し、トランスフェクトされたB H K細胞におけるプロモーター活性をテストした。すべて標準的な操作により、全長の5'上流プロモーター領域およびイントロンプロモーター領域を含む前記ベクターを用いて欠失フラグメントを生じさせ、ついでこれらプロモーター領域5'末端から様々な部分を欠失させ、それらの欠点フラグメントをえた。これら欠失フラグメントについてのプロモーター活性の機能的アッセイは、前述のようにして行った。

5'上流プロモーター領域の欠失フラグメントは、(i) 図2 Aの配列のヌクレオチド番号197からヌクレオチド番号2086までに及ぶ「G N 2 B X」と表されるフラグメント、(ii) 図2 Aの配列のヌクレオチド番号682からヌクレオチド番号2086までに及ぶ「75」と表されるフラグメント、(iii) 図2 Aの配列のヌクレオチド番号709からヌクレオチド番号2086までに及ぶ「P I I I」と表されるフラグメント、(iv) 図2 Aの配列のヌクレオチド番号1335からヌクレオチド番号2086までに及ぶ「76」と表されるフラグメント、ならびに(v) 図2 Aの配列のヌクレオチド番号1527からヌクレオチド番号2086までに及ぶ「P I」と表されるフラグメントを含む。

イントロンプロモーター領域の欠失フラグメントは(vi) 図2 Bの配列のヌクレオチド番号872からヌクレオチド番号1827までに及ぶ「74」と表されるフラグメント、および(vii) 図2 Bの配列のヌクレオチド番号1569からヌクレオチド番号1827までに及ぶ「U I I P」と表されるフラグメントを含む。

前記欠失フラグメント(i) ~ (vii) のすべてを、標準的な方法およびすべてが「センス」オリエンテーションとなる方法で発現ベクターにクローン化した。

結果（表示せず）から、

(a) 5'上流プロモーター領域については、欠失フラグメント(i) ~ (iv) すなわち「G N 2 B X」、「75」、「P I I I」および「76」、のすべては、欠失されていない、クローン化したプロモーター領域（図2 Aのヌクレオチド1 ~ 2089、前記参照）のプロモーター活性に匹敵する十分なプロモーター活性を有していたが、欠失フラグメント(v) すなわち「P I」はきわめて低下したプロモーター活性を有していた。

(b) イントロン領域プロモーターについては、欠失フラグメント(vi)、すなわち「7

10

20

30

40

50

4」は、クローン化された全長フラグメント(「USBX」、図2Bのヌクレオチド1~1827)およびイントロンプロモーター領域の5'領域(図2Bのヌクレオチド1~874)のみを有するほかのクローン化されたフラグメントのきわめて低いプロモーター活性(たとえあるとしても)に匹敵するほど、きわめて少ないプロモーター活性を示した。しかしながら、欠失フラグメント(vii)、すなわち「UIIP」はきわめて著しく増大したプロモーター活性(前述の「75」、「PII」および「76」の活性に匹敵する)を有していたことが明らかとなった。

したがって、前記結果から、

(a) 5'上流プロモーターについては、プロモーターの5'末端が欠失フラグメント(iv)、すなわち「76」の5'末端(図2Aのヌクレオチド番号1335)と欠失フラグメント番号(v)、すなわち「PI」の5'末端(図2Aのヌクレオチド番号1527)との間に位置する。

10

(b) 第1イントロンプロモーター領域については、イントロンの3'末端に約1.9 kbフラグメントの唯一1つのプロモーターが存在する。このプロモーターの5'末端は、欠失フラグメント(vii)、すなわち「UIIP」の5'末端(図2Bのヌクレオチド番号1569)と1768(新規なリーダーの開始、前記参照)との間に位置する。さらにこの結果は全長イントロンフラグメントの5'末端(図2Bのヌクレオチド1)と「UIIP」の5'末端(図2Bのヌクレオチド1569)との間に位置する抑制領域がある、という驚くべき観察をももたらした。この抑制領域配列の少なくとも一部分は、欠失フラグメント(vii)、すなわち「74」の5'末端(図2Bのヌクレオチド872)と「UIIP」の5'末端(図2Bのヌクレオチド1569)との間に位置する、ということが結論付けされるであろう。

20

こうしてもはや5'上流プロモーターは、図2Aのヌクレオチド1335~1527によって決まる領域内に存在するということが、十分に定義されたのである。

イントロンプロモーターについては、図2Bのヌクレオチド1と「74」の5'末端(図2Bのヌクレオチド872)との間の領域に、プロモーターは存在せず、むしろ転写抑制領域が存在するということが結果より示される。さらに、この抑制領域はより小さい「UIIP」フラグメントの5'末端(図2Bのヌクレオチド1569)にまで「74」フラグメントに及ぶことが明らかである。

したがって、イントロンプロモーター領域は、「UIIP」の5'末端(図2Bのヌクレオチド1569から図2Bのヌクレオチド1768まで)から新規なリーダーの開始点まで存在する。

30

1つのTCC繰り返し(前記および図2B参照)を除いてすべての観察されたモチーフが、いまや抑制的であると信じられている領域の上流に存在するので、この新規なイントロンプロモーターは、イントロンに存在するということのほかに、通常プロモーターに存在する多数のモチーフを明らかに欠いているという点においてもユニークである。

イントロンにこのプロモーターが存在することにより、p75-TNF-Rの別の形態、すなわち、推定の新規リーダー配列、それに続くp75-TNF-R遺伝子のエキソン2およびその残りのエキソンによってコードされている領域を有するものが作製されるかもしれない。そうすると、このp75-TNF-Rの別の形態は、第1エキソンによってコードされている領域、すなわち、システイン-リッチな領域(TNF結合領域)のすぐ上流にあると知られている細胞外ドメイン領域のN末端部を欠くこととなる。

40

タンパク質が異なるプロモーターから転写されるばあいには、選択的スプライシング機構が同時に生じることが、ほかのタンパク質(たとえばジストロフィン)では知られている。したがって、イントロンプロモーターから転写されるp75-TNF-Rの推定の新規な形態にも選択的スプライシングが行われ、TNF-結合領域であるシステイン-リッチなドメインのみを含むp75-TNF-Rの可溶性形態である最終産物がえられる可能性がある。イントロンプロモーターから転写されるp75-TNF-R転写のこの選択的スプライシング機構は、自然に生ずる可溶性の形態のp75-TNF-Rが産出されるほかの方法(以前に述べたプロテアーゼ分解法のほかに)であるかもしれない。

50

イントロンプロモーターのイントロン上流に転写抑制領域を見出したことにより、この抑制領域が、p 7 5 T N F - R 遺伝子の発現、さらには p 7 5 - T N F - R の推定の新規な形態の発現のモジュレーターとして働くことが示される。このモジュレーションは、サイトカイン、とくに T N F および I L - 1 の作用を介するかまたは分化誘導される変化を介するであろう。予備実験の結果（表示せず）によれば、実際のところ、T N F は抑制領域を抑制することによりイントロンプロモーターの機能を増大することが示された。さらに、イントロンプロモーターの細胞に特異的な発現もみられ、ある細胞はこのプロモーターを自然に多く発現し、ある細胞は発現していない。これらの違いは明らかにいくつかの細胞の種類における抑制領域の不活性化による分化の変化に関係する。

実施例 4

プロモーター領域に結合する転写因子の精製

プロモーター領域（すなわち、5' 上流および第 1 イントロンプロモーター）および第 1 イントロン領域上流のイントロンプロモーターに存在する抑制領域（実施例 3 参照）における機能的なモチーフを、従来の手段（Erase-a-Base キット、プロメガ・コープ (Promega Corp.)）により、プロモーターおよび / または抑制領域の 3' および / または 5' 末端から段階的に核酸配列を欠失して同定することができる。そこで、欠失したプロモーターのフラグメントまたは抑制領域のフラグメントの活性をテストする。同様に、試験管内での突然変異誘発またはリンカースキャン（31）により、内部配列を欠失させるかまたは変化させることができる。活性化転写因子と結合するモチーフは、欠失されるかまたは突然変異されてプロモーター活性を失うことにより明らかとなる。逆に、プロモーター活性を抑制する転写因子と結合するモチーフは、野生型プロモーターに比べて活性が高まった、突然変異されたまたは欠失されたプロモーターフラグメントにより同定される。同様に、転写抑制領域の活性化または抑制に関与し、抑制因子または抑制サプレッサー因子と結合するモチーフもまた、同定されうる。したがって、これらモチーフの詳細な分析は、オリジナルのモチーフの配列およびその突然変異された形態を用いてオリゴヌクレオチドを化学的に合成することにより行われる。これらのオリゴヌクレオチドは対応するモチーフを欠くプロモーターフラグメントに連結され、えられた構築物のプロモーター活性をテストする。オリジナルの活性が復元されれば、このモチーフは機能的に変化していない、すなわち、このモチーフに導入されたこれらの突然変異はその機能を妨げない、と見なすことができる。一方、突然変異されたモチーフに関してプロモーター活性がほとんど観察されない場合は、野生型モチーフに比べて変化したヌクレオチドがその機能に必須であると結論付けることができる。

したがって、5' 上流およびイントロンプロモーター領域内の、前記実施例 2 で述べた様々なモチーフを、どれが十分な機能を有するものが決定するために、前記分析操作に付すことができる。

モチーフに結合する転写因子がいったん同定されると、対応する転写因子が単離される。この目的で、数種のソースからの抽出物がその転写因子を多く発現しているかについてスクリーンされる。存在する転写因子の量は、5' 末端を標識した機能モチーフの配列を含む前述のオリゴヌクレオチド、d s - D N A プローブを用いて、ゲルシフトアッセイにより測定されることができる。

転写因子を豊富に含むソースが同定されれば、最適な結合に必要な条件を決定することができる。p H、様々な 1 価および 2 価のカチオンの存在、塩濃度ならびに還元剤、たとえば D T T またはメルカプトエタノールの存在などの異なった化学的パラメーターを調整してこの目標は達成される。

転写因子の最適な結合条件が決定されれば、従来の手段、たとえば塩沈殿、ホスホセルロースおよび / または D E A E クロマトグラフィーなどによって精製が行われる。そののち、濃縮された転写因子の沈殿を D N A アフィニティーカラムにてさらに精製する。ここでは、対応するモチーフを含むオリゴヌクレオチドが不溶性のマトリックスに結合し、そして転写因子を含む溶液が結合に最適な条件下でカラムを通過する。不純物を洗い出したのち、D N A が結合しない条件、たとえば p H シフト、変化した塩濃度、または D N A の

10

20

30

40

50

結合に必要な 2 価の塩（通常 Z^{++} ）のキレートによって精製された転写因子を溶出する。転写因子が精製されれば、その分子に「逆遺伝学」を適用する、すなわちタンパク質シーケンシング、タンパク質配列に対応する変性したオリゴヌクレオチドを用いる cDNA クローニングおよび最終的にはプローブとして cDNA を用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによる転写因子をコードする遺伝子のクローニングの適用をする。これらすべての手段、すなわちゲノムクローン、cDNA および精製された転写因子を用いれば、つぎの手段、(1)そのプロモーターに影響を与えること、(2)p75 遺伝子プロモーターにおけるターゲットに対するその結合に影響を与えること、または(3)その活性をモジュレートすることのうちの 1 つによって、転写因子の活性を調節する方法を決めることができる。

10

(1)についての詳細な操作を実施例 5 に記載する。(2)および(3)の方法は、この転写因子の機能に対応する妨害に関して多数の薬剤をスクリーニングすることにより達成されることができる。

同様に、クローンを同定し、第 1 イントロン上流のイントロンプロモーターに存在する抑制領域（実施例 3 参照）を認識する因子の活性を確認し、調節するために、前述と類似の操作を行ってもよい。

実施例 5

特定の配列領域によるプロモーター活性のモジュレーション

不十分に供給される転写因子の不要物を除去する(Scavenge)ことにより、プロモーターの活性を調節することができる。これは、転写因子が結合する対応モチーフの多数のコピーを発現することにより行うことができる。この機構は、ハムスター CHO 細胞株の c-myc プロモーターのネガティブプロモータードメインを発現させ、増幅させたパイ(Pai)らによって最近示された(34)。それに引き続き、著者らはハムスター c-myc の増大した発現ならびに myc タンパク質によって誘導される細胞増殖および形態における対応する変化を観察した。ほぼ同じ方法で、プロモーター活性を活性化し、増強するプロモーター領域を増幅すること、およびそれにより対応するタンパク質の発現を低下させることが可能となる。

20

p75 プロモーターについては、5' 領域プロモーターの先端全体または第 1 イントロンのプロモーター全体（実施例 2 参照）のいずれかまたはネガティブもしくはポジティブ調節ドメインとして同定されたそれらの部分が、制限酵素の消化によってまたは不適当な配列のエキソヌクレアーゼの欠失により、プロモーター配列から与えられうる。えられたフラグメントは、そののち遺伝子を増幅させるベクターに連結され、細胞系、たとえば CHO 細胞、これは増幅させたベクター配列を選択する、にトランスフェクトされる。選択および増幅ののちに、CHO 細胞からえられたクローンを mRNA での p75 遺伝子発現およびタンパク質レベルについてチェックする。加えて、イスラエル国特許出願第 103051 号に記載されているように、TNF または TNF 模擬(mimicking)抗体を用いる細胞障害アッセイにより、レセプターの機能をチェックする。

30

このシステムで増幅すると、p75 レセプターの活性をモジュレートするプロモーター領域を確立すれば、2 つの方法で増幅された遺伝子産物を選択させない細胞にこれらと同じ領域を導入する。すなわち、

40

(1)ウィルスの複製起点を含むベクター（たとえば SV40 または EBNA）に連結されたプロモーター領域と、T 抗原（SV40 の）または EBNA 抗原を発現するベクターとをともに発現させる。このことにより、標的細胞の核において誘導されたプロモーターフラグメントのエピゾームの多数のコピーを複製することが可能となり、したがって、組み込まれた配列の DNA 増幅の効果を模擬する。

(2)プロモータードメインからなる ds オリゴヌクレオチドの化学的合成およびそのオリゴヌクレオチドの十分な量の細胞への適用により、対応する転写因子のスキャベンジ(scavenge)およびプロモーター活性への影響が可能となる。(a)オリゴヌクレオチドをさらに親油性とし、その結果それが細胞膜を通過できるようにするために、(b)最小限の分解のためにその安定性を増強させるために、オリゴヌクレオチドの化学的性質を変化させなけれ

50

ばならない。これは通常の手段により、たとえばホスホチオエート結合オリゴヌクレオチドを用いることにより行われる。

参考文献

1. Tracey, J.T. et al. (1987) Nature 330:662-664.
2. Piquet, P.F. et al. (1987) J. Exp. Med. 166:1280-1289.
3. Beutler, B. and Cerami, C. (1987) NEJM, 316:379-385.
4. Hohmann, H.-P. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:14927-14934.
5. Engelmann, H. et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:1531-1536.
6. Brockhause, M. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3127-3131.
7. Loetscher, H. et al. (1990) Cell 61:351-359.
8. Schall, T.J. et al. (1990) Cell 61:361-370.
9. Nophar, Y. et al. (1990) EMBO J. 9:3269-3278.
10. Smith, C.A. et al. (1990) Science 248:1019-1023.
11. Heller, R.A. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6151-6155.
12. Aggarwal, B.B. et al. (1985) Nature 318:665-667.
13. Israel, S. et al. (1986) Immunol. Lett. 12:217-224.
14. Tsujimoto, M. et al. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 137:1094-1100.
15. Ruggiero, V.J. et al. (1986) J. Immunol. 136:2445.
16. Holtman, H. and D. Wallach (1987) J. Immunol. 139:1161-1167.
17. Ding, A.H. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:3924.
18. Porteu, F. and Nathan, C. (1990) J. Exp. Med. 171:599-607.
19. Porteu, F. et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:18846.
20. Ware, C.F. et al. (1991) J. Immunol. 147:4229.
21. Erikstein, B.K. et al. (1991) Eur. J. Immunol. 21:1033.
22. Winzen, R. et al. (1992) J. Immunol. 148:3454.
23. Espevik, T. et al. (1990) J. Exp. Med. 171:415-426.
24. Engelmann, H. et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:14497-14504.
25. Thoma, B. et al. (1990) J. Exp. Med. 172:1019-1023.
26. Tartaglia, L.A. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9292-9296.
27. Gehr, G. et al. (1992) J. Immunol. 149:911.
28. Heller, R.A. et al. (1992) Cell 70:47.

10

20

30

40

50

29. Brakebusch, C. et al. (1992) EMBO J. 11:943-950.
30. Vandenabeele, P. et al. (1992) J. Exp. Med. 176:1015.
31. Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
32. Lenardo, M.J. and Baltimore, D. (1989) Cell 58:227-229.
33. Imagawa, M. et al. (1987) Cell 51:251-260. 10
34. Pai et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:12428-12431.
35. Kohno T. et al, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:8331-8335
36. Seto E. et al (1991) Nature 354:241-245
37. Kageyama R. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:217-224.
38. Kageyama R. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:15508-14.
39. Fashena S.J. et al. (1992) Mol. Cell Biol. 12:894-903. 20
40. Murre C. et al. (1989) Cell 56:777-83.
41. Shannon M.T. et al. (1990) Mol Cell Biol. 10:2950-2959.
42. Anisowicz A. et al. (1991) J. Immunol. 147:520-527.
43. Winzen R. et al. (1993) J. Immunol. 150:4346-53.
44. Kalthoff H. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:2762-6.
45. Fujita T. et al. (1987) Cell 49:357-67.
46. Harroch S. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:9092-9097.
47. Mitchell P. et al. (1987) Cell 50:847-61. 30
48. Scheurich P. et al. (1989) J. Exp. Med. 170:947-58.
49. Hohmann H-P. et al. (1990) - J. Biol. Chem. 265:22409-17.
50. Aggarwal B. B. et al. (1993) Lymph. Cyt. Res. 12:149-58.
51. Lewis E. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3550-4.
52. Ullman K.S. et al. (1991) Science 254:558-62. 40
53. Corcoran L.M. et al. (1993) Genes Dev. 7:570-82.
54. Abe E. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2864-8.
55. Aebl M. and Weismann C. (1987) TIG 3:102-107.
56. Kemper O. and Wallach, D. (1993) Gene 134:209-216.

57. Shannon M. F. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
85:674-678.
58. Okret S. et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
83:5899-903.
59. Chambaut-Geurin, A-M. and Thomopoulos, P. (1991) Eur.
Cyt. Netw. 2:355-60
60. GCG Computer Program, Genetics Computer Group, 575
Science Drive, Madison, Wisconsin USA 53711 (1991). 10
61. Kozak M. (1987) Nucleic Acids Res. 15:8125-8148.
62. Ausubel F.M. et al. (1989) Current Protocols in
Molecular Biology, John Wiley, N.Y. 15.4.1
63. Nordeen S.K. (1988) Biotechniques 6:454-8.
64. Boshart K. et al. (1992) Gene 110:129-130.
65. Koizumi, M. et al. (1993) Biol. Pharm. Bull. (Japan)
16:879-83.
66. Crisell, P. et al. (1993) Nucleic Acids Res. 21:5251-5. 20
67. Barinaga, M. (1993) Science 262:1512-4.
68. Cantor, G.H. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
90:10932-6.
69. Shimayama, T. et al. (1993) Nucleic Acids Symp. Ser.
29:177-8.
70. Joseph, S. and Burke, J.M. (1993) J. Biol. Chem.
268:24515-8.
71. Chen, C.J. et al. (1992) Ann N.Y. Acad. Sci. 660:271-3. 30
72. Shore, S.K. et al. (1993) Oncogene 8:3183-8.
73. Zhao, J.J. and Pick, L. (1993) Nature 365:448-51.

配 列 表

(1)一般情報

(i)出願人:

(A)名称: イエダ リサーチ アンド ディベロップメント カンパニーリミテッド

(B)街路: ピーオー ボックス 95、ワイズマン インスティテュート オブ サイエンス

(C)都市: レホボト

(E)国: イスラエル国 40

(F)郵便番号: 76100

(G)電話: 011-972-847-0617

(H)ファクシミリ: 011-972-847-0733

(A)氏名: ヘンリー ウェインワーズル

(B)街路: ハーツァル ストリート 43

(C)都市: ラーナナ

(E)国: イスラエル国

(F)郵便番号: 43353

(A)氏名: デイビッド ワラック

(B)街路: ボロチョフ ストリート 24 50

- (C)都市：レホボト
(E)国：イスラエル国
(F)郵便番号：76406
(A)氏名：ペーター クーネルト（ユニバーシティ オブ ベルン、インスティテュート
オブ ベタリナリー バクテリアロジ）
(B)街路：ランガス - シュトラッセ 122
(C)都市：ベルン
(E)国：スイス連邦
(F)郵便番号：ツェーハー - 3012
(A)氏名：ゴッツ エールハルト 10
(B)街路：タールシュトラッセ 35
(C)都市：シュテイスリンゲン
(E)国：ドイツ連邦共和国
(F)郵便番号：78256
(A)氏名：オーリバー ケンパー
(B)街路：アネモネン ヴェーク 10
(C)都市：ボケンハイム
(E)国：ドイツ連邦共和国
(F)郵便番号：6719
(ii)発明の名称：p 7 5 T N F 受容体プロモーター 20
(iii)配列の数：2 3
(iv)連絡先：
(A)名宛人：ブラウディ アンド ニーマーク
(B)街路：エヌ ダブリュ、セブンス ストリート 419、スイート 300
(C)都市：ワシントン
(D)州：ディストリクト オブ コロンビア
(E)国：アメリカ合衆国
(F)郵便番号：20004
(v)コンピュータ読取フォーム：
(A)媒体：フロッピーディスク 30
(B)コンピューター：I B M 製パーソナルコンピューターコンパチブル
(C)オペレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS
(D)ソフトウェア：PatentIn Release 1.0、バージョン 1.30（ヨーロッパ特許局）
(vi)出願データ
(A)出願番号：PCT/US95/05853
(B)出願日：1995年5月11日
(vii)優先権データ：
(A)出願番号：イスラエル国、109,633
(B)出願日：1994年5月11日
(viii)代理人情報： 40
(A)氏名：ブラウディ、ロジャー エル
(B)登録番号：25,618
(C)ファイル番号：WALLACH=14 PCT
(ix)連絡先情報：
(A)電話：202-628-5197
(B)ファクシミリ：202-737-3528
(C)テレックス：248633
(2)配列番号：1
(i)配列の特性：
(A)配列の長さ：2 1 8 1 50

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸 c D N A

(ix)配列の特徴：

(A)名称 / キー：CDS

(B)位置：2094..2171

(xi)配列：配列番号：1

CCATGGAACA CTGTGCCCTT TCCTTCCCAA ACCCTCACCC CTGGGCCTGA CCCTGGAGTC 60

10

AAGAACTGCA CTTGGCAGAG TTCAGAGAGA AGTCGCCTGC TCTCAAGCCT GGGTCGGCCT 120

GGAGAAGGGG AGAAGCCCCA TGTTCATAG AGATTAAGCT TGAATTCGTT CCCAGGATGG 180

GACCTAAGCC TGGGAGGATC CCCACCTTCA GGAGGTGATG GTGCCATTCA CTGGGATAGG 240

20

GAAACTGGCA GGAGGAGCCG GTTGTTCAGG GTTGGGGGTG CAGACAGTCT GTTGGTCCCA 300

TTGGTCTTGA GGTGTGTGGG GGACAACTAG AGAGAACTAT TGTCCCCTGC TTCCACGAGG 360

TGACATCTCC CTCCTGCCTT CAGCTCTATT TTAGGGATCA AGGAGTCCTT GGAGCTGCTC	420
CTAGGCATTG TCATAAGGGC CAGAAGAGCT CTGCATGTCT GTCCAGCGGC TCTGCAGAGT	480
TAAGGCTGTG GGTACATACCA GCCACACCCT CAGCGTGGTC CATGTCACAG AAACATGTGG	540
AAACCAGGTG ATTTCCCAGC CTCCTGGTCA GGAGGTGGGG TTTTCCATCC CCAGGGAGTC	600
ACTTCCCAGT TTCTCACTCA GCACTCAGCA CCTAGAAGCA CCATCCTTGC AGGCTCCACT	660
GTGGGGCTGG TGGCCGGGAG AAAGGGTCTC TGTACCTCTT CAGGCAGCCT GCAGTGAGGA	720
AACAGGGAAC AGAATAGCCT CCTGCCACCC AGCCACCCC AACCCTTAGA AATGCCCTAT	780
GTGCTGGGGG CTAGGACCCC CGTAATCCAG GGCTGGAGGA ATGTGCTCTG GCGCCGAGG	840
GCTGGCCCTG TATTAGGGCT GGAACCTAAA GTGGGGATGG GGGGACAGAT TGCAGCTGGA	900
ATGGGTGCTC GGTATGATG TAAATCCTGG GGAAGCCAGC TCTCCTGGGC CTGGTCTCAG	960
CAGCCCCTCA GGGGCCTGCA GCTTCCCTGG TGACATTCTC TCCCAGCCTC TGTTCATCTG	1020
CCCCCTGCCT GGGCAGGAGA CTTGAGCAGG GAAGTGCAGA GTCTTCTCCC TGTGAGAAGG	1080
CTGGATGCGT GTTTAAGGAT AAATGAACAC GCGAAGAGTA GTAACAACAG CCAAGATTTA	1140
TAAATGCCTA TTGTTATATA TGTAGATACT TACTTAAGTA TATATAAAGT ACAGACTGCA	1200

10

20

30

40

TTATGTATAT TACATATCTT TAAATTTTTA GAATAGTCCT ATGAGGTCAG TTCAGAGATC	1260
CAGACCCAGG TGGTCTGGCT CTAGAGTCTA AACAGGCCGA GTGCAGTGGC TCACACCTAT	1320
AATCCCAGCA CCTTGGGAGG CCAGAGGCCG GAAGATCACT TGAGGGTGGG AAGAACACGT	1380
GAGCTCAGGA GTTCGAGACC AGCCTGGACA ACATGGCGAA ACCCATCTC TATAAAGAAA	1440
TCAGCCTAGC ATGGTGGCCC GAGCCTGTAG TCCCAGCTAC TCGGGAGGCT GAGGTGGGAG	1500
GATCGCTTGA GCGCAGGAGT TGGAGGCTGC AGTGAGCTAT GGGTGAAAGA GTGAGACCTT	1560
GTCTCAAAAA AAATTAAAAA ATAAGAATTA AATATATTTA AAATAGAGTC TAAATAAGTG	1620
AATGATCTAG AATTCTCTTG GTTCCCCTAA AGCAGCTGTC AGCTTTGGGG GATGTTTTTC	1680
CAAATTAGTG CCTCACCTC ACGGGACAGG GAAGCCTGTG GGAGCTGGGA GGGCAGGTGG	1740
AGGCCGGGCA GGTGGAGGCC GGGCAGGTGG AGATGGTGAT TCGAAGAGGA GGGGACGATA	1800
GGAGGAGGTT GAGGGGTCAC CCGAGTGCTG GGAGTGACGC TGGAGGTATC GGCCACGGA	1860
TGCTGGAGTG GTCGGGTCGG AGGCCAGCA GCGTCTGGGG AGGGGCGTGG GGGAGGCGTG	1920
TCCAAGGCCG GCTGGCCCCG CCCC GCCCG CCGCCTGGCC TCTGGCCCGC TGGGGCGCGG	1980
GCTTTCGCTT TCAGTCGAGG GCTAGCGAGC GCAGCGGAGC CTGGAGAGAA GGCCTGGGC	2040

10

20

30

40

TGCGAGGGCG CGAGGGCGCG AGGGCAGGGG GCAACCGGAC CCCGCCGCA CCC ATG 2096
Met
1

GCG CCC GTC GCC GTC TGG GCC GCG CTG GCC GTC GGA CTG GAG CTC TGG 2144
Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu Trp 10
5 10 15

GCT GCG GCG CAC GCC TTG CCC GCC CAG GTGGGTGACT 2181
Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln
20 25

(2)配列番号：2

(i)配列の特性：

20

(A)配列の長さ：26

(B)配列の型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号：2

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu

1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln 30
20 25

(2)配列番号：3

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ：1827

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸 cDNA

40

(ix)配列の特徴：

(A)名称 / キー：CDS

(B)位置：1795..1827

(xi)配列：配列番号：3

CCCCGGGGTC CTGGGAAGGC ACAATGGTGA CAGTGCTGCA GCTCTGCACT CCTGGAGGGT	60
CACTCAGAGA CCCGAGAGAG GAGGGCTCTG CGTCTGCTCC TCTGTCCAGG GCTGTAGCTT	120
CTCTGGGTGC CTTTGCTTTT CTCTTTTCTC CCCTCTTTTT TTTTTTTTTT CGAGATGGAG	180
TTTGCTCTG TCAATTAGGC TGGAAGTGCA GTGGCATGAT CTCAGCTCAC TGCAACCTCC	240

TCCTCCCAGG TTCAGGGGAT TCTCCTGCCT CAGCCTCCAG AGTAGCTGGG ATTACAGGCA 300

CACGCCACTA TGCCGGGATA ATTTTGTATT TTTAGTAGAG ACAGGGTTTT GCCTTGTTGG 360

CCAGGCTGGT CTCGAACTCT TGACCTCAAG TGATCCACCT GCTTCGGCCT CCCAAAGTGC 420

TGGGATTACA GGTGTGAGCC ACCACACCTG GCCCTCTCTC TCTTTTCATT CATCACATTG 480

TTCATCTCTT CCCGGAGGCA TCCAGCACAG TCTTTGAGAC TGTGAGCTGT GAAGTCAGAC 540

AGGACCCAGG TCCAAACCTT TCTCTGTAC TTACCAGGTC TGGGACCTTG GGCAGGTGAC 600

CTGCCCTCTC AGGCCTCGGT TTCCTGTTCT ATAAAATGGC TGCAGTAGGG AAACCGTCTC 660

CATCTTCATT GGGTGGTTGG GAAGTCTTGC TGAGACCACA CACCTGTCTC AGGTAGGGTC 720

TTCCAGAAGC AGAGCCTGAG GCAGGGATCT TTGTGAAAGT GATTGCTAG GGAGGGCTCC 780

CAGGAGAAGC AGGCAGGGCA GGTCAAGGGA GGGGGCTTAG CAGGGACGTT GTTCACCAGC 840

TTAGCCCAA CACCACGGGG GTGGCTCTGG ACCATGAATT GTACCAGGGT GGGTCCCACC 900

TTGAGGCTGT GGAGCATTCA TTATCAGCCA ACACCCACAG CAGCTGGGGG AGCGGTGCCC 960

TGCTGGCAGC AGGGGTCTGA GTGGGGTGCA ACAGCACCCA CCAATTCGAG CAGCAGAAAC 1020

GCTTAGAACA GTGCCTGGTA CCTAGGCAGT GCTTCAAAAA TGGCAACGAT TGTCATGGTC 1080

10

20

30

40

ATAACCAACA TTCAGCTGAT GAGTGCCGGC TCTACGGTGG GTCCCATGTG AGAGATTGAG	1140	
GGTCTAGAGA TGACAAGGCT GCCACCTCTG CTGTCTGCAT CACAAGTGTG TGTGTACACA	1200	
TGTGTGTGCA TACATACCCA CAGGGGGTGG AACGACAAGC AAGTAACCAT TCCAGAACAA	1260	
TGAGATGACT GTTAGAGGGG TCATAACCCA CGTTTAGAGA GAGCCGAGAG GAGGAGGAGG	1320	10
AGGAGCTTGA ATTAGCCTTG GGTAGTCAGG GAGGGCTTCC CAGAGGAGGC AGCACTCATC	1380	
TTGAAAGACA AAGGGATGTT TCAGGTGCAG GAGGGAAGGA GAGGTATCTT CCTTCCTCAG	1440	
CAGAAGGCAG CTTTGTGCTG AGAACCCCCG TTCTCTGTGA CCAAGGCCAC TGTCTTCTGG	1500	20
ATATCTGTCC CATGCAGTGT TAGGGGTCAC CCAGCACTGG AGAAGGCCAG CAGAGTCAGT	1560	
GCTTCTGCCT GCAGACATGA CTAGGGTACA CTGAGGTGGG GAGGCAGGGG AGGTAAAAGA	1620	
AGGCACGAGC TCTCCTTCCT GTACCCTGCT CCAGGGGGAG AAACCTCCCC AGCCATCATC	1680	30
AGTGCAGACT GGCAGGGGGA GGGCCAAACA TTTGCAGGGC GGGGACCTGG GCATCAGGCA	1740	
TGGCAGAACC CAGGGGCGGC CCTGTTGATG GCAGTCTTCC CTTCTTCCTT CCAG GTG	1797	
		Val
GCA TTT ACA CCC TAC GCC CCG GAG CCC GGG	1827	40
Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly		

30

35

(2)配列番号 : 4

(i)配列の特性 :

(A)配列の長さ : 1 1

(B)配列の型 : アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号：4

Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly

1

5

10

(2)配列番号：5

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ：1 2

(B)配列の型：核酸

10

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸 c D N A

(xi)配列：配列番号：5

GRAAGCNGAA AG

12

(2)配列番号：6

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ：1 0

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

20

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸 c D N A

(xi)配列：配列番号：6

YCSCCWNSSS

10

(2)配列番号：7

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ：1 1

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

30

(ii)配列の種類：他の核酸 c D N A

(xi)配列：配列番号：7

CGAAAATTTC C

11

(2)配列番号：8

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ：1 5

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸 c D N A

40

(xi)配列：配列番号：8

YYYYYYYYYY YNCAG

15

(2)配列番号：9

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ：6 0

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸 c D N A

(ix)配列の特徴：

50

(A)名称 / キー : CDS

(B)位置 : 1..60

(xi)配列 : 配列番号 : 9

ATG GCA GTC TTC CCT TCT TCC TTC CAG GTG GCA TTT ACA CCC TAC GCC 48

Met Ala Val Phe Pro Ser Ser Phe Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala

15

20

25

CCG GAG CCC GGG

60

10

Pro Glu Pro Gly

30

(2)配列番号 : 1 0

(i)配列の特性 :

(A)配列の長さ : 2 0

(B)配列の型 : アミノ酸

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : タンパク質

20

(xi)配列 : 配列番号 : 1 0

Met Ala Val Phe Pro Ser Ser Phe Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala

1

5

10

15

Pro Glu Pro Gly

20

(2)配列番号 : 1 1

30

(i)配列の特性 :

(A)配列の長さ : 1 0

(B)配列の型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : 他の核酸 c D N A

(xi)配列 : 配列番号 : 1 1

SSSNKGGSCR

10

(2)配列番号 : 1 2

(i)配列の特性 :

(A)配列の長さ : 1 0

(B)配列の型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : 他の核酸 c D N A

(xi)配列 : 配列番号 : 1 2

GGGRHTYYHC

10

(2)配列番号 : 1 3

(i)配列の特性 :

(A)配列の長さ : 1 0

50

(B)配列の型：核酸	
(C)鎖の数：一本鎖	
(D)トポロジー：直鎖状	
(ii)配列の種類：他の核酸	c D N A
(xi)配列：配列番号：1 3	
GDRRADYCCC	10
(2)配列番号：1 4	
(i)配列の特性：	
(A)配列の長さ：1 0	
(B)配列の型：核酸	10
(C)鎖の数：一本鎖	
(D)トポロジー：直鎖状	
(ii)配列の種類：他の核酸	c D N A
(xi)配列：配列番号：1 4	
GGGRHTYYHC	10
(2)配列番号：1 5	
(i)配列の特性：	
(A)配列の長さ：1 0	
(B)配列の型：核酸	
(C)鎖の数：一本鎖	20
(D)トポロジー：直鎖状	
(ii)配列の種類：他の核酸	c D N A
(xi)配列：配列番号：1 5	
GGGGCGGGGC	10
(2)配列番号：1 6	
(i)配列の特性：	
(A)配列の長さ：1 0	
(B)配列の型：核酸	
(C)鎖の数：一本鎖	
(D)トポロジー：直鎖状	30
(ii)配列の種類：他の核酸	c D N A
(xi)配列：配列番号：1 6	
STTTCNTTYC	10
(2)配列番号：1 7	
(i)配列の特性：	
(A)配列の長さ：1 0	
(B)配列の型：核酸	
(C)鎖の数：一本鎖	
(D)トポロジー：直鎖状	
(ii)配列の種類：他の核酸	c D N A
(xi)配列：配列番号：1 7	
GRAANGAAAS	10
(2)配列番号：1 8	
(i)配列の特性：	
(A)配列の長さ：1 6	
(B)配列の型：核酸	
(C)鎖の数：一本鎖	
(D)トポロジー：直鎖状	
(ii)配列の種類：他の核酸	c D N A
(xi)配列：配列番号：1 8	50

GCTATGGGTG AAAGAG

16

(2)配列番号：19

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ：28

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸 c D N A

(xi)配列：配列番号：19

GCACTGGGTG AATGAGGACA TTACTGAC

28

10

(2)配列番号：20

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ：10

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸 c D N A

(xi)配列：配列番号：20

AGGCATGCCT

10

(2)配列番号：21

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ：17

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸 c D N A

(xi)配列：配列番号：21

GTCTCCANN NNNNNG

17

(2)配列番号：22

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ：10

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸 c D N A

(xi)配列：配列番号：22

GTGGAATCTC

10

(2)配列番号：23

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ：10

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸 c D N A

(xi)配列：配列番号：23

GAGATTCCAC

10

40

20

30

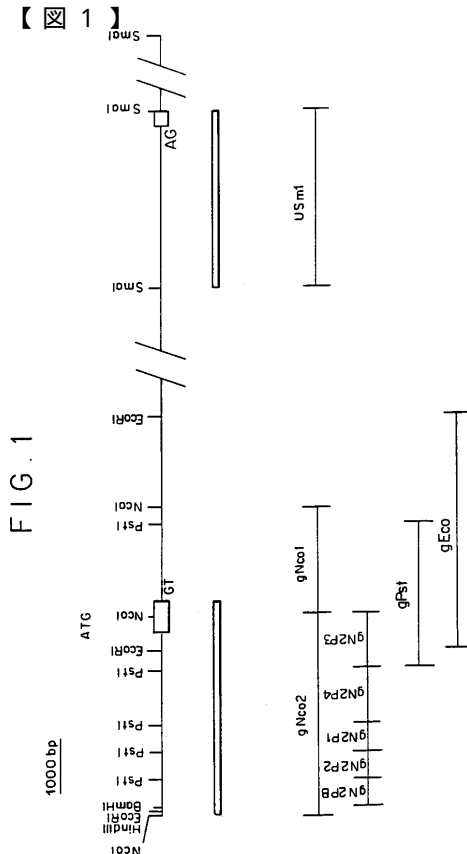


FIG. 2b

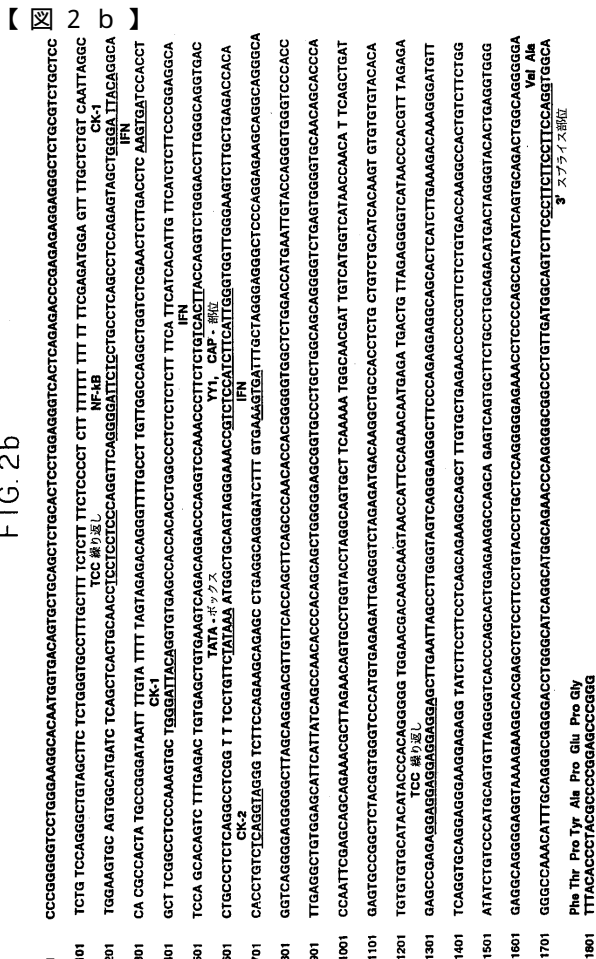
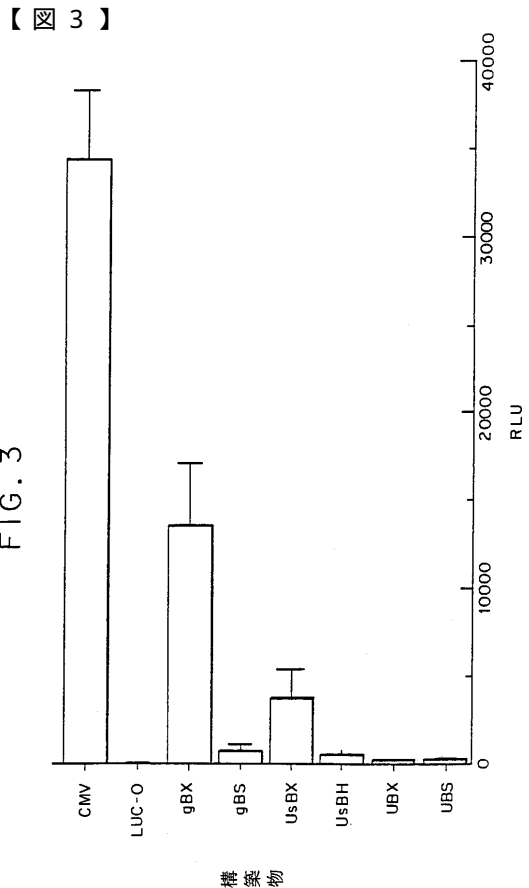


FIG. 3



フロントページの続き

- (72)発明者 クーネルト、ペーター
スイス連邦、ツェーハー - 3 0 1 2 ベルン、ランガス - シュトラッセ 1 2 2、ユニバーシティ
オブ ベルン、インスティテュート オブ ベタリナリー バクテリアアロジー (番地なし
)
- (72)発明者 エールハルト、ゴッツ
ドイツ連邦共和国、デー - 7 8 2 5 6 シュテイスリンゲン、タールシュトラッセ 3 5
- (72)発明者 ケンパー、オーリバー
ドイツ連邦共和国、6 7 1 9 ボケンハイム、アネモネン ヴェーク 1 0

審査官 内藤 伸一

- (56)参考文献 Gene, (1993), 134, p209-216
Science, (1990), 248, p1019-1023

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)

C12N 15/09 ZNA
C07K 14/715
BIOSIS(DIALOG)
CA(STN)
MEDLINE(STN)
WPIDS(STN)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq