(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2010 年 9 月 10 日(10.09.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/101248 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01)	*C07K 14/47* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)	*C07K 19/00* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)	*C12N 1/15* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)	*C12N 1/19* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)	*C12N 1/21* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)	*C12N 5/10* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)	*G01N 33/15* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)	*G01N 33/50* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/053665

(22) 国際出願日: 2010 年 3 月 5 日(05.03.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2009-052628 2009 年 3 月 5 日(05.03.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人京都大学(Kyoto University) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ Kyoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 米原 伸(YONEHARA, Shin) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院生命科学研究科内 Kyoto (JP). 桐山 真利亜(KIRIYAMA, Maria) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院生命科学研究科内 Kyoto (JP). 石川 冬木(ISHIKAWA, Fuyuki) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院生命科学研究科内 Kyoto (JP). 斉藤 基輝(SAITO, Motoki) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院生命科学研究科内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目１番１号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

(54) **Title**: CELL PROLIFERATION INHIBITOR AND METHOD FOR SCREENING SAME

(54) 発明の名称 : 細胞増殖抑制剤及びそのスクリーニング方法

(57) **Abstract**: It is found that the progression of cell cycle can be accelerated when a FARB region in FLASH is bound to an ARS2 region in ARS2. Based on this finding, a method for screening a compound capable of inhibiting cell proliferation is provided. The method comprises selecting a compound that inhibits the binding between a polypeptide containing the FARB region and a polypeptide containing the ARS2 region as the compound capable of inhibiting cell proliferation. Also disclosed are: a polypeptide containing the FARB region, which is useful for achieving the screening method; a polynucleotide encoding the polypeptide; an expression vector carrying the polynucleotide; and others.

(57) 要約: ＦＬＡＳＨ中のＦＡＲＢ領域が、ＡＲＳ２中のＡＲＳ２領域と会合することにより細胞周期の進行が促進されることが見出された。当該知見に基づき、本発明は、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドと、ＡＲＳ２領域を含むポリペプチドとの結合を阻害する化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法を提供する。また、本発明は当該スクリーニング方法の実施に有用なＦＡＲＢ領域を含むポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター等を提供する。

WO 2010/101248 A1

明　細　書

発明の名称 ： 細胞増殖抑制剤及びそのスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞増殖抑制剤、そのスクリーニング方法、及び該方法に有用な種々のリサーチツール（ポリペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター、形質転換体等）に関する。

背景技術

[0002] 細胞周期の進行はサイクリンやＣＤＫキナーゼ等の分子により制御されていることが知られている。そこで、細胞周期の進行に関わるこれらの分子を標的とした、異常な細胞増殖を伴う疾患（癌、自己免疫疾患等）の治療薬がこれまでに数多く開発されてきた。しかし、サイクリンやＣＤＫキナーゼの機能を薬物により阻害すると、細胞の増殖が一旦は停止するが、薬物のウォッシュアウトにより阻害が解除された後には細胞増殖が復活してしまうため、効率的に細胞増殖を阻害するためには、薬物を投与し続けることにより標的細胞周辺の薬物濃度を一定レベル以上に保つ必要がある。そこで、細胞周期の進行の詳細なメカニズムを解明し、それに基づく新規な細胞増殖阻害剤の開発が望まれている。

[0003] FADD-like IL-1β-converting enzyme (FLICE)/caspase-8-associated huge protein［ＦＬＡＳＨ又はＣＡＳＰ８ＡＰ２］は、元々はＦａｓ－カスパーゼ８媒介アポトーシス誘導経路の構成因子として同定されたものであるが（非特許文献１）、近年、核から細胞質への移行を通じたＦａｓ媒介アポトーシスシグナリングに関与することが報告されている（非特許文献２）。ＦＬＡＳＨは、ステロイドホルモン受容体媒介転写のエンハンサー及び／又はリプレッサーとして核内において作用することも示されている（非特許文献３～５）。一方、ｓｉＲＮＡｓ（short interfering RNAs）のゲノム規模ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングにより、ＦＬＡＳＨが細胞分裂に必須であることが見出された（非特許文献６）。ＦＬＡＳＨは、リ

ンパ芽球性白血病の症例における潜在的予後マーカーであることも報告されている（非特許文献７）。近年、ＦＬＡＳＨが核内におけるカハール体の必須の構成因子であり、ヒストン転写及びＳ期進行において重要な役割を果たすことが示された（非特許文献８及び９）。また、これらの報告においては、ＦＬＡＳＨがカハール体の構成因子であるＮＰＡＴ（p220/Nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus）と相互作用することが示されている。サイクリンＥ／Ｃｄｋ２によるＮＰＡＴのリン酸化がＳ期におけるヒストン転写の活性化を制御しており、細胞周期の間のカハール体の構造の維持に必要であることが報告されている（非特許文献１０～１４）。従って、ＦＬＡＳＨは、おそらくはＮＰＡＴとの相互作用を介してＳ期進行において必須の役割を果たしていると考えられてきた。しかしながら、細胞周期進行におけるＦＬＡＳＨの役割の根底にある分子メカニズムについては、多くが不明のままである。

[0004] カハール体は、１９０３年にサンディアゴ・ラモン・イ・カハールにより最初に記載された小さな核内小器官であり、核内低分子リボ核タンパク質粒子（small nuclear ribonucleoprotein particles; snRNPs）及び核小体低分子リボ核タンパク質粒子（small nucleolar ribonucleoprotein particles; snoRNPs）の生合成及び輸送、並びにプレリボソーマルＲＮＡ及び複製依存的ヒストンｍＲＮＡのプロセシングを含む多くの核機能に寄与している（非特許文献１５及び１６）。近年、かなりのカハール体は、ＦＬＡＳＨ及びＮＰＡＴを含有するが、カハール体の通常のマーカーであるＣｏｉｌｉｎを含有しないことが見出され、カハール体の中の可変性が、癌細胞株における細胞の倍数性と関連することが報告されている（非特許文献１７）。

[0005] 亜ヒ酸抵抗性タンパク質２（arsenite resistance protein 2；ＡＲＳ２；最初はＡＳＲ２）は、最初は、亜ヒ酸高感受性細胞株に亜ヒ酸への抵抗性を付与する遺伝子産物として同定された（非特許文献１８）。ＡＲＳ２は、哺乳動物、ゼブラフィッシュ及び植物において高度に保存されていることが報告されている（非特許文献１９～２２）。近年、ＡＲＳ２ノックアウトマウ

ス由来のＡＲＳ２ヌル胚の解析に基づき、ＡＲＳ２は哺乳動物の初期発生において必須であることが示されている（非特許文献２２）。しかしながら、ＡＲＳ２の生物学的機能については、特に分子レベルにおいて、ほとんど知られていない。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Nature, 398, 777-785 (1999)

非特許文献2：Embo J, 26, 391-401 (2007)

非特許文献3：J Biol Chem, 278, 3023-3029 (2003)

非特許文献4：J Steroid Biochem Mol Biol, 92, 357-363 (2004)

非特許文献5：Mol Pharmacol, 65, 761-769 (2004)

非特許文献6：Nature, 432, 1036-1040 (2004)

非特許文献7：Blood 108, 1050-1057 (2006)

非特許文献8：Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 14808-14812 (2006)

非特許文献9：Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 14802-14807 (2006)

非特許文献10：Mol Cell Biol, 28, 435-447 (2008)

非特許文献11：Genes Dev, 14, 2298-2313 (2000)

非特許文献12：Mol Cell Biol, 23, 3669-3680 (2003)

非特許文献13：Mol Cell Biol, 23, 8586-8600 (2003)

非特許文献14：Genes Dev, 14, 2283-2297 (2000)

非特許文献15：Annu Rev Cell Dev Biol, 21, 105-131 (2005)

非特許文献16：Annu Rev Cell Dev Biol, 16, 273-300 (2000)

非特許文献17：Cell Cycle, 7, 2357-2367 (2008)

非特許文献18：Carcinogenesis, 20, 311-316 (1999)

非特許文献19：Proc Natl Acad Sci U S A, 101, 12792-12797 (2004)

非特許文献20：Nat Genet, 31, 135-140 (2002)

非特許文献21：Plant Cell, 13, 1263-1279 (2001)

非特許文献22：Mol Cell Biol, 28, 1503-1514 (2008)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、細胞周期進行におけるＦＬＡＳＨの機能を分子レベルで解明し、その機能に基づく細胞増殖調節剤、そのスクリーニング方法、該スクリーニングに有用なリサーチツール等を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、ＦＬＡＳＨの発現抑制を誘導する系を種々のヒト細胞株を用いて構築した。その結果、ＦＬＡＳＨの発現抑制を誘導すると、細胞周期がＳ期で停止するが、弱いＤＮＡ合成は実行され続けるという奇妙な状態に陥ることが明らかとなった。ＦＬＡＳＨはＮＰＡＴと会合して機能すると報告されていたが（Proc Natl Acad Sci USA. 103:14802-7 & 14808-12, 2006）、Ｓ期進行にはＦＬＡＳＨのＣ末端領域は必要ないこと、ＮＰＡＴはＦＬＡＳＨのＣ末端領域と会合すること等からＦＬＡＳＨとＮＰＡＴとの会合はＳ期進行には必要ではないことが示唆された。

一方、ＦＬＡＳＨのＮ末端領域欠損変異体は細胞周期進行活性を示さなかった。ＦＬＡＳＨのＣ末端領域欠失変異体は全長ＦＬＡＳＨのヒストンの転写誘導活性と同等の活性を有していたが、Ｎ末端領域欠失変異体はこれを有していなかった。ＦＬＡＳＨのＮ末端領域にはコイルドコイル領域が存在し、この領域でＦＬＡＳＨが自己会合していることが示された。

次に、全長ＦＬＡＳＨと同等のＳ期進行維持活性を有するＣ末端領域欠失変異体に注目し、このＣ末端領域欠失変異体と特異的に会合するタンパク質の同定を、質量分析法により試行した。その結果、ヒ素に耐性の表現型を付与する遺伝子として同定されたＡＲＳ２（Carcinogenesis, 20:311-316.1999）というタンパク質が同定された。ｓｈＲＮＡによりＡＲＳ２の発現を抑制したところ、ＦＬＡＳＨの発現を抑制したときと同様に、細胞周期のＳ期進行が阻害された。また、ＡＲＳ２との会合が、共免疫沈降実験により確認された。

種々の欠失変異体を用いてＦＬＡＳＨとＡＲＳ２の会合領域を解析したと

ころ、ＡＲＳ２中のＣ末端側のＡＲＳ領域が、ＦＬＡＳＨの中央部分の領域と会合することが明らかとなった。ＦＬＡＳＨにおける会合領域を狭めていったところ、生物種を超えてＦＬＡＳＨに高度に保存されている１３アミノ酸残基（ヒト：DELEEGEIRSDSE、マウス：DELEEGEIRSDDE）からなる領域を同定し、この短いペプチドの配列を、ＦＡＲＢ（ＦＬＡＳＨ-ＡＲＳ２-binding）配列と命名した。そして、ＧＦＰとＦＡＲＢとの融合タンパク質がＡＲＳ２と会合し得ること、またＦＡＲＢを欠失したＦＬＡＳＨ変異体（ΔＦＡＲＢ-ＦＬＡＳＨ）はＡＲＳ２と会合できないことから、ＦＡＲＢがＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との会合に必要十分であることが示唆された。更に、ヒトＦＡＲＢ配列に含まれる２個のアミノ酸をアラニンに置換した変異体を作成し、その変異体とＡＲＳ２との会合を解析し、ＦＡＲＢとＡＲＳ２との会合に重要なＦＡＲＢ中のアミノ酸を特定した。また、ΔＦＡＲＢ-ＦＬＡＳＨは、ＦＬＡＳＨノックダウン細胞で認められる、細胞周期Ｓ期停滞やヒストン転写低下という表現型を相補できなかったことから、ＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との会合が細胞周期におけるＳ期進行に極めて重要であることが明らかとなった。

更に、ＥＧＦＰ、ＦＡＲＢ及び核移行シグナルペプチドからなる融合タンパク質をヒト鼻咽喉癌由来細胞株ＫＢ細胞へ導入すると、細胞増殖は認められず、細胞が死滅したことから、ＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との会合を阻害することにより、細胞増殖を抑制し得ることが示された。

以上の知見に基づき、本発明が完成された。

[0009] 即ち、本発明は以下に関する。

［１］（Ａ）（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含み、且つ長さが２００アミノ酸以下であるポリペプチド；並びに

（Ｂ）（Ａ）のポリペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端に少なくとも１つのタグポリペプチド又はシグナル配列が融合してなる融合ポリペプチド

からなる群から選択されるいずれかのポリペプチド。

[２][１]記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[３][２]記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[４][３]記載の発現ベクターを含む形質転換体。

[５]（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチド（但し、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含むポリペプチドを除く）、又は該ポリペプチドを発現し得る発現ベクターを含む、細胞増殖抑制剤。

[６]ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸、又はこれらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクターを含む、細胞増殖抑制剤。

[７]（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチドと、

（１’）配列番号１３で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２’）配列番号１３で表されるアミノ酸配列と９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３’）配列番号１３で表されるアミノ酸配列において１～１０個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチドとの結合を阻害する化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法。

［８］（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかのポリペプチド領域へ結合する化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法。

［９］（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチドと、

（１’）配列番号１３で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２’）配列番号１３で表されるアミノ酸配列と９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３’）配列番号１３で表されるアミノ酸配列において１～１０個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチド

との組み合わせ物。

[１０]ＡＲＳ２の発現を低下させる化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法。

[１１]ＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合を阻害する化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法。

[１２]ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインへ結合する化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法。

[１３]細胞増殖の抑制において使用するための、

（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチド（但し、ＦＬ

ＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含むポリペプチドを除く）、又は該ポリペプチドを発現し得る発現ベクター。

[１４]細胞増殖の抑制において使用するための、ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸、又はこれらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクター。

[１５]哺乳動物に対して、

（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチド（但し、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含むポリペプチドを除く）、又は該ポリペプチドを発現し得る発現ベクターの有効量を投与することを含む、該哺乳動物における細胞増殖の抑制方法。

[１６]哺乳動物に対して、ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸、又はこれらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクターの有効量を投与することを含む、該哺乳動物における細胞増殖の抑制方法。

[１７]（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチド（但し、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含むポリペプチドを除く）、又は該ポリペプチドを発現し得る発現ベクターを含む、異常な細胞増殖に起因する疾患の予防又は治療剤。

[１８]ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸、又はこれらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクターを含む、異常な細胞増殖に起因する疾患の予防又は治療剤。

[１９]異常な細胞増殖に起因する疾患の予防又は治療において使用するための、

（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチド（但し、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含むポリペプチドを除く）、又は該ポリペプチドを発現し得る発現ベクター。

[２０]異常な細胞増殖に起因する疾患の予防又は治療において使用するための、ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸、又はこれらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクター。

[２１]哺乳動物に対して、

（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠

失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチド（但し、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含むポリペプチドを除く）、又は該ポリペプチドを発現し得る発現ベクターの有効量を投与することを含む、該哺乳動物における異常な細胞増殖に起因する疾患の予防又は治療の抑制方法。

[２２]哺乳動物に対して、ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸、又はこれらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクターの有効量を投与することを含む、該哺乳動物における異常な細胞増殖に起因する疾患の予防又は治療方法。

[２３]（Ａ）配列番号５で表されるアミノ酸配列において、第４番目のグルタミン酸、第５番目のグルタミン酸及び第７番目のグルタミン酸からなる群から選択される少なくとも１つのグルタミン酸がグルタミン酸以外のアミノ酸で置換されているアミノ酸配列を含み、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有していないポリペプチド、並びに

（Ｂ）（Ａ）のポリペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端に少なくとも１つのタグポリペプチド又はシグナル配列が融合してなるポリペプチド

からなる群から選択されるいずれかのポリペプチド。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、ＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との相互作用の阻害や、ＦＬＡＳＨの自己会合の阻害という、これまでにない新たなメカニズムに立脚した細胞増殖抑制剤や、そのスクリーニング方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0011] [図1A]図１Ａ－Ｇは、FLASHのN末端領域がS期進行に必要であることを示す。（図１Ａ）Tet-On shFLASH（FLASHに対するshRNA）又はshlacZ（lacZに対するshRNA）を有するKB細胞を1 μg/ml Doxと共に、又はそれなしで、３日間培養した。細胞ライセートを抗FLASHモノクローナル抗体で免疫沈降（IP）し、

同一の抗FLASHモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティング（WB）により解析した。全タンパク質量を確認するため、全細胞ライセートをSDS-PAGE中で分離し、ゲルをクーマジー・ブリリアント・ブルー（CBB）で染色した。矢印、FLASH；*、非特異的バンド。

[図1B]Tet-On shlacZ又はshFLASHを有するKB細胞を、表示した期間にわたり、1 μg/ml Doxで処理した。ヘモサイトメーターを用いて、トリパンブルー色素排除法により細胞数を定量した。全てトリプリケートで行った、３回の独立した試験からの代表的なデータを示す。エラーバーは± s.e.m.を意味する。

[図1C]BrdUでパルスラベルした細胞を用いた細胞周期解析。1 μg/ml Doxで３日間処理後、Tet-On shFLASHを有するKB細胞を10 μM BrdUで３０分間パルスラベルし、FITC結合抗BrdU及びPIで染色し、フローサイトメトリーにより解析した。S期におけるBrdU陽性細胞のパーセンテージを示す。３回の独立した試験からの代表的データを示す。

[図1D]全長マウスFLASH(mFLASH)及び多様な欠失変異体の図解概要。mFLASHにおけるアミノ酸残基の番号を示す。NLS、核局在化シグナル（nuclear localization signal）；NES、核外移行シグナル（nuclear export signal）；DRD、DED動員ドメイン（DED-recruiting domain）。

[図1E]EGFPが融合された種々のmFLASHの変異体を発現している、shFLASHを有するKB細胞をDoxで３日間処理した。細胞ライセートを抗GFP抗体で免疫沈降し、抗FLASH抗体を用いたウェスタンブロッティング（WB）により解析した。

[図1F]図１Ａ及びＥで説明したKB細胞をDoxで３日間処理し、PIで染色後、フローサイトメトリーで解析した。S期の細胞のパーセンテージを示す。

[図1G]293T細胞へ、mFLASH-EGFPをコードする発現ベクターと共に、空ベクター(-)或いはmFLASH-FLAG3、ΔCC mFLASH-FLAG3又はΔN194 mFLASH-FLAG3をコードする発現ベクターをトランスフェクトした。４８時間培養後、抗Flagアガロース樹脂又は抗GFP抗体により得られたmFLASH免疫沈降物を、抗Flag抗体及び抗GFP抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。

[図2A]図２Ａ－Ｅは、FLASHとNPATとの相互作用がS期進行には不要であることを示す。（図２Ａ）293T細胞へ、空ベクター（-）或いはmFLASH-EGFP、ΔN mFLASH-EGFP、ΔC1 mFLASH-EGFP又はΔC2 mFLASH-EGFPをトランスフェクトした。４８時間培養後、抗GFP抗体により得られた免疫沈降物（IP）を抗GFP抗体又は抗NPAT抗体を用いたウェスタンブロッティング（WB）により解析した。３回の独立した試験からの代表的な結果を示す。矢印、FLASHの種々の欠失変異体；*、非特異的バンド。

[図2B]mFLASH-EGFPを発現している、又は発現していない、Tet-On shFLASHを有するKB細胞を、1 μg/ml Doxと共に、又はそれ無しで、３日間培養し、NPATを、抗NPAT抗体で染色した。NPAT（赤色）及びEGFP（緑色）を共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。DNAをDAPI（青色）で染色した。スケールバー、5 μm。

[図2C]mFLASH-EGFPを発現している、又は発現していない、Tet-On shFLASHを有するKB細胞を、1 μg/ml Doxと共に、又はそれ無しで、３日間培養し、Coilinを、抗Coilin抗体で染色した。Coilin（赤色）及びEGFP（緑色）を共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。DNAをDAPI（青色）で染色した。スケールバー、5 μm。

[図2D]左のグラフ：KB細胞における、NPAT foci（D）を有する細胞のパーセンテージを（B）で記載したように決定した。右のグラフ：KB細胞における、FLASH foci（EGFP foci）と共にあるNPAT fociを有する細胞のパーセンテージを図１Ｅで記載したように決定した。全てトリプリケートで行った３回の独立した試験からの代表的な結果を示す。エラーバーは± s.e.m.を意味する。

[図2E]左のグラフ：KB細胞における、Coilin foci（E）を有する細胞のパーセンテージを（C）で記載したように決定した。右のグラフ：KB細胞における、FLASH foci（EGFP foci）と共にあるCoilin fociを有する細胞のパーセンテージを図１Ｅで記載したように決定した。全てトリプリケートで行った３回の独立した試験からの代表的な結果を示す。エラーバーは± s.e.m.を意味する。なお、図２Ａ－Ｅは本来カラー図面である。

[図3A]図３Ａ－Ｇは、S期進行に必要なARS2がFLASHと相互作用することを示

す。（図３Ａ）FLAG3-mutARS2（サイレント変異を有するARS2）をコードするレンチウイルスベクターで感染した、Tet-On shARS2を有するKB細胞を、1 μg/ml Doxで６日間処理した。抗FLASH抗体、抗FLAGアガロース樹脂又はコントロールIgGを用いて免疫沈降を行い、免疫沈降物を抗FLASHモノクローナル抗体又は抗Flag M2モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティング（WB）により解析した。

[図3B]Tet-On shARS2を有するKB細胞を1 μg/ml Doxと共に、又はそれ無しで、６日間培養し、ARS2のノックダウンを、抗ARS2ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。アクチンも、ローディングコントロールとして検出した。３回の独立した試験からの代表的な結果を示す。

[図3C]Tet-On shlacZ又はshARS2を有するKB細胞を1 μg/ml Doxで表示した期間にわたり処理した。細胞数を、ヘモサイトメーターを用いて、トリパンブルー色素排除法により定量した。全てトリプリケートで行った３回の独立した試験からの代表的な結果を示す。エラーバーは± s.e.m.を示す。

[図3D]Tet-On shARS2を有するKB細胞へ、flag-mutARS2をコードする発現ベクター又は空ベクター（Vector）を感染させ、２４穴プレート中に1.0×10^3 個/ウェルで播種し、1 μg/ml Doxと共に９日間培養した。ヘモサイトメーターを用いて、細胞数をトリパンブルー色素排除法により定量した。全てトリプリケートで行った３回の独立した試験からの代表的な結果を示す。エラーバーは± s.e.m.を示す。

[図3E]BrdUでパルスラベルした細胞を用いた細胞周期解析。1 μg/ml Doxで６日間処理後、Tet-On shARS2を有するKB細胞を、10 μM BrdUで３０分間パルスラベルし、FITC結合抗BrdU抗体及びPIで染色し、フローサイトメトリーで解析した。S期におけるBrdU陽性細胞のパーセンテージを示す。独立した３回の試験からの代表的なデータを示す。

[図3F]図３Ｅの細胞を抗NPAT抗体又は抗Coilin抗体で染色し、NPAT foci（上段）又はCoilin foci（下段）を数えた。エラーバーは、± s.e.m.を意味す

る。

[図3G]mFLASH-EGFP及びHA-mutARSの両方を発現しているTet-On shARS2を有するKB細胞を1 μg/ml Doxで６日間処理し、抗HA抗体（赤色）で染色し、共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。DNAをDAPI（青色）で染色した。スケールバー、5 μm。なお、図３Ａ－Ｇは本来カラー図面である。

[図4A]図４Ａ－Ｄは、ARS2がARS2ドメインを介してFLASHと相互作用することを示す。（図４Ａ）Tet-OnshARS2を有するKB細胞へ、DsRed-モノマー-mutARS2 (DsRed-mutARS2)をコードする発現ベクター又は空ベクター（Vector）を感染させ、２４穴プレートへ1.25×10^3 個/ウェルで播種し、1 μg/ml Doxと共に９日間培養した。ヘモサイトメーターを用いて、トリパンブルー色素排除法により細胞数を定量した。全てトリプリケートにより行われた３回の独立した試験からの代表的なデータを示す。エラーバーは± s.e.m.を示す。

[図4B]図４Ａで記載したKB細胞を、1 μg/ml Doxにより、又はそれなしで６日間処理し、NPATを抗NPAT抗体で染色した。細胞を共焦点蛍光顕微鏡下で観察し、NPAT fociを有する細胞のパーセンテージを決定した。独立した３回の試験からの代表的なデータを示す。エラーバーは± s.e.m.を意味する。

[図4C]全長ヒトARS2(hARS2)及びhARS2の種々の欠失変異体の図解概要。hARS2におけるアミノ酸残基の番号を示す。CC、コイルドコイルドメイン；ARS2、ARSドメイン。

[図4D]293T細胞へ、HA-hARS2、HA-ΔN1 ARS2、HA-ΔN2 ARS2、HA-ΔC1 ARS2又はHA-ΔC2 ARS2をコードする発現ベクターを、mFLASH-FLAG3をコードする発現ベクターと共にトランスフェクトした。４８時間後に、抗HA抗体及び抗Flagアガロース樹脂をそれぞれ用いて得たARS2及びmFLASH免疫沈降物を、抗HA抗体及び抗Flag抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。アクチンもローディングコントロールとして検出した。独立した３回の試験からの代表的な結果を示す。**、抗体の重鎖。

[図5A]図５Ａ－Ｄは、FLASHがその中央領域を介してARS2と相互作用することを示す。（図５Ａ）mFLASH及びその種々の欠失変異体の図解概要。mFLASHに

おけるアミノ酸残基の番号を示す。

[図5B]293Tへ、空ベクター（Control）或いはmFLASH-FLAG3又は表示したその欠失変異体をコードする発現ベクターを、HA-ARS2をコードする発現ベクターと共に一過性にトランスフェクトした。４８時間後、種々のmFLASH-FLAG3の変異体又はHA-ARS2を、抗FLAG樹脂及び抗HA抗体をそれぞれ用いて免疫沈降した。免疫沈降物をウェスタンブロッティングで解析した。アクチンもローディングコントロールとして検出した。独立した３回の試験からの代表的な結果を示す。**、IgGの重鎖；***、IgGの軽鎖。

[図5C]293Tへ、空ベクター（Control）或いはmFLASH-FLAG3又は表示したその欠失変異体をコードする発現ベクターを、HA-ARS2をコードする発現ベクターと共に一過性にトランスフェクトした。４８時間後、種々のmFLASH-FLAG3の変異体又はHA-ARS2を、抗FLAG樹脂及び抗HA抗体をそれぞれ用いて免疫沈降した。免疫沈降物をウェスタンブロッティングで解析した。アクチンもローディングコントロールとして検出した。独立した３回の試験からの代表的な結果を示す。**、IgGの重鎖；***、IgGの軽鎖。

[図5D]ヒト、マウス、ウシ及びニワトリFLASHの中央領域におけるアライメント。同一及び類似アミノ酸を、黒色及び影の枠でそれぞれ示す。高度に保存された領域を点線で囲んだ。

[図6A]図６Ａ－Ｆは、FARB領域を介したFLASHとARS2との相互作用がS期進行に必要であることを示す。（図６Ａ）mFLASH欠失変異体の図解概要。

[図6B]293T細胞へ、空ベクター（Control）或いはmFLASH-FLAG3、Δ887-896 mFLASH-FLAG3又はΔ914-926 mFLASH-FLAG3をコードする発現ベクターを、HA-ARS2をコードする発現ベクターと共に、一過性にトランスフェクトした。４８時間後にmFLASH又はARS2を抗FLAG樹脂及び抗HA抗体をそれぞれ用いて免疫沈降した。免疫沈降物をウェスタンブロッティングで解析した。アクチンもローディングコントロールとして検出した。独立した３回の試験からの代表的なデータを示す。

[図6C]293T細胞へ、EGFPへ融合したmFLASHのFARB領域又はEGFPをコードした

発現ベクターを、HA-ARS2をコードする発現ベクターと共に、一過性にトランスフェクトした。４８時間後、ARS2とEGFP又はFARB-EGFPを、抗HA抗体及び抗GFP抗体をそれぞれ用いて免疫沈降した。免疫沈降物をウェスタンブロッティングで解析した。アクチンもローディングコントロールとして検出した。独立した３回の試験からの代表的なデータを示す。

[図6D]Tet-On shFLASHを有するKB細胞へ、空ベクター（Vector）或いはmFLASH-EGFP、ΔCC mFLASH-EGFP又はΔFARB mFLASH-EGFPをコードするレンチウイルス発現ベクターを感染させた。細胞を1 μg/ml Doxと共に３日間培養し、抗FLASHモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングのために溶解した。矢印、EGFP融合FLASH；*非特異的バンド。

[図6E]図６Ｄで示したKB細胞を２４穴プレート中に2.5×10^3個/ウェルで播種し、1 μg/ml Doxと共に３日間培養した。ヘモサイトメーターを用いて細胞数をトリパンブルー色素排除法で定量した。全てトリプリケートで行った３回の独立した試験からの代表的なデータを示す。エラーバーは± s.e.m.を意味する。

[図6F]図６Ｅで述べた細胞をBrdUで３０分間パルスラベルし、S期の細胞（BrdU陽性細胞）のパーセンテージをフローサイトメトリーにより決定した。倍数変化、即ちS期におけるshFLASHを発現していない細胞(Dox-)に対するshFLASHを発現している細胞(Dox+)のパーセンテージを算出した。全てトリプリケートで行った３回の独立した試験からの代表的なデータを示す。エラーバーは± s.e.m.を意味する。

[図7A]図７Ａ－Ｃは、FLASHノックダウンKB細胞の特徴づけを示す。（図７Ａ）Tet-On shFLASHを有するKB細胞を1 μg/ml Doxと共に、又はそれ無しで、３日間培養し、位相差顕微鏡下で観察した。スケールバー、100 μm。

[図7B]1 μg/ml Doxと共に、又はそれ無しで培養した後で、Tet-On shFLASHを有するKB細胞の体積を、フローサイトメトリーにより解析した。FS、前方散乱；SS、側方散乱。

[図7C]Tet-On shFLASHを有するKB細胞における複製依存的ヒストンmRNAのノ

ザンブロッティング。細胞を、1 μg/ml Doxと共に、又はそれ無しで３日間培養し、全RNAを抽出した。RNAはS期に同期化された細胞（SC）からも抽出された。該細胞は、80 ng/mlノコダゾールで１６時間処理し、ノコダゾールなしで更に１２時間培養することにより調製した。各ヒストン遺伝子のオープンリーディングフレーム領域をアルカリフォスファターゼで標識し、プローブとして使用した。ヒトeEF1A1（hEF1α）もコントロールとして解析した。矢印、複製依存的ヒストン；矢頭、複製非依存的ヒストン。

[図8A]図８Ａ及びＢは、ARS2ノックダウンKB細胞の特徴づけを示す。（図８Ａ）複製依存的ヒストンmRNAのノザンブロッティングを、Tet-On shlacZ又はshARS2を有するKB細胞において行った。細胞を1 μg/ml Doxと共に、又はそれ無しで、６日間培養し、図７Ｃにおいて述べたように、ノザンブロットを行った。矢印、複製依存的ヒストン；矢頭、複製非依存的ヒストン。

[図8B]NPAT（上段パネル）又はCoilin（下段パネル）の核内fociをARS2ノックダウンKB細胞において観察した。Tet-On shARS2を有するKB細胞を1 μg/ml Doxと共に、又はそれ無しで６日間培養し、NPAT（緑色）又はCoilin（緑色）に対する抗体により染色した後、共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。DNAをDAPI（青色）で染色した。スケールバー、１０μm。なお、図８Ａ及びＢは本来カラー図面である。

[図9A]図９Ａ及びＢは、ARS2ノックダウンKB細胞における、外因性ARSの回復した発現を示す。（図９Ａ）空ベクター(Vector)又はflag-mutARS2を安定に発現している、Tet-On shARS2を有するKB細胞を、1 μg/ml Doxで、又はそれ無しで、６日間処理した後、抗Flag抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。アクチンもローディングコントロールとして解析した。独立した３回の試験からの代表的な結果を示す。

[図9B]1 μg/ml Doxで、又はそれ無しで、６日間処理した後で、空ベクター(Vector)或いはDsRedモノマーmutARS2（DsRed-mutARS2)を発現している、Tet-On shARS2を有するKB細胞を、抗NPAT抗体（緑色）で染色し、共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。DNAをDAPI（青色）で染色した。スケールバー、８μm。な

お、図９Ａ及びＢは本来カラー図面である。

[図10A]図１０Ａ－Ｄは、FLASHがその中央領域を介してARS2と相互作用することを示す。（図１０Ａ）全長マウスFLASH(mFLASH)及びその多様な欠失変異体の図解概要。mFLASHにおけるアミノ酸残基の番号を示す。NLS、核内局在化シグナル；NES、核外輸送シグナル；DRD、DEDリクルーティングドメイン。

[図10B]293T細胞を、空ベクター（Control）或いはmFLASH-FLAG3又は表示したmFLASH-FLAG3の欠失変異体をコードする発現ベクターを、HA-ARS2をコードする発現ベクターと共に、一過性にトランスフェクトした。48時間後、種々のmFLASH-FLAG3の欠失変異体又はHA-ARS2を、抗FLAG樹脂及び抗HA抗体をそれぞれ用いて免疫沈降した。免疫沈降物を、抗Flag抗体又は抗HA抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。アクチンも、ローディングコントロールとして検出した。独立した３回の試験からの代表的な結果を示す。NC、トランスフェクトしていない293T細胞。

[図10C]293T細胞を、空ベクター（Control）或いはmFLASH-FLAG3又は表示したmFLASH-FLAG3の欠失変異体をコードする発現ベクターを、HA-ARS2をコードする発現ベクターと共に、一過性にトランスフェクトした。48時間後、種々のmFLASH-FLAG3の欠失変異体又はHA-ARS2を、抗FLAG樹脂及び抗HA抗体をそれぞれ用いて免疫沈降した。免疫沈降物を、抗Flag抗体又は抗HA抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。アクチンも、ローディングコントロールとして検出した。独立した３回の試験からの代表的な結果を示す。NC、トランスフェクトしていない293T細胞。

[図10D]293T細胞を、空ベクター（Control）或いはmFLASH-FLAG3又は表示したmFLASH-FLAG3の欠失変異体をコードする発現ベクターを、HA-ARS2をコードする発現ベクターと共に、一過性にトランスフェクトした。48時間後、種々のmFLASH-FLAG3の欠失変異体又はHA-ARS2を、抗FLAG樹脂及び抗HA抗体をそれぞれ用いて免疫沈降した。免疫沈降物を、抗Flag抗体又は抗HA抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。アクチンも、ローディングコントロールとして検出した。独立した３回の試験からの代表的な結果を示す。N

C、トランスフェクトしていない293T細胞。

[図11]ヒトＦＡＲＢとヒトＡＲＳ２との結合を示す、免疫沈降試験の結果である。

[図12]ｈＦＡＲＢ－ＥＧＦＰ及びｍＦＡＲＢ－ＥＧＦＰの構造を模式的に示す。

[図13]ＫＢ細胞の増殖に対するｈＦＡＲＢ－ＥＧＦＰ及びｍＦＡＲＢ－ＥＧＦＰの効果を示す。A_4Cはリンカーを意味する。

[図14A]免疫共沈降による変異ＦＡＲＢとＡＲＳとの会合の解析結果を示す。各レーンの上に示した番号は、表３に示した各変異ＦＡＲＢ配列に対応する。ＩＰは免疫共沈降に用いた抗体が認識する抗原を、ＷＢはウェスタンブロッティングに用いた抗体が認識する抗原を、それぞれ示す。

[図14B]免疫共沈降による変異ＦＡＲＢとＡＲＳとの会合の解析結果を示す。各レーンの上に示した番号は、表３に示した各変異ＦＡＲＢ配列に対応する。ＩＰは免疫共沈降に用いた抗体が認識する抗原を、ＷＢはウェスタンブロッティングに用いた抗体が認識する抗原を、それぞれ示す。

[図15]ＫＢ細胞のＳ期進行に対する７５８－９４４　ａａ－ＥＧＦＰ－ＮＬＳの効果を示す。

発明を実施するための形態

[0012] [１]ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチド

後述の実施例に示されるように、細胞周期の進行（特にＳ期進行）においてＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との会合が重要な役割を果たしており、また、ＦＬＡＳＨのＡＲＳ２への会合にはＦＬＡＳＨに含まれる特定の領域が必須である。本発明は、このＡＲＳ２への会合に必須なＦＬＡＳＨ中の領域（以下、ＦＡＲＢ領域（FLASH-ARS2 binding region）と略称する）を含むポリペプチドを提供する。本発明のポリペプチドは、下記に詳述するようなＦＬＡＳＨ－ＡＲＳ２相互作用の阻害に基づく細胞増殖抑制剤として、又はそのスクリーニングを行う際に使用する試薬として有用である。

[0013] ＦＬＡＳＨ（FLICE-associated huge protein）は、ＣＡＳＰ８ＡＰ２とも

呼ばれ、Ｆａｓ－カスパーゼ８媒介アポトーシス誘導経路の構成因子として同定された公知の遺伝子であり（非特許文献１）、Ｓ期進行において重要な役割を果たすことが報告されている（非特許文献９）。また、ＡＲＳ２（arsenite resistance protein 2）は、亜ヒ酸高感受性細胞株に亜ヒ酸への抵抗性を付与する遺伝子産物として同定された公知の遺伝子である。

[0014] 本明細書中、ＦＬＡＳＨ及びＡＲＳ２は通常、温血動物（哺乳動物又は鳥類）由来のものを意味する。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ミンク等の家畜、イヌ、ネコ等のペット、ヒト、サル、カニクイザル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類等を挙げることが出来るが、これらに限定されるものではない。鳥類としては、ニワトリ、ウズラ、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウ、エミュ、ダチョウ、ホロホロ鳥、ハト等を挙げることができる。ＦＬＡＳＨ及びＡＲＳ２は、好ましくは哺乳動物由来のものであり、より好ましくは霊長類（ヒト等）又はげっ歯類（マウス等）由来のものである。

[0015] ＦＬＡＳＨのヌクレオチド配列やアミノ酸配列は公知である。ヒト、マウス、ウシ及びニワトリのＦＬＡＳＨの代表的なヌクレオチド配列及びアミノ酸配列が、ＮＣＢＩに以下の通りに登録されている。

[ヒトＦＬＡＳＨ]

ヌクレオチド配列（ｃＤＮＡ配列）：アクセッション番号　NM_001137668（バージョンNM_001137668.1）（配列番号１）、アクセッション番号　NM_012115（バージョンNM_012115.3）（配列番号１９）

アミノ酸配列：アクセッション番号　NP_001131140（バージョンNP_001131140.1）（配列番号２）、アクセッション番号　NP_036247（バージョンNP_036247.1）（配列番号２０）

[マウスＦＬＡＳＨ]

ヌクレオチド配列（ｃＤＮＡ配列）：アクセッション番号　NM_011997（バージョンNM_011997.2）（配列番号３）

アミノ酸配列：アクセッション番号　NP_036127（バージョンNP_036127.2）（配列番号４）

[ウシＦＬＡＳＨ]

ヌクレオチド配列（ｃＤＮＡ配列）：アクセッション番号　XM_581379（バージョンXM_581379.3）

アミノ酸配列：アクセッション番号　XP_581379（バージョンXP_581379.3）

[ニワトリＦＬＡＳＨ]

ヌクレオチド配列（ｃＤＮＡ配列）：アクセッション番号　XM_419834（バージョンXM_419834.2）

アミノ酸配列：アクセッション番号　XP_419834（バージョンXP_419834.2）

[0016]　ＡＲＳ２のヌクレオチド配列やアミノ酸配列は公知である。ヒト及びマウスのＡＲＳ２の代表的なヌクレオチド配列及びアミノ酸配列が、ＮＣＢＩに以下の通りに登録されている。

[ヒトＡＲＳ２]

ヌクレオチド配列（cDNA配列）：アクセッション番号　NM_015908（バージョンNM_015908.5）（配列番号９）

アミノ酸配列：アクセッション番号　NP_056992（バージョンNP_056992.4）（配列番号１０）

[マウスＡＲＳ２]

ヌクレオチド配列（cDNA配列）：アクセッション番号　NM_031405（バージョンNM_031405.2）（配列番号１１）

アミノ酸配列：アクセッション番号　NP_113582（バージョンNP_113582.1）（配列番号１２）

[0017]　本明細書中、ＦＡＲＢ領域とは、

（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を意味する。

[0018] 配列番号５で表されるアミノ酸配列は、ヒトＦＬＡＳＨのＦＡＲＢ領域のアミノ酸配列であり、ヒトＦＬＡＳＨのアミノ酸配列（配列番号２）の第９３１～９４３番アミノ酸に相当する。

[0019] ＦＡＲＢ領域は、ＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する。当該結合は、免疫沈降試験においてＡＲＳ２ポリペプチドとの共沈降を可能にする程度の強度である。かかる結合活性の有無は、ヒト細胞（例えばＫＢ細胞）において評価対象の領域を含むポリペプチドとＡＲＳ２ポリペプチドを共発現させ、適切な可溶化緩衝液により細胞ライセートを調製し、いずれか一方のポリペプチドを特異的に認識する抗体による免疫沈降試験を当該ライセートについて実施することにより確認することが出来る。免疫沈降物中に評価対象の領域を含むポリペプチドとＡＲＳ２ポリペプチドの双方が認められた場合、当該領域はＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有すると評価することが出来る。

[0020] 本発明のポリペプチドは、ＦＡＲＢ領域を有するので、ＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する。

[0021] 上記（２）の領域のアミノ酸配列は、配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上、好ましくは７６％以上、より好ましくは８４％以上、更に好ましくは９２％以上の同一性を有するアミノ酸配列である。

[0022] 本明細書においてアミノ酸配列の「同一性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて２つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント（好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである）における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する、同一アミノ酸残基の割合（％）を意味する。

[0023] 本明細書におけるアミノ酸配列の同一性は、ＮＣＢＩのインターネットホームページ上に公開されている相同性計算アルゴリズムNCBI blastp/Blast 2 sequences (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (Short queries=off／Expect threshold=10／Matrix=BLOSUM62／Gap Costs=Existence:11 Extension:1／Compositional adjustments=Conditional compositional score matrix adjustment／filter=off／Mask=off) にて計算することができる。アミノ酸配列の同一性を決定するためのアルゴリズムとしては、例えば、Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877 (1993) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはNBLASTおよびXBLASTプログラム(version 2.0) に組み込まれている (Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402 (1997))] 、Needleman et al., J. Mol. Biol., 48:444-453 (1970) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムに組み込まれている] 、Myers and Miller, CABIOS, 4: 11-17 (1988) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはCGC配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム (version 2.0) に組み込まれている] 、Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444-2448 (1988) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のFASTAプログラムに組み込まれている] 等が挙げられるが、それらに限定されない。

[0024] 上記（３）の領域のアミノ酸配列は、配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個（好ましくは１～３個、より好ましくは１又は２個、最も好ましくは１個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、例えば、(1)配列番号５に示されるアミノ酸配列中の１～４個（好ましくは１～３個、より好ましくは１又は２個、最も好ましくは１個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2)配列番号５に示されるアミノ酸配列に１～４個（好ましくは１～３個、より好ましくは１又は２個、最も好ましくは１個）のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列、(3)配列番号５に示されるアミノ酸配

列に１～４個（好ましくは１～３個、より好ましくは１又は２個、最も好ましくは１個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4)配列番号５に示されるアミノ酸配列中の１～４個（好ましくは１～３個、より好ましくは１又は２個、最も好ましくは１個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(5)上記(1)～(4)の変異が組み合わされたアミノ酸配列（この場合、変異したアミノ酸の総和が１～４個、好ましくは１～３個、より好ましくは１又は２個、最も好ましくは１個）である。

[0025] 更なる局面において、上記（２）又は（３）の領域のアミノ酸配列においては、配列番号５で表されるアミノ酸配列における第４番目、第５番目及び第７番目のグルタミン酸残基が保存されていることが好ましく、より好ましくは配列番号５で表されるアミノ酸配列における第４番目のグルタミン酸～第７番目のグルタミン酸までの領域のアミノ酸配列が保存されていることが好ましい。この領域におけるアミノ酸残基の欠失、置換、挿入又は付加は、ＡＲＳ２ポリペプチドへの結合活性を低下又は喪失させる可能性が高い。一方、この領域以外の配列番号５で表されるアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の欠失、置換、挿入又は付加（特に置換）は、ＡＲＳ２ポリペプチドへの結合活性を低下又は喪失させる可能性が低い。

[0026] 上記（２）及び（３）の領域のアミノ酸配列の好適な例としては、例えば、マウス、ウシ及びニワトリのＦＡＲＢ領域のアミノ酸配列（それぞれ、配列番号６、７及び８）を挙げることが出来る。マウスのＦＡＲＢ領域のアミノ酸配列は、ヒトＦＡＲＢ領域のアミノ酸配列において１個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなり、ヒトＦＡＲＢ領域のアミノ酸配列と９２．３％（１２／１３）の同一性を有する。ウシのＦＡＲＢ領域のアミノ酸配列は、ヒトＦＡＲＢ領域のアミノ酸配列において２個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなり、ヒトＦＡＲＢ領域のアミノ酸配列と８４．６％（１１／１３）の同一性を有する。ニワトリのＦＡＲＢ領域のアミノ酸配列は、ヒトＦＡＲＢ領域のアミノ酸配列において４個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなり、ヒトＦＡＲＢ領域のアミノ酸配列と６９．２％（９／１

３）の同一性を有する。

[0027] 更なる局面において、上記（２）及び（３）の領域のアミノ酸配列の好適な例としては、配列番号２７、２８、３０、又は３２～３６で表されるアミノ酸配列を挙げることが出来る。

[0028] 本発明のポリペプチドは、ＡＲＳ２ポリペプチドへの結合活性を有する限り、その長さは特に制限されず、使用目的に応じて所望の長さのポリペプチドを選択することが出来る。例えば、本発明のポリペプチドとして、長さが３０００アミノ酸以下のもの、２０００アミノ酸以下のもの、１０００アミノ酸以下のもの、５００アミノ酸以下のもの、４００アミノ酸以下のもの、３００アミノ酸以下のもの、２５０アミノ酸以下のもの、２００アミノ酸以下のもの、１５０アミノ酸以下のもの、１００アミノ酸以下のもの、９０アミノ酸以下のもの、８０アミノ酸以下のもの、７０アミノ酸以下のもの、６０アミノ酸以下のもの、５０アミノ酸以下のもの、４０アミノ酸以下のもの、３０アミノ酸以下のもの、２０アミノ酸以下のもの、１９アミノ酸以下のもの、１８アミノ酸以下のもの、１７アミノ酸以下のもの、１６アミノ酸以下のもの、１５アミノ酸以下のもの、１４アミノ酸以下のもの等を適宜選択することが出来る。本発明のポリペプチドは、９アミノ酸以上、好ましくは１１アミノ酸以上、最も好ましくは１３アミノ酸以上の長さを有する。

[0029] 本発明のポリペプチドにおける、ＦＡＲＢ領域以外の部分のアミノ酸配列は、本発明のポリペプチドがＡＲＳ２ポリペプチドへの結合活性を有する限り、特に限定されない。

[0030] 上記本発明のポリペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端に少なくとも１つのタグポリペプチド又はシグナル配列が融合してなる融合ポリペプチドも、本発明のポリペプチドの態様の一つに含まれる。

[0031] タグポリペプチドとは、ポリペプチドの検出や精製等を容易ならしめるために付加されるポリペプチドをいう。タグポリペプチドとしては、エピトープタグ、蛍光ポリペプチド、イムノグロブリンＦｃ領域等を挙げることが出来るがこれに限定されない。エピトープタグとは、抗体または他の結合パー

トナーによって特異的に認識されるペプチドをいい、具体的には、Ｆｌａｇタグ、ポリヒスチジンタグ、ｃ－Ｍｙｃタグ、ＨＡタグ、ＡＵ１タグ、ＧＳＴタグ、ＭＢＰタグ等を挙げることが出来る。蛍光ポリペプチドとしては、ＧＦＰ、ＹＦＰ、ＲＦＰ、ＣＦＰ、ＢＦＰ、ＥＧＦＰ等を挙げることが出来る。このようなタグポリペプチドは当業者に周知であり、当該タグポリペプチドを特異的に認識する多様な抗体が市販されている。

[0032] シグナル配列とは、ポリペプチドの翻訳と同時にまたは翻訳後に、合成部位から細胞内部の特定部位、又は細胞外部へのポリペプチドの運搬や局在を指示するポリペプチド配列をいう。シグナル配列には、ポリペプチドの分泌を誘導するリーダー配列、核移行シグナル配列（例えば、ＳＶ４０ Ｔ抗原の核移行シグナル配列）、核外移行シグナル配列、核小体局在シグナル等を挙げることが出来るがこれに限定されない。このようなシグナル配列は当業者に周知であり、目的に応じて適宜選択することが出来る。

[0033] 上記本発明のポリペプチドとタグポリペプチド又はシグナル配列とは直接又はリンカーを介して連結される。リンカーとは、２つのポリペプチドドメインを共有結合するアミノ酸配列をいう。リンカーを介して結合することにより、連結したポリペプチドドメインに回転自由が提供されるので、タグポリペプチド又はシグナル配列による立体構造上の制限により本発明のポリペプチドのＡＲＳ２ポリペプチドへの結合活性が減弱されるリスクを回避することができる。リンカーの長さは、ポリペプチドがＡＲＳ２ポリペプチドへの結合活性を有する限り特に制限されないが、通常１～２５アミノ酸、好ましくは１～１０アミノ酸であって、当該技術分野において周知である。リンカーのアミノ酸配列も、ポリペプチドがＡＲＳ２ポリペプチドへの結合活性を有する限り特に制限されない。リンカーのアミノ酸配列の具体例としては、ＡＡＡＡＣ（配列番号１６）、グリシン(4)-セリンスペーサー（Chaudhary et al. (1989)）等を挙げることができるが、これらに限定されるわけではない。

[0034] 上記本発明のポリペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端に少なくとも１つの

タグポリペプチド又はシグナル配列が融合している場合、当該ポリペプチドの長さは、ＡＲＳ２ポリペプチドへの結合活性を有する限り、特に制限されず、使用目的に応じて所望の長さのポリペプチドを選択することが出来る。この場合、付加部分（タグポリペプチド又はシグナル配列）以外の部分のポリペプチドの長さとして、３０００アミノ酸以下のもの、２０００アミノ酸以下のもの、１０００アミノ酸以下のもの、５００アミノ酸以下のもの、４００アミノ酸以下のもの、３００アミノ酸以下のもの、２５０アミノ酸以下のもの、２００アミノ酸以下のもの、１５０アミノ酸以下のもの、１００アミノ酸以下のもの、９０アミノ酸以下のもの、８０アミノ酸以下のもの、７０アミノ酸以下のもの、６０アミノ酸以下のもの、５０アミノ酸以下のもの、４０アミノ酸以下のもの、３０アミノ酸以下のもの、２０アミノ酸以下のもの、１９アミノ酸以下のもの、１８アミノ酸以下のもの、１７アミノ酸以下のもの、１６アミノ酸以下のもの、１５アミノ酸以下のもの、１４アミノ酸以下のもの等を適宜選択することが出来る（尚、リンカーを使用する場合には、当該長さはリンカー部分を除いた長さを示す）。融合した付加ペプチド以外の部分のポリペプチドの長さは、９アミノ酸以上、好ましくは１１アミノ酸以上、最も好ましくは１３アミノ酸以上である。

[0035] 本発明のポリペプチドは、ＡＲＳ２ポリペプチドへ結合するので、細胞内（好ましくは核内）においてＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との会合を阻害することが可能である。ＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との会合は細胞周期の進行（特にＳ期の進行）に重要な役割を果たす。従って、１つの態様において、本発明のポリペプチドは、細胞増殖を抑制する活性を有する。本態様を「細胞増殖抑制活性を有する態様」と称する。

[0036] 本態様のポリペプチドが増殖を抑制することの出来る細胞は、ＦＬＡＳＨ及びＡＲＳ２を発現する細胞であれば特に限定されないが、通常、温血動物（哺乳動物又は鳥類）の細胞である。哺乳動物や鳥類の具体例は上述の通りである。細胞は通常は哺乳動物の細胞であり、より好ましくは霊長類（ヒト等）又はげっ歯類（マウス等）の細胞である。

[0037] 細胞増殖抑制活性の有無は、発現ベクターを用いて増殖可能な細胞（例えばＫＢ細胞）内へ評価対象のポリペプチドを導入し、適切な培地中で３日間培養した後で、空ベクター導入群と比較して細胞数が減少するか否か解析することにより評価することが出来る。空ベクター導入群と比較して細胞数が減少した場合は、評価対象のポリペプチドは細胞増殖抑制活性を有すると判断することが出来る。

[0038] また、本態様のポリペプチドは、細胞周期の進行（特にＳ期進行）を促進するというＦＬＡＳＨの活性を代替しない。該特性の有無は、ＦＬＡＳＨに対する特異的ｓｉＲＮＡにより、ＦＬＡＳＨの発現を抑制した細胞（ＦＬＡＳＨノックダウン細胞）（例えばＫＢ細胞）へ、発現ベクターを用いて評価対象のポリペプチドを導入し、空ベクター導入群と比較してフローサイトメトリーによりＳ期の細胞の割合が減少するか否か解析することにより評価することが出来る。ＦＬＡＳＨノックダウン細胞はＳ期に蓄積されるが、空ベクター導入群よりもＳ期の細胞の割合を有意に減少させた場合には、評価対象のポリペプチドはＦＬＡＳＨの機能を代替する活性を有していると判断することが出来る。

[0039] 後述の実施例において示されるように、ＦＬＡＳＨが細胞周期の進行（特にＳ期進行）を促進する機能を発揮するためには、ＦＬＡＳＨ中に含まれるコイルドコイルドメインを介するＦＬＡＳＨの自己会合が必須であり、このドメインを欠失したＦＬＡＳＨ変異体は、細胞周期の進行（特にＳ期進行）というＦＬＡＳＨの機能を十分に代替することができない。従って、本態様のポリペプチドは、好ましくはＦＬＡＳＨのコイルドコイルドメインを有さない。このポリペプチドは、ＦＬＡＳＨへ会合できないため、ＦＬＡＳＨの機能を代替することができない。

[0040] ＦＬＡＳＨのコイルドコイルドメインとは、

（１）配列番号１４で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号１４で表されるアミノ酸配列と８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有す

る領域；及び

（３）配列番号１４で表されるアミノ酸配列において１～９個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を意味する。

[0041] 配列番号１４で表されるアミノ酸配列は、ヒトＦＬＡＳＨのコイルドコイルドメインのアミノ酸配列であり、ヒトＦＬＡＳＨのアミノ酸配列（配列番号２）の第６８～１４２番アミノ酸に相当する。

[0042] ＦＬＡＳＨのコイルドコイルドメインは、ＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有する。当該結合は、免疫沈降試験において共沈降を可能にする程度の強度である。かかる結合活性の有無は、ヒト細胞において評価対象の領域を含むポリペプチドとＦＬＡＳＨポリペプチドを共発現させ、適切な可溶化緩衝液により細胞ライセートを調製し、いずれか一方のポリペプチドを特異的に認識する抗体による免疫沈降試験を当該ライセートについて実施することにより確認することが出来る。免疫沈降物中に評価対象の領域を含むポリペプチドとＦＬＡＳＨポリペプチドの双方が認められた場合、当該領域はＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有すると評価することが出来る。

[0043] 上記（３）の領域のアミノ酸配列は、配列番号１４で表されるアミノ酸配列において１～９個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、例えば、(1)配列番号１４に示されるアミノ酸配列中の１～９個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2)配列番号１４に示されるアミノ酸配列に１～９個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列、(3)配列番号１４に示されるアミノ酸配列に１～９個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4)配列番号１４に示されるアミノ酸配列中の１～９個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(5)上記(1)～(4)の変異が組み合わされたアミノ酸配列（この場合、変異したアミノ酸の総和が１～９個）である。

[0044] 上記（２）及び（３）の領域のアミノ酸配列の好適な例としては、例えば

、マウスＦＬＡＳＨのコイルドコイルドメインのアミノ酸配列（配列番号１５）を挙げることが出来る。マウスＦＬＡＳＨのコイルドコイルドメインのアミノ酸配列は、ヒトＦＬＡＳＨのコイルドコイルドメインのアミノ酸配列において９個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなり、ヒトＦＡＲＢ領域のアミノ酸配列と８８．０％（６６／７５）の同一性を有する。

[0045] 本発明のポリペプチドは修飾されていてもよい。該修飾としては、脂質鎖の付加（脂肪族アシル化（パルミトイル化、ミリストイル化等）、プレニル化（ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化等）等）、リン酸化（セリン残基、スレオニン残基、チロシン残基等におけるリン酸化）、アセチル化、糖鎖の付加（Ｎグリコシル化、Ｏグリコシル化）等を挙げることが出来る。

[0046] また、本発明のポリペプチドは、適当な標識剤、例えば、放射性同位元素（例：^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ等）、酵素（例：βーガラクトシダーゼ、βーグルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等）、蛍光物質（例：フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等）、発光物質（例：ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン等）、アフィニティタグ（例：ビオチン等）などで標識されていてもよい。

[0047] また、本明細書において用語「ポリペプチド」は、その塩をも含む意味として用いられる。ポリペプチドの塩としては生理学的に許容される酸（例：無機酸、有機酸）や塩基（例：アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが挙げられる。

[0048] 本発明のポリペプチドの例としては、例えば、ＦＬＡＳＨポリペプチド、ＦＡＲＢ領域を含むＦＬＡＳＨの部分ポリペプチド、これらのポリペプチドとタグポリペプチド及び／又はシグナル配列との融合ポリペプチド等を挙げ

ることが出来る。

[0049] 本発明のポリペプチドは単離又は精製されていることが好ましい。「単離又は精製」とは、目的とする成分以外の成分を除去する操作が施されていることを意味する。単離又は精製された本発明のポリペプチドの純度（全ポリペプチド重量に対する、本発明のポリペプチドの重量の割合）は、通常５０％以上、好ましくは７０％以上、より好ましくは９０％以上、最も好ましくは９５％以上（例えば実質的に１００％）である。

[0050] 本発明のポリペプチドの製造方法については特に制限はなく、公知のペプチド合成法に従って製造してもよく、また公知の遺伝子組み換え技術を用いて製造してもよい。ペプチド合成法は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれであってもよい。本発明のポリペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合し、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的とするポリペプチドを製造することができる。

[0051] 遺伝子組み換え技術を用いて本発明のポリペプチドを製造する場合には、先ず後述するような本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを取得し、該ポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクターで宿主を形質転換し、得られる形質転換体を培養することによって、該ポリペプチドを製造することができる。該ポリヌクレオチド、遺伝子組み換え技術を用いた本発明のポリペプチドの製造方法については本明細書中後述する。

[0052] [２]ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

本発明は上記本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供するものである。該ポリヌクレオチドは、ＤＮＡであってもＲＮＡであってもよく、あるいはＤＮＡ／ＲＮＡキメラであってもよい。また、該ポリヌクレオチドは二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖ＤＮＡ、二本鎖ＲＮＡまたはＤＮＡ：ＲＮＡのハイブリッドでもよい。

[0053] 本発明のポリヌクレオチドとしては、配列番号１７又は１８で表されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを挙げることが出来る。配列番号１

７で表されるヌクレオチド配列はヒトＦＡＲＢ領域からなるポリペプチド（配列番号５）を、配列番号１８で表されるヌクレオチド配列は、マウスＦＡＲＢ領域からなるポリペプチド（配列番号６）を、それぞれコードする。

[0054] 本発明のポリヌクレオチドは、公知の配列情報や本明細書の配列表に記載された配列情報に基づき、公知の遺伝子組換え技術を利用することにより容易に製造することが出来る。例えば、配列情報に基づき適当なプライマーを設計し、本発明のポリペプチドを構成する構成要素をコードするＤＮＡをＰＣＲによって増幅し、ＤＮＡフラグメントをリガーゼなどの適切な酵素を用いて連結することにより、本発明のポリペプチドを製造することが出来る。或いは、配列情報に基づいて、ポリヌクレオチド合成装置により各構成要素をコードするポリヌクレオチドを合成してもよい。

[0055] 取得された本発明のポリヌクレオチドは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化するか、リンカーを付加した後に、使用することができる。該ポリヌクレオチドはその５’末端側に翻訳開始コドンとしてのＡＴＧを有し、また３’末端側には翻訳終止コドンとしてのＴＡＡ、ＴＧＡまたはＴＡＧを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成ＤＮＡアダプターを用いて付加することができる。

[0056] 本発明のポリヌクレオチドは、好ましくは単離又は精製されている。

[0057] ［３］ベクター及び形質転換体

本発明は、上記本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを提供するものである。該ベクターは好ましくは単離又は精製されている。ベクターとしては発現ベクター、クローニングベクター等を挙げることができ、目的に応じて選択することが可能であるが、好ましくは、ベクターは発現ベクターである。該発現ベクターは、本発明のポリペプチドを発現し得る。該発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドを適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に機能的に連結することにより製造することができる。ベクターの種類としては、プラスミドベクター、ウイルスベクター等を挙げることができ、用いる宿主に応じて適宜選択することが出来る。

[0058] 宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌（エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）等）、バチルス属菌（バチルス・サブチルス（Bacillus subtilis）等）、酵母（サッカロマイセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）等）、昆虫細胞（夜盗蛾の幼虫由来株化細胞（Spodoptera frugiperda cell；Ｓｆ細胞）等）、昆虫（カイコの幼虫等）、哺乳動物細胞（ラット神経細胞、サル細胞（ＣＯＳ－７等）、チャイニーズハムスター細胞（ＣＨＯ細胞等）等）などが用いられる。

[0059] 哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ミンク等の家畜、イヌ、ネコ等のペット、ヒト、サル、カニクイザル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類等を挙げることが出来るが、これらに限定されるものではない。

[0060] プラスミドベクターとしては、大腸菌由来のプラスミドベクター（例、ｐＢＲ３２２，ｐＢＲ３２５，ｐＵＣ１２，ｐＵＣ１３）、枯草菌由来のプラスミドベクター（例、ｐＵＢ１１０，ｐＴＰ５，ｐＣ１９４）、酵母由来プラスミドベクター（例、ｐＳＨ１９，ｐＳＨ１５）等を挙げることができ、用いる宿主の種類や使用目的に応じて適宜選択することが出来る。

[0061] ウイルスベクターの種類は、用いる宿主の種類や使用目的に応じて適宜選択することが出来る。例えば、宿主として昆虫細胞を用いる場合には、バキュロウイルスベクター等を用いることが出来る。また、宿主として哺乳動物細胞を用いる場合には、モロニーマウス白血病ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター等のレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、パルボウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、センダイウイルスベクター等を用いることが出来る。

[0062] また、プロモーターは、用いる宿主の種類に対応して、該宿主内で転写を開始可能なものを選択することが出来る。例えば、宿主がエシェリヒア属菌である場合、ｔｒｐプロモーター、ｌａｃプロモーター、Ｔ７プロモーター

などが好ましい。宿主がバチルス属菌である場合、ＳＰＯ１プロモーター、ＳＰＯ２プロモーター、ｐｅｎＰプロモーターなどが好ましい。宿主が酵母である場合、ＰＨＯ５プロモーター、ＰＧＫプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合、ポリヘドリンプロモーター、Ｐ１０プロモーターなどが好ましい。宿主が哺乳動物細胞である場合、サブゲノミック（２６Ｓ）プロモーター、ＣＭＶプロモーター、ＳＲαプロモーターなどが好ましい。

[0063] 本発明のベクターは、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリＡ付加シグナル、選択マーカー、ＳＶ４０複製オリジン（以下、ＳＶ４０ｏｒｉと略称する場合がある）などを、それぞれ機能可能な態様で含有していてもよい。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、ｄｈｆｒと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（ＭＴＸ）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Ａｍｐｒと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Ｎｅｏｒと略称する場合がある、Ｇ４１８耐性）等が挙げられる。

[0064] 上記本発明のベクターを、自体公知の遺伝子導入法（例えば、リポフェクション法、リン酸カルシウム法、マイクロインジェクション法、プロトプラスト融合法、エレクトロポレーション法、DEAEデキストラン法、Gene Gunによる遺伝子導入法等）に従って上記宿主へ導入することにより、該ベクターが導入された形質転換体（本発明の形質転換体）を製造することができる。導入されるベクターとして発現ベクターを使用することにより、該形質転換体は本発明のポリペプチドを発現し得る。本発明の形質転換体は、本発明のポリペプチドの製造等に有用である。

[0065] 本発明の形質転換体を、宿主の種類に応じて、自体公知の方法で培養し、培養物から本発明のポリペプチドを単離することにより、本発明のポリペプチドを製造することが出来る。宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体の培養は、ＬＢ培地やＭ９培地等の適切な培地中、通常約１５～４３℃で、約３～２４時間行なわれる。宿主がバチルス属菌である形質転換体の培養は、

適切な培地中、通常約３０～４０℃で、約６～２４時間行なわれる。宿主が酵母である形質転換体の培養は、バークホールダー培地等の適切な培地中、通常約２０℃～３５℃で、約２４～７２時間行なわれる。宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体の培養は、約１０%のウシ血清が添加されたGrace's Insect medium等の適切な培地中、通常約２７℃で、約３～５日間行なわれる。宿主が動物細胞である形質転換体の培養は、約１０%のウシ血清が添加されたＭＥＭ培地等の適切な培地中、通常約３０℃～４０℃で、約１５～６０時間行なわれる。いずれの培養においても、必要に応じて通気や撹拌を行ってもよい。培養物からの本発明のポリペプチドの単離又は精製は、例えば、菌体溶解液や培養上清を、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどの複数のクロマトグラフィーに供することにより達成することができる。

[0066] ［４］細胞増殖抑制剤Ｉ

後述の実施例に示されるように、細胞周期の進行（特にＳ期進行）においてＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との会合が重要な役割を果たす。また、この会合に責を負う領域は、ＦＬＡＳＨにおいてはＦＡＲＢ領域である。従って、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドによって、ＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との会合を阻害することにより、細胞の増殖を抑制することが可能となる。従って、本発明は、上記本発明のポリペプチド（ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチド）又は該ポリペプチドを発現し得る発現ベクターを含む、細胞増殖抑制剤（細胞増殖抑制剤Ｉ）を提供するものである。

[0067] 細胞増殖抑制剤Ｉに用いられるＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドとしては、上記[１]における細胞増殖抑制活性を有する態様の本発明のポリペプチドが好ましい。

[0068] 細胞周期の進行（Ｓ期進行）に寄与するＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との会合は、通常核内で起こるので、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドの核内への移行を促進するため、細胞増殖抑制剤Ｉに用いられるＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドは、核移行シグナルを有していることが好ましい。また、通常、分子

量４５０００Ｄａ以下、好ましくは分子量４００００Ｄａ以下の物質であれば、容易に核膜を透過し、細胞質から核内へ移行することが出来るので、細胞増殖抑制剤Ｉに用いられるＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドの分子量は、好ましくは４５０００Ｄａ以下、より好ましくは４００００Ｄａ以下である。

[0069] また、細胞増殖抑制剤Ｉに用いられるＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドは、ポリペプチドの細胞内への導入を容易ならしめるためのProtein Transduction Domain（PTD）等の配列等の付加配列を含んでいてもよい。PTDとしては、ANTENNAPEDIA、HIV/TAT、HSV/VP-22等の細胞通過ドメイン、７～１１個のアルギニンからなるポリアルギニン等を挙げることが出来る。

[0070] 細胞増殖抑制剤Ｉにおいて用いられる発現ベクターとしては、上記[３]の項で記載したものを用いることが出来る。該発現ベクターにおいては、通常、上述のＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（好ましくはDNA）が、投与対象である哺乳動物（好ましくはヒト）の細胞（例えば、肉腫細胞）内でプロモーター活性を発揮し得るプロモーターに機能的に連結されている。

[0071] 細胞増殖抑制剤Ｉにおいて用いられる発現ベクターに使用されるベクターの種類は特に制限されないが、ヒト等の哺乳動物への投与に好適なベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルスベクターが挙げられる。このうち、アデノウイルスは、遺伝子導入効率が極めて高く、非分裂細胞にも導入可能である等の利点を有する。但し、導入遺伝子の宿主染色体への組込みは極めて稀であるので、遺伝子発現は一過性で通常約４週間程度しか持続しない。治療効果の持続性を考慮すれば、比較的遺伝子導入効率が高く、非分裂細胞にも導入可能で、且つ逆位末端繰り返し配列（ITR）を介して染色体に組み込まれ得るアデノ随伴ウイルスの使用もまた好ましい。

[0072] 細胞増殖抑制剤Ｉは、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチド又はこれを発現し得る発現ベクターに加え、任意の担体、例えば医薬上許容される担体を含む

ことができる。

[0073] 医薬上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル等の滑剤、クエン酸、メントール等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水等の希釈剤、ベースワックス等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。

[0074] 細胞増殖抑制剤Ｉの有効成分が発現ベクターである場合、ポリヌクレオチドの細胞内への導入を促進するために、細胞増殖抑制剤Ｉは更に核酸導入用試薬を含むことができる。該ポリヌクレオチドがウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターに組み込まれている場合には、遺伝子導入試薬としてはレトロネクチン、ファイブロネクチン、ポリブレン等を用いることができる。また、該ポリヌクレオチドがプラスミドベクターに組み込まれている場合は、リポフェクチン、リプフェクタミン（lipfectamine）、DOGS（トランスフェクタム）、DOPE、DOTAP、DDAB、DHDEAB、HDEAB、ポリブレン、あるいはポリ（エチレンイミン）(PEI)等の陽イオン性脂質を用いることが出来る。

[0075] 経口投与に好適な製剤としては、液剤、カプセル剤、サッシェ剤、錠剤、懸濁液剤、乳剤等を挙げることができる。

[0076] 非経口的な投与（例えば、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与など）に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分および医薬上許容される担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解または懸濁すればよい状態

で保存することもできる。

[0077] 医薬組成物中のＦＡＲＢ領域を含むポリペプチド又は該ポリペプチドを発現し得る発現ベクターの含有量は、例えば、医薬組成物全体の約０．１ないし１００重量%である。

[0078] 細胞増殖抑制剤Ｉの投与量は、有効成分の活性や種類、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なり一概に云えないが、通常、成人１日あたり有効成分量として約０．００１～約５００ｍｇ／ｋｇである。

[0079] 本発明の細胞増殖抑制剤Ｉは、好ましくは、その有効成分である上記のポリヌクレオチド又はこれを発現し得る発現ベクターが、標的となる細胞に送達されるように、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウシ、サル、ヒト）に対して安全に投与される。

[0080] 本発明の細胞増殖抑制剤Ｉは、異常な細胞増殖に起因する疾患、例えば、良性腫瘍（子宮筋腫など）；固形癌（咽頭癌、食道癌、大腸癌、肺癌、胃癌、膵臓癌、肝癌などを含む扁平上皮癌および腺癌、または脳腫癌）、神経膠腫、白血病、悪性リンパ腫などを含む悪性腫瘍もしくは癌（癌腫、肉腫）；腎炎（糸球体腎炎など）、ヒト自己免疫性リンパ球増殖性症候群、リンパ球増殖性疾患、血管免疫芽細胞性リンパ節症、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎等）、進行性全身性硬化症、多発性筋炎（皮膚筋炎）、シェーグレン症候群、骨髄異形成症候群、強皮症、慢性関節リウマチ、乾癬、創傷の過形成（肉芽等）等の予防・治療薬として有用である。

[0081] ［５］細胞増殖抑制剤ＩＩ

後述の実施例に示されるように、細胞周期の進行（特にＳ期進行）においてＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との結合が重要な役割を果たし、ＡＲＳ２の発現を抑制することにより、細胞の増殖を抑制することが可能となる。従って、本発明は、ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸、又はこれらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクターを含む、細胞

増殖抑制剤（細胞増殖抑制剤ＩＩ）を提供するものである。

[0082] 「特異的な遺伝子発現の抑制」とは、標的とする遺伝子の発現を、それ以外の遺伝子の発現よりも強く抑制することを意味する。

[0083] ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮＡとしては、例えば

（Ａ）ＡＲＳ２をコードするｍＲＮＡ（成熟ｍＲＮＡ又は初期転写産物）のヌクレオチド配列又は１８塩基以上のその部分配列に相補的なヌクレオチド配列を含む２本鎖のＲＮＡ、及び

（Ｂ）ＡＲＳ２をコードするｍＲＮＡ（成熟ｍＲＮＡ又は初期転写産物）と治療対象動物（好ましくはヒト）の細胞内でハイブリダイズし得る１８塩基以上のヌクレオチド配列を含み、且つハイブリダイズすることによりＡＲＳ２の転写を抑制する２本鎖のＲＮＡ

を挙げることができる。

[0084] ＡＲＳ２をコードするｍＲＮＡのヌクレオチド配列としては、例えば、配列番号９で表されるヌクレオチド配列（ヒトＡＲＳ２）、配列番号１１で表されるヌクレオチド配列（マウスＡＲＳ２）を挙げることが出来る。

[0085] 短い二本鎖ＲＮＡを細胞内に導入するとそのＲＮＡに相補的なｍＲＮＡが分解される、いわゆるＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）と呼ばれる現象は、以前から線虫、昆虫、植物等で知られていたが、最近、この現象が動物細胞でも起こることが確認されたことから［Nature, 411(6836): 494-498 (2001)］、リボザイムの代替技術として注目されている。

[0086] ｓｉＲＮＡは、代表的には、標的遺伝子のｍＲＮＡのヌクレオチド配列又はその部分配列（以下、標的ヌクレオチド配列）と相補的な配列を有するＲＮＡとその相補鎖からなる２本鎖オリゴＲＮＡである。また、ヘアピンループ部分を介して、標的ヌクレオチド配列に相補的な配列（第１の配列）と、その相補配列（第２の配列）とが連結された一本鎖ＲＮＡであって、ヘアピンループ型の構造をとることにより、第１の配列が第２の配列と２本鎖構造を形成するＲＮＡ（small hairpin RNA: shRNA）もｓｉＲＮＡの好ましい態様の１つである。

[0087] ｓｉＲＮＡに含まれる、標的ヌクレオチド配列と相補的な部分の長さは、通常、約１８塩基以上、好ましくは約１９塩基以上、より好ましくは約２１塩基以上の長さであるが、標的遺伝子の発現を特異的に抑制可能である限り、特に限定されない。ｓｉＲＮＡが２３塩基よりも長い場合には、該ｓｉＲＮＡは細胞内で分解されて、約２０塩基前後のｓｉＲＮＡを生じ得るので、理論的には標的ヌクレオチド配列と相補的な部分の長さの上限は、標的遺伝子のｍＲＮＡ（成熟ｍＲＮＡもしくは初期転写産物）のヌクレオチド配列の全長である。しかし、インターフェロン誘導の回避、合成の容易さ、抗原性の問題等を考慮すると、該相補部分の長さは、例えば約５０塩基以下、好ましくは約２５塩基以下、最も好ましくは約２３塩基以下である。即ち、該相補部分の長さは、通常、約１８～５０塩基、好ましくは約１９～約２５塩基、より好ましくは約２１～約２３塩基である。

[0088] また、ｓｉＲＮＡを構成する各ＲＮＡ鎖の長さも、通常、約１８塩基以上、好ましくは約１９塩基以上、より好ましくは約２１塩基以上の長さであるが、標的遺伝子の発現を特異的に抑制可能である限り、特に限定されず、理論的には各ＲＮＡ鎖の長さの上限はない。しかし、インターフェロン誘導の回避、合成の容易さ、抗原性の問題等を考慮すると、ｓｉＲＮＡの長さは、例えば約５０塩基以下、好ましくは約２５塩基以下、最も好ましくは約２３塩基以下である。即ち、各ＲＮＡ鎖の長さは、例えば通常、約１８～５０塩基、好ましくは約１９～約２５塩基、より好ましくは約２１～約２３塩基である。なお、ｓｈＲＮＡの長さは、２本鎖構造をとった場合の２本鎖部分の長さとして示すものとする。

[0089] 標的ヌクレオチド配列と、ｓｉＲＮＡに含まれるそれに相補的な配列とは、完全に相補的であることが好ましい。しかし、ｓｉＲＮＡの中央から外れた位置についての塩基の変異（少なくとも９０％以上、好ましくは９５％以上の同一性の範囲内であり得る）については、完全にＲＮＡ干渉による切断活性がなくなるのではなく、部分的な活性が残存し得る。他方、ｓｉＲＮＡの中央部の塩基の変異は影響が大きく、ＲＮＡ干渉によるｍＲＮＡの切断活

性が極度に低下し得る。

[0090] ｓｉＲＮＡは、５’及び／又は３’末端に塩基対を形成しない、付加的な塩基を有していてもよい。該付加的塩基の長さは、ｓｉＲＮＡが標的遺伝子の発現を特異的に抑制可能である限り特に限定されないが、通常５塩基以下、例えば２～４塩基である。該付加的塩基は、ＤＮＡでもＲＮＡでもよいが、ＤＮＡを用いるとｓｉＲＮＡの安定性を向上させることができる。このような付加的塩基の配列としては、例えばug-3’、uu-3’、tg-3’、tt-3’、ggg-3’、guuu-3’、gttt-3’、ttttt-3’、uuuuu-3’などの配列が挙げられるが、これに限定されるものではない。

[0091] ｓｈＲＮＡのヘアピンループのループ部分の長さは、標的遺伝子の発現を特異的に抑制可能である限り、特に限定されないが、通常、５～２５塩基程度である。該ループ部分のヌクレオチド配列は、ループを形成することができ、且つ、ｓｈＲＮＡが標的遺伝子の発現を特異的に抑制可能である限り、特に限定されない。

[0092] 「アンチセンス核酸」とは、標的ｍＲＮＡ（成熟ｍＲＮＡ又は初期転写産物）を発現する細胞の生理的条件下で該標的ｍＲＮＡとハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を含み、且つハイブリダイズした状態で該標的ｍＲＮＡにコードされるポリペプチドの翻訳を阻害し得る核酸をいう。アンチセンス核酸の種類はＤＮＡであってもＲＮＡであってもよいし、あるいはＤＮＡ／ＲＮＡキメラであってもよいが、好ましくはＤＮＡである。

[0093] ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るアンチセンス核酸としては、例えば

（Ａ）ＡＲＳ２をコードするｍＲＮＡ（成熟ｍＲＮＡ又は初期転写産物）のヌクレオチド配列又は１２塩基以上のその部分配列に相補的なヌクレオチド配列を含む核酸、及び

（Ｂ）ＡＲＳ２をコードするｍＲＮＡ（成熟mRNA又は初期転写産物）と治療対象動物（好ましくはヒト）の細胞内でハイブリダイズし得る１２塩基以上のヌクレオチド配列を含み、且つハイブリダイズした状態でＡＲＳ２ポリペプチドへの翻訳を阻害し得る核酸

等を挙げることが出来る。

[0094] アンチセンス核酸中の標的ｍＲＮＡとハイブリダイズする部分の長さは、ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制する限り特に制限はなく、通常、約１２塩基以上であり、長いものでｍＲＮＡ（成熟ｍＲＮＡ又は初期転写産物）の全長配列と同一の長さである。ハイブリダイゼーションの特異性を考慮すると、該長さは好ましくは約１５塩基以上、より好ましくは約１８塩基以上である。また、合成の容易さや抗原性の問題等を考慮すると、標的ｍＲＮＡとハイブリダイズする部分の長さは、通常、約２００塩基以下、好ましくは約５０塩基以下、より好ましくは約３０塩基以下である。即ち、標的ｍＲＮＡとハイブリダイズする部分の長さは、例えば約１２～約２００塩基、好ましくは約１５～約５０塩基、より好ましくは約１８～約３０塩基である。

[0095] アンチセンス核酸の標的ヌクレオチド配列は、ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制可能であれば特に制限はなく、ＡＲＳ２のｍＲＮＡ（成熟ｍＲＮＡ又は初期転写産物）の全長配列であっても部分配列（例えば約１２塩基以上、好ましくは約１５塩基以上、より好ましくは約１８塩基以上）であってもよいし、あるいは初期転写産物のイントロン部分であってもよいが、好ましくは、標的配列はＡＲＳ２のｍＲＮＡの５’末端からコード領域のＣ末端までに位置することが望ましい。

[0096] アンチセンス核酸中の標的ｍＲＮＡとハイブリダイズする部分のヌクレオチド配列は、標的配列の塩基組成によっても異なるが、生理的条件下でＡＲＳ２のｍＲＮＡとハイブリダイズし得るために、標的配列の相補配列に対して通常約９０％以上（好ましくは９５％以上、最も好ましくは１００％）の同一性を有するものである。

[0097] アンチセンス核酸の大きさは、通常約１２塩基以上、好ましくは約１５塩基以上、より好ましくは約１８塩基以上である。該大きさは、合成の容易さや抗原性の問題等から、通常約２００塩基以下、好ましくは約５０塩基以下、より好ましくは約３０塩基以下である。

[0098] さらに、アンチセンス核酸は、ＡＲＳ２のｍＲＮＡもしくは初期転写産物

とハイブリダイズして翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖ＤＮＡであるＡＲＳ２遺伝子と結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、ｍＲＮＡへの転写を阻害し得るものであってもよい。

[0099] 天然型の核酸は、細胞中に存在する核酸分解酵素によってそのリン酸ジエステル結合が容易に分解されるので、本発明において使用されるｓｉＲＮＡやアンチセンス核酸は、分解酵素に安定なチオリン酸型（リン酸結合のＰ＝ＯをＰ＝Ｓに置換）や２’－Ｏ－メチル型等の修飾ヌクレオチドを用いて合成することもできる。ｓｉＲＮＡやアンチセンス核酸の設計に重要な他の要素として、水溶性及び細胞膜透過性を高めること等が挙げられるが、これらはリポソームやマイクロスフェアを使用するなどの剤形の工夫によっても克服することができる。

[0100] ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮＡ及びアンチセンス核酸は、ＡＲＳ２のｍＲＮＡ配列（例えば配列番号９で表されるヌクレオチド配列）や染色体ＤＮＡ配列に基づいて標的配列を決定し、市販のＤＮＡ／ＲＮＡ自動合成機（アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等）を用いて、これに相補的なヌクレオチド配列を合成することにより調製できる。ｓｉＲＮＡは、センス鎖及びアンチセンス鎖をＤＮＡ／ＲＮＡ自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中、約９０～約９５℃で約１分程度変性させた後、約３０～約７０℃で約１～約８時間アニーリングさせることにより調製できる。また、相補的なオリゴヌクレオチド鎖を交互にオーバーラップするように合成して、これらをアニーリングさせた後リガーゼでライゲーションすることにより、より長い２本鎖ポリヌクレオチドを調製できる。

[0101] 細胞増殖抑制剤ＩＩは、ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制するｓｉＲＮＡ又はアンチセンス核酸を発現し得る（コードする）発現ベクターを有効成分とすることもできる。当該発現ベクターにおいては、上述のｓｉＲＮＡ又はアンチセンス核酸或いはそれをコードする核酸（好ましくはＤＮＡ）が、投与対象である哺乳動物（好ましくはヒト）の細胞（例えば、肉腫細胞）内でプ

ロモーター活性を発揮し得るプロモーターに機能的に連結されている。

[0102] 使用されるプロモーターは、投与対象である哺乳動物の細胞内で機能し得るものであれば特に制限はない。プロモーターとしては、ｐｏｌＩ系プロモーター、ｐｏｌＩＩ系プロモーター、ｐｏｌＩＩＩ系プロモーター等を使用することができる。具体的には、ＳＶ４０由来初期プロモーター、サイトメガロウイルスＬＴＲ等のウイルスプロモーター、βーアクチン遺伝子プロモーター等の哺乳動物の構成蛋白質遺伝子プロモーター、並びにｔＲＮＡプロモーター等のＲＮＡプロモーター等が用いられる。

[0103] ｓｉＲＮＡの発現を意図する場合には、プロモーターとしてｐｏｌＩＩＩ系プロモーターを使用することが好ましい。ｐｏｌＩＩＩ系プロモーターとしては、例えば、Ｕ６プロモーター、Ｈ１プロモーター、ｔＲＮＡプロモーター等を挙げることができる。

[0104] 上記発現ベクターは、好ましくは上述のポリヌクレオチド又はそれをコードする核酸の下流に転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含有する。さらに、形質転換細胞選択のための選択マーカー遺伝子（テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン等の薬剤に対する抵抗性を付与する遺伝子、栄養要求性変異を相補する遺伝子等）をさらに含有することもできる。

[0105] 本発明において発現ベクターに使用されるベクターの種類は特に制限されないが、ヒト等の哺乳動物への投与に好適なベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルスベクターが挙げられる。このうち、アデノウイルスは、遺伝子導入効率が極めて高く、非分裂細胞にも導入可能である等の利点を有する。但し、導入遺伝子の宿主染色体への組込みは極めて稀であるので、遺伝子発現は一過性で通常約４週間程度しか持続しない。治療効果の持続性を考慮すれば、比較的遺伝子導入効率が高く、非分裂細胞にも導入可能で、且つ逆位末端繰り返し配列（ITR）を介して染色体に組み込まれ得るアデノ随伴ウイルスの使用もまた好ましい。

[0106] 細胞増殖抑制剤ＩＩの投与は、投与対象の体内に直接ベクターを投与して

導入を行うin vivo法で行われる。この場合、ウイルスベクターは、注射剤等の形態で静脈内、動脈内、皮下、皮内、筋肉内、腹腔内等に投与される。ウイルスベクターに対する中和抗体の産生が問題となる場合が、患部（肉腫組織）付近に局所的にベクターを注入すれば（in situ法）、抗体の存在による悪影響を軽減することができる。

[0107] 細胞増殖抑制剤ＩＩは、ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制するｓｉＲＮＡ又はアンチセンス核酸或いはこれらを発現し得る発現ベクターに加え、任意の担体、例えば医薬上許容される担体を含むことができ、細胞増殖抑制剤Ｉと同様に製剤化することができる。

[0108] 細胞増殖抑制剤ＩＩの投与量は、有効成分の活性や種類、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なり一概に云えないが、通常、成人１日あたり有効成分量として約０．００１～約５００ｍｇ／ｋｇである。

[0109] 細胞増殖抑制剤ＩＩは、好ましくは、その有効成分であるｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸、或いはこれらを発現し得る発現ベクターが標的とする細胞に送達されるように、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウシ、サル、ヒト）に対して安全に投与される。

[0110] 細胞増殖抑制剤ＩＩは、異常な細胞増殖に起因する疾患、例えば、良性腫瘍（子宮筋腫など）；固形癌（咽頭癌、食道癌、大腸癌、肺癌、胃癌、膵臓癌、肝癌などを含む扁平上皮癌および腺癌、または脳腫癌）、神経膠腫、白血病、悪性リンパ腫などを含む悪性腫瘍もしくは癌（癌腫、肉腫）；腎炎（糸球体腎炎など）、ヒト自己免疫性リンパ球増殖性症候群、リンパ球増殖性疾患、血管免疫芽細胞性リンパ節症、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎等）、進行性全身性硬化症、多発性筋炎（皮膚筋炎）、シェーグレン症候群、骨髄異形成症候群、強皮症、慢性関節リウマチ、乾癬、創傷の過形成（肉芽等）等の予防・治療薬として有用である。

[0111] ［６］スクリーニング方法Ｉ

後述の実施例に示されるように、細胞周期の進行（特にＳ期進行）においてＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との会合が重要な役割を果たす。また、この会合に責を負う領域は、ＦＬＡＳＨにおいてはＦＡＲＢ領域であり、ＡＲＳ２においてはＡＲＳ２領域である。従って、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドと、ＡＲＳ２領域を含むポリペプチドとの結合を阻害する化合物は、細胞周期の進行（特にＳ期進行）を抑制し、細胞増殖を抑制し得る。これらの知見に基づき、本発明は、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドと、ＡＲＳ２領域を含むポリペプチドとの結合を阻害する化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法（スクリーニング方法Ｉ）を提供するものである。

[0112] 本明細書中、ＡＲＳ２領域とは、

（１）配列番号１３で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号１３で表されるアミノ酸配列と９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～１０個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を意味する。

[0113] 配列番号１３で表されるアミノ酸配列は、ヒトＡＲＳ２及びマウスＡＲＳ２のＡＲＳ２領域のアミノ酸配列であり、それぞれ、ヒトＡＲＳ２のアミノ酸配列（配列番号１０）の第６３６～８５７番アミノ酸、マウスＡＲＳ２のアミノ酸配列（配列番号１２）の第６３５～８５６番アミノ酸に相当する。

[0114] ＡＲＳ２領域及びＡＲＳ２領域を含むポリペプチドは、ＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有する。当該結合は、免疫沈降試験においてＦＬＡＳＨポリペプチドとの共沈降を可能にする程度の強度である。かかる結合活性の有無は、ヒト細胞（例えばＫＢ細胞）において評価対象の領域を含むポリペプチドとＦＬＡＳＨポリペプチドを共発現させ、適切な可溶化緩衝液に

より細胞ライセートを調製し、いずれか一方のポリペプチドを特異的に認識する抗体による免疫沈降試験を当該ライセートについて実施することにより確認することが出来る。免疫沈降物中に評価対象の領域を含むポリペプチドとＦＬＡＳＨポリペプチドの双方が認められた場合、当該領域（又はポリペプチド）はＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有すると評価することが出来る。

[0115] 上記（２）の領域のアミノ酸配列は、配列番号１３で表されるアミノ酸配列と９５％以上、好ましくは９７％以上、より好ましくは９９％以上の同一性を有するアミノ酸配列である。

[0116] 上記（３）の領域のアミノ酸配列は、配列番号１３で表されるアミノ酸配列において１～１０個（好ましくは１～６個、より好ましくは１又は２個、最も好ましくは１個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、例えば、(1)配列番号１３に示されるアミノ酸配列中の１～１０個（好ましくは１～６個、より好ましくは１又は２個、最も好ましくは１個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2)配列番号１３に示されるアミノ酸配列に１～１０個（好ましくは１～６個、より好ましくは１又は２個、最も好ましくは１個）のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列、(3)配列番号１３に示されるアミノ酸配列に１～１０個（好ましくは１～６個、より好ましくは１又は２個、最も好ましくは１個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4)配列番号１３に示されるアミノ酸配列中の１～１０個（好ましくは１～６個、より好ましくは１又は２個、最も好ましくは１個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(5)上記(1)～(4)の変異が組み合わされたアミノ酸配列（この場合、変異したアミノ酸の総和が１～１０個（好ましくは１～６個、より好ましくは１又は２個、最も好ましくは１個）である）である。

[0117] 本発明において使用するＡＲＳ２領域を含むポリペプチドは、ＦＬＡＳＨポリペプチドへの結合活性を有する限り、その長さは特に制限されず、使用目的に応じて所望の長さのポリペプチドを選択することが出来る。例えば、

本発明のポリペプチドとして、長さが３０００アミノ酸以下のもの、２０００アミノ酸以下のもの、１０００アミノ酸以下のもの、５００アミノ酸以下のもの、４００アミノ酸以下のもの、３００アミノ酸以下のもの、２５０アミノ酸以下のもの、２４０アミノ酸以下のもの、２３０アミノ酸以下のもの、２２５アミノ酸以下のもの等を適宜選択することが出来る。本発明において使用するＡＲＳ２領域を含むポリペプチドは、２１２アミノ酸以上、好ましくは２１８アミノ酸以上、最も好ましくは２２２アミノ酸以上の長さを有する。

[0118] 本発明において使用するＡＲＳ２領域を含むポリペプチドにおける、ＡＲＳ２領域以外の部分のアミノ酸配列は、当該ポリペプチドがＦＬＡＳＨポリペプチドへの結合活性を有する限り、特に限定されない。

[0119] 上記ＡＲＳ２領域を含むポリペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端に少なくとも１つのタグポリペプチド又はシグナル配列が融合してなる融合ポリペプチドも、好適な態様の一つである。

[0120] ＡＲＳ２領域を含むポリペプチドは修飾されていてもよい。該修飾としては、脂質鎖の付加（脂肪族アシル化（パルミトイル化、ミリストイル化等）、プレニル化（ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化等）等）、リン酸化（セリン残基、スレオニン残基、チロシン残基等におけるリン酸化）、アセチル化、糖鎖の付加（Ｎグリコシル化、Ｏグリコシル化）等を挙げることが出来る。

[0121] また、ＡＲＳ２領域を含むポリペプチドは、適当な標識剤、例えば、放射性同位元素（例：^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ等）、酵素（例：β－ガラクトシダーゼ、β－グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等）、蛍光物質（例：フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等）、発光物質（例：ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン等）、アフィニティタグ（例：ビオチン等）などで標識されていてもよい。

[0122] ＡＲＳ２領域を含むポリペプチドの例としては、例えば、ＡＲＳ２ポリペ

プチド、ＡＲＳ２領域を含むＡＲＳ２の部分ポリペプチド、これらのポリペプチドとタグポリペプチド及び／又はシグナル配列との融合ポリペプチド等を挙げることが出来る。

[0123] 本発明に用いるＡＲＳ２領域を含むポリペプチドは、好ましくは単離又は精製されている。

[0124] スクリーニング方法Ｉは、具体的には以下の工程を含む：

（Ｉ）被検化合物の存在下および非存在下で、それぞれ、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドと、ＡＲＳ２領域を含むポリペプチドとの結合度（結合量又は結合強度）を評価すること；

（ＩＩ）被検化合物の存在下での結合度と、被検化合物の非存在下での結合度とを比較すること；及び

（ＩＩＩ）被検化合物の非存在下と比較して、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドと、ＡＲＳ２領域を含むポリペプチドとの結合度を低下させる被検化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択すること。

[0125] スクリーニング方法Ｉに供される被検化合物は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、蛋白質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

[0126] ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドとＡＲＳ２領域を含むポリペプチドとの結合度は、自体公知の方法、例えば単離されたＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドと、単離されたＡＲＳ２領域を含むポリペプチドとを用いた、バインディングアッセイ、表面プラズモン共鳴を利用する方法（例えば、Biacore(登録商標）の使用）により評価することができる。

[0127] また、同一の細胞（好ましくは哺乳動物細胞）内に、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチド及びＡＲＳ２領域を含むポリペプチドを発現した細胞内における両者の結合度を、免疫沈降法等を用いて測定することも好ましい。例えば

、被検化合物の存在下で、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチド及びＡＲＳ２領域を含むポリペプチドを発現する細胞を培養し、適切な可溶化緩衝液で細胞を可溶化し、得られたライセート中におけるＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドとＡＲＳ２領域を含むポリペプチドの複合体の量を、被検化合物の不在下での該複合体の量と比較する。

[0128] 次いで、被検化合物の存在中でのＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドとＡＲＳ２領域を含むポリペプチドとの結合度が、被検化合物の不在中での該結合度と比較される。結合の程度の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。被検化合物の不在中での結合度は、被検化合物の存在中での結合度の測定に対し、事前に測定した値であっても、同時に測定した値であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した値であることが好ましい。

[0129] 比較の結果、本発明のＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドとＡＲＳ２領域を含むポリペプチドとの結合を阻害する化合物（ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドとＡＲＳ２領域を含むポリペプチドとの結合度を低下させる化合物）が細胞増殖を抑制し得る化合物として選択される。

[0130] このようにして獲得した化合物が、実際に細胞増殖を抑制し得るか否かを確認してもよい。この場合、以下の工程が上記（Ｉ）～（ＩＩＩ）の工程に続けて行われる：

（ＩＶ）被検化合物の存在下および非存在下で、それぞれ、細胞の増殖度を評価すること；

（Ｖ）被検化合物の存在下での細胞増殖度と、被検化合物の非存在下での細胞増殖度とを比較すること；及び

（ＶＩ）被検化合物の非存在下と比較して、細胞増殖度を低下させる被検化合物を選択すること。

[0131] （ＩＶ）において用いられる細胞の種類は、インビトロでの培養により増殖し得る細胞であれば特に限定されないが、通常は、温血動物（哺乳動物又は鳥類）由来のものである。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、

ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ミンク等の家畜、イヌ、ネコ等のペット、ヒト、サル、カニクイザル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類等を挙げることが出来るが、これらに限定されるものではない。鳥類としては、ニワトリ、ウズラ、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウ、エミュ、ダチョウ、ホロホロ鳥、ハト等を挙げることができる。細胞は、好ましくは哺乳動物由来のものであり、より好ましくは霊長類（ヒト等）又はげっ歯類（マウス等）由来のものである。

[0132] 被検化合物は、ＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との結合を阻害することにより、細胞周期進行（即ち、細胞増殖）を抑制することが期待されることから、（ＩＶ）において用いられる細胞としては、ＦＬＡＳＨ及びＡＲＳ２を発現した細胞を用いることが好ましい。

[0133] 例えば、被検化合物を含む培地中で細胞を一定期間培養し、培養後の細胞の増殖度を、被検化合物の不在下での増殖度と比較する。使用する培地の種類や、培養条件（温度、湿度、時間）等は、当該技術分野において周知であり、当業者であれば、使用する細胞の種類に併せて、適切な条件を設定することが出来る。

[0134] 細胞の増殖度は、自体公知の方法で測定することが可能であり、例えば、^{3}Ｈ－チミジンの細胞内への取り込みを測定すること等により評価することが出来る。

[0135] 次いで、被検化合物の存在中での細胞増殖度が、被検化合物の不在中での細胞増殖度と比較される。結合の程度の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。被検化合物の不在中での結合度は、被検化合物の存在中での結合度の測定に対し、事前に測定した値であっても、同時に測定した値であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した値であることが好ましい。

[0136] 比較の結果、細胞増殖を抑制する活性を有することが確認された化合物が、最終的に選択される。

[0137] スクリーニング方法Ｉにより得られた化合物は、細胞増殖を抑制し得るので、異常な細胞増殖に起因する疾患、例えば、良性腫瘍（子宮筋腫など）；固形癌（咽頭癌、食道癌、大腸癌、肺癌、胃癌、膵臓癌、肝癌などを含む扁平上皮癌および腺癌、または脳腫癌）、神経膠腫、白血病、悪性リンパ腫などを含む悪性腫瘍もしくは癌（癌腫、肉腫）；腎炎（糸球体腎炎など）、ヒト自己免疫性リンパ球増殖性症候群、リンパ球増殖性疾患、血管免疫芽細胞性リンパ節症、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎等）、進行性全身性硬化症、多発性筋炎（皮膚筋炎）、シェーグレン症候群、骨髄異形成症候群、強皮症、慢性関節リウマチ、乾癬、創傷の過形成（肉芽等）等の予防・治療薬の候補化合物として有用である。

[0138] また、本発明は、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドと、ＡＲＳ２領域を含むポリペプチドとの組み合わせ物を提供するものである。該組み合わせ物はキットであり得る。本発明の組み合わせ物は、上記スクリーニング方法Ｉを実施するためのキットとして有用である。

[0139] ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチド及びＡＲＳ２領域を含むポリペプチドは、各々別個に（あるいは可能であれば混合した状態で）水もしくは適当な緩衝液（例：TEバッファー、PBSなど）中に適当な濃度となるように溶解し、約-20℃～4℃で保存することができる。

[0140] 本発明の組み合わせは、他の構成要素（例えば上記スクリーニング方法Ｉの実施に必要な構成要素）を含んでいてもよい。例えば、２種のポリペプチドの結合を免疫沈降法で検出する場合などにおいては、本発明の組み合わせは、追加的な構成要素として、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドやＡＲＳ２領域を含むポリペプチドを特異的に認識する抗体、これらのポリペプチドに含まれるタグポリペプチドを特異的に認識する抗体、標識二次抗体、発色基質、ブロッキング液、洗浄緩衝液、ELISAプレート、ブロッティング膜等を含むことが出来る。

[0141] [７]スクリーニング方法ＩＩ

後述の実施例に示されるように、細胞周期の進行（特にＳ期進行）におい

てＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との会合が重要な役割を果たす。また、この会合に責を負う領域は、ＦＬＡＳＨにおいてはＦＡＲＢ領域である。従って、ＦＡＲＢ領域へ結合する化合物は、ＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との会合を阻害し、細胞周期の進行（特にＳ期進行）を抑制し、細胞増殖を抑制し得る。これらの知見に基づき、本発明は、ＦＡＲＢ領域へ結合する化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法（スクリーニング方法ＩＩ）を提供するものである。

[0142] スクリーニング方法ＩＩは、具体的には以下の工程を含む：

（Ｉ）ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチド及びＦＡＲＢ領域を含まないコントロールポリペプチドを、それぞれ被検化合物に接触させ、被検化合物と各ポリペプチドとの結合度を評価すること；

（ＩＩ）被検化合物とＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドとの結合度を、被検化合物とコントロールポリペプチドとの結合度と比較すること；及び

（ＩＩＩ）コントロールポリペプチドと比較して、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドとの結合度が高い被検化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択すること。

[0143] スクリーニング方法ＩＩに供される被検化合物は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、蛋白質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

[0144] コントロールポリペプチドの種類は、ＦＡＲＢ領域を含まない限り、特に限定されないが、ＦＡＲＢ領域へ特異的に結合する化合物を効率的に探索するという観点から、コントロールポリペプチドは、評価に使用するＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドから、ＦＡＲＢ領域を欠失させた構成を有するポリペプチド、又は該ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドに含まれるＦＡＲＢ領域をＦＡＲＢ領域以外のアミノ酸配列で置換したポリペプチドが好ましい。

[0145] ポリペプチドへの被検化合物への接触は、適切な緩衝液中で行われる。被検化合物とポリペプチドとの結合度は、自体公知の方法、例えばバインディングアッセイ、表面プラズモン共鳴を利用する方法（例えば、Biacore(登録商標）の使用）により評価することができる。

[0146] 次いで、被検化合物とＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドとの結合度が、被検化合物とコントロールペプチドとの結合度と比較される。結合の程度の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。コントロールペプチドとの結合度は、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドとの結合度の測定に対し、事前に測定した値であっても、同時に測定した値であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した値であることが好ましい。

[0147] 比較の結果、コントロールペプチドと比較して、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドとの結合度が高い被検化合物が、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択される。

[0148] 工程（ＩＩＩ）で獲得した化合物が、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドとＡＲＳ２領域を含むポリペプチドとの結合を阻害し得るか否かを確認してもよい。この場合、上記（Ｉ）～（ＩＩＩ）の工程の後で、工程（ＩＩＩ）で得られた化合物がスクリーニング方法Ｉの工程に付される。

[0149] あるいは、工程（ＩＩＩ）で獲得した化合物が、実際に細胞増殖を抑制し得るか否かを確認してもよい。この場合、上記（Ｉ）～（ＩＩＩ）の工程の後で、工程（ＩＩＩ）で獲得した化合物が、スクリーニング方法Ｉの工程（ＩＶ）～（ＶＩ）に付される。

[0150] スクリーニング方法ＩＩにより得られた化合物は、細胞増殖を抑制し得るので、スクリーニング方法Ｉにより得られる化合物と同様に、種々の異常な細胞増殖に起因する疾患の予防・治療薬の候補化合物として有用である。

[0151] ［８］スクリーニング方法ＩＩＩ

後述の実施例に示されるように、細胞周期の進行（特にＳ期進行）においてＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との会合が重要な役割を果たし、ＡＲＳ２の発現を抑制することにより、細胞の増殖を抑制することが可能となる。従って、本

発明は、被検物質がＡＲＳ２の発現を抑制するか否かを評価することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法（スクリーニング方法ＩＩＩ）を提供する。スクリーニング方法ＩＩＩにおいては、ＡＲＳ２の発現を抑制する化合物が、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択される。

[0152] スクリーニング方法ＩＩＩは、具体的には以下の工程を含む：

（Ｉ）被検化合物の存在下および非存在下で、それぞれ、ＡＲＳ２の発現を測定可能な細胞を培養し、培養後のＡＲＳ２の発現レベルを評価すること；

（ＩＩ）被検化合物の存在下でのＡＲＳ２の発現量と、被検化合物の非存在下でのＡＲＳ２の発現量とを比較すること；及び

（ＩＩＩ）被検化合物の非存在下と比較して、ＡＲＳ２の発現を低下させる被検化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択すること。

[0153] スクリーニング方法ＩＩＩに供される被検化合物は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、蛋白質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、ランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

[0154] スクリーニング方法ＩＩＩに使用される細胞は、通常、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウシ、サル、ヒト、好ましくはヒト）由来である。

[0155] 「発現を測定可能な細胞」とは、測定対象遺伝子のｍＲＮＡ又は蛋白質の発現量を直接的又は間接的に評価可能な細胞をいう。測定対象遺伝子のｍＲＮＡ又は蛋白質の発現量を直接的に評価可能な細胞としては、測定対象遺伝子を天然で発現可能な細胞が挙げられ、一方、測定対象遺伝子のｍＲＮＡ又は蛋白質の発現量を間接的に評価可能な細胞としては、測定対象遺伝子の転写調節領域についてレポーターアッセイを可能とする細胞が挙げられる。

[0156] ＡＲＳ２を天然で発現可能な細胞は、ＡＲＳ２を潜在的に発現するものである限り特に限定されず、当該細胞として、初代培養細胞、当該初代培養細胞から誘導された細胞株などを用いることができる。ＡＲＳ２は哺乳動物に

おいては、通常、ユビキタスに発現しているので、任意の哺乳動物細胞を、ＡＲＳ２を天然で発現可能な細胞として使用することができる。

[0157] ＡＲＳ２の転写調節領域についてレポーターアッセイを可能とする細胞は、ＡＲＳ２遺伝子の転写調節領域（例えば、転写開始点から上流約２ｋｂｐの塩基配列からなるＤＮＡ）、当該領域に機能可能に連結されたレポーター遺伝子（例えばＧＦＰ遺伝子）を含む細胞である。ＡＲＳ２に対する生理的な転写調節因子を発現し、ＡＲＳ２の発現調節の評価により適切であると考えられることから、測定対象の細胞としては肉腫細胞が好ましい。

[0158] ＡＲＳ２の発現を測定可能な細胞の培養は、適切な培地中で行われる。培地は、ＡＲＳ２の発現を測定可能な細胞に応じて適宜選択されるが、例えば、約５～２０％のウシ胎仔血清を含む最少必須培地（ＭＥＭ）、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）などである。培養条件も同様に適宜決定されるが、例えば、培地のpHは約６～約８であり、培養温度は通常約３０～約４０℃であり、培養時間は約１２～約７２時間である。

[0159] ＡＲＳ２を発現可能な細胞を用いた場合、ＡＲＳ２ポリペプチドの発現レベルの測定は、ＡＲＳ２を特異的に認識する抗体を用いた、免疫学的手法により測定することができる。免疫学的手法としては、フローサイトメトリー解析、放射性同位元素免疫測定法（ＲＩＡ法）、ＥＬＩＳＡ法（Methods in Enzymol. 70: 419-439 (1980)）、ウェスタンブロッティング、免疫組織染色等を挙げることができる。また、ＡＲＳ２ ｍＲＮＡの発現レベルは、該ポリヌクレオチドを特異的に検出し得る核酸プローブ又はプライマーを用いて、自体公知の方法により測定することが出来る。該測定方法としては、例えば、ＲＴ－ＰＣＲ、ノザンブロッティング、ｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーション、ｃＤＮＡアレイ等を挙げることができる。レポーター遺伝子を含む細胞が用いられた場合、発現量は、レポーター遺伝子のシグナル強度に基づき測定される。

[0160] 発現量の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれ得る。なお、被検化合物を接触させない対照細胞におけるＡＲＳ２の発現量は、被検

物質を接触させた細胞におけるＡＲＳ２の発現量の測定に対し、事前に測定した発現量であっても、同時に測定した発現量であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した発現量であることが好ましい。

[0161] そして、比較の結果得られた、ＡＲＳ２の発現量を抑制する化合物が、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択される。

[0162] 工程（ＩＩＩ）で獲得した化合物が、実際に細胞増殖を抑制し得るか否かを確認してもよい。この場合、上記（Ｉ）～（ＩＩＩ）の工程の後で、工程（ＩＩＩ）で獲得した化合物が、スクリーニング方法Ｉの工程（ＩＶ）～（ＶＩ）に付される。

[0163] スクリーニング方法ＩＩＩにより得られた化合物は、細胞増殖を抑制し得るので、スクリーニング方法Ｉ及びＩＩにより得られる化合物と同様に、種々の異常な細胞増殖に起因する疾患の予防・治療薬の候補化合物として有用である。

[0164] ［９］スクリーニング方法ＩＶ

後述の実施例に示されるように、細胞周期の進行（特にＳ期進行）においてＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合が重要な役割を果たしている。従って、ＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合を阻害する化合物は、細胞周期の進行（特にＳ期進行）を抑制し、細胞増殖を抑制し得る。これらの知見に基づき、本発明は、ＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合を阻害する化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法（スクリーニング方法ＩＶ）を提供するものである。

[0165] スクリーニング方法ＩＶは、具体的には以下の工程を含む：

（Ｉ）被検化合物の存在下および非存在下で、それぞれ、ＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合の程度を評価すること；

（ＩＩ）被検化合物の存在下での自己会合の程度と、被検化合物の非存在下での自己会合の程度とを比較すること；及び

（ＩＩＩ）被検化合物の非存在下と比較して、ＦＬＡＳＨポリペプチドの自己

会合を低下させた被検化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択すること。

[0166] スクリーニング方法ＩＶに供される被検化合物は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、蛋白質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

[0167] ＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合の程度は、免疫沈降法、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー等により、評価することが出来る。例えば、ＦＬＡＳＨとタグポリペプチド（Ｘ）との融合ペプチドＩと、ＦＬＡＳＨとタグポリペプチド（Ｙ：ＹはＸとは異なるタグである）との融合ペプチドＩＩとを混合し、混合物をタグポリペプチド（Ｘ）に対する抗体による免疫沈降操作に付し、沈降物中の融合ペプチドＩＩの量を評価することにより、ＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合の程度を評価することが出来る。或いは、単離／精製したＦＬＡＳＨポリペプチドをＳＤＳ－ＰＡＧＥやゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、単量体と多量体との比を測定することによっても、ＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合の程度を評価することが出来る。被検化合物の存在下で、ＦＬＡＳＨポリペプチドを一定時間インキュベートした後で、自己会合の程度を評価することにより、自己会合への被検化合物の作用を調べることが出来る。

[0168] また、同一の細胞（好ましくは哺乳動物細胞）内に、上述の融合ポリペプチドＩ及びＩＩを発現した細胞内における両者の会合を、免疫沈降法等を用いて測定することも好ましい。例えば、被検化合物の存在下で、融合ポリペプチドＩ及びＩＩを発現した細胞を培養し、適切な可溶化緩衝液で細胞を可溶化し、得られたライセート中における融合ポリペプチドＩと融合ポリペプチドＩＩの複合体の量を、被検化合物の不在下での該複合体の量と比較する。

[0169] 次いで、被検化合物の存在中でのＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合の程度が、被検化合物の不在中での該自己会合の程度と比較される。自己会合の程度の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。被検化合物の不在中での自己会合の程度は、被検化合物の存在中での自己会合の程度の測定に対し、事前に測定した値であっても、同時に測定した値であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した値であることが好ましい。

[0170] 比較の結果、ＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合を阻害する化合物（ＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合の程度を低下させる化合物）が細胞増殖を抑制し得る化合物として選択される。

[0171] 工程（ＩＩＩ）で獲得した化合物が、実際に細胞増殖を抑制し得るか否かを確認してもよい。この場合、上記（Ｉ）～（ＩＩＩ）の工程に続けて、工程（ＩＩＩ）で獲得した化合物が、スクリーニング方法Ｉの工程（ＩＶ）～（ＶＩ）に付される。

[0172] 本発明のスクリーニング方法ＩＶにより得られた化合物は、細胞増殖を抑制し得るので、スクリーニング方法Ｉ～ＩＩＩにより得られる化合物と同様に、種々の異常な細胞増殖に起因する疾患の予防・治療薬の候補化合物として有用である。

[0173] ［１０］スクリーニング方法Ｖ

後述の実施例に示されるように、細胞周期の進行（特にＳ期進行）においてＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合が重要な役割を果たしている。また、この自己会合にはＦＬＡＳＨ中のコイルドコイルドメインが寄与している。従って、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインへ結合する化合物は、ＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合を阻害し、細胞周期の進行（特にＳ期進行）を抑制し、細胞増殖を抑制し得る。これらの知見に基づき、本発明は、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインへ結合する化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法（スクリーニング方法Ｖ）を提供する

ものである。

[0174] スクリーニング方法Ｖは、具体的には以下の工程を含む：

（Ｉ）ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含むポリペプチド及び該コイルドコイルドメインを含まないコントロールポリペプチドを、それぞれ被検化合物に接触させ、被検化合物と各ポリペプチドとの結合度を評価すること；

（ＩＩ）被検化合物と該コイルドコイルドメインを含むポリペプチドとの結合度を、被検化合物とコントロールポリペプチドとの結合度と比較すること；及び

（ＩＩＩ）コントロールポリペプチドと比較して、該コイルドコイルドメインを含むポリペプチドとの結合度が高い被検化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択すること。

[0175] スクリーニング方法Ｖに供される被検化合物は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、蛋白質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

[0176] コントロールポリペプチドの種類は、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含まない限り、特に限定されないが、該コイルドコイルドメインへ特異的に結合する化合物を効率的に探索するという観点から、コントロールポリペプチドは、該コイルドコイルドメインを含むポリペプチドから、該コイルドコイルドメインを欠失させた構成を有するポリペプチド、又は該コイルドコイルドメインを含むポリペプチドに含まれる該コイルドコイルドメインを該コイルドコイルドメイン以外のアミノ酸配列で置換したポリペプチドが好ましい。

[0177] ポリペプチドへの被検化合物への接触は、適切な緩衝液中で行われる。被検化合物とポリペプチドとの結合度は、自体公知の方法、例えばバインディ

ングアッセイ、表面プラズモン共鳴を利用する方法（例えば、Biacore(登録商標）の使用）により評価することができる。

[0178] 次いで、被検化合物と該コイルドコイルドメインを含むポリペプチドとの結合度が、被検化合物とコントロールペプチドとの結合度と比較される。結合の程度の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。コントロールペプチドとの結合度は、該コイルドコイルドメインを含むポリペプチドとの結合度の測定に対し、事前に測定した値であっても、同時に測定した値であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した値であることが好ましい。

[0179] 比較の結果、コントロールペプチドと比較して、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含むポリペプチドとの結合度が高い被検化合物が、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択される。

[0180] 工程（ＩＩＩ）で獲得した化合物が、ＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合を阻害し得るか否かを確認してもよい。この場合、上記（Ｉ）～（ＩＩＩ）の工程の後で、該工程で得られた化合物が、スクリーニング方法ＩＶの工程に付される。

[0181] あるいは、工程（ＩＩＩ）で獲得した化合物が、実際に細胞増殖を抑制し得るか否かを確認してもよい。この場合、上記（Ｉ）～（ＩＩＩ）の工程の後で、工程（ＩＩＩ）で獲得した化合物が、スクリーニング方法Ｉの工程（ＩＶ）～（ＶＩ）に付される。

[0182] 本発明のスクリーニング方法Ｖにより得られた化合物は、細胞増殖を抑制し得るので、スクリーニング方法Ｉ～ＩＶにより得られる化合物と同様に、種々の異常な細胞増殖に起因する疾患の予防・治療薬の候補化合物として有用である。

[0183] ［１１］変異ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチド

更なる局面において、本発明は、配列番号５で表されるアミノ酸配列において、第４番目のグルタミン酸、第５番目のグルタミン酸及び第７番目のグルタミン酸からなる群から選択される少なくとも１つのグルタミン酸がグル

タミン酸以外のアミノ酸で置換されているアミノ酸配列（以下、変異ＦＡＲＢ配列）を含み、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有していないポリペプチド（以下、変異ＦＡＲＢポリペプチド）を提供する。変異ＦＡＲＢポリペプチドは、上述のＦＡＲＢ領域を含む本発明のポリペプチドとＡＲＳ２領域を含むポリペプチドとの結合を指標とするスクリーニング方法（スクリーニング方法Ｉ）において、ネガティブコントロールとして有用である。

[0184] 変異ＦＡＲＢポリペプチドにおいては、第４番目のグルタミン酸、第５番目のグルタミン酸及び第７番目のグルタミン酸からなる群から選択される少なくとも１つ、例えば１、２又は３個のグルタミン酸がグルタミン酸以外のアミノ酸で置換されている。好ましい態様としては、第４番目及び第５番目のグルタミン酸がグルタミン酸がグルタミン酸以外のアミノ酸で置換されている態様、第７番目のグルタミン酸がグルタミン酸以外のアミノ酸で置換されている態様を挙げることが出来る。

[0185] グルタミン酸以外のアミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン等の非極性疎水性アミノ酸、アルギニン、リジン、ヒスチジン等の塩基性アミノ酸、グリシン、アスパラギン、セリン、システイン、グルタミン等の極性無電荷アミノ酸、アスパラギン酸等の酸性アミノ酸、プロリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン等を挙げることが出来る。グルタミン酸以外のアミノ酸は、好ましくは非極性疎水性アミノ酸であり、より好ましくはアラニンである。

[0186] 好ましい変異ＦＡＲＢ配列の具体例としては、配列番号２９又は３１で表されるアミノ酸配列を挙げることが出来る。

[0187] 変異ＦＡＲＢポリペプチドは、ＡＲＳ２ポリペプチドへの結合活性を有しない限り、その長さは特に制限されず、使用目的に応じて所望の長さのポリペプチドを選択することが出来る。例えば、本発明のポリペプチドとして、長さが３０００アミノ酸以下のもの、２０００アミノ酸以下のもの、１０００アミノ酸以下のもの、５００アミノ酸以下のもの、４００アミノ酸以下の

もの、３００アミノ酸以下のもの、２５０アミノ酸以下のもの、２００アミノ酸以下のもの、１５０アミノ酸以下のもの、１００アミノ酸以下のもの、９０アミノ酸以下のもの、８０アミノ酸以下のもの、７０アミノ酸以下のもの、６０アミノ酸以下のもの、５０アミノ酸以下のもの、４０アミノ酸以下のもの、３０アミノ酸以下のもの、２０アミノ酸以下のもの、１９アミノ酸以下のもの、１８アミノ酸以下のもの、１７アミノ酸以下のもの、１６アミノ酸以下のもの、１５アミノ酸以下のもの、１４アミノ酸以下のもの等を適宜選択することが出来る。

[0188] 変異ＦＡＲＢポリペプチドにおける、変異ＦＡＲＢ領域以外の部分のアミノ酸配列は、変異ＦＡＲＢポリペプチドがＡＲＳ２ポリペプチドへの結合活性を有しない限り、特に限定されない。当該結合は、免疫沈降試験においてＡＲＳ２ポリペプチドとの共沈降を可能にする程度の強度である。該結合の有無は、上記［１］の項に記載した方法により、評価することが出来る。

[0189] 変異ＦＡＲＢポリペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端に少なくとも１つのタグポリペプチド又はシグナル配列が融合してなる融合ポリペプチドも、変異ＦＡＲＢポリペプチドの態様の一つに含まれる。

[0190] 変異ＦＡＲＢポリペプチドとタグポリペプチド又はシグナル配列とは直接又はリンカーを介して連結される。リンカーの長さは、ポリペプチドがＡＲＳ２ポリペプチドへの結合活性を有しない限り特に制限されないが、通常１～２５アミノ酸、好ましくは１～１０アミノ酸であって、当該技術分野において周知である。リンカーのアミノ酸配列も、ポリペプチドがＡＲＳ２ポリペプチドへの結合活性を有する限り特に制限されない。

[0191] 変異ＦＡＲＢポリペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端に少なくとも１つのタグポリペプチド又はシグナル配列が融合している場合、当該ポリペプチドの長さは、ＡＲＳ２ポリペプチドへの結合活性を有しない限り、特に制限されず、使用目的に応じて所望の長さのポリペプチドを選択することが出来る。この場合、付加部分（タグポリペプチド又はシグナル配列）以外の部分のポリペプチドの長さとして、３０００アミノ酸以下のもの、２０００アミノ

酸以下のもの、１０００アミノ酸以下のもの、５００アミノ酸以下のもの、４００アミノ酸以下のもの、３００アミノ酸以下のもの、２５０アミノ酸以下のもの、２００アミノ酸以下のもの、１５０アミノ酸以下のもの、１００アミノ酸以下のもの、９０アミノ酸以下のもの、８０アミノ酸以下のもの、７０アミノ酸以下のもの、６０アミノ酸以下のもの、５０アミノ酸以下のもの、４０アミノ酸以下のもの、３０アミノ酸以下のもの、２０アミノ酸以下のもの、１９アミノ酸以下のもの、１８アミノ酸以下のもの、１７アミノ酸以下のもの、１６アミノ酸以下のもの、１５アミノ酸以下のもの、１４アミノ酸以下のもの等を適宜選択することが出来る（尚、リンカーを使用する場合には、当該長さはリンカー部分を除いた長さを示す）。

[0192] 変異ＦＡＲＢポリペプチドは修飾されていてもよい。該修飾としては、脂質鎖の付加（脂肪族アシル化（パルミトイル化、ミリストイル化等）、プレニル化（ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化等）等）、リン酸化（セリン残基、スレオニン残基、チロシン残基等におけるリン酸化）、アセチル化、糖鎖の付加（Ｎグリコシル化、Ｏグリコシル化）等を挙げることが出来る。

[0193] また、変異ＦＡＲＢポリペプチドは、適当な標識剤、例えば、放射性同位元素（例：^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ等）、酵素（例：βーガラクトシダーゼ、βーグルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等）、蛍光物質（例：フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等）、発光物質（例：ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン等）、アフィニティタグ（例：ビオチン等）などで標識されていてもよい。

[0194] 変異ＦＡＲＢポリペプチドは単離又は精製されていることが好ましい。「単離又は精製」とは、目的とする成分以外の成分を除去する操作が施されていることを意味する。単離又は精製された本発明のポリペプチドの純度（全ポリペプチド重量に対する、本発明のポリペプチドの重量の割合）は、通常５０％以上、好ましくは７０％以上、より好ましくは９０％以上、最も好ましくは９５％以上（例えば実質的に１００％）である。

[0195] 変異ＦＡＲＢポリペプチドの製造方法については特に制限はなく、公知のペプチド合成法に従って製造してもよく、また公知の遺伝子組み換え技術を用いて製造してもよい。

[0196] ［１２］変異ＦＡＲＢポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

本発明は上記変異ＦＡＲＢポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド（変異ＦＡＲＢポリヌクレオチド）を提供するものである。該ポリヌクレオチドは、ＤＮＡであってもＲＮＡであってもよく、あるいはＤＮＡ／ＲＮＡキメラであってもよい。また、該ポリヌクレオチドは二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖ＤＮＡ、二本鎖ＲＮＡまたはＤＮＡ：ＲＮＡのハイブリッドでもよい。

[0197] 変異ＦＡＲＢポリヌクレオチドは、本明細書の配列表に記載された配列情報に基づき、公知の遺伝子組換え技術を利用することにより容易に製造することが出来る。

[0198] 変異ＦＡＲＢポリヌクレオチドは、好ましくは単離又は精製されている。

[0199] ［１３］変異ベクター及び形質転換体

本発明は、上記変異ＦＡＲＢポリヌクレオチドを含むベクターを提供するものである。該ベクターは好ましくは単離又は精製されている。ベクターとしては発現ベクター、クローニングベクター等を挙げることができ、目的に応じて選択することが可能であるが、好ましくは、ベクターは発現ベクターである。該発現ベクターは、上記変異ＦＡＲＢポリペプチドを発現し得る。該発現ベクターは、変異ＦＡＲＢポリヌクレオチドを適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に機能的に連結することにより製造することができる。ベクターの種類としては、プラスミドベクター、ウイルスベクター等を挙げることができ、用いる宿主に応じて適宜選択することが出来る。

[0200] また、本発明は、変異ＦＡＲＢポリヌクレオチドを含むベクターを含む形質転換体を提供する。

[0201] ベクター及び形質転換体の宿主の具体的な態様については、変異ＦＡＲＢポリヌクレオチドを除き、上記［３］に準ずる。

[0202] 以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例

[0203] [実施例１]

（試験方法）

細胞株、培養条件及び一過性トランスフェクション

ヒト咽頭カルシノーマ由来のＫＢ細胞及びヒト胚性腎臓由来の２９３細胞を、１０％ ＦＣＳ (Sigma)、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン(Nacalai tesque)を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (Nacalai tesque) 中にて、３７℃、５％CO_2で培養した。一過性トランスフェクションのため、製造者の指示書に従い、リポフェクタミン及びプラス試薬(Invitrogen)を用いて、２９３Ｔ細胞へ発現ベクターをトランスフェクトした。

[0204] レンチウイルス発現ベクター

H.Miyoshi氏(RIKEN)より提供されたレンチウイルスベクターを既述(Okamoto et al., 2006)のように調製した。ヒトＡＲＳ２ ｃＤＮＡを、ヒトＴリンパ腫由来Ｊｕｒｋａｔ細胞のｍＲＮＡから、フォワードプライマーとして５’－ATGGGTGACAGTGATG－３’（配列番号２１）を、リバースプライマーとして５’－TCAAAAGAAATCAACATCGT－３’（配列番号２２）を用いてＲＴ－ＰＣＴにより増幅し、レンチウイルスベクターであるＣＳＩＩ－ＥＦ－ＭＣＳ－ＩＲＥＳ－Ｈｙｇ(Okamoto et al., 2006)中に、ユニークな制限酵素部位であるＸｈｏＩ及びＢａｍＨＩを利用することにより、ＨＡ、ＤｓＲｅｄモノマー又はＦＬＡＧ３タグと共に、インフレームにクローニングした。マウスＦＬＡＳＨ ｃＤＮＡ (Imai et al., 1999)を、ＣＳＩＩ－ＥＦ－ＭＣＳ中へ、ＥＧＦＰ又はＦＬＡＧ３タグと共にインフレームにサブクローニングした。マウスＦＬＡＳＨ及びヒトＡＲＳ２の多様な欠損変異体の構築のため、変異体ｃＤＮＡを、野生型ｃＤＮＡから特異的プライマーを用いてＰＣＲにより増幅し、ＣＳＩＩ－ＥＦ－ＭＣＳ又はＣＳＩＩ－ＥＦ－ＭＣＳ－ＩＲＥＳ

ーＨｙｇ中へクローニングした。ＰＣＲで作成された全てのプラスミドについて、ＤＮＡ配列決定により検証した。

[0205] テトラサイクリン誘導ｓｈＲＮＡ発現系

特異的遺伝子サイレンシングを誘導するため、レンチウイルスベースのベクターを用いたテトラサイクリン誘導可能ｓｈＲＮＡ発現系(Ｔｅｔ－Ｏｎｓｈ ＲＮＡ系)を既述のように使用した(Kobayashi and Yonehara, 2009)。細胞を1μｇ／ｍｌドキシサイクリン（Ｄｏｘ）(Nacalai tesque)で処理することにより、ｓｈＲＮＡの発現を誘導した。ヒトＦＬＡＳＨのｓｈＲＮＡ(ｓｈＦＬＡＳＨ)及びヒトＡＲＳ２のｓｈＲＮＡ(ｓｈＡＲＳ２)のオリゴヌクレオチドは、ＦＬＡＳＨ ｃＤＮＡ(GenBank no. NM_012115)（配列番号１９）の第７５５－７７７番目のヌクレオチド及びＡＲＳ２ ｃＤＮＡ (GeneBank no. NM_015908)（配列番号９）の第３８０－４００番目のヌクレオチドからそれぞれ作成した。ｌａｃＺのサイレンシングのためのｓｈＲＮＡ（ｓｈｌａｃＺ)のオリゴヌクレオチドはｌａｃＺ ｃＤＮＡ (GenBank no. V00296)の第４０７－４２５番目のヌクレオチドから作成した。

[0206] フローサイトメトリー

ＤＮＡ含有量の解析（セルサイクル解析）のため、細胞を氷冷した７０％エタノール（ＰＢＳ中）で固定し、２５０μｇ／ｍｌ ＲＮａｓｅで１５分間、３７℃にて処理した後、５０μｇ／ｍｌのプロピジウム・イオダイド（ＰＩ）を含むＰＢＳで３０分間、４℃にてインキュベートした。ＢｒｄＵ取込みアッセイのため、細胞を１０μＭ ＢｒｄＵで３０分間ラベルし、７０％エタノール及び５０ｍＭグリシンを含むＰＢＳ［ｐＨ ２．０]中で３０分間、４℃にて固定した。４Ｎ ＨＣｌで、２０分間、室温にて処理した後、取込まれたＢｒｄＵをＦＩＴＣ結合抗ＢｒｄＵ抗体 (BD biosciences)又はＡＰＣ結合抗ＢｒｄＵ抗体 (BD Pharmingen)で、４５分間、３７℃にて染色した。解析の前に、細胞を１０μｇ／ｍｌ ＰＩを含むＰＢＳ中で、３０分間、４℃にてインキュベートした。細胞は、ＥＰＩＣＳ ＸＬフローサイトメーター(Beckman Coulter)又はＦＡＣＳＣａｎｔｏ ＩＩ(Becton Dickinson)で解析した

。データは、ＥＸＰＯ３２ソフトウェア(Beckman Coulter)又はＢＤ ＦＡＣＳＤｉｖａソフトウェア (Becton Dickinson)を用いて解析した。

[0207] 免疫沈降及びウェスタンブロッティング

全細胞ライセートを、コンプリートプロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche Molecular Biochemicals)を添加した、可溶化緩衝液(２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ［ｐＨ ７．４]、１０％ グリセロール、１％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、０．５％ ＮＰ－４０、１５０ ｍＭ ＮａＣｌ、１ｍＭ ＥＤＴＡ及び１ｍＭ ＥＧＴＡ)又はＲＩＰＡ緩衝液(５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ［ｐＨ ７．５]、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、１ｍＭ ＥＤＴＡ、１％ ＮＰ－４０及び０．５％ デオキシコール酸ナトリウム)を用いて調製した。既述(Lee and Yonehara, 2002)のように、免疫沈降を行った後で、細胞ライセート及び溶出した免疫沈降物をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより展開し、ウェスタンブロッティングにより解析した。ＦＬＡＳＨの検出については、ＦＬＡＳＨがナイロン膜へ転写される効率が非常に低いので、十分な感度を達成するために、分離ゲルとして４％アクリルアミドを用いた。使用した抗体は、抗ＦＬＡＳＨ モノクローナル抗体（１：１０００；マウスＦＬＡＳＨの第１２６０－１５７５番アミノ酸のペプチドに対して本発明者らの研究室にて作成されたものであり、マウスＦＬＡＳＨ及びヒトＦＬＡＳＨの両方に反応できる）、抗Ｆｌａｇ Ｍ２アガロース樹脂 (Sigma)、抗ＧＦＰ(１：１０００；１Ｅ４ モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体；MBL) 抗ＮＰＡＴ(１：１００；BD biosciences)、抗ＨＡ(１：２０００；１６Ｂ１２；Covance)、抗Ｆｌａｇ Ｍ２(１：１０００；Sigma)、抗ＡＲＳ２ (１：５００；Novus Biologicals)及び抗アクチン(１：５０００；Chemicon)である。

[0208] 蛍光免疫染色

チャンバースライド中の細胞を３％ホルムアルデヒド（ＰＢＳ中）で、４℃にて２０分間固定し、０．５％ Ｔｒｉｔｏｎ緩衝液(０．５％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ［ｐＨ ７．４]、５０ｍＭ ＮａＣｌ、３ｍＭ $MgCl_2$及び ３００ｍＭスクロース)で、１０分間、室温

にて透過処理をした。１０％ＢＳＡ（ＰＢＳ中）で１時間ブロッキングした後、細胞を一次抗体で一晩処理し、Alexa Fluor 488又はAlexa Fluor 594を結合した二次抗体(１：１０００；Molecular probes)と共に１時間インキュベートした。ＤＮＡを１μｇ／ｍｌ ＤＡＰＩ（ＰＢＳ中）で２０分間染色した。蛍光イメージを共焦点顕微鏡ＴＣＳ ＳＰ２ ＡＯＢＳ(Leica)下で得た。細胞中の核ｆｏｃｉの数をカウントするため、イメージをＤＡＳ顕微鏡(Leica)を用いて得た。以下の一次抗体を使用した：抗ＮＰＡＴ(１：１２０； BD Pharmingen)、及び抗Ｃｏｉｌｉｎ(１：１２５； ab11822, Abcam)。

[0209] マススペクトロメトリー

ΔＣ２ ｍＦＬＡＳＨ－ＦＬＡＧ３とのタンパク質複合体のアフィニティ精製のため、１０枚の１５０ｍｍディッシュ中で、Ｔｅｔ－Ｏｎ ｓｈＦＬＡＳＨを有し、ΔＣ２ ｍＦＬＡＳＨ－ＦＬＡＧ３を発現しているＫＢ細胞を、１μｇ／ｍｌ Ｄｏｘで３日間処理し、氷冷したＲＩＰＡ緩衝液を用いて細胞ライセートを調製した。９，４００×ｇにて５０分間遠心分離することにより可溶性画分を回収し、１００μｌのプロテインＧビーズで、１時間、４℃にてプレクリアーした。次に、上清を更に１００μｌの抗Ｆｌａｇ Ｍ２アガロース樹脂(Sigma)と共に、５時間、４℃にてインキュベートした。樹脂を可溶化緩衝液で７回洗浄した。溶出のため、サンプルバッファー（６２．５ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ［ｐＨ６．８］、２％ ＳＤＳ、１０％グリセロール)を加え、室温にて１０分間、それに引き続き３７℃にて５分間インキュベートした。溶出された画分を濃縮し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ(５－１５％ グラジエントアクリルアミドゲル)により分離し、銀染色により可視化した。マススペクトル解析のため、分離されたゲルを１３枚の切片に切断し、トリプシン(Promega)で消化した。各切片から抽出されたペプチドを、ナノエレクトロスプレーイオン源を備えたハイブリッドマススペクトロメーター (QSTAR XL；Applied Biosystems)で解析した。

[0210] ノザンブロッティング及びリアルタイムＲＴ－ＰＣＴ

ノザンブロッティング及びリアルタイムＲＴ－ＰＣＴのための全ｍＲＮＡ

を、ＩＳＯＧＥＮ (Nippon gene)及びＲＮｅａｓｙ Ｍｉｎｉ ｋｉｔ(QIAGEN)をそれぞれ用い、製造者の指示書に従って調製した。ノザンブロッティングのため、全ＲＮＡ（２０μｇ）を電気泳動用１．０%ホルムアルデヒドアガロースゲルへ付し、Ｈｙｂｏｎｄ Ｎ＋ナイロン膜(GE healthcare)へ転写した。ＡｌｋＰｈｏｓ Ｄｉｒｅｃｔ(GE Healthcare)を用いてアルカリフォスファターゼでラベルされた、ヒストン及びヒトｅＥＦ１Ａ１（ｈＥＦ１α)用ＤＮＡプローブにより、膜をハイブリダイズした。ヒストンｍＲＮＡ用のプローブとして、以下のそれぞれのヒストンのコーディング領域をＰＣＲにより増幅した：Ｈ１用としてＨ１ｃ（第44-685ヌクレオチド、NM_005319)、Ｈ２Ａ用としてＨ２ａｄ(第1-393ヌクレオチ、NM_021065)、Ｈ２Ｂ用としてＨ２ｂｆ(第1-381ヌクレオチド、NM_003522)、Ｈ３用としてＨ３ａ(第1-411ヌクレオチド、NM_003529)、及びＨ４用としてＨ４ａ(第1-312ヌクレオチド, NM_003538)。ヒトｅＥＦ１Ａ１(ｈＥＦ１α) ｃＤＮＡ用のプローブをスタンダードとして用いた。ｓｈＲＮＡによるノックダウン効率をチェックするため、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems)により逆転写産物を調製し、StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems)を用いた、以下のプライマーセットによる定量的ＰＣＲにより解析した：ＡＲＳ２用として5’-cattgtcaagatgctggatg-3’（配列番号２３）及び、5’-ctcatccttgtcgttggttt-3’（配列番号２４）；スタンダードとしてのＧＡＰＤＨ用として、5’-gagtcaacggatttggtcgt-3’（配列番号２５）及び5’-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3’（配列番号２６）。

[0211] （結果）

<u>ＦＬＡＳＨのＮ末端領域がＳ期進行に必要である</u>

ＦＬＡＳＨに特異的なショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）（ｓｈＦＬＡＳＨ）を一過性に発現する細胞の解析により、ＦＬＡＳＨがＳ期進行に決定的な役割を果たしていることが以前に示されている(Alm-Kristiansen et al., 2008; Barcaroli et al., 2006a; Barcaroli et al., 2006b)。Ｓ期におけるＦＬＡＳＨの機能を詳細に調べるため、レンチウイルスベースの発現ベ

クターを用いた以前確立したテトラサイクリン（Ｔｅｔ）誘導可能（Ｔｅｔ－Ｏｎ）ｓｈＦＬＡＳＨ発現系を使用した(Kobayashi and Yonehara, 2009)。Ｔｅｔ－Ｏｎ ｓｈＦＬＡＳＨを有するＫＢ細胞を、ドキシサイクリン（Ｄｏｘ）で３日間処理することによりＦＬＡＳＨ発現が下方制御された（図１Ａ）。同様に、位相差顕微鏡を用いた解析により、ＦＬＡＳＨノックダウンＫＢ細胞は、培養ディッシュから中程度にはがれ、正常細胞よりも大きく見えることが示された(図７Ａ)。フローサイトメトリーにより、ＦＬＡＳＨ発現の下方制御における細胞体積の上昇が確認された(図７Ｂ)。また、その下方制御により細胞増殖が阻害された（図１Ｂ）。ｓｈＦＬＡＳＨを発現しており、５－ブロモ－２’－デオキシウリジン（ＢｒｄＵ)で追加ラベルされたＫＢ細胞の細胞周期解析により、細胞がＳ期に集積するが、低いレベルでＢｒｄＵを取込み続けることが示された（図１Ｃ）。ＦＬＡＳＨ発現の下方制御の同様の効果がＵ２ＯＳ細胞においても認められた。

本発明者らは、Ｓ期進行において必要とされるＦＬＡＳＨの領域について解析した。カルボキシ（Ｃ）末端に高感度緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）を融合させた、多様なマウスＦＬＡＳＨ(ｍＦＬＡＳＨ)の欠失変異体をコードするレンチウイルスベースの発現ベクターを感染させることにより、Ｔｅｔ－Ｏｎ ｓｈＦＬＡＳＨを有するＫＢ細胞におけるＦＬＡＳＨ発現を回復させた（図１Ｄ及び１Ｅ）。このレンチウイルス発現系では、ほとんど全ての細胞がＥＧＦＰ発現を示し、トランスフェクション効率がほとんど１００％であることが示された。ｓｈＦＬＡＳＨ発現ＫＢ細胞におけるＳ期進行の欠損が、ＥＧＦＰを融合した全長ｍＦＬＡＳＨ（ｍＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰ）の発現により回復した（図１Ｆ）。アミノ（Ｎ）末端の第１－２５３番目のアミノ酸(a.a.)を欠損した欠失変異体の発現では、Ｓ期進行におけるＦＬＡＳＨの機能を回復させることは出来なかった。対照的に、Ｃ末端の第１８８６－１９６２番目のアミノ酸の欠失体(ΔＣ１)及び第１４０３－１９６２番目のアミノ酸の欠失体(ΔＣ２)は、ＦＬＡＳＨの機能を確かに回復させた(図１Ｆ)。従って、コイルドコイルドメイン(第６８－１４２番目のアミノ酸)を含

有するＮ末端領域が、Ｓ期進行におけるＦＬＡＳＨの機能に必要であることが示唆された。

コイルドコイルドメインを含むＦＬＡＳＨのＮ末端領域の役割を更に調べるため、ｍＦＬＡＳＨの多様な変異体を、全長ｍＦＬＡＳＨと共に使用した免疫沈降試験を行った。ｍＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰを、全長ｍＦＬＡＳＨ、Ｎ末端コイルドコイルドメイン（第６８－１４２番目のアミノ酸）のないｍＦＬＡＳＨ又はＮ末端の１９４アミノ酸がないｍＦＬＡＳＨとともに２９３細胞へトランスフェクトした：ここで、これらの全てのｍＦＬＡＳＨはＣ末端において３コピーのＦＬＡＧ（ＦＬＡＧ３）でタグ標識されたものである(それぞれ、ｍＦＬＡＳＨ－ＦＬＡＧ３、ΔＣＣ ｍＦＬＡＳＨ－ＦＬＡＧ３及びΔＮ１９４ ｍＦＬＡＳＨ－ＦＬＡＧ３）（図１Ｄ）。ｍＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰはｍＦＬＡＳＨ－ＦＬＡＧ３と免疫共沈降したが、ΔＣＣ ｍＦＬＡＳＨ－ＦＬＡＧ３やΔＮ１９４ ｍＦＬＡＳＨ－ＦＬＡＧ３とは免疫共沈降しなかった（図１Ｇ）。これらの結果から、Ｎ末端コイルドコイルドメインを介して、ＦＬＡＳＨタンパク質が自己会合することが示された。

[0212] ＦＬＡＳＨのＮＰＡＴとの相互作用は、Ｓ期進行に必要ではない

ＦＬＡＳＨはＮＰＡＴと相互作用し、そしてこの相互作用がＳ期進行において重要であると推測されてきた(Barcaroli et al., 2006a)。ＮＰＡＴと相互作用するＦＬＡＳＨの領域を特定するため、ｍＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰ、ΔＮ ｍＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰ、ΔＣ１ ｍＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰ又はΔＣ２ ｍＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰをコードする発現ベクターを２９３Ｔ細胞へ一過性にトランスフェクトし、ＮＰＡＴ及びｍＦＬＡＳＨの欠失変異体を用いて免疫共沈降解析を行った。ΔＮ ｍＦＬＡＳＨの発現レベルが低すぎて抗ＧＦＰ抗体により検出することが出来なかったが、抗ＧＦＰ抗体による免疫沈降物中に見出すことができた。ｍＦＬＡＳＨ及びΔＮ ｍＦＬＡＳＨはＮＰＡＴと免疫共沈降することが示されたがΔＣ１ ｍＦＬＡＳＨ及びΔＣ２ ｍＦＬＡＳＨでは認められなかった（図２Ａ）。従って、ＦＬＡＳＨはＮＰＡＴとＣ末端領域を介して相互作用することが示された。一方、ＮＰＡＴへ結合する活

性のないΔＣ１ ｍＦＬＡＳＨ及びΔＣ２ ｍＦＬＡＳＨは、全長ｍＦＬＡＳＨと同様にＳ期進行を支持できた。以上より、ＦＬＡＳＨとＮＰＡＴとの相互作用はＳ期進行の支持におけるＦＬＡＳＨの機能には関係ないことが示唆された。

[0213] Ｃｏｉｌｉｎを含有するカハール体の形成は、ＦＬＡＳＨ依存的Ｓ期進行と相関する

以前の報告では、ＦＬＡＳＨはカハール体中でＮＰＡＴと共局在し、ＦＬＡＳＨ発現の下方制御によりＮＰＡＴの核ｆｏｃｉ及びカハール体の主要な構成要素であるＣｏｉｌｉｎの核ｆｏｃｉの破壊が引き起こされることが示されている(Barcaroli et al., 2006a; Barcaroli et al., 2006b)。本発明者らは、ｓｈＦＬＡＳＨを発現するＫＢ細胞において、ｍＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰとそれと同様にＥＧＦＰへ融合した欠失変異体の、ＮＰＡＴ又はＣｏｉｌｉｎの核ｆｏｃｉに対する影響を調べた。Ｔｅｔ－Ｏｎ ｓｈＦＬＡＳＨを有するＫＢ細胞におけるＮＰＡＴ ｆｏｃｉ及びＣｏｉｌｉｎ ｆｏｃｉの両方のシグナルは、Ｄｏｘによる３日間の処理後に消失した（図２Ｂ及び２Ｃ）。全長ｍＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰはｓｈＦＬＡＳＨ発現ＫＢ細胞において核ｆｏｃｉの形成が認められ、核内においてＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰ ｆｏｃｉはＮＰＡＴ ｆｏｃｉと完全に共局在した(図２Ｂ)。これらの知見はこれまでの報告(Barcaroli et al., 2006a; Barcaroli et al., 2006b)と一貫性がある。一方、ＦＬＡＳＨ ｆｏｃｉの約２０%及びＣｏｉｌｉｎ ｆｏｃｉの約２１%が、Ｃｏｉｌｉｎ ｆｏｃｉ及びＦＬＡＳＨ ｆｏｃｉとそれぞれ共局在した（図２Ｃ）。ΔＮ ｍＦＬＡＳＨ、ΔＣ１ ｍＦＬＡＳＨ及びΔＣ２ ｍＦＬＡＳＨは、いずれも核内でｆｏｃｉを形成せず、ΔＮ ｍＦＬＡＳＨ、ΔＣ１ ｍＦＬＡＳＨ又はΔＣ２ ｍＦＬＡＳＨを発現するＦＬＡＳＨノックダウン ＫＢ細胞のいずれにおいてもＮＰＡＴ ｆｏｃｉの形成は認められなかった（図２Ｄ及び表１）。

[0214]

[表1]

外因性の mFLASH	Dox	核内 foci 形成			ヒストン mRNAs の発現	細胞周期進行
		FLASH foci	NPAT foci	Coilin foci		
-	-		++	++	++	++
-	+		-	-	±	-
mFLASH	+	++	++	++	++	++
ΔCC mFLASH	+	-	-	-	±	-
ΔC1 mFLASH	+	-	-	+	+ 又は ++	++
ΔC2 mFLASH	+	-	-	+	+ 又は ++	++
ΔFARB mFLASH	+	+	+	+	±	±

[0215] 表１に、外因的に発現させたＦＬＡＳＨ及びその変異体の種々の生物学的機能をまとめた。Ｔｅｔ－Ｏｎ ｓｈＦＬＡＳＨを有するＫＢ細胞を１μｇ／ｍｌ Ｄｏｘと共に、又はそれ無しで、３日間培養し、ＦＬＡＳＨ、ＮＰＡＴ及びＣｏｉｌｉｎの核内ｆｏｃｉ；ヒストンｍＲＮＡｓの発現レベル；並びに細胞周期進行を図１、２Ｂ－Ｅ及び図７Ｃに示したように調べた。++、正常；+、弱いが有意である；±、ほとんど検出不可能；－、検出不可能。

[0216] 一方、ｍＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰ、ΔＣ１ ｍＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰ又はΔＣ２ ｍＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰを発現するＦＬＡＳＨノックダウン ＫＢ細胞のいずれにおいてもＣｏｉｌｉｎ ｆｏｃｉの形成は回復したが、ΔＮ ｍＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰを発現する細胞においては回復しなかった（図２Ｅ及び表１）。まとめると、ＦＬＡＳＨとＮＰＡＴは同一のｆｏｃｉ内において共局在し、ＦＬＡＳＨによるｆｏｃｉの形成は、ＦＬＡＳＨのＮ末端及びＣ末端の両方に依存しており、ＮＰＡＴのそれとよく相関した。しかしながら、ＦＬＡＳＨ ｆｏｃｉ及びＮＰＡＴ ｆｏｃｉの形成はいずれも、Ｓ期進行を支持するＦＬＡＳＨの能力とは相関しなかった（表１）。一方、Ｃｏｉｌｉｎのｆｏｃｉは、ＦＬＡＳＨのｆｏｃｉに依存しないが、Ｓ期進行を支持する能力のあるｍＦＬＡＳＨコンストラクト（全長ｍＦＬＡＳＨ、ΔＣ１ ｍＦＬ

ＡＳＨ又はΔＣ２ ｍＦＬＡＳＨ）には依存しており、Ｓ期進行には必要であると思われた。

[0217] ＡＲＳ２の発現はＳ期進行に必要である

Ｓ期進行においてΔＣ２ ｍＦＬＡＳＨがどのように機能するか明らかにするため、ｓｈＦＬＡＳＨを発現しているＫＢ細胞においてΔＣ２ ｍＦＬＡＳＨ－ＦＬＡＧ３と相互作用するタンパク質を精製した。ΔＣ２ ｍＦＬＡＳＨの免疫沈降物のマススペクトロメトリーによりＡＲＳ２を同定した。ＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との間の物理的相互作用を免疫沈降及びウェスタンブロッティングにより確認した（図３Ａ）。

その生理学的機能を調べるため、Ｔｅｔ－Ｏｎ ｓｈＲＮＡ発現系を用いて、ＫＢ細胞におけるＡＲＳ２をノックダウンした。ＡＲＳ２の発現をＤｏｘで６日間処理することにより下方制御した（図３Ｂ）。ＡＲＳ２に特異的なｓｈＲＮＡ（ｓｈＡＲＳ２）の発現により、細胞増殖停止が誘導されたが（図３Ｃ）、その増殖は、ｓｈＡＲＳ２の標的ヌクレオチド部位にサイレント変異を有する外因性のｆｌａｇタグ標識化ＡＲＳ２（ｆｌａｇ－ｍｕｔＡＲＳ２）を発現させることにより回復した(図３Ｄ及び図９Ａ)。興味深いことに、ＢｒｄＵで追加標識したｓｈＡＲＳ２発現細胞の解析により、ＡＲＳ２のノックダウンにより、ＦＬＡＳＨノックダウン細胞で観察されたのと同様のＳ期停止が誘導されたことが示された（図３Ｅ）。

以上の結果から、ＡＲＳ２の発現を抑制することにより、細胞増殖を抑制できることが示唆された。

[0218] ＡＲＳ２は、ヒストンの複製依存的転写及びＮＰＡＴ ｆｏｃｉの形成の双方に必要である

細胞がＳ期に入ると、複製依存的ヒストンｍＲＮＡの量が増加し、それはＳ期の終わりには急速に分解される(Sittman et al., 1983)。複製依存的ヒストンｍＲＮＡは、ポリアデニル化されていない後生動物ｍＲＮＡのみであるが、代替の（複製非依存的）ヒストンｍＲＮＡはポリアデニル化されている(Dominski and Marzluff, 1999)。ｓｈＡＲＳ２を発現するＫＢ細胞におけ

るヒストンｍＲＮＡのレベルを調べるため、ノザンブロッティングを行った。この方法によって、複製依存的及び複製非依存的なヒストンの全てのバリアントのｍＲＮＡを、異なるバンドとして同時に検出できる。ｓｈＡＲＳ２を発現するＫＢ細胞においては、複製依存的リンカーヒストン（Ｈ１）及びコアヒストン（Ｈ２Ａ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３及びＨ４）のｍＲＮＡレベルが減少していた(図８Ａ)。報告されているように(Barcaroli et al., 2006a)、ｓｈＦＬＡＳＨを発現するＫＢ細胞において、ヒストンｍＲＮＡの同様の減少が観察された(図７Ｃ)。従って、ＦＬＡＳＨのみならずＡＲＳ２も複製依存的なヒストン遺伝子の転写に必要であることが示された。

本発明者らは、ｓｈＡＲＳ２をＫＢ細胞に発現させた後で、ＮＰＡＴ及びＣｏｉｌｉｎの核内ｆｏｃｉを解析し、ＡＲＳ２発現の下方制御によりＮＰＡＴのシグナルは途絶されるが、Ｃｏｉｌｉｎのシグナルはそうではないことを見出した（図３Ｆ及び図８Ｂ)。

本発明者らは、次に、ＡＲＳ２及びＦＬＡＳＨの細胞内分布を解析した。Ｔｅｔ－Ｏｎ ｓｈＡＲＳ２を有するＫＢ細胞に、ｍＦＬＡＳＨ－ＥＧＦＰ及びＨＡタグ標識したｍｕｔＡＲＳ２（ＨＡ－ｍｕｔＡＲＳ２)をコードするレトロウイルスベクターを感染させた。抗ＨＡ抗体によるＨＡ－ｍｕｔＡＲＳ２の蛍光免疫染色により、ＡＲＳ２は核内に局在し、ＦＬＡＳＨ ｆｏｃｉと共局在した核内ｆｏｃｉを形成することが示された（図３Ｇ）。

ＡＲＳ２がＮＰＡＴ ｆｏｃｉの形成に必要であることを確認するため、Ｔｅｔ－Ｏｎ ｓｈＡＲＳ２を有するＫＢ細胞へ、Ｎ末端にＤｓＲｅｄモノマーをタグ標識したｍｕｔＡＲＳ２(ＤｓＲｅｄ－ｍｕｔＡＲＳ２)をコードするレトロウイルスベクターを感染させた。Ｄｏｘで６日間処理後、ＮＰＡＴの核内ｆｏｃｉを共焦点蛍光免疫顕微鏡下で観察した。ＤｓＲｅｄ－ｍｕｔＡＲＳ２の発現は、ＡＲＳ２ノックダウン細胞における細胞増殖を回復させることができ（図４Ａ）、ｓｈＡＲＳ２を発現するＫＢ細胞においてＮＰＡＴのｆｏｃｉを形成する能力を回復させることが示された（図４Ｂ及び図９）。従って、ＡＲＳ２は、ＦＬＡＳＨと全く同じように、ＮＰＡＴの核内ｆｏ

ｃｉに必要である。

[0219] ＡＲＳ２はＡＲＳ２ドメインを介してＦＬＡＳＨと相互作用する

ＦＬＡＳＨへ結合するＡＲＳ２の領域を同定するため、図４Ｃに示すように、ヒトＡＲＳ２の種々の欠失変異体を構築した。これらのＡＲＳ２変異をＮ末端でＨＡでタグ標識し、ｍＦＬＡＳＨ－ＦＬＡＧ３と共に２９３Ｔ細胞中で発現させた。ＡＲＳ２ドメインを含む変異体(ΔＮ１及びΔＮ２)は、全長ＡＲＳ２と同様にＦＬＡＳＨと免疫共沈降したが、ＡＲＳ２ドメインのない変異体(ΔＣ１及びΔＣ２)はＦＬＡＳＨと相互作用しなかった（図４Ｄ）。これらの結果から、ＡＲＳ２ドメインは、ＡＲＳ２がＦＬＡＳＨへ相互作用するのに必要であることが示された。

[0220] ＦＬＡＳＨは、１３アミノ酸から構成される中央領域を介して、ＡＲＳ２と相互作用する

ＡＲＳ２へ結合するＦＬＡＳＨの領域を同定するため、ＨＡタグ標識したＡＲＳ２を多様なｍＦＬＡＳＨの欠失変異体と共に一過性に発現している２９３Ｔ細胞を用いて、免疫共沈降試験を行った(図１０Ａ及び図５Ａ)。これらのｍＦＬＡＳＨの欠失変異体は、Ｃ末端において３コピーのＦＬＡＧでタグ標識されている。全長ｍＦＬＡＳＨ及びΔＣ２ ｍＦＬＡＳＨがＨＡ－ＡＲＳ２と免疫共沈降することを確認した(図１０Ｂ)。コイルドコイルドメインを欠失したｍＦＬＡＳＨ（ΔＣＣ)及び２種類のＮ末端欠失変異体ΔＮ１９４及びΔＮ５５１（それぞれ、ｍＦＬＡＳＨの第１９５－１９６２番目のアミノ酸及び第５５２－１９６２番目のアミノ酸を含む）もまたＨＡ－ＡＲＳ２と相互作用した(図１０Ｂ及び図１０Ｃ)。しかしながら、ｍＦＬＡＳＨの第９４４－１９６２番目のアミノ酸を含むΔＮ９４３ ｍＦＬＡＳＨは、ＨＡ－ＡＲＳ２と相互作用できず(図１０Ｄ)、このことから、ｍＦＬＡＳＨの第５５２－９４３番目のアミノ酸がＡＲＳ２との相互作用に重要であることが示唆された。この領域を更に調べるため、図５Ａに示すように、第５５２－７６３番目のアミノ酸からなるｍＦＬＡＳＨの欠失変異体及び第７５８－９４４番目のアミノ酸からなるｍＦＬＡＳＨの欠失変異体を構築した。ＡＲＳ２

は７５８－９４４ ｍＦＬＡＳＨと免疫共沈降したが、５５２－７６３ ｍＦＬＡＳＨとは免疫共沈降しないことが
示された（図５Ｂ）。全ての結果から、第７５８－９４４番目のアミノ酸から構成されるｍＦＬＡＳＨの中央領域がＡＲＳ２との相互作用に必要であることが示された。

次に、図５Ａに示すように、ｍＦＬＡＳＨの第７６４－８２９番目、第７９８－８６０番目、第８６１－９２６番目又は第８２０－８９６番目のアミノ酸から構成されるｍＦＬＡＳＨの欠失変異体を構築した。８６１－９２６ ｍＦＬＡＳＨのみがＡＲＳ２と相互作用した（図５Ｃ）。マウスＦＬＡＳＨのこの領域（第８６１－９２６番目のアミノ酸）をヒト、ウシ及びニワトリのＦＬＡＳＨの対応する領域とアラインすると（図５Ｄ）、マウスＦＬＡＳＨの第８８７－８９６番目及び第９１４－９２６番目のアミノ酸の２つの領域が高度に保存されていることが判明した。本発明者らは、図６Ａに示すように、ｍＦＬＡＳＨの第８８７－８９６番目のアミノ酸がないもの、及び第９１４－９２６番目のアミノ酸がないものの２種類のＦＬＡＳＨ欠失変異体を構築した。Δ８８７－８９６ ｍＦＬＡＳＨはＡＲＳ２に結合したが、Δ９１４－９２６ ｍＦＬＡＳＨは結合しなかった（図６Ｂ）。本発明者らは、ｍＦＬＡＳＨの第９１４－９２６番目のアミノ酸から構築される領域を「ＦＡＲＢ領域」(FLASH-ARS2 binding region)と命名した。マウス及びヒトのＦＡＲＢ配列は、それぞれ、「DELEEGEIRSDDE」（配列番号６）及び「DELEEGEIRSDSE」（配列番号５）である。

そこで、本発明者らは、ＦＡＲＢのＮ末端にＥＧＦＰを融合させた。ＦＡＲＢ－ＥＧＦＰはＡＲＳ２と相互作用可能であった（図６Ｃ）。全ての結果から、ＦＬＡＳＨのＦＡＲＢ領域が、ＡＲＳ２との相互作用に必要十分であることが示唆された。

[0221] ＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との相互作用はＳ期進行に必要である

ＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との間の相互作用がＳ期進行に必須であることを確認するため、ｍＦＬＡＳＨ、ΔＣＣ ｍＦＬＡＳＨ又はΔＦＡＲＢ ｍＦＬＡ

ＳＨ（Δ９１４－９２６ ｍＦＬＡＳＨ)を発現しているｓｈＦＬＡＳＨトランスフェクトＫＢ細胞の増殖を解析した（図６Ｄ）。ΔＦＡＲＢ ｍＦＬＡＳＨは、ΔＣＣ ｍＦＬＡＳＨがそうであった様に、全長ｍＦＬＡＳＨと比較して、細胞の増殖を促進する能力が減少していた（図６Ｅ）。Ｓ期の細胞数を調べるため、ＢｒｄＵが取り込まれた細胞を用いて細胞周期解析を行った。Ｓ期の細胞の割合は、ΔＣＣ ｍＦＬＡＳＨやΔＦＡＲＢ ｍＦＬＡＳＨを発現している、ｓｈＦＬＡＳＨトランスフェクトＫＢ細胞において、全長ｍＦＬＡＳＨを発現している細胞と比較して上昇していた（図６Ｆ）。

本発明者らは、ΔＦＡＲＢ ｍＦＬＡＳＨの、ｓｈＦＬＡＳＨ発現ＫＢ細胞における、ＦＬＡＳＨ、ＮＰＡＴ又はＣｏｉｌｉｎの核内ｆｏｃｉを形成する能力について調べた。共焦点蛍光免疫顕微鏡により、ΔＦＡＲＢ ＦＬＡＳＨは、ＦＬＡＳＨ、ＮＰＡＴ及びＣｏｉｌｉｎから構成される核内ｆｏｃｉを形成する能力を、弱いながらも有意に保持していることが明らかとなった（表１）。

ΔＦＡＲＢ ｍＦＬＡＳＨを発現しているｓｈＦＬＡＳＨトランスフェクトＫＢ細胞におけるヒストンｍＲＮＡのレベルを調べるため、ノザンブロッティングを行い、その結果、ΔＦＡＲＢ ｍＦＬＡＳＨを発現する細胞においては、全てのリンカー及びコアヒストンのｍＲＮＡレベルが著しく減少していることが示された(表２)。

[0222] [表2]

		ヒストンmRNAの発現				
外因性の mFLASH	Dox	hH1	hH2A	hH2B	hH3	hH4
-	-	++	++	++	++	++
-	+	±	±	±	±	±
mFLASH	+	++	++	++	++	++
ΔCC mFLASH	+	±	±	±	±	±
ΔC1 mFLASH	+	++	+	++	+	+
ΔC2 mFLASH	+	++	++	++	+	++
ΔFARB mFLASH	+	±	±	±	±	±

[0223] 表２は、種々のｍＦＬＡＳＨの欠失変異体を発現している、Ｔｅｔ－Ｏｎ ｓｈＦＬＡＳＨを有するＫＢ細胞におけるヒストンｍＲＮＡの発現レベルを示す。この表は、Ｔｅｔ－Ｏｎ ｓｈＦＬＡＳＨを有するKB細胞における複製依存的ヒストンｍＲＮＡのレベルに対する、外因性に発現させたＦＬＡＳＨ及びその変異体の効果をまとめたものである。細胞を、１μｇ／ｍｌ Ｄｏｘと共に、又はそれ無しで、３日間培養し、ヒストンｍＲＮＡのレベルを、図７Ｃで述べたようにノザンブロッティングにより解析した。++、正常；+、弱いが有意；±、ほとんど検出不可能。

[0224] これらの結果から、ＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との間の相互作用が、Ｓ期進行を促進するとともに、ヒストンｍＲＮＡレベルを維持するのにも重要であることが示された。

[0225] [実施例２]

実施例１と同様に、ＨＡタグ標識したヒトＡＲＳ２、並びにＣ末端にＦｌａｇタグ、Ｎ末端にＥＧＦＰ及びＮＬＳを融合したヒトＦＡＲＢを２９３Ｔ細胞へ導入し、抗ＨＡ抗体、抗Ｆｌａｇ抗体及び抗体ＧＲＰ抗体を用いた免疫沈降試験により両者の会合の有無を調べた。

その結果、ヒトＦＡＲＢとヒトＡＲＳ２とは共免疫沈降した。（図１１）

この結果から、マウスと同様に、ヒトＦＬＡＳＨのＦＡＲＢ領域のみで、ヒトＡＲＳ２と結合可能であることが立証された。

[0226] [実施例３]

実施例１に準じ、H.Miyoshi氏(RIKEN)より提供されたレンチウイルスベクターを用いて、ヒト又はマウスのＦＡＲＢとＥＧＦＰとの融合ペプチドをヒト咽頭カルシノーマ由来のＫＢ細胞へ導入し、細胞増殖に対する効果を調べた。導入したポリペプチドのＣ末端にＳＶ４０ Ｔ抗原の核移行配列を連結させた。また、ヒトＦＡＲＢ－ＥＧＦＰ融合ペプチド（ｈＦＡＲＢ－ＥＧＦＰ）については、ＦＡＲＢとＥＧＦＰとの間にリンカーを設けたバージョンと、リンカーを設けないバージョンの２種類のポリペプチドを作成した。ｈＦＡＲＢ－ＥＧＦＰ及びマウスＦＡＲＢ－ＥＧＦＰ融合ペプチド（ｍＦＡＲＢ

－ＥＧＦＰ）の構造を図１２に示す。コントロールとしては、Ｃ末端にＳＶ４０　Ｔ抗原の核移行配列を連結したＥＧＦＰを用いた。

ＫＢ細胞をレンチウイルスベクターで感染させ、２４時間後にフローサイトメトリーにより該細胞を解析したところ、ほぼ全ての細胞がＥＧＦＰを発現していた。即ち、感染効率はほぼ１００％であった。

ＫＢ細胞を更に３日間培養した後に、細胞を回収し、細胞数を計測した。

その結果、ｈＦＡＲＢ－ＥＧＦＰの導入により、細胞増殖が抑制された（図１３Ａ）。同様の効果がｍＦＡＲＢ－ＥＧＦＰによっても認められた（図１３Ｂ）。ＦＡＲＢとＥＧＦＰの間にリンカーを挿入すると、細胞増殖抑制効果が上昇した（図１３Ａ）。

以上の結果から、ＦＡＲＢ領域を含むポリペプチドの導入により、細胞増殖を抑制し得ることが立証された。

[0227] [実施例４]

ヒトＦＡＲＢ配列に含まれる１個又は２個のアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体を作成し、実施例１及び２に準じて、ＦＡＲＢ領域とＡＲＳ２との会合を評価する系（ＦＡＲＢ－ＥＧＦＰ－ＮＬＳポリペプチドとＨＡ－ＡＲＳ２ポリペプチドとの会合を免疫沈降にて評価する系）を用い、該変異体とＡＲＳ２との会合を解析した。

[0228] 変異体に含まれるミュータントヒトＦＡＲＢ配列は、以下の通りである。

[0229] [表3]

WT	D E L E E G E I R S D S E	配列番号５
1	A A L E E G E I R S D S E	配列番号２７
2	D E A E E G E I R S D S E	配列番号２８
3	D E L A A G E I R S D S E	配列番号２９
4	D E L E E A E I R S D S E	配列番号３０
5	D E L E E G A I R S D S E	配列番号３１
6	D E L E E G E A R S D S E	配列番号３２
7	D E L E E G E I A S D S E	配列番号３３
8	D E L E E G E I R A D S E	配列番号３４
9	D E L E E G E I R S A S A	配列番号３５
10	D E L E E G E I R S D A E	配列番号３６

[0230] ＦＡＲＢ－ＥＧＦＰ－ＮＬＳとＨＡ－ＡＲＳ２とを２９３Ｔ細胞に発現させ、ウェスタンブロッティングにより細胞ライセート中での発現を確認した。また、細胞ライセートから抗ＧＦＰ抗体又は抗ＨＡ抗体で免疫沈降を行い、ＦＡＲＢ－ＥＧＦＰ－ＮＬＳとＨＡ－ＡＲＳ２とが共免疫沈降するか解析した。

[0231] 結果を図１４及び表４に示す。ＦＡＲＢ配列のＮ末端側から４番目と５番目のグルタミン酸残基をアラニンに置換した場合（＃３）、及び７番目のグルタミン酸をアラニンに置換した場合（＃５）には、ＦＡＲＢ－ＥＧＦＰ－ＮＬＳとＨＡ－ＡＲＳ２との結合が検出できなかった。４番目のグリシンをアラニンに置換した場合（＃４）には、両者の弱い結合が検出された。その他の位置のアミノ酸残基を置換した場合には、野生型ＦＡＲＢ配列を用いた場合と同程度のＨＡ－ＡＲＳ２との結合が検出された。

[0232] [表4]

		Ars2との結合能
WT	D E L E E G E I R S D S E	○
1	A A L E E G E I R S D S E	○
2	D E A E E G E I R S D S E	○
3	D E L A A G E I R S D S E	×
4	D E L E E A E I R S D S E	△
5	D E L E E G A I R S D S E	×
6	D E L E E G E A R S D S E	○
7	D E L E E G E I A S D S E	○
8	D E L E E G E I R A D S E	○
9	D E L E E G E I R S A S A	○
10	D E L E E G E I R S D A E	○

[0233] ○：結合する、△：弱く結合する、×：結合を検出できない。

[0234] 以上の結果より、ＦＡＲＢ配列における第４番目、第５番目及び第７番目のグルタミン酸が、ＡＲＳ２との会合に必須であることが示された。

[0235] [実施例５]

実施例１及び３に準じて、ヒトＦＬＡＳＨのＦＡＲＢを含む１８７アミノ酸残基（第７５８～９４４番目のアミノ酸）からなる領域をＥＧＦＰ及びＮＬＳと結合した融合ポリペプチド（７５８－９４４　ａａ－ＥＧＦＰ－ＮＬＳ）をＫＢ細胞に強制発現させ、該細胞の細胞周期を観察した。

[0236] 結果を図１５に示す。上記融合ポリペプチドの発現により細胞の増殖がＳ期で停止した。

[0237] 参考文献

Alm-Kristiansen, A. H., Saether, T., Matre, V., Gilfillan, S., Dahle, O., and Gabrielsen, O. S. (2008). FLASH acts as a co-activator of the transcription factor c-Myb and localizes to active RNA polymerase II foci. Oncogene 27, 4644-4656.

Amsterdam, A., Nissen, R. M., Sun, Z., Swindell, E. C., Farrington, S., and Hopkins, N. (2004). Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 12792-12797.

Barcaroli, D., Bongiorno-Borbone, L., Terrinoni, A., Hofmann, T. G., Rossi, M., Knight, R. A., Matera, A. G., Melino, G., and De Laurenzi, V. (2006a). FLASH is required for histone transcription and S-phase progression. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 14808-14812.

Barcaroli, D., Dinsdale, D., Neale, M. H., Bongiorno-Borbone, L., Ranalli, M., Munarriz, E., Sayan, A. E., McWilliam, J. M., Smith, T. M., Fava, E., et al. (2006b). FLASH is an essential component of Cajal bodies. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 14802-14807.

Bongiorno-Borbone, L., De Cola, A., Vernole, P., Finos, L., Barcaroli, D., Knight, R. A., Melino, G., and De Laurenzi, V. (2008). FLASH and NPAT positive but not Coilin positive Cajal Bodies correlate with cell ploidy. Cell Cycle 7, 2357-2367.

Cioce, M., and Lamond, A. I. (2005). Cajal bodies: a long history of

discovery. Annu Rev Cell Dev Biol 21, 105-131.

DeRan, M., Pulvino, M., Greene, E., Su, C., and Zhao, J. (2008). Transcriptional activation of histone genes requires NPAT-dependent recruitment of TRRAP-Tip60 complex to histone promoters during the G1/S phase transition. Mol Cell Biol 28, 435-447.

Dominski, Z., and Marzluff, W. F. (1999). Formation of the 3' end of histone mRNA. Gene 239, 1-14.

Ewing, R. M., Chu, P., Elisma, F., Li, H., Taylor, P., Climie, S., McBroom-Cerajewski, L., Robinson, M. D., O'Connor, L., Li, M., et al. (2007). Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. Mol Syst Biol 3, 89.

Flotho, C., Coustan-Smith, E., Pei, D., Iwamoto, S., Song, G., Cheng, C., Pui, C. H., Downing, J. R., and Campana, D. (2006). Genes contributing to minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance of CASP8AP2. Blood 108, 1050-1057.

Gall, J. G. (2000). Cajal bodies: the first 100 years. Annu Rev Cell Dev Biol 16, 273-300.

Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S., et al. (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. Nat Genet 31, 135-140.

Imai, Y., Kimura, T., Murakami, A., Yajima, N., Sakamaki, K., and Yonehara, S. (1999). The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. Nature 398, 777-785.

Kino, T., and Chrousos, G. P. (2003). Tumor necrosis factor alpha receptor- and Fas-associated FLASH inhibit transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by binding to and interfering with its int

eraction with p160 type nuclear receptor coactivators. J Biol Chem 278, 3023-3029.

Kino, T., Ichijo, T., and Chrousos, G. P. (2004). FLASH interacts with p160 coactivator subtypes and differentially suppresses transcriptional activity of steroid hormone receptors. J Steroid Biochem Mol Biol 92, 357-363.

Kittler, R., Putz, G., Pelletier, L., Poser, I., Heninger, A. K., Drechsel, D., Fischer, S., Konstantinova, I., Habermann, B., Grabner, H., et al. (2004). An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. Nature 432, 1036-1040.

Kobayashi, Y., and Yonehara, S. (2009). Novel cell death by downregulation of eEF1A1 expression in tetraploids. Cell Death Differ 16, 139-150.

Lee, K. K., and Yonehara, S. (2002). Phosphorylation and dimerization regulate nucleocytoplasmic shuttling of mammalian STE20-like kinase (MST). J Biol Chem 277, 12351-12358.

Ma, T., Van Tine, B. A., Wei, Y., Garrett, M. D., Nelson, D., Adams, P. D., Wang, J., Qin, J., Chow, L. T., and Harper, J. W. (2000). Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. Genes Dev 14, 2298-2313.

Milovic-Holm, K., Krieghoff, E., Jensen, K., Will, H., and Hofmann, T. G. (2007). FLASH links the CD95 signaling pathway to the cell nucleus and nuclear bodies. Embo J 26, 391-401.

Obradovic, D., Tirard, M., Nemethy, Z., Hirsch, O., Gronemeyer, H., and Almeida, O. F. (2004). DAXX, FLASH, and FAF-1 modulate mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated transcription in hippocam

pal cells--toward a basis for the opposite actions elicited by two nu clear receptors? Mol Pharmacol 65, 761-769.

Okamoto, K., Fujisawa, J., Reth, M., and Yonehara, S. (2006). Human T -cell leukemia virus type-I oncoprotein Tax inhibits Fas-mediated apo ptosis by inducing cellular FLIP through activation of NF-kappaB. Gen es Cells 11, 177-191.

Prigge, M. J., and Wagner, D. R. (2001). The arabidopsis serrate gene encodes a zinc-finger protein required for normal shoot development. Plant Cell 13, 1263-1279.

Rossman, T. G., and Wang, Z. (1999). Expression cloning for arsenite-resistance resulted in isolation of tumor-suppressor fau cDNA: possib le involvement of the ubiquitin system in arsenic carcinogenesis. Car cinogenesis 20, 311-316.

Sakashita, E., Tatsumi, S., Werner, D., Endo, H., and Mayeda, A. (200 4). Human RNPS1 and its associated factors: a versatile alternative p re-mRNA splicing regulator in vivo. Mol Cell Biol 24, 1174-1187.

Sittman, D. B., Graves, R. A., and Marzluff, W. F. (1983). Histone mR NA concentrations are regulated at the level of transcription and mRN A degradation. Proc Natl Acad Sci U S A 80, 1849-1853.

Wei, Y., Jin, J., and Harper, J. W. (2003). The cyclin E/Cdk2 substra te and Cajal body component p220(NPAT) activates histone transcriptio n through a novel LisH-like domain. Mol Cell Biol 23, 3669-3680.

Wilson, M. D., Wang, D., Wagner, R., Breyssens, H., Gertsenstein, M., Lobe, C., Lu, X., Nagy, A., Burke, R. D., Koop, B. F., and Howard, P . L. (2008). ARS2 is a conserved eukaryotic gene essential for early mammalian development. Mol Cell Biol 28, 1503-1514.

Ye, X., Wei, Y., Nalepa, G., and Harper, J. W. (2003). The cyclin E/C dk2 substrate p220(NPAT) is required for S-phase entry, histone gene

expression, and Cajal body maintenance in human somatic cells. Mol Cell Biol 23, 8586-8600.

Zhao, J., Kennedy, B. K., Lawrence, B. D., Barbie, D. A., Matera, A. G., Fletcher, J. A., and Harlow, E. (2000). NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. Genes Dev 14, 2283-2297.

産業上の利用可能性

[0238] 本発明によれば、ＦＬＡＳＨとＡＲＳ２との相互作用の阻害や、ＦＬＡＳＨの自己会合の阻害という、これまでにない新たなメカニズムに立脚した細胞増殖抑制剤や、そのスクリーニング方法が提供される。

本出願は日本で出願された特願２００９－０５２６２８（出願日：２００９年３月５日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

[請求項1] （Ａ）（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含み、且つ長さが２００アミノ酸以下であるポリペプチド；並びに

（Ｂ）（Ａ）のポリペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端に少なくとも１つのタグポリペプチド又はシグナル配列が融合してなる融合ポリペプチド

からなる群から選択されるいずれかのポリペプチド。

[請求項2] 請求項１記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[請求項3] 請求項２記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[請求項4] 請求項３記載の発現ベクターを含む形質転換体。

[請求項5] （１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチド（但し、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含むポリペプチドを除く）、又は該ポリペプチドを発現し得る発現ベクターを含む、細胞増殖抑制剤。

[請求項6] ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸、又はこれらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクターを含む、細胞増殖抑制剤。

[請求項7] （１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチドと、

（１’）配列番号１３で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２’）配列番号１３で表されるアミノ酸配列と９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３’）配列番号１３で表されるアミノ酸配列において１～１０個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチドとの結合を阻害する化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法。

[請求項8] （１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかのポリペプチド領域へ結合する化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法。

[請求項9] （１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチドと、

（１’）配列番号１３で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２’）配列番号１３で表されるアミノ酸配列と９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３’）配列番号１３で表されるアミノ酸配列において１～１０個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＦＬＡＳＨポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチド

との組み合わせ物。

[請求項10] ＡＲＳ２の発現を低下させる化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法。

[請求項11] ＦＬＡＳＨポリペプチドの自己会合を阻害する化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法。

[請求項12] ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインへ結合する化合物を、細胞増殖を抑制し得る化合物として選択することを含む、細胞

増殖を抑制し得る化合物のスクリーニング方法。

[請求項13] 細胞増殖の抑制において使用するための、

（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチド（但し、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含むポリペプチドを除く）、又は該ポリペプチドを発現し得る発現ベクター。

[請求項14] 細胞増殖の抑制において使用するための、ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸、又はこれらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクター。

[請求項15] 哺乳動物に対して、

（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチド（但し、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含むポリペプチドを除く）、又は該ポリペプチドを発現し得る発現ベクターの有効量を投与することを含む、該哺乳動物における細胞増殖の抑制方法。

[請求項16] 哺乳動物に対して、ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮ

Ａ、アンチセンス核酸、又はこれらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクターの有効量を投与することを含む、該哺乳動物における細胞増殖の抑制方法。

[請求項17] （１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチド（但し、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含むポリペプチドを除く）、又は該ポリペプチドを発現し得る発現ベクターを含む、異常な細胞増殖に起因する疾患の予防又は治療剤。

[請求項18] ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸、又はこれらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクターを含む、異常な細胞増殖に起因する疾患の予防又は治療剤。

[請求項19] 異常な細胞増殖に起因する疾患の予防又は治療において使用するための、

（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチド（但し、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含むポリペプ

チドを除く）、又は該ポリペプチドを発現し得る発現ベクター。

[請求項20] 異常な細胞増殖に起因する疾患の予防又は治療において使用するための、ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸、又はこれらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクター。

[請求項21] 哺乳動物に対して、

（１）配列番号５で表されるアミノ酸配列からなる領域；

（２）配列番号５で表されるアミノ酸配列と６９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域；及び

（３）配列番号５で表されるアミノ酸配列において１～４個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有する領域

からなる群から選択されるいずれかの領域を含むポリペプチド（但し、ＦＬＡＳＨポリペプチドのコイルドコイルドメインを含むポリペプチドを除く）、又は該ポリペプチドを発現し得る発現ベクターの有効量を投与することを含む、該哺乳動物における異常な細胞増殖に起因する疾患の予防又は治療の抑制方法。

[請求項22] 哺乳動物に対して、ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制し得るｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸、又はこれらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクターの有効量を投与することを含む、該哺乳動物における異常な細胞増殖に起因する疾患の予防又は治療方法。

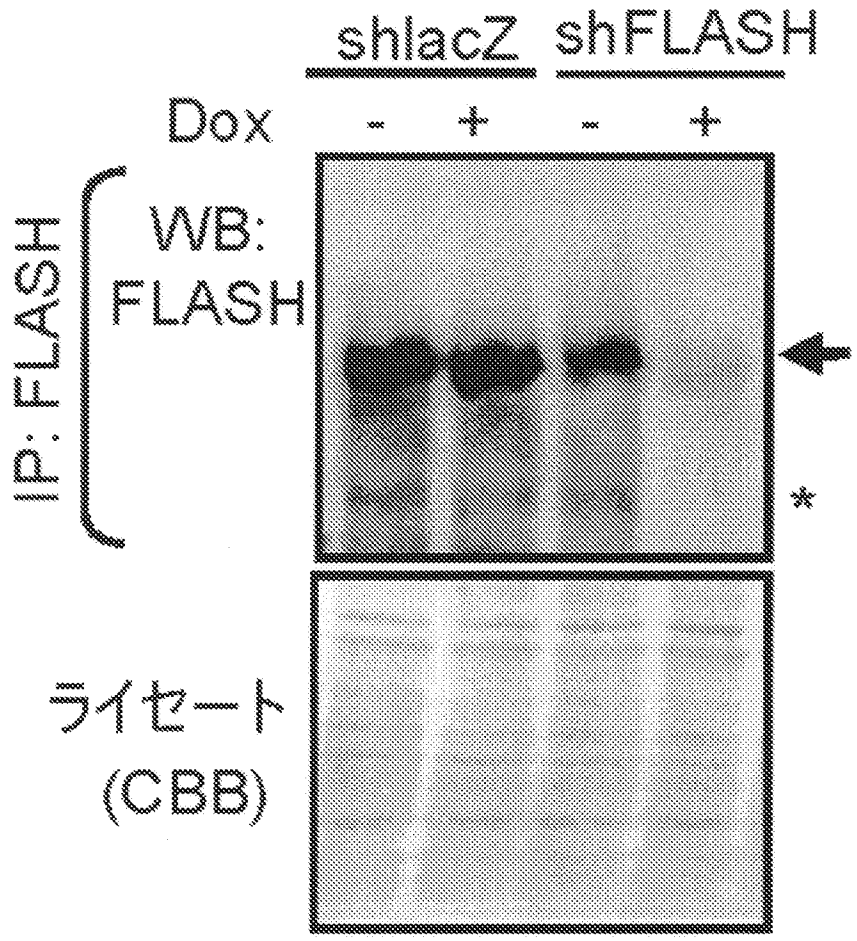
[請求項23] （Ａ）配列番号５で表されるアミノ酸配列において、第４番目のグルタミン酸、第５番目のグルタミン酸及び第７番目のグルタミン酸からなる群から選択される少なくとも１つのグルタミン酸がグルタミン酸以外のアミノ酸で置換されているアミノ酸配列を含み、且つＡＲＳ２ポリペプチドへ結合する活性を有していないポリペプチド、並びに

（Ｂ）（Ａ）のポリペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端に少なくとも１つのタグポリペプチド又はシグナル配列が融合してなるポリペプチ

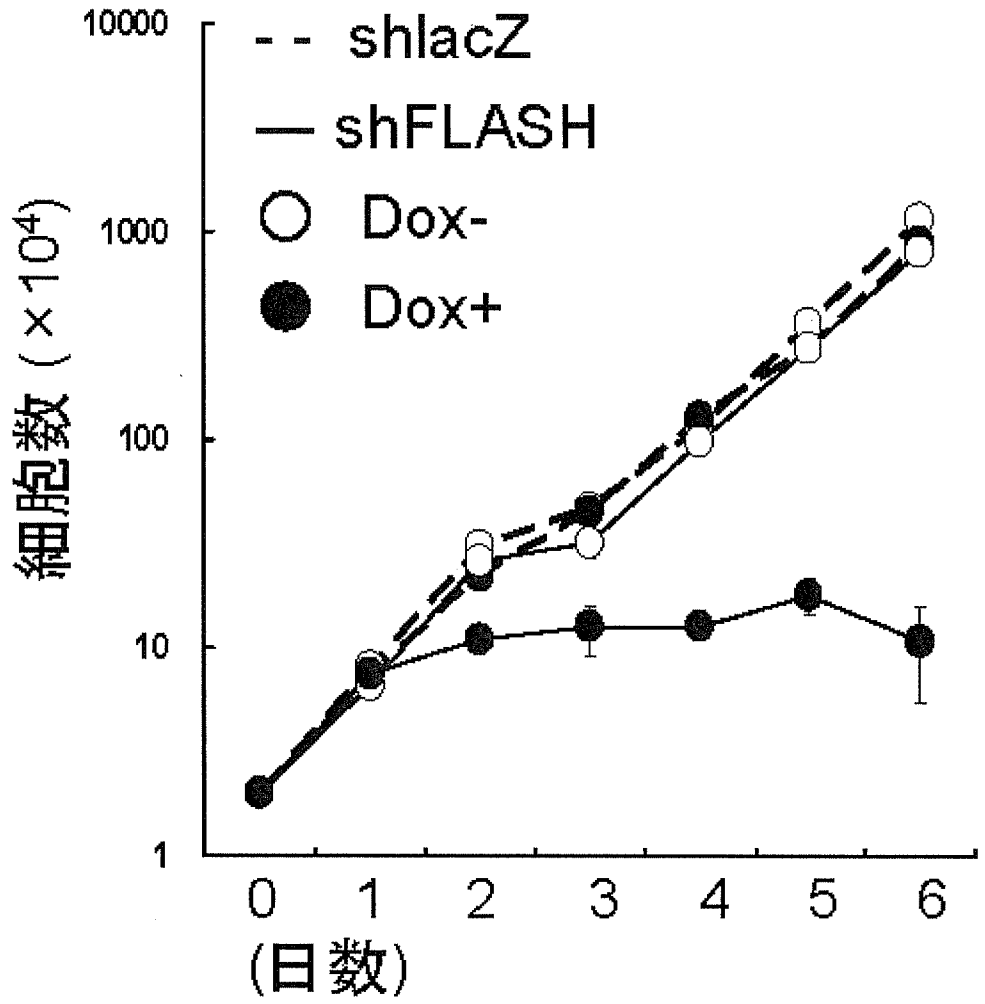
ド

からなる群から選択されるいずれかのポリペプチド。

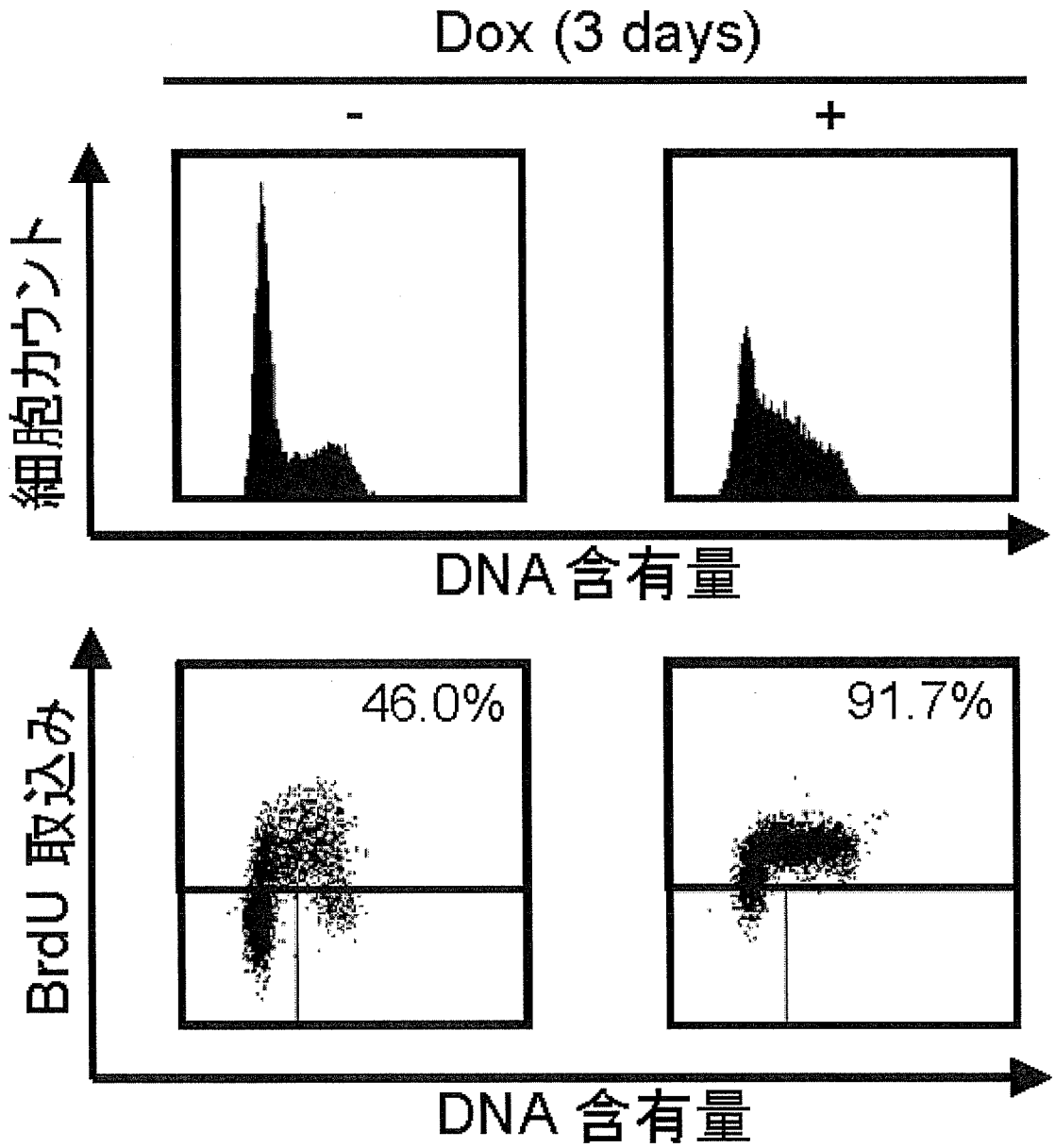
[図1A]



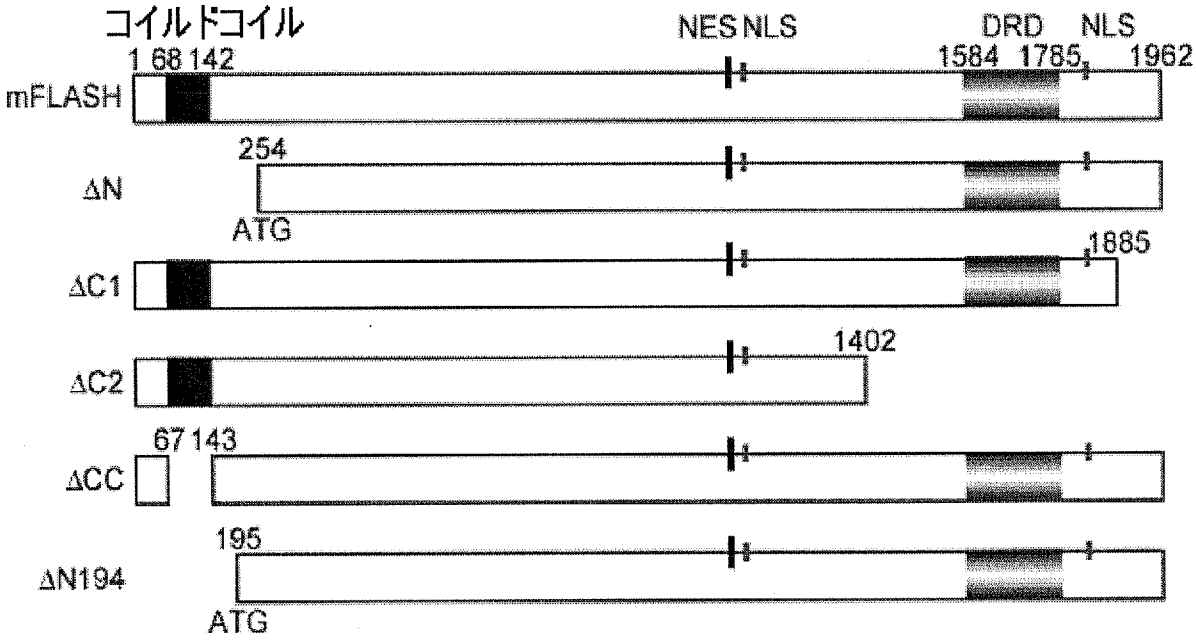
[図1B]



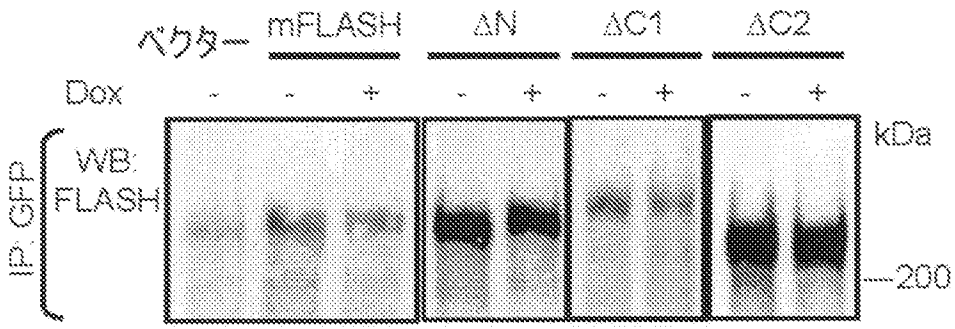
[図1C]



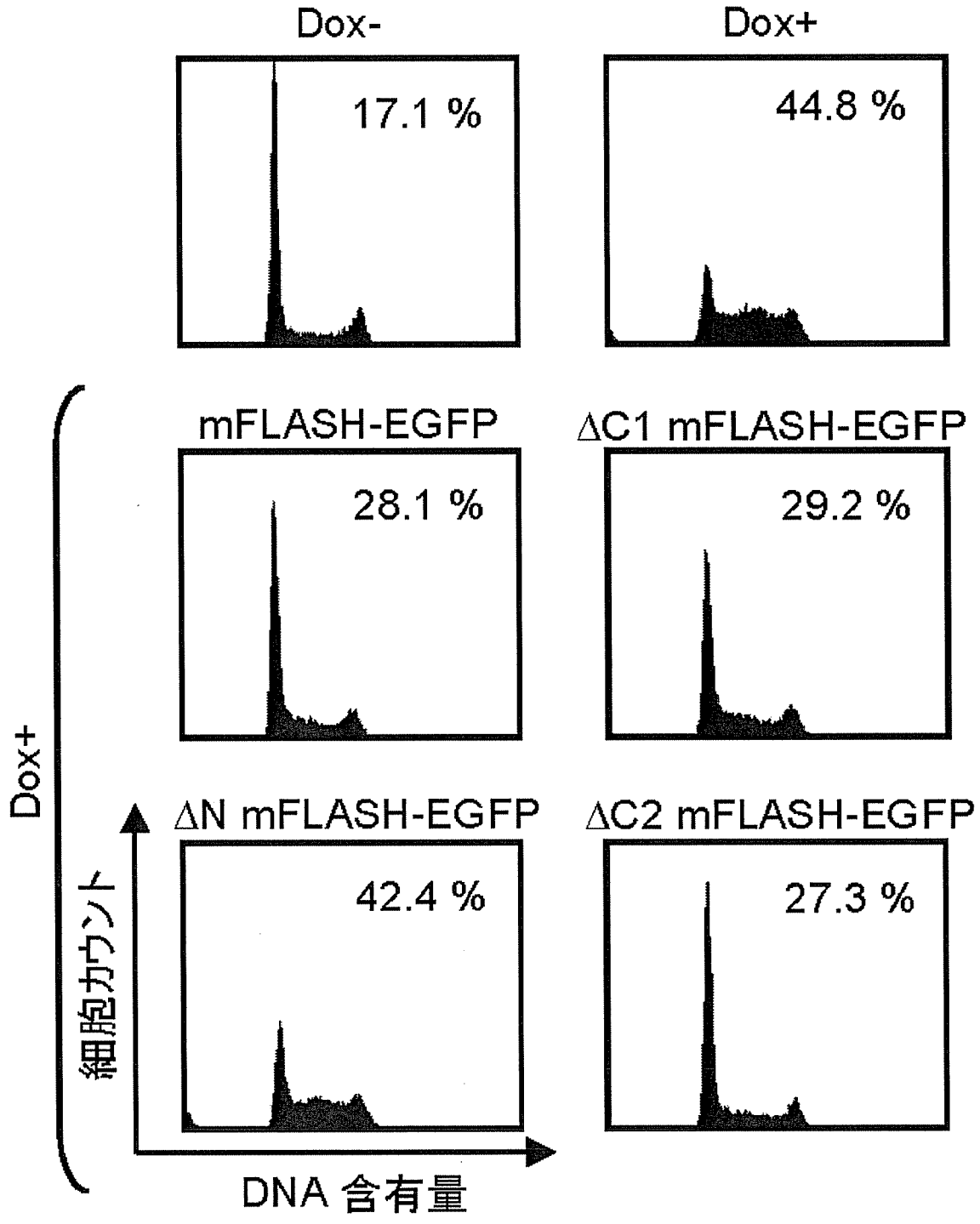
[図1D]


コイルドコイル
NES NLS
DRD NLS
1 68 142
1584 1785 1962
mFLASH
254
ΔN
ATG
1885
ΔC1
1402
ΔC2
67 143
ΔCC
195
ΔN194
ATG

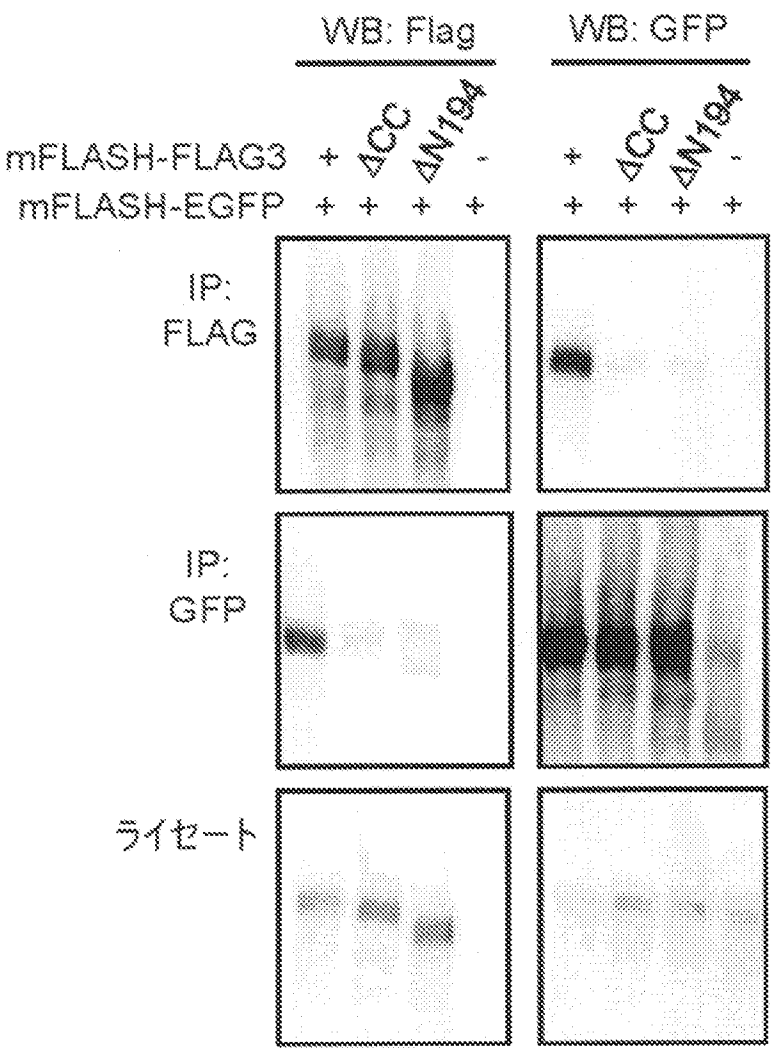
[図1E]


ベクター
mFLASH
ΔN
ΔC1
ΔC2
Dox
- - + - + - + - +
kDa
WB:
FLASH
IP: GFP
200

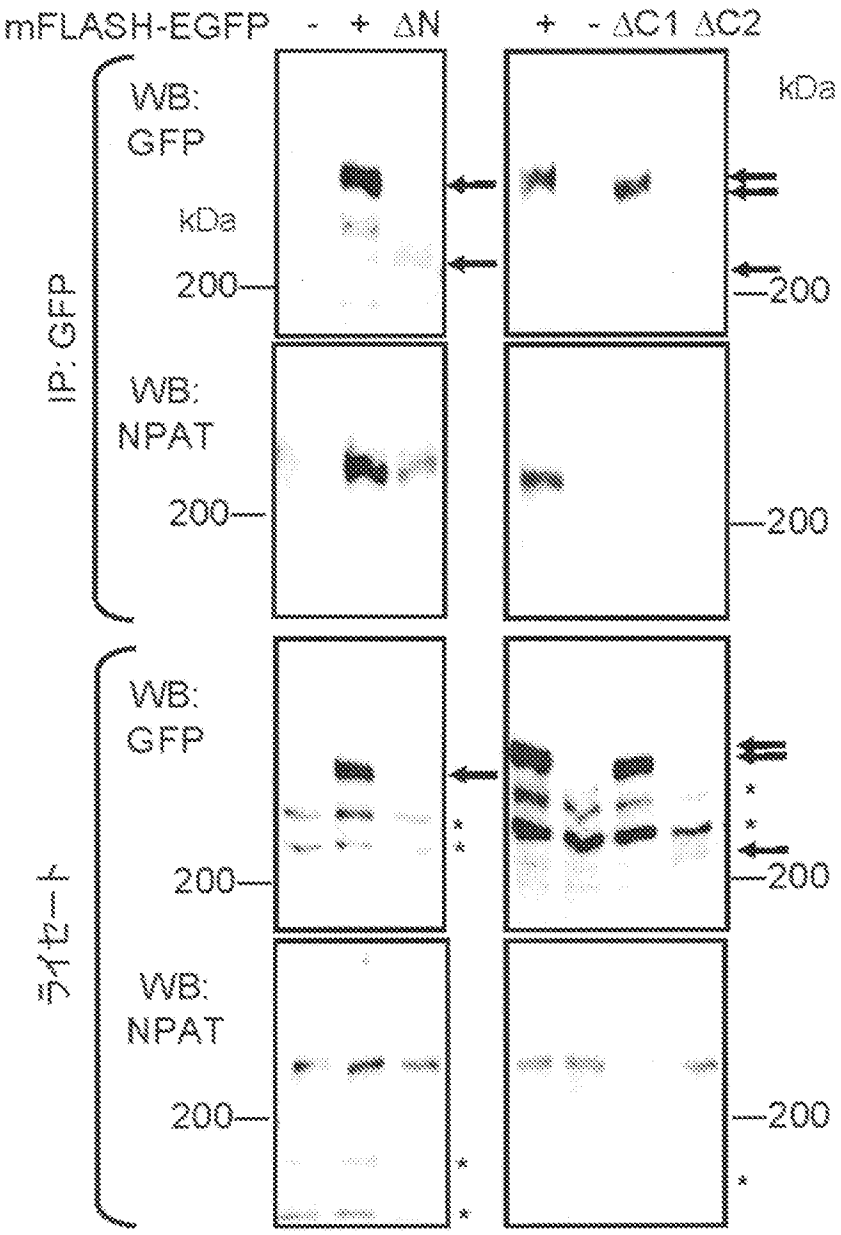
[図1F]


Dox-
Dox+
17.1 %
44.8 %
mFLASH-EGFP
ΔC1 mFLASH-EGFP
28.1 %
29.2 %
Dox+
ΔN mFLASH-EGFP
ΔC2 mFLASH-EGFP
42.4 %
27.3 %
細胞カウント
DNA 含有量

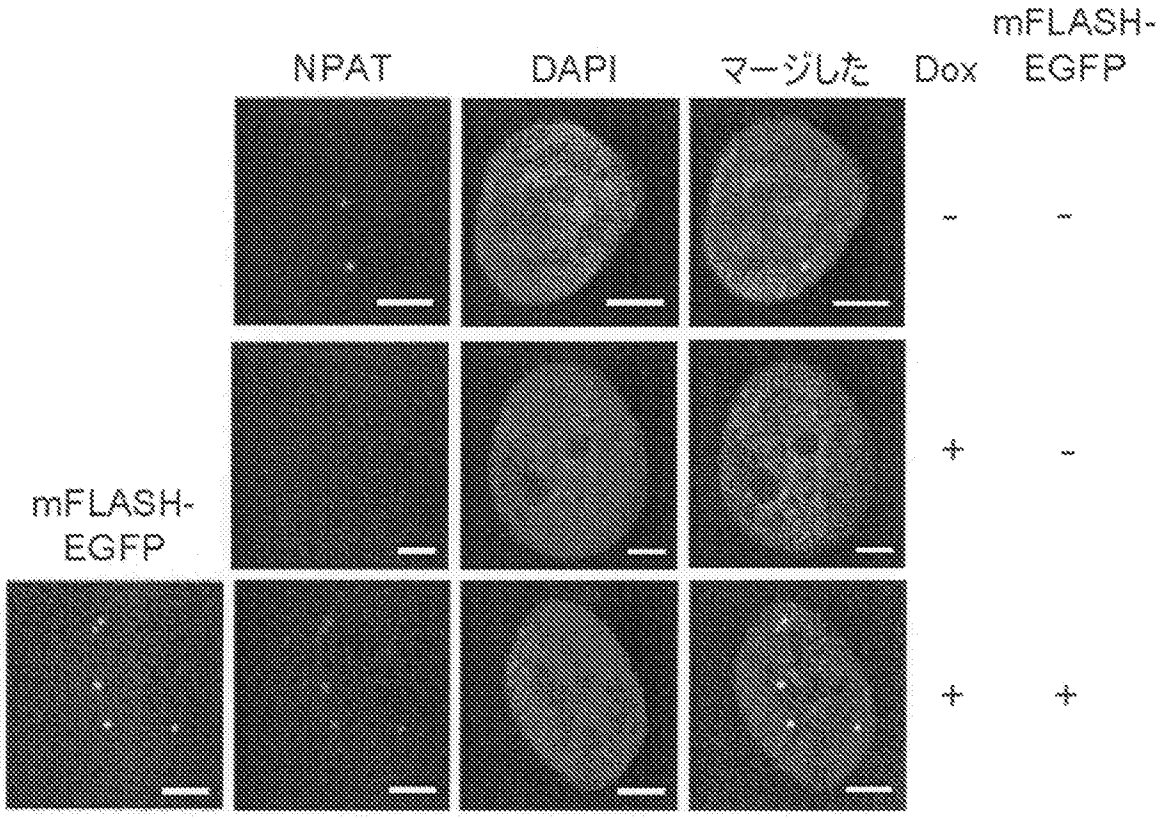
[図1G]


WB: Flag
WB: GFP
mFLASH-FLAG3
ΔCC
ΔN194
mFLASH-EGFP
IP: FLAG
IP: GFP
ライセート

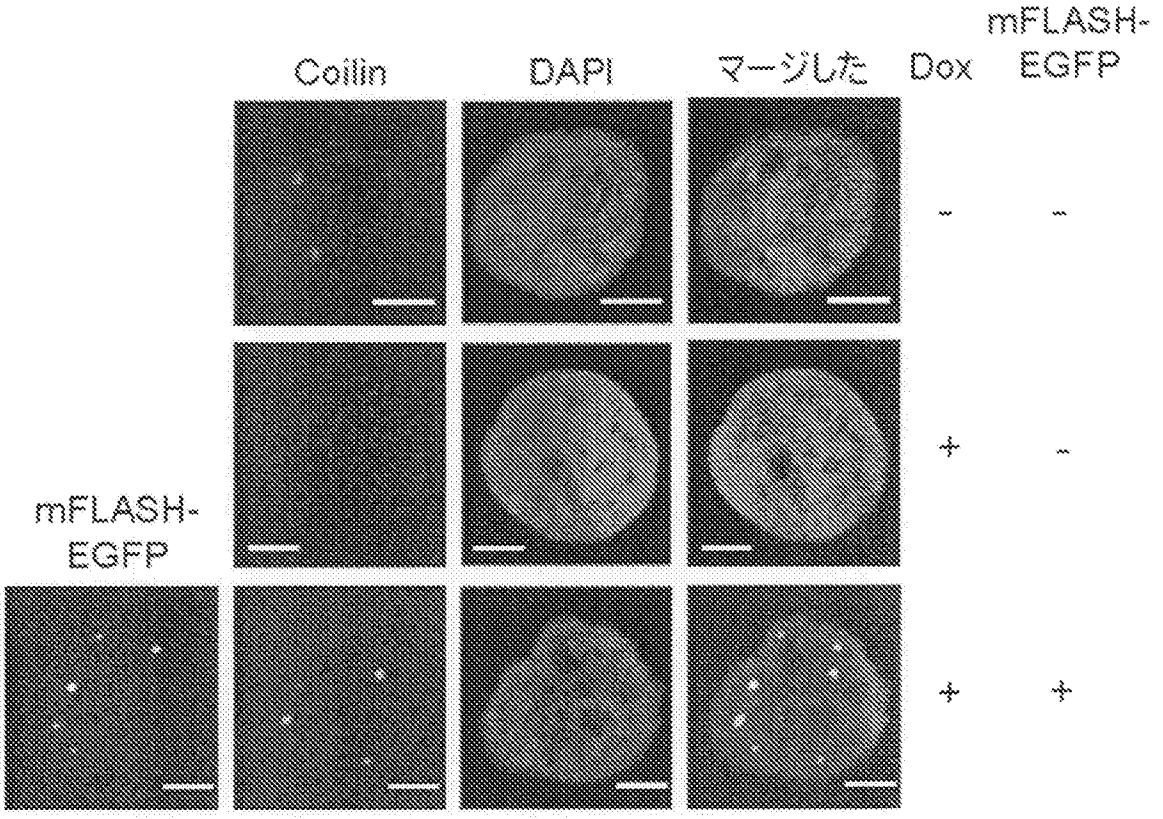
[図2A]


mFLASH-EGFP - + ΔN + - ΔC1 ΔC2
kDa
IP: GFP
WB: GFP
kDa
200
WB: NPAT
200
200
200
インプット
WB: GFP
200
WB: NPAT
200
200
*
*
*
*
*
*

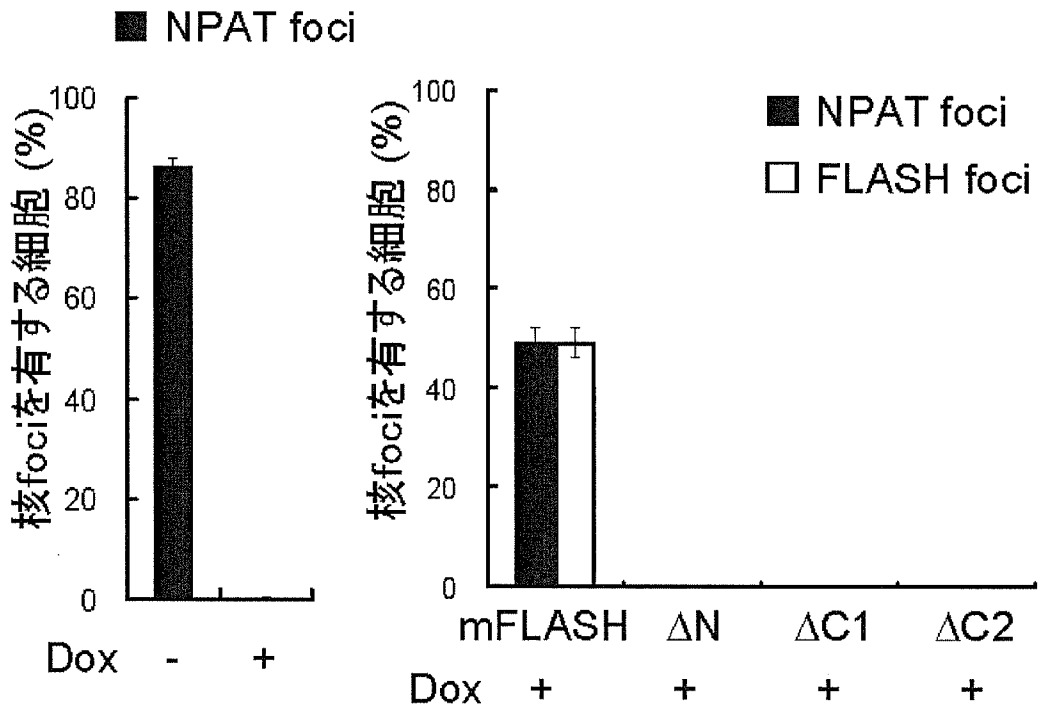
[図2B]


NPAT
DAPI
マージした
Dox
mFLASH-EGFP
mFLASH-EGFP
-
-
+
-
+
+

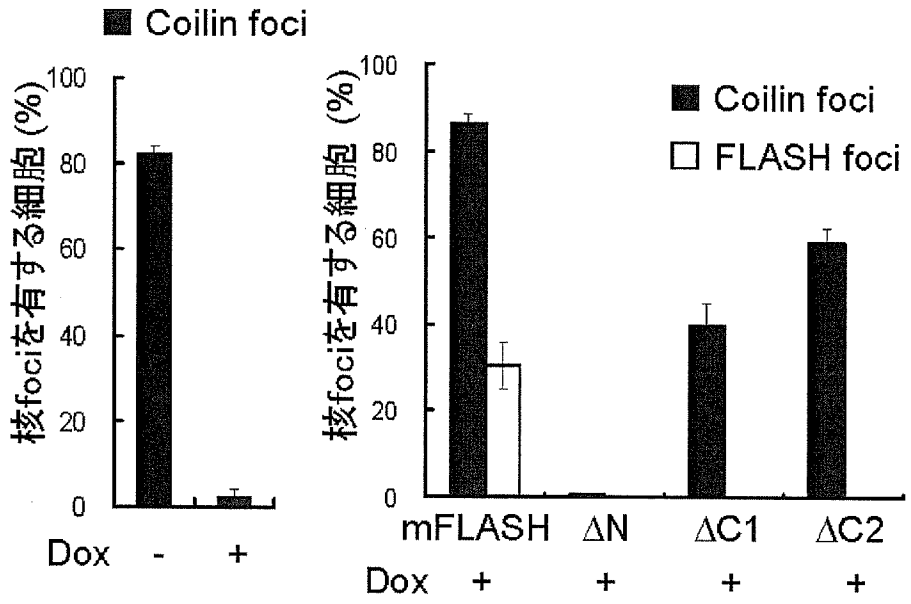
[図2C]


Coilin
DAPI
マージした
Dox
mFLASH-EGFP
mFLASH-EGFP
-
-
+
-
+
+

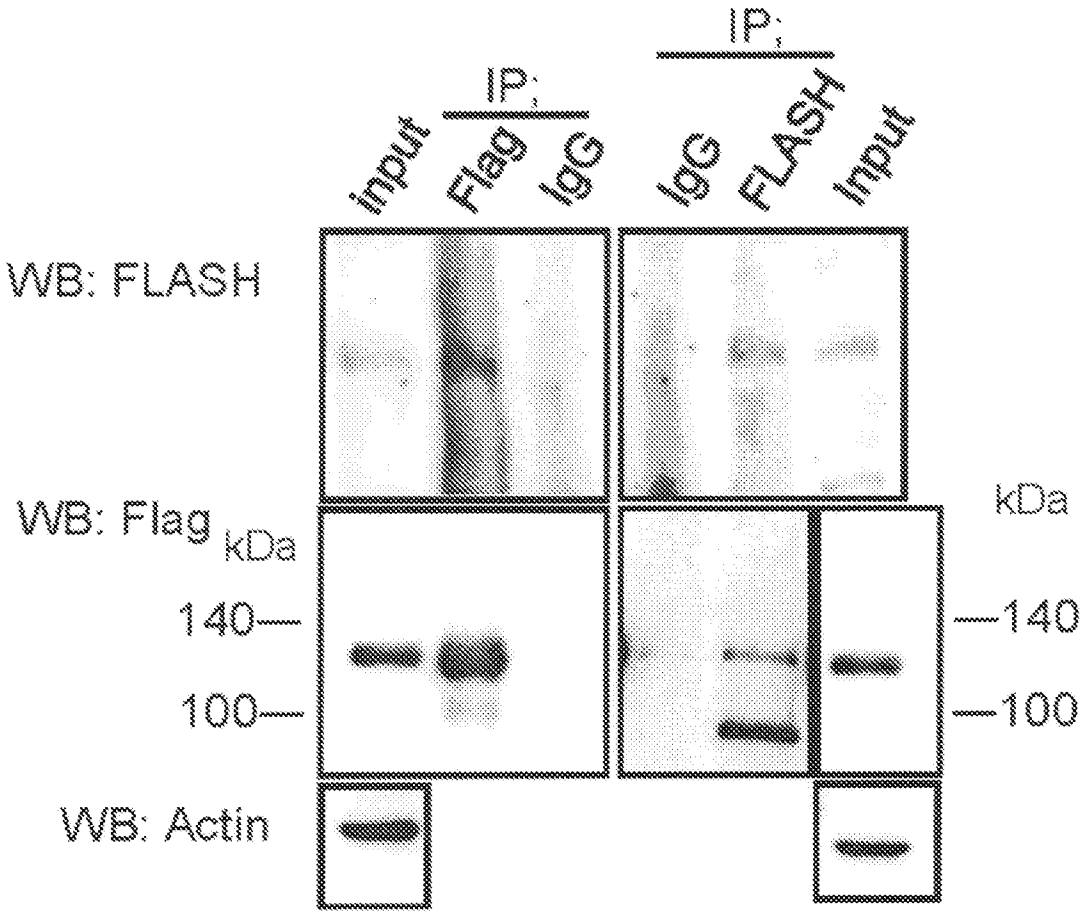
[図2D]


NPAT foci
核fociを有する細胞 (%)
100
80
60
40
20
0
Dox - +
NPAT foci
FLASH foci
mFLASH ΔN ΔC1 ΔC2
Dox + + + +

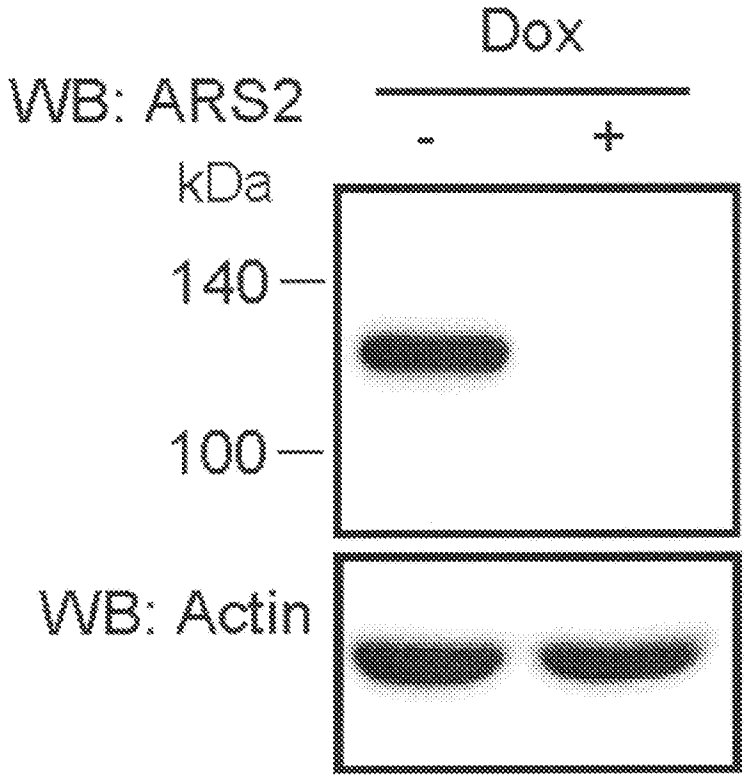
[図2E]


Coilin foci
核fociを有する細胞 (%)
100
80
60
40
20
0
Dox - +
Coilin foci
FLASH foci
mFLASH ΔN ΔC1 ΔC2
Dox + + + +

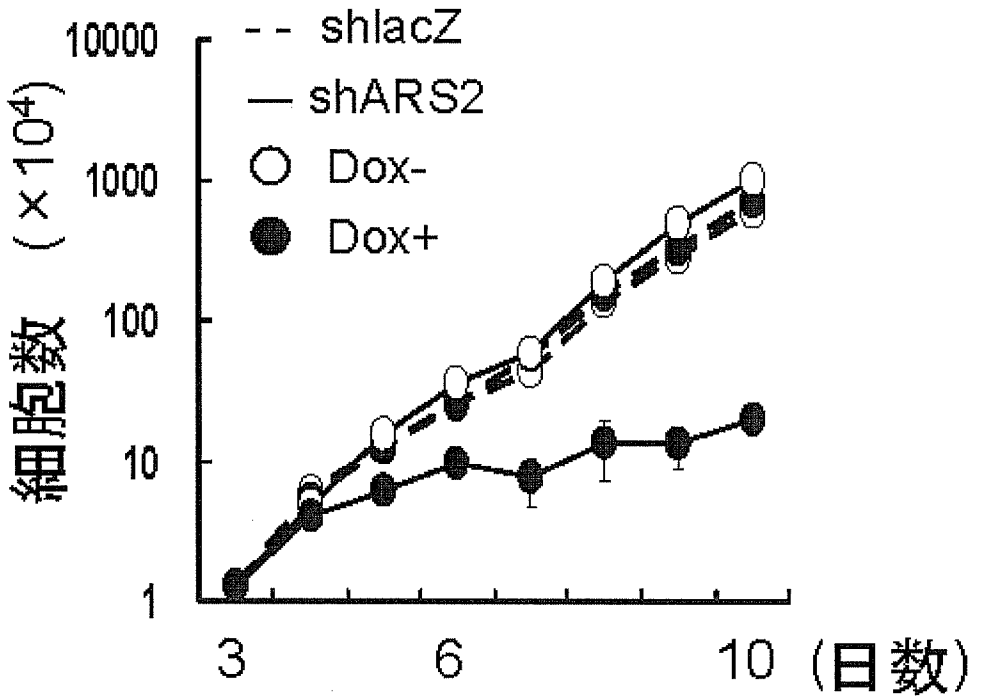
[図3A]


IP;
IP;
input
Flag
IgG
IgG
FLASH
Input
WB: FLASH
WB: Flag
kDa
140
100
kDa
140
100
WB: Actin

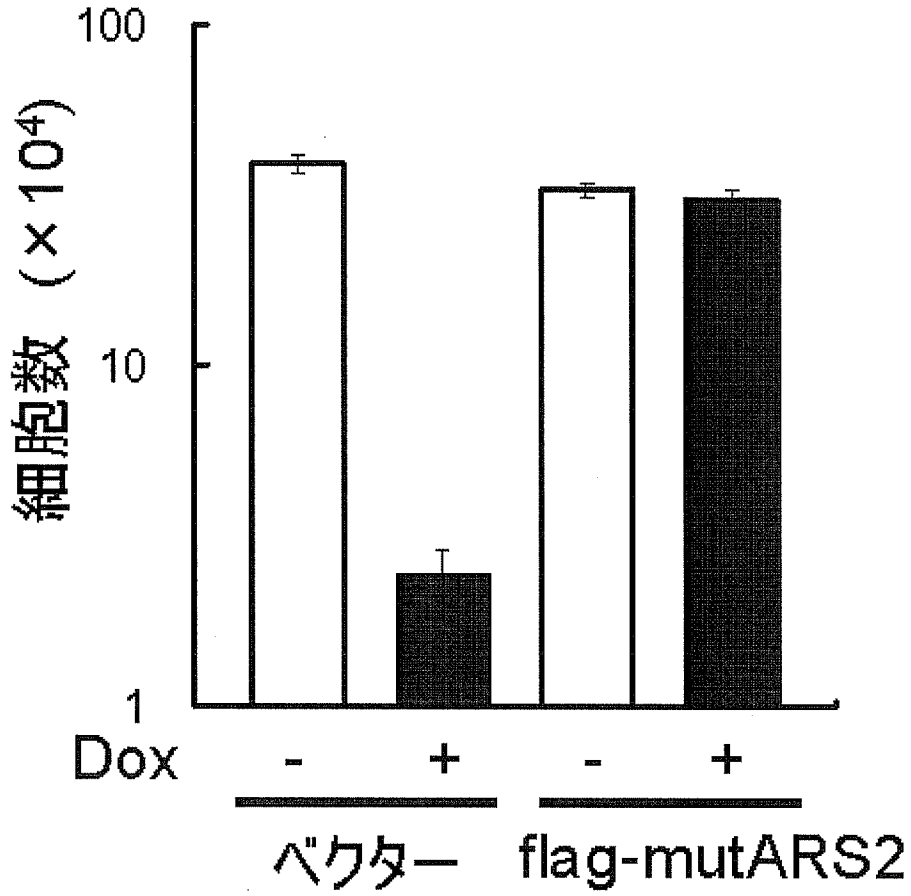
[図3B]


Dox
WB: ARS2
-
+
kDa
140
100
WB: Actin

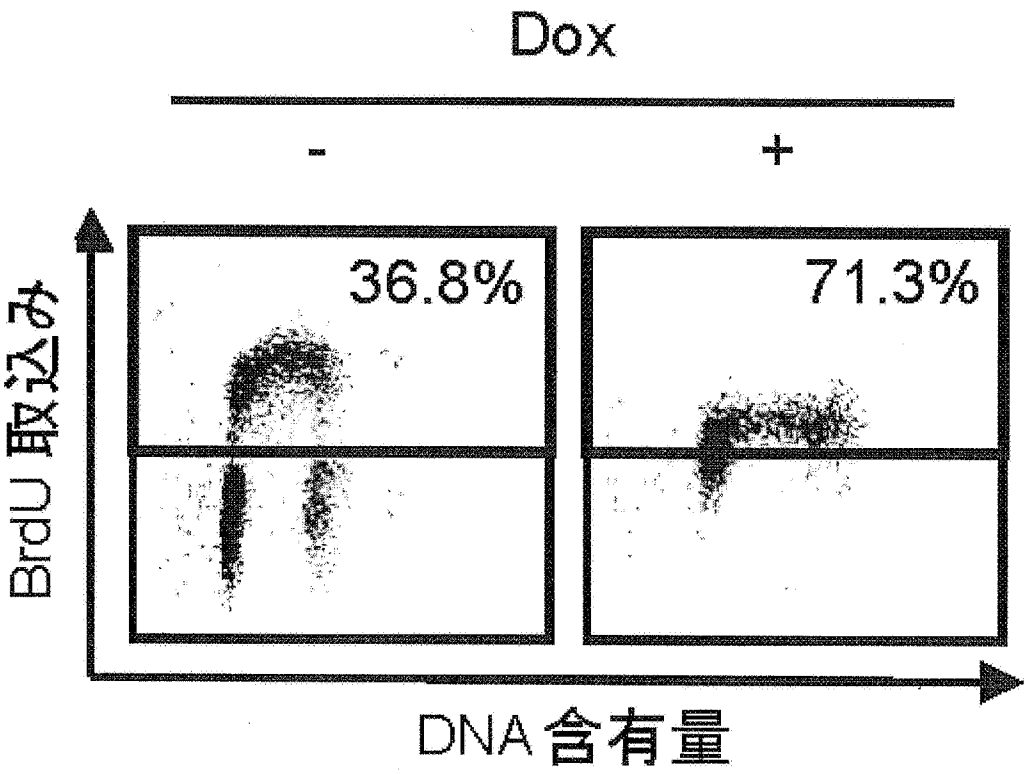
[図3C]


10000
1000
100
10
1
細胞数（×10⁴）
-- shlacZ
— shARS2
Dox-
Dox+
3
6
10
（日数）

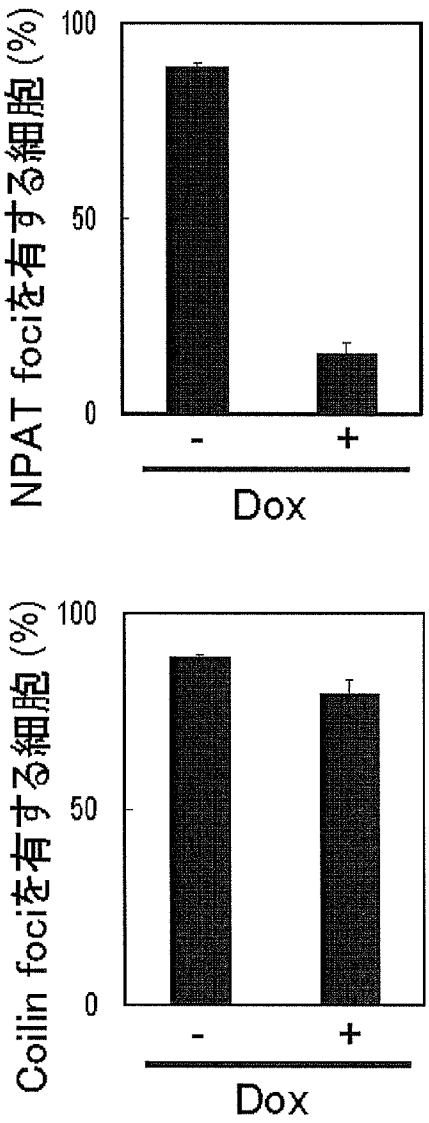
[図3D]


100
10
1
細胞数（×10⁴）
Dox
-
+
-
+
ベクター
flag-mutARS2

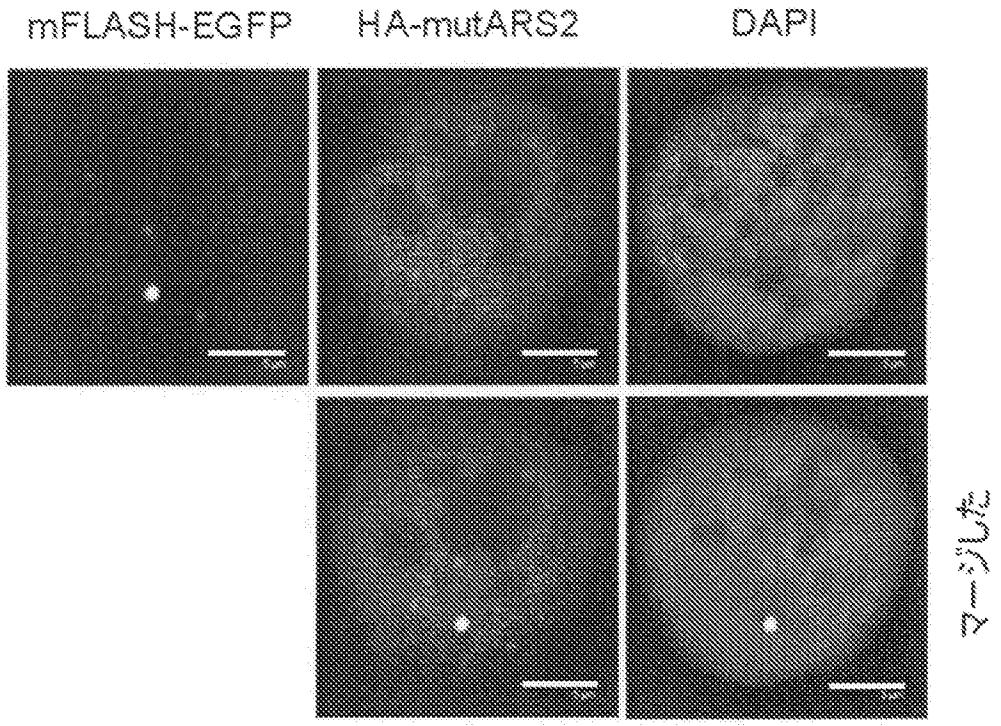
[図3E]



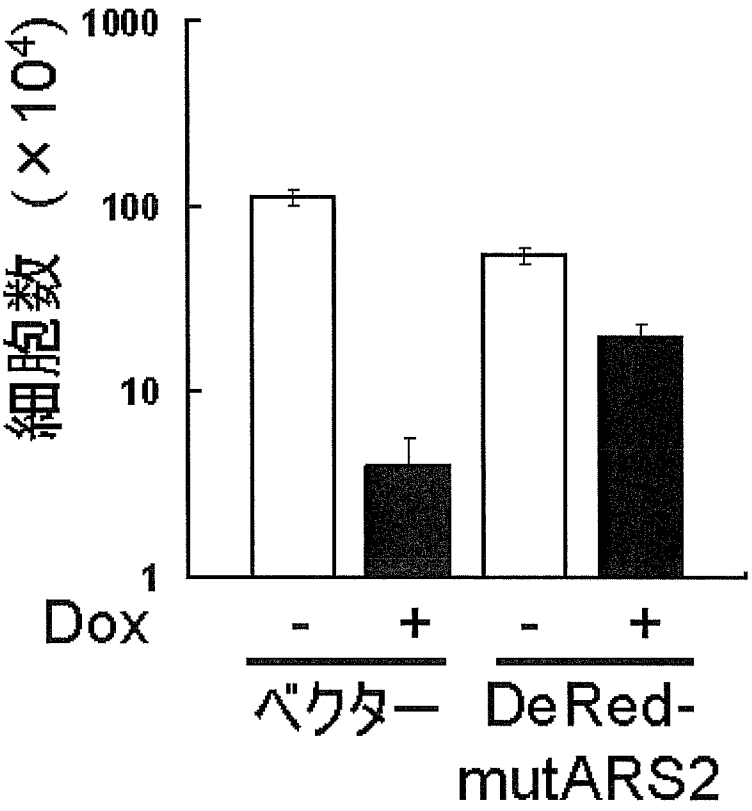
[図3F]



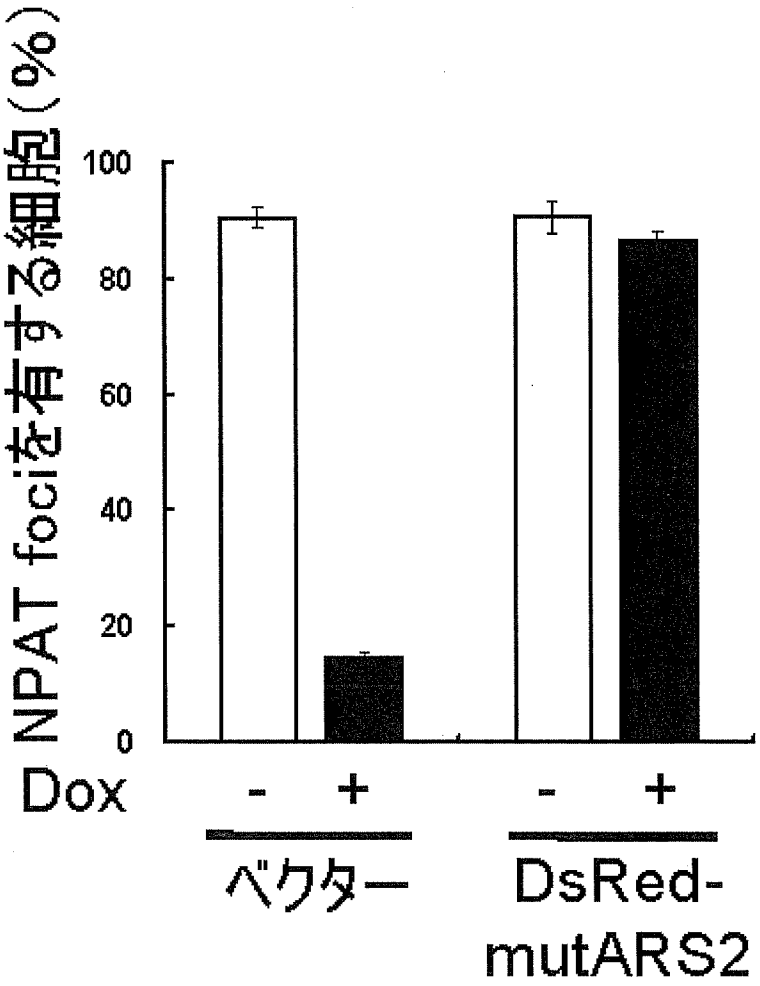
[図3G]


mFLASH-EGFP
HA-mutARS2
DAPI
マージした

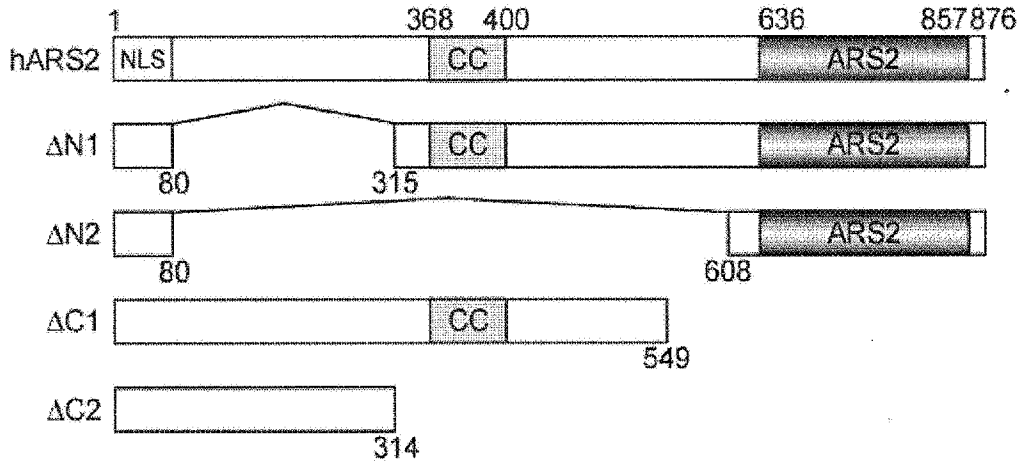
[図4A]


細胞数（×10⁴）
1000
100
10
1
Dox
-
+
-
+
ベクター
DeRed-mutARS2

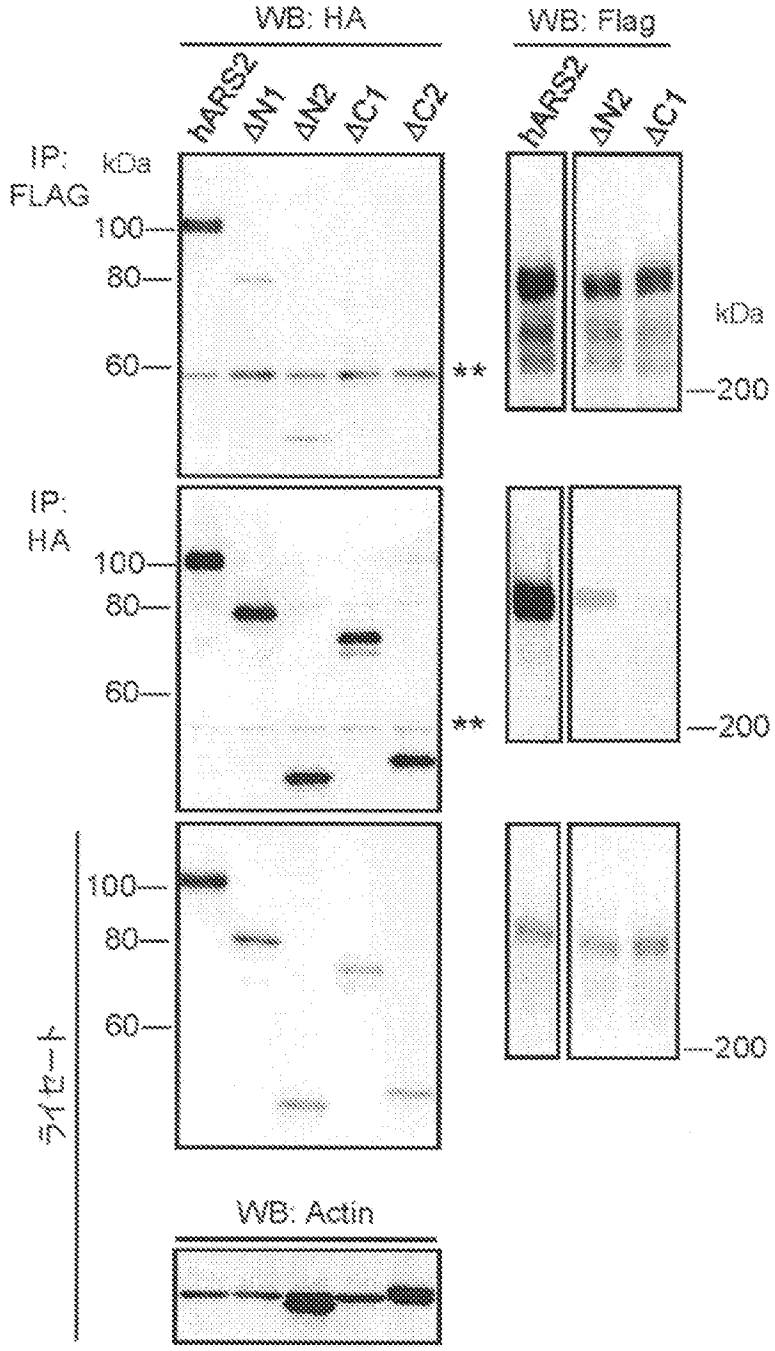
[図4B]


NPAT fociを有する細胞(%)
100
80
60
40
20
0
Dox
-
+
-
+
ベクター
DsRed-
mutARS2

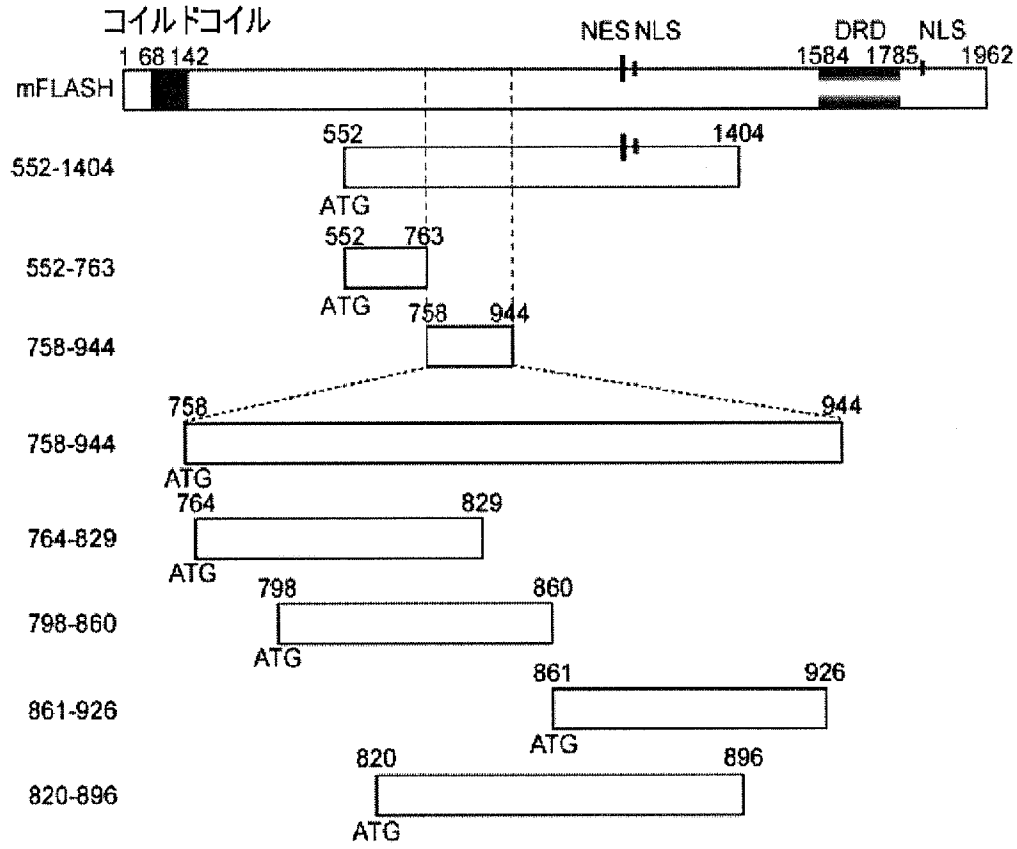
[図4C]


1
368
400
636
857876
hARS2
NLS
CC
ARS2
ΔN1
80
315
ΔN2
608
ΔC1
549
ΔC2
314

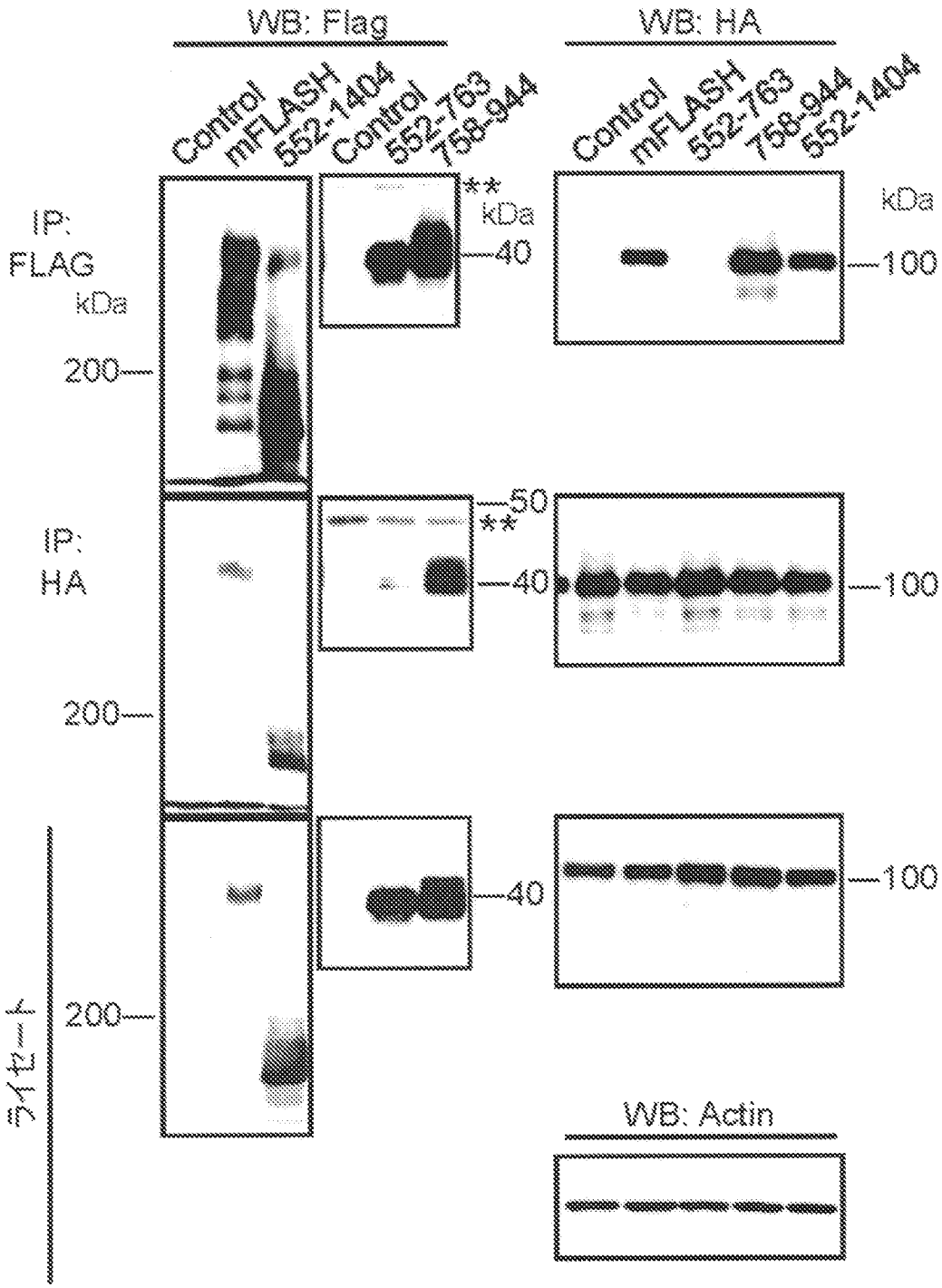
[図4D]


WB: HA
WB: Flag
hARS2
ΔN1
ΔN2
ΔC1
ΔC2
hARS2
ΔN2
ΔC1
IP: FLAG
kDa
100
80
60
**
kDa
200
IP: HA
100
80
60
**
200
インプット
100
80
60
200
WB: Actin

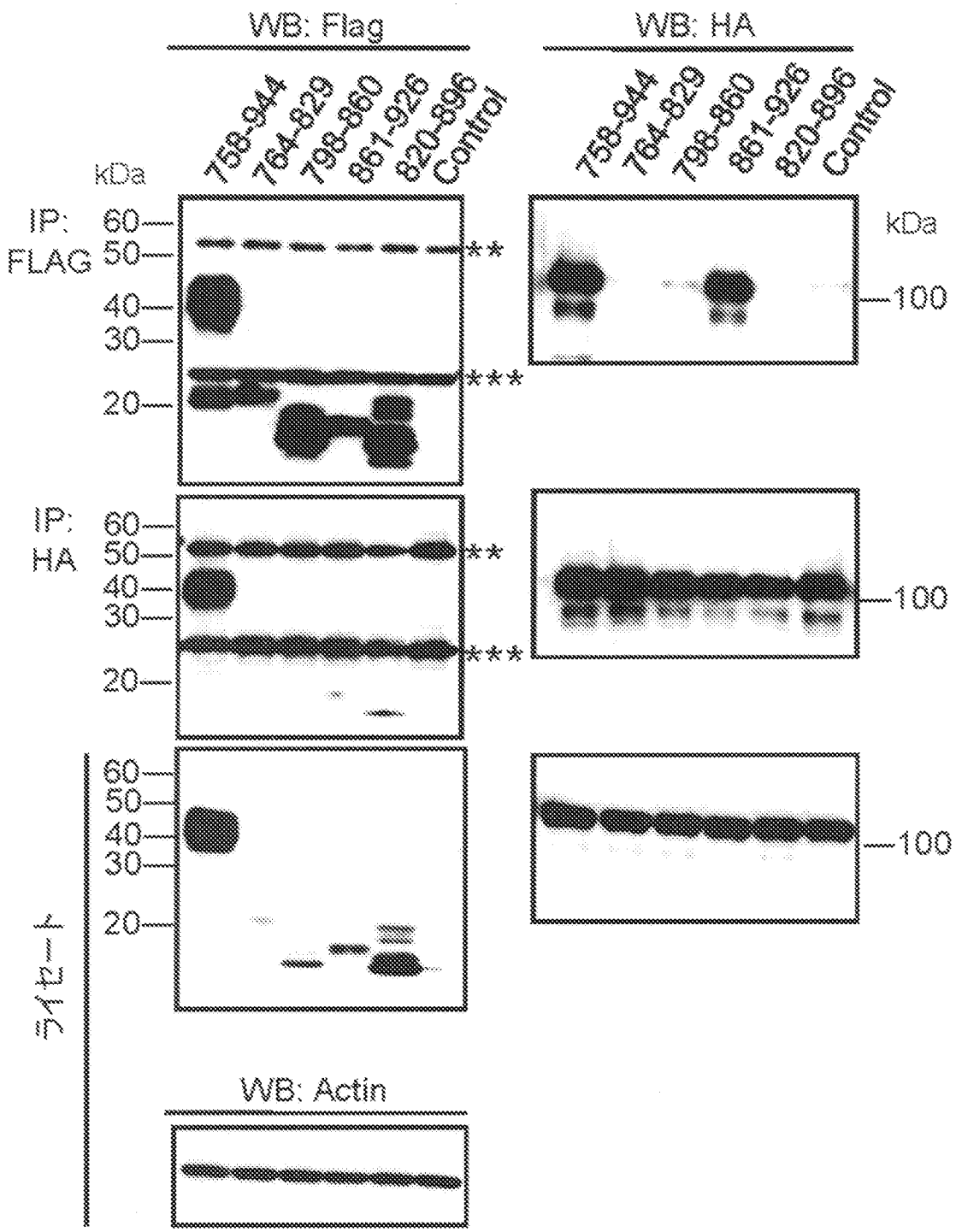
[図5A]


コイルドコイル
NES NLS
DRD
NLS
1 68 142
1584 1785
1962
mFLASH
552
1404
552-1404
ATG
552
763
552-763
ATG
758
944
758-944
758
944
758-944
ATG
764
829
764-829
ATG
798
860
798-860
ATG
861
926
861-926
ATG
820
896
820-896
ATG

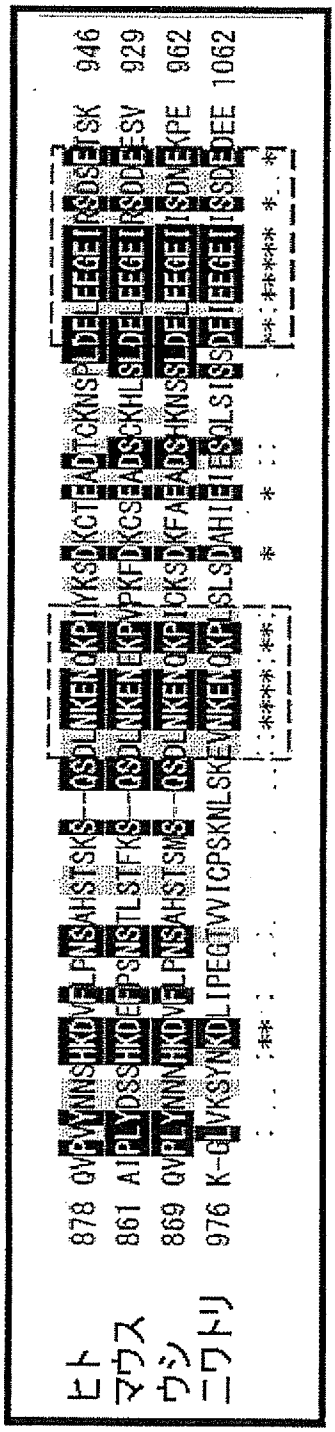
[図5B]


WB: Flag
WB: HA
Control
mFLASH
552-1404
Control
552-763
758-944
552-763
758-944
552-1404
IP:
FLAG
kDa
200
**
kDa
40
kDa
100
IP:
HA
200
50
**
40
100
200
40
100
ライセート
WB: Actin

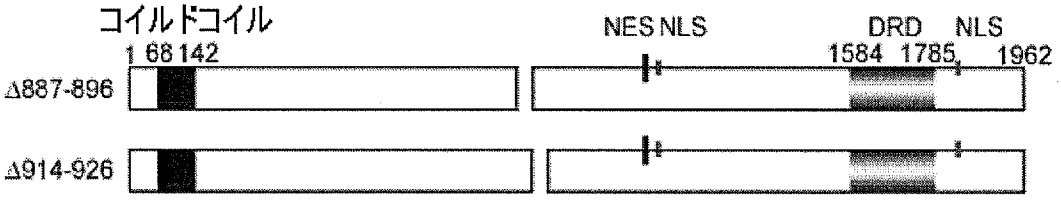
[図5C]


WB: Flag
WB: HA
758-944
764-829
798-860
861-926
820-896
Control
kDa
IP: FLAG
IP: HA
60
50
40
30
20
100
**
***
ライセート
WB: Actin

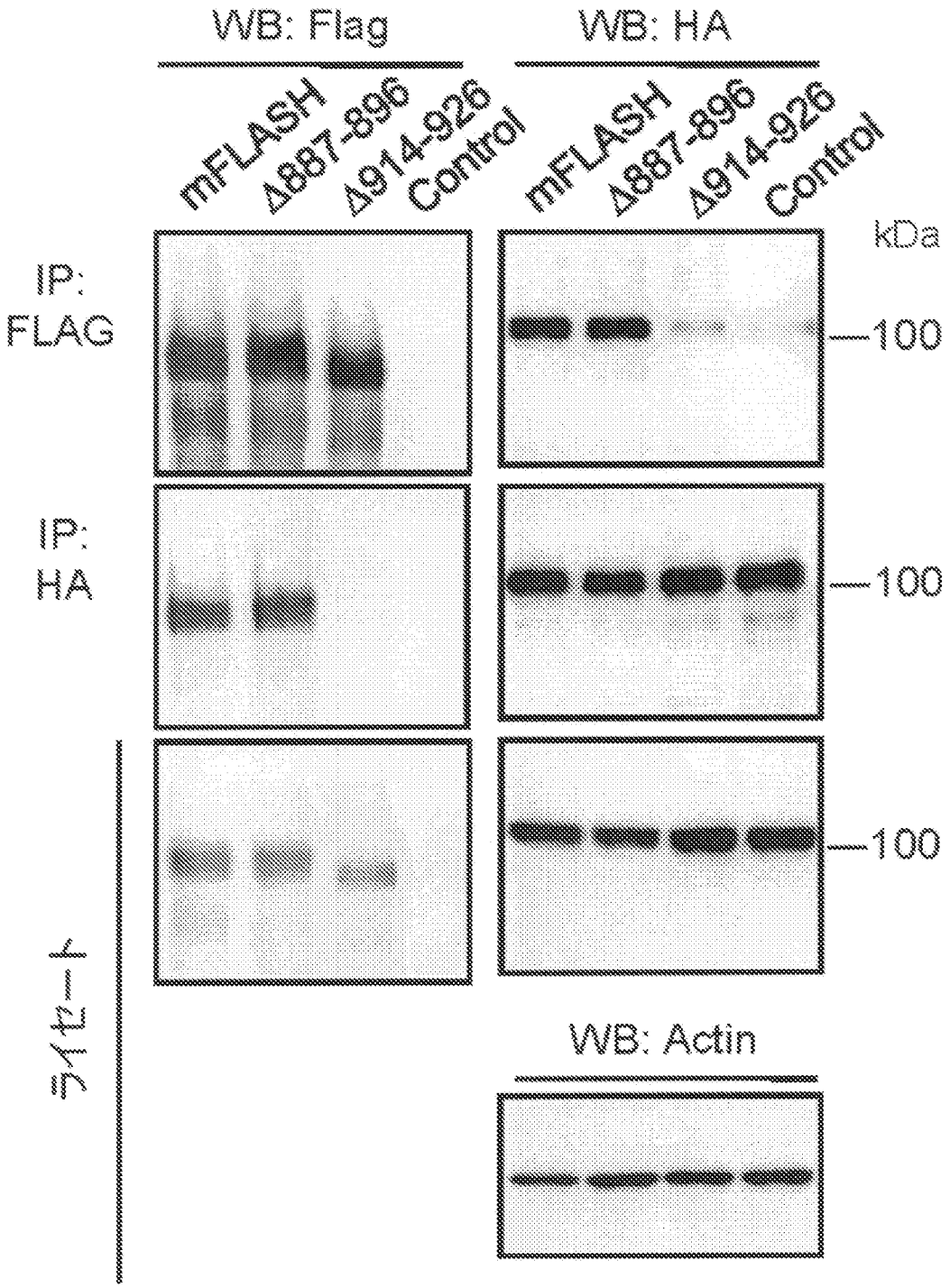
[図5D]


ヒト
マウス
ウシ
ニワトリ

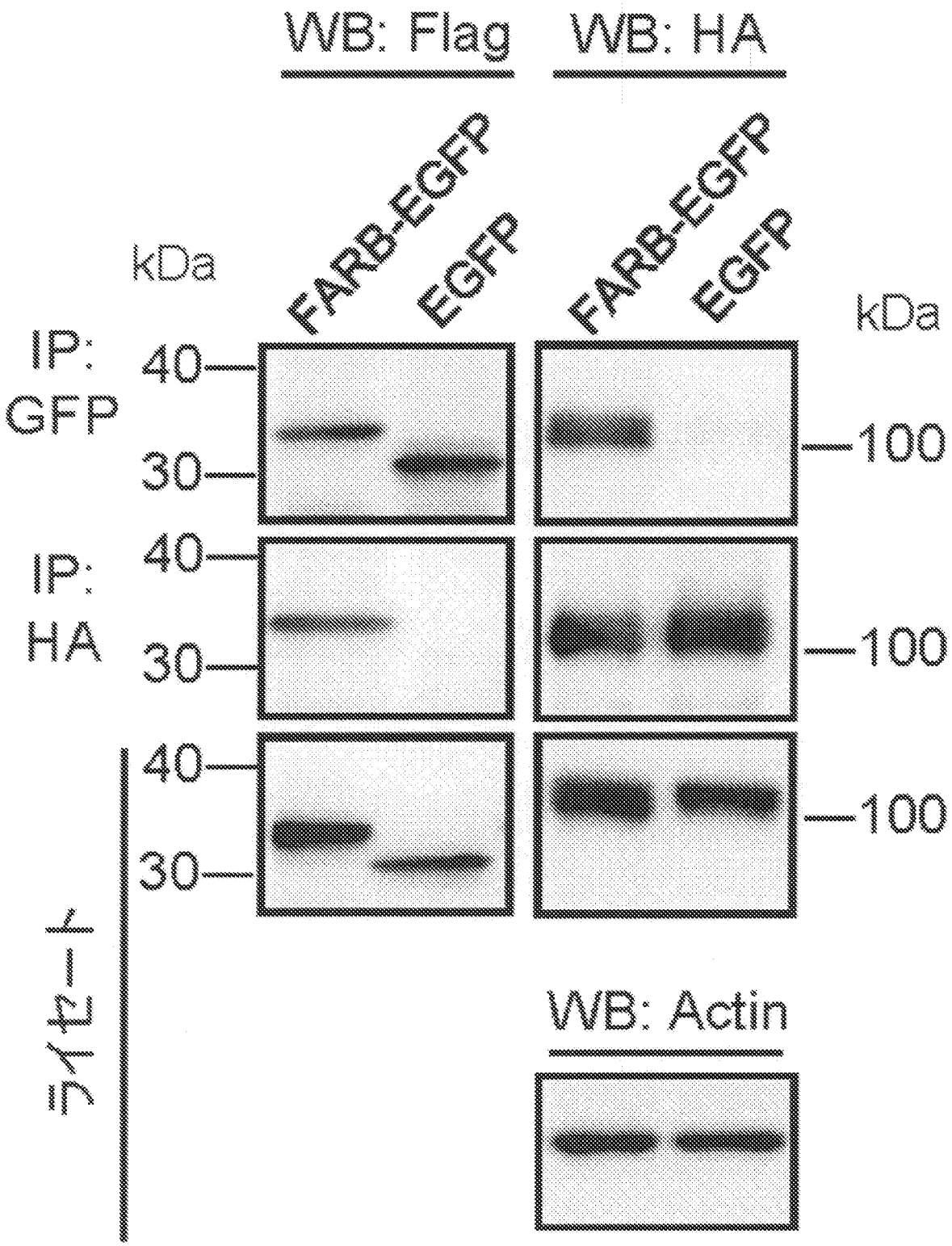
[図6A]


コイルドコイル
1 68 142
NES NLS
DRD
1584 1785
NLS
1962
Δ887-896
Δ914-926

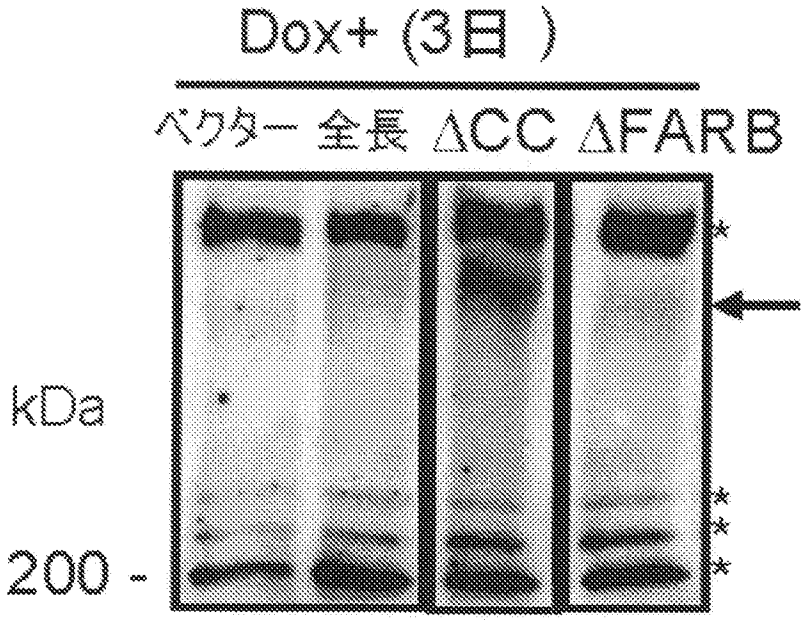
[図6B]


WB: Flag
WB: HA
mFLASH
Δ887-896
Δ914-926
Control
kDa
IP: FLAG
IP: HA
100
WB: Actin
ライセート

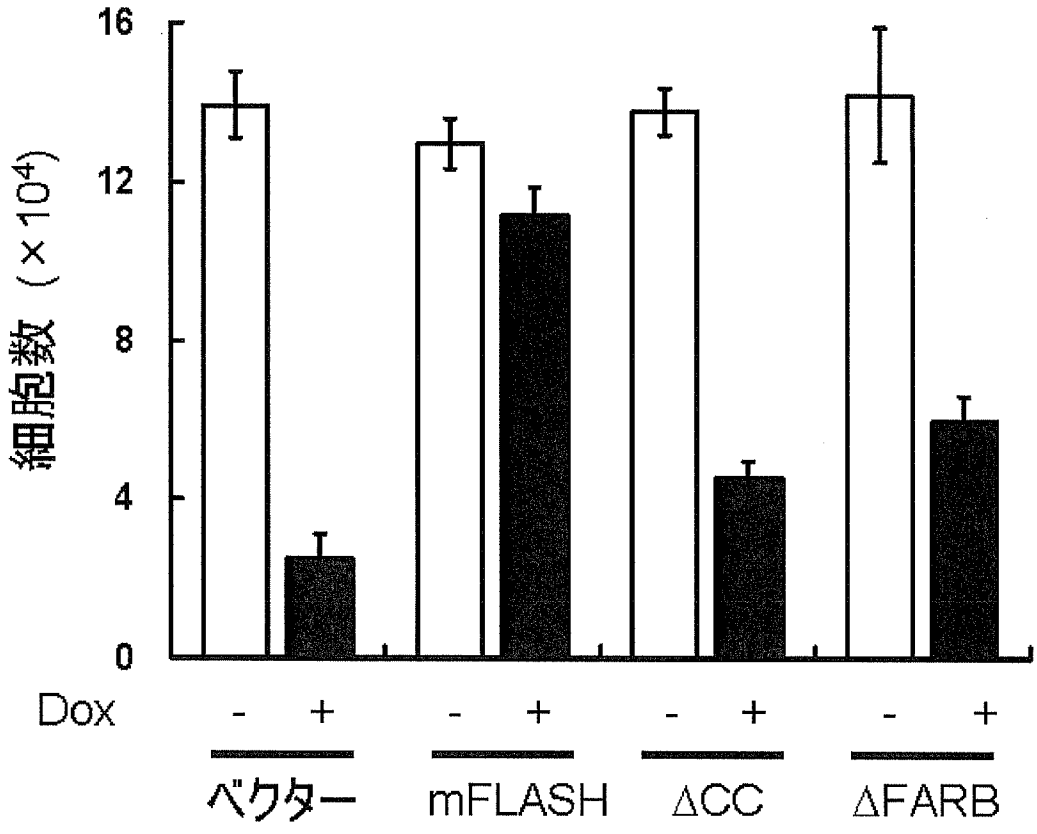
[図6C]


WB: Flag
WB: HA
FARB-EGFP
EGFP
FARB-EGFP
EGFP
kDa
kDa
IP: GFP
IP: HA
40
30
40
30
40
30
100
100
100
WB: Actin
ライセート

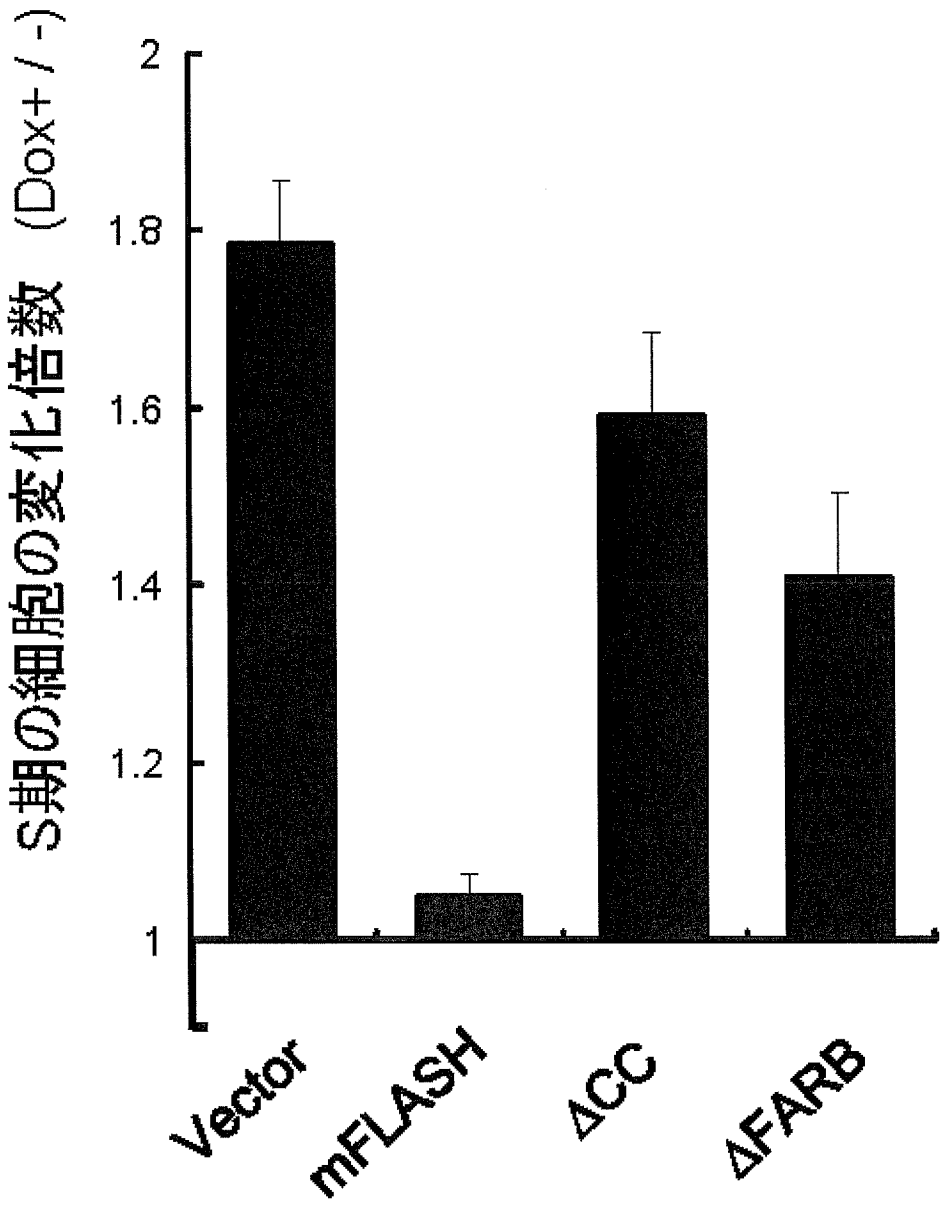
[図6D]


Dox+ (3日)
ベクター 全長 ΔCC ΔFARB
kDa
200 -

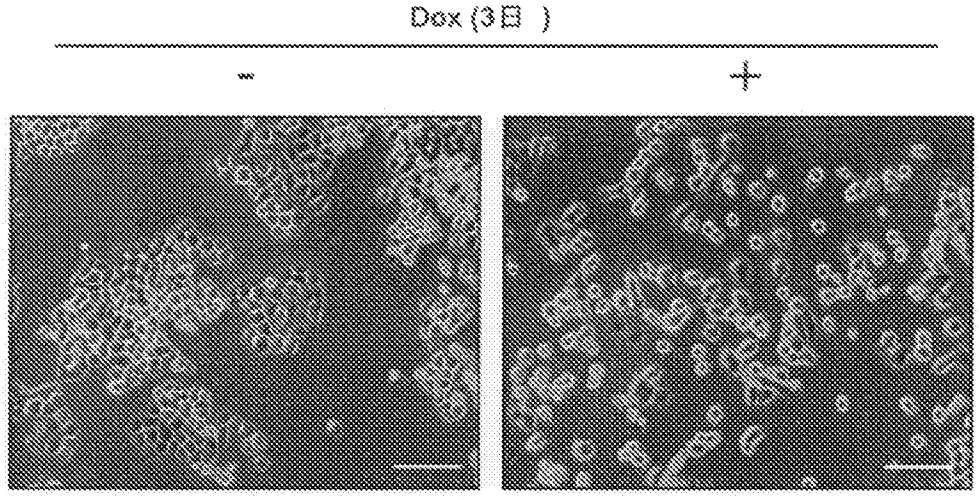
[図6E]


16
12
8
4
0
細胞数 (×10⁴)
Dox
- + - + - + - +
ベクター
mFLASH
ΔCC
ΔFARB

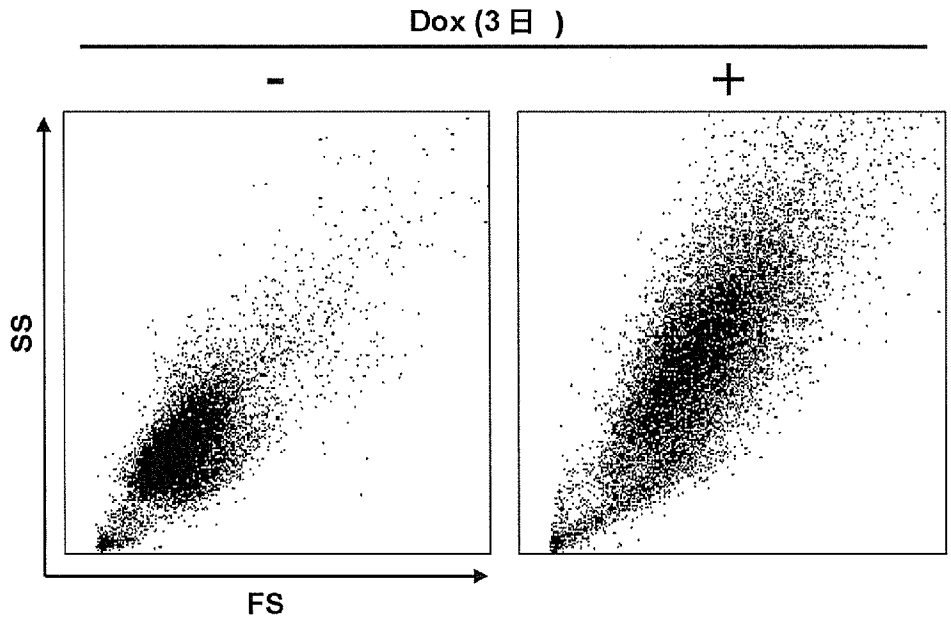
[図6F]



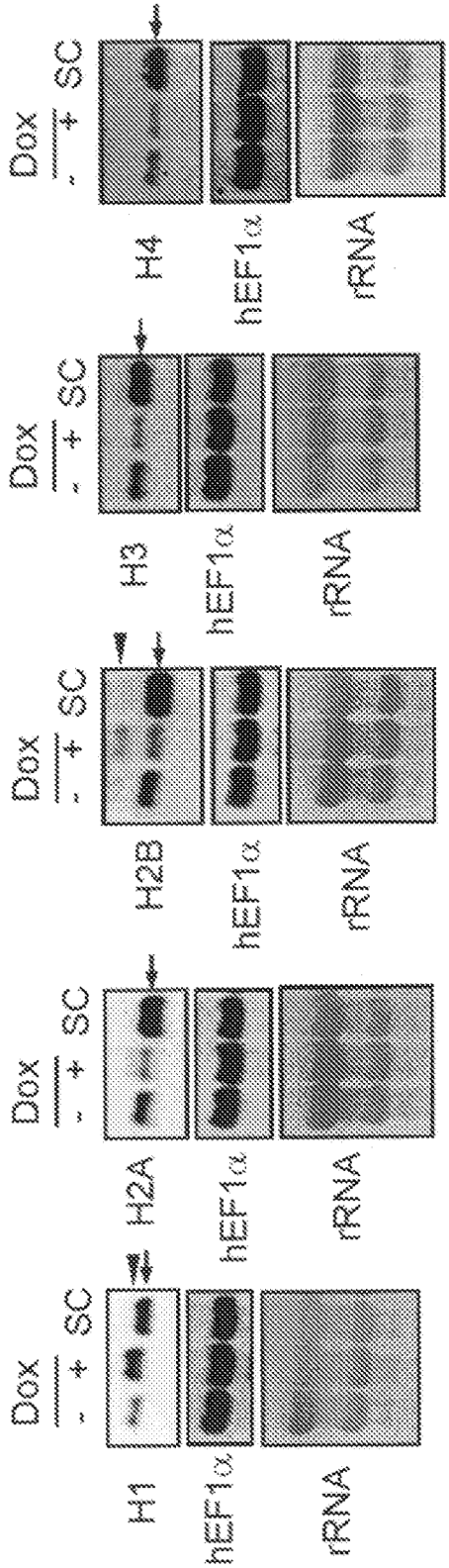
[図7A]



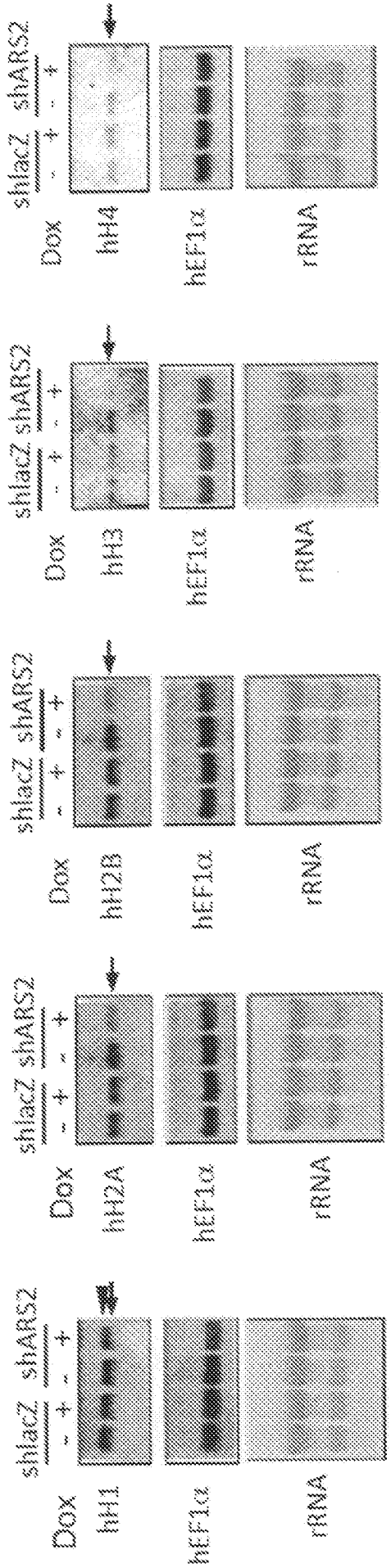
[図7B]



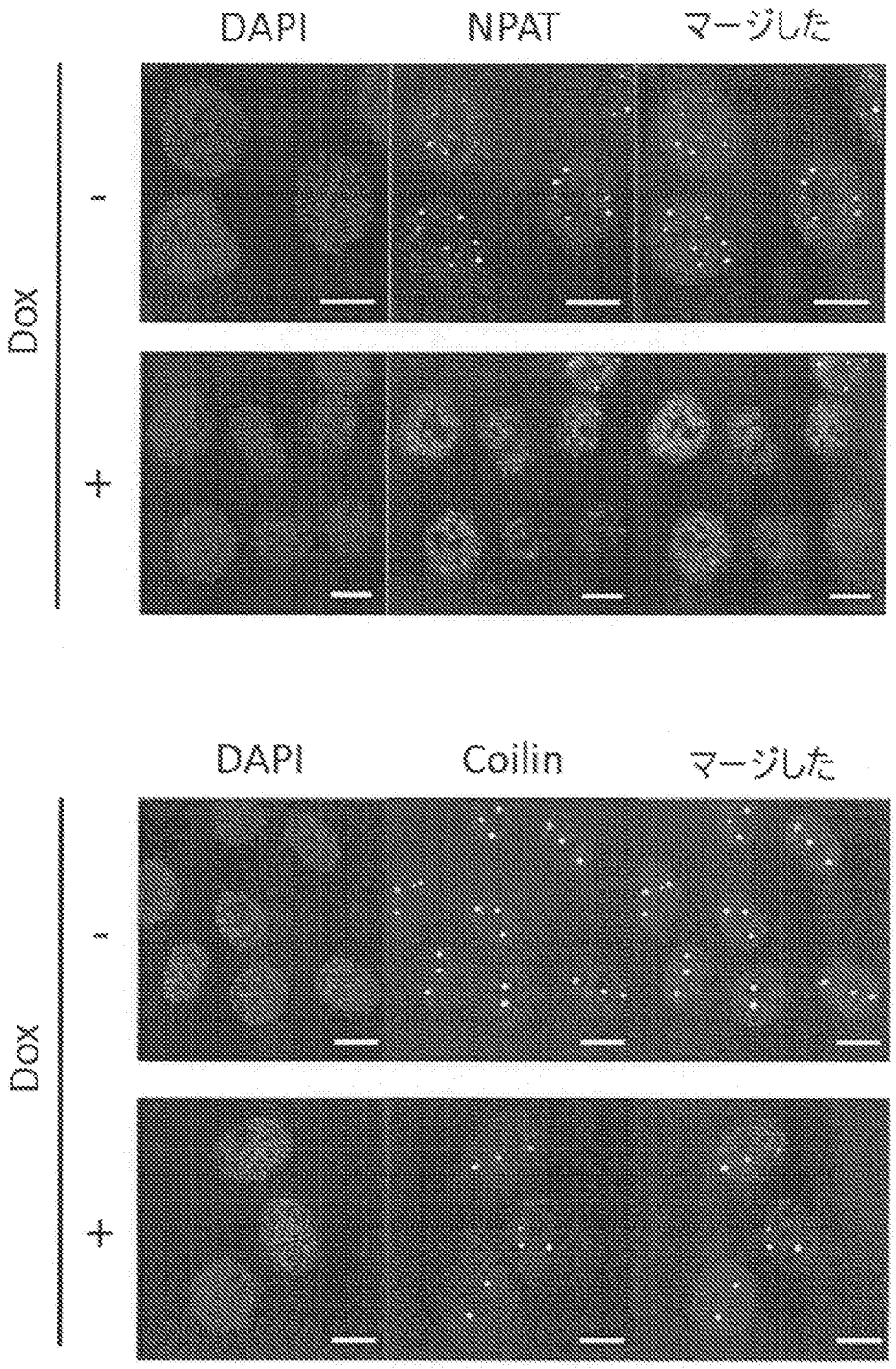
[図7C]


Dox
-
+
SC
H4
hEF1α
rRNA
H3
hEF1α
rRNA
H2B
hEF1α
rRNA
H2A
hEF1α
rRNA
H1
hEF1α
rRNA

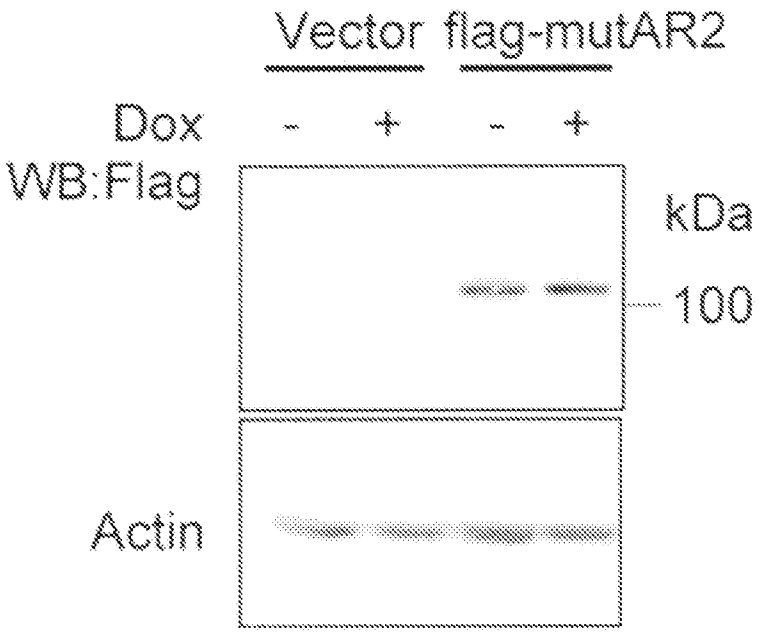
[図8A]


shlacZ shARS2
Dox - + - +
hH1
hEF1α
rRNA
shlacZ shARS2
Dox - + - +
hH2A
hEF1α
rRNA
shlacZ shARS2
Dox - + - +
hH2B
hEF1α
rRNA
shlacZ shARS2
Dox - + - +
hH3
hEF1α
rRNA
shlacZ shARS2
Dox - + - +
hH4
hEF1α
rRNA

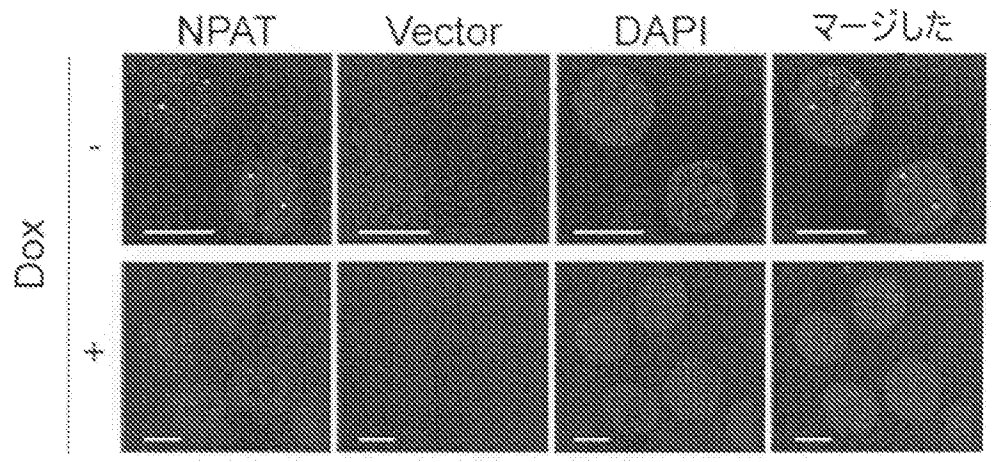
[図8B]

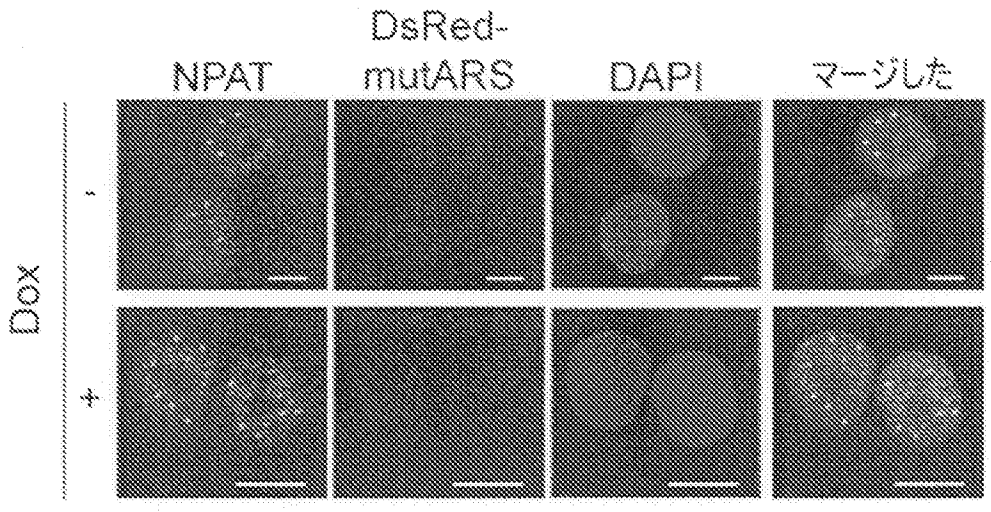


[図9A]

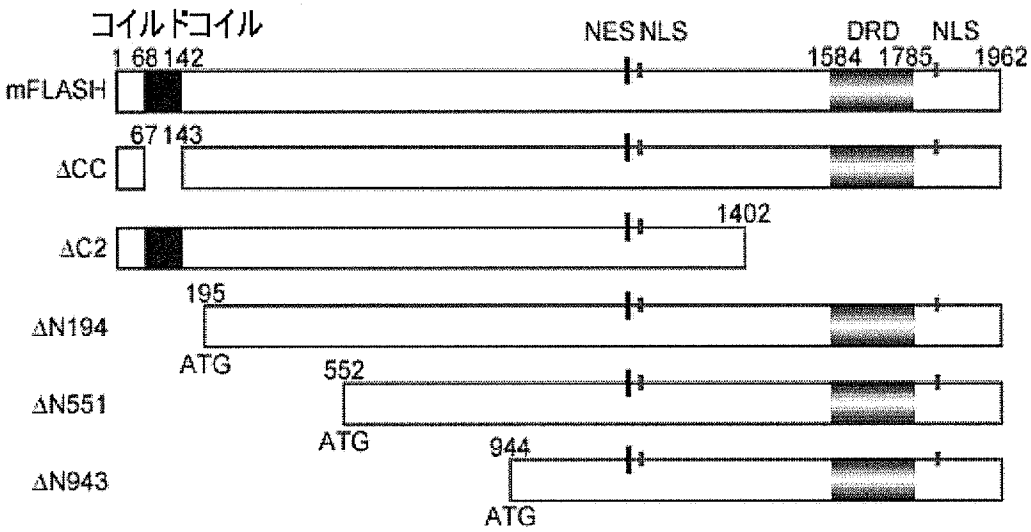

Vector flag-mutAR2
Dox
- + - +
WB:Flag
kDa
100
Actin

[図9B]

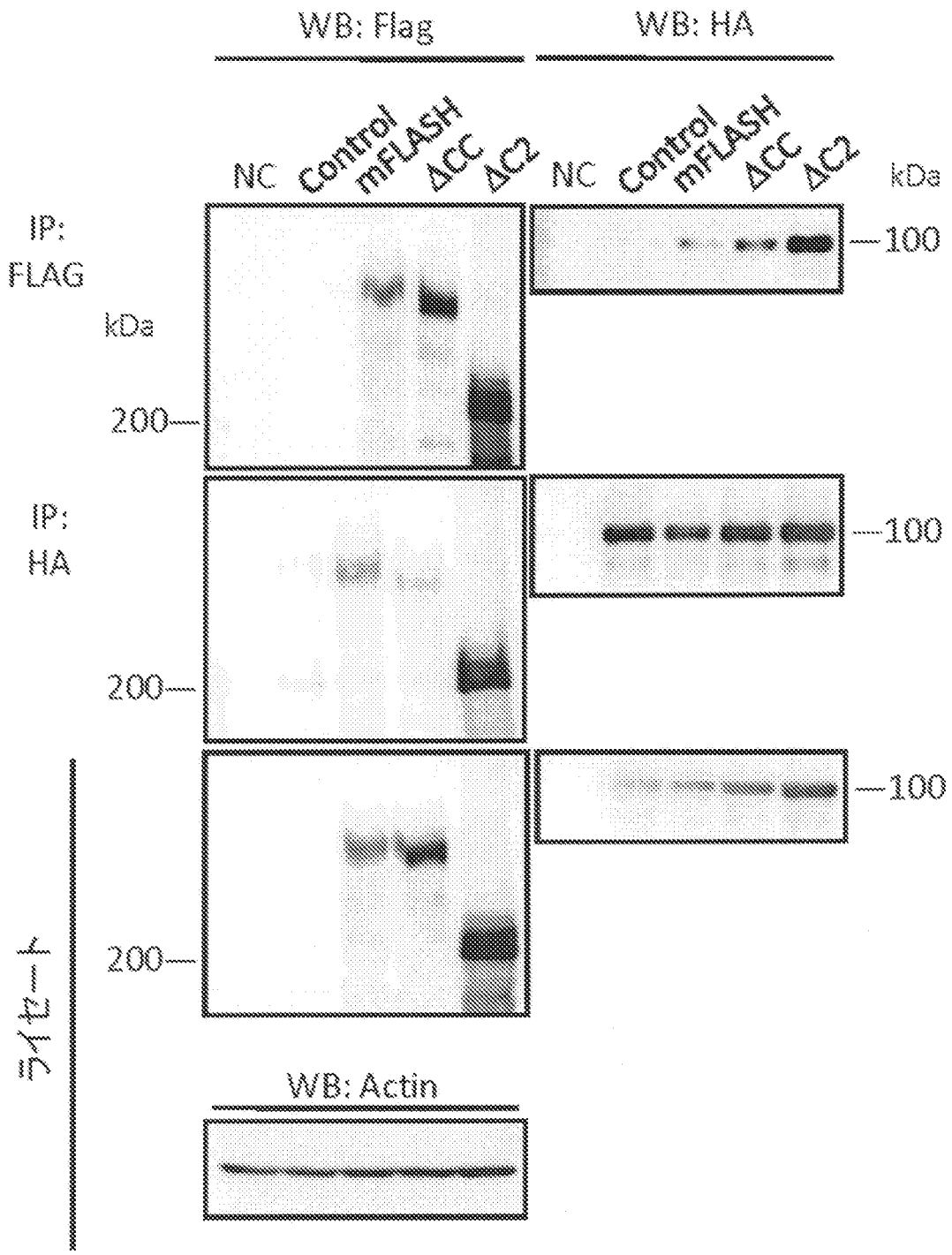

NPAT
Vector
DAPI
マージした
Dox
-
+


NPAT
DsRed-mutARS
DAPI
マージした
Dox
-
+

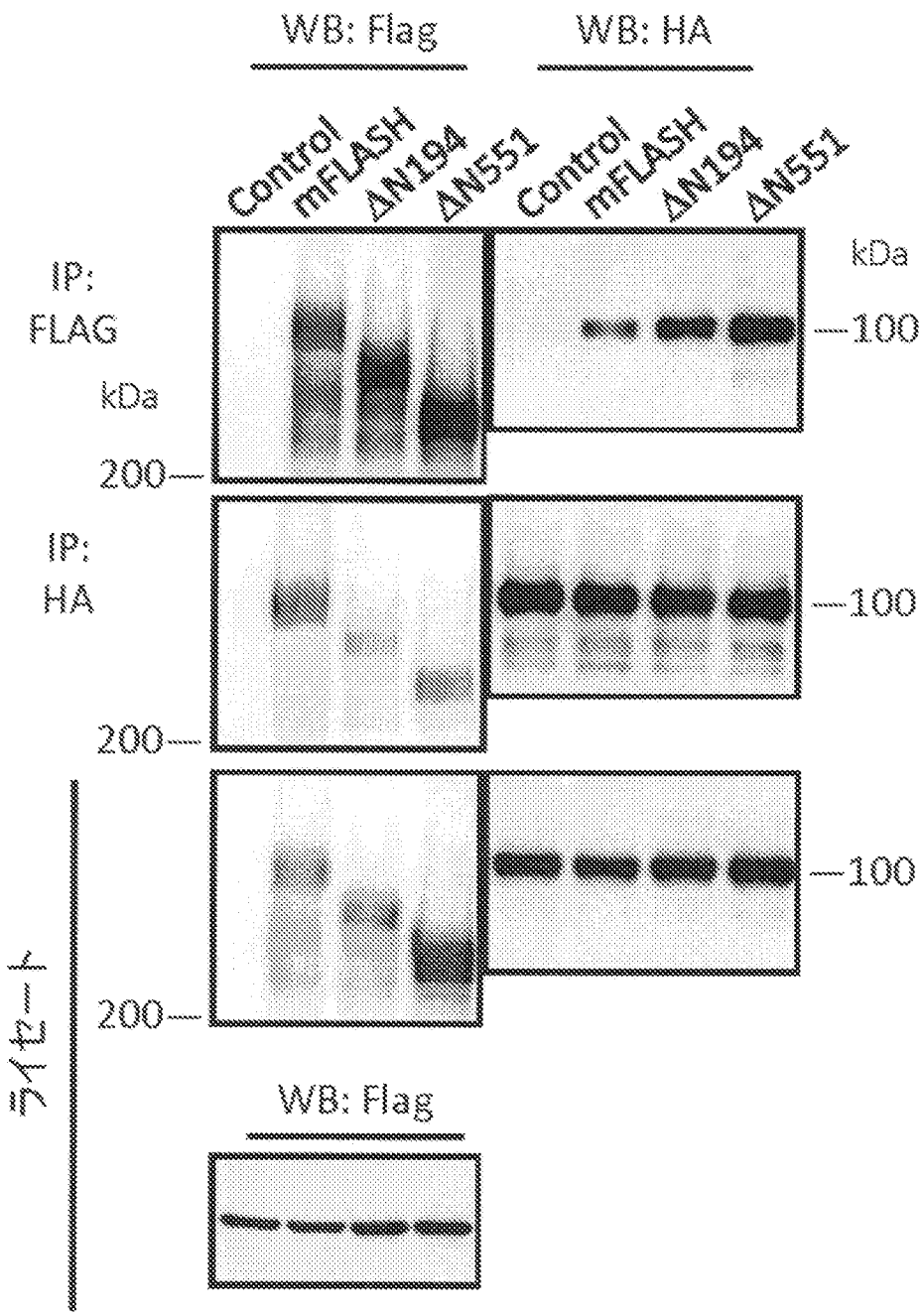
[図10A]


コイルドコイル
NES NLS
DRD
NLS
1 68 142
1584 1785
1962
mFLASH
67 143
ΔCC
1402
ΔC2
195
ΔN194
ATG
552
ΔN551
ATG
944
ΔN943
ATG

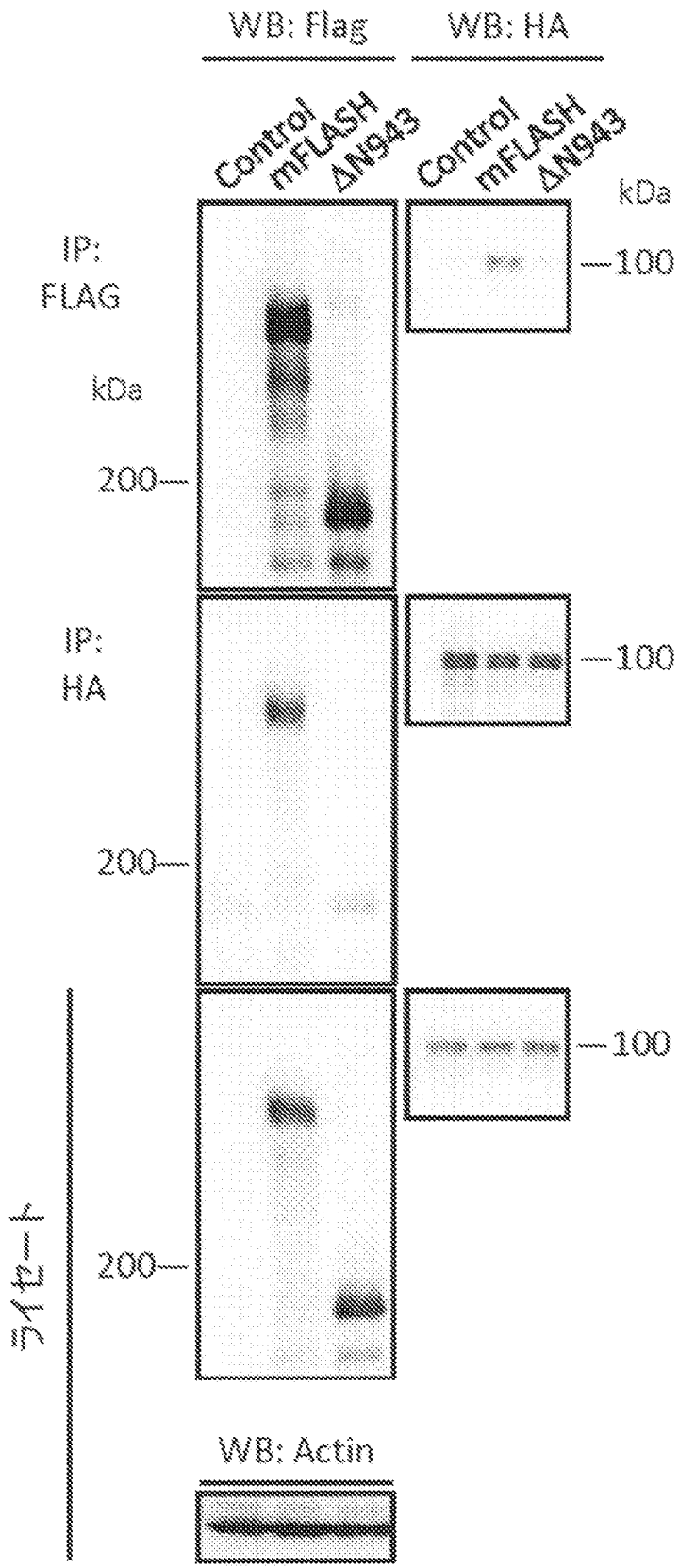
[図10B]


WB: Flag
WB: HA
NC
control
mFLASH
ΔCC
ΔC2
NC
control
mFLASH
ΔCC
ΔC2
kDa
IP:
FLAG
kDa
200
100
IP:
HA
200
100
200
100
ライセート
WB: Actin

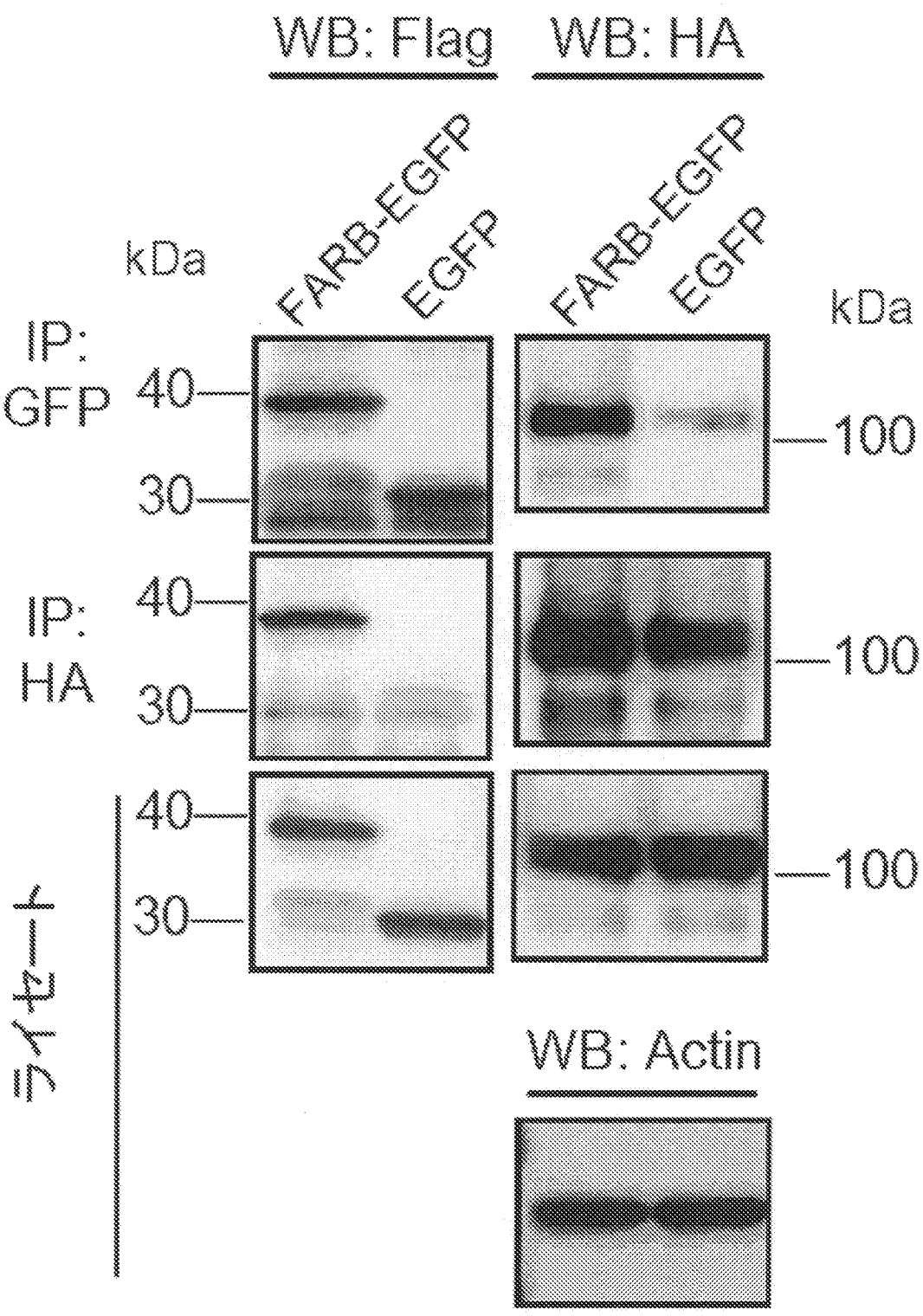
[図10C]


WB: Flag
WB: HA
Control
mFLASH
ΔN194
ΔN551
Control
mFLASH
ΔN194
ΔN551
kDa
IP:
FLAG
kDa
200
100
IP:
HA
200
100
200
100
インプット
WB: Flag

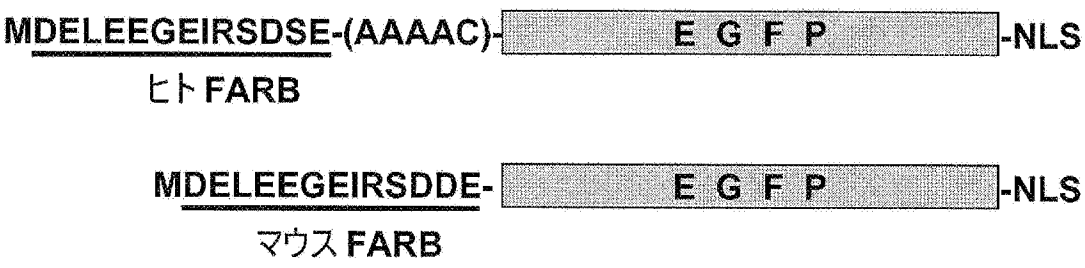
[図10D]


WB: Flag
WB: HA
Control
mFLASH
ΔN943
Control
mFLASH
ΔN943
kDa
IP:
FLAG
kDa
200
100
IP:
HA
200
100
200
100
ライセート
WB: Actin

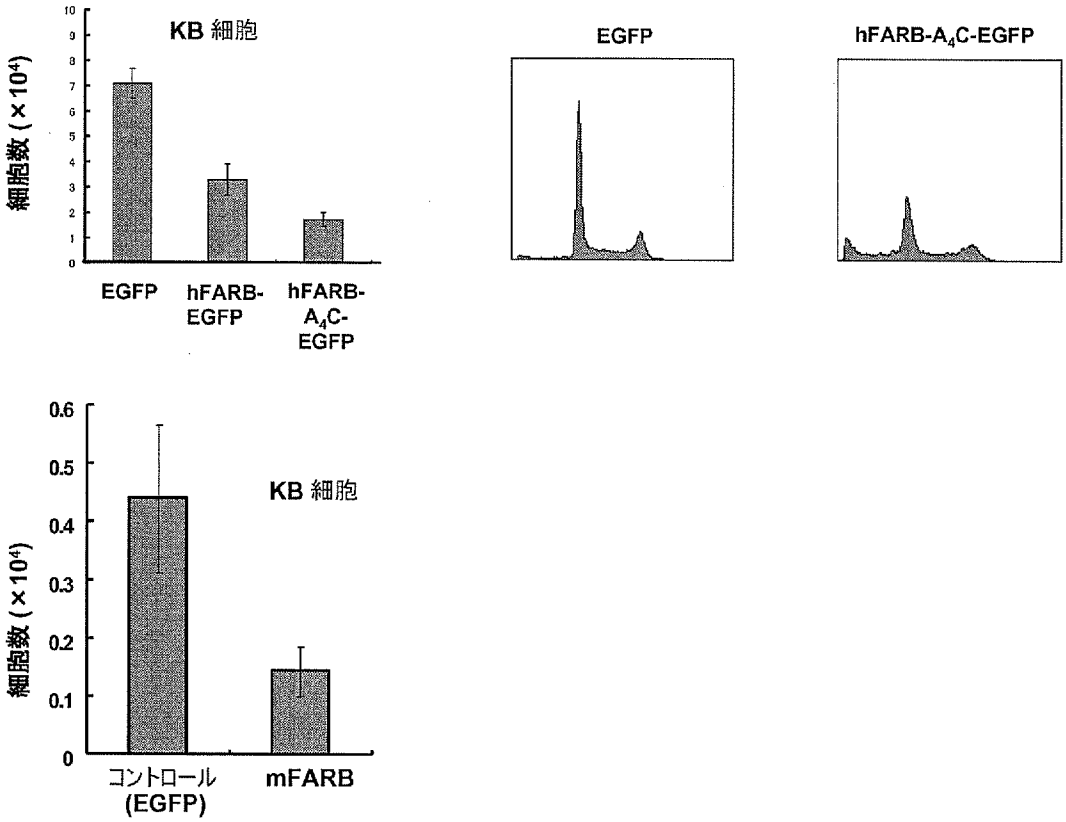
[図11]


WB: Flag
WB: HA
FARB-EGFP
EGFP
FARB-EGFP
EGFP
kDa
kDa
IP: GFP
IP: HA
40
30
100
インプット
WB: Actin

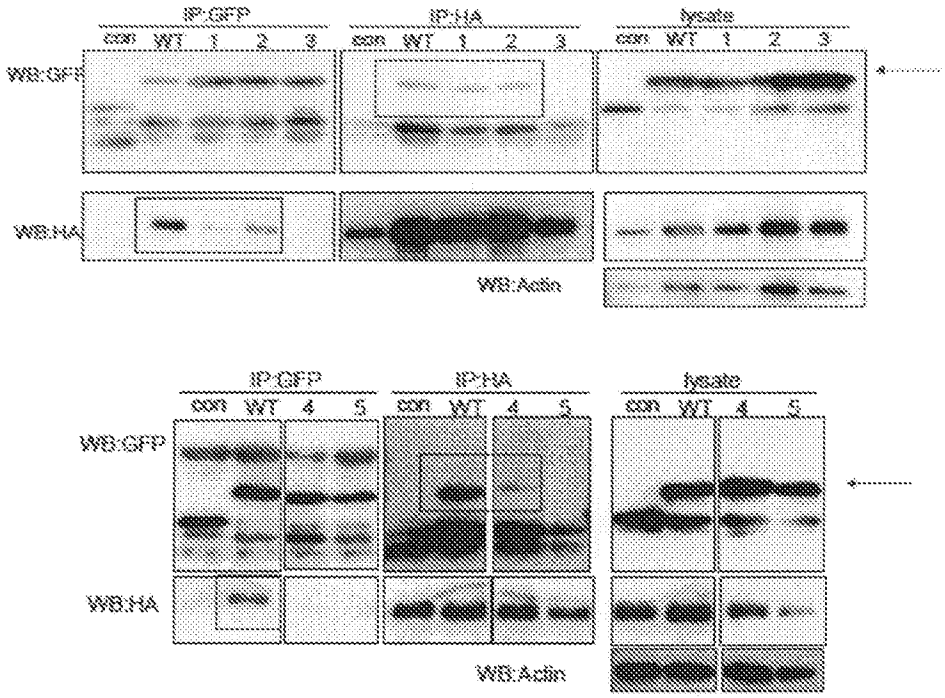
[図12]


MDELEEGEIRSDSE-(AAAAC)-
E G F P
-NLS
ヒトFARB
MDELEEGEIRSDDE-
E G F P
-NLS
マウスFARB

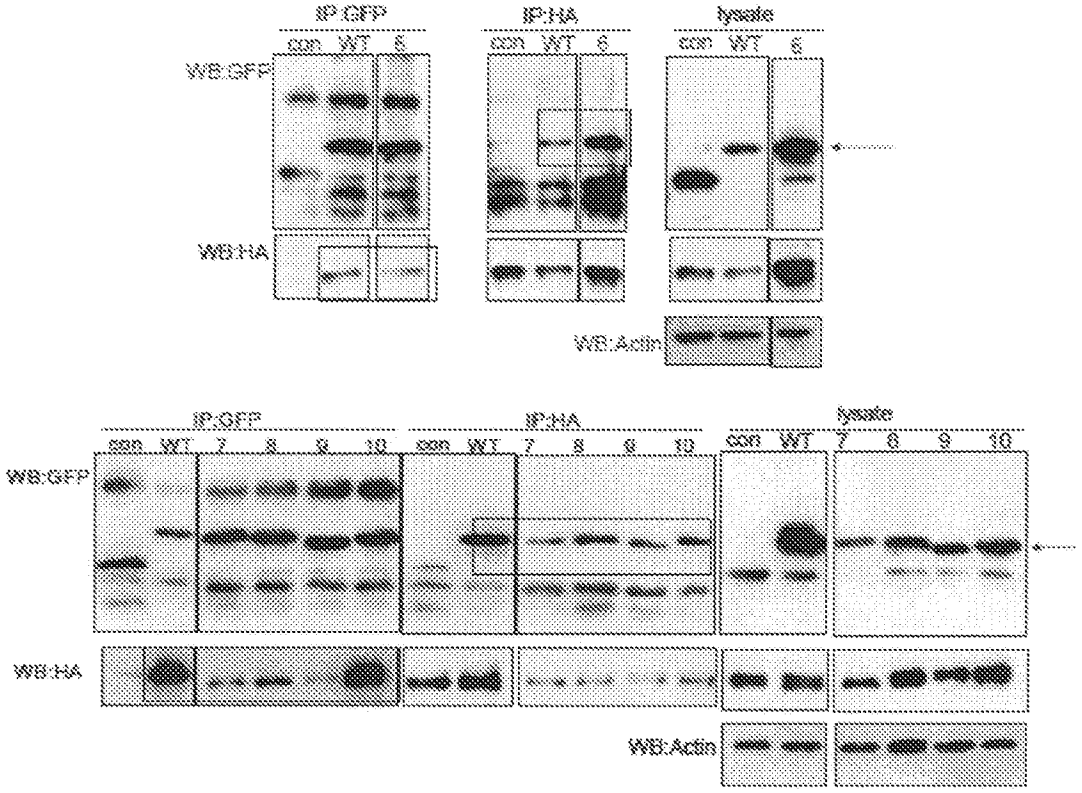
[図13]


KB 細胞
細胞数 (×10⁴)
EGFP
hFARB-EGFP
hFARB-A4C-EGFP
EGFP
hFARB-A4C-EGFP
KB 細胞
細胞数 (×10⁴)
コントロール (EGFP)
mFARB

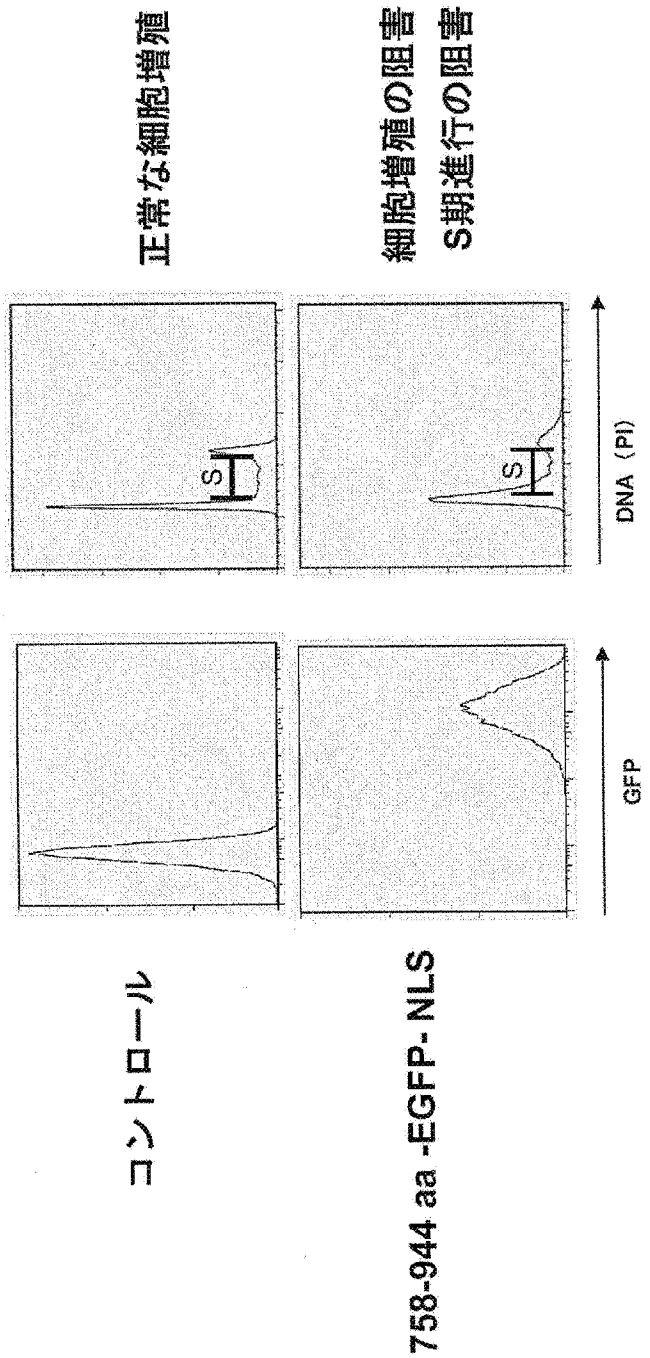
[図14A]


IP:GFP
IP:HA
lysate
con WT 1 2 3
WB:GFP
WB:HA
WB:Actin
IP:GFP
IP:HA
lysate
con WT 4 5
WB:GFP
WB:HA
WB:Actin

[図14B]


IP:GFP
IP:HA
lysate
con WT 6
WB:GFP
WB:HA
WB:Actin
IP:GFP
IP:HA
lysate
con WT 7 8 9 10
WB:GFP
WB:HA
WB:Actin

[図15]


正常な細胞増殖
細胞増殖の阻害
S期進行の阻害
S
S
DNA（PI）
GFP
コントロール
758-944 aa -EGFP- NLS

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/053665

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
See extra sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, A61K31/7088, A61K31/7105, A61K38/00, A61K48/00, A61P35/00, A61P37/00, A61P43/00, C07K14/47, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), UniProt/GeneSeq, PubMed, WPI, GeneCards

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	KIRIYAMA, M. et al., "Interaction of FLASH with arsenite resistance protein 2 is involved in cell cycle progression at S phase.", MOL. CELL. BIOL., 2009.09, Vol.29, No.17, P.4729-4741	1-5,7-13,17, 19,23
X,P	Maria KIRIYAMA et al., "Saibo Shuki S-ki no Shinko ni Hitsuyo na FLASH to ARS2(Arsenite Resistance Protein2) tono Kaigo", Dai 82 Kai The Japanese Biochemical Society Taikai Program ·Koen Yoshishu, 25 September 2009 (25.09.2009), abstract CD, 3T10A-4, (3P-483)	1-5,7-13,17, 19,23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 April, 2010 (26.04.10)	11 May, 2010 (11.05.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/053665

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BARCAROLI, D. et al., "FLASH is required for histone transcription and S-phase progression.", PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 2006.10.03, Vol.103, No.40, P.14808-14812	1-5,7-13,17, 19,23
A	"C8AP2_HUMAN.", [online], UniProtKB, 2009.03.03, AC: Q9UKL3, [retrieval date:Heisei 22 Nen 4 Gatsu 26 Nichi], <URL, http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UKL3.txt?version=45>	1-5,7-13,17, 19,23
A	WILSON, M.D. et al., "ARS2 is a conserved eukaryotic gene essential for early mammalian development.", MOL. CELL. BIOL., 2008.03, Vol.28, No.5, P.1503-1514	1-5,7-13,17, 19,23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/053665

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N15/09(2006.01)i, *A61K31/7088*(2006.01)i, *A61K31/7105*(2006.01)i, *A61K38/00*(2006.01)i, *A61K48/00*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *A61P37/00*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *C07K14/47*(2006.01)i, *C07K19/00*(2006.01)i, *C12N1/15*(2006.01)i, *C12N1/19*(2006.01)i, *C12N1/21*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *G01N33/15*(2006.01)i, *G01N33/50*(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/053665

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 15-16, 21-22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The methods described in claims 15-16 and 21-22 appear to include "a therapeutic method for the human body". Namely, the inventions according to these claims pertain to "a method for treatment or diagnosis of the human
(continued to extra sheet)

2. [X] Claims Nos.: 6, 14, 18, 20
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The material "siRNA or an antisense nucleic acid capable of inhibiting the expression of ARS2 specifically " recited in claims 6, 14, 18 and 20 is defined only by a function desired for the material, and the structure of the material
(continued to extra sheet)

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

body by surgery or therapy". Thus, the inventions of these claims relate to a subject matter which this international searching authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

is not specified. Therefore, persons skilled in the art cannot conceive the identity of the matter specifically. Similar comments apply to the material "an expression vector capable of expressing the polynucleotide".

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０５３６６５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　特別ページ参照

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09, A61K31/7088, A61K31/7105, A61K38/00, A61K48/00, A61P35/00, A61P37/00, A61P43/00, C07K14/47, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１０年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), UniProt/GeneSeq, PubMed, WPI, GeneCards

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X, P	KIRIYAMA, M. et al., "Interaction of FLASH with arsenite resistance protein 2 is involved in cell cycle progression at S phase.", MOL. CELL. BIOL., 2009.09, Vol.29, No.17, P.4729-4741	1-5,7-13,17,19,23
X, P	桐山真利亜、他４名，「細胞周期Ｓ期の進行に必要なＦＬＡＳＨとＡＲＳ２(Arsenite Resistance Protein2)との会合」，第８２回日本生化学会大会　プログラム・講演要旨集，2009.09.25，抄録CD，3T10A-4，(3P-483)	1-5,7-13,17,19,23

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ２６．０４．２０１０	国際調査報告の発送日 １１．０５．２０１０
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　４１５５ 野村　英雄 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	BARCAROLI, D. et al., "FLASH is required for histone transcription and S-phase progression.", PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 2006.10.03, Vol.103, No.40, P.14808-14812	1-5,7-13,17,19,23
A	"C8AP2_HUMAN.", [online], UniProtKB, 2009.03.03, AC: Q9UKL3, [検索日:平成22年4月26日], <URL, http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UKL3.txt?version=45>	1-5,7-13,17,19,23
A	WILSON, M.D. et al., "ARS2 is a conserved eukaryotic gene essential for early mammalian development.", MOL. CELL. BIOL., 2008.03, Vol.28, No.5, P.1503-1514	1-5,7-13,17,19,23

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０５３６６５

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求項　15-16, 21-22　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項１５－１６、２１－２２に記載の方法は、「ヒトに対する治療方法」を含むと認められる。すなわち、上記請求項に係る発明は、「人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法」に該当するから、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

２．☑ 請求項　6, 14, 18, 20　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求項６、１４、１８、２０に記載の「ＡＲＳ２の発現を特異的に抑制しうるｓｉＲＮＡ、アンチセンス核酸」は、所望の機能のみで特定されており、構造が何ら特定されていないので、物として当業者が具体的に想定できない。「これらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクター」についても同様である。

３．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

発明の属する分野の分類
C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i