

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

P T D (p r o t e i n t r a n s d u c t i o n d o m a i n) および M I T F (m i c r o p h t h a l m i a - a s s o c i a t e d t r a n s c r i p t i o n f a c t o r) 変異体から構成される融合蛋白質を有効成分とするマスト細胞の細胞死誘発剤。

【請求項 2】

融合蛋白質が H i s T a g 、 P T D および M I T F 変異体から構成される請求項 1 記載の細胞死誘発剤。

【請求項 3】

M I T F 変異体が M I T F の m i 変異体、w h 変異体、H L H (b a s i c - h e l i x - l o o p - h e l i x / l e u c i n e z i p p e r) 断片または A タイプの N 末領域 (1 - 3 0 5) 断片であり、P T D が T A T 由来ペプチドである請求項 1 記載の細胞死誘発剤。

【請求項 4】

融合蛋白質が、配列表配列番号 1 1、1 3、1 5 または 2 3 で示されるアミノ酸配列を有する請求項 1 記載の細胞死誘発剤。

【請求項 5】

融合蛋白質の、1 または複数のアミノ酸を置換、欠失、挿入または付加してなり、かつその活性が実質的に同等である請求項 4 記載の細胞死誘発剤。

【請求項 6】

有効成分が融合蛋白質を変性剤 (カオトロピック剤) 処理後に当該変性剤を除去して得られたものである請求項 1 記載の細胞死誘発剤。

【請求項 7】

変性剤が尿素、塩酸グアニジンまたはチオシアン酸塩である請求項 1 記載の細胞死誘発剤。

【請求項 8】

P T D および M I T F 変異体から構成される融合蛋白質を有効成分とするマスト細胞が関与する疾患の予防治療剤。

【請求項 9】

マスト細胞が関与する疾患がアレルギー、喘息、自己免疫疾患、肺線維症、癌、マストサイトーマまたはマストサイトーシスである請求項 8 記載の予防治療剤。

【請求項 1 0】

融合蛋白質が H i s T a g 、 P T D および M I T F 変異体から構成される請求項 8 記載の予防治療剤。

【請求項 1 1】

H i s T a g 、 P T D および M I T F 変異体から構成される融合蛋白質において、M I T F 変異体が M I T F の m i 変異体、w h 変異体、H L H 断片または A タイプの N 末領域 (1 - 3 0 5) 断片であり、P T D が T A T 由来ペプチドである、当該融合蛋白質。

【請求項 1 2】

融合蛋白質が、配列表配列番号 1 1、1 3、1 5 または 2 3 で示されるアミノ酸配列を有する請求項 1 1 記載の融合蛋白質。

【請求項 1 3】

融合蛋白質が、1 または複数のアミノ酸を置換、欠失、挿入または付加してなり、かつその活性が実質的に同等である請求項 1 2 記載の融合蛋白質。

【請求項 1 4】

請求項 1 1 記載の融合蛋白質および製剤学的に許容しうる担体を含む医薬組成物。

【請求項 1 5】

融合蛋白質の濃度が 0 . 1 ~ 1 0 0 μ g / m l または 0 . 1 ~ 1 0 0 n M である請求項 1 4 記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

請求項 11 記載の融合蛋白質の製造方法において、遺伝子工学的手法を用いて融合蛋白質を産生する工程を含む当該製造方法。

【請求項 17】

さらに変性剤処理、Ni カラムによる処理、変性剤除去の各工程を含む請求項 16 記載の製造方法。

【請求項 18】

大腸菌由来の宿主発現系を用いて融合蛋白質を産生する請求項 16 記載の製造方法。

【請求項 19】

変性剤の除去を、陰イオン交換体または透析の処理工程により行う請求項 16 記載の製造方法。 10

【請求項 20】

変性剤が尿素、塩酸グアニジンまたはチオシアン酸塩である請求項 16 記載の製造方法。

【請求項 21】

変性剤処理時の変性剤の添加濃度が 1 ～ 10 M である請求項 16 記載の製造方法。

【請求項 22】

請求項 11 記載の融合蛋白質をコードする DNA。

【請求項 23】

融合蛋白質が、配列表配列番号 11、13、15 または 23 で示されるアミノ酸配列を有する請求項 22 記載の DNA。 20

【請求項 24】

融合蛋白質が、1 または複数個のアミノ酸を置換、欠失、挿入または付加してなり、かつその活性が実質的に同等である請求項 23 記載の DNA。

【請求項 25】

前記 DNA が、配列表配列番号 12、14、16 または 24 で示される塩基配列を有する請求項 22 記載の DNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は MITF 変異体を用いた医薬用途に関する。より詳細には MITF 変異体を構成要素とする融合蛋白質の医薬用途に関する。 30

【0002】

【従来技術】

MITF (microphthalmia-associated transcription factor の略) は生体内に存在する転写制御因子の一種であり、マスト細胞に特有な、c-kit 遺伝子発現調節能を有する蛋白質である。

【0003】

MITF は既知の物質である (非特許文献 1) が、最初に見出されたのは MITF をコードする遺伝子であった。すなわち、当該遺伝子は、mi/mi マウスの原因遺伝子として単離された。mi/mi マウスにおいては、MITF 遺伝子に突然変異、すなわち MITF 遺伝子の転写活性化領域の 1 アミノ酸欠失が生じたため、正常な MITF が発現されない。mi/mi マウスは、眼球の形成不全、メラノサイトの欠損、マスト細胞の消失、骨大理石症を主な症状とする変異マウスであり、メラノサイト、マスト細胞、網膜色素上皮細胞、破骨細胞などの組織で分化異常を呈する。mi/mi マウスにおけるこれらの細胞の分化異常は、正常 MITF が発現されず MITF による遺伝子転写活性化が行われないことに起因する。 40

【0004】

また、正常マウスの組織あるいは培養細胞株を用いたノザンブロットによる発現組織分布の解析で、MITF mRNA が、心臓、メラノサイト、マスト細胞で発現していることが認められた。近年では、MITF には cDNA の 5' 末端の配列が異なるアイソフォーム 50

、すなわちメラノサイト型（Mタイプ）、心臓型（Hタイプ）、Aタイプが存在することが報告されている（非特許文献2）。MITF遺伝子は10個（Mタイプ）あるいは11個（A、Hタイプ）のエクソンから構成されており、エクソン2以降は3タイプ共ほぼ共通である。Mタイプにおいては、6アミノ酸をコードする18塩基からなるエクソン5bの付加の有無によって、さらに2つのタイプに区別される。AとHのタイプはエクソン1B以降が完全に一致しており、5'末端のエクソン1が異なる。A、HタイプとMタイプとは、エクソン2以降は共通であるが、Mタイプにはエクソン2の上流にエクソン1Bがなく、特異的なエクソン1がつながる。また、ゲノム配列からそれぞれのタイプのプロモーターは異なっていることが明らかになっている。

【0005】

10

MITF蛋白質は、核移行領域、転写活性化領域、DNA結合領域、二量体形成領域およびMITF自体の活性化領域からなることが推定されており、これら領域を含むことは既知の全てのタイプで共通である。MITF蛋白質は、その構造の中央にbHLH-Zip（basic-helix-loop-helix/leucine zipper）を有する転写制御因子であり、二量体を形成してDNAに結合し、対象となる遺伝子の転写を活性化する。AタイプとHタイプの転写活性には大きな差があることが報告されており、両タイプ間で遺伝子配列の異なるエクソン1に、転写活性を制御する機能があると推測される。

【0006】

また、MITF蛋白質は、メラノサイトにおいては転写制御因子として作用し、メラノサイトの増殖分化、ならびにメラニン合成系等に関わっていることが報告されている。

20

【0007】

マスト細胞においても、MITF蛋白質はc-kit遺伝子発現を調節する転写制御因子（c-kitプロモーターを活性化する転写因子）として作用することが報告されている（非特許文献3）。c-kit遺伝子は造血前駆細胞、マスト細胞、色素細胞、生殖細胞で発現されており、これら細胞の増殖分化を、S1因子の作用により制御している。マスト細胞において、MITF蛋白質は、c-kit遺伝子発現を制御することによりマスト細胞の生存維持に関わっていると考えられる。

【0008】

マスト細胞はアレルギー疾病に関与していることが古くから報告されている（非特許文献4）。また、アレルギー疾病以外にマスト細胞に関わる疾病として、自己免疫疾患、肺線維症、癌、マストサイトーシス、マストサイトーマ等が挙げられる。

30

【0009】

一方、PTD（Protein Transduction Domainの略）は、生体膜を貫通して蛋白質を細胞内に移行させる（取り込ませる）働きを有するドメインの総称である。例えば、HIV抗原中のドメイン単位で分析したところ、TAT由来ペプチドの部分が、HIV抗原を正常なT細胞内に移行させる働きを有しており、これが細胞感染の一因であることが確認されている（非特許文献5）。こうした知見がベースとなって、TATと同じような働きを有する各種PTDが存在すること、これらのPTDと各種蛋白質を融合させることにより細胞内に移行させる手法が報告されている（非特許文献6）。

40

【0010】

しかしながら、MITFあるいはマスト細胞に関して、PTDを利用して細胞内に移行させる技術については、今までのところ報告例は見出されていない。

【0011】

【特許文献1】

国際公開第00/47765号パンフレット

【特許文献2】

国際公開第01/66735号パンフレット

【特許文献3】

特表2001-513987号公報

50

【特許文献4】

特表2002-505077号公報

【特許文献5】

特表平5-505102号公報

【特許文献6】

特表2002-512808号公報

【非特許文献1】

セル (Cell)、1993年、74巻、395～404頁

【非特許文献2】

生化学、1999年、71巻1号、61～64頁

10

【非特許文献3】

ブラッド (Blood)、1996年、88巻4号、1225～1233頁

【非特許文献4】

IgE, mast cells and the allergic response (Ciba Foundation symposium) 147、John Wiley & Sons 出版社、Chichester, UK、1989年

【非特許文献5】

セル (Cell)、1988年、55巻、1179～1188頁

【非特許文献6】

カレント・オピニオン・イン・モレキュラ・セラピューティクス (Current Opinion in Molecular Therapeutics) 2000、2000年、2巻2号、162～167頁

20

【非特許文献7】

トレンドズ・イン・ジェネティクス (Trends in Genetics)、1995年、11巻11号、442～448頁

【非特許文献8】

プロシーディング・ネイショナル・アカデミック・ソサイアティ・USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、1988年、85巻、8998～9002頁

【非特許文献9】

カレント・プロトコールズ・イン・イムノロジー (ウィレイ) セクション [Current Protocols in Immunology (Wiley) Section] 7.25.2

30

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、MITF変異体を用いた新規な医薬用途を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の事情を考慮して研究を行った結果、MITF変異体とPTDを組合せることにより、マスト細胞の細胞死を誘発できることを見出して本発明を完成した。

【0014】

40

すなわち、本発明は、PTDおよびMITF変異体から構成される融合蛋白質を有効成分とするマスト細胞の細胞死誘発剤；PTDおよびMITF変異体から構成される融合蛋白質を有効成分とするマスト細胞が関与する疾患の予防治療剤；HisTag、PTDおよびMITF変異体から構成される融合蛋白質において、MITF変異体がMITFのmi変異体、wh変異体、HLH断片またはAタイプのN末領域(1-305)断片であり、PTDがTAT由来ペプチドである、当該融合蛋白質；前記の融合蛋白質および製剤学的に許容しうる担体を含む医薬組成物；前記の融合蛋白質の製造方法において、遺伝子工学的手法を用いて融合蛋白質を産生する工程を含む、当該製造方法；前記の融合蛋白質をコードするDNA、に関するものである。以下の詳細を説明する。

【0015】

50

【発明の実施の形態】

A. M I T F 変異体

本発明で用いられるM I T F 変異体は、天然型（野生型）M I T F の変異体であって、M I T F 阻害活性を有するものであれば、特に限定されるものではない。具体的には、M I T F の m i 変異体、M I T F の w h 変異体、その他のM I T F 変異体、例えば、スプライシングバリエーション（A 体、H 体、M 体、N 体由来のいずれでも可）、あるいはM I T F の部分構造であってM I T F 阻害活性を有するもの、例えば、b H L H - Z i p （M 体のN 末196番目から285番目まで）断片、その部分を含むN 末側断片、A 体のN 末領域（N 末1番目から305番目まで）断片などが例示される。具体的には、非特許文献7、特許文献1、特許文献2などに開示されたM I T F 変異体などが挙げられる。特に好ましい変異体は、m i 変異体、w h 変異体、b H L H - Z i p 断片（以下、H L H 断片）、A 体のN 末領域（1 - 305）断片である。これらのアミノ酸配列、塩基配列の関係は表1のとおりである。

【0016】

【表1】

M I T F 変異体	アミノ酸配列	好ましい塩基配列
m i 変異体	配列番号1	配列番号2
w h 変異体	配列番号3	配列番号4
H L H 断片	配列番号5	配列番号6
A タイプN 末領域	配列番号21	配列番号22

【0017】

また、これらの変異体の構造類似体であっても、当該変異体と実質的に同程度のM I T F 阻害活性を有するものも本発明の範疇に含まれる。例えば、上述のアミノ酸配列において、1または複数個のアミノ酸を置換、欠失、挿入または付加したものであって、当該変異体と実質的に同程度の活性を有するものであってもよい。

【0018】

B. P T D

本発明で用いられるP T Dは、細胞内に取り込まれる（移行する）性質を有するものであれば、特に限定されるものではなく、公知のものを利用できる。具体的には、前記の文献（非特許文献6）中の164頁表2に列挙された各種オリゴペプチド、特許文献3、特許文献4、特許文献5で開示されたP T D用の各種オリゴペプチドなどが例示される。より好ましいP T Dは、T A T 由来ペプチド（アミノ酸配列はY G R K K R R Q R R R、配列番号7、好ましい塩基配列は同8で各々示される）である。P T DはM I T F 変異体のN 末側、C 末側のいずれに結合していてもよい。また、結合は直接でもよく、架橋剤（リンカー）を介して間接的なものであってもよい。リンカーとしてはグリシン残基などが例示される。

【0019】

C. その他の構成要素（ドメイン）

本発明の融合蛋白質は、精製用アフィニティクロマトにおけるリガンドに対して親和性を有するものを結合していてもよい。当該ドメインは特に限定されるものではなく、公知のものを利用することができる。このような関係にあるものとしては、抗原とその抗体、受容体とそのリガンド、N i - N T A （ニトリロ三酢酸）とH i s T a g、アビジン（またはストレプトアビジン）とビオチン、などが例示される。より好ましいのは、H i s T a g （アミノ酸配列はM G G S H H H H H H、配列番号9、好ましい塩基配列は同10で各々示される）である。本ドメインは融合蛋白質のN 末側、C 末側のいずれに結合していてもよい。また、結合は直接でもよく、架橋剤（リンカー）を介して間接的なものであってもよい。リンカーとしてはグリシン残基などが例示される。

【0020】

D. 融合蛋白質の調製

10

20

30

40

50

本発明の融合蛋白質の調製方法としては、▲1▼融合蛋白質全体を、化学的合成手法を用いて合成する方法、▲2▼上記の各構成要素（ドメイン）を各々別個に調製した後に、化学的な反応手段を用いて結合する方法、▲3▼各構成要素をコードする遺伝子を連結した上で遺伝子工学的手法を用いて一気に融合蛋白質として発現させる方法などが例示される。▲2▼の場合、各構成要素の調製方法としては、化学的合成方法、細胞培養法、遺伝子工学的な手法を用いる方法などが挙げられる。PTDはHIV抗原からの切断・単離によっても調製することもできる。

【0021】

例えば、融合蛋白質を遺伝子工学手法により調製する場合で説明する。

1) 融合蛋白質をコードするDNAを調製する。当該調製は常法により行われる。まず、MITF変異体をコードする遺伝子を調製する。当該遺伝子の調製は、適当な細胞からmRNAを抽出し、逆転写酵素とDNAポリメラーゼを用いてcDNAを合成し、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法で増幅することにより得ることができる。具体的には、mRNAの抽出は、市販のmRNA抽出用キットなどを用いて行い、逆転写、cDNA合成および増幅は、市販のcDNA増幅キットなどを用いた5' - RACE法（非特許文献8）または適当なプライマーを用いた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法などにより行うことができる。また、適当な細胞からゲノムDNAを抽出し、当該遺伝子をPCRで増幅して得ることもできる。また、公知の報告例、例えば、上述の非特許文献1、特許文献2で開示されたMITFをコードする遺伝子を利用することもできる。例えば、本発明のHLH断片はMITFのMタイプから、AタイプのN末領域（1-305）断片はMITFのAタイプ（MITF A/pCDNA3）から、各々調製することもできる。

【0022】

次いで、PTDをコードする遺伝子を上記と同様の方法により調製し、MITF変異体をコードする遺伝子と連結する。HisTagについても同様である。また、HisTagを担持する市販のプラスミド（pTrcHisB、インビトロジェン社）を用いて、PTD-MITF変異体からなる融合蛋白質をコードするDNAを挿入することにより、本発明の融合蛋白質をコードするDNAを調製することができる。

【0023】

2) DNAを適当なベクターに組込んで発現用ベクターを調製する。当該ベクターは特定のプロモーターの制御下に融合蛋白質を発現するために用いる。その組込みは常法により行われる。

【0024】

上記得られた目的のDNAを精製し、ベクターDNAに導入して、宿主・ベクター系を構築することができる。宿主・ベクター系は一般に宿主細胞とコンパチブルな種に由来するレプリコンと、当該宿主を組合せて使用する。ベクターDNAは、複製起点、プロモーター、制御配列（エンハンサー）、シグナル配列、リボソーム結合部位、RNAスプライス配列、ポリA付加部位、転写終結配列（ターミネーター）などを有する。また、形質転換細胞中で表現型の選択が可能となるマーカーの配列を有していてもよい。ベクターDNAとしては、例えば、染色体、エピソーム由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来のベクター、またはバキュロウイルス、パポバウイルス、SV40、などのウイルス由来のベクター、あるいはコスミドおよびファージミドなどが挙げられる。また、目的により発現ベクターやクロニングベクターなどを用いることができる。

【0025】

プロモーターは公知のものが挙げられ、発現のための宿主に合わせて選択することができる。例えば、大腸菌を宿主とする場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、trcプロモーター（trpプロモーターの-35領域とlacプロモーターの-10領域を連結した合成プロモーター）、T7プロモーターなどのプロモーターが例示される。また、当該発現ベクターはamp^rなどのマーカー遺伝子を担持していてもよい。

【0026】

ベクターDNAに本発明に係るDNAを組み込む方法は、自体公知の方法を適用し得る。

例えば、適当な制限酵素を選択し、処理して目的のDNAを特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターDNAと混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。あるいは、目的のDNAに適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所望の組換えベクターが得られる。また、宿主に導入するベクターDNAとして発現ベクターを使用すれば、目的とする蛋白質の製造が可能である。

【0027】

3) 発現用ベクターを宿主に導入して形質転換体を調製する。形質転換は常法により行われる。宿主としては、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞などを用いることができる。好ましくは大腸菌である。また、栄養要求性株、抗生物質感受性株を宿主とすることもできる。 10

【0028】

形質転換体を調製する方法としては、プラスミドを直接宿主細胞内に導入する方法、プラスミドを染色体上に組込む方法などが挙げられる。前者としては、プロトプラストポリエチレングリコール法、エレクトロポレーション法などが例示される。後者としては、宿主染色体中に存在する遺伝子の一部のDNA配列をプラスミドに含有させて、その相同な配列部分を利用して、プラスミドまたはその線状断片を相同組換えにより宿主染色体上に導入することができる。

【0029】

4) 形質転換体を培養し、融合蛋白質を産生する。培養は常法により宿主に応じて適当な培地、培養条件(温度、時間など)を用いて行われる。大腸菌を用いる場合の培養条件としては通常、15~43℃(好ましくは30~37℃)程度で、1~100時間程度行う。また、必要に応じて通気や攪拌を加えることもできる。培養形式としては、回分培養、半回分培養(フェッド・バッチ培養)、連続培養のいずれであってもよい。 20

【0030】

5) 産生された融合蛋白質を精製する。宿主として大腸菌を用いた場合はまず菌体を超音波粉碎等の処理により当該蛋白を可溶化する。産生された融合蛋白質の精製は自体公知の手法により行うことができる(特許文献6など)。例えば、Niカラムを用いる方法、陰イオン交換体処理、透析処理などが例示される。また、本発明の融合蛋白質は変性剤(カオトロピック剤)処理後に変性剤を除去して得られたものを用いることが好ましい。変性剤としては尿素、塩酸グアニジン、チオシアン酸塩などが例示される。変性剤処理時の変性剤の添加条件としては、濃度1~10M程度が例示される。具体的には融合蛋白質と変性剤を接触させて処理した後に、変性剤の共存下にNiカラムを用いて処理を行い、さらに陰イオン交換体または透析処理により変性剤を除去する操作を行って、当該融合蛋白質を精製する。 30

【0031】

E. 調製された融合蛋白質の性状

本発明の融合蛋白質は、細胞内、特にマスト細胞内に移行する性質を有するものである。好ましくは、HisTag、PTDおよびMITF変異体から構成される。このものは10~100キロダルトン(kDa)程度の分子量を有する。好適には、N末側からみて、HisTag、PTD、MITF変異体の順番に並んだものである。具体的な配列としては、表2に示すとおりである。 40

【0032】

【表2】

融合蛋白質	アミノ酸配列	好ましい塩基配列
HisTag-PTD-MITF の mi 変異体	配列番号 1 1	配列番号 1 2
HisTag-PTD-MITF の wh 変異体	配列番号 1 3	配列番号 1 4
HisTag-PTD-H L H 断片	配列番号 1 5	配列番号 1 6
HisTag-PTD-MITF A タイプの N 末領域	配列番号 2 3	配列番号 2 4

【0033】

F. 製剤化

本発明の融合蛋白質の製剤化には、自体公知の手法を用いることができる。例えば融合蛋白質に、製剤学的に許容しうる担体を添加あるいは混合すればよい。製剤化により得られた医薬組成物において、融合蛋白質の濃度として0.1～100 μg/mLまたは0.1～100 nM程度が例示される。

【0034】

G. 用途

本発明のMITF変異体（または、それを用いた融合蛋白質）はマスト細胞内に移行することにより内在性MITFの活性を阻害する、前駆細胞からのマスト細胞の分化を阻害する、マスト細胞の生存を阻害する、成熟マスト細胞に細胞死（アポトーシス）を誘導する、などの作用を有する。従って、本発明の製剤は、マスト細胞が関与する各種疾患の予防・治療に有用であることが期待される。当該疾患としては、例えば、アレルギー、喘息、自己免疫疾患、肺線維症、癌、マストサイトーシス、マストサイトーマ等が挙げられる。

【0035】

H. 用法・用量

本発明の融合蛋白質の用法・用量としては、生体内において0.001～10 μg/mL程度の濃度で存在するように、投与量を選択すればよい。あるいは投与量として、10 μg～50 mg程度が例示される。投与経路としては、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、経皮投与、気道内投与などが例示される。

【0036】

【実施例】

本発明をより詳細に説明するために実施例、製剤例および実験例を挙げるが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0037】

実施例 1

1) 融合蛋白質発現プラスミドの構築

発現プラスミドは、大腸菌用発現ベクター pTrcHisB（インビトロジェン社、No. V360-20）のHisTag配列の上流に存在するNcoIサイトとマルチクロニングサイト中のHindIIIサイトの間に、精製用のHisTagの下流にPTD配列が接続し、その下流にMITF変異体のcDNAを接続したHisTag-PTD-MITF変異体の遺伝子を挿入することにより構築した。図1を参照のこと。

【0038】

MITFのcDNAへのHisTag、PTD配列の付加はPCR法を用いて行った。まず、MITF MタイプのcDNA（pSU054、MITF-M/pT7 Blue）を鋳型にして、MITFおよびBamHIサイトを含む上流部分をPCR法により増幅した。さらに4種類のプライマー（M-tat、Tat3、Tat2、Tat1）を用いてMITFの転写開始コドンの上流にHisTagと制限酵素NcoIの認識配列を付加するまで伸長させた後に、大腸菌用発現ベクター pTrcHisB（このものはlac P/OおよびAmp^rを担持してなる）のNcoIサイトとBamHIサイトの間にクロニングした。

【0039】

各プライマーは以下の塩基配列を有する。

10

20

30

40

50

M-t a t (配列番号17) : G C G A C G A A G A G G T A T G C T A G A A T A C
A G T C A C T A C C

T a t 3 (配列番号18) : G G C A G G A A G A A G C G G A G A C A G C G A C
G A A G A G G T A T G

T a t 2 (配列番号19) : A T C A T C A T C A T G G T G G T T A T G G C A G
G A A G A A G C G G

T a t 1 (配列番号20) : T A A A C C A T G G G G G G T T C T C A T C A T C
A T C A T C A T C A T G G T G

【0040】

次いで、Mタイプ (p S U 0 5 4)、m i 変異体 (p S U 0 6 1、M I T F-M m i / p T 7 B l u e)、w h 変異体 (p S U 0 6 2、M I T F-M w h / p T 7 B l u e) をそれぞれ B a m H I と H i n d I I I 消化することにより、M I T F c D N A の下流部分を単離した。この部分に変異部分も含まれる。単離した c D N A 断片を、上流部分をクローニングしたプラスミドの B a m H I サイトと H i n d I I I サイトの間に挿入した。プラスミド p S U 8 1 は正常型 M I T F である M タイプを含む融合蛋白質の遺伝子を挿入したものである。p S U 0 8 2 は m i 変異体を、p S U 0 8 3 は w h 変異体を含む融合蛋白質を各々挿入したものである。

【0041】

2) 融合蛋白質の発現

構築した発現プラスミドを大腸菌 D H 5 α (東洋紡) に導入し形質転換した。50 mL の L-B r o t h (50 μ g / mL のアンピシリンを含む) に、大腸菌を1白金耳量となるように植菌し、37℃で17時間培養した。さらに、1 L の L-B r o t h (50 μ g / mL のアンピシリンおよび0.2%のグルコースを含む) に、培養液を1%となるように植菌した。A 600 の濁度が約0.1となるまで37℃で培養した後に、I P T G (イソプロピルチオ-β-D-ガラクトシド) を終濃度0.4 mM となるように添加した。2時間培養後に大腸菌を集菌した。

【0042】

3) 融合蛋白質の精製

大腸菌を遠心分離にて回収し、8 M の尿素、0.1 M の塩化ナトリウム、10 mM の D T T を含む20 mM の H E P E S 緩衝液 (p H 8.0、p H は以下同様) 中で超音波粉碎し可溶化した。得られた L y s a t e を8 M の尿素、0.1 M の塩化ナトリウム、10 mM のイミダゾール、1 mM の D T T を含む20 mM の H E P E S 緩衝液で平衡化した N i - N T A アガロース (Q i a g e n 社) カラムにアプライし、同緩衝液で洗浄した。カラムに結合した蛋白をA液として同緩衝液、B液として200 mM のイミダゾールを含む同緩衝液を用いたイミダゾールの濃度直線勾配法で溶出し、S D S - P A G E (T e f c o 社) で解析して目的の分子量を示す画分をプールした。

【0043】

溶出液1容量に対して、20 mM の H E P E S 緩衝液を1容量、4 M の尿素を含む同緩衝液を2容量、各々添加して希釈した溶液を、4 M の尿素、25 mM の塩化ナトリウムを含む20 mM の H E P E S 緩衝液で平衡化した四級アンモニウム塩型強陰イオン交換体 (商品名 Q-S e p h a r o s e、ファルマシア社) にアプライし、同緩衝液で洗浄した。次に、20 mM の H E P E S 緩衝液で洗浄して尿素を除去した後に、1 M の塩化ナトリウムを含む同緩衝液でカラムに結合した蛋白を溶出した。溶出した融合蛋白質は10%グリセロールを含む D u l b e c c o ' s P B S (等張化リン酸緩衝液) に対して透析した後に分注して-80℃で保存した。

【0044】

得られた最終産物を S D S - P A G E で分析したところ、還元条件下で約50キロダルトンの分子量を示すバンドが観察された。このバンドはウサギ抗 M I T F 抗体と反応した。なお、このウサギ抗 M I T F 抗体は、ウサギに M I T F の C 末20アミノ酸残基のペプチドを免疫して得られた抗血清を、同ペプチドを結合したカラムを用いてアフィニティ精製

を行うことにより、同ペプチドを特異的に認識する抗体を調製したものである。

【0045】

製剤例 1

本発明の融合蛋白質、および、10%グリセロールを含む Dulbecco's PBS からなる組成物を調製した。

【0046】

実験例 1

1) まず、本発明の融合蛋白質が細胞内に移行しているかどうかを確認した。実施例 1 で調製した MITF 変異体の融合蛋白質を FITC (フルオレセイン・イソチオシアネート) で常法により蛍光標識し、COS7 細胞に添加した。添加 1 時間後に FACS (fluorescence-activated cell sorter) Calibur (ベクトン・ディキンソン社) を用いて、蛍光強度を測定した。その結果を表 3 に示す。 10

【0047】

【表 3】

添加薬剤	蛍光強度のピーク位置 (FL1-H)
PBS (融合蛋白質無添加)	3
HisTag-PTD-MITF の mi 変異体	6
HisTag-PTD-MITF の wh 変異体	10

【0048】

表 3 から明らかなように強い蛍光が細胞に会合 (アソシエート) していることが観察され、当該融合蛋白質が細胞内に効率よく移行していることが確認された。

【0049】

2) 本発明の融合蛋白質が細胞内に移行して内在性 MITF の活性を阻害するか調べる目的でルシフェラーゼ分析を行った。

【0050】

発現用プラスミドとして、正常 MITF 発現用プラスミド pSU063 (MITF-M/pCDNA3)、c-kit 遺伝子プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を接続したプラスミドを調製するための各種ベクター、すなわち、C-kit-Rluc 発現用ベクター pSU053 (C-kit/Rluc)、ルシフェラーゼ発現用ベクター pGL2 (Luc、プロメガ社) を用いた。各プラスミドを、COS7 細胞に導入 (トランスフェクト) した。その条件は以下のとおり。プラスミドの使用量は、6cm のディッシュ当たり 3 μ g (pSU063 : pSU053 : pGL2 = 1 : 1 : 0.1)。プラスミドの導入にはトランスフェクションキット (Stratagene 社、#200385) を用いた。 30

【0051】

6 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 1×10^5 個の細胞を植え込み、17 時間 CO₂ インキュベータに静置した。10 μ L の Solution 1 (前記キットに添付されている試薬。2.5M CaCl₂ からなる) に 90 μ L の蒸留水と 3 μ g の DNA を添加した後に、等量の Solution 2 [前記キットに添付されている試薬。2 $\times$ PBS (pH 6.95) からなる] を加え、室温で 20 分間静置した。混合した DNA 溶液を培養液に添加した。24 時間後に上記の培地を交換し、1 μ g/mL の本発明の融合蛋白質 (実施例 1 で調製) を添加した。 40

【0052】

本発明の融合蛋白質の添加 48 時間後に細胞を PBS (-) で洗浄し、6 穴のディッシュ当たり 0.5 mL の passive lysis buffer を添加し、スクレーパーを用いて細胞を掻き採った。細胞を 1.5 mL 容のチューブに移し、14000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心した。ルシフェラーゼ活性の測定は、Dual luciferase assay kit (プロメガ社) を用いて行った。96 穴プレート上で 20 μ L の遠心上清に、100 μ L の Luciferase Assay Reagent II を添加 50

・混合し、ホタルルシフェラーゼ活性を測定した。さらに混合液に100 μ LのStop & Go Reagentを添加・混合し、ウミシイタケルシフェラーゼ (R-luc) 活性を測定した。R-lucの数値をpGL2で補正後、PBS添加におけるR-lucを1としたときの値に換算した。その結果を表4に示す。

【0053】

【表4】

添加薬剤	ルシフェラーゼ活性
pSU053+pSU063+PBS	1とする
pSU053+pSU063+mi	0.92
pSU053+pSU063+wh	0.72

10

【0054】

なお、表中のmiはHisTag-PTD-MITFのmi変異体からなる融合蛋白質、whはHisTag-PTD-MITFのwh変異体からなる融合蛋白質、を各々示す。

【0055】

COS細胞が発現するルシフェラーゼ活性も本発明の融合蛋白質存在下で阻害され、当該融合蛋白質が細胞内に移行して内在性MITFを阻害することが示唆された。

【0056】

実験例2

20

本発明の融合蛋白質がSCFで誘導されるマスト細胞の分化系にどのように影響するかを確認した。

【0057】

正常マウスから骨髓細胞を調製し、その 2×10^6 個/穴を、10%のFCS、0.1mMの非必須アミノ酸、1mMのピルビン酸ナトリウム、2mMのグルタミン、100U/mLのペニシリン、100 μ g/mLのストレプトマイシン、50 μ Mの2-メルカプトエタノール、2 μ g/mLの本発明の融合蛋白質 (HisTag-PTD-MITFのwh変異体) を含むRPMI1640中で骨髓細胞因子 (SCF、IBL社) 50~100 ng/mLの存在下に24穴プレートにて培養した。週に一度培地を半量交換し、その際にSCFも添加した。37℃で21日間培養した後に、マスト細胞数、c-kitおよびIgE受容体の発現量を測定した。

30

【0058】

マスト細胞数の測定はトルイジン青染色法によった。トルイジン青染色は非特許文献9に従い、pH2.7の染色液を用いて行った。

【0059】

c-kitの発現量の測定はFACSを用いて行った。細胞を、0.1%のNaN₃、0.1%のBSAを含むPBS100 μ Lに懸濁し、5~10 μ g/mLのR-PE (R-phycoerythrin) 標識抗マウスc-kit抗体 (PharMingen社) あるいはR-PE標識ラットIgG2B, k isotype standard (PharMingen社) と水中で1時間インキュベーションした。洗浄後に1 μ g/mLのヨウ化ピリジウムを添加して、FACS Calibur (前記) で解析した。IgE受容体の発現量の測定は、5 μ g/mLのFITC標識マウスIgEを用いて同様にFITCによる解析を行った。マスト細胞数に関する結果を表5に示す。

40

【0060】

【表5】

本発明の融合蛋白質	マスト細胞数	
	培養14日目	培養21日目
未添加	9×10^4	3×10^6
添加	3×10^4	2×10^5

【0061】

本発明の融合蛋白質の添加群では、培養21日目でマスト細胞数が未添加群に比べて10分の1以下に減少していた。また、c-kitの発現に関する培養21日目の結果を表6に示す。

【0062】

【表6】

本発明の融合蛋白質	蛍光強度のピーク位置
未添加	1×10^3
添加	7×10^1

【0063】

本発明の融合蛋白質の添加群では、培養21日目でc-kitの発現量が未添加群に比べて10分の1以下に減少していた。また、IgE受容体の発現量は変化がなかった（実験データは示さず）。このように本発明の融合蛋白質はマスト細胞前駆細胞のSCF受容体c-kitの発現を特異的に阻害し、その結果、マスト細胞の分化を強く阻害することが確認された。

【0064】

実験例3

本発明の融合蛋白質の、成熟マスト細胞への影響を確認する目的で、線維芽細胞との共培養系でのマスト細胞生存への影響を確認した。

【0065】

正常マウスから脾細胞を調製し、10%のFCS、0.1mMの非必須アミノ酸、1mMのピルビン酸ナトリウム、2mMのグルタミン、100U/mLのペニシリン、100μg/mLのストレプトマイシン、50μMの2-メルカプトエタノールを含むRPMI 1640中でIL-3（GENZYME社）またはWEHI-3細胞conditioned培地（WEHI-3CM）存在下に3週間以上培養して、脾臓由来培養マスト細胞（SMC）を得た。6穴プレートに線維芽細胞のNIH-3T3（理研セルバンク）をコンフルエントまで培養し、当該SMCをIL-3およびWEHI-3CMを含まず、かつ、1μg/mLの本発明の融合蛋白質を含む、上記の培地に懸濁し、 3×10^5 個で播種した。2～3日ごとに新鮮培地に交換した。37℃で15日間培養した後に、マスト細胞数、ヒスタミン量およびキマーゼ活性を測定した。各種実験系を表7に示す。

【0066】

【表7】

実験系	線維芽細胞	マスト細胞	融合蛋白質
A	○	正常マスト細胞	添加せず
B	○	同上	HisTag-PTD-MITFのmi変異体
C	○	同上	HisTag-PTD-MITFのwh変異体
D	○	miマスト細胞 (mi/miSMC)	添加せず

【0067】

ヒスタミンの定量はRIA法（栄研化学）によった。顆粒中のキマーゼ活性の測定は特異的な合成基質であるN-サクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA（シグマ

10

20

30

40

50

社)を用いて行った。結果を表8に示す。

【0068】

【表8】

実験系	マスト細胞数 (個/穴)	キマーゼ活性 (mOD/分/穴)	ヒスタミン (ng/穴)
A	3×10^4	14	1.05
B	1×10^4	4	0.25
C	7×10^3	3	0.2
D	8×10^2	0	0.03

10

【0069】

線維芽細胞と正常マスト細胞を共培養するとマスト細胞は長期間生存し続けた。また、MITFに異常を持つ人為的に作成したmiマスト細胞(mi/miSMC、天然には存在しない)は線維芽細胞との共培養においてアポトーシスにより2週間以内に死滅した。正常マスト細胞と線維芽細胞の共培養に本発明の融合蛋白質(mi変異体型、wh変異体型)を添加すると、マスト細胞の生存は阻害され、miマスト細胞と同様に2週間後にはほとんどが死滅した。マスト細胞数の低下は、ヒスタミン量の低下およびキマーゼ活性の低下によっても確認された。この結果、本発明の融合蛋白質は、成熟マスト細胞にアポトーシスを誘導することが示唆された。

20

【0070】

実験例4

本発明の融合蛋白質の添加濃度における影響を調べた。MC/9マスト細胞株(ATCCより入手)をFITC標識したHisTag-PTD-MITFのwh変異体からなる融合蛋白質の存在下または非存在下に、FACS染色緩衝液(0.1%ウシ血清アルブミンおよび0.1%アジ化ナトリウムを含むDulbecco's PBS)中で氷上1時間インキュベートした。洗浄後にヨウ化ピリジウムを添加して死細胞をゲートアウトし、FACS Calibur(前記)で解析した。結果を表9に示す。

【0071】

【表9】

融合蛋白質の添加濃度	蛍光強度のピーク位置
0 ($\mu\text{g/mL}$)	2.5
2.5	3.5
12.6	7
63	22

30

【0072】

表9の結果から、本発明の融合蛋白質の添加濃度に依存して、当該融合蛋白質が細胞内により高濃度で移行していることが判明した。

40

【0073】

実施例2: HisTag-PTD-HLH

1) 発現ベクターの構築

発現ベクター作成の鋳型としては正常型のMITFのMタイプ(pSU054)を用いた。HLH断片はMタイプのN末196番目から285番目のアミノ酸までの領域をPCR法により増幅した。増幅断片のN末側には、プライマー(Tat1、Tat2、Tat3およびHLH-F)を用い、HisTag、PTDと制限酵素NcoIの認識配列を付加した。またC末側には制限酵素XbaIの認識配列を付加した。増幅断片をNcoI+XbaIで消化し、実施例1で作成したpSU081のNcoI-XbaI領域と置換した。当該増幅断片をTAクローニングし塩基配列が正しいことを確認した。構築したベクタ

50

ーpSU085はlacプロモーター、HisTag-PTD-HLH領域の融合蛋白質のDNA、amp^rから構成される(図2)。

【0074】

プライマーHLH-Fは以下の塩基配列を有する。

HLH-F(配列番号25): GCGACGAAGAGGTATGTTGGCTAAAGAGAGG

2) 実施例1に準じて融合蛋白質を産生・精製した。

【0075】

実施例3: HisTag-PTD-MITFのAタイプN末領域

1) 発現ベクターの構築

pSU064(MITFのAタイプ/pCDNA3、特許文献2を参照のこと)を鋳型に、2種類のプライマー(pTD3-MITFa、MITFR-N)を用いてPCRを行い、N末領域(N末1番目から305番目までのアミノ酸)を増幅した。pTD3-MITFaの5'末端にはSacIIサイトを、MITFR-Nの5'末端にはEcoRIサイトを付加した。増幅断片をSacII+EcoRIで消化し、pSU093(pTrcHisを基本骨格とするPTDカセット発現ベクター)の同サイト間に挿入した(図3)。構築した発現ベクターpSU087は、HisTag-PTD-AタイプのN末領域の順にDNA断片がつながり、lacプロモーターの制御下に融合蛋白質が発現する。

【0076】

各プライマーは以下の塩基配列を有する。

pTD3-MITFa(配列番号26): CGCCGCGGAATGCAGTCCGAATCGGGAATC

MITFR-N(配列番号27): GAATTCACTATGCTCTTGCTTCA GACTCTGTGGGG

【0077】

2) 実施例1に準じて融合蛋白質を産生した後、これを精製する際に、Ni-アガロースの代わりにTALON(商品名、CLONTECH社)を用いて行った。精製物は10%グリセロール/PBS溶液として調製した。

【0078】

実施例4: pET14bを用いた発現ベクターの構築

pSU083(wh系)のNcoI-NdeI断片とpET14b(T7プロモーター、HisTag、amp^rを連結してなる。Takara)の同領域を置換して発現ベクターpSU121を構築した(図4)。このpSU121はT7プロモーターの下流に、HisTag、PTD配列、MITFのwhタイプがつながり、大腸菌の菌体内において、T7プロモーターの制御下に融合蛋白質(HisTag-PTD-MITFのwhタイプ)を発現する。

【0079】

実施例1に従い、大腸菌をフラスコで培養し、融合蛋白質(wh系)を産生した。Ni-NTAアガロースを用いた精製を実施例1に準じて行った後に、Slide-A-Dialyzer(Pierce)を用いて透析し脱尿素処理を行った。溶媒としては290mMソルビトール、10μM EDTA、1mMトリス緩衝液(pH8)を用いた。培養液1L当たり約10mgの融合蛋白質が精製された。

【0080】

実施例5: 精製工程(HLH)

融合蛋白質(HLH系、実施例2により調製)をQ-セファロースカラムから1M NaCl/20mM HEPES(pH8)で溶出し、回収した画分を、使用前にPD-10カラム(ファルマシア)を用いてPBSに置換した。

【0081】

実施例6: 高密度培養(wh系)

発現ベクターpSU083を大腸菌HB101株に導入し、形質転換体を調製した。EB

10

20

30

40

50

M0010010 培地（アンピシリン添加）を用いてジャーファーメンターで 37℃ 16 時間培養し、融合蛋白質を産生した。精製は実施例 1 に準じて行った。

【0082】

実施例 7： 高密度培養（HLH）

pSU085 を用いて実施例 6 に準じて融合蛋白質を産生した。精製を実施例 1 に準じて行う際に以下の点を変更した。Ni-NTA アガロース処理時に 8 M 尿素の代わりに 6 M 塩酸グアニジンを用いたこと、陰イオン交換体処理の代わりに分子量 3000 カット膜を用いて濃縮した後に、0.5 M NaCl / 20 mM HEPES (pH 8) で平衡化した PD-10 カラム（ファルマシア）で脱塩したこと。0.5 M NaCl / 20 mM HEPES (pH 7.4) に対して透析し分注して -80℃ で保存した。インビボで使用する際には NaCl 濃度を 0.15 M となるように希釈して用いた。 10

【0083】

製剤例 2

融合蛋白質、10% グリセロール、PBS からなる組成物を調製した。

【0084】

製剤例 3

融合蛋白質、0.15～1 M NaCl、20 mM HEPES (pH 7.4～8) 溶液として調製した。

【0085】

実験例 5（精製結果）

各種融合蛋白質（実施例 1～3 により調製）を大腸菌菌体より精製し、その分子量、収量（4 L フラスコ培養当たり）を表 10 に示した。なお、融合蛋白質（A タイプの N 末領域）の分子量は 37 kDa であった。 20

【0086】

【表 10】

融合蛋白質	分子量 (kDa)	収量 (μg)
mi 系	50	630
wh 系	50	400
HLH 系	14	130

30

【0087】

実験例 6（インビトロ阻害）

実験例 3 に準じて実験した。10 nM の融合蛋白質を 17 日間作用させた後にマスト細胞数、ヒスタミン、トリプターゼ、キマーゼを測定した。結果を表 11 に示す。

【0088】

【表 11】

	HLH 系	ベヒクル（溶媒のみ）
マスト細胞数（個／穴）	6±1** (×10 ⁴)	25±1 (×10 ⁴)
ヒスタミン (ng／穴)	52±4**	90±4
トリプターゼ (mOD／分)	2.3±0.4**	10.6±1.2
キマーゼ (mOD／分)	0.23±0.08**	0.78±0.10

40

【0089】

表中の数値は平均±標準偏差を示す。また**は溶媒群との間に、student's test により p<0.05 で有意差があることを示す。また*は同じく p<0.01 で有意差があることを示す。以下同様。

【0090】

実験例 7（同上）

実験例 3 に準じて実験した。20 nM の融合蛋白質を 15 日間作用させた後にマスト細胞 50

比率を測定した。結果を表 1 2 に示す。本発明の融合蛋白質はマスト細胞の生存を抑制した。

【0091】

【表 1 2】

融合蛋白質	マスト細胞比率 (%)
mi 系	0.9 ± 0.1 **
wh 系	0.7 ± 0.2 **
H L H 系	0.8 ± 0.1 **
ベヒクル	1.4 ± 0.1

10

【0092】

実験例 8 (同上)

1) 実験例 2 に準じて実験を行った。マウス骨髄細胞 (2×10^6 / ウェル) を S C F の存在下に融合蛋白質を添加して 28 日間培養したときのマスト細胞数を求めた。例数は 3 とした。結果を表 1 3 に示す。

【0093】

【表 1 3】

融合蛋白質	添加濃度	マスト細胞数
ベヒクル (P B S)		8×10^6
wh 系	40 (nM)	3×10^5
H L H 系	70	3×10^5

20

【0094】

2) 実験は 1) に準じて行った。融合蛋白質の添加濃度は 2.5 nM とした。ヒスタミン濃度、キマーゼ活性を求めた。結果を表 1 4 に示す。

【0095】

【表 1 4】

ヒスタミン (ng/mL)	H L H 系	280 ± 40 **
	ベヒクル	740 ± 40
キマーゼ (mOD/分)	mi 系	0.9 ± 0.2 *
	H L H 系	0.6 ± 0.2 **
	ベヒクル	1.8 ± 0.2

30

【0096】

3) 実験は 1) と同様に行った。融合蛋白質の添加濃度は 2.5 ~ 20 nM とした。細胞数とキマーゼ活性を求めた。例数は 2 とした。結果を表 1 5 に示す。

【0097】

【表 1 5】

融合蛋白質	細胞数		キマーゼ (mOD/分)	
	A タイプ N 末	H L H	A タイプ N 末	H L H
ベヒクル	10×10^6	10×10^6	10	10
2.5 (nM)	0.3×10^6	5×10^6	0.2	3
5	0.2×10^6	6×10^6	0.05	1
10	0.4×10^6	1×10^6	0.06	0.09
20	0.4×10^6	0.6×10^6	0.03	0.03

40

【0098】

実験例 9 (ヒトマスト細胞への作用)

50

1) ヒトCD34陽性骨髄細胞 (BioWhittaker社) 2×10^4 /ウェルを、SCF (100 ng/ml)、IL-6 (100 ng/ml)、IL-10 (10 ng/ml)、融合蛋白質 (HLH系) を添加した培養液を週に一度、半量交換しながら9週間培養し、細胞数、回収した細胞についてlysate中のキマーゼ活性、ヒスタミン含量を測定した。培養液は5% FCSを含むMedia 1 (免疫生物研究所) を用いた。例数は3とした。その結果、本発明の融合蛋白質はヒトマスト細胞分化を阻害した (表16)。

【0099】

【表16】

	融合蛋白質	ベヒクル
細胞数 (最大時)	6×10^5	4×10^5
キマーゼ (mOD/分)	0.07 ± 0.02	0.25 ± 0.07
ヒスタミン (ng/mL)	40 ± 20	70 ± 15

10

【0100】

2) ヒトCD34陽性骨髄細胞を1) に準じてサイトカインの存在下に8週間培養し、途中まで分化した未成熟なマスト細胞を調製した。細胞を一旦回収、遠心洗浄し、新しくプレートに培養液中で 7×10^5 /ウェルずつ播種し、融合蛋白質 (HLH系を10または50 nM添加) を添加した同培養液 (前記のサイトカインを含む) を用いて培養を継続した。週に一度培養液を半量交換した。培養2週間後に細胞数、キマーゼ活性、ヒスタミン含量を測定した。また当該細胞をPE標識抗c-kit抗体 (あるいはPE標識対照抗体) で染色し、FACSで解析した。その結果、本発明の融合蛋白質は未成熟マスト細胞に作用してc-kit発現を阻害し、ヒトマスト細胞の成熟を阻害した (表17)。

20

【0101】

【表17】

	培養直前	融合蛋白質 50nM	融合蛋白質 10nM	ベヒクル
キマーゼ (mOD/分)	0.08	0.03	0.06	0.15
ヒスタミン (ng/mL)	290	200	330	570
FACSビーク位置		8×10	1×10^2	2×10^2

30

【0102】

3) ヒトCD34陽性骨髄細胞を1) に準じてサイトカインの存在下に12週間培養し、分化完了した成熟なマスト細胞を調製した。細胞を一旦回収、遠心洗浄し、新しくプレートに培養液中で 2.4×10^4 /ウェルずつ播種し、融合蛋白質 (HLH系を2、10または50 nM添加) を添加した同培養液 (前記のサイトカインを含む) を用いて培養を継続した。週に一度培養液を半量交換した。培養3週間後に細胞数、ヒスタミン含量を測定した。その結果、本発明の融合蛋白質は濃度依存的にヒスタミン含量を低下させ、成熟ヒト骨髄培養マスト細胞の機能を抑制した (表18)。

40

【0103】

【表18】

融合蛋白質 (nM)	ヒスタミン (ng/mL)
溶媒のみ	600 ± 20
2	520 ± 50
10	370 ± 10
50	300 ± 10

【0104】

実験例10 (インビボ阻害)

50

1) C57BL/6マウスに融合蛋白質 (wh系) 60 μ g を 200 μ L の PBS 中で週 3 回 4 週間まで腹腔内投与した。最終投与の翌日に腹腔細胞を回収し、以下の項目を測定した。例数は 4 とした。投与 4 週間の結果を表 19 に示す。

【0105】

総細胞数： コールターカウンターまたは血球計数装置により測定した。

マスト細胞： スメア標本をトルイジンブルーで染色し、陽性の比率を算出した。

ヒスタミン： 腹腔細胞懸濁液にトリトン X100 を添加して Lysate を調製し、Lysate について ELISA キットにより測定した。

c-kit および IgE 受容体両陽性細胞： 回収した腹腔細胞を PE 標識抗 c-kit 抗体およびマウス IgE / ビオチン標識抗 IgE 抗体 / APC 標識ストレプトアビジンで二重染色し FACS で解析した。 10

【0106】

【表 19】

	ベヒクル群	融合蛋白質	有意差
マスト細胞比率 (%)	0.8	0.4	0.0394
マスト細胞数	0.3×10^5	0.17×10^5	0.2784
c-kit ⁺ IgE ⁺ 細胞頻度 (%)	0.6	0.4	0.3080
同細胞数	2.3×10^5	1.4×10^5	0.2214
ヒスタミン (ng/ 10^6 cell)	42	11	0.0510

20

【0107】

2) 10 または 50 μ g の融合蛋白質 (wh系、いずれも 200 μ L ベヒクル中で) をマウス腹腔内に 2 週間投与した。例数は 10 とした。1) と同様にして各項目を測定した。結果を表 20 に示す。

【0108】

【表 20】

	ベヒクル群	融合蛋白質 10 μ g	融合蛋白質 50 μ g
総細胞数	$9 \pm 1 (X10^6)$	$11 \pm 1 (X10^6)$	$12 \pm 1^* (X10^6)$
マスト細胞の比率 (%)	0.9 ± 0.2	$0.4 \pm 0.1^{**}$	$0.2 \pm 0.1^{**}$
両陽性のマスト細胞 の比率 (%)	0.48 ± 0.10	0.29 ± 0.05	$0.20 \pm 0.04^{**}$
c-kit の平均蛍光強度	900 ± 50	$680 \pm 30^{**}$	$670 \pm 30^{**}$

30

【0109】

3) 10 μ g の融合蛋白質 (HLH系) を 350 μ L ベヒクル中でマウス腹腔内に 13 日間投与した。マスト細胞数、ヒスタミン含量の測定は 1) に準じて行った。結果を表 21 に示す。

40

【0110】

【表 21】

	ベヒクル群	融合蛋白質
マスト細胞数	$1.9 \pm 0.6 (X10^4)$	$0.1 \pm 0.1^{**} (X10^4)$
ヒスタミン (nM)	6.7 ± 2.0	$0.7 \pm 0.5^*$

【0111】

本発明の融合蛋白質 (wh系、HLH系) はいずれの実験系においてもインビボでマスト細胞数を減少させた。

50

【0112】

【発明の効果】

本発明によれば、MITF変異体を用いて、マスト細胞の細胞死を誘発することができる。よって、マスト細胞が関与する各種疾患の予防・治療に有用な薬剤を臨床の場に提供することができる。

【0113】

【配列表】

配列表配列番号1：MITFのmi変異体のアミノ酸配列	
配列表配列番号2：その塩基配列	
配列表配列番号3：MITFのwh変異体のアミノ酸配列	10
配列表配列番号4：その塩基配列	
配列表配列番号5：bHLH-Zip断片のアミノ酸配列	
配列表配列番号6：その塩基配列	
配列表配列番号7：TAT由来ペプチドのアミノ酸配列	
配列表配列番号8：その塩基配列	
配列表配列番号9：HisTagのアミノ酸配列	
配列表配列番号10：その塩基配列	
配列表配列番号11：HisTag-PTD-MITFのmi変異体からなる融合蛋白質のアミノ酸配列	
配列表配列番号12：その塩基配列	20
配列表配列番号13：HisTag-PTD-MITFのwh変異体からなる融合蛋白質のアミノ酸配列	
配列表配列番号14：その塩基配列	
配列表配列番号15：HisTag-PTD-MITFのbHLH-Zip断片からなる融合蛋白質のアミノ酸配列	
配列表配列番号16：その塩基配列	
配列表配列番号17：プライマーM-Tatの塩基配列	
配列表配列番号18：プライマーTat 3の塩基配列	
配列表配列番号19：プライマーTat 2の塩基配列	
配列表配列番号20：プライマーTat 1の塩基配列	30
配列表配列番号21：MITFのAタイプN末領域（1-305）のアミノ酸配列	
配列表配列番号22：その塩基配列	
配列表配列番号23：HisTag-PTD-MITFのAタイプN末領域（1-305）からなる融合蛋白質のアミノ酸配列	
配列表配列番号24：その塩基配列	
配列表配列番号25：プライマーHLHF	
配列表配列番号26：プライマーpTD3-MITFa	
配列表配列番号27：プライマーMITFR-N	

【0114】

SEQUENCE LISTING

<110> MITSUBISHI PHARMA CORPORATION

<120> AGENT FOR INDUCING APOPTOSIS OF MAST CELL

<130> RK02006

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 415

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> MITF ni mutant

<400> 1

Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro

1

5

10

15

Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr

20

25

30

Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser

35

40

45

Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly

50

55

60

Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn

65

70

75

80

Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu
85 90 95

Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln
100 105 110

Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn
115 120 125

Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr
130 135 140

Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu
145 150 155 160

Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro
165 170 175

Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Ala Cys Ile Phe Pro Thr Glu Ser Glu
180 185 190

Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu
195 200 205

Ile Glu Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly
210 215 220

Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly
225 230 235 240

Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu
245 250 255

Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His
260 265 270

Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala
275 280 285

10

20

30

40

Arg Ala His Gly Leu Ser Leu Ile Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro
 290 295 300

Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile Lys Gln Glu Pro Val Leu Glu Asn Cys
 305 310 315 320

Ser Gln Glu Leu Val Gln His Gln Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr
 325 330 335

Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr Ile Thr Phe Thr Asn Asn Leu Gly Thr
 340 345 350

Met Pro Glu Ser Ser Pro Ala Tyr Ser Ile Pro Arg Lys Met Gly Ser
 355 360 365

Asn Leu Glu Asp Ile Leu Met Asp Asp Ala Leu Ser Pro Val Gly Val
 370 375 380

Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser Val Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser
 385 390 395 400

Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser Ala Glu Glu Thr Glu His Ala Cys
 405 410 415

10

20

30

40

<210> 2

<211> 1248

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> DNA coding MITF mi mutant

<200>

<221> CDS

<222> (1)..(1248)

<400> 2

atg cta gaa tac agt cac tac cag gtg cag acc cac ctg gaa aac ccc 48

Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro

1

5

10

15

acc aag tac cac ata cag caa gct cag agg cac cag gta aag cag tac 96

Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr

20

25

30

ctt tct acc act tta gca aat aaa cat gcc agc caa gtc ctg agc tca 144

Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser

35

40

45

cca tgt cca aac cag cct ggc gac cat gcc atg cca cca gtg ccg ggg 192

Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly

50

55

60

agc agc gca ccc aac agc cct atg gct atg ctc act ctt aac tcc aac 240

Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn

65

70

75

80

tgt gaa aaa gag gca ttt tat aag ttt gag gag cag agc agg gca gag 288

Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu

10

20

30

40

85

90

95

agt gag tgc cca ggt atg aac acg cac tct cga gcg tgc tgc atg cag 336

Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln

100

105

110

atg gat gat gta att gat gac atc atc agc ctg gaa tca agt tat aat 384

Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn

115

120

125

gaa gaa att ttg ggc ttg atg gat ccg gcc ttg caa atg gca aat acg 432

Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr

130

135

140

tta ccc gtc tct gga aac ttg atc gac ctc tac agc aac cag ggc ctg 480

Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu

145

150

155

160

cca ccg cca ggc ctt acc atc agc aac tcc tgt cca gcc aac ctt ccc 528

Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro

165

170

175

aac ata aaa agg gag ctc aca gcg tgt att ttc ccc aca gag tct gaa 576

Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Ala Cys Ile Phe Pro Thr Glu Ser Glu

180

185

190

gca aga gca ttg gct aaa gag agg cag aaa aag gac aat cac aac ttg 624

Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu

195

200

205

10

20

30

40

att gaa cga aga aga ttt aac ata aac gac cgc att aag gag cta ggt 672
 Ile Glu Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly
 210 215 220

act ctg atc ccc aag tca aat gat cca gac atg cgg tgg aac aag gga 720
 Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly
 225 230 235 240

10

acc att ctc aag gcc tct gtg gac tac atc cgg aag ttg caa cgg gaa 768
 Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu
 245 250 255

cag caa cga gct aag gac ctt gaa aac cga cag aag aag ctg gag cat 816
 Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His
 260 265 270

20

gcg aac cgg cac ctg ctg ctc aga gta cag gag ctg gag atg cag gct 864
 Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala
 275 280 285

30

aga gcg cat gga ctt tcc ctt atc cca tcc acc ggt ctc tgc tcg cct 912
 Arg Ala His Gly Leu Ser Leu Ile Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro
 290 295 300

gat ctg gtg aat cgg atc atc aag caa gaa cca gtt ctt gag aac tgc 960
 Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile Lys Gln Glu Pro Val Leu Glu Asn Cys
 305 310 315 320

40

agc cag gaa ctt gta cag cac cag gca gac ctg aca tgt acg aca act 1008
 Ser Gln Glu Leu Val Gln His Gln Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr
 325 330 335

ctg gat ctc acg gac ggt acc atc acc ttt acc aac aac ctc ggc acc 1056
 Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr Ile Thr Phe Thr Asn Asn Leu Gly Thr
 340 345 350

10

atg ccg gag agc agc ccg gcc tac agc atc ccc agg aag atg ggc tcc 1104
 Met Pro Glu Ser Ser Pro Ala Tyr Ser Ile Pro Arg Lys Met Gly Ser
 355 360 365

aac ttg gaa gac atc ctg atg gac gat gcc ctc tca cct gtt gga gtc 1152
 Asn Leu Glu Asp Ile Leu Met Asp Asp Ala Leu Ser Pro Val Gly Val
 370 375 380

20

acc gac cca ctg ctg tca tca gtg tcg cca gga gct tca aaa aca agc 1200
 Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser Val Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser
 385 390 395 400

agc cgg agg agc agt atg agc gca gaa gaa acg gag cat gcg tgt tag 1248
 Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser Ala Glu Glu Thr Glu His Ala Cys
 405 410 415

30

<210> 3

<211> 410

<212> PRT

40

<213> Mus musculus

<220>

<223> MITF wh mutant

<400> 3

Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr
 20 25 30

Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser
 35 40 45

Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly
 50 55 60

Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn
 65 70 75 80

Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu
 85 90 95

Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln
 100 105 110

Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn
 115 120 125

Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr

10

20

30

40

130

135

140

Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu
 145 150 155 160

Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro
 165 170 175

10

Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys
 180 185 190

Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Asn Glu Arg Arg Arg Arg
 195 200 205

20

Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys
 210 215 220

Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala
 225 230 235 240

Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys
 245 250 255

30

Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu
 260 265 270

Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu
 275 280 285

40

Ser Leu Ile Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg
 290 295 300

Ile Ile Lys Gln Glu Pro Val Leu Glu Asn Cys Ser Gln Glu Leu Val
 305 310 315 320

Gln His Gln Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp
 325 330 335

10

Gly Thr Ile Thr Phe Thr Asn Asn Leu Gly Thr Met Pro Glu Ser Ser
 340 345 350

Pro Ala Tyr Ser Ile Pro Arg Lys Met Gly Ser Asn Leu Glu Asp Ile
 355 360 365

20

Leu Met Asp Asp Ala Leu Ser Pro Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu
 370 375 380

Ser Ser Val Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser
 385 390 395 400

30

Met Ser Ala Glu Glu Thr Glu His Ala Cys
 405 410

<210> 4

<211> 1233

<212> DNA

40

<213> Mus musculus

<220>

<223> DNA coding MITF wh mutant

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1233)

<400> 4

atg cta gaa tac agt cac tac cag gtg cag acc cac ctg gaa aac ccc 48
 Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro
 1 5 10 15

acc aag tac cac ata cag caa gct cag agg cac cag gta aag cag tac 96
 Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr
 20 25 30

ctt tct acc act tta gca aat aaa cat gcc agc caa gtc ctg agc tca 144
 Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser
 35 40 45

cca tgt cca aac cag cct ggc gac cat gcc atg cca cca gtg ccg ggg 192
 Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly
 50 55 60

agc agc gca ccc aac agc cct atg gct atg ctc act ctt aac tcc aac 240
 Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn
 65 70 75 80

tgt gaa aaa gag gca ttt tat aag ttt gag gag cag agc agg gca gag 288
 Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu

10

20

30

40

85

90

95

agt gag tgc cca ggt atg aac acg cac tct cga gcg tgc tgc atg cag 336

Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln

100

105

110

atg gat gat gta att gat gac atc atc agc ctg gaa tca agt tat aat 384

Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn

115

120

125

gaa gaa att ttg ggc ttg atg gat ccg gcc ttg caa atg gca aat acg 432

Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr

130

135

140

tta ccc gtc tct gga aac ttg atc gac ctc tac agc aac cag ggc ctg 480

Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu

145

150

155

160

cca ccg cca ggc ctt acc atc agc aac tcc tgt cca gcc aac ctt ccc 528

Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro

165

170

175

aac ata aaa agg gag ctc aca gag tct gaa gca aga gca ttg gct aaa 576

Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys

180

185

190

gag agg cag aaa aag gac aat cac aac ttg aat gaa cga aga aga aga 624

Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Asn Glu Arg Arg Arg Arg

195

200

205

10

20

30

40

ttt aac ata aac gac cgc att aag gag cta ggt act ctg atc ccc aag 672
 Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys
 210 215 220

tca aat gat cca gac atg cgg tgg aac aag gga acc att ctc aag gcc 720
 Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala
 225 230 235 240

tct gtg gac tac atc cgg aag ttg caa cgg gaa cag caa cga gct aag 768
 Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys
 245 250 255

gac ctt gaa aac cga cag aag aag ctg gag cat gcg aac cgg cac ctg 816
 Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu
 260 265 270

ctg ctc aga gta cag gag ctg gag atg cag gct aga gcg cat gga ctt 864
 Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu
 275 280 285

tcc ctt atc cca tcc acc ggt ctc tgc tcg cct gat ctg gtg aat cgg 912
 Ser Leu Ile Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg
 290 295 300

atc atc aag caa gaa cca gtt ctt gag aac tgc agc cag gaa ctt gta 960
 Ile Ile Lys Gln Glu Pro Val Leu Glu Asn Cys Ser Gln Glu Leu Val
 305 310 315 320

10

20

30

40

cag cac cag gca gac ctg aca tgt acg aca act ctg gat ctc acg gac 1008
 Gln His Gln Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp
 325 330 335

ggc acc atc acc ttt acc aac aac ctc ggc acc atg ccg gag agc agc 1056
 Gly Thr Ile Thr Phe Thr Asn Asn Leu Gly Thr Met Pro Glu Ser Ser
 340 345 350

10

ccg gcc tac agc atc ccc agg aag atg ggc tcc aac ttg gaa gac atc 1104
 Pro Ala Tyr Ser Ile Pro Arg Lys Met Gly Ser Asn Leu Glu Asp Ile
 355 360 365

ctg atg gac gat gcc ctc tca cct gtt gga gtc acc gac cca ctg ctg 1152
 Leu Met Asp Asp Ala Leu Ser Pro Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu
 370 375 380

20

tca tca gtg tcg cca gga gct tca aaa aca agc agc cgg agg agc agt 1200
 Ser Ser Val Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser
 385 390 395 400

atg agc gca gaa gaa acg gag cat gcg tgt tag 1233
 Met Ser Ala Glu Glu Thr Glu His Ala Cys
 405 410

30

<210> 5

<211> 91

<212> PRT

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MITF bHLH-Zip fragment

<400> 5

Met Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr
20 25 30

Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr
35 40 45

Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln
50 55 60

Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala
65 70 75 80

Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu
85 90

<210> 6

<211> 276

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding MITF bHLH-Zip fragment

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(276)

<400> 6

atg ttg gct aaa gag agg cag aaa aag gac aat cac aac ttg att gaa 48
 Met Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu
 1 5 10 15

10

cga aga aga aga ttt aac ata aac gac cgc att aag gag cta ggt act 96
 Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr
 20 25 30

ctg atc ccc aag tca aat gat cca gac atg cgg tgg aac aag gga acc 144
 Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr
 35 40 45

20

att ctc aag gcc tct gtg gac tac atc cgg aag ttg caa cgg gaa cag 192
 Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln
 50 55 60

30

caa cga gct aag gac ctt gaa aac cga cag aag aag ctg gag cat gcg 240
 Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala
 65 70 75 80

aac cgg cac ctg ctg ctc aga gta cag gag ctg tag 276
 Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu
 85 90

40

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TAT-derived peptide

<400> 7

10

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

10

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding TAT-derived peptide

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 8

20

30

tat ggc agg aag aag cgg aga cag cga cga aga

33

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

10

40

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HisTag

<400> 9

10

Met Gly Gly Ser His His His His His His

1

5

10

<210> 10

<211> 30

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding HisTag

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(30)

30

<400> 10

atg ~~ggg~~ ggt tct cat cat cat cat cat cat

30

Met Gly Gly Ser His His His His His His

1

5

10

40

<210> 11

<211> 439

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fused protein composing of HisTag-PTD-MITF mi mutant

<400> 11

Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys
1 5 10 15

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln
20 25 30

Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala
35 40 45

Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys
50 55 60

His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp
65 70 75 80

His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met
85 90 95

Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys
100 105 110

Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr

10

20

30

40

115	120	125
His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile		
130	135	140
Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp		
145	150	155 160
Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile		
165	170	175
Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser		
180	185	190
Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Ala		
195	200	205
Cys Ile Phe Pro Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg		
210	215	220
Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Phe Asn Ile		
225	230	235 240
Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp		
245	250	255
Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp		
260	265	270

10

20

30

40

Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu
 275 280 285

Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg
 290 295 300

Val Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu Ser Leu Ile
 305 310 315 320

10

Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile Lys
 325 330 335

Gln Glu Pro Val Leu Glu Asn Cys Ser Gln Glu Leu Val Gln His Gln
 340 345 350

20

Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr Ile
 355 360 365

Thr Phe Thr Asn Asn Leu Gly Thr Met Pro Glu Ser Ser Pro Ala Tyr
 370 375 380

30

Ser Ile Pro Arg Lys Met Gly Ser Asn Leu Glu Asp Ile Leu Met Asp
 385 390 395 400

Asp Ala Leu Ser Pro Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser Val
 405 410 415

Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser Ala
 420 425 430

40

Glu Glu Thr Glu His Ala Cys
435

<210> 12

<211> 1320

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding the fused protein composing of HisTag-PTD-MITF mi mutant

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1320)

<400> 12

atg ggg ggt tct cat cat cat cat cat cat ggt ggt tat ggc agg aag 48
Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys
1 5 10 15

aag cgg aga cag cga cga aga ggt atg cta gaa tac agt cac tac cag 96
Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln
20 25 30

gtg cag acc cac ctg gaa aac ccc acc aag tac cac ata cag caa gct 144
Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala
35 40 45

10

20

30

40

cag agg cac cag gta aag cag tac ctt tct acc act tta gca aat aaa 192
 Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys
 50 55 60

cat gcc agc caa gtc ctg agc tca cca tgt cca aac cag cct ggc gac 240
 His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp
 65 70 75 80

10

cat gcc atg cca cca gtg ccg ggg agc agc gca ccc aac agc cct atg 288
 His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met
 85 90 95

gct atg ctc act ctt aac tcc aac tgt gaa aaa gag gca ttt tat aag 336
 Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys
 100 105 110

20

ttt gag gag cag agc agg gca gag agt gag tgc cca ggt atg aac acg 384
 Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr
 115 120 125

cac tct cga gcg tcg tgc atg cag atg gat gat gta att gat gac atc 432
 His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile
 130 135 140

30

atc agc ctg gaa tca agt tat aat gaa gaa att ttg ggc ttg atg gat 480
 Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp
 145 150 155 160

40

ccg gcc ttg caa atg gca aat acg tta ccc gtc tct gga aac ttg atc 528

Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile
 165 170 175

gac ctc tac agc aac cag ggc ctg cca ccg cca ggc ctt acc atc agc 576
 Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser
 180 185 190

aac tcc tgt cca gcc aac ctt ccc aac ata aaa agg gag ctc aca gcg 624
 Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Ala
 195 200 205

tgt att ttc ccc aca gag tct gaa gca aga gca ttg gct aaa gag agg 672
 Cys Ile Phe Pro Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg
 210 215 220

cag aaa aag gac aat cac aac ttg att gaa cga aga aga ttt aac ata 720
 Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Phe Asn Ile
 225 230 235 240

aac gac cgc att aag gag cta ggt act ctg atc ccc aag tca aat gat 768
 Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp
 245 250 255

cca gac atg cgg tgg aac aag gga acc att ctc aag gcc tct gtg gac 816
 Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp
 260 265 270

tac atc cgg aag ttg caa cgg gaa cag caa cga gct aag gac ctt gaa 864
 Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu

10

20

30

40

275	280	285		
aac cga cag aag aag ctg gag cat gcg aac cgg cac ctg ctg ctc aga	912			
Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg				
290	295	300		
gta cag gag ctg gag atg cag gct aga gcg cat gga ctt tcc ctt atc	960			10
Val Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu Ser Leu Ile				
305	310	315	320	
cca tcc acc ggt ctc tgc tgc cct gat ctg gtg aat cgg atc atc aag	1008			
Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile Lys				
325	330	335		20
caa gaa cca gtt ctt gag aac tgc agc cag gaa ctt gta cag cac cag	1056			
Gln Glu Pro Val Leu Glu Asn Cys Ser Gln Glu Leu Val Gln His Gln				
340	345	350		
gca gac ctg aca tgt acg aca act ctg gat ctc acg gac ggt acc atc	1104			
Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr Ile				
355	360	365		30
acc ttt acc aac aac ctc ggc acc atg ccg gag agc agc ccg gcc tac	1152			
Thr Phe Thr Asn Asn Leu Gly Thr Met Pro Glu Ser Ser Pro Ala Tyr				
370	375	380		
agc atc ccc agg aag atg ggc tcc aac ttg gaa gac atc ctg atg gac	1200			
Ser Ile Pro Arg Lys Met Gly Ser Asn Leu Glu Asp Ile Leu Met Asp				40
385	390	395	400	

gat gcc ctc tca cct gtt gga gtc acc gac cca ctg ctg tca tca gtg 1248
 Asp Ala Leu Ser Pro Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser Val
 405 410 415

tcg cca gga gct tca aaa aca agc agc cgg agg agc agt atg agc gca 1296
 Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser Ala
 420 425 430

10

gaa gaa acg gag cat gcg tgt tag 1320
 Glu Glu Thr Glu His Ala Cys
 435 440

20

<210> 13

<211> 434

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fused protein composing of HisTag-PTD-MITF wh mutant

<400> 13

30

Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln
 20 25 30

40

Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala

35

40

45

Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys
 50 55 60

His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp
 65 70 75 80

10

His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met
 85 90 95

Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys
 100 105 110

20

Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr
 115 120 125

His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile
 130 135 140

Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp
 145 150 155 160

30

Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile
 165 170 175

Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser
 180 185 190

40

Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Glu
 195 200 205

Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His
 210 215 220

Asn Leu Asn Glu Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys
 225 230 235 240

10

Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp
 245 250 255

Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu
 260 265 270

20

Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys
 275 280 285

Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu Glu
 290 295 300

30

Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu Ser Leu Ile Pro Ser Thr Gly Leu
 305 310 315 320

Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile Lys Gln Glu Pro Val Leu
 325 330 335

Glu Asn Cys Ser Gln Glu Leu Val Gln His Gln Ala Asp Leu Thr Cys
 340 345 350

40

Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr Ile Thr Phe Thr Asn Asn
355 360 365

Leu Gly Thr Met Pro Glu Ser Ser Pro Ala Tyr Ser Ile Pro Arg Lys
370 375 380

Met Gly Ser Asn Leu Glu Asp Ile Leu Met Asp Asp Ala Leu Ser Pro
385 390 395 400

Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser Val Ser Pro Gly Ala Ser
405 410 415

Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser Ala Glu Glu Thr Glu His
420 425 430

Ala Cys

<210> 14

<211> 1305

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding the fused protein composing of HisTag-PTD-MITF wh mutan
t

<220>

<221> CDS

10

20

30

40

<222> (1)..(1305)

<400> 14

atg ggg ggt tct cat cat cat cat cat cat ggt ggt tat ggc agg aag 48
 Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys
 1 5 10 15

aag cgg aga cag cga cga aga ggt atg cta gaa tac agt cac tac cag 96
 Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Leu Glu Tyr Ser His Tyr Gln
 20 25 30

gtg cag acc cac ctg gaa aac ccc acc aag tac cac ata cag caa gct 144
 Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala
 35 40 45

cag agg cac cag gta aag cag tac ctt tct acc act tta gca aat aaa 192
 Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys
 50 55 60

cat gcc agc caa gtc ctg agc tca cca tgt cca aac cag cct ggc gac 240
 His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp
 65 70 75 80

cat gcc atg cca cca gtg ccg ggg agc agc gca ccc aac agc cct atg 288
 His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met
 85 90 95

gct atg ctc act ctt aac tcc aac tgt gaa aaa gag gca ttt tat aag 336
 Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys

10

20

30

40

100	105	110		
ttt gag gag cag agc agg gca gag agt gag tgc cca ggt atg aac acg	384			
Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr				
115	120	125		
cac tct cga gcg tcg tgc atg cag atg gat gat gta att gat gac atc	432			10
His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile				
130	135	140		
atc agc ctg gaa tca agt tat aat gaa gaa att ttg ggc ttg atg gat	480			
Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp				
145	150	155	160	
				20
ccg gcc ttg caa atg gca aat acg tta ccc gtc tct gga aac ttg atc	528			
Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile				
165	170	175		
gac ctc tac agc aac cag ggc ctg cca ccg cca ggc ctt acc atc agc	576			
Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser				
180	185	190		30
aac tcc tgt cca gcc aac ctt ccc aac ata aaa agg gag ctc aca gag	624			
Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Glu				
195	200	205		
tct gaa gca aga gca ttg gct aaa gag agg cag aaa aag gac aat cac	672			
Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His				40
210	215	220		

aac ttg aat gaa cga aga aga aga ttt aac ata aac gac cgc att aag 720
 Asn Leu Asn Glu Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys
 225 230 235 240

gag cta ggt act ctg atc ccc aag tca aat gat cca gac atg cgg tgg 768
 Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp
 245 250 255

aac aag gga acc att ctc aag gcc tct gtg gac tac atc cgg aag ttg 816
 Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu
 260 265 270

caa cgg gaa cag caa cga gct aag gac ctt gaa aac cga cag aag aag 864
 Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys
 275 280 285

ctg gag cat gcg aac cgg cac ctg ctg ctc aga gta cag gag ctg gag 912
 Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val Gln Glu Leu Glu
 290 295 300

atg cag gct aga gcg cat gga ctt tcc ctt atc cca tcc acc ggt ctc 960
 Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu Ser Leu Ile Pro Ser Thr Gly Leu
 305 310 315 320

tgc tcg cct gat ctg gtg aat cgg atc atc aag caa gaa cca gtt ctt 1008
 Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile Lys Gln Glu Pro Val Leu
 325 330 335

10

20

30

40

gag aac tgc agc cag gaa ctt gta cag cac cag gca gac ctg aca tgt 1056
 Glu Asn Cys Ser Gln Glu Leu Val Gln His Gln Ala Asp Leu Thr Cys
 340 345 350

acg aca act ctg gat ctc acg gac ggt acc atc acc ttt acc aac aac 1104
 Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr Ile Thr Phe Thr Asn Asn
 355 360 365

10

ctc ggc acc atg ccg gag agc agc ccg gcc tac agc atc ccc agg aag 1152
 Leu Gly Thr Met Pro Glu Ser Ser Pro Ala Tyr Ser Ile Pro Arg Lys
 370 375 380

atg ggc tcc aac ttg gaa gac atc ctg atg gac gat gcc ctc tca cct 1200
 Met Gly Ser Asn Leu Glu Asp Ile Leu Met Asp Asp Ala Leu Ser Pro
 385 390 395 400

20

gtt gga gtc acc gac cca ctg ctg tca tca gtg tcg cca gga gct tca 1248
 Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser Val Ser Pro Gly Ala Ser
 405 410 415

aaa aca agc agc cgg agg agc agt atg agc gca gaa gaa acg gag cat 1296
 Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser Ala Glu Glu Thr Glu His
 420 425 430

30

gcg tgt tag 1305
 Ala Cys
 435

40

<210> 15

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fused protein composing of HisTag-PTD-MITF bHLH-Zip fragment

<400> 15

Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys
1 5 10 15

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys
20 25 30

Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn
35 40 45

Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro
50 55 60

Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr
65 70 75 80

Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn
85 90 95

Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val
100 105 110

10

20

30

40

Gln Glu Leu
115

<210> 16

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding the fused protein composing of HisTag-PTD-MITF bHLH-Zip
fragment

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(345)

<400> 16

atg ggg ggt tct cat cat cat cat cat cat ggt ggt tat ggc agg aag 48
Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys
1 5 10 15

aag cgg aga cag cga cga aga ggt atg ttg gct aaa gag agg cag aaa 96
Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys
20 25 30

aag gac aat cac aac ttg att gaa cga aga aga aga ttt aac ata aac 144
Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn
35 40 45

gac cgc att aag gag cta ggt act ctg atc ccc aag tca aat gat cca 192

10

20

30

40

Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro
 50 55 60

gac atg cgg tgg aac aag gga acc att ctc aag gcc tct gtg gac tac 240
 Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr
 65 70 75 80

atc cgg aag ttg caa cgg gaa cag caa cga gct aag gac ctt gaa aac 288
 Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Asp Leu Glu Asn
 85 90 95

cga cag aag aag ctg gag cat gcg aac cgg cac ctg ctg ctc aga gta 336
 Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Val
 100 105 110

cag gag ctg tag 348
 Gln Glu Leu
 115

<210> 17

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer M-tat

<400> 17

gcgacgaaga ggtatgctag aatacagtca ctacc 35

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer tat 3

<400> 18

10

ggcaggaaga agcggagaca gcgacgaaga ggtatg

36

<210> 19

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer tat 2

<400> 19

20

atcatcatca tggtaggttat ggcaggaaga agcgg

35

30

<210> 20

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Primer tat 1

<400> 20

taaaccatgg ggggttctca tcatcatcat catcatggtg

40

<210> 21

10

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MITF A-type N-terminal region(1-305)

<400> 21

20

Met Gln Ser Glu Ser Gly Ile Val Ala Asp Phe Glu Val Gly Glu Glu

1

5

10

15

Phe His Glu Glu Pro Lys Thr Tyr Tyr Glu Leu Lys Ser Gln Pro Leu

20

25

30

Lys Ser Ser Ser Ser Ala Glu His Ser Gly Ala Ser Lys Pro Pro Leu

30

35

40

45

Ser Ser Ser Thr Met Thr Ser Arg Ile Leu Leu Arg Gln Gln Leu Met

50

55

60

Arg Glu Gln Met Gln Glu Gln Glu Arg Arg Glu Gln Gln Gln Lys Leu

40

65

70

75

80

Gln Ala Ala Gln Phe Met Gln Gln Arg Val Ala Val Ser Gln Thr Pro
 85 90 95

Ala Ile Asn Val Ser Val Pro Thr Thr Leu Pro Ser Ala Thr Gln Val
 100 105 110

Pro Met Glu Val Leu Lys Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys
 115 120 125

10

Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser
 130 135 140

Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys
 145 150 155 160

20

Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser
 165 170 175

Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu
 180 185 190

30

Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu
 195 200 205

Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp
 210 215 220

Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu
 225 230 235 240

40

Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro
 245 250 255

Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro
 260 265 270

Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile
 275 280 285

Lys Arg Glu Leu Thr Ala Cys Ile Phe Pro Thr Glu Ser Glu Ala Arg
 290 295 300

Ala
 305

<210> 22

<211> 918

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding MITF A-type N-terminal region(1-305)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(918)

<400> 22

atg cag tcc gaa tcc gga atc gtg gcg gat ttc gaa gtc ggg gag gag 48

Met Gln Ser Glu Ser Gly Ile Val Ala Asp Phe Glu Val Gly Glu Glu
 1 5 10 15

ttt cac gaa gaa ccc aaa acc tat tac gaa ctc aaa agt caa cct ctg 96
 Phe His Glu Glu Pro Lys Thr Tyr Tyr Glu Leu Lys Ser Gln Pro Leu
 20 25 30

aag agc agc agt tct gca gag cat tct ggg gcc tcc aag cct ccg tta 144
 Lys Ser Ser Ser Ser Ala Glu His Ser Gly Ala Ser Lys Pro Pro Leu
 35 40 45

agc tcc tcc act atg aca tca cgc atc ttg cta cgc cag caa ctc atg 192
 Ser Ser Ser Thr Met Thr Ser Arg Ile Leu Leu Arg Gln Gln Leu Met
 50 55 60

cgt gag cag atg cag gag cag gag cgc agg gag cag cag cag aag ctg 240
 Arg Glu Gln Met Gln Glu Gln Glu Arg Arg Glu Gln Gln Gln Lys Leu
 65 70 75 80

cag gca gcc cag ttc atg caa cag aga gtg gcc gtg agt cag aca cca 288
 Gln Ala Ala Gln Phe Met Gln Gln Arg Val Ala Val Ser Gln Thr Pro
 85 90 95

gcc ata aac gtc agc gtg ccc acc acc ctt ccc tct gcc acc cag gtg 336
 Ala Ile Asn Val Ser Val Pro Thr Thr Leu Pro Ser Ala Thr Gln Val
 100 105 110

ccg atg gaa gtc ctt aag gtg cag acc cac ctg gaa aac ccc acc aag 384
 Pro Met Glu Val Leu Lys Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys

10

20

30

40

115	120	125		
tac cac ata cag caa gct cag agg cac cag gta aag cag tac ctt tct	432			
Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser				
130	135	140		
acc act tta gca aat aaa cat gcc agc caa gtc ctg agc tca cca tgt	480			10
Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys				
145	150	155	160	
cca aac cag cct ggc gac cat gcc atg cca cca gtg ccg ggg agc agc	528			
Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser				
165	170	175		
				20
gca ccc aac agc cct atg gct atg ctc act ctt aac tcc aac tgt gaa	576			
Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu				
180	185	190		
aaa gag gca ttt tat aag ttt gag gag cag agc agg gca gag agt gag	624			
Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu				
195	200	205		30
igc cca ggt atg aac acg cac tct cga gcg tcg tgc atg cag atg gat	672			
Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp				
210	215	220		
gat gta att gat gac atc atc agc ctg gaa tca agt tat aat gaa gaa	720			
Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu				40
225	230	235	240	

att ttg ggc ttg atg gat ccg gcc ttg caa atg gca aat acg tta ccc 768
 Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro
 245 250 255

gtc tct gga aac ttg atc gac ctc tac agc aac cag ggc ctg cca ccg 816
 Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro
 260 265 270

10

cca ggc ctt acc atc agc aac tcc tgt cca gcc aac ctt ccc aac ata 864
 Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile
 275 280 285

aaa agg gag ctc aca gcg tgt att ttc ccc aca gag tct gaa gca aga 912
 Lys Arg Glu Leu Thr Ala Cys Ile Phe Pro Thr Glu Ser Glu Ala Arg
 290 295 300

20

gca tga 918
 Ala
 305

30

<210> 23

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fused protein composing of HisTag-PTD-MITF A-type N-terminal regio
 n(1-305)

40

〈400〉 23

Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Gln Ser Glu Ser Gly Ile Val
 20 25 30

10

Ala Asp Phe Glu Val Gly Glu Glu Phe His Glu Glu Pro Lys Thr Tyr
 35 40 45

Tyr Glu Leu Lys Ser Gln Pro Leu Lys Ser Ser Ser Ser Ala Glu His
 50 55 60

20

Ser Gly Ala Ser Lys Pro Pro Leu Ser Ser Ser Thr Met Thr Ser Arg
 65 70 75 80

Ile Leu Leu Arg Gln Gln Leu Met Arg Glu Gln Met Gln Glu Gln Glu
 85 90 95

Arg Arg Glu Gln Gln Gln Lys Leu Gln Ala Ala Gln Phe Met Gln Gln
 100 105 110

30

Arg Val Ala Val Ser Gln Thr Pro Ala Ile Asn Val Ser Val Pro Thr
 115 120 125

Thr Leu Pro Ser Ala Thr Gln Val Pro Met Glu Val Leu Lys Val Gln
 130 135 140

40

Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg
 145 150 155 160

His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala
 165 170 175

Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala
 180 185 190

10

Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met
 195 200 205

Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu
 210 215 220

20

Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser
 225 230 235 240

Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser
 245 250 255

30

Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala
 260 265 270

Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu
 275 280 285

Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser
 290 295 300

40

Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Ala Cys Ile
 305 310 315 320

Phe Pro Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala
 325

10

<210> 24

<211> 990

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding the fused protein composing of HisTag-PTD-MITF A-type N
 -terminal region(1-305)

20

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(990)

<400> 24

atg ggg ggt tct cat cat cat cat cat cat ggt ggt tat ggc agg aag 48
 Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Gly Tyr Gly Arg Lys
 1 5 10 15

30

aag cgg aga cag cga cga aga ggt atg cag tcc gaa tcg gga atc gtg 96
 Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Gln Ser Glu Ser Gly Ile Val
 20 25 30

40

gcg gat ttc gaa gtc ggg gag gag ttt cac gaa gaa ccc aaa acc tat 144

Ala Asp Phe Glu Val Gly Glu Glu Phe His Glu Glu Pro Lys Thr Tyr
 35 40 45

tac gaa ctc aaa agt caa cct ctg aag agc agc agt tct gca gag cat 192
 Tyr Glu Leu Lys Ser Gln Pro Leu Lys Ser Ser Ser Ser Ala Glu His
 50 55 60

tct ggg gcc tcc aag cct ccg tta agc tcc tcc act atg aca tca cgc 240
 Ser Gly Ala Ser Lys Pro Pro Leu Ser Ser Ser Thr Met Thr Ser Arg
 65 70 75 80

atc ttg cta cgc cag caa ctc atg cgt gag cag atg cag gag cag gag 288
 Ile Leu Leu Arg Gln Gln Leu Met Arg Glu Gln Met Gln Glu Gln Glu
 85 90 95

cgc agg gag cag cag cag aag ctg cag gca gcc cag ttc atg caa cag 336
 Arg Arg Glu Gln Gln Gln Lys Leu Gln Ala Ala Gln Phe Met Gln Gln
 100 105 110

aga gtg gcc gtg agt cag aca cca gcc ata aac gtc agc gtg ccc acc 384
 Arg Val Ala Val Ser Gln Thr Pro Ala Ile Asn Val Ser Val Pro Thr
 115 120 125

acc ctt ccc tct gcc acc cag gtg ccg atg gaa gtc ctt aag gtg cag 432
 Thr Leu Pro Ser Ala Thr Gln Val Pro Met Glu Val Leu Lys Val Gln
 130 135 140

acc cac ctg gaa aac ccc acc aag tac cac ata cag caa gct cag agg 480
 Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg

10

20

30

40

145	150	155	160		
cac cag gta aag cag tac ctt tct acc act tta gca aat aaa cat gcc	528				
His Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala					
165	170	175			
agc caa gtc ctg agc tca cca tgt cca aac cag cct ggc gac cat gcc	576			10	
Ser Gln Val Leu Ser Ser Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Ala					
180	185	190			
atg cca cca gtg ccg ggg agc agc gca ccc aac agc cct atg gct atg	624				
Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met					
195	200	205			
				20	
ctc act ctt aac tcc aac tgt gaa aaa gag gca ttt tat aag ttt gag	672				
Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu Lys Glu Ala Phe Tyr Lys Phe Glu					
210	215	220			
gag cag agc agg gca gag agt gag tgc cca ggt atg aac acg cac tct	720				
Glu Gln Ser Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser					
225	230	235	240	30	
cga gcg tcg tgc atg cag atg gat gat gta att gat gac atc atc agc	768				
Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser					
245	250	255			
ctg gaa tca agt tat aat gaa gaa att ttg ggc ttg atg gat ccg gcc	816				
Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala				40	
260	265	270			

ttg caa atg gca aat acg tta ccc gtc tct gga aac ttg atc gac ctc 864
 Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu
 275 280 285

tac agc aac cag ggc ctg cca ccg cca ggc ctt acc atc agc aac tcc 912
 Tyr Ser Asn Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser
 290 295 300

10

tgt cca gcc aac ctt ccc aac ata aaa agg gag ctc aca gcg tgt att 960
 Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile Lys Arg Glu Leu Thr Ala Cys Ile
 305 310 315 320

ttc ccc aca gag tct gaa gca aga gca tga 990
 Phe Pro Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala
 325 330

20

<210> 25

<211> 31

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer HLH F

<400> 25

gagacgaaga ggtatgttgg cttaaagagag g 31

40

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer pTD3-MITFa

<400> 26

10

cgccgcggaa tgcagtcga atcggaatc

30

<210> 27

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer MITFR-N

<400> 27

20

gaattcacta tgctcttgct tcagactctg tgggg

35

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の融合蛋白質（m i 系、w h 系）および当該融合蛋白質を発現するプラスミド p S U 0 8 2（m i 系／p T r c H i s B）、p S U 0 8 3（w h 系／p T r c H i s B）の構造を概略的に示したものである。

【図 2】本発明の融合蛋白質（H L H 系）および当該融合蛋白質を発現するプラスミド p S U 0 8 5（H L H 系／p T r c H i s B）の構造を概略的に示したものである。

【図 3】本発明の融合蛋白質（A タイプ N 末領域）を発現するプラスミド p S U 0 8 7（A タイプ N 末領域／p S U 0 9 3）の構築手順を概略的に示したものである。

【図 4】本発明の融合蛋白質（w h 系）を発現するプラスミド p S U 1 2 1（w h 系／p E T 1 4）の構築手順を概略的に示したものである。

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	A 6 1 K 37/02	

F ターム(参考)	4B024	AA01	AA20	BA80	CA04	CA07	DA06	EA04	GA11	HA03	HA20
	4B064	AG01	CA02	CA19	CC01	CE02	CE06	CE11	CE12	CE20	DA01
	4C084	AA02	AA03	BA01	BA08	BA22	BA23	CA23	CA53	NA14	ZA592
		ZB082	ZB132	ZB212	ZB262						
	4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	BA41	CA40	DA75	EA20	FA74
		GA01	GA10	GA23	GA26						