

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-254699

(P2010-254699A)

(43) 公開日 平成22年11月11日(2010.11.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47 Z N A	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	
審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 52 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-123841 (P2010-123841)	(71) 出願人	506361661
(22) 出願日	平成22年5月31日 (2010. 5. 31)		エスケー コープ
(62) 分割の表示	特願2007-510163 (P2007-510163) の分割		韓国, ソウル, チョンログ, ソリンドン 9 9
原出願日	平成17年4月29日 (2005. 4. 29)	(71) 出願人	506361672
(31) 優先権主張番号	60/566, 966		エファ ウーマンズ ユニバーシティ
(32) 優先日	平成16年4月29日 (2004. 4. 29)		韓国, ソウル, ソデモンク, デヒョンドン
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100088904
(31) 優先権主張番号	60/590, 327		弁理士 庄司 隆
(32) 優先日	平成16年7月21日 (2004. 7. 21)	(74) 代理人	100124453
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 資延 由利子
		(74) 代理人	100135208
			弁理士 大杉 卓也
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 FAS関連因子1 (FASASSOCIATEDFACTOR1)

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 H s c / H s p 7 0、ユビキチン化タンパク質およびバロシン含有タンパク質に結合するタンパク質、および、そのフラグメントの利用。

【解決手段】 H s c / H s p 7 0、ユビキチン化タンパク質およびバロシン含有タンパク質に結合する F a s 関連因子1 (F a s a s s o c i a t e d F a c t o r 1) のポリペプチドフラグメント。ユビキチン化タンパク質を該たんぱく質フラグメントに接触させることによるユビキチン化タンパク質分解の防止方法、および、該たんぱく質フラグメントを用いたサンプル組織および既知の正常組織中の F a s 関連因子1 の発現のアッセイを含む、サンプル組織が癌性であるかを診断する方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ユビキチン化タンパク質、あるいはバロシン含有タンパク質に結合する F a s 関連因子 1 (F a s a s s o c i a t e d F a c t o r 1) のポリペプチドフラグメント。

【請求項 2】

ユビキチン化タンパク質に結合する請求項 1 に記載の F a s 関連因子 1 のポリペプチドフラグメント。

【請求項 3】

F a s 関連因子 1 のユビキチン結合 (U B A) ドメインである請求項 2 に記載のフラグメント。

10

【請求項 4】

F a s 関連因子 1 がヒト F a s 関連因子 1 である請求項 3 に記載のフラグメント。

【請求項 5】

アミノ酸位置約 1 ～約 8 1 から構成される請求項 4 に記載の F a s 関連因子 1 のフラグメント。

【請求項 6】

バロシン含有タンパク質に結合する請求項 1 に記載の F a s 関連因子 1 のポリペプチドフラグメント。

【請求項 7】

F a s 関連因子 1 の U B X (ユビキチン調節 X) ドメインである請求項 6 に記載のフラグメント。

20

【請求項 8】

ユビキチン化タンパク質を請求項 2 に記載のフラグメントに接触させることによるユビキチン化タンパク質分解の防止方法。

【請求項 9】

フラグメントが F a s 関連因子 1 のユビキチン結合 (U B A) ドメインである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

サンプル組織中の F a s 関連因子 1 の発現が比較的少ないことから、該サンプルは癌性であると示唆する、サンプル組織および既知の正常組織中の F a s 関連因子 1 の発現のアクセシを含む、サンプル組織が癌性であるかを診断する方法。

30

【請求項 11】

癌が、癌腫、黒色腫、あるいは肉腫である請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

治療を要する被験者 (体) に請求項 2 に記載の組成物を投与することによる過形成あるいは癌を治療する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

40

1. 発明の属する分野

本発明は、F a s 関連因子 1 (F A F 1) およびそのフラグメントに関する。また、本発明は細胞死領域に関する。更には、本発明は H S P 7 0 のシャペロン活性阻害およびユビキチン化タンパク質の分解阻害に関する。また更に、本発明は細胞死誘導分子のスクリーニング方法に関する。また、本発明は癌診断マーカーに関する。また、本発明は癌治療に関する。更に、本発明は過形成あるいは急速な細胞成長の治療に関する。更には、本発明は F A F 1 活性の阻害による細胞死により生じた疾患の治療に関する。

【背景技術】

【0002】

2. 当技術の一般的背景および水準

50

F a s 関連因子 1 (F A F 1) は、当初マウスを対象とした酵母ツーハイブリッドスクリーニングにおいて、F a s 細胞質領域結合タンパク質として特定された。マウス F A F 1 (m F A F 1) の一過性過剰発現により、L 細胞における F a s 誘導アポトーシスが増加する (Chu et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:11894-11898)。m F A F 1 とは異なり、ヒト F A F 1 (h F A F 1) の場合は、一時的な過剰発現による場合にのみ B O S C 2 3 細胞においてアポトーシスを生じさせる。h F A F 1 は、1 ~ 2 0 1 番目のアミノ酸配列を通じて F a s に結合する (Ryu and Kim-2001, Biochem. Biophys. Res. Commun. 286:1027-1032)。F a s 以外にも、カゼインキナーゼ 2 サブユニット (C K 2) が F A F 1 結合分子として報告されている (Kusk et al., 1999, Mol. Cell. Biochem. 191:51-58)。h F A F 1 は、2 8 9 番目および 2 9 1 番目のセリン残基上で C K 2 によりリン酸化され、アポトーシスが生じると h F A F 1 - C K 2 複合体形成が促される (Jensen et al., 2001, Int. J. Biochem. Cell Biol. 33:577-589; Guerra et al., 2001, Int. J. Oncol. 19:1117-1126)。近年、h F A F 1 は、F A D D およびカスパーゼ - 8 の相互作用による F a s - 細胞死誘導シグナル複合体 (F a s - D I S C) に属することが報告された (Ryu et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:24003-24010)。

10

【0003】

アミノ酸配列解析によると、その他の F a s 関連タンパク質とは異なり、h F A F 1 はデスドメインを含まないが、複数の相同ドメインを含む。2 つのユビキチン相同ドメイン (U b s)、線虫 (C a e n o r h a b d i t i s e l e g a n s) O R F C 2 8 1 . 1 と相同する 1 つの U A S ドメイン、およびユビキチン経路 (U B X) に関わるタンパク質と相同するもう 1 つのドメインである (3) 。

20

【0004】

熱ショックタンパク質 7 0 (H s p 7 0) は、新規合成タンパク質のフォールディング、細胞内タンパク質の移行、オリゴマータンパク構造の合成および分解、変性タンパク質の分解、そして調節タンパク質の活性制御に関わる (Haiti, 1996, Nature 381:571-580; Frydman and H?hfeld, 1997, Trends Biochem. Sci 22:87-92; H?hfeld and Jentsch, 1997, EMBO J. 16:6209-6216; Bukau and Horwich, 1998, Cell 92:351-366)。H s p 7 0 は、様々なシャペロン補助因子あるいはコシャペロンに結合することにより、多様な役割を果たすため、基質タンパク質の運命は、コシャペロンの性質によって決まる。大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i) において、H s p 7 0 ホモログである D n a K は、2 つのコシャペロンに支援されることが示されている。1 つは、基質結合のために高い基質親和性形状を示す D n a J であり、もう 1 つは、基質放出を促す G r p E である (Liberek et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 88:2874-2878; McCarty et al., 1995, J Mol. Biol. 249:126-137)。哺乳類系においては複数のコシャペロンが同定されており、D n a J のホモログである H s p 4 0 / H d j - 1 および H s c 7 0 相互作用タンパク質 (H i p / p 4 8) は、基質タンパク質親和性を高め、変性タンパク質の凝集を防ぐことが示された (Minami et al., 1996, J Biol. Chem. 271:19617-19624; H?hfeld et al., 1995 Cell 83:589-598)。H s c 7 0 - H s p 9 0 構成タンパク質 (H o p / p 6 0 / S t i 1) は、H s c 7 0 のカルボキシ末端ドメインと相互作用し、H s c 7 0 のシャペロン活性に影響をおよぼすことなく、H s c 7 0 - H o p - H s p 9 0 複合体を形成するアダプター分子として働く (Demand et al., 1998, Mol. Cell. Biol. 8:2023-2028; Schumacher et al., 1994, J Biol. Chem., 269:9493-9499; Smith et al., 1993, Mol. Cell. Biol. 13:869-876)。B c l - 2 に結合することにより、抗アポトーシス活性を示すことで知られる B A G - 1 は、H s p 7 0 の A T P アーゼドメインに結合し、H s c 7 0 のシャペロン活性を低下させる (Hoehfeld and Jentsch, 1997, EMBO J. 16:6209-6216; Takayama et al., 1997, EMBO J. 16:4887-4896; Zeiner et al., 1997, EMBO J. 16:5483-5490)。H s c 7 0 相互作用タンパク質 (C H I P) の C 末端は、変性タンパク質に対するリフォールディング作用を阻害する (Ballinger et al., 1999, Mol. Cell. Biol. 19:4535-4545)。C h a p 1 / P L I C - 2 および C h a p 2 / B a t 3 / S c y t h e は、H s p 7 0 ファミリーメンバーの A T P アーゼドメインに結合する (Kaye et al

30

40

50

., 2000, FEBS Lett. 467:348-355)。

【0005】

hFAF1が、熱ショック媒介シグナル伝達経路におけるシャペロンとの結合を通じて、シャペロン活性を制御するか否かが検証された。免疫沈降法を行い、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF MS)を用いて結合タンパク質を同定することにより、hFAF1が新たなHsc70/Hsp70結合タンパク質であることが発見された。hFAF1の一過性の過剰発現により、Hsp70のシャペロン活性が阻害される事実により、hFAF1がHsp70のコシャペロンであることが示唆される。hFAF1は、Hsp70を結合パートナーとして用いることにより、ストレス誘導性の細胞死の制御に関与している可能性がある。

10

【0006】

ユビキチン化経路において、Ub活性化酵素(E1)によりE1のシステインとUbのC末端間にチオエステルを形成することにより、遊離ユビキチンが活性化される。その後チオエステルは、Ub共役酵素(E2)メンバーに転換される。Ubタンパク質リガーゼ(E3)は、基質認識および基質に対するUbライゲーション促進に関与していることが示されてきた。これらのマルチユビキチン標識基質は、26Sプロテアソームにより認識され、分解される(14)。近年、AAAファミリー(様々な細胞活動に関係するATPアーゼ)に属するVCP、およびUBAドメインを含有するタンパク質は、マルチユビキチン化基質に結合し、ユビキチン化後発事象としてそのタンパク質分解を調節することが報告された(33)。hFAF1は、アトポシスおよびユビキチン経路に関わる複数の機能を持つと思われるが、この点に関する役割は明らかになっていない。hFAF1は、複数のユビキチン関連ドメインを有するため、ユビキチン-プロテアソーム経路との関連を究明するための試験が行われた。免疫化学的手法と質量分光分析法とを併用することにより、hFAF1がそのC末端UBXドメインを通じてVCPと結合し、そのN末端UBAドメインを通じてマルチユビキチン化基質を動員することが判明した。hFAF1の一過性過剰発現により、UBAドメインを通じてユビキチン化基質が蓄積され、これらのユビキチン化タンパク質の分解が阻害される。hFAF1は、ユビキチン-プロテアソーム経路に関与し、プロテアソームにおけるユビキチン化タンパク質の分解を調節する。

20

【非特許文献1】Bays, N. W. and Hampton, R. Y. 2002. Cdc48-ufdl-npl4: stuck in the middle with Ub. Curr. Biol. 12: R366-R371.

30

【非特許文献2】Becker, K., Schneider, P., Hofmann, K., Mattmann, C. and Tschopp, J. 1997. Interaction of Fas(Apo-1/CD95) with proteins implicated in the ubiquitination pathway. FEBS Lett. 412: 102-106.

【非特許文献3】Buchberger, A., Howard, M. J., Proctor, M. and Bycroft, M. 2001. The UBX domain: a widespread ubiquitin-like module. J. Mol. Biol. 307: 17-24.

【非特許文献4】Chen, L. and Madura, K. 2002. Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. Mol. Cell. Biol. 22: 4902-4913.

【非特許文献5】Chu, K., Niu, X. and Williams, L. T. A. 1995. Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 11894-11898.

40

【非特許文献6】Dai, R. M. and Li C. C. H. 2001. Valosin-containing protein is a multiubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. Nat. Cell Biol. 3: 740-744.

【非特許文献7】Dai, R. M., Chen, E., Longo, D. L., Gorbe, C. M. and Li C. C. H. 1998. Involvement of valosin-containing protein, an ATPase copurified with I[kappa]B[alpha] and 26S proteasome, in ubiquitin-proteasome mediated degradation of I[kappa]B[alpha]. J. Biol. Chem. 273: 3562-3573.

【非特許文献8】Dantuma, N. P., Lindsten, K., Glas, R., Jellen, M. and Masucci, M. G. 2000. Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome dependent proteolysis in living cells. Nat. Biotechnol. 18: 538-542.

50

- 【非特許文献 9】Doss-Pepe, E. W., Stenroos, E. S., Johnson, W. G. and Madura K. 2003. Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. *Mol. Cell. Biol.* 23: 6469-6483.
- 【非特許文献 10】Finley, D. 2001. Signal transduction. An alternative to destruction. *Nature* 412: 285- 286.
- 【非特許文献 11】Frohlich, T., Risau, W. and Flamme, I. 1998. Characterization of novel nuclear targeting and apoptosis-inducing domains in FAS associated factor 1. *J. Cell Sci.* 111: 2353- 2363.
- 【非特許文献 12】Funakoshi, M., Sasaki, T., Nishimoto, T. and Kobayashi, H. 2002. Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 745-750.
- 【非特許文献 13】Ghislain, M., Dohmen, R., Levy, F. and Varshavsky, A. 1996. Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15: 4884-4899.
- 【非特許文献 14】Hershko, A. and Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425-430.
- 【非特許文献 15】Hofmann, K. and Bucher, P. 1996. The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem. Sci.* 21: 172-173.
- 【非特許文献 16】Johnson, E. S., Ma, P. C. M., Ota, I. M., and Varshavsky, A. 1995. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J. Biol. Chem.* 270: 17442-17456.
- 【非特許文献 17】Kim, H. J., Song, E. J., Lee, Y. S., Kim, E., and Lee, K. J. Human Fas Associated Factor 1 Interacts with Heat Shock Protein 70 and Negatively Regulates Chaperone Activity, unpublished data
- 【非特許文献 18】Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H., Mayer, T. and Jentsch, S. A. 1999. Novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96: 635-644.
- 【非特許文献 19】Kondo, H., Rabouille, C., Newman, R., Levine, T. P., Pappin, D., Freemont, P. and Warren, G. 1997 p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Nature* 388: 75- 78.
- 【非特許文献 20】Lindsten, K., de Vrij F. M., Verhoef, L. G., Fischer, D. F., van Leeuwen, F. W., HoI, E. M., Masucci, M. G. and Dantuma, N. P. 2002. Mutant ubiquitin found in neurodegenerative disorders is a ubiquitin fusion degradation substrate that blocks proteasomal degradation. *J. Cell Biol.* 157: 417-427.
- 【非特許文献 21】Lord, J. M., Ceriotti, A. and Roberts, L. M. 2002. ER dislocation: Cdc48p/p97 gets into the AAAct. *Curr. Biol.* 12: R1 82-R1 84.
- 【非特許文献 22】McBride, W. H, Iwamoto, K. S., Syljuasen, R., Pervan, M. and Pajonk, F. 2003. The role of the ubiquitin/proteasome system in cellular response to radiation. *Oncogene* 22: 5755-5773.
- 【非特許文献 23】Meyer, H. H., Shorter, J. G., Seemann, J., Pappin, D. and Warren, G. 2000. Complex of mammalian Ufd1 and Npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *EMBO J.* 19: 2181-2192.
- 【非特許文献 24】Meyer, H. H., Wang, Y. and Warren G. 2002. Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4.. *EMBO J.* 21: 5645-5652.
- 【非特許文献 25】Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Poulaki, V., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., Libermann, T. A., Treon, S. P., Munshi, N. C, Richardson, P. G., Hideshima, T. and Anderson, K. C. 2002. Molecular s

equelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 14374-14379.

【非特許文献 2 6】Moir, D., Stewart, S., Osmond, B. and Bostein, D. 1982. Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties and pseudo reversion studies. *Genetics* 100: 547-564.

【非特許文献 2 7】Mueller, T. D. and Feigon, J. 2002. Solution structures of UBA domains reveal a conserved hydrophobic surface for protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* 319: 1243-1255.

【非特許文献 2 8】Orlowski, R. Z. 1999. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6: 303-313.

【非特許文献 2 9】Park, M. Y., Jang, H. D., Lee, S. Y., Lee, K. J., and Kim, E. 2004. Fas-associated Factor-1 inhibits nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity by interfering with nuclear translocation of the RelA (p65) subunit of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 279: 2544-2549.

【非特許文献 3 0】Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C, Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. and Gygi, S. P. 2003. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* 8: 921-926.

【非特許文献 3 1】Pickart, C. M. 2001. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol. Cell.* 8: 499-504.

【非特許文献 3 2】Raasi, S. and Pickart, C. M. 2003. Rad23 UBA domains inhibit 26S proteasome-catalyzed proteolysis by sequestering lysine48-linked polyubiquitin chains. *J. Biol. Chem.* 278: 8951-8959.

【非特許文献 3 3】Rabouille, C, Kondo, H., Newman, R., Hui, N., Freemont, P. and Warren, G. 1998. Syntaxin 5 is a common component of the NSF-and p97-mediated reassembly pathways of golgi cisternae from mitotic golgi fragments in vitro. *Cell* 92: 603-610.

【非特許文献 3 4】Ryu, S. W., Chae, S. K., Lee, K. J. and Kim, E. 1999. Identification and characterization of human Fas associated factor 1, hFAF1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262: 388-394.

【非特許文献 3 5】Ryu, S. W., Lee, S. J., Park, M. Y., Jun, J. L, Jung, Y. K. and Kim, E. 2003. Fas-associated factor 1, FAF1, is a member of Fas death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* 278: 24003-24010.

【非特許文献 3 6】Vadlamudi, R. K., Joung, L, Strominger, J. L. and Shin, J. 1996 p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56 lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 271: 20235-20237.

【非特許文献 3 7】Wilkinson, C. R. Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C. and Gordon, C. 2001. Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat. Cell. Biol.* 3: 939-943.

【非特許文献 3 8】Yang, Y. and Yu, X. 2003. Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB* 17: 790-799.

【非特許文献 3 9】Yaron, A., Hatzubai, A., Davis, M., Lavon, L, Amit, S., Mannin, A. M., Adhersén, J. S., Mann, M., Mercurio, F., and Ben-Neriah, Y. 1998. Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature* 396: 590-594.

【非特許文献 4 0】Ye, Y., Meyer, H. H. and Rapoport, T. A. 2001. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414: 652-656.

【非特許文献 4 1】Yuan, X. Shaw, A., Zhang, X., Kondo, H., Lally, J., Freemont, P. S. and Matthews, S. 2001. Solution structure and interaction surface of the c-terminal domain from p47: A major p97-cofactor involved in SNARE disassembly. *J*

10

20

30

40

50

. MoL Biol. 311: 255-263.

- 【非特許文献 4 2】 Kusk et al., 1999, MoI. Cell. Biochem. 191 :51-58
- 【非特許文献 4 3】 Jensen et al., 2001, Int. J. Biochem. Cell Biol. 33:577-589
- 【非特許文献 4 4】 Guerra et al., 2001, Int. J. Oncol. 19:1117-1126
- 【非特許文献 4 5】 Haiti, 1996, Nature 381:571-580
- 【非特許文献 4 6】 Frydman and Hoehfeld, 1997, Trends Biochem. Sci 22:87-92
- 【非特許文献 4 7】 Hoehfeld and Jentsch, 1997, EMBO J. 16:6209-6216
- 【非特許文献 4 8】 Bukau and Horwich, 1998, Cell 92:351-366
- 【非特許文献 4 9】 Liberek et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 88:2874-2878
- 【非特許文献 5 0】 McCarty et al, 1995, J MoI. Biol. 249:126-137 10
- 【非特許文献 5 1】 Minami et al., 1996, J Biol. Chem. 271:19617-19624
- 【非特許文献 5 2】 Hoehfeld et al., 1995 Cell 83:589-598
- 【非特許文献 5 3】 Demand et al., 1998, MoI. Cell. Biol. 8:2023-2028
- 【非特許文献 5 4】 Schumacher et al., 1994, J Biol. Chem., 269:9493-9499
- 【非特許文献 5 5】 Smith et al., 1993, MoI. Cell. Biol. 13:869-876
- 【非特許文献 5 6】 Hoehfeld and Jentsch, 1997, EMBO J. 16:6209-6216
- 【非特許文献 5 7】 Takayama et al., 1997, EMBO J. 16:4887-4896
- 【非特許文献 5 8】 Zeiner et al., 1997, EMBO J. 16:5483-5490
- 【非特許文献 5 9】 Ballinger et al., 1999, MoI. Cell. Biol. 19:4535-4545
- 【非特許文献 6 0】 Kaye et al., 2000, FEBS Lett. 467:348-355 20
- 【非特許文献 6 1】 Altschul et al., (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res., 25:3389-3402.
- 【非特許文献 6 2】 Thress et al., 2001, EMBO J. 20:1033-1041
- 【非特許文献 6 3】 Gabai et al., 1997. J Biol. Chem. 272:18033-18037
- 【非特許文献 6 4】 Meriin et al., 1999, MoI. Cell. Biol. 19:2547-2555
- 【非特許文献 6 5】 Volloch et al., 1999, FEBS Lett. 461:73-76
- 【非特許文献 6 6】 Kim et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:23193-23207
- 【非特許文献 6 7】 Kim and Lee, 2000, MoI. Cell. Biochem. 229:139-151
- 【非特許文献 6 8】 Volloch et al., 1998, Cell Stress Chaperones 3:265-271
- 【非特許文献 6 9】 Stege et al., 1994, Exp. Cell Res. 214:279-284 30
- 【非特許文献 7 0】 Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989)
- 【非特許文献 7 1】 Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989)
- 【非特許文献 7 2】 Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)
- 【非特許文献 7 3】 Michels et al., 1995, Eur. J. Biochem. 234:382-389
- 【非特許文献 7 4】 Nollen et al., 2000, MoI. Cell. Biol 20:1083-1088

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概要

本発明は、ある側面において、H s c 7 0 / H s p 7 0、ユビキチン化タンパク質、あるいはバロシン含有タンパク質に結合する F a s 関連因子 1 のポリペプチドフラグメントを対象とする。

【0008】

当該ポリペプチドフラグメントは、H s c 7 0 / H s p 7 0 に結合し得るものとし、F A F 1 はヒト F A F 1 であってよい。更に、当該フラグメントは、アミノ酸位置約 1 ～ 約 3 4 5、アミノ酸位置約 1 ～ 約 2 0 1、アミノ酸位置約 8 2 ～ 約 6 5 0、あるいはアミノ酸位置約 8 2 ～ 約 1 8 0 から構成され得るものとする。また本発明は、H s c 7 0 / H s p 7 0 を上記のポリペプチドフラグメントに接触させることによる H s c 7 0 / H s p 7 0 のシャペロン活性阻害方法を対象とする。更に本発明は、治療を要する被験者（体）に上

40

50

記のポリペプチドフラグメントを投与することによる癌あるいは過形成の治療方法を対象とする。

【0009】

また本発明は、ユビキチン化タンパク質に結合する F a s 関連因子 1 のフラグメントを対象とする。当該フラグメントは、F a s 関連因子 1 のユビキチン結合 (U B A) ドメインであってよい。更に、当該フラグメントはヒト F a s 関連因子 1 であってよい。当該フラグメントは、h F A F 1 のアミノ酸位置約 1 ～約 8 1 から構成され得るものとする。また本発明は、ユビキチン化タンパク質を上記のフラグメントに接触させることによるユビキチン化タンパク質の分解防止方法を対象とする。更に本発明は、治療を要する被験者 (体)

10

【0010】

また本発明は、バロシン含有タンパク質に結合する F a s 関連因子 1 のフラグメントを対象とする。当該フラグメントは、F a s 関連因子 1 の U B X (ユビキチン調節 X) ドメインであってよい。

【0011】

更に本発明は、サンプル組織および既知の正常組織における F a s 関連因子 1 発現のアッセイにより、サンプル組織が過形成性あるいは癌性であるか否かを診断する方法を対象とする。同法においては、サンプル組織において F a s 関連因子 1 の発現が相対的に少ない場合、サンプル組織が過形成性あるいは癌性であることが示唆される。癌は、癌腫、黒色腫、あるいは肉腫であってよい。

20

【0012】

本発明が対象とする上記およびその他の目的は、本発明に関わる以下の記載および本明細書に添付された参照図面により、更に十分に理解されよう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

好ましい実施形態の詳細な説明

本出願において、「a (1つの)」および「an (1つの)」は、単数および多数性の目的物両方を示すのに用いられる。

【0014】

本出願において、「約」あるいは「ほぼ」は、一般に正確な数字に限定されないよう幅を与える。例えば、ポリペプチド配列長に関する文脈において使用されている通り、「約」あるいは「ほぼ」は、ポリペプチドが列挙されたアミノ酸番号に限定されないことを示す。結合活性などの機能活性が存在する限りにおいて、N末端あるいはC末端において、少数のアミノ酸が加減されたものが含まれ得る。

30

【0015】

本出願において、1つ以上の更なる治療薬「との併用」投与には、同時 (併用) および任意の順序における連続投与が含まれる。

【0016】

本出願において、「アミノ酸 (単数形 amino acid)」および「アミノ酸 (複数形 amino acids)」は、全ての自然発生的 L- α -アミノ酸を示す。この定義は、ノルロイシン、オルニチン、およびホモシステインも含むことを意図されている。

40

【0017】

本出願において、一般に「アミノ酸配列バリエーション」という語は、標準 (天然配列など) ポリペプチドに比べ、アミノ酸配列に幾分かの差異を有する分子のことを示す。アミノ酸の変化には、アミノ酸の天然配列における置換、挿入、欠失、あるいはそのような変化の任意の望ましい組み合わせがあってよい。

【0018】

置換型バリエーションとは、天然配列における少なくとも 1 個のアミノ酸残基が除かれ、同位置に異なるアミノ酸が挿入されたものである。置換は、分子中 1 個のアミノ酸のみが置換

50

された単数の場合もあり、あるいは同一分子内において、2個以上のアミノ酸が置換された複数の場合もあり得る。

【0019】

配列中のアミノ酸置換基は、当該アミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択され得る。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンを含む。極性中性アミノ酸は、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンを含む。正電荷を帯びた（塩基性）アミノ酸は、アルギニン、リジンおよびヒスチジンを含む。負の電荷を帯びた（酸性）アミノ酸は、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含む。また、本発明の範囲には、タンパク質あるいはフラグメント、あるいはそれらと同一あるいは類似の生物活性を示すその誘導体、および例えばグリコシル化、タンパク質分解的切断、抗体分子あるいはその他の細胞リガンドへの結合などにより、翻訳中あるいは翻訳後に異なる修飾が施された誘導体が含まれる。

10

【0020】

挿入型バリエーションとは、アミノ酸の天然配列における特定の位置にあるアミノ酸に直接隣接する位置に、1個以上のアミノ酸が挿入されたものである。アミノ酸に直接隣接するとは、アミノ酸の α -カルボキシ官能基あるいは α -アミノ官能基群のいずれかに接することを意味する。

【0021】

欠失型バリエーションとは、アミノ酸の天然配列において、1個以上のアミノ酸が欠失したものである。通常、欠失型バリエーションでは、分子の特定の領域において1個あるいは2個のアミノ酸が欠失している。

20

【0022】

本出願において、「Hsc70/Hsp70結合ポリペプチドあるいはフラグメント」とは、Hsc70/Hsp70に特異的に結合するFAF1ポリペプチドあるいはフラグメントのことであり、ヒトFAF1のアミノ酸領域82~180に対し、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%あるいは100%の同一性を有する。

【0023】

本出願において、「ユビキチン化タンパク質結合ポリペプチドあるいはフラグメント」とは、ユビキチン化タンパク質、好ましくはマルチユビキチン化タンパク質に特異的に結合するFAF1ポリペプチドあるいはフラグメントのことであり、ヒトFAF1のアミノ酸領域1~81に対し、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%あるいは100%の同一性を有する。

30

【0024】

本出願において、「バロシン含有タンパク質結合ポリペプチドあるいはフラグメント」とは、ユビキチン化タンパク質、好ましくはマルチユビキチン化タンパク質に特異的に結合するFAF1ポリペプチドあるいはフラグメントのことであり、ヒトFAF1のカルボキシ末端から始まる80個のアミノ酸のアミノ酸領域に対し、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%あるいは100%の同一性を有する。

40

【0025】

出願人は、FAF1がHsc70/Hsp70、ユビキチン化タンパク質およびバロシン含有タンパク質に結合することを初めて発見したことから、これらのタンパク質への結合能を保持したままFAF1配列に対して特定の変更を行うことは、当業者の技術範囲内となるものである。特に、これらのタンパク質により非機能性複合体を形成するためには、様々な構造体を作られ得るし、またそれらの構造体を作るために多様なFAF1配列が利用され得る。

【0026】

本出願において、「担体」は、適用される用量および濃度において暴露された細胞あるい

50

は哺乳類にとって無毒性である薬学的に許容される担体、賦形剤または安定剤を含む。薬学的に許容される担体は、水性pH緩衝液であることが多い。薬学的に許容される担体の例には、リン酸、クエン酸、あるいはその他の有機酸の緩衝液；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（残基数が約10個未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、あるいはリジンなどのアミノ酸；ブドウ糖、マンノース、あるいはデキストリンを含む単糖類、二糖類、およびその他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；マンニトールあるいはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；および／あるいはTWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）、およびPLURONICS（登録商標）などの非イオン性界面活性剤が含まれるが、これに限るものではない。

10

【0027】

本出願において、「共有結合誘導体」には、有機タンパク性あるいは非タンパク性誘導体化剤による天然ポリペプチドあるいはそのフラグメントの修飾、および翻訳後修飾が含まれる。従来、選択された側あるいは末端残基との反応能を持つ有機誘導体化剤によって標的アミノ酸残基を反応させることにより、あるいは選択された組換え宿主細胞内において機能する翻訳後修飾作用を利用することにより、共有結合性修飾は導入される。一部の翻訳後修飾は、発現したポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用により生じる。グルタミニルおよびアスパラギニル残基は、相当するグルタミルおよびアスパルチル残基へと、翻訳後にしばしば脱アミド化される。別の方法としては、軽度の酸性条件下において、これらの残基は脱アミド化される。

20

【0028】

本出願において、「有効量」とは、有益なあるいは求める臨床的あるいは生化学的な結果を生じるに十分な量のことである。有効量は、1回以上投与することが可能である。本発明の目的において、阻害成分の有効量とは、病状の進行を軽減、改善、安定、回復、減速、遅延させるに十分な量のことである。本発明の好ましい実施形態において、「有効量」とは、Hsc70/Hsp70およびユビキチン化タンパク質への結合能を持つ成分の抗腫瘍量と定義される。その他の実施形態においては、「有効量」とは、Hsc70/Hsp70および／あるいはユビキチン化タンパク質の更なる反応を防ぐために、これらと結合して封鎖するFAF1ポリペプチドの量を意味し得る。更に本発明の他の実施形態において、「有効量」とは、癌の治療が求められる場合に、Hsc70/Hsp70および／あるいはユビキチン化タンパク質に結合して封鎖し、更なる反応に対して不活化するのに十分なFAF1フラグメントあるいはポリペプチドの量を示し得る。

30

【0029】

本出願において、「フラグメント」とは、利用可能かつ機能的な性質を保持するポリペプチドの一部を示す。例えば、本発明の文脈内で使用される通り、ポリペプチドフラグメントはHsc70/Hsp70、ユビキチン化タンパク質、あるいはバロシン含有ポリペプチドに結合する機能を有する

【0030】

本出願において、「ヒトFas関連因子1」タンパク質は、以下のアミノ酸配列を有する。1 - MASNMDREMILADFQACTGIENIDEAITLLEQNNWDLVAAINGVIPQENGILQSEYGGETIPGPAFNPASHPASAPTSSSSSAFRPVMPSRQIVERQPRMLDFRVEYRDRNVDVLEDTCTVGEIKQILENELQIPVSKMLLKGWKTGDVEDSTVLKSLHLPKNSLYVLTPDLPPSSSSSHAGALQESLNQNFMLIITHREVQREYNLNFSGSSTIQEVKRNVDLTSSIPVRHQLWEGWPTSATDDSMCLAESGLSYPCHRLTVGRRSSPAQTREQSEEQITDVHMSDSDGDDFEDATEFGVDDGEVFGM ASSALRKSPMPENAENEGDALLQFTAEFSSRYGDCHPVFFIGSLEAAFQEAFFVKARDRKLAIYLHHDSESVLTNVFCSQMLCAESIVSYLSQNFITWAWDLTKDSNRARFLTM CNRHFGSVVAQTIRTQKTDQKPLFLIIMGKRSSNEVLNVIQGNITVDELMMLRLMAAMEIFTAQQQEDIKGDEREARENVKREQDEAYRLSLEADRAKREAREREMAEQFRLEQIRKEQEEEREAIRLSLEQALPPEPKENAEPVSKLRIRTPSGEFLERRFLASNKLQIVFDVASKGFPWDEYKLLSTFPRRDVTQLDPN KSLLEVKLFPQETLFLEAKE - 650（配列番号：7）。ヒトFAF1タンパク質に関しては、本出願において様々なアミノ酸残基番号が列挙されているため、上記配列が基準点となる

40

50

。

【0031】

本出願において、「過形成」とは正常な組織あるいは器官における細胞産生の増加を示す。また、過形成とは正常組織の過剰をも示す。

【0032】

本出願において、「精製」あるいは「単離された」分子とは、本来の環境から除去され、単離あるいは分離され、本来伴うはずのその他の成分を含まない生体分子を示す。

【0033】

本出願において、「サンプル」あるいは「生体サンプル」とは、最も広い意味において用いられ、行われるアッセイの種類に応じて、個体、体液、細胞系、組織培養、あるいはF A F 1、H s c 7 0 / H s p 7 0、ユビキチン化タンパク質あるいはパロシン含有ポリペプチドを含み得るその他の採取源から得られた任意の生体サンプルが含まれる。示された通り、生体サンプルは、精液、リンパ液、血清、血漿、尿、滑液、髄液などの体液を含む。哺乳類からの組織生検および体液の採取方法は、当技術分野においてよく知られている。

10

【0034】

加えて、患者から得られた「生体サンプル」は、「生体サンプル」あるいは「患者サンプル」のいずれかとして示され得る。「患者サンプル」の解析においては、患者からの細胞あるいは組織の除去が必ずしも求められないことが好ましい。例えば、適切に標識されたポリペプチド（例えば、F A F 1に結合する抗体あるいはポリペプチドは、被験者（体）に注射することができ、（標的に結合したら）標準的画像技術（例えばC A T、N M R、E P R、P E Tなど）を用いて可視化することができる。癌診断においては、F A F 1の相対的発現を検証することができる。

20

【0035】

本出願において、「配列同一性」とは、配列同一性の割合を最大化し、かついかなる保存的置換も配列同一性の一部と見なされないように、必要であれば配列のアラインメントおよびギャップの挿入を行った後の、ポリペプチド天然配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の割合と定義される。配列同一性%値は、A l t s c h u l r（1997）による"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"（Nucleic Acids Res.,25:3389-3402）に定められた通り、N C B I B L A S T 2 . 0ソフトウェアにより算出される。パラメーターは、ミスマッチ時のペナルティーが-1と設定される点を除いて、デフォルト値に設定される。

30

【0036】

本出願において、「特異的に結合する」という語は、2つの分子間における非無作為的結合反応を示し、例えば、抗原と免疫反応を生じる抗体分子や、あるいは他のポリペプチドと反応する非抗体リガンドなどがある。

【0037】

本出願において、「被験者（体）」とは、脊椎動物、好ましくは哺乳類、更に好ましくはヒトである。

【0038】

本出願において、「治療」とは、有益なあるいは望ましい臨床結果を得るための手法である。本発明の目的において、有益なあるいは望ましい臨床結果には、検出不可の如何を問わず、症状の緩和、疾患程度の減少、疾患の安定した（すなわち悪化しない）状態、疾患の進行の遅延あるいは減速、病状の改善あるいは軽減、および寛解（部分的あるいは全体的のいずれか）を含むが、これに限るものではない。また、「治療」とは、治療を受けない場合に予期される生存時間に比べ、生存時間が延びることをも意味する。「治療」とは、治癒的治療および予防的あるいは防止的手段の両方を示す。治療を必要とする者には、既に障害を有する者と同時に、障害を防止し得る者も含まれる。疾患を「軽減する」とは、治療を受けない場合に比べて、病状の程度および／あるいは病状による望ましくない臨床徴候が軽減されること、および／あるいは進行の経時変化が減速あるいは長期化する

40

50

ことを意味する。

本出願において、「ベクター」、「ポリヌクレオチドベクター」、「構造体」および「ポリヌクレオチド構造体」は、ほぼ同一の意味で用いられる。本発明におけるポリヌクレオチドベクターは、RNA、DNA、レトロウイルス外被に包まれたRNA、アデノウイルス外被に包まれたDNA、その他のウイルスあるいはウイルス様形状に包まれたDNA（単純ヘルペス、およびアデノ随伴ウイルス（AAV）など）、リボソームに包まれたDNA、ポリリジンとの複合体DNA、合成ポリカチオン性分子との複合体DNA、免疫的に分子を「マスク」し、および／あるいは半減期を伸ばすポリエチレングリコール（PEG）などの成分との複合体DNA、あるいは非ウイルス性タンパク質との共役体DNAなどを含む複数の形態のいずれかをとり得るが、これに限るものではない。ポリヌクレオチドがDNAであることが好ましい。本出願において、「DNA」には、A、T、C、およびGの塩基のみではなく、メチル化ヌクレオチド、非荷電結合およびチオアートなどのインターヌクレオチド部修飾、糖類似物の利用、およびポリアミドなどの骨格構造の修飾および／あるいは代替など、それら塩基の類似物あるいは修飾形状のいずれもが含まれる。

10

【0039】

FAF1はHsc70/Hsp70に結合する

熱ショックシグナル伝達経路におけるヒトFas関連因子1（hFAF1）の細胞死誘導性が検証された。共免疫沈降法およびMALDI-TOF-MSを用いたペプチドマスマーキングが行われ、hFAF1が70kDa熱ショックタンパク質ファミリー（Hsc70/Hsp70）に結合することが明らかになった。相互作用のマッピングにより、hFAF1の82～180の配列が、Hsc70/Hsp70の配列1～120を含むN末端領域に直接結合することが示される。この結合は、ATPおよび熱ショック処理に関係なく、極めて堅固である。Hsc70/Hsp70およびhFAF1は、サイトゾルおよび核内に共局在し、熱ショック処理により核周囲領域に集中した。hFAF1が、Hsp70の機能をどのように調節するのか検証され、hFAF1が変性タンパク質基質をリフォールディングするHsp70のシャペロン活性を阻害し、熱ショック誘導性のSAPK/JNK活性化を加速し、結合依存的に熱ショック誘導性の細胞死を引き起こすことが明らかになった。これらの結果により、hFAF1がHsp70に結合し、そのシャペロン活性を阻害し、ストレス後の細胞の回復を阻止することにより、細胞死誘導性を示すことが示唆される。

20

30

【0040】

これらの試験は、hFAF1とHsc70/Hsp70間の相互作用、および熱ショック誘導性細胞シグナル伝達におけるこの相互作用の機能的な重要性を明らかにしている。あらかじめ、酵母ツーハイブリッドアッセイ（Ryu et al., 1999, Biochem. Biophys. Res. Commun. 262:388-394）を用いて、hFAF1のアミノ酸領域1～201がFas結合ドメインとして同定された。死受容体であるFasのアダプター分子として知られる新規タンパク質、hFAF1の細胞機能は、Fas-細胞死誘導シグナル複合体（Ryu et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:24003-24010）のメンバーであることが同定された。hFAF1の82～180のアミノ酸領域がHsp70のN末端（1～120）と直接相互作用することが、インビボでは2D-ゲル電気泳動およびMALDI-TOF-MS、ゲルろ過ゲルクロマトグラフィーを用いて、インビトロではプルダウンアッセイにより示された。大腸菌（E. coli）溶解物から組換えhFAF1を精製する際に、DnaKおよびDnaJなどのHspホモログが共精製された。

40

【0041】

ストレス誘導性の細胞死において、Hsp70は重要な保護役を担う。hFAF1の結合は、Hsp70が有するこの役割に対し、2つの潜在的方法により影響を及ぼし得る。1つ目の可能性は、hFAF1が基質として働き、Hsp70によりリフォールディングされ、分解され、あるいは転位され得ることである。2つ目の可能性は、hFAF1がHsp70機能の修飾物質として働き得ることである。hFAF1は、Hsp70の基質結合

50

部位であるペプチド結合ドメイン (PBD) には結合せず、コシャペロンである Bag - 1 および Hip が ATP アーゼドメインに結合するのと同様、Hsp 70 の ATP アーゼドメインの N 末端に結合することが、今回の研究により明らかになった。また、様々なストレス条件において、hFAF1 の発現レベルは変化しなかった。これにより、hFAF1 は Hsp 70 の基質ではないことが示唆される。そのため、Hsp 70 活性の制御に対する hFAF1 の関与の有無を検証した。hFAF1 の一過性過剰発現は、Hsp 70 のシャペロン活性に対する阻害作用を示し、一方、N 末端欠失 hFAF1 変異体の一過性発現は、逆の作用を示した。これにより、hFAF1 がコシャペロンとして作用し、Hsp 70 のシャペロン活性を阻害する可能性が示唆された。近年、Hsp 40、Hip、Hop、Bag - 1、CHIP、Chap1 / PLIC - 2、および Chap2 / Bat3 / Scythe などの Hsp 70 のコシャペロンが同定されてきている。Hip および Hop はフォールドされていないタンパク質のリフォールディングを促し、Bag - 1、CHIP、および Chap2 / Bat3 / Scythe は Hsp 70 のシャペロン活性を軽減した (Hofeld and Jentsch, 1997, EMBO J. 16:6209-6216; Minami et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:19617-19624; Schumacher et al., 1994, J Biol. Chem., 269:9493-9499; Smith et al., 1993, Mol. Cell. Biol. 13:869-876; Takayama et al., 1997, EMBO J. 16:4887-4896; Zeiner et al., 1997, EMBO J. 16:5483-5490; Ballinger et al., 1999, Mol. Cell. Biol. 19:4535-4545; Thress et al., 2001, EMBO J. 20:1033-1041)。後者にはプロテアソームに結合するユビキチン様ドメインが含まれるため、プロテアソームにおける Hsp 70 基質の分解に関わると考えられる。Bag - 1 はプロテアソームに結合するユビキチン様ドメインを含み、CHIP はユビキチンリガーゼ活性を有する U-box ドメインを有し、また Chap2 / Bat3 / Scythe はユビキチン様ドメインを含む。FAF1 の全配列は、脊椎動物間においては 78 ~ 95 % 同一であるが、脊椎動物と無脊椎動物間では 18 ~ 21 % 同一である。UAS および UBX の 2 つのユビキチン関連ドメインを含む。

【0042】

Hsp 70 のシャペロン活性に対する hFAF1 の負の制御に反映される hFAF1 の生物学的機能を理解するために、熱ショック反応における hFAF1 の作用を検証した。Hsp 70 は、SAPK / JNK の活性化抑制により、熱ショックへの応答において、プログラムされた細胞死を防止する重要な役割を担っていると思われる (Gabai et al., 1997, J Biol. Chem. 272:18033-18037; Meriin et al., 1999, Mol. Cell. Biol. 19:2547-2555; Volloch et al., 1999, FEBS Lett. 461:73-76)。ストレスに対する細胞の感受性マーカーとして SAPK / JNK の活性化および非活性化の反応速度を用いることにより、Hsp 70 の発現が増加した耐熱性 (TT) 細胞において、ストレス量が多いと SAPK / JNK が活性化され、コントロールに比べ、TT 細胞における非活性化速度は極めて速いことが明らかになった (Kim and Lee, 2000, Mol. Cell. Biochem. 229:139-151)。また最近出願者は、熱ショックにより、様々なタンパク質の一過性チロシンリン酸化が誘導されることを報告した (Kim et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:23193-23207)。図 8 に示された通り、ベクターによりトランスフェクトされたコントロール細胞に比べ、hFAF1 過剰発現細胞における熱ショック誘導性 SAPK / JNK 活性化は加速され、回復時の非活性化は劇的に遅くなった。この作用は、Hsp 70 結合親和性を欠く N 末端切断型 hFAF1 の過剰発現により完全に廃絶された。このことから、hFAF1 が過剰発現すると、おそらく Hsp 70 のシャペロン活性の阻害により、熱ショックに対する細胞の感受性が高まることが示される。Hsp 70 のシャペロン活性は、様々なストレスおよび抗アポトーシス性により誘導された SAPK / JNK 活性の阻害に関わる可能性がある。Volloch らは、SAPK / JNK 阻害に Hsp 70 の ABD を要しないことを示した (Volloch et al., 1998, Cell Stress Chaperones 3:265-271)。ATP の加水分解をエネルギー源として用いた Hsp 70 のシャペロン活性は、SAPK / JNK 活性にもはや影響を及ぼさないように思われた。しかしながら、ABD の役割と Hsp 70 のシャペロン機能とは、完全に一致しているわけではない (Steger et al., 1994, Exp. Cell Re

s. 214:279-284)。今回行われた試験では、H s p 7 0 の A B D 欠失変異型は、H s p 7 0 完全型よりは低い、シャペロン活性の上昇を示し、今回行われた試験において、従来の A B D (1 ~ 4 2 8) に比べて割り当てられたドメインが小さい A B D (1 2 0 ~ 4 2 8) は、シャペロン活性にとって不可欠ではないことが示唆された。したがって、H s p 7 0 のシャペロン活性が S A P K / J N K 活性化に影響を及ぼす可能性を除外するべきではない。

【 0 0 4 3 】

その後、h F A F 1 過剰発現細胞系における熱ショックへの細胞感受性の上昇が、細胞死と関わるか否かが検証された。F l a g - h F A F 1 の一過性過剰発現を伴う H E K 2 9 3 T 細胞は、ベクタートランスフェクト細胞に比べ、重度の熱ショック処理に対して低い生存率を示した。また、H s p 7 0 への結合部位を欠く F l a g - h F A F 1 Δ N 欠失変異型は、ベクタートランスフェクト細胞に比べ、高い生存率を示した。このことにより、h F A F 1 は、H s p 7 0 のシャペロン活性を阻害することにより、熱ショックに対する細胞の感受性を高めることが示唆される。F l a g - h F A F 1 Δ N トランスフェクト細胞の生存率は上昇するが、これはおそらく、欠失変異型が、h F A F 1 完全型に対してドミナントネガティブ変異体として働くことによる。h F A F 1 が複数のドメインを有し、C 末端への結合がユビキチン化経路を調節している可能性がある。

【 0 0 4 4 】

h F A F 1 は、当初 F a s 関連タンパク質として同定された。アミノ酸配列 1 ~ 2 0 1 は、F a s デスドメインに対する結合ドメインである (Ryu et al., 1999, Biochem. Biophys. Res. Commun. 262:388-394)。この領域は、H s p 7 0 の相互作用領域であるアミノ酸残基 8 2 ~ 1 8 0 と重なる。h F A F 1 は、様々な細胞条件により、f a s あるいは H s p 7 0 に結合する可能性がある。

【 0 0 4 5 】

h F A F 1 は新規タンパク質であるが、その細胞機能は依然として明らかになっていない。今回行われた試験により、h F A F 1 は、H s p 7 0 に結合してそのシャペロン活性を阻害することにより、ストレス誘導性シグナル伝達経路に関わることが示唆される。h F A F 1 が H s p 7 0 の新規コシャペロンとして働き、細胞死誘導能を発揮することが、今回の実証試験により示されている。h F A F 1 が有するこれらの機能は、翻訳後修飾 (Jensen et al., 2001, Int. J. Biochem. Cell Biol. 33:577-589)、および複数のドメインにおける結合の変化により調節されている可能性がある。

【 0 0 4 6 】

F A F 1 はバロシン含有タンパク質およびマルチュビキチン化タンパク質に結合する。出願人は、h F A F 1 がバロシン含有タンパク質 (V C P) およびマルチュビキチン化タンパク質と結合することを示した。これらの相互作用は、プロテアソームにおけるタンパク質分解の調節に関わると思われる。

【 0 0 4 7 】

V C P は、A A A ファミリー (様々な細胞活動を有する A T P アーゼ関連ファミリー) のメンバーである。V C P の酵母ホモログである c d c 4 8 p は、細胞分裂周期タンパク質として同定された (24)。V C P は、特異的補助因子への結合を通して、膜融合、小胞介在輸送およびペルオキシソームのアセンブリー (1、21) など、様々な細胞プロセスに関わる。例えば p 47 は、ゴルジ層板の分裂後再アセンブリー中の膜融合において、V C P の補助因子として働き、α - S N A P アナログであるシンタクシン 5 への V C P の結合を媒介する (33)。また、U f d 1 および N p 1 4 は、V C P の補助因子として、プロテアソーム媒介による E R 結合タンパク質およびサイトゾルタンパク質のプロセッシングに関与しているとされてきた (23、40)。更に、c d c 4 8 p は、ユビキチン融合分解 (U F D) 経路に関わる U f d 3 p および U f d 2 p など、複数のタンパク質に結合することが示されてきた (13、18)。I κ B α をプロテアソームによる分解の標的とする際の V C P の役割 (6、7、9) に関しては、既に注目されてきた。これらの所見により、多数の基質をプロテアソームによる分解の標的とするシャペロンとして、V C P が働

く可能性が示唆されている。

【0048】

UBAドメインは、約45のアミノ酸残基、好ましくは約40～50のアミノ酸残基を有し、そのサイズは小さい(15)。UBAドメインは、UBP、E2、E3；Rad23およびDsk2などのUV除去修復タンパク質；細胞シグナル伝達経路および細胞周期制御に関わるp62などのプロテインキナーゼなど、ユビキチン化経路における多くのタンパク質内に存在する(27、36)。Muellerらは、NMR分光法により、UBAドメインの三次元溶液構造を提示した(27)。疎水性表面パッチは、多様なUBAドメインに存在する一般的なタンパク質相互作用面であり、UBAドメインの疎水性表面パッチが、ユビキチンの5本鎖βシート上の疎水性表面と相互作用することが示唆された。実際に、UBAドメインを含むRad23およびDsk2は、モノ、ジ、テトラ、およびマルチユビキチン鎖に結合することが報告されている。加えて、UBAドメインタンパク質は、ユビキチン化標的タンパク質と相互作用し、そのタンパク質分解を調節することができる(4、12、37)。

10

【0049】

同定されたhFAF1のN末端UBAドメインは、ユビキチン化プロテアソーム基質の動員および安定化において、重要に思われる。hFAF1のC末端UBXドメインに結合したVCPは、プロテアソームにおけるユビキチン化タンパク質の分解およびhFAF1の負に調節された機能を促すことが明らかになった。hFAF1は多くのユビキチン経路関連のドメインを有するため、hFAF1とユビキチン経路との関係が提示された(2)。ここに記載された試験は、hFAF1がユビキチン-プロテアソーム経路に関わることを初めて実験的に確認したものである。

20

【0050】

hFAF1は、80個のアミノ酸残基から成るC末端UBXドメインを通じて、VCPと相互作用する。UBXドメインは、ユビキチンと構造的関連を表し、p47、Y33K、FAF1、UBXD1およびRep-8タンパク質中に存在することが示されてきた(3)。これらの内、p47のUBXドメインの機能のみがこれまでに説明されてきた。明らかに、p47はそのUBXドメインを通じてVCPと相互作用し(41)、膜融合プロセスにおいて、VCPのアダプターとしての役割を担う(19)。VCPは、同様の方法により異なるタンパク質と相互作用することによって、ユビキチン経路への関与も含め、様々な細胞機能を発揮している可能性がある。

30

【0051】

また、今回行われた試験では、hFAF1はインビボにおいて、そのN末端UBAドメインを通じてHEK293T細胞のマルチユビキチン化タンパク質と関わり、hFAF1はインビトロにおいて、Lys48により結合されたポリユビキチン鎖(UB₂₋₇)と相互作用することも示されている。図15に示された通り、hFAF1は、モノユビキチンとは相互作用しないが、テラユビキチン鎖より長いマルチユビキチン鎖とはかなり強く相互作用を生じる。この所見は、UBAドメインが、モノユビキチン(K_d>1mM)よりテトラユビキチン(K_d、30nM)に対し、高い親和性を有するというこれまでの報告(37)と一致している。図15Cに示された通り、hFAF1のUBAドメインが、異なるタンパク質のUBAペプチド配列とのアラインメントを有するという今回の所見は、hFAF1のUBAドメインが他のUBAドメインと共に完全に保存されるのではなく、三次元構造において疎水性表面パッチの位置を占めるアミノ酸残基、すなわちユビキチンと相互作用する部分が、高度に保存されることを示唆している(図15C)。hFAF1は、独自のUBAドメインを有する新規タンパク質ファミリーに相当する可能性がある」と結論する。

40

【0052】

hFAF1は、当初Fas関連タンパク質として同定され、そのアミノ酸配列1～201は、Fasデスドメインに結合する領域であることが明らかにされた(34)。加えて、hFAF1は、アミノ酸残基82～180を通じてHsp70と相互作用することが示さ

50

れた(17)。Flag-hFAF1[1~201]およびFlag-hFAF1[1~345]は、マルチユビキチン化タンパク質に結合するが、その相互作用は、Flag-hFAF1完全型およびFlag-hFAF1[1~81]の場合より弱いことが明らかになった(図14)。また、アミノ酸残基1~201および1~345は、UBAドメインに加え、FasおよびHsp70相互作用ドメインをも含む。切断型構造体の相互作用が弱い理由は構造的変化により説明され得る。しかし今回の試験結果により、hFAF1のマルチユビキチン化タンパク質との相互作用が、他の結合タンパク質により調節されている可能性が示唆される。これらの、およびその他の代替的な可能性の是非に関して判断するには、hFAF1、Fas、Hsp70およびユビキチン化タンパク質間の相互作用に関する更なる研究が求められるのは明らかである。

10

【0053】

試験の一環として、マルチユビキチン化タンパク質と相互に作用するhFAF1の、プロテアソーム基質分解への関与について検証されたが、hFAF1完全型およびhFAF1[1~81]の過剰発現により、人工基質Ub^{G76V-GFP}、および内因性基質IκBαの分解が妨げられることが明らかになった。UBAドメインを含まない構造体は、Ub^{G76V-GFP}およびIκBαの分解を阻害しなかった。hFAF1完全型とhFAF1[1~81]のユビキチン化タンパク質に対する結合は同程度であったが(図14)、hFAF1切断型[1~81]および[1~345]は、hFAF1完全型より、Ub^{G76V-GFP}分解に対する阻害の程度が大きかった(図18)。これらの結果により、C末端UBXドメインは、UBAドメインに結合するユビキチン化タンパク質の分解に必要であることが示唆される。

20

【0054】

Dantumaらにより開発された手法(8、20)を用いて、生細胞におけるユビキチン-プロテアソーム依存タンパク質分解の定量試験が行われ、hFAF1が、人工基質と同様に内因性基質のタンパク質分解を阻害することが確認された(図19)。

【0055】

最近の研究においては、ユビキチンおよびユビキチン化は、中でもタンパク質分解、エンドサイトーシス、タンパク質選別、核内輸送および遺伝子発現など、多くの生物学的プロセスに関与するとしている(31)。Lys48結合マルチユビキチン鎖は、主要なプロテアソーム標的シグナルであり、一方Lys63結合鎖は、非タンパク質分解シグナルであると思われる(10、31)。Raasiらは、合成ペプチドを用いて、Rad23のC末端UBAドメインが、Lys63/Lys29結合鎖よりLys48結合ポリユビキチン鎖に優先的に結合することを発見した(32)。Pengらは、Lys48および63結合鎖に比べ、それ以外のLys結合鎖の相対存在量が少ないにも関わらず、Lys6、11、27、33、48、63残基がユビキチン鎖形成に関与していると報告した(30)。今回行われた試験において、hFAF1のN末端UBAドメインが、Lys48およびLys63結合ユビキチン鎖のいずれとも相互作用することが示されており、ユビキチン化経路において、hFAF1がプロテアソームによる分解以外の機能を有する可能性が示唆されている。現在もなお、出願人の研究室では、hFAF1と相互作用するユビキチン化タンパク質の同定を目的とした試験が継続されている。これらの試験が、この相互作用における細胞機能を説明する一助となることが望まれる。

30

40

【0056】

hFAF1自体の過剰発現により細胞死が生じ、UBAドメインがその原因であることが明らかになった。また、他の試験により、ユビキチン化とアポトーシスとの関連が明らかにされている。DNA損傷剤、血清枯渇、およびγ線照射など、様々な原因により生じた複数のアポトーシスモデルにおいて、ユビキチン化タンパク質は劇的に増加する(22、27)。タンパク質分解阻害剤は、一部の種類の癌細胞に対し、アポトーシスを誘導する。加えて、プロテアソーム阻害剤PS-341は、Bcl-2およびFLIPなど、複数の抗アポトーシスタンパク質のレベルを低下させ、Fas、Fasリガンドおよびカスパーゼなど、プロアポトーシスカスケードに関わるタンパク質を増加させた(25、38)

50

。h F A F 1 の U B A ドメインがプロテアソーム阻害剤として機能し、アポトーシスに
与するタンパク質レベルを調節している可能性がある」と仮定するのは妥当に思われる。

【0057】

F A F 1 検出による過形成および癌の診断アッセイ

本発明はまた、生体サンプルにおける F A F 1 の有無を検出するための診断方法を提供する。直接的（F A F 1 ポリペプチドあるいはそのフラグメントに対する反応により誘導される抗体を用いたポリペプチドレベルのアッセイによってなど）、あるいは間接的（F A F 1 ポリペプチドあるいはそのフラグメントに対して特異性を有する抗体のアッセイによってなど）のいずれの方法によってもアッセイすることができる。

【0058】

図 2 2 および 2 3 に見られる通り、F A F 1 発現に関して、卵巢癌組織が正常組織と比較された。F A F 1 は腫瘍組織においては発現しないが、正常組織においては高い発現率を示す。これは、F A F 1 が過形成あるいは癌検出における生物学的マーカーであることを示すものである。図 2 2 および 2 3 は卵巢腫瘍に関するデータを示すものであるが、本発明による癌診断方法が、卵巢癌のみの検出に限定されるべきであるとする理由はない。F A F 1 は、H s p 7 0 活性を阻害し、ユビキチン化タンパク質に結合して細胞毒性を生じ、それによってこれらの対象とされたタンパク質の分解を妨げることにより、細胞死を促す。したがって、本発明は、癌腫、黒色腫および肉腫を含むがこれに限るものではない全形状の癌の診断を対象とする。癌のサブタイプには、膀胱癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸部癌、結腸直腸癌、食道癌、子宮内膜癌、肝細胞癌、胃腸間質性腫瘍（G I S T）、喉頭癌、肺癌、骨肉腫、卵巢癌、膀胱癌、前立腺癌、腎細胞癌あるいは甲状腺癌が含まれるがこれに限るものではない。

【0059】

病状の診断が既になされた場合には、本発明は、患者組織における F A F 1 発現レベルを測定することにより、あるいは F A F 1 産生量が低下している患者において、F A F 1 産生量が多い患者に比べ、臨床転帰が悪化を示すことにより、病状の進行あるいは退行のモニタリングに有用である。

【0060】

インビボでの走査技術において知られる方法を用いて、患者の体内における標識分子の有無を検出することができる。これらの方法は、用いられる標識の種類によって異なる。当該技術における専門家であれば、特定の標識を検出するのに適した方法を判断することができる。本発明の診断方法に用いられ得る手法および装置には、コンピュータ断層撮影（C T）、および陽電子放出断層撮影（P E T）、磁気共鳴画像（M R I）、超音波検査などの全身走査、更に電子常磁性共鳴（E P R）および核磁気共鳴（N M R）が含まれるが、これに限るものではない。

【0061】

標識

適切な酵素標識には、例えば、基質と反応することにより過酸化水素産生を触媒するオキシダーゼ群の酵素が含まれる。グルコースオキシダーゼは、安定性が良好であり、基質（ブドウ糖）が容易に入手できるため、特に望ましい。オキシダーゼ標識の活性は、酵素標識抗体／基質反応により形成された過酸化水素の濃度を測定することにより、アッセイすることができる。酵素以外の適切な標識には、ヨウ素（ ^{125}I 、 ^{131}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{112}In ）、およびテクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）などの放射性同位体や、フルオレセインおよびローダミンなどの蛍光標識、およびビオチンが含まれる。

【0062】

適切な放射性同位体標識の例には、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{152}Eu 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{217}Bi 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{47}Sc 、 ^{109}Pd などが含まれる。インビボ造影が用いられる場合、 ^{125}I あるいは ^{131}I 標識ポリペプチドが肝

10

20

30

40

50

臓により脱ハロゲン化される問題を回避できるため、 ^{111}In が好ましい同位体である。更に、この放射性ヌクレオチドは、造影により適したガンマ放射エネルギーを有する。例えば、 $1-(\text{P-イソチオシアネートベンジル})-\text{DPTA}$ ($1-(\text{P-isothiocyanatobenzyl})-\text{DPTA}$) を有するモノクローナル抗体に結合させた ^{111}In は非腫瘍性組織、特に肝臓において、ほとんど吸収されないことが示されたため、腫瘍局在化における特異性が高まる。

【0063】

適切な非放射性同位体標識の例には、 ^{157}Gd 、 ^{55}Mn 、 ^{162}Dy 、 ^{52}Tr 、および ^{56}Fe が含まれる。適切な蛍光標識の例には、 152Eu 標識、フルオレセイン標識、イソチオシアネート標識、ローダミン標識、フィコエリトリン標識、フィコシアニン標識、アロフィコシアニン標識、 α -フタルアルデヒド標識、およびフルオレスカミン標識が含まれる。適切な毒素標識の例には、緑膿菌毒素、ジフテリア毒素、リシン、コレラ毒素が含まれる。

【0064】

化学発光標識の例には、ルミナール標識、イソルミナール標識、芳香族アクリジニウムエステル標識、イミダゾール標識、アクリジニウム塩標識、シュウ酸エステル標識、ルシフェリン標識、ルシフェラーゼ標識、およびエクオリン標識が含まれる。核磁気共鳴造影剤の例には、 Gd 、 Mn 、および鉄などの重金属核が含まれる。また、重水素を使うこともできる。 EPR 、 PET あるいはその他の造影法のために他の造影剤も存在し、当該技術における専門家には認知されている。

【0065】

バイオチップおよびバイオセンサー技術を用いて FAF1 発現を検出するためには、様々なポリペプチドおよび抗体が利用可能である。本発明におけるバイオチップおよびバイオセンサーは、 FAF1 により特異的に認識されるポリペプチドあるいは抗体から成り得るものとする。

【0066】

FAF1 投与による癌あるいは過形成の治療

本発明はまた、 Hcp70/Hsp70 およびユビキチン化タンパク質に結合し、細胞死を生じる FAF1 [1~81] など、 FAF1 ポリペプチドフラグメントの投与による過形成あるいは癌の治療方法を対象とする。治療される癌の種類は、いかなる特定の種類にも限定されるものではない。治療される癌の種類には、癌腫、黒色腫および肉腫が含まれるがこれに限るものではない。癌のサブタイプには、膀胱癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸部癌、結腸直腸癌、食道癌、子宮内膜癌、肝細胞癌、胃腸間質性腫瘍 (GIST)、喉頭癌、肺癌、骨肉腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、腎細胞癌あるいは甲状腺癌が含まれるがこれに限るものではない。

【0067】

FAF1 阻害剤の投与による細胞死関連疾患の治療

本発明は、 FAF1 の活性を阻害することにより、アルツハイマー病などの細胞死により生じる変性疾患の治療に用いることができる。これらの阻害剤には、化学系、ポリペプチド系、あるいは核酸系などがある。例えば、 FAF1 活性を阻害し、細胞死を防ぐために、 FAF1 に対して作られた RNAi を被験者 (体) に投与することができる。

【0068】

遺伝子治療

ある具体的な実施形態においては、癌に伴う疾患あるいは障害を治療、阻害、あるいは予防するために、 FAF1 ポリペプチドあるいはフラグメントをコードする配列を含む核酸が、遺伝子治療手法により投与される。遺伝子治療とは、発現した、あるいは発現し得る核酸の被験者 (体) への投与による治療を示す。本発明の上記実施形態において、核酸は、そこにコードされた治療効果を媒介するタンパク質を産生する。

【0069】

本発明に準じて、当技術分野で利用可能なあらゆる遺伝子治療手法を用いることができる

。

【0070】

好ましい態様において、核酸配列は F A F 1 ポリペプチドあるいはフラグメントをコードでき、当該 F A F 1 ポリペプチドあるいはフラグメント内において、その核酸配列は適した宿主内でポリペプチドを発現する発現ベクターの一部である。特に、かような核酸配列は、ポリペプチドコード領域に操作可能な状態で結合されたプロモーターを有し、当該プロモーターは誘導性あるいは構造的性を有し、また任意的に組織特異性を有する。もう1つの具体的な実施形態においては、ゲノムの望ましい部位でのホモログ組換えを促す領域に、ポリペプチドコード配列および任意のその他の望ましい配列が隣接された状態で、核酸分子が使われ、その結果、核酸をコードしている抗体が染色体内で発現する (Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989))。

10

【0071】

患者の体内への核酸デリバリーは、核酸あるいは核酸運搬ベクターに患者が直接暴露される直接的な方法、あるいは、まずインビトロにおいて核酸により細胞をトランスフェクトし、その後患者に移植する間接的な方法のいずれでも可能である。これらの2つの手法は、それぞれインビボ、あるいはエキソビボ遺伝子治療として知られている。

【0072】

ある具体的な実施形態において、核酸配列は、インビボで直接投与され、そこで当該コード産物を産生するよう発現される。これは、例えば適切な核酸発現ベクターの一部に組み込み、および例えば欠損型または弱毒化レトロウイルスやその他のウイルスベクターを用いて感染させるといった細胞内に入るよう投与する方法、あるいは裸のDNA、または脂質あるいは細胞表面受容体あるいはトランスフェクト媒介物によるコーティング物、リボソームカプセル、微小粒子、またはマイクロカプセルなどを直接注射する方法、あるいは核に侵入することが知られているペプチドと連鎖投与する方法、受容体を介したエンドサイトーシスを受けるリガンドと連鎖投与する方法 (例えば、Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987) を参照) (当該受容体の特異的に発現する種類の細胞を標的にすることに用いることができる) など、当技術分野で知られる多数の方法のいずれによっても遂行することができる。

20

【0073】

ある具体的な実施形態において、ポリペプチドをコードしている核酸配列を含むウイルスベクターが使用される。ポリペプチドをコードする遺伝子治療用核酸配列は、1つ以上のベクターにクローン化され、それらが患者の体内における遺伝子デリバリーを促進する。使用され得るウイルスベクターの例としては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスが挙げられる。レトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムを正しくパッケージングし、宿主細胞DNAへ組み込むために必要な成分を含む。

30

【0074】

アデノウイルスは、本来呼吸上皮に感染し、そこに軽度の疾患を引き起こすため、呼吸上皮への遺伝子デリバリーにおいて、特に魅力的な担体である。アデノウイルスを用いたデリバリーシステムのその他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスには、非分裂細胞への感染能を持つという利点がある。加えて、アデノ随伴ウイルス (AAV) もまた、遺伝子治療への使用が提唱されてきた。

40

【0075】

遺伝子治療を行うもう1つの方法には、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウムを介したトランスフェクション、あるいはウイルス感染などの方法による組織培養中の細胞への遺伝子導入を伴う。通常、導入法には選択可能なマーカーの細胞への導入が含まれる。その後、それらの細胞は、導入された遺伝子を受け入れ、発現している細胞を単離するために、選別される。その後、当該細胞が患者の体内にデリバリーされる。

【0076】

50

治療薬の組成

1つの実施形態において、本発明は、FAF1発現の欠如を特徴とする癌の治療に関する。本実施形態において、Hsp70シャペロン化活性あるいはユビキチン化タンパク質分解を阻害する化合物を用いて、当該疾患を患う、あるいは患う傾向のあるヒト患者に対し、本発明による治療用化合物を投与することができる。

【0077】

もう1つの実施形態において、本発明は、過剰な細胞成長を特徴とする様々な疾患の治療に関するものであり、それらの疾患は様々な種類の癌を含むが、これに限るものではない。

【0078】

治療用化合物の製剤に関しては、当技術分野で一般に知られており、好都合には、Remington's Pharmaceutical Sciences第17版（米ペンシルバニア州イーストンMack Publishing Co.）を参照することができる。例えば、1日、体重1キログラム当たり約0.05 μ g～約20mgを投与することができる。用法は、最適な治療反応を得るために、調整することができる。例えば、複数に分けた用量を毎日投与することもでき、あるいは、治療状況における緊急性に応じて、用量を比例的に減らすこともできる。活性化合物は、経口、経静脈（水溶性の場合）、筋肉内、経皮、鼻内、皮内、あるいは坐薬経路あるいは移植（例えば、腹腔内経路により徐放性分子を用いる方法や、あるいはインビトロにおいて感作された単球あるいは樹状突起細胞などの細胞を用いて、レシピエントに養子移植する方法）など、利便性の良い方法により投与することができる。投与経路によっては、当該成分を不活化させ得る酵素、酸およびその他の自然条件による作用から保護する物質により、ペプチドをコーティングする必要が生じる可能性がある。

【0079】

例えば、ペプチドの親油性が低い場合、消化管においてペプチド結合切断能を持つ酵素により、また胃において酸加水分解により、ペプチドは分解され得る。非経口投与以外の方法によりペプチドを投与するためには、その不活化を防止する物質でコーティングし、あるいはそのような物質と同時に投与する必要がある。例えばペプチドは、アジュバントに入れて投与したり、酵素阻害剤と同時に投与したり、あるいはリポソームに入れて投与することができる。本発明において想定されるアジュバントには、レゾルシノール、ポリオキシエチレンオレイルエーテル（polyoxyethylene oleyl ether）およびn-ヘキサデシルポリエチレンエーテル（n-hexadecyl polyethylene ether）などの非イオン性界面活性剤が含まれる。酵素阻害剤には、膵臓トリプシン阻害剤、フルオロリン酸ジイソプロピル（diisopropyl fluorophosphate）（DEP）およびトラジロールが含まれる。リポソームには、従来のリポソームと同時に、水中油中水（W/O/W）型CGF乳剤もが含まれる。

【0080】

また活性化合物は、非経口あるいは腹腔内投与を行うこともできる。また分散液は、グリセロール液状ポリエチレングリコールとその混合液、および油中において調整することもできる。通常の保管および使用条件下においては、これらの調整物には微生物の増殖を防ぐための防腐剤が含まれる。

【0081】

注射用に適した剤型には、滅菌水溶液（水溶性の場合）あるいは滅菌注射液あるいは分散液の即時調整のための分散液および滅菌粉体が含まれる。いかなる場合にも、形状は滅菌性でなければならず、注射が容易である程度に液状でなければならない。製造および保管の条件下において安定でなければならず、細菌や真菌などの微生物の汚染作用を防ぐよう保存されなければならない。担体には、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液状ポリエチレングリコールなど）、それらの適切な混合物、および植物油などを含む溶媒あるいは分散媒を使用することができる。適

10

20

30

40

50

度の流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの利用、分散液の場合には必要な粒子サイズの維持、および界面活性剤の使用により、維持することができる。微生物による作用の予防は、例えば、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、テオマーサル（theomersal）などの様々な抗菌剤および抗真菌剤により実現できる。多くの場合、例えば、糖あるいは塩化ナトリウムなどの等張剤を含むことが好ましい。注射用組成の持続的吸収は、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収遅延剤を組成中に使用することにより実現できる。

【0082】

滅菌注射液は、必要に応じて上述の様々な他の成分と共に、必要な量の活性化化合物を適切な溶媒に配合し、その後フィルター滅菌することにより調整される。一般に、分散液は、ベースとなる分散媒および上述の成分中必要なその他の成分を含む滅菌ビヒクルに、様々な滅菌活性成分を配合することにより調整される。滅菌注射液調整のための滅菌粉体の場合、好ましい調整法は、事前にフィルター滅菌されたその溶液から得られた任意の望ましい追加成分に加えて、活性成分の粉体を生成することができる真空乾燥および凍結乾燥技術である。

【0083】

ペプチドが上述の通り適切に保護されている場合、例えば、不活性希釈液あるいは生体同化性のある食用担体を用いて、またはハードあるいはソフトシェルゼラチンカプセルに包んで、あるいは錠剤に打錠して、あるいは食事中的食品に直接配合することにより、活性化化合物を経口投与することができる。治療目的における経口投与においては、活性化化合物を賦形剤に配合し、摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウエハーなどの形状で用いることができる。これらの組成物および調剤は、総重量の少なくとも1%の活性化化合物を含むべきである。組成物および調剤の割合は、当然ながら多様であり、好都合には単位総重量の約5%～約80%である。かかる治療上有益な組成物における活性化化合物の量は、適切な用量が得られるところのものである。本発明による好ましい組成物あるいは調剤は、経口用量単位剤型に約0.1 μg～2000 mgの活性化化合物を含むよう調整されたものである。

【0084】

錠剤、丸薬、カプセルなどにもまた、以下が含まれる：トラガカントゴム、アラビアゴム、コーンスターチあるいはゼラチンなどの結合剤；第2リン酸カルシウム（dicalcium phosphate）などの賦形剤；コーンスターチ、ポテトスターチ、アルギン酸などの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；また、ショ糖、乳糖、あるいはサッカリンなどの甘味剤を添加してもよく、あるいはハッカ、ウィンターグリーン油、あるいはチェリー香料などの着香剤を加えてもよい。用量単位剤型がカプセルの場合、上記種類の物質に加え、液体担体を含み得る。コーティング剤として、あるいは用量単位の物理的形狀を変更するために、他にも様々な物質を含み得る。例えば、錠剤、丸薬、あるいはカプセルは、セラック、糖、あるいはその両方によりコーティングされ得る。シロップあるいはエリキシル剤には、活性化化合物、甘味剤としてショ糖、防腐剤としてメチルおよびプロピルパラベン、着色剤およびチェリーあるいはオレンジ香料などの着香剤を含み得る。当然ながら、いかなる用量単位剤型の調整に用いられるいかなる物質も、薬学的に純粋かつ用いられる量においてほぼ無毒性であるべきである。加えて、活性化化合物を徐放調剤および製剤に組み込むこともできる。

【0085】

本出願において、「薬学的に許容される担体および／あるいは希釈液」には、任意の及び全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。薬剤活性物質におけるこれらの媒体および作用物の利用に関しては、当技術分野ではよく知られている。従来の媒体あるいは作用物が活性成分に不適合である限りを除いて、治療用組成物におけるそれらの使用が想定される。また、追加の活性成分を組成物中に配合することもできる。

【0086】

投与を容易にし、用量を均一に保つためには、用量単位剤型において非経口組成物を製剤することは特に有益である。本出願において用いられる用量単位剤型とは、治療される哺乳類被験者（体）にとって単位用量として適した量に、物理的に分けられた単位を示す。各単位は、必要な薬学的担体と共に、目的とする治療効果を生み出すよう計算された所定量の活性物質を含む。本発明における用量単位剤系の規格は、（a）活性物質固有の性質および達成されるべき特定の治療効果、および（b）病状にあり、身体健康が損なわれた生体被験者（体）の疾患治療のための当該活性物質の化合技術における固有の限界、により決定付けられ、直接左右される。

【0087】

主要な活性成分は、用量単位剤型において薬学的に許容される適切な担体と共に、有効量を都合よくかつ効果的に投与できるよう化合される。単位用量剤型は、例えば、 $0.5 \mu\text{g}$ ～ 約 2000 mg の範囲にわたる量の主要な活性化合物を含み得る。割合で示すと、活性化合物は一般に、担体の約 $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ 以上の割合で含まれる。追加の活性成分を含む組成物の場合、用量は、当該成分の通常の用量および投与法を参照して定められる。

【0088】

デリバリーシステム

本発明における化合物の投与には、例えば、リボソームカプセル、微小粒子、マイクロカプセル、当該化合物発現能を持つ組換え細胞、受容体を介したエンドサイトーシス、レトロウイルスあるいはその他のベクターの一部に核酸を組み込んだ構造体など、様々なデリバリーシステムが知られており、利用可能である。導入方法には、皮内、筋肉内、腹腔内、経静脈、経皮、鼻内、硬膜外、および経口経路を含むが、これに限るものではない。化合物あるいは組成物は任意の都合の良い経路、例えば、輸液あるいはボーラス注射、上皮あるいは皮膚粘膜層（例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜など）經由での吸収などによって投与可能であり、またその他の生理活性物質と共に投与することもできる。投与は、全身あるいは局所のいずれでも可能である。加えて、本発明における薬剤化合物あるいは組成物を、脳室内および髄腔内注射など、任意の適した経路による中枢神経系へ導入することも望ましい。脳室内注射は、例えば、オンマヤリザーバー（Ommaya reservoir）などのリザーバーに接続された脳室内カテーテルにより、容易に行うことができる。また、例えば吸入器あるいは噴霧器、およびエアロゾル化剤を配合した製剤を用いて、肺内投与を行うこともできる。

【0089】

ある具体的な実施形態において、本発明による薬剤化合物あるいは組成物を治療の必要な部位に局所的に投与することが望ましい。これは、例えば手術中の局所輸液、例えば創傷被覆材と併せての手術後の局所塗布、注射、カテーテル、坐薬、あるいは移植により実現することができるが、これに限るものではない。当該移植材は、多孔質材、無孔質材、あるいはシアラスティック（sialastic）膜などの膜を含むゼラチン状素材、あるいは繊維である。好ましくは、本発明における抗体あるいはペプチドなど、タンパク質を投与する際には、タンパク質が吸収されない素材を用いるよう注意を払わなければならない。もう1つの実施形態において、化合物あるいは組成物をベシクル、特にリボソームに入れてデリバリーすることができる。更に他の実施形態において、化合物あるいは組成物を制御された放出システムによりデリバリーすることができる。ある実施形態において、ポンプを使用することができる。もう1つの実施形態において、ポリマー素材を用いることができる。更に他の実施形態においては、治療標的、すなわち脳に近接して制御された放出システムを設置でき、そのため全身投与の場合の用量と比べ、ごく少量しか要しない。その投与がレシピエント動物に耐容され得る場合、およびさもなければ当該動物への投与に適している場合、組成は「薬学的あるいは生理学的に容認される」と言われる。投与量が生理学的に有意である場合、当該作用物質が「治療上の有効量」投与されたと言われる。レシピエント患者の生理において、その存在により検出可能な変化をもたらした場合、作用物質は生理学的に有意である。

【0090】

本発明は、ここに示される具体的な実施形態により、その適用範囲が制限されるものではない。実際、上述の記載および付随する図面により、ここに示されたものに加え、本発明の様々な変更態様が当業者には明らかになるであろう。そのような変更態様は、添付の請求事項の範囲に収まるものとされる。以下の実施例は、本発明を説明するためのものであり、これを限定するためのものではない。

【実施例 1】

【0091】

実施例 1 - H C P 7 0 / H S P 7 0 に結合する F A F 1 に関わる実験手順

実施例 1. 1 - プラスミド

完全長ヒト H s p 7 0 を、p G E X - 4 T - 1 ベクターにサブクローン化した。p G E X - 4 T - 1 / H s p 7 0 Δ A B D (1 ~ 1 1 9 、 4 2 9 ~ 6 4 0) 、構造体 p G E X - 4 T - 1 / H s p 7 0 N (1 ~ 1 1 9) は、センスプライマー 5' - G A A G A A T T C A T G G C C A A A G C C G C G G C A G - 3' (配列番号: 1) およびアンチセンスプライマー 5' - G C A T C T C G A G C G A G A T C T C C T C G G G G T A - 3' (配列番号: 2) を用いて P C R 法により調整し、p G E X - 4 T - 1 ベクターにサブクローン化した。p G E X - 4 T - 1 / H s p 7 0 Δ N (1 2 0 ~ 6 4 0) は、センスプライマー 5' - C G A G G A A T T C A T G T C C A T G G T G C T G A C C - 3' (配列番号: 3) およびアンチセンスプライマー 5' - G G C C T C G A G C T A A T C T A C C T C C T C A A T G - 3' (配列番号: 4) を用いて P C R 法により調整し、p G E X - 4 T - 1 ベクターにサブクローン化された。p G E X - 4 T - 1 / H s p 7 0 Δ P B D (1 ~ 4 3 5 、 6 1 9 ~ 6 4 0) は前述の方法により調整した (Park et al., 2001, EMBO J. 20:446-456) 。構造体 p F l a g - C M V - 2 / h F A F 1 、 p F L A G - C M V - 2 / h F A F 1 [1 ~ 2 0 1] 、 p F L A G - C M V - 2 / h F A F 1 [1 ~ 3 4 5] 、 p F L A G - C M V - 2 / h F A F 1 [8 2 ~ 6 5 0] 、 p F L A G - C M V - 2 / h F A F 1 [3 6 6 ~ 6 5 0] (h F A F 1 Δ N) 、 p F L A G - C M V - 2 / h F A F 1 [1 8 1 ~ 3 8 1] 、および p C D N A / h F A F 1 は、前述の方法により調整した (Hartl, 1996, Nature 381 :571-580) 。細胞質ルシフェラーゼをコードする p C y t l u c (p R S V L L / V) は、S. S u b r a m a n i (カリフォルニア大学サンディエゴ校) により提供された。

【0092】

実施例 1. 2 - 細胞および試薬

ヒト胎児腎臓上皮 (H E K 2 9 3 T) 細胞が、10% ウシ胎児血清を添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M) を用いて、37℃、5% C O ₂ の条件下で培養、維持した。モノクローナル抗 F l a g 抗体 M 2 は、S i g m a 社から購入した。モノクローナル抗 H s c 7 0 / H s p 7 0 抗体は、S t r e s s G e n 社から入手された。抗 h F A F 1 ポリクローナル抗体は、出願者グループ内において作成した。

【0093】

実施例 1. 3 - 一過性トランスフェクション

H E K 2 9 3 T 細胞が、リン酸カルシウム沈降法を用いて、発現プラスミドによりトランスフェクトした。トランスフェクションを行う前日に、1. 5 x 1 0 ⁶ 個の密度で 1 0 c m 培養皿に細胞を播き、6 ~ 1 2 μ g の発現プラスミドを用いてリン酸カルシウム法により一時的にトランスフェクトした。トランスフェクションから 6 時間後に新たな培地に変え、更に 1 8 時間培養した。

【0094】

実施例 1. 4 - 代謝標識および免疫沈降法

メチオニン半量添加培地において 1 8 時間、2 μ C i / m L [³⁵ S] メチオニンにより細胞を代謝標識した。プロテアーゼ阻害剤を含む緩衝液 (5 0 m M トリス、p H 8. 0 、1 5 0 m M N a C l 、2 m M E D T A 、0. 5 % N P - 4 0 、1 m M P M S F 、0. 5 m M D T T 、5 μ g / m L アプロチニン、1 μ g / m L ロイペプチン、5 m M N a ₃ V O ₄ 、5 m M N a F) を用いて 3 0 分間氷上に置き、細胞を破碎した。

溶解物を、12,000rpmにて1時間遠心分離し、その上清を、モノクローナル抗Flag-M2-アフィニティー架橋アガロースビーズを用いて4℃にて3時間、あるいは抗Flag抗体を用いて2時間、その後タンパクA固定化ビーズを加えて更に1時間4℃にてインキュベートした。ビーズは、溶解緩衝液1mLにより3回以上洗浄した。

【0095】

実施例1.5 - 二次元ゲル電気泳動

タンパク質サンプルを、30分間室温にて、9.5M 尿素、2% トライトンX-100、5% β -メルカプトエタノール、1mM PMSF、5 μ g/mL アプロチニン、10 μ g/mL ペプスタチンA、10 μ g/mL ロイペプチン、1mM EDTA、10mM Na_3VO_4 、10mM NaFを含む緩衝液と混合し、Amersham社製IPGphorにより、7cmのImmobiline Dry Strips (pH 4~7)を用いて等電点電気泳動を行った。以下の等電点電気泳動手順を用いた：20℃にて1ストリップ当たり50 μ A；(1)16時間再水和；(2)500Vで1時間（ステップ及びホールド）；(3)1000Vで1時間（ステップ及びホールド）；(4)8000Vで3時間（ステップ及びホールド）。等電点電気泳動後、ストリップは平衡化緩衝液（1.5M トリス-HCl、pH 8.8、6M 尿素、30% グリセロール、2% SDS、10mg/mL DTT）と共に15分間振とうし、Bio-Rad社製mini 2D-gel SDS-PAGEにセットした。

10

【0096】

実施例1.6 - インビトロ結合アッセイ

GST-Hsp70欠失変異型発現大腸菌（E.coli）サイトゾルを、グルタチオン-セファロース4Bビーズに加え、0.1% トライトンX-100を含むPBS中において、4℃にて3時間インキュベートした。ビーズは、0.1% トライトンX-100を含むPBSにより3回洗浄した。グルタチオン-セファロース4Bビーズに結合したHsp70欠失変異型およびトロニンによりGST-hFAF1から切り取ったhFAF1を用いて、結合緩衝液（1mL当たり1mgのウシ血清アルブミンを加えた50mM NaCl）中において、4℃にて3時間揺動し、結合アッセイを行った。ビーズを、0.5% NP-40を含むPBSにより5回洗浄し、2倍ゲルサンプル緩衝液中で再懸濁した。その後、SDS-PAGEにより還元し、クマシーブルー染色した。ゲル画像を得た後、ゲル中のタンパク質をPVDf膜に転写し、抗hFAF1ポリクローナル抗体により免疫染色した。

20

30

【0097】

実施例1.7 - 共焦点顕微鏡法

形態観察のために、コーティングされたカバースリップ上で細胞を培養し、一時的にトランスフェクトし、熱ショック処理した。HBSS中で当該細胞を静かにすすぎ、HBSS中で室温にて10分間、4%パラホルムアルデヒドで固定した。HBSSで洗浄した後、細胞は、0.1% トライトンX-100を加えてHBSS中において室温にて10分間インキュベートすることにより、免疫染色の前に透過処理した。3% BSA、0.2% Tween 20、および0.2% ゼラチンを含むHBSS中において、細胞を1時間インキュベートすることにより、非特異的タンパク質吸収を阻害した。Hsc70/Hsp70の染色のために、1% ショ糖および1% BSAを含むHBSS中に1:150の割合で希釈したマウスモノクローナルHsc70/Hsp70抗体（Stress Gen社製）を加えて、37℃にて2時間、細胞をインキュベートした。HBSSにより3回洗浄した後、1:200の割合で希釈したテキサスレッド共役ウサギ抗マウス（分子プローブ）を加えて、細胞を1時間インキュベートし、その後HBSSにより洗浄した。Flag-hFAF1を、1:200の割合で希釈したFITC標識モノクローナルM2抗Flag抗体により、室温にて1時間染色した。顕微鏡（Nikon社製Eclipse TE300）に接続したMulti-photon Radiance 2000（Bio-Rad社製）により、共焦点顕微鏡法を行った。

40

【0098】

50

実施例 1. 8 - ゲル内消化および質量分光分析

細胞タンパク質が 2D - ゲル電気泳動上に分離し、クマシーブルーあるいは銀により染色した。メスを用いてゲルスポットが切り出し、粉碎し、25mM NH_4HCO_3 / 50% アセトニトリルにより洗浄し、脱染した。銀染色ゲルは、15mM $\text{K}_4\text{Fe(CN)}_6$ / 50mM チオ硫酸ナトリウムにより洗浄し、脱染した。当該ゲルは粉碎後、アセトニトリルを加えて脱水し、10ng/ μL シークエンシンググレードトリプシン (Promega 社製) を含む 25mM 重炭酸アンモニウム 10~20 μL を加えて再脱水し、37℃にて 12~15 時間インキュベートした。60% アセトニトリル / 0.1% トリフルオロ酢酸を含む溶液 30 μL の添加により、ペプチドを抽出した。3 回抽出を繰り返し、最後にアセトニトリル 20 μL を添加した。抽出液が蓄積し、Speed Vac 真空遠心機により乾燥するまで蒸発させた。サンプルは、0.1% TFA 10 μL により還元し、C18 樹脂を含む Zip Tips (Millipore 社製) により、製造元の指示に従い処理した。洗浄したペプチドは、飽和基質溶液 (α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) 含有 60% アセトニトリル / 0.1% トリフルオロ酢酸) により溶出した。遅延イオン抽出法およびイオンミラーリフレクター質量分析計 (Voyager-DE STR; Applied Biosystems, Inc. 社製) を用いて、MALDI-TOF-MS により、ペプチド混合物を解析した。外部較正は、Sequazyme Peptide Mass Standard Kit (PerSeptive Biosystems 社製) を用いて行い、内部較正は、トリプシンの自己溶解ピーク値を用いて行った。本手順は、通常、50ppm の質量精度を示す。質量スペクトルの解釈には、サンフランシスコのカリフォルニア大学のインターネットウェブサイトで購入可能な Ms-Fit プログラムを使用した。

10

20

30

40

50

【0099】

実施例 1. 9 - ルシフェラーゼ再活性化アッセイ

pCytLuc および Flag 標識 Hsp70 あるいは hFAF1 により、細胞を一時的にトランスフェクトした。トランスフェクションから 24 時間後、細胞を 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ シクロヘキシミドを含む培地の入った組織培養皿に移し、37℃にて 30 分間培養した。細胞が 45℃にて 15 分間加熱処理し、ルシフェラーゼを不活化し、37℃にて様々な時間回復させた。ルシフェラーゼアッセイキット (Promega 社製) を用いて、回収した細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。

【0100】

実施例 1. 10 - SAPK/JNK アッセイ

抗 JNK 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社製) による免疫沈降の後、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ-c-Jun 1~89 ペプチド (Dr. J. R. Woodgett 提供) を基質として用いて、SAPK/JNK がアッセイした。20mM HEPES、pH7.4、50mM β グリセロリン酸 (β -glycerophosphate)、2mM EGTA、1mM ジチオスレイトール、1mM Na_3VO_4 、1% トライトン X-100、10% グリセロール、2 μM ロイペプチン、400 μM フッ化フェニルメチルスルホニル (phenylmethylsulfonyl fluoride)、および 10 単位/ mL アプロチニンを含む緩衝液 A により、細胞ペレットをホモジナイズした。タンパク質 1mg を含む上清を、抗哺乳類抗体 SAPK/JNK を加えてインキュベートし、その後タンパク質 A セファロース 4B 懸濁液を加えてインキュベートした。免疫複合体を、3 回洗浄し、その後グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)-c-Jun および [γ - ^{32}P] ATP を添加したキナーゼ緩衝液 (50mM トリス-Cl、pH7.4、10mM MgCl_2 、2mM EGTA、1mM DTT、0.1% トライトン X-100) を加え、37℃にて 20 分間インキュベートした。反応を停止させるために、2 倍ゲルサンプル緩衝液を添加した。サンプルは、12% SDS-PAGE に供し、ゲルを染色、脱染し、その後乾燥した。c-Jun のリン酸化が、BAS2500 (Fuji 社製) により測定した。

【実施例 2】

【0101】

実施例 2 - 結果

実施例 2. 1 - H s c 7 0 および H s p 7 0 が h F A F 1 相互作用タンパク質であることのインビボにおける同定

h F A F 1 と相互作用するタンパク質を同定するために、共免疫沈降試験を行った。F l a g 標識 h F A F 1 を、H E K 2 9 3 T 細胞内において一時的に過剰発現し、 $2 \mu\text{Ci} / \text{mL} [^3\text{S}]$ メチオニンにより細胞タンパク質を代謝標識した。h F A F 1 相互作用タンパク質を 2 つの画分に分割し、2 D - ゲル電気泳動法により解析した。1 つの画分は、オートラジオグラムおよびウエスタンブロット解析のために N C 膜に転写し、もう 1 つの画分は、可視化のために銀染色した (図 1)。オートラジオグラムにより検出したタンパクスポットを、対応する銀染色ゲルから切り出し、トリプシンによるゲル内消化および M A L D I - T O F - M S を用いたペプチドマスフィンガープリント解析に供した。スポット番号 1 および 2 が、それぞれ熱ショックタンパク質 7 0 同族 (H s c 7 0) および熱ショックタンパク質 7 0 誘導型 (H s p 7 0) であることを同定した (表 1)。抗 H s c 7 0 / H s p 7 0 モノクローナル抗体を用いた N C 膜のウエスタンブロット解析により、H s c 7 0 および H s p 7 0 への結合を再確認した (図 1 C)。更に結合を確認するために、F l a g - h F A F 1 過剰発現細胞系から得られた細胞溶解物を、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー上で分離し、h F A F 1 および H s c 7 0 / H s p 7 0 の結合複合体を 250 ~ 300 k D a 画分において共溶出した (データ非掲載)。

【0102】

表 1. 2 D - ゲル電気泳動法および M A L D I - T O F により同定した F l a g - h F A F 1 結合タンパク質

【0103】

【表 1】

スポット 番号	同定された タンパク	N C B I G I 番号	質量 (D a)	p I	収率 (%)
1	H s c 7 0	18273804	70899	5.4	29
2	H s p 7 0	386785	69869	5.4	30

【0104】

インビボにおいて、内因性 h F A F 1 が内因性 H s c 7 0 / H s p 7 0 と相互作用するかを調べるために、ポリクローナル抗 h F A F 1 抗体を用いて、H E K 2 9 3 T 細胞中において免疫沈降試験を行った。図 2 は、インビボにおいて、内因性 H s c 7 0 / H s p 7 0 が h F A F 1 タンパク質複合体中に存在することを示す。加えて、大腸菌 (E. c o l i) に発現させた組換え h F A F 1 は、細菌 H s p 7 0 である D n a K への結合能を有するため (データ非掲載)、h F A F 1 が H s p 7 0 に対して固有に結合する性質を有することが示唆される。

【0105】

実施例 2. 2 - インビボにおいて、H s c 7 0 / H s p 7 0 は h F A F 1 のアミノ酸 82 ~ 180 と相互作用する

H s p 7 0 との相互作用に必要な h F A F 1 ドメインを明らかにするために、内因性 H s c 7 0 / H s p 7 0 と一時的にトランスフェクトした一連の F l a g - h F A F 1 欠失変異型との結合を検証した (図 3 A)。様々な F l a g 標識 h F A F 1 欠失変異型を用いて、H E K 2 9 3 T 細胞をトランスフェクトし、抗 F l a g - M 2 - アフィニティー架橋アガロースゲルにより免疫沈降した。抗 F l a g 抗体 (図 3 B の上パネル) および抗 H s c 7 0 / H s p 7 0 抗体 (図 3 B の下パネル) を用いて、沈降物をウエスタンブロット法により解析した。H s c 7 0 / H s p 7 0 は、ベクタートランスフェクト細胞の抗 F l a g - M 2 - アフィニティー架橋アガロースゲルには結合せず、F l a g 標識 h F A F 1 のアミノ酸配列 366 ~ 650 および 181 ~ 381 には極めてわずかにしか結合しなかったが、アミノ酸配列 1 ~ 201、1 ~ 345、および 82 ~ 650 を含む N 末端 h F A F 1 フラグメントには良好に結合した。これらのデータにより、H s c 7 0 / H s p 7 0 との

結合には、h F A F のアミノ酸配列 8 2 ~ 1 8 0 が必要であることが示された。このことは、図 3 C において確認された。h F A F 1 のアミノ酸 8 2 ~ 1 8 0 は、内因性 H s c 7 0 / H s p 7 0 に結合した。この領域には、F a s デスドメイン結合ドメイン（アミノ酸残基 1 ~ 2 0 1）を含む（Ryu et al., 1999, Biochem. Biophys. Res. Commun. 262:388-394）。

【0106】

実施例 2. 3 - インビトロにおいて、h F A F 1 は H s p 7 0 N 末端ドメインと直接結合する

h F A F 1 が H s p 7 0 と直接的あるいは間接的のいずれで結合するかを検証するために、アクセサリタンパク質媒介プロセスにおいて、インビトロ・プルダウンアッセイを行った。G S T - H s p 7 0 の様々な切断型（図 4 A）：H s p 7 0 完全型、1 ~ 6 4 0 ; 1 ~ 1 2 0 ; 1 2 0 ~ 6 4 0 ; 1 ~ 1 1 9 および 4 2 8 ~ 6 4 0 ; また 1 ~ 4 3 5 および 6 1 6 ~ 6 4 0 を用意した。様々な組換え G S T - H s p 7 0 が、グルタチオン - セファロースビーズに固定化し、精製 h F A F 1 を加えて 1 0 m M A T P 存在下にてインキュベートした。抗 h F A F 1 抗体を用いた免疫プロット法により、h F A F 1 と G S T - H s p 7 0 (1 ~ 1 2 0) 間の直接的相互作用が明らかになった（図 4 B）。A T P が存在しない場合でも、H s p 7 0 と h F A F 1 間の結合は影響受けなかった（図 4 C）。これらのデータにより、h F A F 1 が H s p 7 0 の N 末端と直接相互作用し、A T P に誘導した H s p 7 0 の構造変化により、結合に変化が生じないことが示唆される。

【0107】

実施例 2. 4 - 熱ショックは H s p 7 0 と h F A F 1 間の相互作用に影響を及ぼさない
インビボにおいて、h F A F 1 と H s c 7 0 / H s p 7 0 間の相互作用に対する熱ショックの影響を検証した。p F l a g - C M V - 2 ベクターあるいは F l a g 標識 h F A F 1 により一時的にトランスフェクトした H E K 2 9 3 T 細胞を、4 5 ° C にて 4 5 分間熱ショック処理し、3 7 ° C にて様々な時間回復し、抗 F l a g - M 2 - アフィニティー架橋アガロースゲルを用いて免疫沈降した。免疫沈降物は、抗 H s c 7 0 / H s p 7 0 （図 5 の上パネル）および抗 F l a g - M 2 抗体（図 5 の下パネル）を用いて、ウェスタンブロット法により解析した。L A S 1 0 0 0 (F u j i 社製) を用いて、直線領域における H s c 7 0 / H s p 7 0 の F l a g - h F A F 1 に対する割合の定量解析を行ったが、熱ショック処理後の回復時間中、H s c 7 0 の相互作用は変化しなかった。このことから、h F A F 1 と H s c 7 0 / H s p 7 0 間の相互作用は恒常的なものであり、熱ショック処理により影響されないことが示唆される。

【0108】

実施例 2. 5 - h F A F 1 および H s c 7 0 / H s p 7 0 の細胞内局在性は熱ショックにより変化した

h F A F 1 と H s c 7 0 / H s p 7 0 間の相互作用は、A T P およびストレスによる影響を受けなかったため、結合複合体の局在性が特異的で熱ショックにより変化するか否かという疑問が生じる。H e L a 細胞中において一時的に過剰発現した F l a g - h F A F 1 が 4 5 ° C にて 3 0 分間熱ショック処理し、2 4 時間後、3 7 ° C で回復した。H s p 7 0 / H s c 7 0 タンパク質は、モノクローナル抗 H s c 7 0 / H s p 7 0 抗体およびテキサスレッド標識二次抗体により、また F l a g - h F A F 1 は、F I T C 標識抗 F l a g - M 2 モノクローナル抗体により染色した。h F A F 1 および H s p 7 0 は、正常にサイトゾルおよび核中に現れた（図 6 A および B）。2 つの画像を重ね合わせた場合には、サイトゾルおよび核領域は明るい黄色を示し、2 つのタンパク質の共局在性が示唆された（図 6 C）。4 5 ° C にて 3 0 分間細胞が熱ショック処理した場合、熱ショック直後には h F A F 1 および H s p 7 0 は核周囲領域およびサイトゾルにおける明るい黄色の斑点に共局在した（図 6 F）。3 7 ° C にて 2 4 時間回復後には、h F A F 1 は主に核およびサイトゾルに再局在し、H s p 7 0 はコントロール細胞に比べ、核における集積を示した（図 6 G および H）。再度、2 つのタンパク質は核周囲領域に共局在した（図 6 I）。これらの結果により、h F A F 1 および H s p 7 0 の共局在化部位は、熱ショックおよび回復条件により

、サイトゾルおよび核領域、また核周囲領域と様々であることが示される。

【0109】

実施例 2. 6 - インビボにおいて、h F A F 1 は H s p 7 0 媒介による熱変性ホタルルシフェラーゼの再活性化を阻害する

これまでの報告により、細胞中に一時的に発現させたルシフェラーゼ活性は、インビボにおいて、H s p 7 0 のシャペロン活性マーカーの役目を果たし得ることが示された (Mich
els et al., 1995, Eur. J. Biochem. 234:382-389; Nollen et al., 2000, Mol. Cell.
Biol. 20:1083-1088)。インビボにおいて、F l a g 標識 H s p 7 0 が熱変性ルシフェ
ラーゼの再活性化を加速するか否かを検証するために、F l a g 標識 H s p 7 0 あるいは H
s p 7 0 の A T P 結合ドメイン欠失変異型 (H s p 7 0 Δ A B D、1 ~ 1 1 9 および 4 2
9 ~ 6 4 0) を、H E K 2 9 3 T 細胞中において一時的にトランスフェクトした。熱不活
化から回復中の酵素活性がシャペロン活性に依存するホタルルシフェラーゼを、共発現さ
せた。抗 F l a g 抗体による F l a g - H s p 7 0 の検出には問題があったため、抗 H s
p 7 0 抗体を用いたウエスタンブロット解析により、各タンパク質の過剰発現を確認した
(図 7 A)。4 5 $^{\circ}$ C にて 1 5 分間、細胞が熱ショック処理し、3 7 $^{\circ}$ C にて示された時間回
復した後、回収、溶解し、ルシフェラーゼアッセイを行った (図 7 B)。H s p 7 0 単独
の過剰発現であっても、3 7 $^{\circ}$ C にて回復中のルシフェラーゼ活性の再活性化が十分に促進
された。しかしながら、H s p 7 0 Δ A B D トランスフェクト細胞においては、ルシフェ
ラーゼの再活性化は H s p 7 0 発現細胞の場合より遅いが、コントロール細胞の場合より
速かった。このことにより、熱ショックにより不活化したルシフェラーゼは、H s p 7 0
のシャペロン活性により再活性化し、またインビボにおいて、A T P 結合ドメインがシャ
ペロン活性に不可欠ではないことが示唆された。

【0110】

H s p 7 0 のシャペロン活性に対する h F A F 1 の影響を検証するために、F l a g 標識
h F A F 1 を有するまたは有さない H s p 7 0 を H E K 2 9 3 T へトランスフェクトした
。抗 F l a g および抗 h F A F 1 抗体を用いたウエスタンブロット解析により、F l a g
標識 h F A F 1 の過剰発現を確認した (図 7 C)。H s p 7 0 は h F A F 1 とほぼ一緒に
移動するため、図 7 C のパネルには H s p 7 0 は現れなかった。F l a g - h F A F 1 と
H s p 7 0 との共トランスフェクションは、H s p 7 0 の再生活性を有意に低下させた (図
7 D)。

【0111】

h F A F 1 の阻害作用が、内因性 H s p 7 0 との結合を介することを確認するために、F
l a g 標識 h F A F 1、あるいは H s p 7 0 の過剰発現がない場合に H s p 7 0 との相互
作用に必要な N 末端ドメインを欠く欠失変異型、F l a g - h F A F 1 のアミノ酸配列 3
6 6 ~ 6 5 0 (F l a g - h F A F 1 Δ N) により、H E K 2 9 3 T 細胞へトランスフェ
クトした。ウエスタンブロット解析により、F l a g - h F A F 1 および F l a g - h F
A F 1 Δ N の発現をモニタリングした (図 7 E)。F l a g - C M V - 2 ベクタープラス
ミド単独のトランスフェクトであっても、3 7 $^{\circ}$ C にて 4 時間後には、熱変性細胞質ルシフ
ェラーゼの基礎レベルが最大 1 1 % まで再活性化した。一方、F l a g - h F A F 1 が存
在すると、ルシフェラーゼ活性は 6 あるいは 7 % へと有意に低下した。しかしながら、F
l a g - h F A F 1 Δ N の発現は、H s p 7 0 のシャペロン活性を阻害しなかった (図 7
F)。図 7 F に示した通り、H s p 7 0 相互作用に必要な N 末端ドメインを欠く F l a g
- h F A F 1 Δ N h F A F 1 の過剰発現によるドミナントネガティブ様作用を確認する
ために、1 μ g および 2 μ g の F l a g - h F A F 1 Δ N ベクター DNA が、H E K 2 9
3 T 細胞中においてトランスフェクトした。ウエスタンブロット解析により、F l a g -
h F A F 1 Δ N の発現をモニタリングした。(図 7 G)。F l a g - h F A F 1 Δ N のト
ランスフェクトにより、H s p 7 0 の再生活性が、量依存的に増加した (図 7 H)。これ
らの試験により、h F A F 1 が H s p 7 0 のシャペロン活性に対する阻害剤として働き、
h F A F 1 の N 末端残基がこの H s p 7 0 シャペロン活性阻害に関与することが証明される

。

【0112】

実施例2. 7 - h F A F 1 の過剰発現により熱ショックストレスに対する細胞感受性が高まる

ストレス誘導性アポトーシスにはS A P K / J N Kの活性化が必要であり、H s p 7 0の過剰発現は、S A P K / J N Kの活性化を抑制することにより、アポトーシスを防ぐ (Ga bai et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:18033-18037; Volloch et al., 1998, Cell Str ess Chaperones 3:265-271; Meriin et al., 1999, Mol. Cell. Biol. 19:2547-2555)。H s p 7 0発現が多く、ストレス耐性が高くなった細胞は、ストレス感受性が低下し、ストレスが高まるとS A P K / J N Kを活性化し、同量のストレス下においてはS A P K / J N Kの非活性化速度を高めることが示された。したがって、S A P K / J N K活性化および非活性化の反応速度は、様々なストレスに対する細胞感受性を示すマーカーとしての役目を果たし得ると思われる (Kim and Lee, 2000, Mol. Cell. Biochem. 229; 139-151)。

10

【0113】

その後、S A P K / J N K活性化をマーカーとして、熱ショック誘導性細胞反応に対するh F A F 1の過剰発現による影響を検証した。F l a g - C M V - 2ベクター、F l a g標識h F A F 1、あるいはF l a g標識h F A F 1 Δ Nを用いて、H E K 2 9 3 T細胞をトランスフェクトした。トランスフェクトしたH E K 2 9 3 T細胞は、4 5 °Cにて4 5 分間熱ショック処理し、S A P K / J N K活性を測定した (図8)。コントロールおよびF l a g - h F A F 1 Δ N発現細胞のいずれにおいても、S A P K / J N K活性化反応速度は同様であった。熱ショックおよび非活性化直後の活性は、7時間回復後の基礎レベルの1 3 倍であった。他方で、F l a g - h F A F 1発現細胞におけるS A P K / J N K活性は、熱ショック直後の活性が1 6 倍と増加し、その状態が最大2時間まで持続した。非活性化は最大7時間まで有意に遅延した。これにより、h F A F 1発現細胞は、熱ショックに対する感受性が高く、回復力が低いことが示される。また、熱ショック処理F l a g - h F A F 1発現細胞において観察されたS A P K / J N Kの過度の活性化は、熱ショック処理F l a g - h F A F 1 Δ N発現細胞においては見られなかった。これにより、h F A F 1の過剰発現により熱ショックに対する細胞の感受性が高まり、アポトーシスを生じる傾向が高まることが示唆される。

20

【0114】

実施例2. 8 - h F A F 1 の過剰発現により熱ショック誘導性の細胞死が増加する
ストレス誘導性細胞死に対するh F A F 1の影響を確認するために、熱ショック後の細胞生存率を検証した。F l a g - C M V - 2ベクター、F l a g標識h F A F 1、あるいはF l a g標識h F A F 1 Δ NによりトランスフェクトしたH E K 2 9 3 T細胞を、4 5 °Cにて9 0 分間熱ショック処理した。3 7 °Cにて4 8時間回復した後、トリパンブルー色素排除法により生存細胞の割合を判定した。F l a g - h F A F 1過剰発現H E K 2 9 3 T細胞は、ベクタートランスフェクト型に比べ、生存率が低く、生存率が高かったF l a g - h F A F 1 Δ Nトランスフェクト細胞とは対照的であった (図9)。これにより、h F A F 1との複合体形成により、H s p 7 0のシャペロン活性が低下し、細胞のストレス感受性が高まることが確認した。H s p 7 0結合親和性を欠くF l a g - h F A F 1 Δ N発現細胞は、熱ショックに対する耐性を示した。これは、H s p 7 0のシャペロン活性上昇によるものか、あるいはh F A F 1 C末端が有する何らかの未知の働きによるものかの可能性がある。

30

40

【0115】

実施例2. 9 - 脊椎動物においてF A F 1配列は高度に保存される

F A F 1が、進化の過程を通じて高度に保存されているか否かを判断するために、h F A F 1の長鎖型および短鎖型 (Ryu et al., 1999, Biochem. Biophys. Res. Commun. 262:388-394)、ラット、マウス、ウズラ、ゼブラフィッシュ (D. rerio)、線虫、およびハエのF A F 1をアラインメント処理した。図10に示した通り、H s p 7 0が結合するアミノ酸領域8 2 ~ 1 8 0と同様に、F A F 1全配列が高度に保存されている。脊椎動

50

物間においては78～95%同一であり、脊椎動物と無脊椎動物間では18～21%同一である。これにより、脊椎動物全体において、FAF1が不可欠の役割を果たすことが示唆される。

【実施例3】

【0116】

実施例3 - VCPおよびユビキチン化タンパク質に結合するFAF1に関する実験手順

実施例3. 1 - 細胞培養、cDNA発現および抗体

37℃、5%CO₂の条件下で、293ヒト胎児腎臓上皮(HEK293T)細胞を、高グルコースダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)を用いて培養、維持し、Jurkat Tリンパ腫細胞(E6-1クローン)は、10%ウシ胎児血清(FBS)を添加したRPMI-1640を用いて培養した。

10

【0117】

哺乳類細胞において発現させるために、pFlag-CMV-2-hFAF1完全型、pFlag-CMV-2-FAF1[1～81]、pFlag-CMV-2-FAF1[1～201]、pFlag-CMV-2-FAF1[1～345]、pFlag-CMV-2-FAF1[181～381]、pFlag-CMV-2-FAF1[366～650]、pFlag-CMV-2-FAF1[567～650]、およびGST-hFAF1をコードしている構造体を、前述の通り用意した(35)。ヒトcDNAライブラリーから得たVCPのcDNAクローンを
用いて、pFlag-CMV-2ベクターおよびpGEX-4T-1ベクターのEcoRIおよびSalI部位に、Flag-VCPおよびGST-VCPがクローン化した。EGFP-N1ベクターのEcoRIおよびBamHI部位にクローン化したUbG76V-GFPベクターは、N. P. Dantuma(スウェーデン、Karolinska Institutet)により提供された(8、20)。抗Flagモノクローナル抗体(M2)、モノクローナル抗Flag-M2-アフィニティー架橋アガロースゲルおよびMTTアッセイキットはSigma社(米ミズーリ州セントルイス)から、ポリユビキチン鎖(Ub2-7)はAffinity Research Products社(英BIOMOL International LP)から購入した。モノクローナル抗チューブリン、抗GFPおよび抗IkBα抗体はSanta Cruz Biotechnology社(米カリフォルニア州サンタクルーズ)から、抗ユビキチンモノクローナル抗体はChemicon社(米カリフォルニア州テメキュラ)から、抗VCPモノクローナル抗体はResearch Diagnostics社(米ニュージャージー州Research Diagnostics Inc)から、そしてTNF-αはR&D Systems社(米ミネソタ州ミネアポリス)から購入した。hFAF1のポリクローナル抗血清は、ヒト組換えFAF1を抗原としてマウス内で作製した(35)。

20

30

【0118】

実施例3. 2 - 一過性トランスフェクション

HEK293T細胞は、発現プラスミドを用いて、リン酸カルシウム沈降法によりトランスフェクトした。トランスフェクションを行う前日に、 1.2×10^6 個の密度で10cm培養皿に細胞を播き、6～12μgの発現プラスミドを用いてリン酸カルシウム法により一時的にトランスフェクトした。Amaxa apparatus社(独ケルン、Amaxa)から提供されたヌクレオフェクター溶液を用いて、Jurkat細胞にトランスフェクトした。Amaxaシステムを用いるために、 5×10^6 個のJurkat細胞を回収し、その後プラスミドDNA5μgを加えた特異化エレクトロポレーション緩衝液100μL中に再懸濁した。再懸濁した細胞をキュベットに移し、Amaxaヌクレオフェクター装置を用いてヌクレオフェクト(nucleofect)した。

40

【0119】

実施例3. 3 - 免疫沈降法

プロテアーゼ阻害剤(50mM トリス-HCl、pH8.0、150mM NaCl、2mM EDTA、0.5% NP-40、1mM PMSF、0.5mM DTT、5μ

50

g/mL アプロチニン、10 µg/mL ペプスタチンA、10 µg/mL ロイペプチン)を含む溶解緩衝液を用いて30分間氷上に置き、細胞を破碎した。溶解物を12,000 rpmにて1時間遠心分離し、その上清を、モノクローナル抗Flag-M2-アフィニティー架橋アガロースビーズ (Sigma社製)を用いて4℃にて3時間インキュベートした。内因性FAF1を免疫沈降するために、マウス免疫グロブリンGあるいは抗FAF1ポリクローナル抗体を加えて細胞溶解物をインキュベートし、その後タンパクGビーズを加えてインキュベートした。免疫沈降したビーズは、0.5% NP-40を含む1 mL溶解緩衝液により3回以上洗浄した。得られたペレットは、免疫ブロット法に用いた。ユビキチン結合のために、30分間氷上にて、プロテアーゼ阻害剤 (10 mM HEPES、1.5 mM MgCl₂、10 mM KCl、0.5 mM PMSF、0.2 mM DTT、5 µg/mL アプロチニン、10 µg/mL ペプスタチンA、10 µg/mL ロイペプチン、pH 7.9)を含む低張緩衝液400 µL中で細胞ペレットを溶解し、4,000 rpmにて15分間遠心分離した。その上清を、モノクローナル抗Flag-M2-アフィニティー架橋アガロースビーズを用いて4℃にて3時間インキュベートした。ビーズは、0.5% NP-40を含む1 mL溶解緩衝液により3回洗浄した。

10

【0120】

実施例 3. 4 - 二次元ゲル電気泳動

タンパク質サンプルを、9.5 M 尿素、2% トライトンX-100、5% β-メルカプトエタノール、1 mM PMSF、5 µg/mL アプロチニン、10 µg/mL ペプスタチンA、10 µg/mL ロイペプチン、1 mM EDTA、10 mM Na₃VO₄、10 mM NaFを含む緩衝液と30分間室温にて混合し、Amersham社製IPGphorにより、7 cmのImmobiline Dry Strips (pH 4~7)を用いて等電点電気泳動を行った。以下の等電点電気泳動手順を用いた：20℃にて1ストリップ当たり50 µA；(1) 16時間再水和；(2) 500 Vで1時間 (ステップ及びホールド)；(3) 1000 Vで1時間 (ステップ及びホールド)；(4) 8000 Vで3時間 (ステップ及びホールド)。等電点電気泳動後、ストリップは平衡化緩衝液 (1.5 M トリス-Cl、pH 8.8、6 M 尿素、30% グリセロール、2% SDS、10 mg/mL DTT)と共に15分間振とうし、Bio-Rad社製mini 2D-gel SDS-PAGEにセットした。

20

30

【0121】

実施例 3. 5 - ゲル内消化および質量分光分析

メスを用いてゲルスポットを切り出し、粉碎し、25 mM 重炭酸アンモニウム/50% アセトニトリルにより洗浄し、脱染した。銀染色ゲルは、15 mM フェリシアン化カリウム/50 mM チオ硫酸ナトリウムにより洗浄し、脱染した。その後粉碎し、アセトニトリルを加えて脱水し、10 ng/µLのシーケンシンググレードトリプシン (Promega社製)を加えた25 mM 重炭酸アンモニウム10~20 µLを加えて再脱水し、37℃にて12~15時間インキュベートした。60% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸を含む溶液30 µLの添加によりペプチドを3回抽出し、最後にアセトニトリル20 µLにより抽出した。抽出液を蓄積し、Speed Vac真空遠心機により乾燥するまで蒸発させた。乾燥させたペプチドは、飽和基質溶液α-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸含有60% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸と混合した。MALDI-TOF-MS (Voyager-DE STR; Applied Biosystems, Inc. 社製)あるいはESI-q-TOFタンデム質量分析装置 (Micromass/Waters Corp. 社製)に、カリフォルニア大学サンフランシスコ校のインターネットウェブサイト (<http://prospector.ucsf.edu/>)で入手可能なMs-Fitプログラムを併用し、ペプチド混合物を解析した。

40

【0122】

実施例 3. 6 - インビトロ結合アッセイ

GST-hFAF1欠失変異型融合タンパク質およびGST-VCpを、大腸菌 (Esc

50

herichia coli) BL21 (DE3) 細胞中において発現させ、グルタチオン-セファロース4Bビーズに結合した。ビーズは、0.1%トライトンX-100を含むPBSにより3回洗浄した。グルタチオン-セファロース4Bビーズに結合したGST-hFAF1に、組換えVCPを加えてインキュベートした。グルタチオン-セファロース4Bビーズに結合したGST-VCPに、組換えhFAF1を加え、結合緩衝液(50mM トリス-HCl、pH7.4、150mM NaCl、1mg/mL BSA)中において、4℃にて3時間揺動しつつインキュベートした。ユビキチン結合のために、ビーズに結合したGST-hFAF1を、HEK293T細胞から抽出した細胞質抽出物あるいはポリユビキチン鎖(UB₂₋₇)と共に、結合緩衝液(50mM トリス-HCl、pH7.4、150mM NaCl、1mg/mL BSA)中において4℃にて3時間インキュベートした。ビーズは、1mLの0.1%トライトンX-100を含む結合緩衝液中にて5回洗浄し、その後2倍ゲルサンプル緩衝液中で再懸濁した。

10

【0123】

実施例3.7-ユビキチン化タンパク質分解の定量

UbG76V-GFPを基質として用い、ユビキチン化タンパク質のタンパク質分解を定量した(8,20)。HEK293T細胞に、発現プラスミド、Ub^{G76V}-GFPあるいはEGFP-N1ベクター200ngおよび様々なFlag-hFAF1切断型構造体1μgを加え、35mm培養皿にてリン酸カルシウム沈降法により共トランスフェクトした。24時間後、PBSにより細胞を洗浄し、細胞数10,000個当たりのUbG76V-GFPの蛍光度がFACSフローサイトメーター(Beckton&Dickinson社製)により測定した。平均蛍光強度は、Cellquestソフトウェアにより算出した。

20

【0124】

実施例3.8-細胞生存率アッセイ

細胞生存率を評価するために、MTT変換アッセイを行った。Amxaエレクトロポレーターを用いて、発現プラスミドにより一時的にトランスフェクトしたJurkat細胞は、 1×10^5 個/ウェルの密度で96ウェルプレートに播いた。MTT(Sigma社製)10μLを加え、その後、MTTの3-[4,5-ジメチルジアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルホルマザン(3-[4,5-dimethyl diazol-2-yl]-2,5-diphenyl formazan)への代謝を促すため、2時間インキュベートした。後者は、酸性イソプロパノールにより可溶化し、マイクロプレートリーダーを用いて、570nmにおける吸光度を測定した。

30

【実施例4】

【0125】

実施例4-結果

実施例4.1-インビトロおよびインビボにおいて、hFAF1はVCPと相互作用するhFAF1の機能を理解する指標として、hFAF1と相互作用するタンパク質の同定を試みた。HEK293T細胞内において、Flag-hFAF1が一時的に過剰発現させた。HEK293T細胞溶解物は、モノクローナル抗Flag-M2-アフィニティー架橋アガロースビーズを用いて免疫沈降し、その免疫沈降物を二次元ゲル電気泳動法により解析した。1つの画分は、ウェスタンブロット解析のためにPVD膜に転写し、もう1つの画分は、可視化のために銀染色した。銀染色により、80~85kDaにおいてFlag-hFAF1が検出し、ウェスタンブロット法により確認した(データ非掲載)。これまでの研究によりhFAF1と相互作用することが示されたHsp70に加え(17)、hsc70も検出し、またFlag標識hFAF1との共沈降物中に新たなスポットを検出したが、コントロールFlagにおいては検出されなかった。銀染色ゲルにおいて検出した新たなスポットは、トリプシンによるゲル内消化に供し、MALDI-TOF-MSおよびESI-q-TOF-tandem MSを用いて解析した。hFAF1と相互作用するタンパク質は、MALDI-TOF-MSを用いたペプチドマスフィンガープリントにより、バロシン含有タンパク質(VCP、NCBIアクセッション番号60059

40

50

42) であると同定し、ESI-q-TOF-tandem MSを用いたシーケンシングにより確認した(図11B)。

【0126】

hFAF1がVCPと直接相互作用するか否かを検証するために、相互インビトロ結合アッセイを行った。GST-hFAF1は、グルタチオン-セファロースビーズ上に固定化し、精製組換えVCPを加えてインキュベートした。抗VCP抗体を用いて、GST-hFAF1とVCP間の直接的な相互作用を観察した(図11C)。相互実験において、グルタチオンビーズ上に固定化したGST-VCPが、精製組換えhFAF1を加えてインキュベートし、抗FAF1抗体を用いて、GST-VCPに結合したhFAF1を検出した(図11D)。

10

【0127】

インビボにおいて、内因性hFAF1が内因性VCPと相互作用するか否かを見るために、HEK293T細胞およびJurkat細胞中において、抗hFAF1ポリクローナル抗体を用いた免疫沈降試験を行った。HEK293TおよびJurkat細胞のいずれにおいても、内因性FAF1がVCPと共免疫沈降することが抗VCP抗体により検出された(図11E)。これにより、インビボにおいても内因性FAF1がVCPと相互作用することが示唆される。

【0128】

実施例4. 2-hFAF1はUBXドメインを通じてVCPと相互作用する

hFAF1とVCP間の相互作用が生じるドメインを明らかにするために、様々なFlag-hFAF1切断型をHEK293T細胞中において過剰発現し、内因性VCPとそれらの相互作用を検証した。図12Aに示した通り、過剰発現したFlag-hFAF1切断型を、抗Flag-M2-アフィニティー架橋アガロースビーズを用いて免疫沈降し、抗Flag抗体(図12B)および抗VCP抗体(図12C)を用いて、免疫プロットした。図12に示した通り、内因性VCPは、Flag-hFAF1完全型、およびアミノ酸366~650および567~650を含むhFAF1フラグメントに結合する。これにより、アミノ酸配列567~650に位置するUBXドメインを通じて、VCPがhFAF1と相互作用することが示唆される。これらの結果は、VCPと複合体を形成した主要タンパク質として同定し、そのUBXドメインが構造的にhFAF1のUBXドメインに極めて類似しているp47が(17, 37)、UBXドメインを通じてVCPと相互作用するというこれまでの報告と一致する。hFAF1は、UBXドメインを通じてVCPと相互作用するもう1つのタンパク質であると思われる。

20

30

【0129】

実施例4. 3-hFAF1はサイトゾル内において、VCPと相互作用する

これまでの報告において、ウズラFAF1(qFAF1)が新規核局在性シグナルを有し、核に局在することが示された(11)。hFAF1が、サイトゾル画分あるいは核画分のいずれにおいてVCPと相互作用するか、また熱ショック誘導性ユビキチン化がこの相互作用に影響を及ぼすか否かに関して検証した。Flag-hFAF1によりトランスフェクトしたHEK293T細胞は、45℃で45分間熱ショックストレスに暴露し、サイトゾル画分と核画分に分画した。図13Aに示した通り、Flag-hFAF1およびVCPのいずれもサイトゾル画分および核画分に存在したが、サイトゾル画分のみにおいて、VCPはFlag-hFAF1と共免疫沈降した(図13B)。Flag-hFAF1と共免疫沈降したVCP量は、熱ショックにより有意に減少し、回復時間中増加したが、一方サイトゾル中のVCP総量は変化しなかった。これにより、hFAF1のVCPとの相互作用が、サイトゾル内においてのみストレス依存的に生じ(図13B)、タンパク質分解に関与する可能性があることが示唆される。

40

【0130】

実施例4. 4-インビトロおよびインビボにおいて、hFAF1はユビキチン化基質に結合する

hFAF1は複数のユビキチン関連ドメインを有し、またユビキチン-プロテアソーム経

50

路に関わることが知られるVCPと相互作用するため(21、36)、hFAF1がユビキチン-プロテアソーム経路に関与するか否かを調査した。図14Aに示した様々なFlag-hFAF1切断型を、HEK293T細胞中において過剰発現し、抗Flag-M2-アフィニティー架橋アガロースビーズにより免疫沈降し、抗ユビキチン抗体により免疫ブロットした。図14Cに示した通り、Flag-hFAF1完全型はマルチユビキチン化タンパク質に結合した。アミノ酸1~81を含むN末端フラグメントは、hFAF1において、hFAF1完全型と同等以上に結合に関わる領域であると思われる。Flag-hFAF1[1~201]およびFlag-hFAF1[1~345]もまた、マルチユビキチン化タンパク質に結合したが、結合は野生型より弱かった。

【0131】

hFAF1がマルチユビキチン化タンパク質と直接的に相互作用するか否かを検証するために、インビトロ結合アッセイを行った。グルタチオン-セファロースビーズに固定化した様々なGST-hFAF1切断型に、ポリユビキチン鎖(UB₂₋₇)を加えてインキュベートし、抗ユビキチン抗体、および内因性マルチユビキチン化基質を模倣する合成Lys48結合ポリユビキチン鎖(UB₂₋₇)(Affinity Research社製)を用いて、免疫ブロット法により結合を検出した。図15Bに示した通り、インビトロにおいて、hFAF1完全型、およびアミノ酸1~81を含みアミノ酸82~650を含まないそのフラグメントは、ポリユビキチン鎖(UB₂₋₇)に結合することが明らかになった。加えて、GST-hFAF1完全型およびGST-hFAF1[1~81]は、マルチユビキチン鎖と相互作用するが、モノユビキチンとは相互作用しなかった。GST-hFAF1[1~81]は、GST-hFAF1完全型に比べ、ジ-、トリ-ユビキチン鎖とより強く相互作用した。しかしながら、GST-hFAF1完全型およびGST-hFAF1[1~81]のいずれも、更に長いポリユビキチン鎖に対しては、同様の親和性を有する。これらの結果により、hFAF1はアミノ酸1~81を直接通じて、マルチユビキチン化タンパク質に直接結合することが示唆される。おそらく、構造上の差異が、hFAF1[1~81]とhFAF1完全型との結合親和性の差異の原因である。

【0132】

Jalviewプログラムを用いて、hFAF1[1~81]のアミノ酸配列を異なるタンパク質とアラインメント処理し、マルチユビキチン化タンパク質に対する結合への関与が知られるUBAドメイン(ユビキチン結合ドメイン)に対する相同性を観察した(図15C)。hFAF1のN末端アミノ酸配列は、種間において高度に保存されているように思われる。マウスFAF1のものと同一であり、p47およびY33Kのものと類似しており、その全てがC末端UBXドメインを含む。Rad23およびPLICは、中央およびC末端にUBAドメインを有するタンパク質であり、UBAドメインを通じてマルチユビキチン化タンパク質に結合する(12、37)。UBAドメインは、溶液構造において、疎水性表面パッチを保存し、図15Cの矢印は、UBAドメイン表面に現れたアミノ酸残基を示す(27)。UBAドメインの疎水性表面パッチは、ユビキチンの5本鎖βシート上の疎水性表面と相互作用するため、重要である。hFAF1のUBAドメインは、他のUBAドメインと完全に保存されているわけではないが、三次元構造において疎水性表面パッチの位置を占めるアミノ酸残基は、高度に保存される(図15C)。実験結果と相同性探索結果を併せた結果に基づき、hFAF1は、N末端UBAドメインを通じてマルチユビキチン化タンパク質に結合する新たなタンパク質ファミリーに属すると思われる。

【0133】

実施例4.5-hFAF1はUBAドメインを通じて、Lys48結合およびLys63結合ユビキチン化タンパク質に結合する

マルチユビキチン鎖のどの集団がhFAF1と相互作用し得るかを究明するために、GST-hFAF1およびGST-hFAF1[1~81]をグルタチオン-セファロースビーズに共役させ、HEK293T細胞溶解物と共にインキュベートした。抗ユビキチン抗体を用いて、ウェスタンブロット解析により相互作用を検出した(データ非掲載)。高分子量マルチユビキチン化タンパク質を質量分光法により解析した(図16A)。ユビキチ

10

20

30

40

50

ン - プロテアソーム経路において、マルチュビキチンは、L y s 4 8 - G l y 7 6 イソペプチド結合を通じて、基質のリジン残基と結合した近接Ubと共に連鎖している（30）。ユビキチン共役タンパク質のトリプシン消化により、2 残基断片（G l y - G l y）を含むユビキチン化部位にシグニチャーペプチドが産生した。これはユビキチンC末端から生じたものであり、イソペプチド結合により標的タンパク質のリジン残基に共有結合していた。この信号ペプチド（signature peptide）は、トリプシンが修飾リジンに関わるペプチド結合を切断できないため、タンパク質分解的切断の欠損のみならずリジン残基において1 1 4 . 1 D aの質量シフトを示す（30）。MALDI - TOF - MSを用いて、h F A F 1の高分子相互作用タンパク質がマルチュビキチン鎖（NCBIアクセッション番号1 3 6 6 7 0）であることが同定した。加えて、それぞれアミノ酸残基4 3 ~ 5 4 および5 5 ~ 7 2 から生じた2つの1 1 4 . 1 D aピーク（m/z、1 4 6 0 . 7 8 7 0 ; m/z、2 2 4 4 . 1 8 1 4）の増加が検出した（図1 6 B、表2）。1 1 4 . 1 D aの質量シフトがユビキチン鎖のイソペプチドにより生じたことを検証するために、E S I - q - T O Fタンデム質量分析装置を用いて各ピークのシーケンシングを行い、それぞれL y s 4 8 - G l y G l y（図1 6 C）およびL y s 6 3 - G l y G l yのイソペプチドであることを同定した（データ非掲載）。これらの結果により、h F A F 1がL y s 4 8 結合およびL y s 6 3 結合マルチュビキチン鎖と相互作用することが示された。

10

20

30

40

50

【0 1 3 4】

表2. G S T - h F A F 1 関連ユビキチンのトリプシン切断によるペプチドフラグメントの予測値および実測値

【0 1 3 5】

【表2】

トリプシン ペプチド	予測 m/z	実測 m/z	配列	修飾
12-27	1787.9278	1787.9066		
30-42	1523.7818	1523.7684		
34-42	1039.5172	1039.5037		
43-54	1346.7432	1460.7870	LIFAGK(- GG)QLEDGR	Lys-GlyGly
55-72	2130.1559	2130.1343		
55-72	2130.1559	2244.1814	TLSDYNIQK(- GG)ESTLHLVLR	Lys-GlyGly
64-72	1067.6213	1067.6204		

【0 1 3 6】

実施例4. 6 - h F A F 1 はユビキチン依存基質の分解を阻害する

図1 7 は、F l a g - h F A F 1 およびF l a g - h F A F 1 [1 ~ 8 1] の過剰発現がマルチュビキチン化タンパク質の蓄積を引き起こしたことを、p F l a g - C M V ベクターおよびF l a g - h F A F 1 [8 2 ~ 6 5 0] の過剰発現との対比により示している。h F A F 1 の過剰発現に続いて、細胞内マルチュビキチン化タンパク質の蓄積が生じた原因は、h F A F 1 がそれらと複合体を形成し、そのタンパク質分解を予防あるいは阻害したためであるという仮説が立てられる。本仮説を検証するために、h F A F 1 がユビキチン化タンパク質のタンパク質分解に影響を及ぼすか否かを検証することを決定した。そのために、G F P を用いたプロテアソーム基質、U b ^{G 7 6 V} - G F P が用いて、D a n t u m a らによる生細胞におけるユビキチン - プロテアソーム依存性タンパク質分解の定量を実施した（8 ~ 2 0）。まず、出願人の実験条件下において、前述のシステムが機能することが確認した（図2 1）。その後、2 0 0 n g のU b ^{G 7 6 V} - G F P および1 μ g のF l a g - h F A F 1 あるいはF l a g - V C P を、H E K 2 9 3 T 細胞へ一時的に共トランスフェクトし、プロテアソーム分解後、トランスフェクション後2 4 時間の時点で、フローサイトメトリー法によりG F P の蛍光強度を測定した。

【0 1 3 7】

F l a g - h F A F 1 の過剰発現により、U b ^{G 7 6 V} - G F P 分解が有意に減少したことがウエスタン解析により検出し（図1 8 A）、p F l a g - C M V ベクターの過剰発現

に比べ、平均蛍光強度は2倍に上昇した(図18B)。平均蛍光強度の差異がUb^{G76V}-GFPのトランスフェクション効率による可能性を排除するために、EGFP-N1ベクターを用いて同じ実験を行った。HEK293T細胞に、EGFP-N1ベクターおよびFlag-hFAF1あるいはFlag-VC Pを用いて、一時的に共トランスフェクトした。トランスフェクション後24時間の時点で、GFPのタンパク質レベルをGFP抗体によるウェスタン分析により測定し、チューブリンにより規準化した。図18Aに示す通り、トランスフェクション効率に基づいたGFP濃度は変化せず、これによりhFAF1における増加が、プロテアソームにおけるUb^{G76V}-GFPレポーター分解減少に特異的に関与することを確認した。

【0138】

フローサイトメトリー法およびウェスタンブロット法により、Flag-VC Pの過剰発現がUb^{G76V}-GFPレポーターのレベルを低下させることが明らかになった(図18)。VC Pはユビキチン化タンパク質を動員し、プロテアソームにおけるその分解を促すことが知られているため(6、7)、これは予期した通りの結果であった。Flag-hFAF1およびFlag-VC Pにより共トランスフェクトした場合、Ub^{G76V}-GFPレポーターの蛍光度レベルは、VC PとhFAF1の蛍光度レベルとの間の値を示した。これには2通りの説明が可能である。1つは、今回観察した蛍光度が、Flag-hFAF1とFlag-VC Pの蛍光度レベルの合計値であるという可能性である。もう1つの説明は、VC PがhFAF1に対して負の調節を行い、今回観察した蛍光度を生じたとするものである。これらの可能性のいずれが実際上正しく、どのhFAF1ドメインがプロテアソーム基質の分解を阻害し、安定させるのに必要であるかの究明を試みた。このために、Ub^{G76V}-GFPレポーターおよび様々なFlag-hFAF1切断型を用いて、HEK293T細胞が共トランスフェクトした。フローサイトメトリー法およびウェスタンブロット法により、完全型Flag-hFAF1の過剰発現がUb^{G76V}-GFPのレベルを増加させ、hFAF1[82~650]におけるUBAドメイン欠失は何の影響も及ぼさないことが明らかになった(図18C、18D)。UBAドメインを含むがVC P結合ドメインを含まないFlag-hFAF1[1~81]およびFlag-hFAF1[1~345]は、完全型hFAF1に比べ、蛍光度レベルを有意に増加させた(図18Cおよび18D)。これらの結果により、hFAF1のUBAドメインは、ユビキチン化プロテアソーム基質の蓄積に必要かつ十分であり、C末端を通じてhFAF1と相互作用するVC Pは、hFAF1によるこのような蓄積を阻害することが示唆される。

【0139】

実施例4. 7-hFAF1は内因性ユビキチン化基質のタンパク質分解を妨げる
hFAF1はUb^{G76V}-GFPの分解を阻害したため、hFAF1が内因性ユビキチン化基質の分解にも影響を及ぼし得るか否かが検証した。IκBαはユビキチン-プロテアソーム経路により分解されることが知られ(39)、またVC Pがプロテアソームに動員されると、ユビキチン化IκBαに関与するため(7)、内因性基質としてはIκBαを選択した。Flag-hFAF1あるいはその切断型をトランスフェクトしたHEK293T細胞は、トランスフェクション後24時間の時点で、5、10、15、20分間、腫瘍壊死因子α(TNF-α、10ng/mL)に暴露した。図19に示した通り、全細胞溶解物がIκBα抗体およびTNF-αを用いて免疫ブロットしたが、その暴露時間に応じて、IκBαの分解が促進した。未処理細胞においては、DNAの過剰発現に関係なく、IκBαの含有量はほぼ同等であった。しかしながら、Flag-hFAF1およびFlag-hFAF1[1~81]の過剰発現は、IκBα分解を妨げたが、一方FlagベクターおよびFlag-hFAF1[366~650]は分解を妨げなかった(図19A)。Flag-hFAF1が過剰発現している15分間までは、またFlag-hFAF1[1~81]が過剰発現している20分間までは、IκBα含有量に変化は見られなかった。チューブリンにより規準化したタンパク質レベルにより、TNF-α処理による分解がなかったことが示される(図19B)。Ub^{G76V}-GFPレポーターを用い

た結果と一致して、F l a g - h F A F 1 [1 ~ 8 1] の作用は、F l a g - h F A F 1 より強い。F l a g - h F A F 1 [1 ~ 8 1] に対してはV C Pが結合できないため、その作用が強くなっている可能性がある。加えて、I κ B α 総含有量に差異が見られないことから、h F A F 1 がユビキチン化タンパク質にのみ影響を及ぼすことが示唆される。これらの結果を併せると、h F A F 1 が内因性ユビキチン化タンパク質同様、人工ユビキチン化タンパク質の分解をも阻害することが示される。

【0140】

実施例 4. 8 - 細胞死は h F A F 1 の過剰発現により誘導され、それにはU B A ドメインを要する

これまでの報告によると、未処理状態における h F A F 1 の過剰発現は、B O S C 2 3 細胞においてアポトーシスを引き起こし、J u r k a t 細胞において、h F A F 1 が F a s 細胞死誘導シグナル伝達複合体 (F a s - D I S C) メンバーと相互作用する (3 4 、 3 5) 。しかしながら、ユビキチン化と h F A F 1 による細胞死の関係は、明らかになっていない。そのため、h F A F 1 によるユビキチン化タンパク質の蓄積が、h F A F 1 誘導性細胞死に影響を及ぼすか否かを検証した。これまで行われてきた試験において、とりわけ F A F 1 による細胞死の試験には、J u r k a t 細胞が用いられてきたため (3 4 、 3 5) 、今回行われた試験においても J u r k a t 細胞を使用した。F l a g - h F A F 1 あるいはその切断型を用いて、A m a x a エレクトロポレーターにより J u r k a t 細胞に一時的にトランスフェクトし、記載の方法により細胞生存率を評価した。F l a g - h F A F 1 の過剰発現は、これまで報告した通り (3 4 、 3 5) 、細胞死を誘導し、U B A ドメインを含む F l a g - h F A F 1 [1 ~ 8 1] は、細胞死を有意に増加させた (図 2 0 A) 。h F A F 1 完全型より強い唯一の U B A ドメインである h F A F 1 [1 ~ 8 1] の細胞死に対する影響は、G F P レポーターを用いた実験結果と一致した。F l a g - h F A F 1 [3 6 6 ~ 6 5 0] を用いた場合には、コントロールに比べ、細胞生存率はむしろ増加した。U B A ドメインの細胞死に対する影響を確認するために、様々な量の F l a g - h F A F 1 [1 ~ 8 1] を用いて、A m a x a エレクトロポレーターにより J u r k a t 細胞に一時的にトランスフェクトし、M T T アッセイにより細胞生存率を評価した。トランスフェクトした DNA 濃度に依存する形で、F l a g - h F A F 1 [1 ~ 8 1] により細胞死が誘導した (図 2 0 B) 。これにより、h F A F 1 の U B A ドメインが、ユビキチン化タンパク質を蓄積することにより、細胞死を誘導することが示唆される (図 1 7 および図 2 0) 。

【実施例 5】

【0141】

実施例 5 - 正常体と卵巣腫瘍間の F A F 1 の差次的発現に関わる実験手順

アッセイに使われる正常あるいは腫瘍組織サンプルを、低温の 1 倍 P B S により 3 回洗浄した。サンプルは、滅菌ランセットを用いて小片に切断した。赤血球を除去するために、赤血球溶解緩衝液をサンプルに添加した。サンプルの 3 倍量の溶解緩衝液 (1 0 m M トリスアセテート、1 0 m M N a C l 、0 . 1 m M E D T A 、プロテアーゼ阻害剤) を加え、サンプルをホモジナイズし、4 °C、1 2 0 0 r p m にて約 3 0 分間遠心分離し、サイトゾルを得た。

【0142】

正常および腫瘍細胞において、様々なタンパク質の有無のアッセイを行った。標準的なアッセイ手順により、様々なタンパク質に対する抗体を用いて、様々なタンパク質に対してウェスタンブロットアッセイを行った。アッセイしたタンパク質には、アクチン、α - チューブリン、F A F 1 、H s p 7 0 、H s p 2 7 、V C P 、I T S N 、U C H L 1 、S U M O 、分泌促進物質、N m 2 3 - ポリ A b (N m 2 3 - p o l y A b) 、N m 2 3 - モノ A b (N m 2 3 - m o n o - A b) および G A P D H を含む (図 2 2 および 2 3) 。

【0143】

上記結果により、F A F 1 が、正常細胞において差次的に発現されることが示される。卵巣腫瘍細胞における F A F 1 の発現は少なかった。

【図面の簡単な説明】

【0144】

本発明は、以下に示す詳細な記載および例示のみを目的とした添付図面により、更に十分に理解されるようになるものであり、従ってこれらは本発明を限定するものではない。ここに含まれる図面を以下に説明する。

【図1】図1A～1Cは、Flag-hFAF1がHsc70およびHsp70と相互作用することを示す。HEK293T細胞に、(A) pFlag-CMV-2ベクターおよび(B) Flag標識hFAF1をトランスフェクトし、2 μ Ci/mL [35S]メチオニンを用いて標識した。細胞を溶解し、抗Flag-M2-アフィニティー架橋アガロースゲルを用いて免疫沈降した。沈降物は2D-ゲル電気泳動法により解析し、BAS2500を用いてオートラジオグラフィを行った。オートラジオグラフィにより検出したタンパクスポットは、対応する銀染色ゲルから切り出しを行い、トリプシンによるゲル内消化に供し、その後ペプチドマスフィンガープリント解析を行った。点線で描かれた長方形の拡大図は、各ゲルの右下に示している。(C) 同定したHsc70/Hsp70は、ウェスタンブロット解析により確認した。

10

【図2】図2は、内因性hFAF1が内因性Hsc70/Hsp70と相互作用することを示す。HEK293T細胞が溶解し、マウスIgGをコントロールとし(レーン1)、抗hFAF1ポリクローナル抗体(レーン2)を用いて免疫沈降を行った。沈降物を、抗hFAF1ポリクローナル抗体(上パネル)および抗Hsc70/Hsp70モノクローナル抗体(下パネル)を用いて、SDS-PAGE法およびウェスタンブロット法により解析した。

20

【図3-1】図3A～3Cは、Hsc70およびHsp70がインビボにおいて、hFAF1のアミノ酸82～180と相互作用することを示す。(A) Flag標識hFAF1フラグメントの図。(A)に示した通り、HEK293T細胞に、pFlag-CMV-2ベクターあるいはpFlag-CMV/hFAF1フラグメントを用いてトランスフェクトした。細胞を溶解し、抗Flag-M2-アフィニティー架橋アガロースビーズ(B、C)、あるいはモノクローナル抗Flag抗体およびタンパクAビーズを用いて免疫沈降した。沈降物を、抗Flag-M2モノクローナル抗体(BおよびCの上パネル)および抗Hsc70/Hsp70抗体(BおよびCの下パネル)を用いて、ウェスタンブロット法により解析した。

30

【図3-2】図3A～3Cは、Hsc70およびHsp70がインビボにおいて、hFAF1のアミノ酸82～180と相互作用することを示す。(A) Flag標識hFAF1フラグメントの図。(A)に示した通り、HEK293T細胞に、pFlag-CMV-2ベクターあるいはpFlag-CMV/hFAF1フラグメントを用いてトランスフェクトした。細胞を溶解し、抗Flag-M2-アフィニティー架橋アガロースビーズ(B、C)、あるいはモノクローナル抗Flag抗体およびタンパクAビーズを用いて免疫沈降した。沈降物を、抗Flag-M2モノクローナル抗体(BおよびCの上パネル)および抗Hsc70/Hsp70抗体(BおよびCの下パネル)を用いて、ウェスタンブロット法により解析した。

【図4】図4A～4Bは、hFAF1がインビトロにおいて、Hsp70のN末端ドメインと直接相互作用することを示す。(A) GST標識Hsp70フラグメントの図。(B) 精製組換えhFAF1を、10mMのATPを添加あるいは非添加の条件の下で、グルタチオン-セファロース上に固定化したGST-Hsp70欠失変異型を加えてインキュベートした。沈降物を、クマシーブルー染色法(B、上パネル)および抗hFAF1ポリクローナル抗体を用いた免疫ブロット法(B、下の2つのパネル)により検出した。

40

【図5】図5は、熱ショックがHsc70/Hsp70とhFAF1間の相互作用に影響を及ぼさないことを示す。HEK293T細胞を、pFlag-CMV-2ベクターあるいはFlag標識hFAF1により、一時的にトランスフェクトした。45℃にて45分間細胞を熱ショック処理し、あるいは熱ショック処理せずに(C)、示した時間回復させた。各時点において、細胞が溶解し、モノクローナル抗Flag-M2抗体を用いて免疫

50

沈降した。沈降物を、抗Hsc70/Hsp70（上パネル）および抗Flag-M2（下パネル）モノクローナル抗体を用いて、ウエスタンブロット法により解析した。

【図6】図6A～6Iは、Flag-hFAF1およびHsp70局在化の免疫蛍光法による解析を示す。HEL細胞を、pFlag-CMV-2ベクターあるいはpFlag-CMV-2/hFAF1を用いて、一時的にトランスフェクトした。細胞は、熱ショック処理を行わない状態（A、BおよびC）で、または45℃にて30分間の熱ショック処理後（D、EおよびC）、あるいは24時間回復後（G、HおよびI）に、免疫染色した。全細胞は、Hsc70/Hsp70に対するモノクローナル抗体で染色し、その後テキサスレッド標識二次抗体を加えてインキュベートした（赤）。細胞は更にその後、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）により標識した抗Flag-M2モノクローナル抗体を用いて染色した（緑）。併合図における黄色（C、F、I）は、赤および緑の蛍光が共局在化することを意味する。画像は、共焦点顕微鏡法により作成した。

【図7-1】図7A～7Hは、hFAF1の過剰発現が、Hsp70媒介による熱変性ホタルルシフェラーゼの再活性化を阻害することを示す。HEK293T細胞は、pCyt1uc（サイトゾルルシフェラーゼをコードする）と共に、示した通り、pFlag-CMV-2ベクター、pFlag-CMV-2/hFAF1、あるいはpFlag-CMV-2/hFAF1ΔABD、pFlag-CMV-2/hFAF1ΔNを用いて、一時的にトランスフェクトし（A、C、E、G）、その後、Flag標識Hsc70/Hsp70、Hsp70ΔABDの発現に関しては抗Hsp70抗体を、またhFAF1およびhFAF1ΔNの発現に関しては抗Flagあるいは抗FAF1抗体を用いて、ウエスタンブロット解析法により検出した（A、C、E、G）。シクロヘキシミド（20μg/mL）による30分間の前処理の後、細胞を45℃にて15分間加熱し、ルシフェラーゼを不活化した。続いて37℃にて回復中に、サンプルのルシフェラーゼ活性をアッセイした（B、D、F、H）。

【図7-2】図7A～7Hは、hFAF1の過剰発現が、Hsp70媒介による熱変性ホタルルシフェラーゼの再活性化を阻害することを示す。HEK293T細胞は、pCyt1uc（サイトゾルルシフェラーゼをコードする）と共に、示した通り、pFlag-CMV-2ベクター、pFlag-CMV-2/hFAF1、あるいはpFlag-CMV-2/hFAF1ΔABD、pFlag-CMV-2/hFAF1ΔNを用いて、一時的にトランスフェクトし（A、C、E、G）、その後、Flag標識Hsc70/Hsp70、Hsp70ΔABDの発現に関しては抗Hsp70抗体を、またhFAF1およびhFAF1ΔNの発現に関しては抗Flagあるいは抗FAF1抗体を用いて、ウエスタンブロット解析法により検出した（A、C、E、G）。シクロヘキシミド（20μg/mL）による30分間の前処理の後、細胞を45℃にて15分間加熱し、ルシフェラーゼを不活化した。続いて37℃にて回復中に、サンプルのルシフェラーゼ活性をアッセイした（B、D、F、H）。

【図8】図8A～8Bは、Flag-hFAF1の過剰発現により、熱ショック誘導性のSAPK/JNK活性化が加速する様を示す。HEK293T細胞は、pFlag-CMV-2ベクター、pFlag-CMV-2/hFAF1、あるいはpFlag-CMV-2/hFAF1ΔNを一時的にトランスフェクトし、45℃にて45分間、熱ショックに暴露した。示した回復時間の後、SAPK/JNK活性を測定した。

【図9】図9は、Flag-hFAF1の過剰発現により、熱ショック誘導性細胞死が増加することを示す。HEK293T細胞は、pFlag-CMV-2ベクター、pFlag-CMV-2/hFAF1、あるいはpFlag-CMV-2/hFAF1ΔNを一時的にトランスフェクトし、45℃にて90分間、熱ショックに暴露した。37℃にて48時間回復した後、トリパンブルー色素排除アッセイにより、生存細胞の割合を求めた。

【図10-1】図10は、EBIのClustalWを用いて、ヒト、ヒト短鎖型、ラット、マウス、ウズラ、ゼブラフィッシュ（D. rerio）、線虫、およびハエのFAF1のアミノ酸配列を比較したものである。ギャップを挿入し、ダッシュで表している。アスタリスク：アラインメントでの全配列において、当該カラムの残基が同一である部分、

10

20

30

40

50

複点：保存的置換が見られた部分、単点：半保存的置換が見られた部分；ブロック：h F A F 1 と同一のアミノ酸部分。

【図 10-2】図 10 は、E B I の C l u s t a l W を用いて、ヒト、ヒト短鎖型、ラット、マウス、ウズラ、ゼブラフィッシュ (D. r e r i o)、線虫、およびハエの F A F 1 のアミノ酸配列を比較したものである。ギャップを挿入し、ダッシュで表している。アスタリスク：アラインメントでの全配列において、当該カラムの残基が同一である部分、複点：保存的置換が見られた部分、単点：半保存的置換が見られた部分；ブロック：h F A F 1 と同一のアミノ酸部分。

【図 11】図 11 A ~ 11 E は、h F A F 1 がインビトロおよびインビボにおいて、V C P と相互作用することを示す。(A) $1 \mu \text{Ci} / \text{mL} [^3 \text{S}]$ メチオニンにより標識した p F l a g - C M V - 2 ベクターおよび p F l a g - h F A F 1 を H E K 2 9 3 T 細胞にトランスフェクトした。抗 F l a g - M 2 - アフィニティー架橋アガロースビーズ (S i g m a 社製) を用いて、細胞溶解物に対して免疫沈降を行った。沈降物を 2 D - ゲル電気泳動法により解析し、B A S 2 5 0 0 を用いてオートラジオグラフィーを行った。(B) オートラジオグラフィーにより検出したタンパクスポットを、対応する銀染色ゲルから切り出し、トリプシンによるゲル内消化に供した。M A L D I - T O F - M S によりペプチドマスフィンガープリント解析を行い (左のスペクトル図)、エレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間タンデム型質量分析装置 (E S I - q - T O F - t a n d e m - M S) を用いてペプチドのシーケンシングを行った (右のスペクトル図)。(C、D) G S T - h F A F 1 (C) および G S T - V C P (D) は、グルタチオンビーズ上に固定化し、精製組換え V C P (C) および精製組換え h F A F 1 (D) を加えてインキュベートした。結合タンパク質は、10% S D S - P A G E によりクマシー染色で検出し、抗 V C P 抗体 (C) および抗 F A F 1 抗体 (D) により免疫ブロットした。(E) 内因性 F A F 1 と V C P 間の相互作用を調べるために、H E K 2 9 3 T 細胞および J u r k a t 細胞の溶解物に対し、マウス I g G をコントロールとし (レーン 1)、抗 F A F 1 ポリクローナル抗体 (レーン 2) を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降前の細胞溶解物 10% 中の内因性 F A F 1 および V C P 量を、免疫沈降後の量と比較した。免疫沈降物を、抗 F A F 1 および抗 V C P 抗体を用いて、ウェスタンブロット法により解析した。

【図 12】図 12 A ~ 12 C は、h F A F 1 が U B X ドメインを通じて V C P と相互作用することを示す。(A) 様々な F l a g - h F A F 1 切断型の図。ユビキチン相同ドメインである U B 1 および U B 2、線虫 O R F C 2 8 1. 1 と相同する U A S ドメイン、ユビキチン調節タンパク質中に存在するドメインの U B X。(B、C) p F l a g - C M V - 2 ベクターあるいは切断した F l a g - h F A F 1 によりトランスフェクトした H E K 2 9 3 T 細胞を、溶解し、モノクローナル抗 F l a g - M 2 - アフィニティー架橋アガロースゲル (S i g m a 社製) を用いて免疫沈降した。沈降物を、抗 F l a g (B) および抗 V C P 抗体 (C) を用いて、ウェスタンブロット法により解析した。N B は、非特異的タンパク質バンドを示す。

【図 13】図 13 A ~ 13 B は、h F A F 1 がサイトゾル内において V C P と相互作用することを示す。p F l a g - C M V - 2 ベクターあるいは F l a g - h F A F 1 を用いて一時的にトランスフェクトした H E K 2 9 3 T 細胞は、45℃にて45分間熱ショック処理し、図に示した時間回復させた。C は、非処理細胞を示す。各時点において、細胞がサイトゾル画分 (C) と核画分 (N) に分画し、抗 F l a g および抗 V C P 抗体を用いて、ウェスタンブロット法により解析した (A)。結合を検証するために、モノクローナル抗 F l a g - M 2 - アフィニティー架橋アガロースゲルを用いて各画分が免疫沈降し、抗 F l a g および抗 V C P 抗体を用いて、ウェスタンブロット法により沈降物を解析した (B)。

【図 14-1】図 14 A ~ 14 C は、h F A F 1 がインビボにおいてマルチュビキチン化タンパク質に結合することを示す。(A) 様々な F l a g - h F A F 1 切断型の図。(B、C) p F l a g - C M V - 2 ベクターあるいは F l a g - h F A F 1 切断型によりトランスフェクトした H E K 2 9 3 T 細胞を溶解し、モノクローナル抗 F l a g - M 2 - アフ

ィニティー架橋アガロースゲル (Sigma社製) を用いて免疫沈降した。抗Flag (B) および抗ユビキチン抗体 (C) を用いて、ウエスタンブロット法により沈降物を解析した。NBは、非特異的バンドを示し、UBnは、マルチユビキチン化タンパク質を示す。

【図14-2】図14A~14Cは、hFAF1がインビボにおいてマルチユビキチン化タンパク質に結合することを示す。(A) 様々なFlag-hFAF1切断型の図。(B、C) pFlag-CMV-2ベクターあるいはFlag-hFAF1切断型によりトランスフェクトしたHEK293T細胞を溶解し、モノクローナル抗Flag-M2-アフィニティー架橋アガロースゲル (Sigma社製) を用いて免疫沈降した。抗Flag (B) および抗ユビキチン抗体 (C) を用いて、ウエスタンブロット法により沈降物を解析した。NBは、非特異的バンドを示し、UBnは、マルチユビキチン化タンパク質を示す。

【図15】図15A~15Cは、hFAF1がインビトロにおいてマルチユビキチン化タンパク質に結合することを示す。(A、B) グルタチオン-セファロース上に固定化したGST、GST-hFAF1、GST-hFAF1 [1~81] およびGST-hFAF1 [82~650] タンパク質を加え、インビトロにおいてポリユビキチン鎖 (Ub₂₋₇) をインキュベートした。グルタチオンビーズ上に固定化した様々なGSTタンパク質が、クマシー染色を用いた10% SDS-PAGEにおいて検出し (A)、GST-hFAF1に付随するポリユビキチン鎖が、抗ユビキチンモノクローナル抗体を用いた免疫ブロット法により検出した (B)。(C) ClustalWプログラム (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) およびJalviewプログラム (<http://www.ebi.ac.uk/jalview>) を用いて、解析を行った。矢印は、UBAドメインの疎水性表面パッチ上の保存部位を占めるアミノ酸残基を示す (25)。FAF1__ヒト (FAS関連因子1のaアイソフォーム)、NP__008982; FAF1__マウス (FAS関連因子1)、P54731; P47__ヒト (p47タンパク質のaアイソフォーム)、NP__057227; Y33K__ヒト (UBA/UBX 33.3 kDaタンパク質)、Q04323; R23A__ヒト (UV除去修復タンパク質RAD23-Aホモログ)、P54725; PLIC-1__ヒト (PLIC-1)、AAG02473。

【図16】図16A~16Cは、hFAF1がUBAドメインを通じて、Lys48結合およびLys63結合ユビキチン化タンパク質と結合することを示す。GST、GST-hFAF1およびGST-hFAF1 [1~81] タンパク質は、グルタチオンビーズ上に固定化し、HEK293T細胞溶解物を加えてインキュベートし、その後銀染色を用いた10% SDS-PAGEにより検出した (A)。(A) の囲みで示した高分子量タンパク質に対し、トリプシンによるゲル内消化を行い、MALDI-TOF-MSにより解析した (B)。(B) の矢印は、Lys48 (m/z、1460.7870) およびLys63 (m/z、2244.1814) を通じて結合するイソペプチド結合を含むユビキンペプチドを示す。Lys48を通じて結合したペプチドを、ESI-q-TOF-tandem-MSを用いたシーケンシングにより特定し、LIFAGK (-GG) QLEDGRのアミノ酸配列を決定した (C)。

【図17】図17は、hFAF1の過剰発現によりマルチユビキチン化タンパク質が蓄積すること示す。pFlag-CMV-2ベクター、Flag-hFAF1、Flag-hFAF1 [1~81] およびFlag-hFAF1 [82~650] によりトランスフェクトしたHEK293T細胞を、10% SDS-PAGEで分離し、抗ユビキチン抗体を用いたウエスタン分析により、マルチユビキチン化タンパク質を検出した (上パネル)。抗チューブリン抗体により、タンパク質濃度を規準化した (下パネル)。

【図18-1】図18A~18Dは、UBAドメインを通じてユビキチン依存性タンパク質分解をhFAF1が阻害することを示す。前日に2x10⁵個の密度で35mm培養皿に捲いたHEK293T細胞中に、200ngのUb^{G76V}-GFPあるいはEGFP-N1ベクター、1μgのpFlag-CMV-2ベクター、Flag-hFAF1、Flag-VCp、およびFlag-hFAF1とFlag-VCpの混合物により共トラ

ンスフェクトした（A、B）。前日に 2×10^5 個の密度で 35 mm 培養皿に捲いた HEK 293 T 細胞中において、200 ng の Ub^{G76V} - GFP あるいは EGFP - N1 ベクターが、1 μ g の pFlag - CMV - 2 ベクター、Flag - hFAF1、Flag - hFAF1 [1~81]、Flag - hFAF1 [1~345] および Flag - hFAF1 [82~650] を共トランスフェクトした（C、D）。トランスフェクション後 24 時間の時点で、細胞を回収し、2 つに分割した。一方はウエスタン解析に（A、C）、もう一方は FACS 解析に用いた（B、D）。（A、C）hFAF1、VCP および切断した hFAF1 のタンパク質レベルを確認するために、細胞を溶解し、SDS - PAGE において分離し、抗 FAF1（A）、抗 VCP（A）および抗 Flag 抗体（C）を用いて免疫ブロットした。Flag - hFAF1 [1~81] に関しては、トランスフェクション効率が他の切断型より低いため、ウエスタンブロット膜を長時間露光した（C、抗 Flag（L.M.））。抗 GFP 抗体を用いて、Ub^{G76V} - GFP あるいは EGFP - N1 ベクターのレベルが検出し、抗チューブリン抗体によりタンパク質濃度を規準化した。（B、D）FACS フローサイトメーター（Beckton & Dickinson 社製）により採取した細胞の蛍光度を測定し、Cellquest Software により蛍光度データが解析した。3 回の独立した実験から平均蛍光強度を平均 $\pm$ S.D 値として示した（P 値 < 0.05）。

【図 18-2】図 18A~18D は、UBA ドメインを通じてユビキチン依存性タンパク質分解を hFAF1 が阻害することを示す。前日に 2×10^5 個の密度で 35 mm 培養皿に捲いた HEK 293 T 細胞中に、200 ng の Ub^{G76V} - GFP あるいは EGFP - N1 ベクター、1 μ g の pFlag - CMV - 2 ベクター、Flag - hFAF1、Flag - VCP、および Flag - hFAF1 と Flag - VCP の混合物により共トランスフェクトした（A、B）。前日に 2×10^5 個の密度で 35 mm 培養皿に捲いた HEK 293 T 細胞中において、200 ng の Ub^{G76V} - GFP あるいは EGFP - N1 ベクターが、1 μ g の pFlag - CMV - 2 ベクター、Flag - hFAF1、Flag - hFAF1 [1~81]、Flag - hFAF1 [1~345] および Flag - hFAF1 [82~650] を共トランスフェクトした（C、D）。トランスフェクション後 24 時間の時点で、細胞を回収し、2 つに分割した。一方はウエスタン解析に（A、C）、もう一方は FACS 解析に用いた（B、D）。（A、C）hFAF1、VCP および切断した hFAF1 のタンパク質レベルを確認するために、細胞を溶解し、SDS - PAGE において分離し、抗 FAF1（A）、抗 VCP（A）および抗 Flag 抗体（C）を用いて免疫ブロットした。Flag - hFAF1 [1~81] に関しては、トランスフェクション効率が他の切断型より低いため、ウエスタンブロット膜を長時間露光した（C、抗 Flag（L.M.））。抗 GFP 抗体を用いて、Ub^{G76V} - GFP あるいは EGFP - N1 ベクターのレベルが検出し、抗チューブリン抗体によりタンパク質濃度を規準化した。（B、D）FACS フローサイトメーター（Beckton & Dickinson 社製）により採取した細胞の蛍光度を測定し、Cellquest Software により蛍光度データが解析した。3 回の独立した実験から平均蛍光強度を平均 $\pm$ S.D 値として示した（P 値 < 0.05）。

【図 19】図 19A~19B は、hFAF1 が、内因性ユビキチン化基質の分解を妨げることを示す。pFlag - CMV - 2 ベクター、Flag - hFAF1、Flag - hFAF1 [1~81] および Flag - hFAF1 [366~650] によりトランスフェクトした HEK 293 T 細胞を、トランスフェクション 24 時間後に、5、10、15、20 分間、10 ng/mL の TNF- α に暴露した。細胞を溶解し、10% SDS - PAGE で分離し、IkB α 抗体を用いて免疫ブロットした（A）。C は、未処理細胞を示す。抗チューブリン抗体により、タンパク質濃度が規準化した（B）。

【図 20】図 20A~20B は、hFAF1 過剰発現による細胞死への影響を示す。（A）Amara エレクトロポレーターを用いて、pFlag - CMV - 2 ベクター、Flag - hFAF1、Flag - hFAF1 [1~81] および Flag - hFAF1 [366~650] を Jurkat 細胞へトランスフェクトした。トランスフェクション後 24

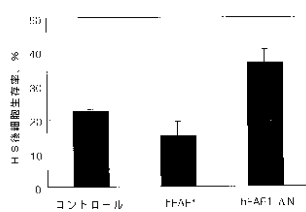
時間の時点で、MTT変換アッセイにより細胞生存率を評価した。相対細胞生存率は、3回の独立した実験から平均±S.D値として示した(P値<0.05)。(B) Amaxaエレクトロポレーターを用いて、1、2、4 μgのFlag-hFAF1 [1~81]をJurkat細胞へトランスフェクトした。トランスフェクション後24時間の時点で、MTT変換アッセイにより細胞生存率を評価した。相対細胞生存率は、3回の独立した実験から平均±S.D値として示した。

【図21】図21は、Ub^{G76V}-GFP分解に対するプロテアソーム阻害剤の影響を示す。100、200、400 ngのUb^{G76V}-GFPにより一時的にトランスフェクトしたHEK293T細胞を、10 μMのMG132 (Calbiochem社製)を添加、あるいは添加しない条件下にて、15時間インキュベートした。トランスフェクション後24時間の時点で、FACSフローサイトメーター(Beckton & Dickinson社製)により回収した細胞の蛍光度を測定し、Cellquest Softwareにより蛍光度データを解析した。3回の独立した実験から平均蛍光強度が平均±S.D値として示した。

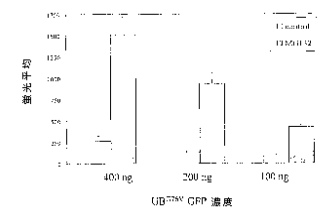
【図22】図22は、示した通りの様々なタンパク質のウェスタンブロットパネルであり、「N」は正常組織を、「T」は卵巣腫瘍を示す。P1、P2、P3、P6、P7、およびP5は扁平上皮癌を示し、P4は腺癌を表す。

【図23】図23は、示した通りの様々なタンパク質のウェスタンブロットパネルであり、「N」は正常組織を、「T」は卵巣腫瘍を示す。P1、P2、P3、P6、P7、およびP5は扁平上皮癌を示し、P4は腺癌を表す。

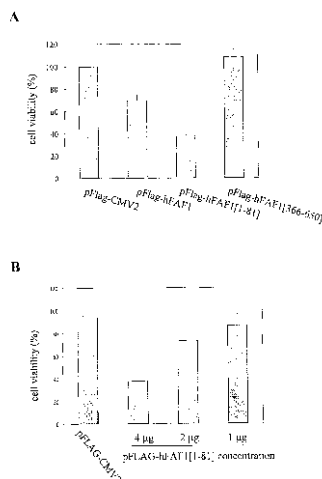
【図9】



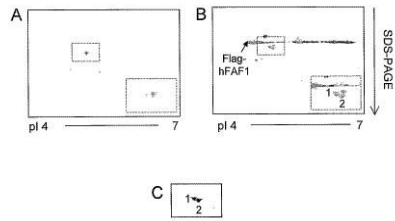
【図21】



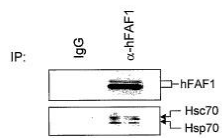
【図20】



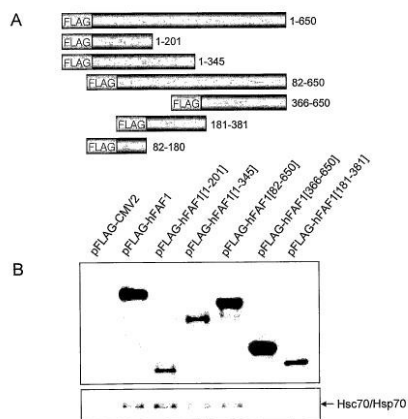
【図 1】



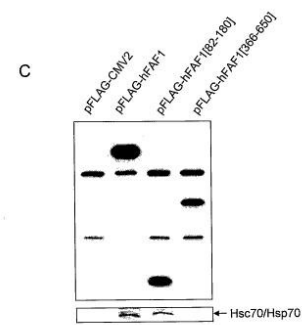
【図 2】



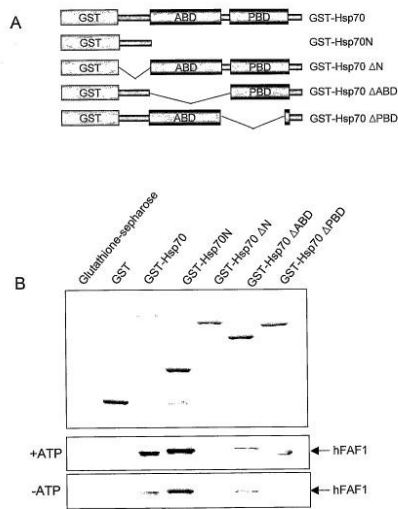
【図 3 - 1】



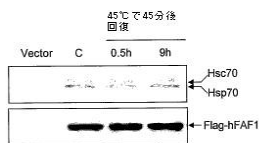
【図 3 - 2】



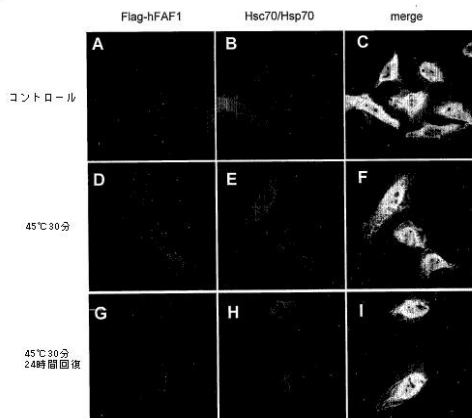
【図 4】



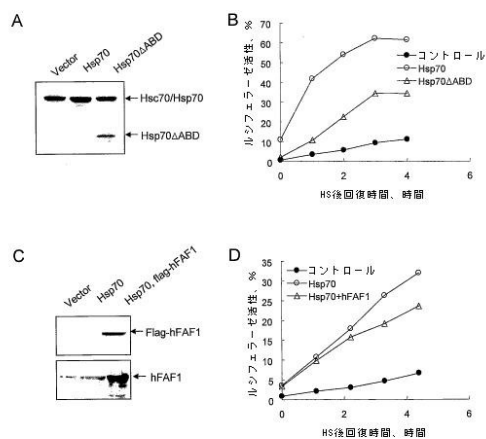
【図 5】



【図 6】



【図 7 - 1】



E

Western blot analysis of hFAF1 and hFAF1ΔN. Lanes: Vector, Flag-hFAF1ΔN (1μg), Flag-hFAF1 (2μg). Arrows indicate Flag-hFAF1 and Flag-hFAF1ΔN bands.

F

Line graph showing hFAF1 degradation percentage over time (0, 2, 4, 6 hours) after HS treatment. Legend: Control (filled circles), hFAF1 (1μg) (open circles), hFAF1 (2μg) (open triangles), hFAF1ΔN (filled triangles).

HS後回復時間・時間	コントロール (%)	hFAF1 (1μg) (%)	hFAF1 (2μg) (%)	hFAF1ΔN (%)
0	0	0	0	0
1	~3.5	~2.5	~2.5	~3.5
2	~6.5	~4.5	~4.5	~6.5
4	~11.5	~6.5	~6.5	~11.5

G

Western blot analysis of hFAF1ΔN. Lanes: Vector, Flag-hFAF1ΔN (1μg), Flag-hFAF1 (2μg). Arrow indicates Flag-hFAF1ΔN band.

H

Line graph showing hFAF1ΔN degradation percentage over time (0, 2, 4, 6 hours) after HS treatment. Legend: Control (filled circles), hFAF1ΔN (1μg) (open circles), hFAF1ΔN (2μg) (open triangles).

HS後回復時間・時間	コントロール (%)	hFAF1ΔN (1μg) (%)	hFAF1ΔN (2μg) (%)
0	0	0	0
1	~3.5	~4.5	~6.5
2	~4.5	~7.5	~10.5
4	~5.5	~9.5	~12.5

Figure 1 Data Summary:

Top Panel: Fold Increase of GST-cJun mRNA

HS 後回復時間、時間 (h)	コントロール (●)	hFAF1 (○)	hFAF1 ΔN (△)
0	1.0	1.0	1.0
0.5	~13.5	~16.5	~8.5
1	~14.0	~17.5	~10.5
2	~11.5	~15.5	~10.5
3	~8.0	~14.0	~8.0
5	~6.0	~12.5	~6.0
7	~5.0	~11.5	~5.0

Bottom Panel: Northern Blot Images

The Northern blot shows GST-cJun mRNA levels at 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, and 7 hours for Control, hFAF1, and hFAF1 ΔN cells. The Control and hFAF1 ΔN lanes show a peak in mRNA levels at 0.5-1 hour, while the hFAF1 lane shows a more sustained and higher level of mRNA expression throughout the time course.

[illegible]

[illegible]

A

pFlag-CMV2

pH 4 ————— 7

pFlag-hFAF1

New spot

Flag-hFAF1

Iuc70

Hsp70

pH 4 ————— 7

SDS-PAGE

B

Mass spectrum of the new spot

m/z

Intensity

1-ASGADSKDDLLSTAILK 18

C

GST GST-hFAF1

Coomassie staining

Anti-VCP

D

GST GST-VCP

Coomassie staining

Anti-FAF1

E

HEK293T cell

Jurkat cell

IP: IgG FAF1 Before IP After IP

Anti-FAF1

Anti-VCP

FAF1

VCP

A

1 **UB1** **UB2** **UAS** **UBX** 650

1 **UB1** **UB2** **UAS** 345

181 **UB2** **UAS** 381

366 **UAS** **UBX** 650

567 **UBX** 650

B

PFLAG-MY2
PFLAG-NP41
PFLAG-NP41(1-241)
PFLAG-NP41(1-355)
PFLAG-NP41(18-281)
PFLAG-NP41(36-450)
PFLAG-NP41(50-450)

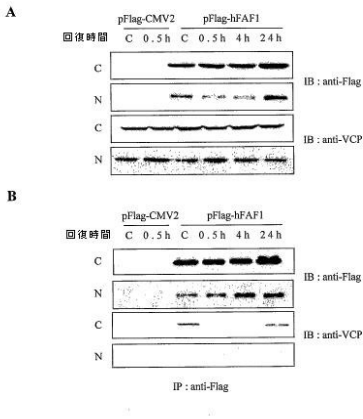
116
84
58
49
37
27

NB

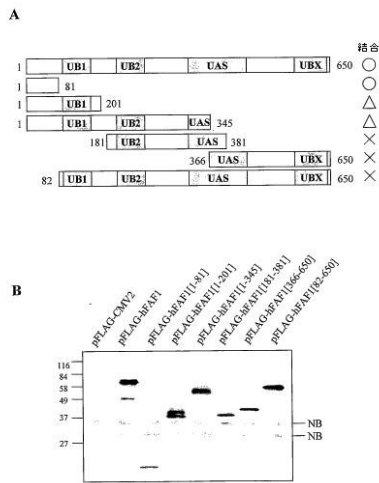
C

← VCP

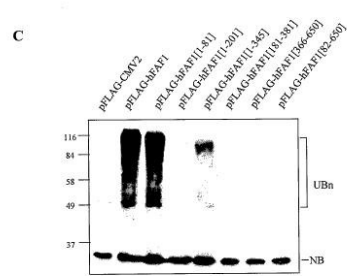
【図 1 3】



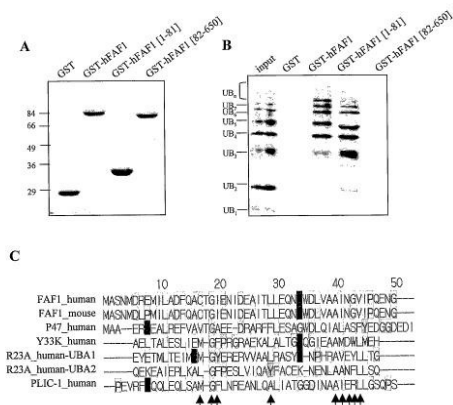
【図 1 4 - 1】



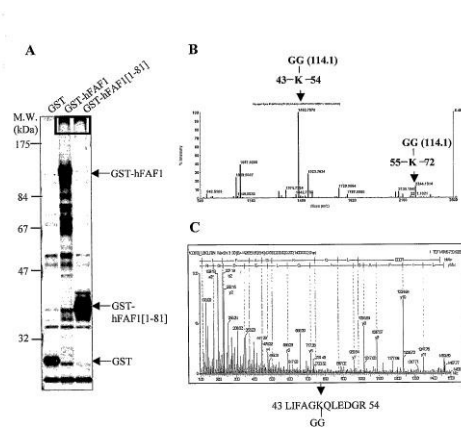
【図 1 4 - 2】



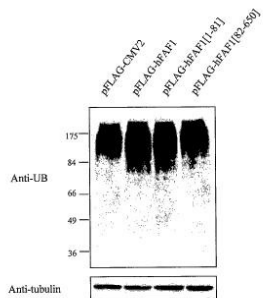
【図 15】



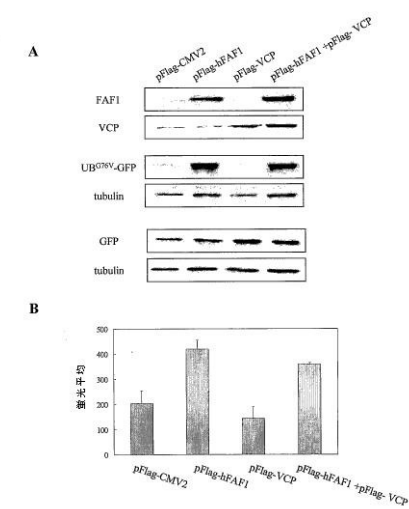
【図 16】



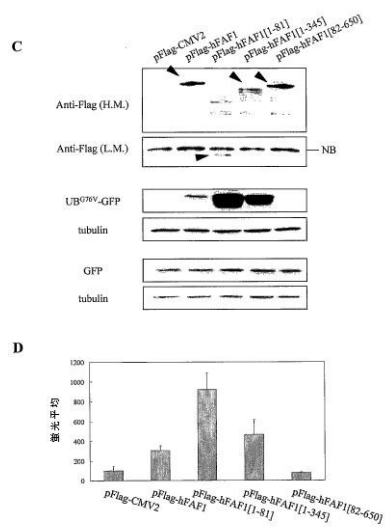
【図 17】



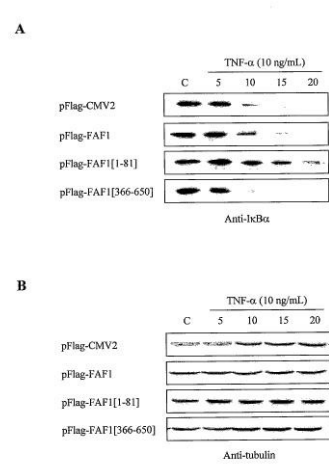
【図 18 - 1】



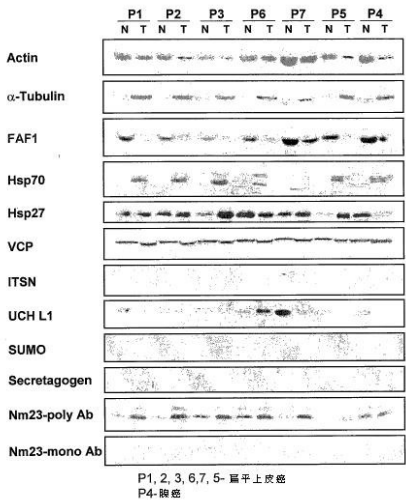
【図 18 - 2】



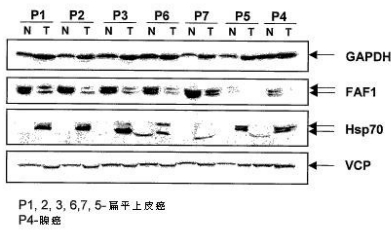
【図 19】



【図 2 2】



【図 2 3】



【配列表】

2010254699000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/574 (2006.01) G 0 1 N 33/574 D

(72)発明者 リー, コン - ジョー
 韓国, ソウル 1 2 0 - 7 5 0, エファ ウーマンズ ユニバーシティ

(72)発明者 キム, ヒ - チョン
 韓国, ソウル 1 2 0 - 7 5 0, エファ ウーマンズ ユニバーシティ

(72)発明者 チョ, ジョン, ウ
 韓国, ソウル, チョンログ, ソリンドン 9 9, エスケー コープ

(72)発明者 キム, ウンヒ
 韓国, テジョン, チョンナム ナショナル ユニバーシティ, ディビジョン オブ ライフ サイエンス

(72)発明者 ソン, ウン, ジョ
 韓国, ソウル 1 2 0 - 7 5 0, エファ ウーマンズ ユニバーシティ

(72)発明者 メン, チョル, ヨン
 韓国, ソウル, チョンログ, ソリンドン 9 9, エスケー コープ

F ターム (参考) 2G045 AA13 AA15 AA26 BB20 CA26 CB01 CB02 CB03 CB13 CB14
 CB17 DA13 DA14 DA20 DA36 DA78 FA16 FB01 FB02 FB03
 FB05 FB07 FB09 FB12 GC10 GC15
 4C084 AA02 BA10 BA18 BA19 BA20 BA21 BA22 DC50 MA17 MA22
 MA23 MA24 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA56 MA59 MA60
 MA63 MA66 NA14 ZB212 ZB262
 4H045 AA10 AA30 BA09