(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2007-534744
(P2007-534744A)
(43)公表日　平成19年11月29日(2007.11.29)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47	ZNA	4C084
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02		4H045
G01N 33/574	(2006.01)	G01N	33/574	A	

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 58 頁）

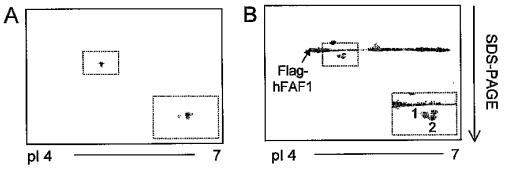
(21)出願番号　特願2007-510163 (P2007-510163)
(86)(22)出願日　平成17年4月29日 (2005.4.29)
(85)翻訳文提出日　平成18年12月22日 (2006.12.22)
(86)国際出願番号　PCT/IB2005/003393
(87)国際公開番号　WO2006/027701
(87)国際公開日　平成18年3月16日 (2006.3.16)
(31)優先権主張番号　60/566,966
(32)優先日　平成16年4月29日 (2004.4.29)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/590,327
(32)優先日　平成16年7月21日 (2004.7.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)

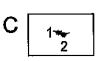
(71)出願人　506361661
エスケー　コープ
韓国，ソウル，チョンログ，ソリンドン
９９
(71)出願人　506361672
エファ　ウーマンズ　ユニバーシティ
韓国，ソウル，ソデモンク，デヒョンドン
(74)代理人　100088904
弁理士　庄司　隆
(74)代理人　100124453
弁理士　資延　由利子
(74)代理人　100135208
弁理士　大杉　卓也

最終頁に続く

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

(57)【要約】
本出願は、Ｈｓｃ／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タンパク質およびそのフラグメントに関して記載したものである。





【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０、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Ｆａｓ関連因子１（Ｆａｓ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｆａｃｔｏｒ １）のポリペプチドフラグメント。
【請求項２】
Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０に結合する請求項１に記載のポリペプチドフラグメント。
【請求項３】
Ｆａｓ関連因子１がヒトＦａｓ関連因子１である請求項２に記載のフラグメント。
【請求項４】
Ｆａｓ関連因子１がアミノ酸位置約１～約３４５から構成される請求項３に記載のフラグメント。
【請求項５】
Ｆａｓ関連因子１がアミノ酸位置約８２～約６５０から構成される請求項２に記載のフラグメント。
【請求項６】
Ｆａｓ関連因子１がアミノ酸位置約８２～約１８０から構成される請求項５に記載のフラグメント。
【請求項７】
ユビキチン化タンパク質に結合する請求項１に記載のＦａｓ関連因子１のポリペプチドフラグメント。
【請求項８】
Ｆａｓ関連因子１のユビキチン結合（ＵＢＡ）ドメインである請求項７に記載のフラグメント。
【請求項９】
Ｆａｓ関連因子１がヒトＦａｓ関連因子１である請求項８に記載のフラグメント。
【請求項１０】
アミノ酸位置約１～約８１から構成される請求項９に記載のＦａｓ関連因子１のフラグメント。
【請求項１１】
バロシン含有タンパク質に結合する請求項１に記載のＦａｓ関連因子１のポリペプチドフラグメント。
【請求項１２】
Ｆａｓ関連因子１のＵＢＸ（ユビキチン調節Ｘ）ドメインである請求項１１に記載のフラグメント。
【請求項１３】
Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０を請求項２に記載のポリペプチドフラグメントに接触させることによるＨｓｃ７０／Ｈｓｐ７０のシャペロン活性阻害方法。
【請求項１４】
Ｆａｓ関連因子１がヒトＦａｓ関連因子１である請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
Ｆａｓ関連因子１がアミノ酸位置約１～約３４５から構成される請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
Ｆａｓ関連因子１がアミノ酸位置約８２～約１８０から構成される請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
ユビキチン化タンパク質を請求項７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１８】

フラグメントがＦａｓ関連因子１のユビキチン結合（ＵＢＡ）ドメインである請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
サンプル組織中のＦａｓ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Ｆａｓ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。
【請求項２０】
癌が、癌腫、黒色腫、あるいは肉腫である請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
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。
【請求項２２】
治療を要する被験者（体）に請求項７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
1.発明の属する分野
本発明は、Ｆａｓ関連因子１（ＦＡＦ１）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ＨＳＰ７０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ＦＡＦ１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
Ｆａｓ関連因子１（ＦＡＦ１）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、Ｆａｓ細胞質領域結合タンパク質として特定された。マウスＦＡＦ１（ｍＦＡＦ１）の一過性過剰発現により、Ｌ細胞におけるＦａｓ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）。ｍＦＡＦ１とは異なり、ヒトＦＡＦ１（ｈＦＡＦ１）の場合は、一時的な過剰発現による場合にのみＢＯＳＣ２３細胞においてアポトーシスを生じさせる。ｈＦＡＦ１は、１～２０１番目のアミノ酸配列を通じてＦａｓに結合する（Ryu and Kim-2001, Biochem. Biophys. Res. Commun. 286:1027-1032）。Ｆａｓ以外にも、カゼインキナーゼ２サブユニット（ＣＫ２）がＦＡＦ１結合分子として報告されている（Kusk et al., 1999, Mol. Cell. Biochem. 191:51-58）。ｈＦＡＦ１は、２８９番目および２９１番目のセリン残基上でＣＫ２によりリン酸化され、アポトーシスが生じるとｈＦＡＦ１‐ＣＫ２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、ｈＦＡＦ１は、ＦＡＤＤおよびカスパーゼ‐８の相互作用によるＦａｓ‐細胞死誘導シグナル複合体（Ｆａｓ‐ＤＩＳＣ）に属することが報告された（Ryu et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:24003-24010）。
【０００３】
アミノ酸配列解析によると、その他のＦａｓ関連タンパク質とは異なり、ｈＦＡＦ１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（Ｕｂｓ）、線虫（Ｃａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ ｅｌｅｇａｎｓ）ＯＲＦ Ｃ２８１．１と相同する１つのＵＡＳドメイン、およびユビキチン経路（ＵＢＸ）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）。
【０００４】

熱ショックタンパク質７０（Ｈｓｐ７０）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）。Ｈｓｐ７０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（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）において、Ｈｓｐ７０ホモログであるＤｎａＫ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ＤｎａＪであり、もう１つは、基質放出を促すＧｒｐＥ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、ＤｎａＪのホモログであるＨｓｐ４０／Ｈｄｊ－１およびＨｓｃ７０相互作用タンパク質（Ｈｉｐ／ｐ４８）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）。Ｈｓｃ７０－Ｈｓｐ９０構成タンパク質（Ｈｏｐ／ｐ６０／Ｓｔｉ１）は、Ｈｓｃ７０のカルボキシ末端ドメインと相互作用し、Ｈｓｃ７０のシャペロン活性に影響をおよぼすことなく、Ｈｓｃ７０－Ｈｏｐ－Ｈｓｐ９０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）。Ｂｃｌ－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ＢＡＧ－１は、Ｈｓｐ７０のＡＴＰアーゼドメインに結合し、Ｈｓｃ７０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）。Ｈｓｃ７０相互作用タンパク質（ＣＨＩＰ）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）。Ｃｈａｐ１／ＰＬＩＣ－２およびＣｈａｐ２／Ｂａｔ３／Ｓｃｙｔｈｅは、Ｈｓｐ７０ファミリーメンバーのＡＴＰアーゼドメインに結合する（Kaye et al., 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。

【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、アトポー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。

【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.
【非特許文献２】Becker, K., Schneider, P., Hofmann, K., Mattmann, C. and Tschopp, J. 1997. Interaction of Fas(Apo-l/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. MoI. 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. MoI. 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, FAFl, potentiates Fas-mediated apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 11894-11898.
【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.
【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. MoI. 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. Ill: 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 Varshavasy, 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: Rl 82-Rl 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 responses 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 Ufdl 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 Ufdl-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 sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 14374-14379.
【非特許文献２６】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２７】Mueller, T. D. and Feigon, J. 2002. Solution structures of UBA domains reveal a conserved hydrophobic surface for protein-protein interactions. J. MoI. Biol. 319: 1243-1255.
【非特許文献２８】Orlowski, R. Z. 1999. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. Cell Death Differ. 6: 303-313.
【非特許文献２９】Park, M. Y., Jang, H. D., Lee, S. Y., Lee, K. J., and Kim, E. 2004. Fas-associated Factor- 1 inhibits nuclear factor-[kappa]B (NF-[kappa]B) activity by interfering with nuclear translocation of the ReIA (p65) subunit of NF-[kappa]B. J. Biol. Chem. 279: 2544-2549.
【非特許文献３０】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３１】Pickart, C. M. 2001. Ubiquitin enters the new millennium. MoI. Cell. 8: 499-504.
【非特許文献３２】Raasi, S. and Pickart, C. M. 2003. Rad23 UBA domains inhibit 26S proteasome- catalyzed proteolysis by sequestering Iysine48-lmked polyubiquitin chains. J. Biol. Chem. 278: 8951-8959.

【非特許文献３３】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３４】Ryu, S. W., Chae, S. K., Lee, K. J. and Kim, E. 1999. Identification and characterization of human Fas associated factor 1, hFAFl. Biochem. Biophys. Res. Commun. 262: 388-394.
【非特許文献３５】Ryu, S. W., Lee, S. J., Park, M. Y., Jun, J. L, Jung, Y. K. and Kim, E. 2003. Fas- associated factor 1, FAFl, is a member of Fas death-inducing signaling complex. J. Biol. Chem. 278: 24003-24010.
【非特許文献３６】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３７】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３８】Yang, Y. and Yu, X. 2003. Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. FASEB 17: 790-799.
【非特許文献３９】Yaron, A., Hatzubai, A., Davis, M., Lavon, L, Amit, S., Manning, A. M., Adhersen, J. S., Mann, M., Mercurio, F., and Ben-Neriah, Y. 1998. Identification of the receptor component if the I[kappa]B[alpha]-ubiquitin ligase. Nature 396: 590-594.
【非特許文献４０】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４１】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. MoL Biol. 311: 255-263.
【非特許文献４２】Kusk et al., 1999, MoI. Cell. Biochem. 191 :51-58
【非特許文献４３】Jensen et al., 2001, Int. J. Biochem. Cell Biol. 33:577-589
【非特許文献４４】Guerra et al., 2001, Int. J. Oncol. 19:1117-1126
【非特許文献４５】Haiti, 1996, Nature 381:571-580
【非特許文献４６】Frydman and Hoehfeld, 1997, Trends Biochem. ScI 22:87-92
【非特許文献４７】Hoehfeld and Jentsch, 1997, EMBO J. 16:6209-6216
【非特許文献４８】Bukau and Horwich, 1998, Cell 92:351-366
【非特許文献４９】Liberek et al., 1991, Proc. Natl. Acad. ScI, USA 88:2874-2878
【非特許文献５０】McCarty et al, 1995, J MoI. Biol. 249:126-137
【非特許文献５１】Minami et al., 1996, J Biol. Chem. 271:19617-19624
【非特許文献５２】Hoehfeld et al., 1995 Cell 83:589-598
【非特許文献５３】Demand et al., 1998, MoI. Cell. Biol. 8:2023-2028
【非特許文献５４】Schumacher et al., 1994, J Biol. Chem., 269:9493-9499
【非特許文献５５】Smith et al., 1993, MoI. Cell. Biol. 13:869-876
【非特許文献５６】Hoehfeld and Jentsch, 1997, EMBO J. 16:6209-6216
【非特許文献５７】Takayama et al., 1997, EMBO J. 16:4887-4896
【非特許文献５８】Zeiner et al., 1997, EMBO J. 16:5483-5490
【非特許文献５９】Ballinger et al., 1999, MoI. Cell. Biol. 19:4535-4545
【非特許文献６０】Kaye et al., 2000, FEBS Lett. 467:348-355
【非特許文献６１】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６２】Thress et al., 2001, EMBO J. 20:1033-1041
【非特許文献６３】Gabai et al., 1997. J Biol. Chem. 272:18033-18037
【非特許文献６４】Meriin et al., 1999, MoI. Cell. Biol. 19:2547-2555
【非特許文献６５】Volloch et al., 1999, FEBS Lett. 461:73-76
【非特許文献６６】Kim et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:23193-23207
【非特許文献６７】Kim and Lee, 2000, MoI. Cell. Biochem. 229:139-151
【非特許文献６８】Volloch et al., 1998, Cell Stress Chaperones 3:265-271
【非特許文献６９】Stege et al., 1994, Exp. Cell Res. 214:279-284
【非特許文献７０】Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989)
【非特許文献７１】Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989)
【非特許文献７２】Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)
【非特許文献７３】Michels et al., 1995, Eur. J. Biochem. 234:382-389
【非特許文献７４】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、Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０、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Ｆａｓ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、Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０に結合し得るものとし、ＦＡＦ１はヒトＦＡＦ１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３４５、アミノ酸位置約１～約２０１、アミノ酸位置約８２～約６５０、あるいはアミノ酸位置約８２～約１８０から構成され得るものとする。また本発明は、Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０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Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０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Ｆａｓ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、Ｆａｓ関連因子１のユビキチン結合（ＵＢＡ）ドメインであってよい。更に、当該フラグメントはヒトＦａｓ関連因子１であってよい。当該フラグメントは、ｈＦＡＦ１のアミノ酸位置約１～約８１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）に上記の組成物を投与することによる過形成あるいは癌の治療方法を対象とする。
【００１０】
また本発明は、バロシン含有タンパク質に結合するＦａｓ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、Ｆａｓ関連因子１のＵＢＸ（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Ｆａｓ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Ｆａｓ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。
【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。
【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。
【００１７】
本出願において、一般に「アミノ酸配列バリアント」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】
置換型バリアントとは、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。
【００２０】
挿入型バリアントとは、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】
欠失型バリアントとは、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、欠失型バリアントでは、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。

【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。
【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。
【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、様々な構造体が作られ得るし、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。
【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。
【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。

【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－

MASNMDREMILADFQACTGIENIDEAITLLEQNNWDLVAAINGVIPQENG
ILQSEYGGETIPGPAFNPASHPASAPTSSS SSAFRPVMPS RQIVERQPRM
LDFRVEYRDR
NVDVVLEDTCTVGEIKQILENELQIPVSKMLLKGWKTGDVEDSTVLKSLHLPKNNSL
YVLTPDLPPPSSSSHAGALQESLNQNFMLIITHREVQREYNLNFSGSSTIQEVKRNVY
DLTSI
PVRHQLWEGWPTSATDDSMCLAESGLSYPCHRLTVGRRSSPAQTREQSEEQITDVH
MVSDSDGDDFEDATEFGVDDGEVFGMASSALRKSPMMPENAENEGDALLQFTAEFS
SRYGDCHPVFFIGSLEAAFQEAFYVKARDRKLLAIYLHHDESVLTNVFCSQMLCAESI
VSYLSQNFITWAWDLTKDSNRARFLTMCNRHFGSVVAQTIRTQKTDQKPLFLIIMGK
RSSNEVLNVIQGNTTVDELMMRLMAAMEIFTAQQQEDIKDGDEREARENVKREQDE
AYRLSLEADRAKREARERFMAEQFRLEQIRKEQEEEREAIRLSLEQALPPEPKEENAE
PVSKLRIRTPSGEFLERRFLASNKLQIVFDFVASKGFPWDEYKLLSTFPRRDVTQLDPN
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。

【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ＦＡＦ１、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。

【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、ＦＡＦ１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ＣＡＴ、ＮＭＲ、ＥＰＲ、ＰＥＴ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、ＦＡＦ１の相対的発現を検証することができる。

【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、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（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、ＮＣＢＩ ＢＬＡＳＴ２．０ソフトウエ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。

【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、検出可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）、リポソームに包まれた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。

【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フィンガープリントが行われ、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。

【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。

【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、Ｈｓｐ７０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Ｈｓｐ７０の基質ではないことが示唆される。そのため、Ｈｓｐ７０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、Ｈｓｐ７０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、Ｈｓｐ７０のシャペロン活性を阻害する可能性が示唆された。近年、Ｈｓｐ４０、Ｈｉｐ、Ｈｏｐ、Ｂａｇ‐１、ＣＨＩＰ、Ｃｈａｐ１／ＰＬＩＣ‐２、およびＣｈａｐ２／Ｂａｔ３／ＳｃｙｔｈｅなどのＨｓｐ７０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Ｈｓｐ７０のシャペロン活性を軽減した（H?hfeld 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をが含まれるため、プロテアソームにおけるＨｓｐ７０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】

Ｈｓｐ７０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。Ｈｓｐ７０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、Ｈｓｐ７０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）。また最近出願者らは、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、Ｈｓｐ７０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Ｈｓｐ７０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。Ｈｓｐ７０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Ｈｓｐ７０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Ｈｓｐ７０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Ｈｓｐ７０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（Stege et al., 1994, Exp. Cell Res. 214:279-284）。今回行われた試験では、Ｈｓｐ７０のＡＢＤ欠失変異型は、Ｈｓｐ７０完全型よりは低いが、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ＡＢＤ（１～４２８）に比べて割り当てられたドメインが小さいＡＢＤ（１２０～４２８）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、Ｈｓｐ７０のシャペロン活性がＳＡＰＫ／ＪＮＫ活性化に影響を及ぼす可能性を除外するべきではない。

【００４３】

その後、ｈＦＡＦ１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。Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１の一過性過剰発現を伴うＨＥＫ２９３Ｔ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、Ｈｓｐ７０への結合部位を欠くＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１ΔＮ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、ｈＦＡＦ１は、Ｈｓｐ７０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。Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１ΔＮ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、ｈＦＡＦ１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。ｈＦＡＦ１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。
【００４４】
ｈＦＡＦ１は、当初Ｆａｓ関連タンパク質として同定された。アミノ酸配列１～２０１は、Ｆａｓ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、Ｈｓｐ７０の相互作用領域であるアミノ酸残基８２～１８０と重なる。ｈＦＡＦ１は、様々な細胞条件により、ｆａｓあるいはＨｓｐ７０に結合する可能性がある。
【００４５】
ｈＦＡＦ１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、ｈＦＡＦ１は、Ｈｓｐ７０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。ｈＦＡＦ１がＨｓｐ７０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。ｈＦＡＦ１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。
【００４６】
ＦＡＦ１はバロシン含有タンパク質およびマルチユビキチン化タンパク質に結合する
出願人は、ｈＦＡＦ１がバロシン含有タンパク質（ＶＣＰ）およびマルチユ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。
【００４７】
ＶＣＰは、ＡＡＡファミリー（様々な細胞活動を有するＡＴＰアーゼ関連ファミリー）のメンバーである。ＶＣＰの酵母ホモログであるｃｄｃ４８ｐは、細胞分裂周期タンパク質として同定された（２４）。ＶＣＰ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ｐ４７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、ＶＣＰの補助因子として働き、α‐ＳＮＡＰアナログであるシンタクシン５へのＶＣＰの結合を媒介する（３３）。また、Ｕｆｄ１およびＮｐ１４は、ＶＣＰの補助因子として、プロテアソーム媒介によるＥＲ結合タンパク質およびサイトゾルタンパク質のプロセシングに関与しているとされてきた（２３、４０）。更に、ｃｄｃ４８ｐは、ユビキチン融合分解（ＵＦＤ）経路に関わるＵｆｄ３ｐおよびＵｆｄ２ｐ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）。ＩκＢαをプロテアソームによる分解の標的とする際のＶＣＰ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、ＶＣＰ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）。
【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。

【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。

【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（UB_{2-7}）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（Ｋｄ＞１ｍＭ）よりテトラユビキチン（Ｋｄ、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。

【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。

【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ｈＦＡ

Ｆ１［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。

【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。

【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）。ｈＦＡＦ１のＵＢＡドメインがプロテアソーム阻害剤として機能し、アポトーシスに関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】

ＦＡＦ１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ＦＡＦ１の有無を検出するための診断方法を提供する。直接的（ＦＡＦ１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（ＦＡＦ１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２２および２３に見られる通り、ＦＡＦ１発現に関して、卵巣癌組織が正常組織と比較された。ＦＡＦ１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、ＦＡＦ１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２２および２３は卵巣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、卵巣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。ＦＡＦ１は、Ｈｓｐ７０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（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。

【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ＦＡＦ１発現レベルを測定することにより、あるいはＦＡＦ１産生量が低下している患者において、ＦＡＦ１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（ＣＴ）、および陽電子放出断層撮影（ＰＥＴ）、磁気共鳴画像（ＭＲＩ）、超音波検査などの全身走査、更に電子常磁性共鳴（ＥＰＲ）および核磁気共鳴（ＮＭＲ）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、^{121}Ｉ）、炭素（^{14}Ｃ）、硫黄（^{35}Ｓ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、インジウム（^{112}Ｉｎ）、およびテクネチウム（^{99}ｍＴｃ）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、^{3}Ｈ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、^{51}Ｃｒ、^{57}Ｔｏ、^{58}Ｃｏ、^{59}Ｆｅ、^{75}Ｓｅ、^{152}Ｅｕ、^{90}Ｙ、^{67}Ｃｕ、^{217}Ｃｉ、^{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、ｌ－（Ｐ－イソチオシアネートベンジル）－ＤＰＴＡ（ｌ－（Ｐ－ｉｓｏｔｈｉｏｃｙａｎａｔｏｂｅｎｚｙｌ）－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、ｏ－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、子宮頚部癌、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ＦＡＦ１ポリペプチドあるいはフラグメントをコードでき、当該ＦＡＦ１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）。

【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、リポソームカプセル、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）（当該受容体を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。

【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。

【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。

【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をが含まれる。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】

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０．０．５μｇ～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（ｄｉｉｓｏｐｒｏｐｙｌｆｌｕｏｒｏｐｈｏｓｐｈａｔｅ）（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、あるいは食事中の食品に直接配合することにより、活性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０．１μｇ～２０００ｍｇの活性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状を変更するために、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、０．５μｇ～約２０００ｍｇ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０．５μｇ／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、リポソームカプセル、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）経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、特にリポ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‐ＨＣＰ７０／ＨＳＰ７０に結合するＦＡＦ１に関わる実験手順

実施例１．１‐プラスミド

完全長ヒトＨｓｐ７０を、ｐＧＥＸ‐４Ｔ‐１ベクターにサブクローン化した。ｐＧＥＸ‐４Ｔ‐１／Ｈｓｐ７０ΔＡＢＤ（１～１１９、４２９～６４０）、構造体ｐＧＥＸ‐４Ｔ‐１／Ｈｓｐ７０Ｎ（１～１１９）は、センスプライマー５'‐ＧＡＡＧＡＡＴＴＣＡＴＧＧＣＣＡＡＡＧＣＣＧＣＧＧＣＡＧ‐３'（配列番号:１）およびアンチセンスプライマー５'‐ＧＣＡＴＣＴＣＧＡＧＣＧＡＧＡＴＣＴＣＣＴＣＧＧＧＧＴＡ‐３'（配列番号:２）を用いてＰＣＲ法により調整し、ｐＧＥＸ‐４Ｔ‐１ベクターにサブクローン化した。ｐＧＥＸ‐４Ｔ‐１／Ｈｓｐ７０ΔＮ（１２０～６４０）は、センスプライマー５'

－ＣＧＡＧＧＡＡＴＴＣＡＴＧＴＣＣＡＴＧＧＴＧＣＴＧＡＣＣ－３'（配列番号:３）およびアンチセンスプライマー５'－ＧＧＣＣＴＣＧＡＧＣＴＡＡＴＣＴＡＣＣＴＣＣＴＣＡＡＴＧ－３'（配列番号:４）を用いてＰＣＲ法により調整し、ｐＧＥＸ－４Ｔ－１ベクターにサブクローン化された。ｐＧＥＸ－４Ｔ－１／Ｈｓｐ７０ΔＰＢＤ（１～４３５、６１９～６４０）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ｐＦｌａｇ－ＣＭＶ－２／ｈＦＡＦ１、ｐＦＬＡＧ－ＣＭＶ－２／ｈＦＡＦ１［１～２０１］、ｐＦＬＡＧ－ＣＭＶ－２／ｈＦＡＦ１［１～３４５］、ｐＦＬＡＧ－ＣＭＶ－２／ｈＦＡＦ１[８２～６５０]、ｐＦＬＡＧ－ＣＭＶ－２／ｈＦＡＦ１［３６６～６５０］（ｈＦＡＦ１ΔＮ）、ｐＦＬＡＧ－ＣＭＶ－２／ｈＦＡＦ１[１８１～３８１]、およびｐＣＤＮＡ／ｈＦＡＦ１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ｐＣｙｔｌｕｃ（ｐＲＳＶＬＬ／Ｖ）は、Ｓ．Ｓｕｂｒａｍａｎｉ（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（ＨＥＫ２９３Ｔ）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（ＤＭＥＭ）を用いて、３７℃、５％CO_2の条件下で培養、維持した。モノクローナル抗Ｆｌａｇ抗体Ｍ２は、Ｓｉｇｍａ社から購入した。モノクローナル抗Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０抗体は、ＳｔｒｅｓｓＧｅｎ社から入手された。抗ｈＦＡＦ１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

ＨＥＫ２９３Ｔ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、１．５ｘ10^6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。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１８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１８時間、２μＣｉ／ｍＬ［^{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（５０ｍＭ トリス、ｐＨ８．０、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、２ｍＭ ＥＤＴＡ、０．５％ ＮＰ－４０、１ｍＭ ＰＭＳＦ、０．５ｍＭ ＤＴＴ、５μｇ／ｍＬ アプロチニン、１μｇ／ｍＬ ロイペプチン、５ｍＭ Na_3VO_4、５ｍＭ ＮａＦ）を用いて３０分間氷上に置き、細胞を破砕した。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、５μｇ/ｍＬ アプロチニン、１０μｇ／ｍＬ ペプスタチンＡ、１０μｇ／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 ＤｒｙＳｔｒｉｐｓ（ｐＨ４～７）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５０μＡ；（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－Ｃｌ、ｐＨ８．８、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。

【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ンビンにより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。

【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％　Ｔｗｅｅｎ２０、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（ＳｔｒｅｓｓＧｅｎ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。

【００９８】

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、粉砕し、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　K_4FeCN_6／５０ｍＭ　チオ硫酸ナトリウムにより洗浄し、脱染した。当該ゲルは粉砕後、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１０～２０μＬ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３０μＬ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２０μＬを添加した。抽出液が蓄積し、ＳｐｅｅｄＶａｃ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％　ＴＦＡ１０μＬにより還元し、Ｃ１８樹脂を含むＺｉｐＴｉｐｓ（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；Ａｐｐｌ

ｉｅｄ 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エブサイトで入手可能なＭｓ‐Ｆｉｔプログラムを使用した。

【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２０μｇ／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、２μＭ ロイペプチン、４００μＭ 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‐Ｈｓｃ７０およびＨｓｐ７０がｈＦＡＦ１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

ｈＦＡＦ１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。Ｆｌａｇ標識ｈＦＡＦ１を、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞内において一時的に過剰発現し、２μＣｉ／ｍＬ［^{35}Ｓ］メチオニンにより細胞タンパク質を代謝標識した。ｈＦＡＦ１相互作用タンパク質を２つの画分に分割し、２Ｄ‐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ＮＣ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ＭＡＬＤＩ‐ＴＯＦ‐ＭＳ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７０同族（Ｈｓｃ７０）および熱ショックタンパク質７０誘導型（Ｈｓｐ７０）であることを同定した（表１）。抗Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０モノクローナル抗体を用いたＮＣ膜のウエスタンブロット解析により、Ｈ

ｓｃ７０およびＨｓｐ７０への結合を再確認した（図１Ｃ）。更に結合を確認するために、Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１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、ｈＦＡＦ１およびＨｓｃ７０／Ｈｓｐ７０の結合複合体を２５０～３００ｋＤａ画分において共溶出した（データ非掲載）。

【０１０２】

表１．　２Ｄ‐ゲル電気泳動法およびＭＡＬＤＩ‐ＴＯＦにより同定したＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１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	ＮＣＢＩ ＧＩ番号	質量（Ｄａ）	ｐＩ	収率（%）
1	Ｈｓｃ７０	13273304	70899	5.4	29
2	Ｈｓｐ７０	386785	69869	5.4	30

【０１０４】

インビボにおいて、内因性ｈＦＡＦ１が内因性Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０と相互作用するかを調べるために、ポリクローナル抗ｈＦＡＦ１抗体を用いて、ＨＥＫ２９３Ｔ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Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０がｈＦＡＦ１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．ｃｏｌｉ）に発現させた組換えｈＦＡＦ１は、細菌Ｈｓｐ７０であるＤｎａＫへの結合能を有するため（データ非掲載）、ｈＦＡＦ１がＨｓｐ７０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、Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０はｈＦＡＦ１のアミノ酸８２～１８０と相互作用する

Ｈｓｐ７０との相互作用に必要なｈＦＡＦ１ドメインを明らかにするために、内因性Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０と一時的にトランスフェクトした一連のＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１欠失変異型との結合を検証した（図３Ａ）。様々なＦｌａｇ標識ｈＦＡＦ１欠失変異型を用いて、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞をトランスフェクトし、抗Ｆｌａｇ‐Ｍ２‐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Ｆｌａｇ抗体（図３Ｂの上パネル）および抗Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０抗体（図３Ｂ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。Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０は、ベクタートランスフェクト細胞の抗Ｆｌａｇ‐Ｍ２‐アフィニティー架橋アガロースゲルには結合せず、Ｆｌａｇ標識ｈＦＡＦ１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ｈＦＡＦ１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、Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０との結合には、ｈＦＡＦのアミノ酸配列８２～１８０が必要であることが示された。このことは、図３Ｃにおいて確認された。ｈＦＡＦ１のアミノ酸８２～１８０は、内因性Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０に結合した。この領域には、Ｆａｓデスドメイン結合ドメイン（アミノ酸残基１～２０１）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、ｈＦＡＦ１はＨｓｐ７０Ｎ末端ドメインと直接結合する

ｈＦＡＦ１がＨｓｐ７０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、アクセサリー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。ＧＳＴ‐Ｈｓｐ７０の様々な切断型（図４Ａ）：Ｈｓｐ７０完全型、１～６４０；１～１２０；１２０～６４０；１～１１９および４２８～６４０；また１～４３５および６１６～６４０を用意した。様々な組換えＧＳＴ‐Ｈｓｐ７０が、グルタチオン‐セファロースビーズに固定化し、精製ｈＦＡＦ１を加えて１０ｍＭ　ＡＴＰ存在下にてインキュベートした。抗ｈＦＡＦ１抗体を用いた免疫ブロット法により、ｈＦＡＦ１とＧＳＴ‐Ｈｓｐ７０（１～１２０）間の直接的相互作用が明らかになった（図４Ｂ）。ＡＴＰが存在

しない場合でも、Ｈｓｐ７０とｈＦＡＦ１間の結合は影響受けなかった（図４Ｃ）。これらのデータにより、ｈＦＡＦ１がＨｓｐ７０のＮ末端と直接相互作用し、ＡＴＰに誘導したＨｓｐ７０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Ｈｓｐ７０とｈＦＡＦ１間の相互作用に影響を及ぼさない

インビボにおいて、ｈＦＡＦ１とＨｓｃ７０／Ｈｓｐ７０間の相互作用に対する熱ショックの影響を検証した。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ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、４５℃にて４５分間熱ショック処理し、３７℃にて様々な時間回復し、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。免疫沈降物は、抗Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０（図５の上パネル）および抗Ｆｌａｇ‐Ｍ２抗体（図５の下パネル）を用いて、ウエスタンブロット法により解析した。ＬＡＳ１ＯＯＯ（Ｆｕｊｉ社製）を用いて、直線領域におけるＨｓｃ７０／Ｈｓｐ７０のＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１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、Ｈｓｃ７０の相互作用は変化しなかった。このことから、ｈＦＡＦ１とＨｓｃ７０／Ｈｓｐ７０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‐ｈＦＡＦ１およびＨｓｃ７０／Ｈｓｐ７０の細胞内局在性は熱ショックにより変化した

ｈＦＡＦ１とＨｓｃ７０／Ｈｓｐ７０間の相互作用は、ＡＴＰ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。ＨｅＬａ細胞中において一時的に過剰発現したＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１が４５℃にて３０分間熱ショック処理し、２４時間後、３７℃で回復した。Ｈｓｐ７０／Ｈｓｃ７０タンパク質は、モノクローナル抗Ｈｓｃ７０／Ｈｓｐ７０抗体およびテキサスレッド標識二次抗体により、またＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１は、ＦＩＴＣ標識抗Ｆｌａｇ‐Ｍ２モノクローナル抗体により染色した。ｈＦＡＦ１およびＨｓｐ７０は、正常にサイトゾルおよび核中に現れた（図６Ａ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６Ｃ）。４５℃にて３０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ｈＦＡＦ１およびＨｓｐ７０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６Ｆ）。３７℃にて２４時間回復後には、ｈＦＡＦ１は主に核およびサイトゾルに再局在し、Ｈｓｐ７０はコントロール細胞に比べ、核における集積を示した（図６Ｇ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６Ｉ）。これらの結果により、ｈＦＡＦ１およびＨｓｐ７０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、ｈＦＡＦ１は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、Ｈｓｐ７０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（Michels 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、Ｆｌａｇ標識Ｈｓｐ７０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、Ｆｌａｇ標識Ｈｓｐ７０あるいはＨｓｐ７０のＡＴＰ結合ドメイン欠失変異型（Ｈｓｐ７０ΔＡＢＤ、１～１１９および４２９～６４０）を、ＨＥＫ２９３Ｔ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Ｆｌａｇ抗体によるＦｌａｇ‐Ｈｓｐ７０の検出には問題があったため、抗Ｈｓｐ７０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７Ａ）。４５℃にて１５分間、細胞が熱ショック処理し、３７℃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７Ｂ）。Ｈｓｐ７０単独

の過剰発現であっても、３７℃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、Ｈｓｐ７０ΔＡＢＤ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Ｈｓｐ７０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、Ｈｓｐ７０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、ＡＴＰ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】

Ｈｓｐ７０のシャペロン活性に対するｈＦＡＦ１の影響を検証するために、Ｆｌａｇ標識ｈＦＡＦ１を有するまたは有さないＨｓｐ７０をＨＥＫ２９３Ｔへトランスフェクトした。抗Ｆｌａｇおよび抗ｈＦＡＦ１抗体を用いたウエスタンブロット解析により、Ｆｌａｇ標識ｈＦＡＦ１の過剰発現を確認した（図７Ｃ）。Ｈｓｐ７０はｈＦＡＦ１とほぼ一緒に移動するため、図７Ｃのパネルには Ｈｓｐ７０は現れなかった。Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１とＨｓｐ７０との共トランスフェクションは、Ｈｓｐ７０の再生活性を有意に低下させた（図７Ｄ）。

【０１１１】

ｈＦＡＦ１の阻害作用が、内因性Ｈｓｐ７０との結合を介することを確認するために、Ｆｌａｇ標識ｈＦＡＦ１、あるいはＨｓｐ７０の過剰発現がない場合にＨｓｐ７０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、Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１のアミノ酸配列３６６～６５０（Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１ΔＮ）により、ＨＥＫ２９３Ｔ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、Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１およびＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１ΔＮの発現をモニタリングした（図７Ｅ）。Ｆｌａｇ‐ＣＭＶ‐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、３７℃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１１％まで再活性化した。一方、Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１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、Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１ΔＮの発現は、Ｈｓｐ７０のシャペロン活性を阻害しなかった（図７Ｆ）。図７Ｆに示した通り、Ｈｓｐ７０相互作用に必要なＮ末端ドメインを欠くＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１ΔＮ　ｈＦＡＦ１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、１μｇおよび２μｇのＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１ΔＮベクターＤＮＡが、ＨＥＫ２９３Ｔ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、Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１ΔＮの発現をモニタリングした。（図７Ｇ）。Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１ΔＮのトランスフェクトにより、Ｈｓｐ７０の再生活性が、量依存的に増加した（図７Ｈ）。これらの試験により、ｈＦＡＦ１がＨｓｐ７０のシャペロン活性に対する阻害剤として働き、ｈＦＡＦ１のＮ末端残基がこのＨｓｐ７０シャペロン活性阻害に関わることが証明される。

【０１１２】

実施例２．７‐ｈＦＡＦ１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ＳＡＰＫ／ＪＮＫの活性化が必要であり、Ｈｓｐ７０の過剰発現は、ＳＡＰＫ／ＪＮＫの活性化を抑制することにより、アポトーシスを防ぐ（Gabai et al., 1997. J. Biol. Chem. 272:18033-18037; Volloch et al., 1998, Cell Stress Chaperones 3:265-271; Meriin et al., 1999, Mol. Cell. Biol. 19:2547-2555）。Ｈｓｐ７０発現が多く、ストレス耐容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ＳＡＰＫ／ＪＮＫを活性化し、同量のストレス下においてはＳＡＰＫ／ＪＮＫの非活性化速度を高めることが示された。したがって、ＳＡＰＫ／ＪＮＫ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）。

【０１１３】

その後、ＳＡＰＫ／ＪＮＫ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ｈＦＡＦ１の過剰発現による影響を検証した。Ｆｌａｇ‐ＣＭＶ‐２ベクター、Ｆｌａｇ

標識ｈＦＡＦ１、あるいはＦｌａｇ標識ｈＦＡＦ１ΔＮを用いて、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞をトランスフェクトした。トランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞は、４５℃にて４５分間熱ショック処理し、ＳＡＰＫ／ＪＮＫ活性を測定した（図８）。コントロールおよびＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１ΔＮ発現細胞のいずれにおいても、ＳＡＰＫ／ＪＮＫ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１３倍であった。他方で、Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１発現細胞におけるＳＡＰＫ／ＪＮＫ活性は、熱ショック直後の活性が１６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、ｈＦＡＦ１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Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１発現細胞において観察されたＳＡＰＫ／ＪＮＫの過度の活性化は、熱ショック処理Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１ΔＮ発現細胞においては見られなかった。これにより、ｈＦＡＦ１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。

【０１１４】

実施例２．８‐ｈＦＡＦ１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ｈＦＡＦ１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。Ｆｌａｇ‐ＣＭＶ‐２ベクター、Ｆｌａｇ標識ｈＦＡＦ１、あるいはＦｌａｇ標識ｈＦＡＦ１ΔＮによりトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、４５℃にて９０分間熱ショック処理した。３７℃にて４８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。Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１過剰発現ＨＥＫ２９３Ｔ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Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１ΔＮ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、ｈＦＡＦ１との複合体形成により、Ｈｓｐ７０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。Ｈｓｐ７０結合親和性を欠くＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１ΔＮ発現細胞は、熱ショックに対する耐性を示した。これは、Ｈｓｐ７０のシャペロン活性上昇によるものか、あるいはｈＦＡＦ１Ｃ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。

【０１１５】

実施例２．９‐脊椎動物においてＦＡＦ１配列は高度に保存される

ＦＡＦ１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、ｈＦＡＦ１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ＦＡＦ１をアラインメント処理した。図１０に示した通り、Ｈｓｐ７０が結合するアミノ酸領域８２～１８０と同様に、ＦＡＦ１全配列が高度に保存されている。脊椎動物間においては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％CO_2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、ＪｕｒｋａｔＴ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。

【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］、ｐＦｌａｇ‐ＣＭＶ‐２‐ＦＡＦ１［８２～６５０］、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Ａｆｆｉｎｉｔｉ　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ＩκＢα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）。

【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、１．２ｘ10^6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、５ｘ10^6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。

【０１１９】

実施例３．３‐免疫沈降法

プロテアーゼ阻害剤（５０ｍＭ　トリス‐Ｃｌ、ｐＨ８．０、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．５％　ＮＰ‐４０、１ｍＭ　ＰＭＳＦ、０．５ｍＭ　ＤＴＴ、５μｇ／ｍＬ　アプロチニン、１０μｇ／ｍＬ　ペプスタチンＡ、１０μｇ／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、細胞を破砕した。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（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１ｍＬ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（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１．５ｍＭ　$MgCl_2$、１０ｍＭ　ＫＣｌ、０．５ｍＭ　ＰＭＳＦ、０．２ｍＭ　ＤＴＴ、５μｇ／ｍＬ　アプロチニン、１０μｇ／ｍＬ　ペプスタチンＡ、１０μｇ／ｍＬ　ロイペプチン、ｐＨ７．９）を含む低張緩衝液４００μＬ中で細胞ペレットを溶解し、４，０００ｒｐｍ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１ｍＬ溶解緩衝液により３回洗浄した。

【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、９．５Ｍ　尿素、２％　トライトンＸ－１００、５％　β－メルカプトエタノール、１ｍＭ　ＰＭＳＦ、５μｇ/ｍＬ　アプロチニン、１０μｇ／ｍＬ　ペプスタチンＡ、１０μｇ／ｍＬ　ロイペプチン、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、１０ｍＭ　Na_3VO_4、１０ｍＭ　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、７ｃｍのＩｍｍｏｂｉｌｉｎｅ　ＤｒｙＳｔｒｉｐｓ（ｐＨ４～７）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５０μＡ；（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－Ｃｌ、ｐＨ８．８、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。
【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、粉砕し、２５ｍＭ　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、１５ｍＭ　フェリシアン化カリウム／５０ｍＭ　チオ硫酸ナトリウムにより洗浄し、脱染した。その後粉砕し、アセトニトリルを加えて脱水し、１０ｎｇ／μＬのシークエンシンググレードトリプシン（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を加えた２５ｍＭ　重炭酸アンモニウム１０～２０μＬ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３０μＬ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２０μＬにより抽出した。抽出液を蓄積し、ＳｐｅｅｄＶａｃ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エブサイト（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。
【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（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　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－Ｃｌ、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（UB_{2-7}）と共に、結合緩衝液（５０ｍＭ　トリス－Ｃｌ、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。
【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ソフトウエアにより算出した。

【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。Ａｍａｘａ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、$1x10^5$個／ウェルの密度で９６ウェルプレートに捲いた。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‐ｄｉｍｅｔｈｙｌｄｉａｚｏｌ‐２‐ｙｌ］‐２，５‐ｄｉｐｈｅｎｙｌｆｏｒｍａｚａｎ）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。

【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、ウエスタンブロット解析のためにＰＶＤＦ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、ウエ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６００５９４２）であると同定し、ＥＳＩ‐ｑ‐ＴＯＦ‐ｔａｎｄｅｍ ＭＳを用いたシークエ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が観察した（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）。

【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、免疫ブロットした。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。

【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。

【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（UB_{2-7}）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（UB_{2-7}）（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（UB_{2-7}）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［ｌ～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［ｌ～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、ウエ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）。ユビキチン‐プロテアソーム経路において、マルチユビキチンは、Ｌｙｓ４８‐Ｇｌｙ７６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チン消化により、２残基断片（Ｇｌｙ‐Ｇｌｙ）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１１４．１Ｄａの質量シフトを示す（３０）。ＭＡＬＤＩ‐ＴＯＦ‐ＭＳを用いて、ｈＦＡＦ１の高分子相互作用タンパク質がマルチユビキチン鎖（ＮＣＢＩアクセッション番号１３６６７０）であることが同定した。加えて、それぞれアミノ酸残基４３～５４および５５～７２から生じた２つの１１４．１Ｄａピーク（ｍ／ｚ、１４６０．７８７０；ｍ／ｚ、２２４４．１８１４）の増加が検出した（図１６Ｂ、表２）。１１４．１Ｄａ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、ＥＳＩ‐ｑ‐ＴＯＦタンデム質量分析装置を用いて各ピークのシークエンシングを行い、それぞれＬｙｓ４８‐ＧｌｙＧｌｙ（図１６Ｃ）およびＬｙｓ６３‐ＧｌｙＧｌｙ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、ｈＦＡ

Ｆ１がＬｙｓ４８結合およびＬｙｓ６３結合マルチユビキチン鎖と相互作用することが示された。

【０１３４】

表２．　ＧＳＴ‐ｈＦＡＦ１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

【０１３５】

【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	1523.7634		
34-42	1039.5172	1039.5087		
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		

【０１３６】

実施例４．６‐ｈＦＡＦ１はユビキチン依存基質の分解を阻害する

図１７は、Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１およびＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１[１～８１]の過剰発現がマルチユビキチン化タンパク質の蓄積を引き起こしたことを、ｐＦｌａｇ‐ＣＭＶベクターおよびＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１［８２～６５０］の過剰発現との対比により示している。ｈＦＡＦ１の過剰発現に続いて、細胞内マルチユビキチン化タンパク質の蓄積が生じた原因は、ｈＦＡＦ１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、ｈＦＡＦ１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、ＧＦＰを用いたプロテアソーム基質、Ub^{G76V}‐ＧＦＰが用いて、Ｄａｎｔｕｍａ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（８～２０）。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２１）。その後、２００ｎｇのUb^{G76V}‐ＧＦＰおよび１μｇのＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１あるいはＦｌａｇ‐ＶＣＰを、ＨＥＫ２９３Ｔ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２４時間の時点で、フローサイトメトリー法によりＧＦＰの蛍光強度を測定した。

【０１３７】

Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１の過剰発現により、Ub^{G76V}‐ＧＦＰ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１８Ａ）、ｐＦｌａｇ‐ＣＭＶ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ＵｂＧ７６Ｖ‐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‐ＶＣＰ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抗体によるウエ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エスタンブロット法により、Ｆｌａｇ‐ＶＣＰ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）。ＶＣＰ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‐ＶＣＰ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、ＶＣＰ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‐ＶＣＰ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、ＶＣＰ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エ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ＶＣＰ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ＶＣＰ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ＶＣＰ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［ｌ～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、Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１［１～８１］の作用は、Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１より強い。Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１［１～８１］に対してはＶＣＰ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、ＩκＢα総含有量に差異が見られないことから、ｈＦＡＦ１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、ｈＦＡＦ１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ｈＦＡＦ１の過剰発現により誘導され、それにはＵＢＡ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ｈＦＡＦ１の過剰発現は、ＢＯＳＣ２３細胞においてアポトーシスを引き起こし、Ｊｕｒｋａｔ細胞において、ｈＦＡＦ１がＦａｓ細胞死誘導シグナル伝達複合体（Ｆａｓ‐ＤＩＳＣ）メンバーと相互作用する（３４、３５）。しかしながら、ユビキチン化とｈＦＡＦ１による細胞死の関係は、明らかになっていない。そのため、ｈＦＡＦ１によるユビキチン化タンパク質の蓄積が、ｈＦＡＦ１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ＦＡＦ１による細胞死の試験には、Ｊｕｒｋａｔ細胞が用いられてきたため（３４、３

５）、今回行われた試験においてもＪｕｒｋａｔ細胞を使用した。Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１あるいはその切断型を用いて、Ａｍａｘａエレクトロポレーターにより Ｊｕｒｋａｔ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。Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１の過剰発現は、これまで報告した通り（３４、３５）、細胞死を誘導し、ＵＢＡドメインを含むＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１［１～８１］は、細胞死を有意に増加させた（図２０Ａ）。ｈＦＡＦ１完全型より強い唯一のＵＢＡドメインであるｈＦＡＦ１［１～８１］の細胞死に対する影響は、ＧＦＰレポーターを用いた実験結果と一致した。Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１［３６６～６５０］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。ＵＢＡ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Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１［１～８１］を用いて、Ａｍａｘａエレクトロポレーターにより Ｊｕｒｋａｔ細胞に一時的にトランスフェクトし、ＭＴＴ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、Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１［１～８１］により細胞死が誘導した（図２０Ｂ）。これにより、ｈＦＡＦ１のＵＢＡ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１７および図２０）。

【実施例５】

【０１４１】

実施例５‐正常体と卵巣腫瘍間のＦＡＦ１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ＰＢＳ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（１０ｍＭ　トリスアセテート、１０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ、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℃、１２００ｒｐｍにて約３０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エ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、ＦＡＦ１、Ｈｓｐ７０、Ｈｓｐ２７、ＶＣＰ、ＩＴＳＮ、ＵＣＨ　Ｌ１、ＳＵＭＯ、分泌促進物質、Ｎｍ２３‐ポリＡｂ（Ｎｍ２３‐ｐｏｌｙ　Ａｂ）、Ｎｍ２３‐モノＡｂ（Ｎｍ２３‐ｍｏｎｏ‐Ａｂ）およびＧＡＰＤＨを含む（図２２および２３）。

【０１４３】

上記結果により、ＦＡＦ１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ＦＡＦ１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、２μＣｉ／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ーを行った。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、ウエスタンブロット解析により確認した。

【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法およびウエスタンブロット法により解析した。

【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、ウエスタンブロット法により解析した。

【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、ウエ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。

【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。ＨｅＬａ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、ｐＣｙｔｌｕｃ（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／Ｈｓｐ７０、あるいはｐＦｌａｇ‐ＣＭＶ

－２／Ｈｓｐ７０ΔＡＢＤ、ｐＦｌａｇ－ＣＭＶ－２／ｈＦＡＦ１、あるいは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、ｐＣｙｔｌｕｃ（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／Ｈｓｐ７０、あるいはｐＦｌａｇ－ＣＭＶ－２／Ｈｓｐ７０ΔＡＢＤ、ｐＦｌａｇ－ＣＭＶ－２／ｈＦＡＦ１、あるいは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、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：ｈＦＡＦ１と同一のアミノ酸部分。

【図１０－２】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、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：ｈＦＡＦ１と同一のアミノ酸部分。

【図１１】図１１Ａ～１１Ｅは、ｈＦＡＦ１がインビトロおよびインビボにおいて、ＶＣＰと相互作用することを示す。（Ａ）１μＣｉ／ｍＬ［^{35}Ｓ］メチオニンにより標識したｐＦｌａｇ－ＣＭＶ－２ベクターおよびｐＦｌａｇ－ｈＦＡＦ１をＨＥＫ２９３Ｔ細胞にトランスフェクトした。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、細胞溶解物に対して免疫沈降を行った。沈降物を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。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ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（ＥＳＩ‐ｑ‐ＴＯＦ‐ｔａｎｄｅｍ‐ＭＳ）を用いてペプチドのシークエンシングを行った（右のスペクトル図）。（Ｃ、Ｄ）ＧＳＴ‐ｈＦＡＦ１（Ｃ）およびＧＳＴ‐ＶＣＰ（Ｄ）は、グルタチオンビーズ上に固定化し、精製組換えＶＣＰ（Ｃ）および精製組換えｈＦＡＦ１（Ｄ）を加えてインキュベートした。結合タンパク質は、１０％ＳＤＳ‐ＰＡＧＥによりクマシー染色で検出し、抗ＶＣＰ抗体（Ｃ）および抗ＦＡＦ１抗体（Ｄ）により免疫ブロットした。（Ｅ）内因性ＦＡＦ１とＶＣＰ間の相互作用を調べるために、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞およびＪｕｒｋａｔ細胞の溶解物に対し、マウスＩｇＧをコントロールとし（レーン１）、抗ＦＡＦ１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ＦＡＦ１およびＶＣＰ量を、免疫沈降後の量と比較した。免疫沈降物を、抗ＦＡＦ１および抗ＶＣＰ抗体を用いて、ウエスタンブロット法により解析した。

【図１２】図１２Ａ～１２Ｃは、ｈＦＡＦ１がＵＢＸドメインを通じてＶＣＰと相互作用することを示す。（Ａ）様々なＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１切断型の図。ユビキチン相同ドメインであるＵＢ１およびＵＢ２、線虫ＯＲＦ　Ｃ２８１．１と相同するＵＡＳ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ＵＢＸ。（Ｂ、Ｃ）ｐＦｌａｇ‐ＣＭＶ‐２ベクターあるいは切断したＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１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。沈降物を、抗Ｆｌａｇ（Ｂ）および抗ＶＣＰ抗体（Ｃ）を用いて、ウエスタンブロット法により解析した。ＮＢは、非特異的タンパク質バンドを示す。

【図１３】図１３Ａ～１３Ｂは、ｈＦＡＦ１がサイトゾル内においてＶＣＰと相互作用することを示す。ｐＦｌａｇ‐ＣＭＶ‐２ベクターあるいはＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１を用いて一時的にトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ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Ｆｌａｇおよび抗ＶＣＰ抗体を用いて、ウエ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Ｆｌａｇ‐Ｍ２‐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Ｆｌａｇおよび抗ＶＣＰ抗体を用いて、ウエスタンブロット法により沈降物を解析した（Ｂ）。

【図１４－１】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（Ub_2‐

$_7$）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　３３．３ｋＤａ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チンペプチドを示す。Ｌｙｓ４８を通じて結合したペプチドを、ＥＳＩ‐ｑ‐ＴＯＦ‐ｔａｎｄｅｍ‐ＭＳを用いたシークエ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）。

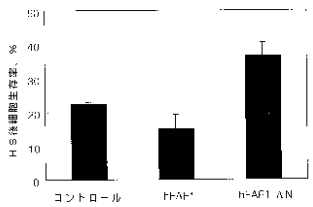
【図１７】図１７は、ｈＦＡＦ１の過剰発現によりマルチユビキチン化タンパク質が蓄積すること示す。ｐＦｌａｇ‐ＣＭＶ‐２ベクター、Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１、Ｆｌａｇ‐ｈＦＡＦ１［１～８１］およびＦｌａｇ‐ｈＦＡＦ１［８２～６５０］によりトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、１０％ＳＤＳ‐ＰＡＧＥで分離し、抗ユビキチン抗体を用いたウエスタン分析により、マルチユビキチン化タンパク質を検出した（上パネル）。抗チューブリン抗体により、タンパク質濃度を規準化した（下パネル）。

【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２ｘ１０^{5}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２ｘ１０^{5}個の密度で３５ｍｍ培養皿に捲いたＨＥＫ２９３Ｔ細胞中において、２００ｎｇのＵｂ^{G76V}‐ＧＦＰあるいはＥＧＦＰ‐Ｎ１ベクターが、１μｇ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　Ｓｏｆｔｅａｒｅ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±Ｓ．Ｄ値と

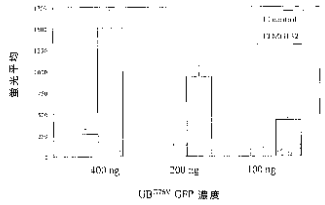
して示した（Ｐ値＜０．０５）。
【図１８－２】図１８Ａ～１８Ｄは、ＵＢＡドメインを通じてユビキチン依存性タンパク質分解をｈＦＡＦ１が阻害することを示す。前日に２ｘ１０^{5}個の密度で３５ｍｍ培養皿に捲いたＨＥＫ２９３Ｔ細胞中に、２００ｎｇのＵｂ^{Ｇ７６Ｖ}－ＧＦＰあるいはＥＧＦＰ－Ｎ１ベクター、１μｇのｐＦｌａｇ－ＣＭＶ－２ベクター、Ｆｌａｇ－ｈＦＡＦ１、Ｆｌａｇ－ＶＣＰ、およびＦｌａｇ－ｈＦＡＦ１とＦｌａｇ－ＶＣＰの混合物により共トランスフェクトした（Ａ、Ｂ）。前日に２ｘ１０^{5}個の密度で３５ｍｍ培養皿に捲いたＨＥＫ２９３Ｔ細胞中において、２００ｎｇのＵｂ^{Ｇ７６Ｖ}－ＧＦＰあるいはＥＧＦＰ－Ｎ１ベクターが、１μｇ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 Ｓｏｆｔｅａｒｅ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±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ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、トランスフェクション２４時間後に、５、１０、１５、２０分間、１０ｎｇ／ｍＬのＴＮＦ－αに暴露した。細胞を溶解し、１０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、ＩκＢα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）Ａｍａｘａ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、４μｇ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転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、４００ｎｇ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、１０μＭ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エ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エ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。

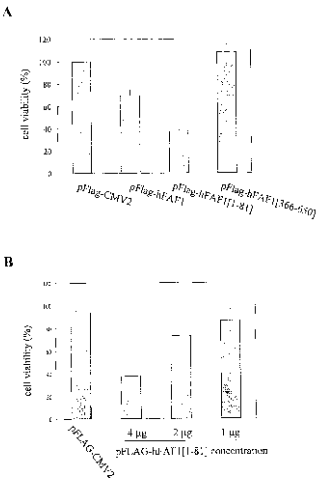
【図９】



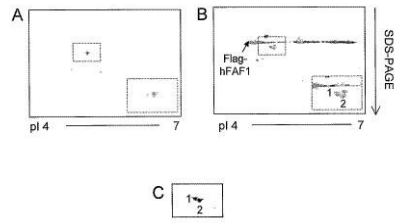
【図２１】



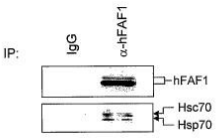
【図２０】



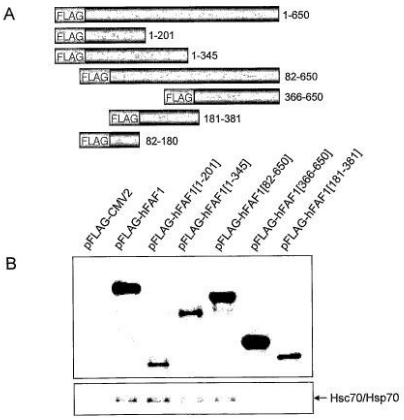
【図１】


A
B
Flag-
hFAF1
SDS-PAGE
pI 4
7
C

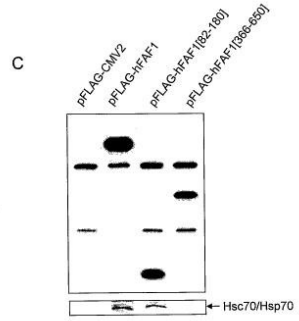
【図２】


IP:
IgG
α-hFAF1
hFAF1
Hsc70
Hsp70

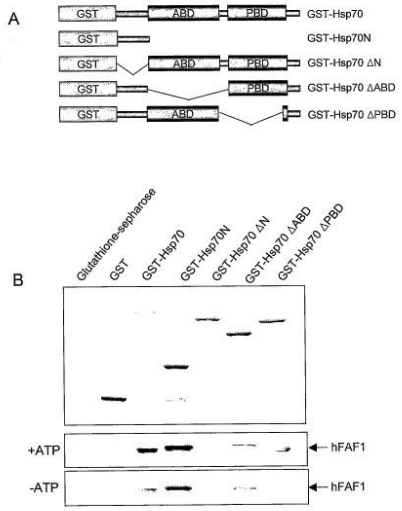
【図３－１】


A
FLAG
1-650
1-201
1-345
82-650
366-650
181-381
82-180
B
pFLAG-CMV2
pFLAG-hFAF1
pFLAG-hFAF1[1-201]
pFLAG-hFAF1[1-345]
pFLAG-hFAF1[82-650]
pFLAG-hFAF1[366-650]
pFLAG-hFAF1[181-381]
Hsc70/Hsp70

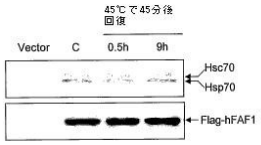
【図３－２】


C
pFLAG-CMV2
pFLAG-hFAF1
pFLAG-hFAF1[82-180]
pFLAG-hFAF1[366-650]
Hsc70/Hsp70

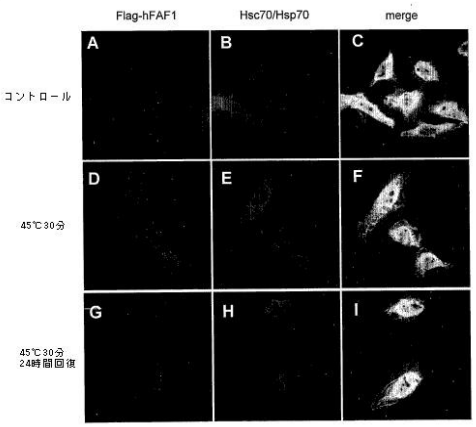
【図４】


A
GST
ABD
PBD
GST-Hsp70
GST-Hsp70N
GST-Hsp70 ΔN
GST-Hsp70 ΔABD
GST-Hsp70 ΔPBD
B
Glutathione-sepharose
GST
GST-Hsp70
GST-Hsp70N
GST-Hsp70 ΔN
GST-Hsp70 ΔABD
GST-Hsp70 ΔPBD
+ATP
-ATP
hFAF1
hFAF1

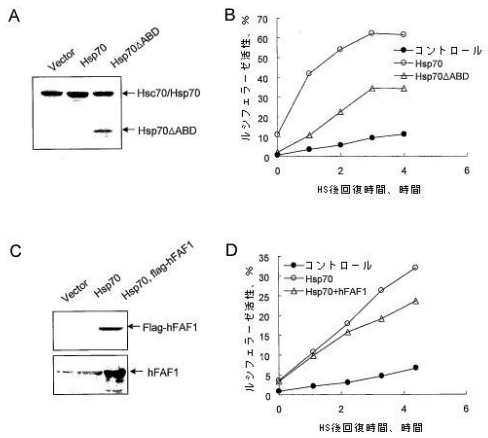
【図５】


45℃で45分後
回復
Vector
C
0.5h
9h
Hsc70
Hsp70
Flag-hFAF1

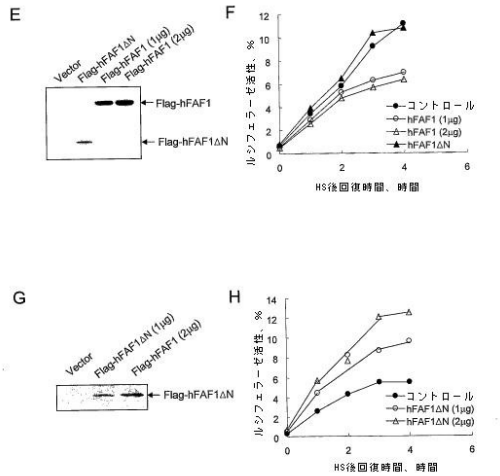
【図６】


Flag-hFAF1
Hsc70/Hsp70
merge
A
B
C
コントロール
D
E
F
45℃30分
G
H
I
45℃30分
24時間回復

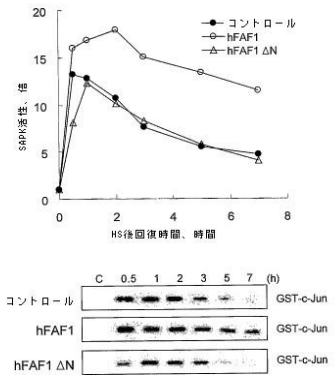
【図７－１】


A
Vector
Hsp70
Hsp70ΔABD
Hsc70/Hsp70
Hsp70ΔABD
B
ルシフェラーゼ活性 %
コントロール
Hsp70
Hsp70ΔABD
HS後回復時間、時間
C
Vector
Hsp70
Hsp70, flag-hFAF1
Flag-hFAF1
hFAF1
D
ルシフェラーゼ活性 %
コントロール
Hsp70
Hsp70+hFAF1
HS後回復時間、時間

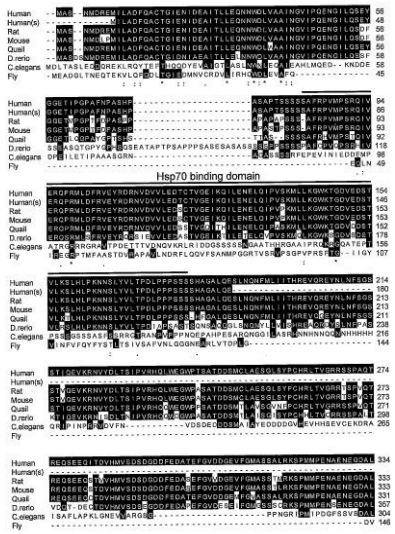
【図７－２】


E
Vector
Flag-hFAF1ΔN
Flag-hFAF1 (1μg)
Flag-hFAF1 (2μg)
Flag-hFAF1
Flag-hFAF1ΔN
F
ルシフェラーゼ活性、%
コントロール
hFAF1 (1μg)
hFAF1 (2μg)
hFAF1ΔN
HS後回復時間、時間
G
Vector
Flag-hFAF1ΔN (1μg)
Flag-hFAF1 (2μg)
Flag-hFAF1ΔN
H
ルシフェラーゼ活性、%
コントロール
hFAF1ΔN (1μg)
hFAF1ΔN (2μg)
HS後回復時間、時間

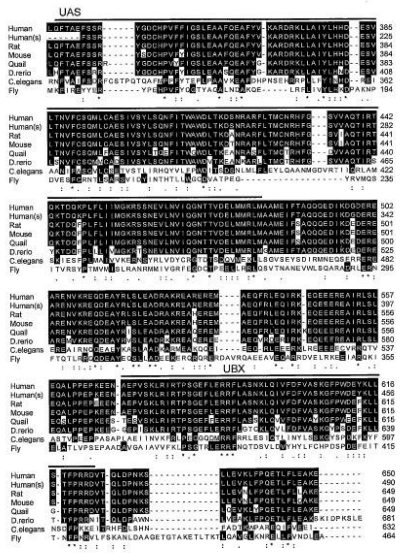
【図８】


SAPK活性、倍
コントロール
hFAF1
hFAF1 ΔN
HS後回復時間、時間
C 0.5 1 2 3 5 7 (h)
コントロール
hFAF1
hFAF1 ΔN
GST-c-Jun

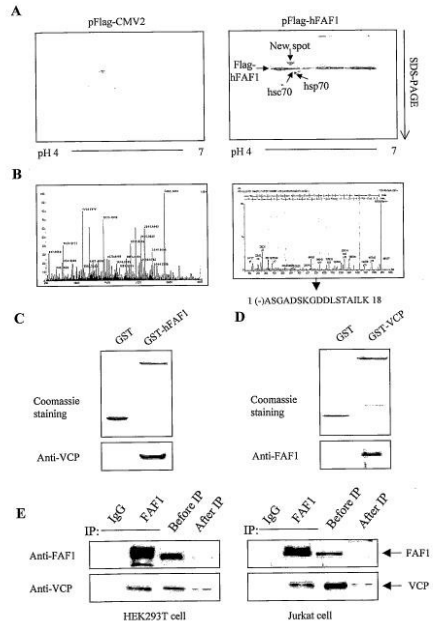
【図１０－１】


Hsp70 binding domain

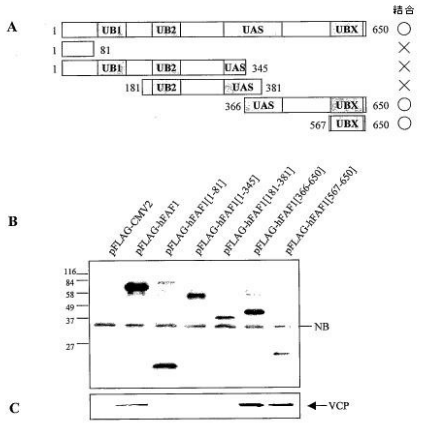
【図１０－２】


UAS
UBX
Human
Human(s)
Rat
Mouse
Quail
D.rerio
C.elegans
Fly

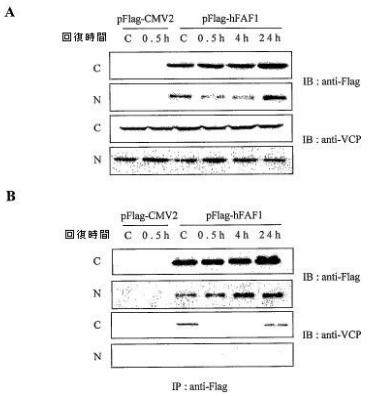
【図１１】


A
pFlag-CMV2
pFlag-hFAF1
New spot
Flag-hFAF1
hsc70
hsp70
SDS-PAGE
pH 4
7
B
1 (-)ASGADSKGDDLSTAILK 18
C
GST
GST-hFAF1
Coomassie staining
Anti-VCP
D
GST
GST-VCP
Coomassie staining
Anti-FAF1
E
IP:
IgG
FAF1
Before IP
After IP
Anti-FAF1
Anti-VCP
FAF1
VCP
HEK293T cell
Jurkat cell

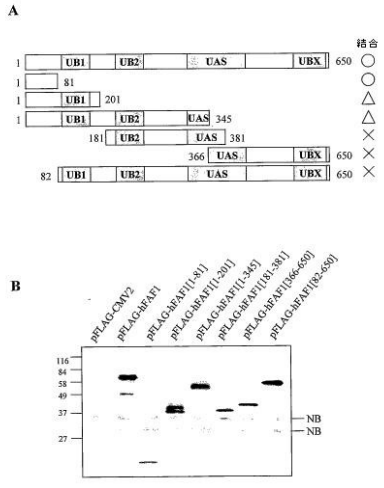
【図１２】


結合
A
UB1
UB2
UAS
UBX
650
81
345
381
366
567
B
pFLAG-CMV2
pFLAG-hFAF1
pFLAG-hFAF1[1-81]
pFLAG-hFAF1[1-345]
pFLAG-hFAF1[181-381]
pFLAG-hFAF1[366-650]
pFLAG-hFAF1[567-650]
116
84
58
49
37
27
NB
C
VCP

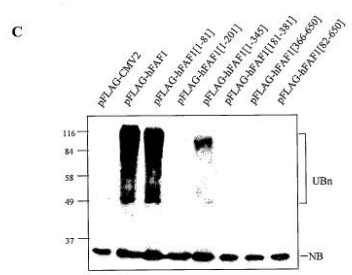
【図１３】



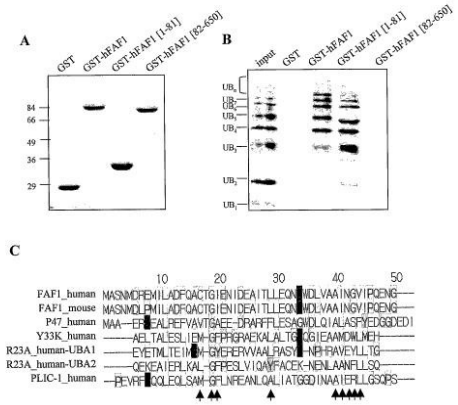
【図１４－１】



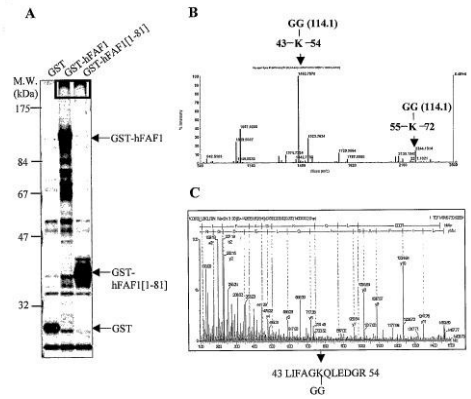
【図１４－２】



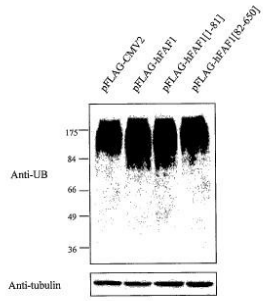
【図１５】


A
GST
GST-hFAF1
GST-hFAF1 [1-81]
GST-hFAF1 [82-650]
84
66
49
36
29
B
Input
GST
GST-hFAF1
GST-hFAF1 [1-81]
GST-hFAF1 [82-650]
UB6
UB5
UB4
UB3
UB2
UB1
C
10
20
30
40
50
FAF1_human
FAF1_mouse
P47_human
Y33K_human
R23A_human-UBA1
R23A_human-UBA2
PLIC-1_human

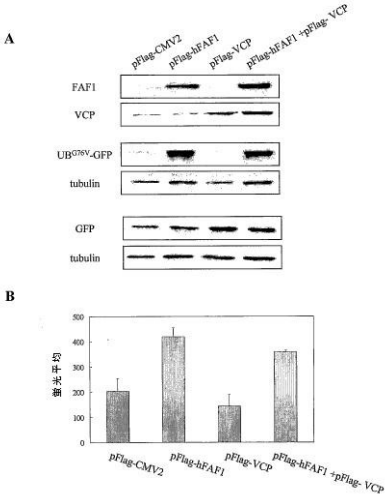
【図１６】


A
GST
GST-hFAF1
GST-hFAF1[1-81]
M.W.
(kDa)
175
84
67
47
32
GST-hFAF1
GST-hFAF1[1-81]
GST
B
GG (114.1)
43−K −54
GG (114.1)
55−K −72
C
43 LIFAGKQLEDGR 54
GG

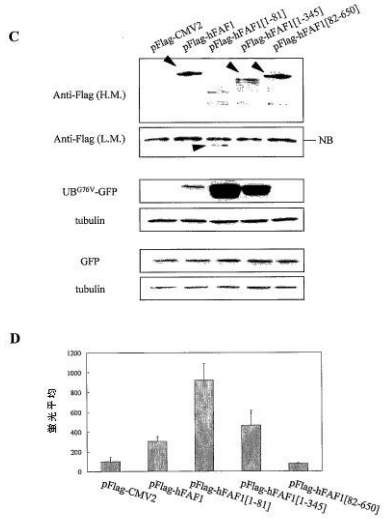
【図１７】


pFLAG-CMV2
pFLAG-hFAF1
pFLAG-hFAF1[1-81]
pFLAG-hFAF1[82-650]
175
84
66
49
36
Anti-UB
Anti-tubulin

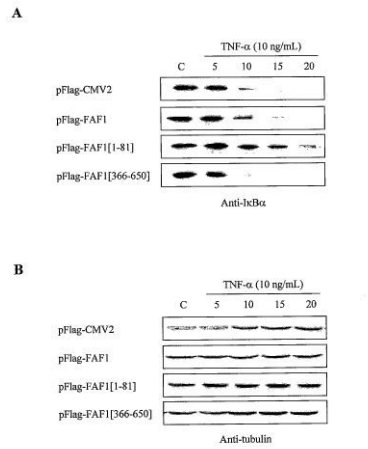
【図１８－１】



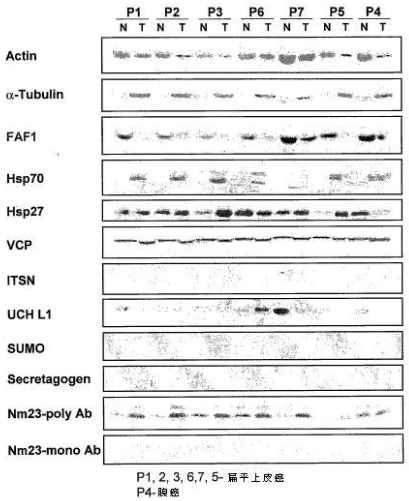
【図１８－２】



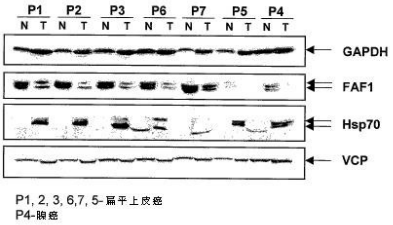
【図１９】



【図２２】



【図２３】



【配列表】

2007534744000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2005/003393

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Files: Medline, WPIDS, Biosis and HCA; Keywords: FAF1, hFAF1, Fas-associated factor 1. ANGIS: Blastp Seq ID No.7 and fragments thereof.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Kim, H.J. et al "Human Fas-associated Factor 1 interacts with Heat Shock Protein 70 and Negatively Regulates Chaperone Activity" **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 280, No.9, Issue of March 4, pp8125-8133, 2005 See abstract, page 8125 column 2 second paragraph, page 8127 column 1 second paragraph.	1-3, 5-6, 13-16
P,X	Song, E.J. et al "Human Fas-Associated Factor-1, Interacting with Ubiquinated Proteins and Valosin-Containing Protein, Is Involved in the Ubiquitin-Proteasome Pathway" **Molecular and Cellular biology**, (2005, Mar) Vol. 25, No. 6, pp2511-24 See abstract, page 2512 column 2, page 2516, 2517 column 2, page 2521 column 2 to page 2523 column 1.	1-4, 7-12, 17-18

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] See patent family annex

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

Date of the actual completion of the international search
18 April 2006

Date of mailing of the international search report
24 APR 2006

Name and mailing address of the ISA/AU
AUSTRALIAN PATENT OFFICE
PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA
E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au
Facsimile No. (02) 6285 3929

Authorized officer
IAN DOWD
Telephone No : (02) 6283 2273

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2005/003393

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BIOSIS online abstract accession number 2005:396254 Ko, S. et al **FASEB Journal**, (May 14 2004) Vol 18, No. 8, Suppl. S, ppC257. See abstract	1-3, 7-12
X	Derwent abstracts accession number 2005-270109/28 Class B04 D16 KR 2004101707 A (UNIV PAI CHAI)3 December 2004 See abstract	1-4, 21-22
X	BIOSIS online abstract accession number 2002:343946 Imai, Y. et al **FASEB Journal**, (March 20 2002) Vol 16, No. 4, pp A674. See abstract	1, 7-9
X	Bjorling-Poulsen, M. et al "The pro-apoptotic FAS-associated factor 1 is specifically reduced in human gastric carcinomas" **International Journal of Oncology**, (2003 Oct) Vol. 23, No. 4, pp1015-23 See abstract	19-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2005/003393

Supplemental Box
(To be used when the space in any of Boxes I to VIII is not sufficient)

Continuation of Box No: III

The different inventions are:

1. Claims 1-18, 21-22 directed to peptide fragments of Fas associated factor 1 and uses therefor.
2. Claims 19-20 directed to a method for diagnosing cancer in a tissue sample.

The common technical feature between these claim sets is the Fas associated factor 1 peptide. However, this peptide is known and hence the application lacks unity of invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IB2005/003393

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report	Patent Family Member
KR 2004101707A	NONE

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

END OF ANNEX

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2005/003393

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **1-3, 7-9, 11-14, 17-18, 21-22 (all in part)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Due to economic reasons, the application was searched according to the specific embodiments described. Consequently, the above claims were not fully searched.

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

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

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

1. Claims 1-18, 21-22
2. Claims 19-20

As reasoned on the extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 リー，コン‐ジョー
韓国，ソウル １２０－７５０，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 １２０－７５０，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 ９９，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 １２０－７５０，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 ９９，エスケー コープ

Ｆターム(参考) 4C084 AA01 AA02 BA44 CA18 DA27 NA14 ZB262
4H045 AA10 AA30 BA10 BA16 BA17 CA40 EA28 EA51 FA74