

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4261050号
(P4261050)

(45) 発行日 平成21年4月30日 (2009. 4. 30)

(24) 登録日 平成21年2月20日 (2009. 2. 20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 K 67/027 (2006. 01)

A O 1 K 67/027

C O 7 K 16/40 (2006. 01)

C O 7 K 16/40

C 1 2 N 5/10 (2006. 01)

C 1 2 N 5/00

B

C 1 2 N 9/12 (2006. 01)

C 1 2 N 9/12

請求項の数 11 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-521208 (P2000-521208)
 (86) (22) 出願日 平成10年10月21日 (1998. 10. 21)
 (65) 公表番号 特表2001-523461 (P2001-523461A)
 (43) 公表日 平成13年11月27日 (2001. 11. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP1998/006981
 (87) 国際公開番号 W01999/025843
 (87) 国際公開日 平成11年5月27日 (1999. 5. 27)
 審査請求日 平成17年10月18日 (2005. 10. 18)
 (31) 優先権主張番号 9722320.0
 (32) 優先日 平成9年10月22日 (1997. 10. 22)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 500184121
 ザ・スクリプス・リサーチ・インスティテュート
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・92037、ラ・ホーヤ、ノース・トレイ・パインズ・ロード・10550、メイル・ドロップ・テラー・ピー・シー-8
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100105393
 弁理士 伏見 直哉
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト・チェックポイントキナーゼHCD S 1の組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：1 に示された核酸配列をもつ単離されたDNA分子を含むDNA発現ベクター。

【請求項 2】

配列番号：1 に示された核酸配列の66番目から1694番目の残基によって示されている核酸配列をもつ単離されたDNA分子を含むDNA発現ベクター。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 のベクターによって形質転換、トランスフェクションまたは感染を受けた宿主細胞。

【請求項 4】

細胞が真核生物または原核生物の細胞である、請求項 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 5】

真核生物細胞が哺乳動物細胞である、請求項 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 6】

真核生物細胞が昆虫細胞である、請求項 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 7】

以下のタンパク質をコードする導入遺伝子を有する遺伝子導入細胞、組織または非ヒト生物体；配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号 2 のアミノ酸配列について 1 又は数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入を含み、かつヒト細胞周期チェックポ

イント経路においてC d c 2 5 タンパク質をリン酸化する能力を有するタンパク質。

【請求項 8】

請求項 3 から請求項 7 の何れかに記載の細胞から発現される以下のタンパク質；配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 2 のアミノ酸配列の 1 又は数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入を含み、かつヒト細胞周期チェックポイント経路においてC d c 2 5 タンパク質をリン酸化する能力を有するタンパク質。

【請求項 9】

単離された以下のタンパク質；配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号 2 のアミノ酸配列の 1 又は数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入を含み、かつヒト細胞周期チェックポイント経路においてC d c 2 5 タンパク質をリン酸化する能力を有するタンパク質。

10

【請求項 10】

配列番号：2 のアミノ酸配列からなるタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項 11】

モノクローナル抗体である、請求項 10 に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(背景技術)

分裂中の細胞にとって、ゲノムの統合性が最も重要である。DNA 損傷への応答において、真核細胞は、細胞周期の進行を遅延させるためのチェックポイント制御を行なう複合システムに依存する。正常な真核生物の細胞周期は、細胞の形態および生化学的活性の違いに応じて4つの段階(順番に、G1、S、G2、M)に分けられ、また細胞周期から離脱した細胞をG0期、または非周期状態にあるという。細胞周期にある細胞が活発に複製しているとき、DNA複製はS期に起こり、活発な細胞分裂はM期に起こる。一般的には、Benjamin Lewin, 遺伝子VI (GENES VI) (36章、1997年、英国オクスフォードにあるオクスフォード大学出版(Oxford University Press, Oxford, GB))を参照。DNAは、真核細胞の中で次第に高いレベルの構造体となり、最後に染色体を形成する。性染色体以外の染色体は、通常対になって存在し、細胞分裂の間、各染色体のDNAは複製して対になった染色分体になる(一般的には、Benjamin Lewin, 遺伝子VI (GENES VI) (5章、1997年、英国オクスフォードにあるオクスフォード大学出版(Oxford University Press, Oxford, GB))を参照。))。

20

30

【0002】

チェックポイント遅延によって、S期における複製の前およびM期に染色分体が分離する前に、損傷を受けたDNAを修復するための時間ができる(HartwellとWeinert, 1989, Science. 246:629-634)。多くの場合、DNA損傷反応経路は、サイクリン依存型キナーゼの活性を阻害することによって細胞周期停止をもたらす(Elledge, 1997, Science. 274:1664-1671)。ヒトの細胞の中ではDNA損傷によって起こるG2期の遅延はCdc2の阻害的なリン酸化に大きく依存している(Blasinaら、1997, Mol. Cell Biol., 8:1-11; Jinら、1996, J. Cell Biol., 134:963-970)ことから、この遅延は、Cdc2に作用する対抗キナーゼおよびCdc2に作用するホスファターゼの活性の変化から生じる可能性が高い。しかし、これらの酵素の活性がDNA損傷に応答して実質的に変化するものの証拠はない(Poonら、1997, Cancer Res., 57:5168-5178)。

40

【0003】

ヒト細胞の中では、3種類のCdc25タンパク質が発現している。Cdc25Aは、G1期からS期に移行するのに特に必要である(Hoffmanら、1994, EMBO J., 13:4302-4310; Jinnoら、1994, EMBO J.

50

、13:1549-1556)が、Cdc25BとCdc25Cは、G2期からM期に移行するのに必要とされる(Gabrielliniら、1996, J. Cell Sci., 7:1081-1093; Galaktionovら、1991, Cell, 67:1181-1194; Millarら、1991, Proc. Natl. Acad. Sci. Acad. USA, 88:10500-10504; Nishijimaら、1997, J. Cell Biol., 138:1105-1116)。M期の進行に対するCdc25BとCdc25Cの正確な関与は解っていない。

【0004】

チェックポイントコントロールに関する最近の知見は、出芽酵母(サッカロマイセス・セレビシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*))および分裂酵母(シゾサッカロマイセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*))を用いた研究から得られている。酵母および高等真核生物における細胞周期チェックポイントについて最近の理解を総説したものが多数出版されている(HartwellとKastan, 1994, Science, 266:1821-1828; Murray, 1994, Current Biology, 6:872-876; Elledge, 1996, Science, 274:1664-1672; KaufmannとPaules, 1996, FASEB J., 10:238-247)。分裂酵母における6種の遺伝子産物rad1⁺, rad3⁺, rad9⁺, rad17⁺, rad26⁺, およびhus1⁺が、DNA損傷依存型チェックポイント経路とDNA複製依存型チェックポイント経路の両方の構成要素であるとして同定されている。さらに、酵母では、cds1⁺がDNA複製依存型チェックポイントに必要であり、また、rad27⁺/chk1⁺が、DNA損傷依存型チェックポイントが必要であると同定されている。

【0005】

これらの遺伝子のいくつかは、出芽酵母の遺伝子と構造的に類似しており、さらに最近では、真核生物全体にわたっても保存されていることが、分裂酵母のrad3⁺の2つのヒトにおける2つの相同遺伝子、すなわちATM(毛細血管拡張性運動失調突然変異)(Savitskyら、1995, Science, 268:1749-1753)およびATR(毛細血管拡張性運動失調およびrad3⁺関連)(Bentleyら、1996, EMBO J., 15:6641-6651; Cimpriichら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:2850-2855)、ならびに分裂酵母rad9⁺のヒト相同遺伝子(Libermanら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:13890-13885)のクローニングによって示唆されている。

【0006】

酵母のチェックポイントタンパク質と遺伝子について多くのことが解っているが、それらの知見によって、それらに相当するヒトの遺伝子またはタンパク質が存在すること、またはヒトの細胞周期の制御調節におけるそれらのエフェクターの役割を完全に予想できるわけではない。

【0007】

ガンの影響を改善させるための、新規でより効果的な治療法および治療薬を開発するためには、ヒトチェックポイントタンパク質を同定してその特徴を調べ、それらの活性のメディエーターを同定することが重要である。

【0008】

(発明の概要)

本発明は、新規のヒトチェックポイントキナーゼ遺伝子hCDS1、タンパク質、および、hCDS1を産生および使用するための構築物および方法を目的としている。

【0009】

特に、本発明はhCDS1をコードする核酸配列で、配列番号:1の核酸配列からなる核

10

20

30

40

50

酸配列を含む。特に本発明は、配列番号：1の核酸配列の66番目から1694番目の核酸配列で、h C D S 1タンパク質に翻訳されるものを含む。本発明はまた、配列番号：1の核酸配列を含む核酸の構築物、ベクター、プラスミド、およびコスミドなどを含む。特に本発明は、配列番号：1の核酸配列を含む核酸ベクター構築物を提供しており、この核酸の配列からタンパク質を発現することができる。本発明は、真核細胞か原核細胞いずれかの宿主細胞の形質転換、ウイルスベクターへの組み込み、またはインビトロでのタンパク質発現を行なうのに適した核酸ベクターを含む。さらに、本発明は、配列番号：1の核酸がコードするタンパク質の少なくとも機能的部分を含む融合タンパク質産物を生成させるための付加的核酸を直列につなぐか、さもなければ結合させた配列番号1の核酸を具体化している。また、本発明は、標的細胞の中に取り込ませて発現させるための剥き出しのDNA形質転換体として用いるように調整した配列番号：1の核酸を含む。本発明は、また、配列番号：1の核酸配列の相補配列のアンチセンスDNA分子処方剤およびその断片で、配列番号：1の核酸配列の連続的または不連続な部分に相補的なアンチセンスDNA分子処方剤も提供する。また、本発明は、配列番号：1の核酸配列、その相補配列またはその断片をコードする修飾塩基またはバックボーンとなる成分を組み込む組成物を提供する。このような修飾塩基および核酸は、当技術分野において既知である（例えば、Vermaら、Ann. Rev. Biochem. 67:99-134 (1998)）。すなわち、本発明は、例えば塩基結合間の修飾、塩基修飾、糖修飾、非放射性標識、核酸クロスリンキング、およびPNA（ポリペプチド核酸）を含んだ改変バックボーンなどの修飾核酸を含む。

10

20

【0010】

本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列からなる新規のチェックポイントキナーゼタンパク質h C D S 1を提供する。本発明は、組換えDNA技術によって作製され、インビボまたはインビトロで発現されたh C D S 1タンパク質を含む。したがって、本発明は形質転換した宿主細胞によって、小規模または大規模に産生されるh C D S 1タンパク質を含む。本発明は、真核生物または原核生物の細胞によって産生された、グリコシル化型または非グリコシル化型の全長h C D S 1タンパク質を含む。本発明は、哺乳動物、昆虫、植物、バクテリア、菌類、またはその他の適当な宿主細胞から発現されたh C D S 1タンパク質を提供する。本発明は、融合タンパク質産物として産生されるh C D S 1タンパク質、固体支持体に結合したもの、または、化学的マーカー、放射性マーカー、蛍光マーカー、化学発光性マーカー、またはその他の検出マーカーによって標識されたh C D S 1タンパク質を含む。また、本発明は、天然資源から単離し、天然に見られるよりも精製度の高いh C D S 1タンパク質を提供する。また、本発明は、h C D S 1タンパク質の薬学的処方剤および薬学的に許容される担体または賦形剤の中に入れたh C D S 1タンパク質の処方剤を提供する。

30

【0011】

配列番号：2のアミノ酸配列をもつタンパク質をコードする核酸配列を作製するための核酸の暗号は、当業者にとって予測可能であるため、本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列をコードする核酸配列およびこれらの核酸配列の配列番号：1について説明したような実施形態を含む。

40

【0012】

本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列またはその断片をもつタンパク質によって哺乳動物を免疫して作製された、h C D S 1タンパク質に特異的に結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を含む。

【0013】

また、本発明は、配列番号：2の配列中のアミノ酸置換で、同等であると合理的に予想できる置換をもつ同等のタンパク質、およびその実施形態で配列番号：2について説明したようなものも含む。例えば、非極性（疎水性側鎖）アミノ酸のアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン；非荷電性極性アミノ酸のグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン

50

、グルタミン；荷電性極性アミノ酸のアスパラギン酸、グルタミン酸；塩基性アミノ酸のリジン、アルギニン、およびヒスチジンが、置換されたときに機能的に予測可能な効果をもつものと当業者に理解されている。したがって、本発明は、このような同等のタンパク質をコードする同等の核酸、およびその実施形態で配列番号：1について説明したような実施形態も含む。

【0014】

また、本発明は、組換えDNA技術と、hCDS1タンパク質、融合タンパク質、またはその断片をコードする適当な核酸を用いて、hCDS1タンパク質を生成する方法も提供する。本発明は、適当な核酸配列を適当な発現ベクターの中に、誘導的または定常的に発現させるためのプロモーター、エンハンサーなどの適当な調節因子とともに組み込むことを提供する。本発明は、少なくとも1つの付加的な選抜マーカーまたは発現可能なタンパク質をもつ発現ベクター、またはそれをもたない発現ベクターを使用することを提供する。本発明は、適当に構築された発現ベクターを適当な宿主細胞に形質転換するか導入して、そのような細胞によってタンパク質を発現させる方法を提供する。したがって、本発明はまた、形質転換された宿主細胞でhCDS1タンパク質、融合タンパク質、またはその断片を産生することのできる細胞も提供する。

10

【0015】

DNA損傷チェックポイントにおいて、hCDS1はCdc25と協調して働くという発見によって、DNA損傷チェックポイントの異常な機能を含む病気を治療するための方法において、本発明の化合物の使用が可能になる。本発明はさらに、ガンを治療するための治療薬として本発明の化合物を使用することを提供する。特に本発明は、細胞中でhCDS1-Cdc25DNA損傷チェックポイントを特異的に改変することを可能にする。

20

【0016】

また、本発明は、hCDS1による真核細胞のチェックポイント機能に影響を与える試験化合物の有効性をスクリーニングするための方法で、試験化合物を真核細胞に接触させること、およびhCDS1の発現または機能の変化を検出することを含む方法も含む。したがって、本発明はさらに、hCDS1の発現または機能の変化検出を、hCDS1 mRNA産生のアッセイまたはhCDS1タンパク質発現のアッセイにより行うことを特徴とするスクリーニング法を含む。特に本発明は、Cdc25リン酸化またはキナーゼ活性の変化をスクリーニングして、DNA損傷チェックポイントを修飾する効果をもつ候補物質をスクリーニングすることを可能にする。本発明のアッセイ法によって同定される化合物または物質、またはそのような化合物または物質に相当する化合物は、治療薬を製造するために用いることができる。

30

【0017】

このように、一つの実施形態において、本発明はhCDS1タンパク質、hCDS1核酸、hCDS1アンチセンス核酸を含む薬学的組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、本発明のアッセイ法によって治療薬として使用するのに適すると同定された化合物または物質を薬学的処方剤として提供する。これらの薬学的組成物はさらに、ガンを治療するときに用いるための化学療法剤または別の抗ガン剤の投与をともなう療法で投与される化学療法剤を含むことができる。本発明はしたがって、一つの実施形態において、hCDS1由来の薬剤を他の化学療法剤とは独立に、または一緒に組み合わせて使用する組み合わせ化学療法のための方法を含み、第2の実施形態においては、一回投与のための他の抗ガン治療剤との混合物を含む。

40

【0018】

本発明の一つの局面において、図2（配列番号：2）に示されたアミノ酸配列をもつhCDS1タンパク質をコードする核酸、または該タンパク質の機能的に同等な断片またはこれらの生物学的前駆体をコードする核酸が提供されている。好ましくは、核酸はゲノムDNA分子などのDNA分子であり、より好ましくはcDNA分子であるが、RNAでもよい。

【0019】

50

好ましい実施形態において、h C D S 1 タンパク質をコードする核酸は、図 1 に示された核酸配列（配列番号：1）の 66 番目から 1694 番目に示されている核酸配列、その相補配列またはそれらのいずれかに高い厳密度条件下でハイブリッド形成することのできる核酸配列を含む。

【0020】

ここで特定された核酸配列は、低い緊縮条件下においても、ファミリーのメンバーに由来する核酸配列とハイブリダイズでき、それらからの相同遺伝子であるかあるいは別種に由来する核酸配列であるかを確認することができる。

【0021】

当業者に公知のように、遺伝子暗号の縮重によって、本発明に記載された核酸配列は、その中に置換があるが、なお同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。

10

【0022】

有利には、本発明に記載された核酸は発現ベクターに組み込まれ、次いで適当な宿主細胞を形質転換トランスフェクションまたは感染させるために用いることができる。このような発現ベクターの中で、本発明による核酸は適当なプロモーターなどの調節配列に機能的に連結して、適当な宿主細胞内で本発明に記載されたタンパク質が確実に発現するようにする。発現ベクターは、有利にはプラスミド、コスミド、ウイルス、またはその他の適当なベクターである。この発現ベクターおよびこのベクターによって形質転換または感染を受けた宿主細胞も本発明の一部を構成する。好ましくは、宿主細胞は真核細胞または細菌細胞であるが、より好ましくは哺乳動物細胞または昆虫細胞である。哺乳動物の宿主細胞は、本発明に記載された発現タンパク質に最適な生物学的活性を付与し、単離して診断キットなどに都合よく使用することのできるグリコシル化などの必要な翻訳後修飾を該タンパク質に行なうことができるため、とりわけ有利である。

20

【0023】

本発明に記載された該核酸を含む発現ベクターはインビボで、例えば遺伝子治療などで適宜用いることができる。

【0024】

本発明のさらなる局面では、h C D S 1 タンパク質で、図 2（配列番号：2）に示されたアミノ酸配列またはそれと機能的に同等なもの、または生物学的前駆体、またはその断片を含むタンパク質を発現することのできる導入遺伝子を含む遺伝子導入細胞、組織または生物が提供される。本明細書で使用されている「発現することのできる導入遺伝子」という語は、h C D S 1 またはこれと同一の機能、および／または活性をもつタンパク質の発現をもたらす適当な核酸配列を意味する。導入遺伝子には、例えば、ゲノムに組み込まれたまたは染色体外にある DNA を含んだ、ヒト細胞から単離されたゲノム核酸または合成核酸を含む。好ましくは、導入遺伝子は、本明細書で説明されているような本発明に記載のタンパク質をコードする核酸または該核酸の機能的な断片を含む。該核酸の機能的な断片とは、本発明に記載のタンパク質、または該タンパク質の機能的同等物、派生物、もしくは優性の負の突然変異体などの非機能的派生物、または生物学的前駆体をコードする該核酸を含む遺伝子断片を意味するものである。例えば、該核酸によってコードされるタンパク質の配列を変えることなく、または本発明に記載の機能的なタンパク質をコードするように日常的な技術を用いて、塩基置換または欠失を行なうことができることは、当業者が容易に想到できよう。

30

40

【0025】

該遺伝子導入細胞、組織または生物によって発現される h C D S 1 タンパク質、または該タンパク質の機能的同等物、または生物学的前駆体も、本発明の一部を構成するものである。

【0026】

さらに本発明によって提供されているのは、本発明に記載の核酸とハイブリッド形成することのできるアンチセンス分子である。本発明に記載のアンチセンス分子は、適宜治療薬として、またはガンおよびその他の増殖性疾患の治療用の治療薬の調製に用いることがで

50

きる。

【 0 0 2 7 】

また本発明は、少なくとも約 15ヌクレオチドからなる、好ましくは15から50ヌクレオチドからなる、本発明に記載の核酸の核酸配列を適宜提供する。これらの配列は、複製などを開始させるためのプローブまたはプライマーとして適宜用いることができる。このような核酸配列は、組換え法または合成法など、当技術分野において公知の技術によって作製することができる。これらは、本発明に記載の核酸が存在することを検出するための診断用キットなどで使用することもできる。これらの検査は、一般的に、ハイブリッド形成する条件下でプローブとサンプルとを接触させること、および、プローブとサンプル中の核酸との間に形成された二本鎖または三本鎖を検出することを含む。

10

【 0 0 2 8 】

本発明に記載の核酸配列は、有利には、例えば、クローニングしたい遺伝子の領域に対する約15から50ヌクレオチドからなる一組のプライマーを作り、このプライマーをヒト細胞由来のmRNA、cDNA、またはゲノムDNAと接触させ、所望の領域（必要であれば最初に逆転写ステップを行うこと）の増幅を生じるような条件下でポリメラーゼ連鎖反応を行ない、増幅された領域または断片を単離し、増幅されたDNAを回収するということを一般的に含むPCRクローニングのメカニズムなどの組換え法または合成法などを用いて作製することができる。一般的には、ここで定義されているような技術は、Sambrookら、(分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: a Laboratory Manual)、1989)に記載されているように、当技術分野において公知である。例えば、別個の集団に由来する個体範囲からのゲノムDNAライブラリーのプローブ検索または他の遺伝子型決定技術を用いて、本発明に記載の核酸のヒト対立遺伝子変異体を得ることができる。さらに、本発明に記載の核酸およびプローブを用い、当技術分野において公知の技術、例えばサンガーのジデオキシチェンターミネーション法を用いて、患者からのゲノムDNAの配列を決定して、有利にはある種の増殖性疾患に対する患者の素因を確認することができる。

20

【 0 0 2 9 】

さらに、本発明によって提供されているのは、図2(配列番号：2)に示されたアミノ酸配列をもつ単離タンパク質、または該タンパク質と機能的に同等な機能的断片、または生物学的前駆体のアミノ酸配列をもつ単離タンパク質、また、これらのタンパク質またはそれらの断片に結合することのできるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。当業者には公知であろうが、本発明は保存的置換、欠失、または挿入により図2に開示されたアミノ酸とは異なるアミノ酸を含むタンパク質を含むが、そのような置換、欠失、または挿入は、本発明に記載のタンパク質の活性やヒト細胞周期チェックポイント経路における相互作用能力に影響を与えることはない。

30

【 0 0 3 0 】

好ましい断片は、本発明に記載のタンパク質のエピトープを含む断片である。エピトープは、例えば、Geyserら、Mol. Immunol., 23:709-715(1986)に記載されているペプチド走査技術などを用いて決定することができる。

【 0 0 3 1 】

本発明に記載の抗体は、当技術分野において既知の技術によって作製することができる。モノクローナル抗体は、Kohler FとMilstein C(1985), Nature 256:495-497に記載されている通常のハイブリドーマ技術を用いて調製することができる。ポリクローナル抗体も当業者に公知の従来の技術を用いて調製することができるが、これはマウスなどの宿主動物に本発明に記載のタンパク質またはエピトープを接種して、免疫された血液を回収することを含む。本発明は、また、結合活性を維持している抗体全体の断片、例えば、Fv、F(ab')、およびF(ab')₂断片ならびに一本鎖抗体も含む。

40

【 0 0 3 2 】

本発明に記載の核酸および/またはタンパク質は、適宜、薬学的に許容される担体、希釈

50

剤、または賦形剤とともに薬学的組成物に入れることができる。本発明に記載の核酸を含む薬学的組成物は、例えば、遺伝子治療に用いることができる。本発明に記載のこのような核酸は、剥き出しのまま、または、タンパク質製カプセル、脂質カプセル、リポソーム、膜を基質とするカプセル、ウイルスタンパク質、ウイルスそのもの、細胞ベクター、細菌細胞宿主、改変された哺乳細胞宿主、またはその他の投与に適した方法でパッケージして投与することができる。

【0033】

本発明によってさらに提供されているのは、生物サンプルにおいて本発明に記載の核酸の有無を検出するための方法であって、a) 該サンプルをハイブリッド形成する条件下で本発明に記載の核酸またはプローブを含むプローブと接触させること、およびb) 例えば、
10 該プローブと該サンプル中に存在する核酸との間に形成される二本鎖または三本鎖を検出することによってハイブリッド形成を検出することを含む方法である。本発明に記載のタンパク質も、a) 該サンプルを抗体と接触させて、抗原-抗体複合体が形成される条件下で本発明に記載のタンパク質のエピトープに結合させること、およびb) 抗原-抗体複合体の存在を観察することによって検出することができる。

【0034】

該核酸およびタンパク質を検出するためのキットも、本発明によって提供される。生物サンプルにおいて本発明に記載の核酸を検出するためのキットは、(a) サンプルを本発明に記載の核酸またはプローブを含むプローブと接触させる手段、および、該プローブとサンプル中に存在する核酸との間に形成される二本鎖または三本鎖の形成を検出するための
20 方法とを含むであろう。

【0035】

同様に、生物サンプル中に本発明に記載のタンパク質が存在することを検出するためのキットは、(a) 抗原-抗体複合体が形成される条件下で該サンプルと本発明に記載のタンパク質のエピトープに結合する抗体とを接触させる手段、および該サンプルを観察して、抗原-抗体複合体の存在を調べる手段を含むであろう。

【0036】

本発明のさらなる局面は、ある化合物がヒト細胞周期チェックポイント経路タンパク質のいずれかのインヒビターであるかアクチベーターであるかを決定する方法であって、該経路でタンパク質を発現している細胞を該化合物と接触させること、および該細胞のいずれ
30 かのチェックポイント経路タンパク質の発現レベルを該化合物と接触させていない細胞と比較することを含む方法を提供する。そして、同定された化合物は、有利には、ガンまたは増殖性疾患を治療するための治療薬として、または治療薬の調製に用いることができる。あるいは、この化合物を薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤とともに薬学的組成物に含ませることができる。細胞チェックポイント経路のインヒビターと同定された化合物は、有利にはDNA損傷化学療法剤などの細胞毒性因子、および薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤とともに本発明に記載の薬学的組成物に含ませることができる。したがって、ヒト細胞周期チェックポイントインヒビターは、例えば、抗ガン療法に用いられる細胞毒剤の化学治療的效果を増強することができる。

【0037】

抗ガン治療のための候補物質をスクリーニングするための方法で、a) キナーゼが基質に対して作用するような条件下で、キナーゼ活性を示す本発明に記載のタンパク質を該タンパク質に対する基質とともに提供すること、b) タンパク質と基質を候補物質に接触させること、c) タンパク質のキナーゼ活性の増加および減少の程度を測定すること、及びd) 活性の増加または減少をもたらす候補物質を選択することを含む方法が、本発明によ
40 て提供されている。このような候補物質も、ガンまたは増殖性細胞疾患を治療するための治療薬として、または、治療薬の調製に用いることができる。

【0038】

また、本発明は、細胞のチェックポイント経路で活性をもつ他のタンパク質を同定する方法において、a) 適当な結合条件下で細胞抽出物を抗体と本発明に記載のタンパク質のエ
50

ピトーブに対する抗体とを接触させること、b) 抗原 - 抗体複合体を同定すること、および、c) 複合体を解析して、または本発明に記載のタンパク質以外の抗体またはタンパク質に結合したタンパク質を同定することを含む方法を含む。

【0039】

細胞のチェックポイント経路に關与するタンパク質を同定するための別の方法は、Chienら、前掲(1991)によって酵母で開発された2ハイブリッドシステムを利用する方法である。この技術は、レポーター遺伝子を活性化させる転写因子をインビボで機能的に再構成させることに基づく技術である。より特定すると、この技術は、DNA結合部位と活性化部位をもつ転写因子によって制御されているプロモーターの調節下にあるレポーター遺伝子を含むDNA構築物を有する適当な宿主細胞を提出すること、宿主細胞の中で、本発明に記載の核酸配列の断片または全配列と転写因子の該DNA結合部位または活性化部位のいずれかとの第1の融合配列をコードするハイブリッドDNA配列を発現させること、宿主細胞の中で、調べたい推定結合タンパク質と転写因子のDNA結合部位または活性化部位であって第一の融合配列に組み込まれなかった部位とをコードする、(少なくとも一つの)第二のハイブリッドDNA配列を発現させ；調べようとするタンパク質が本発明に記載のタンパク質と結合することを、宿主細胞におけるレポーター遺伝子産物を検出することによって検出し；任意には、結合タンパク質をコードする第二のハイブリッドDNA配列を単離することを含む。本発明のこの局面における一つの実施形態において、この方法は、

(a) 一つのベクターが、本発明に記載のタンパク質をコードする核酸配列に機能的に結合したGAL4タンパク質のDNA結合部位をコードするヌクレオチド分節を含み、第2のベクターが、調べようとするタンパク質をコードする核酸配列に機能的に結合したGAL4のタンパク質結合部位をコードする核酸配列を含む、少なくとも2種類のヌクレオチドベクターを構築すること、

(b) 該ベクターを、ガラクトースを代謝するタンパク質をコードする遺伝子の転写に欠損をもつ酵母細胞に同時形質転換することを含む、これにより該試験タンパク質と本発明記細のタンパク質との間の相互作用がガラクトース代謝遺伝子の転写をもたらす。

【0040】

本発明は、実施例としてのみ示される以下の実施例から、添付の図面を参照して、より明確に理解することができよう。

【0041】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

本発明は、新規のヒトチェックポイントキナーゼ遺伝子とhCDS1と呼ばれるタンパク質を単離し、特徴を調べることを含む。hCDS1遺伝子とタンパク質は、分裂酵母に存在する相同遺伝子とタンパク質に類似性を示す。

【0042】

分裂酵母のcds1⁺遺伝子は、それがDNAポリメラーゼ 変異体に相補できることから同定された(MurakamiとOkayama, 1995, Nature, 374: 817-819)。分裂酵母cds1は、分裂酵母のrad1、rad3、およびrad9変異菌株のヒドロキシウレア感受性(DNA複製依存型チェックポイント)を抑制することもできたが、UV感受性(DNA損傷依存型チェックポイント)を抑制することはできなかった。これは、分裂酵母cds1が、DNA合成の間にそのチェックポイント機能を発揮することを示すものである。

【0043】

分裂酵母cds1は、出芽酵母のチェックポイント遺伝子RAD53に70%相同なプロテインキナーゼと推定されている。出芽酵母では、DNA損傷型およびDNA複製型のチェックポイントは、DNA損傷を検出するレベルで遺伝子的に分かれる。そして、2つの経路は、シグナル伝達経路において増幅因子として作用する可能性をもつRad53プロテインキナーゼに収束する。これは、分裂酵母には当てはまらず、そこでは同じタンパク質がすべての型の損傷の検出に關与するが、シグナル伝達は、異なったプロテインキナー

ゼが関与する、DNA複製型チェックポイントでは分裂酵母 *c d s 1*、およびDNA損傷型経路では *C h k / R a d 2 7* といった異なった経路をたどる。*c d s 1* キナーゼのS期特異的活性化が、分裂酵母におけるチェックポイント応答の副次的経路が決定することが示唆されている (Lindsayら、1998, *Genes and Development*, 12: 382 - 395)。

【0044】

分裂酵母 *c d s 1* は、DNAポリメラーゼ と相互作用を介してDNA複製の進行または複製複合体の完全性を監視する可能性がある。DNAポリメラーゼ と結合する適当な分子量のキナーゼについては、ショウジョウバエでその証拠が見られる (Pecckら、1993, *B . B . R . C .*, 190: 325 - 331)。あるいは、G1/S期サイクリン依存型キナーゼの活性に最終的な影響を与える *C h k 1* と同じような方法で、*p 1 0 7 w e e l* のリン酸化を通して作用するのかもしれない。

【0045】

以下の実施例に記載した基礎的な分子生物学の実験を行うための方法と材料の多くは、当技術分野において既知のものであり、Sambrookら、分子クローニング (*M o l e c u l a r C l o n i n g*)、第2版、コールドスプリングハーバー研究所出版 (*C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s*) (1989) ; Bergerら、分子クローニング技術への手引き (*G u i d e t o M o l e c u l a r C l o n i n g T e c h n i q u e s*), *M e h t o d s i n E n z y m o l o g y*, Vol. 152, アカデミックプレス社 (*A c a d e m i c P r e s s I n c .*)、(1987) ; Davisら、分子生物学の基礎的方法 (*B a s i c M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y*)、エスルヴィア・サイエンスパブリッシング (*E l s e v i e r S c i e n c e P u b l i s h i n g C o . , I n c .*) (1986) ; Ausubelら、分子生物学の簡易プロトコール (*S h o r t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y*)、第2版、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社 (*J o h n W i l e y & S o n s*)、(1992) ; Goeddel、遺伝子発現技術 (*G e n e E x p r e s s i o n T e c h n o l o g y*)、*M e h t o d s i n E n z y m o l o g y*, Vol. 185, アカデミックプレス社 (*A c a d e m i c P r e s s , I n c .*) (1991) ; Guthrieら、酵母の遺伝学および分子生物学への手引き (*G u i d e t o Y e a s t G n e n e t i c s a n d M o l e c u l a r B i o l o g y*)、*M e h t o d s i n E n z y m o l o g y*, Vol. 194, アカデミックプレス社 (*A c a d e m i c P r e s s , I n c .*) (1991) ; McPhersonら、PCR第1巻 (*P C R V o l u m e 1*)、オクスフォード大学出版 (*O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s*)、(1991) などの参考文献で読むことができる。

【0046】

本発明は、いくつかの局面において以下の実施例を概観することによって、より容易に理解することができる。

【0047】

実施例1. *h C D S 1* の単離

TBLASTNプログラムを用いて、分裂酵母 *c d s 1 +* に類似した配列を検索することから、*h C D S 1* の単離を開始した。商標登録されたLifeSeqデータベース (米国カリフォルニア州パロアルト (*P a l o A l t o , C A*) のインサイト・ファーマシューティカルズ社 (*I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s I n c .*)) の中からヒトの発現配列 (EST番号: 864164) を同定した。1.3 kbの挿入配列を解析したところ、分裂酵母の *c d s 1* に類似した不完全なオープンリーディングフレームが明らかになった。マラソン既製 (*M a r a t h o n R e a d y*) ヒト胎盤cDNA (クローンテック社 (*C l o n t e c h*)) を用い、製造業者の指示にしたがって5' RACE (*c D N A* 末端の迅速増幅) を行なって、約650ヌクレオチドの新規の5'側DN

10

20

30

40

50

A配列が得られた。

【0048】

概要を説明すると、ネステッドPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）反応に使用したhCDS1遺伝子に特異的な2種類のプライマーは、GSP3 5' - TTTTGTGATGATCTTTTATGGCTAC - 3'（配列番号：3）、およびGSP4 5' - CACAGGCACCACTTCCAAGAGTTT - 3'（配列番号：4）であった。その後、下記のPCRプライマーを用いてヒトSK-N-MC神経芽細胞cDNAライブラリーからhCDS1の完全なORFを増幅した。

5' - GGGCTCGAGAGCAGCGATGTCTCGGGAGTCGGATGT - 3'（配列番号：5）

10

および

5' - GGC GGATCCTCGAGTCAACAACAGCAGCACACAC - 3'（配列番号：6）。そして、この増幅産物をpCR2.1ベクター（インビトロジェン社（Invitrogen））にクローニングして、DNA配列を決定した。

【0049】

hCDS1の核酸配列は、分裂酵母c ds1*にDNAレベルで47.8%の同一性を示すことが分かった。hCDS1の開始コドンと思われるところから5'側に120塩基の中に3つの読み取り枠全部に終止コドンが存在したが、このことは完全長のコーディング領域が単離されたことを示している。配列の一部が、NCBIのデータベース中の部分配列であるEST AA285249、ゲノム配列H55451、および54塩基の断片H55698と一致することも分かった。

20

【0050】

hCDS1の核酸配列をコードする同定されたヒト遺伝子とベクターは、プラスミドHCD S1 ORF / pCR - Bluntとして寄託番号LMBP 3708の下に、プラスミドHCD S1 5' RACE断片 / pGEM - Easyは寄託番号LMBP 3710として、また、プラスミドHCD S1 3'断片Incyteクローン864164 / pSPORTは寄託番号LMBP 3709として、1997年4月28日のブダペスト条約の規定にしたがって、ベルギー国アントワープ（Gent）B-9000の分子生物学用プラスミド受託研究所（Laboratorium Voor Moleculaire Biologies - Plasmidencollectie）（LMBP）35にあるベルギー微生物共同受託機関（Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms）（BCCM）に寄託されている。

30

【0051】

hCDS1の組織発現分布を、hCDS1 ORFをプローブとして、複数組織ノザンブロット（クローンテック社）と、ガン細胞系ノザンブロット（クローンテック社）で調べた。約2.1kbの単一の転写産物が見られた。通常のノザンブロットハイブリダイゼーション条件によっては、調査した正常なヒト組織のすべてで発現を検出することはできなかった。しかし、調査したガン細胞のすべてで発現が大きく上昇していることが分かった。

。

【0052】

全長ORFをFISH（蛍光インサイチュハイブリダイゼーション）解析用のプローブとして用いて決定したところ、hCDS1遺伝子は染色体の22q11.2 - q12に位置していた。ハイブリダイゼーションの効率は約62%で、用いた条件下ではこの他の遺伝子座は検出されなかった。

40

【0053】

概要を説明すると、ヒト血液から単離されたリンパ球を、10%ウシ胎児血清とフィトヘマグルチニン（PHA）を添加した最小必須培地（MEM）の中で、37℃で68 - 72時間培養した。細胞集団を同調させるために、リンパ球培養液をBrdU（0.18 mg / ml, シグマ社）で処理した。同調した細胞を、無血清培地で3回洗浄してブロックを外し、チミジン（2.5 μg / ml, シグマ社）入りの - MEMで37℃ 6時

50

間再培養した。細胞を回収して、低張処理、固定、および風乾などの標準的な手順を用いて、スライドを調製した。hCDS1の全長ORFを含むDNA断片をゲル精製し、BRL BioNICK標識キットを用いて(15で1時間)、dATPでビオチン化した(Hengら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:9509-9513)。

【0054】

そして、スライドを55で1時間乾燥させ、RNase処理後、スライドを2×SSC中70%ホルムアミドで2分間70で変性させた後、エタノールで脱水した。プローブは、50%ホルムアミドおよび10%デキストラン硫酸からなるハイブリダイゼーション混合液中で、75で5分間変性させた。プローブを変性させた染色体スライドに載せた。一晩ハイブリダイゼーションを行なった後、スライドを洗浄してから検出を行なった。FISHシグナルとDAPIバンドパターンを、写真に撮って別々に記録した。染色体バンドによるFISHマッピングデータの特特定を、FISHシグナルをDAPIでバンド化した染色体と重ね合わせることによって行なった(HengとTsui, 1994, Methods in Mol. Biol., 33:35-49)。

【0055】

実施例2. hCDS1タンパク質の特徴づけ

hCDS1 cDNAの核酸配列から、分子量約61kDaの543アミノ酸の翻訳産物が推定された。これは、ヒラ(HeLa)細胞の内生Cds1タンパク質の見かけ上の分子量に近い。推定されたhCDS1タンパク質は、分裂酵母のcds1タンパク質と28%、出芽酵母のRAD53と28%、DUN1キナーゼと27%それぞれ一致している。これらの見かけ上の相同遺伝子の配列アラインメントは、キナーゼ部位以外のところにフォークヘッド関連保存部位(Fork Head Associated domain)(Hoffmanら、1995, Trends. Biochem. Sci., 20:347-9)など、いくつかの配列類似領域があることを示している。ヒトのタンパク質は、RAD53に見られる長いC末端配列をもたないという点で、分裂酵母のCDS1および出芽酵母のDUN1と全体的な構造が同一であることを示している。hCDS1によるノザンプロット解析によって、検査した精巣と8個のヒトのガンのサンプルから約2.2kbの単一の転写産物を同定した。

【0056】

概要を説明すると、2つの複数組織ノザンプロット(クローンテック社(Clontech))とガン細胞系ノザンプロット(クローンテック社(Clontech))が、hCDS1のcDNAプローブとハイブリッド形成した。このプローブは、上記の全長ORFと一致する。プロットを高厳密度条件(0.1×SSC, 0.1%SDS, 50, 2×20分)で洗浄して、コダック(Kodak)X-OMATオートラジオグラフィフィルムを増感スクリーンとともに-70で用いて感光させた。

【0057】

実施例3. Cdc25の全活性アッセイ法

DNA損傷の下でCdc2の脱リン酸化が下方制御されるという可能性を調べるためには、Cdc25の全活性の解析を可能にするアッセイ法が必要であった。EDTA存在下では、非同調HeLa細胞抽出物から採取したCdc2/サイクリンBは、そのままでは不活性化することが分かった。

【0058】

簡単に言うと、細胞を氷冷した溶解バッファー(2mMの塩化マグネシウム、1mMのフェニルメチルスルフォニルフルオリド、および5μg/mlのロイペプチン、ペプスタチン、およびアプロチニンを含む、50mM Tris pH7.4)に溶解させた。10, 000×gで10分間遠心分離して溶解液を清澄にし、ローリー法を用いて上清のタンパク質濃度を測定した。10mMのEDTAを上清に加え(60μL中100μg)、30でインキュベートして反応を開始させた。抗サイクリンB免疫沈殿中に存在するヒストンH1キナーゼ活性を測定して、Cdc2/サイクリンBの活性を測定時間毎に測定し

た (Blasina ら、前掲)。免疫ブロットのために、抗サイクリン B 抗体を用いて 400 μ g の細胞溶解液を免疫沈殿させ、11% アクリルアミド - SDS ゲルで分析した。Cdc2 に対する PSTAIR E モチーフに対するモノクローナル抗体を用いて、Cdc2 の異なったリン酸型を検出した。

【0059】

活性化は、SDS - PAGE ゲル上の移動度の遅い分子種として見えるリン酸化により阻害された Cdc2 の消失と比例する。活性化は、Cdc25 やその他のチロシンホスファターゼのインヒビターであるバナジウム酸によって阻害された。さらに、Cdc25 特異的な抗血清によって免疫涸渇させると、Cdc2 / サイクリン B の活性化は大きく減少した。Cdc2 およびサイクリン B のレベルは上昇せず、WEE1 および Myt1 によるリン酸化は、10 mM EDTA を加えることによって阻害された。このような結果は、Cdc2 の活性化は脱リン酸化によって起こることを示している。非同調 HeLa 細胞の細胞溶解液において、内生 Cdc25 のホスファターゼ活性は、利用可能な Cdc2 / サイクリン B の 80% 以上を 30 分間でリン酸化して活性化するのに十分である。回収する 1 時間前に 10 Gy の線照射して DNA 損傷を与えた HeLa 細胞の細胞溶解液を解析したところ、Cdc2 の活性化の割合は有意に低下し、30 分間のインキュベーションでは利用可能な Cdc2 / サイクリン B の 25% までしか活性化されなかった。複合体になっている Cdc2 / サイクリン B の量はさほど変化せず、また外来性 GST - Cdc25 を加えた対照用 Cdc2 / サイクリン B と同程度に活性化された。10 Gy の照射は、10 の経時点を調べたところ、Cdc2 の脱リン酸化の割合は 3 倍以上減少させた。上記で測定された Cdc25 の不活性化がヒト細胞における DNA 損傷チェックポイント反応の一部であるならば、DNA 損傷チェックポイントを乗り越えられるような実験条件を設定することによって、放射線照射によって誘導された Cdc25 の阻害を防止することができると思われる。

【0060】

実施例 4 . hCDS1 の DNA 損傷チェックポイント効果

さまざまな細胞における DNA 損傷反応には、構造的には PI - 3 キナーゼに似た、さまざまな関連キナーゼが必要なことが知られている。少なくともファミリーの 1 つである DNA プロテインキナーゼは、インビトロでウォルトマンニン感受性であることが示されている (Hawley ら、1996, Genes and Dev., 10:2383 - 8; Hartley ら、1995, Cell, 82:849 - 856)。このため、ウォルトマンニン感受性のキナーゼが放射線で誘導される M 期開始遅延の上流に作用する可能性を調べた (Price ら、1996, Cancer Research, 56:246 - 250)。HeLa 細胞は、ノコダゾール (nocodazole) によって M 期で停止させることができ、放射線照射はノコダゾール感受性 M 期阻害点よりも前の G2 期での遅延を生じさせる。したがって、ノコダゾール中で培養している細胞の有糸分裂指数を記録することによって、有糸分裂への進行が遅れているかどうかを判定することができる。ノコダゾール存在下で 14 時間培養した対照用細胞は 60% の有糸分裂細胞を含んでいたが、ウォルトマンニンはこの数にはほとんど影響を与えなかった。しかし、放射線照射によって、ノコダゾール阻害点にまで到達する細胞数は 10% にまで減少した。これに対して、ウォルトマンニン存在下での照射はわずかな影響しかもたらさなかった。これらの結果は、ウォルトマンニンが HeLa 細胞の DNA 損傷による G2 チェックポイントを克服できることを示している。

【0061】

次に、放射線誘導による Cdc25 の不活性化に対するウォルトマンニンの効果を調べた。放射線照射していない培養細胞から調製した抽出液中では、Cdc2 / サイクリン B の活性化に対するウォルトマンニンの効果はほとんどなかったが、放射線照射による Cdc25 活性低下を大きく減少させた。

【0062】

また、放射線照射による G2 チェックポイントは、遺伝性毛細血管拡張性運動失調症の患

10

20

30

40

50

者に由来する細胞系でも無効化されている。毛細血管拡張性運動失調変異細胞は、G1およびG2チェックポイントに欠損があり、DNAを損傷する薬剤のすべてにはないが、その多くに曝される(Canmanら、1994, Cancer Research, 54:5054-5058)。AT欠損細胞がG1遅延を生じることができなくなることは、p53の上方制御ができなくなることと相関があり(Kastanら、1992, Cell, 71:587-589)、cAb1をリン酸化して活性化できなくなることとも相関がある(Baskaranら、1997, Nature, 387:516-519; Shafmanら、1997, Nature, 387:520-523)。G2期を遅延できなくなることの分子的原理は解っていない。AT欠損細胞では、電離性線などの染色体切断を生じさせる因子に対する反応が非常に鈍いことが分かる。特筆すべきは、UV源を用いた照射によって生じる塩基損傷後では、AT欠損細胞はほぼ正常な反応を示すことである(Canmanら、1994, Cancer Research, 54:5054-5058; Painterら、1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:7315-7317; Zampetti-Bosselerら、1981, Int. J. Radiat. Biol., 39:547-558)。AT+またはAT-のSV40で形質転換したヒト線維芽細胞系のCdc25活性に対するUVと線照射の影響を調べた。AT-細胞は、UV照射に対して、Cdc2が脱リン酸化される比率を確実に低下させて反応する。これに対し、線照射はCdc2の脱リン酸化の割合にはほとんど影響を与えなかった。AT+細胞においては、イオン化照射後もしくはUV照射後のいずれかで、Cdc2の脱リン酸化比率は有意に低下した。これらのデータは、線照射後のCdc25の効率的な不活性化にはATM遺伝子産物が必要であることを示しており、またDNA損傷後のCdc25の不活性化とM期への進行遅延との間に相関関係があることを示している。

【0063】

ヒト細胞におけるCdc25のチェックポイントに依存した不活性化のメディエーターは、抗ガン治療を促進し、正常細胞への副作用を低下させる治療薬や治療法を作り上げるための優れた標的である。

【0064】

hCDS1の生化学的な特徴づけを容易に行うために、6his-hCDS1を昆虫細胞で発現させ、アフィニティー精製して、ATP再生系存在下でHeLa細胞抽出液の中でインキュベートした。EDTAを加えて抽出液中のキナーゼを阻害した。そして、Cdc2/サイクリンBの脱リン酸化および活性化の割合を観察した。

【0065】

概略を説明すると、Gibco/BRLのBac-to-Bac発現システムを用いて、6his-hCDS1、6his-Chk1、6his-Cdc2、およびGST-Cdc25Cをコードする組換えウイルスを作製した。Kumagaiら、(1995), Mol. Biol. Cell, 6:199-213に記載されている方法にしたがって、6his-融合タンパク質を精製した。GSH-セファロースビーズをSf9抽出液中で15分間インキュベートし、遠心してビーズを集め、溶解バッファー(50mM Tris pH8.0, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 0.1% NP49, 5%グリセロール、0.1% -メルカプトエタノールおよびプロテアーゼインヒビター)で3回洗浄した。リン酸化反応を行う前に、ビーズをキナーゼアッセイバッファー(50mM Tris pH7.4, 10mM MgCl₂)で3回洗浄するか、ホスファターゼ反応前にホスファターゼアッセイバッファー(50mMイミダゾール pH7.4, 5mM EDTA, および0.1% -メルカプトエタノール)で3回洗浄した。

【0066】

これらのアッセイにおいて、6his-Chk1と6his-hCDS1は、Cdc2/サイクリンBの活性化を有意に低下させることが分かった。Cdc2の活性低下は、用量依存的でATPを必要とした。Cdc2が6his-Chk1または6his-hCDS

10

20

30

40

50

1 によって非可逆的に阻害されるわけではないことは、キナーゼ処理後に G S T - C d c 2 5 を加えたときに活性化が生じることによって確認された。したがって、6 h i s - h C D S 1 も 6 h i s - C h k 1 も、抽出液で見られる放射線照射による C d c 2 5 の下方制御を模倣することができるのである。これらの実験は、遠心分離によって清澄化された H e L a 細胞溶解液を用いたものであるから、細胞以外の場所での変化が C d c 2 5 の不活性化をもたらした可能性はない (P e n g ら、1 9 9 7 , S c i e n c e , 2 7 7 : 1 5 0 1 - 1 5 0 5)

実施例 5 . h C D S 1 の C d c 2 5 に対する直接の効果

細胞溶解液アッセイ法では、h C D S 1 によって C d c 2 5 を阻害する間接的な機構があるかもしれないという可能性を排除することはできないため、アフィニティー精製した試薬を用いて、h C D S 1 による G S T - C d c 2 5 活性の直接のリン酸化と阻害を測定した。

【 0 0 6 7 】

- ^{3 2} P A T P 存在下、G S T - C d c 2 5 を 6 h i s - h C D S 1、偽ビーズ、または 6 h i s - C h k 1 とともに 1 5 分間 3 0 でインキュベートした。タンパク質を S D S - P A G E で分析して、ラジオオートグラフィーで画像化した。G S T - C d c 2 5 は 6 h i s - C h k 1、および 6 h i s - h C D S 1 によってリン酸化した。このリン酸化によって C d c 2 5 ホスファターゼ活性が影響を受けるか否かを判定するためにアッセイを行なった。

【 0 0 6 8 】

G S T - C d c 2 5 を測定して、C d c 2 / サイクリン B 免疫沈殿物のヒストン - H 1 キナーゼ活性を活性化できるかを調べた。6 h i s - h C D S 1 による G S T - C d c 2 5 のリン酸化は、C d c 2 / サイクリン B を活性化する G S T - C d c 2 5 の能力を阻害することが分かった。つまりこれらのデータは、6 h i s - h C D S 1 がインビトロで C d c 2 5 を不活性化し、またインビボでは D N A 損傷後に C d c 2 5 が不活性化されることを明らかにしている。

【 0 0 6 9 】

6 h i s - C h k 1 は、G S T - C d c 2 5 と結合して、インビトロでヒストン - H 1 キナーゼ活性をもつため (S a n c h e z ら、1 9 9 7 , S c i e n c e , 2 7 7 : 1 4 9 7 - 1 5 0 1)、C d c 2 / サイクリン B のキナーゼ活性の解析結果は不明瞭であった。G S T - C h k 1 の影響を調べるために、ゲル移動度解析によって移動度の遅い C d c 2 分子種が消えることから、C d c 2 の脱リン酸化を観察するアッセイ法を用いた。

【 0 0 7 0 】

概略を説明すると、6 h i s - C d c 2、6 h i s - W e e 1、6 h i s - M y t 1、および G S T - サイクリン B をコードする組換えバキュロウイルスを同時感染させた S f 9 細胞から、脱リン酸化された C d c 2 を精製した (P a r k e r ら、1 9 9 2 , S c i e n c e , 2 5 7 : 1 9 5 5 - 1 9 5 7)。サイクリン B と複合体を作る 6 h i s - C d c 2 を、溶解バッファーに 1 m M V O ₄ を加えた以外は G S T - C d c 2 5 に対する条件と同じ条件で G S H ビーズを用いて精製した。ウエスタンブロット解析によって、この四重感染が、一つまたは二つの阻害部位で大部分の C d c 2 / G S T - サイクリン B をリン酸化することが明らかになった。これらのホスファターゼアッセイは、1 0 m M E D T A が存在し A T P が存在しないという 6 h i s - C h k 1 が C d c 2 またはサイクリン B を直接リン酸化するという可能性を排除する条件下で行なわれた。G S T - C d c 2 5 は、遅い移動度のリン酸化された型 C d c 2 の還元を触媒する。6 h i s - C h k 1 によって予め G S T - C d c 2 5 をリン酸化することで G S T - C d c 2 5 の活性は用量依存的に低下する。これらのデータによって、C h k 1 が C d c 2 5 の活性を負に制御していることが確認される (F u r n a r i ら、1 9 9 7 , S c i e n c e , 2 7 7 : 1 4 9 5 - 1 4 9 7 ; W e i n e r t , 1 9 9 7 , S c i e n c e , 2 7 7 : 1 4 5 0)、これを敷衍すれば、この負の制御が、ホスファターゼ活性の不活性化を含むことが示されているといえる。

10

20

30

40

50

【0071】

実施例6. DNA損傷とhCDS1の修飾

以前のデータによって、6his-hCDS1がCdc25を不活性化することおよびDNA損傷がCdc25の不活性化と関係することが示されていたため、DNA損傷がhCDS1に何らかの修飾または活性化をもたらすかを判定するためにアッセイを行なった。HeLa細胞溶解液を用いた免疫複合体キナーゼアッセイ法において、6his-hCDS1に対して作製した抗血清を用いた。非同調HeLa細胞由来のサンプルで、hCDS1に対応する弱いシグナルが検出され、放射線照射後にhCDS1のリン酸化の上昇が見られた。

【0072】

概略を説明すると、Sf9細胞から精製した6his-hCDS1によってウサギを免疫して、hCDS1の抗体を作製した(Harlowら、抗体(Antibodies)(コールドスプリングハーバー研究所出版(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、ニューヨーク、1988)。この結果できた抗血清は、6his-hCDS1ウイルスを感染させたSf9細胞から得た予想分子量の活性キナーゼを免疫沈降させたが、非感染のSf9細胞または6his-hChk1ウイルスを感染させた他の細胞からは予想分子量をもつ活性キナーゼを免疫沈降させなかった。

【0073】

この結果は、4%SDSで変性させたタンパク質バンドを再沈殿させることによって、hCDS1によるものであることが確認された。インビトロでのリン酸化は自己リン酸化による可能性が最も高く、またシグナルの上昇は放射線照射後の活性の上昇を反映している。p64^{Cds1}のインビトロでのリン酸化上昇は、RAD53やDUN1と同じように、hCDS1がDNA損傷に反応して修飾されることを示唆している。

【0074】

さらにアッセイを行なって、p64^{Cds1}のリン酸化に対するDNA合成停止の効果を調べた。複製期で停止した細胞からのhCDS1は、非同調培養細胞から採取したタンパク質と同じような挙動をとり、DNA複製を阻害するチミジンその他の薬剤に応答したリン酸化の有意な上昇は見られなかった。p64^{Cds1}におけるリン酸化の上昇が、チミジンで停止させた細胞を放射線照射した後に検出された。主にS期以外で停止している細胞におけるDNA損傷の効果も調べた。放射線照射前に20時間、ノコダゾール存在下で細胞を培養した。再び、非照射サンプルについて弱い検出可能なシグナルが見られた。しかし、ノコダゾール停止細胞を放射線照射するとリン酸化の上昇が生じた。

【0075】

これらの発見は、酵母で見られた結果と驚くほど対照的である。酵母では、分裂酵母のCds1が不完全なDNA複製に応答して活性化されることが分かっている(Boddyら、1998, Science, 280:909-12; Lindsayら、1998, Genes and Dev., 12:382-95)。ここでの結果は、以前酵母で発見された複製チェックポイントではなく、DNA損傷チェックポイントにおけるヒトCds1の役割を示している。

【0076】

実施例7. 薬剤同定

上記のCdc25アッセイ法は、活性が阻害されまたは活性化されることで、hCDS1およびCdc25が調節するDNA損傷チェックポイントを修飾する化学薬剤を同定するときに使用するのに適している。すなわち、一般的なスクリーニングアッセイ法では、上記と同じ条件と試験すべき薬剤を加えて用いる。アッセイする成分の活性の観察、すなわち上記したようなリン酸化の検出は、促進活性および阻害活性を検出するために対照用反応と比較して行なうことができる。

【0077】

明らかに、このようなアッセイ法は、機械的/自動的な装置と検出に容易に応用することができる。公知アッセイ反応の基本的な要素とともに、このアッセイ法は、CCD検出装

10

20

30

40

50

置に連結させたセルバイオチップアレイまたは顕微鏡スライドアレイを組み込むことのできる自動高速大量低シグナル装置に使用することができ、また、リン酸化またはキナーゼ活性に対する他の反応によって生じる可視シグナルの使用に明らかに適している。

【0078】

実施例8． 治療上の使用

hCDS1の特徴づけと、酵母に見られるような複製依存型チェックポイントにおいてではなく、DNA損傷チェックポイントにおけるヒトCds1の役割を明らかにすることによって、この知見を薬剤の調製およびガンの化学療法の付加剤として作用させるための治療法に応用することができる。

【0079】

特に、cDNA、RNA、アンチセンス分子、hCDS1タンパク質、hCDS1タンパク質に対する抗体、またはその他の本発明のアッセイ法によって同定された治療薬に相当するものを取り込んだ本発明の薬学的処方剤を、化学療法剤の主要な働きを補助薬として作用させるために、適当な化学療法剤とともに投与することができる。例えば、代謝拮抗剤、抗生物質、アルキル化剤、微小管阻害剤、ステロイドホルモン、その他の拮抗剤などの抗ガン剤の使用は、一般的に細胞複製に必須の代謝部位に向けられる。理想的には、これらの薬剤は悪性細胞に特異的な細胞プロセスにだけ介入するべきであるが、現在使用可能な抗ガン剤は、正常細胞であれ、悪性細胞であれ、すべての増殖細胞に作用する。このため、現行の化学療法は、毒性効果と治療効果の両方に関する急勾配の用量依存的な応答曲線によって阻害されている。したがって、本発明のhCDS1を素材とする薬剤および本発明のhCDS1アッセイによって同定された薬剤を、化学療法剤とともに同時投与すれば、悪性細胞の殺傷を促進することができよう。

【0080】

殺傷を促進するための機構の一つは、悪性細胞のDNA損傷チェックポイントコントロールを不能にし、それによってDNA損傷化学療法剤の投与をより効果的にすることによってもたらされる。DNA損傷チェックポイントコントロールを不能にすることは、上記のデータで示されているように、hCDS1応答を改変することによってもたらすことができる。

【0081】

このように、hCDS1を素材とする新規の薬剤を一つ以上の抗ガン剤と組み合わせて同時に投与することが、本発明の意図するところである。例えば、シタラビン(Fludarabine)、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、メソトレキセート、6-チオグアニン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン(Idarubicin)、プリカマイシン(Plinamicin)、カルムスチン、イオムスチン、シクロホスファミド、イフォスファミド(Ifosfamide)、メクロレタミン、ストレプトゾトシン、ナベルピン(Navelbine、登録商標)、パクリタキセル、ビンブラスチン、ピンクリスチン、アスパラギナーゼ、シスプラチン、カルボプラチン、エトポシド、インターフェロン、プロカルバジンなどの抗ガン剤をhCDS1を素材とする適当な用量の薬剤とともに投与して、a) 投与時間の長さを変える、b) 投与間隔時間を変え、c) 化学療法剤の悪性細胞に対する効果を変え、またはd) 正常細胞に対する化学療法剤の副作用を変え、hCDS1を素材とする薬剤を同時投与する効果は、他の効果に加えて、これらの効果の一つまたはその組み合わせたものとなりうる。

【0082】

一般的には、化学療法剤によるガン細胞の破壊は、一次動力学に従って、対数殺傷効果(log kill effect)をもたらす。したがって、hCDS1を素材とする薬剤の同時投与は、ログ殺傷効果を促進するように設計されるだろう。一般的には、化学療法のプロトコールには、代謝経路の異なった段階で作用する薬剤を組み合わせ、それによって、毒性レベル以下に保ったまま、殺傷作用を高めることが必要となる。したがって、hCDS1を素材とする薬剤の同時投与は、理想的には、そのようなプロトコールと組み

10

20

30

40

50

合わせてその効果を向上させる。

【 0 0 8 3 】

究極として、最も効果的な治療法は、化学療法剤および/またはMDR（多剤耐性）阻害剤の標的投与をhCDS1を素材とする薬剤と組み合わせて行ない、DNA損傷回復なしに細胞自身の非制御的複製を行わせ、そして最終的に細胞死をもたらすことによって悪性細胞を特異的に狙った除去を行なうことであろう。

【 0 0 8 4 】

上記の考察と実施例は本発明を具体的に説明するためのものであるから、制約的なものと解されるべきではない。さらに別の変形形態を本発明の精神と範囲に含むことが可能であって、それらは当業者によって容易に想起できよう。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 hCDS1の核酸配列（配列番号：1）を示したもので、66から1694番目の残基がコーディング配列であり、3'側および5'側非翻訳領域（UTRs）を含んでいる。開始コドンと終止コドンを太字で示す。

【図2】 hCDS1の推定アミノ酸配列（配列番号：2）を示している。

【図3】 CLUSTALWアラインメントプログラムを用いて行われたhCDS1と分裂酵母のcds1とのアミノ酸配列アラインメントと、GENEDOCプログラムを用いたアノテーションを示す。黒く影をつけた残基が、2つのタンパク質で同一の残基であり、灰色で影を付けた残基が類似の残基である。

【配列表】

20

SEQUENCE LISTING

<110> The Scripps Research Institute et al.
 <120> A Novel Human Checkpoint Kinase, hCDS1, Compositions
 and Methods
 <130> TSRI649.SPB
 <140>
 <141>
 <150> GB 9722320.0
 <151> 1997-10-22
 <160> 6
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 1858
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (66)..(1694)
 <400> 1
 actagtgtatt actcacaggg ctgcagcggc cgcccgggca ggtcaggtgg gctcacgcgg 60

 tcgtg atg tct cgg gag tcg gat gtt gag gct cag cag tct cat ggc agc 110
 Met Ser Arg Glu Ser Asp Val Glu Ala Gln Gln Ser His Gly Ser
 1 5 10 15
 agt gcc tgt tca cag ccc cat ggc agc gtt acc cag tcc caa ggc tcc 158
 Ser Ala Cys Ser Gln Pro His Gly Ser Val Thr Gln Ser Gln Gly Ser
 20 25 30
 tcc tca cag tcc cag ggc ata tcc agc tcc tct acc agc acg atg cca 206
 Ser Ser Gln Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ser Thr Met Pro
 35 40 45
 aac tcc agc cag tcc tct cac tcc agc tct ggg aca ctg agc tcc tta 254
 Asn Ser Ser Gln Ser Ser His Ser Ser Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu
 50 55 60
 gag aca gtg tcc act cag gaa ctc tat tct att cct gag gac caa gaa 302
 Glu Thr Val Ser Thr Gln Glu Leu Tyr Ser Ile Pro Glu Asp Gln Glu
 65 70 75
 cct gag gac caa gaa cct gag gag cct acc cct gcc ccc tgg gct cga 350
 Pro Glu Asp Gln Glu Pro Glu Glu Pro Thr Pro Ala Pro Trp Ala Arg
 80 85 90 95
 tta tgg gcc ctt cag gat gga ttt gcc aat ctt gaa tgt gtg aat gac 398
 Leu Trp Ala Leu Gln Asp Gly Phe Ala Asn Leu Glu Cys Val Asn Asp
 100 105 110
 aac tac tgg ttt ggg agg gac aaa agc tgt gaa tat tgc ttt gat gaa 446
 Asn Tyr Trp Phe Gly Arg Asp Lys Ser Cys Glu Tyr Cys Phe Asp Glu
 115 120 125
 cca ctg ctg aaa aga aca gat aaa tac cga aca tac agc aag aaa cac 494
 Pro Leu Leu Lys Arg Thr Asp Lys Tyr Arg Thr Tyr Ser Lys Lys His
 130 135 140
 ttt cgg att ttc agg gaa gtg ggt cct aaa aac tct tac att gca tac 542
 Phe Arg Ile Phe Arg Glu Val Gly Pro Lys Asn Ser Tyr Ile Ala Tyr
 145 150 155
 ata gaa gat cac agt ggc aat gga acc ttt gta aat aca gag ctt gta 590
 Ile Glu Asp His Ser Gly Asn Gly Thr Phe Val Asn Thr Glu Leu Val
 160 165 170 175
 ggg aaa gga aaa cgc cgt cct ttg aat aac aat tct gaa att gca ctg 638
 Gly Lys Gly Lys Arg Arg Pro Leu Asn Asn Asn Ser Glu Ile Ala Leu
 180 185 190
 tca cta agc aga aat aaa gtt ttt gtc ttt ttt gat ctg act gta gat 686
 Ser Leu Ser Arg Asn Lys Val Phe Val Phe Phe Asp Leu Thr Val Asp
 195 200 205
 gat cag tca gtt tat cct aag gca tta aga gat gaa tac atc atg tca 734
 Asp Gln Ser Val Tyr Pro Lys Ala Leu Arg Asp Glu Tyr Ile Met Ser
 210 215 220
 aaa act ctt gga agt ggt gcc tgt gga gag gta aag ctg gct ttc gag 782
 Lys Thr Leu Gly Ser Gly Ala Cys Gly Glu Val Lys Leu Ala Phe Glu
 225 230 235
 agg aaa aca tgt aag aaa gta gcc ata aag atc atc agc aaa agg aag 830
 Arg Lys Thr Cys Lys Lys Val Ala Ile Lys Ile Ile Ser Lys Arg Lys

10

20

30

240 ttt gct att ggt tca gca aga gag gca gac cca gct ctc aat gtt gaa 878
 Phe Ala Ile Gly Ser Ala Arg Glu Ala Asp Pro Ala Leu Asn Val Glu
 245 260 265 270
 aca gaa ata gaa att ttg aaa aag cta aat cat cct tgc atc atc aag 926
 Thr Glu Ile Gly Ile Leu Lys Lys Leu Asn His Pro Cys Ile Ile Lys
 275 280 285
 att aaa aac ttt ttt gat gca gaa gat tat tat att gtt ttg gaa ttg 974
 Ile Lys Asn Phe Phe Asp Ala Glu Asp Tyr Tyr Ile Val Leu Glu Leu
 290 295 300
 atg gaa ggg gga gag ctg ttt gac aaa gtg gtg ggg aat aaa cgc ctg 1022
 Met Glu Gly Gly Glu Leu Phe Asp Lys Val Val Gly Asn Lys Arg Leu
 305 310 315
 aaa gaa gct acc tgc aag ctc tat ttt tac cag atg ctc ttg gct gtg 1070
 Lys Glu Ala Thr Cys Lys Leu Tyr Phe Tyr Gln Met Leu Leu Ala Val
 320 325 330 335
 cag tac ctt cat gaa aac ggt att ata cac cgt gac tta aag cca gag 1118
 Gln Tyr Leu His Glu Asn Gly Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Glu
 340 345 350
 aat gtt tta ctg tca tct caa gaa gag gac tgt ctt ata aag att act 1166
 Asn Val Leu Leu Ser Ser Gln Glu Glu Asp Cys Leu Ile Lys Ile Thr
 355 360 365
 gat ttt ggg cac tcc aag att ttg gga gag acc tct ctc atg aga acc 1214
 Asp Phe Gly His Ser Lys Ile Leu Gly Glu Thr Ser Leu Met Arg Thr
 370 375 380
 tta tgt gga acc ccc acc tac ttg gcg cct gaa gtt ctt gtt tct gtt 1262
 Leu Cys Gly Thr Pro Thr Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Val Ser Val
 385 390 395
 ggg act gct ggg tat aac cgt gct gtg gac tgc tgg agt tta gga gtt 1310
 Gly Thr Ala Gly Tyr Asn Arg Ala Val Asp Cys Trp Ser Leu Gly Val
 400 405 410 415
 att ctt ttt atc tgc ctt agt ggg tat cca cct ttc tct gag cat agg 1358
 Ile Leu Phe Ile Cys Leu Ser Gly Tyr Pro Pro Phe Ser Glu His Arg
 420 425 430
 act caa gtg tca ctg aag gat cag atc acc agt gga aaa tac aac ttc 1406
 Thr Gln Val Ser Leu Lys Asp Gln Ile Thr Ser Gly Lys Tyr Asn Phe
 435 440 445
 att cct gaa gtc tgg gca gaa gtc tca gag aaa gct ctg gac ctt gtc 1454
 Ile Pro Glu Val Trp Ala Glu Val Ser Glu Lys Ala Leu Asp Leu Val
 450 455 460
 aag aag ttg ttg gta gtg gat cca aag gca cgt ttt acg aca gaa gaa 1502
 Lys Lys Leu Leu Val Val Asp Pro Lys Ala Arg Phe Thr Thr Glu Glu
 465 470 475
 gcc tta aga cac ccg tgg ctt cag gat gaa gac atg aag aga aag ttt 1550
 Ala Leu Arg His Pro Trp Leu Gln Asp Glu Asp Met Lys Arg Lys Phe
 480 485 490 495
 caa gat ctt ctg tct gag gaa aat gaa tcc aca gct cta ccc cag gtt 1598
 Gln Asp Leu Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Thr Ala Leu Pro Gln Val
 500 505 510
 cta gcc cag cct tct act agt cga aag cgg ccc cgt gaa ggg gaa gcc 1646
 Leu Ala Gln Pro Ser Thr Ser Arg Lys Arg Pro Arg Glu Gly Glu Ala
 515 520 525
 gag ggt gcc gag acc aca aag cgc cca gct gtg tgt gct gct gtg ttg 1694
 Glu Gly Ala Glu Thr Lys Arg Pro Ala Val Cys Ala Ala Val Leu
 530 535 540
 tgaactccgt gggttgaaca cgaagaaat gtaccttctt tcaactctgtc atctttcttt 1754
 tcttttgatc tggtttttta tagtttgat tttaattatg ggaataattg ctttttcaca 1814
 gtcactgatg tacaattaaa aacctgatgg aacctggaaa aaaa 1858
 <210> 2
 <211> 543
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Ser Arg Glu Ser Asp Val Glu Ala Gln Gln Ser His Gly Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Cys Ser Gln Pro His Gly Ser Val Thr Gln Ser Gln Gly Ser Ser
 20 25 30
 Ser Gln Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ser Thr Ser Thr Met Pro Asn
 35 40 45

10

20

30

```

Ser Ser Gln Ser Ser His Ser Ser Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Glu
 50      55
Thr Val Ser Thr Gln Glu Leu Tyr Ser Ile Pro Glu Asp Gln Glu Pro
 65      70      75      80
Glu Asp Gln Glu Pro Glu Glu Pro Thr Pro Ala Pro Trp Ala Arg Leu
      85      90      95
Trp Ala Leu Gln Asp Gly Phe Ala Asn Leu Glu Cys Val Asn Asp Asn
 100      105      110
Tyr Trp Phe Gly Arg Asp Lys Ser Cys Glu Tyr Cys Phe Asp Glu Pro
 115      120      125
Leu Leu Lys Arg Thr Asp Lys Tyr Arg Thr Tyr Ser Lys Lys His Phe
 130      135      140
Arg Ile Phe Arg Glu Val Gly Pro Lys Asn Ser Tyr Ile Ala Tyr Ile
 145      150      155      160
Glu Asp His Ser Gly Asn Gly Thr Phe Val Asn Thr Glu Leu Val Gly
      165      170      175
Lys Gly Lys Arg Arg Pro Leu Asn Asn Asn Ser Glu Ile Ala Leu Ser
 180      185      190
Leu Ser Arg Asn Lys Val Phe Val Phe Phe Asp Leu Thr Val Asp Asp
 195      200      205
Gln Ser Val Tyr Pro Lys Ala Leu Arg Asp Glu Tyr Ile Met Ser Lys
 210      215      220
Thr Leu Gly Ser Gly Ala Cys Gly Glu Val Lys Leu Ala Phe Glu Arg
 225      230      235      240
Lys Thr Cys Lys Lys Val Ala Ile Lys Ile Ile Ser Lys Arg Lys Phe
      245      250      255
Ala Ile Gly Ser Ala Arg Glu Ala Asp Pro Ala Leu Asn Val Glu Thr
 260      265      270
Glu Ile Glu Ile Leu Lys Lys Leu Asn His Pro Cys Ile Ile Lys Ile
 275      280      285
Lys Asn Phe Phe Asp Ala Glu Asp Tyr Tyr Ile Val Leu Glu Leu Met
 290      295      300
Glu Gly Gly Glu Leu Phe Asp Lys Val Val Gly Asn Lys Arg Leu Lys
 305      310      315      320
Glu Ala Thr Cys Lys Leu Tyr Phe Tyr Gln Met Leu Leu Ala Val Gln
      325      330      335
Tyr Leu His Glu Asn Gly Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn
 340      345      350
Val Leu Leu Ser Ser Gln Glu Glu Asp Cys Leu Ile Lys Ile Thr Asp
 355      360      365
Phe Gly His Ser Lys Ile Leu Gly Glu Thr Ser Leu Met Arg Thr Leu
 370      375      380
Cys Gly Thr Pro Thr Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Val Ser Val Gly
 385      390      395      400
Thr Ala Gly Tyr Asn Arg Ala Val Asp Cys Trp Ser Leu Gly Val Ile
      405      410      415
Leu Phe Ile Cys Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Ser Glu His Arg Thr
 420      425      430
Gln Val Ser Leu Lys Asp Gln Ile Thr Ser Gly Lys Tyr Asn Phe Ile
 435      440      445
Pro Glu Val Trp Ala Glu Val Ser Glu Lys Ala Leu Asp Leu Val Lys
 450      455      460
Lys Leu Leu Val Val Asp Pro Lys Ala Arg Phe Thr Thr Glu Glu Ala
 465      470      475      480
Leu Arg His Pro Trp Leu Gln Asp Glu Asp Met Lys Arg Lys Phe Gln
      485      490      495
Asp Leu Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Thr Ala Leu Pro Gln Val Leu
 500      505      510
Ala Gln Pro Ser Thr Ser Arg Lys Arg Pro Arg Glu Gly Glu Ala Glu
 515      520      525
Gly Ala Glu Thr Thr Lys Arg Pro Ala Val Cys Ala Ala Val Leu
 530      535      540
<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer GSP3
<400> 3

```

10

20

30

```

ttttgctgat gatctttatg gctac
<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer
GSP4
<400> 4
cacaggcacc acttccaaga gtttt
<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer
<400> 5
gggctcgaga gcagcgatgt ctgaggagtc ggtatgt
<210> 6
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer
<400> 6
ggcgatcct cgagtcacaa cacagcagca cacac

```

25

25

36

35

10

【 図 1 】

FIG. 1

HCDS1 cDNA nucleotide sequence

```

1 actagtgatt actcacaggc cgcgggggga ggtcagggtg 50
51 gctcacggcg tctgtgatgc tggggagtcg gatgttgagg ctccagcagtc 100
101 tcatggcagc agtgcctcgt cacagcccca tggcagcgtt acccagtcctc 150
151 aaggctccct ctccagctcc caggccatct ccagctctct taccagtcagc 200
201 atgcccatac ccagccagtc ctctcactcc agctctggga cactgagcttc 250
251 cttagagaca gtgtccactc aggaactcct tctctactct gaggaccaa 300
301 aactcgaga ccagaacct gaggagctca cccctgcccc ctgggctcga 350
351 ttatgggccc ttacgagatg atttgcaact cttgaatgtg tgaatgacaa 400
401 ctactgtgtt gggaggagca aaagctgtga atattgcttt gatgaaccac 450
451 tgctgaaaag aacagataaa taccgaacct acagcaagaa acactttctg 500
501 attttcaggg aagtgggtcc taaaaactct taactgtcat acatagaaga 550
551 tccagctgpc aatcgaaact ttgtaaaac agsgctgtga gggaaggaa 600
601 aacgctgccc ttgtaataac aattctgaaa ttgcactgtc actaagcaga 650
651 aataaagtgt ttgtcttttt tgatctgact gtgatgtatc agtcagttaa 700
701 tccataaggca ttaagagatg aatacatcat gtcaaaaact cttggaagt 750
751 gtgcctgtgg agaggtaaa ctggcttttc agaggaaaac atgcaagaaa 800
801 gttagccataa agatcatcac caaagaagag ttgtgtatg gtccagcag 850
851 agagcgagcc cagctgtcca atgttgaaa agaaatagaa attttgaaaa 900
901 agctaaatca tctctgcatc atcaagataa aaaaactttt tgatgcagaa 950
951 gattattata ttgtttttga atgtatggga gggggagagc tgtttgacaa 1000
1001 agtgggtggg aataaacgcc tgaagaagac taccctgcaag cctactttct 1050
1051 accagatgct ctggcgctgg cagcaactct atgaaaacgg tattatcac 1100
1101 cgtgaactaa agccagagga ttgtttactg ccatctcaag aagagagctg 1150
1151 tcttataaag attactgat ttgggcaact caagattttg ggagagacct 1200
1201 ctctcatgag aacctatgtg ggaaccccca cctactgtgc gctgaagtt 1250
1251 cttgtttctg ttgggactgc tgggtataac cgtgctgtgg actgtcgagg 1300
1301 tttagaggtc atctcttca tctgctcagg cgggtatcca cctttctgtg 1350
1351 agcataggac tcnagtgtca ctgaagatc agatcacagg tggaaaatac 1400
1401 aactctatc ctgaagcttc ggcagaagct cagacaagag cctctgacct 1450
1451 tgtcaagaag ttgttggttg tggatccaaa ggcacgtttt acgacagaa 1500
1501 aagccttaag acacccgttg cttcaggatg aagacatcaa gagaagatt 1550
1551 caagatcttc tgcctgagaa aaatgaatcc acagctctac ccaggttct 1600
1601 agccagacct tctactagtc gaagcggccc ccgtgaaggg gaagcggagg 1650
1651 gtgcggagac cacaaagcgc ccagctgtgt gtgctgctgt gttgtgaact 1700
1701 ccgtggtttg aacacgaag aaatgtacct tcttctcact tgtcatcttt 1750
1751 cttttctgtt agctgtgttt ttatagttt gtattttaat tatgggaata 1800
1801 attgtctttt ccagctcact gatgtacact taataacctg atggaacctg 1850
1851 gaaaaaaa

```

【 図 2 】

FIG. 2

Predicted hCD51 Amino acid sequence

```

1 MSRESVDVEAQ QSHSSSACSQ PHGVSQTQSQQ SSSSQSGISS 40
41 SSTSTPNSS QSHSSSGTL SLETVSTQCE LYSIPEDQEF 80
81 EDQPEEPTP APWARKLWALQ DGFANLCVN DNYWFGDRDKS 120
121 CEYCFDEPL KRTDKYRTYS KKHFRIFREV GPKNSYIAVI 160
161 EDHSGNGTFV NTELVGKGKR RPLNNNSEIA LSLRNKAFV 200
201 FFDLTVDGGS VYPKALRDEY IMKTLGSEA COEVKLAFA 240
241 KTCKKVAIK ISKRFAGS AREADPALNV ETEIHLKKL 280
281 NHPCHIKKN FFAFAYVIV LELMEGGEFL DKVGVNKRLL 320
321 EATCKIYFYQ MLLAVQYLHE NGIHRDLKP ENVLSSQEE 360
361 DCLIKITDFG HSKLGETSL MRTLCTPTTY LAPEVLVSV 400
401 TAGYNRAVDC WSLGVILFC LSGYPPFSEH RTQVSLKDQI 440
441 TSGKYNFPE VVAEVSEKAL DLVKKLLVVD PKARFTTEA 480
481 LRHPWLQED MKRKFODLLS EENESTALPQ VLAQPSTSRK 520
521 RPRGEAGEA ETTKRPAVCA AVL

```

【 図 3 】

FIG. 3

```

78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100
101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122
123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145
146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168
169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191
192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214
215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237
238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261
262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284
285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307
308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331
332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355
356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378
379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402
403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426
427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450
451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474
475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498
499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522
523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547
548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572
573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597
598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622
623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647
648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672
673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697
698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722
723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747
748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772
773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797
798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822
823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847
848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872
873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897
898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922
923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947
948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972
973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997
998 999 1000

```

FIG. 3

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

- (72)発明者 ライテン, ワルター・ハー・エム・エル
ベルギー国、ペー - 2 3 4 0・ペールセ、トゥルンホートスウエヒ・3 0、ヤンセン・ファルマス
ーチカ・エヌ・ペー
- (72)発明者 パーカー, アンドリユー・イー
イギリス国、チエシャー・エス・ケー・1 0・4・テイー・ジー、マクルズフィールド、オールダ
リー・パーク、メアサイド、8・エイ・エフ・2 2、ゼネカ・ファーマシユーティカルズ
- (72)発明者 マゴーアン, クレア
アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 0 1 4、デル・マー、ピア・フェリーノ・1 2 7 2 8
- (72)発明者 ブラシーナ, アレッサンドラ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 1 3 0、サン・ディエゴ、1 4 4、カーメル・クリーク・
ロード・1 2 5 3 0

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 Eur. J. Biochem., (1996), 238, [1], p.28-37

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
C12N 15/00-15/90
PubMed