

(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 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
A 01 K 67/027	(2006.01) A 01 K 67/027
C 07 K 16/40	(2006.01) C 07 K 16/40
C 12 N 5/10	(2006.01) C 12 N 5/00 B
C 12 N 9/12	(2006.01) C 12 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) 國際出願番号	PCT/EP1998/006981
(87) 國際公開番号	W01999/025843
(87) 國際公開日	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	英國(GB)

(73) 特許権者	500184121 ザ・スクリプス・リサーチ・インスティチ ュート アメリカ合衆国、カリフォルニア・920 37、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・テイー・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。

10

【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ボ

20

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、英国オックスフォードにあるオッ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、英国オックスフォードにあるオックスフォード大学出版 (Oxford University Press, Oxford, GB)) を参照。）。

20

【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 (Edelge, 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ことの証拠はない (Poona ら、1997, Cancer Res., 57: 5168-5178)。

30

【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 (Hoffmann ら、1994, EMBO J., 13: 4302-4310; Jinno ら、1994, EMBO J.

40

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(Gabrielli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; KauffmannとPauls, 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; Cimprich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(Lieberman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、核酸クロスリンク、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、インビオ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產生される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產生された、グリコシリ化型または非グルコシリ化型の全長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產生される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、またはその断片を產生することができる細胞も提供する。

【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。

【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。

【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。

【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】

10

20

30

40

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。

【 0 0 2 0 】

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。

【 0 0 2 1 】

当業者に公知なように、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

【 0 0 2 2 】

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なる。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リ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

【 0 0 2 3 】

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

【 0 0 2 4 】

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 D N A 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

【 0 0 2 5 】

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。

【 0 0 2 6 】

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きる。 40

きる。

【0027】

また本発明は、少なくとも約15スクレオチドからなる、好ましくは15から50ス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

【0028】

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ス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エント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

【0029】

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

【0030】

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、Geysen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。

40

【0031】

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')₂、およびF(ab')₂断片ならびに一本鎖抗体も含む。

【0032】

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) 例えは、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。

10

【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方法とを含むであろう。

20

【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のち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、および該細胞のいのち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、例えは、抗ガン療法に用いられる細胞毒剤の化学治療的効果を増強することができる。

30

【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、本発明によって提供されている。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。

40

【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工

50

ピトープ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関するタンパク質を同定するための別な方法は、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構築物を有する適當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載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%相同的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增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関与するが、シグナル伝達は、異なったプロテインキナ-

10

20

30

40

50

ゼが関与する、DNA複製型チェックポイントでは分裂酵母cds1、およびDNA損傷型経路ではChk1/Rad27といった異なった経路をたどる。cds1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cds1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(Peck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Chk1と同じような方法で、p107wee1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(Molecular Cloning)、第2版、コールドスプリングハーバー研究所出版(Cold Spring Harbor Laboratory Press)(1989)；Bergerら、分子クローニング技術への手引き(Guide to Molecular Cloning Techniques), Methods in Enzymology, Vol. 152, アカデミックプレス社(Academic Press Inc.)(1987)；Davisら、分子生物学の基礎的方法(Basic Methods in Molecular Biology)、エスルヴィア・サイエンスパブリッシング(Elsevier Science Publishing Co., Inc.)(1986)；Ausubelら、分子生物学の簡易プロトコール(Short Protocols in Molecular Biology)、第2版、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社(John Wiley & Sons)、(1992)；Goeddel、遺伝子発現技術(Gene Expression Technology)、Methods in Enzymology, Vol. 185, アカデミックプレス社(Academic Press, Inc.)(1991)；Guthrieら、酵母の遺伝学および分子生物学への手引き(Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology)、Methods in Enzymology, Vol. 194, アカデミックプレス社(Academic Press, Inc.)(1991)；McPhersonら、PCR第1巻(PCR Volume 1), オックスフォード大学出版(Oxford University Press)、(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. hCDS1の単離

TBLASTNプログラムを用いて、分裂酵母cds1+に類似した配列を検索することから、hCDS1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(Palo Alto, CA)のインサイト・ファーマシューティカルズ社(Insyte Pharmaceuticals Inc.))の中からヒトの発現配列(EST番号:864164)を同定した。1.3kbの挿入配列を解析したところ、分裂酵母のcds1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(Marathon Ready)ヒト胎盤cDNA(クローンテック社(Clontech))を用い、製造業者の指示にしたがって5' RACE(cDNA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

30

40

50

A配列が得られた。

【0048】

概要を説明すると、ネスティド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'-TTTTGCTGATGATCTTTATGGCTAC-3'（配列番号：3）、およびGSP4 5'-CACAGGCACCCACTTCCAAGAGTTT-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'-GGGCTCGAGAGCAGCGATGTCCTCGGGAGTCGGATGT-3'（配列番号：5）

10

および

5'-GGCGGATCCTCGAGTCACACACAGCAGCACAC-3'（配列番号：6）。そして、この増幅産物をpCR2.1ベクター（インビトロジエン社（*In vitro*gen））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cds1⁺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hCDS1 ORF / pCR-Bluntとして寄託番号LMBP 3708の下に、プラスミドhCDS1 5' RACE断片 / pGEM-Easyは寄託番号LMBP 3710として、また、プラスミドhCDS1 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、ベルギー国ゲント（Gent）B-9000の分子生物学用プラスミド受託研究所（Laboratorium Voor Moleculaire Biologie - Plasmidencollecte）（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、複数組織ノザンプロット（クローンテック社）と、ガン細胞系ノザンプロット（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。通常のノザンプ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】

40

全長ORFをFISH（蛍光インサイチュー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。

【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BradU（0.18mg/ml、シグマ社）で処理した。同調した細胞を、無血清培地で3回洗浄してプロックを外し、チミジン（2.5μg/ml、シグマ社）入りの-MEMで376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、BR-L 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、ヒーラ(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)(Hoffmann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ー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、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のロイペプチド、ペプスタチン、およびアプロチニンを含む、50mM Tris pH 7.4)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

10

20

30

40

50

た (B l a s i n a ら、前掲)。免疫プロットのために、抗サイクリンB抗体を用いて400 μg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P S T A I R 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. h C D S 1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たなかった。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ではないが、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な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斷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たかった。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 pH 8.0, 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 pH 7.4, 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pH 7.4, 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できた。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GST-Cdc25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、6his-hCDS1も6his-Chk1も、抽出液で見られる放射線照射によるCdc25の下方制御を模倣することができる。これらの実験は、遠心分離によって清澄化されたHeLa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Cdc25の不活性化をもたらした可能性はない(Pengら、1997, Science, 277: 1501-1505)

実施例5. hCDS1のCdc25に対する直接の効果

細胞溶解液アッセイ法では、hCDS1によってCdc25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、hCDS1によるGST-Cdc25活性の直接のリン酸化と阻害を測定した。

【0067】

-32P ATP存在下、GST-Cdc25を6his-hCDS1、偽ビーズ、または6his-Chk1とともに15分間30でインキュベートした。タンパク質をSDS-PAGEで分析して、ラジオオートグラフィーで画像化した。GST-Cdc25は6his-Chk1、および6his-hCDS1によってリン酸化した。このリン酸化によってCdc25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。

【0068】

GST-Cdc25を測定して、Cdc2/SイクリンB免疫沈殿物のヒストン-H1キナーゼ活性を活性化できるかを調べた。6his-hCDS1によるGST-Cdc25のリン酸化は、Cdc2/SイクリンBを活性化するGST-Cdc25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、6his-hCDS1がインビトロでCdc25を不活性化し、またインビトロではDNA損傷後にCdc25が不活性化されることを明らかにしている。

【0069】

6his-Chk1は、GST-Cdc25と結合して、インビトロでヒストン-H1キナーゼ活性をもつため(Sanchezら、1997, Science, 277: 1497-1501)、Cdc2/S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。GST-Chk1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Cdc2分子種が消えることから、Cdc2の脱リン酸化を観察するアッセイ法を用いた。

【0070】

概略を説明すると、6his-Cdc2、6his-Wee1、6his-Myt1、およびGST-S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Sf9細胞から、脱リン酸化されたCdc2を精製した(Parkerら、1992, Science, 257: 1955-1957)。イクリンBと複合体を作る6his-Cdc2を、溶解バッファーに1mM VO₄を加えた以外はGST-Cdc25に対する条件と同じ条件でGSHビーズを用いて精製した。ウエスタンプ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Cdc2/GST-S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、10mM EDTAが存在しATPが存在しないという6his-Chk1がCdc2またはイクリン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。GST-Cdc25は、遅い移動度のリン酸化された型Cdc2の還元を触媒する。6his-Chk1によって予めGST-Cdc25をリン酸化することでGST-Cdc25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、Chk1がCdc25の活性を負に制御していることが確認される(Furnariら、1997, Science, 277: 1495-1497; Weinert, 1997, Science, 277: 1450)、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】

10

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。インピ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^{Cdc25}のインピ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。

20

【0074】

さらにアッセイを行なって、p64^{Cdc25}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^{Cdc25}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が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。

30

【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Cdc25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Cdc25の役割を示している。

【0076】

40

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検出裝

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

h C D S 1 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、D N A 損傷チェックポイントにおけるヒト C d s 1 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、c D N A 、R N A 、アンチセンス分子、h C D S 1 タンパク質、h C D S 1 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h C D S 1 を素材とする薬剤および本発明のh C D S 1 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。

10

【0080】

殺傷を促進するための機構の一つは、悪性細胞のD N A 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D N A 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。D N A 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、h C D S 1 応答を変更することによってもたらすことができる。

20

【0081】

このように、h C D S 1 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、フルダラビン(F l u d a r a b i n e)、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)、ブリカマイシン(Platinum)、カルムスチン、イオムスチン、シクロホスファミド、イフオスファミド(Ifosfamide)、メクロレタミン、ストレプトゾトシン、ナベルビン(Navelbine、登録商標)、パクリタキセル、ピンプラスチン、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h C D S 1 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る、c)化学療法剤の悪性細胞に対する効果を変える、またはd)正常細胞に対する化学療法剤の副作用を変えることができる。h C D S 1 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。

30

【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、h C D S 1 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、h C D S 1 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

40

50

合わせてその効果を向上させる。

【0083】

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。

【0084】

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つて、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
 actagtgatt actcacaggg ctcgagcggc cgccgggca ggtcaggtgg gtcacgcgg 60

tcgtg atg tct cgg gag tcg gat gtt gag gct 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 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 gct ccc tgg gct cga 350
 Pro Glu Asp Gln Glu Pro 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 Lys Arg Thr Asp Lys Tyr Arg Thr Tyr Ser Lys Lys His
 130 135 140
 ttt cgg att ttc agg gaa gtc 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 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 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 Val Ala Ile Lys Ile Ser Lys Arg Lys

10

20

30

240	245	250	255	878
ttt gct att ggt tca gca aga gag gca gac cca gct ctc aat gtt gaa				
Phe Ala Ile Gly Ser Ala Arg Glu Ala Asp Pro Ala Leu Asn Val Glu				
260	265	270		
aca gaa ata gaa att ttg aaa aag cta aat cat cct tgc atc atc aag				926
Thr Glu Ile Glu Ile Leu 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 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 Thr Lys Arg Pro Ala Val Cys Ala Ala Val Leu				
530	535	540		
tgaactccgt ggtttgaaca cgaaagaataa gtacctttt tcactctgtc atctttcttt				1754
tctttgagtc tgttttttt tagtttgtat tttaattatg ggaataattg ctttttcaca				1814
gtcaactgtatg tacaattaaa aacctgtatgg aaccctggaaa 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 Ser Thr Ser Thr Met Pro Asn				
35 40 45				

Ser Ser Gln Ser Ser His Ser Ser Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Glu
 50 55 60
 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 Ser Glu Ile Ala Leu Ser
 180 185 190
 Leu Ser Arg Asn Lys Val Phe Val 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 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 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

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

【図1】

FIG. 1

【図2】

FIG. 2

```

Predicted hCD31 Amino acid sequence
 51  MRSRSDVEAQ QSHGSSACSQG PHGSVTSQSG SSSOSQGSS 40
 41  SSTSSTMPNSQ QSHSSSSQ SLSTEVTSTOE LYSIPDDEOP 80
 81  EDQEPEPTE PAPWRLWALQ DGFANALEVN DNWFGRDKS 120
 121 CEYCFDEPLR KRTKDYKRTYS KKHFRFIREV GPKNSYIAVY 160
 161 EDHSGNSGTVF NTELVGKGRK RPLNNNSSEA LLSLRNKKVFV 200
 201 FFDLTDVQDQG KPKALRDEY IMSKTLGSSG CGEVLFAKER 240
 241 KTCCKVVAI SKRKFAGA AREADPLAVN TEIIEKLKBL 280
 281 NHPCIIKRN FFFDAEYDYY LELMEGGLF DKVGNKRNKL 320
 321 EATCKLYFYQ MLLAVOYLYHE NGIHRDLPK ENVLLQSSSE 360
 361 DCLKLTIDFG HSXKILGTL RMTLGCPTVY LAPEVWVSG 400
 401 TAGYRNARVDC WLSGVILFCI LSGYPPFSHEH RTQVSQDQQ 440
 441 TSGKYNFPE VVAEWEKSALE DLVKKLUVV PKARFTTEEE 480
 481 LRHPWLOQED MKRKFQDLSL EENESTALPQ VLAQPSTSRK 520
 521 RPRGEAEAGA ETTKRPVCA AVL

```

【図3】

25

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 12 P 21/08 (2006.01) C 12 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、ベー・2340・ベールセ、トゥルンホーツウェヒ・30、ヤンセン・ファルマス
ーチカ・エヌ・ベー
(72)発明者 パーカー, アンドリュー・イー
イギリス国、チエシヤー・エス・ケー・10・4・ティー・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・22、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・92014、デル・マー、ピア・フェリーノ・12728
(72)発明者 ブラシーナ, アレツサンドラ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・92130、サン・ディエゴ、144、カーメル・クリーク・
ロード・12530

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., DB名)
C12N 15/00-15/90
PubMed