

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年9月19日 (19.09.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/072827 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, 1/19, 1/21, 5/10, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02, C12Q 1/68, A61K 45/00, A61P 1/00, 9/00, 11/00, 17/00, 19/00, 25/00, 29/00, 31/00, 35/00, 37/00, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/566
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 入江 新司 (IRIE, Shinji) [JP/JP]; 〒299-0114 千葉県 市原市 泉台 2-1 7-2 Chiba (JP). 佐藤 孝明 (SATO, Takaaki) [JP/US]; 07024 ニュージャージー州 フォートリー 8 P, 5丁目 1 2 7 5 NJ (US).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/01849
- (74) 代理人: 今村 正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.); 〒104-0031 東京都 中央区 京橋 1丁目 8番 7号 京橋 日殖ビル 8階 Tokyo (JP).
- (22) 国際公開日: 2002年2月28日 (28.02.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (81) 指定国 (国内): US.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (30) 優先権データ:
特願2001-055119 2001年2月28日 (28.02.2001) JP
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広 沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TRAF3-BINDING B CELL-SPECIFIC RECEPTOR

(54) 発明の名称: T R A F 3 結合性 B 細胞特異受容体

(57) Abstract: Signal transferring molecules binding to TRAF3 are identified. A protein having an amino acid sequence as specified by one of the following items: (a) the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1; (b) an amino acid sequence derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 by deletion, substitution and/or insertion of one to several amino acids and having an activity of binding to TRAF3; and (c) an amino acid sequence having a homology of at least 60% with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 and having an activity of binding to TRAF3.

(57) 要約:

TRAF3に結合するシグナル伝達分子を同定する。

下記の何れかのアミノ酸配列を有するタンパク質。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列;

(b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換及び/又は挿入したアミノ酸配列であって、TRAF3に対する結合活性を有するアミノ酸配列; 又は、

(c) 配列番号1に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、TRAF3に対する結合活性を有するアミノ酸配列;



WO 02/072827 A1

明 細 書

T R A F 3 結合性B細胞特異受容体

技術分野

本発明は、B細胞特異的受容体の一員である新規なT R A F 3 結合性タンパク質に関する。本発明はまた、該タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を有するベクター、該遺伝子を有する形質転換体、該タンパク質を認識する抗体、該タンパク質を利用した医薬のスクリーニング法、並びに該タンパク質を利用した診断方法に関する。

背景技術

生物学的作用はある刺激に対する反応によって制御されている。即ち、多くのサイトカインは受容体に結合し、細胞内反応を引き起こす。例えば、腫瘍壊死因子 (TNF) は、TNF受容体を経て作用し、感染およびショックの誘導および炎症性疾患に対する保護などの生物学的過程を調節する。TNFはTNF-リガンドスーパーファミリーに属し、そのリガンドであるTNF受容体スーパーファミリーとともに作用する。リガンドとしては、TNF- α 、リンホトキシン (LT) - α 、LT- β 、FasL、CD40L、CD27L、CD30L、OX40Lおよび神経栄養因子 (NGF) などが知られている。TNF受容体スーパーファミリーとしては、p55 TNF受容体、p75 TNF受容体、TNF受容体関連因子、Fas抗原、CD40、CD27、CD30、OX40、低親和性p75およびNGF受容体などが知られている。数種のTNF受容体ファミリーの機能はすでに解明されており、例えば、Fas抗原や低親和性NGF受容体とそれらのリガンドは、プログラムされた細胞死に関係し、CD40リガンドはT細胞依存性B細胞活性化に関与する。

生理学的過程の一つであるプログラムされた細胞死は正常な発育および多細胞

生物の恒常性にとって必須であり、アポトーシスの混乱は癌、神経変性疾患、および後天性免疫不全症候群(AIDS)を含むヒトの疾患の病因に関与している。Fasの活性化はデスドメイン含有アダプター分子であるFADD/MORT1がFasの細胞内ドメインに結合し、これが次にプロアポトーシスプロテアーゼであるカスパー8を活性化し、最終的にアポトーシスを実行する。一方、TNFR-1は主にNF- κ Bを活性化することにより一連の広範な生物学的活性のシグナルを伝達する。TNFR-1はデスドメインを含むTRADDとTNFR-1の細胞内ドメインで結合し、FADD、TRAF2、およびRIPなど多数のシグナル伝達分子との会合を通じて、アポトーシスとNF- κ B活性化との両方のシグナルを伝達する。このようにTNFファミリーリガンドとTNFファミリー受容体の作用は多様であり、多くの生物学的プロセスに影響を与えるため、これらの受容体、リガンドおよびそれらに関するシグナル伝達分子を同定して解析することは疾患の治療法を確立する上で重要である。

TNF受容体関連因子(TRAF)は、TNF受容体スーパーファミリーの下流シグナル伝達因子として最初に発見されたタンパク質ファミリーである [Rothe, M. 他、(1994) Cell 78, 681-692; Hu, H. M., 他、(1994) J. Biol. Chem. 269, 30069-30072; 及び Cheng, G., 他、(1995) Science 267, 1494-1498]。現在までに、TRAFファミリーとしては6種の因子が同定されている [Rothe, M. 他、(1994) Cell 78, 681-692; Hu, H. M., 他、(1994) J. Biol. Chem. 269, 30069-30072; Cheng, G., 他、(1995) Science 267, 1494-1498; Cao, Z., 他、(1996) Nature (London) 383, 443-446; Mosialos, G., 他、(1995) Cell 80, 389-399; Sato, T., 他、(1995) FEBS Lett. 358, 113-118; Regnier, C. H., 他、(1995) J. Biol. Chem. 270, 25715-25721; Ishida, T. K., 他、(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9437-9442; Nakano, H., 他、(1996) J. Biol. Chem. 271, 14661-14664; 及び Ishida, T. K., 他、(1996) J. Biol. Chem. 271, 28745-28748]。TRAF1-6は何れも、コイルドコイルのTRAF-Nドメインを有し、C末端のTRAF-Cドメインが保存されている。 [Cao, Z., 他、(1996) Nature (London) 383, 443-446]。TRAF-Cドメイン

は、TRAFタンパク質間の相互作用、ならびに該タンパク質とTNFRスーパーファミリーの因子との結合を仲介する [Cheng, G., 他、(1995) Science 267, 1494-1498; Takeuchi, M., 他、(1996) J. Biol. Chem. 271, 19935-19942; 及び Hsu, H., 他、(1996) Cell 84, 299-308]。

TRAF 3は、B細胞表面マーカーであるCD 40およびエプスタイン-バーウイルス潜在性膜タンパク質であるLMP-1の細胞質ドメインに結合した分子として最初に同定された [Mosialos, G., 他、(1995) Cell 80, 389-399; Sato, T., 他、(1995) FEBS Lett. 358, 113-118; Hu, H. M., 他、(1994) J. Biol. Chem. 269, 30069-30072; 及び Cheng, G., 他、(1995) Science 267, 1494-1498]。また、TRAF 3は、リンフォトキシン β 受容体などのTNFRファミリーの他の因子の細胞質末端部分と相互作用することが示された [Force, W. R., 他、(1997) J. Biol. Chem. 272, 30835-30840]。TRAF 3を含むTRAFファミリータンパク質は、触媒活性を欠損すると思われる細胞質タンパク質であり、一般にアダプタータンパク質として働くと考えられている。これに関連して、TRAF 3はNIK、ASKおよびTANKなどの他のシグナル伝達分子と相互作用することが判明している [Song, H. Y., 他、(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 9792-9796; Nishitoh, H., 他、(1995) Mol. Cell 2, 389-395; 及び Regnier, C. H., 他、(1997) Cell 90, 373-383]。しかしながら、TRAF 3がシグナル伝達を仲介する機構は完全には解明されていない。

発明の開示

本発明は、TRAF 3に結合するシグナル伝達分子を同定することを解決すべき課題とした。本発明はまた、TRAF 3に結合するシグナル伝達分子をコードする遺伝子をクローニングし、その遺伝子の構造と機能を解明することを解決すべき課題とした。本発明はさらに、TRAF 3に結合するシグナル伝達分子をコードする遺伝子を利用して新規な医薬または診断方法を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために、酵母を用いてタンパク質-タンパク質相互作用のスクリーニングを実施した。このスクリーニングは、ヒト由来 *Sos* (*hSos*) 蛋白質を細胞膜にリクルートさせることによって酵母 RAS シグナル伝達経路を活性化させ、酵母 *cdc25* 遺伝子欠損を相補させることを利用するものである。本発明者らは、WEHI 231 細胞由来の cDNA 発現ライブラリーおよび *hSos* に融合した完全長 TRAF 3 を用いる上記スクリーニング法により、新規な TRAF 3 結合タンパク質 (以下、T3BP とも称する) を同定し、さらにこの T3BP タンパク質の構造と機能を解明した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有するタンパク質が提供される。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列 ;

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換及び/または挿入したアミノ酸配列であって、TRAF 3 に対する結合活性を有するアミノ酸配列 ; または、

(c) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と 60% 以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、TRAF 3 に対する結合活性を有するアミノ酸配列 :

さらに本発明によれば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子が提供される。

さらに本発明によれば、下記の何れかの塩基配列を有する遺伝子が提供される。

(a) 配列番号 2 に記載の塩基配列 ;

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基が欠失、付加または置換されている塩基配列であって、TRAF 3 に対する結合活性を有するタンパク質をコードする塩基配列 ; または

(c) 配列番号 2 に記載の塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、TRAF 3 に対する結合活性を有するタンパク質をコードする塩基配列 :

さらに本発明によれば、本発明の遺伝子を含むベクターが提供される。

さらに本発明によれば、本発明の遺伝子または本発明のベクターを有する形質転換体が提供される。

さらに本発明によれば、本発明の形質転換体を用いることを特徴とする、TRAF 3に対する結合活性を有するタンパク質の製造方法が提供される。

さらに本発明によれば、本発明のタンパク質を認識する抗体が提供される。

さらに本発明によれば、本発明のタンパク質または抗体を用いて、該タンパク質または抗体の機能を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法が提供される。好ましくは、本発明のタンパク質または抗体の機能を促進または抑制する物質は、TRAF 3を介した細胞内シグナル伝達を促進または抑制する物質である。

さらに本発明によれば、本発明のスクリーニング方法により得られる、本発明のタンパク質の機能を促進または抑制する物質が提供される。

さらに本発明によれば、上記物質を有効成分として含む医薬が提供される。本発明の医薬は、好ましくは、TRAF 3を介する細胞内シグナル伝達の異常に関連する疾患の予防または治療のために使用される。

さらに本発明によれば、生体由来成分における本発明のタンパク質のレベルを測定することを含む、TRAF 3を介する細胞内シグナル伝達の異常に関連する疾患の診断方法が提供される。

図面の簡単な説明

図1 Aは、T3BPの推定アミノ酸配列、図1 BはT3BP mRNAのノーザンブロット分析の結果を示す。

図2 Aは、GST融合タンパク質（GST-クローン3，GST-クローン10）のTRAF 2，TRAF 3に対する結合特性のGSTプルダウンアッセイによる分析結果を示す。

図2 Bは、GST-T3BPのTRAF 2，TRAF 3，TRAF 5，TRA

F 6 に対する結合特性の GST プルダウンアッセイによる分析結果を示す。

図 2 C は、TRAF 3 と T 3 B P との相互作用の免疫沈降アッセイによる分析結果を示す。

図 3 A 及び図 3 B は、TRAF 3 中の T 3 B P 結合領域のマッピングの結果を示す。

図 3 C は、マウス TRAF 3 の一次構造の概略を示す。

図 4 A は、GST 融合 T 3 B P トランケーション突然変異体の TRAF 3 に対する結合特性の *in vitro* アッセイによる分析結果を示す。

図 4 B は、GST 融合 T 3 B P トランケーション突然変異体の TRAF 3 に対する結合特性の GST プルダウンアッセイによる分析結果を示す。

図 4 C は T 3 B P の一次構造とその TRAF 3 結合領域を示す。

図 5 A は、T 3 B P の発現による細胞の形態変化を示す。

図 5 B は、TRAF 3 の細胞分布に及ぼす T 3 B P 発現の影響を示す。

図 6 A は、T 3 B P による細胞性 F アクチン含量の増大を示す。

図 6 B は、T 3 B P を発現する細胞中における F アクチンの細胞分布を観察した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施態様及び実施方法について詳細に説明する。

(1) 本発明のタンパク質及び遺伝子

本発明は、下記の何れかのアミノ酸配列を有するタンパク質、並びにそれをコードする遺伝子に関する。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換及び／または挿入したアミノ酸配列であって、TRAF 3 に対する結合活性を有するアミノ酸配列；または、

(c) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と 60% 以上の相同性を有するアミノ酸

配列であって、TRAF3に対する結合活性を有するアミノ酸配列：

本発明の遺伝子の具体例としては、下記の何れかの塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。

(a) 配列番号2に記載の塩基配列；

(b) 配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基が欠失、付加または置換されている塩基配列であって、TRAF3に対する結合活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；または

(c) 配列番号2に記載の塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、TRAF3に対する結合活性を有するタンパク質をコードする塩基配列：

上記した「配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換及び/または挿入したアミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

上記した「配列番号1に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列」とは、該アミノ酸配列と配列番号1に記載のアミノ酸配列との相同性が少なくとも60%以上であり、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上であり、最も好ましくは98%以上であることを意味する。

上記した「配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基が欠失、付加または置換されている塩基配列」における「1から数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から60個、好ましくは1から30個、より好ましくは1から20個、さらに好ましくは1から10個、特に好ましくは1から5個程度を意味する。

上記した「ストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列」とは、DNAをプローブとして使用し、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラー

クハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAの塩基配列を意味し、例えば、コロニーあるいはプラーク由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2×SSC溶液（1×SSC溶液は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNA等を挙げる事ができる。ハイブリダイゼーションは、**Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.,1989.** 以後“モレキュラークローニング第2版”と略す）等に記載されている方法に準じて行うことができる。

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、プローブとして使用するDNAの塩基配列と一定以上の相同性を有するDNAが挙げられ、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは93%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAが挙げられる。

上記した「TRAF3に対する結合活性を有する」とは、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質と同程度またはそれ以上の親和性でTRAF3と結合することができ、それによってTRAF3が仲介する細胞内シグナル伝達に関与できることを言う。

本発明の遺伝子の取得方法は特に限定されない。本明細書中の配列表の配列番号1および配列番号2に記載した塩基配列及びアミノ酸配列の情報に基づいて適当なプローブやプライマーを調製し、それらを用いてマウスなどのcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより本発明の遺伝子を単離することができる。

マウスの由来のcDNAライブラリーは、本発明の遺伝子を発現している細胞、器官または組織から作製することが好ましい。当該遺伝子を発現している細胞の具体例としてはWEHI231細胞などが挙げられるが、これに限定されるわけではない。

PCR法により配列番号2に記載した塩基配列を有するDNAを取得することもできる。マウスの染色体DNAまたはcDNAライブラリーを鋳型として使用し、配列番号2に記載した塩基配列を増幅できるように設計した1対のプライマーを使用してPCRを行う。

PCRの反応条件は適宜設定することができ、例えば、94℃で30秒間（変性）、55℃で30秒～1分間（アニーリング）、72℃で2分間（伸長）からなる反応工程を1サイクルとして、例えば30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件などを挙げるることができる。次いで、増幅されたDNA断片を、大腸菌等の宿主で増幅可能な適切なベクター中にクローニングすることができる。

上記したプローブまたはプライマーの調製、cDNAライブラリーの構築、cDNAライブラリーのスクリーニング、並びに目的遺伝子のクローニングなどの操作は当業者に既知であり、例えば、モレキュラークローニング第2版、*Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)*（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）等に記載された方法に準じて行うことができる。

本明細書中上記した、(b)配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基が欠失、付加または置換されている塩基配列であって、TRAF3に対する結合活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する遺伝子（変異遺伝子）は、化学合成、遺伝子工学的手法または突然変異誘発などの当業者に既知の任意の方法で作製することもできる。具体的には、配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAを利用し、これらDNAに変異を導入することにより変異DNAを取得することができる。

例えば、配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAに対し、変異原となる薬剤と接触作用させる方法、紫外線を照射する方法、遺伝子工学的手法等を用いて行うことができる。遺伝子工学的手法の一つである部位特異的変異誘発法は特定の位置に特定の変異を導入できる手法であることから有用であり、モレキュラークローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオ

ロジー等に記載の方法に準じて行うことができる。

本明細書中上記した、(c) 配列番号 2 に記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、TRAF 3 に対する結合活性を有するタンパク質をコードする塩基配列は、上述の通り、一定のハイブリダイゼーション条件下でコロニー・ハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法などを行うことにより得ることができる。

次に、本発明のタンパク質の入手・製造方法について説明する。本発明のタンパク質の入手・製造方法は特に限定されず、天然由来のタンパク質でも、化学合成したタンパク質でも、遺伝子組み換え技術により作製した組み換えタンパク質の何れでもよい。比較的容易な操作でかつ大量に製造できるという点では、組み換えタンパク質が好ましい。

天然由来のタンパク質を入手する場合には、該タンパク質を発現している細胞または組織からタンパク質の単離・精製方法を適宜組み合わせて単離することができる。化学合成タンパク質を入手する場合には、例えば、Fmoc 法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc 法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法に従って本発明のタンパク質を合成することができる。また、各種の市販のペプチド合成機(例えば、桑和貿易(米国 Advanced Chem Tech 社製)、パーキンエルマー・ジャパン(米国 Perkin-Elmer 社製)、ファルマシアバイオテック(スウェーデン Pharmacia Biotech 社製)、アロカ(米国 Protein Technology Instrument 社製)、クラボウ(米国 Synthecell-Vega 社製)、日本パーセプティブ・リミテッド(米国 PerSeptive 社製)、島津製作所等)を利用して本発明のタンパク質を合成することもできる。

本発明のタンパク質を組み換えタンパク質として産生するには、該タンパク質をコードする塩基配列(例えば、配列番号 2 に記載の塩基配列)を有する DNA またはその変異体または相同体を入手し、これを好適な発現系に導入することにより本発明のタンパク質を製造することができる。発現ベクターおよび形質転換

体の作成およびそれを用いた組み換えタンパク質の産生については本明細書中後記する。

なお、配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換または挿入したアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号1に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質は、配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするDNA配列の一例示す配列番号2に記載の塩基配列の情報に基づいて当業者であれば適宜製造または入手することができる。

例えば、配列番号2に記載の塩基配列またはその一部を有するDNAプローブとしてマウスまたはマウス以外の生物より、該DNAのホモログを適当な条件下でスクリーニングすることにより単離することができる。或いはDNA配列データベースのホモロジー検索から対応cDNA配列を取得し、PCR等で調製することもできる。このホモログDNAの全長DNAをクローニング後、発現ベクターに組み込み適当な宿主で発現させることにより、該ホモログDNAによりコードされるタンパク質を製造することができる。

(2) 本発明の遺伝子を有するベクター

本発明の遺伝子は適当なベクター中に組み込んで組み換えベクターとして使用することができる。ベクターの種類は発現ベクターでも非発現ベクターでもよく、目的に応じて選ぶことができる。

クローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自律複製できるものが好ましく、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる、具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494(1989)]、Lambda ZAP II(ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49(1985)]、λTriplEx(クローンテック社製)、λExCell(ファルマシア社製)、pT7T318U(ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Gen. Biol., 3, 280 (1983)]、pMW218(和光純薬社製)、pUC118(宝酒造社製)、pEG400 [J.Bac., 172, 2392

(1990)]、pQE-30 (QIAGEN 社製)等をあげることができる。

発現ベクターとしては、好ましくは宿主細胞において自立複製可能であるか、あるいは宿主細胞の染色体中へ組込み可能であるものを使用する。また、発現ベクターとしては、本発明の遺伝子を発現できる位置にプロモーターを含有しているものが使用される。

細菌を宿主細胞として用いる場合は、本発明の遺伝子を発現させるための発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、上記 DNA および転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

細菌用の発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2(いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pKK233-2(Pharmacia 社製)、pSE280(Invitrogen 社製)、pGEMEX-1(Promega 社製)、pQE-8(QIAGEN 社製)、pQE-30(QIAGEN 社製)、pKYP10(特開昭 58-110600)、pKYP200 [Agric.Biol.Chem., 48, 669(1984)]、PLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277(1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK+、pBluescriptII SK(-)(Stratagene 社製)、pTrs30(FERMBP-5407)、pTrs32(FERMBP-5408)、pGEX(Pharmacia 社製)、pET-3(Novagen 社製)、pTerm2(US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pUC18 [Gene, 33, 103(1985)]、pUC19 [Gene, 33, 103(1985)]、pSTV28(宝酒造社製)、pSTV29(宝酒造社製)、pUC118(宝酒造社製)、pQE-30(QIAGEN 社製)等が挙げられる。細菌用のプロモーターとしては、例えば、trp プロモーター(P trp)、lac プロモーター(P lac)、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、P_{SE}プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01 プロモーター、SP02 プロモーター、penP プロモーター等を挙げるができる。

酵母用の発現ベクターとして、例えば、YEpl3(ATCC37115)、YEpl24(ATCC37051)、Ycp50(ATCC37419)、pHS19、pHS15 等を例示することができる。酵母用のプロモーターとしては、例えば、PHO5 プロモーター、PGK

プロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターを挙げることができる。

動物細胞用の発現ベクターとして、例えば、pcDNAI、pcDM8(フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平 3-22979; Cytotechnology, 3, 133,(1990)]、pAS3-3(特開平 2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840,(1987)]、pcDNAI/AmP(Invitrogen社製)、pREP4(Invitrogen社製)、pAGE103 [J.Biochem., 101, 1307(1987)]、pAGE210等を例示することができる。動物細胞用のプロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等を挙げることができる。

植物細胞用の発現ベクターとしては、例えば、pIG121-Hm [Plant Cell Report, 15, 809-814(1995)]、pBI121 [EMBO J. 6, 3901-3907(1987)]等を例示することができる。植物細胞用のプロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター [Mol.Gen.Genet (1990) 220, 389-392]、ルブロースピスフォスフェートカルボキシラーゼスモールサブユニットプロモーター等を挙げることができる。

(3) 本発明の遺伝子を有する形質転換体

本発明のTRAF3に対する結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を有する形質転換体は、上記した組み換えベクター(好ましくは発現ベクター)を宿主に導入することにより作製することができる。

細菌の宿主細胞の具体例としては、Escherichia 属、Corynebacterium 属、Brevibacterium 属、Bacillus 属、Microbacterium 属、Serratia 属、Pseudomonas 属、Agrobacterium 属、Alicyclobacillus 属、Anabaena 属、Anacystis 属、Arthrobacter 属、Azobacter 属、Chromatium 属、Erwinia 属、Methylobacterium 属、Phormidium 属、Rhodobacter 属、Rhodospseudomonas 属、Rhodospirillum

属、*Scenedesmun* 属、*Streptomyces* 属、*Synnecoccus* 属、*Zymomonas* 属等に属する微生物をあげることができる。細菌宿主へ組換えベクターを導入する方法としては、例えば、カルシウムイオンを用いる方法やプロトプラスト法等を挙げることができる。

酵母宿主の具体例としては、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ボンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、クリュイベロミセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、トリコスポロン・プルランス(*Trichosporon pullulans*)、シュワニオミセス・アルビウス(*Schwanniomyces alluvius*)等を挙げることができる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

動物細胞宿主としては、ナマルバ細胞、COS1 細胞、COS7 細胞、CHO 細胞等を挙げることができる。動物細胞への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる(例えば、*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*; 及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、*Bio/Technology*, 6, 47(1988)等に記載)。

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞である Sf 9、Sf 21 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー(W. H. Freeman

and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞である *H i F i v e* (インビトロジェン社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法またはリポフェクション法等を挙げることができる。

(4) 本発明の形質転換体を用いた組み換えタンパク質の製造

本発明においては、上記のようにして作製した本発明の遺伝子を有する形質転換体を培養し、培養物中に本発明のタンパク質を生成蓄積させ、該培養物より本発明のタンパク質を採取することにより組み換えタンパク質を単離することができる。

本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行うことが好ましく、培養温度は通常 15~40℃であり、培養時間は、通常 16 時間~7 日間である。培養中、pH は 3.0~9.0 に保持する。pH の調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPM11640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967)]、Eagle の MEM 培地 [Science, 122, 501(1952)]、DMEM 培地 [Virology, 8, 396(1959)]、199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常 pH6~8、30~40℃、5%CO₂ 存在下等の条件下で 1~7 日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、MS培地、R2P培地等、その植物種に応じて通常用いられる培地が用いられる。培養は、通常pH6～8、15～35℃等の条件下で1～21日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

形質転換体の培養物から、本発明のタンパク質を単離精製するには、通常のタンパク質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明のタンパク質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常のタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース、DIAION HPA-75(三菱化成社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該タンパク質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該タンパク質を回収後、該タンパク質の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該タンパク質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

(5) 本発明のタンパク質を認識する抗体

本発明により T R A F 3 結合性タンパク質が同定されたことにより、該タンパク質を認識する抗体を作製することができる。このような抗体の作製は、当該タンパク質または T R A F 3 の動態の解明などの研究において有用である。本発明の抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、その作製は定法により行なうことができる。

例えば、本発明のタンパク質を認識するポリクローナル抗体は、本発明のタンパク質を抗原として哺乳動物を免疫感作し、該哺乳動物から血液を採取し、採取した血液から抗体を分離・精製することにより得ることができる。例えば、マウス、ハムスター、モルモット、ニワトリ、ラット、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ等の哺乳動物を免疫することができる。免疫感作の方法は当業者に公知であり、例えば抗原を1回以上投与することにより行うことができる。抗原投与は、例えば7～30日間隔で2～3回投与すればよい。投与量は1回につき、例えば抗原約0.05～2mg程度とすることができる。投与経路も特に限定されず、皮下投与、皮内投与、腹膜腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等を適宜選択することができるが、静脈内、腹膜腔内もしくは皮下に注射することにより投与することが好ましい。また、抗原は適当な緩衝液、例えば完全フロイントアジュバントまたは水酸化アルミニウム等の通常用いられるアジュバントを含有する適当な緩衝液に溶解して用いることができるが、投与経路や条件等に応じてアジュバントを使用しない場合もある。

免疫感作した哺乳動物を一定期間飼育した後、該哺乳動物の血清をサンプリングし、抗体価を測定する。抗体価が上昇してきたら、例えば100 μ g～1000 μ gの抗原を用いて追加免疫を行なう。最後の投与から1～2ヶ月後に免疫感作した哺乳動物から血液を採取して、該血液を、例えば遠心分離、硫酸アンモニウムまたはポリエチレングリコールを用いた沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等のクロマトグラフィー等の常法によって分離・精製することにより、ポリクローナル抗血清

として、本発明のタンパク質を認識するポリクローナル抗体を得ることができる。なお血清は、たとえば、56℃で30分間処理することによって補体系を不活性化してもよい。

本発明のタンパク質を認識するモノクローナル抗体のグロブリンタイプは特に限定されず、例えばIgG、IgM、IgA、IgE、IgD等が挙げられる。本発明のモノクローナル抗体を産生する細胞株は特に制限されないが、例えば、抗体産生細胞とミエローマ細胞株との細胞融合によりハイブリドーマとして得ることができる。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、以下のような細胞融合法によって得ることができる。

抗体産生細胞としては、免疫された動物からの脾細胞、リンパ節細胞、Bリンパ球等を使用する。抗原としては、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドを使用する。免疫動物としてはマウス、ラット等を使用でき、これらの動物への抗原の投与は常法により行う。例えば完全フロイドアジュバント、不完全フロイドアジュバントなどのアジュバントと抗原である本発明のタンパク質との懸濁液もしくは乳化液を動物の静脈、皮下、皮内、腹腔内等に数回投与することによって動物を免疫化する。免疫化した動物から抗体産生細胞として例えば脾細胞を取得し、これとミエローマ細胞とを公知の方法 (G. Kohler et al., Nature, 256 495 (1975)) により融合してハイブリドーマを作製することができる。

細胞融合に使用するミエローマ細胞株としては、例えばマウスではP3X63Ag8、P3U1株、Sp2/0株などが挙げられる。細胞融合を行なうに際しては、ポリエチレングリコール、センダイウイルスなどの融合促進剤を用い、細胞融合後のハイブリドーマの選択にはヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン (HAT) 培地を常法に従って使用する。細胞融合により得られるハイブリドーマは限界希釈法等によりクローニングする。さらに必要に応じて、本発明のタンパク質を用いた酵素免疫測定法によりスクリーニングを行なうことにより、本発明のタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生する細胞株を得ることができる。

このようにして得られたハイブリドーマから目的とするモノクローナル抗体を製造するには、通常の細胞培養法や腹水形成法により該ハイブリドーマを培養し、培養上清あるいは腹水から該モノクローナル抗体を精製すればよい。培養上清もしくは腹水からのモノクローナル抗体の精製は、常法により行なうことができる。例えば、硫酸分画、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどを適宜組み合わせて使用できる。

本発明のモノクローナル抗体を用いて本発明の T R A F 3 結合性タンパク質を免疫測定するための方法としては、例えば酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法等を挙げることができる。

また、上記した抗体の断片も本発明の範囲内である。抗体の断片としては、F (a b ') 2 フラグメント、F a b ' フラグメント等が挙げられる。

さらに、上記した抗体の標識抗体も本発明の範囲内である。即ち、上記のようにして作製した本発明の抗体は標識して使用することができる。抗体の標識の種類及び標識方法は当業者に公知である。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼなどの酵素標識、F I T C (フルオレセインイソチオシアネート) または T R I T C (テトラメチルローダミンBイソチオシアネート) 等の蛍光標識、コロイド金属および着色ラテックスなどの呈色物質による標識、ビオチンなどのアフィニティー標識、あるいは¹²⁵Iなどの同位体標識などを挙げることができる。本発明の標識抗体を用いた酵素抗体法、免疫組織染色法、免疫ブロット法、直接蛍光抗体法または間接蛍光抗体法等の分析は当業者に周知の方法により行うことができる。

(6) 本発明のタンパク質を用いたスクリーニング法

本発明はさらに、本発明の T R A F 3 結合性タンパク質またはその抗体を用いて、該タンパク質または抗体の機能を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法にも関する。当該スクリーニング方法により、好ましくは、T R A F 3 を介した細胞内シグナル伝達を促進または抑制する物質が選択される。このようなスクリーニング系は、例えば以下の通り構築することができる。

本発明の遺伝子を有する発現ベクターを構築し、この発現ベクターをTRAF3を発現する適当な宿主に導入する。得られる形質転換体においてはTRAF3と本発明のタンパク質の両方が発現し、両者の相互作用を介して、適切なリガンドの存在下においては細胞内シグナル伝達が進行する。

上記のように構築したスクリーニング系に被験物質を添加することができる。被験物質を添加した場合に細胞内シグナル伝達の進行が阻害されれば、その被験物質は、本発明のタンパク質とTRAF3との相互作用を阻害する物質（即ち、本発明のTRAF3結合性タンパク質の機能を抑制する物質）の候補物質として選択することができる。反対に、被験物質を添加した場合に細胞内シグナル伝達が活性化されれば、その被験物質は、本発明のタンパク質とTRAF3との相互作用を活性化する物質（本発明のTRAF3結合性タンパク質の機能を促進する物質）の候補物質として選択することができる。

上記スクリーニング系で使用することができる発現ベクター、宿主細胞などは当業者であれば適宜選択することができ、本明細書中上記したものを使用してもよい。

被験物質としては任意の物質を使用することができ、その種類は特に限定されない。被験物質の具体例としては、低分子合成化合物でもよいし、天然物抽出物でもよく、あるいは化合物ライブラリー、フェージディスプレイライブラリーもしくはコンビナトリアルライブラリーでもよい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。

(7) 本発明の医薬

TNFリガンドファミリーは細胞毒性、抗ウイルス活性、免疫調節活性および数種の遺伝子の転写制御を含む多数の細胞反応を誘導する最も多面的なサイトカインの一つとして知られている。TNFリガンドに対する細胞の応答は正常な生理学的反応のみならず、アポトーシスの増強またはアポトーシスの阻害にも関係する。アポトーシス調節の異常は多数の病因となる。細胞増加に関連する疾患またはアポトーシスの阻害に関する疾患としては、癌、自己免疫疾患、ウイルス感

染症、炎症、移植片対宿主疾患、急性移植片拒絶、および慢性移植片拒絶などが挙げられ、アポトーシスの増強に関連する疾患には、AIDS、神経変性疾患、骨髄形成異常症候群、虚血性損傷、トキシン誘導性肝疾患、敗血症ショック、悪液質および食欲不振などが挙げられる。

本発明のTRAF3結合性タンパク質は、TNF受容体スーパーファミリーには属さないものの、TRAF3に結合することからTNF受容体／リガンドスーパーファミリーが関与する慢性および急性炎症、関節炎、敗血症、自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、乾癬）、移植拒絶反応、移植片対宿主病、感染症、卒中、虚血、急性呼吸器疾患症候群、再狭窄、脳損傷、AIDS、骨疾患、癌（例えば、リンパ球増殖性疾患）、アテローム性動脈硬化症およびアルツハイマー病およびその他の疾患へ関与するものと考えられる。

従って、上記したスクリーニング法により得られる、本発明のTRAF3結合性タンパク質の機能を促進または抑制する物質は、このような疾患の治療および／または予防のための医薬として有用である。

即ち、本発明は、上記したスクリーニング法により得られる本発明のTRAF3結合性タンパク質の機能を促進または抑制する物質を有効成分として含む医薬にも関する。本発明の医薬は、例えば、TRAF3を介する細胞内シグナル伝達の異常に関連する疾患の予防または治療のために使用することができる。

本発明の医薬は一般的には、本発明のTRAF3結合性タンパク質の機能を促進または抑制する物質を有効成分として含み、さらに製剤用添加物（例えば、担体、賦形剤など）を含む医薬組成物の形態で提供される。

本発明の医薬の投与経路は特に限定されず、経口投与または非経口投与（例えば、筋肉内投与、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、鼻腔などへの粘膜投与、または吸入投与など）の何れでもよい。

本発明の医薬の形態は特に限定されず、経口投与のための製剤としては例えば、錠剤、カプセル剤、細粒剤、粉末剤、顆粒剤、液剤、シロップ剤などが挙げられ、

非経口投与のための製剤としては例えば、注射剤、点滴剤、座剤、吸入剤、経粘膜吸収剤、経皮吸収剤、点鼻剤、点耳剤などが挙げられる。

本発明の医薬の形態、使用すべき製剤用添加物、製剤の製造方法などは、いずれも当業者が適宜選択可能である。

本発明の医薬の投与量は、患者の性別、年齢または体重、症状の重症度、予防または治療といった投与目的、あるいは他の合併症状の有無などを総合的に考慮して適宜選択することができる。投与量は、一般的には、 $0.001 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日～ $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日、好ましくは $0.001 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日～ $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日である。

(8) 本発明のタンパク質のレベルを測定することによる疾患の診断方法

本発明はさらに、生体由来成分における本発明のタンパク質のレベルを測定することを含み、TRAF3を介する細胞内シグナル伝達の異常に関連する疾患の診断方法に関する。

上記した通り、本発明のタンパク質は、アポトーシス増強またはアポトーシス阻害に関係する様々な疾患に関与している可能性がある。従って、生体内における本発明のタンパク質の活性またはその量を測定することにより、TRAF3を介する細胞内シグナル伝達の異常に関連する疾患を診断することが可能になる。

本発明のタンパク質のレベルの測定は、当業者に公知の常法に従って行うことができ、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いる免疫学的方法で行ってもよいし、本発明のタンパク質をコードするmRNAの量を測定することによって行ってもよい。

実施例

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例により特に限定されるものではない。

(A) 材料および方法

A-1. 酵母を用いたタンパク質-タンパク質相互作用のスクリーニング

完全長TRAF3をコードするDNAを、CytoTrap(登録商標)ツーハイブリッド系(Stratagene, La Jolla, CA)においてベイト(bait)として使用した。この系で使用した酵母cdc25H株(cdc25遺伝子の温度感受性突然変異株)は以下に示す遺伝子型を有する: MAT α ura3, lys2, leu2, trp1, his200, ade101, cdc25-2, GAL+。ミリスチル化シグナル配列とWEHI231細胞由来のcDNA断片とのハイブリッドタンパク質のライブラリーを、プラスミドpMyr中で構築した。製造業者の推奨通り、変更を加えずにスクリーニングを実施した。

簡単に説明すると、上記酵母株を、適切な添加物質を補充したYPAD培地もしくはBurkholderの最少培地(BMM)中25°Cで増殖させ[Sato, T., 他, (1995) FEBS Lett. 358, 113-118]、酢酸リチウム法で形質転換した。その酵母形質転換体をBMM/ガラクトースプレート上で25°Cにて2日間増殖させ、続いて37°Cで増殖させた。TRAF3と相互作用を有するミリスチル化タンパク質を発現していると考えられる37°Cで増殖したコロニーを拾い、37°CにおけるBMM/グルコースプレートおよびBMM/ガラクトースプレート上での増殖について試験した。37°Cでガラクトース依存性増殖(pMyrに組み込まれたcDNAの発現はガラクトースに依存)を示すクローンからライブラリープラスミド(cDNAが組み込まれたpMyr)を単離し、プラスミドpSos/TRAF3もしくは陰性対照としてpSos/コラゲナーゼを用いてcdc25H細胞に再度形質転換した。pSos/TRAF3の存在下でのみcdc25H表現型を抑制するプラスミドの配列を決定した。DNAの配列決定は、Applied Biosystems 自動DNAシーケンサー、ABI PRISM 310 遺伝子解析機(Foster, CA)で行った。

A-2. ノーザンブロットハイブリダイゼーション

マウス組織(C3H/Hen Crj)から酸性グアニジンフェノールクロロホルム法により調製した10 μ gの全RNAを、ホルムアルデヒド含有1%アガロースゲル上で分離し、20 \times SSC中でHybond(登録商標)-N+(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)にトランスファーし、そしてUV架橋(Stratagene)

により固定化した。ハイブリダイゼーションプローブは、 $[\alpha - ^{32}\text{P}] \text{dCTP}$ (Amersham Pharmacia) によりランダムプライム法で放射標識したゲル精製DNA断片から作製した。プロットを、 $5 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times \text{デンハルト}$ の溶液、 0.1% SDS、 50% 脱イオン化ホルムアミド、および $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子DNAを含有する溶液中で 42°C にてハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、該プロットを室温にて $2 \times \text{SSC}$ および 0.1% SDS、続いて 65°C にて $0.1 \times \text{SSC}$ および 0.1% SDSを用いて洗浄した。該プロットを乾燥し、BAS 2500 (Fuji Ltd., Tokyo, Japan) を使用して分析した。

A-3. 発現プラスミドの構築およびトランスフェクション

T3BP発現構築物を作製するために、マウスT3BPの適切な領域をPCRで増幅し、EcoRIおよびXhoI制限部位を利用してpcDNA 3.1 (-) myc his version B (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中にサブクローニングして、pcDNA/T3BPを得た。T3BPを、C末端に標識したMYC融合タンパク質として発現させた。

EGFP標識T3BP発現プラスミドの構築のために、完全長コード領域をPCRで増幅し、EcoRIおよびXhoI制限部位を利用してpEGFP-N2 (Clontech, California, CA) にライゲートしてpEGFP/T3BPを得た。

FLAG標識マウスTRAF2およびTRAF3をコードする哺乳動物発現ベクターをPCRに基づく方法で作製した。

全ての発現構築物は、ABI PRISM 310 遺伝子解析機を使用して配列決定した。

A-4. 細胞培養およびトランスフェクション

ヒト胎児腎臓由来293細胞は、 10% 仔ウシ血清 (HyClone, Logan, UT)、 $100 \text{U}/\text{ml}$ ペニシリンおよび $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (GIBCO-BRL, Grand Island, NY) を含有するイーグルの最少必須培地中で維持した。WEHI 231細胞は、 10% 仔ウシ血清 (HyClone)、 $5.5 \times 10^{-5} \text{M}$ の2-メルカプトエタノール、 $100 \text{U}/\text{ml}$ ペニシリンおよび $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (GIBCO-BRL) を含有するRPMI-1640培地中で維持した。293細

胞を、10 cm培養皿中に細胞 10^6 個/皿の濃度で接種し、2～3日間培養した。続いて該細胞を、市販溶液 (Eppendorf-5 Prime, Inc., Boulder, CO) を使用した標準リン酸カルシウム共沈法を用いてトランスフェクトした。

A-5. GSTプルダウンアッセイ

GSTプルダウンアッセイのために、GST融合タンパク質を、IPTG誘導後、pGEXベクター (Amersham Pharmacia) を使用して大腸菌 (BLR) で発現させ、グルタチオンビーズ (Amersham Pharmacia) で精製した。FLAG標識 TRAF 2、TRAF 3、TRAF 5、TRAF 6を293細胞中で発現させた。細胞溶解物は、E1Aバッファー (50mM HEPES [pH7.6]、250mM NaCl、0.1% NP-40 および 5mM EDTA) を溶解剤として使用することにより、トランスフェクション細胞から調製した。該細胞溶解物を透明にして、グルタチオンビーズ上に固定化した $2\mu\text{g}$ のGSTもしくはGST融合タンパク質と共にインキュベートした。そのグルタチオンビーズをE1Aバッファーで十分に洗浄した。サンプルを10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、PVDF膜にトランスファーした。ブロッキング後、該膜を抗FLAG M2抗体で処理し、強化型化学発光プロトコール (ECL, Amersham Pharmacia) に従って、5,000倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体 (Bio-Rad) を用いて免疫反応性タンパク質を検出した。TRAF 3の*in vitro*転写・翻訳、35-Sメチオニン標識はT7リンク転写・翻訳システム (Amersham Pharmacia) に従い、検出はフルオログラフィーにて行った。

A-6. 免疫沈降アッセイ

上記細胞を5 mMのEDTAを含有するPBS中でプレートから剥がし、同緩衝液を用いて3回洗浄した。該細胞を1 mlのE1A緩衝液中に4℃にて10分間溶解させた。その細胞溶解物を遠心分離し、上清を細胞抽出物として使用した。該細胞抽出物を、抗FLAG M2抗体、抗MYC 9E10抗体もしくは対照抗体と共に4℃にて2時間インキュベートし、続いてプロテインGセファロースFF (Amersham Pharmacia) による処理を行った。このセファロースビーズをE

1 A緩衝液で十分に洗浄した。サンプルを10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、上述のように免疫反応性タンパク質を抗FLAG M2抗体もしくは抗MYC 9E10抗体を用いて検出した。

A-7. 蛍光顕微鏡法

カバーガラス上で培養したHEK293細胞を、種々の構築物を用いてトランスフェクションした。24時間後に、細胞を3.7%ホルマリンを含有するPBS中で室温にて10分間固定した。細胞をPBSで3回洗浄し、室温にて5分間、PBS中0.2% Triton X-100で処理した。スキムミルクでブロッキングした後、抗FLAG M2モノクローナル抗体もしくは抗MYC 9E10抗体 (Sigma) などの各種一次抗体と一緒に、続いてCy5結合二次抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)と一緒に細胞をインキュベートした。細胞をPBSで3回洗浄し、スライドガラス上にのせた。

蛍光を Carl Zeiss LSM510 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Oberkochen, Germany) を使用して可視化した。

A-8. Fアクチンの定量化

Fアクチン含量測定を既報の通り実施した [Mizuno., 他、(1998) J. Pharm. Pharmacol. 50, 645-648]。簡単に説明すると、リン酸カルシウム法により、12ウェルプレート上で培養した293細胞を指示した量のT3BP発現プラスミドを用いて一時的にトランスフェクションした。トランスフェクトされた全DNA (2 μ g) は、空のベクターに担持することにより一定に維持した。24時間後に、そのトランスフェクション細胞をPBS中で3.7%ホルマリンを用いて37°Cにて10分間固定した。PBS中0.2% Triton X-100を用いて室温で10分間透過した後、細胞をPBS中10 U/mlのローダミン-ファロイジン (Molecular Probe) で室温にて1時間染色した。PBSで十分に洗浄した後、結合したFITC-ファロイジンをメタノールを用いて氷上で1時間抽出した。その蛍光強度を、分光計F-3010 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) を使用して488 nmの励起波長および510 nmの発光波長で測定した。結果を、対照トランスフェク

ト細胞の蛍光強度の比から算出した相対蛍光強度として表した。

(B) 結果

B-1. T3BPをコードするcDNAクローンの単離

TRAF3と直接結合するタンパク質を同定するために、酵母におけるタンパク質-タンパク質相互作用に基づくスクリーニングを実施した。サッカロミセス・セレビシエ(*S. cerevisiae*) cdc25H株は、cdc25遺伝子に温度感受性点突然変異が含まれているため、宿主の増殖は37°Cでは阻害されるが、許容温度(25°C)では正常である。cdc25遺伝子は、RASと結合して活性化することにより細胞増殖を導くグアニルヌクレオチド変換因子をコードしている。本実施例で使用した系は、cdc25欠陥を相補し、酵母RASシグナル伝達経路を活性化するヒト由来Sosの能力を利用している；hSos融合タンパク質(hSos-TRAF3)が発現して、それがタンパク質-タンパク質相互作用を介して形質膜に局在化すると、cdc25H株は37°Cにおいても増殖する。

プラスミドpSos/TRAF3を含む酵母を、ミリスチル化シグナルに融合して形質膜に局在化するWEHI231細胞cDNA発現ライブラリーを用いて形質転換した。約 2×10^5 個の形質転換体を、BMM/ガラクトースプレート上25°Cで2日間増殖させ、次に37°Cのインキュベーターに移した。37°Cで増殖したコロニーを拾い、37°CにおけるBMM/グルコースプレートおよびBMM/ガラクトースプレート上での増殖について試験した。ライブラリープラスミドを、37°Cにおいてガラクトース依存性増殖を示すクローンから単離し、pSos/TRAF3もしくは陰性対照としてpSos/コラゲナーゼを用いてcdc25H細胞に再度形質転換後、pSos/TRAF3の存在下においてのみcdc25H表現型を抑制する9個のcDNAを得た。これらのうちの1つであるクローン3は新規タンパク質の一部をコードしていた。

クローン3中に挿入されている完全長cDNAを単離するために、部分cDNAをプローブとして使用してWEHI231細胞由来のpMrycDNAライブラリーをスクリーニングし、陽性クローンを得た。陽性クローンのDNA配列決

定により、推定分子量18,846ダルトンを有する175アミノ酸のタンパク質をコードすると予測されるオープンリーディングフレームの存在が明らかになった(図1A、配列表の配列番号1及び配列番号2)。この新規タンパク質をT3BPと称する。

図1Aは、全長T3BP cDNAのヌクレオチド配列から推定されたアミノ酸配列を示す。クローン3によりコードされる配列には下線を付してある。網掛けのボックスは推定膜貫通ドメインを示す。

BLASTおよびFASTAプログラムを利用したデータベース検索により、T3BP cDNAが、マウス白血病およびリンパ腫における、体細胞により獲得されたプロウイルスのフランキング配列として報告された配列(AF193161)を含むことが判明した。また、ヒトB細胞成熟因子(BCMA)がT3BPに対し有意な配列類似性を有し、T3BPに対して28%の同一性および42%の類似性を有していた。TmPredプログラムを用いて作製したヒドロパシープロットにより、T3BPが推定膜貫通領域(アミノ酸77-97)を有することが示唆された。PROSITE解析によって、N-グリコシル化部位(アミノ酸23-26)およびN-ミリスチル化部位(アミノ酸81-86)が同定された。PSORT解析によって、このタンパク質がI型膜タンパク質立体構造を有し、形質膜に位置すると推測された。

T3BPの発現パターンを、6種の組織およびWEHI231細胞を用いたノーザンブロットハイブリダイゼーションにより調べた。結果を図1Bに示す。図1Bでは、ブロットを200bのT3BP cDNAプローブを用いてハイブリダイズした。リボソームRNAの位置を左側に示す。

図1Bに示すように、T3BP遺伝子はWEHI231細胞中に約2kbのmRNAを示した。しかしながら、T3BP mRNAは試験した他のマウス組織では検出されなかった。

B-2. TRAF3と特異的に相互作用するT3BP

酵母でのアッセイで観察されたTRAF3とT3BPとの相互作用を確認する

ために、クローン3およびクローン10をGST融合タンパク質として発現させ、TRAF2もしくはTRAF3に対する結合をGSTプルダウンアッセイで試験した。FLAG標識TRAF2もしくはTRAF3を過剰発現する293細胞の細胞溶解物を、GST-クローン3、GST-クローン10もしくはGST単独と一緒にインキュベートし、GST融合タンパク質に結合したTRAFを、グルタチオンセファロースで沈降させた。該TRAFをSDS-PAGEにより分離し、抗FLAG M2抗体を用いたイムノブロッティングで検出した。該細胞溶解物におけるFLAG標識TRAFの発現レベルもまた、抗FLAG M2抗体を用いたイムノブロッティングでモニターした。結果を図2Aに示す。

図2Aで示すように、GST-クローン3は、TRAF2よりもTRAF3に優先的に結合する。一方、GST-クローン10はTRAF2およびTRAF3に対して同様に相互作用する。クローン10の配列解析により、このクローンが、TRAF結合ドメインのコンセンサス配列(PXQXT/S、アミノ酸583-587)を含む、mnkプロテインキナーゼ相同体mp86(Dyrk; MMU 58497、アミノ酸284-763)の一部をコードすることが判明した。しかし、クローン3にはこの配列を含まない。

さらにクローン3と他のTRAFファミリー(TRAF5, 6)との結合特異性を比較するため、同様にGSTプルダウンアッセイを行ったところ、図2Bに示すように、GST-T3BP(クローン3)は他のTRAFに比較してTRAF3と一番強く結合した。

TRAF3とT3BPとの相互作用を、哺乳動物細胞における共免疫沈降アッセイにより分析した。結果を図2Cに示す。まず、293細胞を、MYC標識T3BP(C末端MYCエピトープ標識を含む完全長T3BP)およびFLAG標識TRAF3をコードする発現ベクターを用いて一時的にトランスフェクションした。細胞抽出物を調製し、抗MYC 9E10抗体、抗FLAG M2抗体(抗FLAGモノクローナル抗体)、または対照のマウスIgGを用いて免疫沈降(IP)を行った。共沈するFLAG-TRAF3またはMYC-T3BPを、それ

ぞれ抗FLAG M2抗体（図2Cの上部）または抗MYC 9E10抗体（図2Cの下部）を用いたイムノブロッティング分析で検出した。該細胞溶解物におけるT3BPおよびTRAF3の発現レベルも、それぞれ抗MYC 9E10抗体または抗FLAG M2抗体を用いたイムノブロッティングで測定した。図2Cには、T3BPおよびTRAF3の位置を示す。IgのH鎖およびL鎖の位置も示した。

図2C下図に示す通り、抗MYC抗体は、MYC標識T3BP発現プラスミドによるトランスフェクション細胞溶解物中にアミノ酸配列から推定されたものより大きい（35-50kDa）複数のバンドを特異的に認識したが、対照抗体の場合には認識しなかった。FLAG標識TRAF3によって沈降されるT3BPが約40kDaの位置に検出され（下図）、逆にMYC標識T3BPによって沈降されるTRAF3が約64kDaの位置に検出された（上図）。

B-3. TRAF3中のT3BP結合ドメインのマッピング

T3BPとの結合に関与するTRAF3の領域を決定するために、FLAG標識TRAF3の種々のトランケーション突然変異体を293細胞中で発現させ、GSTプルダウンアッセイを実施した。まず、293細胞を、FLAG標識TRAF3トランケーション突然変異体を用いて一時的にトランスフェクトした。細胞抽出物を調製し、GST-クローン3もしくはGST単独と共にインキュベートした。GST融合タンパク質に結合したTRAFを、グルタチオンセファロースにより沈降させ、SDS-PAGEにより分離し、抗FLAG M2抗体を用いたイムノブロッティングで検出した。細胞溶解物におけるFLAG標識TRAF3トランケーション突然変異体の発現レベルを抗FLAG M2抗体を用いたイムノブロッティングで監視した。結果を図3Aに示す。図3Aから分かるように、TRAF3のTRAFドメインがT3BPと相互作用するために必要であることが判明した。

これを確認するために、hSosに融合させたTRAF3トランケーション突然変異体を作製し、酵母でのタンパク質-タンパク質相互作用アッセイにおいて

T3BPとの相互作用について試験した。具体的には、酵母細胞cdc25Hを指示した構築物を用いてトランスフェクトし、上述の方法と同様に増殖についてアッセイした。許容温度以上で増殖したコロニーは陽性であり、許容温度以上では増殖できないコロニーは陰性である(図3B)。このアッセイによって、TRAF3ドメインがT3BP結合に重要であることが示唆された。図3Cは、マウスTRAF3の一次構造の概略を示す。

B-4. T3BP中のTRAF3結合ドメインのマッピング

TRAF3との結合に関与するT3BPの領域を決定するため、T3BPの種々のトランケーション突然変異体をGST融合蛋白質として大腸菌で発現させ、*in vitro*転写・翻訳、³⁵S-メチオニン標識したTRAF3と共にインキュベーションした。GST融合蛋白質に結合したT3BPをグルタチオンセファロースにより沈降させ、SDS-PAGEにより分離しフルオログラフィーにて検出した。図4Aに示すように、T3BPの151番目以降のアミノ酸を含むC末端部分がTRAF3との相互作用に必要であることが判明した。さらにFLAG標識TRAF3を293細胞中で発現させ、GST及びGST融合T3BPトランケーション突然変異体による293細胞溶解物のGSTプルダウンアッセイを実施したところ、図4Bに示すように抗FRAG M2抗体で検出される結合パターンは図4Aの*in vitro*転写・翻訳産物による結合試験と完全に一致した。図4CはT3BPの一次構造とそのTRAF3結合領域を示す(TMは膜貫通領域)。

B-5. T3BPの細胞分布

T3BPの機能について調べるために、その細胞小器官局在化を蛍光顕微鏡法により調べた。カバーガラス上で培養した293細胞を、pEGFP-N2(対照プラスミド;左側)もしくはpEGFP/T3BP(EGFP標識T3BP発現プラスミド;右側)を用いて一時的にトランスフェクションした。24時間後に細胞を3.7%ホルマリン中で固定した。次にEGFPの蛍光を共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて画像化した。結果を図5Aに示す。

図5Aに示すように、EGFP標識T3BPの発現により形態の変化が誘導された。EGFP標識T3BP発現細胞においては、細胞形状が接着性になり、細胞表面から多くのスパイクが発達した。EGFP融合T3BPの大部分の蛍光が細胞表面およびスパイクにおいて観察された。この観察結果はPSORTによる予測と一致するものである。

次に、TRAF3細胞分布に及ぼすT3BP発現の影響を試験した。カバーガラス上で培養した293細胞を、pEGFP-N2およびpCR/FLAG-TRAF3 (図5B-a, b, c)、またはpEGFP/T3BPおよびpCR/FLAG-TRAF3 (図5B-d, e, f)を用いてトランスフェクトした。2日後に細胞を3.7%ホルマリン中で固定し、0.2%TritonX-100で処理した。ブロッキング後、間接免疫蛍光分析を行った。抗FLAG M2抗体を一次抗体として使用し、続いてCy5-結合二次抗体処理を行った。EGFPおよびCy5からの蛍光を、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて画像化した。上部; EGFPの蛍光画像、中央; Cy5結合二次抗体の蛍光画像、下部; 合併した画像。バーは50 μ m。

図5B-bから分かるように、EGFPおよびFLAG標識TRAF3を共発現する細胞において、FLAG標識TRAF3が核の周辺において可視化された (図5B-b)。EGFP標識T3BPおよびFLAG標識TRAF3を共発現する細胞においては、EGFP標識T3BPが局在化していた細胞表面およびスパイクにおいて、FLAG標識TRAF3が観察された (図5B-e)。

B-6. 細胞性Fアクチン含量に及ぼすT3BPの影響

細胞性Fアクチンに及ぼすT3BPの影響を調べるために、pcDNA/T3BPでトランスフェクションした細胞におけるFアクチンの細胞含量を測定した。12ウェルプレート上で培養した293細胞を、指示した量のpcDNA/T3BPを用いてトランスフェクトした。24時間後に、上述の方法と同様にFITC-ファロイジンを用いてFアクチンレベルを測定した。

結果を図6Aに示す。図6Aから分かるように、T3BPによって濃度依存的

に細胞性Fアクチン含量が増大した。

T3BPによって細胞性Fアクチン含量が増大することを確認するために、MYC標識T3BPを発現する細胞中におけるFアクチンの細胞分布を観察した(図6B)。具体的には、カバーガラス上で培養した293細胞を、pEGFP-N2およびpcDNA(図6B-a)、またはpEGFP-N2およびpcDNA/MYC-T3BP(図6B-b)を用いてトランスフェクションした。24時間後に細胞を3.7%ホルマリン中で固定し、0.2%TritonX-100で処理した。ブロッキング後、細胞をローダミン-ファロイジンで染色した。EGFPからの蛍光(緑色)およびローダミンからの蛍光(赤色)を、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて画像化した。バーは50 μ m。

図6B-bから分かるように、MYC標識T3BP発現によって細胞形状の変化が引き起こされ、T3BPにより誘導されたスパイクはローダミン-ファロイジンにより染色された。

(C) 結論

本実施例では、酵母でのタンパク質-タンパク質相互作用に基づくスクリーニングにより新規なTRAF3結合タンパク質T3BPが同定された。T3BPとTRAF3との結合は、GSTプルダウンアッセイおよび共免疫沈降アッセイにより確認した(図2C)。さらにT3BPとTRAF3は、両方のタンパク質を共発現する細胞中に共局在していた(図5B)。T3BPは、TRAFファミリーの中でTRAF3と優先的に相互作用した。最近の報告によれば、TRAFファミリーの唯一の因子と特異的に相互作用するTRAF結合タンパク質が明らかになった[Gamper, C., 他、(2000) Mol. Immunol. 37, 73-84; Ling, L., 他、(2000) J. Biol. Chem. 275, 23852-23860; 及び Ling, L., 他、(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 9567-9572]。MIP-T3はTRAF3特異的TRAF結合タンパク質として同定され、そしてMIP-T3が微小管に結合しTRAF3を微小管に集めることによって、TRAF3が微小管に結合する(Ling, L., 他、(2000) J. Biol. Chem. 275, 23852-23860)。ヌクレオポリンもまたTRAF3

特異的 T R A F 結合タンパク質として同定された (Gamper, C., 他、(2000) Mol. Immunol. 37, 73-84)。T R A F は特にシグナル伝達カスケードにおいて過剰にまたは特異的に働くと考えられるので、T R A F ファミリーの単一の因子に特異的な T R A F 結合タンパク質の同定および解析は個々の T R A F タンパク質の役割の多様性から見て重要である。

T 3 B P は、17番目の因子として T N F R スーパーファミリーに属するヒト B C M A に対して有意な配列類似性を有する [Madry C., 他、(2000) Int. Immunol. 10, 1693-1702]。興味深いことに、T 3 B P の発現は、B C M A の場合と同様に B 細胞系統の特定の段階に限定され [Laabi, Y., 他、(1992) EMBO J. 11, 3897-3904; 及び Laabi, Y., 他、(1994) Nucleic Acid Res. 22, 1147-1154]、細胞表面に分布する可能性がある (図 1 B および図 5 B)。これ以外にも、T 3 B P 遺伝子がマウス白血病およびリンパ腫におけるマウス白血病レトロウイルスの挿入によって破壊されることが報告されている [Hansen, G.M., 他、(2000) Genome Res. 10, 237-43]。以上から、T 3 B P は B 細胞分化において細胞表面受容体として重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、T 3 B P は推定細胞外領域にシステインリッチ領域をもたないため腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーには属さない。

本発明によって明らかとなった新規 T R A F 3 結合蛋白質は、最近報告された B A F F [T N F ファミリーの B 細胞活性化因子: B cell activation factor from the TNF family (BAFF)] の特異的な受容体 [Thompson, J.S., 他、(2001) Science 293, 2108-2111] と一致した。B A F F は B 細胞の増殖に関係し [Schneider, P., 他、(1999) J. Exp. Med. 189, 1747-1756]、B A F F を高発現させたマウスは成熟 B 細胞の過形成や全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus) の症状を呈することから、自己反応性 B 細胞の増殖による自己免疫疾患への関連が示唆されている [Mackay, F., 他、(1999) J. Exp. Med. 190, 1697-1710, Batten, M., 他、J. Exp. Med. (2000) 192, 1453-1466]。従って、B A F F を介した B 細胞増殖の細胞内情報伝達系に対し T R A F 3 は重要な機能を有しているものと推

定され、BAFFとTRAF3結合性B細胞特異受容体との相互作用の調節のみならず、TRAF3結合性B細胞特異受容体とTRAF3間の相互作用の調節による自己免疫疾患に対する治療薬の開発が期待される。

産業上の利用可能性

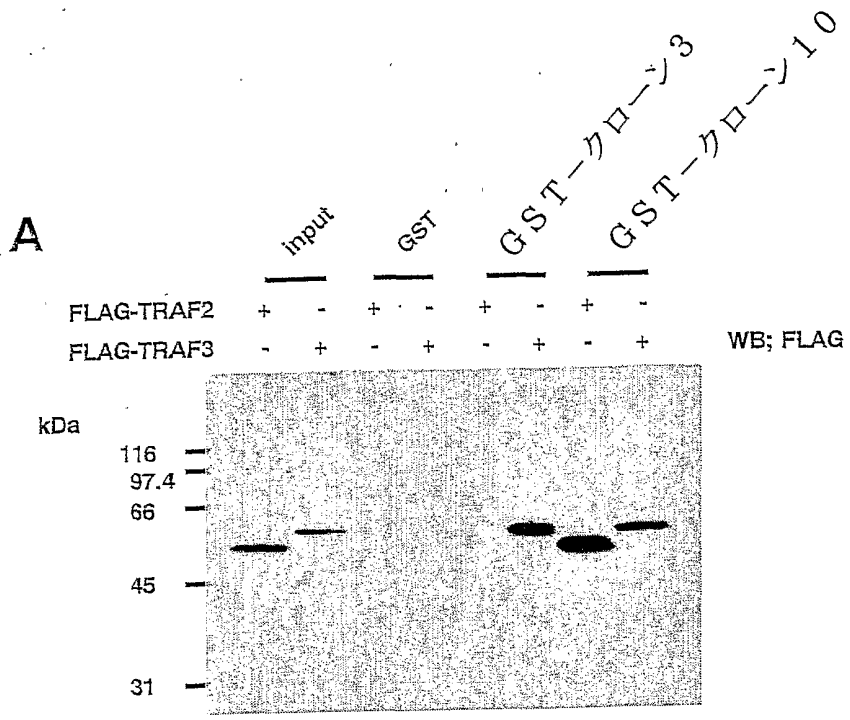
本発明により、TRAF3に結合する新規なシグナル伝達分子が同定された。また、本発明によりTRAF3に結合するシグナル伝達分子をコードする遺伝子がクローニングされた。本発明で同定された新規タンパク質を利用することにより新規な医薬を開発したり、疾患の診断方法を提供することが可能になる。

請 求 の 範 囲

1. 下記の何れかのアミノ酸配列を有するタンパク質。
 - (a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列；
 - (b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換及び／または挿入したアミノ酸配列であって、TRAF3に対する結合活性を有するアミノ酸配列；または、
 - (c) 配列番号1に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、TRAF3に対する結合活性を有するアミノ酸配列；
2. 請求項1に記載のタンパク質をコードする遺伝子。
3. 下記の何れかの塩基配列を有する遺伝子。
 - (a) 配列番号2に記載の塩基配列；
 - (b) 配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基が欠失、付加または置換されている塩基配列であって、TRAF3に対する結合活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；または
 - (c) 配列番号2に記載の塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、TRAF3に対する結合活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；
4. 請求項2または3に記載の遺伝子を含むベクター。
5. 請求項2または3に記載の遺伝子または請求項4に記載のベクターを有する形質転換体。
6. 請求項5に記載の形質転換体を用いることを特徴とする、TRAF3に対する結合活性を有するタンパク質の製造方法。
7. 請求項1に記載のタンパク質を認識する抗体。
8. 請求項1に記載のタンパク質、若しくはTRAF3、または請求項7に記載の抗体を用いて、該タンパク質または抗体の機能を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法。

9. 前記タンパク質が配列番号1に記載のアミノ酸配列の151番目から175番目までのアミノ酸配列を少なくとも含む、請求項8に記載の方法。
10. 前記TRAF3がTRAF-Cドメインに相当する配列番号1に記載のアミノ酸配列の414番目から567番目までのアミノ酸配列を少なくとも含む、請求項8に記載の方法。
11. 請求項1に記載のタンパク質、若しくはTRAF3、または請求項7に記載の抗体の機能を促進または抑制する物質が、TRAF3を介した細胞内シグナル伝達を促進または抑制する物質である、請求項8ないし10のいずれか1項に記載の方法。
12. 請求項8ないし11のいずれか1項に記載の方法により得られる、請求項1に記載のタンパク質の機能を促進または抑制する物質。
13. 請求項12に記載の物質を有効成分として含む医薬。
14. TRAF3を介する細胞内シグナル伝達の異常に関連する疾患の予防または治療のために使用する、請求項13に記載の医薬。
15. 生体由来成分における請求項1に記載のタンパク質のレベルを測定することを含む、TRAF3を介する細胞内シグナル伝達の異常に関連する疾患の診断方法。

図 2 A



☒ 2 B

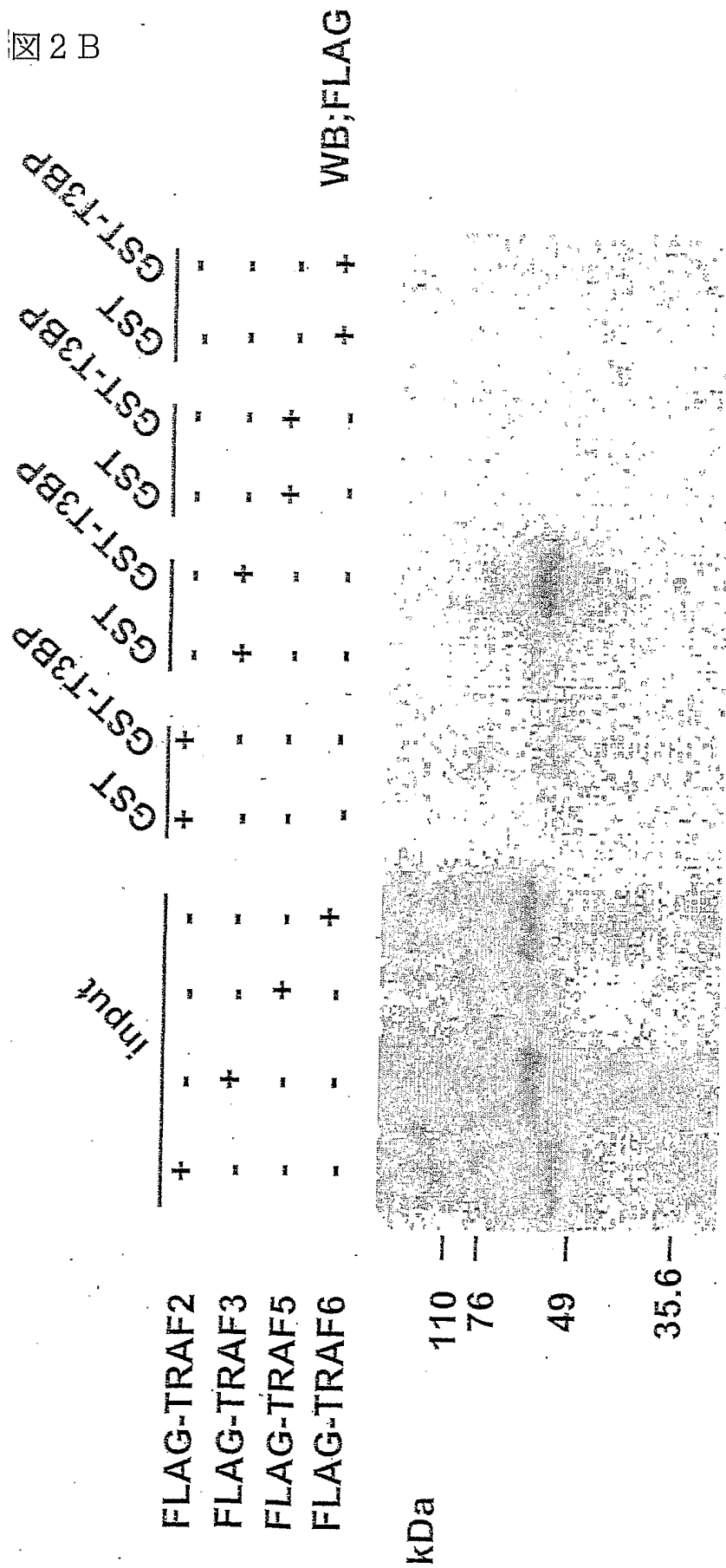


图 2 C

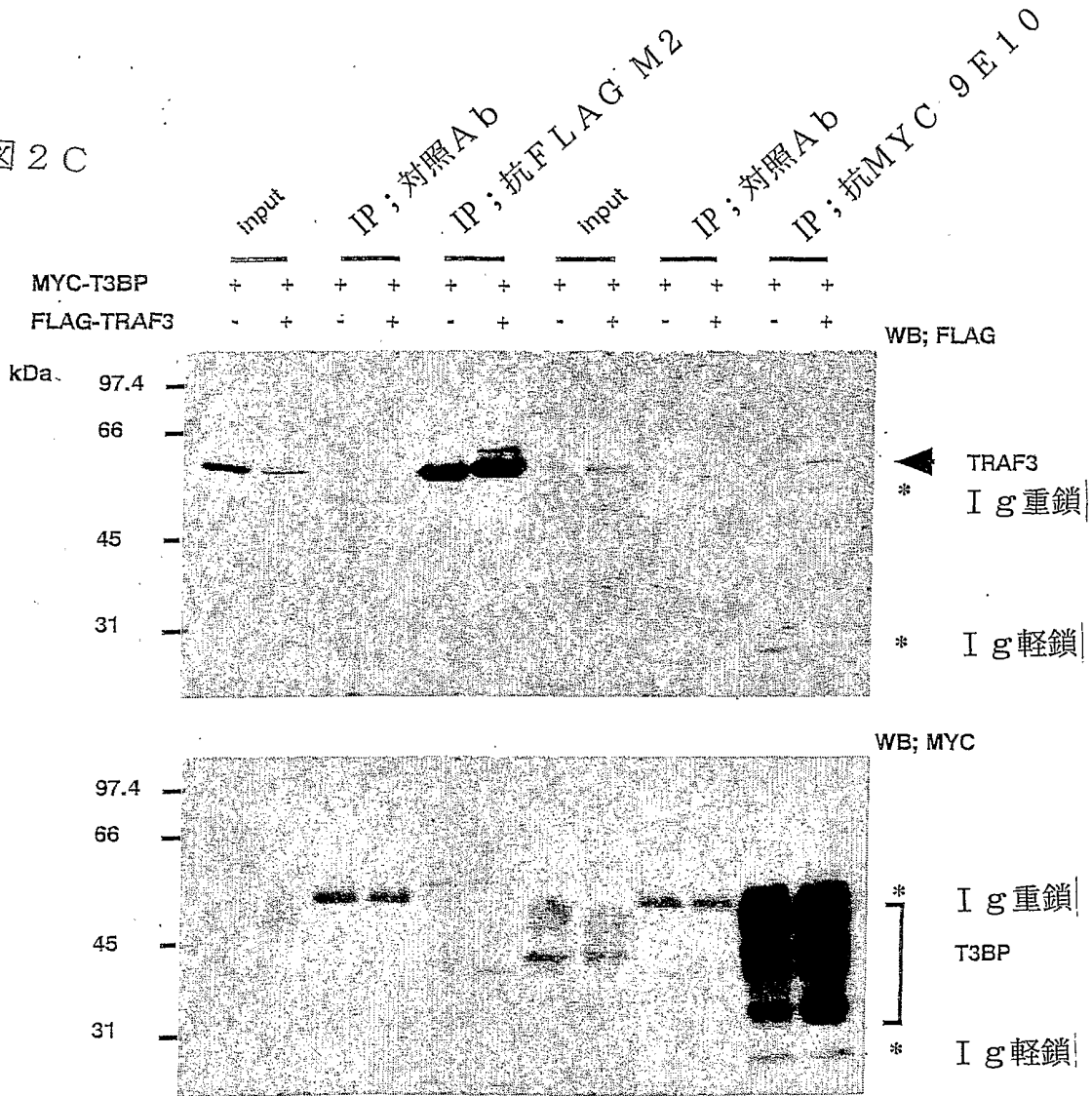


図 3 A

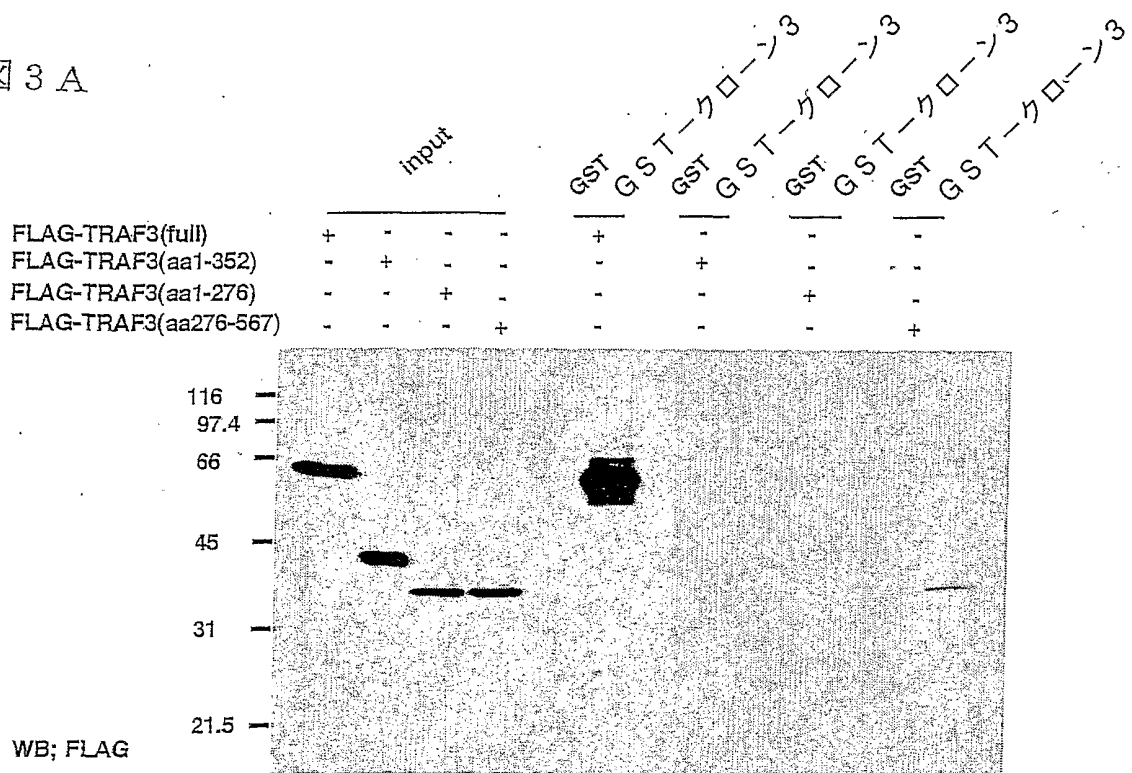
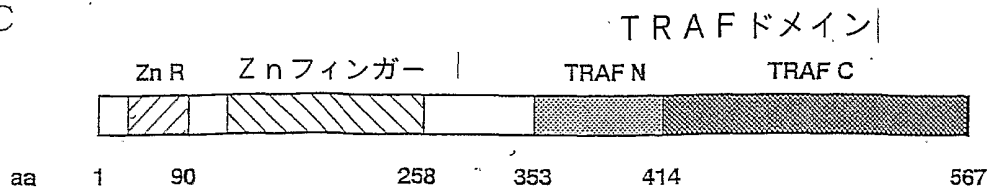


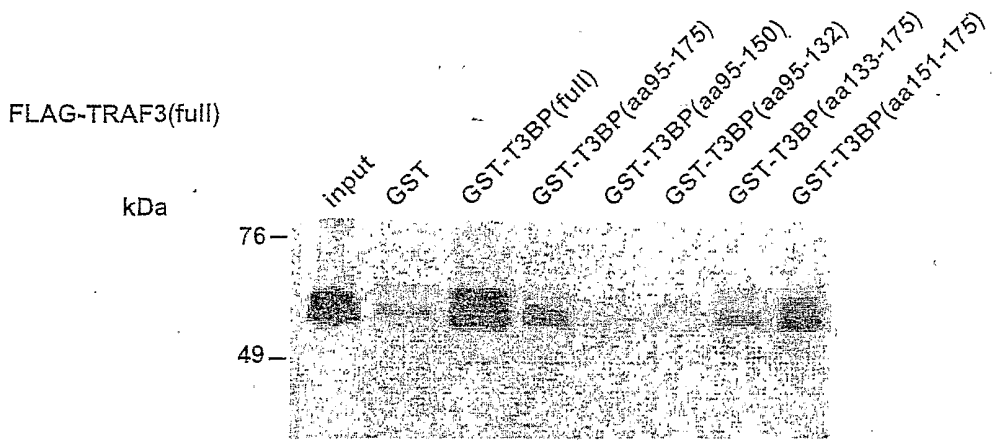
図 3 B

構築物	標的	相互作用
pSos/TRAF3(aa1-258)	pMry/クローン3	-
pSos/TRAF3(aa1-414)	pMry/クローン3	-
pSos/TRAF3(full)	pMry/クローン3	++
pSos/TRAF3(aa90-567)	pMry/クローン3	+

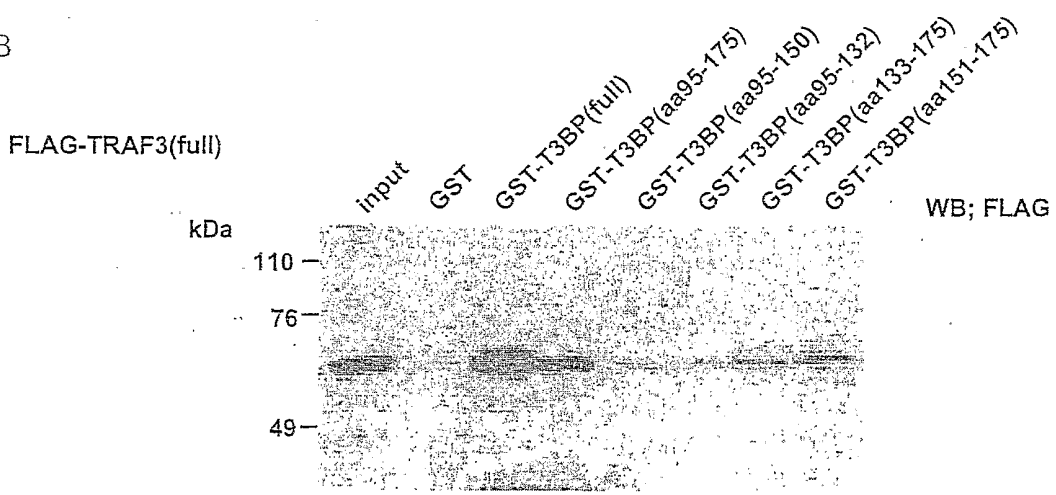
図 3 C



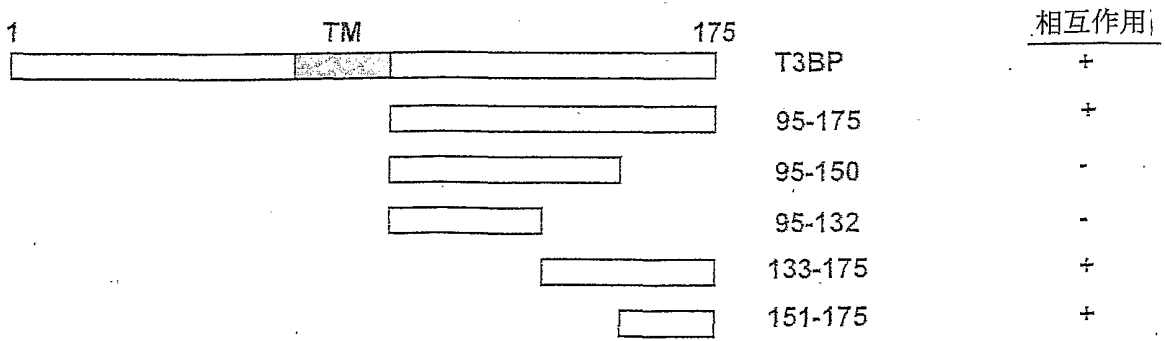
☒ 4 A



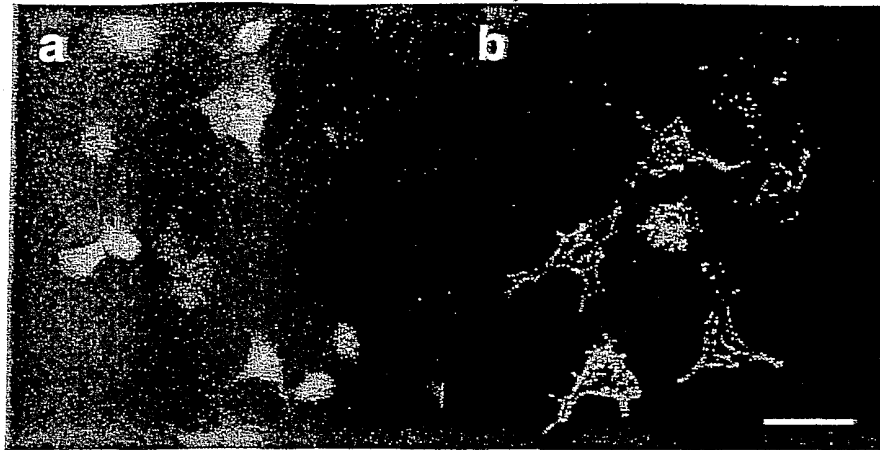
☒ 4 B



☒ 4 C



☒ 5 A



☒ 5 B

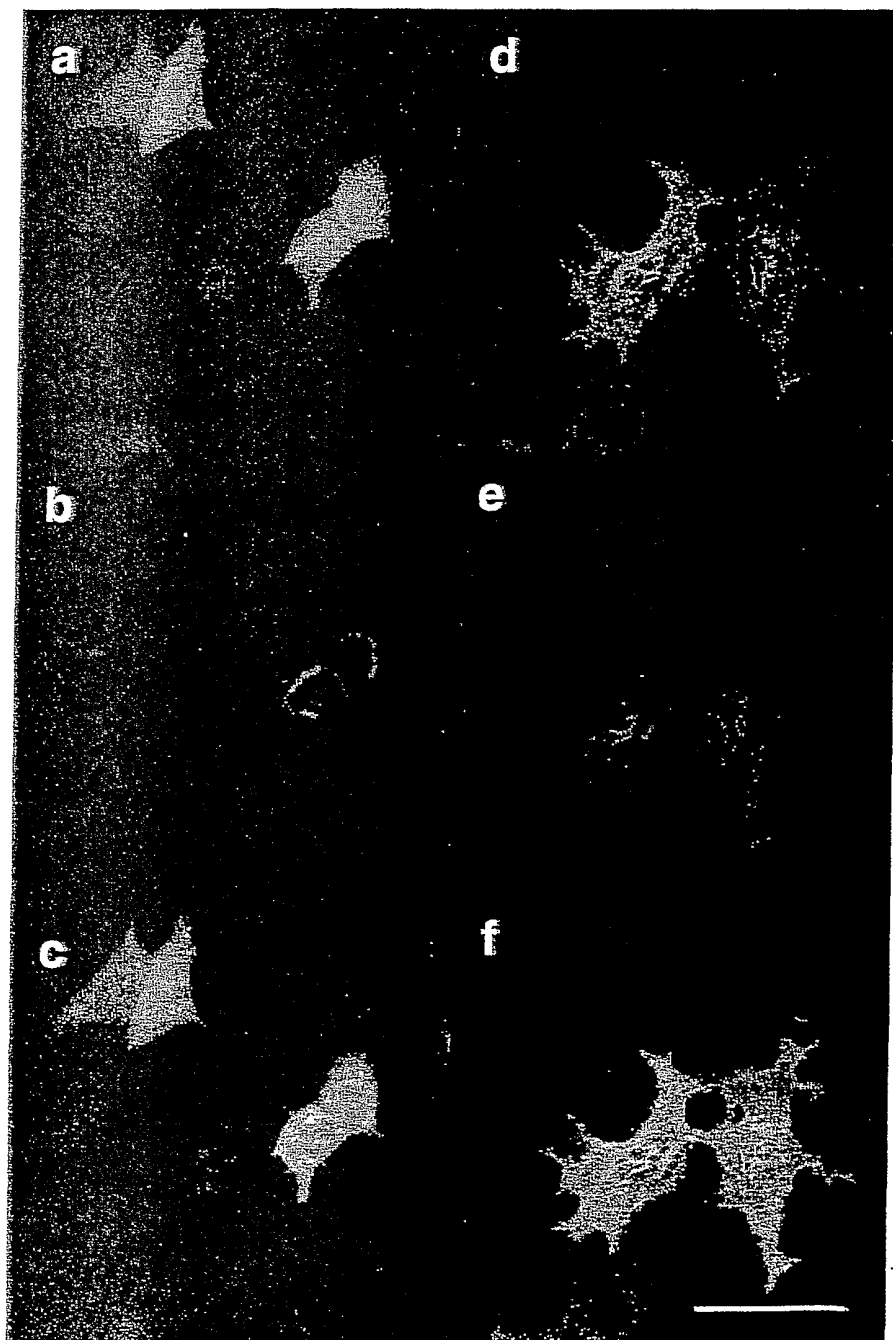


図 6 A

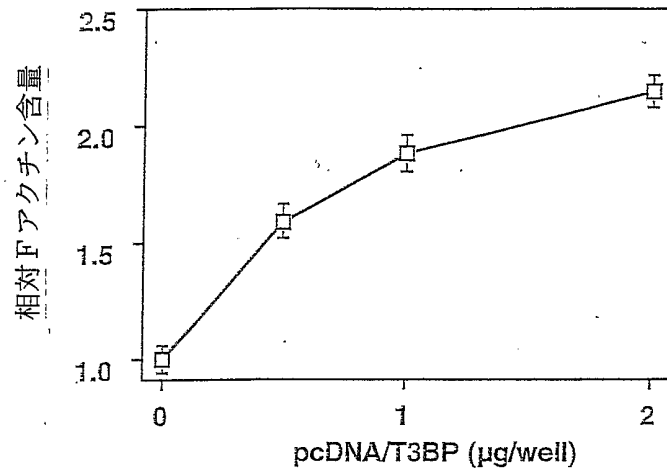
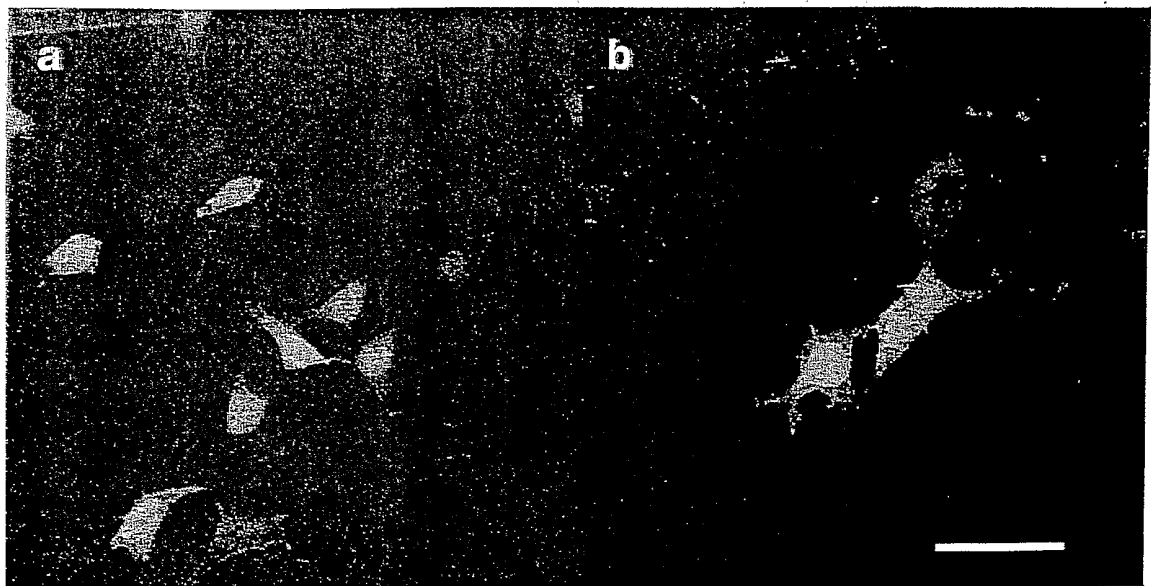


図 6 B



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> A TRAF3-binding B cell specific receptor

<130> A21041M

<160> 2

<210> 1

<211> 175

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Gly Ala Arg Arg Leu Arg Phe Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val
 20 25 30
 Arg Asn Cys Val Ser Cys Glu Leu Phe His Thr Pro Asp Thr Gly His
 35 40 45
 Thr Ser Ser Leu Glu Pro Gly Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Gly Ser
 50 55 60
 Ala Leu Arg Pro Asp Val Ala Leu Leu Val Gly Ala Pro Ala Leu Leu
 65 70 75 80
 Gly Leu Ile Leu Ala Leu Thr Leu Val Gly Leu Val Ser Leu Val Ser
 85 90 95
 Trp Arg Trp Arg Gln Gln Leu Arg Thr Ala Ser Pro Asp Thr Ser Glu
 100 105 110
 Gly Val Gln Gln Glu Ser Leu Glu Asn Val Phe Val Pro Ser Ser Glu

115 120 125
 Thr Pro His Ala Ser Ala Pro Thr Trp Pro Pro Leu Lys Glu Asp Ala
 130 135 140
 Asp Ser Ala Leu Pro Arg His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu
 145 150 155 160
 Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln
 165 170 175

<210> 2

<211> 528

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 2

ATG GGC GCC AGG AGA CTC CGG TTC CGA AGC CAG AGG AGC CGG GAC AGC 48
 Met Gly Ala Arg Arg Leu Arg Phe Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser
 1 5 10 15
 TCG GTG CCC ACC CAG TGC AAT CAG ACC GAG TGC TTC GAC CCT CTG GTG 96
 Ser Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val
 20 25 30
 AGA AAC TGC GTG TCC TGT GAG CTC TTC CAC ACG CCG GAC ACT GGA CAT 144
 Arg Asn Cys Val Ser Cys Glu Leu Phe His Thr Pro Asp Thr Gly His
 35 40 45
 ACA AGC AGC CTG GAG CCT GGG ACA GCT CTG CAG CCT CAG GAG GGC TCC 192
 Thr Ser Ser Leu Glu Pro Gly Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Gly Ser
 50 55 60
 GCG CTG AGA CCC GAC GTG GCG CTG CTC GTC GGT GCC CCC GCA CTC CTG 240
 Ala Leu Arg Pro Asp Val Ala Leu Leu Val Gly Ala Pro Ala Leu Leu

65	70	75	80	
GGA CTG ATA CTG GCG CTG ACC CTG GTG GGT CTA GTG AGT CTG GTG AGC	288			
Gly Leu Ile Leu Ala Leu Thr Leu Val Gly Leu Val Ser Leu Val Ser				
	85	90	95	
TGG AGG TGG CGT CAA CAG CTC AGG ACG GCC TCC CCA GAC ACT TCA GAA	336			
Trp Arg Trp Arg Gln Gln Leu Arg Thr Ala Ser Pro Asp Thr Ser Glu				
	100	105	110	
GGA GTC CAG CAA GAG TCC CTG GAA AAT GTC TTT GTA CCC TCC TCA GAA	384			
Gly Val Gln Gln Glu Ser Leu Glu Asn Val Phe Val Pro Ser Ser Glu				
	115	120	125	
ACC CCT CAT GCC TCA GCT CCT ACC TGG CCT CCG CTC AAA GAA GAT GCA	432			
Thr Pro His Ala Ser Ala Pro Thr Trp Pro Pro Leu Lys Glu Asp Ala				
	130	135	140	
GAC AGC GCC CTG CCA CGC CAC AGC GTC CCG GTG CCC GCC ACA GAA CTG	480			
Asp Ser Ala Leu Pro Arg His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu				
	145	150	155	160
GGC TCC ACC GAG CTG GTG ACC ACC AAG ACA GCT GGC CCA GAG CAA TAG				
Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln				
	165	170	175	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/01849

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/12, 1/19, 1/21, 5/10, C07K14/705, 16/28, C12P21/02, C12Q1/68, A61K45/00, A61P1/00, 9/00, 11/00, 17/00, 19/00, 25/00, 29/00, 31/00, 35/00, 37/00, G01N33/15, 33/50, 33/53, 33/566 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) Int.Cl ⁷ C12N15/00-15/90, C07K14/00-14/825 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) MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), JICST FILE (JOIS) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/18959 A1 (The Trustees of Columbia University in the City of New York), 06 April, 2000 (06.04.00), & AU 99060498 A	1-9,11
A	Takaaki SATO, 3. 1. 7 TNF/NGF Juyotai Family no Joho Dentatsu Kiko no Kaiseki, Gan Saibo no Hyoteki Chiryō no Tameno Sentanteki Kiban Gijutsu no Kaihatsu ni Kansuru Kenkyū (Dai I ki Heisei 8 nendo - 10 nendo [1996 to 1998]) Seika Hokokusho, July 2000, pages 364 to 373	1-9,11
A	Rothe M. et al., I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, Vol.93, pages 8241 to 8246	1-9,11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 document 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, 2002 (18.04.02)		Date of mailing of the international search report 14 May, 2002 (14.05.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/01849

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEE S. Y. et al., TRAF-interacting Protein (TRIP): A Novel Component of the Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR)- and CD30-TRAF Signaling Complexes That Inhibits TRAF2-mediated NF- κ B Activation. J. Exp. Med. 1997, Vol.185, No.7, pages 1275 to 1285	1-9,11

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

(1) Concerning the expression "containing at least the amino acid sequence of from the 414- to the 567-positions in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1" in claim 10, the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 is limited up to the 175-position. Thus it is completely unknown what the amino acid sequence of from the 414- to the 567-positions as described above means.

Therefore, no meaningful search can be made on the inventions as set forth in the above claims.

(2) The compound described in claim 12 is specified by using a method as set forth in any of claims 8 to 11. Thus, it involves any compounds obtained by these methods.

However, no specific compound identified by these methods is cited in the description. Thus, claim 12 is neither supported by the description nor disclosed therein. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it cannot be recognized what specific compounds are involved in the scope and what are not. Thus, the above claims are described in an extremely unclear manner.

Accordingly, no meaningful search can be made on the inventions as set forth in the above claims. The same applies to claims 13 and 14.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/01849

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.: 15

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

It pertains to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.: 10, 12-14

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:

(See extra sheet.)

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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/12, 1/19, 1/21, 5/10, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02, C12Q 1/68,
A61K 45/00, A61P 1/00, 9/00, 11/00, 17/00, 19/00, 25/00, 29/00, 31/00, 35/00, 37/00,
G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/00-15/90, C07K 14/00-14/825

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/18959 A1 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 2000. 04. 06 & AU 9960498 A	i-9, 11
A	佐藤 孝明, 3. 1. 7 TNF/NGF受容体ファミリーの情報伝達機構 の解析, ガン細胞の標的治療のための先端的基盤技術の開発に関す る研究 (第I期 平成8年度~10年度) 成果報告書, 7月. 20 00年, p. 364-373	1-9, 11

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 04. 02

国際調査報告の発送日

14. 05. 02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
鈴木 恵理子



4N 2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	<p>ROTHE M. et al. I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, Vol. 93, p. 8241-8246</p>	1-9, 11
A	<p>LEE S. Y. et al. TRAF-interacting Protein (TRIP): A Novel Component of the Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR)- and CD30-TRAF Signaling Complexes That Inhibits TRAF2-mediated NF-κB Activation. J. Exp. Med. 1997, Vol. 185, No. 7, p. 1275-1285</p>	1-9, 11

第I欄2. について

(1) 請求の範囲10に記載の「配列番号1に記載のアミノ酸配列の414番目から567番目までのアミノ酸配列を少なくとも含む」について、配列番号1に記載のアミノ酸配列は175番目までしかなく、上記414番目から567番目までのアミノ酸配列が何を意味するものか全く不明である。

したがって、前記請求の範囲に記載された発明について有意義な調査をすることができない。

(2) 請求の範囲12に記載の化合物は、請求の範囲8ないし11のいずれか1項に記載の方法を用いることによって特定されており、当該方法によって得られるあらゆる化合物を包含するものである。

しかしながら、明細書には、当該方法で同定される化合物としての具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲12は明細書による裏付けを欠いており、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。

したがって、前記請求の範囲に記載された発明について有意義な調査をすることができない。請求の範囲13-14についても同様である。

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 15 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
人の身体の診断方法を含むものであり、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 10, 12-14 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
別紙 (特別ページ) 参照。
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。