

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4323716号
(P4323716)

(45) 発行日 平成21年9月2日(2009.9.2)

(24) 登録日 平成21年6月12日(2009.6.12)

(51) Int. Cl.	F 1		
C 0 7 K 14/47	(2006.01)	C 0 7 K 14/47	Z N A
A 6 1 K 38/55	(2006.01)	A 6 1 K 37/64	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

請求項の数 2 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2000-509437 (P2000-509437)
 (86) (22) 出願日 平成10年8月6日(1998.8.6)
 (65) 公表番号 特表2002-500160 (P2002-500160A)
 (43) 公表日 平成14年1月8日(2002.1.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/016381
 (87) 国際公開番号 W01999/008700
 (87) 国際公開日 平成11年2月25日(1999.2.25)
 審査請求日 平成17年8月4日(2005.8.4)
 (31) 優先権主張番号 60/056, 207
 (32) 優先日 平成9年8月21日(1997.8.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 597177242
 トーマス・ジェファーソン・ユニバーシテ
 イ
 Thomas Jefferson Un
 iversity
 アメリカ合衆国19107-5587ペン
 シルベニア州フィラデルフィア、ウォール
 ナット・ストリート1020番
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 c d k 2 キナーゼ活性の p R b 2 / p 1 3 O ペプチドインヒビター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

c d k 2 キナーゼ活性を阻害する、S E Q I D N O : 3 からなるペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 記載のペプチドを含む、細胞の c d k 2 キナーゼ活性を阻害するための医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

序論

本発明は研究の際にナショナル・インスティテュート・オブ・ヘルスによる援助を受けて成されたものである。米国政府は本発明について一定の権利を所有する。

【0002】

発明の背景

過去何年もの間、良性又は悪性新形成疾患の主だった特徴は無秩序な有系分裂であると考えられていた。癌の発症は細胞周期を調節する細胞性手段の制御不能によるものと信じられている。

【0003】

哺乳動物細胞の周期は様々なサイクリン/サイクリン特異的キナーゼ(c d k) 対の連鎖的活性化及び不活性化により駆動するものと信じられている(MacLachlanら(1995), Cri t. Rev. in Eukary. Gene Ex. 5 : 127-56)。原型的な細胞周期のキナーゼ c d c 2 は最初に酵母において発見され、そしてDNA複製及び有系分裂の双方の調節に

ことが見い出された。しかしながら、高等生物はこのような現象を誘導する一層複雑なシステムを保有していることが見い出された。

【 0 0 0 4 】

関与するいくつかのキナーゼの一つ、サイクリン特異性キナーゼ 2 (c d k 2) は哺乳動物細胞がその制限時点を通じて D N A 複製に至るために必要とされる (Elledge, S.J. and Spottswood, M.R. (1991) EMBO J. 10 : 2653-2659)。このキナーゼの活性化及び不活性化は、細胞が分裂し始める前の S 期の正確な開始時期にとって重要である。サイクリン A 又は B との過渡的な会合はキナーゼがいつ活性し、それ故 D N A 複製に関与する基質をリン酸化するかを表わす。過去数年の間、 c d k 活性を制御するサイクリン結合以外のいくつかのメカニズムが発見された。リン酸化状態及び補酵素結合における相違の他に、 c d k キナーゼ活性に結合してその活性を阻害することのわかっている低分子量タンパク質の数が増えてきている (Xiong, Y. (1996) Biochim. Biophys. Act. 1288 : 1-5; Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (1995) Genes Dev. 9 : 1149-63)。 c d k インヒビターの C I P / K I P ファミリー (p 2 1 , p 2 7 , p 5 7) 及び I N K ファミリー (p 1 5 , p 1 6 , p 1 8 , p 1 9) はサイクリン又は直接 c d k に結合し、そして細胞周期の進行が継続しうるまでそのキナーゼ活性を抑制する。 I N K ファミリーは D 型サイクリンに複合した早期 G 1 キナーゼ c d k 4 及び c d k 6 に対する特異性を有し、一方 C I P ファミリーはサイクリン A 又は E のいずれかに結合した c d k 2 を優先する。様々な細胞タイプの中で過剰発現されると、これらのインヒビターは増殖を停止させ、細胞を G 1 期にとどめることができる。従って、これらは過渡的調節式タンパク質であり、 G 1 サイクリン - c d k 対を潜在的に阻害する傾向を有する。このようないくつかのタンパク質の消失が腫瘍形成の重要な段階であることが見い出された。例えば、 p 1 6 及び p 1 5 遺伝子は共に、全黒色腫症例の 7 5 % 近くにおいて欠失していることが見い出された領域にある (Kambら (1994) Science 264 : 436-440; Nobori ら (1994) Nature 368 : 753-756)。 c d k 阻害は正常細胞周期の進行にとって必須である。

【 0 0 0 5 】

網膜芽腫ファミリーは、そのタンパク質が真核細胞周期ホメオスタシスにも関与する遺伝子の群から成る。このような遺伝子によりコードされるタンパク質は往々にして、その固有な三次元構造を理由に「ポケットタンパク質」と呼ばれている。この構造はかかる分子が関与する特異性及び機能性の関連するタンパク質 - タンパク質相互作用のほとんどを司る。現在、このファミリーは、 p R b と呼ばれるタンパク質をコードする網膜芽腫 (R B) 遺伝子、 p 1 0 7 と呼ばれるタンパク質をコードする p 1 0 7、及び p R b 2 / p 1 3 0 と呼ばれるタンパク質をコードする p 1 3 0 (p R b 2 / p 1 3 0 と称される) を含む 3 つの構成員から成る。

【 0 0 0 6 】

これら 3 つのポケットタンパク質は全て、主として細胞の核区画に局在する (Lee ら (1987) Nature 329 : 642-645; Ewenら (1991) Cell 66 : 1155-1164; Baldiら (1995) J. Cell. Biochem. 59 : 402-408)。各タンパク質構造は基本的に N 末端部分 ; ドメイン A、スパーサー及びドメイン B へと更に分割されるポケット構造 ; 並びに C 末端部分 (いわゆるドメイン C) から成る。このポケット機能ドメイン A 及び B が最も保存的であり、そして内因性タンパク質又はウィルス性腫瘍タンパク質 (oncoprotein) のいずれかが関与する相互作用のほとんどを司るものと教示されている (Paggi ら J. Cell. Biochem. (1996) 62 : 418-430)。

【 0 0 0 7 】

R b タンパク質は E 2 F 転写因子との相互作用及びその阻害で最もよく知られる。 E 2 F はいくつかの遺伝子であってその生成物が D N A 複製が起こるのに必要とされるものをトランス作用活性化するものと信じられている。しかしながら、 p R b に結合すると、このトランス作用活性化能は失われる (Chellappanら (1991) Cell 65 : 1053-61)。 p R b は網膜芽腫等のいくつかのタイプの癌においても失われていることが見い出されている。 R b 関連タンパク質 p 1 0 7 及び p R b / p 1 3 0 は p R b と似たような、しかしながら異

10

20

30

40

50

なる性質を有することが見い出されている (Ewenら (1991) Cell 66 : 1155-64; Mayolら (1993) Oncogene 8 : 2561-6; Liら (1993) Genes Dev. 7 : 2366-77; 及びHannonら (1993) Genes Dev. 7 : 2378-91)。p R b , p 1 0 7 又は p R b 2 / p 1 3 0 過剰発現は癌細胞の増殖を阻害又は停止させることができるが (Huangら (1988) Science 242 : 1563-1566; Booksteinら (1990) Science 247 : 712-715; Antelmanら (1995) Oncogene 10 : 697-704; 及びClaudioら (1994) Cancer Res. 54 : 5556-5560)、一定の腫瘍細胞はいずれのポケットタンパク質に対しても同等に応答性ではない。例えば、トランケーション化非機能性 p R b 分子を保有する S A O S - 2 ヒト骨癌細胞系は p R b 及び p 1 0 7 の増殖抑制特性に対してもっぱら感受性である。他方、p R b 2 / p 1 3 0 過剰発現は S A O S - 2 増殖を遅くするが、このタンパク質は T 9 8 G ヒトグリア芽腫マルチフォーム及び M C F - 7 ヒト乳腺癌腫細胞系の増殖を阻害することもでき、一方、p R b も p 1 0 7 も阻害作用を全く示さない。T 9 8 G 及び M C F - 7 細胞系は共に c d k 4 及び c d k 6 インヒビターである p 1 6 ^{INK4A} のホモ接合欠失を示す。従って、ポケットタンパク質 R b 及び p 1 0 7 は特異的サイクリン / c d k 複合体により相当にリン酸化され始め、かくして細胞周期のブロッキングにおいて機能的に不活性となり始める。しかしながら、c d k 2 に複合していることの見い出された p R b 2 / p 1 3 0 は p 1 6 ^{INK4A} ホモ接合欠失を解消し、このような細胞系における有効な増殖阻害を及ぼすことができることを見い出された (Paggiら J. Cell. Biochem. (1996) 62 : 418-430)。

10

【 0 0 0 8 】

R b 及び p 1 0 7 タンパク質の機能性ドメインは遺伝子的及び生化学的手段の双方を通じてマッピングされている (Huら (1990) EMBO J. 9 : 1147-1155; Ewenら (1991) Cell 66 : 1155-1164; Ewenら (1992) Science 255 : 85-87)。R b ポケットと称される R b 及び p 1 0 7 の約 4 0 0 個のアミノ酸フラグメントがこのようなタンパク質と、D N A 腫瘍ウイルス性腫瘍タンパク質及び細胞リガンドとの会合を司る。このドメイン内には相当な配列類似性の 6 つの領域がある。同様に、サイクリンは、「サイクリンボックス」と称される約 8 7 個のアミノ酸にわたって広がる大きな配列類似領域を共有している (Pinesら (1989) Cell 58 : 833-846)。このドメインは R b 及び p 1 0 7 のタンパク質：タンパク質相互作用において重要であると信じられている。事実、このドメインの一部を含んで成る配列を有するペプチドが細胞増殖及び増殖のインヒビターであると唱えられている (米国特許第 5 , 6 2 5 , 0 3 1 号)。

20

30

【 0 0 0 9 】

関連 R b タンパク質、p R b 2 / p 1 3 0 の阻害活性はこのサイクリンボックスを介して起こるのではなく、異なる且つ独立のスペーサー領域ドメインを介して起こることがこの度見い出された。更に、様々な細胞プロセスの際の p R b 2 / p 1 3 0 の発現の増大は、c d k 2 のキナーゼの低下に伴うものと実証された。例えば、p R b 2 / p 1 3 0 タンパク質レベルは筋細胞の分化に依存して上昇し、c d k 2 キナーゼ阻害と一致する。これは関連 p 1 0 7 タンパク質であってそのレベルが低下することが示されたものとかかなり相違する。従って、p R b 2 / p 1 3 0 は E 2 F 活性体に結合してそれを改変するだけでなく、その他の R b タンパク質とは異なる態様で p 2 1 と協奏して c d k 2 キナーゼ活性も阻害するものと信じられている。

40

【 0 0 1 0 】

発明の概要

本発明の目的は、c d k 2 キナーゼ活性を阻害する p R b 2 / p 1 3 0 のアミノ酸 6 4 1 ~ 7 1 1 もしくはそのフラグメントを含んで成るペプチド、又はその突然変異体もしくはは相同アミノ酸配列の提供にある。

【 0 0 1 1 】

本発明のその他の目的は、細胞を、c d k 2 キナーゼ活性を阻害する p R b 2 / p 1 3 0 のアミノ酸 6 4 1 ~ 7 1 1 もしくはそのフラグメントを含んで成るペプチド、又はその突然変異体もしくはは相同アミノ酸配列と接触させることを含んで成る、c d k 2 キナーゼ活性を阻害する方法の提供にある。

50

【 0 0 1 2 】

発明の詳細な説明

癌は細胞が増殖制御不能となり、その結果異常且つ侵襲性の周囲組織が大量に増加する異種病理状態の群である。これは通常、急速且つ無秩序な細胞分裂、増強した細胞生存能力、並びに脱分化及び遺伝子改変の蓄積の付随を特徴とする。無秩序な細胞分裂は細胞数を増やすだけでなく、癌細胞において見い出される一般的な現象である遺伝子改変の蓄積にも寄与する。蓄積する改変は損傷を受けた細胞周期制御機能を更に劣悪にしうる。

【 0 0 1 3 】

c d k 2 はヒト細胞周期の重要な調節因子であり、染色体 1 2 q 1 3 上にマッピングされている。この遺伝子座は、限定することなく、子宮平滑筋腫、唾液腺の腺腫及びヒト急性骨髄芽球性白血病等の多数の腫瘍において往々にして改変又は転位していることが示された。腫瘍における 1 2 q 1 3 座の改変は c d k 2 遺伝子の調節における変化に関与するものと信じられている。より詳しくは、c d k 2 タンパク質の活性が増大し、腫瘍細胞が増殖する。従って、c d k 2 活性を阻害する化合物の同定は癌細胞の増殖の調節及び制御において有用であろう。

10

【 0 0 1 4 】

細胞周期制御機構と相互作用するその能力及びその増殖抑制効果を理由に、ポケットタンパク質は腫瘍増殖の制御において有用であると考えられている (Paggi ら J. Cell. Biochem. (1996) 62 : 418-430)。p R b 2 / p 1 3 0 遺伝子生成物は核タンパク質であり、そのリン酸化は細胞周期調節されている (Baldi ら (1995) Journal of Cellular Biochemistry 59 : 402-408)。G 0 特異的転写因子 E 2 F 5 との会合及び分化又は休止細胞における高い発現率に基づき、p R b 2 / p 1 3 0 は主に早期 G 1 期において作用すると考えられている。E 2 F タンパク質機能の潜在的な修飾に加えて、p R b 2 / p 1 3 0 は、細胞の S 期への移行を可能にする c d k 2 の如きキナーゼの活性を低下させることにより G 0 / G 1 停止に寄与することがこの度見い出された。

20

【 0 0 1 5 】

高度に相同性の p 1 0 7 タンパク質も c d k 2 に対してこの効果を有することが示されたが、c d k 2 に対する p R b 2 / p 1 3 0 の効果はいくつかの点で相違する。例えば、c d k 2 キナーゼアッセイに加える p 1 0 7 の量を増やすと、p R b 及びヒストン H 1 基質のリン酸化は低下し、p 1 0 7 自体のリン酸化が高まり始める。このことは、p 1 0 7 がインヒビターというよりは基質として作用することを示唆する。対照的に、p R b 2 / p 1 3 0 は *in vitro* アッセイではリン酸化されず、それ故択一的な基質として作用せず、むしろ阻害特性を有する結合タンパク質として作用する。更に、p 1 0 7 は c d k インヒビターほどには作用せず、むしろ c d k 2 / サイクリン A をその基質 E 2 F 4 からマスキングする。対照的に、*in vitro* 系のモデルでは、p R b 2 / p 1 3 0 タンパク質の増加は c d k 2 阻害と一致し、p R b 2 / p 1 3 0 が E 2 F 活性を調節するように作用するだけでなく、キナーゼ活性を調節するようにも作用しうることを示唆する。

30

【 0 0 1 6 】

最大の阻害効果を発揮する p R b 2 / p 1 3 0 の領域は 2 種類のタンパク質の間でほとんど保存されていないものである。相同性の低いこの領域は R b ファミリーのタンパク質の機能的多彩性を担っているものと信じられている。p R b 2 / p 1 3 0 タンパク質の固有のドメインはこの度 c d k 2 キナーゼ活性を *in vitro* で阻害できるものと同定された。このドメインは推定 E 2 F 結合部位及び C 末端に非常に近い。

40

【 0 0 1 7 】

p R b 2 / p 1 3 0 タンパク質濃度と c d k 活性との間には反比例の関係があることをいくつかのモデルが示唆している。例えば、M L 1 ミエローマ細胞は、*in vitro* で分化すると、末端分化により p R b 2 / p 1 3 0 タンパク質の著しい増大を示し、一方、関連の c d k 2 キナーゼ活性は基底レベルにまで低下する。ネズミ造血始祖細胞系 F D C - P 1 も早期 G 1 期において大量の p R b 2 / p 1 3 0 を示し、それには関連の c d k 2 ヒストン H 1 キナーゼ活性の低下が伴う。タンパク質レベルが後期 G 1 において低下する

50

と、キナーゼ活性体は c d k 2 に回復する。

【 0 0 1 8 】

p R b 2 / p 1 3 0 タンパク質濃度と c d k 2 活性との関係を筋芽細胞系 C 2 C 1 2 において調べた。2%のウマ血清を含む培地の中で培養すると、C 2 C 1 2 細胞は細胞周期の休止となり、隣りの細胞と融合し、そして完全に分化した多核筋繊維へと伸長する。この分化培地の中で5日経過した後、細胞は完全な筋管状の形態を帯びるに至った。従来の研究は p 1 0 7 タンパク質が筋肉分化の間に減少することを示していた (Kiess ら (1995) Cell Growth Diff. 6 : 1287-1298)。対照的に、これらの細胞の24時間の時点でのタンパク質抽出物のイムノプロットは p R b 2 / p 1 3 0 タンパク質の量が2倍以上に増加していることを示した。p R b 2 / p 1 3 0 複合体もこれらの抽出物から免疫沈殿させ、そして基質としてヒストン H 1 を利用するキナーゼアッセイにかけて関連の c d k 2 活性を評価した。c d k 2 キナーゼ活性は分化経路の終了時には半分以下に減少していた。c d k 2 のタンパク質レベルはキナーゼ分析を行ったサンプル全てにおいて等しいことが確認された。これらの結果をまとめると、一致して、p R b 2 / p 1 3 0 タンパク質レベルが上昇すると、関連の c d k 2 活性が低下し、p R b 2 / p 1 3 0 がこのキナーゼの活性の阻害に一役担っていることがあることを示唆する。更に、p R b 2 / p 1 3 0 は結合性細胞周期機構に関し、p 1 0 7 との機能的類似性において異なるようである。

10

【 0 0 1 9 】

p R b 2 / p 1 3 0 タンパク質レベルと c d k 2 キナーゼ活性との間に関係があるため、c d k 2 を直接阻害する p R b 2 / p 1 3 0 の能力を調べた。p R b 2 / p 1 3 0 及び p 1 0 7 の様々な領域を代表する突然変異体のパネル、並びにコントロールとしての p R b を開発し、そして G S T 融合タンパク質として発現させた (図 1 参照)。c d k 2 複合体を対数増殖中の M L 1 ミエローマ細胞のリゼートから免疫沈殿させた。次いで 20 μ g の G S T - 融合タンパク質をこの沈殿物に加え、そしてその混合物を基質としてヒストン H 1 を利用するキナーゼアッセイにかけた。ポケットの A 及び B ドメイン並びに p R b 2 / p 1 3 0 の C 末端領域は、G S T のみで処理した沈殿物と比べ c d k 2 のキナーゼ活性に対してほとんど又は全く影響を及ぼさず、一方 N 末端は中程度の阻害活性を有していた。しかしながら、アミノ酸配列が p R b 2 / p 1 3 0 に特異的であるスペーサー領域は c d k 2 特異的ヒストンリン酸化を著しく低下させた。更に、c d k 2 活性に対するスペーサー領域の阻害効果は用量依存性であることが見いだされた。

20

30

【 0 0 2 0 】

このスペーサー領域の阻害活性も p R b 2 / p 1 3 0 にとって固有である。全ての R b タンパク質ファミリー構成員由来のスペーサー領域を G S T 融合タンパク質として発現させ、そして c d k 2 のキナーゼアッセイに大過剰量で加える実験を実施した。しかしながら、p R b 2 / p 1 3 0 のみがこの領域を介して有意に c d k 2 キナーゼ活性を阻害できた。

【 0 0 2 1 】

c d k 2 に対するこのスペーサー領域の特異性を確認した。これらの実験において、c d c 2 , c d k 2 , c d k 4 及び c d k 5 等の c d c 2 ファミリー構成員を M L 1 細胞から免疫沈殿させ、そして基質としてヒストン H 1 又は R b のいずれかを用いるキナーゼアッセイにかけた。p R b 2 / p 1 3 0 のスペーサー領域は c d k 2 キナーゼ活性のみ低下させることができ、p R b 2 / p 1 3 0 に関連する阻害活性が、細胞内で安定的に結合できるキナーゼ、c d k 2 に対して特異的であることが実証された。

40

【 0 0 2 2 】

c d k 2 の活性を阻害するものと実証された領域はアミノ酸 6 1 6 ~ 8 2 8 (S E Q I D N O : 1) に対応する p R b 2 / p 1 3 0 のスペーサー領域の一部を含んで成る。更なる実験は、アミノ酸 6 1 6 ~ 7 1 1 (S E Q I D N O : 2) 及びアミノ酸 6 4 1 ~ 7 1 1 (S E Q I D N O : 3) を含んで成るペプチドがこの阻害効果を保持していることを特定した。アミノ酸 6 1 6 ~ 6 4 2 , 6 4 1 ~ 6 6 6 , 6 6 3 ~ 7 1 1 , 及び 6 1 6 ~ 6 6 6 から成るペプチドは阻害効果を保持できなかった。従って、本発明の課題に関し

50

、「ペプチド」とはSEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2もしくはSEQ ID NO: 3又はそのフラグメントもしくはその突然変異体を含んで成るペプチド、又は類似のcdk2阻害活性を有する相同アミノ酸配列を意味する。相同アミノ酸配列とは、cdk2阻害活性を有するものと決定されたペプチドの規定の長さにならなくて少なくとも約85%、そして好ましくは90~95%のアミノ酸一致を有する配列である。「ペプチド」とは、アクセプター分子との相互作用においてペプチドの代替物として機能する構造であるペプチド擬似体を含むことも意味する(ペプチド擬似体についてはMorganら(1989) Ann. Reports Med. Chem. 24: 243-252を参照のこと)。ペプチド擬似体には、限定することなく、アミノ酸及び/又はペプチド結合を含む又は含まないが、ペプチドリガンドの構造及び機能的特徴を保持する合成構造体が含まれる。この用語の中に更に含まれるのは、N-置換化アミノ酸のペプチド又はオリゴマーであるペプチド及びオリゴペプチドである。ペプチド擬似体とは、特定のアミノ酸の長さとなるようにデザインされ、且つ考えられる全ての対応のアミノ酸配列であるペプチドの集団であるペプチドライブラリーを含むことも意味する。ペプチドライブラリーを作製する方法は当業者に周知である。

10

【0023】

この阻害活性を発揮できる本発明のペプチドは全長タンパク質のCOOH末端から始まって欠失突然変異体を作製することにより決定できる。このような突然変異配列に対応するキメラ融合ペプチドを次にPGEX-2T発現ベクター系を利用して実施例1及び2に従って作製する。阻害活性を保持するpRb2/p130のペプチド配列はかくして固相又は液相ペプチド合成の如き周知の方法に従って合成的に調製できる。他に、本発明のペ

20

【0024】

cdk2活性を阻害する本発明のペプチドは、cdk2の活性化を物理的に妨害することにより細胞周期のG1/S期の細胞増殖進行を阻害するうえで有用であろう。cdk2のキナーゼ活性を阻害することにより細胞周期の進行を制御するこれらのペプチドは腫瘍増殖の停止を招くものと期待できる。悪性腫瘍の進行段階及び/又はタイプは、効果を奏するのに必要なペプチドの投与量及びルートを特定するであろう。

【0025】

更に、これらのペプチドは細胞周期のG1/S期の調節におけるcdk2の正常な機能の研究において有用であろう。

30

【0026】

以下の非限定的な実施例を本発明の更なる説明のために提供する。

【0027】

実施例

実施例1：構築体の調製

原核発現ベクターpGEX-2T(Stratagene, La Jolla, CA)及びポリメラーゼ連鎖反応(PCR)をキメラグルタチオンS-トランスフェラーゼの構築のために用いた。pGEX-2TにサブクローニングしたPCRフラグメントを増幅するのに用いたプライマーはpRb2/p130のNH₂の5'及び3'末端、A、スパーサー、B及びCOOHドメイン、並びにpRb及びp107のスパーサードメインに由来した。作製したpGEX-2T融合タンパク質を図1に示す。

40

【0028】

実施例2：GST融合タンパク質の調製

pGEX-2Tベクターを担持するXL1-Blue菌を中対数増殖期にまで増殖させ、次いでIPTGを培地に0.25mMの濃度に添加することによりタンパク質の発現を誘導した。この培養物を数時間振盪させた。次いで細菌をペレットにし、そしてNENTバッファー(20mMのトリス、pH8、100mMのNaCl、1mMのEDTA、0.5%のNP40)に再懸濁した。細胞懸濁物を音波処理し、ペレットにし、そして上清液を回収した。次いで残りの細菌をNENT+2%のN-ラウリル-サルコシンに再懸濁し、ペレット

50

にし、そしてその上清液を再び回収した。合わせた上清液をグルタチオンアガロース (Pharmacia, Piscataway, NJ) と 4 で一夜インキュベーションした。次いでアガロースをペレットにし、そして N E N T バッファーの中で 3 回洗った。

【 0 0 2 9 】

実施例 3 : イムノプロットティング

細胞リゼートはペレットにした細胞を 2 0 0 μ l の溶解バッファー (5 0 mM のトリス、5 mM の E D T A、2 5 0 mM の N a C l、5 0 mM の N a F、0 . 1 % のトリトン、0 . 1 mM の N a₃ V O₄、プロテアーゼインヒビター) の中に再懸濁することにより調製した。5 0 μ g のタンパク質を 7 % のポリアクリルアミドゲルに泳動させた。ポリアクリルアミドゲル内のタンパク質を C A P S バッファー (1 0 mM の C A P S、2 0 % のメタノール、pH 1 1) 中の P V D F 膜 (Millipore Corp., Bedford, MA) に転写した。この膜を T B S - T バッファー (2 mM のトリス、1 3 . 7 mM の N a C l、0 . 1 % の T w e e n - 2 0、pH 7 . 6) 中の 5 % のミルクでブロッキングし、次いで T B S - T で洗った。第一抗体を 3 % のミルク内でこの膜とインキュベーションし、次いで T B S - T で洗った。この膜を西洋ワサビペルオキシダーゼ (Amersham, Arlington Hts, IL) に複合した抗ウサギとインキュベーションし、そして T B S - T で洗った。膜に結合した第二抗体の存在を E C L システム (Dupont NEN, Boston, MA) を利用して検定した。

10

【 0 0 3 0 】

実施例 4 : キナーゼアッセイ

細胞リゼートはペレットにした細胞を 2 0 0 μ l の溶解バッファー (5 0 mM のトリス、5 mM の E D T A、2 5 0 mM の N a C l、5 0 mM の N a F、0 . 1 % のトリトン、0 . 1 mM の N a₃ V O₄、プロテアーゼインヒビター) の中に再懸濁することにより調製した。各フラクションにつき等量のタンパク質を特異的な A b で免疫沈殿させた。ヒストン H 1 キナーゼ活性の存在の検定の前に、各サンプルを等量の前述の P G E X - 2 7 構築体と 4 で 3 0 分インキュベーションした。タンパク質キナーゼアッセイは Giordano ら (1991) Science 253 : 1271-5 に記載の手順に従って実施した。キナーゼアッセイは少なくとも 3 回繰り返し、タンパク質量を標準化してアッセイ間標準偏差が 1 0 % 以内となるようにした。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 グルタチオン S - トランスフェラーゼ - p R b , p 1 0 7 及び p R b 2 / p 1 3 0 融合タンパク質の模式図。

30

【 図 1 】

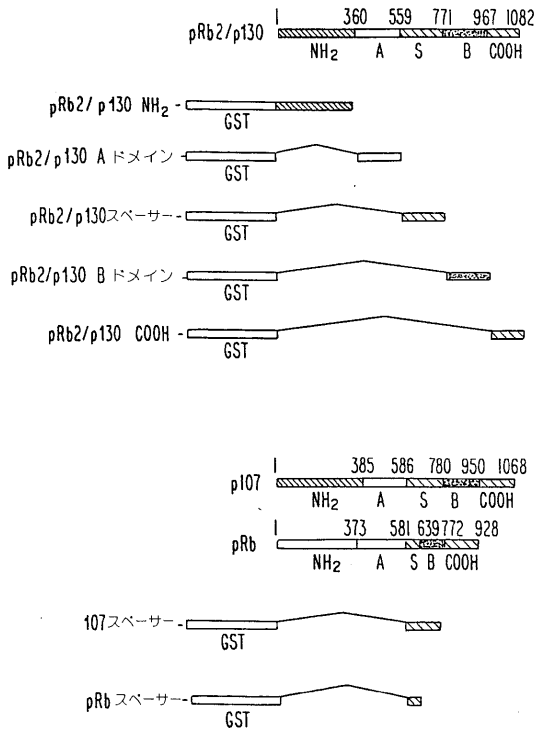


Fig. 1

【 配列表 】

0004323716000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100122389

弁理士 新井 栄一

(72)発明者 ジオールダノ, アントニオ

アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19128, フィラデルフィア, ジンジャー レーン 303

審査官 佐久 敬

(56)参考文献 特開平07-316196(JP, A)

特表平09-501568(JP, A)

Nature, 1993年, Vol.366, p.707-710

Genes & Development, 1995年, Vol.9, p.1740-1752

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 14/47

A61K 38/55

A61P 35/00

A61P 43/00

C12N 15/09

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq