

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4754819号
(P4754819)

(45) 発行日 平成23年8月24日 (2011.8.24)

(24) 登録日 平成23年6月3日 (2011.6.3)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/132 (2006.01)

A 6 1 K 31/132

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 O 5

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/47 (2006.01)

C O 7 K 14/47

請求項の数 5 (全 52 頁)

(21) 出願番号 特願2004-503607 (P2004-503607)
 (86) (22) 出願日 平成15年5月7日 (2003.5.7)
 (65) 公表番号 特表2005-524410 (P2005-524410A)
 (43) 公表日 平成17年8月18日 (2005.8.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/014049
 (87) 国際公開番号 W02003/095613
 (87) 国際公開日 平成15年11月20日 (2003.11.20)
 審査請求日 平成18年5月1日 (2006.5.1)
 (31) 優先権主張番号 10/141,647
 (32) 優先日 平成14年5月7日 (2002.5.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10/200,148
 (32) 優先日 平成14年7月23日 (2002.7.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502458132
 セネスコ テクノロジーズ, インコーポレ
 イティド
 アメリカ合衆国, ニュージャージー 08
 901, ニュー ブルンズウィック, スイ
 ート 420, ジョージ ストリート 3
 03
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポトーシス調節に関する核酸、ポリペプチド及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類の黄体細胞のアポトーシスを阻害又は遅延させるための医薬組成物であって、ス
 ペルミジンである、アポトーシス誘導DHSによって触媒される化学反応を阻害することが
 できる物質を含んで成り、アポトーシス誘導DHSによって触媒される化学反応の阻害がア
 ポトーシスを阻害又は遅延させる、医薬組成物。

【請求項 2】

アポトーシス誘導DHSによって触媒される化学反応の阻害が、活性化されたアポトーシ
 ス誘導eIF-5Aのレベルを減少させるか、又はアポトーシス誘導eIF-5Aの活性化を阻害し、
 そして、アポトーシス誘導eIF-5Aのレベルの減少又はアポトーシス誘導eIF-5Aの活性化の
 阻害がアポトーシスを阻害又は遅延させる、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

哺乳類の黄体細胞におけるアポトーシス誘導eIF-5Aの活性化を阻害又は遅延させるため
 の医薬組成物であって、外来性のスペルミジンである、アポトーシス誘導DHSによって触
 媒される化学反応を阻害することができる物質を含んで成り、当該物質が毒性のある濃度
 で含まれておらず、アポトーシス誘導DHSによって触媒される化学反応の阻害が、アポト
 ーシスカスケードを阻害又は減少させ、当該カスケードが外来性のスペルミジンの4-アミ
 ノブチル残基を、不活性アポトーシス誘導eIF-5A上の保存されたりジン上の -アミノ基
 に転移させることを含んで成り、当該転移が前記リジンをデオキシハイプシンに変換させ
 、デオキシハイプシンヒドロキシラーゼがデオキシハイプシンをハイプシンに変換させ、

10

20

そして前記アポトーシスカスケードの阻害又は減少が、前記細胞における、活性化されたアポトーシス誘導eIF-5Aの量を減少させ、又はアポトーシス誘導eIF-5Aの活性化を阻害する、医薬組成物。

【請求項 4】

哺乳類の黄体細胞のアポトーシスを阻害又は遅延させるための医薬組成物であって、スベルミジンである、アポトーシス誘導DHSによって触媒される化学反応を阻害することができる物質を含んで成り、当該物質が毒性のある濃度で含まれておらず、そしてアポトーシス誘導DHSによって触媒される化学反応の阻害が前記細胞におけるアポトーシスを阻害又は遅延させる、医薬組成物。

【請求項 5】

アポトーシス誘導DHSによって触媒される化学反応の阻害が、活性化されたアポトーシス誘導eIF-5Aのレベルを減少させるか、又はアポトーシス誘導eIF-5Aの活性化を阻害し、そして、アポトーシス誘導eIF-5Aのレベルの減少又はアポトーシス誘導eIF-5Aの活性化の阻害がアポトーシスを阻害又は遅延させる、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の技術分野

本発明は、アポトーシス-特異的眞核細胞翻訳開始因子-5A(eIF-5A)及びデオキシハイブシン合成酵素(DHS)の核酸及びポリペプチド、並びにアポトーシス-特異的eIF-5A及びDHSを使用する細胞におけるアポトーシスを調節する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

アポトーシスは、細胞縮小、クロマチン凝縮、核断片化及び膜泡のような、良く定義された形態学的特徴により特徴付けられる、遺伝的にプログラムされた細胞事象である。Kerrら、Br. J. Cancer、26: 239-257 (1972) ; Wyllieら、Int. Rev. Cytol、68: 251-306 (1980)。これは、正常組織の発達及びホメオスタシスにおいて重要な役割を果たし、並びにアポトーシスプログラムの欠損は、神経変性性及び自己免疫系の障害から新生物までの広範なヒト障害の原因であると考えられる。Thompson、Science、267: 1456-1462 (1995) ; Mullauerら、Mutat. Res、488: 211-231 (2001)。アポトーシス細胞の形態学的特徴は、良く特徴付けられているが、このプロセスを調節する分子経路は解明され始めたばかりである。

【0003】

アポトーシスにおいて重要な役割を果たすと考えられるタンパク質の一群は、カスパーゼと称される、システインプロテアーゼファミリーであり、これはアポトーシスのほとんどの経路にとって必要であるように見える。Creagh及びMartin、Biochem. Soc. Trans、29: 696-701 (2001) ; Dalesら、Leuk Lymphoma、41: 247-253 (2001)。カスパーゼは、様々な細胞タンパク質を切断することによるアポトーシス刺激に反応して、アポトーシスを引き起こし、これは細胞縮小、膜泡及びDNA断片化を含む、古典的アポトーシス徴候を生じる。Chang及びYang、Microbiol. Mol. Biol. Rev.、64: 821-846 (2000)。

【0004】

Bax又はBakのようなプロ-アポトーシスタンパク質も、ミトコンドリアシトクロムcのようなカスパーゼ-活性化分子を放出し、これによりアポトーシスによる細胞死を促進することにより、アポトーシス経路において重要な役割を果たしている。Martinou及びGreen、Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.、2: 63-67 (2001) ; Zouら、Cell、90: 405-413 (1997)。Bcl-2のような抗-アポトーシスタンパク質は、プロ-アポトーシスタンパク質Bax及びBakの活性と拮抗することにより、細胞生存を促進する。Tsujimoto、Genes Cells、3: 697-707 (1998) ; Kroemer、Nature Med.、3: 614-620 (1997)。Bax : Bcl-2の比は、細胞の運命を決定する方法のひとつであると考えられ ; 過剰なBaxはアポトーシスを促進し、及び過

10

20

30

40

50

剰なBcl-2は細胞生存を促進する。Salomonsら、Int. J. Cancer、71: 959-965 (1997) ; Wallace-Brodeur及びLowe、Cell Mol. Life Sci.、55: 64-75 (1999)。

【 0 0 0 5 】

アポトーシスに関連した別の重要なタンパク質は、腫瘍抑制遺伝子p53によりコードされたものである。このタンパク質は、恐らくBaxのアップレギュレーションを通じ、細胞増殖を調節し並びに損傷され及び遺伝的に不安定な細胞においてアポトーシスを誘導する転写因子である。Boldら、Surgical Oncology、6: 133-142 (1997) ; Ronenら、1996 ; Schuler及びGreen、Biochem. Soc. Trans.、29: 684-688 (2001) ; Ryanら、Curr. Opin. Cell Biol.、13: 332-337 (2001) ; Zornigら、Biochem. Biophys. Acta、1551: F1-F37 (2001)。

10

【 0 0 0 6 】

アポトーシスを受ける細胞を特徴付ける個別の形態学的特徴は、アポトーシスの開始及び進行を評価するための多くの方法を生み出している。それらの検出のために利用することができるこのようなアポトーシス細胞の特徴のひとつは、形質膜の内側リーフレットに通常局在化されるリン脂質であるホスファチジルセリンの外向き輸送(externalization)を生じるフリッパーゼの活性化である。Fadokら、J. Immunol.、149: 4029-4035 (1992) 。外向き輸送されたホスファチジルセリンを生じるアポトーシス細胞は、蛍光色素に複合されたホスファチジルセリン-結合タンパク質であるアネキシンVによる染色により検出することができる。アポトーシスプロセスの過程において生じる特徴的DNA断片化は、フルオレセイン-標識したデオキシヌクレオチドによるDNA断片の露出された3'-OH末端の標識により検出することができる。Hoerscht 33258のような、核酸に結合する蛍光色素は、アポトーシス細胞におけるクロマチン凝縮及び核断片化を検出するために使用することができる。細胞集団内のアポトーシスの程度は、細胞抽出物中に存在するカスパーゼのタンパク質分解性活性の程度により推測することもできる。

20

【 0 0 0 7 】

遺伝的に定義されたプロセスのように、アポトーシスは、他の発生プログラム同様、突然変異により破壊することができる。アポトーシス経路における変更は、癌を含む、多くの疾患プロセスにおいて重要な役割を果たすと考えられる。Wyllieら、Int. Rev. Cytol.、68: 251-306 (1980) ; Thompson、Science、267: 1456-1462 (1995) ; Sen及びD'Incalci、FEBS Letters、307: 122-127 (1992) ; McDonnellら、Seminars in Cancer and Biology、6: 53-60 (1995)。癌発生及び進行の研究は、伝統的に細胞増殖に焦点を当てている。しかし、アポトーシスが腫瘍形成において果たす重要な役割が、最近明らかになってきている。実際に、アポトーシスの制御は腫瘍細胞において何らかの方法で常に変更されているので、現在アポトーシスについて分かっている多くは、腫瘍モデルを用い研究されている。Boldら、Surgical Oncology、6: 133-142 (1997)。

30

【 0 0 0 8 】

アポトーシスは、様々なシグナルにより腫瘍発生時に引き金を引くことができる。細胞外シグナルは、増殖因子又は生存因子の枯渇、低酸素及び電離放射線を含む。アポトーシスの引き金をひくことができる内部シグナルは、不適切な増殖シグナルを生じる、DNA損傷、テロメアの短縮化、及び腫瘍形成性突然変異を含む。Lowe及びLin、Carcinogenesis、21: 485-495 (2000)。悪性疾患の治療に使用される電離放射線及びほぼ全ての細胞毒性化学療法剤は、内因性アポトーシス機構の引き金をひくことにより、細胞死を誘導するように働くと考えられる。Rowan及びFisher、Leukemia、11: 457-465 (1997) ; Kerrら、Cancer、73: 2013-2026 (1994) ; Martin及びSchwartz、Oncology Research、9: 1-5 (1997) 。

40

【 0 0 0 9 】

癌進行の初期において、腫瘍細胞は、アポトーシスを誘導する物質(例えば、電離放射線又は化学療法剤)に対して感受性があることを示唆する証拠がある。しかし、腫瘍が進行するにつれて、これらの細胞は、アポトーシス刺激に対する抵抗性を発揮する。Naikら、Genes and Development、10: 2105-2116 (1996)。これは、初期癌が、より進行した病

50

巢よりも、治療により良く反応する理由を説明することができる。後期癌の化学療法及び放射線療法に抵抗性を発揮する能力は、腫瘍細胞のアポトーシス刺激に反応する能力を制限するアポトーシス経路の変更に結びつけられているように見える。Reedら、*Journal of Cellular Biology*、60: 23-32 (1996) ; Meynら、*Cancer Metastasis Reviews*、15: 119-131 (1996) ; Hannun、*Blood*、89: 1845-1853 (1997) ; Reed、*Toxicology Letters*、82-83: 155-158 (1995) ; Hickman、*European Journal of Cancer*、32A: 921-926 (1996)。化学療法に対する抵抗性は、慢性リンパ球性白血病及び結腸癌において、各々、抗-アポトーシス遺伝子bcl-2の過剰発現、及びプロアポトーシスbax遺伝子の欠失又は突然変異と相關されている。

【 0 0 1 0 】

腫瘍細胞の播種性転移をうまく確立する能力も、アポトーシス経路の変更に關与しているように見える。Boldら、*Surgical Oncology*、6: 133-142 (1997)。例えば、腫瘍抑制遺伝子p53の突然変異は、腫瘍の70%で生じるように思われる。Evanら、*Curr. Opin. Cell Biol.*、7: 825-834 (1995)。p53を失活する突然変異は、DNA損傷に反応してアポトーシスを誘導する細胞の能力を制限し、その細胞を更なる突然変異に攻撃されやすいようにする。Ko及びPrives、*Genes and Development*、10: 1054-1072 (1996)。

【 0 0 1 1 】

従ってアポトーシスは、新生物の悪性転換及び転移の発生及び進行に密に関連し、関連したアポトーシス経路のより良い理解は、遺伝子療法のアプローチを通じてのアポトーシス経路の調節により、癌治療の新たな可能性のある標的につながり得る。Boldら、*Surgical Oncology*、6: 133-142 (1997)。

【 0 0 1 2 】

デオキシハイプシン合成酵素(DHS)及びハイプシン-含有真核細胞翻訳開始因子-5A(eIF-5A)は、細胞増殖及び分化を含む多くの細胞プロセスにおいて、重要な役割を果たすことが知られている。独特なアミノ酸であるハイプシンは、全ての試験された真核生物及び古細菌において発見されているが、真正細菌においては発見されず、並びにeIF-5Aは唯一の公知のハイプシン-含有タンパク質である。Park、*J. Biol. Chem.*、263: 7447-7449 (1988) ; Schumann及びKlink、*System. Appl. Microbiol.*、11: 103-107 (1989) ; Bartigら、*System. Appl. Microbiol.*、13: 112-116 (1990) ; Gordonら、*J. Biol. Chem.*、262: 16585-16589 (1987a)。活性eIF-5Aは、ふたつの翻訳後工程において形成される：第一の工程は、デオキシハイプシン合成酵素により触媒された、スベルミジンの4-アミノブチル部分の、前駆体eIF-5Aの特異的リシンの -アミノ基への転移による、デオキシハイプシン残基の形成であり；第二の工程は、デオキシハイプシンヒドロキシラーゼによるこの4-アミノブチル部分をヒドロキシル化し、ハイプシンを生成することが関連している。

【 0 0 1 3 】

eIF-5Aのアミノ酸配列は、種間で良く保存されており、eIF-5Aのハイプシン残基の周囲のアミノ酸配列の厳密な保存が存在し、このことはこの修飾が生存に重要であることを示唆している。Parkら、*Biofactors*、4: 95-104 (1993)。この推定は更に、酵母において今日までに認められたeIF-5Aの両アイソフォームの不活性化、又はそれらの活性化の最初の工程を触媒するDHS遺伝子の不活性化は、細胞分裂をブロックするという知見により裏付けられている。Schnierら、*Mol. Cell. Biol.*、11: 3105-3114 (1991) ; Sasakiら、*FEBS Lett.*、384: 151-154 (1996) ; Parkら、*J. Biol. Chem.*、273: 1677-1683 (1998)。しかし、酵母におけるeIF-5Aタンパク質の枯渇は、総タンパク質合成のわずかな減少のみを生じ、これは、eIF-5Aは、タンパク質の全合成よりもむしろ、mRNAの特異的サブセットの翻訳に必要であることを示唆している。Kangら、「Effect of initiation factor eIF-5A depletion on cell proliferation and protein synthesis」、Tuite, M.(編集)、*Protein Synthesis and Targeting in Yeast*、NATO Series H、(1993)。eIF-5Aに結合するリガンドは、高度に保存された部分を共有するという最新の知見も、eIF-5Aの重要性を裏付けている。Xu及びChen、*J. Biol.Chem.*、276: 2555-2561 (2001)。加えて、修飾されたeIF-5Aのハイプシン残基は、RNAへの配列-特異的結合にとって必須であり、及び結合は、リボヌ

10

20

30

40

50

クレアーゼからの保護を提供しないことが認められた。

【 0 0 1 4 】

eIF-5Aの最初のcDNAは、1989年にSmit-McBrideらにより、ヒトからクローニングされ、それ以降eIF-5AのcDNA又は遺伝子が、酵母、ラット、ニワトリ胚、アルファルファ、及びトマトを含む様々な真核生物からクローニングされている。Smit-McBrideら、J. Biol. Chem., 264: 1578-1583 (1989a) ; Schnierら、(1991)(酵母) ; Sano, A., Imahori, M.ら(編集)、*「Polyamines, Basic and Clinical Aspects」*、VNU Science Press社、オランダ、81-88 (1995)(ラット) ; Rinaudo及びPark、FASEB J., 6: A453 (1992)(ニワトリ胚) ; Payら、Plant Mol. Biol., 17: 927-929 (1991)(アルファルファ) ; Wangら、J. Biol. Chem., 276: 17541-17549 (2001)(トマト)。

10

【 0 0 1 5 】

加えて、eIF-5Aの細胞内欠乏は、核内での特異的mRNAの有意な蓄積を生じ、これは、eIF-5Aは、核から細胞質へのmRNAの特異的クラスのシャトル輸送の原因であり得ることを示唆する。Liu及びTartakoff、*「Molecular Biology of the Cell」*補遺、8: 426a (1997) 。第37回 American Society for Cell Biology Annual Meetingの要約集No.2476。核膜孔-会合した核内フィラメントへのeIF-5Aの蓄積及びその一般的核輸送受容体との相互作用は更に、eIF-5Aは、ポリソームの構成要素よりもむしろ、核原形質のシャトル輸送タンパク質であることを示唆している。Rosoriusら、J. Cell Science, 112: 2369-2380 (1999)。

【 0 0 1 6 】

20

eIF-5A mRNAの発現は、様々なヒト組織及び哺乳類細胞株において調べられている。例えば、eIF-5A発現の変化が、ヒト線維芽細胞において、血清枯渇に続く血清の添加後に認められている。Pang及びChen、J. Cell Physiol., 160: 531-538 (1994)。デオキシハイプシン合成酵素活性及び前駆体eIF-5Aの豊富さの年齢に関連した減少も、老化した線維芽細胞において認められているが、これがアイソフォームのディファレンシャルな変化の平均化を反映する可能性については、決定されていない。Chen及びChen、J. Cell Physiol., 170: 248-254 (1997b)。

【 0 0 1 7 】

eIF-5Aは、ヒト免疫不全ウイルスI型Revタンパク質及びヒトT細胞白血病ウイルスI型Revタンパク質などの、ウイルスタンパク質の細胞標的であることが、研究により示されている。Ruhlら、J. Cell Biol., 123: 1309-1320 (1993) ; Katahiraら、J. Virol., 69: 3125-3133 (1995)。予備試験は、eIF-5Aは、Revのような他のRNA-結合タンパク質との相互作用により、RNAを標的化することができ、このことはこれらのウイルスタンパク質は、ウイルスのRNAプロセシングのためにeIF-5Aを動員することができることを示唆している。Liuら、Biol. Signals, 6: 166-174 (1997)。

30

【 0 0 1 8 】

デオキシハイプシン合成酵素及びeIF-5Aは、細胞増殖及び老化を含む、鍵となる細胞プロセスにおいて、重要な役割を果たしていることがわかっている。例えば、植物におけるデオキシハイプシン合成酵素発現のアンチセンス減少は、葉及び果実の老化の遅延を生じ、これは、植物においてeIF-5Aの老化を誘導するアイソフォームが存在することを示唆している。国際公開公報第01/02592号 ; PCT/US01/44505号 ; 米国特許出願第09/909,796号を参照のこと。酵母におけるデオキシハイプシン合成酵素又はeIF-5Aの遺伝子の不活性化は、細胞分裂の阻害を生じる。Schnierら、Mol. Cell. Biol., 11: 3105-3114 (1991) ; Sasakiら、FEBS Lett., 384: 151-154 (1996) ; Parkら、J. Biol. Chem., 273: 1677-1683 (1998)。

40

【 0 0 1 9 】

スベルミジンアナログは、in vitroにおけるデオキシハイプシン合成酵素の阻害に加え、in vivoにおけるハイプシン形成の阻害においてうまく利用されており、これはタンパク質合成及び細胞増殖の阻害を随伴している。Jakusら、J. Biol. Chem., 268: 13151-13159 (1993) ; Parkら、J Biol. Chem., 269: 27827-27832 (1994)。ポリアミン、特にプト

50

レスシン及びスペルミジンはそれら自身も、細胞増殖及び分化において重要な役割を果たすように見える。Tabor及びTabor、Annu. Rev. Biochem., 53: 749-790 (1984); Pegg、Cancer Res., 48: 759-774 (1988)。例えば、ポリアミン生合成経路がブロックされている酵母変異体は、外来性ポリアミンが提供されない限りは、増殖することができない。Cohnら、J. Bacteriol., 134: 208-213 (1980)。

【 0 0 2 0 】

ポリアミンは、アポトーシスの誘導から細胞を保護することも示されている。例えば、胸腺細胞のアポトーシスは、スペルミジン及びスペルミンへの曝露によりブロックされ、その機構はエンドヌクレアーゼ活性化の妨害であると思われる。Desiderioら、Cell Growth Differ., 6: 505-513 (1995); Bruneら、Exp. Cell Res., 195: 323-329 (1991)。加えて、外来性ポリアミンは、B細胞受容体-媒介したアポトーシスに加え、単細胞寄生体トリパノソマ(Trypanosoma cruzi)におけるアポトーシスも抑制することが示されている。Nittaら、Exptl. Cell Res., 265: 174-183 (2001); Piacenzaら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 98: 7301-7306 (2001)。低濃度のスペルミン及びスペルミジンは、新生仔ラットの正常な発達時に、神経細胞喪失の数を低下することに加え、脳虚血時に脳を神経損傷から保護することも観察されている。Giladら、Brain Res., 348: 363-366 (1985); Gilad及びGilad、Exp. Neurol., 111: 349-355 (1991)。ポリアミンは更に、植物組織におけるプログラムされた細胞死の形である老化も阻害する。スペルミン及びプトレスシンは、カーネーションの花及び切り離れたラディッシュの葉の収穫後老化を遅延することが示されている。Wang及びBaker、HortScience, 15: 805-806 (1980)(カーネーションの花); Altman、Physiol. Plant., 54: 189-193 (1982)(切り離れたラディッシュの葉)。

【 0 0 2 1 】

しかし別の研究において、アポトーシスの誘導が、外来性ポリアミンに対する反応において観察されている。例えば、ヒト乳癌細胞株は、アポトーシス誘導によりポリアミンアナログに反応し、そして過剰なプトレスシンは、DH23A細胞におけるアポトーシスを誘導することが示されている。McCloskeyら、Cancer Res., 55: 3233-3236 (1995); Tomeら、Biochem. J., 328: 847-854 (1997)。

【 0 0 2 2 】

ポリアミンを用いるこれらの実験の結果は、eIF-5Aの特異的アイソフォームの存在が、アポトーシスの誘導において役割を果たすことを集会的に示唆している。具体的には、このデータは、DHSにより活性化される、eIF-5Aのアポトーシス-特異的アイソフォームが存在するという観点と一致している。このDHS反応はスペルミジンを必要とするという事実は、ポリアミンは、アポトーシス-関連したタンパク質分解の重要な実行者(executor)であるカスパーゼの活性化を誘起することを示す知見と一致している。Stefanelliら、Biochem. J., 347: 875-880 (2000); Stefanelliら、FEBS Lett., 451: 95-98 (1999)。同様の筋道(vein)において、ポリアミン合成のインヒビターは、アポトーシスを遅延することができる。Dasら、Oncol. Res., 9, 565-572(1997); Montiら、Life Sci., 72: 799-806 (1998); Rayら、Am. J. Physiol., 278: C480-C489 (2000); Packham及びCleveland、Mol. Cell Biol., 14: 5741-5747 (1994)。

【 0 0 2 3 】

外来性ポリアミンは、アポトーシスを阻害及び促進の両方を行うという知見は、適用されたレベルに応じて、これらは、DHS反応を阻害し、eIF-5Aの活性化につながり、その結果アポトーシスを妨げることができるという事実か、又は、毒性の理由により、アポトーシスを誘導することができるという事実のいずれかにより説明することができる。低濃度の外来性ポリアミンは、植物及び動物システムにおいてアポトーシスをブロックするという知見は、低濃度のポリアミン及びそれらのアナログは、DHS反応の競合的インヒビターとして作用するという事実と一致する。実際、DHS反応の基質である、外来性スペルミジンであっても、基質阻害を通じて反応を妨げるであろう。Jakusら、J. Biol. Chem., 268: 13153-13159 (1993)。

【 0 0 2 4 】

しかし、全てのポリアミン及びそれらのアナログは、高濃度では毒性があり、且つアポトーシスを誘導することができる。これは、以下のふたつの理由で、eIF-5Aの推定のアポトーシス-特異的アイソフォームの活性化を阻害するそれらの能力の代わりに、生じる。第一に、活性化されたeIF-5Aは、長い半減期を有する。Torrelioら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*、145: 1335-1341 (1987) ; Dou及びChen、*Biochim. Biophys. Acta.*、1036: 128-137 (1990)。従って、デオキシハイプシン合成酵素活性の阻害から生じる活性化されたアポトーシス-特異的eIF-5Aの枯渇は、スベルミジンの毒性作用により引き起こされたアポトーシスを時間内にブロックすることは生じない。第二に、ポリアミンは、デオキシハイプシン反応の競合的インヒビターであり、従って恐らく、毒性のある濃度であってもこの反応を完全にはブロックしないであろう。

10

【0025】

本発明は、アポトーシス誘導の直前にアップレギュレーションされるeIF-5A cDNAのクローニングに関連している。このアポトーシス-特異的eIF-5Aは、アポトーシス経路に関連した下流のエフェクター及び転写因子の転写後調節のレベルで作用するように見えるので、恐らくこれはアポトーシス-惹起する病態の介入にとって適当な標的であろう。特に、アポトーシス-特異的eIF-5Aは、核から細胞質へのアポトーシスの下流のエフェクター及び転写因子をコードしているmRNAの転位を選択的に促進し、そこでこれらは引き続き翻訳されるように見える。アポトーシスを開始する最終決定は、内部及び外部のプロ-及び抗-アポトーシスシグナルの間の複雑な相互作用に起因するように見える。Lowe及びLin、*Carcinogenesis*、21: 485-495 (2000)。下流アポトーシスエフェクター及び転写因子の翻訳を促進するその能力にもかかわらず、アポトーシスに関連したeIF-5Aは、アポトーシスに好ましいこれらのシグナル間のバランスを傾ける(tip)ように見える。

20

【0026】

先に説明されたように、抗癌剤はアポトーシスを誘導すること、及びアポトーシス経路の変更は、薬物が誘導した細胞死を減弱することができることは、よく確立されている。Schmitt及びLowe、*J. Pathol.*、187: 127-137 (1999)。例えば、多くの抗癌剤は、p53をアップレギュレーションし、及びp53を喪失した腫瘍細胞は、これらの薬物に対する抵抗性を生じる。しかしほぼ全ての化学療法剤は、用量が十分である場合、p53とは無関係にアポトーシスを誘導することができ、これは例え薬物-抵抗性腫瘍においても、アポトーシスへの経路は完全にはブロックされないことを示している。Wallace-Brodeur及びLowe、*Cell Mol. Life Sci.*、55: 64-75 (1999)。これは、アポトーシスeIF-5Aの誘導は、例え突然変異された遺伝子を補正することはできないとしても、p53-依存型経路を迂回し、及び代替経路を促進することにより、アポトーシスを誘導することができることを示唆している。

30

【0027】

アポトーシスに関連したeIF-5Aの誘導は、正常な隣接細胞にはほとんど又は全く作用を有さず、癌細胞を選択的にターゲティングする能力を有する。これは、腫瘍細胞において発現された分裂促進性癌遺伝子は、正常細胞には存在しないmRNAの特異的種の形でアポトーシスシグナルを提供することから生じる。Loweら、*Cell*、74:954-967 (1993) ; Lowe及びLin、*Carcinogenesis*、21: 485-495 (2000)。例えば、p53-変異体腫瘍細胞における野生型p53の回復は、アポトーシスを直接誘導し、更には腫瘍細胞株及び異種移植片における薬物感受性を増大する(Spitzら、1996 ; Badieら、1998)。

40

【0028】

アポトーシス-eIF-5Aの選択性は、核から細胞質へのそれらの転位を媒介することにより、下流アポトーシスエフェクター及び転写因子のmRNAの翻訳を選択的に促進するという事実から生じる。従って、アポトーシスeIF-5Aが作用を有するために、これらのエフェクター及び転写因子のmRNAは、転写されなければならない。これらのmRNAは癌細胞において転写されるが隣接正常細胞においては転写されないの、アポトーシスeIF-5Aは、癌細胞のアポトーシスは促進するが、正常細胞に対する作用はあったとしても最小であると予想される。従って、アポトーシス-関連したeIF-5Aによる腫瘍細胞におけるアポトーシス能

50

の回復は、腫瘍細胞の選択的ターゲティングのために、癌患者が経験した毒性及び副作用を減弱することができる。アポトーシスeIF-5Aの誘導も、抗-癌剤に対する腫瘍細胞の反応を強化し、これにより薬物-抵抗性腫瘍に対するこれらの物質の有効性を改善する能力を有する。これは次に、効能に関する抗癌剤の用量低下及び患者への低下した毒性をもたらすことができる。

【発明の開示】

【0029】

発明の概要

本発明は、単離された及び/又は精製されたラットアポトーシス-特異的eIF-5A及びDHSの核酸及びポリペプチド、並びにアポトーシス-特異的eIF-5A及びDHSのアンチセンスオリゴヌクレオチド及び発現ベクターを提供する。本発明は、アポトーシス-特異的eIF-5A及びDHSを使用する、アポトーシスを調節する方法も提供する。

【0030】

発明の詳細な説明

本発明は、一部、アポトーシスに関連している(アポトーシス-特異的)、ラット黄体から単離されたeIF-5Aをコードしている完全長cDNAの発見及び特徴決定を基にしている。従って、ひとつの態様において、本発明は、ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離された核酸を提供する。本発明により、ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチドのアミノ酸配列を含む精製されたポリペプチドも提供される。ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチドは、アポトーシス細胞においてディファレンシャルに発現されており、且つ、デオキシハイプシン合成酵素により触媒されたスperlミジンの4-アミノブチル部分の前駆体eIF-5Aの特異的に保存されたリシンの -アミノ基への転位によるデオキシハイプシン残基の形成、及びこの4-アミノブチル部分のデオキシハイプシンヒドロキシラーゼによるヒドロキシ化によるハイプシン形成、から生じ、その結果eIF-5Aを活性化する、ラットに特異的ないずれかのポリペプチドを意味する。

【0031】

加えて、本発明のラットアポトーシス-特異的eIF-5A配列の核酸及びポリペプチドを使用し、他の細胞、組織、臓器又は動物から、アポトーシス-特異的な核酸及びポリペプチドを、本願明細書記載の指針及び当業者に周知の技術を用い、単離することができる。本発明は更に、本発明のラットアポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチドをコードしている核酸の検出のためのプライマー又はハイブリダイゼーションプローブとして適している核酸分子も提供する。

【0032】

本発明の核酸は、DNA、RNA、DNA/RNA二重鎖、タンパク質-核酸(PNA)、又はそれらの誘導体であることができる。本願明細書において使用される核酸又はポリペプチドは、それが、細胞材料を実質的に含まない又は化学物質前駆体もしくは他の化学物質を含まない場合に、「単離された」又は「精製された」と称される。用語としての単離された又は精製されたは、無数の他の配列断片を含むライブラリー-型調製物は意味しないことは理解されなければならない。本発明の核酸又はポリペプチドは、均質に又は他の純度に精製することができる。精製レベルは、意図された用途を基にしている。重要な特徴は、この調製は、他の成分のかなりの量の存在下であったとしても、核酸又はポリペプチドの所望の機能を可能にすることである。

【0033】

単離されたポリペプチドは、これを天然に発現する細胞から精製するか、これを発現するように変更された(組換え)細胞から精製するか、又は公知のタンパク質合成法を用い合成することができる。例えば、タンパク質の組換え生成は、アポトーシスを誘導するeIF-5A又はDHSのいずれかをコードしている核酸分子の発現ベクターへのクローニングに関連している。この発現ベクターは、宿主細胞へ導入され、及びこのタンパク質は、宿主細胞において発現される。その後このタンパク質は、標準のタンパク質精製技術を使用する、

いずれか適当な精製法により細胞から単離することができる。

【0034】

好ましくは、本発明のラットアポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチドをコードしている単離された核酸は、配列番号:1のヌクレオチド配列を有し、及び本発明の精製されたポリペプチドは、配列番号:2のアミノ酸配列を有する。本発明のラットアポトーシス-特異的eIF-5A核酸及びポリペプチドは、各々、配列番号:1及び配列番号:2と同じ又は相同である実質的配列を有する配列に加え、それらの機能的誘導体及び変種も包含している。

【0035】

本願明細書において使用される用語「実質的配列同一性」又は「実質的相同性」は、配列が、別の配列と実質的な構造又は機能の同等性を示すことを示すために使用される。実質的配列同一性又は実質的相同性を有する配列間の構造的又は機能的差異は、最小であり (de minimus) ; すなわち、これらは、望ましい用途において示されるように機能する配列の能力に影響を及ぼさないであろう。差異は、例えば異種間のコドン使用頻度における固有の変動に起因してもよい。2つ又はそれよりも多い異なる配列間に有意量の配列の重複もしくは類似性が存在する場合、又は例え配列が長さもしくは構造が異なる場合であっても異なる配列が類似した物理特性を示す場合には、構造的差異は、最小であると考えられる。このような特性は、例えば、規定された条件下でハイブリダイズする能力、又はタンパク質の場合は、免疫学的交差反応性、類似した酵素活性などを含む。当業者は、当該技術分野において公知の方法によりこれらの特性を各々容易に決定することができる。

【0036】

加えて、2つのヌクレオチド配列は、これらの配列が、少なくとも約70%又はそれよりも多く、より好ましくは80%又はそれよりも多く、更により好ましくは約90%又はそれよりも多く、及び最も好ましくは約95%又はそれよりも多くそれらの間に配列類似性を有する場合に、「実質的に相補的」である。2つのアミノ酸配列は、これらが、少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、更により好ましくは少なくとも90%、及び最も好ましくは少なくとも95%の類似性を有する場合に、ポリペプチドの活性のある、又は作用可能に関連した部分の間で実質的に相同である。

【0037】

ふたつの配列の%同一性を決定するために、これらの配列を、最適な比較を目的として並置した(例えば、ギャップを、最適アラインメントのために、第一及び第二のアミノ酸又は核酸配列の一方又は両方に導入することができ、並びに非相同配列は、比較目的に無視することができる。)。好ましい態様において、参照配列の長さの少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%又はそれよりも多くが、比較目的のために並置される。その後対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置でアミノ酸残基又はヌクレオチドが比較される。第一の配列の位置が、第二の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドにより占拠されている場合は、結果的にこの分子は、その位置で同一である(本願明細書において使用されるアミノ酸又は核酸の「同一性」は、アミノ酸又は核酸の「相同性」と同等である。)。ふたつの配列の間の%同一性は、これらのふたつの配列の最適アラインメントのために導入される必要がある、ギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮し、これらの配列により共有される同一である位置の数の関数である。

【0038】

ふたつの配列間の配列の比較並びに同一性及び類似性の割合の決定は、数学的アルゴリズムを用いて実現することができる。(Computational Molecular Biology、Lesk, A. M. 編集、Oxford University Press社、NY、1988 ; Biocomputing: Informatics and Genome Projects、Smith, D. W. 編集、Academic Press社、NY、1993 ; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1、Griffin, A. M. 及びGriffin, H. G. 編集、Humana Press社、NJ、1994 ; Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje, G.、Academic Press社、1987 ; 及び、Sequence Analysis Primer、Gribskov, M. 及びDevereux, J. 編集、M Stockton Press社、NY、1991)。

【0039】

本発明の核酸配列及びタンパク質配列は更に、例えば他のファミリーメンバー又は関連した配列を同定するために、「クエリー配列」として用い、配列データベースに対する検索を行うことができる。このような検索は、Altschulらの論文(J. Mol. Biol., 215: 403-10 (1990))のNBLAST及びXBLASTプログラム(version 2.0)を用い行うことができる。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラムにより行うことができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラムにより行い、本発明のタンパク質と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的でギャップ付きアラインメントを得るために、Gapped BLASTを、Altschulらの論文(Nucleic Acids Res., 25(17): 3389-3402 (1997))に説明されたように利用することができる。BLAST及びギャップ付きBLASTプログラムを利用する場合、各プログラム(例えば、XBLAST及びNBLAST)のデフォルトのパラメータを使用することができる。

10

【0040】

用語としての核酸の「機能的誘導体」は、遺伝子又はヌクレオチド配列のホモログ又はアナログを意味するように本願明細書においては使用される。機能的誘導体は、所定の遺伝子の機能の少なくとも一部は保持することができ、これは本発明におけるその利用を可能にする。本願明細書に説明されたアポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチドの「機能的誘導体」は、アポトーシス-特異的eIF-5A活性の少なくとも一部、又はアポトーシス-特異的eIF-5Aに特異的である抗体との免疫交差反応性を保持する、アポトーシス-特異的eIF-5Aの断片、変種、アナログ、又は化学物質誘導体である。アポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチドの断片は、この分子のいずれかのサブセットを意味する。

【0041】

20

機能的変種は、機能の変化を生じないか又は些細な変化を生じる類似アミノ酸の置換も含むことができる。機能に本質的であるアミノ酸は、位置指定突然変異誘発又はアラニン-スキャニング突然変異誘発(Cunninghamら、Science, 244: 1081-1085 (1989))のような、当該技術分野において公知の方法により同定することができる。後者の手順は、単独のアラニン突然変異を、その分子の各残基に導入する。その後得られる突然変異分子は、キナーゼ活性のような生物学的活性について、又はin vitro増殖活性のようなアッセイにおいて試験される。結合パートナー/基質結合について重要である位置も、結晶化、核磁気共鳴又は光親和性標識(Smithら、J. Mol. Biol., 224: 899-904 (1992); de Vosら、Science, 255: 306-312 (1992))のような、構造分析により決定することができる。

【0042】

30

「変種」は、1個又は複数の置換されたヌクレオチドを有するが、特定の遺伝子にハイブリダイズする能力又は未変性のDNAにハイブリダイズするmRNA転写産物をコードする能力は維持しているヌクレオチド置換変種のように、全遺伝子又はそれらの断片のいずれかに実質的に類似した分子を意味する。「ホモログ」は、異なる動物属又は種由来の断片又は変種配列を意味する。「アナログ」は、全分子、それらの変種又は断片と実質的に類似した又はそれらに関連して機能する天然に存在しない分子を意味する。

【0043】

変種ペプチドは、天然の変種に加え、当該技術分野において周知の方法により製造されたものを含む。このような変種は、本願明細書に明らかにされた分子技術及び配列情報を用い、容易に同定/産生することができる。更に、このような変種は、本発明のeIF-5A又はDHSタンパク質に対する配列及び/又は構造的相同性を基に、他のタンパク質から容易に識別することができる。存在する相同性/同一性の程度は主に、そのタンパク質が機能的変種又は非-機能的変種であるかどうか、偽推理(paralog)ファミリーに存在する多様性の大きさ、及びこれらの相同分子種間の進化の距離を基にするであろう。

40

【0044】

本発明のeIF-5A又はDHSタンパク質の天然に存在しない変種は、組換え技術を用い容易に産生することができる。このような変種は、タンパク質のアミノ酸配列の欠失、付加及び置換を含むが、これらに限定されるものではない。例えば、置換のひとつのクラスは、保存的アミノ酸置換である。このような置換は、タンパク質の所定のアミノ酸を同様の特性の他のアミノ酸と置換するものである。典型的には、保存的置換は、脂肪族アミノ酸Al

50

a、Val、Leu及びIleの間のひとつの別との交換；Ser及びThrのヒドロキシル基の相互交換；Asp及びGluの酸性基の交換；Asn及びGlnのアミド基間の置換；Lys及びArgの塩基性基の交換；並びに、Phe及びTyrの芳香族残基の交換であることが認められる。どのアミノ酸の変化が恐らく表現型としてサイレントであるかに関する指針は、Bowieらの論文(Science、247: 1306-1310 (1990))に認めることができる。

【0045】

代わりに、しかし同じく好ましくは、本発明のラットアポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチドをコードしている核酸は、高ストリンジェント条件下で、配列番号:1のそれと相補的であるヌクレオチド配列とハイブリダイズする。本願明細書において使用される用語「ハイブリダイゼーション」は一般に、プローブ配列及び標的配列の性質に応じて、当業者

10

【0046】

条件の選択は、ハイブリダイズされる配列の長さ、特にプローブ配列の長さ、核酸の相対G-C含量、及び許されるミスマッチの量により指示される。低ストリンジェンシー条件は、相補度がより低い鎖間の部分的ハイブリダイゼーションが望ましい場合に好ましい。完全な又はほぼ完全な相補性が望ましい場合には、高ストリンジェンシー条件が好ましい。典型的な高ストリンジェンシー条件に関して、ハイブリダイゼーション溶液は、6xS.S.C.、0.01M EDTA、1xデンハルト液及び0.5% SDSを含有する。ハイブリダイゼーションは、クローニングされたDNA断片について、約68℃で約3~4時間、並びに全真核細胞DNAについて約12~16時間実行される。より低いストリンジェンシーについて、ハイブリダイゼーションの温度は、その二重鎖の融解温度(T_m)よりも低い約42℃に低下される。 T_m は、G-C含量及び二重鎖長に加え、溶液のイオン強度の関数として知られている。

20

【0047】

本願明細書において使用される語句としての、DNA又はRNA分子の「対応する部分にハイブリダイズする」は、例えばオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、又はいずれかのヌクレオチド配列(センス又はアンチセンス方向)にハイブリダイズする分子が、適当な条件下でハイブリダイゼーションを達成するように、ほぼ同じサイズであり及び十分な配列類似性を有する別の核酸分子の配列を認識し及びハイブリダイズすることを意味する。例えば、約70%又はそれよりも多い配列類似性がふたつの配列間に存在する限りは、100個のヌクレオチド長のセンス分子は、ヌクレオチド配列のおよそ100個のヌクレオチド部分を認識し及びこれとハイブリダイズするであろう。「対応する部分」のサイズは、ハイブリダイゼーションにおけるいくつかのミスマッチを可能にし、その結果「対応する部分」は、それにハイブリダイズする分子よりもより小さい又はより大きい、例えば例えば20~30%長い又は短い、好ましくは約12~15%を超えずにより長い又はより短いことも理解される。

30

40

【0048】

加えて、ポリペプチドの機能的変種は、機能の変化を生じないか又は些細な変化を生じる類似のアミノ酸の置換も含むことができる。機能に必須であるアミノ酸は、部位指定突然変異誘発又はアラニン-スキャニング突然変異誘発(Cunninghamら、Science、244: 1081-1085 (1989))などの、当該技術分野において公知の方法により同定することができる。後者の手法は、単独のアラニン突然変異をその分子の各残基に導入する。その後得られる変異体分子を、生物学的活性又はアッセイにおいて試験する。

【0049】

例えば、アポトーシス-特異的eIF-5Aのアナログは、全タンパク質又はそれらの断片の

いずれかに実質的に類似している天然に存在しないタンパク質又はペプチドミメティックを意味する。アポトーシス-特異的eIF-5Aの化学誘導体は、通常はペプチド又はペプチド断片の一部ではない追加の化学部分を含む。修飾は、ペプチド又はそれらの断片に、そのペプチドの標的化されたアミノ酸残基を、選択された側鎖又は末端残基と反応することが可能である有機誘導体化合物と反応することにより、導入することができる。

【0050】

ラット黄体から単離されたアポトーシス-特異的eIF-5Aをコードしている完全長cDNAの最初の発見及び特徴決定は、DHSをコードしている部分長cDNAクローンの発見及び特徴決定につながり、これも、ラット黄体から単離され、そしてアポトーシスに関連している。従って追加の態様において、本発明は、ラットアポトーシス-特異的DHSポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む、単離された核酸を提供する。同じく、ラットアポトーシス-特異的DHSポリペプチドのアミノ酸配列を含む精製されたポリペプチドも提供される。ラットアポトーシス-特異的DHSポリペプチドは、アポトーシス状態の細胞においてディファレンシャルに発現され、且つスベルミジンの4-アミノブチル部分の、非活性eIF-5Aの特異的に保存されたリシンの -アミノ基への転位により、デオキシハイプシン残基の形成を触媒してデオキシハイプシンを形成せしめ、それによりeIF-5Aを活性化するような、ラットに特異的ないずれか適当なポリペプチドを意味する。

【0051】

好ましくは、本発明のラットアポトーシス-特異的DHSポリペプチドをコードしている単離された核酸は、配列番号:6のヌクレオチド配列を有し、そして本発明の精製されたポリペプチドは、配列番号:7のアミノ酸配列を有する。本発明のラットアポトーシス-特異的DHS核酸及びポリペプチドは、各々、配列番号:6及び配列番号:7と実質的配列同一性又は相同性を有する配列に加え、先に説明されているような、それらの機能的誘導体及び変種も包含している。あるいは、及び好ましくは、本発明の単離された核酸は、高ストリンジェント条件下で、配列番号:6の相補体とハイブリダイズするヌクレオチド配列を有し、これも先に説明されている。

【0052】

本願明細書に説明したラットアポトーシス-特異的eIF-5A配列の核酸及びポリペプチドの場合のように、本発明のラットアポトーシス-特異的DHS配列の核酸及びポリペプチドを使用し、ヒトを含む他の動物からアポトーシス-特異的DHS核酸及びポリペプチドを単離することができる。このようなDHS配列の動物及びヒトからの単離は、種を超えて少なくとも80%の配列類似性を基に、当該技術分野において公知の方法及び本願明細書に提供された指針を用い実現することができる。本発明は、本発明のラットアポトーシス-特異的DHSポリペプチドをコードしている核酸の検出のための、プライマー又はハイブリダイゼーションプローブとして適している核酸分子も提供する。

【0053】

アポトーシス-特異的eIF-5A及びDHSは、アポトーシス経路に關与する下流のエフェクター及び転写因子の転写後調節において恐らく作用するので、これは、疾患プロセスの基礎となるアポトーシスを含む、アポトーシスの調節に適した標的である。従って本発明は、アポトーシス-特異的eIF-5A及び / 又はDHS機能を調節する物質を細胞に投与することによる、細胞におけるアポトーシスを調節する方法も提供する。当業者により、この物質は、アポトーシス-特異的eIF-5A機能のみ、アポトーシス-特異的DHS機能単独のみ、又はアポトーシス-特異的eIF-5A及びDHSの両機能を調節するものであることができることは理解されなければならない。

【0054】

アポトーシスは、細胞における正常レベルのアポトーシス-特異的eIF-5A及び / 又はDHS機能の適当な変更により、調節することができる。本願明細書において意図されるように、修飾又は変更は、完全もしくは部分的であることができ、並びに転写もしくは翻訳の制御の変化又は細胞におけるアポトーシス-特異的eIF-5A及び / 又はDHS機能を変更するその他の変化を含むことができる。アポトーシス-特異的eIF-5A又はDHS機能は、DHSにより触

媒される、スperlミジンの4-アミノブチ部分の、前駆体eIF-5Aに特異的に保存されたリシンの -アミノ基への転位によるデオキシハイプシン残基の形成、並びにハイプシンを形成してeIF-5Aを活性化するための、この4-アミノブチル部分の、デオキシハイプシンヒドロキシラーゼによるヒドロキシル化、を意味する。

【 0 0 5 5 】

本発明のひとつの態様において、この物質は、アポトーシス-特異的eIF-5A及び / 又はDHS機能を阻害し、これによりアポトーシスを阻害することができる。アポトーシスの阻害は、強度及び / もしくは数の減少、並びに / 又は例えば、細胞縮小、クロマチン凝縮、核断片化、及び膜泡などの、いずれかもしくは全ての良く定義されたアポトーシスの形態学的特徴の開始の遅延を意味する。

10

【 0 0 5 6 】

アポトーシス-特異的eIF-5A及び / 又はDHS機能を阻害することができるひとつの物質は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチド及び / 又はアポトーシス-特異的DHSポリペプチドの一部をコードしているヌクレオチド配列を有する。アポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチド及び / 又はDHSポリペプチドをコードしている多くの適当な核酸配列は、当該技術分野において公知である。例えば、配列番号:1、3、4、5、11、15、19、20、及び21(アポトーシス-特異的eIF-5A核酸配列)、配列番号:6及び8(アポトーシス-特異的DHS核酸配列)、配列番号:12及び16(アポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチド配列)、並びに配列番号:7(アポトーシス-特異的DHSポリペプチド配列)、又はそれらの一部は、適当な配列を提供する。他の適当な配列は、本願明細書に説明した方法に従うプローブとして公知の配列を用い、見つけることができる。

20

【 0 0 5 7 】

従って本発明は、アポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチド及び / 又はアポトーシス-特異的DHSポリペプチドの一部をコードしているアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はそれらの相補体も提供する。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、RNA又はDNAの形、例えばcDNA、ゲノムDNA、又は合成RNAもしくはDNAであることができる。DNAは、二本鎖又は一本鎖であることができ、そして一本鎖であるならば、コード鎖又は非コード鎖であることができる。オリゴマー化合物のその標的核酸との特異的ハイブリダイゼーションは、この核酸の正常機能の妨害を生じ、これは一般に「アンチセンス」と称される。妨害されるDNAの機能は、複製及び転写を含む。妨害されるRNAの機能は、例えば、タンパク質翻訳部位へのRNAの転位、RNAからのタンパク質翻訳、RNAのスプライシングによる1種又は複数のmRNA種の産生、及びRNAにより保証された(engage)又は促進される触媒活性を含む。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドの全般的作用は、アポトーシス-特異的eIF-5A及び / もしくはDHSの発現の阻害、並びに / 又は生成した活性化アポトーシス-特異的eIF-5Aの量の阻害である。

30

【 0 0 5 8 】

あるいは、アポトーシス-特異的eIF-5Aのアポトーシス-特異的DHSによる活性化は、DHS酵素反応を阻害する化学物質の投与により阻害することができる。例えば、ラット黄体におけるアポトーシスを反映しているDNAラダーの開始は、PGF-2 の注射によるアポトーシス誘導後のDHS反応のインヒビターであるスperlミジンで動物が処置された場合には、遅延される(図18-19)。Jakus ら、J. Biol. Chem.、268: 13151-13159 (1993)。

40

【 0 0 5 9 】

アポトーシスは、アポトーシス-特異的eIF-5AのDNA、RNA、もしくはタンパク質を分解する物質、又はアポトーシス-特異的DHSのDNA、RNA、もしくはタンパク質を分解する物質の添加により阻害されることもあり又は実質的に減少することもあり、その結果アポトーシス-特異的DHSによるアポトーシス-特異的eIF-5Aの活性化が妨害される。別の本発明の態様において、内因性哺乳類アポトーシス-特異的DHS、アポトーシス-特異的eIF-5A、又は両方の発現の阻害は、リボザイムの使用を通じて影響を受ける。適当な薬物の例は、アポトーシス-特異的DHSによるアポトーシス-特異的eIF-5Aの活性化を阻害するもの、デオ

50

キシハイブシンヒドロキシラーゼによるアポトーシス-特異的eIF-5Aの活性化を阻害するもの、アポトーシス-特異的DHSの転写及び／又は翻訳を阻害するもの、並びにアポトーシス-特異的デオキシハイブシンヒドロキシラーゼの転写及び／又は翻訳を阻害するもの、アポトーシス-特異的eIF-5Aの転写又は翻訳を阻害するものを含む。アポトーシス-特異的DHSによるeIF-5Aの活性化を阻害する薬物の例は、スペルミジン、1,3-ジアミノ-プロパン、1,4-ジアミノ-ブタン(プトレスシン)、1,7-ジアミノ-ヘプタン、又は1,8-ジアミノ-オクタンがある。

【 0 0 6 0 】

細胞におけるアポトーシス-特異的eIF-5Aをコードしている遺伝子の不活性化により、アポトーシス-特異的eIF-5Aを阻害することも可能である。このような不活性化は、細胞における遺伝子の欠失、又は遺伝子への欠失もしくは突然変異の導入及びこれによるその遺伝子の不活性化により生じることができる。この遺伝子は、別のDNA断片へ挿入することにより不活性化し、その結果内因性アポトーシス-特異的eIF-5Aタンパク質の発現が生じないこともできる。同様に、細胞におけるアポトーシス-特異的DHSをコードしている遺伝子の不活性化により、アポトーシス-特異的eIF-5Aの活性化を阻害することも可能である。欠失及び挿入のような突然変異を真核細胞遺伝子へ導入する方法は、例えば米国特許第5,464,764号など、当該技術分野において公知である。細胞における遺伝子の突然変異に有用なオリゴヌクレオチド及び発現ベクターは、当該技術分野において公知の方法及び本願明細書に提供された指針に従い產生することができ；例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドの產生及び発現に有用な方法を使用し、細胞における遺伝子の突然変異に有用なオリゴヌクレオチド及び発現ベクターを產生することができる。

【 0 0 6 1 】

細胞におけるアポトーシス-特異的eIF-5Aをコードしている遺伝子の発現を抑制することにより、アポトーシス-特異的eIF-5Aの発現を阻害することも可能である。このような不活性化は、共抑制を介して、例えば、共抑制を生じるようなアポトーシス-特異的eIF-5Aをコードしているヌクレオチド配列(複数)の細胞への導入によって、実現することができる。同様に、共抑制を介する、細胞におけるアポトーシス-特異的DHSをコードしている遺伝子の発現の抑制により、アポトーシス-特異的eIF-5Aの活性化を阻害することが可能である。共抑制に有用なオリゴヌクレオチド及び発現ベクターは、当該技術分野において公知の方法及び本願明細書に提供した指針に従い產生することができ；例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドの產生及び発現に有用な方法は、共抑制に有用なオリゴヌクレオチド及び発現ベクターの產生に使用することができる。共抑制の方法は、例えば米国特許第5,686,649号のように、当該技術分野において公知である。

【 0 0 6 2 】

阻害(例えば、アンチセンス、突然変異、又は共抑制による)のひとつの結果は、内因性の翻訳可能なアポトーシス-特異的eIF-5A又はDHSをコードしているmRNAの量の減少である。結果的に、生成されたアポトーシス-特異的DHSタンパク質の量は、減少され、これにより活性化されたeIF-5Aの量が減少し、このことは次にアポトーシス-特異的タンパク質の翻訳を減少する。従って新規タンパク質合成がアポトーシスの開始には必要であるので、アポトーシスは阻害又は遅延される。

【 0 0 6 3 】

別の本発明の態様において、この物質は、アポトーシス-特異的eIF-5A又はDHS機能を誘導し、これによりアポトーシスを誘導することができる。アポトーシスの誘導は、細胞縮小、クロマチン凝縮、核断片化、及び膜泡のような、アポトーシスの特徴的な良く定義された形態学的特性のいずれか又は全ての、強度もしくは数のいずれかの増加、又は開始の促進を意味する。

【 0 0 6 4 】

アポトーシス-特異的eIF-5A及び／又はDHSの機能を誘導するいずれか適当な物質を使用することができる。当業者には、アポトーシス-特異的eIF-5Aの非活性型及び活性型の両方を投与することができることが理解される。非活性型、又はハイブシン非修飾型が投与

される場合、未変性のアポトーシス-特異的DHSは、eIF-5Aを活性化するであろう。アポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチド及び/又はDHSポリペプチドをコードしている多くの適当な核酸配列が、当該技術分野において公知である。例えば、配列番号:1、3、4、5、11、15、19、20及び21(アポトーシス-特異的eIF-5A核酸配列)、配列番号:6及び8(アポトーシス-特異的DHS核酸配列)、配列番号:12及び16(アポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチド配列)、並びに配列番号:7(アポトーシス-特異的DHSポリペプチド配列)、又はそれらの一部は、適当な配列を提供する。他の適当な配列は、既知の配列を本願明細書記載の方法に従いプローブとして用い見つけることができる。

【0065】

例えば、裸の核酸(オリゴヌクレオチド又はプラスミドのような裸のDNAベクター)、又は組換えにより産生されたポリペプチドを含むポリペプチドを、細胞に投与することができる。組換えにより産生されたポリペプチドは、eIF-5A又はDHSタンパク質をコードしているDNA配列が、適当な発現ベクターに配置されることを意味し、これは以下に詳述される。宿主は、この発現ベクターでトランスフェクションされ、その後所望のポリペプチドを産生する。このポリペプチドは、その後宿主細胞から単離される。組換えアポトーシスを誘導するeIF-5Aタンパク質は、例えば、当業者により、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞において産生され、及び組換えDHSを用い活性化することができる。Wangら、J Biol. Chem.、276: 17541-17549 (2001) ; Erikssonら、Semin. Hematol、38: 24-31 (2001)。これらのポリペプチドも合成することができ、これは公知のタンパク質合成法を用い合成される。

【0066】

ポリペプチド取込みは、例えば、広範な細胞への取込みを媒介する炭疽菌由来のリガンドのような、リガンドを用い促進することができる。Liuら、J. Biol.Chem.、276: 46326-46332 (2001)。組換えタンパク質は、リボソームを用い、哺乳類の標的細胞、組織、及び臓器に投与することもできる。本タンパク質を閉じ込めているリボソームは、静脈内投与される。ターゲティングは、リボソームへの細胞受容体に特異的なリガンドの組込みにより実現することができる。例えば、Kaneda、Adv Drug Delivery Rev、43: 197-205 (2000)を参照のこと。

【0067】

アポトーシス-特異的eIF-5A又はDHSの機能を誘導するひとつの好ましい物質は、発現ベクターである。従って本発明は、アポトーシス-特異的eIF-5Aポリペプチド及び/又はDHSポリペプチドをコードしている核酸に作用可能に連結されたプロモーターを有する発現ベクターを提供する。本発明の発現ベクターは、RNA又はDNAの形、例えば、cDNA、ゲノムDNA、又は合成のRNAもしくはDNAであることができる。このDNAは、二本鎖又は一本鎖であることができ、一本鎖である場合は、コード鎖又は非コード鎖であることができる。いずれか適当な発現ベクター(例えば、Pouwelsら、Cloning Vectors: A Laboratory Manual、(Elsevier, N.Y.: 1985)参照)を使用することができる。好ましい発現ベクターは、アポトーシス-特異的(関連した)eIF-5Aポリペプチド及び/又はアポトーシス-特異的(関連した)DHSポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列に作用可能に連結されたプロモーター配列を有する。

【0068】

この発現ベクターにおいて、所望の核酸及びプロモーターは作用可能に連結され、その結果プロモーターは核酸の発現を駆動することができる。核酸が発現されるという条件で、いずれか適当なプロモーターを使用することができる。このような適当なプロモーターの例は、様々なウイルスのプロモーター、真核細胞プロモーター、及び構成的に活性のあるプロモーターを含む。この作用可能な連結が維持される限りは、発現ベクターは、1以上の核酸(例えば、アポトーシス-特異的eIF-5A及び/又はDHSの両方をコードしている核酸)を含むことができる。この発現ベクターは、ポリアデニル化配列、リボソーム結合部位(RES)、転写調節エレメント(例えば、エンハンサー、サイレンサーなど)、そのベクターもしくは転写産物の安定性又は細胞内の所望の転写産物の翻訳もしくはプロセッシングを

増強する他の配列(例えば、分泌シグナル、リーダーなど)又はいずれか他の適当なエレメントのような、その他のエレメントを任意に含むことができる。

【0069】

発現ベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルス又はレンチウイルスのような、ウイルス類に由来することができる。本発明の発現ベクターは、宿主細胞へトランスフェクションすることができ、これは、バキュロウイルスシステムを含む、細菌種、哺乳類又は昆虫の宿主細胞システム(例えば、Luckowら、Bio/Technology、6: 47 (1988)参照)、並びに293、COS-7、C127、3T3、CHO、HeLa、BHKのような確立された細胞株を含むが、これらに限定されるものではない。

【0070】

プラスミド及び他のウイルスベクター(例えば、単純ヘルペスウイルス)とは異なり、アデノウイルスベクターは、分裂及び非分裂の両細胞において遺伝子導入を実現し、心筋、血管内皮、及び骨格筋のような心臓血管系関連部位において高レベルのタンパク質発現を伴うので、アデノウイルスベクターが好ましい。更にアデノウイルスベクターにより導入された遺伝子は、染色体外(epichromosomal)の位置で機能し、その結果導入遺伝子の宿主ゲノムの重要な部位への不適切な挿入のリスクがほとんどない。アデノウイルスベクターは、望ましくはウイルス複製に必要な少なくとも1つの遺伝子機能を欠損していてもいる。好ましくは、アデノウイルスベクターは、アデノウイルスゲノムのE1、E2、及び/又はE4領域の少なくとも1つの必須遺伝子機能を欠損している。より好ましくは、追加的にこのベクターは、アデノウイルスゲノムのE3領域の少なくとも一部を欠損している(例えば、E3領域のXbaI欠失)。

【0071】

組換えアデノウイルスは、このウイルスを、培養培地へ単に添加することにより、培養された細胞へ送達することができる。宿主動物/ヒトの感染は、このウイルス粒子を血流又は望ましい組織へ直接注射することにより、実現することができる。このウイルスの血清中半減期は、ウイルスをリボソーム(例えば、Lipofectin、Life Technologies社)又はポリエチレングリコールと複合することにより延長することができる。アデノウイルスベクターは、通常ウイルスのファイバータンパク質のknobドメインと、コクサッキーウイルス/アデノウイルス受容体(CAR)の間の相互作用を介して、細胞に侵入する。このウイルスベクターは、ある種の細胞受容体に特異的なリガンドを発現するようにウイルスを遺伝子操作することにより、特異的細胞、又はCARを発現しない細胞へ方向付けることができる。

【0072】

別の態様において、アポトーシスは、内因性アポトーシス-特異的eIF-5A、もしくはアポトーシス-特異的DHS、又は両方の転写を、化学物質により化学的にアップレギュレーションするか、もしくはアポトーシス-特異的eIF-5Aの活性化を化学的に増強することにより、開始又は増強することができる。このような態様のひとつにおいて、DHS及びeIF-5Aの転写をアップレギュレーションするために、PGF-2 を動物/ヒトの癌細胞又は腫瘍へ投与することができる。

【0073】

アポトーシス-特異的eIF-5Aは、アポトーシス経路に関連した下流のエフェクター及び転写因子の転写後調節において恐らく作用するので、これは、疾患プロセスの基礎となるアポトーシスを含む、アポトーシスの調節のための適当な標的である。アポトーシス-特異的eIF-5A及びアポトーシス-特異的DHSを、いずれか単独で又は組合せて調節する本発明の方法は、動物の細胞において実現することができ、アポトーシスの誘導又は増強を生じ、並びにアポトーシスを受ける細胞の不能に関連した病因を生じる、さもなければ病因を有することにより引き起こされた疾患の治療及び予防のための新規方法及び組成物をもたす。

【0074】

多くの重要なヒト疾患が、アポトーシス制御の異常により引き起こされる。これらの異

10

20

30

40

50

常は、細胞数の病的増加(例えば、癌)又は細胞の損傷を及ぼす喪失(例えば、変性性疾患)を生じることができる。非限定的例として、本発明の方法及び組成物を使用し、下記のアポトーシス-関連疾患及び障害を予防又は治療することができる：神経学的／神経変性性障害(例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ルー・ゲーリング病)、自己免疫疾患(例えば、リウマチ様関節炎、全身性紅斑狼瘡(SLE)、多発性硬化症)、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)、運動神経障害、虚血、慢性心不全、卒中、乳児脊髄性筋萎縮症、心停止、腎不全、アトピー性皮膚炎、敗血症及び敗血症性ショック、AIDS、肝炎、緑内障、糖尿病(1型及び2型)、喘息、色素性網膜炎、骨粗鬆症、異種移植片拒絶反応、及び火傷損傷。

【0075】

10

本発明の方法は、癌細胞を殺傷するか又は腫瘍の進行を阻害するのに十分な量で、各々、癌細胞を有する動物又は腫瘍に罹患した動物の治療的処置のために使用することができる。これを実現するのに適当な量は、治療の有効量として定義される。この用途に関する有効量は、疾患の重症度及び動物自身の免疫系の全般的状態に応じて決まる。

【0076】

腫瘍増殖の阻害は、例えば、腫瘍の増殖、浸潤、転移及び／又は再発のような、腫瘍の進行の予防又は低下を意味する。本発明の方法を使用し、例えば、乳房、心臓、肺、小腸、結腸、脾臓、腎臓、膀胱、頭部及び頸部、卵巣、前立腺、脳、膵臓、皮膚、骨、骨髓、血液、胸腺、子宮、精巣、頸管又は肝臓の腫瘍を含む、適当な腫瘍を治療することができる。動物、好ましくは哺乳類、及びより好ましくはヒトは、本発明の組成物及び方法を用い治療することができる。従って本発明の方法は、*in vitro*、*ex vivo*、又は*in vivo*で行うことができる。

20

【0077】

投与スケジュールは、病態及び動物の状態によっても変動し、並びに典型的には単回ボラス用量又は連続注入から、1日あたりの反復投与(例えば、4～6時間毎)までの範囲であるか、又は治療及び動物の状態により示されるであろう。しかし、本発明は、いずれか特定の用量に限定されないことは注意しなければならない。

【0078】

本発明において、投与のためには、例えば、経口、静脈内、腹腔内、皮下、又は筋肉内投与などの、いずれか適当な方法又は経路を使用することができる。投与されるアンタゴニストの投与量は、多くの要因によって決まり、これは例えば投与される分子の種類、治療される腫瘍の種類及び重症度、並びに投与経路を含む。しかし、本発明は、いずれか特定の投与方法又は経路に限定されないことは強調されるべきである。

30

【0079】

ひとつの代わりの態様において、本発明の方法は、1又は複数の従来の療法と組合せて使用することができる。例えば、化学療法剤又は放射線照射のような、適当な抗新生物形成性物質を使用することができる。追加の別の態様において、本発明の方法は、1種又は複数の適当なアジュバント、例えばサイトカイン(例えばIL-10及びIL-13)又は他の免疫賦活剤と組合せて使用することができる。

【0080】

40

別の代わりの態様において、アポトーシス-特異的eIF-5A及び増殖性eIF-5Aを使用し、アポトーシス-関連した障害の診断を行うことができ、増殖しているeIF-5Aは、アポトーシス-特異的eIF-5Aとは、異なるプロモーターで異なる位置から転写される点異なる；これらふたつは、構造的に相同であるか、カルボキシ末端が異なる。本発明の診断法は、所定の細胞内に存在する増殖性eIF-5Aの量の、同じ細胞に存在するアポトーシス-特異的eIF-5Aの量との比較に関連している。正常に機能する期間に、細胞は、増殖性eIF-5Aをアポトーシス-特異的eIF-5Aよりもより多くの量有する。しかし、一部の癌細胞において、正常調節機構は消失し(*go awry*)、及び増殖性eIF-5Aの量に対するアポトーシス-特異的eIF-5Aの量は、変更される。これは恐らく、細胞の表現型の変化の前に、細胞の癌性として診断することを可能にする。

50

【0081】

更に別の態様において、増殖性eIF-5Aのアポトーシス-特異的eIF-5Aに対する比を、薬物スクリーニングにおいて使用することができる。このような方法は、所定の細胞に存在する増殖性eIF-5Aの量の、同じ細胞に存在するアポトーシス-特異的eIF-5A量との比較にも関連している。増殖性eIF-5Aのアポトーシス-特異的eIF-5Aに対する正常な比は、細胞を薬物候補物質と接触した後の増殖性eIF-5Aのアポトーシス-特異的eIF-5Aへの比と比較されるであろう。接触後の増殖性eIF-5Aのアポトーシス-特異的eIF-5Aに対する比の変更は、これらのアポトーシス-調節活性を有する候補物質の同定を可能にする。アポトーシス調節活性を有する候補物質は、アポトーシスの阻害又は誘導のいずれかを通じ、アポトーシスに関連した疾患の治療において有用である。加えて、増殖性eIF-5Aのアポトーシス-特異的eIF-5Aに対する比の変更を用い、アポトーシスを調節することができ、これは異常アポトーシスに関連して本願明細書において説明された状態のいずれかの治療において有用であることができる。

10

【0082】

この方法を使用し、大量の可能性のある候補物質、すなわちライブラリーを、効果的にスクリーニングし、アポトーシスを調節するライブラリーのメンバーを同定することができる。いずれかの候補物質又は候補物質のライブラリーを、本方法を用いスクリーニングすることができる。例えば、アポトーシスモジュレーターとして有望であることが示された生物学的反応修飾剤は、シグナル伝達経路を変更するモノクローナル抗体、TRAIL(Apo2リガンド)のようなサイトカイン、レチノイド/ステロイドファミリー核受容体のリガンド、並びにプロテインキナーゼに結合及び阻害する小-分子化合物を含み、これらは本発明の方法を用い、規定されたアポトーシス調節する活性をスクリーニングすることができる。

20

【0083】

ひとつの適当な候補物質は、プロテインキナーゼC- アンチセンスオリゴヌクレオチド、ISIS 3521(ISIS Pharmaceuticals社、カールスバッド、CA)であり、これは抗-腫瘍活性を有する。別の特異的候補物質は、カスパーゼ(Idun Pharmaceuticals社、サンディエゴ、CA)、これは、癌及び神経変性性疾患につながる様々な細胞種におけるアポトーシスの惹起及び実行において重要な役割を果たすことが知られている；GENASENSE(商標)(Genta社、パークレーハイツ、NJ)、これはBcl-2の生成をブロックするアンチセンス薬物である；INGN 241(Introgen Therapeutics社、ヒューストン、TX)、これはP53を標的とする遺伝子療法である；リツキシマブ(IDEC社、大阪、日本)、これは抗-CD20モノクローナル抗体である；並びに、心臓血管系疾患及び癌のための全般的アポトーシス駆動療法(AEgera Therapeutics社、ケベック、カナダ)を含む。

30

【0084】

本発明の核酸及びポリペプチドは、予防又は治療の目的で動物において使用される場合には、医薬として許容できる担体を追加的に含有する組成物の形で投与されることは理解される。適当な医薬として許容できる担体は、例えば、1又は複数の水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどに加え、それらの組合せを含む。医薬として許容できる担体は更に、湿潤剤又は乳化剤、保存剤又は緩衝剤のような少量の佐剤を含有し、これらは結合タンパク質の貯蔵期間又は有効性を増強する。当該技術分野において周知であるように、注射剤組成物を、哺乳類への投与後、活性成分の即時、持続又は遅延された放出を提供するために、製剤することができる。

40

【0085】

本発明の組成物は、様々な形であることができる。これらは、例えば、固形、半固形及び液体の剤形、例えば錠剤、丸剤、散剤、液体の液剤、分散剤又は懸濁剤、リポソーム、坐剤、注射用及び点滴用液剤を含む。好ましい形は、意図された投与様式及び治療用途によって決まる。

【0086】

このような組成物は、医薬の技術分野において周知の方法で調製することができる。こ

50

の組成物の製造において、活性成分は通常、担体と混合されるか、又は担体で希釈されるか、及び／又は例えばカプセル、サシェ、紙もしくは他の容器のような担体内に封入される。担体が希釈剤として利用される場合、これは、固形、半固形又は液体の材料であり、これは、活性成分の溶媒、賦形剤又は媒質として作用する。従って本組成物は、錠剤、トローチ剤、サシェ剤、カシェ剤、エリキシル剤、懸濁剤、エアロゾル(固形物として又は液体媒質中)、例えば最大10質量%の活性成分を含有する軟膏剤、軟及び硬ゼラチンカプセル剤、坐剤、注射用液剤、懸濁剤、無菌包装した散剤、及び局所用貼付剤の形であることができる。

【0087】

ここで本願明細書において一般的に説明されたように、同じものが、例証のために提供される下記実施例を参照しより容易に理解されるであろう。これらの実施例は、本発明の理解を補助するために示されているが、いかなる意味においてもその範囲を制限することは意図されず、そのようには構築されていない。これらの実施例は、通常の方法の詳細な説明は含まない。このような方法は、当業者には周知であり、及び多くの刊行物において説明されている。ベクター及びプラスミドの構築、ポリペプチドをコードしている核酸のそのようなベクター及びプラスミドへの挿入、プラスミドの宿主細胞への導入、並びに遺伝子及び遺伝子産物のそれらの発現及び決定において使用されるもののような、通常の方法の詳細な説明は、Sambrook, J.らの著書(Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press社(1989))を含む、多くの刊行物から得ることができる。本願明細書において言及された全ての参考文献は、それらの全体が組込まれている。

【実施例】

【0088】

実施例

実施例1

本実施例は、アポトーシス-特異的発現を示しているラットeIF-5A核酸をコードしている完全長cDNAの単離及び特徴決定を説明している。

【0089】

ラット黄体における過排卵及びアポトーシス誘導

幼体(21-30日齢)雌ラットを、PMSG(妊馬血清ゴナドトロピン)50IUを、そして60~65時間後にHCG(ヒト絨毛性ゴナドトロピン)50IUを皮下注射することにより、過剰排卵させた。HCGによる処置後7日目に、PGF-2 を500mg皮下注射することにより黄体アポトーシスを誘導した。ラットは、PGF-2 処置後異なる時点(例えば、1、8、及び24時間)で屠殺し、黄体を摘出し、液体窒素中に入れた。対照黄体組織を、PGF-2 処置直前に屠殺したラットから摘出した。

【0090】

ラット卵巢卵黄細胞の分散

過排卵の6~9日後、ラットを、PGF-2 500mgの複数部位への皮下注射により処置した。15~30分後、過剰排卵したラットから卵巢を摘出し、及び氷上のEBSS(Gibco社)中に入れ、乾くまでふき取り、秤量した。結合組織を取り除き、カミソリの刃で卵巢を細かく細断し、及びEBSS 2Xで2回洗浄した。コラゲナーゼ溶液を、EBSS 5ml中でコラゲナーゼ(Sigma社、カタログ番号C5138)6.5mgを激しく攪拌することにより調製した。8個の卵巢から細断した組織を、50mlエレンマイヤーフラスコに入ったEBSS中のコラゲナーゼ5mlに添加し、Diamedピペットに数回吸引(withdrawing)することによりゆっくり攪拌した。その後細断した組織の入ったフラスコを、95%空気、5%CO₂下で、穏やかに攪拌(GFLインキュベーターにおいて位置45で)しながら37 °Cの水浴中に20分間配置した。

【0091】

このインキュベーション後、フラスコを氷上に配置し、細胞浮遊液をプラスチック製全容ピペットにより、Swiss Nitex Nylon Monofilament(75m)を装着したNitexフィルター上に移した。濾液を、15mlのFalcon試験管に収集した。コラゲナーゼ溶液(コラゲナーゼ6.5

mg / EBSS 5ml)の第二のアリコート(2.5ml)を、50mlのエレンマイヤーフラスコに残留している細断した組織に添加し、ピペットを用いて穏やかに攪拌し、10分間インキュベーションし、前述のように濾過した。これらふたつの濾液を一緒にし、臨床用遠心機(～200g)で5分間室温で遠心した。2ml以下を残して全ての上清を、ピペットで除去し、廃棄し、沈殿した細胞を、残留する上清2ml中に再浮遊させた。

【0092】

これらの細胞を、MEM 5mlを添加し及び遠心し及び前述のように再浮遊することにより、2回洗浄した。洗浄した細胞を、50mlのエレンマイヤーフラスコ中で10mMグルタミンを含有するMEM 30ml中に再浮遊し、及び振盪せずに37℃で、95%空気、5%CO₂下で1時間インキュベーションした。その後細胞を、前述のように遠心し、10mMグルタミンを含有するMEM中に再浮遊した。

10

【0093】

分散した細胞の濃度を、血球計数器を用いて決定し、そして、生存度をトリパンブルー色素を用いて評価した。細胞2～5×10⁵個のアリコートを、12x75mm試験管中に配置し、振盪せずに、37℃で、95%空気、5%CO₂下で2～5時間インキュベーションした。この期間の間のアポトーシスの進行を、DNAラダーの程度の評価によりモニタリングした。

【0094】

DNAラダーによるラット黄体アポトーシスの可視化

アポトーシスの程度を、DNAラダーにより決定した。ゲノムDNAを、分散された黄体細胞又は摘出された黄体組織から、QIAamp DNA Blood Kit(Qiagen社)を製造業者の指示に従い使用し、単離した。黄体組織を、PGF-2 処置によるアポトーシス誘導前に、アポトーシス誘導後1及び24時間で摘出した。単離されたDNAは、DNAの500ngを、0.2 µCi [_a-³²P]dCTP、1mM Tris、0.5mM EDTA、3単位のクレノウ酵素、並びに各0.2pMのdATP、dGTP、及びdTTPと共に、室温で30分間インキュベーションすることにより、末端-標識した。組込まれなかったヌクレオチドを、Sambrookらに従い、1ml Sepadex G-50カラム中を試料を通すことにより除去した。その後試料を、Tris-酢酸-EDTA(1.8%)ゲル電気泳動において分離した。ゲルを、減圧下、室温で30分間乾燥し、x-線フィルムに-80℃で24時間曝露した。

20

【0095】

ひとつの実験において、過剰排卵したラット黄体のアポトーシスの程度を、PGF-2 の注射後、0、1、又は24時間のいずれかで試験した。0時間対照においては、卵巣を、PGF-2 注射せずに摘出した。アポトーシスに関連したヌクレアーゼ活性を反映している低分子量DNA断片のラダーは、PGF-2 処置前に摘出した対照黄体組織においては明らかではないが、アポトーシス誘導後1時間以内に認識可能となり、アポトーシス誘導後24時間までに顕著となり、これは図16に示した。この図において、上側パネルは、ラット黄体アポトーシス-特異的DHS cDNAの³²P-dCTP-標識された3'-非翻訳領域でプロービングしたノーザンプロットのオートラジオグラフィーである。下側パネルは、総RNAの臭化エチジウム染色したゲルである。各レーンは、10 µg RNAを含んだ。このデータは、血清採取後eIF-5A転写産物がダウンレギュレーションされたことを示している。

30

【0096】

別の実施例においては、対応する対照動物を、PGF-2 の代わりに生理食塩水で処置した。生理食塩水又はPGF-2 による処置の15分後、黄体を動物から摘出した。ゲノムDNAを、動物からの組織の摘出後3時間及び6時間で、黄体から単離した。DNAラダー及びゲノムDNAの増大した末端標識が、PGF-2 -処置した動物からの組織の摘出後6時間で明らかであったが、組織摘出後3時間では明らかではなかった。図17参照。黄体を、PGF-2 で処置後15分で摘出し、そしてEBSS(Gibco社)中のin vitro条件下で6時間維持した場合にも、アポトーシスを反映しているDNAラダーが明らかであった。アポトーシスに関連したヌクレアーゼ活性も、ゲノムDNAのより多数の末端標識から明らかであった。

40

【0097】

別の実験において、過排卵は、PGF-2 500 µgの皮下注射により誘導した。対照ラットは、等量の生理食塩水で処置した。15～30分後に、卵巣を摘出し、そしてコラゲナーゼと

50

共に細断した。PGF-2 処理したラット由来の分散された細胞を、10mMグルタミン + 10mM スペルミジン中で1時間及び更にスペルミジンを伴わずに10mMグルタミン中で5時間(レーン2)、又は10mMグルタミン + 10mMスペルミジンで1時間及び更に10mMグルタミン + 1mMスペルミジン中で5時間(レーン3)インキュベーションした。生理食塩水で処置したラット由来の対照細胞は、コラゲナーゼで分散し、そしてグルタミン単独中で1時間及び更に5時間インキュベーションした(レーン1)。各試料から500ngのDNAを、クレノウ酵素を用い[$-^{32}\text{P}$]-dCTPで標識し、1.8%アガロースゲル上で分離し、及びフィルムに24時間曝露した。結果を図18に示した。

【0098】

更に別の実験において、過剰排卵したラットに、スペルミジン1mg/100g体重を皮下注射し、PGF-2 の500 μg の皮下注射の24、12、及び2時間前に3回、0.333mg/100g体重の等用量で送達した。対照ラットは3セットに分けた：無注射、スペルミジンの3回注射、PGF-2 なし；及び、PGF-2 処置前の等量の生理食塩水の3回注射。卵巣を、プロスタグランジン処置後1時間35分又は3時間45分後のいずれかで、ラットから摘出し、そしてDNAの単離に使用した。各試料からの500ngのDNAを、クレノウ酵素を用い[$-^{32}\text{P}$]-dCTPで標識し、1.8%アガロースゲルで分離し、及びフィルムに24時間曝露した：レーン1、無注射(動物は、レーン3-5と同時に屠殺した)；レーン2、スペルミジンの3回の注射(動物は、レーン3-5と同時に屠殺した)；レーン3、生理食塩水で3回の注射、その後のPGF-2 の注射(動物は、PGF-2 処置後、1時間35分で屠殺した)；レーン4、スペルミジンの3回の注射、その後のPGF-2 の注射(動物は、PGF-2 処置後、1時間35分で屠殺した)；レーン5、スペルミジンの3回の注射、その後のPGF-2 の注射(動物は、PGF-2 処置後、1時間35分で屠殺した)；レーン6、スペルミジンの3回の注射、その後のPGF-2 の注射(動物は、PGF-2 処置後、3時間45分で屠殺した)；レーン7、スペルミジンの3回の注射、その後のPGF-2 の注射(動物は、PGF-2 処置後、3時間45分で屠殺した)。結果を図19に示した。

【0099】

RNA単離

総RNAを、PGF-2 によるアポトーシス誘導後、様々な時点で、ラットから摘出した黄体組織から単離した。簡単に述べると、組織(5g)を、液体窒素中で粉碎した。粉碎した粉末を、グアニジウム緩衝液30ml(4Mグアニジニウムイソチオシアネート、2.5mM NaOAc、pH8.5、0.8% β -メルカプトエタノール)と混合した。この混合物を、4層のMiraclothを通して濾過し、10,000g、4 で30分間遠心した。その後上清を、11,200gで20時間、塩化セシウム密度勾配遠心分離を施した。ペレット化したRNAを、75%エタノールで洗浄し、DEPC-処理水600ml中に再懸濁し、95%エタノール1.5ml及び3M NaOAc 60mlにより、RNAを-70 で沈殿した。

【0100】

ゲノムDNA単離及びラダー

ゲノムDNAを、QIAamp DNA Blood Kit(Qiagen社)を製造業者の指示に従い使い、抽出された黄体組織又は分散された黄体細胞から、単離した。DNAは、500ngのDNAを、0.2 μCi [$-^{32}\text{P}$]dCTP、1mM Tris、0.5mM EDTA、3単位クレノウ酵素、及び各0.2pMのdATP、dGTP、及びdTTPと共に、室温で30分間インキュベーションし、末端-標識した。組込まれなかったヌクレオチドを、Maniatisに説明された方法に従い、1ml Sepadex G-50カラム中に試料を通すことにより除去した。その後試料を、Tris-酢酸-EDTA(2%)ゲル電気泳動において分離した。ゲルを、減圧下、室温で30分間乾燥し、x-線フィルムに-80 で24時間曝露した。

【0101】

プラスミドDNA単離、DNA配列決定

Sambrookら(前掲)の説明した、アルカリ溶解法を用い、プラスミドDNAを単離した。完全長陽性(positive)cDNAクローンを、ジデオキシ配列決定法を用い、配列決定した。Sangerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、74: 5463-5467。オープンリーディングフレームを集計し、及びBLAST検索(GenBank、ベセスダ、MD)を用いて解析し、そして配列アラインメ

ントを、BCM Search Launcher: Multiple Sequence Alignments Pattern-Induced Multiple Alignment Methodを用いて行った(F. Corpet、Nuc. Acids Res., 16: 10881-10890 (1987)参照)。配列及び配列アラインメントを図5-11に示す。

【0102】

ラット黄体RNAのノーザンブロットハイブリダイゼーション

アポトーシスの様々な段階でラット黄体から単離した総RNA 20mgを、1%変性ホルムアルデヒドアガロースゲル上で分離し、ナイロン膜に固定した。ランダムプライマーキット(Boehringer社)を用いて³²P-dCTPで標識された完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5A cDNA(配列番号:1)を用い、膜をプロービングした(7x10⁷)。あるいは、ランダムプライマーキット(Boehringer社)を用い³²P-dCTPで標識された完全長ラットアポトーシス-特異的DHS cDNA(配列番号:6)を用い、膜をプロービングした(7x10⁷cpm)。これらの膜を、1x SSC、0.1%SDSで室温で1回、及び0.2xSSC、0.1%SDS、65℃で3回洗浄した。これらの膜を乾燥し、X-線フィルムに一晚-70℃で曝露した。

【0103】

認めることができるように、eIF-5A及びDHSは両方とも、アポトーシス状態の黄体組織において、アップレギュレーションされた。アポトーシス-特異的eIF-5Aの発現は、PGF-2処置によるアポトーシスの誘導後に有意に増強され、0時には低い、処理の1時間以内に実質的に増大され、処理の8時間以内にさらに増大され、処理の24時間以内にわずかに増大された(図14)。DHSの発現は、0時に低く、処理の1時間以内に実質的に増大され、処理の8時間以内にさらに増大され、処理の24時間以内に再度わずかに増大された(図15)。

【0104】

酵母、真菌、及びヒトeIF-5A配列を基にしたプライマーを使用するアポトーシス状態のラット黄体RT-PCR産物の産生

この遺伝子の3'末端に相当する部分長のアポトーシス-特異的eIF-5A配列(配列番号:11)を、アポトーシス状態のラット黄体RNA鋳型から、酵母、真菌及びヒトeIF-5A配列からデザインされたオリゴヌクレオチドプライマー対を使用する、RT-PCRにより産生した。ラットeIF-5A遺伝子の3'末端の単離に使用した上流プライマーは、20ヌクレオチド縮重プライマー: 5' TC SAARACHGGNAAGCAYGG 3'(配列番号:9)、ここでSは、C及びGから選択され; Rは、A及びGから選択され; Hは、A、T、及びCから選択され; Yは、C及びTから選択され; そして、Nは、いずれかの核酸である。ラットeIF-5A遺伝子の3'末端の単離に使用された下流プライマーは、42ヌクレオチドを含む: 5' GCGAAGCTTCCATGGCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTT 3'(配列番号:10)。逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を行った。簡単に述べると、下流プライマー5mgを使用し、cDNAの第一鎖を合成した。その後第一鎖を、上流及び下流両プライマーを使用する、RT-PCRの鋳型として使用した。

【0105】

アガロースゲル上のRT-PCR産物の分離は、900bp断片の存在を明らかにし、これを、平滑末端ライゲーションを使用しpBluescript(商標)(Stratagene Cloning Systems社、ラホヤ、CA)にサブクローニングし、そして配列決定した(配列番号:11)。3'末端のcDNA配列は、配列番号:11であり、そして3'末端のアミノ酸配列は、配列番号:12である。図1-2参照。

【0106】

この遺伝子の5'末端に相当する部分長アポトーシス-特異的eIF-5A配列(配列番号:15)及び3'末端との重複を、アポトーシス状態のラット黄体RNA鋳型から、RT-PCRにより産生した。5'プライマーは、配列5' CAGGTCTAGAGTTGGAATCGAAGC 3'(配列番号:13)を有する24-merであり、これはヒトeIF-5A配列からデザインされた。3'プライマーは、配列5' ATATCTC GAGCCTTGATTGCAACAGCTGCC 3'(配列番号:14)を有する30-merであり、これは3'末端RT-PCR断片に従いデザインした。逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を行った。簡単に述べると、下流プライマー5mgを使用し、cDNAの第一鎖を合成した。その後第一鎖を、上流及び下流両プライマーを使用する、RT-PCRの鋳型として使用した。

【0107】

アガロースゲル上のRT-PCR産物の分離は、500bp断片の存在を明らかにし、これを、それぞれ、上流及び下流プライマーに存在するXbaI及びXhoIクローニング部位を使用しpBluescript(商標)(Stratagene Cloning Systems社、ラホヤ、CA)にサブクローニングし、並びに配列決定した(配列番号:15)。5'末端のcDNA配列は、配列番号:15であり、そして5'末端のアミノ酸配列は、配列番号:16である。図2参照。

【0108】

ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aの3'及び5'末端の配列(各々、配列番号:11及び配列番号:15)は、重複し、及び完全長cDNA配列(配列番号:1)を生じた。この完全長配列を並置し、そしてGeneBankデータベースの配列と比較した。図1-2参照。このcDNAクローンは、計算分子質量16.8kDaを持つ154個のアミノ酸ポリペプチド(配列番号:2)をコードしている。RT-PCRにより得られたラットアポトーシス-特異的eIF-5A遺伝子の完全長cDNAのヌクレオチド配列、配列番号:1は、図3に示し、そして対応する由来したアミノ酸配列は、配列番号:9である。由来したeIF-5Aの完全長アミノ酸配列は、ヒト及びマウスeIF-5a配列と並置した。図7-9参照。

10

【0109】

ヒトDHS配列を基にしたプライマーを使用するアポトーシス状態のラット黄体RT-PCR産物の産生

この遺伝子の3'末端に相当する部分長アポトーシス-特異的DHS配列(配列番号:6)を、アポトーシス状態のラット黄体RNA鋳型から、ヒトDHS配列からデザインしたオリゴヌクレオチドプライマー対を使用する、RT-PCRにより産生した。5'プライマーは、配列5'GTCTGTGT ATTATTGGGCC 3' (配列番号:17)を有する20-merであり；3'プライマーは、配列5' GCGAAG CTTCATGGCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3' (配列番号:18)を有する42-merである。逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を行った。簡単に述べると、下流プライマー5mgを使用し、cDNAの第一鎖を合成した。その後第一鎖を、上流及び下流両プライマーを使用する、RT-PCRの鋳型として使用した。

20

【0110】

アガロースゲル上のRT-PCR産物の分離は、606bp断片の存在を明らかにし、これを、平滑末端ライゲーションを使用しpBluescript(商標)(Stratagene Cloning Systems社、ラホヤ、CA)にサブクローニングし及び配列決定した(配列番号:6)。RT-PCRにより得られたラットアポトーシス-特異的eIF-5A遺伝子の部分長cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:6)を、図4に示し、及び対応する由来したアミノ酸配列は、配列番号:7である。

30

【0111】

ゲノムDNAの単離及びサザンブロット解析

サザンブロットのためのゲノムDNAを、摘出したラット卵巢から単離した。卵巢組織約100mgを、小片に分割し、15mlのチューブ内に入れた。この組織を、PBS 1mlと共に組織浮遊液を穏やかに振盪することにより2回洗浄し、その後ピペットを用いPBSを除去した。この組織を、DNA-緩衝液(0.2M Tris-HCl、pH8.0及び0.1mM EDTA)2.06ml中に再懸濁させ、並びに10%SDS 240 µl及びプロテアーゼK(Boehringer Mannheim社；10mg/ml)100 µlを添加した。この組織を、振盪している水浴中に45℃で一晩放置した。翌日、別のプロテアーゼK(10mg/ml)100 µlを添加し、そして組織浮遊液を、45℃の水浴中で更に4時間インキュベーションした。インキュベーション後、この組織浮遊液を、等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)で1回、そして等量のクロロホルム：イソアミルアルコール(24:1)で1回抽出した。抽出後、1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)及び2容量のエタノールを添加した。ブンゼンバーナーを用い密封し及びフック(hook)を形成したガラス製ピペットを用い、溶液からDNA糸を吸い込み、このDNAを、清潔な微量遠心管に移した。このDNAを、1回70%エタノールで洗浄し、そして10分間風乾した。DNAペレットを、500 µlの10mM Tris-HCl(pH8.0)中に溶解し、そして10 µl RNase A(10mg/ml)を添加し、そしてこのDNAを、37℃で1時間インキュベーションした。DNAを、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)で1回抽出し、そしてこのDNAを、1/10容量の3M酢酸ナト

40

50

リウム(pH5.2)及び2容量のエタノールを添加することにより沈殿させた。DNAを、13,000x g、4 で10分間遠心することにより、ペレット化した。DNAペレットを、70%エタノールで1回洗浄し、そしてDNAを200 μ lの10mM Tris-HCl(pH8.0)中で4 で一晩回転することにより、溶解した。

【0112】

サザンブロット解析のために、ラット卵巣から単離されたゲノムDNAを、内在性遺伝子を切断しないか又は1回のみ切断するような様々な制限酵素により消化した。これを実現するために、10 μ gのゲノムDNA、20 μ l 10x反応緩衝液及び100U制限酵素を、5~6時間、総反応容量200 μ l中で反応させた。消化したDNAを、0.7%アガロースゲル上に負荷し、そして40Vで6時間又は15Vで一晩のいずれかで電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを、0.2 N HCl中で10分間脱プリン化(depurate)し、その後2回変性溶液(0.5M NaOH、1.5M NaCl)中で15分間の洗浄、並びに中和緩衝液(1.5M NaCl、0.5M Tris-HCl、pH7.4)中での15分間の洗浄を2回行った。DNAを、ナイロン膜に転写し、及びこの膜を、ハイブリダイゼーション溶液(40%ホルムアミド、6xSSC、5xDenhardt's液(1xDenhardt's液は、0.02% Ficoll、0.02% PVP、及び0.02% BSAである。)、0.5% SDS、及び1.5mg変性サケ精子DNA)中で予備ハイブリダイズした。ラットeIF-5A cDNA(650bpの3'UTR及び50bpのコード領域)の3'UTRの700bp PCR断片を、ランダムプライミングにより[32 P]-dCTPで標識し、及びこの膜に1 x 10⁶ cpm/mlで添加した。

【0113】

同様に、ラットDHS cDNA(450bpのコード領域及び156bpの3'UTR)の606bp PCR断片を、ランダムプライムし、[32 P]-dCTPで標識し、そして第二の同定膜へ、1 x 10⁶ cpm/mlで添加した。これらのブロットを、一晩、42 でハイブリダイズし、その後2xSSC及び0.1% SDSで2回42 で、並びに1xSSC及び0.1% SDSで2回42 で洗浄した。その後これらのブロットを、3~10日間、フィルムに曝露した。

【0114】

ラット黄体(corpus)ゲノムDNAを、図20に示された制限酵素により切断し、そして 32 P-dCTP-標識された完全長eIF-5A cDNAでプロービングした。高ストリンジェンシー条件下でのハイブリダイゼーションは、完全長cDNAプローブの、各制限酵素が消化したDNA試料のいくつかの制限断片へのハイブリダイゼーションを明らかにし、このことは、eIF-5Aのいくつかのアイソフォームの存在を示している。特に注目すべきは、ラットゲノムDNAを、アポトーシス-特異的eIF-5Aのオープンリーディングフレーム内に制限部位を有するEcoRVで消化した場合には、eIF-5Aのアポトーシス-特異的アイソフォームのふたつの制限断片が、サザンブロットで検出可能であることである。これらふたつの断片は、図20において2個の矢印で示した。eIF-5Aのアポトーシス-特異的アイソフォームに対応する制限断片は、EcoR1及びBamH1で標識されたレーンにおいて1個の矢印で示し、これらの制限酵素は、オープンリーディングフレーム内に切断部位を有さなかった。これらの結果は、アポトーシス-特異的eIF-5Aは、ラットにおいて単コピー遺伝子であることを示唆している。図5から13に示したように、eIF-5A遺伝子は、種を超えて高度に保存されており、その結果、あらゆる種内のアイソフォーム間には著しい量の保存が存在すると予想される。

【0115】

図21は、 32 P-dCTP標識された部分長ラット黄体アポトーシス-特異的DHS cDNAでプロービングしたラットゲノムDNAのサザンブロットを示している。このゲノムDNAは、EcoRVで切断したが、この制限酵素は、プローブとして使用した部分長cDNAは切断しない。2個の制限断片が明らかであり、このことはその遺伝子の2種のコピーが存在するか、又はこの遺伝子はEcoRV部位を伴うイントロンを含むことを示している。

【0116】

実施例2

本実施例は、アポトーシス-特異的eIF-5A及びDHSによるアポトーシスの調節を明らかにしている。

【0117】

COS-7細胞の培養及びRNA単離

野生型T抗原をコードしているSV40変異体により形質転換されたアフリカミドリザル腎臓線維芽細胞様細胞株であるCOS-7を、全てのトランスフェクション-ベースの実験に使用した。COS-7細胞を、L-グルタミン0.584g/L、グルコース4.5g/L、及び炭酸水素ナトリウム0.37%を含有する、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)において培養した。この培養培地に、10%ウシ胎仔血清(FBS)及び100Uペニシリン/ストربتマイシンを補充した。細胞を、5%CO₂及び95%空気の加湿環境下、37℃で増殖した。細胞を、0.25%トリプシン及び1mM EDTAの溶液で接着細胞を剥離することにより、3~4日毎に、継代培養した。剥離した細胞は、新たな培地が入った新規培養皿に分割比1:10で分配した。

【0118】

RNA単離に使用したCOS-7細胞は、150-mm組織培養処理皿(Coming社)において増殖した。これらの細胞をトリプシン-EDTA溶液で剥離することにより、それらを収集した。剥離した細胞は、遠心管に収集し、そして細胞を3000rpmで5分間の遠心によりペレット化した。上清を除去し、及び細胞ペレットを、液体窒素中で瞬間凍結した。RNAは、GenElute Mammalian Total RNA Miniprepキット(Sigma社)を製造業者の指示に従い使用し、凍結細胞から単離した。

【0119】

組換えプラスミドの構築及びCOS-細胞のトランスフェクション

センス方向にラットアポトーシスeIF-5Aの完全長コード配列及びアンチセンス方向にラットアポトーシスeIF-5Aの3'非翻訳領域(UTR)を保持する組換えプラスミドを、哺乳類エピトープタグ発現ベクターpHM6(Roche Molecular Biochemicals社)を用いて構築し、これは図21に示した。このベクターは、下記を含む：CMVプロモーター-ヒトサイトメガロウイルス即時型プロモーター/エンハンサー；HA-インフルエンザヘマグルチニン由来のノナペプチドエピトープタグ；BGH pA-ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル；f1 ori-f1起点(origin)；SV40 ori-SV40初期プロモーター及び起点；ネオマイシン-ネオマイシン耐性(G418)遺伝子；SV40 pA-SV40ポリアデニル化部位シグナル；Col E1-ColE1起点；アンピシリン-アンピシリン耐性遺伝子。ラットアポトーシスeIF-5Aの完全長コード配列及びラットアポトーシスeIF-5Aの3'UTRは、pBluescript内の当初のラットeIF-5A RT-PCR断片(配列番号:1)から、PCRにより増幅した。完全長eIF-5Aを増幅するために、使用したプライマーは以下であった：フォワード5' GCCAAGCTTAATGGCAGATGATTTGG 3' (Hind3)(配列番号:22)、及びリバー5' CTGAATTCCAGTTATTTGCCATGG 3' (EcoR1)(配列番号:23)。3'UTRラットeIF-5Aを増幅するために、使用したプライマーは以下であった：フォワード5' ATGAATTCGCCATGACAGAGGAGGC 3' (EcoR1)(配列番号:24)及びリバー5' GCGAAGCTTCCATGGCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3' (Hind3)(配列番号:10)。

【0120】

アガロースゲル電気泳動後に単離された完全長ラットeIF-5A PCR産物は、長さ430bpであるのに対し、3'UTRラットeIF-5A PCR産物は、長さ697bpであった。両方のPCR産物を、pHM6のHind 3及びEcoR1部位へサブクロニングし、pHM6-完全長eIF-5A及びpHM6-アンチセンス3'UTR eIF-5Aを産生した。この完全長ラットeIF-5A PCR産物を、抗-[HA]-ペルオキシダーゼ抗体を用い組換えタンパク質の検出を可能にするために、複数のクロニング部位の上流に存在するインフルエンザヘマグルチニン(HA)由来のノナペプチドエピトープタグで、インフレーションでサブクロニングした。発現は、ヒトサイトメガロウイルス即時型初期プロモーター/エンハンサーにより駆動し、哺乳類細胞株における高レベルの発現を確実にした。このプラスミドは、安定したトランスフェクタントの選択を可能にするネオマイシン耐性(G418)遺伝子、及びSV40ラージT抗原を発現している細胞、例えばCOS-7におけるエピソーム複製を可能にするSV40初期プロモーター及び起点も特徴としている。

【0121】

トランスフェクション実験に使用されるCOS-7細胞は、タンパク質抽出に使用される細胞のための24ウェル細胞培養プレート(Corning社)、又は染色に使用する細胞のための4チャンパー培養スライド(Falcon社)のいずれかにおいて培養した。細胞は、10%FBSを補充

10

20

30

40

50

したが、ペニシリン/ストレプトマイシンを欠いた、DMEM培地において、集密度50~70%まで増殖した。24-ウェルプレートの1個のウェル又は培養スライドに十分なトランスフェクション培地を、無血清DMEMの42.5 µl中で0.32 µgのプラスミドDNAを希釈し、そしてこの混合物を室温で15分間インキュベーションすることにより調製した。トランスフェクション試薬LipofectAMINE(Gibco, BRL社)1.6 µlを、無血清DMEM 42.5 µl中に希釈し、室温で5分間インキュベーションした。5分後、LipofectAMINE混合物を、DNA混合物に添加し、室温で30~60分間インキュベーションした。トランスフェクションされる細胞は、無血清DMEMにより1回洗浄し、その後トランスフェクション培地に積層し、そして細胞を増殖チャンバーに戻し4時間放置した。

【0122】

インキュベーション後、DMEM 0.17ml + 20% FBSを、これらの細胞に添加した。これらの細胞を、更に40時間培養し、その後アポトーシスを受けるように誘導し、その後染色又はウェスタンブロット解析のために収集した。対照として、プラスミドDNAを、トランスフェクション培地から除いた偽トランスフェクションも行った。

【0123】

タンパク質抽出及びウェスタンブロット

タンパク質を、トランスフェクションされた細胞から、PBS(8g/L NaCl、0.2g/L KCl、1.44g/L Na₂HPO₄、及び0.24g/L KH₂PO₄)中の細胞の2回の洗浄により、ウェスタンブロットのために単離し、その後150 µlの熱SDSゲル-負荷緩衝液(50mM Tris-HCl、pH6.8、100mMジチオスレイトール、2% SDS、0.1% ブロモフェノールブルー、及び10% グリセロール)を添加した。細胞ライゼートを、微量遠心管に収集し、95 °Cで10分間加熱し、その後13,000xgで10分間遠心した。上清を、新たな微量遠心管に移し、-20 °Cで使用時まで貯蔵した。

【0124】

ウェスタンブロットのために、総タンパク質の2.5又は5 µgを、12% SDSポリアクリルアミドゲル上で分離した。分離したタンパク質を、ニフ化ポリビニリデン膜に転写した。次にこの膜を、ブロック液(PBS中の5% スキムミルク粉末、0.02% アジ化ナトリウム)中で1時間インキュベーションし、そしてPBS-T(PBS + 0.05% Tween-20)中で15分間かけて3回洗浄した。この膜を、一晚、PBS-T中で4 °Cで保存した。翌日室温まで温めた後、この膜を、1 µg/mlポリビニルアルコール中で、30秒間ブロックした。この膜を、脱イオン水で5回すすぎ、及びPBSを溶媒とする5% ミルク溶液で30分間ブロックした。一次抗体を、PBSを溶媒とする5% ミルク溶液で30分間ブレインキュベーションし、その後膜とインキュベーションした。

【0125】

いくつかの一次抗体を使用した。抗-[HA]-ペルオキシダーゼ抗体(Roche Molecular Biochemicals社)を、希釈1:5000で用い、組換えタンパク質の発現を検出した。この抗体は、ペルオキシダーゼに複合されているので、二次抗体は不要であり、そしてこのプロットを洗浄し、及び化学発光により展開した。使用した別の一次抗体は、p53(Ab-6)、Bcl-2(Ab-1)、及びc-Myc(Ab-2)を認識する癌遺伝子由来のモノクローナル抗体である。p53に対するモノクローナル抗体を、0.1 µg/mlの希釈で使用し、並びにBcl-2及びc-Mycに対するモノクローナル抗体は両方とも、希釈0.83 µg/mlで使用した。一次抗体と60~90分間インキュベーションした後、この膜を、PBS-Tで15分かけて3回洗浄した。次に二次抗体を、PBSを溶媒とする1% ミルク中に希釈し、及び膜と共に60~90分間インキュベーションした。p53(Ab-6)を一次抗体として使用する場合は、使用した二次抗体は、1:1000希釈したアルカリホスファターゼに複合したヤギ抗-マウスIgG(Rockland社)である。Bcl-2(Ab-1)及びc-Myc(Ab-2)を一次抗体として使用する場合は、ペルオキシダーゼに複合されたウサギ抗-マウスIgG(Sigma社)を、希釈1:5000で使用した。二次抗体とのインキュベーション後、膜をPBS-Tで3回洗浄した。

【0126】

比色法及び化学発光法のふたつの検出法を用い、プロットを展開した。比色法は、p53(Ab-6)を一次抗体としてアルカリホスファターゼに複合した二次抗体と複合して使用した

10

20

30

40

50

場合のみ使用した。結合した抗体は、0.33mg/mLニトロブルー・テトラゾリウム、0.165mg/mL 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸、100mM NaCl、5mM MgCl₂、及び100mM Tris-HCl (pH9.5)の溶液中での、暗所におけるプロットのインキュベーションにより可視化した。呈色反応は、プロットの、PBSを溶媒とする2mM EDTA中でのインキュベーションにより停止した。化学発光検出法は、抗-[HA]ペルオキシダーゼ、Bcl-2(Ab-1)、及びc-Myc(Ab-2)を含む、他の全ての一次抗体について使用した。ECL Plusウェスタンブロット検出キット(Amersham Pharmacia Biotech社)を用い、ペルオキシダーゼ-複合した結合した抗体を検出した。簡単に述べると、膜を、わずかに乾くまでふき取り、次に暗所において、試薬A及び試薬Bの40:1混合物と5分間インキュベーションした。膜を乾くまでふき取り、アセテートシートの上に配置し、そしてX-線フィルムに10秒～10分間の変動する期間曝露した。

10

【0127】

COS-7細胞におけるアポトーシスの導入

ふたつの方法、血清枯渇及び、ストレプトマイセス種(Calbiochem社)のアクチノマイシンDによる処理を使用し、トランスフェクションされたCOS-7細胞にアポトーシスを誘導した。両方の処置については、培地を、トランスフェクション後40時間で除去した。血清飢餓実験については、培地を、血清-及び抗生物質-非含有DMEMと交換した。10%FBSを補充した抗生物質-非含有DMEMにおいて増殖した細胞を、対照として使用した。アポトーシスのアクチノマイシンD誘導については、培地を、10%FBS及びメタノールに溶解した1µg/mlアクチノマイシンDを補充した抗生物質-非含有DMEMと交換した。対照細胞は、10%FBS及び等量のメタノールを補充した抗生物質-非含有DMEM中で増殖した。両方の方法について、アポトーシス細胞の割合を、Hoescht又はアネキシン V-Cy3のいずれかで染色後48時間で決定した。アポトーシス誘導は、ノーザンブロット解析によっても確認し、図22に示した。

20

【0128】

Hoescht染色

核断片化及び凝縮のような、形態学的特徴を基にアポトーシス細胞を同定するために、核染色Hoeschtを使用し、トランスフェクションされたCOS-7細胞の核を標識した。無水メタノール及び氷酢酸の3:1混合物からなる固定液を、使用直前に調製した。等量の固定液を、培養スライド上で増殖しているCOS-7細胞の培地に添加し、そして2分間インキュベーションした。培地/固定液混合物を、細胞から除去及び廃棄し、そして固定液1mlを細胞に添加した。5分後、固定液を廃棄し、そして新たな固定液1mlを細胞に添加し、そして5分間インキュベーションした。固定液を廃棄し、細胞を4分間風乾し、その後Hoescht染色液(PBS中0.5µg/ml Hoescht 33258)1mlを添加した。暗所で10分間インキュベーション後、染色液を廃棄し、スライドを、脱イオン水で1分間かけて3回洗浄した。洗浄後、McIlvaine's緩衝液(0.021Mクエン酸、0.058M Na₂HPO₄・7H₂O; pH5.6)1mlを細胞に添加し、そして、これらを暗所で20分間インキュベーションした。緩衝液を廃棄し、細胞を、暗所で5分間風乾し、培養スライドのウェルを分離しているチャンバーを取り除いた。蛍光のためのVectashieldマウント培地(Vector Laboratories社)数滴を、スライドに添加し、カバースリップを重ねた。染色した細胞を、UVフィルターを使用し、蛍光顕微鏡下で観察した。明るく染色され及び断片化された核を伴う細胞を、アポトーシスについてスコア化した。

30

40

【0129】

アネキシンV-Cy3染色

アネキシンV-Cy3アポトーシス検出キット(Sigma社)を用い、アポトーシス細胞上の外向き輸送されたホスファチジルセリンを蛍光標識した。このキットを、下記のように変更し、他は製造業者のプロトコールに従い使用した。簡単に述べると、4個のチャンバー培養スライド上で増殖するトランスフェクションされたCOS-7細胞を、PBSで2回、及び1x結合緩衝液で3回洗浄した。染色液(1x結合緩衝液中の1µg/ml AnnCy3)150µlを添加し、そして細胞を暗所で10分間インキュベーションした。その後染色液を除去し、細胞を、1x結合緩衝液で5回洗浄した。チャンバー壁を、培養スライドから取り出し、1x結合緩衝液数滴

50

を、細胞上にのせ、そしてカバースリップを重ねた。染色した細胞を、グリーンフィルターを用い、蛍光顕微鏡により分析し、陽性染色された(アポトーシス)細胞の赤色蛍光を可視化した。総細胞占有(population)を、可視光下で細胞数を計測することにより決定した。

【0130】

実施例3

本実施例は、アポトーシス-特異的eIF-5A及びDHSによる、アポトーシスの調節を明らかにしている。

【0131】

図23は、先の実施例において説明された一般的手法及び方法を用いる、COS-7細胞の一過性トランスフェクションの手順を例示しているフローチャートであり、ここでは無血清培地中の細胞を、lipofectAMINE中のプラスミドDNA中で4時間インキュベーションし、血清を添加し、そして細胞を更に40時間インキュベーションした。その後細胞を、分析前に通常の培地で48時間インキュベーション(すなわち、更なる処理をしない)するか、分析前にアポトーシス誘導するために48時間血清枯渇するか、もしくは分析前にアポトーシス誘導するために48時間アクチノマイシンDで処理するかのいずれかを行った。

【0132】

図22は、pHM6でトランスフェクション後のCOS-7細胞における外来タンパク質の一過性発現を例示しているウェスタンブロットである。偽トランスフェクション、又はpHM6-LacZ、pHM6-アンチセンス3' rF5A(pHM6-アンチセンス3' UTRラットアポトーシスeIF-5A)、もしくはpHM6-センスrF5A(pHM6-完全長ラットアポトーシスeIF-5A)でトランスフェクションのいずれかを行った48時間後に、タンパク質を、COS-7細胞から単離した。各試料からのタンパク質5 µgを、SDS-PAGEにより分画し、PVDF膜に転写し、そして抗-[HA]ペルオキシダーゼでウェスタンブロットした。結合した抗体を、化学発光により検出し、及びx-線フィルムに30秒間曝露した。LacZ(レーン2)及びセンスラットアポトーシスeIF-5A(レーン4)の発現は、明確に認識可能である。

【0133】

前述のように、COS-7細胞は、偽トランスフェクションするか、又はpHM6-センスrF5A(pHM6-完全長ラットeIF-5A)でトランスフェクションするかのいずれかを行った。トランスフェクションの40時間後、これらの細胞を、血清の48時間の回収により、アポトーシスを受けるように誘導した。トランスフェクションされた細胞抽出物におけるカスパーゼタンパク質分解活性を、蛍光定量均質(fluorometric homogenous)カスパーゼアッセイキット(Roche Diagnostics社)を用いて測定した。DNA断片化も、DNA断片の露出した3'-OH末端を、フルオレセイン-標識されたデオキシヌクレオチドで標識する、FragEL DNA断片化アポトーシス検出キット(Oncogene社)を用いて測定した。

【0134】

追加のCOS-7細胞は、偽トランスフェクションするか、又はpHM6-センスrF5A(pHM6-完全長ラットeIF-5A)でトランスフェクションするかのいずれかを行った。トランスフェクションの40時間後、細胞を、更に48時間血清を含有する通常の培地において増殖する(更なる処理なし)か、48時間の血清回収によりアポトーシスを受けるように誘導するか、又はアクチノマイシンDの0.5 µg/mlで48時間アポトーシスを受けるように誘導するかのいずれかを行った。細胞を、アポトーシスに付随する核断片化を示すHoescht 33258で染色するか、又はアポトーシスに付随するホスファチジルセリン露出を示すアネキシンV-Cy3のいずれかで染色した。染色した細胞は、グリーンフィルターを使用する蛍光顕微鏡でも可視化し、そして計数し、アポトーシスを受けている細胞の割合を決定した。

【0135】

図25は、COS-7細胞がセンス方向に完全長ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aを含有するpHM6で一過性にトランスフェクションされた場合の、増大したカスパーゼ活性により反映されるような、増強されたアポトーシスを例示している。ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aの発現は、カスパーゼ活性の60%の増加を生じた。

【 0 1 3 6 】

図26は、COS-7細胞がセンス方向で完全長ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aを含むpHM6で一過性にトランスフェクションされた場合の、増大されたDNA断片化により反映されるような、増強されたアポトーシスを例示している。ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aの発現は、DNA断片化の273%の増加を生じた。図27は、COS-7細胞がセンス方向で完全長ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aを含むpHM6で一過性にトランスフェクションされた場合の、増大されたDNA断片化により反映されるような、アポトーシスの検出を例示している。ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aを発現している細胞において、より大きいDNA断片化の発現率が存在した。図28は、COS-7細胞がセンス方向で完全長ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aを含むpHM6で一過性にトランスフェクションされた場合の、増大された核断片化により反映されるような、増強されたアポトーシスを例示している。ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aの発現は、非血清飢餓試料及び血清飢餓試料において、各々、対照を上回る核断片化の27%及び63%の増加を生じた。

10

【 0 1 3 7 】

図29は、COS-7細胞がセンス方向で完全長ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aを含むpHM6で一過性にトランスフェクションされた場合の、ホスファチジルセリン露出により反映されるような、アポトーシスの検出を例示している。図30は、COS-7細胞がセンス方向で完全長ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aを含むpHM6で一過性にトランスフェクションされた場合の、増加したホスファチジルセリン露出により反映されるような、増強されたアポトーシスを例示している。ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aの発現は、非-血清飢餓試料及び血清飢餓試料において、各々、対照を上回るホスファチジルセリン曝露の140%及び198%の増加を生じた。

20

【 0 1 3 8 】

図31は、COS-7細胞がセンス方向で完全長ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aを含むpHM6で一過性にトランスフェクションされた場合の、増加した核断片化により反映されるような、増強されたアポトーシスを例示している。ラットアポトーシス誘導したeIF-5Aの発現は、未処理試料及び処理試料において、各々、対照を上回る核断片化の115%及び62%の増加を生じた。図32は、センス方向で完全長ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aを含むpHM6で一過性にトランスフェクションされたCOS-7細胞が、更なる処理なし又はアポトーシスを誘導する処理ありの条件下で比較した、増強されたアポトーシスの比較を例示している。

30

【 0 1 3 9 】

実施例4

本実施例は、アポトーシス-特異的eIF-5A及びDHSの投与後の、アポトーシス活性の調節を明らかにしている。

【 0 1 4 0 】

更に、COS-7細胞は、偽トランスフェクションするか、pHM6-LacZでトランスフェクションするか、又はpHM6-センスrF5A(pHM6-完全長ラットeIF-5A)でトランスフェクションし、及び40時間インキュベーションした。各試料からのタンパク質抽出物試料5 µgを、SDS-PAGEにより分画し、PVDF膜に転写し、及びBcl-2を認識するモノクローナル抗体でウェスタンブロットした。ペルオキシダーゼに複合したウサギ抗-マウスIgGを二次抗体として用い、そして結合した抗体を、化学発光及びx-線フィルムへの曝露により検出した。結果を図32に示した。pHM6-LacZでトランスフェクションされた細胞よりも、pHM6-センスrF5Aでトランスフェクションされた細胞において、少ないBcl-2が検出可能であり；その結果、Bcl-2はダウンレギュレーションされた。

40

【 0 1 4 1 】

追加のCOS-7細胞を、偽トランスフェクションするか、pHM6-アンチセンス3' rF5A(ラットアポトーシス-特異的eIF-5AのpHM6-アンチセンス3' UTR)でトランスフェクションするか、又はpHM6-センスrF5A(pHM6-完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5A)でトランスフェクションした。トランスフェクションの40時間後、これらの細胞に、48時間の血清回収に

50

より、アポトーシスを誘導した。各試料からのタンパク質抽出物試料5 µgを、SDS-PAGEにより分画し、PVDF膜に転写し、及びBcl-2を認識するモノクローナル抗体でウェスタンブロットした。ペルオキシダーゼに複合したウサギ抗-マウスIgGを、二次抗体として用い、及び結合した抗体を、化学発光及びx-線フィルムへの曝露により検出した。

【 0 1 4 2 】

更に加えて、COS-7細胞を、偽トランスフェクションするか、pHM6-LacZでトランスフェクションするか、又はpHM6-センスrF5A(pHM6-完全長ラットeIF-5A)でトランスフェクションし、並びに40時間インキュベーションした。各試料からのタンパク質抽出物試料5 µgを、SDS-PAGEにより分画し、PVDF膜に転写し、そしてp53を認識するモノクローナル抗体でウェスタンブロットした。アルカリホスファターゼに複合したヤギ抗-マウスIgGを、二次抗体として用い、及び結合した抗体を、比色法により検出した。

10

【 0 1 4 3 】

最後に、COS-7細胞を、偽トランスフェクションするか、pHM6-LacZでトランスフェクションするか、又はpHM6-センスrF5A(pHM6-完全長ラットeIF-5A)でトランスフェクションし、並びに40時間インキュベーションした。各試料からのタンパク質抽出物試料5 µgを、SDS-PAGEにより分画し、PVDF膜に転写し、そしてp53を認識するモノクローナル抗体でプロービングした。対応するタンパク質ブロットを、抗-[HA]-ペルオキシダーゼでプロービングし、ラットアポトーシス-特異的eIF-5A発現のレベルを決定した。アルカリホスファターゼに複合したヤギ抗-マウスIgGを、二次抗体として用い、及び結合した抗体を、化学発光により検出した。

20

【 0 1 4 4 】

図33は、COS-7細胞を、センス方向に完全長ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aを含むpHM6で、一過性にトランスフェクションした場合の、Bcl-2のダウレギュレーションを示す。上側パネルは、クマシーブルー-染色したタンパク質ブロットを示し；下側パネルは、対応するウェスタンブロットを示している。pHM6-LacZでトランスフェクションされた細胞よりも、pHM6-センスrF5Aでトランスフェクションされた細胞において、より少ないBcl-2が検出可能であった。

【 0 1 4 5 】

図34は、COS-7細胞を、アンチセンス方向に完全長ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aを含むpHM6で一過性にトランスフェクションした場合の、Bcl-2のアップレギュレーションを示している。上側パネルは、クマシーブルー-染色したタンパク質ブロットを示し；下側パネルは、対応するウェスタンブロットを示している。偽トランスフェクションされた細胞又はpHM6-センスrF5Aでトランスフェクションされた細胞よりも、pHM6-アンチセンス3' rF5Aでトランスフェクションされた細胞において、より多いBcl-2が検出可能であった。

30

【 0 1 4 6 】

図35は、COS-7細胞を、センス方向に完全長ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aを含むpHM6で一過性にトランスフェクションした場合の、c-Mycのアップレギュレーションを示している。上側パネルは、クマシーブルー-染色したタンパク質ブロットを示し；下側パネルは、対応するウェスタンブロットを示している。pHM6-LacZでトランスフェクションされた細胞又は偽対照よりも、pHM6-センスrF5Aでトランスフェクションされた細胞において、より多いc-Mycが検出可能であった。

40

【 0 1 4 7 】

図36は、COS-7細胞を、センス方向に完全長ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aを含むpHM6で一過性にトランスフェクションした場合の、p53のアップレギュレーションを示している。上側パネルは、クマシーブルー-染色したタンパク質ブロットを示し；下側パネルは、対応するウェスタンブロットを示している。pHM6-LacZでトランスフェクションされた細胞又は偽対照よりも、pHM6-センスrF5Aでトランスフェクションされた細胞において、より多いp53が検出可能であった。

【 0 1 4 8 】

50

図37は、COS-7細胞における、pHM6-完全長ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aの発現に対するp53アップレギュレーションの依存性を示している。抗-[HA]-ペルオキシダーゼでプロービングしたウェスタンブロットにおいて、上側パネルは、クマシーブルー-染色されたタンパク質ブロットを示し、及び下側パネルは、対応するウェスタンブロットを示している。第二のトランスフェクションよりも、第一のトランスフェクションで、より多いラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aが検出可能であった。抗-p53でプロービングされたウェスタンブロットにおいて、Aの上側パネルは、対応するクマシーブルー-染色したタンパク質ブロットを示し、そして下側パネルは、p53によるウェスタンブロットを示している。第一のトランスフェクションについて、pHM6-LacZでトランスフェクションされた細胞又は偽対照よりも、pHM6-センスrF5Aによりトランスフェクションされた細胞において、より多くのp53が検出可能であった。ラットアポトーシス-誘導したeIF-5Aのより少ない発現が存在する第二のトランスフェクションについて、pHM6-センスrF5A、pHM6-LacZでトランスフェクションされた細胞又は偽対照の間で、p53レベルの差異は検出不可能であった。

10

【 0 1 4 9 】

実施例5

本実施例は、アポトーシス-特異的eIF-5Aは、活性p53を伴う細胞(RK0細胞)及び活性p53を伴わない細胞(RK0-E6細胞)においてアポトーシスを誘導することができることを明らかにしており、このことはアポトーシス-特異的eIF-5Aは、p53経路以外の経路(複数)を介してアポトーシスを開始することができることを示している。このことは、これは、上流で作用し、そして恐らく広範な異なる癌型を殺傷することができるという本発明者らの主張も裏付ける。

20

【 0 1 5 0 】

本実施例は、eIF-5A1の活性部位は、恐らくRNA結合ドメインを含む、タンパク質のカルボキシ末端(すなわち、切断型eIF-5A1による実験を参照)であることも示している。

【 0 1 5 1 】

更に、本実施例は、ヒトeIF-5A2は、アポトーシスを誘導することができないので、これはたいていは増殖性eIF-5Aであることも示している。従って、これはヒトデータバンクのふたつのeIF-5A遺伝子であり、アポトーシス-特異的eIF-5A1はアポトーシス遺伝子であり、そしてeIF-5A2は増殖遺伝子であると考えられる。

30

【 0 1 5 2 】

RK0及びRK0-E6細胞の培養

野生型p53を発現しているヒト結腸癌細胞株であるRK0(アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC) CRL-2577)、及び正常p53レベル及び機能の低下を引き起こす安定して組込まれたヒトパピローマウイルスE6癌遺伝子を含むRK0由来の細胞株である RK0-E6(ATCC CRL2578)を、トランスフェクション-ベースの実験に使用した。RK0及びRK0-E6細胞は、非必須アミノ酸、Earle's塩、及びL-グルタミンを含むイーグル最小必須培地(MEM)において培養した。培養培地には、10%ウシ胎仔血清(FBS)及び100Uペニシリン/ストレプトマイシンを補充した。細胞を、5%CO₂及び95%空気の加湿した環境で37℃で増殖した。これらの細胞は、0.25%トリプシン及び1mM EDTAの溶液で、接着細胞を剥離することにより、3~4日毎に継代した。剥離された細胞は、新たな培地を入れた新規培養皿に、分離比1:10~1:12で分配した。

40

【 0 1 5 3 】

ヒトeIF5A2のクローニング

ヒトeIF5A2は、GenBank(寄託番号XM_113401)から入手可能なヒトeIF5A2の配列に対してデザインしたプライマーを用い、RK0細胞から単離されたRNAから、RT-PCRにより単離した。図38は、RK0細胞から単離されたヒトeIF-5AのヒトeIF-5A2の配列とのアラインメントを提供する。RNAは、GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma社)を用い、RK0細胞から単離した。eIF5A2を増幅するために使用したフォワードプライマーは、配列5' A AACTACCATCTCCCCTGCC 3' (配列番号:24)を有し、そしてリバースプライマーは、配列5' TG

50

CCCTACACAGGCTGAAAG 3' (配列番号:25)を有した。得られる936bp PCR産物を、pGEM-T Easy Vector (Promega社)にサブクローニングし、配列決定した。

【 0 1 5 4 】

その後pGEM-T Easy-eIF5A2構築体を鋳型として使用し、哺乳類発現ベクターpHM6(Roche社)ヘインフレームでサブクローニングした。ヒトeIF5A2を増幅するために使用したフォワードプライマーは、5' ATCAAGCTTGCCACCATGGCAGACG 3' (配列番号:26)であり、そしてリバースプライマーは、5' AACGAATTCATGCCTGATGTTTCCG 3' (配列番号:27)であった。得られる505bp PCR産物を、Hind3及びEcoR1で消化し、及びpHM6のHind3及びEcoR1部位にクローニングした。

【 0 1 5 5 】

pHM6-切断型eIF5A1の構築

eIF5A1のカルボキシ-末端領域は、そのアポトーシス-誘導活性にとって重要であるかどうかを決定するために、カルボキシ-末端を欠失したeIF5A1を構築した。アミノ酸1~127をコードしている切断型eIF5A1を、pBS-ラットeIF5A1を鋳型として用い、PCRにより産生した。フォワードPCRプライマーは、5' GCCAAGCTTAATGGCAGATGATTTGG 3' (配列番号:18)であり、そしてリバースプライマーは、5' TCCGAATTCGTACTTCTGCTCAATC 3' (配列番号:28)であった。得られる390bp PCR産物を、EcoR1及びHind3で消化し、及びpHM6のEcoR1及びHind3部位にサブクローニングした。

【 0 1 5 6 】

トランスフェクション

トランスフェクション実験において使用したRK0又はRK0-E6細胞を、Hoescht染色に使用される細胞については8ウェルチャンバー培養スライド(Falcon社)において、そしてフローサイトメトリーにより分析される細胞については6ウェルプレートにおいて培養した。これらの細胞を、10%FBSを補充したが、ペニシリン/ストレプトマイシンを欠いたMEM培地で、集密度70~80%まで培養した。8ウェル培養スライドの1個のウェルに十分なトランスフェクション培地は、無血清MEMの22 μ l中にプラスミドDNA 0.425 μ gを希釈し、及びこの混合物を室温で15分間インキュベーションすることにより調製した。トランスフェクション試薬LipofectAMINE(Gibco, BRL社)0.85 μ lを、無血清MEMの22 μ l中に希釈し、及び室温で5分間インキュベーションした。5分後、LipofectAMINE混合物を、このDNA混合物に添加し、室温で30~60分間インキュベーションした。トランスフェクションされた細胞を、無血清MEMで1回洗浄し、その後MEMの44 μ lをトランスフェクション培地へ添加し、そしてこれを細胞に積層した。これらの細胞を、増殖チャンバーへ戻し4時間放置した。インキュベーション後、MEM 88 μ l + 20%FBSを、細胞へ添加した。その後細胞を、更に44時間培養し、その後Hoescht 33258により先に説明されたように染色した。別の実験セットにおいて、8-ウェル培養スライド中のRK0又はRK0-E6細胞を、トランスフェクション後、アクチノマイシンD 0.25 μ g/mlで24時間処理し、そしてその後Hoeschtで20時間染色した。6-ウェルプレートにおいて実施したトランスフェクションは、全ての試薬を4.81倍に増加した以外は、同じ方法で行った。6ウェルプレートにおいてトランスフェクションしたRK0細胞は、トランスフェクション後48時間で収集し、下記のようにフローサイトメトリーにより分析するために固定した。

【 0 1 5 7 】

トランスフェクション効率の決定

トランスフェクション効率は、pHM6-LacZ-トランスフェクションされた細胞を5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトピラノシド(X-GAL)により染色することにより決定した。青色染色された細胞は、LacZ-発現しているトランスフェクションされた細胞であり、トランスフェクション効率は、細胞総数で除算した青色染色された細胞の数として計算した。トランスフェクションされた細胞は、トランスフェクション後48時間染色した。これらの細胞を、PBSで2回洗浄し、その後0.5%グルタルアルデヒド/PBSにより室温で10分間固定した。これらの細胞を、1mM $MgCl_2$ /PBSで3回洗浄し、その後染色液[PBS中の5mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 、5mM $K_3Fe(CN)_6$ 、1mM $MgCl_2$ 、0.1% X-GAL]と共に、青色染色された細胞

10

20

30

40

50

胞が出現するまで、インキュベーションした。

【0158】

Hoescht 染色

核断片化及び凝縮を基にアポトーシス細胞を同定するために、核染色用Hoeschtを使用し、トランスフェクションされたRK0及びRK0-E6細胞の核を標識した。無水メタノール及び氷酢酸の3:1混合物からなる固定液を、使用直前に調製した。等量の固定液を、培養スライド上の増殖している細胞の培地に添加し、2分間インキュベーションした。培地/固定液混合物を、細胞から除去及び廃棄し、そして固定液1mlを、細胞へ添加した。5分後、固定液を廃棄し、そして新鮮な固定液1mlを、細胞に添加し、5分間インキュベーションした。固定液を廃棄し、細胞を4分間風乾し、その後Hoescht染色液(PBS中の0.5 µg/ml Hoescht 33258)1mlを添加した。暗所で10分間インキュベーションした後、染色液を廃棄し、このスライドを、脱イオン水で1分間3回洗浄した。洗浄後、McIlvaine's緩衝液(0.021Mクエン酸、0.058M Na₂HPO₄・7H₂O; pH5.6)1mlを、細胞へ添加し、暗所で20分間インキュベーションした。緩衝液を廃棄し、細胞を暗所で5分間風乾し、培養スライドのウェルを仕切っているチャンバーを取り外した。蛍光のための数滴のVectashieldマウント培地(Vector Laboratories社)を、スライドへ添加し、カバースリップをかぶせた。染色した細胞を、UVフィルターを使用し、蛍光顕微鏡下で視認した。明色に染色された細胞又は断片化された核を、アポトーシスとしてスコア化した。

【0159】

フローサイトメトリーによるDNA断片化検出

アポトーシスの間に産生されたDNA断片を、フルオレセイン-FragELTM DNA断片化検出キット(Oncogene Research Products社)を用い、フルオレセイン-標識されたデオキシヌクレオチドで標識した。6ウェル培養プレート内で様々な構築体によりトランスフェクションされた細胞を、トランスフェクション後48時間でトリプシン処理により収集し、そして製造業者の指示に従い固定及び標識した。簡単に述べると、細胞を、1000xgで5分間4でペレット化し、及び一回PBS(8g/L NaCl、0.2g/L KCl、1.44g/L Na₂HPO₄、及び0.24g/L KH₂PO₄)中で洗浄した。細胞を、4%ホルムアルデヒド/PBS中で再懸濁し、室温で10分間インキュベーションした。これらの細胞を、再度ペレット化し、80%エタノール1ml中に再懸濁し、4で貯蔵した。分析の日に、固定した細胞1ml(1x10⁶個細胞/ml)を、微量遠心管に移し、細胞を、1000xgで5分間の遠心分離によりペレット化した。ペレット化した細胞を、1xTBS(20mM Tris、pH7.6、140mM NaCl)200 µl中に再懸濁し、及び室温で10~15分間インキュベーションした。その後これらの細胞を、再度ペレット化し、及び20 µg/ml プロテアーゼK 100 µl中に再懸濁し、室温で5分間インキュベーションした。これらの細胞を、ペレット化し、及び1xTdT平衡化緩衝液100 µl中に再懸濁し、室温で10~30分間インキュベーションした。その後細胞を、遠心によりペレット化し、TdT標識反応混合物60 µl中に再懸濁し、暗所で1~1.5時間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞を、遠心によりペレット化し、1xTBS 200 µlで2回洗浄した。これらの細胞を、最終容量0.5 mlの1xTBS中に再懸濁し、そして488nmアルゴンイオンレーザー給源を備えたフローサイトメーターにより分析した。

【0160】

タンパク質抽出及びウェスタンブロット

タンパク質を、細胞のPBSで2回の洗浄、その後の温SDSゲル-負荷用緩衝液(50mM Tris-HCl、pH6.8、100mMジチオスレイトール、2%SDS、0.1%ブromoフェノールブルー、及び10%グリセロール)の150 µlの添加により、トランスフェクションされた細胞からウェスタンブロットのために単離した。細胞ライゼートを、微量遠心管に収集し、95で10分間加熱し、その後13,000xgで10分間遠心した。上清を、新たな微量遠心管に移し、使用時まで-20で貯蔵した。

【0161】

ウェスタンブロットのために、総タンパク質5 µg又は10 µgを、12%SDSポリアクリルアミドゲル上で分離した。分離したタンパク質を、ニフッ化ポリビニリデン膜に転写した。

その後この膜を、ブロック液(PBS中の5%スキムミルク粉末、0.02%アジ化ナトリウム)で1時間インキュベーションし、PBS-T(PBS + 0.05%Tween-20)中で15分間3回洗浄した。この膜を、PBS-T中で4日で一晩貯蔵した。翌日室温に温めた後、膜を、1 μ g/mlポリビニルアルコール中で30秒間ブロックした。この膜を、脱イオン水で5回洗浄し、その後PBS中の5%ミルク溶液で、30分間ブロックした。一次抗体を、PBS / 0.025%Tween-20中の5%ミルク溶液で、30分間ブロックし、その後、この膜と一緒にインキュベーションした。

【0162】

これらの膜を、p53を認識する癌遺伝子由来のモノクローナル抗体(Ab-6)、又はニワトリにおいて生じたヒトeIF5A1のc-末端に相同な合成ペプチド(アミノ-CRLPEGLDGKEIEQKYD-カルボキシ)に対するポリクローナル抗体のいずれかにより、プロットした。p53に対するモノクローナル抗体を、希釈0.1 μ g/mlで使用し、eIF5A1に対する抗体は、希釈1:1000で使用した。膜を、60~90分間一次抗体とのインキュベーションした後、PBS-Tで15分かけて3回洗浄した。次に二次抗体を、PBS/0.025%Tween-20中の1%ミルクで希釈し、そして60~90分間膜と共にインキュベーションした。p53(Ab-6)を一次抗体として使用した場合、使用した二次抗体は1:1000に希釈したアルカリホスファターゼに複合したヤギ抗-マウスIgG(Rockland社)であった。抗-eIF5A1を一次抗体として使用した場合、ペルオキシダーゼに複合したウサギ抗-ニワトリIgY(Gallus Immunotech社)を、希釈1:10000で用いた。二次抗体とのインキュベーション後、膜を、PBS-Tで3回洗浄した。

【0163】

比色法及び化学発光法のふたつの検出法を用い、これらのプロットを発色した。比色法は、p53(Ab-6)を、アルカリホスファターゼ複合した二次抗体に複合している一次抗体として使用した場合にのみ使用した。結合した抗体は、0.33mg/mLニトロブルーテトラゾリウム、0.165mg/mL 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸、100mM NaCl、5mM MgCl₂、及び100mM Tris-HCl(pH9.5)の溶液中の暗所におけるプロットのインキュベーションにより可視化した。呈色反応は、プロットのPBS中の2mM EDTA中でのインキュベーションにより停止した。化学発光検出法は、抗-[HA]ペルオキシダーゼ及び抗-eIF5A1を含む、全ての他の一次抗体について使用した。ECL Plusウェスタンプロット検出キット(Amersham Pharmacia Biotech社)を使用し、ペルオキシダーゼ-複合した結合した抗体を検出した。簡単に述べると、膜を、乾くまでわずかにふき取り、その後試薬A及び試薬Bの40:1混合物と暗所において5分間のインキュベーションした。膜を、乾くまでふき取り、アセテートシートの間に配置し、X-線フィルムに、10秒~30分間の変動する期間曝露した。

【0164】

図39は、一過性トランスフェクション後にRK0及びRK0-E6細胞で生じるアポトーシスの割合を示すグラフを示している。RK0及びRK0-E6細胞は、pHM6-LacZ又はpHM6-eIF5A1により、一過性にトランスフェクションした。24時間後、これらの細胞を、0.25 μ g/mlアクチノマイシンD又は等量のメタノール(対照)のいずれかにより処理した。これらの細胞を、20時間後Hoeschtで染色し、蛍光顕微鏡下で、UVフィルターを用い、目視した。凝縮したクロマチンのために明るく染色した細胞を、アポトーシス度としてスコア化した。前記実験は、アクチノマイシンDで処理し且つpHM6-eIF5A1でトランスフェクションしたRK0細胞は、アクチノマイシンDで処理しなかったpHM6-LacZでトランスフェクションした細胞と比べて、アポトーシスの240%の増加を示したことを明らかにした。アクチノマイシンDで処理し且つpHM6-eIF5A1でトランスフェクションしたRK0-E6細胞は、アクチノマイシンDで処理しなかったpHM6-LacZでトランスフェクションした細胞に対し、アポトーシスの105%の増加を示した。

【0165】

図40は、一過性トランスフェクション後にRK0細胞で生じるアポトーシスの割合を示すグラフを提供している。RK0細胞は、pHM6-LacZ、pHM6-eIF5A1、pHM6-eIF5A2、又はpHM6-切断型eIF5A1により、一過性にトランスフェクションした。44時間後、これらの細胞を、Hoeschtで染色し、蛍光顕微鏡下で、UVフィルターを用い、目視した。凝縮したクロマチンのために明るく染色した細胞を、アポトーシス度としてスコア化した。pHM6-eIF5A1で

トランスフェクションした細胞は、pHM6-LacZでトランスフェクションした対照細胞に対して、アポトーシス度の25%の増加を示した。この増加は、pHM6-eIF5A2又はpHM6-切断型eIF5A1でトランスフェクションした細胞については、明らかではなかった。

【0166】

図41は、一過性トランスフェクション後にRK0細胞で生じるアポトーシスの割合を示すグラフを提供している。RK0細胞は、トランスフェクションしないか、又はpHM6-LacZもしくはpHM6-eIF5A1により、一過性にトランスフェクションした。44時間後、これらの細胞を、Hoeschtで染色し、蛍光顕微鏡下で、UVフィルターを用い、目視した。凝縮したクロマチンのために明るく染色した細胞を、アポトーシス度としてスコア化した。トランスフェクション効率を補正した後、pHM6-eIF5A1でトランスフェクションされた細胞の60%は、アポトーシスであった。

10

【0167】

図42は、一過性にトランスフェクションされた後の、RK0細胞アポトーシスのフローサイトメトリー分析を提供している。RK0細胞は、トランスフェクションしないか、又はpHM6-LacZ、pHM6-eIF5A1、pHM6-eIF5A2、もしくはpHM6-切断型eIF5A1で一過性にトランスフェクションしたかのいずれかであった。48時間後、細胞を収集し、そして固定した。アポトーシスを反映している断片化したDNAを、フルオレセイン-複合したデオキシヌクレオチドで標識し、及び488nmアルゴンイオンレーザー給源を備えたフローサイトメトリーにおいて分析した。ゲートEにおいて生じる蛍光は、非-アポトーシス細胞由来であり、ゲートFにおいて生じる蛍光は、アポトーシスが進行している細胞に由来する。この表は、各ゲートピーク下面積を基に計算されたアポトーシスが進行している細胞の割合を示している。非トランスフェクション細胞におけるバックグラウンドアポトーシス及びトランスフェクション効率について補正後、pHM6-eIF5A1でトランスフェクションされた細胞の80%は、アポトーシスを示した。pHM6-LacZ、pHM6-eIF5A2又はpHM6-切断型eIF5A1でトランスフェクションされた細胞は、アポトーシスのバックグラウンドレベルのみを示した。

20

【0168】

図43は、0.25 µg/mlアクチノマイシンDで、0、3、7、24、及び48時間処理したRK0細胞から抽出されたタンパク質のウェスタンブロットを提供する。総タンパク質5 µg(抗-eIF5A1)又は10 µg(抗-p53)を、12%SDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離し、そしてニフツ化ポリビニリデン膜に転写した。上側パネルは、一次抗体として抗-p53を使用するウェスタンブロットを示している。中央パネルは、抗-eIF5A1を一次抗体として使用するウェスタンブロットを示している。下側パネルは、等量の負荷を証明するために化学発光検出後クマシーブルーで染色した抗-eIF5A1ブロットを使用した膜を示している。p53及びeIF5A1は両方とも、アクチノマイシンD処理によりアップレギュレーションされた。

30

【図面の簡単な説明】

【0169】

【図1】図1は、ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aの3'末端のヌクレオチド配列及びこれに由来するアミノ酸配列を示す。

【図2】図2は、ラットアポトーシス-特異的eIF-5A cDNAの5'末端のヌクレオチド配列及びこれに由来するアミノ酸配列を示す。

40

【図3】図3は、ラット黄体アポトーシス-特異的eIF-5A完全長cDNAのヌクレオチド配列を示す。

【図4】図4は、ラットアポトーシス-特異的DHS cDNAの3'末端のヌクレオチド配列及びこれに由来するアミノ酸配列を示す。

【図5】図5は、ラット黄体アポトーシス-特異的eIF-5A cDNAの完全長ヌクレオチド配列の、ヒトeIF-5Aヌクレオチド配列(寄託番号BC000751又はNM_001970、配列番号:3)とのアラインメントを示す。

【図6】図6は、ラット黄体アポトーシス-特異的eIF-5A cDNAの完全長ヌクレオチド配列の、ヒトeIF-5Aヌクレオチド配列(寄託番号NM-020390、配列番号:4)とのアラインメントを示す。

50

【図 7】図7は、ラット黄体アポトーシス-特異的eIF-5A cDNAの完全長ヌクレオチド配列の、マウスeIF-5Aヌクレオチド配列(寄託番号BC003889)とのアラインメントを示す。マウスヌクレオチド配列(寄託番号BC003889)は、配列番号:5である。

【図 8】図8は、ラット黄体アポトーシス-特異的eIF-5A由来の完全長アミノ酸配列の、ヒトeIF-5A由来のアミノ酸配列(寄託番号BC0000751又はNM_001970)とのアラインメントである。

【図 9】図9は、ラット黄体アポトーシス-特異的eIF-5A由来の完全長アミノ酸配列の、ヒトeIF-5A由来のアミノ酸配列(寄託番号NM_020390)とのアラインメントである。

【図 10】図10は、ラット黄体アポトーシス-特異的eIF-5A由来の完全長アミノ酸配列の、マウスeIF-5A由来のアミノ酸配列(寄託番号BC003889)とのアラインメントである。

10

【図 11】図11は、ラット黄体アポトーシス-特異的DHS cDNAの部分長のヌクレオチド配列の、ヒトDHSヌクレオチド配列(寄託番号BC000333、配列番号:8)とのアラインメントである。

【図 12】図12は、ラット黄体アポトーシス-特異的eIF-5A cDNAの制限地図である。

【図 13】図13は、部分長ラットアポトーシス-特異的DHS cDNAの制限地図である。

【図 14】図14は、ラット黄体アポトーシス-特異的eIF-5A cDNAの³²P-dCTP-標識された3'-末端によりプローピングされた総RNAのノーザンブロット(図14A)及び臭化エチジウム染色したゲル(図14B)である。

【図 15】図15は、ラット黄体アポトーシス-特異的DHS cDNAの³²P-dCTP-標識された3'-末端によりプローピングされた総RNAのノーザンブロット(図15A)及び臭化エチジウム染色したゲル(図15B)である。

20

【図 16】図16は、過剰排卵したラット黄体におけるアポトーシスの程度を、PGF-2 の注射後に試験したDNAラダー実験を示す。

【図 17】図17は、ラットのPGF-2 処置後のDNAラダーを示す、アポトーシス状態のラット黄体から単離されたゲノムDNAのアガロースゲルである。

【図 18】図18は、過剰排卵したラット黄体の分散された細胞におけるアポトーシスの程度を、プロスタグランジンF-2 (PGF-2)に曝露される前に、スペルミジンで処置したラットにおいて試験したDNAラダー実験を示す。

【図 19】図19は、過剰排卵したラット黄体におけるアポトーシスの程度を、スペルミジン及び/又はPGF-2 で処置したラットにおいて試験したDNAラダー実験を示す。

30

【図 20】図20は、³²P-dCTP-標識された部分長ラット黄体アポトーシス-特異的eIF-5A cDNAによりプローピングされたラットゲノムDNAのサザンブロットである。

【図 21】図21は、哺乳類エピトープタグ発現ベクター-pHM6を示す(Roche Molecular Biochemicals社)。

【図 22】図22は、ラット黄体アポトーシス-特異的DHS cDNAの³²P-dCTP-標識された3'-非翻訳領域でプローピングされた血清の除去によるアポトーシスの誘導後、COS-7細胞から単離された総RNAのノーザンブロット(図22A)及び臭化エチジウム染色したゲル(図22B)を示す。

【図 23】図23は、COS-7細胞の一過性トランスフェクションの手順を例示しているフローチャートである。

40

【図 24】図24は、pHM6によるトランスフェクション後の、COS-7細胞における前記タンパク質の一過性発現のウェスタンブロットである。

【図 25】図25は、COS-7細胞をセンス方向で完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aを含むpHM6で一過性トランスフェクションした場合に、増大したカスパーゼ活性により反映される、増強されたアポトーシスを例示している。

【図 26】図26は、COS-7細胞を、センス方向に完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aを含むpHM6により、一過性にトランスフェクションした場合に、増大したDNA断片化により反映される増強されたアポトーシスを例示している。

【図 27】図27は、COS-7細胞を、センス方向に完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aを含むpHM6により一過性にトランスフェクションした場合に、増大した核断片化により反

50

映されるアポトーシスの検出を例示している。

【図 2 8】図28は、COS-7細胞を、センス方向に完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aを含むpHM6により一過性にトランスフェクションした場合に、増加した核断片化により反映される増強されたアポトーシスを例示している。

【図 2 9】図29は、COS-7細胞を、センス方向に完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aを含むpHM6により一過性にトランスフェクションした場合に、ホスファチジルセリン曝露により反映されたアポトーシスの検出を例示している。

【図 3 0】図30は、COS-7細胞を、センス方向に完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aを含むpHM6により一過性にトランスフェクションした場合に、増大したホスファチジルセリン曝露により反映される増強されたアポトーシスを例示している。

【図 3 1】図31は、COS-7細胞を、センス方向に完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aを含むp11MGにより一過性にトランスフェクションした場合に、増大した核断片化により反映された増強されたアポトーシスを例示している。

【図 3 2】図32は、COS-7細胞を、センス方向に完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aを含むpHM6で一過性にトランスフェクションした場合に、増強されたアポトーシスを例示している。

【図 3 3】図33は、COS-7細胞を、センス方向に完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aを含むpHM6で一過性にトランスフェクションした場合の、Bcl-2のダウンレギュレーションを例示している。図33Aは、クマシーブルー-染色したタンパク質プロットであり；図33Bは、対応するウェスタンプロットである。

【図 3 4】図34は、プローブとしてBcl-2を使用する、アンチセンス方向に完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aを含むpHM6により一過性トランスフェクションされたCOS-7細胞の、クマシーブルー-染色したタンパク質プロット（図 3 4 A）及び対応するウェスタンプロット（図 3 4 B）である。

【図 3 5】図35は、プローブとしてc-Mycを使用する、センス方向に完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aを含むpHM6により、一過性トランスフェクションされたCOS-7細胞のクマシーブルー-染色されたタンパク質プロット（図 3 5 A）及び対応するウェスタンプロット（図 3 5 B）である。

【図 3 6】図36は、p53がプローブとして使用された場合に、センス方向に完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aを含むpHM6により、一過性トランスフェクションされたCOS-7細胞のクマシーブルー-染色したタンパク質プロット（図 3 6 A）及び対応するウェスタンプロット（図 3 6 B）である。

【図 3 7 A】図37は、抗-[HA]-ペルオキシダーゼプローブを使用する、COS-7細胞におけるpHM6-完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aの発現のクマシーブルー-染色したタンパク質プロット（図 3 7 A）及び対応するウェスタンプロット（図 3 7 B）、並びにp53プローブが使用される場合の、COS-7細胞におけるpHM6-完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aの発現のクマシーブルー-染色したタンパク質プロット及び対応するウェスタンプロット（図 3 7 C）である。

【図 3 7 B】図37は、抗-[HA]-ペルオキシダーゼプローブを使用する、COS-7細胞におけるpHM6-完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aの発現のクマシーブルー-染色したタンパク質プロット（図 3 7 A）及び対応するウェスタンプロット（図 3 7 B）、並びにp53プローブが使用される場合の、COS-7細胞におけるpHM6-完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aの発現のクマシーブルー-染色したタンパク質プロット及び対応するウェスタンプロット（図 3 7 C）である。

【図 3 7 C】図37は、抗-[HA]-ペルオキシダーゼプローブを使用する、COS-7細胞におけるpHM6-完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aの発現のクマシーブルー-染色したタンパク質プロット（図 3 7 A）及び対応するウェスタンプロット（図 3 7 B）、並びにp53プローブが使用される場合の、COS-7細胞におけるpHM6-完全長ラットアポトーシス-特異的eIF-5Aの発現のクマシーブルー-染色したタンパク質プロット及び対応するウェスタンプロット（図 3 7 C）である。

【図 3 8】図38は、RK0細胞から単離されたヒトeIF5A2の、ヒトeIF5A2の配列(Genbank 寄託番号XM_113401)とのアラインメントである。

【図 3 9】図39は、一過性トランスフェクション後のRK0及びRK0-E6細胞において生じるアポトーシスの割合を示すグラフである。RK0及びRK0-E6細胞は、pHM6-LacZ又はpHM6-eIF5A1により、一過性にトランスフェクションした。RK0細胞は、アクチノマイシンDで処理し、そしてpRM6-eIF5A1でトランスフェクションし、アクチノマイシンDで処理しなかったpHM6-LacZでトランスフェクションされた細胞と比べ、アポトーシスの240%の増加を示した。RK0-E6細胞は、アクチノマイシンDで処理し、及びpHM6-eIF5A1でトランスフェクションし、これはアクチノマイシンDで処理しなかったpHM6-LacZでトランスフェクションした細胞と比べ、アポトーシスの105%の増加を示した。

10

【図 4 0】図40は、一過性トランスフェクション後のRK0細胞において生じるアポトーシスの割合を示すグラフである。RK0細胞は、pHM6-LacZ、pHM6-eIF5A1、pHM6-eIF5A2、又はpHM6-切断型eIF5A1により一過性トランスフェクションした。pHM6-eIF5A1でトランスフェクションした細胞は、pHM6LacZでトランスフェクションした対照細胞と比べ、アポトーシスの25%の増加を示した。この増加は、pHM6-eIF5A2又はpHM6-切断型eIF5A1によりトランスフェクションされた細胞では明らかではなかった。

【図 4 1】図41は、一過性トランスフェクション後のRK0細胞において生じるアポトーシスの割合を示すグラフである。RK0細胞は、トランスフェクションしないか、又はpHM6-LacZもしくはpHM6-eIF5A1により一過性にトランスフェクションするかのいずれかであった。トランスフェクション効率の補正後、pHM6-eIF5A1でトランスフェクションした細胞の60%は、アポトーシスであった。

20

【図 4 2 A】図 4 2 A は、一過性トランスフェクション後のRK0細胞アポトーシスのフローサイトメトリー分析の結果を提供している。RK0細胞は、トランスフェクションしないか、又はpHM6-LacZ、pHM6-eIF5A1、pHM6-eIF5A2、もしくはpHM6-切断型eIF5A1により一過性トランスフェクションしたかのいずれかであった。

【図 4 2 B】図 4 2 B の表は、各ゲートピーク下面積を基に計算されたアポトーシスを受けている細胞の割合を示す。トランスフェクションされない細胞のアポトーシスをバックグラウンドとしトランスフェクション効率の補正後、pHM6-eIF5A1でトランスフェクションした細胞の80%は、アポトーシスを示した。pHM6-LacZ、pHM6-eIF5A2又はpHM6-切断型eIF5A1でトランスフェクションされた細胞は、単にバックグラウンドレベルのみを示した。

30

【図 4 3】図43は、0.25 µg/ml アクチノマイシンDで、0、3、7、24、及び48時間処理したRK0細胞から抽出されたタンパク質のウェスタンブロットを提供する。上側パネルは、一次抗体として抗-p53を使用する、ウェスタンブロットを示している。中央パネルは、一次抗体として抗-eIF5A1を使用する、ウェスタンブロットを示している。下側パネルは、等量負荷を明らかにするための、化学発光検出後のクマシーブルーで染色した抗-eIF5A1ブロットを使用した膜を示している。p53及びeIF5A1は両方とも、アクチノマイシンD処理によりアップレギュレーションされた。

【 図 2 】

TCGAAGACCGGTAGCAGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTGGATTGATATTTTACCTGGGAGAAATAT
S K T G K G H G A K C H K V H L V G I D I F T G K K Y
GAAGATATCTGCCGCTGACTACATACATGGATGCTCCCAAGCATCAAAAGGAATATTTCCAGCTGATTTGGC
E D I C P S T H M D M V P N T K R N D F Q L I G
ATCCAGGATGGGTACTTCTCCCTGCTCCAGGACAGTGGGAGGTACGAGAGGACCTTGTCTGCCTGAGGGA
I Q D G G Y L S L L Q D S S E V R E D L R L P E G
GACCTTCGCGAAGGATGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCCTGATCAGCTGCTGTCCGCATG
D L G K E I E Q K Y D C G E E I L I T V L S A M
ACAGAGGAGGACAGTGTGCAATCAAGGCTGACGCAAAATAACTGGCTTCCAGGGTGGCGGTGGTGGCAGCA
T E E A A V A I K A M A A
GTGATCCATGAGCTCAGACAGGCGCTCCCCAGCTTGGCTGGGCGCTTGGCTGAGCTCTCAATTAATT
TTGAGCTGTTATTTGGTTTCTCCACCTCCCTCAAACTGCGGGAGAGACCTGCCCTTCACTGATCTCCCT
TGGCAGGCGATGAGGGACCATGGCTTGGTGAAGCTACTGCCTTCTCTCGACGCCGTGATGGGGAAA
GGGAGTGGGATCTGCTGGTGGTTAGTGTCCCTCTCCCTCTTCTTTTAAATCAATTTGGAATCAGAAG
CTGTGGATTCTGGCAATGTTCTTGTTGCTCTTCCACTCAAAACCGACTTGTGCCCTGTCTCATAGT
CCTTCATAGGACGACCACTCAGACAGTGGGAGCAGGCCCGCTTCCGCTGTGCTCTTCTCCAAACCGCT
TCTATAGGGGTGACAGAGAAGAGAGGGGGGAGGAGGACCATCCTCTCTCAGCATCTG66GAGAGCTTCG
CCCCATGGGCTTACCTCTTCTGTGGGCTTCTCCCTGACACATTGTGTAATAATCAAACTGAATAAAAC
TACAAGTTTAAATGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA
(972 nt, 109 aa)

CAGGTCCTAGAGTTGGAATCGAAGCCTCTAAATGSGCAGATGATTTGGACTTCGAGCAGGAGATCGAGGG.
 M A D A D T E T G D A G
 CCTCAGCCACCTTCCC AATGCAGTGTCCAGCATCTAGTAAGATGGTTTGTGGTGCTCAAGGCGGCCCA
 A S A T A T G M Q C S A L R K G F V V L K G R P
 GTAAGATGTCGAGATGCTACTTCCGAAGCTGGCAAGCATGCCAAGTGCCATCTGGTTGGTATTG
 C K I V E M S T S K T G K H G H A K V H V L G I
 ATATTTTACTGGGAGAAATATGAAGATATCTGCCCGCACTCAATACATGGATGCTCCCAACATCAAAA
 D I F T K K Y E D I C P S T H N M D V P N I K
 GGAATGATTTCCAGCTGATTGSGCATCCAGGATGGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGAGGTCAG
 R N D F Q L G I G I Q D G Y L S L L Q D S G E V R
 AGGACCTCTGCTGCTGAGGAGCACTTGGCAAGGAGATGAGCAGAGATGTAGCTTGGAGAAAGATCC
 E D L R L P E G D L G K E I E Q K Y D C G E E I
 TGATCAGCTGCTGTCCGCATGACAGGAGGCGAGCTGTGTGCAATCAAGGCTCGAG
 L I T V L S A M T E A A V A I K A

(488 NT, 151 aa)

FIG.2

FIG. 1

【 図 4 】

CAGGCTTAGAGTTGGAAATCGAAGCTCTTAAATGGCGAGATGATTTGGACTTCGAGACGAGAGATCGCAGGGG
 13
 M A D D L F E D A G
 CCTCTCAGCAGCATTCCCAATCGAGTGCAGAGTATAGAGATAGTTTGTGGTGTCTCAGGGGGCGGSCAT
 144
 A S A T F C G A A C K N G F V L K G R P
 TGTGAAGATGTCTACTTCGGAAGCTGGCAGATGGCCATCGCAAGGTTCATCTGGTGGTATGTG
 61
 C K L V E M S T S K T G K H G A K V H L V L G I
 ATATATTATTTGGAGAGAAATATBAAGATATATCGCGGTGCATCTATACATATGATTTGCCATCAATCAAAA
 288
 I F T G K Y K E I D C I C M N D V P N I K
 GGGAAATGATTTCAGAGTGAATTGGATATCGAGGATGGGTACTTCTCTGCTTCAGGACGATGGGAGAGTACAG
 109
 R N D F Q L G I Q D G Y L Q L S D S G E V R
 TGTCTGCTCGATCGAGGAGAGATGTGGACGAGAGATATGACTGTGGAGAGAGATCC
 432
 TGTADACAGTGTCTGCCCATTCAGAGAGGAGCAGCTGTGCATTAAGGCTCATGGCAAAATGTGGCTT
 154
 T A E E A A V A I C K A A *
 CAGGGTGGCGGTGGTGGCAGAGATGATCAAGCTTCAGAGGCGCTCCCCAGCTTGGCTGGCGCTT
 576
 TGGTGGACCTCTATCCAAATTTATGGAGTTTATTTGGTTTCTTCCACCTCTCAAACTGTGGGGAGAG
 720
 CCTCTGCCCTTACAGTACGCTCCCTGGGACAGATCAGAGGAGAGATGGCTTGGTGAAGCTACTGCTCTCTC
 TATTAATCAATTTGGAATCAAGAAAGCTGTGATCTGGCAAAATGGTCTGTGGTCTTTATCGCAACTCAAAACCA
 864
 TGTGTCCCTCTGTCTCATAGCTCTTCAAGCTCCACCCCAAGCAGACATGACAGCTGGGAGAGATCCCTCT
 1008
 GCGTGTCTCTCTTCGAAAGCTCTTATAGGGTGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATCCCTCT
 TACAGCACTATGGGAGAGAGTGTGCCCACTGGAGCTTGTCTCTGTGGGCTTTCTCCCTGACCAATTGTG
 1139
 TAAAAATCAAGCTGAATTAATAACTCAAGTTTATTAAGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA

GCTGTGTATTATTGGGCCATAAGAACCACATACCTGTGCTGAGTCTGCACACAGAGGGCTACTGGGT
 GACATYVYWAHKNHPIPLTLDGSLG
 GACATGATCTTTTCATTCATAAAACCCAGGCTGTGGCTCGGACATCGTTGAAGACGTCGGGCTCATC
 DMIIFCFHSHYKNPGLVLDIVEDLRLRI
 AACATCGAGGCCATTTCGCCAAGCGCTAGGATGATCATCTGGTGGAGGCGTGTCGAAGCACCATC
 NMQAIFAKRTGMTILGGGVVKHHI
 GCCAATGCTAACCTCATCGGAATGAGCGTGACTACGCTGTTATATCAACAGCCAGGAGTTTGATGGC
 ANANLNRMGADYAVYINCAQEFQD
 TCAGACTCAGGAGCCCGGCAGATGAGCGTGTCTCCGGGGCAAGATCCGATGATGCACAGCCAGTAAAG
 SDSGARPD EAVSWGKIRMDAPQVK
 GTCTATGCTGATGACCTCTGGTTTCCCTCTGCTGGTGGCTGAGACATCGCCCAAAAGGACAGATGCGTTC
 VYADAGTASLVFPLLLVAETFAQKADAF
 AGAGCTGAGAGAATGAGGACTGAGCAGATGGGTAAAGCAGSAGGCTTGCACACCTTTATTATTATT
 RAEKNE D
 GCATACACACCCCTCTGGGCCCTCTCTTGCTGACGAGCATTTGAGAATAAATGGCTTTTGTGGTTT
 CTATGAAAAAAGGACTTTAAAAAATAAAAA

(606 NT, 151 aa)

FIG.4

FIG. 3

【図 5】

ラット対ヒト(BC000751又はNM_001970) 96.5%同一性(コード部分)

```

      10      20      30      40      50      60
rat   ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCGAGGGGCTCAGCCACCTTCCCAATG
      10      20      30      40      50      60
human ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCGAGGGGCTCAGCCACCTTCCCAATG

      70      80      90     100     110     120
rat   CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTGTGGTCTCAAGGGCCGGCCATGTAAGATC
      70      80      90     100     110     120
human CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGCTTGTGGTCTCAAGGGCCGGCCATGTAAGATC

      130     140     150     160     170     180
rat   GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT
      130     140     150     160     170     180
human GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT

      190     200     210     220     230     240
rat   ATTGATATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCCGTCGACTCATAACATGGAT
      190     200     210     220     230     240
human ATTGACATCTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCCGTCGACTCATAATATGGAT

      250     260     270     280     290     300
rat   GTCCCCAACATCAAAGGAATGATTTCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCC
      250     260     270     280     290     300
human GTCCCCAACATCAAAGGAATGACTTCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCA

      310     320     330     340     350     360
rat   CTGCTCCAGGACAGTGGGAGGTACGAGAGGACCTTCTGCTCGCTGAGGGAGACCTTGGC
      310     320     330     340     350     360
human CTGCTCCAGGACAGTGGGAGGTACGAGAGGACCTTCTGCTCGCTGAGGGAGACCTTGGC

      370     380     390     400     410     420
rat   AAGGAGATTGAGCAGAGATATGACTGTGGAGAAAGAGATCCTGATCAGCTGTCTGCC
      370     380     390     400     410     420
human AAGGAGATTGAGCAGAGATATGACTGTGGAGAAAGAGATCCTGATCAGGCTGTCTGCC

      430     440     450     460
rat   ATGACAGAGGAGGCGACCTGTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA
      430     440     450     460
human ATGACAGAGGAGGCGACCTGTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA
```

FIG. 5

【図 6】

ラット対ヒト(NM_020390) 72.5%同一性(コード部分)

```

      10      20      30      40      50      60
rat   ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCGAGGGGCTCAGCCACCTTCCCAATG
      10      20      30      40      50      60
human ATGGCAGACGAAATTGATTCTACTCTGGAGATGCCGGGCTTCCAGCAGCTTACCCATG

      70      80      90     100     110     120
rat   CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTGTGGTCTCAAGGGCCGGCCATGTAAGATC
      70      80      90     100     110     120
human CAGTGCTCGGCTTGGCAAAACGGCTTGTGGTCTCAAGGACGACCATGCAAAATA

      130     140     150     160     170     180
rat   GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT
      130     140     150     160     170     180
human GTGGAGATGTCACTTCCAAACTGGAAAGCATGGTCATGCCAAGGTTCACCTTGTGGGA

      190     200     210     220     230     240
rat   ATTGATATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCCGTCGACTCATAACATGGAT
      190     200     210     220     230     240
human ATTGATATTTTACGGGCAAAATATGAAGATATTTGTCTTCTACTCACAACATGGAT

      250     260     270     280     290     300
rat   GTCCCCAACATCAAAGGAATGATTTCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCC
      250     260     270     280     290     300
human GTTCCAAATATTAAGAGAAATGATTATCACTGATATGCATCAAGATGGTTACCTTTCC

      310     320     330     340     350     360
rat   CTGCTCCAGGACAGTGGGAGGTACGAGAGGACCTTCTGCTCGCTGAGGGAGACCTTGGC
      310     320     330     340     350     360
human CTGCTGACAGAACTGGTGAAGTTCGTGAGGATCTTAACTGCCAGAAAGTGAACATAGC

      370     380     390     400     410     420
rat   AAGGAGATTGAGCAGAGATATGACTGTGGAGAAAGAGATCCTGATCAGCTGTCTGCC
      370     380     390     400     410     420
human AAGGAAATAGAGGAGAAATATCAATGCAAGGTGAAGATGACAGGCTGTCTGTGATGGTGA

      430     440     450     460
rat   ATGACAGAGGAGGCGAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA
      430     440     450     460
human ATGAGTGAAGAAATATGCTGTAGCCATAAAACCTT--GCAAT
```

FIG. 6

【図 7】

ラット対マウス(BC003889) 98.3%同一性(コード部分)

```

      10      20      30      40      50      60
rat   ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCGAGGGGCTCAGCCACCTTCCCAATG
      10      20      30      40      50      60
mouse ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCGAGGGGCTCAGCCACCTTCCCAATG

      70      80      90     100     110     120
rat   CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTGTGGTCTCAAGGGCCGGCCATGTAAGATC
      70      80      90     100     110     120
mouse CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTGTGGTCTCAAGGGCCGGCCATGTAAGATC

      130     140     150     160     170     180
rat   GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT
      130     140     150     160     170     180
mouse GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGC

      190     200     210     220     230     240
rat   ATTGATATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCCGTCGACTCATAACATGGAT
      190     200     210     220     230     240
mouse ATTGACATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCCGTCGACTCATAATATGGAT

      250     260     270     280     290     300
rat   GTCCCCAACATCAAAGGAATGATTTCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCC
      250     260     270     280     290     300
mouse GTCCCCAACATCAAAGGAATGACTTCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCC

      310     320     330     340     350     360
rat   CTGCTCCAGGACAGTGGGAGGTACGAGAGGACCTTCTGCTCGCTGAGGGAGACCTTGGC
      310     320     330     340     350     360
mouse CTGCTCCAGGACAGTGGGAGGTACGAGAGGACCTTCTGCTCGCTGAGGGAGACCTTGGC

      370     380     390     400     410     420
rat   AAGGAGATTGAGCAGAGATATGACTGTGGAGAAAGAGATCCTGATCAGCTGTCTGCC
      370     380     390     400     410     420
mouse AAGGAGATTGAGCAGAGATATGACTGTGGAGAAAGAGATCCTGATCAGCTGTCTGCC

      430     440     450     460
rat   ATGACAGAGGAGGCGACCTGTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA
      430     440     450     460
mouse ATGACAGAGGAGGCGACCTGTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA
```

FIG. 7

【図 8】

ラット対ヒト(BC000751又はNM_001970) 100.0%同一性

```

      10      20      30      40      50      60
rat   MADDLDFETGDAGASATFFMQCSALRNQFVVLKGRPKIVEMSTSKTGHGKHAHVHLVG
      10      20      30      40      50      60
human MADDLDFETGDAGASATFFMQCSALRNQFVVLKGRPKIVEMSTSKTGHGKHAHVHLVG

      70      80      90     100     110     120
rat   IDIFTGKKYEDICPSTHMDVPNIKRMDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGLG
      70      80      90     100     110     120
human IDIFTGKKYEDICPSTHMDVPNIKRMDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGLG

      130     140     150
rat   KEIEQKYDCGEELLITVLSAMTEEAAVAIAKAMAK
      130     140     150
human KEIEQKYDCGEELLITVLSAMTEEAAVAIAKAMAK
```

FIG. 8

【図 9】

ラット対ヒト(NM.020390) 82.5%同一性

	10	20	30	40	50	60
rat	MADLLD	FETGDAGASAT	PFMQCSALR	KNGFVVLKGR	PKIVEMST	SKTGKHAKVHLVG
human	MADEID	FTTGDAGASST	YPMQCSALR	KNGFVVLKGR	PKIVEMST	SKTGKHAKVHLVG
	10	20	30	40	50	60
rat	IDIFTG	KKYE	ICPSTH	NMDVP	NIKRND	FOLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG
human	IDIFTG	KKYE	ICPSTH	NMDVP	NIKRND	FOLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPESELG
	70	80	90	100	110	120
rat	KEIEQKY	DCGE	EILITV	LSAMTE	EA	VAIKAMAK
human	KEIEGKY	NAGE	DVQSV	MCAMSE	EY	VAIKP-CK
	130	140	150			

FIG. 9

【図 10】

ラット対マウス(BC003889) 100.0%同一性

	10	20	30	40	50	60
rat	MADLLD	FETGDAGASAT	PFMQCSALR	KNGFVVLKGR	PKIVEMST	SKTGKHAKVHLVG
mouse	MADLLD	FETGDAGASAT	PFMQCSALR	KNGFVVLKGR	PKIVEMST	SKTGKHAKVHLVG
	10	20	30	40	50	60
rat	IDIFTG	KKYE	ICPSTH	NMDVP	NIKRND	FOLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG
mouse	IDIFTG	KKYE	ICPSTH	NMDVP	NIKRND	FOLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG
	70	80	90	100	110	120
rat	KEIEQKY	DCGE	EILITV	LSAMTE	EA	VAIKAMAK
mouse	KEIEQKY	DCGE	EILITV	LSAMTE	EA	VAIKAMAK
	130	140	150			

FIG. 10

【図 11】

ラット対ヒト(BC000333) 87.4%同一性(コード部分)

	10	20	30	40	50	60
rat	GCTGTG	TATTAT	TGGGCC	ATAAGA	ACCATAC	TGTGCTGAGTCTCAGCTCACAGAC
human	TCCGTG	TATTAT	TGGGCC	CAGAAG	ACCATAC	TGTGCTGAGTCTCAGCTCACAGAC
	10	20	30	40	50	60
rat	GGCTCA	TGGCTG	ACATGAT	CTTTTC	ATTTAA	AAACCGGCTTGGTCTGGAC
human	GGCTCG	TGGCTG	ACATGAT	CTTTTC	ATTTAA	AAACCGGCTTGGTCTGGAC
	70	80	90	100	110	120
rat	ATCGTT	GAGACT	GAGGCT	CATCA	ACATG	CAGGCCATTTTGGCAAGCGCACTGGGATG
human	ATCGTT	GAGACT	GAGGCT	CATCA	ACATG	CAGGCCATTTTGGCAAGCGCACTGGGATG
	130	140	150	160	170	180
rat	ATCATC	TGGGTG	GAGGCT	GATCA	AGCACC	ACATGCGCAATGCTAACTCATGCGGAAT
human	ATCATC	TGGGTG	GAGGCT	GATCA	AGCACC	ACATGCGCAATGCTAACTCATGCGGAAT
	190	200	210	220	230	240
rat	GGAGCT	GACTAG	CTGTTT	ATATCA	ACACAG	CCCGAGTTTGTGAGTCTCAGACTCAGGA
human	GGAGCT	GACTAG	CTGTTT	ATATCA	ACACAG	CCCGAGTTTGTGAGTCTCAGACTCAGGA
	250	260	270	280	290	300
rat	GCCCCG	CAAGAT	GAGGCT	GTCTCT	CTGGGG	CAAGATCCGGATGGATGCACAGCCAGTAAG
human	GCCCCG	CAAGAT	GAGGCT	GTCTCT	CTGGGG	CAAGATCCGGATGGATGCACAGCCAGTAAG
	310	320	330	340	350	360
rat	GTCTAT	GCTGAT	CTCTG	GTCTT	TCCCTT	GCTGCTGAGATTCGCCCAAG
human	GTCTAT	GCTGAT	CTCTG	GTCTT	TCCCTT	GCTGCTGAGATTCGCCCAAG
	370	380	390	400	410	420
rat	GCAGAT	GCTTCA	GAGCTG	AGAA	GAATG	AGGAC
human	GCAGAT	GCTTCA	GAGCTG	AGAA	GAATG	AGGAC
	430	440	450			

FIG. 11

【図 12】

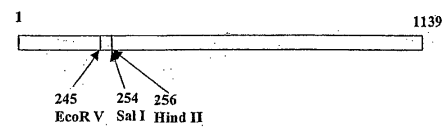


FIG. 12

【図 13】

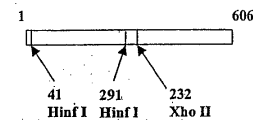


FIG. 13

【図 14】

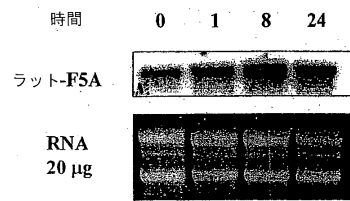


FIG. 14

【図 15】

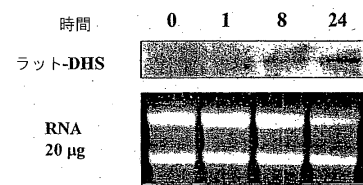


FIG. 15

【図 16】

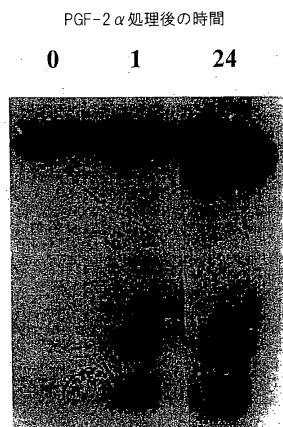


FIG. 16

【図 17】

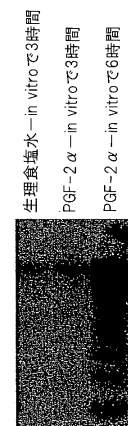


FIG. 17

【図 18】

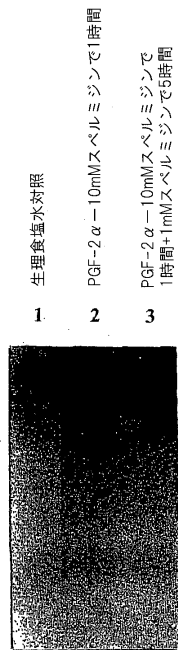


FIG. 18

【図 19】

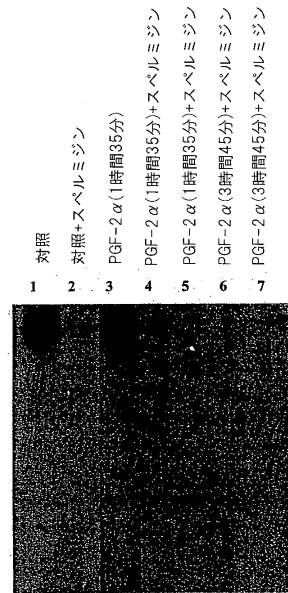


FIG. 19

【図 20】

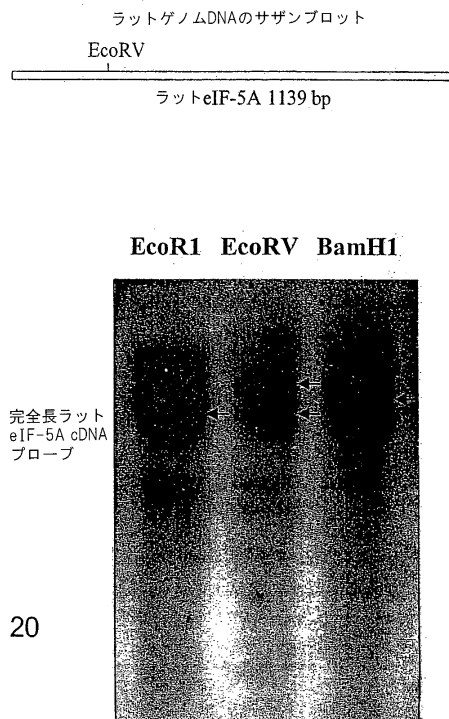


FIG. 20

【図 21】

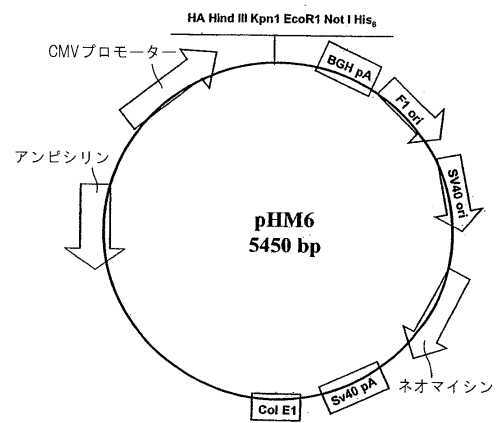


FIG. 21

【図 22】

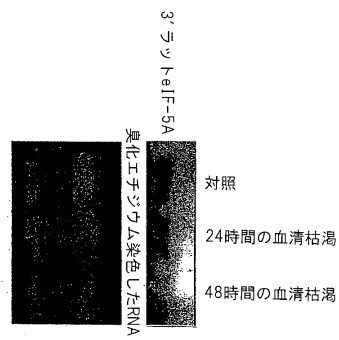


FIG. 22

【図 23】

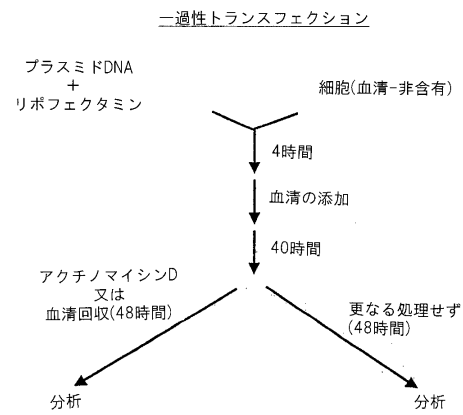


FIG. 23

【図 24】

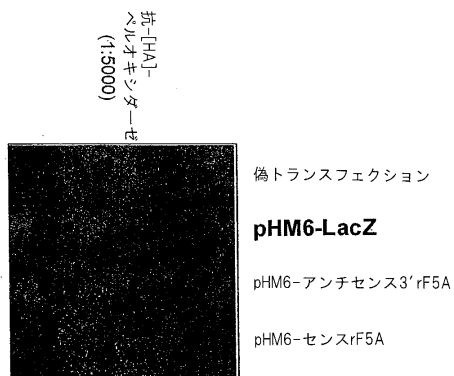


FIG. 24

【図 25】

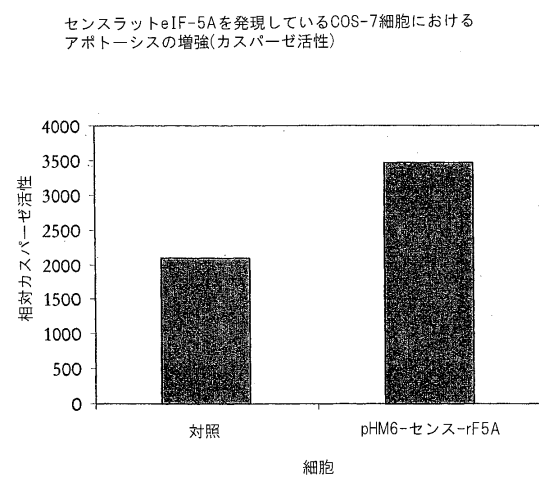


FIG. 25

【図 26】

血清下でトランスフェクションされた
COS-7細胞のアポトーシス細胞数
における増加率(%)

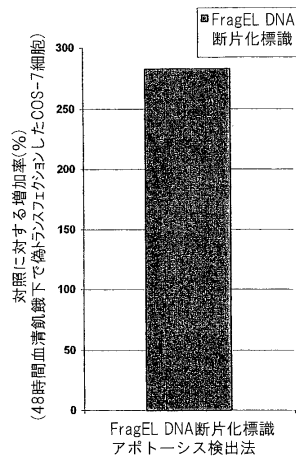
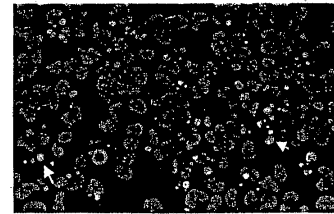
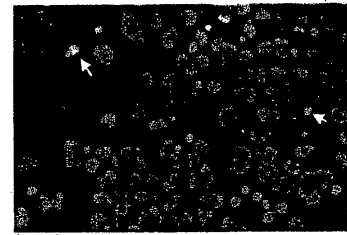


FIG. 26

【図 27】

血清枯渇下で形質転換されたCOS-7細胞のHoescht染色



pHM6-センスラットF5A

FIG. 27

【図 28】

48時間の血清枯渇後に一過性トランスフェクションされた
COS-7細胞のアポトーシス率(%)

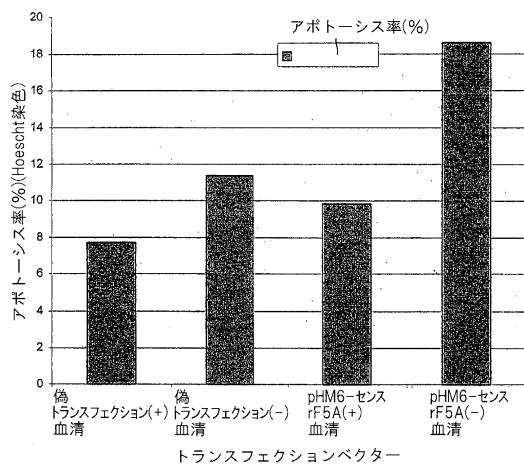


FIG. 28

【図 29】

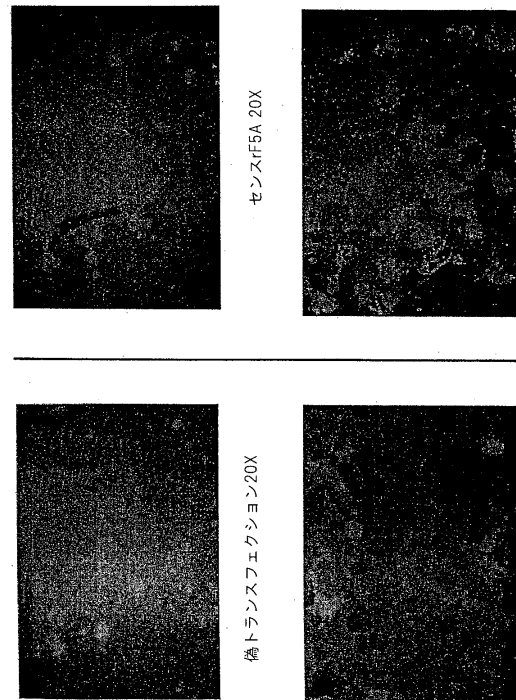
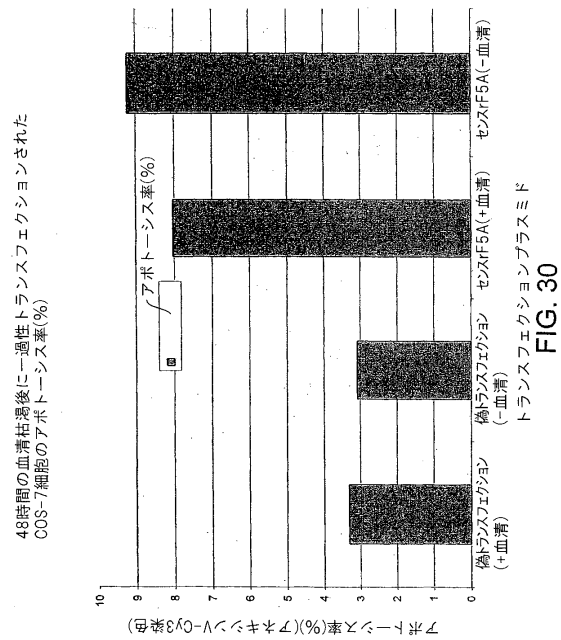
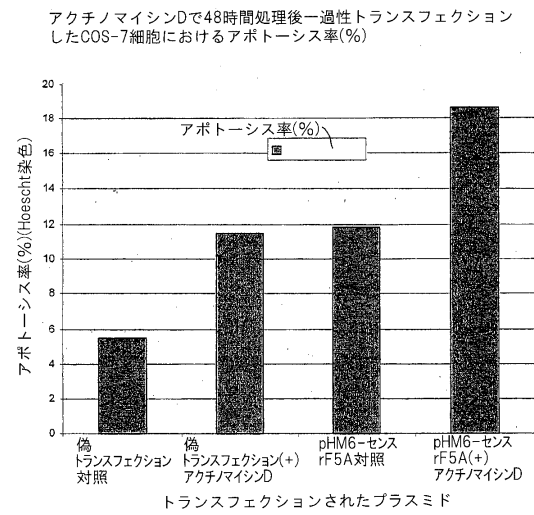


FIG. 29

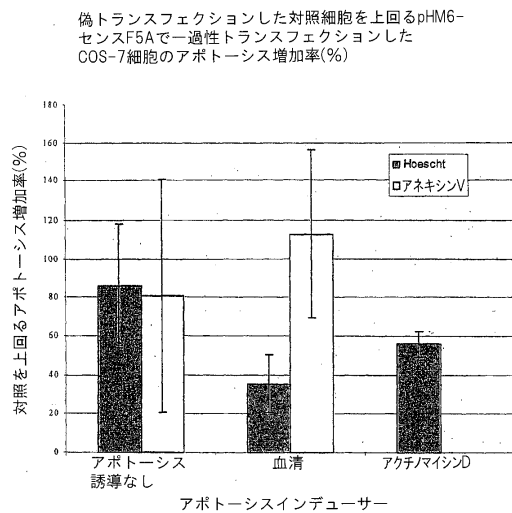
【図 30】



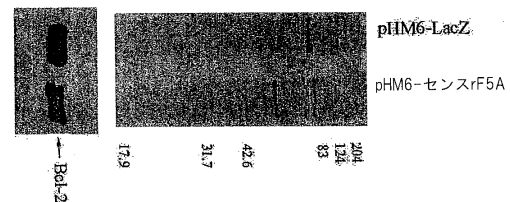
【図 31】



【図 32】



【図 33】



【図 3 4】

48時間血清飢餓下の一過性トランスフェクション
したCOS-7細胞におけるBcl-2発現レベル

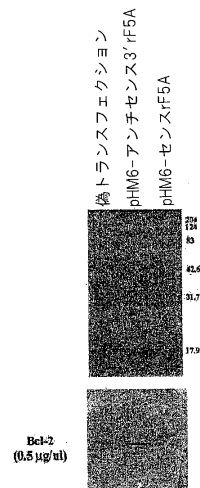


FIG. 34

【図 3 5】

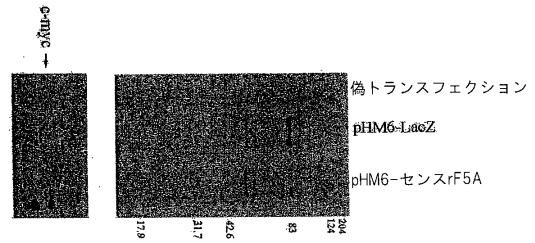


FIG. 35

【図 3 6】

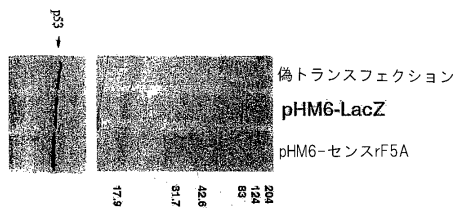


FIG. 36

【図 3 7 A】

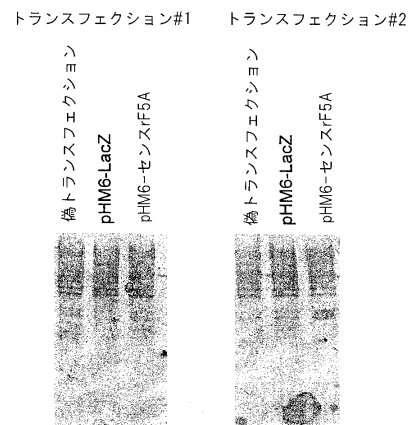


FIG.37A

【図 37 B】

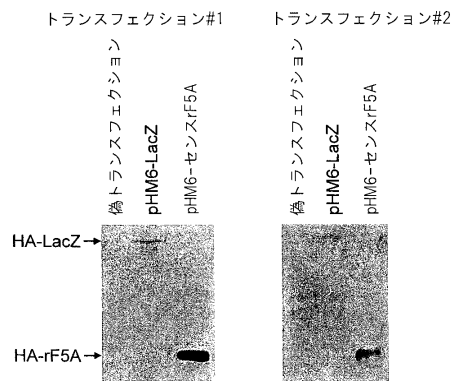


FIG.37B

【図 37 C】

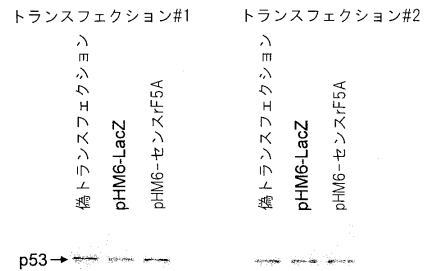


FIG.37C

【図 38】

RKO細胞から単離したヒトeIF5A2配列及び
Gen Bank ヒトeIF5A2配列とのアラインメント
(寄託番号XM_113401)

XM_113401	MADEIDFTTG	DAGASSTYPM	QCSALRYNGF	VVLKGRPCKI	VMSTSKTSG	
PCR	MADEIDFTTG	DAGASSTYPM	QCSALRYNGF	VVLKGRPCKI	VMSTSKTSG	
Consensus	MADEIDFTTG	DAGASSTYPM	QCSALRYNGF	VVLKGRPCKI	VMSTSKTSG	
	51				100	
XM_113401	HSHAKVHLVG	IDIFTGKKYE	DICPSTHMD	VNIKKNDYQ	LICIQDGYS	
PCR	HSHAKVHLVG	IDIFTGKKYE	DICPSTHMD	VNIKKNDYQ	LICIQDGYS	
Consensus	HSHAKVHLVG	IDIFTGKKYE	DICPSTHMD	VNIKKNDYQ	LICIQDGYS	
	101				150	
XM_113401	LLETETGEVRE	DLKLPEGELG	KEIEGKYNAG	EDVQVSVNCA	MSEETAVAIK	
PCR	LLETETGEVRE	DLKLPEGELG	KEIEGKYNAG	EDVQVSVNCA	MSEETAVAIK	
Consensus	LLETETGEVRE	DLKLPEGELG	KEIEGKYNAG	EDVQVSVNCA	MSEETAVAIK	
	151					
XM_113401	PCK					
PCR	PCK					
Consensus	PCK					

FIG. 38

【図 39】

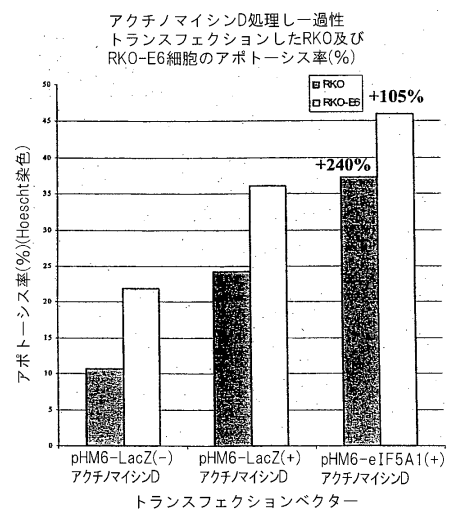


FIG. 39

【図 40】

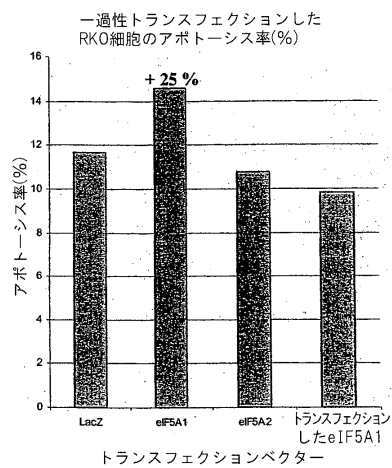
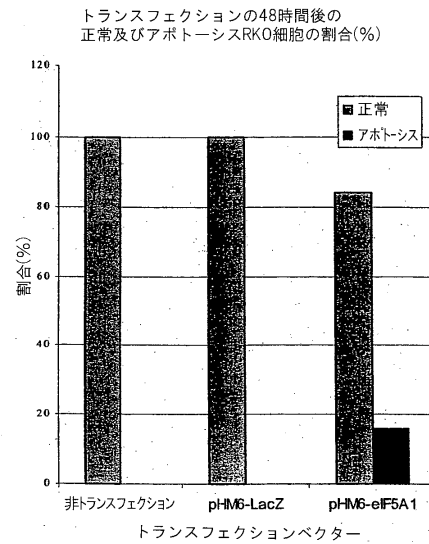


FIG. 40

【図 41】



トランスフェクション効率=30%

FIG. 41

【図 42 A】

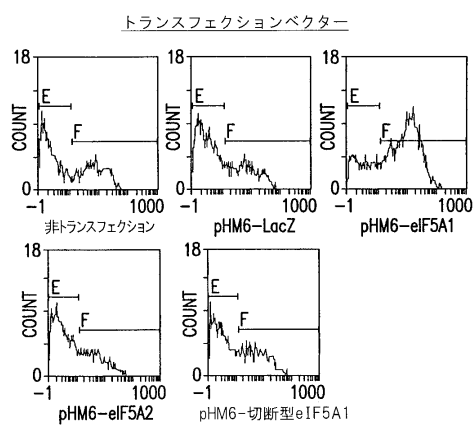


FIG.42A

【図 43】

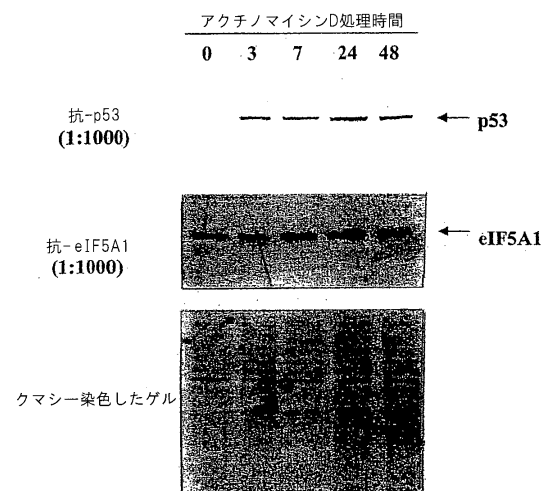


FIG. 43

【図 42 B】

トランスフェクション プラスミド	アポトーシス率
非トランスフェクション	21.2%
pHM6-Lac Z	21.7%
pHM6-eIF5A1	60.7% (80%)*
pHM6-eIF5A2	20.5%
pHM6-切断型eIF5A1	24.1%

*非トランスフェクション細胞のバックグラウンド
アポトーシス及びトランスフェクション効率にて補正

FIG.42B

【配列表】

0004754819000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
- (74)代理人 100166028
弁理士 北谷 賢次
- (72)発明者 テイラー, キャサリン
カナダ国, オンタリオ エヌ2ケー 3エヌ1, ウォータールー, フォックスハント ロード 1
2 2
- (72)発明者 ワン, ツァン - ウェイ
カナダ国, オンタリオ エヌ2ブイ 2エル5, ウォータールー, サルズバーグ ドライブ 6 0
7
- (72)発明者 ペトロフ, ラリー
カナダ国, オンタリオ エム2アール 3ジー8, ノース ヨーク, ブルー フラッグ ゲート
2
- (72)発明者 カールソン, ジョン シー.
カナダ国, オンタリオ エヌ2ティー 1ジー9, ウォータールー, ウッドベンド クレセント
1 2 6
- (72)発明者 ナラヤンシン, リチャード
カナダ国, オンタリオ エヌ2エス 2ジェイ5, キッチナー, ロリリー クレセント 1 1 9
- (72)発明者 トンプソン, ジョン イー.
カナダ国, オンタリオ エヌ2ジェイ 4ジー8, ウォータールー, ウールウィッチ ストリート
6 4 0
- (72)発明者 クライシュ, ドミニク
カナダ国, オンタリオ エヌ2エー 2ジー4, キッチナー ユニット #52, オールド チコ
ピー ドライブ 7 5
- (72)発明者 カウプ, マリアンス
カナダ国, オンタリオ エヌ3エー 4ジェイ2, ニュー ハンバーグ, パース ストリート 2
7 2

審査官 高堀 栄二

- (56)参考文献 国際公開第01/010906 (WO, A1)
国際公開第99/001551 (WO, A1)
特表平10-509327 (JP, A)
国際公開第01/002592 (WO, A1)
Amino acids, 2001年, Vol.20, No.2, pp.91-104
Biochem. J., 1997年, Vol.328, pp.847-854
Biol. Signals, 1997年, Vol.6, No.3, pp.150-156
J. Biol. Chem., 1995年, Vol.270, No.15, pp.8660-8666
J. Biol. Chem., 1995年, Vol.270, No.38, pp.22386-22392
J. Cell. Biol., 1993年, Vol.123, No.6, pp.1309-1320
J. Biol. Chem., 2001年, Vol.276, No.20, pp.17541-17549
Int. J. Biochem. Cel. Biol., 1999年, Vol.31, pp.59-72
Experimental Cell Research, 1991年, Vol.195, pp.323-329

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
CA/REGISTRY(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq