

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成18年8月31日(2006.8.31)

【公表番号】特表2006-515159(P2006-515159A)

【公表日】平成18年5月25日(2006.5.25)

【年通号数】公開・登録公報2006-020

【出願番号】特願2004-526272(P2004-526272)

【国際特許分類】

C 1 2 N 9/12 (2006.01)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 P 1/04 (2006.01)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)
A 6 1 P 11/06 (2006.01)
A 6 1 P 17/02 (2006.01)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
C 0 7 K 14/47 (2006.01)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)
C 0 7 K 16/40 (2006.01)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)
G 0 1 N 33/15 (2006.01)
G 0 1 N 33/50 (2006.01)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 9/12 Z N A
A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 11/06
A 6 1 P 17/02
A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P 43/00 1 1 1
C 0 7 K 14/47

C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	16/40	
C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/48	Z
G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	Z
A 6 1 K	37/02	
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	5/00	A

【誤訳訂正書】

【提出日】平成18年7月12日(2006.7.12)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離された、精製された、または組み換えタンパク質複合体であって以下：

(i) M K 2 ポリペプチド；および

(i i) S T S、H P H 2、および S h c から選択される M K 2 相互作用タンパク質、を含む、複合体。

【請求項2】

M K 2 ポリペプチドおよび少なくとも1つの M K 2 相互作用タンパク質を含む、請求項1に記載の複合体。

【請求項3】

前記 M K 2 相互作用タンパク質が、S T S、H P H 2、および S h c から選択される、請求項2に記載の複合体。

【請求項4】

M K 2 ポリペプチドおよび少なくとも2つの M K 2 相互作用タンパク質を含む、請求項1に記載の複合体。

【請求項5】

前記 M K 2 相互作用タンパク質が、S T S、H P H 2、および S h c から選択される、請求項4に記載の複合体。

【請求項6】

前記 M K 2 ポリペプチドが、融合タンパク質を含む、請求項1に記載の複合体。

【請求項7】

前記融合タンパク質が、該融合タンパク質を精製、単離、または検出するためのドメインを含む、請求項6に記載の複合体。

【請求項8】

前記融合タンパク質が、アフィニティータグ、放射性核種、酵素、およびフルオロフォアからなる群より選択されるドメインを含む、請求項6に記載の複合体。

【請求項9】

前記ドメインが、ポリヒスチジン、F L A G、G l u - G l u、グルタチオンSトランス

フェラーゼ (G S T)、チオレドキシン、プロテイン A、プロテイン G、および免疫グロブリン重鎖定常領域からなる群より選択される、請求項 7 に記載の複合体。

【請求項 10】

第 1 核酸および第 2 核酸を含む宿主細胞であって、該第 1 核酸は、組み換え M K 2 ポリペプチドをコードし、かつ該第 2 核酸は、S T S、H P H 2、および S h c から選択される M K 2 相互作用タンパク質をコードする、宿主細胞。

【請求項 11】

S T S、H P H 2、および S h c から選択される第 2 の M K 2 相互作用タンパク質をコードする第 3 核酸をさらに含む、請求項 10 に記載の宿主細胞。

【請求項 12】

試験化合物が、タンパク質複合体の形成を阻害するかまたは促進するかを決定するアッセイであって：

(a) M K 2 ポリペプチド、少なくとも 1 つの M K 2 相互作用タンパク質、および試験化合物を含む反応混合物を形成する工程；ならびに

(b) M K 2 と M K 2 相互作用タンパク質との間のタンパク質複合体の存在を検出する工程、

を包含し、ここで、該試験化合物の非存在下での複合体の量と比較した場合の、該試験化合物の存在下での該複合体の量の差は、該試験化合物が、複合体形成を阻害または促進することを示す、アッセイ。

【請求項 13】

前記試験化合物の存在下での前記複合体量の増加は、該試験化合物が、複合体形成を促進することを示している、請求項 12 に記載のアッセイ。

【請求項 14】

前記試験化合物の存在下での前記複合体量の減少は、該試験化合物が、複合体形成を阻害することを示している、請求項 12 に記載のアッセイ。

【請求項 15】

試験化合物が、M K 2 活性に影響を及ぼすか否かを決定する方法であって：

(a) M K 2 ポリペプチドおよび M K 2 相互作用タンパク質を含むタンパク質複合体を形成する工程；

(b) 該タンパク質複合体と試験化合物とを接触させる工程；および

(c) M K 2 キナーゼ活性、該複合体中の M K 2 の量、T N F 産生、および M K 2 の基質のリン酸化形態の量から選択される 1 つ以上の活性に対する該試験化合物の効果を決定する工程、

を包含する、方法。

【請求項 16】

タンパク質複合体の形成を阻害または促進する化合物を同定するためのスクリーニングアッセイであって：

(i) M K 2 ポリペプチドを含む第 1 融合タンパク質ならびに S T S、H P H 2、および S h c のうちの 1 つ以上から選択されるポリペプチドを含む第 2 融合タンパク質を含むツーハイブリッドアッセイシステムを、これらの 2 つのタンパク質が、該ツーハイブリッドアッセイシステムにおいて相互作用する条件下で提供する工程；

(i i) 試験化合物の存在下および非存在下で該融合タンパク質間の相互作用レベルを測定する工程；

(i i i) 該融合タンパク質の相互作用のレベルを比較する工程、

を包含し、ここで、該相互作用レベルにおける減少は、M K 2 ポリペプチドと、S T S、H P H 2、および S h c のうちの 1 つ以上から選択されるポリペプチドとの間の相互作用を阻害する化合物の指標である、アッセイ。

【請求項 17】

M K 2 ポリペプチド、ならびに、S T S、H P H 2、および S h c から選択される M K 2 相互作用タンパク質を含む複合体における 1 つ以上のタンパク質と結合する抗体。

【請求項 18】

M K 2 と前記 M K 2 相互作用タンパク質の相互作用を阻害する、請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 19】

少なくとも第 1 のタンパク質および第 2 のタンパク質を含む細胞におけるタンパク質複合体の形成を調節する方法であって、該第 1 タンパク質は M K 2 ポリペプチドであり、該第 2 タンパク質は S T S、H P H 2、および S h c のうちの 1 つ以上から選択され、該方法は、該複合体の形成を調節し得る化合物を該細胞に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 20】

複合体を生成する方法であって、M K 2 ポリペプチドならびに S T S、H P H 2、および S h c の 1 つ以上から選択される M K 2 相互作用タンパク質をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドで細胞をトランスフェクトする工程を包含し、これによって、該ポリペプチドが複合体を形成する、方法。

【請求項 21】

抗炎症薬を同定するための薬物スクリーニング方法であって：

- a) M K 2 および少なくとも 1 つの M K 2 相互作用タンパク質を提供する工程；
- b) M K 2 と該タンパク質とを相互作用させて複合体を形成させる工程；
- c) 該複合体に、有効量の潜在的薬物を添加する工程；および
- d) 該潜在的薬物が複合体形成を阻害するか否かを決定する工程、

を包含する、方法。

【請求項 22】

M K 2 および前記タンパク質が、インビボでの酵母ツーハイブリッドシステムにおいて相互作用する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

M K 2 および前記タンパク質が、インビボでの哺乳動物ツーハイブリッドシステムにおいて相互作用する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

M K 2 および前記タンパク質がインビトロで相互作用する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

前記タンパク質が S T S である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 26】

前記タンパク質が S h c である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 27】

前記タンパク質が H P H 2 である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 28】

前記薬物が低分子である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 29】

前記薬物がペプチドまたはタンパク質である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 30】

前記薬物が抗体である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 31】

前記薬物が化学因子である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 32】

組織における炎症を調節するための薬学的組成物であって、該薬学的組成物は、M K 2 相互作用タンパク質をコードする核酸を含み、該組織に送達するために処方され、その結果、該核酸は該 M K 2 相互作用タンパク質を発現し、それによって、該組織における炎症を調節する、薬学的組成物。

【請求項 33】

前記核酸が、S T S、H P H 2、および S h c から選択されるタンパク質を発現する、請求項 32 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3 4】

組織における炎症を処置または予防するための薬学的組成物であって、該組織に投与するために処方された治療有効量の少なくとも1つの因子を含み、該因子は、以下：

- a) M K 2 と M K 2 相互作用タンパク質との間の相互作用をブロックするか；または
- b) 該相互作用を許容するが、M K 2 活性をブロックするか、

のいずれかである、薬学的組成物。

【請求項 3 5】

前記因子が抗体である、請求項 3 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3 6】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 3 5 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3 7】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 3 5 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3 8】

前記抗体が M K 2 に結合する、請求項 3 5 ~ 3 7 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3 9】

前記抗体が M K 2 相互作用タンパク質に結合する、請求項 3 5 ~ 3 7 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 0】

前記因子が化学因子である、請求項 3 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 1】

前記因子がペプチドまたはタンパク質である、請求項 3 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 2】

前記因子が低分子である、請求項 3 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 3】

組織における炎症を調節するための薬学的組成物であって、該薬学的組成物は、M K 2 に結合する少なくとも1つのタンパク質を含み、該組織と接触させるために処方され、その結果、該タンパク質は、該組織における炎症を調節する、薬学的組成物。

【請求項 4 4】

少なくとも1つの炎症状態を患っている患者を処置するための薬学的組成物であって、該薬学的組成物は、M K 2 または M K 2 複合体のうちの少なくとも1つと相互作用する化合物から選択される、治療有効量の少なくとも1つの化合物を含み、該化合物は、抗体、化学因子、低分子、タンパク質、およびペプチドから選択され、該化合物は、M K 2 または M K 2 複合体のうちの少なくとも1つと結合して炎症を調節する、薬学的組成物。

【請求項 4 5】

前記タンパク質またはペプチドが、M K 2 活性を刺激する野生型タンパク質またはペプチドの変異形態である、請求項 4 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 6】

前記タンパク質が、S T S、H P H 2、および S h c から選択される、請求項 4 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 7】

前記状態が、クローン病、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、急性呼吸窮迫症候群、気腫、遅延型過敏症、ぜん息、全身性エリテマトーデス、および外傷または損傷に起因する炎症から選択される、請求項 4 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 8】

細胞中で核酸を発現し炎症を阻害するための薬学的組成物であって、該薬学的組成物は、M K 2 または M K 2 複合体のうちの少なくとも1つと相互作用する化合物から選択される化合物をコードする少なくとも1つの核酸であって、該化合物は、抗体、化学因子、低分子、タンパク質、およびペプチドから選択される、少なくとも1つの核酸を含み、該細胞に投与するために処方され、それによって、該細胞は該化合物を発現させて炎症を阻害する、薬学的組成物。

【請求項 49】

前記核酸が、STS、HPH2、およびShcから選択されるタンパク質をコードする、請求項48に記載の薬学的組成物。

【請求項 50】

サンプル中のMK2の非存在、存在、および量のうちの少なくとも1つを検出する方法であって、サンプル中のMK2の非存在、存在、もしくは量と、結合したタンパク質または化合物の非存在、存在、もしくは量とを関連付ける工程を包含し、ここで、該サンプルは、MK2またはMK2複合体のうちの少なくとも1つと相互作用する少なくとも1つの化合物を投与され、該化合物は、抗体、化学因子、低分子、タンパク質、およびペプチドから選択される、方法。

【請求項 51】

前記タンパク質が、STS、HPH2、およびShcから選択される、請求項50に記載の方法。

【請求項 52】

MK2の定性的検出を可能にするキットであって：

MK2またはMK2複合体のうちの少なくとも1つと相互作用する化合物であって、該化合物は、抗体、化学因子、低分子、タンパク質、およびペプチドから選択される、化合物；ならびに

以下から選択される少なくとも1つの他のキット要素：

a) 緩衝液および溶液のうちの少なくとも1つ；

b) 少なくとも1つの構造的要素、

を含む、キット。

【請求項 53】

前記タンパク質または化合物に結合する因子をさらに含む、請求項52に記載のキット。

【請求項 54】

前記因子が抗体である、請求項53に記載のキット。

【請求項 55】

前記タンパク質が、STS、HPH2、およびShcから選択される、請求項52に記載のキット。

【請求項 56】

薬学的組成物であって：

a) MK2に結合する少なくとも1つのタンパク質、および

b) 少なくとも1つの薬学的に受容可能なキャリア、

を含む、組成物。

【請求項 57】

前記タンパク質が、STS、HPH2、およびShcから選択される、請求項56に記載の組成物。

【請求項 58】

前記MK2相互作用タンパク質が、配列番号1、2、および3から選択されるヌクレオチド配列を含むcDNA分子によりコードされる、請求項1に記載のタンパク質複合体。

【請求項 59】

前記MK2相互作用タンパク質が、配列番号1、2、および3のフラグメント；スプライス改変体；付加変異体、欠失変異体、および置換変異体；ならびにホモログから選択されるヌクレオチド配列を含むcDNA分子によりコードされ、ここで該MK2相互作用タンパク質はMK2に結合する、請求項1に記載のタンパク質複合体。

【請求項 60】

前記MK2相互作用タンパク質は、配列番号4、5、および6から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のタンパク質複合体。

【請求項 61】

前記MK2相互作用タンパク質が、配列番号4、5、および6のフラグメント；スプライ

ス改変体；付加変異体、欠失変異体、および置換変異体；ならびにホモログから選択されるアミノ酸配列を含み、ここで、該MK2相互作用タンパク質は、MK2に結合する、請求項1に記載のタンパク質複合体。

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0030

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0030】

しかし、特定の細菌感染（例えば、*Listeria monocytogenes* 感染）のような特定の状態の場合、増強されたMK2活性を有することが望ましい。従って、治療的利益はまた、MK2活性を増強するかまたはMK2とタンパク質との相互作用（ここで、この相互作用は、MK2活性を増強し、例えば、細菌感染に対する増加した耐性を生じる）を促進する因子の投与の前後に、このような感染に対する増加した耐性により決定され得る。

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0032

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0032】

本明細書中で使用される場合、用語「ドメイン」は、いくつかの独特の物理的特長または役割（例えば、独立した構造または機能）を有するポリペプチドの領域（タンパク質を含む）を意味する。ドメインは、そのポリペプチドに対してネイティブまたは非ネイティブであり得るポリペプチドの部分を用いる。ドメインは、独特の物理的特長を有するアミノ酸配列を含み得るか、またはその配列のフラグメントを含み得る。ドメインは、ポリペプチドまたはタンパク質内の他のドメインと相互作用し得る。本発明のいくつかの実施形態において、MK2ポリペプチドおよび/またはMK2相互作用タンパク質は、アフィニティータグ、放射性核種、酵素、およびフルオロフォアから選択されるドメインを含む。このようなドメインは、MK2および相互作用タンパク質を含む複合体の単離または精製のため、またはこのドメインを含むタンパク質の単離のための使用され得る。ドメインの例としては、ポリヒスチジン、FLAG、Glu-Glu、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）、チオレドキシン、プロテインA、プロテインG、および免疫グロブリン重鎖定常領域が挙げられるがこれらに限定されない。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0033

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0033】

用語「融合タンパク質」は、第1供給源由来の第1アミノ酸配列が、第2供給源由来の第2アミノ酸配列に共有結合または非共有結合により連結されているタンパク質を用いる。ここで、第1アミノ酸配列および第2アミノ酸配列は同じではない。同じではない第1供給源および第2供給源としては、2つの異なる生物学的実体、または同じ生物学的実体由来の2つの異なるタンパク質、または生物学的実体および非生物学的実体が挙げられる。融合タンパク質としては、例えば、少なくとも2つの異なる生物学的供給源由来のタンパク質が挙げられる。生物学的供給源としては、任意の非合成核酸またはアミノ酸配列が挙げられる（例えば、本明細書中にさらに記載されるように、上記いずれかのゲノム配列またはcDNA配列、プラスミドベクターまたはウイルスベクター、ネイティブビリオンまたは変異体またはアナログ）。合成性供給源としては、生物学的系によってではなく、化

学的に製造されたタンパク質配列または核酸配列が挙げられ得る（例えば、アミノ酸配列の固相合成）。融合タンパク質はまた、少なくとも2つの異なる合成性供給源由来のタンパク質または少なくとも1つの生物学的供給源および少なくとも1つの合成性供給源由来のタンパク質が挙げられる。

【誤訳訂正5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0038

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0038】

HPH2は、Y2H系アッセイによってMK2に結合することが以前から知られている（B. Neufield, Neue Interaktionspartner der MAPKAP-Kinasen 3pK und MK2: die Polycomb-Proteine HPH2 und Bmi1 sowie der basische Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor E47 (2000) (未発行のPh.D. 学術論文、University of Wuzburg)。この発見は、本発明において確認された（図2Aおよび2B、図9Bおよび実施例5）。さらに、STS（図1A~1B、図9Bおよび実施例5）およびShc（図3Aおよび3B、図9Bおよび実施例5）は、本発明において、Y2H系を用いてMK2に結合することが示されている。

【誤訳訂正6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0039

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0039】

MK2に結合するタンパク質は、種々の方法を用いて単離され得る。例えば、実施例7に例示されるように、同時免疫沈降法が使用され得る。V-5またはHA-タグMK2相互作用タンパク質、およびMYCタグ-MK2が細胞中で同時発現される。細胞の溶解物を調製し、抗HA抗体または抗V5抗体を用いて免疫沈降した。免疫沈降物をSDS PAGEにより分離し、抗MYC抗体を用いて免疫プロットし、同時免疫沈降したMK2を検出した。

【誤訳訂正7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0046

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0046】

MK2に結合するタンパク質がその活性に影響を及ぼすか否かを調査するため、MK2活性（例えば、MK2キナーゼ活性）に対する結合タンパク質の効果が決定され得る。例えば、HAタグ-MK2相互作用タンパク質（例えば、Shc）およびMycタグ-MK2が、293T細胞において同時発現され得る。細胞溶解物が調製され、SDS PAGEによって分離され得る。活性化MK2を検出するための抗体（例えば、抗ホスホMK2スレオニン334）を用いたその後の免疫プロットングにより、MK2の活性化状態が決定される。あるいは、MK2キナーゼ活性に対するMK2結合の効果は、MK2に対する既知の基質のリン酸化型の量を定量することによって決定され得る。

【誤訳訂正8】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0047

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0047】

さらに、実施例9に例示されるように、TNF- α 生合成に対するMK2相互作用タンパク質の効果が決定され得る。HAタグ-MK2相互作用タンパク質（例えば、Shc）およびMYCタグ-MK2が、TNF α ルシフェラーゼレポーター遺伝子と共に、適切な細胞（例えば、RAW）に同時トランスフェクトされ得る。細胞は、未刺激であるか、またはアニソマイシンにより刺激されるかのいずれかである。TNF α 産生についてのアッセイのために培地が回収され、細胞溶解物が調製されて、ルシフェラーゼ活性が決定される。MK2結合タンパク質の存在下でのTNF α 生合成は、コントロールサンプルにおけるそれと比較される。

【誤訳訂正9】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0099

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0099】

（J. 組織、器官、または生物においてDNAを発現する方法）

MK2に結合するタンパク質（抗体を含む）をコードするDNA、ならびにMK2複合体に結合することによりMK2活性を調節するタンパク質、ペプチド、および抗体をコードするDNAは、組織、器官、または生物内の細胞に導入され得る。次いで、DNAによりコードされるタンパク質、ペプチド、または抗体は、組織、器官、または生物の細胞において発現され得る。本発明の1つの実施形態において、タンパク質、ペプチド、または抗体をコードするDNAは、組織、器官、または生物の細胞におけるサイトカインの産生または活性を変更するため、細胞に導入され得る。この方法は、組織、器官、または生物における炎症を低減するのに使用され得る。本発明は、クローン病、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、急性呼吸窮迫症候群、気腫、遅延型過敏症、ぜん息、全身性エリテマトーデス、および外傷または損傷に起因する炎症のような状態を処置するのに有用である。

【誤訳訂正10】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0114

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0114】

MK2構築物で形質転換した酵母のコロニーを、250~270rpmで振盪しながら、30℃で一晩SD/-Trp(Clontech)培地中に接種した。次の日、OD₆₀₀が>0.8であることを測定した。この細胞を、1000xg、5分間の遠心分離によりスピンドウンした。上清をデカントし、そして細胞ペレットを、ボルテックスにより残留液に再懸濁した。

【誤訳訂正11】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0118

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0118】

SD/-His/-Leu/-Trp X⁻-Gal培地を含むプレート上で増殖したコロニーを、SD/-His/-Leu/-Trp X⁻-Galプレートに再度ストリークし、表現型を確認した。次に、クローンをX⁻-GAL(Clontech)を含有するよりストリンジентなSD/-Ade/-His/-Leu/-Trpプレート上でスクリーニングした。ポジティブなコロニーを、グリッド式(Clontech

)に、SD / - Ade / - His / - Leu / - Trp上に再度ストリークし、マスタープレートを作製した。酵母のDNAプレップおよびグリセロールストックを、これらのマスタープレートから作製した。

【誤訳訂正12】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0120

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0120】

(実施例5：ポジティブクローンの分析)

独立した配列を、細菌(DH5)に形質転換し、その後、その細菌からDNAを単離した。次に、DNAを酵母株AH109に形質転換した。いくつかのベイト：MK2、触媒不活性MK2 K93R、空ベクターpGBKT7、TPL2、p53、およびLamin(Clontech)を、酵母株Y187に形質転換した。AH109において形質転換した各々の独立した配列の株を、3つのベイトの各々で形質転換したY187酵母と接合した。SD / - Ade / - His / - Leu / - Trp X - - GAL上での青色によりアッセイした場合に、MK2およびMK2 K93Rと相互作用したが、空ベクターpGBKT7、TPL2、p53、またはLaminと相互作用しなかった独立クローンを、特定のMK2相互作用タンパク質をコードするDNAインサートを含むクローンとして同定した(図9A)。MK2相互作用タンパク質は、野生型MK2およびMK2 K93Rと実質的に同じ親和性で結合した。このことは、MK2の結合が、キナーゼ不活性化変異体MK2 K93Rの結果ではないことを示している。特徴付けられた独立DNA配列によりコードされる1つのタンパク質は、「スムーゼリン類似」(STS)であった。このタンパク質をコードするcDNA配列を図1および配列番号1に提供し；そのアミノ酸配列を、図4および配列番号4に提供する。

【誤訳訂正13】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0123

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0123】

(実施例6：MK2相互作用ドメインの描写)

Shc A、HPH2、およびSTSとの相互作用に必要とされるMK2ドメインを描写するために、いくつかのMK2欠失変異体を使用した。試験したMK2変異体は、MK2 N(MK2アミノ酸41~400)、MK2 C(MK2アミノ酸1~370)、およびMK2 Cat(MK2触媒ドメインアミノ酸41~338)を含んだ。MK2 Nは、プロリンリッチなN末端が欠失されており、MK2 Cは、MK2核局在化シグナル(NLS)およびp38結合部位が欠失されており、そしてMK2 Catは、N末端プロリンリッチドメインならびにC末端自己阻害ドメイン、核輸送シグナル(NES)、およびNLSが欠失されていた。2ハイブリッド分析は、Shc Aが、全長MK2、MK2 C、およびMK2 Catと等しく十分に相互作用することを示した。しかし、MK2 Nとの相互作用は、ほとんど検出できなかった。Shc Aとの相互作用プロフィールは、最低、Shc AはMK2触媒ドメインと相互作用すること、およびMK2のN末端の欠失はコンホメーション変化を誘導し得、その結果Shc AはMK2と効果的に結合しなくなることを示している。

【誤訳訂正14】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0125

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0125】

スムーセリン類似は、酵母における増殖および着色アッセイによってアッセイした場合、Shc AまたはHPH2のいずれよりも高い親和性でMK2と結合する。さらに、スムーセリン類似は、MK2、MK2 N、MK2 C、およびMK2 Catの各々と実質的に同じ親和性で結合する。これは、MK2における複数の部位がこのタンパク質と相互作用することを示している。