

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年11月25日(25.11.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/134226 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/070081
- (22) 国際出願日: 2009年11月20日(20.11.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-122552 2009年5月20日(20.05.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人日本大学(NIHON UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 花澤重正(HANAZAWA, Shigemasa) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP). 舩廣善和(MASUHIRO, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九

段南四丁目8番24号学校法人日本大学内 Tokyo (JP).

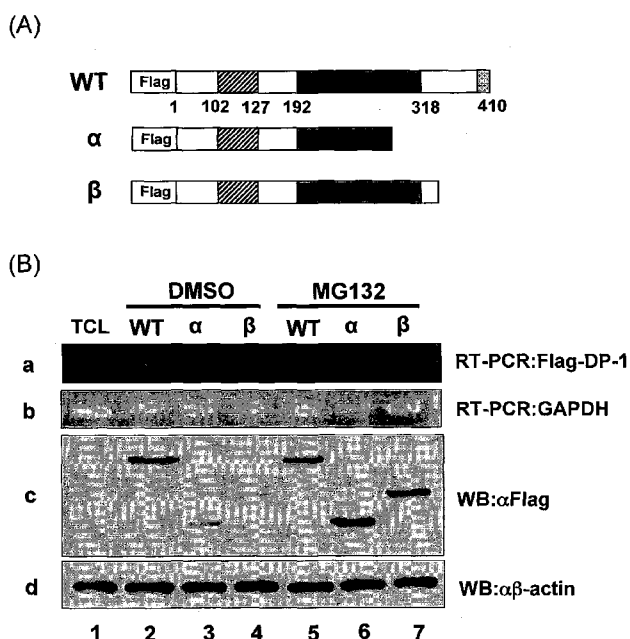
- (74) 代理人: 大賀眞司, 外(OHGA, Shinji et al.); 〒1050022 東京都港区海岸1-2-20汐留ビルディング3階サンネクスト国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

[続葉有]

(54) Title: ESTABLISHMENT OF MOTIF COMPRISING ACIDIC AMINO ACID, CAPABLE OF STABILIZING PROTEIN IN CELLS, AND APPLICABLE TO PROTEIN THERAPY, CONTROL OF DIFFERENTIATION/UNDIFFERENTIATION OF CELL AND ANTIBODY THERAPY

(54) 発明の名称: タンパク質療法や細胞の分化/未分化制御、抗体療法に応用可能な細胞内でのタンパク質の安定化を可能にする酸性アミノ酸からなるモチーフの確立

図1



(57) Abstract: A motif is searched which can inhibit the proteolysis of a protein that has been administered to a cell or an individual. Thus, disclosed is a method for designing/producing a protein having resistance to proteolysis. Specifically disclosed is a motif capable of inhibiting proteolysis, which comprises an amino acid region laying between the 396th position and the 410th position from the C-terminal of DP-1.

(57) 要約: 細胞や個体に投与されたタンパク質がタンパク質分解されることを防ぐモチーフを検索し、タンパク質分解耐性のタンパク質設計・産生法を提供する。本発明は、DP-1のC末端側396~410アミノ酸領域から成るタンパク質分解阻害モチーフであることを特徴とする。



GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

規則 4.17 に規定する申立て:

- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に
関する申立て (規則 4.17(v))

明細書

タンパク質療法や細胞の分化/未分化制御、抗体療法に応用可能な細胞内でのタンパク質の安定化を可能にする酸性アミノ酸からなるモチーフの確立

5 技術分野

本発明は、タンパク質療法や抗体療法に用いるタンパク質や抗体に融合することで、投与タンパク質を分解から防ぐことができる酸性アミノ酸からなるモチーフ等に関する。

10 背景技術

近年、細胞膜透過性タンパク質を応用したタンパク質療法の開発が顕著である。タンパク質療法には、特定の遺伝子変異や組換えによるフレームシフト等により、アミノ酸配列に置換や変異等の異常を来し発病する疾病に対し、正常型のタンパク質を発現系により作製し投与する方法がある。また、極最近報告された piPS

- 15 (protein-induced pluripotent stem cell)細胞作製のように、既に分化した細胞から未分化細胞を誘導するのに、細胞膜透過性の機能性タンパク質(4種の転写因子 Oct4, Klf4, Sox2, cMyc)を投与し、未分化を誘導する方法がある(例えば、非特許文献1を参照)。

- 20 また、再生医療では未分化細胞から特定の細胞を分化させる方法の確立が必要であるが、これにも細胞膜透過性タンパク質が応用される可能性が高い。また、特定タンパク質の機能を、抗体を用いて抑制する抗体療法の開発も急速に進んでいる。

- 従来、iPS細胞は、体細胞に4因子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)の遺伝子を、それぞれレトロウイルスやレンチウイルスなどのウイルスベクターで体細胞に導入することによって確立されてきたが、ゲノムへのウイルスベクター挿入に起因する腫瘍
25 形成が危惧されていた。また、ウイルスベクターは厳密に管理された環境で作成する必要があり、iPS細胞技術の普及の障害となっていた。

そこで、4 因子に塩基性アミノ酸であるアルギニン 11 個を繋いで、これを、細胞膜を透過し易い性質を持つように改造し、ウイルスを使わずにマウスの胎児の細胞に入れることによって piPS 細胞を生成できることが発表された。

しかし、これらのタンパク質を用いた療法では、細胞や個体に投与後、タンパク質
5 がプロテアソームやファゴソーム、オートファジーやタンパク質分解酵素等によって分解され、その結果、投与タンパク質があまり効力を発揮しなかったり、極めて頻繁に投与する必要を生じる場合が多い（例えば、非特許文献 1 を参照）。

これまでに、このような細胞膜透過性タンパク質の細胞内でのタンパク質分解からの抑制を行なえるモチーフとしては、ポリアルギニンタグ (poly-arginine) が知られ
10 ている。これは 8 個のアルギニンから成る 8R や主にアルギニンからなるモチーフがプロテアソーム等によるタンパク質分解を防ぐというものである（例えば、非特許文献 2、3 を参照）。

また、酸性アミノ酸から成るモチーフがタンパク質の安定性に重要である報告はあるものの（例えば、非特許文献 4、5 を参照）、酸性アミノ酸から成るモチーフがタ
15 ンパク質分解からの抑制を行っているという報告はない。

piPS にアルギニンが繋がれた誘導因子を供給しても、誘導因子はタンパク質分解に晒さらされるために、誘導因子を長期間大量に細胞に供給しなければならず piPS の作成には数か月の期間を要するという課題がある。

非特許文献 1 Zhou H. et. al., Cell Stem Cell. 2009; 4(5): 381-384

20 非特許文献 2 Kloss A. et al., Eur J Pharm Biopharm. 2009 ;72(1):219-225.

非特許文献 3 Anbanandam A. et. al., J Mol Biol. 2008 ;384(1):219-227.

非特許文献 4 Yi P. et. al., Mol Cell. 2008 ;29(4):465-476.

非特許文献 5 Yen HC. et. al., Science. 2008 ;322(5903):918-923.

発明の概要

25 発明が解決しようとする課題

そこで、本発明は、細胞や個体に投与されたタンパク質がプロテアソームやオートファジー、その他タンパク質分解酵素などによって分解されることを防ぐモチーフを検索し、タンパク質分解に耐性を有するタンパク質設計・産生法を提供することを目的とする。

5

課題を解決するための手段

本発明者らは上記課題を解決するために研究を重ねた結果、細胞周期調節性の転写因子 DP-1 の C 末端側酸性領域が DP-1 の細胞内でのタンパク質分解に抵抗性を有し、そして、他分子のタンパク質分解をも強力に防ぐモチーフであることを見出し、本発

10 明を完成するに至った。

即ち、本発明は、酸性アミノ酸から主としてなる配列を有するタンパク質分解阻害モチーフであり、好ましくは、DP-1 タンパク質の C 末端側の酸性アミノ酸領域の全部又は一部のアミノ酸配列からなるか、又はこれを含む、タンパク質分解阻害モチーフである。

15 本発明に係る分解阻害モチーフの形態は、前記 DP-1 タンパク質の C 末端側 395～410 のアミノ酸領域から成る分解阻害モチーフであり、また、下記アミノ酸配列からなるタンパク質分解阻害モチーフである。

(1) EDDEEDDDFNENDEDD

(2) EDDEE

20 E:グルタミン酸

D:アスパラギン酸

N:アスパラギン

F:フェニルアラニン

25 さらに、本発明の他の形態は、前記酸性アミノ酸がグルタミン酸またはアスパラギン酸から主として成るタンパク質分解阻害モチーフである。

また、本発明は、既述のモチーフが任意のタンパク質のN末端に、C末端に、その途中に、の少なくともいずれかに融合され、タンパク質分解耐性を得た融合タンパク質である

このタンパク質としては、体細胞を誘導多能性幹細胞（iPS細胞）に誘導するための誘導因子がある。詳しくは、Sox2のC末端に前記モチーフが融合されたアミノ酸配列、Oct4のN末端に前記モチーフが融合されたアミノ酸配列、及び、Klf4のN末端に前記モチーフが融合されたアミノ酸配列である。

さらに本発明は前記モチーフのアミノ酸配列をコードする核酸であり、その核酸を有する発現ベクターであり、そして、この発現ベクターを含む形質転換体である。

さらにまた、本発明は、前記融合タンパク質を含む医薬組成物であり、そして、細胞膜透過性タグがさらに融合された前記細胞膜透過性タンパク質であり、またさらに、前記融合タンパク質、又は、細胞膜透過性タンパク質を含む抗体タンパク質である。

発明の効果

既述の酸性アミノ酸から成るモチーフは、融合したタンパク質をタンパク質分解から防ぐ。従って、タンパク質療法や抗体療法に用いられる細胞膜透過性タンパク質や抗体に、前記モチーフを融合することで、タンパク質分解耐性のタンパク質を提供することが可能となることから、これらの療法に顕著な効率化（投与回数の減少、効果の増大）をもたらすなどの有用が発揮される。

また、本発明に係る、酸性アミノ酸から成るモチーフは融合したタンパク質をタンパク質分解から防ぐことから、発現プラスミド等にこれをコードするオリゴヌクレオチドを導入し、目的タンパク質との融合タンパク質発現系を作製すれば、これまでタンパク質分解が激しく機能解析が不可能であったタンパク質も、分解耐性を獲得し機能解析が可能となり、分子生物学のツールとしても極めて有効である。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明のきっかけとなった DP-1 の C 末端側がタンパク質分解を防ぐ機能を持つことを示した図である。

図 2 は、DP-1 の C 末端側 396～410 アミノ酸領域が DP-1 のタンパク質分解を防ぐ領域であることを示した図である。

図 3 は、DP-1 の C 末端側 396～410 アミノ酸領域は DP-1(・)のタンパク質分解促進を防ぐことを示した図である。

図 4 は、DP-1 の 128～192 アミノ酸領域に DP-1 の分解促進領域が存在することを示した図である。

図 5 は、DP-1 の C 末端側 396～410 アミノ酸領域は他分子 (GAL4DBD; GAL4 DNA 結合領域) においてもタンパク質分解を防ぐことが可能であることを示した図である。

図 6 は、Stabilon を iPS 細胞誘導因子に導入した実施形態の結果を説明する第 1 の図である。

図 7 は、Stabilon を iPS 細胞誘導因子に導入した実施形態の結果を説明する第 2 の図である。

図 8 は、Stabilon の配列の変化がタンパク質分解阻害性に与える影響を説明する図である。

発明を実施するための形態

DP-1 タンパク質は、410 アミノ酸から構成され、その配列は、次のとおりである。下線部が、タンパク質分解阻害モチーフを構成する、DP-1 タンパク質の C 末端側の酸性アミノ酸領域である。

makdagliea ngelkvfidq nlspgkgvvs lvavhpstvn plgkqlpkt fgqsnvniaq qvvigtpqrp
aasntlvvgs phtpsthas qnqpsdssp sagkrnrkge kngkglrhfs mkvcekvqrk gttsynevad
elvaeftaad nhilpnesay dqknirrrvy dalnvlmamn iiskekkeik wiglptnsaq ecqnleverq
rrlerikqkq sqlqelilqq iaftnlvqrn rhaeqqasrp pppnsvihlp fiiivntskkt vidcsisndk

feylfnfdnt feihddievl krmgmacgle sgscsaedlk marslvpkal epyvtemaqq tvggvfitta
gstsngtrfs asdltn gadg mlatssngsq ysgsrvetpv syvgeddeed ddfnendedd

上記の配列は、NCBI (National Center for Biotechnology Information) アメリカ合衆国国立生物工学情報センターに登録されている (NM_007111)。

- 5 本発明に係る酸性アミノ酸から主として成るモチーフは、主にグルタミン酸 (Glu;E)、およびアスパラギン酸 (Asp;D) から成るモチーフであり、その構成比や長さは特に規定されず、全体として他のアミノ酸を含む場合もある。また、若干酸性であるグルタミン (Q;Gln)、アスパラギン (Asn;N)、システイン (Cys;C) も含んでもよい。また、リン酸化アミノ酸 (セリン [Ser;S]、スレオニン [Thr:T]、チロシン [Tyr;Y])
- 10 も酸性となることからこれらのリン酸化アミノ酸を含んでもよい。さらに、本発明に係わるモチーフの一例は、1～50個のアミノ酸からなり、そのうち、酸性アミノ酸数が20%以上であることが望ましい。本発明のモチーフには、プロテアソームに対する分解抵抗性を有する限り、フェニルアラニン [Phe:F] などの非酸性アミノ酸が含まれていてもよい。
- 15 本明細書において、「アミノ酸」とは、その最も広い意味で用いられ、天然のアミノ酸のみならずアミノ酸変異体及び誘導体といったような非天然アミノ酸を含む。好ましい様態において、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフに含まれるアミノ酸は、天然のアミノ酸のみから成る。
- 20 本明細書において、「1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された」という場合、置換されるアミノ酸の個数は、結果として得られるタンパク質が融合したタンパク質の活性を保持する限り特に限定されないが、1～9個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個程度であるか、あるいは全体の長さの20%以内、好ましくは10%以内である。置換又は付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸又はアミノ酸アナログであり得、好ましくは天然のアミノ酸である。
- 25 本発明の酸性アミノ酸から成るか、酸性アミノ酸をからモチーフ (「安定化促進領域」 「Stabilon」 「CTAD;C-terminal acidic domain」 「酸性アミノ酸領域」と表記

することもある。)は、融合したタンパク質をタンパク質分解から防ぐことができる限り、構成アミノ酸やその長さ、融合の位置や方式等において特に限定されない。

本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフは融合タンパク質のどこに位置してもよく、融合タンパク質のN末端側、C末端側もしくは内部のいずれに連結してもよい。

- 5 本発明に係る分解阻害性モチーフが融合或いは付加されるタンパク質は、分解阻害モチーフの追加によって、タンパク質分解に抵抗性が発揮され、さらに、所定の生理活性を有するかこれを期待できるタンパク質であれば特に限定されない。例えば、既述の Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc は、当該タンパク質の好適な例である。

- 10 本発明に係る「本発明に係る融合タンパク質をコードする核酸」は本発明に係る融合タンパク質をコードする塩基配列を含むものであればいかなるものであってもよく、好ましくは DNA である。かかる DNA は、例えば、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、所定の細胞、組織に由来する cDNA 及び cDNA ライブラリーから得ることができ、合成した DNA であってもよい。所定の細胞・組織から全 RNA または mRNA 画分を調整し、RT-PCR 法によって増幅して得ることもできる。

- 15 本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフをコードする核酸は、アミノ酸配列に基づいて塩基配列を決定し、当該配列に基づいて合成した DNA からなる。また、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフに融合するタンパク質やペプチド等をコードする核酸は、例えば細胞から抽出した RNA を用い、RT-PCR 法によって得た cDNA や cDNA ライブラリーから得ることができ、合成した DNA であってもよい。それぞれの核酸は連結
20 してから発現ベクターに挿入することもできるし、それぞれの核酸を発現ベクターのクローニングサイトに挿入することによって融合タンパク質が発現されるように連結してもよく、いずれの場合も本発明の「融合タンパク質をコードする核酸」に含まれる。

- 「融合タンパク質が発現されるように」連結するとは、目的タンパク質、本発明の
25 酸性アミノ酸から成るモチーフの他、精製用タグ、核移行シグナル(NLS; nuclear localization signal; 以下 NLS と表記することもある。)等の細胞内局在を誘導する

ことが可能なモチーフ等をコードする核酸のフレームを合わせて(in frame で)連結することを意味する。

本発明に関わる「発現ベクター」は、上述の本発明に関わる酸性アミノ酸から成るモチーフをコードする核酸が挿入されているベクターである。発現ベクターは、宿主

5 中で自己複製能を有し、宿主細胞と容易に区別しうる表現系の遺伝子を有し、制限酵素切断部位を少なくとも一つ有し、宿主細胞外では生存できないという条件を満たす限り、どのようなものを用いてもよく、宿主との組み合わせで選択することができる。

例えば、宿主を大腸菌とする場合には、pBR 系ベクター、pUC 系ベクター、pET 系ベクター、pQE 系ベクター等のプラスミドが好ましく用いられ、その他、動物細胞発現用

10 プラスミド、大腸菌細胞発現用

プラスミド、酵母細胞発現用プラスミド、昆虫細胞発現用ウイルス（バキュロウイルス等）、ウイルスベクター、ファージベクター、コスミドベクター、酵母由来プラスミド、酵母人工染色体(YAC)等を用いることもできる。

発現ベクターには、宿主で機能するプロモーターが組み込まれ、プロモーターの制御下に本発明の核酸が挿入される。発現ベクターには、他えば、複製起点、ターミネーター領域、形質転換体を選択するための選択マーカー遺伝子等も挿入される場合がある。選択マーカー遺伝子としては、例えば、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ネオマイシン、ジェネティシン等の抗生物質耐性遺伝子が用いられる。

15

本発明に関わる「形質転換体」は、上述した本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフをコードする核酸が挿入されている発現ベクターを用いて形質転換した宿主をいう。宿主としては発現ベクターが大腸菌用の発現ベクターである場合、例えば、大腸菌、その他細菌類等を用いることができるが、大量生産にも適する大腸菌が好ましい。発現ベクターが動物細胞用の発現ベクターである場合、例えば、HEK293 細胞、HeLa 細胞、MCF-7 細胞、Cos 細胞等の培養細胞を用いることができる。

20

次に、本発明に係る融合タンパク質の製造方法について説明する。本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質は上述した本発明の核酸を含む発現

25

ベクターを用いて、宿主を形質転換し、当該宿主を培養して融合タンパク質を発現させ、当該融合タンパク質を精製して得ることができる。その他、動物培養細胞にトランスフェクション試薬やエレクトロポレーション等を用い発現ベクターを導入し、一過的に発現を調べたりすることも可能である。

- 5 本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質の発現ベクターで宿主を形質転換させる方法には、公知の方法を用いることができ、例えば、宿主が大腸菌の場合、塩化マンガンや塩化カルシウムで処理してコンピテント細胞を作製し、懸濁液に発現ベクターを混ぜてヒートショックにより取り込ませる方法、エレクトロポレーション法、ファージベクターの場合には宿主にファージを感染させる方法等を
- 10 挙げることができる。また、宿主が動物培養細胞の場合、市販のトランスフェクション試薬やエレクトロポレーション法、塩化カルシウム沈殿法等により取り込ませることができる。

- こうして得られた形質転換体を適当な培地で培養することにより、目的とする融合タンパク質を発現させることができる。培地の組成、培養の温度、時間、誘導物質の
- 15 添加等の条件は、形質転換体が生育し、融合タンパク質が効率よく産生されるよう、公知の方法に従って当業者が決定することができる。また、例えば、選択マーカーとして抗生物質抵抗性遺伝子を発現ベクターに組み込んだ場合、培地に抗生物質を加えることにより、形質転換体を選択することができる。

- 産生された融合タンパク質は、公知の方法に従って精製することができる。例えば、
- 20 宿主を緩衝液に懸濁して超音波破碎等の方法で破壊する。続いて融合タンパク質に精製用タグが融合されている場合は、まず当該精製用タグに特異的な親和性を有するアフィニティーカラムを通し、カラムに吸着された融合タンパク質を溶出用の緩衝液で溶出することによって精製することができる。また、得られた融合タンパク質溶液を、再度アフィニティーカラムを通す工程を複数回繰り返すことによって、さらに純度を
- 25 高めることが可能である。

特に、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質を医薬として用いる場合には、少なくとも 90%、好ましくは 95%以上、より好ましくは 98%以上、さらに好ましくは 99%以上に精製されたものを使用するのが好ましいところ、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合した精製用タグを含む場合、このような純度を容易に達成することができる。

大腸菌における発現系で、精製用タグにポリヒスチジン(His6)を用いる場合、発現タンパク質を封入体として発現させ、アフィニティーカラムに通す前に、尿素やグアニジン塩酸等のタンパク質変性剤や、界面活性剤で処理することも好ましい。変性して精製したタンパク質は、リフォールディングすることによって、適切に機能を発揮させることができる。リフォールディングは、例えば、過剰量のアルギニンを含む緩衝液で希釈することや同緩衝液での透析によって行なうことができる。

本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質は、融合したタンパク質の機能によっては医薬組成物となる。

本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合するタンパク質としては、細胞膜透過性タンパク質、抗体、ペプチド、細胞内でタンパク質分解されるタンパク質等が挙げられる。

これらのタンパク質が、細胞内や個体内でタンパク質分解される様な状況の場合、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合していないタンパク質の分解は早い
が、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質は、タンパク質分解耐性を発揮し難分解性であることが予想される。従って、タンパク質を長期間大量に投与しなくてはならない治療法や細胞分化法に対し、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合するタンパク質を使用した場合、短期間に少量の投与で極めて高い効果が得られると予想される。

本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質からなる医薬組成物は、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、不湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤あるいは賦形剤を用いて、通常の医薬組成物の形態に製剤化される。こ

のような医薬組成物としては、例えば、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射等が挙げられる。

医薬組成物中に含有される本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質の量は、特に限定されず広い範囲内から適宜選択することができるが、通常、
5 医薬組成物に本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質を1～70%重量%含有させるのが好ましい。本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質を有効成分として含有する医薬組成物は、さらに他の有効成分を含有することもできるし、他の有効成分を含有する医薬組成物と組み合わせて用いることもできる。

- 10 本発明に係る医薬組成物の投与方法としては特に制限はなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別、疾患の状態、その他の条件に応じた方法で投与される。錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤及びカプセル剤の場合の投与方法としては、例えば、経口投与が挙げられる。また、注射剤の場合には、単独で、又はブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して、静脈内、筋肉内、皮内、皮下又は腹腔内に投与することが
15 できる。坐剤の場合には直腸内に投与される。

- 上記医薬組成物の投与量は、用法、患者の年齢、性別、疾患の程度、その他の条件に応じて適宜選択すればよく、経口投与する場合、通常、成人（60kg）に対し、1回あたり、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質を約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。また、注
20 射剤として投与する場合、成人（60kg）に対し、1回あたり、本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質を約0.1mg～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mg投与する。

- 上記医薬組成物の投与回数は、用法、患者の年齢、性別、疾患の程度、その他の条件に応じて適宜選択すればよく、例えば、2週間に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月に1
25 回等の頻度で投与することができる。

本発明の酸性アミノ酸から成るモチーフを融合したタンパク質は、動物培養細胞内で発現させることで従来細胞内でタンパク質分解が早いために、発現が十分に見られず、機能解析が不可能であったタンパク質に対し有効であると考えられる。

以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は何らこれらに限定

5 されるものではない。

図 1 について説明する。DP-1 (WT, ・, ・) を発現プラスミドにより HEK 293F 細胞に強制発現させた際の DP-1 の分解度について、プロテアソーム阻害剤である MG132 の有無の条件下で調べた。

10 1.1 発現プラスミドの作製および大量調整

Flag タグ融合 DP-1 (WT, ・, ・) をは乳動物培養細胞で発現させるため、pcDNA3 発現プラスミド (Invitrogen 社) に Flag タグと DP-1 をコードする cDNA を Ligation により挿入した (図 1 -A、本発現プラスミドの構築については Ishida H. ら、2005 J Biol Chem. 2005 vol. 280 No. 26:24642-8. に報告)。

15 Flag タグは Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys からなるアミノ酸配列であり、この配列を融合することで、ウェスタンブロッティングによる検出が極めて容易になること (ウェスタンブロッティングに用いる HRP 融合 Flag 抗体 [SIGMA 社] は極めて高感度で Flag タグ融合タンパク質を検出可能である) から使用した。

各プラスミドを含む単一クローン化した大腸菌を、各々アンピシリン入り LB 培地
20 を用いて培養した。遠心分離により集菌後、Plasmid Purification MAXI Kit (QIAGEN 社) を用い発現プラスミドを精製した。

1.2 細胞培養

HEK 293F 細胞を 10%FBS 入り DMEM 培地 (抗生物質としてペニシリンとストレプトマイシンを含む) により培養した。トランスフェクション用には、トランスフェクシ
25 ン時に 50%コンフレントになるよう、前日 6cm ディッシュに HEK 293F 細胞を撒いた。

1.3 トランスフェクション

図1の1~7レーンの並びの通りの組み合わせで、HEK 293F 細胞にプラスミドをトランスフェクションした。発現プラスミドはFlag-DP-1/pcDNA3 200ng 用い、補正用に cDNA3 発現プラスミドを計 2.6mg となるように加え TE バッファー (10mM

Tris-HCl [pH8.0], 1mM EDTA) で 100ml になるように調整した。トランスフェクション

- 5 試薬には Polyfect transfection reagent を用いた。発現プラスミド溶液に 30ml Polyfect transfection reagent (QIAGEN 社) を加えボルテックスし、攪拌混濁した。DNA、Polyfect transfection reagent 複合体を形成するため 5 分間静置した。その間、細胞の培地を交換した。DNA、Polyfect transfection reagent 複合体を培地に添加し、ゆっくり混ぜた。CO₂ インキュベーターに置き、5% CO₂ 濃度、37℃ の条件化
- 10 で培養を続けた。

1.4 MG132 の添加

MG132 は DMSO に溶解したものをを用いた。レーン 5~7 には MG132 が最終濃度 10m M になるよう、細胞回収の 6 時間前に添加した。レーン 2~6 には DMSO 濃度がレーン 5

- 15 ~7 と同じ濃度になるよう DMSO のみを加えた。

RT-PCR 法による mRNA の発現解析 (図 1、パネル a, b)

1.5.1 Total RNA の抽出

トランスフェクション後 24 時間培養を続けた細胞から培地を捨てた。1ml の PBS

20 を加え、軽いピペッティングで細胞を剥がし、1.5ml のエッペンチューブに移した。1,500rpm の遠心分離で細胞を回収し、上清を捨てた。沈殿した細胞に 700ml の PBS を加え、更に 700ml の Isogen (ニッポンジーン社) を加えた。Isogen のプロトコールに従い、total RNA を調整した。

25 1.5.2 RT-PCR 法

RT-PCR によって強制発現させる Flag-DP-1/pcDNA3 由来の Flag-DP-1 mRNA の量の定量化を試みた。RT-PCR 用のプライマーは Flag-DP-1 mRNA 用と補正用にハウスキーピング遺伝子である GAPDH を用いることとし、以下のように設計した。

5 Flag-DP-1

Forward : AGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATAC

Reverse : CGAGCGGGTTGACGGTGGAGGGGTGAACGGCCACG

GAPDH

Forward : CCCAGAAGACTGTGGATGGCCCC

10 Reverse : CGTTGTCATACCAGGAAATGAGCTTGACAAAG

RT 反応は、AccessQuick RT-PCR system (プロメガ社)を用いて以下の様に行った。

1.5.2.a. RT 反応組成

15	RNA (1 m g/ m l)	1 m l
	Master Mix (2x)	10 m l
	3' primer (50pmol/l)	0.4 m l
	AMV Reverse Transcriptase	0.4 m l
	<u>Nuclease-free water</u>	<u>13 m l</u>
20	Total	20 m l

1.5.2.b. RT-PCR プログラム

	45°C	45 分
	94°C	2 分
25	4°C	∞

PCR 反応は ExTaq (タカラバイオ社) により以下のように行った。

1. 5. 2. c. PCR 反応組成

	10X Ex Taq Buffer	4 m l
5	dNTP Mixture	3.2 m l
	5' primer	0.8 m l
	3' primer	0.8 m l
	TaKaRa Ex Taq (5unit/ μ l)	0.4 m l
	<u>H₂O</u>	<u>30.8 m l</u>
10	Total	40.0 m l

1. 5. 2. d. PCR 反応プログラム

Flag-pcDNA3-DP-1 の増幅

	96°C	1 分
15	96°C	20 秒
	71°C	45 秒
	4°C	∞

(96°C; 20 秒、71°C; 45 秒の反応は 35 サイクル繰り返す。)

20 GAPDH の増幅

	96°C	1 分
	96°C	20 秒
	71°C	45 秒
	4°C	∞

25 (この 96°C; 20 秒、71°C; 45 秒の反応は 30 サイクル繰り返す。)

1.5.2. e. 電気泳動法による増幅の確認

PCR 産物は 2 %アガロースゲルを用いて電気泳動を行い展開し、エチジウムブロマイドにより染色した後、Transilluminator(株式会社アドバンス)で確認しデジタルカメラ FinePix F11 (FUJIFILM) によって記録した。

5

Western blotting 解析によるタンパク質発現量解析 (図 1、パネル c, d)

1.6.1 Total 細胞抽出液

トランスフェクション後 24 時間培養を続けた細胞から培地を捨てた。1ml の PBS を加え、軽いピペッティングで細胞を剥がし、1.5ml のエッペンチューブに移した。

- 10 1,500rpm の遠心分離で細胞を回収し、上清を捨てた。沈殿した細胞に 300ml の NET-N +バッファー(20mM Tris-HCl[pH7.9], 1mM EDTA[pH7.9], 150mM NaCl, 1% NP-40, プロテアーゼインヒビターカクテルを使用直前に添加)を加え、数度のピペッティングにより抽出し、13,500rpm、4℃の遠心分離をした。上清を別の新しい 1.5ml のエッペンチューブに移し、300ml の 2xSDS-PAGE sample バッファーを加え攪拌した。98℃で
- 15 1 分間煮沸し、サンプル化した。

1.6.2 Western blotting 法

- 12% SDS-PAGE ゲルにより、各レーンの細胞抽出液サンプル 10ml をロードし泳動した。泳動後、ゲル板からゲルを外し、トランスファーバッファーに浸した。ゲルをト
- 20 ランスファーブロット(BioRAD 社)にセットし、分離したサンプルタンパク質を PVDF メンブレン (ミリポア社)に移した。サンプルタンパク質を移し取った PVDF メンブレンをブロッキングバッファー (ナカライ社)に浸した。TBST バッファー(20mM Tris-HCl[pH7.5], 150mM NaCl, 0.1% Tween 20)で 4 回洗浄後、一次抗体として HRP (Horseradish peroxidase) 融合 Flag 抗体、またサンプルの抽出液の均一性を補正す
- 25 るためにハウスキーピング遺伝子である b-アクチンを用いた。b-アクチンを使用した場合は、TBST バッファーで 4 回洗浄後、二次抗体として HRP 融合 anti-mouse IgG 抗

体を用いた。検出はケミルミワンを HRP の基質として用い、発色をハイパーフィルム (GE ヘルスケア社) によって検出した。

図 1、パネル a, b のレーン 2~7 において、Flag-DP-1 (WT, . . . , .) mRNA はほぼ
5 等量の良好な発現を示した。MG132 添加による mRNA 量の変化はなかった。図 1、パネ
ル c, d、DMSO のみの添加群において (レーン 2~4)、Flag-DP-1 (WT) タンパク質は通
常の良好な発現を示したが (パネル c、レーン 2)、Flag-DP-1 (. . . , .) タンパク質は
非常に低レベルの発現量であった (パネル c、レーン 3, 4)。MG132 添加群において (レ
ーン 5~7)、Flag-DP-1 (WT, . . . , .) タンパク質はほぼ等量の発現であった (パネル
10 c、レーン 5~7)。よって、Flag-DP-1 (. . . , .) タンパク質は MG132 添加により、大幅
に発現量が増加した (パネル c、レーン 3, 4 とレーン 6, 7 の比較)。よって、
Flag-DP-1 (. . . , .) タンパク質はプロテアソームにより強力に分解されるタンパク質
であることが判明した。また、Flag-DP-1 (. . . , .) が欠いている C 末端側領域に DP-1
の分解抑制に重要であるドメインかモチーフが存在することが考えられた。

15 次に、図 2 について説明する。DP-1 (WT, . . . , Δ C364, Δ C395) を発現プラスミ
ドにより HEK 293F 細胞に強制発現させた際の DP-1 の分解度について、プロテアソー
ム阻害剤である MG132 の有無の条件下で調べた。

2.1 発現プラスミドの作製および大量調整

20 Flag タグ融合 DP-1 (WT, . . . , Δ C364, Δ C395) をほ乳動物培養細胞で発現させるた
め、pcDNA3 発現プラスミド (Invitrogen 社) に Flag タグと DP-1 をコードする cDNA を
Ligation により挿入した (図 2-A)。Flag タグ融合 DP-1 (WT, . . . , .) に関しては、
前記 1.1 に記載のものと同一ものを使用した。Flag タグ融合 DP-1 (Δ C364, Δ C395)
発現プラスミドの構築については、DP-1 欠失変異体フラグメントを以下のプライマー
25 を用いた PCR により増幅した。

FlagDP-1 (Δ C364)

Forward; 5' -TCGAATTCATGGCAAAAGATGCCGGTCTAATTGAA-3'

Reverse; 5' -AATTCTAGATCACAGCTCACTGGCAGAGAACCTTGTG-3'

DP-1 (Δ C395)

5 Forward; 5' -TCGAATTCATGGCAAAAGATGCCGGTCTAATTGAA-3'

Reverse; 5' -AATTCTAGATCACCCCGACGTAGGACACCGGAGTCTC-3'

PCR 反応

	50pmol 5' primer	1 μ l
10	50pmol 3' primer	1 μ l
	template DNA (10ng/ μ l)	1 μ l
	5 $\times$ PS Buffer	10 μ l
	dNTP	4 μ l
	H ₂ O	32.5 μ l
15	<u>PrimeStar HS DNA polymerase</u>	<u>0.5 μ l</u>
	Total	50 μ l

以上の混合液を以下のサイクルで反応させた。

	98°C	1 分
20	98°C	10 秒
	71°C	1 分
	4°C	∞

(98°C ; 10 秒、71°C ; 1 分は 28cycle 繰り返す。)

増幅した産物を制限酵素処理し、同制限酵素で処理した pcDNA3-Flag ベクターに Ligation し挿入した。挿入はミニプレップ後制限処理し確認した。また全配列が正しいことをシーケンスにより確認した。

発現プラスミドの大量調整は〔0 0 3 9〕で示した Plasmid Purification MAXI Kit

5 (QIAGEN 社)を用い発現プラスミドを精製した。

2.2 細胞培養については、前記 1.2 と同様である、

2.3 トランスフェクションについては、前記 1.3 と同様である、

2.4 MG132 の添加については、前記 1.4 と同様である、

10 2.5 Western blotting 解析については、前記 1.5 と同様である。

MG132 が不在条件において、DP-1 (・, ・)はほとんど発現が見られなかった (図 2-B パネル a, レーン 3, 5)。MG132 が不在条件において、DP-1 (・, ・)と同様に DP-1(ΔC364, ΔC395)も発現がみられなかった (図 2-B パネル a, レーン 7, 9)。また、DP-1(ΔC364, ΔC395)の分解は MG132 の添加により抑制された (図 2-B パネル a, 15 レーン 8, 10)。よって、DP-1 のプロテアソームによる分解を抑制する領域は、DP-1 の最も C 末端側の 395-410 アミノ酸 (EDDEEDDDFNENDEDD) であることが判明した。この領域はグルタミン酸 (E) とアスパラギン酸 (D) に富む酸性領域である。

次に、図 4 について説明する。DP-1 (・, ・+CTAD, ΔC364, ΔC364+CTAD) を発現 20 プラスミドにより HEK 293F 細胞に強制発現させた際の DP-1 の分解度について調べた。

3.1 発現プラスミドの作製および大量調整

Flag タグ融合 DP-1(・, ・+CTAD, ΔC364, ΔC364+CTAD)をほ乳動物培養細胞で発現させるため、pcDNA3 発現プラスミド(Invitrogen 社)に Flag タグと DP-1 をコード 25 する cDNA を Ligation により挿入した (図 3-A)。Flag タグ融合 DP-1(・)の構築については、前記 1. 1 に記載のものと同一ものを使用した。Flag タグ融合 DP-1(ΔC364)

の構築については、前記 2.1 に記載のものと同一ものを使用した。Flag タグ融合 DP-1 (・+CTAD, ΔC364+CTAD) の構築については発現プラスミドの構築については、DP-1 (・)、DP-1 (ΔC364) にそれぞれ CTAD をコードするフラグメントを Ligation した。挿入はミニプレップ後制限処理し確認した。また全配列が正しいことをシーケンスにより確認した。

発現プラスミドの大量調整は前記 1.1 で示した Plasmid Purification MAXI Kit (QIAGEN 社) を用い発現プラスミドを精製した。

3.2 細胞培養については、前記 1.2 と同様であり、

10 3.3 トランスフェクションについては、前記 1.3 と同様であり、

3.4 Western blotting 解析については、前記 1.6 同様である。

図 3 の実験は全て MG132 が不在条件において行われている。Flag-DP-1 (・) はほとんど発現が見られなかった (図 3-B パネル a, レーン 1)。また、Flag-DP-1 (・+CTAD) は十分な発現が見られた (図 3-B パネル a, レーン 2)。Flag-DP-1 (ΔC364) は弱い発現が見られた (図 3-B パネル a, レーン 3)。Flag-DP-1 (ΔC364+CTAD) は十分な発現が見られた (図 3-B パネル a, レーン 4)。よって、図 2 で決定した DP-1 のプロテアソームによる分解を抑制する領域 (DP-1 の最も C 末端側の 395-410 アミノ酸、EDDEEDDDFNENDEDD; CTAD) は DP-1 (・) 領域内に存在する DP-1 のタンパク質分解に係る領域の抑制を行うことが示された。

次に、図 4 について説明する。DP-1 (WT, ΔCTAD, ΔN102, ΔN102+CTAD, ΔN126, ΔN126+CTAD, ΔN191, ΔN191+CTAD, ・, ΔC191-410, ΔC127-410) を発現プラスミドにより HEK 293F 細胞に強制発現させた際の DP-1 の分解度について調べた。

4.1 発現プラスミドの作製および大量調整

Flag タグ融合 DP-1 (WT, Δ CTAD, Δ N102, Δ N102+ Δ CTAD, Δ N126, Δ N126+ Δ CTAD, Δ N191, Δ N191+ Δ CTAD, $\cdot$, Δ C191-410, Δ C127-410) をほ乳動物培養細胞で発現させるため、pcDNA3 発現プラスミド (Invitrogen 社) に Flag タグと DP-1 をコードする cDNA を Ligation により挿入した (図 4-A)。Flag タグ融合 DP-1 (WT, $\cdot$) の構築につ

5 いては [0039] に記載のものと同じものを使用した。Flag タグ融合 DP-1 (Δ CTAD, Δ N102, Δ N102+ Δ CTAD, Δ N126, Δ N126+ Δ CTAD, Δ N191, Δ N191+ Δ CTAD, $\cdot$, Δ C191-410, Δ C127-410) の構築については、DP-1 欠失変異体フラグメントを以下のプライマーを用いた PCR により増幅した。

10 FlagDP-1 (Δ CTAD)

Forward; 5' - TCGAATTCATGGCAAAAGATGCCGGTCTAATTGAA -3'

Reverse; 5' - AATTCTAGATCACCCCGACGTAGGACACCGGAGTCTC -3'

DP-1 (Δ N102)

Forward; 5' - AAGAATTCAAGCGCAACAGGAAAGGAGAGAAGAATG -3'

15 Reverse; 5' - AATTCTAGATCAGTCGTCCTCGTCATTCTCGTTG -3'

DP-1 (Δ N102+ Δ CTAD)

Forward; 5' - AAGAATTCAAGCGCAACAGGAAAGGAGAG AAGAATG -3'

Reverse; 5' - AATTCTAGATCACCCCGACGTAGGACACCGGAGTCTC -3'

DP-1 (Δ N126)

20 Forward; 5' - AAGAATTCCAGAGGAAAGGGACCACTTCCTACAACG -3'

Reverse; 5' - AATTCTAGATCAGTCGTCCTCGTCATTCTCGTTG -3'

DP-1 (Δ N126+ Δ CTAD)

Forward; 5' - AAGAATTCCAGAGGAAAGGGACCACTTCCTACAACG -3'

Reverse; 5' - AATTCTAGATCACCCCGACGTAGGACACCGGAGTCTC -3'

25 DP-1 (Δ N191)

Forward; 5' - AAGAATTCCGGTCTGCCCACCAACTCGGC -3'

Reverse;5' - AATTCTAGATCAGTCGTCCTCGTCATTCTCGTTG -3'

DP-1 (ΔN191+ΔCTAD)

Forward;5' - AAGAATTCCGGTCTGCCCACCAACTCGGC -3'

Reverse;5' - AATTCTAGATCACCCCGACGTAGGACACCGGAGTCTC -3'

5 DP-1 (ΔC191-410)

Forward;5' - TCGAATTCATGGCAAAAGATGCCGGTCTAATTGAA -3'

Reverse;5' - TTTCTAGATTAAATCCACTTGATCTCCTTCTTCTCCTTGGAG -3'

DP-1 (ΔC127-410)

Forward;5' - TCGAATTCATGGCAAAAGATGCCGGTCTAATTGAA -3'

10 Reverse;5' - TTTCTAGATTACACCTTCTCGCAGACCTTCATGGAGA -3'

PCR 反応

	50pmol 5' primer	1 μl
	50pmol 3' primer	1 μl
15	template DNA (10ng/μl)	1 μl
	5×PS Buffer	10 μl
	dNTP	4 μl
	H ₂ O	32.5 μl
	<u>PrimeStar HS DNA polymerase</u>	<u>0.5 μl</u>
20	Total	50 μl

以上の混合液を以下のサイクルで反応させた。

	98°C	1 分
	98°C	10 秒
25	71°C	1 分
	4°C	∞

(98℃ ; 10 秒、71℃ ; 1 分は 28cycle 繰り返す。)

増幅した産物を制限酵素処理し、同制限酵素で処理した pcDNA3-Flag ベクターに Ligation し挿入した。挿入はミニプレップ後制限処理し確認した。また全配列が正し

5 いことをシーケンスにより確認した。

発現プラスミドの大量調整は、前記 1.1 で示した Plasmid Purification MAXI Kit (QIAGEN 社)を用い発現プラスミドを精製した。

- 10 4.2 細胞培養については、前記 1.2 と、
4.3 トランスフェクションについては、前記 1.3 と、
4.4 Western blotting 解析については、前記 1.61, 1.62 と、同様に行なった。

図 4 の実験は全て MG132 がない条件において行われている。Flag-DP-1 (各種欠失
15 変異体 ; 前記 4.1 に記載)を発現させたところ、Flag-DP-1 (Δ N191, Δ N191+ Δ CTAD)
に十分な発現が見られた(図 4-B パネル a, レーン 7, 8)。また、Flag-DP-1(Δ C191-410)
はほとんど発現が見られなかったが(図 4-B パネル a, レーン 10) ;
Flag-DP-1(Δ C127-410)は発現が見られた(図 4-B パネル a, レーン 11)。よって、DP-1
のタンパク質分解を促進する領域は 128-192 アミノ酸の領域であることが示された。

20

次に、図 5 について説明する。DP-1 (CTAD)が、タンパク質分解される他分子にお
いてもタンパク質分解を阻害するように機能するかを確認するため、DP-1 (CTAD)を
細胞内で分解されやすいタンパク質である GAL4 の DNA 結合領域(DNA binding

domain ;DBD と略す場合もある)に融合し、HEK 293F 細胞に強制発現させた際の分解

25 度について、プロテアソーム阻害剤である MG132 の有無の条件下で調べた。

5.1 発現プラスミドの作製および大量調整

GAL4DBD 単体、GAL4DBD 融合 DP-1 (Stabilon ; CTAD, Degron) をほ乳動物培養細胞で発現させるため、pcDNA3 発現プラスミド (Invitrogen 社) に GAL4DBD と DP-1 をコードする cDNA を Ligation により挿入した (図 5-A)。本発現プラスミドの構築について

5 は、GAL4DBD はコードする DNA を pM プラスミド (クロンテック社) より BglIII-EcoRI で切り出し、BamHI-EcoRI で制限酵素消化した pcDNA3 に挿入した。GAL4DBD 融合 Stabilon ; CTAD は EcoRI-XbaI で前述の GAL4DBD-pcDNA3 に挿入した。GAL4DBD 融合 Degron は EcoRI-XbaI で前述の GAL4DBD-pcDNA3 に挿入した。

発現プラスミドの大量調整は、前記 1.1 で示した Plasmid Purification MAXI Kit

10 (QIAGEN 社) を用い発現プラスミドを精製した。

5.2 細胞培養については、前記 1.2 と、

5.3 トランスフェクションについては、前記 1.3 と、

5.4 MG132 の添加については、前記 1.4 と、

15 5.5 Western blotting 解析については、前記 1.61, 1.62 と、同様に行なった。

ただし、Western blotting の抗体については GAL4 検出には GAL4DBD 抗体 (Santa cruz 社; RK5C1; HRP 融合; sc-501) を使用した。

MG132 が不在条件において、GAL4DBD は極めて弱い発現が見られた (図 5-B パネル a, レーン 1)。MG132 が不在条件において、GAL4DBD+Degron は弱い発現が見られた (図 5-B パネル a, レーン 3)。MG132 が不在条件において、GAL4DBD+Stabilon(CTAD) は十分な発現が見られた (図 5-B パネル a, レーン 5)。また、GAL4DBD、GAL4DBD+Degron、GAL4DBD+Stabilon(CTAD) とともに、MG132 の添加で発現は極めて改善された (図 5-B パネル a, レーン 2, 4, 6)。よって、DP-1 の CTAD (DP-1 の C 末端側の 395-410 アミノ

20 酸; EDDEEDDDFNENDEDD) は GAL4DBD のプロテアソームによる分解を阻害した。よって、

25

DP-1 の CTAD はタンパク質分解されるタンパク質の一般的な阻害モチーフとなる可能性が高い。

次に、Stabilon を iPS 細胞誘導因子に導入した実施形態について説明する。

5 実験方法

- 10% FBS 入り D-MEM 培地で培養した HEK293 細胞に pcDNA3 ベクターに組み込んだ Flag もしくは HA タグ融合 Oct4, Sox2, Klf4 をポリフェクトによりトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後、各実験レーン 2 のディッシュにプロテアソーム阻害剤 MG132 を最終濃度 10 μ M で添加した。トランスフェクション 36 時間培養後、
- 10 PBS バッファーで細胞を洗浄後、TNE-N+バッファーでタンパク質を抽出した。抽出液を等量ずつ SDS-PAGE 電気泳動で展開した。泳動後、分離したタンパク質を PVDF メンブレンに移し、HRP 融合 Flag 抗体と β -actin 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行なった。検出の基質にはケミルミワン L (ナカライ) を用い、ハイパーフィルム (GEヘルス) に感光させ検出した。検出したバンドは ImageJ (NIH) で定量化を行った。
- 15 Stabilon を Oct4 と klf4 の N 末端に融合し、Sox2 の C 末端に融合した。結果を図 6、図 7 に示す。

結果

- HA-Oct4 (WT) は MG132 により約 1.7 倍安定化したが、Stabilon タグ融合により約 2.2
- 20 倍安定化した。Flag-Oct4 (偽遺伝子) は MG132 により約 10 倍安定化したが、Stabilon タグ融合により約 2.7 倍安定化した。Flag-Sox2 は MG132 により約 2.3 倍安定化したが、Stabilon タグ融合により約 15 倍安定化した。Flag-Klf4 は MG132 により約 3 倍安定化したが、Stabilon タグ融合により約 2.7 倍安定化した。以上の結果から、Stabilon タグは MG132 と同等もしくはそれ以上の分解耐性能を持つと考えられた。し
- 25 たがって、Stabilon を piPS 細胞誘導因子に融合することによって、piPS 細胞を 1 週間程度で作成できる可能性がある。

次に、Stabilon の配列と細胞内でのタンパク質安定化の関係について検討した。

実験方法

10% FBS 入り D-MEM 培地で培養した HEK293 細胞に pcDNA3 ベクターに組み込んだ Flag
5 もしくは HA タグ融合 Oct4, Sox2, Klf4 をポリフェクトによりトランスフェクションし
た。トランスフェクション 24 時間後、各実験レーン 2 のディッシュにプロテアソーム
阻害剤 MG132 を最終濃度 10 μ M で添加した。トランスフェクション 36 時間培養後、
PBS バッファーで細胞を洗浄後、TNE-N+バッファーでタンパク質を抽出した。抽出液
10 を等量ずつ SDS-PAGE 電気泳動で展開した。泳動後、分離したタンパク質を PVDF メン
ブレンに移し、HRP 融合 Flag 抗体と β -actin 抗体を用いたウェスタンブロット解析
を行なった。検出の基質にはケミルミワン L (ナカライ) を用い、ハイパーフィルム
(GEヘルス)に感光させ検出した。検出したバンドは ImageJ (NIH) で定量化を行った。
結果を図 8 に示す。

15 結果

HA-Oct4 (WT) は MG132 により約 1.7 倍安定化したが、Stabilon タグ融合により約 2.2
倍安定化した。Flag-Oct4 (偽遺伝子) は MG132 により約 10 倍安定化したが、Stabilon
タグ融合により約 2.7 倍安定化した。Flag-Sox2 は MG132 により約 2.3 倍安定化し
たが、Stabilon タグ融合により約 15 倍安定化した。Flag-Klf4 は MG132 により約 3 倍
20 安定化したが、Stabilon タグ融合により約 2.7 倍安定化した。以上の結果から、
Stabilon タグは MG132 と同等もしくはそれ以上の分解耐性能を持つと考えられる。

請求の範囲

1. 酸性アミノ酸から主としてなる配列を有するタンパク質分解阻害モチーフ。

2. DP-1 タンパク質の C 末端側の酸性アミノ酸領域の全部又は一部のアミノ酸配列
5 からなるか、又はこれを含む、請求項 1 記載のタンパク質分解阻害モチーフ。

3. 前記 DP-1 タンパク質の C 末端側 395～410 のアミノ酸領域から成るタンパク質
請求項 2 分解阻害モチーフ。

10 4. 前記アミノ酸領域が下記アミノ酸配列からなる、請求項 3 記載のタンパク質分
解阻害モチーフ。

EDDEEDDDFNENDEDD

E: グルタミン酸

D: アスパラギン酸

15 N: アスパラギン

F: フェニルアラニン

5. 下記アミノ酸配列からなる、請求項 2 記載のタンパク質分解阻害モチーフ。

EDDEE

20 E: グルタミン酸

D: アスパラギン酸

6. 前記酸性アミノ酸がグルタミン酸またはアスパラギン酸から主として成る、請
求項 1 記載のプロテアソームによるタンパク質分解阻害モチーフ。

7. 請求項1～6の何れか1項に記載のモチーフが任意のタンパク質のN末端、C末端、そして、その途中の少なくともいずれかに融合され、タンパク質分解耐性を得た融合タンパク質。

5 8. 前記タンパク質が体細胞を誘導多能性幹細胞（iPS細胞）に誘導するための誘導因子である、請求項7記載の融合タンパク質。

9. Sox2のC末端に請求項1～6のいずれか1項記載のモチーフが融合されたアミノ酸配列、Oct4のN末端に請求項1～6のいずれか1項記載のモチーフが融合された

10 アミノ酸配列、及び、Klf4のN末端に請求項1～6のいずれか1項記載のモチーフが融合されたアミノ酸配列の少なくとも何れかである請求項6記載の融合タンパク質。

10. 請求項1～6のいずれか1項に記載のタンパク質分解阻害モチーフのアミノ酸配列をコードする核酸。

15

11. 請求項10に記載の核酸を有する発現ベクター。

12. 請求項11に記載の発現ベクターを含む形質転換体。

20 13. 請求項7～9のいずれか1項に記載の融合タンパク質を含む医薬組成物。

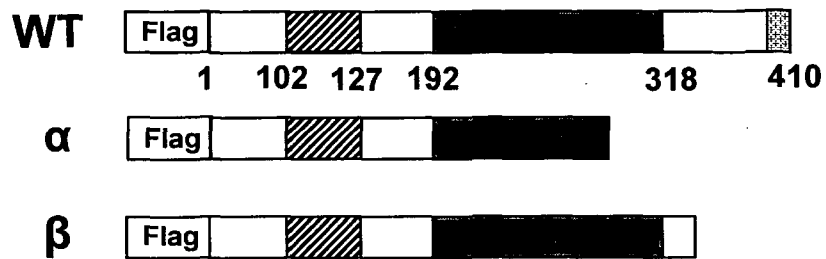
14. 細胞膜透過性タグがさらに融合された前記請求項7～9の何れか1項に記載の細胞膜透過性タンパク質。

25 15. 請求項7～9の何れか1項記載の融合タンパク質、又は、請求項14記載の細胞膜透過性タンパク質を含む抗体タンパク質。

16. 請求項7～9の何れか1項記載の融合タンパク質、又は、請求項14記載の細胞膜透過性タンパク質より短いペプチド。

図 1

(A)



(B)

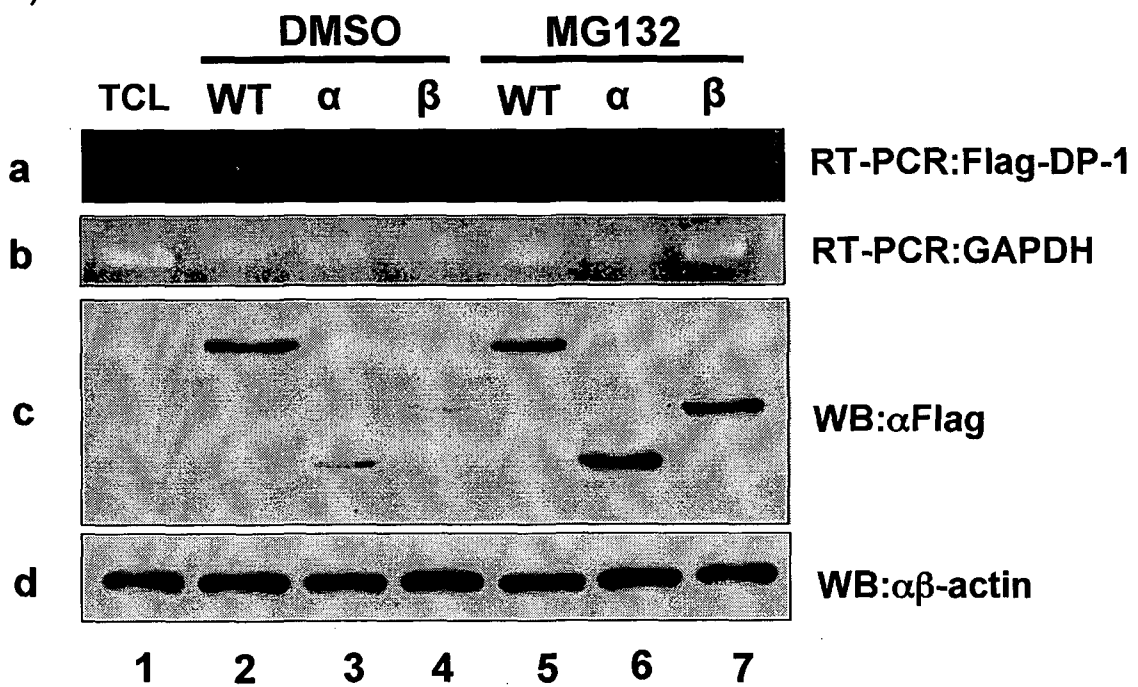
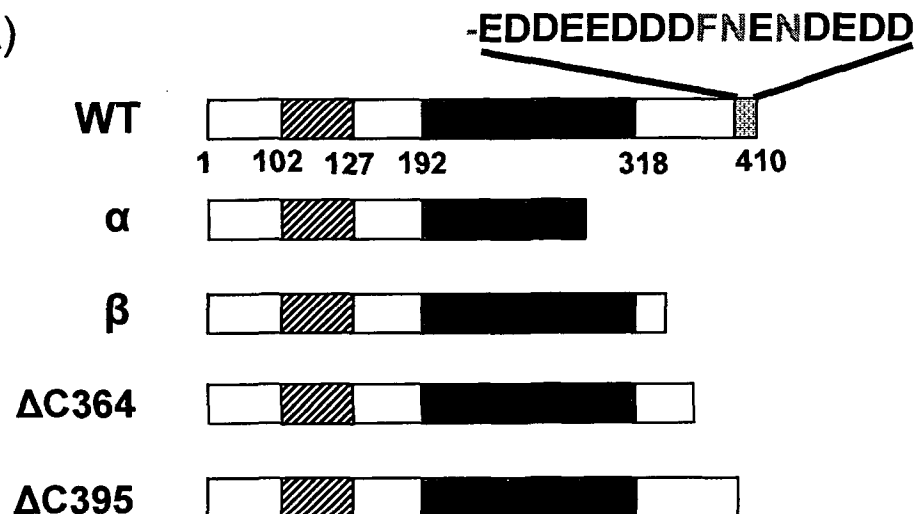


図 2

(A)



(B)

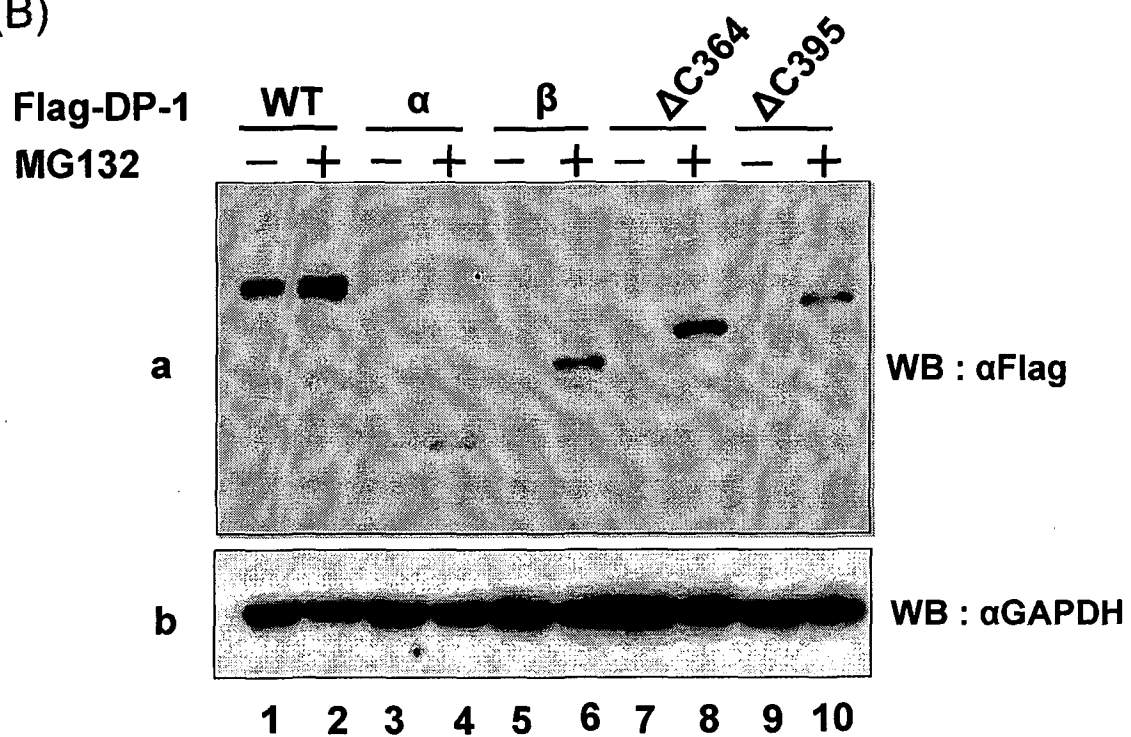
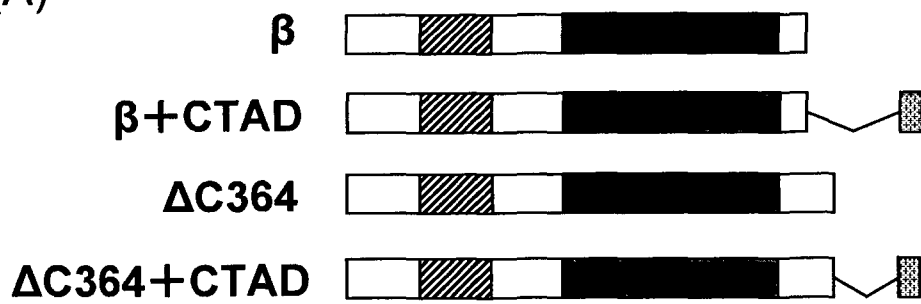


図 3

(A)



(B)

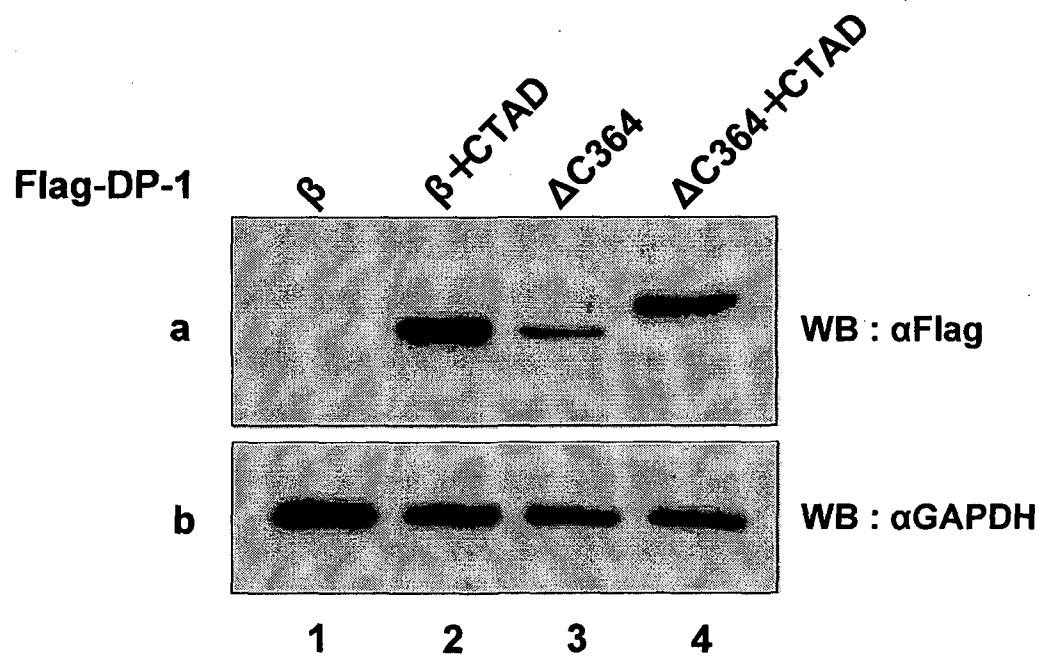


図 4

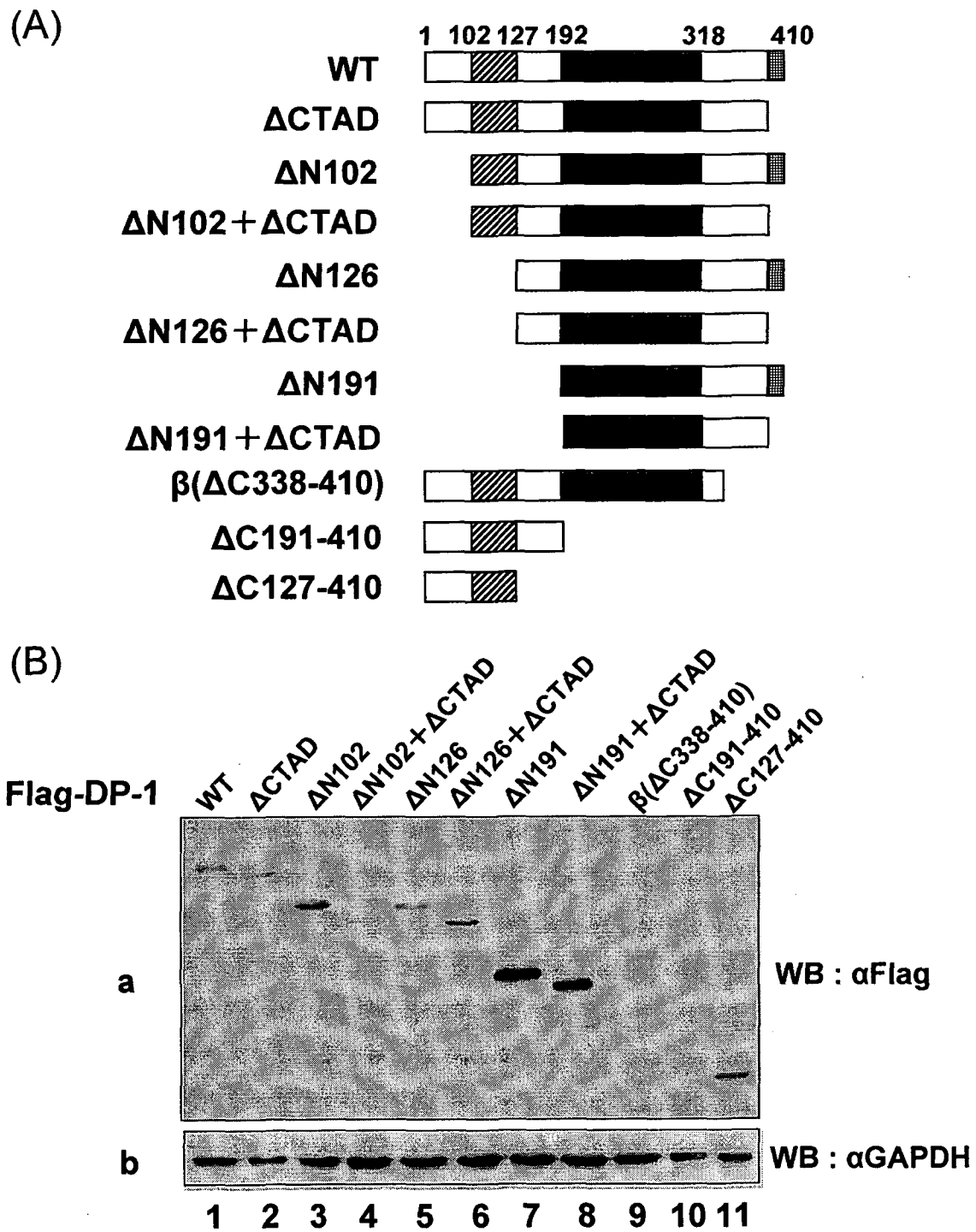
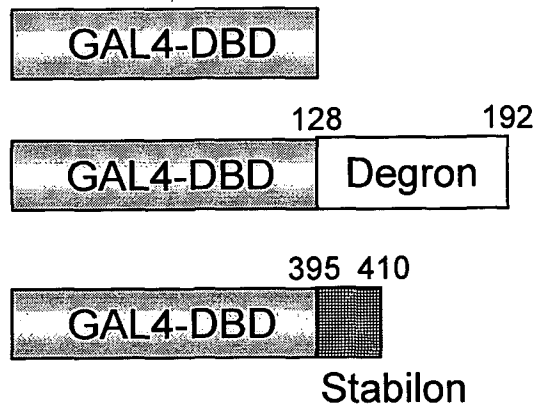


図 5

(A)



(B)

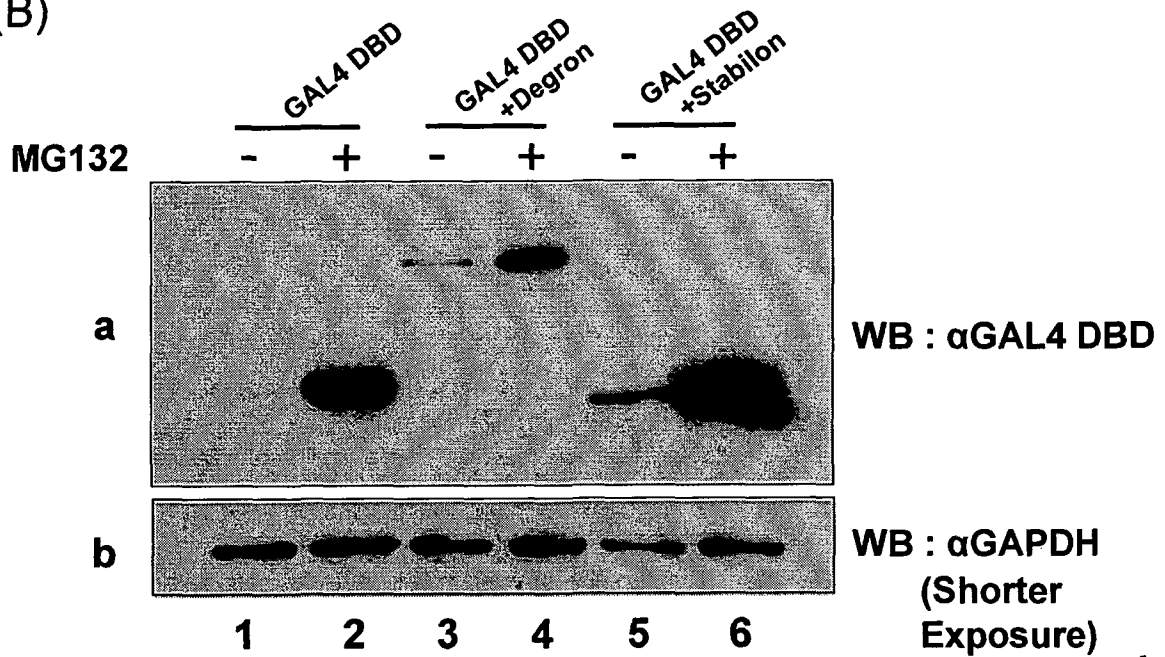


図 6

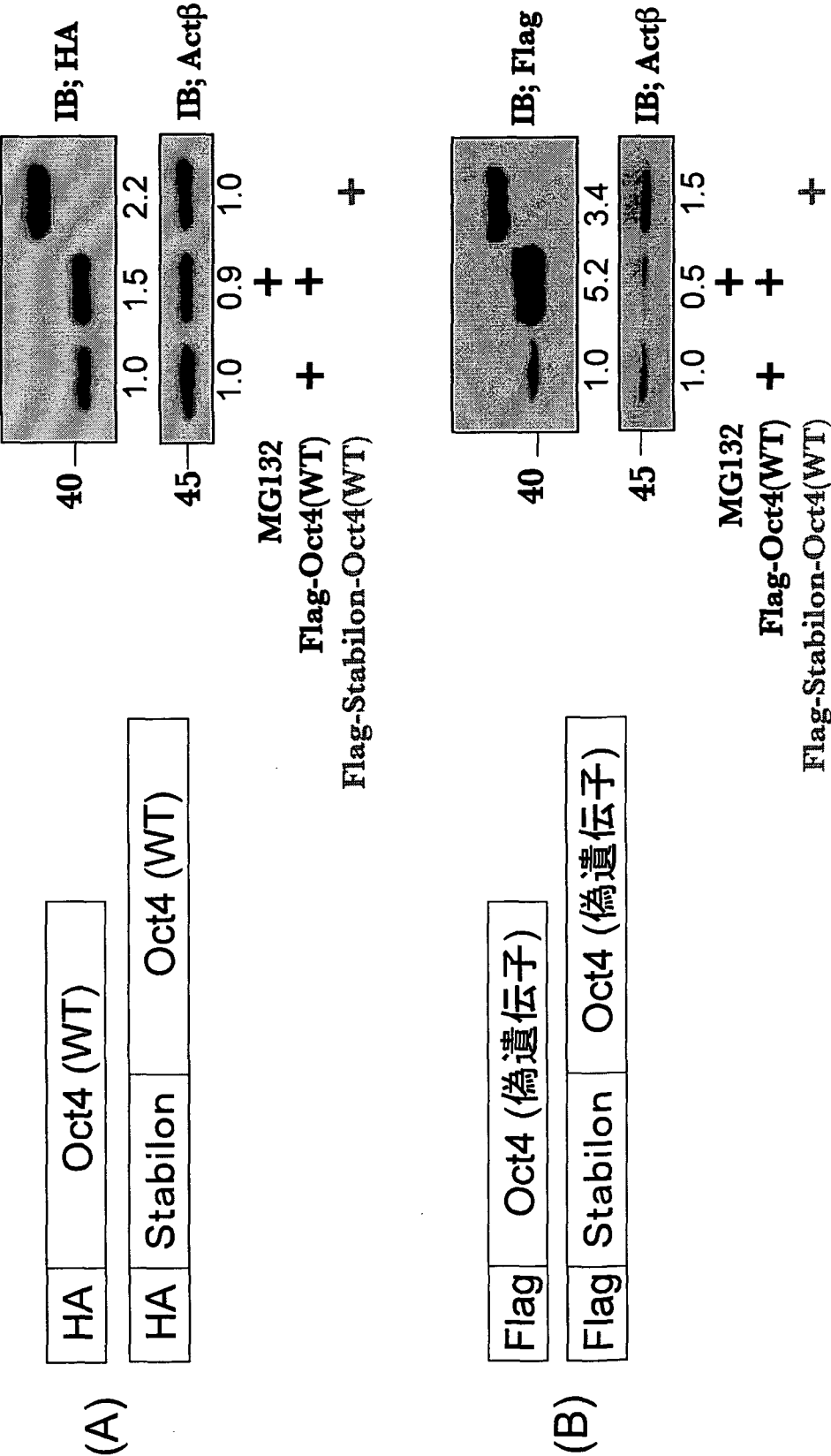


図 7

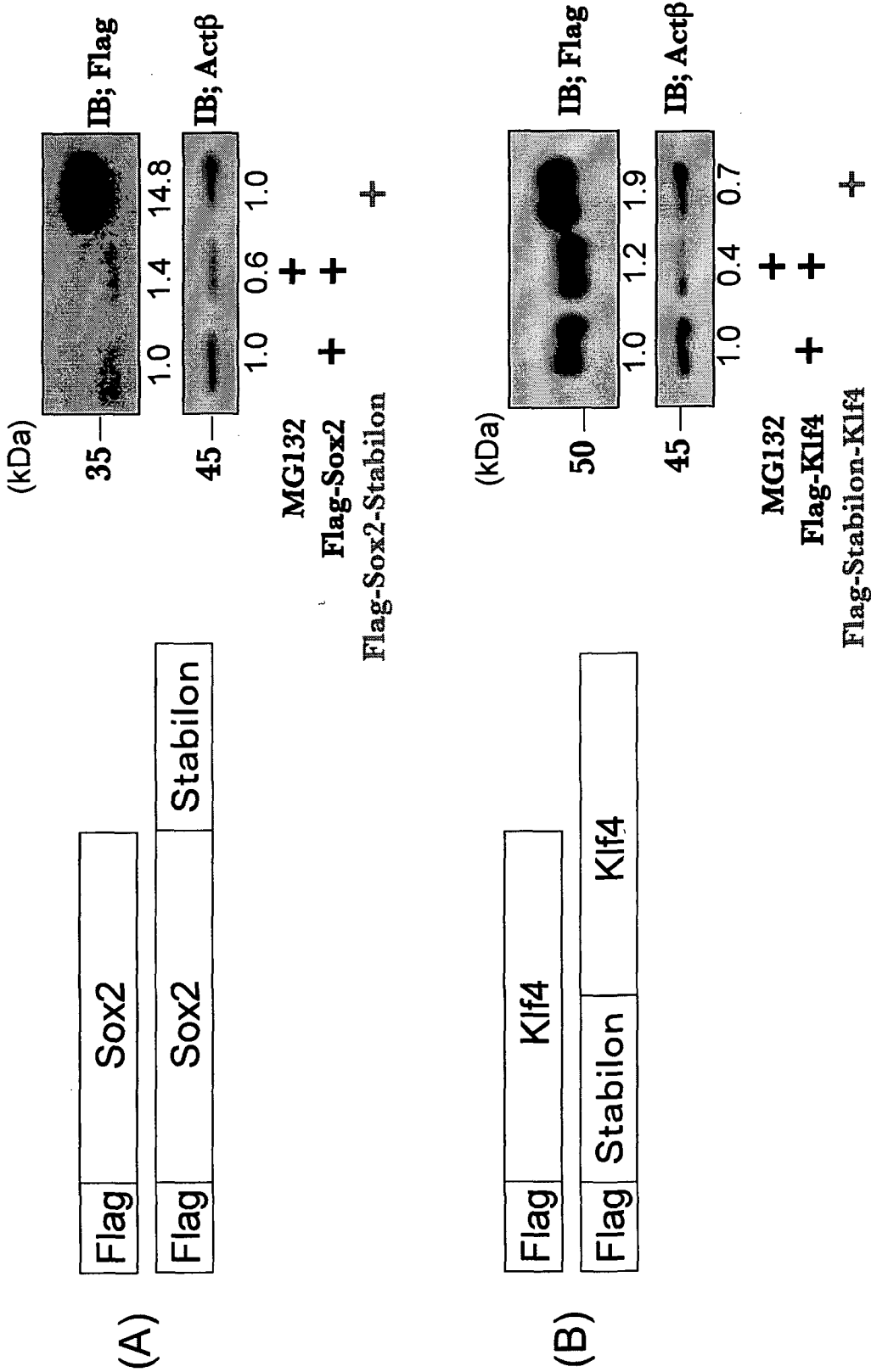
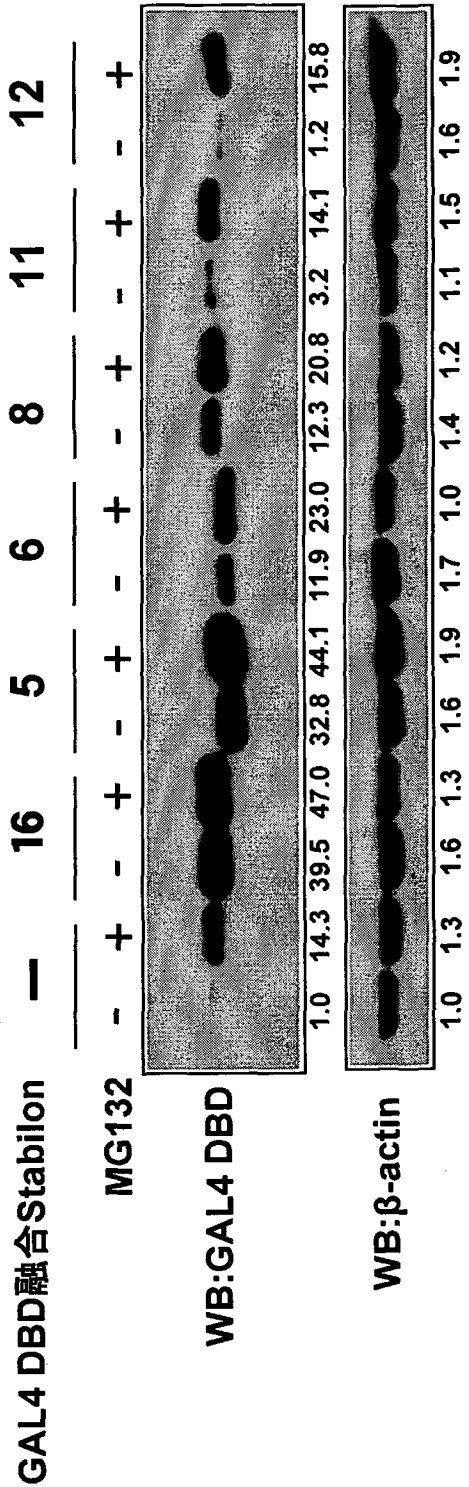


図 8

GAL4 DBD融合		Stabilonの配列	安定化度(GAL4DBD/actin) (MG132-時の比較)
—	GAL4 DBD		1.0
16-Stabilon	GAL4 DBD	EDDEEDDDFNEDDED	24.7
5-Stabilon	GAL4 DBD	EDDEE	20.5
6-Stabilon	GAL4 DBD	EDDEED	7.0
8-Stabilon	GAL4 DBD	EDDEEDDD	8.8
11-Stabilon	GAL4 DBD	EDDEEDDDFNE	2.9
12-Stabilon	GAL4 DBD	EDDEEDDDFNEN	0.8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/070081

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C07K7/08, C07K19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed, JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAMIYA Y. et al., "Mechanisms of autoproteolysis of cell-cycle regulatory transcription factor DP-1 through proteasome.", journal of japanese biochemical Society, 2008, abstract CD, Page.4P-0404	1-6, 10-12
X	ARAKAWA T. et al., "Saibo Shuki Chosetsusei Tensha Inshi DP-1 no Proteasome o Kaisuru Bunkai Kiko; sono Bunkai Seigyo Ryoiki Stabilon Oyobi Degron no Dotei", Nippon Nogei Kagakukai Taikai Koen Yoshishu, vol.2009, 05 March 2009 (05.03.2009), page 301, 3P1086B	1-6, 10-12
X	WO 2008/083678 A2 (TROJANON GMBH & CO. KG.), 17 July 2008 (17.07.2008), claim 10 (Family: none)	5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 January, 2010 (04.01.10)Date of mailing of the international search report
19 January, 2010 (19.01.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/070081

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/042010 A2 (GORNE H.), 19 April 2007 (19.04.2007), claim 7 & JP 2009-514800 A & EP 1986634 A2	5
A	YEN H-C. S. et al., Global Protein Stability Profiling in Mammalian Cells., Science, 2008, Vol.322, No.5903, Page.918-923	1-16
A	WO 01/021644 A2 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONE SCIENTIFICAS), 29 March 2001 (29.03.2001), entire text & JP 2003-510040 A & EP 1214436 A2	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/070081

1. With regard to the term "a proteolysis-inhibiting motif comprising a sequence mainly composed of acidic amino acid residues" as claimed in claim 1, it is unclear as to what compounds having what amino acid sequences are included within the scope of the term, even though the common technical knowledge at the time of filing the present application is taken into consideration. Therefore, claim 1 does not comply with the requirement of clarity under PCT Article 6.

Similar comments apply to claims 2 and 6.

2. With regard to the invention of claim 16 "a fusion protein as claimed in any one of claims 7-9 or a peptide shorter than a cell-membrane-permeable protein as claimed in claim 14", the scope of the invention is unclear. Therefore, claim 1 does not comply with the requirement of clarity under PCT Article 6.

3. Such being the case, the inventions relating to the proteins which are particularly disclosed in the description and are specified in claims 3-5 were searched.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C07K7/08, C07K19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 9 年

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

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed, JSTPlus (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	KAMIYA Y. et al., Mechanisms of autoproteolysis of cell-cycle regulatory transcription factor DP-1 through proteasome., 生化学, 2008, 抄録 CD, Page. 4P-0404	1-6, 10-12
X	ARAKAWA T. et al., 細胞周期調節性転写因子 DP-1 のプロテアソームを介する分解機構; その分解制御領域 Stablon 及び Degron の同定, 日本農芸化学会大会講演要旨集, Vol. 2009, 2009. 03. 05, p. 301, 3P1086B	1-6, 10-12

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 4 . 0 1 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

1 9 . 0 1 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4 B

9 1 5 2

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2008/083678 A2 (TROJANON GMBH & CO. KG) 2008.07.17, 請求項 1 0 (ファミリーなし)	5
X	WO 2007/042010 A2 (GORNE H.) 2007.04.19, 請求項 7 & JP 2009-514800 A & EP 1986634 A2	5
A	YEN H-C. S. et al., Global Protein Stability Profiling in Mammalian Cells., Science, 2008, Vol.322, No.5903, Page.918-923	1-16
A	WO 01/021644 A2 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 2001.03.29, 全文 & JP 2003-510040 A & EP 1214436 A2	1-16

1. 請求項1の「酸性アミノ酸から主としてなる配列を有するタンパク質分解阻害モチーフ。」は、出願時の技術常識を考慮しても、どのようなアミノ酸配列からなる化合物を包含するのか不明であり、PCT6条における明確性の要件を欠いている。

請求項2、6も同様である。

2. 請求項16の「請求項7～9の何れか1項記載の融合タンパク質、又は、請求項14記載の細胞膜透過性タンパク質より短いペプチド。」は、発明の範囲が不明確であり、PCT6条における明確性の要件を欠いている。

3. よって、調査は、明細書に具体的に記載され、請求項3－5に特定されているタンパク質に関連する発明について行った。