(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3871339号

(P3871339)

(45)発行日　平成19年1月24日(2007.1.24)　(24)登録日　平成18年10月27日(2006.10.27)

(51)Int.Cl.		F I		
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	

請求項の数 42　(全 64 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7-503082
(86)(22)出願日　平成6年6月22日(1994.6.22)
(65)公表番号　特表平9-502603
(43)公表日　平成9年3月18日(1997.3.18)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/007089
(87)国際公開番号　WO1995/000642
(87)国際公開日　平成7年1月5日(1995.1.5)
審査請求日　平成11年12月28日(1999.12.28)
(31)優先権主張番号　08/081,448
(32)優先日　平成5年6月22日(1993.6.22)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　594184953
アーチ　ディベロップメント　コーポレイション
アメリカ合衆国　イリノイ　６０６３７，シカゴ，　エス　ウッドローン　５５５５，　スイート　３００

最終頁に続く

(54)【発明の名称】脊椎動物アポトーシス遺伝子：組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

$BCL\text{-}X_L$(配列番号７)または$BCL\text{-}X_S$(配列番号９)をコードする、単離されおよび精製されたポリヌクレオチド。

【請求項２】

前記ポリヌクレオチドがDNA分子である、請求項１に記載の単離されおよび精製されたポリヌクレオチド。

【請求項３】

前記ポリヌクレオチドが配列番号６または８の塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項１に記載の単離されおよび精製されたポリヌクレオチド。

【請求項４】

配列番号１、３、６、または配列番号８の少なくとも２０個の連続する塩基のセグメントと同一または相補的である塩基配列を含む、単離されおよび精製されたポリヌクレオチド。

【請求項５】

プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、単離されおよび精製されたポリペプチドであって、$BCL\text{-}X_L$(配列番号７)または$BCL\text{-}X_S$(配列番号９)である、ポリペプチド。

【請求項６】

$BCL\text{-}X_L$(配列番号７)または$BCL\text{-}X_S$(配列番号９)をコードするポリヌクレオチドを含む発現

ベクター。
【請求項７】
前記ポリヌクレオチドがエンハンサー-プロモーターに作動可能に連結している、請求項６に記載の発現ベクター。
【請求項８】
$BCL\text{-}X_L$(配列番号７)または$BCL\text{-}X_S$(配列番号９)をコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトされた組換え宿主細胞。
【請求項９】
前記ポリヌクレオチドが、前記組換え宿主細胞中で機能的な調節シグナルの転写制御下にあり、該調節シグナルが、すべての必要な転写および転写後改変が可能な様式で前記ポリペプチドの発現を適切に制御する、請求項８に記載の組換え宿主細胞。
【請求項１０】
$BCL\text{-}X_L$(配列番号７)または$BCL\text{-}X_S$(配列番号９)を調製する方法であって：
(a)該$BCL\text{-}X_L$または$BCL\text{-}X_S$をコードするポリヌクレオチドで細胞をトランスフェクトし、形質転換宿主細胞を生成する工程；および
(b)該形質転換宿主細胞を、該ポリペプチドの発現に十分な生物学的条件下に維持する工程
を包含する、方法。
【請求項１１】
$BCL\text{-}X_L$(配列番号７)または$BCL\text{-}X_S$(配列番号９)と免疫反応性の抗体。
【請求項１２】
プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害するポリペプチドを検出する方法であって、該方法は該ポリペプチドを請求項１１に記載の抗体と免疫反応させ、抗体-ポリペプチド結合体を形成する工程および該結合体を検出する工程を包含する、方法。
【請求項１３】
前記ポリペプチドが、$BCL\text{-}X_L$(配列番号７)または$BCL\text{-}X_S$(配列番号９)である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
$BCL\text{-}X_L$(配列番号７)または$BCL\text{-}X_S$(配列番号９)をコードするメッセンジャーRNA転写物を検出する方法であって、該メッセンジャーRNA転写物を、請求項４に記載のポリヌクレオチドとハイブリダイズして二重鎖を形成する工程、および該二重鎖を検出する工程を包含する、方法。
【請求項１５】
プログラムされた細胞死を改変する能力について物質をスクリーニングする方法であって、該方法は以下の工程：
(a) $BCL\text{-}X_L$(配列番号７)または$BCL\text{-}X_S$(配列番号９)を有する細胞を提供する工程；
(b)該物質のプログラムされた細胞死を改変する能力を試験する工程、を包含する方法。
【請求項１６】
前記提供する工程が、宿主細胞を形質転換して形質転換細胞を形成し、そして該形質転換細胞を、$BCL\text{-}X_L$(配列番号７)または$BCL\text{-}X_S$(配列番号９)の発現に十分な生物学的条件下に維持することである、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
細胞においてプログラムされた細胞死を改変する方法であって、
(a)該細胞に、$BCL\text{-}X_L$(配列番号７)または$BCL\text{-}X_S$(配列番号９)をコードするポリヌクレオチドを含むDNA分子の有効量を導入する工程；および
(b)該細胞を、$BCL\text{-}X_L$(配列番号７)または$BCL\text{-}X_S$(配列番号９)の発現に十分な条件下に維持する工程
を包含し、ここで、該細胞は、ヒト身体に存在する細胞ではない、方法。
【請求項１８】
前記導入する工程が前記細胞にDNA分子を注入することである、請求項１７に記載の方法

。
【請求項１９】
前記導入が、前記DNA分子を、前記細胞が位置する非ヒト被験体の循環系中に投与することである、請求項１７に記載の方法。
【請求項２０】
前記投与が以下の工程：
(a)前記DNA分子を含むビヒクルを提供する工程；および
(b)該ビヒクルを被験体に投与する工程
を包含する、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記ビヒクルが、前記DNA分子で形質転換またはトランスフェクトされたビヒクル細胞、またはそのような形質転換またはトランスフェクトされた細胞由来のトランスフェクトされた細胞である、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記ビヒクルが、前記細胞に特異的に感染するかまたは細胞の抗原と特異的に免疫反応するウイルスまたは抗体である、請求項２０に記載の方法。
【請求項２３】
前記ウイルスがレトロウイルスである、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記レトロウイルスが、該ウイルスが非感染性であるように改変された、ワクチニアウイルス、ピコルナウイルス、コロナウイルス、トガウイルス、またはラブドウイルスである、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記細胞が神経細胞である、請求項１７に記載の方法。
【請求項２６】
前記細胞がリンパ球である、請求項１７に記載の方法。
【請求項２７】
前記リンパ球がCD4細胞である、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
プログラムされた細胞死を行っているまたは行いそうな細胞中に、プログラムされた細胞死を行っているまたは行いそうな神経細胞が位置している非ヒト被験体の中枢神経系の領域中に、いくつかの効果を生む神経細胞株の細胞を移植する工程を包含する方法により、ベクターを導入する工程をさらに包含する、請求項２５に記載の方法。
【請求項２９】
細胞死を行っているまたは行いそうな神経細胞の末梢神経末端の部位で、ベクターを注入することにより非ヒト動物の神経細胞中に該ベクターを導入する工程をさらに含む、請求項２５に記載の方法。
【請求項３０】
前記ベクターを神経細胞とともにインキュベーションすることにより細胞死を行いそうなまたは行っている培養中の神経細胞中に、該ベクターを導入する工程をさらに含む、請求項２５に記載の方法。
【請求項３１】
インビトロまたは非ヒト被験体における神経細胞においてプログラムされた細胞死を予防または処置する方法であって：
(a)BCL-X_L(配列番号７)またはBCL-X_S(配列番号９)を調製する工程；
(b)BCL-X_L(配列番号７)またはBCL-X_S(配列番号９)を生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせ、薬学的組成物を形成する工程；および
(c)該組成物をプログラムされた細胞死を行いそうなまたは行っているニューロンに投与する工程
を包含する、方法。

【請求項３２】
非ヒト被験体の遺伝子治療のために、BCL-X_L(配列番号７)またはBCL-X_S(配列番号９)をコードする遺伝子を送達する方法であって：
(a)請求項６に記載のベクターを提供する工程；
(b)該ベクターを生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせて薬学的組成物を形成する工程；および
(c)該薬学的組成物を、該ベクターが目的の細胞標的に到達するように投与する工程を包含する、方法。
【請求項３３】
前記薬学的組成物が前記細胞標的の部位で非ヒト動物中への注入により導入される、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記細胞標的が中枢神経系にあり、そして該細胞標的の部位に位置するニューロンから生じる末梢神経末端の部位で前記薬学的組成物が非ヒト動物中に注入により導入される、請求項３２に記載の方法。
【請求項３５】
非ヒト動物における腫瘍形成性の疾患を処置する方法であって；
(a)請求項６に記載の発現ベクターを提供する工程；
(b)該ベクターを、生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせて薬学的組成物を形成する工程；および
(c)腫瘍細胞標的に該組成物を投与する工程
を包含する、方法。
【請求項３６】
インビトロまたは非ヒト動物におけるリンパ球においてプログラムされた細胞死を防ぐまたは処置する工程であって：
(a)BCL-X_L(配列番号７)またはBCL-X_S(配列番号９)を調製する工程：
(b)BCL-X_L(配列番号７)またはBCL-X_S(配列番号９)を生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせ、薬学的組成物を形成する工程；および
(c)該組成物をプログラムされた細胞死を行いそうなまたは行っているリンパ球に投与する工程
を包含する、方法。
【請求項３７】
プログラムされた細胞死を改変する方法における使用のための、請求項１～３のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
【請求項３８】
神経細胞においてプログラムされた細胞死を防ぐまたは処置する方法における使用のための、請求項５に記載のポリペプチド。
【請求項３９】
遺伝子治療のための遺伝子を送達する方法における使用のための、請求項５に記載のポリペプチドをコードする遺伝子。
【請求項４０】
腫瘍形成性疾患を処置する方法における使用のための、請求項６または７に記載の発現ベクター。
【請求項４１】
リンパ球におけるプログラムされた細胞死を防ぐまたは処置する方法における使用のための、請求項５に記載のポリペプチド。
【請求項４２】
配列番号１の塩基配列を含む、単離されおよび精製されたポリヌクレオチド。
【発明の詳細な説明】
発明の技術分野

本発明は、一般に、プログラムされ脊椎動物の細胞死(アポトーシス)を改変または調節するための組成物および方法に関する。より特定すれば、本発明は、アポトーシスを促進または阻害するポリペプチドをコードするDNA配列、これらの配列を有する組換えベクター、上記配列またはベクターのいずれかを含む組換え宿主細胞、およびポリペプチドに関する。本発明はまた、単離された、組換えポリペプチドを、アポトーシスに影響する候補物質を選択および改良するために設計されたアッセイで使用するための方法、ならびに診断、薬物設計および治療用途で使用するためのポリペプチドおよびポリヌクレオチドを含む。

発明の背景

多細胞真核生物における細胞数の制御は、細胞増殖と細胞死のバランスを意味する。最近数年間で細胞増殖の調節について、多くのことが知られているが、細胞死の制御については相対的にほとんど知られていない(Ellisら、1991；Raff、1992)。最近、プログラムされた細胞死を調節するメカニズムに注意が集中し始めている(アポトーシス)(Williams、1991)。アポトーシスは、複雑な真核生物において発育および自己維持の間に多くの細胞が死滅する活性なプロセスである(Kerrら、1972)。アポトーシスによる細胞死は、外因性または内因性シグナルのいずれかの結果として、細胞が、内部にコードされた自殺プログラムを活性化するときに起こる。アポトーシスの細胞死は、細胞質膜小気胞化(blebbing)、細胞容積損失、核凝縮(condensation)、およびヌクレオソーム間隔でDNAのエンドヌクレオリティクな分解により特徴付けられる(Wyllieら、1980)。

プログラムされた細胞死が役割を演じる２つの最も良く研究された脊椎動物系は、神経およびリンパ球発達である。胸腺におけるＴ細胞発達の間に、各個々のＴ細胞前駆体は、独特のＴ細胞抗原レセプター(TCR)を、TCR遺伝子セグメントの連結的な再配置により生成し、そして細胞は次に一連の選択プロセスを行う(Blackmanら、1990；Rothenberg、1992)。Ｔ細胞が発現する自己反応性TCRは、ネガティブ選択の結果としてアポトーシスにより欠失される(Murphyら、1990)。他の細胞は、自己がコードする、胸腺間質細胞(thymic stromal cell)上で発現される主要組織適合性複合体(MHC)分子との相互作用によりポジティブ選択を行い、プロセスがプログラムされた細胞死を防ぎ、そして成熟Ｔ細胞レパートリーの次のMHC制限を生じる。別のセットの胸腺細胞が、無視、ネガティブまたはポジティブ選択いずれかの不在の結果として死滅する。範囲の広い細胞死がまた、神経系の発達において生じる(Cowanら、1984；Davies、1987；Oppenheim、1991)。発達の間のニューロン(neuron)の初期増殖に次いで、シナプス相互作用の確立の結果として、神経構造の有意な再成形が起こる。この再形成期間の間、ニューロンの生存は、それらの神経栄養性成長因子の供給により決定される。成長因子欠損となる細胞がアポトーシスにより死滅する。一旦シナプス連結が確立されると、生存ニューロンは、延長した寿命で有糸分裂後の細胞に発育する。このように、プログラムされた細胞死は、リンパ球発達において自己反応性Ｔ細胞を除去することにより、および神経系内で有効なシナプスネットワークの確立を促進することにより必須の役割を果たす。

これらの発達プロセスに対するプログラムされた細胞死の重要性のため、アポトーシスを調節し得る遺伝子にかなりの興味がもたれている。脊椎動物におけるアポトーシス細胞死の調節の理解において最も重要な進歩の１つは、腫瘍遺伝子bcl-2の研究から得られた。bcl-2は、当初、多くのヒトＢ細胞リンパ腫に存在するt(14;18)転座のブレークポイントからクローン化された(Clearyら、1986；Tsujimotoら、1986)。この転座は、免疫グロブリン重鎖遺伝子の遺伝子座とのその並置の結果としてbcl-2遺伝子の脱調節発現を生じる(Bakhshiら、1985)。インビトロで、BCL-2(bcl-2の遺伝子産物；配列番号５)は、成長因子を剥奪した培養細胞においてアポトーシス細胞死を防ぐことが示されている(Vauxら、1988；Hockenberyら、1990；Nunezら、1990；Borzilloら、1992；Garciaら、1992)。しかし、BCL-2は、サイトカイン遮断またはレセプター介在シグナリングにより誘導されるすべての細胞においてアポトーシスをブロックし得ない。例えば、BCL-2は、特定のインターロイキン(IL)IL-3、IL-4、またはGM-CSF依存性の造血細胞株においてアポトーシスを防ぐが、IL-2またはIL-6遮断後他の細胞株のアポトーシスを防がない(Nunezら、1990)。BCL-2の

過剰発現はまた、いくつかのＢ細胞株において抗原レセプター誘導アポトーシスを防がない(Cuendeら、1993)。インビボで、BCL-2は、すべてではないが、リンパ球系発達(Sentmanら、1991；Strasserら、1991a；Strasserら、1991b；Seigalら、1992)、および神経発達(Allsopら、1993)の間で起こる多くのアポトーシス細胞死の形態を防ぐ。bcl-2導入遺伝子の発現は、胸腺細胞における照射-およびカルシウムイオノホア誘導アポトーシス細胞死を防ぎ得るが、ネガティブ選択のプロセスを阻害しない(Sentmanら、1991；Strasserら、1991a)。同様に、bcl-2の過剰発現は、神経成長因子に依存するニューロンにおけるアポトーシスを防ぎ得るが、毛様体神経栄養因子(ciliary neurotrophic factor)に依存するニューロンにおけるアポトーシスは防がない。(Allsopら、1993)。これらの結果は、複数の独立のアポトーシスの細胞内メカニズムが存在し、それらのいくつかがBCL-2およびこの遺伝子により影響されないその他により防ぎ得ることを示唆する。あるいは、これらの別の経路は、BCL-2機能を別に調節するタンパク質を含み得る。

発明の簡単な要旨

１つの局面において、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害するBCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドをコードする単離されそして精製されたポリヌクレオチドを提供する。好適な実施態様において、本発明のポリヌクレオチドは、脊椎動物種由来のDNA分子である。好適な脊椎動物は哺乳類である。好適な哺乳動物はヒトである。より好適には、本発明のポリヌクレオチドは、BCL-X_L(配列番号７)、BCL-X_S(配列番号９)、およびBCL-X_1(配列番号４)と称されるポリペプチドをコードする。さらに好適には、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号２(図１)、または配列番号４、７、および９(図４Ａ-４Ｃ)のアミノ酸残基配列を含むポリペプチドをコードする。最も好適には、本発明の単離されそして精製されたポリヌクレオチドは、配列番号１および３(図１Ａ)；配列番号６(図４Ａ)；配列番号８(図４Ｂ)のヌクレオチド塩基配列または他の脊椎動物種由来のそれらの相同体を含む。

本発明のなお別の局面は、配列番号１および３(図１Ａ)の少なくとも10個の連続する塩基のセグメントと同一または相補的な塩基配列を含む単離されそして精製されたポリヌクレオチドを意図する。ここでこのポリヌクレオチドは、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2以外のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする。好適には、この単離されそして精製されたポリヌクレオチドは、配列番号１および３(図１Ａ)の少なくとも25個～70個の連続する塩基のセグメントに同一または相補的である塩基配列を含む。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、開示されたヌクレオチド配列の40個または55個の連続する塩基に同一または相補的である塩基のセグメントを含み得る。

別の実施態様において、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外の単離されそして精製されたポリペプチドを意図する。好適には、本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチドである。より好適には、本発明のポリペプチドは、BCL-X_L(配列番号７)、BCL-X_S(配列番号９)、およびBCL-X_1(配列番号４)である。さらにより好適には、本発明のポリペプチドは、配列番号２(図１Ａ)または図４Ａ-４Ｃ(配列番号４、７、および９)のアミノ酸残基配列を含む。

別の実施態様では、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。好適には、本発明の発現ベクターは、BCL-X_L(配列番号６)、BCL-X_S(配列番号９)、およびBCL-X_1(配列番号６の510-698位)をコードするポリヌクレオチドを含む。より好適には、本発明の発現ベクターは、配列番号２(図１Ａ)または配列番号４、７、および９(図４Ａ-４Ｃ)のアミノ酸残基配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。より好適には、本発明の発現ベクターは、配列番号１および３(図１Ａ)、または配列番号６および８(図４Ａ-４Ｃ)のヌクレオチド塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む。さらにより好適には、本発明の発現ベクターは、エンハンサー-プロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチドを含む。なおさらにより好適には、本発明の発現ベクターは、原核生物プロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチドを含む。あるい

は、本発明の発現ベクターは、真核生物プロモーターであるエンハンサー-プロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチドを含み、そしてこの発現ベクターはさらに、カルボキシ末端アミノ酸の3'に位置し、そしてコードされるポリペプチドの転写単位内にあるポリアデニル化シグナルを含む。

なお別の実施態様において、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトされた組換え宿主細胞を提供する。図１および４は、例示の脊椎動物ニワトリおよびヒト由来のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。また、本発明により、その他の脊椎動物で見い出されるBCL-2(配列番号５)以外の、相同的または生物学的に等価のポリヌクレオチドおよびポリペプチドが意図される。好適には、本発明の組換え宿主細胞は、$BCL\text{-}X_L$(配列番号６)、$BCL\text{-}X_S$(配列番号８)および$BCL\text{-}X_1$(配列番号６の510～698位)をコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトされる。より好適には、本発明の組換え宿主細胞は、配列番号１および３(図１Ａ)または配列番号６および８(図４Ａ-４Ｃ)のポリヌクレオチド配列でトランスフェクトされる。さらにより好適には、本発明の宿主細胞は、真核生物宿主細胞である。なおより好適には、本発明の組換え宿主細胞は脊椎動物細胞である。好適には、本発明の組換え宿主細胞は哺乳動物細胞である。

別の局面で、本発明の組換え宿主細胞は原核宿主細胞である。好適には、本発明の組換え宿主細胞は細菌細胞、好適にはEscherichia coliの株である。より好適には、組換え宿主細胞は、組換え宿主細胞中で機能的な調節シグナルの転写制御下のポリヌクレオチドを含む。ここで、調節シグナルは、必要なすべての転写および転写後の改変を可能にする様式で、プログラムされた脊椎動物細胞死を、促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドの発現を適切に制御する。

なお別の実施態様では、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドを調製する方法を意図し、この方法は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで細胞をトランスフェクトし、形質転換宿主細胞を生成する工程；およびこの形質転換宿主細胞を、上記ポリペプチドの発現に十分な生物学的条件下で維持する工程を包含する。好適には、上記形質転換細胞は真核生物細胞である。なおより好適には、真核生物細胞は脊椎動物細胞である。あるいは、宿主細胞は原核生物細胞である。より好適には、原核生物細胞は、Echerichia coli DH5α株の細菌細胞である。さらにより好適には、形質転換細胞中にトランスフェクトされるポリヌクレオチドは、配列番号１および３(図１Ａ)、または配列番号６および８(図４Ａ-４Ｃ)のヌクレオチド塩基配列を含む。図１および４は、例示の脊椎動物ニワトリおよびヒトのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。また、本発明により、他の脊椎動物で見い出されるbcl-2/BLC-2(配列番号５)以外の相同体または生物学的に等価なポリヌクレオチドおよびポリペプチドが意図される。

なお別の実施態様では、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドと免疫反応性の抗体を提供する。図１および４は、例示の脊椎動物ニワトリおよびヒト由来のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。また、本発明により、他の脊椎動物で見い出されるbcl-2以外の相同体または生物学的に等価なポリヌクレオチドおよびポリペプチドと免疫反応性の抗体が意図される。好適には、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。より好適には、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドは、$BCL\text{-}X_L$(配列番号７)、$BCL\text{-}X_S$(配列番号９)、または$BCL\text{-}X_1$(配列番号４)である。さらにより好適には、ポリペプチドは、配列番号２(図１)または配列番号４、７、および９(図４Ａ-４Ｃ)のアミノ酸残基配列を含む。

別の局面では、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2以外のポリペプチドと免疫反応性の抗体を生産する方法を意図し、この方法は、(a)プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで組換え宿主細胞をトランスフェクトする工程；(b)

このペプチドの発現に十分な条件下で宿主細胞を培養する工程；(c)このポリペプチドを回収する工程；および(d)このポリペプチドに対する抗体を調製する工程を包含する。図１および４は、例示の脊椎動物ニワトリおよびヒト由来のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。好適には、宿主細胞は、配列番号１および３(図１Ａ)または配列番号６および８(図４Ａ-４Ｃ)のポリヌクレオチドでトランスフェクトされる。さらにより好適には、本発明は、上記の方法に従って調製された抗体を提供する。また、本発明により、抗体を生成する他の脊椎動物で見い出された、BCL-2(配列番号５)以外の相同体または生物学的に等価なポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用が意図される。

あるいは、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドを検出する方法を提供し、ここでこの方法は、上記ペプチドを、上記の方法に従って調製された抗体と免疫反応し、抗体-ポリペプチド結合体を形成する工程、およびこの結合体を検出する工程を包含する。

なお別の実施態様では、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドをコードするメッセンジャーRNA転写物を検出する方法を意図し、ここで、この方法は、(a)メッセンジャーRNA転写物を、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列とハイブリダイズし、二重鎖を形成する工程；および(b)この二重鎖を検出する工程を包含する。あるいは、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドをコードするDNA分子を検出する方法を提供し、ここで、この方法は、(a)プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとDNA分子とをハイブリダイズし、二重鎖を形成する工程；および(b)この二重鎖を検出する工程を包含する。

別の局面において、本発明は、生物学的試料中で、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドの存在を検出するための診断アッセイキットを意図し、ここでこのキットは、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドと免疫反応し得る一次抗体を含む第１のコンテナー(container)を、少なくとも１つのアッセイを実施するに十分な量のこの一次抗体の存在とともに含む。好適には、本発明のアッセイキットは、上記一次抗体と免疫反応する二次抗体を含む第２のコンテナーをさらに含む。より好適には、本発明のアッセイキット中で用いられる抗体はモノクローナル抗体である。さらにより好適には、一次抗体は、固体支持体に固定化される。なおより好適には、一次および二次抗体は、インジケーターを含み、そして、好適には、このインジケーターは、放射能標識または酵素である。

別の局面では、本発明は、生物学的試料中の、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害するBCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在を検出するための診断アッセイキットを提供し、このキットは、bcl-x_L(配列番号６)、bcl-x_S(配列番号８)、またはbcl-x_1(配列番号６の510～698位)の少なくとも10個の連続ヌクレオチド塩基のセグメントに同一または相補的な第２のポリヌクレオチドを含む第１のコンテナーを含む。

別の実施態様では、本発明は、生物学的試料中の、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害するBCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドと免疫反応性の抗体の存在を検出するための診断アッセイキットを意図し、このキットは、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害し、上記抗体と免疫反応する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドを含む第１のコンテナーを、少なくとも１つのアッセイを実施するに十分な量の上記ポリペプチドの存在とともに含む。

別の局面では、本発明は、細胞におけるプログラムされた細胞死を予防または処置する方法を提供し、この方法は以下の工程を包含する：

(a)プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む非病原性のベクターを調製する工程；および

(b)この非病原性のベクターを、プログラムされた細胞死を行うまたは行いそうな細胞中に導入する工程。
好適な実施態様では、このベクターは、非病原性を与えるように改変された、レトロウイルス、ワクシニアウイルス(vaccinia virus)、ピコルナウイルス(picornavirus)、コロナウイルス(coronavirus)、トガウイルス(togavirus)、またはラブドウイルス(rhabdovirus)を含む。
好適には、上記細胞はニューロン細胞であり、そして上記方法は、プログラムされた細胞死を行うまたは行いそうな上記神経細胞が位置する中枢神経系の領域中に、いくつかの効果を生む神経細胞株の細胞を移植する工程を包含する方法により、上記プログラムされた細胞死を行うまたは行いそうな細胞中にベクターを導入する工程をさらに包含する。あるいは、ベクターは、細胞死を行うまたは行いそうなニューロン細胞の末梢神経末端の部位でベクターを注入することにより動物のニューロン細胞中に、または上記ベクターをニューロン細胞とインキュベートすることにより細胞死を行いそうなまたは行う培養中のニューロン細胞中に導入される。
別の局面では、本発明は、ニューロン細胞中でプログラムされた細胞死を予防またたは処置する方法を提供し、この方法は以下の工程を包含する：
(a)プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドを調製する工程；
(b)このペプチドを、生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせて薬学的組成物を形成する工程；および
(c)この組成物を、プログラムされた細胞死を行いそうなまたは行うニューロンに投与する工程。
なお別の局面では、本発明は、遺伝子治療のために、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドをコードする遺伝子を送達する方法を提供し、この方法は以下の工程を包含する：
(a)請求項10に記載のベクターを提供する工程；
(b)このベクターを、生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせ、薬学的組成物を形成する工程；および
(c)このベクターが目的の細胞標的に到達するように、上記生理学的組成物を投与する工程。
好適な実施態様では、薬学的組成物は、上記細胞標的の部位で動物への注入により導入され、そしてこの細胞標的は中枢神経系にあり、そしてこの薬学的組成物は上記細胞標的の部位に位置するニューロンに由来する末梢神経末端の部位で動物への注入により導入される。
なおさらに別の局面では、本発明は、腫瘍形成性の疾患を処置する方法を提供し、この方法は以下の工程を包含する：
(a)請求項10に記載の発現ベクターを提供する工程；
(b)このベクターを、生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせて薬学的組成物を形成する工程；および
(c)腫瘍細胞標的にこの組成物を投与する工程。

【図面の簡単な説明】

本明細書の一部を形成する図面において：
図１。ニワトリbcl-x(配列番号１および３)のヌクレオチド配列および予想される読み取り枠(open reading frame)。Ａ．ニワトリbcl-x(配列番号１および３)のヌクレオチド配列は、cDNAクローンおよび対応するゲノムクローン由来の混成配列を示す。1.3kbクローンからなるcDNAの5'末端を矢印により示す。この配列の5'末端は、ゲノムクローンから得られ、そして予想される読み取り枠の5'末端および5'NarI部位を有する257の付加的なヌクレオチド末端を示す。推定の開始コドンは、コンセンサス真核生物翻訳開始配列にあまり一致せず、そしてまたコンセンサス真核生物開始配列は、この部位の5'側のフレームの外側(out-of-frame)の32ヌクレオチドのようである。cDNAおよびゲノム配列の両方は、天

然のEcoRI部位で終わる。Ｂ．ニワトリbcl-x(配列番号２)(上側の配列)から予想される読み取り枠に対する、ヒトbcl-2b(配列番号５)タンパク質配列(下側の配列)からの読み取り枠の整列。GenBankの検索は、bcl-xが、bcl-2b形態と最も高い相同性を有して、GenBankに存在するbcl-2のすべての形態と有意な相同性を示すことを示した。bcl-2b cDNAのように、bcl-x cDNA(配列番号１および３)は、それが由来したゲノム配列の同一直線上(colinear)にあるので、スプライスされていないRNAから生ずるようである。図２は２つのパネルを含む。

図２。新たに孵化したニワトリから単離された組織中のbcl-x mRNAの発現。孵化の日にニワトリから単離された組織mRNAを、ニワトリbcl-x特異的プローブおよびネズミbcl-2プローブとハイブリダイズさせた。ネズミbcl-2プローブは、試験されたすべての組織中に存在した、矢印により示される6.5kb mRNAを認識したが、bcl-xプローブは、矢印により示された2.7kb mRNAにハイブリダイズした。

図３。ニワトリ、マウス、およびヒトゲノムDNAを用いるbcl-xおよびbcl-2のサザンブロット分析。ニワトリ、マウス、およびヒト由来のゲノムDNAを、BamHI(B)、HindIII(H)、およびPstI(P)により消化した。得られるDNAを、ゲル電気泳動により分離し、そして次いでニトロセルロースに移した。サザンブロットを、ネズミbcl-2の第１のコード化エキソンおよびニワトリbcl-x由来の類似の領域から単離された特異的プローブを用いてハイブリダイズさせ、そして得られるオートラジオグラムを示す。

図４。ニワトリbcl-x(配列番号２)に関連するヒトmRNAの予想されるアミノ酸配列。図４Ａおよび４Ｂは、ニワトリbcl-xに対して相同性を有する、２つの別のヒトcDNA(それぞれ、bcl-x_L(配列番号６)およびbcl-x_S(配列番号８))の予想される読み取り枠である。図４Ｃでは、ヒトBCL-X_S(配列番号９)中で欠失したヒトBCL-X_L(配列番号７)の63のアミノ酸領域(配列番号４)を点で示す。BCL-X_L(配列番号７)、BCL-X_S(配列番号９)の両方に存在する、予想される19のアミノ酸の疎水性ドメインおよび隣接する荷電した残基を、下線およびアステリスクでそれぞれ示す。BCL-X_L(配列番号７)およびBCL-X_S(配列番号９)の両方に存在するこのドメインの平均疎水性は、Kyte-Doolittleの方法により計算したとき1.3である。図４は３つのパネルを含む。

図５。bcl-x_Lおよびbcl-x_S mRNAの翻訳産物。bcl-x_L、およびbcl-x_S mRNAの両方を35S-放射標識メチオニンの存在下でインビトロ翻訳した。得られる翻訳されたタンパク質を、SDSポリアクリルアミドゲル上で泳動した。得られるタンパク質のサイズをキロダルトンで右に示す。bcl-x_LアンチセンスmRNA(bcl-x_L-as)を用いる翻訳反応の結果を、翻訳産物の特異性を示すためのコントロールとして示す。

図６。IL-3使用中止(withdrawal)後のFL5.12細胞生存に対するbcl-X_L発現の影響。順方向(bcl-x_L；Ｂ)および逆方向(bcl-$x_L$rev；N)のbcl-x_L、bcl-2(H)、bcl-2＋bcl-x_L(F)を含むpSFFV-Neoベクターおよびベクターコントロール(Neo；J)を用いたFL5.12の安定なトランスフェクタントを実施例に記載のように調製した。細胞生存は、指示された時点でトリパンブルー排除により測定した。データは、３つの培養の平均＋S.D.として表した。

図７．bcl-x_Sの安定発現が、IL-3使用中止に際しFL5.12細胞のbcl-2誘導生存を妨げる。Ａ．bcl-2(J)、bcl-x_S(H)、bcl-2＋bcl-x_S(Ｅ)を発現するFL5.12の安定なトランスフェクタント、または選択マーカーネオマイシン(Neo；Ｂ)単独を発現するトランスフェクタントを実施例に記載のように調製した。さらに、bcl-x_Sの個々のサブクローン(bcl-x_Sクローン１[N]およびbcl-x_Sクローン２[F]を分析した。０時点で、指数的に成長する細胞の、IL-3サポートを止め、そして生存をトリパンブルー排除により掲示的に分析した。図の下の部分は、ネオマシン(Neo)、bcl-2、およびbcl-2＋bcl-x_Sバルク集団のフローサイトメトリー分析を示す。細胞を実施例に記載のように透過処理(permeabilize)し、そして次いでヒトbcl-2に特異的なモノクローナル抗体(太線)または関係のないコントロール抗体(細線)で染めた。Ｂ．IL-3使用中止後の、個々のbcl-2＋bcl-x_Sサブクローンの生存。bcl-2およびbcl-x_Sの両方を発現するサブクローンの生存を、上記のように成長因子(bcl-2＋bcl-x_Sクローン１およびbcl-2＋bcl-x_Sクローン２)の使用中止後に分析した。図の下半分は、ネオマイシン、bcl-2、bcl-2＋bcl-x_Sクローン１、bcl-2＋bcl-x_Sクローン２集団にお

けるbcl-2発現についてのフローサイトメトリー分析である。細胞を実施例に記載されるように透過処理し、そして次いでヒトbcl-2に特異的なモノクローナル抗体(太線)または関係のないコントロールのイソタイプが合った(isotype-matched)抗体(細線)で染色し、そしてデータを、細胞数に対する蛍光強度で表した。Ｃ．安定にトランスフェクトされたFL5.12細胞株におけるbcl-x RNAの発現。RNAを上記のクローンのそれぞれから単離し、そしてbcl-x特異的およびb-アクチン特異的プローブを用いるハイブリダイゼーションによりノーザンブロット上で分析した。図７は３つのパネルからなる。

図８。IL-3使用中止後のFL5.12細胞のbcl-2誘導生存は、アンチセンスbcl-x_S発現により影響されない。bcl-2(J)またはbcl-2と逆方向にクローン化されたbcl-x_Sを含む発現ベクター（bcl-2＋bcl-$x_S$rev；H)、もしくはネオマイシン単独(Neo；B)のいずれかで安定にトランスフェクトされたFL5.12細胞を、IL-3使用中止後の生存について分析した。下のパネルでは、bcl-2発現のレベルを、蛍光活性化セルソーター上で、bcl-2に対して特異的なモノクローナル抗体(太線)または無関係のコントロール抗体(細線)を用いて透過処理細胞を染色することにより分析される。

図９。ヒト胸腺細胞およびＴ細胞におけるbcl-xの発現。Ｔ細胞発達の間のbcl-xの発現を調べるために、RNAを非分離の胸腺細胞、未成熟の胸腺細胞、成熟胸腺細胞、および末梢血Ｔ細胞から実施例に記載のように調製した。未成熟の胸腺細胞、成熟胸腺細胞、およびＴ細胞集団を、完全培地中で６～８時間PMAおよびイオノマイシンを用いてインビトロ刺激によりさらに分析した。得られるRNAを、グアニジニウムイソチオシアネート法により単離し、そしてノーザンブロット法にかけた。上部パネルは、分析に用いたRNA試料が等しいことを示し、そして下側の２つのパネルは、bcl-x特異的プローブまたはHLAクラスI特異的プローブを用いたハイブリダイゼーションを表す。

図10。末梢血Ｔ細胞活性化後のbcl-xおよびbcl-2 mRNA誘導のパターン。末梢血Ｔ細胞を実施例に記載のように単離し、そして次いで示されたように、０、６、12、または24時間の間PMAおよびイオノマイシンの組み合わせを用いて活性化した。bcl-xおよびbcl-2の相対的誘導をリボソームRNAについて異なる時点からのRNAを等量化することにより分析した(上部パネル)。２回のノーザンブロットを、bcl-xまたはbcl-2のいずれか、およびHLAクラスI mRNAについて調べた。示されたデータにおいて、bcl-xオートラジオグラムは８時間感光し、その一方bcl-2オートラジオグラムは15日間感光した；両方のプローブは類似の長さと塩基組成であった。

図11。ヒト胸腺細胞、Ｔ細胞、および成人脳で発現されるbcl-x_Sおよびbcl-x_L mRNAの相対比率の分析。bcl-x_Sの読み取り枠の5'および3'末端に隣接するPCRプライマーを用いてbcl-x_Lおよびbcl-x_Sを同時に増幅した。これらのプライマーを用いて、種々の供給源からのRNAをPCR分析にかけた。bcl-x_Sテンプレートが利用される場合、591塩基対の単一バンドが生成され、その一方bcl-x_Lテンプレートが利用される場合、780塩基対の単一バンドが観察される。HaeIII消化fX174由来の分子量マーカーが示されている(M)。Ａ．レーンは、bcl-x_Sテンプレート、bcl-x_Lテンプレートを用いるPCR反応、ならびに非刺激の末梢血Ｔ細胞、PMAおよびイオノマイシンで６時間刺激された末梢血Ｔ細胞、非分離のヒト胸腺細胞由来および成人脳由来のRNAを用いるPCR反応由来の産物を示す。bcl-x_Lおよびbcl-x_Sとして組織試料中で観察されるバンドの同定は、各組織供給源から逆転写されたRNAのPCR産物のクローニングおよび部分配列決定により確認した。Ｂ．bcl-x_Lとbcl-x_Sの相対比率の定量化においてPCRアッセイの有効性を示す滴定曲線。この図は１％アガロースゲル上で分離されそしてエチジウムブロマイドで染色されたPCR反応の産物を示す。0:10～10:0まで単位増加で変化するbcl-x_Sに対するbcl-x_Lの比を用いてPCRを実施した。得られる産物は、反応混合物に添加されるbcl-x_Lおよびbcl-x_Sテンプレートの相対比を反映する。

発明の詳細な説明

Ｉ．本発明

本発明は、DNAセグメント、精製ポリペプチド、抗体を得る方法、組換えアポトーシスポリペプチドを得るためおよび使用するために必要な組換え宿主細胞のクローニングおよび使用方法を提供する。従って、本発明は、一般に、プログラムされた脊椎動物細胞死を促

進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドの調製および使用のための組成物および方法に関する。

II．ポリペプチド

Ａ．プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2以外のポリペプチドをコードする単離され、そして精製されたポリペプチド

１つの局面では、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2以外のポリペプチドをコードする単離されそして精製されたポリヌクレオチドを提供する。好適な実施態様では、本発明のポリヌクレオチドは脊椎動物種由来のDNA分子である。好適な脊椎動物は哺乳類である。好適な哺乳類はヒトである。好適な実施態様では、本発明のポリヌクレオチドはDNA分子である。より好適には、本発明のポリヌクレオチドは、BCL-X_1(配列番号６)、BCL-x_S(配列番号８)、およびBCL-X_1(配列番号４)と呼ばれるポリペプチドをコードする。さらにより好適には、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号２、４、７、および９のアミノ酸残基配列を含むポリペプチドをコードする。最も好適には、本発明の単離されそして精製されたポリヌクレオチドは、配列番号１、３、６、および８のヌクレオチド塩基配列を含む。好適な実施態様では、ポリヌクレオチドはbcl-x(配列番号１および３)である。

本明細書で使用されるとき、用語「ポリヌクレオチド」は、ホスホジエステル結合により連結されたヌクレオチドの配列を意味する。本明細書ではポリヌクレオチドは5'から3'方向で表される。本発明のポリヌクレオチドは、約680から約数十万の塩基対まで含み得る。好適には、ポリヌクレオチドは、約680から約150,000塩基対を含み得る。特定のポリヌクレオチドの好適な長さは以後呈示される。本明細書で使用されるとき、ポリヌクレオチド(例えば遺伝子)は、小文字の活字を用いて称される(例えばbcl-2、bcl-x)。

本発明のポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸(DNA)分子またはリボ核酸(RNA)分子であり得る。ポリヌクレオチドがDNA分子の場合、その分子は遺伝子またはcDNA分子であり得る。ヌクレオチド塩基は本明細書では１文字コードにより示される：アデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン(C)、イノシン(I)およびウラシル(U)。

本発明のポリヌクレオチドは、当業者に周知の標準技法を用いて調製され得る。本発明のプログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2以外のポリペプチドをコードするcDNA分子の調製は、実施例１および３において以後記載される。ポリヌクレオチドはまた、ラムダファージ技術を用いてゲノムDNAライブラリーから調製され得る。

別の局面において、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2(配列番号５)以外のポリペプチドをコードする単離されそして精製されたポリヌクレオチドを提供する。ここで、このポリヌクレオチドは、上記ポリペプチドを発現する細胞由来のcDNAクローンのライブラリーを構築する工程；このライブラリーを、このポリペプチドをコードするRNAから調製される標識cDNAプローブを用いてスクリーニングする工程；およびこのプローブにハイブリダイズするクローンを選択する工程を含む方法により調製される。好適には、本発明のポリヌクレオチドは、上記方法により調製される。より好適には、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号６および８のアミノ酸残基配列を有するポリペプチドをコードする。なおより好適には、このポリヌクレオチドは配列番号１および３のヌクレオチド配列を含む。

研究の初期シリーズでは、本発明者らは、ネズミbcl-2 cDNAプローブと低緊縮度(stringency)のハイブリダイゼーションを用いてニワトリリンパ球様細胞中のbcl-2関連遺伝子を同定した。単離されたクローンの１つであるbcl-xは、ヒトまたはマウスBCL-2と44%アミノ酸同一性を示す読み取り枠を含んでいた。サザンブロッティングは、ニワトリBCL-Xがニワトリbcl-2とは異なる遺伝子によりコードされることを示した。ニワトリbcl-xを、次いで、ヒトbcl-x遺伝子由来の２つの異なるcDNAを単離するために使用した。これら２つのcDNAは予想される読み取り枠において異なる。１つのcDNA、bcl-x_L(配列番号６)は、BCL-2(配列番号５)について先に記載されたドメインに類似のドメインとともに233アミノ酸の読み取り枠(配列番号７)を含む。他方のcDNA、bcl-x_S(配列番号８)は、170アミノ酸のタンパク質(配列番号９)をコードし、そこではBCL-2(配列番号５)に対し最も高い相同性

の領域が欠失している。これら２つのcDNAにおける差異は、第１のコード化エキソン内の２つの5'スプライス部位の異なる使用から生じる。これら２つのタンパク質のアポトーシス細胞死を調節する能力を比較するとき、BCL-X_Lが、成長因子遮断に際し、細胞にアポトーシス細胞死に対する耐性を付与したが、BCL-X_Sは、アポトーシス細胞死に対する耐性の誘導からbcl-2の過剰発現を防ぎ得ることが見い出された。このように、発育の間に、発現およびスプライシングの両方の調節が、プログラムされた細胞死に対する細胞の感受性を決定することにおいて重要な役割を演じ得るようである。この観察と一致して、本発明者らは、胸腺で選択を受けるプロセス中にある未成熟の胸腺細胞が高レベルのbcl-x_Sメッセージを発現することを見い出した。bcl-x_Sの発現が、bcl-2がこの細胞集団でネガティブ選択による死を防ぐことが出来ない原因のようである。Bcl-x_Sは、高レベルのbcl-2発現の存在下でさえ、細胞死の優性調節剤(regulator)として機能し得る。さらに、本発明者らは、成熟した天然の構造がblc-x_L mRNAのみを構成的に発現することを見い出した。従って、BCL-X_Lは、プログラムされた細胞死に対する耐性およびこの重要な有糸分裂後の細胞集団の長期間生存力に寄与し得る。それとともに、本研究は、２つのbcl-x遺伝子産物がアポトーシス細胞死の１つまたはそれ以上のBCL-2独立経路を調節し得ることを示す。

bcl-x遺伝子は、脊椎動物進化において高度に保存され、そしてbcl-x mRNAは種々の組織で発現され、リンパ球系および中枢神経系で最も高いmRNAレベルで観察される。本発明者らは、ヒト組織から２つの異なるbcl-x mRNA種を単離した。これら２つのcDNAは、bcl-x遺伝子の第１のコード化エキソン内に位置す２つの異なる5'スプライス部位の二者択一の使用から生じる。長い方のcDNA、bcl-x_L(配列番号６)は、BCL-2にサイズが類似で予想される構造であるようなタンパク質(配列番号７)をコードする。短い方のcDNA、bcl-x_S(配列番号８)は、BCL-X_L(配列番号７)とBCL-X_S(配列番号９)との間で最もアミノ酸同一性の領域を構成するbcl-x_L(配列番号７)読み取り枠から63個のアミノ酸(配列番号４)の欠失を含む。

Ｂ．プローブおよびプライマー。

別の局面において、本発明によって提供されるDNA配列情報により、本明細書に開示の選択されたポリヌクレオチドの遺伝子配列に特異的にハイブリダイズする能力を有する比較的短いDNA（またはRNA）配列の調製が可能になる。これらの局面において、適切な長さの核酸プローブは、配列番号１、３、６、および８の選択されたヌクレオチド配列の考慮に基づいて調製される。このような核酸プローブは、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする。最も重要なことに、このプローブは、与えられた試料における相補的配列の存在を検出するための種々のアッセイにおいて用いられ得る。

特定の実施態様においては、オリゴヌクレオチドプライマーを用いることが有利である。このようなプライマーの配列は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドをコードする、遺伝子の規定されたセグメントまたはポリヌクレオチドの検出、増幅、または変異誘発において用いるために、PCR技術を用いて細胞から、本発明のポリヌクレオチドを用いて設計される。

本発明に従って特定の利点を提供するために、ハイブリダイゼーション研究またはアッセイについて用いられる好ましい核酸配列は、配列番号２、４、７、および９（図１および４Ａ～４Ｃ）に示されるような、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドの少なくとも10～70またはより長いヌクレオチド伸長部(strech)に相補的なプローブ分子を含む。少なくとも10ヌクレオチド長のサイズにすることにより、フラグメントが、安定しかつ選択的である二重鎖分子を形成するのに十分な長さであることを確実にする。10塩基長より長い伸長部以上の相補的配列を有する分子が一般的に好ましいが、ハイブリッドの安定性および選択性を増大し、それにより得られる特異的ハイブリッド分子の質および程度を改善するために、一般に、25～40ヌクレオチド、55～70ヌクレオチド、または望ましい

とされるそれ以上の長さの遺伝子相補的伸長部を有する核酸分子を設計することが好ましい。このようなフラグメントは、例えば、化学的手段によるフラグメントの直接合成、核酸再生技術の適用（例えば、本明細書中に参考として援用されている米国特許第4,603,102号のPCR技術）、または適切な挿入片および適切な制限部位を含む組換えプラスミドからの選択されたDNAフラグメントの切り出しによって容易に調製され得る。

別の局面において、本発明は、少なくとも10個の連続塩基のセグメントに同一または相補的な塩基配列を含む単離および精製されたポリヌクレオチドを意図する。ここで、このポリヌクレオチドは、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドにハイブリダイズする。好ましくは、単離および精製されたポリヌクレオチドは、配列番号１および３（図１）の少なくとも25～70個の連続塩基のセグメントに同一または相補的である塩基配列を含む。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、開示されたヌクレオチド配列の40または50個の連続塩基に同一または相補的である塩基のセグメントを含み得る。

従って、本発明のポリヌクレオチドプローブ分子は、遺伝子の相補的伸長部と二重鎖分子を選択的に形成する能力のために用いられ得る。想定される適用に依存して、標的配列に対して種々のプローブの選択度を達成するために種々のハイブリダイゼーション条件を用いることが望まれる。高い選択度を必要とする適用については、代表的には、ハイブリッドを形成するために比較的ストリンジェントな条件を用いることが望まれる。例えば、比較的低い塩および／または高い温度の条件を選択する（例えば、50℃～70℃で0.02M～0.15MのNaCl）。このような条件は、特に選択性であり、そしてたとえあってもプローブとテンプレートまたは標的鎖との間のミスマッチをほとんど容認しない。

もちろん、いくつかの適用では、例えば、基礎となるテンプレートにハイブリダイズした変異プライマー鎖を用いて変異体を調製することが望まれる場合、またはプログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチド、他の細胞由来のコーディング配列、機能的等価物などを単離しようとする場合、代表的にはややストリンジェント度が低いハイブリダイゼーション条件がヘテロ二重鎖の形成を可能とするのに必要とされる。これらの環境においては、20℃～55℃の温度範囲で0.15M～0.9M塩のような条件を用いることが望まれ得る。クロスハイブリダイゼーション種は、それにより、ハイブリダイゼーションの制御に関してポジティブにハイブリダイズするシグナルとして容易に同定され得る。いずれの場合においても、条件は増量のホルムアミドの添加により、よりストリンジェントにされ得ると一般に理解される。ホルムアミドは、温度の増加と同様にしてハイブリッド二重鎖を脱安定化する役割を担う。従って、ハイブリダイゼーション条件は容易に操作され得、このため一般に所望の結果に依存して選択される方法である。

特定の実施態様においては、ハイブリッド形成の検出のために適切な標識と組み合わせて本発明のポリヌクレオチドを用いることが有利である。広範な種類の適切な標識が、当該分野で公知であり、それは、放射性リガンド、酵素リガンド、または他のリガンドを包含し（例えば、アビジン／ビオチン）、検出可能なシグナルを与え得る。

一般に、本明細書中に記載のハイブリダイゼーションプローブは、溶液ハイブリダイゼーションおよび固相を用いる実施態様の両方における試薬として有用であることが想定される。固相を含む実施態様においては、試験DNA（またはRNA）は、選択されたマトリックスまたは表面に吸着されるか、またはそうでなければ固定化される。次いで、この固定された核酸は、所望の条件下で、選択されたプローブとの特異的ハイブリダイゼーションに供される。選択された条件は、当該分野において周知であるように、特定の環境および必要とされる基準に依存する（例えば、Ｇ＋Ｃ含有量、標的核酸のタイプ、核酸の供給源、ハイブリダイゼーションプローブのサイズ）。マトリックスを洗浄して非特異的に結合したプローブ分子を除去した後、特異的ハイブリダイゼーションが、標識によって検出され、または定量さえ行われる。

II．プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2以外のポリペプチド。

１つの実施態様においては、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2（配列番号５）以外の単離および精製されたポリペプチドを意図する。配列番号１および３、６、および８は、好例の脊椎動物、ニワトリおよびヒトに由来のヌクレオチド配列を記載し、配列番号２、４、７、および９は、アミノ酸配列を記載する。好ましい実施態様においては、本発明のポリペプチドは、脊椎動物種由来のポリペプチドである。好ましい脊椎動物は哺乳動物である。好ましい哺乳動物はヒトである。好ましくは、そのポリペプチドは組換えポリペプチドである。より好ましくは、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドは、BCL-X_L（配列番号７）、BCL-X_S（配列番号９）、またはBCL-X_1（配列番号４）である。大文字活字（例えば、BCL-X、BCL-2）は、本明細書中ではポリペプチド（例えば、遺伝子発現産物）を表している。さらにより好ましくは、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2（配列番号５）以外の本発明のポリペプチドは、配列番号２、４、７、および９のアミノ酸残基配列を含む。

ポリペプチドは、アミノ酸残基配列として本明細書中に開示される。それらの配列は、アミノ末端からカルボキシ末端の方向で左から右に記載される。標準命名法に従って、アミノ酸残基配列は、以下に示すような１文字表記または３文字表記のいずれかにより称される。

アミノ酸残基	３文字表記	１文字表記
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン	Gln	Q
グルタミン酸	Glu	E
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

改変および変更が、本発明のポリペプチドの構造において行われ得、そして同様の特性を

有する分子を得ることができる。例えば、特定のアミノ酸は、レセプター活性が感知し得るほどに損失することなく、配列中で他のアミノ酸に置換され得る。そのポリペプチドの生物学的機能活性を規定するのはポリペプチドの相互作用能および性質であるので、特定のアミノ酸配列置換は、ポリペプチド配列（または、もちろんその基礎となるDNAコーディング配列）において行われ得、そしてそれにも関わらず同様の特性を有するポリペプチドを得ることができる。

このような変更を生成することにおいて、アミノ酸のヒドロパシー指数が考慮され得る。ポリペプチドに相互作用生物学的機能を与えることにおけるヒドロパシーアミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野において理解されている（KyteおよびDoolittle, J. Mol. Biol. 157:105-132, 1982）。特定のアミノ酸が、類似のヒドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸に置換され得、そして類似の生物学的活性を有するポリペプチドをなお生じ得ることが知られている。各アミノ酸は、その疎水性および荷電特性を基にしてヒドロパシー指数が与えられている。これらの指数は以下の通りである：イソロイシン（+4.5）；バリン（+4.2）；ロイシン（+3.8）；フェニルアラニン（+2.8）；システイン／シスチン（+2.5）；メチオニン（+1.9）；アラニン（+1.8）；グリシン（-0.4）；トレオニン（-0.7）；セリン（-0.8）；トリプトファン（-0.9）；チロシン（-1.3）；プロリン（-1.6）；ヒスチジン（-3.2）；グルタミン酸（-3.5）；グルタミン（-3.5）；アスパラギン酸（-3.5）；アスパラギン（-3.5）；リジン（-3.9）；およびアルギニン（-4.5）。

アミノ酸の相対的ヒドロパシー特性が、得られるポリペプチドの二次構造を決定し、そして順次このポリペプチドの他の分子（例えば、酵素、基質、レセプター、抗体、抗原など）との相互作用を規定すると考えられている。アミノ酸が類似のヒドロパシー指数を有する別のアミノ酸により置換され得て、なお機能的に等価なポリペプチドを得ることができることが当該分野において知られている。このような変更において、そのヒドロパシー指数が±２以内のアミノ酸の置換が好ましくは、±１以内が特に好ましく、そして±0.5以内がさらにより特に好ましい。

同様のアミノ酸の置換はまた、特に生物学的に機能等価なポリペプチドまたはそれにより作製されるペプチドが免疫学的な実施態様における使用について意図される場合、親水性に基づいて行われ得る。本明細書中に参考として援用されている米国特許第4,554,101号では、その近接アミノ酸の親水性により支配されるようなポリペプチドの最大局部平均親水性が、その免疫原性および抗原性、すなわちポリペプチドの生物学的特性と相関関係にあることが述べられている。

米国特許第4,551,101号に詳述されるように、以下の親水性値がアミノ酸残基に与えられている：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±１）；グルタミン酸（+3.0±１）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（０）；プロリン（-0.5±１）；トレオニン（-0.4）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）；トリプトファン（-3.4）。アミノ酸が類似の親水性値を有する別のアミノ酸により置換され得て、なお生物学的に等価な、そして特に免疫学的に等価なポリペプチドを得ることができることが理解されている。このような変更において、その親水性値が±２以内のアミノ酸の置換が好ましく、±１以内が特に好ましく、そして±0.5以内がさらにより特に好ましい。

従って、上記により略述したように、アミノ酸置換は、従って一般にアミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。上述の種々の特性を考慮に入れた好例の置換は当業者に周知であり、以下を包含する：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびトレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシン（以下の表１を参照のこと）。従って、本発明は、上述したようなプログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2以外のポリペプチドの機能的または生物学的等価物を意図している。

表１

元の残基	好例の置換
Ala	Gly ; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln ; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala
His	Asn ; Gln
Ile	Leu ; Val
Leu	Ile ; Val
Lys	Arg
Met	Met ; Leu ; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp ; Phe
Val	Ile ; Leu

ポリペプチドの生物学的または機能的等価物はまた、部位特異的変異誘発を用いて調製され得る。部位特異的変異誘発は、基礎となるDNAの特異的変異誘発によって、それらの配列に由来する、第二世代ポリペプチド、または生物学的または機能的に等価なポリペプチドまたはペプチドを調製するのに有用な技術である。上述したように、このような変更は、アミノ酸置換が望ましい場合に所望され得る。この技術は、例えば、上述の１つまたはそれ以上の先の考慮を取り入れて、DNAに１つまたはそれ以上のヌクレオチド配列変化を導入することにより、配列改変体を簡便に調製および試験できることをさらに提供する。部位特異的変異誘発は、所望の変異のDNA配列をコードする特異的なオリゴヌクレオチド配列、および欠失接合部の両側で横切って安定な二重鎖を形成するために十分なサイズおよび配列複雑度のプライマー配列を提供するに十分な数の近接ヌクレオチドを用いて、変異体の生成を可能にする。代表的には、約17～25ヌクレオチド長のプライマーが好ましく、配列の接合部の両側の約５～10残基が改変される。

一般には、部位特異的変異誘発は、Adelmanら（1983）により例示されるように当該分野において周知である。理解されるように、この技術は、代表的には、一本鎖形態および二本鎖形態の両形態で存在し得るファージベクターを用い得る。部位特異的変異誘発に有用な典型的なベクターは、M13ファージのようなベクターを包含する（Messingら1981）。これらのファージは市販されており、そしてそれらの使用は一般に当業者に公知である。

一般に、本発明による部位特異的変異誘発は、まず、その配列内に、選択されたポリペプチド配列の全部または一部をコードするDNA配列を含む一本鎖ベクターを得ることにより

行われる。所望の変異配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーは、一般に合成により、例えば、Creaら（1978）の方法により調製される。次いで、このプライマーは、一本鎖ベクターにアニールされ、そして変異保有鎖の合成を完全にするために酵素（例えば、E. coliポリメラーゼＩクレノウフラグメント）の使用により伸長される。従って、ヘテロ二重鎖が形成され、ここで、一方の鎖は元の非変異配列をコードし、そして第二鎖は所望の変異を有している。次いで、このヘテロ二重鎖ベクターが用いられて、E. coli細胞のような適切な細胞を形質転換し、そして変異を有する組換えベクターを含むクローンが選択される。市販のキットは、オリゴヌクレオチドプライマーを除く必要な全ての試薬と共に得られる。

プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2（配列番号５）以外の本発明のポリペプチドは、特定の供給源に限定されない。本明細書中で開示されるように、本発明の技術および組成物は、例えば、ヒトおよびニワトリのような相違する動物に由来するこのようなペプチドの同定および単離を提供する。従って、本発明は、その属の３種を特定して同定したが、種々の供給源由来のポリペプチドの属の普遍的な検出および単離を提供する。同じファミリーの多くの種のポリペプチドが、本発明の組成物および方法を用いる検出および単離に適用可能であると考えられる。

本発明のポリペプチドは、当業者に周知の標準的技術によって調製され得る。このような技術は、そのポリペプチドを含有することが知られている組織からの単離および精製、および形質転換細胞を用いるこのようなポリペプチドをコードするクローン化DNAからの発現を包含するが、これらに限定されない。

プログラムされた細胞死またはアポトーシスに影響するまたは変化させるポリペプチドは、ヒトを含む実質的に全ての哺乳動物において見出されている。異なる種では、このようなポリペプチドの構造および機能の間で変化が存在すると思われるが、このような差異が存在する場合、それらの差異の同定は、本発明を考慮すれば当業者にはよく知られたところである。従って、本発明は、任意の脊椎動物に由来する、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2以外のポリペプチドを意図する。好ましい哺乳動物はヒトである。好ましい脊椎動物は哺乳動物である。

III. 発現ベクター

別の実施態様において、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。好ましくは、本発明の発現ベクターは、ポリペプチド$BCL\text{-}X_L$（配列番号６）、$BCL\text{-}X_S$（配列番号８）、または$BCL\text{-}X_1$（配列番号６の510位から698位）をコードするポリヌクレオチドを含む。好ましい実施態様においては、本発明の発現ベクターは、配列番号２、４、６、７、および９のアミノ酸残基配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。より好ましくは、本発明の発現ベクターは、配列番号１、３、６、および８のヌクレオチド塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む。好ましい実施態様においては、本発明の発現ベクターは、エンハンサー－プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドを含む。よりさらに好ましくは、本発明の発現ベクターは、原核生物プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドを含む。あるいは、本発明の発現ベクターは、真核生物プロモーターであるエンハンサー－プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドを含み、そしてカルボキシ末端アミノ酸の3'側に位置し、コードされたポリペプチドの転写単位内に位置するポリアデニル化シグナルをさらに含む。

プロモーターは、代表的には転写が始まる位置（すなわち転写開始部位）の前方（上流）の約100ヌクレオチド対内にあるDNA分子の領域である。その領域は、代表的には、いくつかのタイプのDNA配列エレメントを含み、このエレメントは異なる遺伝子において同様の相対的位置に位置している。本明細書中で用いられるように、用語「プロモーター」は、普遍化真核生物RNAポリメラーゼII転写単位の上流プロモーター領域、プロモーター領域、またはプロモーターとして当該分野で称されるものを包含する。

別のタイプの分離した転写調節配列エレメントはエンハンサーである。エンハンサーは、

特定のコード化領域（例えば遺伝子）についての時間、位置、および発現レベルの特異性を提供する。エンハンサーの主要機能は、エンハンサーに結合する１つまたはそれ以上の転写因子を含有する細胞においてコーディング配列の転写レベルを増大させることである。プロモーターとは異なり、エンハンサーは、プロモーターが存在する限り転写開始部位から可変の距離に位置して機能し得る。

本明細書中で用いられるように、語句「エンハンサー－プロモーター」は、エンハンサーおよびプロモーターの両エレメントを含有する複合単位を意味する。エンハンサー－プロモーターは、少なくとも１つの遺伝子産物をコードするコーディング配列に作動可能に連結される。本明細書中で用いられるように、語句「作動可能に連結される」は、エンハンサー－プロモーターが、コーディング配列の転写がそのエンハンサー－プロモーターにより制御および調節されるように、そのコーディング配列に連結されることを意味する。エンハンサー－プロモーターをコーディング配列に作動可能に連結する手段は、当該分野において周知である。当該分野においてまた周知であるように、その転写が制御されるコーディング配列に対する正確な向きおよび位置は、特に、エンハンサー－プロモーターの特異的な性質に依存する。従って、TATAボックス最小プロモーターは、代表的には転写開始部位の約25～約30塩基対上流に位置し、そして上流プロモーターエレメントは、代表的には転写開始部位の約100～約200塩基対上流に位置する。対照的に、エンハンサーは、開始部位の下流に位置し得、そしてその部位から相当の距離であり得る。

本発明のベクター構築物に用いられるエンハンサー－プロモーターは、トランスフェクトされるべき細胞において発現を導く任意のエンハンサー－プロモーターであり得る。周知の特性を有するエンハンサー－プロモーターを用いることにより、遺伝子産物発現のレベルおよびパターンが最適化され得る。

発現ベクターのコーディング配列は転写終結領域に作動可能に連結される。RNAポリメラーゼは、ポリアデニル化が生じる部位を通じて、コードするDNA配列を転写する。代表的には、ポリアデニル化部位の数百塩基対下流に位置するDNA配列は、転写を終結させる役割を有する。これらのDNA配列は、本明細書中では転写終結領域と呼ばれる。これらの領域は、転写されたメッセンジャーRNA（RNA）の効率的なポリアデニル化に必要である。転写終結領域は当該分野において周知である。本発明のアデノウイルスベクター構築物において用いられる好ましい転写終結領域は、SV40またはプロタミン遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む。

発現ベクターは、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。このようなポリペプチドは、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドをコードするヌクレオチド塩基の配列を、上記セグメントをプログラムされた脊椎動物細胞死に影響しないポリペプチドをコードするポリヌクレオチドセグメントから識別するに十分な長さで含むと意味される。本発明のポリペプチドはまた、改変アミノ酸配列を有する生物学的に機能的なポリペプチドまたはペプチドをコードし得る。この改変アミノ酸配列は、アミノ酸の相対的ヒドロパシースコアが交換されるような考慮に基づいて選択された変化を有する。これらの改変配列は、天然供給源から単離された配列、または部位特異的変異誘発のような変異誘発手順を用いて本明細書中に開示された配列中に誘導された配列である。

好ましくは、本発明の発現ベクターは、BCL-X_L（配列番号６）、BCL-X_S（配列番号８）、BCL-X_1（配列番号６の510位から698位）、または配列番号２、４、７、および９のアミノ酸残基配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。発現ベクターは、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドのコーディング領域自身を含み得るか、またはそれは、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進するかまたは阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドのようなポリペプチドの塩基性コーディング領域において選択された変化または改変を有するコーディング領域を含み得る。あるいは、このようなベクターまたはフラグメントは、より大きなポリペプチド、またはそれにも関わらず塩基性コーディング領域を含むポ

リペプチドをコードし得る。いずれの場合においても、コドン縮重および生物学的機能等価性のために、本発明のこの局面は、上述のポリペプチド配列に対応する特定のDNA分子に限定されないことが理解されるべきである。

好例のベクターは、pCMVファミリーの哺乳動物発現ベクターを包含し、このベクターは、pCMV6bおよびpCMV6c（Chiron Corp., Emeryville CA）を包含する。特定の場合において、そして詳細にはこれらの個々の哺乳動物発現ベクターの場合において、得られる構築物は、選択マーカー（例えばpSV2neo）を含有するベクターとの同時トランスフェクションを必要とし得る。ジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞株（例えばDG44）への同時トランスフェクションにより、このような発現ベクターに取り込まれたDNAによってポリペプチドを発現するクローンが検出され得る。

本発明のDNA分子は、当該分野において周知である多くの技術により、ベクター中に取り込まれ得る。例えば、bcl-x（配列番号１および３）、bcl-x_L（配列番号６）、およびbcl-x_S（配列番号８）は、標準的技術を用いてpSFFV-NeoおよびpBluescript-Sk＋に取り込まれ得た（以下の実施例を参照のこと）。

本発明の発現ベクターは、多量のコード化DNAそれ自身を調製する手段およびコードされたポリペプチドを調製する手段の両手段として有用である。本発明のポリペプチドが組換え手段によって作製される場合、シャトル系として原核生物発現ベクターまたは真核生物発現ベクターのいずれかを用い得ることが意図される。しかし、原核生物系が通常、前駆体ポリペプチドを正確にプロセシングし得ない場合、そして特にこのような系が膜関連真核性物ポリペプチドを正確にプロセシングし得ない場合、真核生物ポリペプチドは開示された発明の教示により予期されるので、おそらくこのような配列を真核生物宿主において発現させ得る。しかし、DNAセグメントが真核生物ポリペプチドをコードする場合においてさえ、原核生物発現は、いくつかのさらなる適用性を有し得ることが意図される。従って、本発明は、原核生物細胞と真核生物細胞との間を往復し得るベクターと組み合わせて用いられ得る。細菌宿主細胞および真核生物宿主細胞の使用を可能にするような系が本明細書中に記載される。

本発明の組換えポリペプチドの発現が所望されそして真核生物宿主が意図される場合、真核生物複製起点を取り込んだプラスミドのようなベクターを用いることが最も望ましい。さらに、真核生物系における発現のためには、有効な真核生物プロモーター（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞と組み合わせて用いられるプロモーター）に近接してそしてその制御下に、ポリペプチドをコードする配列を位置させることが所望され得る。コーディング配列をプロモーターの制御下に置くために、そのプロモーターが原核生物プロモーターであれ真核生物プロモーターであれ、一般に必要とされることは、選択されたプロモーターに対してその3'側または下流に約１ヌクレオチドと約50ヌクレオチドとの間に、ポリペプチドの適切な翻訳読み取り枠の翻訳開始側の5'末端を位置させることである。さらに、真核生物発現が予期される場合、代表的には、所望のポリペプチドを含む転写単位に適切なポリアデニル化部位を取り込むことが所望され得る。

pCMVプラスミドは、本発明において特定の有用性を有する一連の哺乳動物発現ベクターである。このベクターは、本質的に全ての培養細胞における使用のために設計され、SV40形質転換サルCOS細胞株において非常によく作動する。pCMV１、２、３、および５ベクターは、各プラスミドのポリリンカー領域における特定のユニークな制限部位において互いに異なる。pCMV４ベクターは、ポリリンカーの前の配列中に翻訳エンハンサーを含む点で、これらの４つのプラスミドとは異なる。pCMV１から５のベクターのシリーズから直接には誘導されないが、機能的に類似のpCMV6bおよびcベクターは、Emeryville, CAのChiron Corp.から入手可能であり、ポリリンカー領域の向きが一方が他方に対して逆であることを除けば同一である。

pCMVプラスミドの一般的な成分は以下の通りである。ベクター骨格は、pTZ18R（Pharmacia）であり、そして一本鎖DNAの生産のためのバクテリオファージf1複製起点およびアンピシリン耐性遺伝子を含有する。CMV領域は、ヒトサイトメガロウイルス（Towne株）主要極初期遺伝子の強力プロモーター－調節領域のヌクレオチド-760から+3からなる（Thomsen

ら，1984；Boshartら，1985）。ヒト成長ホルモンフラグメント（hGH）は、この遺伝子の1533から2157の配列で表される転写終結およびポリアデニル化シグナルを含む（Seeburg，1982）。このフラグメント中にはAlu中頻度(middle)反復DNA配列が存在する。最後に、SV40複製起点およびpcD-Xプラスミド由来の初期領域プロモーター－エンハンサー（HindIIからPstIまでのフラグメント）は、（Okayamaら、1983）に記載されている。このフラグメント中のプロモーターは、転写がCMV/hGH発現カセットから進行するような方向に位置づけられる。

pCMVプラスミドは、ポリリンカー領域における差異および翻訳エンハンサーの存在または不在によって互いに区別され得る。開始pCMV１プラスミドは、ポリリンカー領域において増加する数の唯一の(unique)制限部位を与えるように漸次改変されている。pCMV２を作製するために、pCMV１中の２つのEcoRI部位の１つを破壊した。pCMV３を作製するために、pCMV１は、SV40領域から短いセグメント（StuIからEcoRI）を欠失させることにより改変され、そしてそうすることにおいてポリリンカー中のPstI、SalI、およびBamHI部位を唯一とした。pCMV４を作製するために、CMVプロモーターから転写されたmRNAの5'非翻訳領域に対応するDNAの合成フラグメントをＣに付加した。この配列は、ポリペプチド合成における開始因子に対する要求性を減少させることにより、翻訳エンハンサーとして作用する（Joblingら，1987）；Browningら，1988）。pCMV５を作製するために、DNAのセグメント（HpaIからEcoRI）をpCMV１のSV40起点領域から欠失させ、開始ポリリンカー中に全てのユニークな部位を与えた。

pCMVベクターは、サルCOS細胞、マウスＬ細胞、CHO細胞、およびHeLa細胞において首尾良く発現されている。いくつかの匹敵比較において、COS細胞では、SV40を基本としたベクターよりも５～10倍より高い発現レベルが得られた。pCMVベクターは、LDLレセプター、核因子１、Gsαポリペプチド、ポリペプチドホスファターゼ、シナプトフィジン、シナプシン、インスリンレセプター、インフルエンザヘマグルチニン、アンドロゲンレセプター、ステロール26-ヒドロキシラーゼ、ステロイド17-および21-ヒドロキシラーゼ、シトクロームP-450オキシドレダクターゼ、βアドレナリン性レセプター、葉酸レセプター、コレステロール側鎖切断酵素、および他のcDNAの宿主を発現するために用いられている。これらのプラスミドにおけるSV40プロモーターは、優性選択マーカーのような他の遺伝子を発現するために用いられ得ることが銘記されるべきである。最後に、ポリリンカーにおいて、pCMUにおけるHindIII部位とPstIとの間に、偽翻訳開始を引き起こし得るATG配列が存在する。このコドンは、発現プラスミドにおいて、可能であれば避けるべきである。親のpCMV１およびpCMV４ベクターの構築および使用を記載した文献が公開されている（Andersonら，1989b）。

IV. トランスフェクトされた細胞

さらに別の実施態様では、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を阻害または促進する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで形質転換されるか、またはトランスフェクトされた組換え宿主細胞および形質転換またはトランスフェクトされた細胞由来のトランスジェニック細胞を提供する。好ましくは、本発明の組換え宿主細胞は、配列番号１、３、６、または８の配列を含むポリヌクレオチドでトランスフェクトされる。DNA分子のような外因性ポリヌクレオチドで細胞を形質転換またはトランスフェクトする手段は、当該分野で周知であり、そしてリン酸カルシウム-またはDEAE-デキストラン-介在トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム介在トランスフェクション、直接マイクロインジェクション、およびアデノウイルス感染のような技術が挙げられる（Sambrook，FritshおよびManiatis、1989）。

最も広範に用いられる方法は、リン酸カルシウムまたはDEAE-デキストランのいずれかにより介在されたトランスフェクションである。このメカニズムは曖昧なままであるが、トランスフェクトされたDNAは、エンドサイトーシスにより細胞の細胞質に入り、そして核に輸送されると考えられる。細胞のタイプに依存して、培養細胞群の90％までが任意の時間でトランスフェクトされ得る。この高い効率のために、リン酸カルシウムまたはDEAE-

デキストランで介在されたトランスフェクションは、多くの細胞における外来DNAの一過性の発現を必要とする研究のために選択される方法である。リン酸カルシウム介在トランスフェクションはまた、外来DNAのコピーを組み込む細胞株を樹立するために使用される。これらは、通常、宿主細胞ゲノム内にヘッド-テイルタンデム配置(array)で配置される。

プロトプラスト融合法では、目的のプラスミドの多コピーを有する細菌由来のプロトプラストは、培養された哺乳動物細胞と直接混合される。細胞膜の（通常、ポリエチレングリコールを用いる）融合後、細菌の内容物は哺乳動物細胞の細胞質内に送達され、そしてプラスミドDNAは核に輸送される。プロトプラスト融合は、通常、一過性の発現アッセイに用いられる多くの細胞株のトランスフェクションほど効果的ではないが、DNAのエンドサイトーシスが非効率的に生じる細胞株について有用である。プロトプラスト融合は、頻繁に宿主染色体内にタンデムに組み込まれるプラスミドDNAの多数のコピーを生じる。

種々の哺乳動物細胞および植物細胞への短時間の高電圧電気パルスの印加により、原形質膜内にナノメーターサイズの細孔が形成される。DNAは、これらの細孔を通じてか、または細孔の閉鎖を伴う膜成分の再分配としてかの結果のいずれかにより、細胞の細胞質内に直接取り込まれる。エレクトロポレーションは非常に効果的であり、そしてクローン化された遺伝子の一過性の発現と、目的の遺伝子の組み込まれたコピーを有する細胞株の樹立との両方に用いられ得る。エレクトロポレーションは、リン酸カルシウム介在トランスフェクションおよびプロトプラスト融合とは対照的に、頻繁に外来DNAの１個またはせいぜい数個の組み込まれたコピーを有する細胞株を生じる。

リポソームトランスフェクションは、リポソーム内にDNAおよびRNAをカプセル化し、その後、これらのリポソームと細胞膜とを融合することを包含する。DNAが細胞内にどのように送達されるかというメカニズムは不明であるが、トランスフェクション効率は90%もの高さであり得る。

DNA分子の核内への直接マイクロインジェクションは、DNAを低pHエンドソームのような細胞区画に曝さないという利点を有する。従って、マイクロインジェクションは、目的のDNAの組み込まれたコピーを有する細胞株を樹立するための方法として主に用いられる。

細胞トランスフェクションのためのベクターとしてアデノウイルスを使用することは当該分野において周知である。アデノウイルスベクター介在細胞トランスフェクションは、種々の細胞について報告されている（Stratford-Perricaudetら、1992）。

トランスフェクトされた細胞は、原核生物または真核生物であり得る。好ましくは、本発明の宿主細胞は真核生物の宿主細胞であり得る。本発明の好適な組換え宿主細胞は、ネズミのFL5.12細胞である。プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2以外のヒトポリペプチドを産生することが目的である場合、培養された哺乳動物細胞またはヒト細胞が特に目的とされる。

別の局面では、本発明の組換え宿主細胞は原核生物性の宿主細胞である。好ましくは、組換え宿主細胞は、Escherichia coli株の細菌細胞である。一般に、原核生物は、DNA配列の初期のクローニングおよび本発明において有用なベクターの構築に好ましい。例えば、E. coli K12株は特に有用であり得る。用いられ得る他の微生物株としては、E. coli BおよびE. coli χ1776（ATCC番号31537）が挙げられる。これらの例は、限定よりもむしろ例示であることが意図される。

原核生物はまた発現のために有用であり得る。前述の株、ならびにE. coli W3110（F-、λ、プロトトロフ、ATCC番号273325）、Bacillus subtilusのような桿菌、またはSalmonella typhimuriumまたはSerratus marcesansのような他の腸内細菌、および種々のPseudomonas種が用いられ得る。

一般に、宿主細胞と適合する種由来のレプリコンおよび制御配列を含むプラスミドベクターは、これらの宿主と組み合わせて用いられる。ベクターは、通常、複製部位、および形質転換細胞において表現型選択を提供し得るマーキング配列を有する。例えば、E. coliは、E. coli種由来のプラスミドであるpBR322を用いて形質転換され得る（Bolivarら、1977）。pBR322はアンピシリン耐性およびテトラサイクリン耐性に関する遺伝子を含み、従

って、形質転換細胞を同定するための容易な手段を提供する。pBRプラスミド、あるいは他の微生物プラスミドまたはファージはまた、それ自身のポリペプチドの発現のために微生物により用いられ得るプロモーターを含まなければならないか、またはそのプロモーターを含むように改変されなければならない。

組換えDNAの構築において最も一般に用いられるこれらのプロモーターとしては、β-ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）およびラクトースプロモーター系（Changら、1978；Itakuraら、1977；Goeddelら、1979；Goeddelら、1980）ならびにトリプトファン(TRP)プロモーター系（欧州特許出願公報第0036776号；Siebwenlistら、1980）が挙げられる。これらは最も一般的に用いられるが、他の微生物プロモーターが発見および利用され、そしてそれらのヌクレオチド配列に関する詳細が公開され、当業者がプラスミドベクター内に機能的なプロモーターを導入することが可能となった（Siebwenlistら、1980）。

原核生物に加えて、酵母などの真核微生物もまた用いられ得る。Saccharomyces cerevisiaseまたは一般のパン酵母が真核微生物の間で最も一般的に用いられる。しかし、多くの他の株が一般的に利用可能である。Saccharomycesにおける発現のために、例えば、プラスミドYRp7が一般的に用いられる（Stinchcombら、1979；Kingsmanら、1979；Tschemperら、1980）。このプラスミドはすでにtrpI遺伝子を含み、このtrpI遺伝子は、トリプトファン内で生育するための能力に欠けた酵母の変異株（例えば、ATCC番号44076またはPEP4-1（Jones、1977））のための選択マーカーを提供する。次いで、酵母宿主細胞ゲノムの特徴としてのtrpl欠陥の存在は、トリプトファン欠如下での成長による形質転換を検出するための効果的な環境を提供する。

酵母ベクターにおける適切なプロモーター配列としては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ（Hitzemanら、1980）のプロモーター、またはエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼのような他の解糖系酵素（Hessら、1968；Hollandら、1978）が挙げられる。適切な発現プラスミドを構築する際に、これらの遺伝子と関連する終止配列がまた、発現ベクター内の発現されるべき配列の下流に導入され、mRNAのポリアデニル化および終止が提供される。培養条件により転写が調節されるというさらなる利点を有する他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ２、イソシトクロムＣ、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連した分解酵素、および前述のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼのプロモーター領域、ならびにマルトースおよびガラクトースの利用に関与する酵素である。酵母適合性プロモーター、または複製起点、および終止配列を含む任意のプラスミドベクターが適切である。

微生物に加えて、多細胞生物由来の細胞の培養物がまた、宿主として用いられ得る。原則的には、任意のこのような細胞培養物が、脊椎動物培養物由来であっても無脊椎動物培養物由来であっても、機能し得る。しかし、脊椎動物細胞への関心が最も高く、そして培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖は、近年では常法となった（KruseおよびPeterson、1973）。このような有用な宿主細胞株の例は、AtT-20、VEROおよびHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株、ならびにW138、BHK、COSM6、COS-7、293、およびMDCK細胞株である。このような細胞の発現ベクターは、通常、任意の必要なリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終止配列と共に、（必要であれば）複製起点、発現されるべき遺伝子の上流に位置するプロモーターを含む。

哺乳動物細胞に用いるために、発現ベクターの制御機能は、しばしばウイルス性物質から誘導される。例えば、一般に用いられるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス２、サイトメガロウイルス、および最も頻繁にはシミアンウイルス40(SV40)に由来する。SV40の初期プロモーターおよび後期プロモーターが特に有用である。なぜなら、両者は、SV40ウイルス複製起点もまた含むフラグメントとしてウイルスから容易に得られるからである（Fiersら、1978）。より小さいSV40フラグメントまたはより大きいSV40フラグメントもまた用いられ得る（ただし、ウイルス複製起点内に位置するHindIII部位からBglI部位

の方へ伸長する約250bpの配列が含まれる場合）。さらに、所望の遺伝子配列と通常関連したプロモーターまたは制御配列を利用することがまた可能であり、そしてしばしば所望され得る（ただし、このような制御配列が宿主細胞系と適合性である場合）。
複製起点は、SV40または他のウイルス（例えば、ポリオーマ、アデノ、VSV、BPV、CMV）源に由来し得るような外因性起点を含むようにベクターを構築することにより提供され得るか、または宿主細胞染色体複製メカニズムにより提供され得る。ベクターが宿主細胞染色体内に組み込まれる場合には、後者がしばしば充分である。
Ｖ．プログラムされた脊椎動物細胞死に影響する、BCL-2（配列番号５）以外の組換えポリペプチドの調製
さらに別の実施態様では、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死に影響する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドを調製するためのプロセスを意図し、このプロセスは、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて細胞をトランスフェクトし、形質転換された宿主細胞を生成すること；およびポリペプチドの発現に充分な生物学的条件下で、形質転換された宿主細胞を維持することを包含する。好ましくは、形質転換された宿主細胞は真核生物細胞である。あるいは、この宿主細胞は原核生物細胞である。好ましい原核生物細胞は、Escherichia coliのDH5α株の細菌細胞である。さらにより好ましくは、形質転換された細胞内にトランスフェクトされたポリヌクレオチドは、配列番号１および３のヌクレオチド塩基配列を含む（図１）。最も好ましくは、トランスフェクションは、先に開示した発現ベクターを用いて達成される。
このプロセスに用いられる宿主細胞は、本発明の機能的ポリペプチドを発現し得る。好ましい宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣細胞である。しかし、種々の細胞は本発明のプロセスに対して順応性があり、例としては、酵母細胞、ヒト細胞株、および当業者に周知の他の真核生物細胞株が挙げられる。
トランスフェクションに続いて、細胞はプログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドを発現するのに充分な時間、培養条件下で維持される。培養条件は当該分野で周知であり、そしてイオン組成、および濃度、温度、pHなどを包含する。代表的には、トランスフェクトされた細胞は、培養培地内の培養条件下に維持される。種々の細胞のタイプにとって適切な培地は当該分野で周知である。好ましい実施態様では、温度は約20℃～約50℃であり、より好ましくは約30℃～約40℃であり、そしてさらに好ましくは約37℃である。
pHは好ましくは約6.0の値から約8.0の値であり、より好ましくは約6.8の値から約7.8の値であり、そして最も好ましくは約7.4である。容量オスモル濃度は、好ましくは約200ミリオスモル／リットル(mosm/L)～約400mosm/lであり、そしてより好ましくは約290mosm/L～約310mosm/Lである。トランスフェクションおよびコードされたタンパク質の発現に必要とされる他の生物学的条件は当該分野で周知である。
トランスフェクトされた細胞は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2以外のポリペプチドを発現するに充分な時間維持される。適切な時間は、とりわけ用いられる細胞のタイプに依存し、そして当業者により容易に決定可能である。代表的には、維持時間は約２日～約14日である。
組換えポリペプチドは、トランスフェクトされた細胞、またはそれらの細胞が培養される培地のいずれかより回収されるか、または採集される。回収はポリペプチドの単離および精製を包含する。ポリペプチドの単離および精製技術は当該分野において周知であり、そして例えば、沈殿、濾過、クロマトグラフィー、電気泳動などの方法を包含する。
VI．抗体
さらに別の実施態様では、本発明は、本発明のポリペプチドと免疫反応性の抗体を提供する。好ましくは本発明の抗体はモノクローナル抗体である。抗体を調製し、かつ特徴付けるための方法は当該分野において周知である（例えば、Antibodies, ”A Laboratory Manual”、E. HowellおよびD. Lane、Cold Spring Harbor Laboratory、1988を参照のこと）。
手短に言えば、ポリクローナル抗体は、動物を本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオ

チドを含む免疫原を用いて免疫し、そして免疫した動物から抗血清を収集することにより調製される。広範な動物種が抗血清の生産に用いられ得る。代表的には、抗-抗血清の生産に用いられる動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスターまたはモルモットである。ウサギは比較的大量の血液を有するので、ウサギがポリクローナル抗体の生産のために好適に選択される。

当該分野において周知のように、あるポリペプチドまたはポリヌクレオチドの免疫原性は変化し得る。従って、本発明の免疫原（例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド）をキャリアと連結することがしばしば必要である。代表的かつ好適なキャリアは、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)およびウシ血清アルブミン(BSA)である。オボアルブミン、マウス血清アルブミン、またはウサギ血清アルブミンのような他のアルブミンもまた、キャリアとして用いられ得る。

キャリアタンパク質にポリペプチドまたはポリヌクレオチドを複合するための手段は当該分野において周知であり、そしてグルタルアルデヒド、m-マレイミドベンコイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミド、およびビスビアゾ化ベンジジンを含む。

当該分野において周知のように、特定の免疫原に対する免疫原性は、アジュバントとして知られる免疫応答の非特異的刺激剤(stimulator)の使用により増強され得る。代表的かつ好適なアジュバントとしては、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、および水酸化アルミニウムアジュバントが挙げられる。

ポリクローナル抗体の生産に使用される免疫原の量は、とりわけ免疫原の性質および免疫に用いられる動物により変化する。種々のルート（皮下、筋肉内、真皮内、静脈内、および腹膜腔内）が免疫原を与えるために用いられ得る。ポリクローナル抗体の生産は、免疫後種々の時点で、免疫した動物の血液をサンプリングすることによりモニターされる。所望のレベルの免疫原性が得られたら、免疫した動物から採血し得、そして血清を単離および保存し得る。

別の局面では、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドと免疫反応性である抗体を生産するプロセスを意図する。このプロセスは以下の工程を包含する：(a)組換え宿主細胞を、このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトする工程；(b)ポリペプチドの発現に充分な条件下で宿主細胞を培養する工程；(c)このポリペプチドを回収する工程；および(d)このポリペプチドに対する抗体を調製する工程。さらにより好ましくは、本発明は、上記のプロセスにより調製された抗体を提供する。

本発明のモノクローナル抗体は、米国特許第4,196,265号（これは本明細書中において、参考として援用される）に例示されるような周知の技術を用いて容易に調製され得る。代表的には、この技術は、免疫応答を提供するに充分な様式で、選択された抗原（例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド）を用いて適切な動物をまず免疫する工程を包含する。マウスおよびラットのような齧歯類が好適な動物である。次いで、免疫した動物由来の脾臓細胞が不死ミエローマ細胞の細胞と融合される。免疫した動物がマウスである場合、好ましいミエローマ細胞はネズミのNS-1ミエローマ細胞である。

融合脾臓／ミエローマ細胞は選択培地内で培養され、母細胞からの融合脾臓／ミエローマ細胞を選択する。融合細胞は、未融合母細胞の混合物から、例えば、組織培養培地内のヌクレオチドの新たな(de novo)合成を阻止する試薬の添加により分離される。代表的かつ好適な試薬は、アミノプテリン、メトトレキセート、およびアザセリンである。アミノプリテンおよびメトトレキセートは、プリンとピリミジンとの両方の新たな合成を阻止する。これに対し、アザセリンは、プリン合成のみを阻止する。アミノプテリンまたはメトトレキセートが用いられる場合、ヌクレオチド源としてヒポキサンチンおよびチミジンを培地に補給する。アザセリンが用いられる場合、ヒポキサンチンを培地に補給する。

この培養は、特異的なハイブリドーマが選択されるハイブリドーマ群を提供する。代表的には、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレートで単クローン希釈により細胞を培養し、続いて抗原-ポリペプチドとの反応性について、個々のクローナル上清を試験

することにより行われる。次いで、選択されたクローンは無限に増殖されて、モノクローナル抗体を提供する。
特別な実施例として、本発明の抗体を生産するために、本発明のポリペプチドを含む約１μg～200μgの間の抗原をマウスの腹膜腔内に注射する。Ｂリンパ球細胞は、完全フロイントアジュバント（Mycobacterium tuberculosis死菌を含む免疫応答の非特異的刺激剤）のようなアジュバントとともに抗原を注射することにより成長が刺激される。最初の注射のしばらく後（例えば、少なくとも２週間）で、不完全フロイントアジュバントと混合した抗原の第２の用量を注射することによりマウスを追加的に免疫する。
２回目の注射後数週間で、マウスの尾から採血し、そして放射性標識した抗原に対する免疫沈降により血清の力価を測定する。好ましくは、追加免疫および力価測定のプロセスを、適切な力価が達成されるまで繰り返す。最も高い力価を有するマウスの脾臓を摘出し、そして脾臓をシリンジでホモジナイズすることにより脾臓リンパ球を得る。代表的には、免疫したマウス由来の脾臓は、約５×10^7個～２×10^8個のリンパ球を含有する。
ミエローマ細胞として知られる変異リンパ球細胞は実験用動物から得られ、このような細胞は種々の周知の方法により生育が誘発される。ミエローマ細胞には、ヌクレオチド生合成のサルベージ経路がない。ミエローマ細胞は腫瘍細胞であるので、それらは組織培養において無限に増殖し得、従って、不死と呼ばれる。ネズミのNS-1ミエローマ細胞のようなマウスおよびラット由来のミエローマ細胞の多くの培養細胞株が樹立されている。
ミエローマ細胞は、本発明の抗原／ポリペプチドを用いて注射したマウスまたはラットの脾臓由来の正常な抗体産生細胞との融合を促すのに適切な条件下で組み合わされる。融合条件は、例えば、ポリエチレングリコールの存在を包含する。得られた融合細胞はハイブリドーマ細胞である。ミエローマ細胞のように、ハイブリドーマ細胞は培養時に無限に成長する。
ハイブリドーマ細胞は、HAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）のような選択培地で培養することにより未融合ミエローマ細胞から分離される。未融合ミエローマ細胞には、サルベージ経路からのヌクレオチドを合成するのに必要な酵素がない。なぜなら、それらはアミノプテリン、メトトレキセート、またはアザセリンの存在下で死滅しているからである。未融合リンパ球はまた、組織培養において成長し続けない。従って、うまく融合した細胞（ハイブリドーマ細胞）のみが選択培地内で成長し得る。
生存ハイブリドーマ細胞のそれぞれは、単一の抗体を生産する。次いで、これらの細胞は、本発明の抗原／ポリペプチドと免疫反応性である特異的抗体を生産するためにスクリーニングされる。単細胞ハイブリドーマは、ハイブリドーマを限定希釈することにより単離される。ハイブリドーマを引き続き何回も希釈し、そして希釈物を成長させた後、上清をモノクローナル抗体の存在について試験する。次いで、抗体を生産するクローンを大量に培養し、本発明の抗体を都合の良い量で生産する。
本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、本発明の特異的なポリペプチドおよびポリヌクレオチドが抗原として認識され、従って同定され得る。一旦同定されると、これらのポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、抗体アフィニティークロマトグラフィーのような技術により単離され、精製され得る。抗体アフィニティークロマトグラフィーでは、モノクローナル抗体は固形基質と結合し、そして所望の抗原を含有する溶液に曝される。抗原は、結合した抗体との免疫特異的反応を通じて溶液から除去される。次いで、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは基質から容易に除去され、そして精製される。
VII. 薬学的組成物
好ましい実施態様では、本発明は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、および生理学的に受容可能なキャリアを含有する薬学的組成物を提供する。より好ましくは、薬学的組成物は、ポリペプチドBCL-X_L（配列番号７）、BCL-X_S（配列番号９）、またはBCL-X_1（配列番号４）、あるいはこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。
本発明の組成物は、代表的には、所望されるような標準の周知の非毒性で生理学的に受容可能なキャリア、アジュバント、およびビヒクルを含む投薬単位処方物で非経口的に投与

される。本明細書中に用いられる非経口という用語は、静脈内、筋肉内、動脈内注射、または点滴技術を包含する。

注射用調製物（例えば、滅菌注射用水溶液または油性の懸濁液)は、適切な分散剤または湿潤剤および沈殿防止剤を用いる公知の技術により処方される。滅菌注射用調製物はまた、例えば、1,3-ブタンジオールの溶液のような、非毒性で非経口的に受容可能な希釈剤または溶媒の滅菌注射用溶液または懸濁液であり得る。

用いられ得る受容可能なビヒクルおよび溶媒としては、水、リンゲル液、および塩化ナトリウム等張液が挙げられる。さらに、滅菌固定化オイルが溶媒または懸濁媒体として通常使用される。この目的のために、任意の無刺激性(bland)固定化オイルが用いられ得、それらは合成モノ-またはジ-グリセリドを包含する。さらに、オレイン酸のような脂肪酸が注射用調製物に使用されることが見出される。

好ましいキャリアとしては、ホスフェート、ラクテート、トリスなどで緩衝化した中性の生理食塩水溶液が挙げられる。当然、欠陥干渉性アデノウイルス粒子またはエンドトキシンおよび他の発熱物質のような所望しない夾雑物を本質的に含まないようにするために充分にベクターを精製する。その結果、ベクター構築物を受容する個体内の不適切な反応は生じない。ベクターを精製する好ましい手段としては、塩化セシウム勾配遠心分離のような浮遊密度勾配の使用が挙げられる。

キャリアはまたリポソームであり得る。送達ビヒクルとしてリポソームを用いる手段は当該分野において周知である［Gabizonら、1990；Ferrutiら、1986；およびRanade, V.V.、1989を参照のこと］。

トランスフェクトされた細胞もまた、キャリアとして供し得る。例として、肝細胞を生物から摘出し、上記の方法を用いて本発明のポリヌクレオチドでトランスフェクトし、次いで、トランスフェクトされた細胞を（例えば、静脈内に注射して）生物に戻し得る。

VIII. 本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの検出

あるいは、本発明は、本発明のポリペプチドを検出するプロセスを提供する。ここで、このプロセスは、上記のプロセスに従って調製した抗体とポリペプチドとを免疫反応させ、抗体-ポリペプチド結合体を形成する工程、およびこの結合体を検出する工程を包含する。

さらに別の実施態様では、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするメッセンジャーRNA転写物を検出するプロセスを意図する。ここで、このプロセスは以下の工程を包含する：（a）メッセンジャーRNA転写物を、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列とハイブリダイズして二重鎖を形成する工程；および(b)この二重鎖を検出する工程。あるいは、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするDNA分子を検出するプロセスを提供する。ここで、このプロセスは以下の工程を包含する：(a) DNA分子を、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズして二重鎖を形成する工程；および(b)この二重鎖を検出する工程。

IX. スクリーニングアッセイ

さらに他の局面では、本発明は、本発明の機能性ポリペプチドを含む細胞を提供する工程および選択された物質がその細胞のプログラムされた脊椎動物細胞死に影響を与える能力を試験する工程を包含する、プログラムされた脊椎動物細胞死に影響を与える能力について物質をスクリーニングするプロセスを意図する。

本発明の方法および組成物を用いて、候補物質を試験するためのスクリーニングアッセイが誘導され得る。候補物質は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害するBCL-2以外のポリペプチドとの結合または他の分子内相互作用によってプログラムされた脊椎動物細胞死を潜在的に促進または阻害し得る物質である。

本発明のスクリーニングアッセイは、一般に、プログラムされた脊椎動物細胞死を阻害または促進する候補物質を同定するために候補物質をスクリーニングするような、候補物質が標的細胞の生存能力に影響を与える能力（プログラムされた脊椎動物細胞死に対する感受性）を測定することを包含する。標的細胞は、本発明のポリペプチドを含むことが公知の天然由来の細胞または以下に記載の形質転換プロセスに従って生成される形質転換細胞

のいずれかであり得る。
当該分野で周知のように、スクリーニングアッセイは、プログラムされた脊椎動物細胞死の試験に適切な条件下で細胞を提供する。これらの条件としては、pH、温度、張度(tonicity)、プログラムされた脊椎動物細胞死に関与する関連因子（例えば、増殖因子、IL-3）の存在、およびグリコシル化またはプレニル化のようなポリペプチドに関連する修飾が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のポリペプチドは原核細胞または真核細胞で発現され、そして使用され得ることが意図される。宿主細胞もまた、レセプターが見出され得る細胞以下の画分に分画され得る。例えば、ポリペプチドを発現する細胞は、細胞の核、小胞体、小胞、または膜表面に分画され得る。
pHは、好ましくは約6.0～約8.0の値であり、より好ましくは約6.8～約7.8の値であり、そして最も好ましくは約7.4である。好ましい実施態様においては、温度は約20℃～約50℃であり、より好ましくは約30℃～約40℃であり、そしてさらにより好ましくは約37℃である。容量オスモル濃度は、約５ミリオスモル／リットル（mosm/L）～約400mosm/Lであり、より好ましくは約200ミリオスモル／リットル～約400mosm/Lであり、そしてさらにより好ましくは、約290mosm/L～約310mosm/Lである。因子の存在は、特定の細胞におけるプログラムされた脊椎動物細胞死の適切な試験のために必要であり得る。このような因子としては、例えば、増殖因子、インターロイキン、またはコロニー刺激因子の存在および欠如（停止(withdrawal)）が挙げられる。
１つの実施態様では、本発明の１つまたはそれ以上のポリペプチドと相互作用する選択的な能力を有するが、そのポリペプチドが本明細書中で同定される他のポリペプチドと実質的に重複活性を有さない候補物質を識別し得るスクリーニングアッセイが設計される。
Ａ．本発明のポリペプチドのスクリーニングアッセイ
本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害するBCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドの存在について生物学的試料をスクリーニングするプロセスを提供する。スクリーニングされるべき生物学的試料は、細胞外液または細胞内液のような生物学的液体もしくは細胞または組織抽出物あるいはホモジネートであり得る。生物学的試料はまた、単離細胞（例えば、培養中の）あるいは組織試料または組織学的試料におけるような細胞の集合物であり得る。組織試料は、液体培地に懸濁され得るか、または顕微鏡スライドガラスのような固体支持体上に固定され得る。
スクリーニングアッセイプロセスに従って、生物学的試料をその存在をアッセイするポリペプチドと免疫反応性の抗体に曝露する。代表的には、曝露は、抗体および候補ポリペプチドの両方を含有する液体培地中で混合物を形成することにより達成される。抗体またはポリペプチドを有する試料のいずれかを固体支持体（例えば、カラムまたはマイクロタイタープレート）に付着させ得る。
生物学的試料を生物学的反応条件下、抗体－ポリペプチド結合体形成に充分な時間抗体に曝露する。生物学的反応条件としては、イオン組成および濃度、温度、pHなどが挙げられる。
イオン組成および濃度は、蒸留水のそれからNaClの２モル溶液までの範囲に渡り得る。好ましくは、容量オスモル濃度は、約100mosmols/l～約400mosmols/lであり、より好ましくは、約200mosmols/l～約300mosmols/lである。温度は、好ましくは約４℃～約100℃であり、より好ましくは約15℃～約50℃であり、そしてさらにより好ましくは約25℃～約40℃である。pHは、好ましくは約4.0～約9.0であり、より好ましくは約6.5～約8.5であり、さらにより好ましくは約7.0～約7.5である。生物学的反応条件の唯一の制限は、選択した条件によって抗体－ポリペプチド結合体形成が起こされることと、その条件が抗体またはポリペプチドのいずれにも不利に影響しないことである。
曝露時間は、特に、用いられる生物学的条件、抗体およびポリペプチドの濃度、ならびに試料の性質（例えば、液体試料か組織試料か）によって変わる。曝露時間を決定する手段は当業者に周知である。代表的には、試料が液体であり、かつ試料中のポリペプチド濃度が約10^{-10}Mである場合、曝露時間は約10分～約200分である。
抗体－ポリペプチド結合体の形成および存在を検出することにより、試料中のポリペプチ

ドの存在が検出される。このような抗体－抗原（例えば、レセプターポリペプチド）結合体または複合体を検出する手段としては、当該分野で周知であり、そして遠心分離、アフィニティークロマトグラフィーなどの手順が挙げられ、２次抗体を抗体－候補レセプター複合体に結合させる。

１つの実施態様では、検出は、抗体に付着させたインジケーターを検出することによって達成される。代表的であり、かつ周知のこのようなインジケーターとしては、放射性標識（例えば、^{32}Ｐ、^{125}Ｉ、^{14}Ｃ）、２次抗体、または西洋ワサビペルオキシダーゼのような酵素が挙げられる。インジケーターを抗体に付着させる手段は当該分野で周知である。市販のキットが利用可能である。

Ｂ．抗ポリペプチド抗体のスクリーニングアッセイ

他の局面では、本発明は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害するBCL-2（配列番号５）以外のポリペプチド（例えば、BCL-X_L（配列番号７）、BCL-X_S（配列番号９）、またはBCL-X_1（配列番号４））と免疫反応性である抗体の存在について生物学的試料をスクリーニングするプロセスを提供する。このようなプロセスに従って、生物学的試料を、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害するBCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドに、生物学的条件下、抗体－ポリペプチド結合体形成に充分な時間曝露し、形成された結合体を検出する。

Ｃ．プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのスクリーニングアッセイ

DNA分子、および特にプローブ分子は、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドをコードすると考えられるDNAソースにオリゴヌクレオチドプローブとしてハイブリダイズするために用いられ得る。このプロービングは、通常、アポトーシス遺伝子を有すると考えられるDNAソースにオリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることによって達成される。プローブは単一のプローブのみで構成される場合もあり、特定のアミノ酸配列またはポリペプチド配列に基づくプローブ集合物で構成され、遺伝コードに固有の重複性がそれらの多様性で説明される場合もある。

このようなプロービングに適切なDNAのソースは、本発明のポリペプチドを発現し得、目的の細胞株のゲノムライブラリーであり得る。あるいは、DNAのソースは、目的の細胞株由来のDNA全体を含み得る。本発明のハイブリダイゼーションプロセスが一旦候補DNAセグメントを同定すると、さらなるハイブリダイゼーション、制限酵素マッピング、配列決定および／または発現、ならびに試験によりポジティブクローンが得られることが確認される。

あるいは、このようなDNA分子は、以下のような使用を包含する多数の技術に用いられ得る：(1)患者の細胞由来のDNAにおいて正常または異常DNA配列を検出するための診断ツール；(2)このような配列を潜在的に含むDNAライブラリー由来のポリペプチドファミリーの他のメンバーおよび関連ポリペプチドを検出および単離するための手段；(3)これらの配列の増幅を目的として関連配列にハイブリダイズするためのプライマー；(4)天然のアポトーシスDNA配列を改変するためのプライマー；およびこれらのDNA配列が本明細書中に開示したDNAセグメントの配列と類似していることに基づく他の技術。

上記のように、ある局面では、本発明によって提供されるDNA配列情報は、選択されたアポトーシス遺伝子をコードする配列と特異的にハイブリダイズする比較的短いDNA（またはRNA）配列（例えば、プローブ）の調製を可能にする。これらの局面では、適切な長さの核酸プローブは、本発明のポリペプチドのコード配列を考慮して調製される。このような核酸プローブが、他のコード配列に特異的にハイブリダイズする能力は、これらに多様な実施態様における特別な有用性を与える。最も重要なのは、これらのプローブが、ある試料の相補配列の存在を検出するための種々のアッセイに用いられ得ることである。しかし、変異種プライマー、または他の遺伝子構築物の調製に用いるプライマーの調製のための配列情報の使用を包含する使用が意図される。

本発明に従う特定の利点を提供するために、ハイブリダイゼーションの研究またはアッセイに用いられる好ましい核酸配列は、図１に示す配列のような、少なくとも14～40または

本発明の核酸配列のヌクレオチド長に相補的なプローブ配列を含む。長さが少なくとも14ヌクレオチドのサイズは、フラグメントが安定かつ選択的な二重鎖分子を形成するに充分な長さであることを確実にするのに役立つ。しかし、ハイブリッドの安定性と選択性とを増大させ、それにより得られる特異的ハイブリッド分子の質と程度を向上させるためには、14を超える塩基長にわたる相補配列を有する分子が一般に好ましい。一般に、14～20ヌクレオチドまたは所望の場合にはそれより長いヌクレオチドの遺伝子相補長を有する核酸分子を設計することが好ましい。このようなフラグメントは、例えば、化学的手段、核酸再生技術の応用（例えば、本明細書中で参考として援用される米国特許第4,603,102号のPCR技術）、または組換え産生のための組換えベクター内に選択配列を導入することによってフラグメントを直接合成することにより容易に調製され得る。

従って、本発明のヌクレオチド配列は、遺伝子の相補長を有する二重鎖分子を選択的に形成する能力のために用いられ得る。意図される応用によって、標的配列に対するプローブの選択性の種々の程度を達成するために、種々のハイブリダイゼーションの条件が用いられる。高い選択性が必要な応用では、代表的には比較的ストリンジェントな条件が、ハイブリッドを形成するために用いられる。例えば、0.02M～0.15MのNaClにより50℃～70℃の温度で与えられるような、比較的低塩および／または高温条件が選択される。このような条件は、特に選択性であり、そしてプローブとテンプレートまたは標的鎖との間のミスマッチを、もしあるとしてもほとんど許容しない。

当然、応用の中には、例えば、基礎となるテンプレートにハイブリダイズした変異プライマー鎖を用いて変異体を調製することを所望する場合、または関連種、機能性等価物などに由来するポリペプチドコード配列を単離しようとする場合には、ヘテロ二重鎖を形成させるために、あまりストリンジェントでないハイブリダイゼーション条件が代表的には必要である。このような環境下では、0.15M～0.9Mの塩、20℃～55℃の範囲の温度のような条件が用いられる。そのため、クロスハイブリダイズする種は、コントロールのハイブリダイゼーションに関してポジティブにハイブリダイズするシグナルとして容易に同定され得る。いずれにしても、ホルムアルデヒドの量を増やして添加すること（これは、温度を上げるのと同様にハイブリッド二重鎖を不安定化するように作用する）により、条件をよりストリンジェントにし得ることが一般に認められる。このように、ハイブリダイゼーション条件は容易に操作され得、従って一般に所望の結果に依存する選択方法である。

特定の実施態様では、本発明の核酸配列を、ハイブリダイゼーションを測定するための適切な手段（例えば、標識）と組み合わせて用いることに利点がある。多様な適切なインジケーター手段が当該分野で公知であり、検出可能なシグナルを与え得る、放射性リガンド、酵素リガンド、またはアビジン／ビオチンのような他のリガンドが包含される。好ましい実施態様では、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、またはペルオキシダーゼのような酵素標識を、放射性試薬または他の環境的に望ましくない試薬の代わりに用いるようである。酵素標識の場合には、相補的核酸含有試料で特異的ハイブリダイゼーションを同定するために、肉眼でまたは分光学的に可視的な手段を与えるのに用いられ得る比色測定用インジケーター基質が知られている。

一般に、本明細書中に記載のハイブリダイゼーションプローブは溶液ハイブリダイゼーションの試薬および固相を用いる実施態様での試薬として有用であることが意図される。固相を含む実施態様では、試験DNA（またはRNA）を含む試料を、選択したマトリックスまたは表面に吸着または付着させる。次いで、この固定された一本鎖核酸を所望の条件下で選択したプローブと特異的ハイブリダイゼーションにかける。選択条件は、特に、（例えば、G＋C含有量、標的核酸のタイプ、核酸のソース、ハイブリダイゼーションプローブのサイズなどに依存して）必要な特別な基準に基づく特別な環境に依存する。ハイブリダイズした表面を洗浄して非特異的に結合したプローブ分子を除去した後、標識を介して、特異的ハイブリダイゼーションを検出し、さらに定量も行う。

X．アッセイキット

他の局面では、本発明は、生体試料内の本発明のポリペプチドの存在を検出するための診断アッセイキットを意図する。ここで、このキットは、ポリペプチドと免疫反応し得る1

次抗体を含有する第１の容器を含み、この１次抗体は、少なくとも１回のアッセイを行うに充分な量で存在する。好ましくは、本発明のアッセイキットは、さらに１次抗体と免疫反応する２次抗体を含有する第２の容器を含む。さらに好ましくは、本発明のアッセイキットに用いられる抗体は、モノクローナル抗体である。さらに一層好ましくは、この１次抗体は固体支持体に付着している。より一層好ましくは、１次および２次抗体はインジケーターを含み、好ましくはこのインジケーターは放射性標識または酵素である。

本発明はまた、薬剤をスクリーニングするための診断キットを意図する。このようなキットは、本発明のポリペプチドを含有し得る。このキットは、薬剤と本発明のレセプターとの相互作用を検出するための試薬を含有し得る。提供される試薬は、放射性標識され得る。このキットは、本発明のレセプターと結合または相互作用し得る公知の放射性標識因子を含有し得る。

他の局面では、本発明は、生物学的試料内の本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在を検出するための診断アッセイキットを提供する。このキットは、配列番号１および３の少なくとも10個の連続するヌクレオチド塩基のセグメントと同一または相補的な第２のポリヌクレオチドを含有する第１の容器を含む。

他の実施態様では、本発明は、生物学的試料内の本発明のポリペプチドと免疫反応性の抗体の存在を検出するための診断アッセイキットを意図する。このキットは、プログラムされた脊椎動物細胞死を促進または阻害し、抗体と免疫反応性である、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドを含有する第１の容器を含む。このポリペプチドは、少なくとも１回のアッセイを行うに充分な量で存在する。このキットの試薬は、液体溶液として提供され得るか、固体支持体に付着され得るか、または乾燥粉末として提供され得る。好ましくは、試薬が液体溶液として提供されるときには、この液体溶液は水溶液である。好ましくは、提供される試薬が固体支持体に付着されるときには、固体支持体はクロマトグラフ媒体または顕微鏡スライドガラスであり得る。提供される試薬が乾燥粉末であるときには、粉末は適切な溶媒の添加により再構成され得る。この溶媒は提供され得る。

ＸＩ．プログラムされた細胞死（アポトーシス）の遺伝子治療による処置

この実施例では、アポトーシスの防止または処置に関するbcl-x_L（配列番号６）、bcl-x_s（配列番号８）、またはbcl-x_1（配列番号６の位置510～698）の遺伝子治療を記載する。これらの細胞は、ニューロン細胞、免疫系細胞、および癌細胞または腫瘍細胞を包含するが、これらには限定されない。

さらに他の局面では、本発明は、細胞におけるプログラムされた細胞死を改変する方法を意図し、以下の工程を包含する：

(a)細胞にプログラムされた脊椎動物細胞死を阻害または促進する、BCL-2（配列番号５）以外のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、有効量のDNA分子を送達する工程；および

(b)該ポリペプチドの発現に充分な条件下に細胞を維持する工程。

好ましい実施態様では、ポリペプチドは、BCL-X_L（配列番号７）、BCL-X_s（配列番号９）、またはBCL-X_1（配列番号４）である。送達は、好ましくは、細胞内にDNA分子を注入することにより達成される。細胞が被験者内にあるときには、送達は、好ましくはDNA分子を被験者の循環系内に投与することである。好ましい実施態様では、投与は以下の工程を包含する。

(a)DNA分子を含むビヒクルを提供する工程；および

(b)被験者にこのビヒクルを投与する工程。

ビヒクルは、好ましくはDNA分子で形質転換またはトランスフェクトされた細胞、またはそのような形質転換またはトランスフェクトされた細胞に由来するトランスフェクト細胞である。代表的かつ好ましい形質転換またはトランスフェクト細胞は、腫瘍浸潤リンパ球のような白血球、またはＴ細胞、または処置される腫瘍由来の腫瘍細胞である。本発明のDNA分子で細胞を形質転換またはトランスフェクトする手段は上述している。

ヒトリンパ球もまた、レトロウイルス介在遺伝子転移（Overellら、1991; Fauserら、1991）を包含する既存の技術を用いて、放射線誘導プラスミド構築物でトランスフェクトさ

れ得る。代表的な実施態様では、ある好ましい程度で問題の腫瘍部位にホームイン(homein)する傾向はあるがこれらはまた身体の他の位置にこれら自体を分配することが公知であるLAK細胞が、腫瘍を標的するのに用いられ得る。実際、放射線により誘導可能な系の最も重要な利点の１つは、放射線場にあるこれらのLAK細胞のみが活性化され、そして外因性導入リンパ球遺伝子を活性化させることである。従って、LAK細胞の場合には、さらに標的を行う必要は特にない。

あるいは、ビヒクルは、特異的に腫瘍の抗原と感染または免疫反応するウイルスまたは抗体である。宿主標的細胞に構築物を送達するために用いられるレトロウイルスは、3'LTR（直鎖状転移領域）が不活性化されたウイルスである。すなわち、これらは、エンハンサーのない3'LTRであり、しばしばSIN（自己不活性化ウイルス）と称される。なぜなら、宿主細胞内への産生性感染の後、3'LTRは、5'末端に転移され、ウイルスLTRは両方とも転写活性に関して不活性であるからである。当業者に周知のこれらのウイルスを使用して、クローンした遺伝子の調節因子が２つのLTRの間の空間に挿入されている遺伝子をクローニングする。ウイルス感染系の利点は、適切な受容体細胞、例えば、LAK細胞内への非常に高いレベルでの感染を可能にすることである。

ウイルス構築物は、本発明に用いられる構築物の特性を維持しながら、標的組織の細胞に構築物を到達させる任意の方法で宿主内に送達される。例として、ラット神経膠腫細胞株であるC6-BU-1は、単純ヘルペスウイルス１型(HSV-I）および２型（HSV-2)に対する異なる罹病率を示す。すなわち、これまで試験したHSV-1株は、この細胞系で生存するが、HSV-2株は生存しなかった(Sakihamaら、1991)。C6-BU-1細胞は、HSV-1の罹病率の不均一な部分集団からなり、これらは恐らく相互変換し得る。さらに、HSV-1 tk遺伝子を有するC6由来細胞から産生された腫瘍の成長は、ガンシクロビル(ganciclovir)の腹腔内投与により阻害され得たが、親のC6細胞は阻害され得なかった（Ezzeddineら、1991）。この研究は、脳腫瘍細胞を感作するに際してHSV-1 tk遺伝子により発現されたチミジンキナーゼのヌクレオシドアナログの毒性効果に対する有効性を示した。レトロウイルスベクターは、このように、このキラー遺伝子の神経系で分裂している腫瘍細胞への選択的送達において有用であることが証明できるはずである。この場合、ほとんどの内因性細胞は分裂しない。放射線は、照射領域でのみtk遺伝子の転写物の送達または活性化の特異性を増強するために用いられる。

抗体は、DNA分子を標的および送達するために用いられている。N-末端修飾ポリ-L-リジン(NPLL)-抗体結合体は、プラスミドDNAと容易に複合体を形成する(Trubetskoyら、1992)。NPLLと結合した細胞表面トロンボモジュリン(thrombomodulin)に対するモノクローナル抗体の複合体を用いて、抗原発現性マウス肺内皮細胞株とマウス肺に対する外来プラスミドDNAを標的した。これらの標的された内皮細胞は、その外来DNAにコードされた産生物を発現した。

遺伝子治療用の標的細胞は、正常細胞または構成遺伝子の適切な制御下にない細胞であり得る。例えば、多数の細胞は、正常な発達および自己の維持の間に死滅する。癌組織または腫瘍組織は、細胞が死滅できないときに発達する。さらに、神経変性性疾患は、未成熟神経細胞死と関係している。さらに、免疫系細胞の未成熟死は、自己免疫疾患と関係している。

好ましい神経細胞は、中枢神経系の任意の細胞である。この神経細胞タイプは、正常なニューロンまたはアポトーシスしそうなニューロンであり得る。特に、神経変性疾患（例えば、パーキンソン氏病、筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic Lateral Sclerosis)、および多発硬化症）と関連するニューロン細胞が意図される。

好ましい免疫細胞は、免疫系の任意の細胞である。この細胞タイプは、正常な免疫系細胞またはアポトーシスしそうな細胞であり得る。この細胞は、Ｂリンパ球またはＴリンパ球、白血球、および胸腺細胞を包含するがこれらには限定されないことが意図される。

好ましい癌細胞または腫瘍細胞は、任意の癌細胞または腫瘍細胞である。この細胞タイプは、アポトーシスしない任意の細胞であり得る。癌細胞は、前立腺癌、乳癌、免疫系の癌、骨癌、および中枢神経の腫瘍を包含するがこれらには限定されないことが意図される。

bcl-x_L（配列番号６）、bcl-x_s（配列番号８）、またはbcl-x_1（配列番号６の位置510～698）を含む発現ベクターは、ニューロン細胞、ガン細胞、免疫系細胞、またはアポトーシスの処置が所望される他の細胞内に導入され得る。当業者は、標的細胞タイプの適切なベクターを選択し得る。

特定の例として、変異HSV-1ウイルスが、ニューロン細胞内に遺伝子を導入するためのベクターとして用いられ得る。本発明のこの実施態様は、代替ウイルスまたはファージベクターを用いて実施され得る。これらには、ウイルスを非病原性にするためにゲノムが別の方法で操作されたレトロウイルスベクターおよびワクシニアウイルスが包含される。このようなウイルス変異を生成する方法は、米国特許第4,769,331号に記載されており、これを本明細書中で参考として援用する。多効力神経細胞株がbcl-x_Lまたはbcl-x_s遺伝子をCNSに送達するために用いられ得ることもまた意図される。これらの手順は、胎児CNS起源または生後CNS起源の細胞を取り、それらをインビトロで不死化および形質転換し、それらの細胞をマウスの脳内に戻す移植をすることを含む。これらの細胞は、グラフト化の後、正常な脳細胞の発達の移動パターンおよび環境によるキューに従い、非腫瘍形成性で細胞構築学的に適切な様式で分化する。この研究は、幾つかの文献、特にSnyderら、Cell, 68: 33-51, 1992、およびRanfranzら、Cell, 66: 713-729, 1991に示されている。適切に改変された技術を用いて、bcl-x_Lまたはbcl-x_s遺伝子を単独でまたは目的の他の遺伝子と組み合わせて細胞内に導入し、グラフトすることが可能である。このような技術により、そのままの部位に遺伝子が送達される。これらのニューロンにおけるbcl-x_L、bcl-x_s、またはbcl-x_1遺伝子の適切な発現の結果、神経変性での細胞死が防止され、そして遺伝子治療に適切な外来遺伝子を有する細胞が維持される。

XII. 本発明のポリペプチドによるプログラムされた細胞死（アポトーシス）の処置

実施例２および３に示した典型的な目的について記載した遺伝子治療法の代替法として、プログラムされた細胞死をしているかまたはしそうなニューロン細胞はまた、bcl-x_L、bcl-x_s、またはbcl-x_1遺伝子により発現させたタンパク質、すなわちBCL-X_L（配列番号７）、BCL-X_s（配列番号９）、またはBCL-X_1（配列番号４）で処置され得る。あるいは、生物学的に機能が等価なタンパク質がこのような処置に用いられ得る。

例えば、BCL-X_L（配列番号７）、BCL-X_s（配列番号９）、またはBCL-X_1（配列番号４）は、このタンパク質を発現する細胞から単離され、Ackermanら(J. Virol., 58: 843-850, 1986,本明細書中で参考として援用する）により記載された通常のクロマトグラフィーによる精製および免疫アフィニティー精製を用いて精製される。次いで、精製したタンパク質を、緩衝化生理食塩水または精製蒸留水のような薬学的に適切なキャリアと組み合わせる。投与に際しては、薬学的組成物を幾つかの方法の１つで注入し得る。適切なものとして、以下のものがある；(i)脊椎内注射；(ii)脳室内注射；(iii)プログラムされた細胞死をしているかまたはしそうなニューロンを含む領域内への直接注射、または当業者に理解される任意の適切な投与方法。このような処置は、重篤な(severed)末梢神経の外科的修復において特に適切であり、治療剤としてこのタンパク質を用いることは本明細書に関する医療分野の現在の技術水準内で十分である。

以下の実施例は、本発明の好適な実施態様を例示するために含まれるものである。以下の実施例の特定の局面を、本発明の実施を良好に行うために、本発明において見出されそして意図される技術および手順について記載する。これらの実施例を、発明者の標準的な実験の実施を用いることにより示す。本発明の開示および当該分野の一般的水準に関し、以下の実施例が単に例示であり、本発明の精神および範囲から逸脱することなく多数の変化、改変、および変更が行われ得ることを当業者は認識する。

実施例I:bcl-xのクローニング

鳥類のリンパ球は、２つの異なる器官、ファブリシウスの粘液嚢および胸線内で発達する。これらの器官内で発達するＢ細胞およびＴ細胞は、両方の位置（location）由来の細胞が、その器官の間質構成成分からの除去の際にプログラムされた細胞死の迅速な誘導を経験する点において共通の特徴を有する（Cooperら、1991；Neimanら、1991）。本発明者らは、ネズミbcl-2 cDNAプローブを鳥類のbcl-xをクローニングするために使用した。bcl-x

のヌクレオチド配列（配列番号１および３）は、bcl-2との低レベルの配列同一性（56%）を示し、そしてヒトおよびマウスの両方のbcl-2遺伝子由来のスプライシングされていないbcl-2b転写物において見いだされた読み取り枠と有意な類似性を示す読み取り枠を含んでいた（図1AおよびB）。bcl-xを含むゲノムフラグメントの配列決定は、1.3kbのcDNAがまた、スプライシングの非存在下で直線状のゲノム配列から生じることを示した。この配列のこの特徴は、bcl-x cDNAが鳥類のゲノム内に存在する、加工処理をされていない偽遺伝子（pseudogene）から生じ得る可能性をもたらす。

実施例II：bcl-xは、多くの組織内で発現され、そして脊椎動物の進化において高度に保存されている

新たに孵化したニワトリから単離した種々の組織RNA試料のノーザンブロット解析は、bcl-x特異的プローブが胸線および中枢神経系に最高レベルで存在する2.7kbのmRNA種とハイブリダイズすることを明らかにした（図２）。対照的に、ネズミbcl-2特異的プローブは、アッセイされた全ての組織においてほぼ等しいレベルで存在する約6.5kbのmRNA種を認識した。

bcl-xは、ニワトリ、マウスおよびヒトゲノムにおいて高度に凝縮されている。ニワトリbcl-xおよびbcl-2プローブは、３種すべてに由来するDNAと効率的にハイブリダイズした。しかし、bcl-xおよびbcl-2プローブは、ゲノムDNAの異なるセグメントに結合した。このことは、これらが独立した配列を認識していることを示している。この両方の配列は、脊椎動物の進化の間に高度に保存されてきた（図３）。

実施例III：２つの異なるヒトbcl-x cDNAの同定

次いで、本発明者らは、bcl-xのヒト相同体をクローニングした。彼らは、同一の5'および3'の非翻訳配列により挟まれる異なる読み取り枠を含む２つの異なるタイプのヒトbcl-x cDNAを同定した。より長いタイプのcDNAである$bcl\text{-}x_L$（配列番号６）は、読み取り枠（配列番号７）を、ニワトリbcl-x（配列番号２）との76%より大きいヌクレオチド同一性および74%より大きいアミノ酸同一性（85%のアミノ酸類似性）で含んでいた。しかし、ヒト$bcl\text{-}x_L$（配列番号６）のcDNAは、bcl-2の２つのコーディングエキソンがbcl-2a転写物を生成するために連結する場所、およびbcl-2aがbcl-2bから分かれる場所に対応する位置でニワトリbcl-x（配列番号１および３）配列から分かれた。bcl-2遺伝子に帰すると以前からされている機能的な活性をコードするのはbcl-2a転写物である。ニワトリbcl-x配列からの分岐という観点から、ヒト$bcl\text{-}x_L$の読み取り枠（配列番号７）は、終止コドンに達する前に別の45アミノ酸を伸長する。これらの新規なアミノ酸８個のうち最初の７個は、bcl-2の第２のコーディングエキソンによってコードされ、そしてヒトおよびマウスの両方のbcl-2b mRNAではなくbcl-2a mRNA中に存在するアミノ酸と同一であった（図４ａ；Tsujimotoら、1986；Negriniら、1987）。$bcl\text{-}x_L$によってコードされる最後の36個のアミノ酸もまた、bcl-2タンパク質の細胞質膜への挿入においてある役割を担っていると考えられるbcl-2aの疎水性領域（Chen-Levyら、1989；Chen-LevyおよびCleary、1990）に有意な配列類似性を示した。mRNAプロセッシングの結果としてのこれら新規な$bcl\text{-}x_L$配列の付加と矛盾せずに、$bcl\text{-}x_L$の最後の45個のアミノ酸をコードするゲノム配列は、読み取り枠の残りをコードするエキソンとは別のエキソン上に見い出される。

同定された第２のタイプのヒトbcl-x由来cDNA（図４ｂ）である$bcl\text{-}x_S$（配列番号８）は、$bcl\text{-}x_L$（配列番号６）とは異なる。なぜなら、$bcl\text{-}x_S$は、$bcl\text{-}x_L$読み取り枠（配列番号７）（この領域は、図４ｃにおいて$BCL\text{-}X_1$（配列番号４）として示される）内に存在する63個のアミノ酸の伸長領域（stretch）をコードする配列を欠いているからである。この欠失は、$bcl\text{-}x_L$（配列番号６）において観察される第２のコーディングエキソンのスプライシングの結果として、第１コーディングエキソン内のより近位の5'スプライシングドナーに対して生じる。第２コーディングエキソン由来の45個のアミノ酸の付加は、$bcl\text{-}x_L$の読み取り枠内に位置するスプライシングドナー部位であるAG/GTの位置で正確に始まる。$bcl\text{-}X_S$ cDNAを生成することにおけるこのスプライシングドナー部位の使用は、bcl-2とbcl-xとの間の最大類似性を示す63個のアミノ酸配列の欠失を生じる。$BCL\text{-}X_S$によってコードされるこのアミノ酸配列（配列番号９）は、ヒトBCL-2（配列番号５）における同じ領域

と73%同一性を示す。BCL-2のこの領域はまた、ニワトリ、ネズミ、およびヒトBCL-2の間で最も高度に保存される領域である（Cazals-Hatemら、1992；Eguchiら、1992）。
bcl-x_Lおよびbcl-x_Sを、RNAに転写し、次いでインビトロ翻訳に使用した。図５に見られるように、bcl-x_Sおよびbcl-x_S cDNAの両方は、読み取り枠により予想されるおよそのサイズの翻訳産物を生じる。
実施例IV：bcl-x_Lは、アポトーシス性細胞死のインヒビターとして働き得る
ネズミIL-3依存性プロリンパ球細胞株FL5.12を、pSFFV-Neo発現プラスミドのEcoRIクローニング部位中に挿入されたヒトbcl-x_L cDNA（配列番号６）でトランスフェクトした。細胞を、10日間のネオマイシン耐性に関して選択し、次いでIL-3の除去後アポトーシスに対するそれらの耐性を試験するためにポリクローナル集団として使用した。bcl-x_L-トランスフェクト細胞は、親細胞株およびネオマイシン-トランスフェクトコントロール細胞と比較して類似の成長速度論を有した。比較のために、細胞をまた、pSFFV-NeoのEcoRIクローニング部位中に挿入したヒトbcl-2a読み取り枠でトランスフェクトした。次いで、ネオマイシン耐性細胞をIL-3欠乏にさらし、そして生存細胞の数を、IL-3欠乏の時間から開始した３重の実験において計算した。
図６において見られ得るように、ネオマイシン構築物単独でトランスフェクトしたFL5.12細胞は、成長因子除去後迅速な細胞死を経験する。一連の実験により、これらの細胞は、以前に報告（Hockenberyら、1990；Nunezら、1990）されたように形質膜の水膨れ（blebbing）、細胞容積の消失、核の凝縮、およびヌクレオソームの間隔での核DNAの崩壊により証明されるアポトーシスを経験したことが明らかになった。対照的に、bcl-2-トランスフェクト細胞は、細胞死に対して有意な耐性を示し、そしてIL-3の再添加により細胞周期へ再び入ることを容易に誘導され得る。95%を超えるバルクトランスフェクトされた細胞（bulk transfected cell）におけるbcl-2の発現は、bcl-2に特異的なモノクローナル抗体を用いる特異的な染色により示された。
安定なbcl-x_Lトランスフェクタントを、IL-3欠乏にさらした場合、それらは、細胞死に対して劇的な耐性を示し、８日間の培養期間にわたって細胞生存率の喪失は本質的になかった。細胞死に対するこの耐性は、同様な時間期間にわたる、再現性のある生存細胞数の50%減少がみられたbcl-2-トランスフェクト細胞の耐性より有意に強かった（図６）。bcl-2とbcl-x_Lとの同時トランスフェクションは、bcl-x_L単独でのトランスフェクションの細胞生存を超えて細胞の生存を改善しなかった。bcl-x_L-トランスフェクト細胞の劇的な生存は、成長因子非依存性細胞増殖の形質転換または誘導の結果として進行中の細胞増殖が原因ではなかった。IL-3欠乏の後、細胞は、細胞サイズおよびDNA含有量によって測定した場合の細胞周期にG0/G1期に留まる静止状態の表現型を素早くとり、そしてIL-3が再添加されるまで細胞周期の再び入らなかった。IL-3の再添加により、素早い芽細胞形質転換および細胞周期の進行が導かれる。これらのデータは、bcl-x_Lの発現が、少なくともbcl-2によって与えられる耐性と同程度に強いアポトーシス的な細胞死に対する有意な耐性を導き得ることを示す。bcl-x_L-トランスフェクト細胞のこの性質は、IL-3非依存性細胞成長を生じる細胞の形質転換に起因するようには見えない。
bcl-x_Lの安定なトランスフェクションは、IL-3依存性細胞株の成長因子の欠乏に続くアポトーシス的な細胞死を、bcl-2の過剰発現よりもずっと大きな程度で妨げる。２つのベクターの組合せは、アポトーシス的な細胞死を防ぐことにおいて、bcl-x_L単独より優れてはなかった。このことは、bcl-x_Lが細胞死を妨げるために恒常的な外来信号に対する細胞の依存性を調節することにおいて主要な役割を果たすことを示す。
実施例V：bcl-x_Sは、bcl-2がアポトーシス的な細胞死を妨げる能力を阻害する
bcl-xのbcl-x_Sイソ型は、アポトーシス的な細胞死の調節においてある役割を果たす。FL5.12細胞を、ヒトbcl-x_S発現プラスミドで安定にトランスフェクトした（図７）。安定なトランスフェクタントを容易に単離し、そしてそれらのbcl-x_S mRNA発現をノーザンブロット解析によって確認した（図７ｃ）。IL-3の存在下で、これらの細胞は形態学的に正常に見え、親細胞またはネオマイシン-トランスフェクトコントロールと区別できない成長特性を示した。さらに、この細胞は、IL-3欠乏の際にネオマイシン-トランスフェクトコ

ントロール細胞とは区別できない反応速度論で死んだ。bcl-2-トランスフェクト細胞は、IL-3の除去に際してアポトーシス的な細胞死に対し耐性特性を示した。しかし、注目すべきことに、bcl-x_Sをbcl-2と同時トランスフェクトし、安定なトランスフェクタントを単離した場合、この細胞は成長因子の使用中止に対する感受性を再獲得し、IL-3欠乏の際にアポトーシス的な細胞死を経験した。このことにも関わらず、このポリクローナルな集団内の細胞死の開始の有意な遅延が存在した。bcl-2とbcl-x_Sとを同時トランスフェクトした細胞のIL-3欠乏に対する感受性は、bcl-2発現の減少の結果ではなかった。なぜなら、bcl-2トランスフェクト細胞およびbcl2+bcl-x_Sトランスフェクト細胞の両バルク集団（bulk population）は、ほぼ同等なレベルのbcl-2タンパク質を示したからである。bcl-x_Sがbcl-2機能を阻害する能力の大きさを、同時トランスフェクトした細胞の集団から単離された多くのサブクローンで研究した。これらの全ての細胞は高レベルのトランスフェクトされたbcl-2を発現し、そして全ての細胞が、成長因子の使用中止に際してアポトーシス的な細胞死に対する耐性の減少を示し、いくつかのクローンはbcl-x_S発現の存在下でbcl-2機能のほぼ完全な廃棄を示した（図７ｂ）。さらに、IL-3欠乏後24時間および48時間でアッセイした場合、bcl-2とbcl-x_Sとを同時トランスフェクトした細胞に由来するDNAは、明らかなヌクレオソームの崩壊パターンを示した。一方、bcl-2単独またはbcl-x_S単独をトランスフェクトした細胞に由来するDNAは、このパターンを示さなかった。bcl-2機能の阻害とこの細胞により発現されるbcl-x_S mRNAレベルとの間に相関はあったが、bcl-x_S発現とbcl-2機能的阻害との間の正確な化学量論は決定されなかった。bcl-2およびbcl-x_Sの両方を同時発現するサブクローンにおいて、bcl-x_Sの同時発現による、アポトーシスに対するbcl-2が誘導する耐性の有意な阻害が存在する。bcl-2-トランスフェクト細胞のIL-3除去96時間後の平均生存率は、79＋14%（平均＋１S.D.、ｎ＝３）であった。一方、bcl-2およびbcl-x_Sを同時発現するサブクローンの平均生存率は、８＋８%（平均＋１S.D.、ｎ＝６）であった。

アポトーシス的な細胞死のこの誘導は、bcl-x_S構築物がセンス方向に発現されることを必要とした。アンチセンス方向にクローニングされたbcl-x_Sを含むpSFFV-Neoプラスミドの安定な導入は、bcl-2が成長因子欠乏に際しアポトーシス的な細胞死を妨げる能力に対していかなる効果をも有しなかった（図８）。bcl-x_Sの安定な発現は、成長因子の存在下で細胞成長に対してまたは成長因子除去後のアポトーシス的な細胞死の速度に対していかなる効果をも有しなかった。しかし、bcl-x_Sは、安定なbcl-2の発現が成長因子除去に際してアポトーシス的な細胞死を阻害する能力を妨げ得る。

これらのデータは、bcl-x遺伝子のbcl-x_Sイソ型の発現が、bcl-2のような他の成長生存遺伝子がアポトーシス的な細胞死を妨げる能力を調節することにおいて優勢な役割を果たしているようであることを示す。bcl-x_S発現は、成長因子のような外来シグナルに対するこの細胞の依存性を増大させて細胞死を活性に妨げた。

実施例VI：Ｔ細胞の発達および活性化の間のbcl-x発現

ニワトリにおける最高レベルのbcl-xのmRNAは、リンパ系の発達が起こる器官において観察された。図９に見られ得るように、bcl-x mRNAは、ヒト胸腺において容易に検出され得る。ヒト胸腺細胞の未成熟集団および成熟集団への分別に際し、マイトジェン刺激の非存在下でのbcl-x発現は、CD4およびCD8の両方を発現するを未成熟「二重ポジティブ」胸腺細胞に限られた。bcl-x mRNAは、刺激されていない成熟「単一ポジティブ」（CD4+CD8-およびCD4-CD8+）胸腺細胞においてまたは末梢血Ｔ細胞において検出されなかった。

胸腺内で、bcl-xは、未成熟二重ポジティブ胸腺細胞において発現され、新たに単離された単一ポジティブ胸腺細胞または末梢血Ｔ細胞においては観察されなかった。二重ポジティブ胸腺細胞において見い出されたbcl-x mRNA種は、ほぼ排他的にbcl-x_S形態であった。従来の研究により、bcl-2が胸腺細胞発達の二重ポジティブ段階で通常生じるネガティブ選択を阻害しないことが示された（Sentmanら、1991；Strasserら、1991a）。発達のこの段階でのbcl-x_Sの安定な発現は、この観察の可能な説明を提供する。このことにも関わらず、bcl-2は二重ポジティブ胸腺細胞において生じるいくつかの形態のアポトーシスを妨げ得ることが示されている（Sentmanら、1991；Strasserら、1991a；Seigelら、1991）。

このことは、アポトーシス的な細胞死に関与する中心的な事象を調節することにおけるbcl-2のbcl-x_Sに対する影響が細胞死応答を開始する経路に依存して変わり得ることを示す。あるいは、bcl-x発現のmRNAまたはタンパク質レベルでのダウンレギュレーションは、bcl-2の効果を優勢にし得る。このような条件下で、bcl-2の過剰発現がアポトーシス的な細胞死を妨げることを可能にし得る。

単一ポジティブ胸腺細胞および成熟した末梢血Ｔ細胞は、bcl-xを発現できないが、両集団は、マイトジェン活性化後、高レベルのbcl-x mRNAの発現を素早く誘導され得る。再び、観察された優勢なmRNA種はbcl-x_Sをコードする（配列番号８）。このことは、Ｔ細胞活性化がbcl-x_Sの発現を誘導し、その局所的環境において供給される成長因子に対するこの細胞の依存性を増加する。末梢Ｔ細胞の活性化は、それらの細胞をアポトーシスを受けやすくし得る(KawabeおよびOchi、1991；Webbら、1990）という発見は、Ｔ細胞活性化後に観察されるbcl-2発現のアップレギュレーション（Graningerら、1987；Reedら、1987）と以前から争っている。これらの集団におけるbcl-x_Sの誘導可能な発現は、アポトーシスによるそれらの欠乏を防ぐために、それらを恒常的な外来シグナルに対して高度に依存性にすることにより免疫応答に関与するＴ細胞の増幅を調節するために働き得る。従って、Ｔ細胞の発達およびＴ細胞の活性化の間の異なるbcl-xの調節は、bcl-2とは独立に調節されるとの報告が以前になされたこの細胞系統において生じる２つの重要な形態のアポトーシスの調節において中心的な役割を果たし得る。bcl-x_S発現は、発達的におよび活性化的に誘導される細胞死の両方の調節において重要な役割を果たす。

さらに、これらの単離された細胞集団がPMAとイオノマイシンとのマイトジェン性の組合せで刺激された場合、これらの集団には有意な差異がある。PMAおよびイオノマイシンでの６時間刺激は、二重ポジティブ胸腺細胞集団においてbcl-x mRNA発現に対していかなる効果も有しなかったが、単一ポジティブ胸腺細胞および末梢血Ｔ細胞の両方においてbcl-x mRNA発現の劇的な増大を誘導した。従って、bcl-x mRNAがＴ細胞において、発達的な選択を経験する過程において存在する未成熟な表現型で構成的に発現されるようである。発達的な選択を完了した細胞は、bcl-xの発現をダウンレギュレーションするが、bcl-xの発現はＴ細胞の活性化により素早く誘導され得る。

bcl-2はまた、Ｔ細胞活性化の際に誘導されることが報告されている（Graningerら、1987；Reedら、1987）。末梢血Ｔ細胞におけるbcl-xおよびbcl-2誘導の速度論は劇的に異なった。末梢血Ｔ細胞を、PMAとイオノマイシンとのマイトジェン性の組合せでの活性化後種々の時点で単離した（図１０）。bcl-xは、活性化な際し、刺激後最初の６時間以内に検出可能なmRNAが現れて、素早く誘導された。その後、bcl-x mRNAは相対的に一定のレベルで発現された。対照的に、bcl-2 mRNAは、活性化６時間後から12時間後の間に最初に検出され、そしてマイトジェン活性化後、培養において最初の24時間にわたって漸次蓄積する。同様な結果を、抗原-レセプター架橋の後に得た。bcl-xおよびbcl-2を検出するために使用した２つのプローブは類似のサイズおよびGC含有量を有するので、本発明者らは、bcl-xとbcl-2との間の定常状態のmRNAレベルの差異を評価し得た。細胞活性化の24時間後でさえもbcl-xおよびbcl-2 mRNAの定常状態の蓄積において約50倍の差異がある。従って、Ｔ細胞活性化に際しbcl-2 mRNAの誘導が行うより、より素早くそしてより高い定常状態レベルまでbcl-x mRNA蓄積が起こった。

実施例VII：bcl-x_Lおよびbcl-x_Sの組織特異的発現

本発明者らは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用してＴ細胞の発達および活性化の間に得られる一連のRNA試料において、bcl-x_Lおよびbcl-x_Sの相対的な発生量（abundance）を計量した（図１１）（本明細書で参考として援用される特許第4,603,102号）。bcl-x_L（配列番号６）およびbcl-x_S（配列番号８）により共有される配列に結合するPCRプライマーおよびbcl-x_Sにおいて欠失している領域（配列番号６の510位～698位まで）に隣接するPCRプライマーを、プライマーとして使用して逆転写後にmRNAを増幅した。これら２つのプライマーを別々のコーディングエキソン上に配置し、それゆえ任意の混入しているゲノムDNAの産物は、目的のRNA種の産物よりかなり大量である。PCR反応の条件下で、２つのbcl-x mRNA種の相対的な割合を、図１１Ｂに表されるコントロール研究において示され

るように測定し得る。本発明者らは、培地単独中、またはPMAおよびイオノマイシンで６時間刺激された培地中で培養される分別されていない胸腺細胞および末梢血Ｔ細胞においてbcl-x mRNA種の発現を測定した。ノーザンブロット解析により示されるように、静止Ｔ細胞は、PCRにより同定され得るbcl-x転写物を発現しない。対照的に、活性化されたＴ細胞は、bcl-x_S形態を優性に含む、容易に検出可能なPCR産物を発現する。分別されていない胸腺細胞はまた、bcl-x_S mRNAをほぼ排他的に発現する。これらのデータは、活性化されたＴ細胞および二重ポジティブ胸腺細胞の両方が、アポトーシスを妨げるために外来シグナルに対するこの細胞の依存性を増強するbcl-xの形態を選択的に発現することを示す。この研究成果は、二重ポジティブ胸腺細胞の発達の間のネガティブ選択を克服するためにbcl-2を過剰発現する能力がないことおよび末梢Ｔ細胞応答の間のＴ細胞数を有意に増大させるためにbcl-2を過剰発現することができないことと一致する。

ノーザンブロット解析により相対的に高レベルのbcl-x発現を示すニワトリにおける他の主要な組織は、中枢神経系であった。成人ヒト脳のmRNAのPCR分析は、bcl-x_L mRNA種の排他的な発現を示す（図１１Ａ）。

このように、bcl-x_Lの発現は、成熟神経組織が長期の細胞分裂後の生存率を維持する能力と相関する。従って、異なる組織が、bcl-xの発現とスプライシングとの両方を差別的に調節し得、そしてそれ故この遺伝子の機能的な性質を適合させて、アポトーシス的な細胞死の潜在的な媒介物質(mediator)に対する相対的な感受性を調節し得る。

実施例VIII：プラスミドのクローニングおよび構築

ニワトリの嚢、脾臓および胸腺のcDNAライブラリーおよび赤血球から作成したゲノムライブラリーを、ネズミbcl-2 cDNAを用いて低緊縮度でスクリーニングした。フィルターを、Stark溶液（50%ホルムアミド、5×SSC［１×は0.15M NaClおよび0.015クエン酸ナトリウムに等しい］、１×Denhardt溶液、24mMリン酸ナトリウム,pH6.5、１ml当たり250mgのRNA）中で10%硫酸デキストランで一晩42℃でハイブリダイズした。最終の洗浄条件は、0.1×SSC中42℃で20分間であった。ポジティブクローン由来の挿入物を、pGEM7（Promega）中へサブクローニングし、そしてジデオキシ終結法（dideoxy termination method）により配列決定した。

ヒトbcl-x_S（配列番号８）を、胸腺cDNAライブラリーからニワトリbcl-xのBamHI/SphIフラグメントを使用して上述のハイブリダイゼーション条件および洗浄条件下でクローニングした。次いで、挿入物を、プラーク精製したファージからXbalリンカー部位を有するlgt11プライマーおよびpfuポリメラーゼを使用してPCRによって増幅した。次いで、増幅された0.84kbフラグメントを、配列分析のためにpBluescript-SK+（Stratagene）中にサブクローニングした。

bcl-x_L（配列番号１および３）をクローニングするためおよびbcl-x_S cDNA（配列番号８）を機能的な解析に使用される形態中へ再クローニングするために、bcl-x_S cDNAの5'非翻訳領域（5'-TTGGACAATGGACTGGTTGA-3'（配列番号８の5'末端））および3'非翻訳領域（5'-GTAGAGTGGATGGTCAGTG-3'（配列番号８の3'末端））における配列に対応するPCRプライマーを合成した。プライマーは、サブクローニングのためのEcoRIリンカーを含有し、そしてヒトＴ細胞、Ｔ細胞株ジャーカット、およびヒト脳から調製されるcDNAライブラリー由来のクローンを増幅するために使用した。ファージ（10^7pfu）を、５分間25mlの水中でPCR反応（94℃で1.25分間、56℃で２分間、72℃で３分間×35サイクル）の前に煮沸した。bcl-x_S cDNA（配列番号８）にハイブリダイズし得る適切なサイズ（bcl-x_Lについては0.8kbおよびbcl-x_Sについては0.6kb）のバンドを、配列解析ならびにインビトロ転写産物およびインビトロ翻訳産物の産生のためにpBluescript-SK+のEcoRI部位中へサブクローニングした。トランスフェクションおよび引き続く機能的なアッセイのために、bcl-x_L(配列番号６)挿入物およびbcl-x_S（配列番号８）挿入物を、pBluescript SK+から切り出し、そしてpSFFV-Neo（Neo；Fuhlbriggeら、1988）のEcoRI部位中にサブクローニングした。挿入物の方向を制限酵素マッピングにより決定し、そして挿入物を順方向に有するプラスミドを、pSFFV-Neo-bcl-x_L（bcl-x_L）およびpSFFV-Neo-bcl-x_S（bcl-x_S）と呼んだ。一方、挿入物を逆方向に有するプラスミドを、pSFFV-Neo-bcl-$x_L$rev（bcl-$x_L$rev）およびpSFF

V-Neo-bcl-$x_S$rev（bcl-$x_S$rev）と名付けた。
配列比較およびペプチド解析をウイスコンシン大学遺伝子コンピュータグループのプログラム：FASTA、TFASTA、PILEUP、PEPTIDESTRUCTURE、およびGAPを用いて行った。ニワトリbcl-xのヌクレオチド配列（配列番号１および３）、ヒトbcl-x_Lのヌクレオチド配列（配列番号６）、およびヒトbcl-x_Sのヌクレオチド配列（配列番号８）は、GenBankデータベースに送られた。
実施例IX：サザンブロット解析
ニワトリ、マウス、およびヒトのリンパ系細胞由来のゲノムDNAを、前述（ThompsonおよびNeiman、1987）のように標準的な方法によって単離した。DNAを計量し、そして10mgを示された制限酵素を用いて一晩消化した。消化されたDNAを1%アガロースゲル上で分離し、そしてニトロセルロース上にブロット（blot）した。ブロットを上述のようにニワトリbcl-x（配列番号１および３）のSphI/BamHIフラグメントまたはマウスbcl-2の第１コーディングエキソン由来のHindIII/BamHIフラグメントのいずれかでハイブリダイズした。洗浄条件を上述のようにした。
実施例X：細胞単離およびRNA解析
ニワトリ組織のノーザンブロットのために、新たに孵化したニワトリを屠殺して、そしてRNAを示された組織からイソチオシアン化グアニジニウム法によって単離し、次いで前述（Thompsonら、1986）のように塩化セシウム勾配中で遠心分離した。RNAを28Sリボソーム RNAに対して等量化し(equilized)、アガロース/ホルムアルデヒドゲル上で分離し、そして続いてニトロセルロース上にブロットした。ブロットを、SphI/BamHIニワトリbcl-xフラグメントを用いてプローブした。次いで、ブロットを煮沸によって剥がし、そしてHindIII/BamHIマウスbcl-2プローブでハイブリダイズした。
ヒトＴ細胞を、健常なドナーからleukophoresis後の密度勾配遠心分離により単離した。CD28ポジティブＴ細胞を、immunomagnetic procedure（Juneら、1987）によりネガティブに選択した。次いで、RNAを、静止しているかまたはホルボールミリステートアセテート（PMA：10ng/ml）およびイオノマイシン（0.8mg/ml）で示された時間活性化されているかのいずれかのＴ細胞から単離した。RNAを等量化してアガロース/ホルムアルデヒド変性ゲル中で電気泳動にかけ、次いでこのゲルを上記のようにブロットした。２つのブロットを、ヒトbcl-x_L cDNAまたはマウスbcl-2エキソンIIフラグメントおよびヒトHLAクラスI cDNAでプローブした。最終洗浄条件は、56℃で20分間の0.1×SSC、0.1% SDSであった。
ヒト胸腺細胞を、胸部心臓外科手術を経験した３歳未満の小児に由来する外科的病理標本から単離した。胸腺組織をナイロンメッシュ中に通して単一細胞懸濁液を得て、その後フィコールハイパッククッション（ficoll-hypaque cushion）上で単核細胞を分離した。次いで、RNAを静止している細胞またはPMAおよびイオノマイシンで刺激した細胞のいずれかから抽出し、そしてノーザンブロット解析にかけた。bcl-x発現が胸腺細胞発達の間に調節されるかどうかの決定のために、胸腺細胞を、先に記載(Turkaら、1991）のように刺激およびRNA抽出の前に成熟（「単一ポジティブ」細胞）および未成熟（「二重ポジティブ」）サブ集団に分離する。胸腺細胞の分別を、ネガティブimmunomagnetic選択により行った。未成熟胸腺細胞を、高レベルのCD28を発現する細胞の除去により調製した。一方、成熟胸腺細胞を、CD1+細胞の除去により選択した。CD4およびCD8について得られる細胞の発現状態により、未成熟集団のうち90%を超える細胞がCD4およびCD8を発現し、一方、成熟集団のうち95%を超える細胞が単一ポジティブ細胞であることを確認した。
bcl-x mRNAのどちらの形態が発現されているかを決定するために、種々の供給源からの１mgの総細胞RNAまたは0.1mgのポリＡ+ RNAを、AMV逆転写酵素を用いて42℃で１時間逆転写させた。次いで、cDNA産物の20%を、5'プライマーおよび3'プライマーならびに上述の増幅条件を使用してPCRにかけた。２つのプライマーを、それぞれ別のコーディングエキソン上に配置したので、混入しているゲノムDNAの増幅産物は２つのRNA種（bcl-x_Lおよびbcl-x_S）のいずれかの産物よりずっと多い。PCR条件を、cDNAの一つの形態に偏らせていないことを確実にするために、同時に、PCR反応を、bcl-x_L単独またはbcl-x_S単独あるいは種々の割合で混合したものを含むプラスミドを用いて行った。

実施例XI：細胞のトランスフェクションおよび機能的な研究
ネズミFL5.12細胞を、前述（Hockenberyら、1990；Nunezら、1990）のように培養した。細胞を、bcl-2a（bcl-2）、両方の転写方向のbcl-x_L（bcl-x_Lおよびbcl-$x_L$rev）、ならびに両方の転写方向のbcl-x_S（bcl-x_Sおよびbcl-$x_S$rev）のうちのいずれかを含むpSFFV-Neoプラスミドを用いてエレクトロポレーション（200V、960mF）によりトランスフェクトした。コントロールとして、トランスフェクションをまた、挿入物を有しないpSFFV-Neoプラスミド（Neo）を用いて行った。トランスフェクタントを、G418（１mg/ml）の存在下での成長によりネオマイシン耐性の獲得について選択した。バルクトランスフェクタントおよび単一細胞クローン（限界希釈により作成）を、先に記載（Nunesら、1990）のように、IL-3を補充した培地中における増殖により維持した。細胞の生存を評価するために、細胞を、最初に、最適な濃度の成長因子の存在下で20～24時間２×10^5/mlで増殖させた。次いで、この細胞を、RPMI 1640培地を用いて３回洗浄してすべての残存IL-3を除去し、そして10%仔ウシ胎児血清を補充した培地を含む96ウェルの培養皿中で１ウェル当たり10^5細胞で接種した。細胞の生存を、示された時点でトリパンブルー排除により決定した。細胞死がアポトーシスに起因することを確認するために、トランスフェクトした細胞（２×10^6）を、成長因子除去の０、８、24および48時間後に単離し、1.0% SDS、100mM NaCl、10mMトリスpH8.0、１mM EDTA、および200mg/mlプロテイナーゼK中で２時間50℃で溶解した。インキュベーション後、試料をRNaseA（20mg/ml）を用いて２時間37℃で処理して、フェノール/クロロホルム抽出し、そしてエタノール沈澱させた。次いで、DNAを1.2%アガロースゲル上で分離し、そして臭化エチジウムで染色した。
BCL-2特異的抗体は、BCL-Xと交差反応しなかった。細胞を洗浄し、そして1%パラホルムアルデヒドを用いて10分間室温で固定し、次いで6C8モノクローナル抗体（ヒトbcl-2特異的ハムスターモノクローナル抗体の１種；Hockenberyら、1990）またはイソタイプが適合したハムスター抗体コントロールを用いてPBS中の0.3%サポニンにおいて４℃で30分間染色した。細胞を、0.03%サポニン/PBS中で洗浄し、そしてビオチン化F(ab')２ヤギ抗-ハムスターIgGと30分間４℃でインキュベートした。細胞を、0.03%サポニン/PBS中で洗浄し、そしてRED670ストレプトアビジンと共にインキュベートし、そしてフローサイトメトリーにより分析した。bcl-x_L-トランスフェクト細胞およびbcl-x_S-トランスフェクト細胞の分析は、bcl-2特異的抗体がこれらの細胞において発現したBCL-Xと交差反応しないことを示した。bcl-x発現をノーザンブロット解析により確認し、b-アクチン発現を負荷コントロール（loading control）として利用した。
実施例XII：bcl-xのインビトロ転写および翻訳
bcl-x_L（配列番号６）を含むpBluescript-SK+プラスミドおよびbcl-x_S（配列番号８）を含むpBluescript-SK+プラスミドを、それぞれXbalおよびBamHIを用いて3'多重クローニング部位で直鎖状にし、そしてT7 RNAポリメラーゼを用いて37℃で１時間転写させた。bcl-x_Lをまた、Xholを用いて5'多重クローニング部位で直鎖状にし、そしてアンチセンスコントロールとしてT3ポリメラーゼを用いて転写させた。得られたrun-off転写物（bcl-x_L、bcl-x_Sおよびbcl-x_S-as）をフェノール/クロロホルム抽出し、そしてエタノール沈澱させた。次いで、インビトロ翻訳を、^{35}Sメチオニンの存在下でウサギ網状赤血球溶解物キット（Promega）を用いて30℃で１時間行った。５mlの溶解物をSDS負荷緩衝液に添加し、そしてSDS-PAGE（15%ゲル）にかけた。ゲルを乾燥し、そしてx線フィルムに曝した。
本発明の実施における多くの改変および変化が生じることが当業者に予想されるので、添付される請求の範囲において見られるような限定のみが位置づけられるべきである。
引用文献
以下に挙げた文献および明細書中で引用された全ての文献は、それらが本明細書中で用いられる方法論、技術および/または組成物の背景を補い、説明し、提供する範囲で本明細書において参考として援用される。

Adelman ら (1983) *DNA* 2:183.

Allsopp ら (1993) *Cell* 73:295.

Bakhshi ら (1985) *Cell* 41:899.

Blackman ら (1990) *Science* 248:1335.

Bolivar ら, (1977) *Gene*, 2:95.

Borzillo ら (1992) *Oncogene* 7:869.

Boshart ら (1985) *Cell* 41:521.

Cazals-Hatem ら (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1132:109.

Chang ら, (1978) *Nature*, 375:615.

Chen-Levy, Z.および Cleary, M.L. (1990) *J. Biol. Chem* 265:4929.

Chen-Levy ら (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9:701.

Cleary ら (1986) *Cell* 47:19.

Cooper ら (1991) *Adv. Immunol.* 50:87.

Cowan ら (1984) *Science* 225:1258.

Crea ら, (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 75:5765.

Cuende ら (1993) *EMBO J.* 12:1555.

Davies, A.M. (1987) *Development* 101:185.

Eguchi ら (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:4187.

Ellis ら (1991) *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:663.

Ferruti, P.およびTanzi, M.C., (1986) *Cris. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2:117-136.

Fiers ら , (1978) *Nature* 273:113.

Fuhlbrigge ら . (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5649.

Gabizon, A. ら , (1990) *Cancer Res.* 50:6371-6378

Garcia ら (1992) *Science* 258:302.

Goeddel ら , (1979) *Nature*, 281:544.

Goeddel ら , (1980) *Nucleic Acids Res.*, 8:4057.

Graninger ら (1987) *J. Clin. Invest.* 80:1512.

Hess ら , (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149.

Hitzeman ら , (1980) *J. Biol. Chem.* 255:2073.

Hockenbery ら (1990) *Nature* 348:334.

Holland ら , (1978) *Biochemistry* 17:4900.

Itakura ら , (1977) *Science*, 198:1056.

Jones, (1977) *Genetics* 85:12.

June ら (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:4472.

Kawabe, Y.およびOchi, A. (1991) *Nature* 349:245.

Kerr ら (1972) *Br. J. Cancer* 26:239.

Kingsman ら , (1979) *Gene* 7:141.

Kruseおよび Patterson, 編 (1973) Tissue Culture, Academic Press.

Kyte, J.,および R.F. Doolittle (1982) *J. Mol. Biol.* 157:105.

Messing ら , Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA, Editor A. Walton, Elsevier, Amsterdam (1981).

McDonnell ら (1989) *Cell* 57:79.

Murphy ら (1990) *Science* 250:1720.

Negrini ら (1987) *Cell* 49:455.

Neiman ら (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5857.

Nunez ら (1990) *J. Immunol.* 144:3602.

Okayama ら (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:280.

Oppenheim, R.W. (1991) *Annu. Rev. Neurosci.* 14:453.

Raff, M.C. (1992) *Nature* 356:397.

Ranade, V. V. (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685-694

Reed ら (1987) *Science* 236:1295.

Rothenberg, E.V. (1992) *Adv. Immunol.* 51:85.

Sambrook, J. ら (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Seeburg (1982) *DNA* 1:239.

Sentman ら (1991) *Cell* 67:879.

Siebwenlist ら, (1980) *Cell*, 20:269.

Siegel, ら (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7003.

Stinchcomb ら, (1979) *Nature*, 282:39.

Stratford-Perricaudet ら (1992).

Strasser ら (1991a) *Cell* 67:889.

Strasser ら (1991b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8661.

Thompson ら (1986) *Nature* 319:374.

Thompson, C.B.および Neiman, P.E. (1987) *Cell* 48:369.

Thomsen ら (1984) *PNAS* 81:659.

Tschemper ら, (1980) *Gene* 10:157.

Tsujimoto, Y.および Croce, C.M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5214.

Turka ら (1991) *J. Immunol.* 146:1428.

Vaux ら (1988) *Nature* 335440.

Webb ら (1990) *Cell* 63:1249.

Williams, G.T. (1991) *Cell* 65:1097.

Wyllie ら (1980) *Int. Rev. Cytol.* 68:251.

配列表

(1)一般的情報：
(i)出願人：
(A)名称：アーチ　デベロップメント　コーポレイション
(B)番地：イースト　フィフティエイス　ストリート　1101
(C)市：シカゴ
(D)州：イリノイ
(E)国：アメリカ合衆国
(F)郵便番号：60637
(ii)発明の名称：脊椎動物アポトーシス遺伝子：組成物および方法
(iii)配列数：９
(iv)連絡住所：
(A)名称：アーノルド，ホワイト　アンド　デューク
(B)番地：ピー．オー．ボックス　4433
(C)市：ヒューストン
(D)州：テキサス
(E)国：アメリカ合衆国
(F)郵便番号：77210
(ｖ)コンピューター読み出し形態：
(A)媒体型：フロッピーディスク
(B)コンピューター：IBM PC互換用
(C)OS：PC-DOS/MS-DOS，ASCII
(vi)現在の出願データ：
(A)出願番号：未知
(B)出願日：本明細書と同時
(C)分類：未知
(vii)先願データ：
(A)出願番号：08/081.448
(B)出願日：1993年６月22日
(viii)代理人／事務所情報：
(A)氏名：パーカー，デイビッド　エル．
(B)登録番号：32,165
(C)照会／記録番号：ARCD090
(ix)電話回線情報：
(A)電話：512-320-7200
(B)テレファックス：713-789-2679
(2)配列番号１の情報：
(i)配列の特色：
(A)長さ：1274塩基対
(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(ix)配列の特徴：
(A)特徴を表わす記号：CDS
(B)存在位置：179..751

(xi)配列：配列番号１：

```
GGCGCCAGCA AGCTGTCGTG TTAACCGTTT CCTTGCCTCT CTTTTCCTCT CTGCCTGTCT      60

GTGCAAAGGT CGGATGTGTT CGCCGGTCAC GAGGGAGCGT GGAGCCAGGA GCTGCTAAGT     120

GTGCTCATCT GCTCGTGCAC TGGACCATGG ACTCATTGAG GGCGTCTCAG GTGTGAAA       178

ATG TCC AGC AGT AAC CGG GAG TTA GTG ATT GAC TTT GTT TCC TAC AAG         226
Met Ser Ser Ser Asn Arg Glu Leu Val Ile Asp Phe Val Ser Tyr Lys
  1               5                  10                  15

CTC TCG CAG AGG GGG CAC TGC TGG AGC GAG CTG GAG GAA GAG GAT GAG        274
Leu Ser Gln Arg Gly His Cys Trp Ser Glu Leu Glu Glu Glu Asp Glu
            20                  25                  30

AAC AGG ACT GAC ACT GCA GCT GAG GCA GAG ATG GAC AGC GTC CTC AAT        322
Asn Arg Thr Asp Thr Ala Ala Glu Ala Glu Met Asp Ser Val Leu Asn
        35                  40                  45

GGG AGC CCA TCC TGG CAC CCC CCT GCC GGC CAC GTA GTG AAC GGA GCC        370
Gly Ser Pro Ser Trp His Pro Pro Ala Gly His Val Val Asn Gly Ala
    50                  55                  60
```

```
ACC GTG CAC CGG AGC AGC CTG GAA GTT CAT GAA ATT GTT CGA GCA TCC      418
Thr Val His Arg Ser Ser Leu Glu Val His Glu Ile Val Arg Ala Ser
 65                  70                  75                  80

GAC GTG AGG CAG GCG CTG AGA GAT GCG GGG GAT GAG TTT GAG CTG AGG      466
Asp Val Arg Gln Ala Leu Arg Asp Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg
                 85                  90                  95

TAC CGG AGG GCT TTC AGC GAC CTC ACC TCC CAG CTC CAC ATC ACC CCT      514
Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr Ser Gln Leu His Ile Thr Pro
            100                 105                 110

GGC ACG GCG TAC CAG AGC TTT GAG CAG GTA GTG AAT GAA CTC TTC CAT      562
Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val Val Asn Glu Leu Phe His
        115                 120                 125

GAT GGT GTG AAC TGG GGG CGC ATC GTG GCT TTC TTC TCC TTC GGA GGG      610
Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Ser Phe Gly Gly
    130                 135                 140

GCT TTG TGC GTG GAG AGC GTG GAC AAG GAG ATG CGG GTA CTG GTG GGA      658
Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys Glu Met Arg Val Leu Val Gly
145                 150                 155                 160

CGC ATT GTG TCT TGG ATG ACC ACG TAC TTG ACC GAC CAT CTA GAT CCC      706
Arg Ile Val Ser Trp Met Thr Thr Tyr Leu Thr Asp His Leu Asp Pro
                165                 170                 175

TGG ATC CAG GAG AAT GGC GGC TGG GTA AGA ACT GCT CTC CCA TAGGGATGGC   758
Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Val Arg Thr Ala Leu Pro
            180                 185                 190

TCCCTGCATC CTAGCTCAAG GCCAGCGGCG GTGCTGGCCA GATCAAGCAG CCTTCAGTGA   818
```

TTGTGCTTGT GCTTGGTCTA CACCTTGCAG GGCAATAAAT TGGTACGTGG CCCTTCCCTC 878

TTCATTCTTA ATGCTCTGCT GCAAGAGGGT CAGTCCACTG TGTTGAAACA AAGAGTTAAC 938

ATTCTGATTT GTCCTCCTGC ATCCCTTTTT CTCCTCCTTC TCCCTGGCTG TTACATAAGA 998

GACCCATTTT CCGAGAGCCT GTGGAAATGT AATGTCATCC AAGCTTGTTC TTCAAATGGG 1058

AGCCCTTGCT CTTGGGCATG TTCCTCATGT CATTTAACAG CAGGGAGTGG AGCTTCCTCC 1118

CCTCCGTGCT CAGCAGTGTT CCAGCCTGGC CCTGTGATCT GGTGGGGTAA CAGCTACTTC 1178

TTCATTCTGG AGATGGGACG ATGTCTGCCG CTGCCATCGC GTGGAGTGAA TCCTGCAGCA 1238

GCTCTCTGTG GGTAGGGCTG CTGGGACGCA TCACAG 1274

(2)配列番号２の情報：

(i)配列の特色：
(A)長さ：190アミノ酸
(B)型：アミノ酸
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号２：

Met Ser Ser Ser Asn Arg Glu Leu Val Ile Asp Phe Val Ser Tyr Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Arg Gly His Cys Trp Ser Glu Leu Glu Glu Glu Asp Glu
20 25 30

Asn Arg Thr Asp Thr Ala Ala Glu Ala Glu Met Asp Ser Val Leu Asn
35 40 45

Gly Ser Pro Ser Trp His Pro Pro Ala Gly His Val Val Asn Gly Ala
50 55 60

Thr Val His Arg Ser Ser Leu Glu Val His Glu Ile Val Arg Ala Ser
65 70 75 80

Asp Val Arg Gln Ala Leu Arg Asp Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg
85 90 95

Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr Ser Gln Leu His Ile Thr Pro
100 105 110

Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val Val Asn Glu Leu Phe His
115 120 125

Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Ser Phe Gly Gly
130 135 140

Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys Glu Met Arg Val Leu Val Gly
145 150 155 160

Arg Ile Val Ser Trp Met Thr Thr Tyr Leu Thr Asp His Leu Asp Pro
165 170 175

Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Val Arg Thr Ala Leu Pro
180 185 190

(2)配列番号３の情報：

(i)配列の特色：

30 20 10

(A)長さ：29塩基対
(B)型：核酸
(C)鎖の数：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(xi)配列：配列番号３：

GGAGCGGTGC ACCCAGCGCG CAGGAATTC

(2)配列番号４の情報：

(i)配列の特色：
(A)長さ：63アミノ酸
(B)型：アミノ酸
(C)鎖の数：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(xi)配列：配列番号４：

Val Val Asn Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val
1 5 10 15

Ala Phe Phe Ser Phe Gly Gly Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys
20 25 30

Glu Met Gln Val Leu Val Ser Arg Ile Ala Ala Trp Met Ala Thr Tyr
35 40 45

Leu Asn Asp His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp
50 55 60

(2)配列番号５の情報：

(i)配列の特色：
(A)長さ：205アミノ酸
(B)型：アミノ酸
(C)鎖の数：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(xi)配列：配列番号５：

```
Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
1               5                  10                  15

Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
            20                  25                  30

Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile
        35                  40                  45

Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp
    50                  55                  60

Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala
65                  70                  75                  80

Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Ala
                85                  90                  95

Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Gly Asp Phe
            100                 105                 110
```

```
Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly
        115                 120                 125

Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp
    130                 135                 140

Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu
145                 150                 155                 160

Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp
                165                 170                 175

Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn
            180                 185                 190

Gly Gly Trp Val Gly Ala Ser Gly Asp Val Ser Leu Gly
        195                 200                 205
```

(2)配列番号６の情報：

(i)配列の特色：
(A)長さ：926塩基対
(B)型：核酸
(C)鎖の数：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(ix)配列の特徴：
(A)特徴を表わす記号：CDS
(B)存在位置：135..836

(xi)配列：配列番号６：

```
GAATCTCTTT CTCTCCCTTC AGAATCTTAT CTTGGCTTTG GATCTTAGAA GAGAATCACT   60

AACCAGAGAC GAGACTCAGT GAGTGAGCAG GTGTTTTGGA CAATGGACTG GTTGAGCCCA  120

TCCCTATTAT AAAA ATG TCT CAG AGC AAC CGG GAG CTG GTG GTT GAC TTT     170
                Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe
                  1               5                  10

CTC TCC TAC AAG CTT TCC CAG AAA GGA TAC AGC TGG AGT CAG TTT AGT     218
Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser Trp Ser Gln Phe Ser
             15                  20                  25

GAT GTG GAA GAG AAC AGG ACT GAG GCC CCA GAA GGG ACT GAA TCG GAG     266
Asp Val Glu Glu Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Gly Thr Glu Ser Glu
         30                  35                  40

ATG GAG ACC CCC AGT GCC ATC AAT GGC AAC CCA TCC TGG CAC CTG GCA     314
Met Glu Thr Pro Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala
     45                  50                  55                  60

GAC AGC CCC GCG GTG AAT GGA GCC ACT GGC CAC AGC AGC AGT TTG GAT     362
Asp Ser Pro Ala Val Asn Gly Ala Thr Gly His Ser Ser Ser Leu Asp
                 65                  70                  75

GCC CGG GAG GTG ATC CCC ATG GCA GCA GTA AAG CAA GCG CTG AGG GAG     410
Ala Arg Glu Val Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu
             80                  85                  90

GCA GGC GAC GAG TTT GAA CTG CGG TAC CGG CGG GCA TTC AGT GAC CTG     458
Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu
         95                 100                 105

ACA TCC CAG CTC CAC ATC ACC CCA GGG ACA GCA TAT CAG AGC TTT GAA     506
Thr Ser Gln Leu His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu
```

```
                110                 115                 120
CAG GTA GTG AAT GAA CTC TTC CGG GAT GGG GTA AAC TGG GGT CGC ATT      554
Gln Val Val Asn Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile
125                 130                 135                 140

GTG GCC TTT TTC TCC TTC GGC GGG GCA CTG TGC GTG GAA AGC GTA GAC      602
Val Ala Phe Phe Ser Phe Gly Gly Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp
                145                 150                 155

AAG GAG ATG CAG GTA TTG GTG AGT CGG ATC GCA GCT TGG ATG GCC ACT      650
Lys Glu Met Gln Val Leu Val Ser Arg Ile Ala Ala Trp Met Ala Thr
            160                 165                 170

TAC CTG AAT GAC CAC CTA GAG CCT TGG ATC CAG GAG AAC GGC GGC TGG      698
Tyr Leu Asn Asp His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp
        175                 180                 185

GAT ACT TTT GTG GAA CTC TAT GGG AAC AAT GCA GCA GCC GAG AGC CGA      746
Asp Thr Phe Val Glu Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg
    190                 195                 200

AAG GGC CAG GAA CGC TTC AAC CGC TGG TTC CTG ACG GGC ATG ACT GTG      794
Lys Gly Gln Glu Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr Val
205                 210                 215                 220

GCC GGC GTG GTT CTG CTG GGC TCA CTC TTC AGT CGG AAA TGACCAGACA      843
Ala Gly Val Val Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys
                225                 230

CTGACCATCC ACTCTACCCT CCCACCCCCT TCTCTGCTCC ACCACATCCT CCGTCCAGCC    903

GCCATTGCCA CCAGGAGAAC CG                                            926
```

(2)配列番号７の情報：

(i)配列の特色：
(A)長さ：233アミノ酸
(B)型：アミノ酸
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号７：

```
Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys
 1               5                  10                  15

Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser Trp Ser Gln Phe Ser Asp Val Glu Glu
            20                  25                  30

Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Gly Thr Glu Ser Glu Met Glu Thr Pro
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala Asp Ser Pro Ala
    50                  55                  60

Val Asn Gly Ala Thr Gly His Ser Ser Ser Leu Asp Ala Arg Glu Val
65                  70                  75                  80

Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu
                85                  90                  95

Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr Ser Gln Leu
            100                 105                 110

His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val Val Asn
        115                 120                 125
```

```
Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe
    130                 135                 140

Ser Phe Gly Gly Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys Glu Met Gln
145                 150                 155                 160

Val Leu Val Ser Arg Ile Ala Ala Trp Met Ala Thr Tyr Leu Asn Asp
                165                 170                 175

His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Asp Thr Phe Val
            180                 185                 190

Glu Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg Lys Gly Gln Glu
        195                 200                 205

Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr Val Ala Gly Val Val
    210                 215                 220

Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys
225                 230
```

(2)配列番号８の情報：

(i)配列の特色：
(A)長さ：737塩基対
(B)型：核酸
(C)鎖の数：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(ix)配列の特徴：
(A)特徴を表わす記号：CDS

(B)存在位置：135..647

(xi)配列：配列番号８：

```
GAATCTCTTT CTCTCCCTTC AGAATCTTAT CTTGGCTTTG GATCTTAGAA GAGAATCACT      60

AACCAGAGAC GAGACTCAGT GAGTGAGCAG GTGTTTTGGA CAATGGACTG GTTGAGCCCA     120

TCCCTATTAT AAAA ATG TCT CAG AGC AAC CGG GAG CTG GTG GTT GAC TTT        170
                Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe
                  1               5                  10

CTC TCC TAC AAG CTT TCC CAG AAA GGA TAC AGC TGG AGT CAG TTT AGT        218
Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser Trp Ser Gln Phe Ser
            15                  20                  25

GAT GTG GAA GAG AAC AGG ACT GAG GCC CCA GAA GGG ACT GAA TCG GAG        266
Asp Val Glu Glu Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Gly Thr Glu Ser Glu
        30                  35                  40

ATG GAG ACC CCC AGT GCC ATC AAT GGC AAC CCA TCC TGG CAC CTG GCA        314
Met Glu Thr Pro Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala
    45                  50                  55                  60

GAC AGC CCC GCG GTG AAT GGA GCC ACT GGC CAC AGC AGC AGT TTG GAT        362
Asp Ser Pro Ala Val Asn Gly Ala Thr Gly His Ser Ser Ser Leu Asp
                65                  70                  75

GCC CGG GAG GTG ATC CCC ATG GCA GCA GTA AAG CAA GCG CTG AGG GAG        410
Ala Arg Glu Val Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu
            80                  85                  90

GCA GGC GAC GAG TTT GAA CTG CGG TAC CGG CGG GCA TTC AGT GAC CTG        458
Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu
```

```
                95                  100                 105
ACA TCC CAG CTC CAC ATC ACC CCA GGG ACA GCA TAT CAG AGC TTT GAA      506
Thr Ser Gln Leu His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu
    110                 115                 120

CAG GAT ACT TTT GTG GAA CTC TAT GGG AAC AAT GCA GCA GCC GAG AGC      554
Gln Asp Thr Phe Val Glu Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser
125                 130                 135                 140

CGA AAG GGC CAG GAA CGC TTC AAC CGC TGG TTC CTG ACG GGC ATG ACT      602
Arg Lys Gly Gln Glu Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr
                145                 150                 155

GTG GCC GGC GTG GTT CTG CTG GGC TCA CTC TTC AGT CGG AAA TGACCAGACA   654
Val Ala Gly Val Val Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys
            160                 165                 170

CTGACCATCC ACTCTACCCT CCCACCCCCT TCTCTGCTCC ACCACATCCT CCGTCCAGCC   714

GCCATTGCCA CCAGGAGAAC CCG                                           737
```

(2)配列番号９の情報：

(i)配列の特色：
(A)長さ：170アミノ酸
(B)型：アミノ酸
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号９：

Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser Trp Ser Gln Phe Ser Asp Val Glu Glu
20 25 30

Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Gly Thr Glu Ser Glu Met Glu Thr Pro
35 40 45

Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala Asp Ser Pro Ala
50 55 60

Val Asn Gly Ala Thr Gly His Ser Ser Ser Leu Asp Ala Arg Glu Val
65 70 75 80

Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu
85 90 95

Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr Ser Gln Leu
100 105 110

His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Asp Thr Phe
115 120 125

Val Glu Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg Lys Gly Gln
130 135 140

Glu Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr Val Ala Gly Val
145 150 155 160

Val Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys
165 170

```
bcl-x     1 ......MSSSNRELVIDFVSYKLSQRGHCWSELEEEDENRTDTAAEAEMD  44
                  : .|||:|:.:: |||||||. |    :.::  ...:.:|. .
bcl-2β    1 MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEW....DAGDVGAAPPGAAPAP  46
                .         .         .         .         .
bcl-x    45 SVLNGSPSWHPPAGHVVNGATVHRSSLEVHEIVRASD.........VRQ  84
             :::.: |: |.| . . .::..: |.|:... . |..          |:
bcl-2β   47 GIFSSQPG.HTPHPAASRDPVARTSPLQTPAAPGAAAGPALSPVPPVVHL  95
                .         .         .         .         .
bcl-x    85 ALRDAGDEFELRYRRAFSDLTSQLHITPGTAYQSFEQVVNELFHDGVNWG 134
             |||:|||:|. ||| .|.::.||||:|| || ..|. ||:|||:||||||
bcl-2β   96 ALRQAGDDFSRRYRGDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEELFRDGVNWG 145
                .         .         .         .         .
bcl-x   135 RIVAFFSFGGALCVESVDKEMRVLVGRIVSWMTTYLTDHLDPWIQENGGW 184
             ||||||.|||.:|||||::||..||:.|. |||.||. ||..|||:||||
bcl-2β  146 RIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRHLHTWIQDNGGW 195
                .
bcl-x   185 VRTALP.... 190
             | .. .
bcl-2β  196 VGASGDVSLG 205
```

【図1B】

FIG. 1B

```
1                                                    ggcgccagcaagctgtcgtgttaaccgt   28
29 ttccttgcctctcttttcctctctgcctgtctgtgcaaaggtcggatgtgttcgccggtcacgagggagcgt  100
101 ggagccaggagctgctaagtgtgctcatctgctcgtgcactggaccatggactcattgagggcgtctcaggt  172
173 gtgaaaatgtccagcagtaaccgggagttagtgattgactttgtttcctacaagctctcgcagaggggcac  244
          MetSerSerSerAsnArgGluLeuValIleAspPheValSerTyrLysLeuSerGlnArgGlyHis
245 tgctggagcgagctggaggaagaggatgagaacaggactgacactgcagctgaggcagagatggacagcgtc  316
    CysTrpSerGluLeuGluGluGluAspGluAsnArgThrAspThrAlaAlaGluAlaGluMetAspSerVal
317 ctcaatgggagcccatcctggcacccccctgccggccacgtagtgaacggagccaccgtgcaccggagcagc  388
    LeuAsnGlySerProSerTrpHisProProAlaGlyHisValValAsnGlyAlaThrValHisArgSerSer
389 ctggaagttcatgaaattgttcgagcatccgacgtgaggcaggcgctgagagatgcgggggatgagtttgag  460
    LeuGluValHisGluIleValArgAlaSerAspValArgGlnAlaLeuArgAspAlaGlyAspGluPheGlu
461 ctgaggtaccggagggctttcagcgacctcacctcccagctccacatcacccctggcacggcgtaccagagc  532
    LeuArgTyrArgArgAlaPheSerAspLeuThrSerGlnLeuHisIleThrProGlyThrAlaTyrGlnSer
```

【図1A－1】

FIG. 1A-1

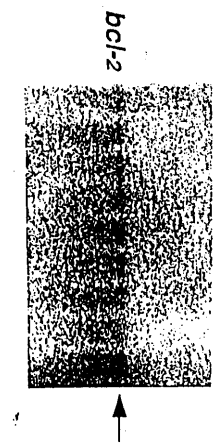


Fig. 2

【図2】

```
533 tttgagcaggtagtgaatgaactcttccatgatggtgtgaactgggggcgcatcgtggctttcttctccttc  604
    PheGluGlnValValAsnGluLeuPheHisAspGlyValAsnTrpGlyArgIleValAlaPhePheSerPhe
                                        ↓
605 ggaggggctttgtgcgtggagagcgtggacaaggagatgcgggtactggtgggacgcattgtgtcttggatg  676
    GlyGlyAlaLeuCysValGluSerValAspLysGluMetArgValLeuValGlyArgIleValSerTrpMet
677 accacgtacttgaccgaccatctagatccctggatccaggagaatggcggctgggtaagaactgctctccca  748
    ThrThrTyrLeuThrAspHisLeuAspProTrpIleGlnGluAsnGlyGlyTrpValArgThrAlaLeuPro
749 tagggatggctccctgcatcctagctcaaggccagcggcggtgctggccagatcaagcagccttcagtgatt  820
821 gtgcttgtgcttggtctacaccttgcagggcaataaattggtacgtggcccttccctcttcattcttaatgc  892
893 tctgctgcaagagggtcagtccactgtgttgaaacaaagagttaacattctgatttgtcctcctgcatccct  964
965 ttttctcctccttctccctggctgttacataagagacccatttccgagagcctgtggaaatgtaatgtcat 1036
1037 ccaagcttgttcttcaaatgggagcccttgctcttgggcatgttcctcatgtcatttaacagcagggagtgg 1108
1109 agcttcctcccctccgtgctcagcagtgttccagcctggccctgtgatctggtggggtaacagctacttctt 1180
1181 cattctggagatgggacgatgtctgccgctgccatcgcgtggagtgaatcctgcagcagctctctgtgggta 1252
1253 gggctgctgggacgcatcacag/.../ggagcggtgcacccagcgcgcaggaattc
```

【図1A－2】

FIG. 1A-2

JP 3871339 B2 2007.1.24

【図３】

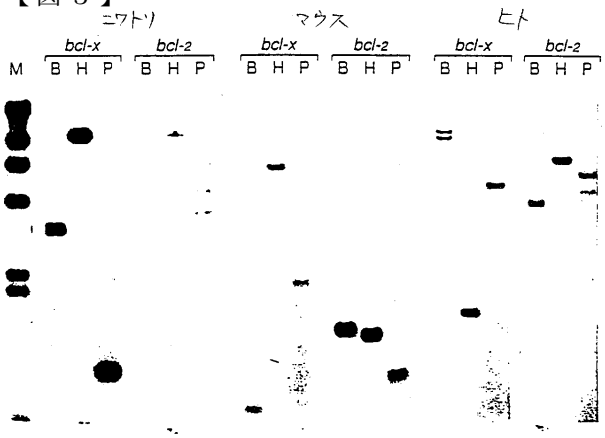


Fig. 3

【図４Ａ】

ヒト bcl-xL ヌクレオチドおよびタンパク質配列

```
1   gaatctctttctctcccctcagaatcttatctttggctttggatcttagaagagaatcactaaccagagacg  71
72  agactcagtgagtgagcaggtgttttggacaatggactggttgagcccatccctattataaaaaatgtctcag 143
                                                              MetSerGln
144 agcaaccgggagctggtggttgactttctctcctacaagctttcccagaaaggatacagctggagtcagttt 215
    SerAsnArgGluLeuValValAspPheLeuSerTyrLysLeuSerGlnLysGlyTyrSerTrpSerGlnPhe
216 agtgatgtggaagagaacaggactgaggccccagaagggactgaatcggagatggagacccccagtgccatc 287
    SerAspValGluGluAsnArgThrGluAlaProGluGlyThrGluSerGluMetGluThrProSerAlaIle
288 aatggcaacccatcctggcacctggcagacagccccgcggtgaatggagccactgcgcacagcagcagtttg 359
    AsnGlyAsnProSerTrpHisLeuAlaAspSerProAlaValAsnGlyAlaThrAlaHisSerSerSerLeu
360 gatgcccgggaggtgatccccatggcagcagtaaagcaagcgctgagggaggcaggcgacgagtttgaactg 431
    AspAlaArgGluValIleProMetAlaAlaValLysGlnAlaLeuArgGluAlaGlyAspGluPheGluLeu
432 cggtaccggcggggcattcagtgacctgacatcccagctccacatcacccccagggacagcatatcagagcttt 503
    ArgTyrArgArgAlaPheSerAspLeuThrSerGlnLeuHisIleThrProGlyThrAlaTyrGlnSerPhe
504 gaacaggtagtgaatgaactcttccgggatggggtaaactggggtcgcattgtggccttttttctcctttcggc 575
    GluGlnValValAsnGluLeuPheArgAspGlyValAsnTrpGlyArgIleValAlaPhePheSerPheGly
576 ggggcactgtgcgtggaaagcgtagacaaggagatgcaggtattggtgagtcggatcgcagcttggatggcc 647
    GlyAlaLeuCysValGluSerValAspLysGluMetGlnValLeuValSerArgIleAlaAlaTrpMetAla
648 acttacctgaatgaccacctagagccttggatccaggagaacggcggctgggatacttttgtggaactctat 719
    ThrTyrLeuAsnAspHisLeuGluProTrpIleGlnGluAsnGlyGlyTrpAspThrPheValGluLeuTyr
720 gggaacaatgcagcagccgagagccgaaagggccaggaacgcttcaaccgctggttcctgacgggcatgact 791
    GlyAsnAsnAlaAlaAlaGluSerArgLysGlyGlnGluArgPheAsnArgTrpPheLeuThrGlyMetThr
792 gtggccggcgtggttctgctgggctcactcttcagtcggaaatgaccagacactgaccatccactctaccct 863
    ValAlaGlyValValLeuLeuGlySerLeuPheSerArgLys
864 cccaccccctttctctgctccaccacatcctccgtccagccgccattgccaccaggagaacccg 926
```

Fig. 4A

【図４Ｂ】

ヒト bcl-xS ヌクレオチドおよびタンパク質配列

```
1   gaatctctttctctcccctcagaatcttatctttggctttggatcttagaagagaatcactaaccagagacg  71
72  agactcagtgagtgagcaggtgttttggacaatggactggttgagcccatccctattataaaaaatgtctcag 143
                                                              MetSerGln
144 agcaaccgggagctggtggttgactttctctcctacaagctttcccagaaaggatacagctggagtcagttt 215
    SerAsnArgGluLeuValValAspPheLeuSerTyrLysLeuSerGlnLysGlyTyrSerTrpSerGlnPhe
216 agtgatgtggaagagaacaggactgaggccccagaagggactgaatcggagatggagacccccagtgccatc 287
    SerAspValGluGluAsnArgThrGluAlaProGluGlyThrGluSerGluMetGluThrProSerAlaIle
288 aatggcaacccatcctggcacctggcagacagccccgcggtgaatggagccactgcgcacagcagcagtttg 359
    AsnGlyAsnProSerTrpHisLeuAlaAspSerProAlaValAsnGlyAlaThrAlaHisSerSerSerLeu
360 gatgcccgggaggtgatccccatggcagcagtaaagcaagcgctgagggaggcaggcgacgagtttgaactg 431
    AspAlaArgGluValIleProMetAlaAlaValLysGlnAlaLeuArgGluAlaGlyAspGluPheGluLeu
432 cggtaccggcggggcattcagtgacctgacatcccagctccacatcacccccagggacagcatatcagagcttt 503
    ArgTyrArgArgAlaPheSerAspLeuThrSerGlnLeuHisIleThrProGlyThrAlaTyrGlnSerPhe
504 gaacaggatacttttgtgggaactctatgggaacaatgcagcagccgagagccgaaagggccaggaacgcttc 575
    GluGlnAspThrPheValGluLeuTyrGlyAsnAsnAlaAlaAlaGluSerArgLysGlyGlnGluArgPhe
576 aaccgctggttcctgacgggcatgactgtggccggcgtggttctgctgggctcactcttcagtcggaaatga 647
    AsnArgTrpPheLeuThrGlyMetThrValAlaGlyValValLeuLeuGlySerLeuPheSerArgLys
648 ccagacactgaccatccactctaccctcccaccccctttctctgctccaccacatcctccgtccagccgccat 719
720 tgccaccaggagaacccg 737
```

Fig. 4B

【図４Ｃ】

```
                                                                    10
                                                                    |
MSQS
MSQS
                                                                    10
                                                                    |
bcl-xL
bcl-xS
bcl-xL NRELVVDFLS YKLSQKGYSW SQFSDVEENR TEAPEGTESE METPSAINGN GDEFELRYRR
bcl-xS NRELVVDFLS YKLSQKGYSW SQFSDVEENR TEAPEGTESE METPSAINGN GDEFELRYRR
                                                                    10
                                                                    |
bcl-xL PSWHLADSPA VNGATAHSSS LDAREVIPMA AVKQALREA  GDEFELRYRR
bcl-xS PSWHLADSPA VNGATAHSSS LDAREVIPMA AVKQALREA  GDEFELRYRR
                                                                    10
                                                                    |
bcl-xL AFSDLTSQLH ITPGTAYQSF EQVVNELFRD GVNWGRIVAF FSFGGALCVE
bcl-xS AFSDLTSQLH ITPGTAYQSF EQ.......... .......... ..........
bcl-x1                       VVNELFRD GVNWGRIVAF FSFGGALCVE
                                                                    10
                                                                    |
bcl-xL SVDKEMQVLV SRIAAWMATY LNDHLEPWIQ ENGGWDTFVE LYGNNAAAES
bcl-xS .......... .......... .....DTFVE LYGNNAAAES
bcl-x1 SVDKEMQVLV SRIAAWMATY LNDHLEPWIQ ENGGW
                                                                    10
                                                                    |
bcl-xL RKGQERFNRW FLTGMTVAGV VLLGSLFSRK
bcl-xS RKGQERFNRW FLTGMTVAGV VLLGSLFSRK
                                        *----------**
```

FIG. 4C

【図５】

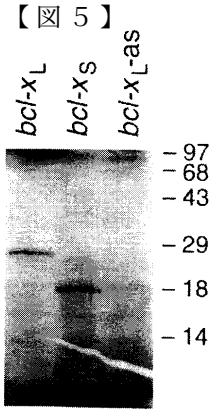


FIG. 5

【図６】

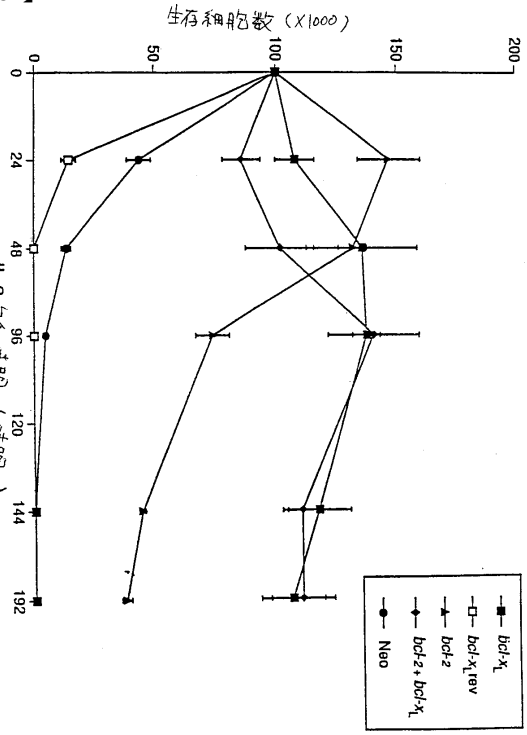


Fig. 6

【図７Ａ】

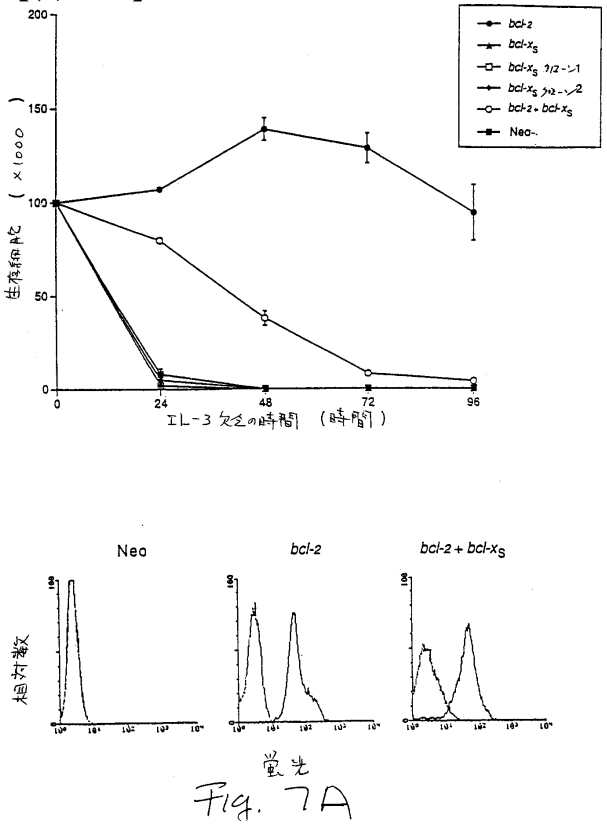


Fig. 7A

【図７Ｂ】

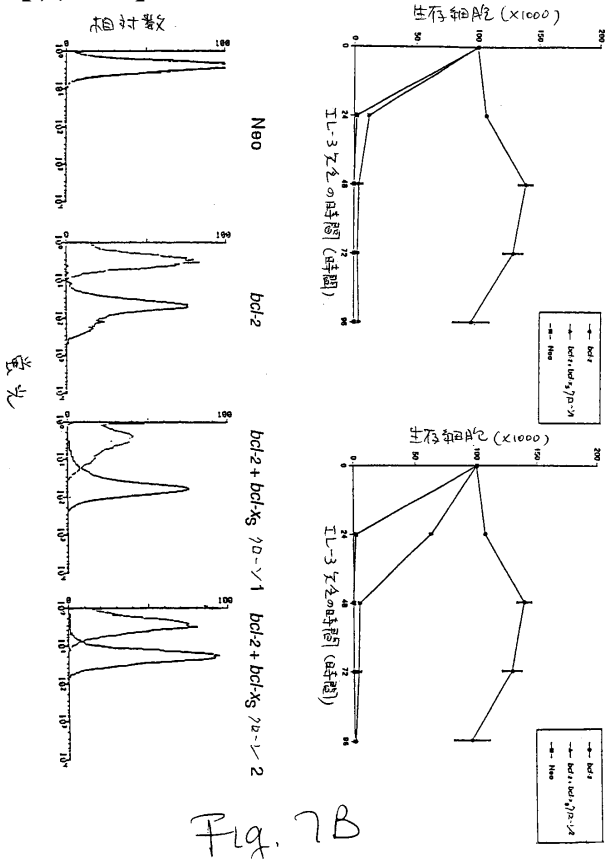


Fig. 7B

【図７Ｃ】

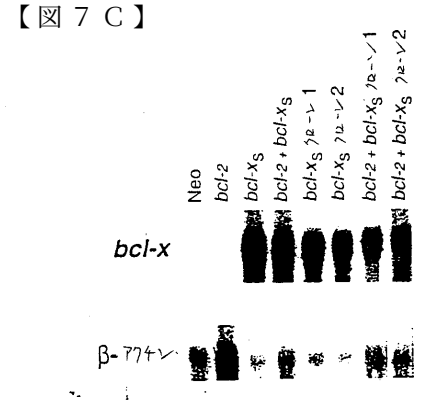
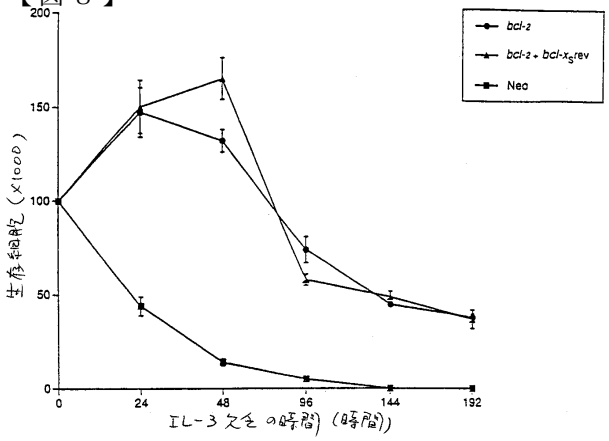


Fig. 7C

【図８】



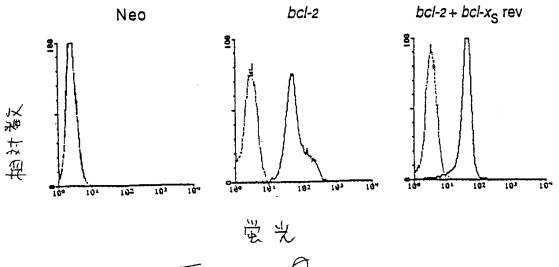


Fig. 8

【図９】



Fig. 9

【図１０】

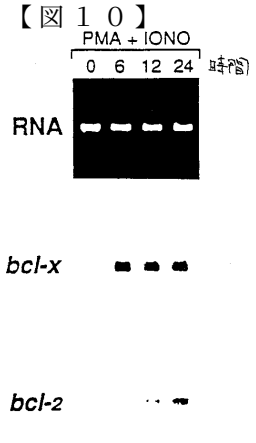


Fig. 10

【図１１Ａ】

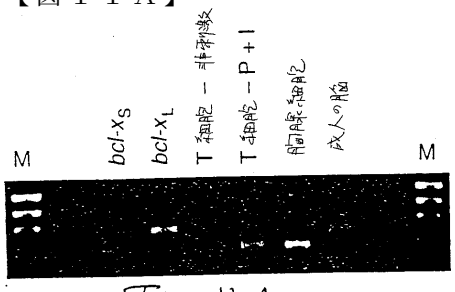


Fig. 11A

【図１１Ｂ】

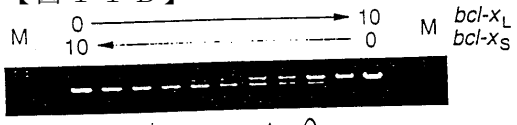


Fig. 11B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	***5/10***	***(2006.01)***	C12N	5/00	A
C12Q	***1/68***	***(2006.01)***	C12Q	1/68	A
G01N	***33/53***	***(2006.01)***	G01N	33/53	D
C07K	***14/47***	***(2006.01)***	C07K	14/47	
C07K	***16/18***	***(2006.01)***	C07K	16/18	

(73)特許権者 597015922
ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ ミシガン
The Regents of the University of Michigan
アメリカ合衆国 ４８１０９ ミシガン アン アーバー ウォルベリン タワー ２０７１ サウス ステート ストリート ３００３
(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74)代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72)発明者 トンプソン，クレイグ ビー.
アメリカ合衆国 イリノイ ６０６３７，シカゴ，イー．５７ティーエイチ ストリート １３７５
(72)発明者 ボイス，ローレンス エイチ.
アメリカ合衆国 イリノイ ６０６１５，シカゴ，エス．ウッドローン アベニュー ５４４７，アパートメント ２
(72)発明者 ヌーネズ，ガブリエル
アメリカ合衆国 ミシガン ４８１０５，アン アーバー，ウィスパーウッド ３０８０，アパートメント ４８０

審査官 坦ケ 隆幸

(56)参考文献 国際公開第９１／００５０４０（WO，Ａ１）
国際公開第９１／０１８０１３（WO，Ａ１）
国際公開第９２／０１４８２１（WO，Ａ１）
欧州特許出願公開第００２５２６８５（ＥＰ，Ａ１）
特開平０１－１１０６２９（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/00 - 15/90
BIOSIS/WPI(DIALOG)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq
PubMed
Science Direct
JSTPlus(JDream2)