

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-229507

(P2004-229507A)

(43) 公開日 平成16年8月19日(2004.8.19)

|                                      |               |             |
|--------------------------------------|---------------|-------------|
| (51) Int.Cl. <sup>7</sup>            | F I           | テーマコード (参考) |
| <b>C 1 2 N 15/09</b>                 | C 1 2 N 15/00 | 2 G O 4 5   |
| <b>A 6 1 K 38/00</b>                 | A 6 1 P 15/00 | 4 B O 2 4   |
| <b>A 6 1 P 15/00</b>                 | A 6 1 P 15/08 | 4 B O 6 3   |
| <b>A 6 1 P 15/08</b>                 | A 6 1 P 19/10 | 4 C O 8 4   |
| <b>A 6 1 P 19/10</b>                 | C O 7 K 14/47 | 4 H O 4 5   |
| 審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 17 頁) 最終頁に続く |               |             |

|           |                            |          |                                |
|-----------|----------------------------|----------|--------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2003-18343 (P2003-18343) | (71) 出願人 | 503360115                      |
| (22) 出願日  | 平成15年1月28日 (2003.1.28)     |          | 独立行政法人 科学技術振興機構                |
|           |                            |          | 埼玉県川口市本町4丁目1番8号                |
|           |                            | (74) 代理人 | 100110249                      |
|           |                            |          | 弁理士 下田 昭                       |
|           |                            | (72) 発明者 | 宮本 薫                           |
|           |                            |          | 福島県坂井郡丸岡町新鳴鹿2丁目111             |
|           |                            | (72) 発明者 | 水谷 哲也                          |
|           |                            |          | 福島県坂井郡丸岡町新鳴鹿2丁目100             |
|           |                            | (72) 発明者 | 梶谷 宇                           |
|           |                            |          | 福島県吉田郡松岡町神明1-140               |
|           |                            | Fターム(参考) | 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB21 |
|           |                            |          | DA13 DA36 DA37 FB02 FB03       |
|           |                            |          | FB05 FB09                      |
|           |                            |          | 4B024 AA01 AA11 CA04 HA14      |
|           |                            |          | 最終頁に続く                         |

(54) 【発明の名称】 転写活性化因子

## (57) 【要約】

【課題】生殖組織に特異的であり、視床下部－下垂体－生殖腺軸中で重要な役割を有していると考えられる新規な転写因子GCX-1を提供する。

【解決手段】卵巣中に卓越して発現している新規遺伝子GCX-1（配列番号2）をラットの卵巣顆粒細胞のcDNAライブラリーから単離した。この遺伝子及び遺伝子産物（配列番号1）の異常あるいは産生異常を調べたり、この転写活性化領域に作用する薬剤を開発すれば、不妊症、多くの胎性卵胞症候群、子宮内膜症、思春期早発症、骨粗しょう症等の生殖系器官の異常に起因する疾患の原因究明と治療が可能である。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の (a) 又は (b) から成る転写活性化因子。

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、転写活性化能を有するタンパク質

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の転写活性化因子を有効成分とする、転写活性化を目的とする薬剤。

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載の転写活性化因子を特異的に認識し結合することができる抗体又はアンタゴニスト。 10

## 【請求項 4】

被検者から生殖系器官の細胞を採取する段階、及び採取した細胞に対する請求項 3 に記載の抗体又はアンタゴニストの反応性を調べる段階から成る、生殖系器官の異常に起因する疾患の検査方法。

## 【請求項 5】

請求項 3 に記載の抗体又はアンタゴニストを有効成分とする、転写活性化を目的とする薬剤のスクリーニング剤。

## 【請求項 6】

以下の (a) 又は (b) から成る転写活性化因子の遺伝子。 20

(a) 配列番号 2 の塩基配列から成る DNA

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列から成るタンパク質、又は該アミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り転写活性化能を有するタンパク質をコードする DNA

## 【請求項 7】

被検者から請求項 6 に記載の遺伝子に相当する部分を含む DNA を採取する段階、及び採取した DNA を請求項 6 に記載の遺伝子の塩基配列と比較する段階から成る、生殖系器官の異常に起因する疾患の検査方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

30

## 【発明の属する技術分野】

この発明は、転写活性化因子に関し、より詳細には、生殖系器官に特異的に発現する転写活性化因子 GCX-1 に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

卵巣における特定の現象、即ち卵胞形成、排卵、又はステロイド産生のような現象はその組織における遺伝子発現に完全に依存している。卵巣における機能と遺伝子の関係を解明するために多くの研究が行われてきた (Endocr Rev 15 : 725-751 (1994); Mol Cell Endocrinol 163 : 61-66 (2000); Endocrinology 142 : 2184-2193 (2001); Trends Endocrinol Metab 13 : 169-173 (2002); Biol Reprod 67 : 900-910 (2002))。 40

発明者らは、卵胞発育の分子メカニズムに焦点を当てて、ゴナドトロピンにより誘導される多くの卵巣の遺伝子を同定した (Biochem Biophys Res Commun 230 : 518-523 (1997); J Biol Chem 275 : 22512-22519 (2000); Biol Reprod 64 : 1315-1319 (2001); Biol Reprod 66 : 1813-1819 (2002); Sekiguchi T et. al., Transcriptional regulation of epiregulin gene in t 50

he rat ovary. Endocrinology in press. )。ゴナドトロピン処置によりラットの卵巣中に強く誘導される新規の転写抑制因子を最近報告し、GIOT-1 (gonadotropin-inducible ovarian transcription factor-1) と命名した (非特許文献1)。次いで、発明者らはGIOT-1の生理学的機能を明らかにするために、卵巣においてGIOT-1と相互作用を示す蛋白を同定する試みを行い、転写性の調節補助因子TIF1 $\beta$  (transcriptional intermediary factor 1 $\beta$ , Proc Natl Acad Sci USA 93: 1422-1426 (2001); Mol Cell Biol 18: 5880-5887 (1998); Genes Dev 15: 3023-3038 (2001)) と転写調節因子RIC (rat homologs of human I-mfa domain containing protein, J Biol Chem 275: 4848-4857 (2000)) がGIOT-1と相互作用を示すことを報告した (非特許文献1)。

#### 【0003】

生殖組織中に発現することが知られている転写因子としてAd4BP/SF-1とDAX-1がある (非特許文献2~4)。Ad4BP/SF-1は、ステロイド産生酵素、StAR又はGIOT-1などを含むステロイド産生と関連する多くの遺伝子を調節してる。また胚形成中の生殖システムの発育において、Ad4BP/SF-1は重要な役割を演じている。DAX-1もAd4BP/SF-1の機能と拮抗することによりその組織の発育に  
20  
関与している。しかし、これらの因子は副腎腺中にも発現しており、副腎腺の発育にも関与しているため、生殖系器官特異的ではない。

#### 【0004】

##### 【非特許文献1】

Mol Endocrinol 15: 1693-1705 (2001)

##### 【非特許文献2】

Endocr Rev 18: 361-377 (1997)

##### 【非特許文献3】

Recent Prog Horm Res 51: 241-260 (1996)

##### 【非特許文献4】

Mol Endocrinol 10: 1261-1272 (1996)

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、生殖組織中に発現する転写因子であるAd4BP/SF-1やDAX-1 (非特許文献2~4) とは異なり、生殖組織に特異的であり、視床下部-下垂体-生殖腺軸中で重要な役割を有していると考えられる新規な転写因子GCX-1を提供する。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

発明者らは、生殖組織における転写因子の研究 (非特許文献1) の過程において、ラットの卵巣顆粒膜細胞cDNAライブラリーから、HMG-boxドメインを含有する転写因子様蛋白をコード化する新規のクローンを単離した。発明者らは、この新規遺伝子GCX-1 (agranulosa cell HMG-box protein-1、配列番号2) を単離し、GCX-1の構造と分布を決定し、GCX-1の生殖系、特に卵巣における役割を解明するために、その遺伝子の機能を解析した。またGCX-1の発現パターンについて実験し、GCX-1蛋白は生殖と関連する組織、即ち、視床下部、下垂体、生殖腺、子宮においてのみ発現していることを見出し、更にGCX-1蛋白が核内に局在していることを見出した。更に発明者らはGAL4を基本とする非相溶性検定法を用いて、GCX-1が遺伝子転写を活性化することを確認した。

#### 【0007】

即ち、本発明は、以下の (a) 又は (b) から成る転写活性化因子である。

10

20

30

40

50

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、転写活性化能を有するタンパク質

この転写活性化能は視床下部、下垂体、生殖腺、子宮などの生殖に関連する組織における転写活性化能をいい、レポーター遺伝子を用いた公知の方法により知ることができる。

また、遺伝子治療の目的で、この因子を生殖系細胞に導入し、細胞内での転写を活性化することができる。従って、本発明は、この転写活性化因子を有効成分とする、転写活性化を目的とする薬剤である。

#### 【0008】

更に、本発明は、この転写活性化因子を特異的に認識し結合することができる抗体又はアンタゴニストである。 10

この抗体は、本発明の転写活性化因子又はその活性部分をマウスなどの適当な動物に投与して、免疫反応を起こさせ、脾臓などの抗体産生組織から採取することができる。

また、このアンタゴニストは、例えば、本発明の転写活性化因子又はその活性部分から予想される立体構造から、結合可能な化合物をスクリーニングすること、又は、本発明の転写活性化因子又はその活性部分と結合するペプチドライブラリーを 2 ハイブリッドシステムを用いてスクリーニングすることにより、取得することができる。

#### 【0009】

また、このアミノ酸配列を認識する抗体を作成し、患者の卵巣顆粒膜細胞（これは体外受精の治療の際に卵とともに採取されてくるので利用可能）での量を調べることにより、GCX-1 の産生異常を知ることができる。 20

即ち、本発明は、被検者から生殖系器官の組織を採取する段階、及び採取した細胞に対する上記抗体又はアンタゴニストの反応性を調べる段階から成る、生殖系器官の異常に起因する疾患の検査方法である。

ここで生殖系器官とは視床下部、下垂体、生殖腺、子宮などをいい、生殖系器官の異常に起因する疾患とは、不妊症、多のう胞性卵胞症候群、子宮内膜症、思春期早発症、骨粗しょう症等をいう。

また、本発明は上記抗体又はアンタゴニストを有効成分とする、転写活性化を目的とする薬剤のスクリーニング剤である。

#### 【0010】

更に、本発明は、以下の (a) 又は (b) から成る転写活性化因子 (GCX-1) の遺伝子である。 30

(a) 配列番号 2 の塩基配列から成る DNA

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列から成るタンパク質、又は該アミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り転写活性化能を有するタンパク質をコードする DNA

この転写活性化能は、例えば、実施例 5 に記載した方法により、この遺伝子と共に適当なレポーター遺伝子を適当な細胞に導入して該レポーター遺伝子の発現を調べることにより知ることができる。

#### 【0011】

また、患者の白血球からゲノム DNA を分離し、GCX-1 の塩基配列に異常があるかどうかを調べることができる。 40

即ち、本発明は、被検者から上記遺伝子に相当する部分を含む DNA を採取する段階、及び採取した DNA をこの遺伝子の塩基配列と比較する段階から成る、生殖系器官の異常に起因する疾患の検査方法である。

#### 【0012】

##### 【発明の実施の形態】

本発明者らは、卵巣中に卓越して発現している新規遺伝子 GCX-1 をラットの卵巣顆粒細胞の cDNA ライブラリーから単離した（実施例 1）。GCX-1 遺伝子は、既によく研究されている DNA 結合モチーフの一種であり、酵母から哺乳類まで全ての真核生物に 50

広く分布しているHMG-boxモチーフを含む蛋白をコードしている。

HMG-boxは酵母から哺乳類まで真核生物に広く分布しているDNA結合モチーフの一つであり(Trends Genet 10: 94-100 (1994); Trends Biochem Sci 26: 163-174 (2001))、多くのHMG-box含有蛋白は、各種の生理学的現象、例えばrRNA転写調節因子としてのUBF(Science 241: 1192-1197 (1988); Nature 344: 830-836 (1990))、性決定に必須の蛋白としてのSRY(Nature 346: 240-244 (1990); Nature 346: 245-250 (1990))、T細胞分化調節因子としてのTCF(Nature 374: 70-74 (1995))とTOX(Nature Immunol 3: 272-280 (2002))などの重要な役割を演じていることが知られている。更に、ある種のHMG-box含有蛋白が転写調節物質としてではなく、細胞内の信号伝達物質として機能していることが最近報告された(Science 1999 285: 248-251 (1999); J Exp Med 192: 565-570 (2000); Nature 418: 191-195 (2002))。加えて、HMG-box蛋白が核のステロイドホルモン受容体と反応し、転写補助因子として作用することが報告されてきた(Mol Cell Biol 18: 4471-4487 (1998); Steroids 64: 576-586 (1999))。そのために、HMG-box蛋白は生殖-内分泌系の生物学的機能に強く関与していると考えられる。

#### 【0013】

HMG-boxモチーフを有する蛋白は、DNA結合様式により大まかに2群に分けられる。SRY又はTCFのような1群の蛋白はそれらの標的遺伝子上の特定のDNA配列を認識する。HMG B1、UBFなどの他の群に所属する蛋白は、非特異的DNA結合能を示す。前者の蛋白は1個のHMG-boxモチーフのみを有するが、後者の蛋白は2個又はそれ以上のHMG-boxモチーフを有している(Mol Endocrinol 10: 1261-1272 (1996); Trends Genet 10: 94-100 (1994))。

G CX-1は特定のタイプのHMG-box蛋白のように1個のHMG-boxモチーフしか持たないが(実施例1)、G CX-1のHMG-box内のアミノ酸配列は、非特異的タイプのHMG-box蛋白(Trends Genet 10: 94-100 (1994); Trends Biochem Sci 26: 163-174 (2001))の配列と低い有意な類似性を示しており、特異的タイプの蛋白とは明らかに類似性がない。それ故に、G CX-1は新規タイプのHMG-box蛋白に属すると考えられる。

#### 【0014】

G CX-1の遺伝子発現は、卵巣、睾丸、下垂体、視床下部に限定されていることから、G CX-1は視床下部-下垂体-生殖腺軸で作用していると考えられる(実施例2)。同様に転写因子であるAd4BP/SF-1とDAX-1はステロイド産生と内分泌組織の胚発育に必須であり、G CX-1と類似した遺伝子発現パターンを示す(Endocr Rev 18: 361-377 (1997); Recent Prog Horm Res 51: 241-260 (1996); Mol Endocrinol 10: 1261-1272 (1996))。しかし、これらの遺伝子は、G CX-1が全く発現していない副腎腺でも発現しており、生殖組織中でのみ発現している転写因子は今までに知られていない。一方、P450アロマターゼ(Endocr Rev 15: 342-355 (1994))とI型17 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素をコード化する遺伝子(Mol Cell Endocrinol 171: 71-76 (2001); Endocr Rev 18: 281-305 (1997))は生殖組織中にのみ発現していることが知られているが、これらは下垂体中では発現していない。それ故に、G CX-1は視床下部-下垂体-生殖腺システムにおいて重要な役割を

演じていると考えられる。

#### 【0015】

in situ 融合研究により GCX-1 の遺伝子発現はステロイド産生活性が未だ非常に低い、早期段階の卵胞の顆粒細胞に限定していることが明らかになった（実施例 3）。そして、GCX-1 の遺伝子発現が他のステロイド産生組織である副腎腺又は胎盤では見られなかったという所見は、GCX-1 がステロイドホルモンの生合成において重要な役割をしていないことを示唆している。むしろ、それは生殖組織の胚発育又は早期段階の卵胞の成長と発育においてある役割を演じていると考えられる。早期段階の卵胞における現象はゴナドトロピン刺激に依存していないと思われる。顆粒膜細胞中においてゴナドトロピンにより GCX-1 の誘導がないという所見は、上の推測と一致していると考えられる。 10

#### 【0016】

GCX-1 のウェスタンブロッティング解析により、GCX-1 遺伝子産物は卵巣の顆粒細胞の核内に実際に存在していることが明らかになり、GFP 融合蛋白解析により、推定上の NLS モチーフは GCX-1 の核内転座に必須であることが明らかとなった（結果は省略する。）。加えて、GAL4 融合蛋白を基本とする非相同性レポーター検定法により、GCX-1 は強力な転写活性化因子であることが明らかとなった。これらのデータは GCX-1 は生殖組織中で転写活性化因子として作用することを示唆している。GCX-1 の活性化ドメインを N 末端から 25-63 個の残基間の部位であることを示した。GCX-1 は夫々セリン、プロリン、リジン残基が豊富な部位も有しているが、これらの部位は転写活性には不要であった。活性化ドメインは LXXLL のような典型的な転写活性化モチーフ（Genes Dev 12: 3357-3368 (1998); Cell 110: 465-474 (2002); Endocrinology 143: 2461-2465 (2002)) を有していないが、その部位は疎水性アミノ酸残基が豊富で且つ LXXLL 様の配列を有している。LXXLL モチーフは核のステロイドホルモン受容体又は核内の相互活性化因子との相互作用に必要であることが知られている。しかし、発明者らは GCX-1 活性化ドメインと数種の既知の相互活性化因子間での相互作用を確認できなかった（データは示さない。）。位置特定変異解析の結果から、発明者らは、完全な活性を示すためには GCX-1 活性化ドメインの全体構造が必要であるに違いないと結論した。GCX-1 活性化ドメインの二次又は三次構造に関する情報はほとんどないが、上記の所見は GCX-1 活性化ドメインは新規タイプの相互活性化ドメインであることを示している。 20 30

#### 【0017】

##### 【発明の効果】

本発明の遺伝子（配列番号 2）及び遺伝子産物（配列番号 1）は生殖系のみが発現しており、特に卵巣で強く発現するため、排卵障害やステロイドホルモン産生異常の原因ともなりうることから、この遺伝子の異常あるいは産生異常を調べることにより、不妊症、多のう胞性卵胞症候群、子宮内膜症、思春期早発症、骨粗しょう症等の生殖系器官の異常に起因する疾患の原因究明と治療に利用できる。 40  
またアミノ酸配列（配列番号 1）中の転写活性化領域に作用する薬剤を開発すれば、それは上記疾患の治療薬となる。

#### 【0018】

##### 【実施例】

以下、実施例にて本発明を例証するが、本発明を限定することを意図するものではない。

##### 実施例 1

まず、ラット顆粒膜細胞を培養した。未成熟の Wistar ラット（21 日齢）を使用した。ごま油 0.1 ml 中にジエチルスチルベストロール（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）2 mg を加え、1 日 1 回、4 日間処置することにより卵巣顆粒膜細胞の増殖を刺激した。常時、国立衛生研究所のガイドラインに従って動物を処置した。卵巣を切開し、26 ゲージの針を用いて卵胞を穿刺することにより顆粒 50

膜細胞を分離し、分離した顆粒細胞を集めた。細胞を洗浄し、室温、5分間500g×5の簡単な遠心により細胞を採取し、トリパンブルー染色により生存性を調べた。細胞生存率は90%以上であった。その後、顆粒膜細胞をコラーゲン処理したプレート上に抗生物質と0.1%BSAを添加したHam F-12: Dulbeccoの修正Eagle培地(1:1, V:V)の中に入れ、炭酸ガス5%と空気95%を含む加湿混合ガス内で37℃下で培養した。

#### 【0019】

次に、酵母2種融合スクリーニングを行った。酵母2種融合システムにはCLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA)から購入したキットを用いた。全ての実験手順は、特記した以外は製造元の指示書に従って実施した。酵母2種融合システムのための親ベクターであるpGBKT7ベクターは酵母内でGAL4 DBD融合蛋白を発現する。誘導プラスミドであるpGBKT7-GIOT-1ベクターは以前記述した方法(非特許文献1)により作製した。TE/LiOAcを基本とした高効率形質転換法(Biotechniques 24: 596-600 (1998) 参照)を用いて、この誘導プラスミドによりAH109細胞を形質転換させた。酵母2種融合スクリーニングのためにラット顆粒膜細胞からプラスミドcDNAライブラリーを、既報(Biol Reprod 64: 1315-1319 (2001) 参照)に従って、作製した。pGBKT7-GIOT-1を有する酵母をライブラリーにより形質転換し、約 $7 \times 10^6$ 個の最初の形質転換した細胞を得た。次いで全てのクローンをスクリーニングし、7種のHIS<sup>3</sup>/ADE2<sup>+</sup>/MEL1<sup>+</sup>陽性クローンを得た。Big DyeターミネーターFSサイクル配列化キットと3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Japan)を用いてヌクレオチド配列解析を行い、次いでGenBank DNAデータベースを用いて同一性検索を行うことにより全てのクローンの特徴を調べた。データベースを用いた検索により、4種のクローンのヌクレオチド配列は既知の蛋白をコード化する遺伝子(非特許文献1)と高い類似性を有し、他の3種クローンは新規の蛋白をコード化することが判明した。この3種の新規クローンから、pACT2-GCX-1と名付けられ、HMG-boxモチーフを有する1219-bpを含むプラスミドを単離した。更に解析を行うために、758-bp EcoRI/BamHI断片(nt-160/597)をpBluescript II SK(+)ベクター(Stratagene, La Jolla, CA)のEcoRI/BamHI部位へサブクローニングし、得られたプラスミドをpBS-GCX-1と命名した。

#### 【0020】

次に、 $\lambda$ -ファージcDNAライブラリーの作製と全配列GCX-1 cDNAのクローニングを行った。TRIzol試薬(Invitrogen, Groningen, Netherlands)を用いて、ヒツジFSH(National Hormone and Pituitary Distribution Program, Bethesda, MD)30ng/mlを3時間処置して、顆粒膜細胞から全RNAを作製した。oligotex dT-30 super(Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)を用いてpoly(A)<sup>+</sup>-RNAを単離した。oligo-dTをプライマーとし、cDNA合成システムとSuperscript II(Invitrogen)を用いて15 $\mu$ gのpoly(A)<sup>+</sup>-RNAからcDNAを合成した。EcoRI/NotIアダプターを二本鎖cDNAに結合させ、両端をT4ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。そのcDNAを $\lambda$ ZAP Expressファージアーム(Stratagene)に結合させ、Gigapack IIGold(Stratagene)を用いてin vitroで包括することにより、cDNAライブラリーを作製した。そのcDNAライブラリーは $1 \times 10^7$ 個の独立したクローンを含んでいた。

GCX-1に対応する全配列cDNAを単離するために、ライブラリーをBcaBest DNA標識キット(宝バイオメディカルス)により標識されたpBS-GTX-1の7

58-bp  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP 標識 EcoRI/BamHI 断片を用いてスクリーニングした。約 60,000 種の cDNA クローンから 11 種の陽性のクローンを単離した。

#### 【0021】

この蛋白をコード化する完全な cDNA クローンを単離するために、単離クローンをプローブとして用いることによりその cDNA ライブラリーを再びスクリーニングし、473 個のアミノ酸の蛋白をコード化する遺伝子の完全な cDNA クローンを得た（配列番号 2）。この塩基配列からアミノ酸配列（配列番号 1）を得た。

図 1 に示すように、この蛋白は蛋白中心部に 1 個の HMG-box モチーフ（配列番号 1 のアミノ酸配列の 205-272 位）を有している。そのために、発明者らはそれを GCX-1 (granulosa cell HMG-box protein-1) と呼ぶ。その蛋白は HMG-box の N 末端に 1 個の NLS (nuclear localization signal) 様モチーフ（配列番号 1 のアミノ酸配列の 180-199 位）と夫々セリン高含有部位（配列番号 1 のアミノ酸配列の 124-164 位）、プロリン高含有部位（配列番号 1 のアミノ酸配列の 348-431 位）、リジン高含有部位（配列番号 1 のアミノ酸配列の 180-199 位）から成る 3 個のドメインも有している。これらの構造的特徴は転写調節因子に典型的なものである。

#### 【0022】

##### 実施例 2

GCX-1 の組織分存を調べるために、21 日齢のラットの各種の組織について RT-PCR を行い、ノーザンブロット解析を行った。

21 日齢の雌ラットを PMSG（帝国臓器株式会社）30 IU 又は hCG（三共株式会社）50 IU で感作し、卵巣を記述した時間に採取した。未成熟雌ラットの各種組織（視床下部、下垂体、小脳、副腎腺、腎臓、脾臓、腸管、肝臓、子宮及び卵巣）と未成熟雄ラットの睪丸から、TRIzol 試薬を用いて全 RNA を抽出した。ノーザンブロット解析のために、10  $\mu$ g の全 RNA を 1% 変性アガロースゲル上で電気泳動により分離し、ナイロン膜 (Biohyne, ICN Biomedicals, Inc., Glen Cove, NY) に移し、UV 照射により交差結合させた。前融合と融合を行うために、ExpressHyb ハイブリダイゼーション液 (CLONTech) を用いた。既に記述した pBS-GCX-1 の 758-bp 放射線標識 EcoRI/BamHI 断片又はラット USF-2（上流刺激因子）の 1.4-kbp  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP 標識 BamHI 断片をプローブとして使用した。前融合、融合及び洗浄法に関する条件は、提供者から得たプロトコルに従って実施した。ブロットを FUJIX 映像板（富士写真フィルム）に曝露した。融合信号を FUJIX BAS-2000 画像解析装置を用いて検出した。RT-PCR を行うために、5  $\mu$ g の全 RNA を逆転写し、反応混合液の一部（1/100）を PCR 反応に使用した。プライマーとして 5'-CCCCAATGAGCCACA GAAGCCA-3'（5'-プライマー：nt 589/609、配列番号 3）と 5'-GGAAAGCCTGCAAGGTCGGAG-3'（3'-プライマー：nt 936/955、配列番号 4）を用いた。反応条件として、FastStart Taq DNA Polymerase (Roche) を用いて 20 秒間 94℃ で変性、30 秒間 55℃ でアニールし、45 秒間 72℃ で伸展する操作を 30 回行った。1.5% アガロースゲル上で PCR 産物 10  $\mu$ l を電気泳動し、次いで臭化エチジウム (EtBr) 染色により可視化した。その結果を図 2 に示す。

#### 【0023】

GCX-1 遺伝子の発現は、視床下部 (hypothalamus)、下垂体 (pituitary)、睪丸 (testis)、子宮 (uterus) 及び卵巣 (ovary) などの、の限定された組織中において検出された。GCX-1 の発現は卵巣中で最も高かったが、副腎腺 (adrenal) と胎盤（データは示していない）中では発現が見られなかった。このことは、GCX-1 は視床下部-下垂体-生殖腺軸上で作用していることを強く示唆している。

#### 【0024】

10

20

30

40

50



実施例 3

*in situ* 融合法により卵胞発育の各段階での G C X - 1 の発現について調べた。アンチセンスプローブ作製のために、E c o R I により直線化された p B S - G C X - 1 を *in vitro* で T 3 R N A ポリメラーゼ (R o c h e) と  $\alpha$  -  $^{35}$  S C T P により転写した。T 7 R N A ポリメラーゼ (R o c h e) と  $\alpha$  -  $^{35}$  S C T P を用いて B a m H I 分解 p B S - G C X - 1 からセンスプローブを転写した。次に、ラット卵巢を鋳型にはめ込み、ドライアイス中で凍結した。12 ~ 14  $\mu$  m の厚さの切片をクリオスタットで作製し、*in situ* 融合のために A P S をコートしたスライドガラス上に包埋した。融合前に切片をプロティナーゼ K を処置し、アセチル化した。 $^{35}$  S 標識 c R N A プローブとの融合は 60 °C で 6 時間行い、切片を高ストリンジェンシーで洗浄し、N T B 3 乳 10  
 化剤 (E a s t m a n K o d a k C o . , R o c h e s t e r , N Y) を用いてオートラジオグラフ解析を行った。

【0025】

その結果を図 3 に示す。A は 8 日齢、B は 21 日齢、C は成熟 (発情間期) のラットの卵巢を摘出し、G C X - 1 の  $^{35}$  S 標識アンチセンス鎖 c R N A プローブと融合させたものを示す。D は、21 日齢ラットの卵巢の切片をセンス鎖 c R N A プローブと融合させたものを示す。

図 3 の A に示すように、非常に早期の前胞状段階の卵胞において強い信号が検出され、その発現は顆粒膜細胞層に限定していた。同様レベルの発現は 2 又はそれ以上の顆粒膜細胞層を有する僅かに進行した段階の卵胞でも観察された。図 3 の B に示すように、大型前胞 20  
 状と小型胞状段階の卵胞においてもその信号が検出されたが、更に進行した段階の大型胞状卵胞では非常に低レベルの発現が観察された。更に、図 3 の C に示すように、その信号は黄体中では僅かしか検出されなかった。これらの所見は、G C X - 1 遺伝子発現は早期の発育段階の卵胞中の未分化顆粒膜細胞に限定されていることを示している。

【0026】実施例 4

G C X - 1 に対する抗体を作製して、細胞中の内因性 G C X - 1 蛋白を確認した。N H <sub>2</sub> - S L L H L G D H E A G Y H S L C - C O <sub>2</sub> H ペプチド配列 (配列番号 1 のアミノ酸配列の 39 - 54 位) を用い、I g G 精製により G C X - 1 特異的ウサギポリクローナル抗血清を作製した。顆粒膜細胞を培養液 5 m l 中に  $5 \times 10^6$  生細胞を含む 60 m m 30  
 シャーレ中で無ホルモン条件下で 24 時間培養し、細胞をスクレーパーを用いて集め、燐酸緩衝食塩液 (P B S) 10 m l で洗浄した。得られた細胞を 1 m l の P B S 中に懸濁し、エッペンドルフ管内へ移し、4 °C 下で  $1500 \times g$ 、10 分間の遠心により、固形化した。既報 (N u c l e i c A c i d R e s 17 : 6419 (1989)) に従って、顆粒膜細胞の細胞抽出物を作製した。細胞固型物を 600  $\mu$  l の冷却緩衝液 A (10 m M H E P E S , p H 7 . 9 ; 10 m M K C l ; 1 m M E D T A ; 0 . 5 m M E G T A ; 1 m M D T T ; 及び 0 . 5 m M P M S F) 中で静かにピペット処理することにより再懸濁した。細胞を 15 分間氷の上で膨張させ、その後、N o n i d e t P - 40 10 % 液 37 . 5  $\mu$  l を加え、10 秒間強く攪拌した。得られたホモジネートを 4 °C 下で 5 分間、 $17000 \times g$  で遠心した。上清を蛋白分析のための細胞質分画とし 40  
 て用い、核固型物を 40  $\mu$  l の氷冷緩衝液 C (20 m M H E P E S , p H 7 . 9 ; 0 . 4 M N a C l ; 1 m M E D T A ; 1 m M E G T A ; 1 m M D T T ; 及び 1 m M P M S F) 中に再懸濁し、試験管を振盪台上で 4 °C 15 分間強く振盪した。その混合液を 4 °C 下で 15 分間  $17000 \times g$  で遠心し、得られた上清を核分画として蛋白分析に使用した。G F P - G C X - 1 融合蛋白を発現している H e p G 2 細胞から採取した核抽出物を同じプロトコールに従って作製した。細胞質と核抽出物 (各 100  $\mu$  g) を還元条件下で 10 % アクリルアミドゲル上で S D S - P A G E により電気泳動を行った。蛋白を I m m o b i l o n - P ニトロセルロース膜 (M i l l i p o r e C o . , B e d f o r d , M A) の方へ電気泳動により移動させ、ミルク緩衝液 (P B S - T [0 . 0001 % の T w e e n - 20 を含有する P B S] 中に 5 % のスキムミルク添加) と、室温中で 1 50

時間、ミルク緩衝液中の I g G 純化 G C X - 1 抗体 ( 0 . 0 1 9  $\mu$  g / m l ) とインキュベートすることによりブロッキングを行った。膜を P B S - T を用いて洗浄し、E C L - P l u s キット ( A m e r c h a m B i o s c i e n c e s C o . , P i s c a t a w a y , N J ) を用いて、製造元の提示書に従って免疫反応性の G C X - 1 蛋白を検出した。

#### 【 0 0 2 7 】

その結果を図 4 に示す。図中、A は G C X - 1 特異的抗血清の解析を示す。p E G F P - C 1 E 1 - 移入 ( l a n e 1 ) 又は p E G F P - G C X - 1 ( - 6 1 - 4 7 3 ) 移入 ( l a n e 2 ) H e p G 2 細胞の核抽出物を抗 G C X - 1 血清 ( I g G 精製を行った ) によるウエスタンブロット解析に供した。1 本の G F P - G C X - 1 融合蛋白に対する特異的バンドが示されている。B は、ラット卵巣の顆粒膜細胞における内因性 G C X - 1 蛋白の検出を示す。培養顆粒膜細胞から細胞質 ( l a n e 1 ) と核 ( l a n e 2 ) 抽出物を作製し、同じ抗血清を用いてウエスタンブロット解析を行った。1 本の G C X - 1 特異的バンドが示されている。

10

図 4 の A に示すようにポリクローナル抗体は効果的に G F P - G C X - 1 蛋白 ( l a n e 2 ) を認識した。免疫反応性の G C X - 1 はラットの顆粒膜細胞の核抽出物中 ( 図 4 の B 、 l a n e 2 ) でのみ検出されるが、細胞質分画中 ( 図 4 の B 、 l a n e 1 ) では検出されない。

#### 【 0 0 2 8 】

##### 実施例 5

20

G C X - 1 は核内蛋白であり、転写因子に典型的なモチーフの 1 種である H M G - b o x を有していることから、G C X - 1 の転写活性について調べた。

G C X - 1 蛋白の標的遺伝子が未だ不明であることから、G C X - 1 の転写能を確認するために G A L 4 を基本とする非相同性ルシフェラーゼレポーターシステムを用いた。p R L - C M V 1 n g と 5  $\times$  G A L 4 - E 1 b / L u c ホタルルシフェラーゼレポータープラスミド又は p G L 3 - 基本レポータープラスミド 1 0 0 n g を H e p G 2 細胞に同時移入した。図 5 に記述した量の p S G - G C X - 1 ( - 6 1 - 4 7 3 ) を同様に細胞内へ移入した。各試料中に等量の D N A を含むように G A L 4 D B D のみを発現する p S G 4 2 4 をある試料中へ添加した。

その結果を図 5 に示す。G A L 4 D B D - G C X - 1 融合蛋白の発現はレポータールシフェラーゼ活性を大きく増強させた。G C X - 1 プラスミド 0 . 1 n g を添加すると、約 2 5 倍のルシフェラーゼ活性の誘導を起し、1 n g のプラスミドは約 1 0 0 倍の誘導を起した。一方、G A L 4 結合配列を有しないレポータープラスミドを 5  $\times$  G A L 4 - E 1 b / L u c の代わりに用いると、G C X - 1 プラスミドの同時移入によっても誘導は見られなかった。これらの所見は G C X - 1 は非常に強力な転写活性化因子であることを明確に示している。

30

#### 【 0 0 2 9 】

##### 実施例 6

次いで G C X - 1 の相互活性化ドメインについて調べた。G A L 4 D B D - G C X - 1 欠損変異を有する各種のプラスミド構成物を作製し、p R L - C M V 1 n g 、 5  $\times$  G A L 4 - E 1 b / L u c レポータープラスミド 1 0 0 n g 及び p S G - G C X - 1 欠損各種変異体 1 n g を H e p G 2 細胞に同時移入した。その結果を図 6 に示す。

40

図 6 に示すように、N 末端から 2 5 - 6 3 個のアミノ酸残基間の部位は G C X - 1 の転写活性に必須であることが証明された。この部位は今までに報告されている典型的な転写活性化モチーフを含有していない。

#### 【 0 0 3 0 】

##### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> 転写活性化因子

<130> PS03-1238

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

10

<211> 473

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 1

Met Ser Asp Gly Asn Pro Glu Leu Leu Ser Thr Ser Gln Thr Tyr Asn

1 5 10 15

Ser Gln Gly Glu Ser Asn Glu Asp Tyr Glu Ile Pro Pro Ile Thr Pro

20

20 25 30

Pro Asn Leu Pro Glu Pro Ser Leu Leu His Leu Gly Asp His Glu Ala

35 40 45

Gly Tyr His Ser Leu Cys His Gly Leu Ala Pro Asn Gly Leu Leu Pro

50 55 60

Ala Tyr Ser Tyr Gln Ala Met Asp Leu Pro Ala Ile Met Val Ser Asn

65 70 75 80

30

Met Leu Ala Gln Asp Gly His Leu Leu Ser Gly Gln Leu Pro Thr Ile

85 90 95

Gln Glu Met Val His Ser Glu Val Ala Ala Tyr Asp Ser Gly Arg Pro

100 105 110

Gly Pro Leu Leu Gly Arg Pro Ala Met Leu Ala Ser His Met Ser Ala

115 120 125

Leu Ser Gln Ser Gln Leu Ile Ser Gln Met Gly Leu Arg Ser Gly Ile

40

130 135 140

Ala His Ser Ser Pro Ser Pro Pro Gly Ser Lys Ser Ala Thr Pro Ser  
 145                      150                      155                      160  
 Pro Ser Ser Ser Thr Gln Glu Glu Glu Ser Asp Ala His Phe Lys Ile  
                                  165                      170                      175  
 Ser Gly Glu Lys Arg Pro Ser Thr Asp Pro Gly Lys Lys Ala Lys Asn  
                                  180                      185                      190  
 Pro Lys Lys Lys Lys Lys Lys Asp Pro Asn Glu Pro Gln Lys Pro Val  
                                  195                      200                      205  
 Ser Ala Tyr Ala Leu Phe Phe Arg Asp Thr Gln Ala Ala Ile Lys Gly  
                                  210                      215                      220  
 Gln Asn Pro Ser Ala Thr Phe Gly Asp Val Ser Lys Ile Val Ala Ser  
 225                      230                      235                      240  
 Met Trp Asp Ser Leu Gly Glu Glu Gln Lys Gln Ala Tyr Lys Arg Lys  
                                  245                      250                      255  
 Thr Glu Ala Ala Lys Lys Glu Tyr Leu Lys Ala Leu Ala Ala Tyr Arg  
                                  260                      265                      270  
 Ala Ser Leu Val Ser Lys Ser Pro Pro Asp Gln Gly Glu Ala Lys Asn  
                                  275                      280                      285  
 Ala Gln Ala Asn Pro Pro Ala Lys Met Leu Pro Pro Lys Gln Pro Met  
                                  290                      295                      300  
 Tyr Ala Met Pro Gly Leu Ala Ser Phe Leu Thr Pro Ser Asp Leu Gln  
 305                      310                      315                      320  
 Ala Phe Arg Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ser Leu Ala Arg Thr Leu Gly  
                                  325                      330                      335  
 Ser Lys Ala Leu Leu Pro Gly Leu Ser Thr Ser Pro Pro Pro Pro Ser  
                                  340                      345                      350  
 Phe Pro Leu Ser Pro Ser Leu His Gln Gln Leu Pro Leu Pro Pro His  
                                  355                      360                      365  
 Ala Gln Gly Thr Leu Leu Ser Pro Pro Leu Ser Met Ser Pro Ala Pro

10

20

30

40

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Gln Pro Pro Val Leu Pro Ala Pro Met Ala Leu Gln Val Gln Leu Ala |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Met Ser Pro Ser Pro Pro Gly Pro Gln Asp Phe Pro His Ile Ser Asp |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Phe Pro Ser Gly Ser Gly Ser Arg Ser Pro Gly Pro Ser Asn Pro Ser |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Ser Ser Gly Asp Trp Asp Gly Ser Tyr Pro Ser Gly Glu Arg Gly Leu |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Gly Thr Cys Arg Leu Cys Arg Ser Ser Pro Pro Pro Thr Thr Ser Pro |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
| Lys Asn Leu Gln Glu Pro Ser Ala Arg                             |     |     |

10

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1419

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 2

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| aigagigacg gaaatccaga gctcctgtca accagccaga cctataacag ccagggcgag | 60  |
| agcaacgaag actatgagat cctcctata acacctccca atctccctga gccatccctc  | 120 |
| ctgcacciggg gggaccacga agccgggtac cactcactgt gtcacggcct tgcgccaac | 180 |
| ggctctgtcc ccgcctactc gtaccaggca atggatctcc cggccatcat ggtgtccaac | 240 |
| atgctggccc aggatggcca cctgctgtca ggacagctgc ccacgatcca ggaaatggtc | 300 |
| cactcggagg tagctgccta tgactcaggc cggccagggc cctgctggg ccgcccctgcg | 360 |
| atgctggcca gccacatgag tgccctcagt caatcccagc tcattccca gatgggcctc  | 420 |
| cggagtggca ttgcccacag ctcctccatca cccccagga gcaagtcagc aaccccgctc | 480 |
| ccatccagct ccacccagga ggaggagtca gatgccatt tcaagattc aggagagaag   | 540 |
| agacctcaa cagacccagg caaaaaggcc aaaaatccaa agaagaagaa gaagaaggat  | 600 |
| cccaatgagc cacagaagcc agtgtcggc tacgtctct tcttcagaga cctcaggct    | 660 |

30

40

```

gccatcaagg ggcagaaccc cagtgccacc tttggggatg tttccaaaat tgtggcctcc 720
atgtgggaca gcctgggaga agagcagaaa caggcgtata agaggaagac cgaagctgcc 780
aagaaggagt acctgaaagc cttggcggcc tacagagcta gcctcgtgtc caagagcccc 840
ccggaccaag gcgaggccaa gaacgctcag gcaaaccac cagccaaaat gcttccaccc 900
aagcagccca tgtacgcat gcccgccctg gcttcccttc tgacgccctc cgacctgcag 960
gctttccgca gcgcagcctc tctgccagc ctgccagaa cgctgggctc caaggccctg 1020
ctgccaggcc tcagcacctc cccaccacca cctctcttcc ctctcagccc ctcttgcac 1080
cagcagctgc cactgccacc ccacgcgcag ggtaccttcc tcagcccgcc tctcagcatg 1140
tccccagccc cgcagcctcc tgtcctgcct gccccatgg cactccaggt gcagctggcg 1200
atgagccctt cgctccagg gccacaggac tttccacaca tctctgactt cccagtggc 1260
tctggctccc gctcacctgg cccatccaac cttccagca gcggggactg ggaatgggagt 1320
taccacagtg gggagcgcgg cctcggcacc tgcagactct gcagaagcag cccaccgccc 1380
accaccagcc caaagaacct gcaggaacct tctgcccg 1419

```

10

〈210〉 3

〈211〉 21

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial sequence

〈400〉 3

```
cccaatgagc cacagaagcc a 21
```

〈210〉 4

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial sequence

〈400〉 4

```
ggaaagcctg caggtcggag 20
```

20

30

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】 G C X - 1 の推定アミノ酸配列（配列番号 1）を示す図である。下線は推定上の核局在信号（N L S）部位を示し、太線は推定上の H M G - b o x ドメインを示す。 40

【図 2】 ラットにおける G C X - 1 の遺伝子発現を示す図である。

【図 3】 ラット卵巣中の G C X - 1 の i n s i t u 融合化を示す図である。左図は明視野観察、右図は暗視野を示し、目盛り線は 0 . 2 m m を示す。

【図 4】 内因性 G C X - 1 蛋白の同定を示す図である。

【図 5】 G C X - 1 は転写活性化因子であることを示す図である。各測定値は、4 回の独立した移入実験における平均値と S D で示す。

【図 6】 G C X - 1 の相互活性化ドメインの決定を示す図である。各測定値は 4 回の独立した移入実験における平均値とその S D で示している。

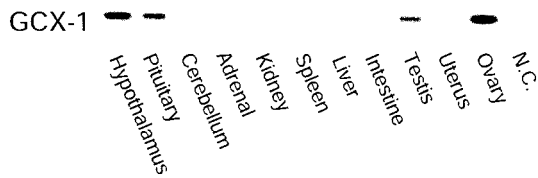
【 図 1 】

```

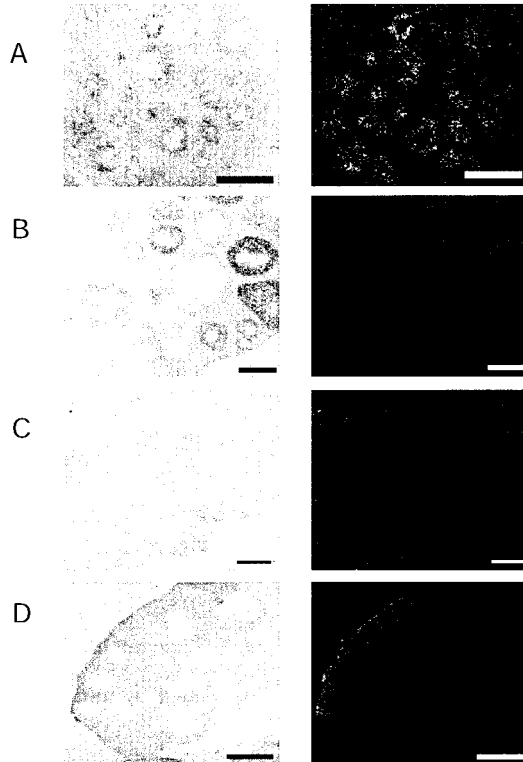
1  MSDGNPELLSTSTQYNSQGESNEDYEIPITPPNLPPEPSLLHLGDHEAGY 50
51 HSLCHGLAPNGLLPAYSQAMDLPALMVSNMLAQDGHLLSGQLPTIQEMV 100
101 HSEVAAYDSGRPGPLLRPAMLASHMSALSQSLISQMGLRSGIAHSSPS 150
151 PPGSKSATPSPSSSTQEEESDAHFKISGEXRPFSTDPGKKAKNPKKKKKD 200
201 PNEPQKFPVSAYALFFRDTQAAIKGQNPSATFGDVSKIIVASMWDSLGEQK 250
251 QAYKRKTEAAKKEYLKALAAAYRASLVSKSPDQGEAKNAQANPPAKMLPP 300
301 KQPMYAMPGLASFLTPSDLQAFRSAASPASLARTLGSKALLPGLSTSPPP 350
351 PSFPLSPSLHQQLPLPPHAQGTLLSPPLSMSPAPQPPVLPAPMALQVQLA 400
401 MSPSPPGPQDFPHISDFPSGSGSRSPGSPSPSSSGDWDGSPYPSGERGLGT 450
451 CRLCRSSPPPTTSPKNLQEPSAR 473

```

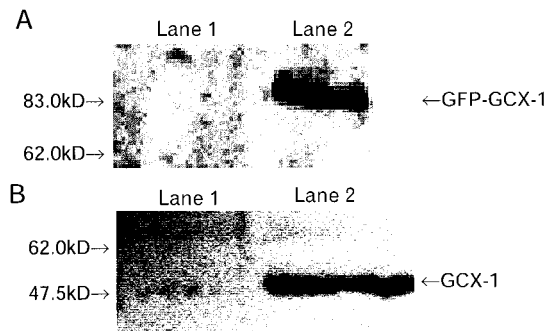
【 図 2 】



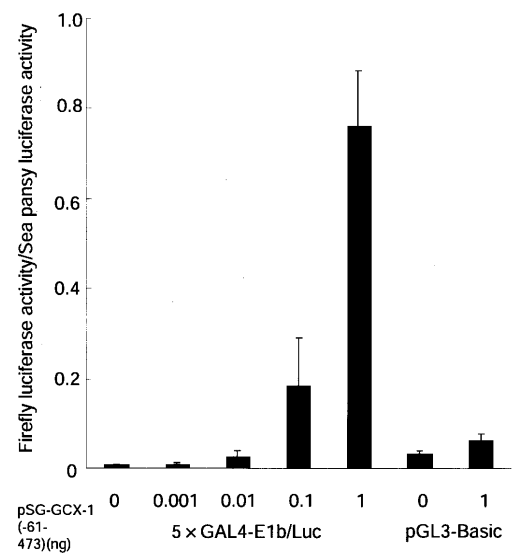
【 図 3 】



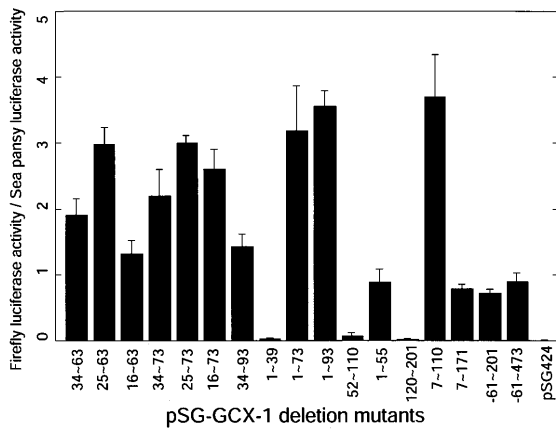
【 図 4 】



【 図 5 】



【図 6】





フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | F I            | テーマコード (参考) |
|--------------------------|----------------|-------------|
| C 0 7 K 14/47            | C 0 7 K 16/18  |             |
| C 0 7 K 16/18            | C 1 2 Q 1/02   |             |
| C 1 2 Q 1/02             | C 1 2 Q 1/68   | A           |
| C 1 2 Q 1/68             | G 0 1 N 33/15  | Z           |
| G 0 1 N 33/15            | G 0 1 N 33/50  | Z           |
| G 0 1 N 33/50            | A 6 1 K 37/02  |             |
| // G 0 1 N 33/53         | G 0 1 N 33/53  | M           |
| G 0 1 N 33/566           | G 0 1 N 33/566 |             |

F ターム(参考) 4B063 QA19 QQ08 QQ43 QR55 QS34  
 4C084 AA02 AA07 BA22 BA23 DC50 ZA81 ZA97  
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA26 EA50