

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3615552号
(P3615552)

(45) 発行日 平成17年2月2日(2005.2.2)

(24) 登録日 平成16年11月12日(2004.11.12)

(51) Int. Cl.⁷

F I

GO 1 N 33/50

GO 1 N 33/50

Z

GO 1 N 33/15

GO 1 N 33/15

Z

GO 1 N 33/566

GO 1 N 33/566

請求項の数 7 (全 10 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平8-531998 (86) (22) 出願日 平成8年4月19日(1996.4.19) (65) 公表番号 特表平11-504423 (43) 公表日 平成11年4月20日(1999.4.20) (86) 国際出願番号 PCT/US1996/005639 (87) 国際公開番号 W01996/033416 (87) 国際公開日 平成8年10月24日(1996.10.24) 審査請求日 平成15年4月4日(2003.4.4) (31) 優先権主張番号 08/426,529 (32) 優先日 平成7年4月20日(1995.4.20) (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 タノックス, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 テキサス 77025, ヒューストン, ステラリンク 103 01 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策 (72) 発明者 バー, フィリップ ジェイ. アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 63, オリンダ, ヤロウ バレー ロー ド 79 (72) 発明者 キーファー, マイケル シー. アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 17, クレイトン, ライト コート 4 01 最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 新規なアポトーシス調整タンパク質を用いる治療剤をスクリーニングする方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

潜在的な抗ウイルス治療剤をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

(a) Bakタンパク質もしくはBak - 2タンパク質または該Bakタンパク質もしくはBak - 2タンパク質の部分もしくは誘導体とウイルスタンパク質とをこれらが結合する条件下で組み合わせて試験サンプルを形成する工程であって、該Bakタンパク質もしくはBak - 2タンパク質または該Bakタンパク質もしくはBak - 2タンパク質の部分もしくは誘導体は、BHRF1に結合し、該誘導体は、該Bakタンパク質もしくはBak - 2タンパク質に対して1または数個のアミノ酸の置換、付加、もしくは欠失を有する、工程；

(b) 該試験サンプルを潜在的な治療剤に曝す工程；および

(c) 該Bakタンパク質もしくは該Bak - 2タンパク質と該ウイルスタンパク質との結合をモニターする工程、を包含し；

ここで、潜在的な治療剤が添加されていないコントロールの試験サンプルと比較して、潜在的な治療剤が該結合を混乱させる場合、該治療剤はさらなる研究のために選択され、ここで、該ウイルスタンパク質は、BHRF1、もしくは該BHRF1に対する相同タンパク質、または該BHRF1もしくは該相同タンパク質の部分もしくは誘導体であり、該BHRF1、もしくは該BHRF1に対する相同タンパク質、または該BHRF1もしくは該相同タンパク質の部分もしくは誘導体は、該Bakタンパク質もしくは該Bak - 2タンパク質に結合し、該BHRF1もしくは該相同タンパク質の誘導体は、該BHRF1もしくは該相同タンパク質に対して1または数個のアミノ酸の置換、付加、または欠失を有する、方法。

10

20

【請求項2】

前記潜在的な治療剤が、任意の薬学的薬剤、サイトカイン、小分子薬剤、細胞透過性小分子薬剤、ホルモン、インターロイキンとレクチン、PMA、LPSとの組み合わせ、二特異性抗体、ペプチド模倣物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および細胞機能またはタンパク質発現を改変する他の薬剤からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記Bakタンパク質または前記Bak - 2タンパク質が、Bak、Bak - 2、前記ウイルスタンパク質への結合をもたらすのに十分なそれらの部分、および前記ウイルスタンパク質への結合をもたらすのに十分なそれらの部分を含有するそれらの融合タンパク質からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

10

【請求項4】

前記融合タンパク質が、エピトープタグ化Bakタンパク質およびエピトープタグ化Bak - 2タンパク質からなる群より選択される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記ウイルスタンパク質が、エプスタイン - バーウイルスBHRF1タンパク質、ならびにヘルペスウイルスおよびヘルペス様ウイルスにより発現されるBHRF1に相同なタンパク質からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記モニターする工程が、共沈、タンパク質相互作用性トラッピング、およびELISAからなる群より選択される方法による、請求項1に記載の方法。

20

【請求項7】

請求項5に記載の方法であって、前記ヘルペスウイルスおよびヘルペス様ウイルスが、サイトメガロウイルス、水痘 - 帯状疱疹ウイルスおよび単純ヘルペスウイルスからなる群より選択される、方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、アポトーシス調整活性を有する新規なタンパク質を用いる治療剤をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

アポトーシスは、個々の細胞死をもたらす正常な生理学的プロセスである。このプログラムされた細胞死のプロセスは、種々の正常および病原性の生物学的事象に關与し、そして多くの無関係な刺激により誘導され得る。アポトーシスの生物学的調節の変化はまた、加齢の間にも起こり、そして加齢に關連する多くの健康状態および疾患の原因ともなっている。アポトーシスの最近の研究は、細胞死に至る一般的な代謝経路が幅広い種々のシグナルにより開始され得ることを示唆している。これらのシグナルには、ホルモン、血清の成長因子涸渇、化学療法剤、電離放射線、およびヒト免疫不全ウイルス(HIV)による感染が挙げられる。Wyllie (1980) Nature 284:555 - 556; Kanterら、(1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 118:392 - 399; DukeおよびCohen (1986) Lymphokine Res. 5:289 - 299; Tomeiら、(1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 155:324 - 331; Krumanら、(1991) J. Cell. Physiol. 148:267 - 273; AmeisenおよびCapron (1991) Immunology Today 12:102; および SheppardおよびAscher (1992) J. AIDS 5:143。従って、アポトーシスの生物学的制御を調整する薬剤は、幅広い種々の状態において治療的有用性を有する。

30

アポトーシス性細胞死は、細胞の収縮、クロマチン縮合、細胞質小泡形成(blebbing)、膜透過性の増大、および染色体内DNA開裂によって特徴付けられる。Kerrら、(1992) FASEB J. 6:2450; およびCohenおよびDuke (1992) Ann. Rev. Immunol. 10:267。小泡(bleb)は、小さく、膜のカプセルで包まれた球体であり、アポトーシス細胞の表面から切り取られ、周囲の細胞組織に損傷を与えるスーパーオキシドラジカルを産生し続け得、そして炎症プロセスに關与し得る。

40

Bcl - 2 遺伝子は、濾胞性リンパ腫における一般的な染色体転座部位 t (14:18) で発見され、そしてbcl - 2 の異常な過剰発現を引き起こす。Tsujiimotoら、(1984) Science 226:

50

1097 - 1099; および Cleary ら、(1986) Cell 47:19 - 28. bcl - 2 の正常な機能は、アポトーシスの防御である; B細胞における bcl - 2 の調節されない発現は、リンパ腫の発達における重要な要因であり得る増殖 B細胞の数の増大につながると考えられている。McDonnell および Korsmeyer (1991) Nature 349:254 - 256; および概説については、Edgington (1993) Bio/Tech. 11; 787 - 792 を参照のこと。Bcl - 2 はまた、線照射により誘導される細胞死をブロックし得る。Sentman ら、(1991) Cell 67:879 - 888; および Strassen (1991) Cell 67:889 - 899. 現在では、bcl - 2 がほとんどのタイプのアポトーシス性細胞死を阻害することは公知であり、そしてフリーラジカル生成部位において酸化防止経路を調節することにより機能すると考えられている。Hockenbery ら、(1993) Cell 75:241 - 451.

正常な細胞事象であるアポトーシスはまた、病的な状態および種々の傷害によっても誘導され得る。アポトーシスは、以下に挙げる広範な種々の状態に關与するが、それらに限定されない: 心臓血管疾患; ガンの退縮; 免疫調節; ウイルス性疾患; 貧血; 神経学的障害; 下痢および赤痢のような胃腸障害; 糖尿病; 脱毛; 器官移植物の拒絶; 前立腺肥大; 肥満; 眼障害; ストレス; および加齢。

Bcl - 2 は、タンパク質のファミリーに属し、それらのいくつかはクローニングされ配列決定されている。Williams および Smith (1993) Cell 74:777 - 779. 種々の Bcl - 2 のメンバーは、ヘテロ 2 量体として相互に会合する能力を有する。Oltvai ら (1993) Cell 74:609 - 619; および Sato ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9238 - 9242. さらに、BHRF1 は、Bcl - 2 に対して 25% の配列同一性を示し (Cleary ら (1986) Cell 47:17 - 28)、そして B細胞をアポトーシスから防御することが遺伝子移入研究により示されている。Henderson ら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8479 - 8483.

ヘルペスウイルス科のウイルスは、代表的に潜伏感染および再発性感染を生じる。ヘルペスウイルスゲノムは、短い領域と長い領域とを有する配列からなる。ヘルペスウイルス粒子は、180nm ~ 200nm の直径を有する。多くの粒子はエンベロープを含まない。代表的には、DNA は、会合したタンパク質のまわりに巻き付けられる。ヘルペスウイルスは、不規則な期間、静止状態を維持する傾向がある。

本明細書に引用される全ての参考文献は、前出および後出のどちらも、本明細書中に参考として暖用される。

発明の要旨

Bak および Bak - 2 タンパク質の活性レベルを刺激する薬学的薬剤、ならびに Bak および Bak - 2 タンパク質の活性レベルを阻害する薬学的薬剤をスクリーニングする方法が提供される。この方法は、Bak タンパク質とウイルスタンパク質とを、これらが相互作用して試験サンプルを形成する条件下で組み合わせる工程、この試験サンプルを潜在的な治療剤に曝す工程、およびタンパク質の相互作用をモニタリングする工程を包含する。薬剤が全く添加されていないコントロールの試験サンプルと比較して、相互作用を混乱させる潜在的な治療剤が、さらなる研究のために選択される。

【図面の簡単な説明】

図 1 は、Bak cDNA のヌクレオチド配列、およびそれによりコードされるアミノ酸配列を示す。

図 2 は、Bak - 2 cDNA の配列および隣接配列、ならびに Bak - 2 タンパク質の対応する推定アミノ酸配列を示す。

図 3 は、Bak および Flag - Bak (F - Bak) 融合タンパク質と Epstein - Barr ウイルス BHRF - 1 タンパク質との相互作用を示す。A 欄において、レーン 1 はインビトロで同時に翻訳されたタンパク質 F - Bak/BHRF - 1 から得られた結果を示し、そしてレーン 2 は抗 FLAG アガロースに結合した F - Bak/BHRF - 1 タンパク質を示す。B 欄において、レーンは、Bak タンパク質が Bak - 2 であること以外は同じである。

発明の開示

本発明は、潜在的な抗ウイルス治療剤をスクリーニングする方法を提供する。新規な bcl - 2 相同物である Bak および Bak - 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質は、Epstein - Barr ウイルス (EBV) のタンパク質 BHRF1 と相互作用

10

20

30

40

50

用することが見出されている。これは、Bakタンパク質が疾患の病原性に寄与することを示す。BHRF1は、EBVの早期溶解サイクルタンパク質である。Pearsonら(1987) *Virology* 160:151-161。本発明は、Bakタンパク質とウイルスタンパク質またはそれらの機能的部分とを、潜在的な治療剤に曝す工程、およびタンパク質の相互作用をモニタリングする工程を含む方法を包含する。本発明はさらに、クローニングされたBakまたはBak-2遺伝子を発現する組換え細胞およびトランスジェニック動物を利用する。

Bakの遺伝子およびタンパク質のクローニングおよび分析は、共有に係るWO出願PCT/US94/13930に詳細に記載される。Bakの遺伝子およびタンパク質はまた、Kieferら(1995) *Nature* 374:736に記載される。Bakタンパク質のヌクレオチド配列および推定アミノ酸残基配列を図1に示し；そしてBak-2のヌクレオチド配列および推定アミノ酸残基配列を図2に示す。Bak mRNAは、種々のヒトの器官および組織においてノーザンブロット分析により検出されている。これらの器官は、肝臓；心臓；骨格筋；肺；腎臓；および膵臓を包含する。

これらの参考文献はまた、Bakタンパク質がアポトーシスを調整し得ることを開示する。リンパ芽球細胞株において、Bakタンパク質の発現が、Fas媒介性アポトーシスを減少させることが示された。マウスの始原B細胞株FL5.12において、Bak-2タンパク質およびBakタンパク質の誘導体がIL-3誘導性アポトーシスを減少させた。一方、Bakタンパク質はアポトーシスを増加させた。従って、細胞の型、Bakタンパク質の誘導体、およびアポトーシスの誘導方法に依存して、アポトーシスは、Bakタンパク質の濃度を制御することにより、高度に特異的な様式で調整され得る。

本明細書中で使用されるように、用語「Bak遺伝子」は、本明細書およびPCT/US94/13930に記載の核酸分子をいい、「Bakタンパク質」は、それらによりコードされるタンパク質をいう。ヌクレオチドは、cDNAおよび相補的DNA、ゲノムに由来するDNA、ならびに合成または半合成のDNAまたはRNAを包含するが、これらに限定されない。Bak cDNAのヌクレオチド配列を、制限エンドヌクレアーゼ部位の位置とともに図1に示す。

Bak-2 cDNAのヌクレオチド配列を、Bak-2タンパク質の推定アミノ酸配列および制限エンドヌクレアーゼ認識部位の位置とともに図に示す。Bak遺伝子はヒトの第6染色体上に位置し、そしてBak-2遺伝子はヒトの第20染色体上に位置する。ヒトの第11染色体上に位置し、このファミリーのメンバーでもあるBak-3も存在する。Bak-3は、偽遺伝子のようなものである。蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)は、Bak遺伝子のおよその位置が6p21-23であることを示した。

本発明は、改変(例えば、欠失、置換、および付加)されたBak DNA配列の使用を含み、特に、ゲノムDNAの非コード領域において改変されたBak DNAの使用を含む。このような変化はクローニングを容易にし、そして遺伝子の発現を改変するのに有用である。BHRF1に結合するに十分なBakタンパク質の一部または任意の他の適切なウイルスタンパク質をコードする任意のDNAが、本明細書における使用に適切である。以下に記載するように、種々の融合タンパク質が本明細書における使用に適切である。

コードされるアミノ酸残基を変化させないか、あるいは結果として保存的に置換されるアミノ酸残基となるかのいずれかである種々の置換が、コード領域内で作製され得る。コードされるアミノ酸残基を変化させないヌクレオチドの置換は、異なる系での遺伝子発現を最適化させるのに有用である。適切な置換は当業者に公知であり、例えば、特定の発現系における好ましいコドン使用を反映するように行われる。

本発明は、Bak遺伝子の機能的に等価な改変体および誘導体の使用を含み、それらはBakタンパク質の特性を高め得るか、減少させ得るか、またはそれに重大な影響を与えないかもしれない。例えば、コードされるアミノ酸配列は変化しないDNA配列内の変化、および結果としてアミノ酸残基の保存的置換をもたらすDNA配列内の変化、1つまたは2、3のアミノ酸の欠失または付加、およびアミノ酸アナログによるアミノ酸残基の置換は、Bakの特性に重大な影響を与えない変化である。

相互に保存的に置換され得るアミノ酸残基には以下のものが挙げられるが、それらに限定されない：グリシン/アラニン；バリン/イソロイシン/ロイシン；アスパラギン/グル

10

20

30

40

50

タミン；アスパラギン酸/グルタミン酸；セリン/トレオニン；リジン/アルギニン；およびフェニルアラニン/チロシン。Bakタンパク質の特性に重大な影響を与えない任意の保存的アミノ酸置換は、本発明に包含される。

本発明の実施に有用な核酸操作の技法は、以下の種々の文献に記載されているが、それらに限定されない；Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版、第1～3巻、Sambrookら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)；およびCurrent Protocols in Molecular Biology、Ausubelら編、Greene Publishing and Wiley - Interscience:New York(1987)、および定期改訂版。

Bak遺伝子のコード領域はまた、心筋細胞、GT1-7のような神経細胞株、およびヒトの結腸腺ガン細胞株HT29のようなTNF感受性細胞を包含するがこれらに限定されない他の細胞型に安定に組み込まれ得る発現ベクター内に連結され得、それによりBakタンパク質によるアポトーシスの調節をモニターするための種々のアッセイ系を提供し得る。

本明細書中で使用するように、「BHRF1」または「ウイルスタンパク質」は、Bakタンパク質またはその部分またはその誘導体に結合するに十分な全長のEBVタンパク質およびその部分またはその誘導体を包含する。このようなタンパク質は、任意のウイルス、例えば、サイトメガロウイルスおよび水疱帯状ヘルペスのような特に種々の形態のヘルペスウイルスおよびヘルペス様ウイルスにより発現される相同タンパク質を包含するがこれらに限定されない。

Bakタンパク質とBHRF-1のようなウイルスタンパク質との間の相互作用は、精製されたタンパク質と一緒に添加することにより生じ得る。しかし、好ましくは、タンパク質は、タンパク質-タンパク質相互作用を可能にする条件下で同時転写および翻訳される。同時翻訳は、天然または組換えのBakタンパク質およびウイルスタンパク質を発現する全細胞中でインビトロまたはインビボで実施され得る。任意の適切な組換え発現ベクターが使用され得る。Bakタンパク質はまた、別々に翻訳され、次いでタンパク質-タンパク質相互作用を可能にする条件下で組み合わされ得る。

タンパク質相互作用をモニタリングする方法は当該分野で公知であり、任意の方法が本明細書中での使用に適切である。好ましくは、共沈が使用される。タンパク質の1つまたはそれに融合された免疫学的タグの1つを沈降させる抗体の能力が、タンパク質を免疫沈降するために用いられ、そして免疫沈降物は両方のタンパク質の存在についてモニタリングされる。共沈の方法は当該分野で公知であり、以下の実施例に記載される。グルタチオンカラム上でのGST融合タンパク質固定化のようなタンパク質相互作用トラッピングおよびELISAを包含するが、それらに限定されない、当該分野の任意の他の方法が本明細書中の使用に適切である。免疫学的タグは、しばしば、融合タンパク質に取り込まれ、そして例えば、FLAG、ヘマグルチニン、およびグルタチオン-Sトランスフェラーゼを包含する。

組換えDNAにより発現されるかまたは生物学的供給源(例えば、組織)由来のいずれかのBakタンパク質の精製または単離は、当該分野において公知の任意の方法により達成され得る。タンパク質の精製方法は当該分野において公知である。一般に、実質的に精製されたタンパク質は、他の混入細胞物質(特に、タンパク質)を含まないタンパク質である。好ましくは、精製されたBakタンパク質は、80パーセントを越えて純粋であり、そして最も好ましくは95パーセントを越えて純粋である。下記のような臨床使用のために、Bakタンパク質は、好ましくは高度に精製されており、少なくとも約99パーセント純粋であり、そして発熱物質および他の混入物を含まない。

タンパク質精製の適切な方法は、当該分野において公知であり、そして以下を包含するが、これらに限定されない：アフィニティークロマトグラフィー、イムノアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、HPLC、およびFPLC。タンパク質の実質的な分解を生じない任意の精製スキームが、本明細書中の使用に適する。

本明細書中で使用されるように、「Bakタンパク質」は、特性に顕著に影響しないそれらの機能的に等価な変異体、および同一の全体アミノ酸配列を保持するが活性を増強または減弱させた変異体を包含する。例えば、アミノ酸残基の保存的置換、1または少数のアミノ酸の欠失または付加、およびアミノ酸アナログによるアミノ酸残基の置換は本発明の範

10

20

30

40

50

圈内である。

相互に保存的に置換され得るアミノ酸残基には以下のものが挙げられるが、それらに限定されない：グリシン/アラニン；バリン/イソロイシン/ロイシン；アスパラギン/グルタミン；アスパラギン酸/グルタミン酸；セリン/トレオニン；リジン/アルギニン；およびフェニルアラニン/チロシン。Bakタンパク質の特性に重大な影響を与えない任意の保存的アミノ酸置換は、本発明に包含される。

本明細書中の使用に適切な抗体は、Bakタンパク質を抗原として、または好ましくはbclファミリーの他の遺伝子産物に対して実質的な相同性を欠くBakタンパク質領域を包含するペプチドを使用することにより産生される。ウイルスタンパク質に対する抗体もまた、本明細書中の使用に適切である。抗体を用いてタンパク質を検出する方法、およびタンパク質または合成ペプチドを用いて抗体を産生する方法は当該分野において公知であり、本明細書に詳細に記述されない。

治療的に有効な薬剤のスクリーニングは、Bakタンパク質とウイルスタンパク質との間の相互作用に直接的または間接的に影響を与え得るこのような薬剤に、Bakタンパク質およびウイルスタンパク質を曝すことにより行われる。適切な潜在的治療剤は、以下を包含するが、これらに限定されない：サイトカイン、小分子薬剤、細胞透過性小分子薬剤、ホルモン、インターロイキンとレクチンと他の刺激剤（例えば、PMA、LPS）との組み合わせ、二特異性抗体、ペプチド模倣物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および細胞機能またはタンパク質発現を改変する他の薬剤のような任意の薬学的薬剤。

タンパク質は同時に添加されるか、または同時に発現され、このような薬剤に生理学的に有効な濃度で曝され、そしてそれらの相互作用はこのような薬剤に曝されないコントロールに対して測定される。コントロールに対するBakタンパク質とウイルスタンパク質との間の相互作用を減少させるこれらの生物学的改変物質は、それらの抗ウイルス活性のさらなる研究のために選択される。

以前に示したように、過剰発現されたBakタンパク質は、血清回収または抗Fas処置の後にEBVで形質転換されたB細胞をアポトーシスから防御する。PCT/US94/13930。これらの結果は、Bak - BHRF1相互作用が存在し、それによってBHRF1がBakタンパク質の正常なアポトーシス効果を中和するだけでなく、さらに防御的活性を誘導することを示す。あるいは、Bak cDNAでトランスフェクトした細胞の増殖は、高レベルのBHRF1または他のEBVコードの抗アポトーシスタンパク質を発現する細胞について選択され得る。これは、細胞を血清回収のようなアポトーシスシグナルに曝した際に抗アポトーシス応答を導き得る。実施例2は、インビトロ翻訳したFlag - Bak（エピトープタグ化）およびBHRF1が、Flagエピトープを認識する抗体で共沈され得ることを示す。これは、Bakタンパク質とBHRF1とが相互に直接相互作用することを示す。

以下の実施例は、本発明を例示するために提供されるが、本発明を限定しない。特に記載されている場合を除いて、すべてのクローニング技術は本質的にSambrookら（1989）により記述された通りであり、そしてすべての試薬は製造業者の指示書に従って使用した。

実施例 1

組換えBak遺伝子の発現

バキュロウイルス系で組換えBak遺伝子を発現させるために、PCT/US94/13930に記載のように作製したBak cDNAを用いて、PCRによって、クローニングを容易にするための制限部位を含有する遺伝子の3'および5'フランピング領域由来のプライマーを使用して、新規なBakベクターを作製した。プラスミドを、ジデオキシターミネータ法（Sangerら、1977）によって、配列決定キット（USB、Sequenase、バージョン2.0）および内部プライマーを用いて配列決定した。これにより、PCRによって生じた変異がないことを確認した。

クローンを用いて、プラスミドとAcNPV野生型のバキュロウイルスとの間のオーバーラップ配列のインピボでの相同組換えによって、組換えウイルスを作製した。昆虫Spodoptera Frugiperdaクローン9（SF9）細胞でのトランスフェクションの48時間後、組換えウイルスを収集し、PCRによって同定し、そしてさらに精製した。組換えバキュロウイルスの選択、スクリーニング、および増殖のための標準的な手順を製造者（Invitrogen）の説明書

10

20

30

40

50

に従って行った。ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE) で、バキュロウイルス系で産生したタンパク質の分子量を、アミノ酸配列に従って予想したBakタンパク質の分子量と比較した。

さらに、類似のクローンは、細菌、酵母、昆虫、および哺乳動物を含むがこれらに限定されない、当該分野で公知の任意の発現系において発現され得る。適切な酵母細胞内発現系は、Barrら、(1992) Transgenesis JAH Murray編 (Wiley and Sons) 55 - 79頁に記載される。

Bak遺伝子のコード配列を切り出し、そしてプラスミドpCEP7、pREP7、およびpcDNA3 (Invitrogen) の適合性制限酵素部位に導入した。pCEP7を、pREP7のRSV 3' - LTRをXba I/Asp718で除去し、そしてpCEP4 (invitrogen) 由来のCMVプロモーターに置換することにより作製した。25 μ g の各Bak含有プラスミドを、Bリンパ芽球細胞株WIL - 2 にエレクトロポレーションし、そしてBakを発現する安定なハイグロマイシン耐性形質転換体またはG418耐性形質転換体 (pcDNA3構築物) を選択した。

実施例 2

Bakタンパク質はエプスタイン - バーウイルスにコードされるBHRF1タンパク質と相互作用する

BHRF1 cDNAを、PCRキットおよびサーマルサイクラー (Perkin Elmer Cetus) の製造者の説明書に従って標準的なPCRプロトコルを用いて、RT - PCRによりWI - L2 mRNAから増幅した。Flag - BakおよびFlag - Bak - 2 のcDNAを、上記のように、RT - PCRにより、BakおよびBak - 2/pcDNA3プラスミドテンプレートから作製したが、センスプライマー中に24塩基のFlagコード配列5' - GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG - 3'を含有した。これにより、N末端Flag - BakおよびFlag - Bak - 2 融合タンパク質をコードするcDNAが得られた。これらの融合タンパク質は、抗Flag M2抗体 (Kodak - IBI) により認識および精製され得た。cDNAを、CMVおよびT7 RNAポリメラーゼプロモーターの制御下にあるpcDNA3ベクター中に連結した。次いで、Flag - BakおよびBHRF1プラスミドまたはFlag - Bak - 2 およびBHRF1プラスミドを、TnT連結網状赤血球溶解系を製造者の説明書 (Promega) に従って用いて同時転写および同時翻訳した。

簡略には、0.5 ~ 1.0 μ g の2つの環状プラスミドを、50 μ L のTnT溶解物中で32 にて90分間、同時に転写および翻訳した。翻訳後、20 μ L の溶解物を、20 μ L の2 \times PBS + 40 μ L の抗Flag M2アフィニティーゲル (Kodak) と混合し、そして穏やかに揺りながら4 にて一晩インキュベートした。免疫沈降物を、エッペンドルフ微量遠心で1500rpmで4 にて15分間遠心分離することにより回収した。ペレットを、1.5mLのPBSで4回洗浄し、最後の洗浄後に30 μ L のSDS - PAGEサンプル緩衝液中に再懸濁した。次いで、サンプルを、18% ポリアクリルアミドゲルでのSDS - PAGEにより分析した。ゲルを10% 氷酢酸で固定し、乾燥し、そしてX線フィルムに室温にて一晩感光させた。

図3に示すように、Flag - BakおよびBHRF1ならびにFlag - Bak - 2 およびBHRF1は、効率的に同時転写および同時翻訳された (レーン1)。明らかに、抗Flag M2抗体により、Flag - BakおよびBHRF1、またはFlag - Bak - 2 およびBHRF1は効果的に共沈する (レーン2)。これは、BHRF1がBakタンパク質およびBak - 2 タンパク質の両方とインビトロで相互作用することを示し、そしてこのような相互作用がインビボで生じてアポトーシスの調整をもたらすことを示唆する。Bakタンパク質とウイルスタンパク質との相互作用は、宿主細胞のアポトーシス性の死の非存在下でウイルス複製を可能にするかまたは潜在し続けるように進化したようである。従って、これらの相互作用の妨害は、新規な抗ウイルス剤の設計のための重要な新しいストラテジーを示す。同様に、EBVのようなウイルスによる形質転換に由来する悪性細胞もまた、これらの薬剤を用いて診断または治療を受けやすい。

上記の発明は、理解を明確にする目的のための例示および実施例として詳細に記載されているが、特定の変更および改変が実施され得ることは当業者にとって明らかである。従って、明細書の記載および実施例は、本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきでなく、本発明の範囲は添付の請求の範囲によって明確に記述される。

【 1 】
 GAGGATCTAC AGGGGACAAG TAAAGGCTAC ATCCAGATGC CGGGAATGCA CTGACGCCCA
 60
 TTCTGGAAA CTGGGCTCCC ACTCAGCCCC TGGGAGCAGC AGCCGCCAGC CCTCTGGACC
 120
 TCCATCTCCA CCTCTGTGAG CCACCCGGGT TGGGCCAGGA TCCCGGCAGG CTGATCCCCT
 180
 CCTCCACTGA GACCTGAAAA ATG GCT TCG GGG CAA GGC CCA GGT CCT CCC
 230
 Met Ala Ser Gly Gln Gly Pro Gly Pro
 1 5 10
 AGG CAG GAG TGC GGA GAG CCT GCC CTG CCC TCT GCT TCT GAG GAG CAG
 278
 Arg Gln Glu Cys Gly Glu Pro Ala Leu Pro Ser Ala Ser Glu Glu Gln
 15 20 25
 GTA GCC CAG GAC ACA GAG GAG GTT TTC CGC AGC TAC GTT TTT TAC CGC
 325
 Val Ala Gln Asp Thr Glu Glu Val Phe Arg Ser Tyr Val Phe Tyr Arg
 30 35 40
 CAT CAG CAG GAA CAG GAG GCT GAA GGG GTG GCT GCC CCT GCC GAC CCA
 374
 His Gln Gln Glu Gln Glu Ala Glu Gly Val Ala Ala Pro Ala Asp Pro
 45 50 55
 GAG ATG GTC ACC TTA CCT CTG CAA CCT AGC AGC ACC ATG GGG CAG GTG
 422
 Glu Met Val Thr Leu Pro Leu Gln Pro Ser Ser Thr Met Gly Gln Val
 60 65 70
 GGA CGG CAG CTC GCC ATC ATC GGG GAC GAC ATC AAC CGA CGC TAT GAC
 470
 Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn Arg Arg Tyr Asp
 75 80 85 90
 TCA GAG TTC CAG ACC ATG TTG CAG CAC CTG CAG CCC ACG GCA GAG AAT
 518
 Ser Glu Phe Gln Thr Met Leu Gln His Leu Gln Pro Thr Ala Glu Asn
 95 100 105
 GCC TAT GAG TAC TTC ACC AAG ATT GCC ACC AGC CTG TTT GAG AGT GGC
 566
 Ala Tyr Glu Tyr Phe Thr Lys Ile Ala Thr Ser Leu Phe Glu Ser Gly
 110 115 120

ATC AAT TGG GGC CGT GTG GTG GCT CTT CTG GGC TTC GGC TAC CGT CTG
 614
 Ile Asn Trp Gly Arg Val Val Ala Leu Leu Gly Phe Gly Tyr Arg Leu
 125 130 135
 GCC CTA CAC GTC TAC CAG CAT GGC CTG ACT GGC TTC CTA GGC CAG GTG
 662
 Ala Leu His Val Tyr Gln His Gly Leu Thr Gly Phe Leu Gly Gln Val
 140 145 150
 ACC CGC TTC GTG GTC GAC TTC ATG CTG CAT CAC TGC ATT GCC CGG TGG
 710
 Thr Arg Phe Val Val Asp Phe Met Leu His His Cys Ile Ala Arg Trp
 155 160 165 170
 ATT GCA CAG AGG GGT GGC TGG GTG GCA GCC CTG AAC TTG GGC AAT GGT
 758
 Ile Ala Gln Arg Gly Gly Trp Val Ala Ala Leu Asn Leu Gly Asn Gly
 175 180 185
 CCC ATC CTG AAC GTG CTG GTG GTT CTG GGT GTG GTT CTG TTG GGC CAG
 806
 Pro Ile Leu Asn Val Leu Val Val Leu Gly Val Val Leu Leu Gly Gln
 190 195 200
 TTT GTG GTA CGA AGA TTC TTC AAA TCA TGACTCCCAA GGGTCCCTT
 853
 Phe Val Val Arg Arg Phe Phe Lys Ser
 205 210
 TGGTCCCGG TTCAGACCCC TGCTGGACT TAAGCGAAGT CTTTGCCTTC TCTGTTCCCT
 913
 TGCAGGGTCC CCCCCTAAGA GTACAGAAGC TTTAGCAAGT GTGCACTCCA GCTTGGGAGG
 973
 CCCTGCGTGG GGGCCAGTCA GGCTGCAGAG GCACCTCAAC ATTGCATGGT GCTAGTGCCC
 1033
 TCTCTTGGG CCCAGGGCTG TGGCCGTCTC CTCCTCAGC TCTCTGGGAC CTCCTTAGCC
 1093
 CTGTCGTGCTA GGCCTGGGG AGACTGATAA CTTGGGGAGG CAAGAGACTG GGAGCCACTT
 1153
 CTCGCCAGAA AGTGTTTAAC GGTTTTAGCT TTTTATAATA CCCITGTGAG AGCCCATTC
 1213
 CACCATTCTA CCTGAGGCCA GGACGTCTGG GGTGTGGGGA TTGTTGGGTC TATGTTCCCC
 1273

Fig. 1

AGGATTCCAG TATTCTGGAA GATCAGCACC CTAAGAGATG GGACTAGGAC CTGAGCCTGG
 1333
 TCCTGGCCGT CCCTAAGCAT GTGTCCAGG AGCAGGACCT ACTAGGAGAG GGGGSCCAAG
 1393
 GTCTGTCTCA ACTCTACCCC TGCTCCCAT CTCCCTCCG GCCATACTGC CTTTGCAGTT
 1453
 GGACTCTCAG GGATCTCTGG CTGTTGGGTGT GGGTGGGGT GGAGTCCGAG ACCAGAGCTG
 1513
 TCTGAACCTCA CGTGTCCAGAA GCCTCCAAGC CTGCCCTCCA AGSTCCTCTC AGTTCTCTCC
 1573
 CTTCTCTCTC CTTTATAGAC ACTTGTCTCC AACCCATCCA CTACAGGTGA AGGCTCTCAC
 1633
 CCATCCCTGG GGGCCTTGGG TGAGTGGCCT GCTAAGGCTC CTCCTTGCCC AGACTACAGG
 1693
 GCTTAGGACT TGGTTTGTTA TATCAGGAAA AAGGAGTAGG GAGTTCATCT GGAGGGTCTT
 1753
 AAGTGGGAGA AGGACTATCA ACACCCTAGT GAATCCAGA GGTGGATCCT CCCTCATGGC
 1813
 TCTGGCACAG TGTRATCCAG GGGTGTAGAT GGGGAACTG TGAATACTTG AACTCTGTTC
 1873
 CCCCACCCTC CATGCTCTCC ACCTGTCTAG GTCTCTCTAG GGTGGGGGT GACAGTCCCT
 1933
 TCTCTATTGG CACAGCCTAG GGTCTTGGGG GTCAGGGGGG AGAAGTTCTT GATTACGCCA
 1993
 AATGCAGGGA GGGGAGGCAG ATGGAGCCCA TAGGCCACCC CCTATCTCTT GAGTGTTTGG
 2053
 AAATAAAGCTG TGCAATCCCC TCAAAAAAAA AACGGAGATC C
 2094

【 2 】
 10 20 30 40 50 60
 TTT TAA TAT AAA TTA ATG TGC TCT ATT TAT AGA GAC AAT ACA TGA AAT ATA CTT AAT AAA
 AAA ATT ATA TTT AAT TAC ACG AGA TAA ATA TCT CTG TTA TGT ACT TTA TAT GAA TTA TTT
 70 80 90 100 110 120
 AAT TCA AAT GTT ATG GAA CTG AAA AAG ATG AAA AGT AAA AAC AAC CTA TTC CCC AGA GGT
 TTA AGT TTA CAA TAT CTT GAC TTT TTC TAC TTT TCA TTT TTG TTG GAT AAG GGG TCT CCA
 130 140 150 160 170 180
 AGC CAC TGT CCA TAG TTT CTA TTT TAG ATT CTT TCC TTT ATA CAA GAT TAT TAT AGC TTC
 TCG GTG ACA GGT ATC AAA GAT AAA ATC TAA GAA AGG AAA TAT GTT CTA ATA ATA TCG AAG
 190 200 210 220 230 240
 TAT TTT TTG GTG TAT GAA CTG TAG TCC TAG AGG AIT TTA TTA GTT ATG AGT TCT ATA ACT
 ATA AAA AAC CAC ATA CTT GAC ATC AGG ATC TCC TAA AAT AAT CAA TAC TCA AGA TAT TGA
 250 260 270 280 290 300
 AAG ATC CAT CAT CTT AGT TGC TAA GAA CGT AGA TAC TGA GAA CAT CAT TTA AAA AAA CAT
 TTC TAG GTA GTA GAA TCA ACG AIT CTT GCA TCT ATG ACT CTT GTA GTA AAT TTT TTT GTA
 310 320 330 340 350 360
 TTT TGG CTG GCA CCT CAT GAT CAC TGG AGT CTC GCG GGT CCC TCA GGC TGC ACA GGG ACA
 AAA ACC GAC CGT GGA GTA CTA GTG ACC TCA GAG CCG CCA GGG AGT CCG ACG TGT CCC TGT
 370 380 390 400 410 420
 AGT AAA GGC TAC ATC CAG ATG CTG GGA ATG CAC TGA CCG CCA TTC CTG GAA ACT GGG CTC
 TCA TTT CCG ATG TAG GTC TAC GAC CCT TAC GTG ACT GCG GGT AAG GAC CTT TGA CCC GAG
 430 440 450 460 470 480
 CCA CTC AGC CCC TGG GAG CAG CAG CCG CCA GCC CCT CGG GAC CTC CAT CTC CAC CCT GCT
 GGT GAG TCG GGG ACC CTC GTC GTC GGC GGT CCG GSA GCC CTG GAG GTA GAG GTG GGA CGA
 490 500 510 520 530 540
 GAG CCA CCC GGG TTG GGC CAG GAT CCC GGC AGG CTG ATC CCG TCC TCC ACT GAG ACC TGA
 CTC GGT GGG CCC AAC CCG GTC CTA GGG CCG TCC GAC TAG GGC AGG AGG TGA CTC TGG ACT
 550 560 570 580 590 600
 AAA ATG SCT TCG GGG CAA GGC CCA GGT CCT CCC AGS CAG GAG TGC GGA GAG CCT GCC CTG
 TTT TAC CGA AGC CCC GTT CCG GGT CCA GGA GGG TCC GTC CTC ACG CCT CTC GGA CGG GAC
 M A S G Q G F G F P R Q E C G E P A L>
 610 620 630 640 650 660
 CCC TCT GCT TCT GAG GAG CRA GTC GTC GGC GAC ACA GAG GAG GTT TTC CGC AGC TAC GTT
 GGG AGA CGA AGA CTC GTC CTC CAT GGC GTC CTG TGT CTC CTC CAA AAG GCG TCG ATG CAA
 P S A S E E Q V A Q D T E E V F R S Y V>
 670 680 690 700 710 720
 TTT TAC CAC CAT CAG CAG GAA CAG GAG GCT GAA GGG GCG GCT GCC CCT GCC GAC CCA GAG
 AAA ATG GTG GTA GTC GTC CTT GTC CTC CGA CTT CCC CSC CSA CCG GGA CCG CTG GGT CTC
 F Y H H Q Q E Q E A E G A A A P A D P E>

Fig. 2

フロントページの続き

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 国際公開第95/05738(WO,A1)
国際公開第95/05750(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷,DB名)
G01N33/48 - 98