

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3816644号

(P3816644)

(45) 発行日 平成18年8月30日(2006.8.30)

(24) 登録日 平成18年6月16日(2006.6.16)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 N 9/12 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 1 2 N 9/12
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21

請求項の数 10 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-261589
 (22) 出願日 平成9年9月26日(1997.9.26)
 (65) 公開番号 特開平11-98984
 (43) 公開日 平成11年4月13日(1999.4.13)
 審査請求日 平成15年5月9日(2003.5.9)

微生物の受託番号 FERM BP-6487

微生物の受託番号 FERM BP-6488

(73) 特許権者 503360115
 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 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100120905
 弁理士 深見 伸子
 (72) 発明者 審良 静男
 大阪府箕面市小野原東6-17-18-2
 02

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セリン／スレオニンキナーゼをコードするDNA

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。

(a) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号1で表わされる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なり、かつアポトーシス誘導活性を有するタンパク質

【請求項2】

以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2で表わされる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なり、かつアポトーシス誘導活性を有するタンパク質

【請求項3】

以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号1で表わされる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なり、かつアポトーシス誘導活性を有するタンパク質

【請求項4】

10

20

以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする DNA。

(a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 で表わされる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なり、かつ アポトーシス誘導活性 を有するタンパク質

【請求項 5】

配列番号 3 で表わされる塩基配列を含む、請求項 3 記載の DNA。

【請求項 6】

配列番号 4 で表わされる塩基配列を含む、請求項 4 記載の DNA。

【請求項 7】

請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA を含む組換えベクター。

【請求項 8】

請求項 7 記載の組換えベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項 9】

請求項 8 記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から アポトーシス誘導活性 を有するタンパク質を採取することを特徴とする アポトーシス誘導活性を有するタンパク質の製造方法。

【請求項 10】

以下の (a) ~ (i) の少なくとも 1 つを含むアポトーシス誘導剤。

(a) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 1 で表わされる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なり、かつ アポトーシス誘導活性 を有するタンパク質

(c) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(d) 配列番号 2 で表わされる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なり、かつ アポトーシス誘導活性 を有するタンパク質

(e) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA

(f) 配列番号 1 で表わされる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なり、かつ アポトーシス誘導活性 を有するタンパク質をコードする DNA

(g) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA

(h) 配列番号 2 で表わされる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なり、かつ アポトーシス誘導活性 を有するタンパク質をコードする DNA

(i) 上記 (e) ~ (h) のいずれかの DNA を含む組換えベクター

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、セリン/スレオニンキナーゼ、該キナーゼをコードする DNA、該 DNA を含む組換えベクター、該ベクターによって形質転換された形質転換体及びセリン/スレオニンキナーゼの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

細胞外からの様々なシグナルは細胞表面の受容体を介して細胞内へ伝えられ、最終的に核内に伝達される。核内に伝達されたシグナルは転写因子を活性化し、その結果、一群の遺伝子の発現が誘導又は抑制され、細胞増殖、分化、さらには細胞死といった表現形が現れる。これまでに多くの転写因子がクローニングされ、機能ドメインの構造等が明らかにされている (MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL THIRD EDITION, pp401-469)。これらの機能ドメインの構造としては、ロイシンジッパー構造、ヘリックス・ループ・ヘリックス構造

10

20

30

40

50

、亜鉛フィンガー構造等が知られている。その中でもロイシンジッパー構造はJun / Fos、ATF / CREB、又はC/EBPファミリー等の転写因子に共通してみられるモチーフであり、これら転写因子は互いのロイシンジッパー構造を介してホモ又はヘテロ二量体を形成し、特異的遺伝子の転写を制御することが多数報告されている (Hai, T. et al., Proc.Natl. Acad.Sci., USA, 88:3720-3724, 1991)。

【0003】

さらに、最近ではロイシンジッパー構造が転写因子以外の機能分子にも認められることが報告され (Holzman, L.B. et al., J. Biol. Chem. 269: 30808-30817, 1994)、ロイシンジッパー構造が転写因子同士の結合のみならず、広くタンパク-タンパク間相互作用ドメインとして細胞内で機能していることが示唆されている。

10

したがって、ロイシンジッパードメインと相互作用する分子の同定は転写因子のもつ新たな機能のみならず、転写因子以外の分子におけるロイシンジッパー構造の機能を解析する上で有用であると考えられる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、セリン/スレオニンキナーゼ、該キナーゼをコードするDNA、該DNAを含む組換えベクター、該ベクターによって形質転換された形質転換体及びセリン/スレオニンキナーゼの製造方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、ヒト胎盤及びマウス脳から調製したcDNAライブラリーからセリン/スレオニンキナーゼをコードするDNAを単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

20

【0006】

すなわち、本発明は、以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質である。

(a) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号1で表わされる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なり、かつセリン/スレオニンキナーゼ活性を有するタンパク質

さらに、本発明は、以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質である。

30

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2で表わされる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なり、かつセリン/スレオニンキナーゼ活性を有するタンパク質

さらに、本発明は、前記タンパク質をコードするDNAである。該DNAとしては、例えば配列番号3又は4で表わされる塩基配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記DNAを含む組換えベクターである。

【0007】

さらに、本発明は、組換えベクターによって形質転換された形質転換体である。

さらに、本発明は、請求項8記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からセリン/スレオニンキナーゼを採取することを特徴とするセリン/スレオニンキナーゼの製造方法である。

40

以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の組換えタンパク質(以下「ZIP-キナーゼ」ともいう)は、ATF4と呼ばれる転写因子のロイシンジッパードメインと結合するタンパク質分子であり、セリン/スレオニンキナーゼ活性を有するものである。また、ZIP-キナーゼはロイシンジッパー構造を有する新規の核内セリン/スレオニンキナーゼであり、アポトーシスを誘導する活性を有する。なお、ATF4とは、cAMP反応要素(cAMP response element)(CRE)に結合し、ATF/CREBファ

50

ミリーに属するロイシンジッパー型転写因子である。

【0009】

一方、本発明のDNAは、ヒト胎盤及びマウス脳から調製されたcDNAライブラリーから、いわゆる酵母2-ハイブリッドシステム（酵母 two-hybrid system）を用いたスクリーニングを行うことにより得られるものであり、ZIP-キナーゼをコードするものである（以下「ZIP-キナーゼDNA」ともいう）。

本発明のDNAは、以下のようにしてクローニングすることができる。

【0010】

1. ZIP-キナーゼDNAのクローニング

(1) ヒト胎盤及びマウス脳のcDNAライブラリーの作製

mRNAの供給源としては、ヒト胎盤又はマウス脳などの組織が挙げられる。また、これらの組織由来の樹立した細胞株を供給源としてもよい。

mRNAの調製は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、上記組織又は細胞を、グアジニン試薬を用いて処理することにより全RNAを得、次いでオリゴdT-セルロースやセファロース2Bを担体とするポリU-セファロース等を用いたアフィニティーカラム法、あるいはバッチ法によりポリ(A+)RNA(mRNA)を得る。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりポリ(A+)RNAをさらに分画することもできる。

【0011】

このようにして得られたmRNAを鋳型として一本鎖cDNAを合成した後、この一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成し、適当なベクターDNAとの組換えプラスミドを作製する。これを用いて大腸菌等を形質転換することにより、cDNAのライブラリーを得る。

あるいは、cDNAのライブラリーとして市販のもの（CLONETECH社）を用いてもよい。

【0012】

(2) プラスミドpAS2-1の構築

前記(1)のようにして得られたcDNAライブラリーから目的のクローンをスクリーニングするためのプラスミドを調製する。

プラスミドは、マウスATF4のロイシンジッパードメイン（ATF4のアミノ酸配列の第298-349番目）をコードするDNAを、GAL4 DNA結合ドメインをコードするDNAに連結することによりキメラDNAを作製し、このキメラDNAをバイトプラスミド(bait plasmid)pAS2-1に連結することにより得ることができる。

【0013】

(3) スクリーニング

続いて上記プラスミドを用いてcDNAライブラリーをスクリーニングする。スクリーニングには、酵母2-ハイブリッドシステム（酵母 two-hybrid system）を用いることができる。

酵母2-ハイブリッドシステムとは、タンパク質間相互作用を酵母内で検出できる実験系であり、目的のタンパク質（バイト）に相互作用するタンパク質のcDNAをライブラリーよりスクリーニングすることが可能である。陽性クローンは、ヒスチジン、トリプトファン及びロイシンを含まない選択培地における増殖及び α -ガラクトシダーゼの活性を指標として選出することができる。

【0014】

(4) 塩基配列の決定

得られたクローンについて塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定はマキサム-ギルバート法、ジデオキシ法等の公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定装置を用いて配列決定が行われる。

配列番号2に本発明のZIP-キナーゼDNAの塩基配列を、配列番号1に本発明のZIP-キナーゼのアミノ酸配列を例示するが、このアミノ酸配列からなるタンパク質がセリン/スレオニンキナーゼとしての活性を有する限り、当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。例えば、配列番号1で表わされるアミノ酸配列の第1番目のメチオニンが欠失した配列を有するものなども、本発明のタンパク質に含まれる。

10

20

30

40

50

【0015】

ここで、セリン/スレオニンキナーゼ活性とは、ATPの末端リン酸基をタンパク質の特定のアミノ酸（セリン又はスレオニン）に移す活性を意味する。なお、変異の導入は、公知の手法により(Deng, W.P. et al., Anal. Biochem. 200: 81, 1992)、あるいは市販のキット（CLONETECH社のSite-Directed Mutagenesis Kit）を用いて行うことができる。

【0016】

一旦本発明のZIP-キナーゼDNAの塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又は種々の組織由来のcDNAを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明のZIP-キナーゼDNAを得ることができる。

10

【0017】

2. 組換えベクター及び形質転換体の作製

(1)組換えベクターの作製

本発明の組換えベクターは、適当なベクターに本発明のZIP-キナーゼDNAを連結（挿入）することにより得ることができる。本発明のZIP-キナーゼDNAを挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミド DNA、ファージ DNA等が挙げられる。プラスミド DNAは、大腸菌やアグロバクテリウムからアルカリ抽出法(Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) Nucleic acid Res 7: 1513)又はその変法等により調製することができる。また、市販のプラスミドとして例えばpUC118（宝酒造社製）、pUC19（宝酒造社製）、pBluescript SK+（Stratagene社製）、pGEM-T（Promega社製）、pT7 Blue（Novagen社）、pBR322（宝酒造社）等を用いてもよい。

20

【0018】

ファージ DNAとしては、例えば M13mp18、M13mp19、gt10、gt11等が挙げられる。ベクターに本発明のDNAを挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

【0019】

本発明のDNAは、そのDNAの機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、本発明のベクターには、プロモーター、本発明のDNAのほか、ターミネーター、リボソーム結合配列等を組み込んでよい。この場合、ターミネーターとしてはストップコドン（TGA、TAG、TAA）が挙げられ、リボソーム結合配列としてはリーダー配列が挙げられる。

30

【0020】

(3)形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の発現用組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。

ここで、宿主としては、本発明のDNAを発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)等のエッシャーヒア属、バチルス属に属する細菌、サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ポンベ(*Saccharomyces pombe*)等の酵母、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞、あるいは昆虫細胞(Sf9)等が挙げられる。

40

【0021】

大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えばpET、pGEX(Pharmacia社製)等が用いられる。

【0022】

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えばtrpプロモーター、lacプロモーター、P_Lプロモーター、P_Rプロモーターなどの

50

、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。T7、T3などのように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。

【0023】

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されない。例えばカルシウムイオンを用いる方法(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,69,2110-2114(1972))、エレクトロポレーション法等が挙げられる。酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばYEp13、YEp24、YCp50等が用いられる。この場合のプロモーターとしては、酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えばgal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF 1プロモーター、SV40プロモーター等が挙げられる。

10

【0024】

酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法(Methods.Enzymol.,194,182-187(1990))、スフェロプラスト法(Proc. Natl.Acad.Sci.,USA,84,1929-1933(1978))、酢酸リチウム法(J. Bacteriol., 153,163-168(1983))等が挙げられる。

【0025】

動物細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばpcDNA1/Amp、pcDNA1(いずれもInvitrogen社)等が用いられる。この場合、プロモーターとしてヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

20

【0026】

なお、本発明の組換えベクター(ヒト胎盤からのZIP-キナーゼDNAを含むベクター及びマウス脳からのZIP-キナーゼDNAを含むベクター)は、それぞれ大腸菌DH5に導入され(それぞれE.coli(hZIP-kinase)DH5、E.coli(mZIP-kinase)DH5)、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成9年9月25日(原寄託日)に、E.coli(hZIP-kinase)DH5についてはFERM BP-6487、E.coli(mZIP-kinase)DH5についてはFERM BP-6488として寄託されている。

【0027】

3.ZIP-キナーゼの生産

本発明のZIP-キナーゼは、前記形質転換体を培地に培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

30

【0028】

大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養効率的に行える培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン、デキストロース等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

40

【0029】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、酵母エキス等が用いられる。

【0030】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、リン酸第二ナトリウム等が用いられる。

50

【0031】

培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、37℃で12～18時間行う。培養期間中、pHは7.0～7.5に保持する。pHの調整は、無機又は有機の酸、アルカリ溶液、炭酸ガス等を用いて行う。

培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0032】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

【0033】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で1～3日行う。

培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0034】

培養後、本発明のZIP-キナーゼが菌体内又は細胞内に生産される場合には菌体又は細胞を破碎等によりZIP-キナーゼを抽出する。また、本発明のZIP-キナーゼが菌体外又は細胞外に生産される場合には培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去した後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせるにより、培養物中から本発明のZIP-キナーゼを単離精製することができる。

【0035】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例1〕ZIP-キナーゼDNAのクローニング

(1)cDNAライブラリーの作製

本発明では、cDNAとして市販のもの(CLONETECH社)を用いた。

(2)プラスミドの調製

マウスATFのロイシンジッパードメインをコードするDNAをPCR法により得た。

【0036】

PCR反応液の組成：

DNA 1.0 μg
 10mM Tris-HCl(pH8.3)
 50mM KCl
 1.5mM MgCl₂
 0.2mM dNTP
 0.5 μM プライマー
 1U Taq

【0037】

プライマーとして以下のものを用いた。

センスプライマー：5'-GGGAATTCGCGGAGCAGGAGGCT-3'(配列番号5)

アンチセンスプライマー：5'-GGGATCCCTAGGGGACCCTTTTCTA-3'(配列番号6)

PCRは、まず94℃で1分反応を行い、次に、94℃で20秒、56℃で20秒及び72℃で30秒の反応を1サイクルとしてこれを25サイクル行い、最後に72℃で10分の反応を行った。

【0038】

PCR産物をEcoRI/BamHIで切断し、pAS2-1ベクターのEcoRI/BamHIサイトへ挿入した。プラスミドを大腸菌DH5へ形質転換し、これよりアルカリ-SDS法に基づいた市販のキット(Wizard miniprep: プロメガ社)により精製を行った。このプラスミドは酵母内でGAL4 DNA結合ドメインの融合タンパク質を発現することができ、バイトとして使用した。

【0039】

(3)スクリーニング

バイトとなるプラスミドを酵母Y190株に形質転換した。形質転換は、CLONETECH社のMATCHMAKER Two-Hybrid System kitを用いて行った。形質転換体は、トリプトファン(-)の培地での生育が可能となるため、これを指標に選別した。さらにGAL4転写活性化ドメインとの融合タンパク質として発現が可能なcDNAライブラリー (CLONETECH社のマウス脳及びヒト胎盤MATCHMAKER cDNAライブラリー) を形質転換した。形質転換体はトリプトファン(-)、ロイシン(-)の培地で生育可能となる。また、バイトと、ライブラリー由来のタンパク質をコードするDNAとが結合すればレポーター遺伝子のHIS3遺伝子及びLacZ遺伝子が転写されるため、陽性クローンは、トリプトファン(-)、ロイシン(-)、ヒスチジン(-)の培地で生育可能になり、さらに -ガラクトシダーゼ活性を有するため、X-gal存在下で青色を呈する。陽性クローンよりプラスミドを精製し (CLONETECH社のMATCHMAKER Two-Hybrid System kitを用いて行った)、大腸菌へ形質転換し、これよりプラスミドを精製し、塩基配列を決定した (ABI model 377)。得られた塩基配列を、GenBank、EMBL、DDBJデータベースを利用してホモロジー検索を行った。

【0040】

その結果、既に報告されているC/EBPファミリーやAP-1ファミリーの他にロイシンジッパー構造を有する遺伝子とホモロジーの高いもの (ホモロジー20%以上) を新規遺伝子とした。この新規遺伝子は、マウス脳cDNAライブラリーより7クローン、ヒト胎盤からは2クローン得られた。これらクローンはすべて同一遺伝子由来であった。

【0041】

(4)塩基配列の決定

前記のようにして得られた遺伝子はキナーゼをコードするものと考えられ、本発明者はこの新規キナーゼをコードするDNAをZIP-キナーゼDNA (Zipper Interacting Protein Kinase DNA) と名付けた。そして、ZIP-キナーゼDNAについて、全長の塩基配列を決定した。

【0042】

ヒト胎盤から得られたZIP-キナーゼDNAの塩基配列を配列番号3に、マウス脳から得られたZIP-キナーゼDNAの塩基配列を配列番号4に示す。また、配列番号3、4で表わされる塩基配列によりコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号1、2に示す。

【0043】

ヒト胎盤から得られたZIP-キナーゼDNAによりコードされるアミノ酸配列 (ヒトZIP-キナーゼ) とマウス脳から得られたZIP-キナーゼDNAによりコードされるアミノ酸配列 (マウスZIP-キナーゼ) との間でホモロジー検索を行ったところ、それぞれのアミノ酸配列のC末端にはロイシンジッパードメインが、N末端側にはセリン/スレオニンキナーゼドメインが認められた (図1)。また、マウス及びヒトZIP-キナーゼはそれぞれ448および454アミノ酸からなっており、マウス - ヒト間の相同性はアミノ酸レベルで84.9%であった。

【0044】

さらに、ZIP-キナーゼのキナーゼドメインは、IFN-によるアポトーシスを正に制御するDAP-キナーゼと高い相同性を示し、これらキナーゼが新たなファミリーを形成していることが示唆された (図2)。

【0045】

〔実施例2〕組換えベクターの構築及び形質転換体の作製

ZIP-キナーゼDNAの組換えベクターを作製するため、ZIP-キナーゼをコードするcDNAをPCR法により合成した。

PCR反応液及びプライマーは下記のものを用いた。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

反応液： PCR反応液の組成：

DNA 1.0 μ g
 10mM Tris-HCl (pH8.3)
 50mM KCl
 1.5mM MgCl₂
 0.2mM dNTP
 0.5 μ M プライマー
 1U Taq

【 0 0 4 7 】

センスプライマー： 5'-GGGTCGACCAC CATGGCTTAC CCATACGATG TTCCAGATTA CGCTATGTCC AC 10
 ATTCAGGC AA-3' (配列番号 7)

アンチセンスプライマー： 5'-GGGTCGACTA GCGCAGCCG CACTCAGCCT GC-3' (配列番号 8)

PCRは、まず96 で1分反応を行い、次に、96 で30秒、56 で30秒及び72 で1分の反応を1サイクルとしてこれを30サイクル行い、最後に72 で10分の反応を行った。

得られたPCR産物をSaIIで切断し、発現ベクターpEF-BOSへ挿入した (TaKaRa社のLigationキット)。さらに、大腸菌DH5 (TOYOBO社)へ形質転換を行った。この大腸菌よりプラスミドを精製し (Promega社のWizard miniprep)、DNAシーケンス (ABI社model 377)で確認を行った。

【 0 0 4 8 】

なお、ZIP-キナーゼの変異体 (配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列の第42番目のアミノ 20
 酸リジンをアラニンに変異させたもの；以下、「ZIP-キナーゼK42A」という)をコードするDNAを、CLONETECH社のSite-Directed Mutagenesis Kitを用いて作製した。また、配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列の第422及び429番目のアミノ酸バリン並びに第436番目のロイシンをそれぞれアラニンに変異させたもの；以下、「ZIP-キナーゼLA」という)をコードするDNAも同様に作製した。

【 0 0 4 9 】

〔実施例 3〕本発明のDNAの機能

(1)細胞内におけるZIP-キナーゼとATF4の結合

ZIP-キナーゼとATF4が細胞内においても結合しているかどうかを調べた。

まず、マウスZIP-キナーゼ (配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列の第309-448番目)を 30
 コードするDNAを発現ベクターpEF-BOSへ挿入した。このとき、ZIP-キナーゼのN末端側に転写因子Mycのタグを施して、これがエピトープとなるようにしたMyc-ZIP-キナーゼ複合体をコードするDNAを設計し、ベクターを構築した (pEF-BOS-Myc-ZIP-キナーゼ)。また、ヒトATF4のN末端にFLAGエピトープが付加されたヒトATF4 (全長) - FLAG複合体をコードするDNAを含む発現ベクターも作成した (pEF-BOS-FLAG-ATF4)。

【 0 0 5 0 】

これらを、COS-7細胞株へリポフェクション法を用いて一過性に導入し、発現させた (図3
 レーン1、4、7、10；FLAG-ATF4、レーン2、5、8、11；Myc-ZIP-キナーゼ、レーン3、6、
 9、12；FLAG-ATF4とMyc-ZIP-キナーゼ)。導入後36時間で細胞を回収し、0.5 % Nonidet P 40
 -40溶解バッファーで可溶化し、細胞可溶化物 (WCE；whole cell extract)を得た。WCE
 をSDS-PAGEで展開後、ニトロセルロース膜へ転写し、抗FLAGモノクローナル抗体 (図3
 レーン1、2、3)及び抗Mycモノクローナル抗体 (レーン7、8、9)を用いてウェスタンブロッ
 ット解析を行い、Myc-ZIP-キナーゼ及びFLAG-ATF4の発現を確認した。

【 0 0 5 1 】

続いて同WCEを抗Mycモノクローナル抗体で免疫沈降し、沈降物を抗FLAGモノクローナル抗体でウェスタンブロット解析を行い、Myc-ZIP-キナーゼとFLAG-ATF4との共免疫沈降の検出を試みた (図3、レーン4～6)。

その結果、レーン6においてFLAG-ATF4のバンドが検出された (図3)。さらに確信を得るため、次に同WCEを抗FLAGモノクローナル抗体で免疫沈降し、沈降物を抗Mycモノクローナル抗体でウェスタンブロット解析を行った (レーン10、11、12)。このときレーン12にお 50

いてのみFLAG-ATF4と共免疫沈降しているMyc-ZIP-キナーゼのバンドが認められた。

【0052】

したがって、細胞内においてもZIP-キナーゼとATF4は相互に結合していることが示された。

このことから、ZIP-キナーゼとATF4とが相互に結合していることは、ZIP-キナーゼの活性をATF4が制御している可能性があることが考えられる。

【0053】

(2)ZIP-キナーゼとATF4との結合に必要なドメインの決定

ZIP-キナーゼとATF4が結合する部位を酵母 two-hybrid systemを用いて決定した。まず、マウスZIP-キナーゼの変異体として、1) ZIP-キナーゼアミノ酸278-448番目 (ZIP-キナーゼ 278-448)、2) ZIP-キナーゼロイシンジッパードメイン (アミノ酸398-448番目) (ZIP-キナーゼ LZ)、3) ZIP-キナーゼのロイシンジッパードメインのバリン及びロイシンをアラニンに置換した変異体 (ZIP-キナーゼ LA)、を作成した。これらをGAL4トランス活性化ドメインとのキメラタンパクになるようにし、該キメラタンパク質をコードするDNAをpACT2へ挿入し、pAS2-1-ATF4 LZと共に酵母細胞株であるY190へ導入した。導入株をヒスチジン⁺、トリプトファン⁻、ロイシン⁻、及びヒスチジン⁻、トリプトファン⁻、ロイシン⁻の選択培地上で培養を行った。

【0054】

ZIP-キナーゼ 278-448をコードするDNAを含む酵母、及びZIP-キナーゼ LZをコードするDNAを含む酵母は、ヒスチジン⁻、トリプトファン⁻、ロイシン⁻の培地上でコロニーを形成できることから、ZIP-キナーゼはC末端に存在するロイシンジッパードメインを介してATF4と結合することが示された (図4)。さらに、このときロイシンジッパー構造内のバリン、ロイシンをアラニンに置換すると、もはやATF4との結合は認められなくなる。以上のことからZIP-キナーゼとATF4とは、互いのロイシンジッパードメインを介して結合することが明らかとなった。

【0055】

(3)ZIP-キナーゼの各組織における発現

ZIP-キナーゼの各組織での発現を調べるためにノーザンブロット解析を行った。

図5に示すように、ZIP-キナーゼのmRNAは約1.4 kbであり、調べた限りのほぼ全ての組織に分布していた。ただし、脾臓においては少量の発現を示すのみであった。

【0056】

(4)ZIP-キナーゼのホモ二量体形成の確認

ZIP-キナーゼのC末端に存在するロイシンジッパードメインはタンパク質同士が結合するドメインと考えられる。そこで、ZIP-キナーゼがホモ二量体を形成するかどうか検討を行った。ZIP-キナーゼのロイシン・ジッパードメインをコードするDNAをpAS2-1へ挿入したプラスミドと、ZIP-キナーゼのロイシンジッパードメイン及び同ドメイン内のバリン、ロイシンをアラニンに置換した変異体をコードするDNAをpACT2に挿入したプラスミドとを酵母に共導入し、選択培地でのコロニー形成を観察した。

【0057】

図6に示すようにZIP-キナーゼのロイシンジッパードメインを共発現させた酵母のみ、ヒスチジン⁻、トリプトファン⁻、ロイシン⁻の培地で生育可能であった。したがって、ZIP-キナーゼはそのロイシンジッパー構造を介して互いにホモ二量体を形成することが明らかとなった。

【0058】

(5)ZIP-キナーゼによるアポトーシスの誘導

ZIP-キナーゼのキナーゼ・ドメインと高い相同性を示すDAP-キナーゼはHeLa細胞においてアポトーシスを誘導することが示されている。そこでZIP-キナーゼがアポトーシス活性を有するか検討した。

HAでタグを施したRNA野生型 ZIP-キナーゼ (pEF-BOS-HA-ZIP-キナーゼ)、ZIP-キナーゼサブドメインII内に存在し、他のキナーゼにおいても保存されているリジン (アミノ酸42

10

20

30

40

50

番目)をアラニンに置換した変異体(pEF-BOS-HA-ZIP-キナーゼ K42A)及びロイシンジッパードメイン内のバリン、ロイシンをアラニンに置換した変異体(pEF-BOS-HA-ZIP-キナーゼ LA)を作成し、これらの各タンパク質をコードするDNAを、LacZ発現ベクター(pEF-BOS-LacZ)とともにNIH 3T3細胞に一過性に導入した。導入してから36時間後にX-gal染色を行った。

【0059】

その結果、顕微鏡下で青く染色されている細胞の形態を観察した(図7)。対照であるpEF-BOS-mock(図7、左上)と比べて、野生型ZIP-キナーゼを導入した細胞(図7、右上)では核の凝集を伴う典型的なアポトーシスの形態を示した。この時のアポトーシス形態を示すLacZ発現細胞の割合を計測したところ44.9%であった(図8)。

10

【0060】

一方、ZIP-キナーゼ-K42A変異株(図7、左下)ではこのような形態変化は認められず、アポトーシスの割合も対照と変化は認められなかった。また、ZIP-キナーゼ-LA(図7、右下)においてはアポトーシスを起こしている細胞が存在するものの、野生型と比べると、その割合は有意に減少していた。

【0061】

以上の結果から、ZIP-キナーゼの発現によるアポトーシスの誘導にはZIP-キナーゼのキナーゼ活性が必須であると考えられる。さらにZIP-キナーゼ同士のホモ二量体を阻害するような変異においてアポトーシスが抑制されることから、ZIP-キナーゼはホモ二量体を形成して活性化型になることが示唆される。

20

【0062】

(6)ZIP-キナーゼのキナーゼ活性

ZIP-キナーゼが実際にキナーゼとしての活性を有するかどうか検討を行った。pEF-BOS-HA-ZIP-キナーゼ、pEF-BOS-HA-ZIP-キナーゼ K42A、及びpEF-BOS-HA-ZIP-キナーゼ LAをそれぞれCOS-7細胞へ一過性に導入し、36時間後に細胞を回収した後、0.5% Nonidet P-40溶解バッファーで可溶化した。可溶化物を抗HAモノクローナル抗体で免疫沈降を行い、沈降物中のキナーゼ活性をin vitroキナーゼアッセイで検出した(図9A)。

【0063】

その結果、野生型ZIP-キナーゼには約50kDaにZIP-キナーゼのリン酸化のバンドが認められた(図9A、HA-ZIP-キナーゼのレーン)。一方、ZIP-キナーゼ K42Aにおいてはこれに相当するバンドは認められなかった。またZIP-キナーゼ LAにおいては、リン酸化のバンドが認められた。しかしながら、同可溶化物におけるHA-ZIP-キナーゼおよびその変異体の発現を抗HAモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットで確認したところ、HA-ZIP-キナーゼの発現量が他の2つの変異体と比べると顕著に減少していた(図9B)。この結果から、ZIP-キナーゼ LAで認められるキナーゼ活性は野生型のそれと比べると非常に弱いものと考えられる。

30

また、野生型ZIP-キナーゼの発現量がCOS-7細胞において低いことは、ZIP-キナーゼがCOS-7細胞に対して何らかの致命的な作用(例えばアポトーシス)を及ぼした結果と考えられる。

【0064】

(7)ZIP-キナーゼの細胞内局在

ZIP-キナーゼの細胞内局在を知ることはZIP-キナーゼの機能を解析する上で、大きな手がかりとなると考えられる。そこで本発明者は、ZIP-キナーゼの局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べた。

FLAGでタグをしたATF4をコードするDNAを含む発現ベクター(pEF-BOS-FLAG-ATF4)及びFLAGでタグを施したZIP-キナーゼ K42AをコードするDNA(pEF-BOS-FLAG-ZIP-キナーゼ K42A)を、それぞれCOS-7細胞に一過性に導入した。36時間後、細胞を固定し、抗FLAGモノクローナル抗体と反応させ、二次抗体としてFITC標識抗マウスIgG抗体を用いて染色した。

40

【0065】

50

共焦点レーザー顕微鏡下で観察したところ、FLAG-ATF4を導入した細胞では細胞質が染色されておらず、核が染色されていた(図10 A)。同様にしてFLAG-ZIP-キナーゼの局在を調べたところ、ATF4の場合と同じ染色パターンが示され、核での局在が確認された(図10 B)。

従って、ZIP-キナーゼは新規の核内セリン/スレオニンキナーゼであると結論づけることができた。

【0066】

【発明の効果】

本発明により、セリン/スレオニンキナーゼ、該キナーゼをコードするDNA、該DNAを含む組換えベクター、該ベクターによって形質転換された形質転換体及びセリン/スレオニンキナーゼの製造方法が提供される。

10

ZIP-キナーゼはアポトーシスを誘導する機能を有するため、ZIP-キナーゼ及び該キナーゼをコードするDNAは癌に対する遺伝子治療剤及び抗癌剤等として利用できる点で有用である。

【0067】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：454

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Ser Thr Phe Arg Gln Glu Asp Val Glu Asp His Tyr Glu Met Gly	10
1 5 10 15	
Glu Glu Leu Gly Ser Gly Gln Phe Ala Ile Val Arg Lys Cys Arg Gln	
20 25 30	
Lys Gly Thr Gly Lys Glu Tyr Ala Ala Lys Phe Ile Lys Lys Arg Arg	
35 40 45	
Leu Ser Ser Ser Arg Arg Gly Val Ser Arg Glu Glu Ile Glu Arg Glu	20
50 55 60	
Val Asn Ile Leu Arg Glu Ile Arg His Pro Asn Ile Ile Thr Leu His	
65 70 75 80	
Asp Ile Phe Glu Asn Lys Thr Asp Val Val Leu Ile Leu Glu Leu Val	
85 90 95	
Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Phe Leu Ala Glu Lys Glu Ser Leu Thr	
100 105 110	
Glu Asp Glu Ala Thr Gln Phe Leu Lys Gln Ile Leu Asp Gly Val His	30
115 120 125	
Tyr Leu His Ser Lys Arg Ile Ala His Phe Asp Leu Lys Pro Glu Asn	
130 135 140	
Ile Met Leu Leu Asp Lys Asn Val Pro Asn Pro Arg Ile Lys Leu Ile	
145 150 155 160	
Asp Phe Gly Ile Ala His Lys Ile Glu Ala Gly Asn Glu Phe Lys Asn	
165 170 175	40
Ile Phe Gly Thr Pro Glu Phe Val Ala Pro Glu Ile Val Asn Tyr Glu	

Glu Asn Arg Tyr Glu Ala Leu Ala Lys Gln Val Ala Ser Glu Met Arg
 420 425 430
Phe Val Gln Asp Leu Val Arg Ala Leu Glu Gln Glu Lys Leu Gln Gly
 435 440 445
Val Glu Cys Gly Leu Arg
 450

[0 0 6 8]

配列番号：2

配列の長さ：448

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Ser Thr Phe Arg Gln Glu Asp Val Glu Asp His Tyr Glu Met Gly	10
1 5 10 15	
Glu Glu Leu Gly Ser Gly Gln Phe Ala Ile Val Arg Lys Cys Gln Gln	
20 25 30	
Lys Gly Thr Gly Met Glu Tyr Ala Ala Lys Phe Ile Lys Lys Arg Arg	
35 40 45	
Leu Pro Ser Ser Arg Arg Gly Val Ser Arg Glu Glu Ile Glu Arg Glu	20
50 55 60	
Val Ser Ile Leu Arg Glu Ile Arg His Pro Asn Ile Ile Thr Leu His	
65 70 75 80	
Asp Val Phe Glu Asn Lys Thr Asp Val Val Leu Ile Leu Glu Leu Val	
85 90 95	
Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Phe Leu Ala Glu Lys Glu Ser Leu Thr	
100 105 110	
Glu Asp Glu Ala Thr Gln Phe Leu Lys Gln Ile Leu Asp Gly Val His	30
115 120 125	
Tyr Leu His Ser Lys Arg Ile Ala His Phe Asp Leu Lys Pro Glu Asn	
130 135 140	
Ile Met Leu Leu Asp Lys His Ala Ala Ser Pro Arg Ile Lys Leu Ile	
145 150 155 160	
Asp Phe Gly Ile Ala His Arg Ile Glu Ala Gly Ser Glu Phe Lys Asn	
165 170 175	40
Ile Phe Gly Thr Pro Glu Phe Val Ala Pro Glu Ile Val Asn Tyr Glu	

配列番号 : 3

配列の長さ : 2132

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表わす記号 : CDS

存在位置 : 94..1455

10

配列

GTTGCCATTA GGGGACTCCT GAGGTCCTAT CTCCAGGCTG CGGTGACTGC ACTTTCCTG 60

GAGTGAAGC TGCTGGAAGG CGGACCGGCC GCC ATG TCC ACG TTC AGG CAG GAG 114

Met Ser Thr Phe Arg Gln Glu

1

5

20

GAC GTG GAG GAC CAT TAT GAG ATG GGG GAG GAG CTG GGC AGC GGC CAG 162

Asp Val Glu Asp His Tyr Glu Met Gly Glu Glu Leu Gly Ser Gly Gln

10

15

20

TTT GCG ATC GTG CGG AAG TGC CGG CAG AAG GGC ACG GGC AAG GAG TAC 210

Phe Ala Ile Val Arg Lys Cys Arg Gln Lys Gly Thr Gly Lys Glu Tyr

25

30

35

GCA GCC AAG TTC ATC AAG AAG CGC CGC CTG TCA TCC AGC CGG CGT GGG 258

Ala Ala Lys Phe Ile Lys Lys Arg Arg Leu Ser Ser Ser Arg Arg Gly

40

45

50

55

30

GTG AGC CGG GAG GAG ATC GAG CGG GAG GTG AAC ATC CTG CGG GAG ATC 306

Val Ser Arg Glu Glu Ile Glu Arg Glu Val Asn Ile Leu Arg Glu Ile

60

65

70

CGG CAC CCC AAC ATC ATC ACC CTG CAC GAC ATC TTC GAG AAC AAG ACG 354

Arg His Pro Asn Ile Ile Thr Leu His Asp Ile Phe Glu Asn Lys Thr

75

80

85

40

GAC GTG GTC CTC ATC CTG GAG CTG GTC TCT GGC GGG GAG CTC TTT GAC	402	
Asp Val Val Leu Ile Leu Glu Leu Val Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp		
90 95 100		
TTC CTG GCG GAG AAA GAG TCG CTG ACG GAG GAC GAG GCC ACC CAG TTC	450	
Phe Leu Ala Glu Lys Glu Ser Leu Thr Glu Asp Glu Ala Thr Gln Phe		
105 110 115		
CTC AAG CAG ATC CTG GAC GGC GTT CAC TAC CTG CAC TCT AAG CGC ATC	498	10
Leu Lys Gln Ile Leu Asp Gly Val His Tyr Leu His Ser Lys Arg Ile		
120 125 130 135		
GCA CAC TTT GAC CTG AAG CCG GAA AAC ATC ATG CTG CTG GAC AAG AAC	546	
Ala His Phe Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Met Leu Leu Asp Lys Asn		
140 145 150		
GTG CCC AAC CCA CGA ATC AAG CTC ATC GAC TTC GGC ATC GCG CAC AAG	594	
Val Pro Asn Pro Arg Ile Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ile Ala His Lys		20
155 160 165		
ATC GAG GCG GGG AAC GAG TTC AAG AAC ATC TTC GGC ACC CCG GAG TTT	642	
Ile Glu Ala Gly Asn Glu Phe Lys Asn Ile Phe Gly Thr Pro Glu Phe		
170 175 180		
GTG GCC CCA GAG ATT GTG AAC TAT GAG CCG CTG GGC CTG GAG GCG GAC	690	
Val Ala Pro Glu Ile Val Asn Tyr Glu Pro Leu Gly Leu Glu Ala Asp		
185 190 195		30
ATG TGG AGC ATC GGT GTC ATC ACC TAT ATC CTC CTG AGC GGT GCA TCC	738	
Met Trp Ser Ile Gly Val Ile Thr Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Ala Ser		
200 205 210 215		
CCG TTC CTG GGC GAG ACC AAG CAG GAG ACG CTC ACC AAC ATC TCA GCC	786	
Pro Phe Leu Gly Glu Thr Lys Gln Glu Thr Leu Thr Asn Ile Ser Ala		
220 225 230		
GTG AAC TAC GAC TTC GAC GAG GAG TAC TTC AGC AAC ACC AGC GAG CTG	834	40
Val Asn Tyr Asp Phe Asp Glu Glu Tyr Phe Ser Asn Thr Ser Glu Leu		

235	240	245	
GCC AAG GAC TTC ATT CGC CGG CTG CTC GTC AAA GAT CCC AAG CGG AGA			882
Ala Lys Asp Phe Ile Arg Arg Leu Leu Val Lys Asp Pro Lys Arg Arg			
250	255	260	
ATG ACC ATT GCC CAG AGC CTG GAA CAT TCC TGG ATT AAG GCG ATC CGG			930
Met Thr Ile Ala Gln Ser Leu Glu His Ser Trp Ile Lys Ala Ile Arg			
265	270	275	10
CGG CGG AAC GTG CGT GGT GAG GAC AGC GGC CGC AAG CCC GAG CGG CGG			978
Arg Arg Asn Val Arg Gly Glu Asp Ser Gly Arg Lys Pro Glu Arg Arg			
280	285	290	295
CGC CTG AAG ACC ACG CGT CTG AAG GAG TAC ACC ATC AAG TCG CAC TCC			1026
Arg Leu Lys Thr Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Thr Ile Lys Ser His Ser			
300	305	310	
AGC TTG CCG CCC AAC AAC AGC TAC GCC GAC TTC GAG CGC TTC TCC AAG			1074
Ser Leu Pro Pro Asn Asn Ser Tyr Ala Asp Phe Glu Arg Phe Ser Lys			20
315	320	325	
GTG CTG GAG GAG GCG GCG GCC GCC GAG GAG GGC CTG CGC GAG CTG CAG			1122
Val Leu Glu Glu Ala Ala Ala Ala Glu Glu Gly Leu Arg Glu Leu Gln			
330	335	340	
CGC AGC CGG CGG CTC TGC CAC GAG GAC GTG GAG GCG CTG GCC GCC ATC			1170
Arg Ser Arg Arg Leu Cys His Glu Asp Val Glu Ala Leu Ala Ala Ile			30
345	350	355	
TAC GAG GAG AAG GAG GCC TGG TAC CGC GAG GAG AGC GAC AGC CTG GGC			1218
Tyr Glu Glu Lys Glu Ala Trp Tyr Arg Glu Glu Ser Asp Ser Leu Gly			
360	365	370	375
CAG GAC CTG CGG AGG CTA CGG CAG GAG CTG CTC AAG ACC GAG GCG CTC			1266
Gln Asp Leu Arg Arg Leu Arg Gln Glu Leu Leu Lys Thr Glu Ala Leu			
380	385	390	40
AAG CGG CAG GCG CAG GAG GAG GCC AAG GGC GCG CTG CTG GGG ACC AGC			1314

配列番号：4

配列の長さ：1429

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：10..1353

10

配列

CCAGCCGCC ATG TCC ACA TTC AGG CAA GAG GAT GTT GAG GAC CAT TAT 48

Met Ser Thr Phe Arg Gln Glu Asp Val Glu Asp His Tyr

1

5

10

GAG ATG GGA GAG GAG CTT GGC AGT GGC CAA TTT GCC ATC GTG CGC AAG 96 20

Glu Met Gly Glu Glu Leu Gly Ser Gly Gln Phe Ala Ile Val Arg Lys

15

20

25

TGC CAG CAG AAG GGC ACG GGC ATG GAG TAT GCA GCC AAG TTC ATC AAG 144

Cys Gln Gln Lys Gly Thr Gly Met Glu Tyr Ala Ala Lys Phe Ile Lys

30

35

40

45

AAG CGG CGC CTG CCA TCC AGC CGG CGC GGT GTG AGC CGG GAG GAG ATC 192

Lys Arg Arg Leu Pro Ser Ser Arg Arg Gly Val Ser Arg Glu Glu Ile 30

50

55

60

GAA CGC GAG GTG AGC ATC CTG CGC GAG ATC CGC CAC CCC AAC ATC ATA 240

Glu Arg Glu Val Ser Ile Leu Arg Glu Ile Arg His Pro Asn Ile Ile

65

70

75

ACA CTG CAT GAC GTG TTC GAG AAC AAG ACA GAT GTG GTG CTG ATC CTG 288

Thr Leu His Asp Val Phe Glu Asn Lys Thr Asp Val Val Leu Ile Leu

80

85

90

40

GAG CTG GTG TCC GGT GGC GAG CTT TTC GAC TTC CTG GCC GAG AAG GAG 336

Glu Leu Val Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Phe Leu Ala Glu Lys Glu		
95	100	105
TCA TTG ACG GAG GAT GAG GCC ACG CAG TTC CTC AAA CAA ATC CTA GAC	384	
Ser Leu Thr Glu Asp Glu Ala Thr Gln Phe Leu Lys Gln Ile Leu Asp		
110	115	120
GGT GTC CAC TAC CTG CAC TCC AAG CGC ATC GCA CAC TTT GAC CTG AAG	432	
Gly Val His Tyr Leu His Ser Lys Arg Ile Ala His Phe Asp Leu Lys		10
130	135	140
CCC GAG AAC ATC ATG TTG CTG GAC AAG CAC GCA GCC AGC CCC CGC ATT	480	
Pro Glu Asn Ile Met Leu Leu Asp Lys His Ala Ala Ser Pro Arg Ile		
145	150	155
AAG CTC ATC GAC TTT GGC ATC GCG CAC AGG ATC GAG GCT GGC AGC GAG	528	
Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ile Ala His Arg Ile Glu Ala Gly Ser Glu		
160	165	170
TTC AAG AAC ATC TTT GGC ACA CCC GAG TTT GTC GCC CCC GAG ATC GTG	576	
Phe Lys Asn Ile Phe Gly Thr Pro Glu Phe Val Ala Pro Glu Ile Val		
175	180	185
AAC TAT GAG CCA CTT GGC TTG GAG GCT GAC ATG TGG AGC ATT GGC GTC	624	
Asn Tyr Glu Pro Leu Gly Leu Glu Ala Asp Met Trp Ser Ile Gly Val		
190	195	200
ATC ACC TAC ATC CTC CTG AGC GGA GCG TCC CCA TTC CTG GGC GAG ACC	672	30
Ile Thr Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Ala Ser Pro Phe Leu Gly Glu Thr		
210	215	220
AAG CAG GAG ACG CTG ACG AAC ATC TCA GCA GTG AAC TAT GAC TTT GAT	720	
Lys Gln Glu Thr Leu Thr Asn Ile Ser Ala Val Asn Tyr Asp Phe Asp		
225	230	235
GAG GAA TAC TTC AGC AGC ACC AGC GAG CTG GCC AAG GAC TTC ATC CGC	768	
Glu Glu Tyr Phe Ser Ser Thr Ser Glu Leu Ala Lys Asp Phe Ile Arg		40
240	245	250

AGG CTG CTG GTC AAA GAC CCC AAG AGG AGG ATG ACC ATC GCA CAG AGC	816	
Arg Leu Leu Val Lys Asp Pro Lys Arg Arg Met Thr Ile Ala Gln Ser		
255 260 265		
CTG GAG CAT TCC TGG ATC AAG GTG CGC AGG CGC GAG GAC GGC GCC CGG	864	
Leu Glu His Ser Trp Ile Lys Val Arg Arg Arg Glu Asp Gly Ala Arg		
270 275 280 285		
AAG CCA GAG CGA CGG CGG CTG CGC GCC GCG CGC CTG CGC GAG TAC AGC	912	10
Lys Pro Glu Arg Arg Arg Leu Arg Ala Ala Arg Leu Arg Glu Tyr Ser		
290 295 300		
CTC AAG TCC CAC TCG AGC ATG CCG CGC AAC ACG AGC TAC GCC AGC TTC	960	
Leu Lys Ser His Ser Ser Met Pro Arg Asn Thr Ser Tyr Ala Ser Phe		
305 310 315		
GAG CGC TTC TCA CGC GTG CTG GAG GAC GTG GCG GCG GCA GAG CAG GGG	1008	
Glu Arg Phe Ser Arg Val Leu Glu Asp Val Ala Ala Ala Glu Gln Gly		20
320 325 330		
CTG CGC GAG CTG CAG CGA GGC AGG CGC CAG TGC CGG GAG CGC GTG TGT	1056	
Leu Arg Glu Leu Gln Arg Gly Arg Arg Gln Cys Arg Glu Arg Val Cys		
335 340 345		
GCG CTG CGC GCG GCC GCC GAG CAG CGG GAG GCG CGC TGC CGC GAC GGG	1104	
Ala Leu Arg Ala Ala Ala Glu Gln Arg Glu Ala Arg Cys Arg Asp Gly		
350 355 360 365		30
AGC GCA GGG CTA GGG CGC GAC CTG CGA CGC CTG CGC ACG GAG CTG GGG	1152	
Ser Ala Gly Leu Gly Arg Asp Leu Arg Arg Leu Arg Thr Glu Leu Gly		
370 375 380		
CGC ACC GAG GCT CTG CGC ACG CGC GCG CAG GAG GAG GCG CGG GCG GCG	1200	
Arg Thr Glu Ala Leu Arg Thr Arg Ala Gln Glu Glu Ala Arg Ala Ala		
385 390 395		
CTG TTG GGT GCC GGG GGC CTG AAG CGT CGC CTG TGT CGC CTG GAG AAC	1248	40
Leu Leu Gly Ala Gly Gly Leu Lys Arg Arg Leu Cys Arg Leu Glu Asn		

400	405	410		
CGT TAC GAC GCG CTA GCC GCT CAG GTG GCC GCT GAG GTG CAA TTC GTG			1296	
Arg Tyr Asp Ala Leu Ala Ala Gln Val Ala Ala Glu Val Gln Phe Val				
415	420	425		
CGC GAC CTG GTG CGT GCG CTG GAG CAG GAA CGG CTG CAG GCT GAG TGC			1344	
Arg Asp Leu Val Arg Ala Leu Glu Gln Glu Arg Leu Gln Ala Glu Cys				
430	435	440	445	10
GGC GTG CGC TAGGCTGCGG CACCCCCAGA CCCCAGCCCA CCCCAGAAT			1393	
Gly Val Arg				
AAAGCTGCTT TCCACGTAAA AAAAAAAAAA AAAAAA			1429	

【 0 0 7 1 】

配列番号 : 5

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸(合成DNA)

配列

GGGAATTCGC GGAGCAGGAG GCT 23

【 0 0 7 2 】

配列番号 : 6

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸(合成DNA)

配列

GGGGATCCCT AGGGGACCCT TTTCTA 26 40

【 0 0 7 3 】

配列番号：7

配列の長さ：62

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸(合成DNA)

配列

GGGTCGACCAC CATGGCTTAC CCATACGATG TTCCAGATTA CGCTATGTCC ACATTCAGGC 60

AA 62

10

【 0 0 7 4 】

配列番号：8

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸(合成DNA)

配列

GGGTCGACTA GCGCACGCCG CACTCAGCCT GC 32

20

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 アミノ酸配列のホモロジー検索結果を示す図である。

【 図 2 】 アミノ酸配列のホモロジー検索結果を示す図である。

【 図 3 】 ウエスタンブロットの結果を示す電気泳動写真である。

【 図 4 】 選択培地でのコロニー形成結果を示す写真である(生物の形態)。

【 図 5 】 ノーザンブロットの結果を示す電気泳動写真である。

【 図 6 】 選択培地でのコロニー形成結果を示す写真である(生物の形態)。

【 図 7 】 アポトーシスの形態を示すNIH3T3細胞の写真である(生物の形態)。

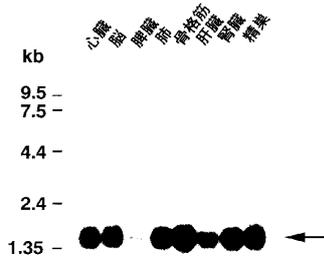
【 図 8 】 アポトーシスの形態を示すLacZ発現細胞の割合を示す図である。

【 図 9 】 ZIP-キナーゼのキナーゼ活性を示す電気泳動写真である。

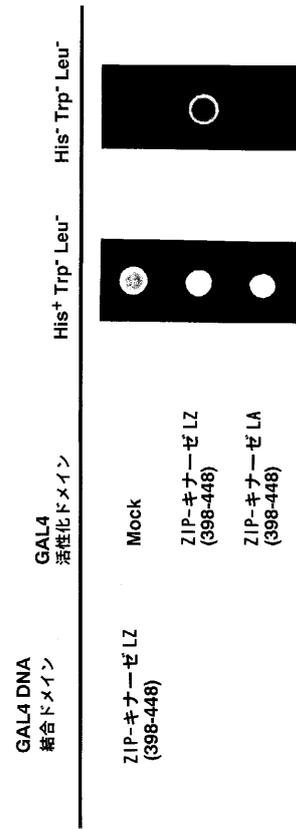
【 図 10 】 ZIP-キナーゼの細胞内局在を示す写真である(生物の形態)。

30

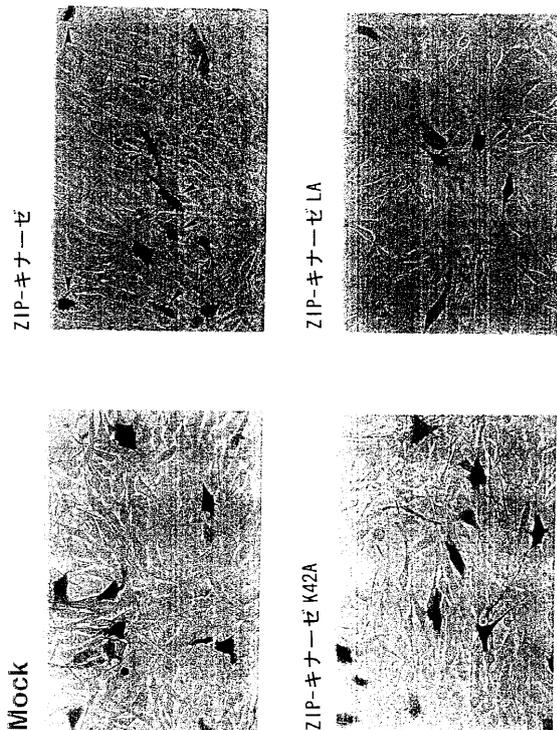
【 図 5 】



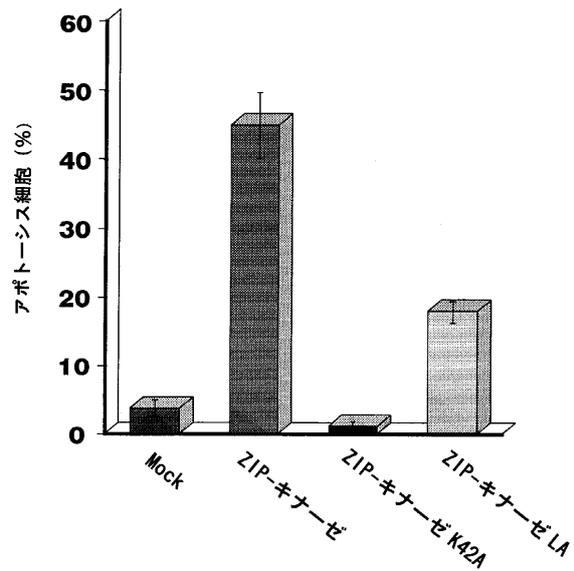
【 図 6 】



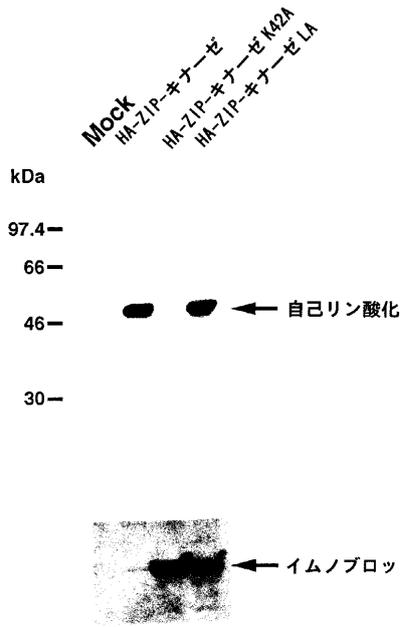
【 図 7 】



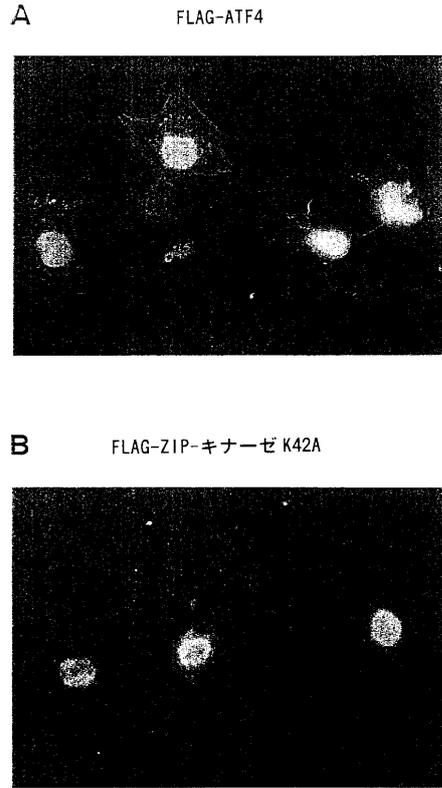
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 A
A 6 1 K 38/00 (2006.01) A 6 1 K 37/02

(72) 発明者 河合 太郎
兵庫県西宮市笠屋町 8 - 3 4 - 2 0 9

審査官 中村 正展

(56) 参考文献 EMBO J. , 1 9 9 7 年 3 月 , Vol. 16 , 998-1008
Genes Dev. , 1 9 9 5 年 , Vol. 9 , 15-30
Genes Dev. , 1 9 9 3 年 , Vol. 7 , 1047-1058
Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1 9 9 1 年 , Vol. 88 , 3720-3724
Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1 9 9 2 年 , Vol. 89 , 5789-5793
Genes Dev. , 1 9 8 9 年 , Vol. 3 , 2083-2090
J. Biol. Chem. , 1 9 9 4 年 , Vol. 269 , 30808-30817

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90
C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/00-5/10
C12N 9/12
A61K 38/00
JSTPlus(JDream2)
PubMed
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq