

(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2019-184500

(P2019-184500A)

(43) 公開日 令和1年10月24日(2019.10.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	2GO45
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 ZNAZ	4BO63
A6 1 K 45/00 (2006.01)	A6 1 K 45/00	4CO84
A6 1 P 35/00 (2006.01)	A6 1 P 35/00	4CO86
A6 1 P 15/00 (2006.01)	A6 1 P 15/00	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-77857 (P2018-77857)
 (22) 出願日 平成30年4月13日 (2018.4.13)

(71) 出願人 304021417
 国立大学法人東京工業大学
 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号
 (74) 代理人 100106909
 弁理士 棚井 澄雄
 (74) 代理人 100161207
 弁理士 西澤 和純
 (74) 代理人 100181722
 弁理士 春田 洋孝
 (74) 代理人 100163496
 弁理士 荒 則彦
 (74) 代理人 100154852
 弁理士 酒井 太一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬をスクリーニングする技術を提供する。

【解決手段】 遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬のスクリーニング方法であって、被験物質の存在下で、クリプトコッカス属菌のBRH2 遺伝子欠損株を培養することと、前記BRH2 遺伝子欠損株の生存率を測定することと、を含み、前記被験物質の存在下における前記BRH2 遺伝子欠損株の生存率が、前記被験物質の非存在下における前記BRH2 遺伝子欠損株の生存率と比較して低いことが、前記被験物質が遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬であることを示す、スクリーニング方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬のスクリーニング方法であって、
被験物質の存在下及び非存在下で、クリプトコッカス属菌のBRH2 遺伝子欠損株及び野生型株をそれぞれ培養することと、

前記被験物質の存在下における前記BRH2 遺伝子欠損株及び野生型株の生存率をそれぞれ測定することと、を含み、

前記BRH2 遺伝子欠損株の生存率が、前記野生型株の生存率と比較して低いことが、前記被験物質が遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬であることを示す、スクリーニング方法。

10

【請求項 2】

遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬のスクリーニング方法であって、

被験物質の存在下で、クリプトコッカス属菌のBRH2 遺伝子欠損株を合成致死又は合成感受性にする遺伝子にコードされるタンパク質の活性を測定することを含み、

前記被験物質の存在下における前記タンパク質の活性が、前記被験物質の非存在下における前記タンパク質の活性と比較して低いことが、前記被験物質が遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬であることを示す、スクリーニング方法。

【請求項 3】

クリプトコッカス属菌のBRH2 遺伝子欠損株を合成致死又は合成感受性にする前記遺伝子が、DNA2、EXO1、FAN1、FANCM、MRE11、MUS81、RAD50、RAD51、RAD51C、RAD52、RAD54、RAD54B、BLM、RSR2、XRCC3、XRCC6、FEN1、RFC1、RFC2、RFC3、RFC4、RFC5、PCNA、ATM、ATR、CHK1、CHK2、APEX1、PARP、XPF、XPG、PNK、NTHL1、MLH1、MSH2、MSH3、MSH6、PMS1、ERCC1、RTEL1、SMARCA1-1、SMARCA1-2、DSS1、TOP1、TOP2-alpha、TOP3-alpha及びSFR1からなる群より選択される遺伝子である、請求項2に記載のスクリーニング方法。

20

【請求項 4】

乳癌細胞又は卵巣癌細胞のポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)阻害剤に対する耐性解除剤のスクリーニング方法であって、

クリプトコッカス属菌のBRH2 遺伝子欠損株をPARP阻害剤耐性にする変異遺伝子を特定することと、

被験物質の存在下で、前記変異遺伝子にコードされるタンパク質の活性を測定することと、を含み、

前記被験物質の存在下における前記タンパク質の活性が、前記被験物質の非存在下における前記タンパク質の活性と比較して低いことが、前記被験物質が乳癌細胞又は卵巣癌細胞のPARP阻害剤に対する耐性解除剤であることを示す、スクリーニング方法。

30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬のスクリーニング方法に関する。より詳細には、本発明は、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬のスクリーニング方法、及び、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ阻害剤に対する耐性解除剤のスクリーニング方法に関する。

40

【背景技術】**【0002】**

乳癌や卵巣癌の5～10%は、遺伝的な要因が強く関与して発症していると考えられている。遺伝的な要因としては、遺伝性乳癌卵巣癌症候群(Hereditary Breast and Ovarian Cancer、HBOC)が最も多い。

【0003】

50

遺伝性乳癌卵巣癌症候群は、BRCA1遺伝子又はBRCA2遺伝子の変異が原因で乳癌や卵巣癌を高いリスクで発症する遺伝性腫瘍の1つである。また、癌を発症する場合には、乳癌及び卵巣癌の両方を発症する場合が多い。

【0004】

例えば非特許文献1には、BRCA1遺伝子又はBRCA2遺伝子の変異を有するヒトのうち、55～65%が70歳までに乳癌を発生すると報告されている。卵巣癌も同程度の割合である。乳癌又は卵巣癌の予防のためにタモキシフェンを投与する場合もあるが、タモキシフェン投与は子宮癌の発生リスクを上昇させてしまう。また、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の癌患者に通常の抗癌剤を安易に投与すると、白血球や好中球が減少する場合がある。

10

【0005】

ところで、RAD51タンパク質は、DNA二重鎖切断の相同組換え修復機構における重要な酵素である。そして、BRCA1タンパク質及びBRCA2タンパク質は、RAD51タンパク質の補助因子として機能していると考えられている。BRCA1タンパク質又はBRCA2タンパク質の欠損だけでは致死とはならないが、相同組換え修復機構の機能が低下することにより、ゲノム不安定化がおり、その結果として癌が発症すると考えられている。

【0006】

DNA代謝の細胞内分子機構は、生物種間で保存されている。例えば、ヒトRAD51タンパク質と酵母Rad51タンパク質は87%の配列同一性を有しており、酵母における研究がヒトの分子機構の解明に直接貢献している。

20

【0007】

しかしながら、基礎研究に用いられる出芽酵母(サッカロミセス・セレビスエ)や分裂酵母(シゾサッカロミセス・ボンベ)は、BRCA1遺伝子及びBRCA2遺伝子を有していない。このため、従来、酵母を用いて、BRCA1遺伝子又はBRCA2遺伝子の機能解析を行うことや、BRCA1遺伝子又はBRCA2遺伝子の変異株の薬剤応答試験等を行うことができなかった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】A. Antoniou, et al., Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies., Am. J. Hum. Genet. 72, 1117-1130, 2003.

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

このような状況のもと、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬が求められている。最近開発された遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬としてオラパリブ(CAS番号:763113-22-0)が知られている。オラパリブは、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(以下、「PARP」という場合がある。)阻害薬である。

40

【0010】

しかしながら、オラパリブを使用すると、オラパリブに対する耐性を有する癌細胞が出現することが知られている。したがって、癌細胞がオラパリブに対する耐性を獲得する機構を解明することが必要である。また、オラパリブに代わる治療薬又はオラパリブと併用することにより、オラパリブに対する耐性を解除する薬剤の開発が必要である。

【0011】

ところで、トウモロコシ黒穂病の原因菌であるウスチラゴ・メイディス(Ustilago maydis)は、ヒトBRCA2タンパク質のホモログを持つことが知られている。しかしながら、ウスチラゴ・メイディスがヒトPARPタンパク質のホモログを有し

50

ているか否かは報告されていない。このため、ウスチラゴ・メイディスを用いてオラパリブに代わる治療薬又はオラパリブに対する耐性を解除する薬剤の開発を行うことができるか否かは不明である。

【0012】

本発明は、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬をスクリーニングする技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

発明者らは、クリプトコッカス属菌が、BRCA2遺伝子のホモログ（以下、「BRH2」という。）を持つことを見出した。発明者らはまた、クリプトコッカス属菌のBRH2遺伝子欠損株が、BRCA2 - / - ヒト細胞と同様にDNA損傷に感受性を示すことを明らかにした。発明者らはまた、クリプトコッカス属菌が、ヒトPARP遺伝子のホモログを持つことを見出した。

10

【0014】

本発明は以下の態様を含む。

[1] 遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬のスクリーニング方法であって、被験物質の存在下及び非存在下で、クリプトコッカス属菌のBRH2遺伝子欠損株及び野生型株をそれぞれ培養することと、前記被験物質の存在下における前記BRH2遺伝子欠損株及び野生型株の生存率をそれぞれ測定することと、を含み、前記BRH2遺伝子欠損株の生存率が、前記野生型株の生存率と比較して低いことが、前記被験物質が遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬であることを示す、スクリーニング方法。

20

[2] 遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬のスクリーニング方法であって、被験物質の存在下で、クリプトコッカス属菌のBRH2遺伝子欠損株を合成致死又は合成感受性にする遺伝子にコードされるタンパク質の活性を測定することを含み、前記被験物質の存在下における前記タンパク質の活性が、前記被験物質の非存在下における前記タンパク質の活性と比較して低いことが、前記被験物質が遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬であることを示す、スクリーニング方法。

[3] クリプトコッカス属菌のBRH2遺伝子欠損株を合成致死又は合成感受性にする前記遺伝子が、DNA2、EXO1、FAN1、FANCM、MRE11、MUS81、RAD50、RAD51、RAD51C、RAD52、RAD54、RAD54B、BLM、SRS2、XRCC3、XRCC6、FEN1、RFC1、RFC2、RFC3、RFC4、RFC5、PCNA、ATM、ATR、CHK1、CHK2、APEX1、PARP、XPF、XPG、PNK、NTHL1、MLH1、MSH2、MSH3、MSH6、PMS1、ERCC1、RTEL1、SMARCA1-1、SMARCA1-2、DSS1、TOP1、TOP2-alpha、TOP3-alpha及びSFR1からなる群より選択される遺伝子である、[2]に記載のスクリーニング方法。

30

[4] 乳癌細胞又は卵巣癌細胞のPARP阻害剤に対する耐性解除剤のスクリーニング方法であって、クリプトコッカス属菌のBRH2遺伝子欠損株をPARP阻害剤耐性にする変異遺伝子を特定することと、被験物質の存在下で、前記変異遺伝子にコードされるタンパク質の活性を測定することと、を含み、前記被験物質の存在下における前記タンパク質の活性が、前記被験物質の非存在下における前記タンパク質の活性と比較して低いことが、前記被験物質が乳癌細胞又は卵巣癌細胞のPARP阻害剤に対する耐性解除剤であることを示す、スクリーニング方法。

40

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬をスクリーニングする技術を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】(a)は、実験例2における、ヒトBRCA2タンパク質、ウスチラゴ・メイデ

50

イスBrh2タンパク質及びクリプトコッカス・リクエファシエンスBrh2タンパク質の構造を示す模式図である。(b)は、実験例2において、ヒトBRCA2タンパク質のBRCLリピートと、クリプトコッカス・リクエファシエンスBrh2タンパク質のBRCLリピートのアミノ酸配列を、それぞれアライメントした図である。(c)は、実験例2において、ヒトBRCA2タンパク質のCCR、ウスチラゴ・メイディスBrh2タンパク質のCCR及びクリプトコッカス・リクエファシエンスBrh2タンパク質のCCRのアミノ酸配列を、それぞれアライメントした図である。

【図2】(a)は、実験例3における、ヒトPARP1タンパク質及びクリプトコッカス・リクエファシエンスParpタンパク質の構造を示す模式図である。(b)は、クリプトコッカス・リクエファシエンスParpタンパク質のアミノ酸配列である。

【図3】(a)は、実験例6において、スプリットマーカー法によりクリプトコッカス・リクエファシエンスのBRH2遺伝子を破壊した手順を説明する模式図である。(b)は、実験例7において、スプリットマーカー法によりクリプトコッカス・リクエファシエンスのPARP遺伝子を破壊した手順を説明する模式図である。(c)は、実験例8において、スプリットマーカー法によりクリプトコッカス・リクエファシエンスのRAD51遺伝子を破壊した手順を説明する模式図である。

【図4】(a)は、実験例9及び10における、対照のクリプトコッカス・リクエファシエンスのスポットの写真である。(b)は、実験例9において、紫外線照射を行ったクリプトコッカス・リクエファシエンスのスポットの写真である。(c)は、実験例10において、ブレオマイシンに暴露したクリプトコッカス・リクエファシエンスのスポットの写真である。(d)は、実験例10において、フィレオマイシンに暴露したクリプトコッカス・リクエファシエンスのスポットの写真である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

[遺伝子名及びタンパク質名の表記]

本明細書において、ヒト遺伝子及びヒトタンパク質は、大文字のアルファベットで表すものとする。また、酵母(クリプトコッカス属菌、ウスチラゴ属菌を含む)の遺伝子は、大文字のアルファベットで表し、タンパク質は先頭文字を大文字のアルファベットで、それ以降を小文字のアルファベットで表すものとする。

【0018】

[遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬のスクリーニング方法]

1実施形態において、本発明は、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬のスクリーニング方法を提供する。

【0019】

(第1実施形態)

第1実施形態に係る遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬のスクリーニング方法は、被験物質の存在下及び非存在下で、クリプトコッカス属菌のBRH2遺伝子欠損株及び野生型株をそれぞれ培養することと、前記被験物質の存在下における前記BRH2遺伝子欠損株及び野生型株の生存率をそれぞれ測定することと、を含み、前記BRH2遺伝子欠損株の生存率が、前記野生型株の生存率と比較して低いことが、前記被験物質が遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬であることを示す、スクリーニング方法である。

【0020】

第1実施形態のスクリーニング方法において、被験物質としては特に制限されず、例えば、天然化合物ライブラリ、合成化合物ライブラリ、既存薬ライブラリ、代謝物ライブラリ等が挙げられる。

【0021】

クリプトコッカス属菌としては、ヒトBRCA2遺伝子のホモログを有する菌であれば特に限定されず、例えば、クリプトコッカス・リクエファシエンス(*Cryptococcus liquefaciens*)、クリプトコッカス・アルビダス(*Cryptococcus albidus*)、クリプトコッカス・ネオフォーマンズ(*Cryptococcus neoformans*)、

10

20

30

40

50

occus neoformans)、クリプトコッカス・ガッティ(Cryptococcus gattii)等が挙げられる。

【0022】

B R H 2 遺伝子とは、発明者らが見出した、クリプトコッカス属菌におけるヒト B R C A 2 遺伝子のホモログである。クリプトコッカス・リクエファシエンスの B R H 2 遺伝子の塩基配列を配列番号 6 1 に示し、B r h 2 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 6 2 に示す。

【0023】

第 1 実施形態のスクリーニング方法において、クリプトコッカス属菌の B R H 2 遺伝子欠損株としては、例えば、実施例において後述するような、クリプトコッカス・リクエファシエンスの B R H 2 遺伝子破壊株を用いることができる。あるいは、s i R N A、s h R N A 等の阻害性 R N A を導入することにより、B R H 2 遺伝子の発現を低下させたクリプトコッカス属菌を用いてもよい。

10

【0024】

被験物質の存在下における B R H 2 遺伝子欠損株の生存率の測定方法は、特に制限されず、酵母の実験で通常用いられる方法を用いて測定することができる。例えば、次のような方法が挙げられる。まず、被験物質の存在下及び非存在下で B R H 2 遺伝子欠損株を培養し、それぞれ生菌数を測定する。続いて、下記式(1)により、生存率を算出する。

生存率 = 被験物質の存在下における生菌数 / 被験物質の非存在下における生菌数 (1)

20

【0025】

また、被験物質の存在下における野生型株の生存率も上記と同様にして求めることができる。具体的には、まず、被験物質の存在下及び非存在下で野生型株を培養し、それぞれ生菌数を測定する。続いて、上記式(1)により、生存率を算出する。

【0026】

その結果、被験物質の存在下における、B R H 2 遺伝子欠損株の生存率が、野生型株の生存率と比較して低かった場合、被験物質は、B R H 2 遺伝子欠損株を特異的に死滅させる活性が高く、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬の候補であると判断することができる。

【0027】

(第 2 実施形態)

30

第 2 実施形態に係る遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬のスクリーニング方法は、被験物質の存在下で、クリプトコッカス属菌の B R H 2 遺伝子欠損株を合成致死又は合成感受性にする遺伝子にコードされるタンパク質の活性を測定することを含み、前記被験物質の存在下における前記タンパク質の活性が、前記被験物質の非存在下における前記タンパク質の活性と比較して低いことが、前記被験物質が遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬であることを示す、スクリーニング方法である。

【0028】

第 2 実施形態のスクリーニング方法において、被験物質、クリプトコッカス属菌、及び、クリプトコッカス属菌の B R H 2 遺伝子欠損株は、第 1 実施形態のスクリーニング方法におけるものと同様である。

40

【0029】

クリプトコッカス属菌の B R H 2 遺伝子欠損株を合成致死にする遺伝子とは、クリプトコッカス属菌の B R H 2 遺伝子欠損株が、更に欠損することにより致死となる遺伝子を意味する。また、B R H 2 遺伝子欠損株を合成感受性にする遺伝子は、D N A 損傷修復機構の機能低下により、D N A 損傷に対する感受性を上昇させる遺伝子であってもよい。ここで、D N A 損傷は、例えば紫外線照射によるものであってもよいし、例えば抗癌剤の投与によるものであってもよい。

【0030】

クリプトコッカス属菌の B R H 2 遺伝子欠損株を合成致死又は合成感受性にする遺伝子は、1 つの遺伝子であってもよく、2 つ以上の遺伝子の組み合わせであってもよい。

50

【 0 0 3 1 】

B R H 2 遺伝子欠損株を合成致死にする遺伝子は、例えば、B R H 2 遺伝子欠損株の温度感受性を上昇させるような変異株を取得し、その原因となる遺伝子（仮に、「遺伝子 X」とする。）を特定すること等により、同定することができる。

【 0 0 3 2 】

この場合、変異した遺伝子 X にコードされるタンパク質は、低温では通常の機能を有し、高温では機能不全となるものである。そして、高温時に、変異した遺伝子 X にコードされるタンパク質のみが機能不全となっても菌は生存可能であるが、変異した遺伝子 X を有する B R H 2 遺伝子欠損株が高温で死滅する場合、遺伝子 X は B R H 2 遺伝子欠損株を合成致死にする遺伝子であるといえることができる。

10

【 0 0 3 3 】

また、B R H 2 遺伝子欠損株を合成感受性にする遺伝子は、例えば、B R H 2 遺伝子欠損株の D N A 損傷に対する感受性を上昇させる変異株を取得し、その原因となる遺伝子を特定すること等により同定することができる。

【 0 0 3 4 】

第 2 実施形態のスクリーニング方法では、クリプトコッカス属菌の B R H 2 遺伝子欠損株を合成致死又は合成感受性にする遺伝子にコードされるタンパク質の阻害剤を、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬であると判断する。すなわち、このような阻害剤を B R H 2 遺伝子欠損株に投与すると、B R H 2 遺伝子欠損株を合成致死又は合成感受性にする遺伝子が欠損した状態と同様の状態になり、B R H 2 遺伝子欠損株を特異的に死滅させるか、あるいは D N A 損傷に対する感受性を上昇させることができる。

20

【 0 0 3 5 】

B R H 2 遺伝子欠損株を合成致死又は合成感受性にする遺伝子にコードされるタンパク質の活性は、当業者であれば、遺伝子に応じて予測し、測定することができる。

【 0 0 3 6 】

被験物質の存在下で、クリプトコッカス属菌の B R H 2 遺伝子欠損株を合成致死又は合成感受性にする遺伝子にコードされるタンパク質の活性を測定した結果、被験物質の存在下における上記タンパク質の活性が、被験物質の非存在下における上記タンパク質の活性と比較して低かった場合、当該被験物質は、上記タンパク質の阻害剤であるといえることができる。このような被験物質は、B R H 2 遺伝子欠損株を特異的に死滅させる活性が高く、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬候補であると判断することができる。

30

【 0 0 3 7 】

クリプトコッカス属菌の B R H 2 遺伝子欠損株を合成致死又は合成感受性にする遺伝子としては、例えば、D N A 2、E X O 1、F A N 1、F A N C M、M R E 1 1、M U S 8 1、R A D 5 0、R A D 5 1、R A D 5 1 C、R A D 5 2、R A D 5 4、R A D 5 4 B、B L M、S R S 2、X R C C 3、X R C C 6、F E N 1、R F C 1、R F C 2、R F C 3、R F C 4、R F C 5、P C N A、A T M、A T R、C H K 1、C H K 2、A P E X 1、P A R P、X P F、X P G、P N K、N T H L 1、M L H 1、M S H 2、M S H 3、M S H 6、P M S 1、E R C C 1、R T E L 1、S M A R C A D 1 - 1、S M A R C A D 1 - 2、D S S 1、T O P 1、T O P 2 - a l p h a、T O P 3 - a l p h a、S F R 1 等が挙げられる。ここで、上記の各遺伝子は、それぞれ、クリプトコッカス属菌におけるヒト遺伝子のホモログ又はオルソログを意味する。

40

【 0 0 3 8 】

下記表 1 及び 2 に上記各遺伝子の塩基配列の対応を示す。例えば、クリプトコッカス属菌におけるヒト A P E X 1 遺伝子のホモログの塩基配列は、配列番号 1 3 に記載の塩基配列の第 6 4 2 0 9 2 番目～第 6 4 4 6 7 6 番目に対応し、以下同様である。

【 0 0 3 9 】

【表 1】

ホモログ	scaffold	配列番号	位置
APEX1	scaffold20_cov128	13	642092-644676
ATM	scaffold13_cov127	5	148994-159510
ATR	scaffold23_cov128	17	1223912-1233632
BLM	scaffold20_cov128	13	652914-659811
BRCA2	scaffold27_cov129	19	643906-648424
CHK1	scaffold16_cov128	9	623239-628468
CHK2	scaffold23_cov128	17	593174-597168
DNA2	scaffold7_cov128	53	188477-196099
DSS1	scaffold7_cov128	53	121266-121592
ERCC1	scaffold9_2_cov128	57	382623-389114
EXO1	scaffold14_cov129	7	347842-351388
FAN1	scaffold60_cov129	49	100860-104991
FANCM	scaffold20_cov128	13	652914-659811
FEN1	scaffold14_cov129	7	1087418-1089884
MLH1	scaffold2_cov132	21	421295-424790
MRE11	scaffold43_cov128	32	536774-540635
MSH2	scaffold9_2_cov128	57	215117-219587
MSH3	scaffold27_cov129	19	776144-784351
MSH6	scaffold17_cov130	10	177976-183922
MUS81	scaffold27_cov129	19	149324-154934
NTHL1	scaffold23_cov128	17	782021-784281
PARP	scaffold13_cov127	5	437007-438872
PCNA	scaffold2_cov132	21	1248438-1250498
PMS1	scaffold9_1_cov128	58	319376-323700
PNK	scaffold43_cov128	32	279539-285759
RAD50	scaffold26_cov128	18	416036-422181
RAD51	scaffold47_cov127	43	267208-269239
RAD51C	scaffold20_cov128	13	578960-581205
RAD52	scaffold14_cov129	7	450984-453734
RAD54	scaffold19_cov129	11	225341-229003
RAD54B	scaffold20_cov128	13	659941-664149

10

20

30

【 0 0 4 0 】

【表 2】

ホモログ	scaffold	配列番号	位置
RFC1	scaffold46_cov128	40	125863-129853
RFC2	scaffold60_cov129	49	162588-167210
RFC3	scaffold26_cov128	18	443460-445512
RFC4	scaffold60_cov129	49	259706-261451
RFC5	scaffold20_cov128	13	106236-108176
RTEL1	scaffold16_cov128	9	717634-726129
SMARCAD1-1	scaffold47_cov127	43	46497-54259
SMARCAD1-2	scaffold46_cov128	40	256547-261988
SRS2	scaffold14_cov129	7	1079973-1084444
TOP1	scaffold16_cov128	9	581006-585215
TOP2-alpha	scaffold32_cov129	23	914909-920260
TOP3-alpha	scaffold2_cov132	21	307633-311663
XPF	scaffold2_cov132	21	1027009-1031153
XPG	scaffold32_cov129	23	1114968-1120036
XRCC3	scaffold3_cov128	30	366069-368027
XRCC6	scaffold2_cov132	21	362429-367113

10

20

【0041】

[乳癌細胞又は卵巣癌細胞のPARP阻害剤に対する耐性解除剤のスクリーニング方法]

1実施形態において、本発明は、乳癌細胞又は卵巣癌細胞のPARP阻害剤に対する耐性解除剤のスクリーニング方法であって、クリプトコッカス属菌のBRH2遺伝子欠損株をPARP阻害剤耐性にする変異遺伝子を特定することと、被験物質の存在下で、前記変異遺伝子にコードされるタンパク質の活性を測定することとを含み、前記被験物質の存在下における前記タンパク質の活性が、前記被験物質の非存在下における前記タンパク質の活性と比較して低いことが、前記被験物質が乳癌細胞又は卵巣癌細胞のPARP阻害剤に対する耐性解除剤であることを示す、スクリーニング方法を提供する。

【0042】

本実施形態のスクリーニング方法において、被験物質、クリプトコッカス属菌は、上述したものと同様である。また、PARP阻害剤としては、オラパリブ、イニパリブ(BSI201)、ABT-888(ベリパリブ)、AG014699、CEP9722、MK4827、LT-673、3-アミノベンズアミド、A-966492、AZD2461等が挙げられる。

30

【0043】

上述したように、癌の治療にオラパリブ等のPARP阻害剤を使用した場合、PARP阻害剤に対する耐性を有する癌細胞が出現することが知られている。本実施形態のスクリーニング方法によれば、乳癌細胞又は卵巣癌細胞の、PARP阻害剤に対する耐性解除剤をスクリーニングすることができる。

40

【0044】

クリプトコッカス属菌のBRH2遺伝子欠損株をPARP阻害剤耐性にする変異遺伝子は、例えば、次のようにして特定することができる。まず、BRH2遺伝子欠損株から、PARP阻害剤に対する耐性菌を単離する。これは、BRH2遺伝子欠損株に変異原処理を行い、PARP阻害剤に耐性となった菌(以下、「PARP阻害剤耐性株」という場合がある。)を分離することによって行うことができる。

【0045】

あるいは、BRH2遺伝子及びPARP遺伝子の二重欠損株のDNA損傷剤に対する高感受性が低感受性となった変異株(三重変異株、以下、「PARP阻害剤耐性株」という場合がある。)を分離することによって行うことができる。ここで、DNA損傷剤として

50

は、例えば、オパラリブ、シスプラチン等が挙げられる。

【0046】

続いて、PARP阻害剤耐性株で変異した遺伝子を特定する。これにより特定された変異遺伝子は、PARP阻害剤に対する耐性獲得に関与していると考えられる。

【0047】

そこで、この変異遺伝子にコードされるタンパク質の阻害剤を、PARP阻害剤に対する耐性解除剤であると判断する。すなわち、このような阻害剤をPARP阻害剤耐性株に投与すると、PARP阻害剤に対する耐性獲得に関与するタンパク質の活性が阻害されてPARP阻害剤に対する耐性が解除され、DNA損傷に対する感受性を再び上昇させることができる。

10

【0048】

上記変異遺伝子にコードされるタンパク質の活性は、当業者であれば、遺伝子に応じて予測し、測定することができる。被験物質の存在下で、上記変異遺伝子にコードされるタンパク質の活性を測定した結果、被験物質の存在下における上記タンパク質の活性が、被験物質の非存在下における上記タンパク質の活性と比較して低かった場合、当該被験物質は、上記タンパク質の阻害剤であるということが出来る。このような被験物質は、乳癌細胞又は卵巣癌細胞のPARP阻害剤に対する耐性を解除することができ、PARP阻害剤に対する耐性解除剤の候補であると判断することができる。

【実施例】

【0049】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

20

【0050】

[実験例1]

(クリプトコッカス・リクエファシエンスの全ゲノムDNAの塩基配列の決定)

クリプトコッカス・リクエファシエンスN6株をYPD培地で培養した。続いて、クリプトコッカス・リクエファシエンスN6株からゲノムDNAを抽出し、シーケンス用ライブラリを調製した。ライブラリの調製には、市販のキット(型式「illumina TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep Kit」、イルミナ社、及び、型式「Nextera Mate Pair Library Prep Kit」、イルミナ社)を用いた。

30

【0051】

続いて、調製したライブラリを次世代シーケンサー(型式「Miseq」、イルミナ社)に供し、300塩基ずつのペアエンドシーケンスを行った。

【0052】

続いて、得られたシーケンスデータを、ゲノムアセンブリ用プログラム(名称「Platanus」、<http://platanus.bio.titech.ac.jp/>)を用いてアセンブルすることにより、全ゲノムDNAの塩基配列を決定した。

【0053】

下記表3に、決定したスキャホールドの塩基配列の配列番号を示す。また、配列番号59は、ミトコンドリアゲノムの塩基配列である。

40

【0054】

【表 3】

スキヤホールド名	配列番号	スキヤホールド名	配列番号
scaffold116_cov197	1	scaffold439_cov393	31
scaffold11_cov128	2	scaffold43_cov128	32
scaffold122_cov165	3	scaffold446_cov376	33
scaffold129_cov76	4	scaffold447_cov458	34
scaffold13_cov127	5	scaffold44_cov128	35
scaffold146_cov140	6	scaffold451_cov1132	36
scaffold14_cov129	7	scaffold453_cov358	37
scaffold153_cov99	8	scaffold45_cov184	38
scaffold16_cov128	9	scaffold460_cov440	39
scaffold17_cov130	10	scaffold46_cov128	40
scaffold19_cov129	11	scaffold473_cov370	41
scaffold203_cov187	12	scaffold478_cov475	42
scaffold20_cov128	13	scaffold47_cov127	43
scaffold218_cov160	14	scaffold49_cov160	44
scaffold222_cov78	15	scaffold500_cov405	45
scaffold22_cov126	16	scaffold52_cov134	46
scaffold23_cov128	17	scaffold56_cov129	47
scaffold26_cov128	18	scaffold5_cov128	48
scaffold27_cov129	19	scaffold60_cov129	49
scaffold29_cov129	20	scaffold6_cov112	50
scaffold2_cov132	21	scaffold73_cov190	51
scaffold327_cov53	22	scaffold75_cov147	52
scaffold32_cov129	23	scaffold7_cov128	53
scaffold34_cov128	24	scaffold81_cov145	54
scaffold361_cov252	25	scaffold82_cov158	55
scaffold362_cov241	26	scaffold93_cov208	56
scaffold377_cov493	27	scaffold9_2_cov128	57
scaffold37_cov128	28	scaffold9_1_cov128	58
scaffold380_cov376	29	ミトコンドリアゲノム	59
scaffold3_cov128	30		

10

20

30

【0055】

また、クリプトコッカス・リクエファシエンスN6株のmRNA-seqも行った。具体的には、培養したクリプトコッカス・リクエファシエンスN6株からmRNAを抽出し、シーケンス用ライブラリを調製した。ライブラリの調製には、市販のキット（型式「KAPAStranded mRNA-Seq Kit」、KAPABIOSYSTEMS社）を用いた。

40

【0056】

続いて、調製したライブラリを次世代シーケンサー（型式「Miseq」、イルミナ社）に供し、300塩基ずつのペアエンドシーケンスを行った。

【0057】

[実験例2]

（クリプトコッカス・リクエファシエンスにおけるBRCA2ホモログの同定）

実験例1で決定した、クリプトコッカス・リクエファシエンスのゲノムDNAの塩基配列から予想されるタンパク質のアミノ酸配列に対して、相同性検索を行い、ヒトBRCA2タンパク質のホモログを探索した。その結果、ヒトBRCA2タンパク質に相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子を見出し、BRH2遺伝子と命名した。

50

【 0 0 5 8 】

ヒト B R C A 2 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 6 0 に示す。また、クリプトコッカス・リクエファシエンスの B R H 2 遺伝子の塩基配列を配列番号 6 1 に示し、B r h 2 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 6 2 に示す。また、ウスチラゴ・メイディスの B R C A 2 ホモログ（以下、「B R H 2 遺伝子」又は「B r h 2 タンパク質」という。）の塩基配列を配列番号 6 3 に示し、アミノ酸配列を配列番号 6 4 に示す。

【 0 0 5 9 】

図 1 (a) は、ヒト B R C A 2 タンパク質、ウスチラゴ・メイディス B r h 2 タンパク質及びクリプトコッカス・リクエファシエンス B r h 2 タンパク質の構造を示す模式図である。ヒト B R C A 2 タンパク質は B R C リピートと呼ばれるモチーフと C C R と呼ばれるモチーフを有することが知られている。図 1 (a) において、黒いボックスで各タンパク質における B R C リピートを示し、灰色のボックスで C C R を示す。

10

【 0 0 6 0 】

また、図 1 (a) 中、「H s B R C A 2」はヒト B R C A 2 タンパク質を示し、「U m B r h 2」はウスチラゴ・メイディス B r h 2 タンパク質を示し、「C l B r h 2」はクリプトコッカス・リクエファシエンス B r h 2 タンパク質を示す。

【 0 0 6 1 】

また、図 1 (b) は、ヒト B R C A 2 タンパク質の第 4 番目の B R C リピートとクリプトコッカス・リクエファシエンス B r h 2 タンパク質の第 1 番目の B R C リピート、及び、ヒト B R C A 2 タンパク質の第 7 番目の B R C リピートとクリプトコッカス・リクエファシエンス B r h 2 タンパク質の第 2 番目の B R C リピートのアミノ酸配列を、それぞれアライメントした図である。

20

【 0 0 6 2 】

図 1 (b) 中、「H s B R C 4」はヒト B R C A 2 タンパク質の第 4 番目の B R C リピートを示し、「H s B R C 7」はヒト B R C A 2 タンパク質の第 7 番目の B R C リピートを示し、「C l B R C 1」はクリプトコッカス・リクエファシエンス B r h 2 タンパク質の第 1 番目の B R C リピートを示し、「C l B R C 2」はクリプトコッカス・リクエファシエンス B r h 2 タンパク質の第 2 番目の B R C リピートを示す。また、図 1 (b) 中、黒いボックスは一致したアミノ酸を示し、灰色のボックスは性質の類似したアミノ酸を示す。

30

【 0 0 6 3 】

また、図 1 (c) は、ヒト B R C A 2 タンパク質の C C R、ウスチラゴ・メイディス B r h 2 タンパク質の C C R 及びクリプトコッカス・リクエファシエンス B r h 2 タンパク質の C C R のアミノ酸配列を、それぞれアライメントした図である。

【 0 0 6 4 】

図 1 (c) 中、「H s C C R」はヒト B R C A 2 タンパク質の C C R を示し、「U m C C R」はウスチラゴ・メイディス B r h 2 タンパク質の C C R を示し、「C l C C R」はクリプトコッカス・リクエファシエンス B r h 2 タンパク質の C C R を示す。また、図 1 (c) 中、黒いボックスは一致したアミノ酸を示し、灰色のボックスは性質の類似したアミノ酸を示す。

40

【 0 0 6 5 】

[実験例 3]

(クリプトコッカス・リクエファシエンスにおける P A R P ホモログの同定)

実験例 1 で決定した、クリプトコッカス・リクエファシエンスのゲノム DNA の塩基配列から予想されるタンパク質のアミノ酸配列に対して、相同性検索を行い、ヒト P A R P タンパク質のホモログを探索した。その結果、ヒト P A R P タンパク質に相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子を見出した。

【 0 0 6 6 】

ヒト P A R P 1 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 6 5 に示す。また、クリプトコッカス・リクエファシエンスの P A R P 遺伝子の塩基配列を配列番号 6 6 に示し、P a r p

50

タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 67 に示す。

【0067】

図2(a)は、ヒトPARP1タンパク質及びクリプトコッカス・リクエファシエンスParpタンパク質の構造を示す模式図である。ヒトPARP1タンパク質はZincフィンガーモチーフとポリメラーゼの活性中心領域(HYE配列)を有することが知られている。図2(a)中、「Hs PARP1」はヒトPARP1タンパク質を示し、「Cl Parp」はクリプトコッカス・リクエファシエンスParpタンパク質を示す。また、黒いボックスで各タンパク質におけるZincフィンガーモチーフを示し、灰色のボックスでHYE配列を示す。

【0068】

図2(b)は、クリプトコッカス・リクエファシエンスParpタンパク質のアミノ酸配列である。図2(b)において、黒いボックスはZincフィンガーモチーフに存在するアミノ酸残基を示し、灰色のボックスはHYE配列中の特徴的なアミノ酸残基を示す。具体的には、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)の結合に重要なアミノ酸残基であるヒスチジン(H)及びチロシン(Y)、並びにポリメラーゼ活性に重要なアミノ酸残基であるグルタミン酸(E)を示す。また、四角で囲んだアミノ酸配列は、推測される核移行シグナルである。

【0069】

[実験例4]

(クリプトコッカス・リクエファシエンスにおけるRAD51ホモログの同定)

実験例1で決定した、クリプトコッカス・リクエファシエンスのゲノムDNAの塩基配列から予想されるタンパク質のアミノ酸配列に対して、相同性検索を行い、ヒトRAD51タンパク質のホモログを探索した。その結果、ヒトRAD51タンパク質に相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子を見出した。

【0070】

ヒトRAD51タンパク質のアミノ酸配列を配列番号68に示す。また、クリプトコッカス・リクエファシエンスのRAD51遺伝子の塩基配列を配列番号69に示し、Rad51タンパク質のアミノ酸配列を配列番号70に示す。

【0071】

[実験例5]

(クリプトコッカス・リクエファシエンスの形質転換技術の確立)

まず、酵母の遺伝学で広く使用されている薬剤である、ノーセオスリシン(Nourseothricin、NAT)、ネオマイシン(Neomycin、Neo)及びハイグロマイシン(hygroscopicin、Hyg)を、クリプトコッカス・リクエファシエンスにおける選択マーカーとして使用するため、各薬剤に対する耐性遺伝子の発現プラスミドを作製した。

【0072】

具体的には、各薬剤に対して耐性となるタンパク質をコードする遺伝子である、NAT耐性遺伝子、Neo耐性遺伝子及びHyg耐性遺伝子のコーディング領域に、クリプトコッカス・リクエファシエンスのTEF1プロモーター及びURA5ターミネーターをそれぞれ連結した発現プラスミドを作製した。以下、NAT耐性遺伝子の発現プラスミドを「pBS-NAT」といい、Neo耐性遺伝子の発現プラスミドを「pBS-Neo」といい、Hyg耐性遺伝子の発現プラスミドを「pBS-Hyg」という。

【0073】

クリプトコッカス・リクエファシエンスのTEF1プロモーターは、クリプトコッカス・リクエファシエンスのゲノムDNAを鋳型に用いたPCRにより調製した。pBS-NAT用のTEF1プロモーターは、プライマーPmp1(配列番号71)及びプライマーPmp2(配列番号72)を用いたPCRにより調製した。また、pBS-Neo用のTEF1プロモーターは、プライマーPmp1(配列番号71)及びプライマーPmp7(配列番号77)を用いたPCRにより調製した。また、pBS-Hyg用のTEF1プロ

10

20

30

40

50

モーターは、プライマー Pmp1 (配列番号71) 及びプライマー Pmp11 (配列番号81) を用いた PCR により調製した。

【0074】

また、クリプトコッカス・リクエファシエンスの URA5 ターミネーターも、クリプトコッカス・リクエファシエンスのゲノム DNA を鋳型に用いた PCR により調製した。pBS-NAT 用の URA5 ターミネーターは、プライマー Pmp5 (配列番号75) 及びプライマー Pmp6 (配列番号76) を用いた PCR により調製した。また、pBS-Neo 用の URA5 ターミネーターは、プライマー Pmp6 (配列番号76) 及びプライマー Pmp8 (配列番号78) を用いた PCR により調製した。pBS-Hyg 用の URA5 ターミネーターは、プライマー Pmp6 (配列番号76) 及びプライマー Pmp12 (配列番号82) を用いた PCR により調製した。

10

【0075】

また、NAT 耐性遺伝子は、プラスミド pFA6a-NAT (英国サセックス大学の Antony M. Carr 博士より分与して頂いた。) を鋳型として、プライマー Pmp3 (配列番号73) 及びプライマー Pmp4 (配列番号74) を用いた PCR により調製した。また、Neo 耐性遺伝子は、プラスミド pCDNA3 (サーモフィッシュサイエンティフィック社) を鋳型として、プライマー Pmp9 (配列番号79) 及びプライマー Pmp10 (配列番号80) を用いた PCR により調製した。また、Hyg 耐性遺伝子は、プラスミド pFA6a-hphMX6 (英国サセックス大学の Antony M. Carr 博士より分与して頂いた。) を鋳型として、プライマー Pmp13 (配列番号83) 及びプライマー Pmp14 (配列番号84) を用いた PCR により調製した。

20

【0076】

下記表5に、pBS-NAT、pBS-Neo 及び pBS-Hyg の作製に用いたプライマーの塩基配列を示す。

【0077】

【表4】

名称	配列番号	塩基配列
Pmp1	71	ACCTCTAGATGTACCAAGAGACGACGAGTC
Pmp2	72	CGTCAAGAGTGGTACCCATTTTGTAGGTTTTTGT
Pmp3	73	AAAAACCTAACAAAATGGGTACCACTCTTGACGAC
Pmp4	74	ATCCCAATCTTTCTTTTAGGGGCAGGGCATGCTC
Pmp5	75	TGCCCTGCCCTAAAAGAAAGATTGGGGATGGGGA
Pmp6	76	ACCGGATCCGGGTCAAGTCTCGTTTCTCCAAC
Pmp7	77	ATCCATCTTGTTCAATCATTTTGTAGGTTTTTGT
Pmp8	78	ACGAGTTCTTCTGAAAGAAAGATTGGGGATGGGGA
Pmp9	79	AAAAACCTAACAAAATGATTGAACAAGATGGATTG
Pmp10	80	TCCCAATCTTTCTTTTCAGAAGAACTCGTCAAGAA
Pmp11	81	GTTCAAGCTTTTTACCCATTTTGTAGGTTTTTGT
Pmp12	82	CCGAGGGCAAAGGAATAAAAGAAAGATTGGGGATG
Pmp13	83	ACCTAACAAAATGGGTAAGCCTGAAGTCAACC
Pmp14	84	ATCCCAATCTTTCTTTTATTCCTTTGCCCTCGGA

30

40

【0078】

続いて、TEF1 プロモーター、各薬剤耐性遺伝子、URA5 ターミネーターを、それぞれフュージョン PCR で連結し、pBluescriptII SK (+) (アジレント・テクノロジー社) の XbaI、BamHI サイトにクローニングし、pBS-NAT、pBS-Neo、pBS-Hyg の各発現プラスミドを作製した。

【0079】

また、条件検討を行った結果、クリプトコッカス・リクエファシエンスへの遺伝子導入

50

は電気穿孔法で行い、遺伝子導入条件は次の通りとした。まず、クリプトコッカス・リクエファシエンスを指数増殖期まで培養し、 $3, 500 \times g$ で5分間遠心して集菌した。続いて、菌体をEBバッファー(10 mM Tris-HCl、pH 7.5、1 mM MgCl₂、270 mMスクロース)で2回洗浄し、4 mMジチオトレイトール(DTT)を含むEBバッファーで懸濁した。続いて、菌体を氷上で15分静置後、EBバッファーで更に一回洗浄し、EBバッファーに再度懸濁した。

【0080】

1回の形質転換あたり、 1.5×10^8 個の細胞に3 μ gのDNAを加え、0.2 cmのキュベットにセットし、エレクトロポレーションシステム(型式「ジーンパルサー」、バイオラッド社)を用いて、0.6 kV、125 μ F、1000 の条件でパルス処理を行った。続いて、パルス処理した細胞を2 mLの完全培地に懸濁し、30 で2~3時間培養した後、適切な選択培地上に播種し、30 で形質転換体が現れるまで3日間ほど培養した。

10

【0081】

また、条件検討を行った結果、クリプトコッカス・リクエファシエンスの完全培地での薬剤耐性菌は以下の条件で選択した。すなわち、ノーセオスリシン耐性菌は100 μ g/mLのノーセオスリシンの存在下で選択した。また、ネオマイシン耐性菌は50 μ g/mLのG418の存在下で選択した。また、ハイグロマイシン耐性菌は40 μ g/mLのハイグロマイシンの存在下で選択した。

20

【0082】

[実験例6]

(クリプトコッカス・リクエファシエンスのBRH2遺伝子破壊株の作製)

スプリットマーカ法を用いて、クリプトコッカス・リクエファシエンスのBRH2遺伝子破壊株を作製した。

【0083】

まず、実験例1で決定した、クリプトコッカス・リクエファシエンスのゲノムDNAの塩基配列に基づいて、クリプトコッカス・リクエファシエンスのBRH2遺伝子座の上流50 bp(以下、「left配列」という場合がある。)及び下流50 bp(以下、「right配列」という場合がある。)のゲノムDNAの塩基配列を特定した。

30

【0084】

続いて、実験例5で作製したpBS-NATの、TEF1プロモーター-NAT耐性遺伝子-URA5ターミネーターを含む領域を増幅できる塩基配列のペア(TATCTGGCTCGATCGCAGCG(配列番号85)、CCCATCCCAATCTTTCTT(配列番号86))のそれぞれの5'末端に、上記のleft配列、right配列を付加した塩基配列を有するオリゴDNAを合成した。

【0085】

続いて、pBS-NATを鋳型とし、合成したオリゴDNAのペアをプライマーに用いたPCRにより、left配列-TEF1プロモーター-NAT耐性遺伝子-URA5ターミネーター-right配列の塩基配列を有するDNA断片を調製した。

40

【0086】

続いて、スプリットマーカ法に用いる2種類のDNA断片を調製した。図3(a)は、スプリットマーカ法によりクリプトコッカス・リクエファシエンスのBRH2遺伝子を破壊した手順を説明する模式図である。図3(a)中、「left」はleft配列を示し、「right」はright配列を示し、「TEF1」はTEF1プロモーターを示し、「NAT」はNAT耐性遺伝子を示し、「BRH2」はBRH2遺伝子を示す。図3(a)において、URA5ターミネーターは図示されていない。

【0087】

スプリットマーカ法では、2種類のDNA断片をクリプトコッカス・リクエファシエンスに導入し形質転換する。一方のDNA断片は、left配列-TEF1プロモーター-NAT耐性遺伝子の5'側の塩基配列を有しており、NAT耐性遺伝子の3'側は欠失

50

していた。他方のDNA断片は、上記1方のDNA断片のNAT耐性遺伝子と約400bp重複した、NAT耐性遺伝子の3'側-Ura5ターミネーター-right配列の塩基配列を有しており、NAT耐性遺伝子の5'側は欠失していた。

【0088】

これらの2種類のDNA断片をクリプトコッカス・リクエファシエンスに導入して形質転換し、NAT耐性株を取得することにより、BRH2遺伝子破壊株を得た。

【0089】

[実験例7]

(クリプトコッカス・リクエファシエンスのPARP遺伝子破壊株の作製)

left配列及びright配列として、クリプトコッカス・リクエファシエンスのPARP遺伝子座の上流50bp及び下流50bpのゲノムDNAの塩基配列をそれぞれ用いた点以外は、実験例6と同様にして、クリプトコッカス・リクエファシエンスのPARP遺伝子破壊株を作製した。

【0090】

図3(b)は、スプリットマーカ法によりクリプトコッカス・リクエファシエンスのPARP遺伝子を破壊した手順を説明する模式図である。図3(b)中、「left」はleft配列を示し、「right」はright配列を示し、「TEF1」はTEF1プロモーターを示し、「NAT」はNAT耐性遺伝子を示し、「PARP」はPARP遺伝子を示す。図3(b)において、URA5ターミネーターは図示されていない。

【0091】

[実験例8]

(クリプトコッカス・リクエファシエンスのRAD51遺伝子破壊株の作製)

left配列及びright配列として、クリプトコッカス・リクエファシエンスのRAD51遺伝子座の上流50bp及び下流50bpのゲノムDNAの塩基配列をそれぞれ用いた点以外は、実験例6と同様にして、クリプトコッカス・リクエファシエンスのRAD51遺伝子破壊株を作製した。

【0092】

図3(c)は、スプリットマーカ法によりクリプトコッカス・リクエファシエンスのRAD51遺伝子を破壊した手順を説明する模式図である。図3(c)中、「left」はleft配列を示し、「right」はright配列を示し、「TEF1」はTEF1プロモーターを示し、「NAT」はNAT耐性遺伝子を示し、「RAD51」はRAD51遺伝子を示す。図3(c)において、URA5ターミネーターは図示されていない。

【0093】

[実験例9]

(紫外線感受性の検討)

実験例6、7、8でそれぞれ作製した、クリプトコッカス・リクエファシエンスのBRH2遺伝子破壊株、PARP遺伝子破壊株及びRAD51遺伝子破壊株の紫外線感受性を検討した。

【0094】

まず、各遺伝子破壊株を液体完全培地で一晚培養し、10倍毎の希釈系列を作製した。続いて、寒天培地上に、各遺伝子破壊株の希釈系列をスポットした。続いて、紫外線ランプ(型式「GL15」、東芝ライフテック社)を用いて300J/m²の紫外線を照射した。続いて、30で3日間培養し、スポットを観察した。また、比較のために、野生型のクリプトコッカス・リクエファシエンスについても同様の実験を行った。

【0095】

図4(a)は、対照として、紫外線照射を行わなかった点以外は、同様の操作を行ったクリプトコッカス・リクエファシエンスのスポットの写真である。図4(b)は、紫外線照射を行ったクリプトコッカス・リクエファシエンスのスポットの写真である。

【0096】

図4(a)及び(b)中、「WT」は野生型のクリプトコッカス・リクエファシエンス

10

20

30

40

50

を示し、「RAD51」はRAD51遺伝子破壊株を示し、「BRH2」はBRH2遺伝子破壊株を示し、「PARP」はPARP遺伝子破壊株を示す。

【0097】

その結果、BRH2遺伝子、PARP遺伝子、RAD51遺伝子のいずれの破壊株も紫外線照射によるDNA傷害に感受性を示すことが明らかとなった。この結果は、クリプトコッカス・リクエファシエンスを、ヒトBRCA2遺伝子、ヒトPARP遺伝子、ヒトRAD51遺伝子の機能解析を行うモデル生物として使用することができることを示す。

[実験例10]

(抗癌剤感受性の検討)

実験例6、7、8でそれぞれ作製した、クリプトコッカス・リクエファシエンスのBRH2遺伝子破壊株、PARP遺伝子破壊株及びRAD51遺伝子破壊株の抗癌剤に対する感受性を検討した。抗癌剤としては、ブレオマイシン及びフィレオマイシンを使用した。

10

【0098】

まず、各遺伝子破壊株を液体完全培地で一晚培養し、10倍毎の希釈系列を作製した。続いて、各希釈系列に終濃度0.5µU/mLのブレオマイシン又は終濃度1.5µg/mLのフィレオマイシンをそれぞれ添加し、寒天培地上にスポットした。続いて、30で3日間培養し、スポットを観察した。また、比較のために、野生型のクリプトコッカス・リクエファシエンスについても同様の実験を行った。

【0099】

図4(a)は、対照として、抗癌剤に暴露しなかった点以外は、同様の操作を行ったクリプトコッカス・リクエファシエンスのスポットの写真である。図4(c)は、ブレオマイシンに暴露したクリプトコッカス・リクエファシエンスのスポットの写真である。図4(d)は、フィレオマイシンに暴露したクリプトコッカス・リクエファシエンスのスポットの写真である。

20

【0100】

図4(a)、(c)及び(d)中、「WT」は野生型のクリプトコッカス・リクエファシエンスを示し、「Rad51」はRAD51遺伝子破壊株を示し、「Brh2」はBRH2遺伝子破壊株を示し、「Parp」はPARP遺伝子破壊株を示す。

【0101】

その結果、BRH2遺伝子、PARP遺伝子、RAD51遺伝子のいずれの破壊株もブレオマイシン及びフィレオマイシンに感受性を示すことが明らかとなった。この結果は、クリプトコッカス・リクエファシエンスを、ヒトBRCA2遺伝子、ヒトPARP遺伝子、ヒトRAD51遺伝子の機能解析を行うモデル生物として使用することができることを更に支持するものである。

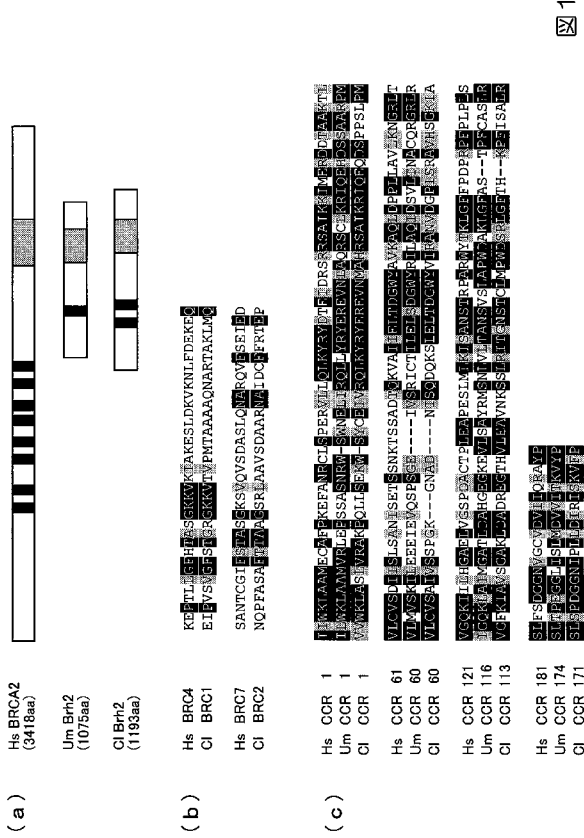
30

【産業上の利用可能性】

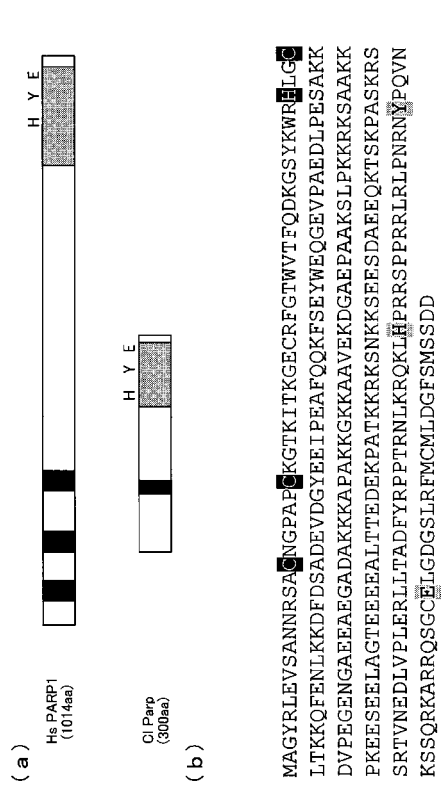
【0102】

本発明によれば、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬をスクリーニングする技術を提供することができる。

【 図 1 】

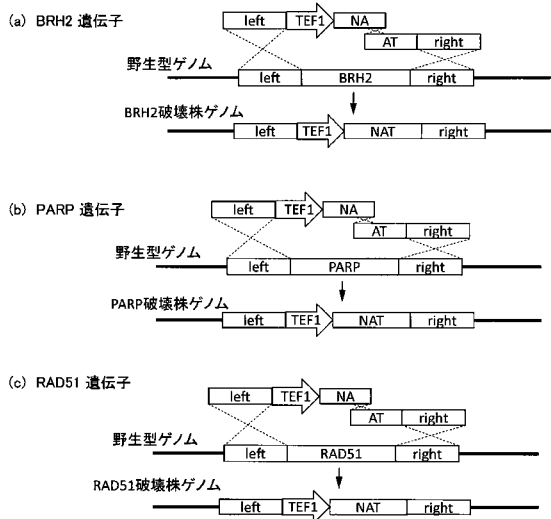


【 図 2 】



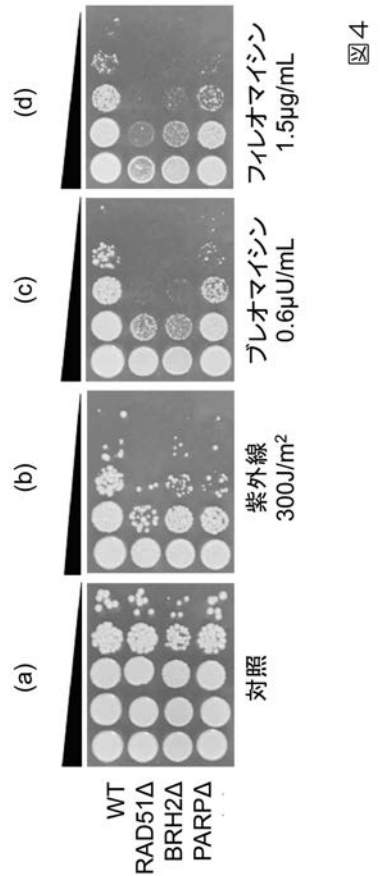
【 図 2 】

【 図 3 】



【 図 3 】

【 図 4 】



【 図 4 】

【配列表】

2019184500000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31
A 6 1 K	31/502 (2006.01)	A 6 1 K	31/502
C 0 7 D	237/32 (2006.01)	C 0 7 D	237/32

- (72)発明者 岩 崎 博史
東京都目黒区大岡山 2 丁目 1 2 番 1 号 国立大学法人東京工業大学内
- (72)発明者 坪内 英生
東京都目黒区大岡山 2 丁目 1 2 番 1 号 国立大学法人東京工業大学内
- (72)発明者 伊藤 武彦
東京都目黒区大岡山 2 丁目 1 2 番 1 号 国立大学法人東京工業大学内
- (72)発明者 梶谷 嶺
東京都目黒区大岡山 2 丁目 1 2 番 1 号 国立大学法人東京工業大学内
- (72)発明者 バリハッティ マルダン
東京都目黒区大岡山 2 丁目 1 2 番 1 号 国立大学法人東京工業大学内
- (72)発明者 韓 龍雲
東京都目黒区大岡山 2 丁目 1 2 番 1 号 国立大学法人東京工業大学内

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB21 DA13 DA36 GC30
4B063 QA01 QA06 QQ91 QR76
4C084 AA17 AA19 NA05 NA14 ZA81 ZB26
4C086 AA01 BC50 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA81 ZB26