

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00809228.1

C07K 14/47
C12N 15/12 C12N 1/21
C12N 5/10 C12P 21/02
A61K 38/17 A61K 48/00
C07K 16/18 A61K 39/395
G01N 33/50 G01N 33/53
G01N 33/574 G01N 33/577
[11]公开号 CN 1364172A

[43]公开日 2002年8月14日

[22]申请日 2000.4.26 [21]申请号 00809228.1

[30]优先权

[32]1999.4.27 [33]JP [31]120266/99

[86]国际申请 PCT/JP00/02727 2000.4.26

[87]国际公布 WO00/64933 日 2000.11.2

[85]进入国家阶段日期 2001.12.20

[71]申请人 协和发酵工业株式会社

地址 日本东京都

[72]发明人 秋山彻 中村勉 多胡贤一

[74]专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 黄益芬

权利要求书2页 说明书50页 附图页数6页

[54]发明名称 转录激活抑制蛋白

[57]摘要

本发明提供了一种蛋白质,其能与β-连环蛋白结合,因而能抑制转录激活,所述转录激活是由β-连环蛋白与属于TCE/Lef家族的蛋白质形成复合物而诱导的,本发明还涉及编码该蛋白质的DNA,识别该蛋白质的抗体,含有所述蛋白质或DNA的治疗剂,和含有所述抗体的诊断试剂。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

- 1.一种蛋白质，其具有与 β -连环蛋白结合并抑制转录激活的活性，所述转录激活是由 β -连环蛋白与属于 TCF/Lef 家族的蛋白质形成复合物而诱导的。
- 2.权利要求 1 的蛋白质，其中该蛋白质含有 SEQ ID NO:2 或 4 的氨基酸序列。
- 3.一种蛋白质，其含有 SEQ ID NO:2 或 4 的氨基酸序列且其中一个或多个氨基酸被添加，缺失或取代，所述蛋白质具有与 β -连环蛋白结合并抑制转录激活的活性，所述转录激活是由 β -连环蛋白与属于 TCF/Lef 家族的蛋白质形成复合物而诱导的。
- 4.编码权利要求 1 至 3 中任一项所述蛋白质的 DNA。
- 5.一种 DNA，其含有选自根据 SEQ ID NO:1, 3, 5 和 6 的核苷酸序列的核苷酸序列。
- 6.一种 DNA，其在严紧条件下能与权利要求 4 或 5 的 DNA 杂交，并且能编码一种蛋白质，所述蛋白质具有与 β -连环蛋白结合并抑制转录激活的活性，所述转录激活是由 β -连环蛋白与属于 TCF/Lef 家族的蛋白质形成复合物而诱导的。
- 7.重组 DNA，所述 DNA 可通过将权利要求 4 至 6 中任一项所述 DNA 插入载体而得到。
- 8.含有权利要求 7 所述重组 DNA 的转化子。
- 9.生产权利要求 1 至 3 中任一项所述蛋白质的方法，其中所述方法包括以下步骤：在培养基中培养权利要求 8 所述的转化子，在培养中产生并积累权利要求 1 至 3 中任一项所述的蛋白质，从培养物中回收蛋白质。
- 10.癌症治疗剂，其中所述治疗剂含有权利要求 1 至 3 中任一项所述的蛋白质作为有效成分。
- 11.癌症治疗剂，其中所述治疗剂含有权利要求 4 至 6 中任一项所述的 DNA 作为有效成分。
- 12.用于癌症基因治疗的载体，其中所述载体含有权利要求 4 至 6 中任一项所述的 DNA。

13.含有权利要求 4 至 6 中任一项所述 DNA 的核苷酸序列中连续 5 至 60 个残基组成的核苷酸序列的寡核苷酸，含有该寡核苷酸序列的互补序列的寡核苷酸，或这些寡核苷酸的衍生物。

5 14.癌症诊断试剂，其中所述诊断试剂含有权利要求 13 所述的寡核苷酸作为有效成分。

15.能识别权利要求 1 至 3 中任一项所述蛋白质的抗体。

16.免疫检测权利要求 1 至 3 中任一项所述蛋白质的方法，其中所述方法利用了权利要求 15 所述的抗体。

10 17.免疫定量权利要求 1 至 3 中任一项所述蛋白质的方法，其中所述方法利用了权利要求 15 所述的抗体。

18.癌症诊断试剂，其中所述诊断试剂含有权利要求 15 所述的抗体作为有效成分。

19.权利要求 10 或 11 所述的治疗剂，其中所述癌症是结肠癌。

20.权利要求 12 所述的载体，其中所述癌症是结肠癌。

15 21.权利要求 18 所述的诊断试剂，其中所述癌症是结肠癌。

说明书

转录激活抑制蛋白

5

技术领域

本发明涉及一种蛋白质，其具有与 β -连环蛋白结合并抑制转录激活的活性，所述转录激活是由 β -连环蛋白与属于 TCF/Lef 家族的蛋白质形成复合物而诱导的，本发明还涉及编码该蛋白质的 DNA，识别该蛋白质的抗体，含有所述蛋白质或 DNA 的治疗剂，和含有所述抗体的诊断试剂。

10

背景技术

本文使用下列缩写：

AD: 转录激活结构域

ADH: 醇脱氢酶

15

APC: 结肠腺癌(adenomatous poliposis coli)

BD: DNA-结合结构域

β -连环蛋白/TCF-4: β -连环蛋白和 TCF-4 的复合物

DCC: 结直肠癌中的缺失

dhfr: 二氢叶酸还原酶

20

DLG: Drosophila Discs Large

DMSO: 二甲亚砜

EDTA: 乙二胺四乙酸

ELISA: 酶联免疫吸附试验

EST: 表达序列标签

25

FAP: 家族性结肠腺癌

FCS: 胎牛血清

FITC: 异硫氰酸荧光素

GST: 谷胱甘肽 S-转移酶

GST/ICAT: GST 和 ICAT 的融合蛋白

30

GSK-3 β : 糖原合酶激酶-3 β

ICAT: β -连环蛋白和 TCF 的抑制剂

IPTG: 异丙基硫代半乳糖苷
KLH: 匙孔血蓝蛋白(Keyhole limpet hemocyanin)

Lef: 淋巴细胞增强子-结合因子

LTR: 长末端重复序列

5 MBS: 间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羧基琥珀酰亚胺

MEM: 极限必需培养基

PCR: 聚合酶链反应

PEG: 聚乙二醇

RITC: 异硫氰酸罗丹明

10 SDS: 十二烷基硫酸钠

SDS-PAGE: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

TCF: T 细胞因子

Tris: 三(羟甲基)氨基甲烷

X-gal: 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷

15 已分离到作为 FAP 致病基因的 APC 基因(Kinzler 和 Vogelstein, 细胞, 87, 159(1996))。然而, 据报道, 不仅可在 FAP 中观察到 APC 基因异常, 也可在 70 至 80% 的偶发性结肠癌病例中观察到 APC 基因异常。据认为, 结肠癌的发生是由很多基因的连续突变引起的, 所述基因包括 K-ras, p53, DCC 等, 也包括 APC。与其它基因相比, APC 基因中的突变发生得最早, 因此, 20 据信 APC 基因的异常是结肠癌发生的主要事件。

为了阐明与 APC 基因异常相关的癌症发生机制, 必须测定基因产物 APC 蛋白的功能。据报道, 大小约为 300kDa 的 APC 蛋白与细胞中的 β -连环蛋白, 糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)以及 DLG 结合(Rubinfeld 等, 科学, 262, 1731(1993); Su 等, 科学, 262, 1734(1993); Rubinfeld 等, 科学, 272, 25 1023(1996); Matsumine 等, 科学, 272, 1020(1996))。关于 APC 蛋白的功能, 据报道, 当在具有 APC 基因突变的结肠癌细胞系 SW480 中表达野生型 APC 蛋白时, β -连环蛋白的水平快速降低(Munemitsu 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 3046(1995))。含有 7 个重复结构的中心区域是 APC 蛋白的功能所必需的, 该区域与很多结肠癌病例中存在有突变的区域一致。另外, 据报 30 道在这些结肠癌细胞中, β -连环蛋白水平升高(Munemitsu 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 3046(1995); Rubinfeld 等, 癌症研究, 57, 4624(1997))。

另外，还已知 β -连环蛋白是细胞粘着分子钙粘着蛋白的膜-骨架蛋白，据报道，它还参与下述 Wnt 蛋白的信号转导(Cadigan & Nusse, Genes Dev., 11, 3286(1997))。Wnt 基因是一个大基因家族，其成员在动物早期胚胎发生和形态发生过程中具有多种功能；在小鼠中，该家族由约 20 种基因组成，这些基因在多种动物中是保守的，所述动物包括非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)，果蝇(*Drosophila melanogaster*)和线虫(*Caenorhabditis elegans*)。当 Wnt 蛋白结合受体 Frizzled 时，通过细胞内信号分子 Dishvelled(Dsh)抑制糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)活性。由于 GSK-3 β 介导的 β -连环蛋白磷酸化导致 β -连环蛋白降解，因此，抑制 GSK-3 β 活性可导致细胞中积累 β -连环蛋白。 β -连环蛋白结合属于转录因子 Lef/TCF 家族的蛋白以形成复合物，从而将属于 Lef/TCF 家族的蛋白激活为转录因子。因此， β -连环蛋白的积累导致 β -连环蛋白/TCF 复合物的形成，所述复合物转运至核中，从而刺激靶基因的转录。在属于 Lef/TCF 家族的蛋白中，TCf-4 在结肠上皮细胞中特异性表达，因此，据信在结肠癌中， β -连环蛋白主要与 TCf-4 形成复合物(Korinek 等，科学，275, 1784(1997))。另外，据报道在有些结肠癌细胞和黑素瘤细胞中，APC 基因为野生型，但 β -连环蛋白基因具有突变，且不受 GSK-3 β 调节(Morin 等，科学，275, 1787(1997); Rubinfeld 等，科学，275, 1790 (1997))。据估计，在这些细胞中， β -连环蛋白不断积累，导致由 β -连环蛋白/TCF 复合物引起的转录激活。

根据上述发现， β -连环蛋白在结肠癌的发生中起着举足轻重的作用。因此，可将能通过 β -连环蛋白结合而抑制其功能的物质与结肠癌的发生相联系，这预示着该物质可用于治疗，诊断结肠癌。最近发现能结合 β -连环蛋白的蛋白质分子是 Axin，Axin 能负调节 Wnt 的信号转导(Zeng 等，细胞，90, 181(1997))。Axin 与 GSK-3 β 结合，从而刺激 β -连环蛋白的磷酸化(Ikeda 等，EMBO J., 17, 1371(1998))。另外，据报道，Axin 也结合 APC 和 β -连环蛋白以刺激 β -连环蛋白的降解，进而降低细胞中的 β -连环蛋白水平(Kishida 等，生物化学杂志，273, 10823(1998); Rubinfeld 等，当代生物学，8, 573(1998); Nakamura 等，Genes to Cells, 3, 395(1998))。然而，目前已知的蛋白质无一能与 β -连环蛋白结合，并直接影响 β -连环蛋白/TCF 复合物作为转录因子的活性。

发明内容

本发明的目的是：提供一种能通过结合 β -连环蛋白来调节 β -连环蛋白/TCF复合物所致转录激活的蛋白质，编码该蛋白质的DNA，识别该蛋白质的抗体，含有所述蛋白质或DNA的治疗剂，和含有所述抗体的诊断试剂，
5 它们都可用于治疗和诊断癌症。

本发明涉及下列主题(1)至(21):

(1)一种蛋白质，其具有与 β -连环蛋白结合并抑制转录激活的活性，所述转录激活是由 β -连环蛋白与属于TCF/Lef家族的蛋白质形成复合物而诱导的；

10 (2)(1)所述的蛋白质，其中蛋白质含有SEQ ID NO:2或4的氨基酸序列；

(3)一种蛋白质，其含有SEQ ID NO:2或4的氨基酸序列，其中一个或多个氨基酸被添加，缺失或取代，所述蛋白质具有与 β -连环蛋白结合并抑制转录激活的活性，所述转录激活是由 β -连环蛋白与属于TCF/Lef家族的蛋白质形成复合物而诱导的；

15 通过按核酸研究，10, 6487(1982); Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982); 基因, 34, 315(1985); 核酸研究, 13, 4431(1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 488(1985)等所述，经定点诱变在编码含有SEQ ID NO:2或4之氨基酸序列的蛋白质的DNA中导入定点突变，即可实现上述氨基酸缺失，取代或添加。

20 (4)编码(1)至(3)中任一项所述蛋白质的DNA；

(5)一种DNA，其含有选自SEQ ID NO:1, 3, 5和6的核苷酸序列；

(6)一种DNA，其在严紧条件下能与(4)或(5)的DNA杂交，并且能编码一种蛋白质，所述蛋白质具有与 β -连环蛋白结合并抑制转录激活的活性，所述转录激活是由 β -连环蛋白与属于TCF/Lef家族的蛋白质形成复合物而诱导的。
25

上述的“在严紧条件下能与(4)或(5)的DNA杂交，并且能编码一种蛋白质(所述蛋白质具有与 β -连环蛋白结合并抑制转录激活的活性，所述转录激活是由 β -连环蛋白与属于TCF/Lef家族的蛋白质形成复合物而诱导)的DNA”指的是：将具有SEQ ID NO:1或3的核苷酸序列的DNA用作探针，
30 经菌落杂交，噬斑杂交，Southern印迹杂交等方法可以获得的DNA。具体地说，所述DNA包括可通过下列方法鉴定的DNA，所述方法为在65°C，

0.7 至 1.0mol/L NaCl 的存在下, 使用其上固定有得自菌落或噬斑的 DNA 的滤膜进行杂交, 然后在 65°C 的条件下, 用 0.1x 至 2xSSC(柠檬酸钠盐水)溶液[1xSSC 溶液(150mmol/L NaCl, 15mmol/L 柠檬酸钠); nX 指的是 n 倍于此溶液浓度]洗涤滤膜。可根据任何实验手册中所述的方法进行杂交, 所述实验手册如 J. Sambrook 等, “分子克隆, 实验室手册, 第 2 版”, 冷泉港实验室出版社(1989); F. M. Frederick 等, “最新分子生物学方法, 附录 1-38”, John Wiley & Sons(1987-1997); D. M. Glover 和 B. D. Hames “DNA 克隆 1: 核心技术, 操作方法, 第 2 版”, 牛津大学出版社(1995)。

5 能杂交的 DNA 的具体例子包括: 与 SEQ ID NO:1 或 3 的核苷酸序列具有至少 80%或更高同源性的 DNA, 优选为具有 95%或更高同源性的 DNA, 此时, 同源性是通过 BLAST (分子生物学杂志, 215, 403(1990)), FASTA(酶学方法, 183, 63(1990))或类似方法计算出的。

(7)重组 DNA, 所述 DNA 是通过将(4)至(6)中任一项所述 DNA 插入载体而得到的;

15 (8)含有(7)所述重组 DNA 的转化子;

(9)生产(1)至(3)中任一项所述蛋白质的方法, 其中所述方法包括以下步骤: 在培养基中培养(8)所述的转化子, 在培养物中产生并积累(1)至(3)中任一项所述的蛋白质, 从培养物中回收蛋白质;

20 (10)癌症治疗剂, 其中治疗剂含有(1)至(3)中任一项所述的蛋白质作为有效成分;

(11)癌症治疗剂, 其中治疗剂含有(4)至(6)中任一项所述的 DNA 作为有效成分;

(12)用于癌症基因治疗的载体, 其中载体含有(4)至(6)中任一项所述的 DNA;

25 (13)含有由(4)至(6)中任一项所述 DNA 之核苷酸序列中的连续 5 至 60 个残基组成的核苷酸序列的寡核苷酸, 含有与该寡核苷酸序列互补之序列的寡核苷酸, 或这些寡核苷酸的衍生物;

(14)癌症诊断试剂, 其中诊断试剂含有(13)所述的寡核苷酸作为有效成分;

30 (15)能识别(1)至(3)中任一项所述蛋白质的抗体;

(16)免疫检测(1)至(3)中任一项所述蛋白质的方法,其中所述方法利用了(15)所述的抗体;

(17)免疫定量(1)至(3)中任一项所述蛋白质的方法,其中所述方法利用了(15)所述的抗体;

- 5 (18)癌症诊断试剂,其中诊断试剂含有(15)所述的抗体作为有效成分;
(19)(10)或(11)所述的治疗剂,其中癌症是结肠癌;
(20)(12)所述的载体,其中癌症是结肠癌;和
(21)(18)所述的诊断试剂,其中癌症是结肠癌。

10 以下将详细描述本发明。在下列描述中,本发明的蛋白质被称为“ β -
连环蛋白和 TCF 的抑制剂(以下简称为 ICAT)”,所述蛋白质具有与 β -
连环蛋白结合并抑制转录激活的活性,所述转录激活是由 β -连环蛋白与属于
TCF/Lef 家族的蛋白质形成复合物而诱导的。另外,将编码 ICAT 的 DNA
简称为 ICAT DNA。

15 1.制备 ICAT DNA

可通过酵母双-杂种体系(S. Fields 等,自然,340,245(1989)),由编码
ICAT 的 cDNA 获得 ICAT DNA。换句话说,ICAT cDNA 一般含有非翻译区
域,但本发明的 ICAT DNA 仅含有其编码区。可通过分析 ICAT cDNA 的核
20 苷酸序列将编码区测定为开放阅读框(ORF)区域(覆盖框内起始密码子至终
止密码子的区域)。

酵母双-杂种体系是检测目的蛋白质 X(在此方法中一般称其为“诱饵”)
和蛋白质 Y 之间的结合的方法,其中利用酵母转录因子 Z,例如在蛋白质
分开的区域内具有 DNA-结合结构域(BD)和转录激活结构域(AD)的 GAL4
完成检测。第一步制备的是用于在宿主酵母细胞中表达 X 和转录因子 Z 的
25 DNA-结合结构域的融合蛋白(以下称之为 BD-X)的质粒(诱饵质粒),和另一
种用于在宿主酵母细胞中表达 Y 和转录因子 Z 的转录激活结构域的融合蛋
白(以下称之为 AD-Y)的质粒。将这两种质粒导入宿主酵母细胞中以共表达
BD-X 和 AD-Y。所用宿主酵母是可在启动子的调节下表达报道基因的酵母,
其中通过转录因子 Z 与启动子的结合来实现转录激活。当蛋白质 Y 能与蛋
30 白质 X 结合时,BD-X 则能与 AD-Y 结合。由于所得复合物具有衍生自转录
因子 Z 的 DNA-结合结构域(BD)和转录激活结构域(AD),复合物与转录因子

Z 一样, 可导致报道基因的表达。因此, 通过使用报道基因的表达作为标记即可检测蛋白质 X 和 Y 之间的结合。当在这种情况下, 使用其中的每种 cDNA(而不仅仅是 Y)都能被表达成与 Z 的转录激活结构域的融合蛋白的 cDNA 文库来替代 AD-Y 表达质粒, 则可通过基于报道基因的表达筛选转化子来分离含有 cDNA 的转化子, 所述 cDNA 编码能与 X 结合的蛋白质 Y。此外, 通过从转化子中分离质粒, 可以克隆到所需的 cDNA。

下文将描述通过使用上述方法克隆 ICAT cDNA 的方案, 其中诱饵 X 是小鼠 β -连环蛋白的犹狻结构域(下文简称为 m β -连环蛋白臂区), 而转录因子 Z 是酵母 GAL4。

10 (1)制备诱饵质粒

在本发明中, 将 m β -连环蛋白臂区(对应于小鼠 β -连环蛋白的氨基酸序列 141 至 664)用作诱饵。为了制备诱饵质粒, 必须得到编码用作诱饵的 m β -连环蛋白臂区的 DNA(下文简称为 m β -连环蛋白臂区 DNA)。由于本领域技术人员已知小鼠 β -连环蛋白 DNA 的完整核苷酸序列和其中的小鼠 β -连环蛋白编码区(GenBank 登录号: M90364; 科学, 257, 1142(1992)), 因此, 可以容易地识别对应于 m β -连环蛋白臂区 DNA 的核苷酸序列。因此, 可通过下文所述的 RT-PCR 法(M. J. McPherson 等, “PCR, 操作方法”, 牛津大学出版社(1991))扩增和分离 m β -连环蛋白臂区 DNA。

具体地说, 从表达 β -连环蛋白的小鼠组织或细胞中分离 RNA; 由 RNA 合成 cDNA; 使用 cDNA 为模板, 并使用对应于 m β -连环蛋白臂区 DNA 核苷酸序列 5'末端的有义引物, 和含有与核苷酸序列 3'末端互补的核苷酸序列的反义引物进行 PCR。当将每种引物的 5'末端设计成具有克隆载体的限制性酶识别位点序列以用于下文所述的诱饵质粒时, 即可通过利用限制性酶位点, 将扩增片段有效插入克隆载体以用于下文所述的诱饵质粒。如果想使引物具有可用于克隆的限制性酶识别序列, 可设计引物, 使得转录因子的转录激活结构域的密码子插入克隆载体时可与 m β -连环蛋白臂区的相应密码子位于同一读码框内。

载体(优选在其中插入通过上述方法制备的 m β -连环蛋白臂区 DNA)包括能在酿酒酵母中复制的载体, 其具有转化所用的适当标记基因, 例如氨基酸生物合成基因, 如 TRP1 和 LEU2, 并可在酵母表达用启动子, 如醇脱氢酶(ADH)启动子的调节下表达 GAL4 的 DNA-结合结构域(下文简称为

GAL4 BD)。在这种情况下，优选使用具有下列特征的载体，所述载体在 GAL4 BD 的 C 末端部分具有可插入 m β -连环蛋白臂区 DNA 的适当限制性酶位点，并且能在大肠杆菌(因其便于操作，例如便于纯化载体 DNA)中复制，另外还具有转化大肠杆菌所用的可测标记，例如氨苄青霉素-抗性基因。

5 这类载体包括 pGBT9(Clontech), pAS1(T. Durfee 等, 基因&发育, 7, 555(1993)), pAS2-1(Clontech)等。

分离上文所制备的 m β -连环蛋白臂区 DNA，然后在密码子框内将其插入载体中 GAL4 BD C-末端的限制性酶位点。

(2)制备 cDNA 文库以表达与转录激活结构域的融合蛋白

10 为了制备 cDNA 文库以表达与 GAL4 转录激活结构域的融合蛋白，可优选在酿酒酵母中复制所用载体，所述载体具有转化所用的适当标记基因，例如酵母氨基酸生物合成基因，如 TRP1 和 LEU2，并可在酵母表达用启动子，如醇脱氢酶(ADH)启动子的调节下表达 GAL4 的转录激活结构域(下文简称为 GAL4 AD)。在这种情况下，优选使用具有下列特征的载体，所述载体在 GAL4 AD 的 C 末端部分具有适当限制性酶位点，并且能在大肠杆菌(因其便于操作，例如便于纯化载体 DNA)中复制，另外还具有转化大肠杆菌所用的可测标记，例如氨苄青霉素-抗性基因。这类载体包括 pGAD(C. T. Chien 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9578(1991)), pGAD424(Clontech), pACT(T. Durfee 等, 基因&发育, 7, 555(1993)), pACT2-1(Clontech)等。

20 据推测，能与细胞中的 β -连环蛋白相互作用的蛋白质能在表达 β -连环蛋白的细胞和组织中表达。因此，可以通过以下方法制备 cDNA 文库，即由据推测可表达 β -连环蛋白的小鼠组织和细胞制备 cDNA，并将其插入用于表达融合蛋白的上述载体中的 GAL4 AD C 末端限制性酶位点。在这种情况下，当 cDNA 和 GAL4 AD 的方向彼此相同，并且位于同一读码框中时，即可表
25 达 GAL4 AD 与 cDNA 所编码蛋白质的融合蛋白。或者，可以使用能在酵母双-杂种体系中使用的商用文库，例如 MATCHMAKER cDNA 文库(Clontech)。

(3)通过酵母双-杂种体系筛选 cDNA

用于导入(1)中制备的诱饵质粒和(2)中制备的 cDNA 文库的酵母包括属
30 于酿酒酵母的酵母，其中导入了上述诱饵质粒和 cDNA 文库，另外，它还需要：(a)导入的质粒中用于转化的标记基因和宿主中对应于双-杂种体系所

用转录因子 GAL4 基因的基因由于缺失或突变而不能被表达；和(b)已将与 GAL4 BD 结合的核苷酸序列插入适当报道基因的启动子区域。在此情况下，优选使用一种报道基因，当通过与诱饵结合来启动所述基因的转录时，易于检测到这种转录，所述基因如氨基酸生物合成的基因，如 HIS3 等(在此情
5 况下，基因应该不同于用作转化诱饵质粒所用标记的基因)，可在酵母中检测的大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因 lacZ 等。例如，宿主酵母包括酿酒酵母 CG1945 菌株(Clontech)，Y153 菌株(基因&发育, 7, 555(1993))，CGY1::171 菌株(细胞, 51, 121(1987))，HF7C 菌株(Clontech)等。

可将(1)中制备的诱饵质粒和(2)中制备的 cDNA 文库导入该宿主酵母，
10 以通过使用报道基因的表达作为标记选择含有 cDNA 的转化子，所述 cDNA 编码能与 m β -连环蛋白臂区结合的蛋白质。例如，当将用于组氨酸生物合成的 HIS3 基因用作报道基因时，可选择在不含组氨酸的基础培养基上生长的菌落，或者，当将大肠杆菌 lacZ 基因用作报道基因时，可选择在 X-gal 的存在下表现为蓝色的菌落。

15 由于所选择的转化子菌落含有两种类型的质粒，即诱饵质粒和 cDNA 文库，根据参考文献(“DNA 克隆 2，表达系统，操作方法，第 2 版”，牛津大学出版社(1995)；Proc. Natl. Acad. Sci., 88, 9578(1991))所述的方法仅分离 cDNA 文库质粒。具体地说，从菌落中分离质粒，然后用该质粒转化大肠杆菌。此时，所用宿主大肠杆菌是不表达 cDNA 文库中所含标记基因，
20 因而在经转化的菌株中可检测到基因表达的菌株。从转化子中选择表达 cDNA 文库中所含标记基因的一些转化子，从选择的转化子中分离质粒 DNA 以获得 cDNA 克隆。

(4)分析 cDNA 克隆的核苷酸序列

通过使用完整的 cDNA 克隆，或者在用适当限制性酶切下 cDNA 组成
25 成分的片断，并将其亚克隆至适当克隆载体，如 pUC118 之后，用常用的分析核苷酸序列的方法，例如 Sanger 等(Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463(1977))的双脱氧-测序法或 Perkin Elmer 等提供的 DNA 测序仪，即可测定(3)中所得 cDNA 克隆的核苷酸序列。

通过在使用同源性检索程序，如 BLAST 检索核苷酸序列数据库，如
30 GenBank, EMBL 和 DDBJ 时证实 cDNA 序列未与数据库中存储的已知基因

的核苷酸序列表现出显著的同源性，可以认为所得 cDNA 的核苷酸序列是新的。

如果核苷酸序列是新的，那么，如(2)中所述，(3)中所得的 cDNA 克隆应该编码融合蛋白，其中 ICAT 与 GAL4 AD 的 C-末端在框内相连。因此，
5 通过在与 GAL4 AD 的翻译读码框相同的框内，在终止密码子的下游将所揭示的 cDNA 的核苷酸序列翻译成相应的氨基酸序列，即可推导出由 cDNA 编码的 ICAT 氨基酸序列。

另外，通过用同源性检索程序，例如 BLAST, FASTA 和 FrameSearch 在氨基酸序列数据库，例如 Genpept, PIR 和 Swiss-Prot 中对该氨基酸序列进行检索，可以选择出与 cDNA 所编码的蛋白质具有同源性的已知基因。
10

然而，所得 cDNA 可仅含有全长 ICAT cDNA 的起始密码子的下游部分，因为如下文实施例 11 所述，甚至当 ICAT N-末端的 12 个氨基酸缺失时，ICAT 也可与 m β -连环蛋白臂区结合。在这种情况下，在通过用下文(5)中所述的方法获得全长 ICAT cDNA 之后，通过使用与所得 ICAT 的氨基酸相同的读
15 码框测定出 ORF 区域，从而揭示出完整的 ICAT 氨基酸序列；可将 ORF 区域用作 ICAT DNA。另外，只要它们能编码 ICAT 的完整氨基酸序列，ICAT DNA 中的各个密码子的核苷酸序列并不局限于与 cDNA 中的密码子相同，它可以使
用任何编码相同氨基酸的密码子的核苷酸序列。

按上述所得的新 cDNA 包括例如：编码含有 SEQ ID NO:2 或 4 所示氨基酸序列的蛋白质的 cDNA。
20

(5)克隆全长 cDNA

当根据(4)中的核苷酸序列分析，以及按下文所述用 Northern 印迹杂交得到的 mRNA 的长度信息推测出(3)中所得 ICAT cDNA 的长度不是全长时，可通过下列方法制备全长 ICAT cDNA。

25 (5-1)筛选 cDNA 文库

将(3)中所得的完整 cDNA 或其部分用作探针，通过菌落杂交或噬斑杂交筛选出(2)中制备的，表达融合蛋白的 cDNA 文库，或者由表达 β -连环蛋白，据信还同时表达 ICAT 的组织或细胞制备的 cDNA 文库，或者按下文所述用 Northern 印迹可检测到 β -连环蛋白 mRNA 的细胞制备的 cDNA 文库，
30 然后在阳性克隆中选择据信为全长的 cDNA 克隆。通过 J. Sambrook 等，“分子克隆，实验室手册，第 2 版”，冷泉港实验室出版社(1989)所述的方法或

其它方法可进行 cDNA 文库的制备和杂交。或者，可以使用来自 Clontech 或其它公司的商用 cDNA 文库。通过按照与(4)中所述相同的方法测定所得 cDNA 克隆的核苷酸序列，可以揭示出小鼠 ICAT cDNA 的完整核苷酸序列，并且揭示出小鼠 ICAT 的完整氨基酸序列。

5 (5-2)RACE

由据推测可表达 ICAT 的组织或细胞制备互补 DNA，然后在 cDNA 的两个末端添加衔接子寡核苷酸。通过 5'-RACE 或 3'-RACE (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998(1988))可得到互补的 DNA 片断，该片断含有(3)中所得 cDNA 的延伸至 5'或 3'方向的部分，其中使用来自所述衔接子的核苷酸序列的引物，和根据(3)中所得 cDNA 克隆的核苷酸序列设计的引物进行 PCR。

也可以按照与(4)相同的方法，通过测定所得 cDNA 的核苷酸序列，然后基于所测定的核苷酸序列，将所得 cDNA 和(3)中所得 cDNA 克隆彼此相连，籍此提供全长 ICAT cDNA。

(5-3)使用 EST 核苷酸序列

15 当通过在公共核苷酸序列数据库中检索同源性来分析(4)中测定的 ICAT cDNA 的核苷酸序列时，即使在已知基因中没有相同的核苷酸序列，在随机 cDNA 克隆的部分序列 EST 中仍可发现与所述 cDNA 序列相同的序列。此时，将这些 EST 和其它含有与该 EST 相同的核苷酸序列的 EST，以及得自同一克隆的 EST 全部集中到一起，作为得自同一基因的 EST。有时，
20 通过装配这些据信得自 ICAT cDNA 的 EST 的核苷酸序列，可以发现与(3)中所得的 cDNA 相比在 5'或 3'方向延伸得更长的核苷酸序列。在这种情况下，通过 RT-PCR 即可获得位于(4)中所得 cDNA 核苷酸序列 5'或 3'方向的 cDNA 延伸部分，所述 PCR 使用了具有得自经装配 EST 的核苷酸序列的 5'末端核苷酸序列的有义引物，或具有与所述 EST 3'末端的核苷酸序列互补
25 的核苷酸序列的反义引物。在 RT-PCR 中，可将互补 DNA 或得自据推测可表达 ICAT 的小鼠组织或细胞的 cDNA 文库用作模板。按照与(4)中所述相同的方法测定所得 cDNA 的核苷酸序列。当在公共核苷酸序列数据库中得到很多据信得自小鼠 ICAT cDNA 的 EST 时，无需使用 RT-PCR，通过装配收集的 EST 核苷酸序列即可揭示出小鼠 ICAT 的全长 cDNA 核苷酸序列。

30 另外，一旦按上述揭示出 ICAT cDNA 的全长核苷酸序列，可按照与(3)中所述相同的方法，将制备自据推测可表达 ICAT 的小鼠组织或细胞的

cDNA 或 cDNA 文库用作模板，并使用根据 cDNA 的核苷酸序列设计的引物进行 PCR，从而获得 ICAT cDNA。已于 1999 年 4 月 14 日将含有所得小鼠 ICAT cDNA 克隆 pmICAT 的转化子大肠杆菌 DH5 α /pmICAT 保藏于工业技术院生命工学工业技术研究所(日本茨城县茨城市 1-1-3, 邮编 305-8566), 5 保藏号为 FERM BP-6701。

另外，可以根据按上述测定的 ICAT cDNA 的核苷酸序列，在 DNA 合成仪中化学合成 ICAT DNA。所述 DNA 合成仪包括购自 Perkin Elmer 的，利用亚磷酰胺法的 392 型 DNA 合成仪等。

(6)分离编码人 ICAT 的 DNA

10 为了分析人结肠癌发生的机理以及为了治疗和诊断癌症，更重要的是获得人 ICAT 或编码 DNA(下文简称为人 ICAT DNA)，而不是小鼠 ICAT。一般说来，得自不同物种，但具有相同功能的蛋白质经常具有不同的氨基酸序列，但这些序列之间表现出同源性。因此，据信编码蛋白质的 DNA 之间也会表现出同源性。另外，在生物进化过程中，突变在基因中积累，因此，可以设想物种的系统发育谱系越近，同源性就会越高。因此，通过根据下文所述的方法，利用(3)中所得的小鼠 ICAT DNA 的核苷酸序列，即可从其它哺乳动物，例如人 ICAT DNA 中获得 ICAT DNA。无需获得小鼠 ICAT DNA，也可按照与(1)至(5)所述相同的方法直接获得人 ICAT DNA，所述方法为具有诱饵质粒和人 cDNA 文库的酵母双-杂种体系，其中人 β -连环蛋白的犹猿结构域(细胞生物学杂志, 127, 2601(1994))被用作诱饵。 15 20

(6-1)筛选 cDNA 文库

由于人 ICAT 被设想为与小鼠 ICAT 具有相同的功能，据推测，人 ICAT 与小鼠 ICAT 在相同的组织和细胞中表达。因此，可以根据与(5-1)所述相同的方法，通过使用经放射性同位素，地高辛配基等标记的小鼠 ICAT DNA 25 为探针，进行菌落杂交或噬斑杂交，从 cDNA 文库，例如制备自等同于表达小鼠 ICAT 的小鼠组织的人组织，或制备自得自这种人组织的细胞的 cDNA 文库，或者从可商购的，得自所述人组织或细胞的人 cDNA 文库中获得人 ICAT 的 cDNA 克隆。

(6-2)使用 EST

30 使用同源性检索程序检索公共核苷酸序列数据库，如 GenBank，以寻找与(4)中所得小鼠 ICAT DNA 的核苷酸序列表现出同源性的 EST。据认

为,这种与小鼠 ICAT DNA 表现出同源性的 EST 得自人 ICAT cDNA,因此,通过装配 EST 的核苷酸序列,至少可获得人 ICAT cDNA 的部分核苷酸序列。在用于测定 EST 核苷酸序列的克隆中,得自基因组表达聚生体的整合分子分析(I. M. A. G. E. Consortium)以及基因组研究所(TIGR)的克隆来自 ATCC。

5 通过装配根据 EST 的核苷酸序列,被认为含有人 ICAT cDNA 的 5'末端, 3'末端或中间部分的所得 cDNA 克隆,也可获得覆盖整个人 ICAT cDNA 的 cDNA 克隆。已于 1999 年 4 月 14 日将含有所得全长人 ICAT cDNA 克隆 phICAT 的转化子大肠杆菌 DH5 α /phICAT 保藏于工业技术院生命工学工业技术研究所(日本茨城县茨城市 1-1-3, 邮编 305-8566), 保藏号为 FERM
10 BP-6700。

通过按照与(3)中所述相同的方法进行 RT-PCR 扩增,也可以获得人 ICAT cDNA,所述 PCR 使用了对应于人 ICAT cDNA 核苷酸序列的 3'末端和 5'末端的引物,并且使用了制备自据推测可表达 ICAT 的人组织或细胞的 RNA 作为模板。

15 将人 ICAT DNA 测定为根据上述方法获得的全长人 ICAT cDNA 的 ORF 区域。即使存在很多 ORF,仍可将与小鼠 ICAT cDNA 中的确定 ORF 具有同源性的 ORF 选择为人 ICAT DNA,原因是小鼠 ICAT 和人 ICAT 具有氨基酸序列同源性。可将人 ICAT 的氨基酸序列测定为由 ORF 编码的氨基酸序列。

20 (7)制备 ICAT 寡核苷酸

可在(5)中所述的 DNA 合成仪中制备寡核苷酸,所述寡核苷酸含有本发明 ICAT DNA 的部分序列,或具有与该序列互补的核苷酸序列(下文简称为 ICAT 寡核苷酸)。

具体地说, ICAT 寡核苷酸包括具有与 SEQ ID NO:1 或 3 的核苷酸序列
25 中的连续 5 至 60 个核苷酸相同之序列的 DNA,或具有与所述 DNA 互补之序列的 DNA。当用作有义引物或反义引物时,优选这些 DNA 是解链温度和核苷酸数目相差不大的寡核苷酸。

本发明的寡核苷酸包括寡核苷酸的任何衍生物(下文也称寡核苷酸衍生物)。寡核苷酸衍生物的例子有:寡核苷酸衍生物,其中寡核苷酸中的磷酸二酯键已被转变为硫代磷酸酯键;寡核苷酸衍生物,其中寡核苷酸中的
30 磷酸二酯键已被转变为 N3'-P5'氨基磷酸酯键;寡核苷酸衍生物,其中寡核

5 苷酸中位于核糖和磷酸之间的磷酸二酯键已被转变为肽-核酸键；寡核苷酸衍生物，其中寡核苷酸中的尿嘧啶已被 C-5 丙炔基尿嘧啶所取代；寡核苷酸衍生物，其中寡核苷酸中的尿嘧啶已被 C-5 噻唑尿嘧啶所取代；寡核苷酸衍生物，其中寡核苷酸中的胞嘧啶已被 C-5 丙炔基胞嘧啶所取代；寡核苷酸衍生物，其中寡核苷酸中的胞嘧啶已被经吩恶嗪-修饰的胞嘧啶所取代；寡核苷酸衍生物，其中寡核苷酸中的核糖已被 2'-O-丙基核糖所取代；寡核苷酸衍生物，其中寡核苷酸中的核糖已被 2'-甲氧基乙氧基核糖所取代(细胞技术, 16, 1463(1997))。

10 2.产生 ICAT

通过根据“分子克隆，实验室手册，第2版”(J. Sambrook 等，冷泉港实验室出版社(1989))，“DNA克隆1：核心技术，操作方法，第2版”(D. M. Glover 和 B. D. Hames, 牛津大学出版社(1995))等所述的方法，在宿主细胞中表达按照第1节的内容制备的 ICAT DNA，即可产生本发明的 ICAT。

15 具体地说，通过制备重组载体(其中已将 ICAT DNA 插入适当表达载体的启动子下游)，将该载体导入宿主细胞以得到表达 ICAT 的转化子，然后培养转化子，即可生产本发明的 ICAT。

所用表达载体是能自我复制，或整合至宿主细胞染色体中，并含有能在宿主细胞中介导 ICAT DNA 转录为 mRNA 的启动子的载体。

20 可以使用任何宿主细胞，包括原核细胞，酵母细胞，动物细胞，昆虫细胞，植物细胞等，只要细胞可表达所需基因即可。也可以使用动物个体和植物体。

25 当将原核细胞，例如细菌用作宿主细胞时，所用 ICAT 表达载体应能在宿主原核细胞中自我复制，其中已将 ICAT DNA 置于含有核糖体-结合序列的启动子的下游。优选已适当调节核糖体-结合序列与起始密码子之间的距离(例如，对大肠杆菌宿主而言为 6 至 18 个核苷酸)。优选将转录终止序列置于紧接 ICAT DNA 下游的位置，但在本发明中这并不是必需的。另外，载体应该被设计成含有表达标记基因，如药物抗性基因所需的序列以便于选择转化子。

30 可使用任何启动子，只要它能介导宿主细胞中的表达即可。例如，当宿主为大肠杆菌时，启动子包括得自大肠杆菌和噬菌体的启动子，例如 *trp*

5 启动子(*P_{trp}*), *lac* 启动子(*P_{lac}*), *P_L* 启动子, T7 启动子, *P_R* 启动子等。也可以使用人工设计的或经修饰的启动子, 例如两个 *P_{trp}* 彼此串联的启动子, *tac* 启动子, T7-*lac* 启动子, *let I* 启动子等。当宿主为枯草芽孢杆菌时, 启动子包括得自枯草芽孢杆菌噬菌体 SPO1 和 SPO2 的启动子以及 *PenP* 启动子。

表达载体的例子有 *pSE280*(Invitrogen), *pGEMEX-1*(Promega), *pQE-8*(QIAGEN), *pKYP200*(农业生物化学, 48, 669(1984)), *pLSA1* (农业生物化学, 53, 277(1989)), *pGEL1*(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306(1985)), *pBluescript II SK(-)*(Stratagene), *pKK223-3* (Amersham Pharmacia Biotech),
10 *pGEX-5X-3*(Amersham Pharmacia Biotech)和 *pET14*(Novagen)。

宿主细胞可以是属于埃希氏菌属, 沙雷氏菌属, 芽孢杆菌属, 短杆菌属, 棒状杆菌属, 微杆菌属, 假单胞菌属的微生物, 例如大肠杆菌 XL1-Blue, 大肠杆菌 XL2-Blue, 大肠杆菌 DH1, 大肠杆菌 MC1000, 大肠杆菌 KY3276, 大肠杆菌 W1485, 大肠杆菌 JM109, 大肠杆菌 HB101, 大肠杆菌 No.49,
15 大肠杆菌 W3110, 大肠杆菌 NY49, 无花果沙雷氏菌, 居泉沙雷氏菌, 液化沙雷氏菌, 粘质沙雷氏菌, 枯草芽孢杆菌, 解淀粉芽孢杆菌, 产氨短杆菌, *Brevibacterium immariophilum* ATCC14068, 解糖短杆菌 ATCC 14066, 谷氨酸棒杆菌 ATCC13032, 谷氨酸棒杆菌 ATCC14067, 谷氨酸棒杆菌 ATCC13869, 嗜乙酰乙酸棒杆菌 ATCC13870, 嗜氨微杆菌 ATCC15354, 假
20 单胞菌菌株 D-0110。

可以使用任何导入重组载体的方法, 只要这种方法能将 DNA 导入上述宿主细胞即可。所述方法包括例如电穿孔(核酸研究, 16, 6127(1988)), 使用钙离子的方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)), 原生质体法(日本公开未审专利申请 248394/88)或基因, 17, 107(1982)或分子&普通遗传学,
25 168, 111(1979)中所述的其它方法。

当酵母被用作宿主细胞时, 所用表达载体包括含有以下组成元件的载体: 即含有能介导宿主酵母中的转录的启动子, ICAT DNA, 转录终止序列和能在酵母中表达转化用标记基因(例如药物抗性基因和氨基酸生物合成基因, 如 TRP1, HIS3 和 LEU2)的序列。另外, 优选使用能自我复制并能表达
30 药物抗性基因的表达载体, 所述药物抗性基因可用作转化大肠杆菌的标记, 以便于制备和维持载体。

可使用任何启动子，只要它能介导酵母中的转录即可。所述启动子包括例如醇脱氢酶基因 ADH1 和参与半乳糖代谢的基因，如 GAL1, GAL10 等的启动子，酸性磷酸酶基因 PHO5 的启动子，磷酸甘油酸激酶基因 PGK 的启动子，甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 GAP 的启动子，热激蛋白基因的启动子，
5 α -交配因子基因 MF α 1 的启动子，和得自酿酒酵母的铜-金属硫蛋白基因 CUP1 的启动子以及得自巴斯德毕赤氏酵母的醇氧化酶基因 AOX1 的启动子。

宿主细胞包括属于糖酵母属，裂殖糖酵母属，毕赤氏酵母属，假丝酵母属等的酵母菌株，具体包括酿酒酵母，粟酒裂殖糖酵母，巴斯德毕赤氏
10 酵母，产朊假丝酵母等。

可以使用任何导入重组载体的方法，只要所述方法能将 DNA 导入酵母即可。所述方法包括例如电穿孔(酶学方法, 194, 182 (1990)), 原生质球方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4889(1984)), 醋酸锂法(细菌学杂志, 153, 163(1983))等。

15 当将动物细胞用作宿主时，所用表达载体包括含有以下组成元件的载体：即含有能介导宿主动物细胞中的转录的启动子，ICAT DNA，用于转录终止和转录物聚腺苷酸化的信号序列。另外，优选使用能自我复制并能表达药物抗性基因的载体，所述药物抗性基因可用作转化大肠杆菌的标记，以便于制备和维持载体。可使用任何启动子，只要它能介导动物细胞
20 中的转录即可。所述启动子包括得自病毒的序列，例如 SV40 早期启动子，人巨细胞病毒 IE(即早期)基因的启动子和增强子元件，源自逆转录病毒，如 Rous 肉瘤病毒，人 T 细胞白血病病毒 I, Moloney 鼠白血病病毒等的 LTR；或得自动物细胞的基因的启动子，所述基因如金属硫蛋白基因， β -肌动蛋白基因，延伸因子-1 等。另外，还可以使用将如上所述的多个启动子元件连
25 接在一起而形成的人工启动子，例如通过将 SV40 早期启动子和人 T 细胞白血病病毒 I 的 LTR 相互连接而形成的 SR α 启动子。

通过将 ICAT 表达载体导入宿主细胞，其中所述载体含有用于表达抗药物(如 G418 或潮霉素)的药物抗性基因的序列，并在药物的存在下培养细胞，即可选择出其中 ICAT DNA 已整合至宿主染色体 DNA，并且能组成型表达
30 ICAT 的细胞。另外，为了增加宿主细胞中所产生的 ICAT 的量，可将组成型表达 ICAT 的载体导入宿主细胞，所述载体含有能表达二氢叶酸还原酶

(dhfr)基因的序列, 培养细胞, 同时连续增加作为 dhfr 抑制剂的氨甲碟吟的浓度; 因此, 可以成功地扩增 ICAT DNA 以及 dhfr 基因的拷贝数。利用 dhfr 基因已达到基因扩增目的的宿主细胞可以是含无功能的 dhfr 基因的细胞, 例如 CHO/dhfr^r(ATCC: CRL-9096)等。

5 用于制备上述 ICAT 表达载体的载体具体包括例如 pAGE107 (日本公开未审专利申请 22979/91; 细胞技术, 3, 133(1990)), pAS3-3(227075/90), pCDM8(自然, 329, 840(1987)), pcDNA3.1(+) (Invitrogen), pREP4(Invitrogen), pBK-RSV(Stratagene) , pSVK3 (Amersham Pharmacia Biotech) , pcDNA1.1/Amp(Invitrogen), pAMo (生物化学杂志, 268, 22782(1993))等。

10 宿主细胞包括细胞系, 例如得自人的细胞, HeLa 和 Namalwa 以及人肾细胞系 293(ATCC:CRL-1573); 非洲绿猴肾细胞 COS-1 和 COS-7; 仓鼠 CHO 和 BHK 细胞; 小鼠骨髓瘤的 SP2/0 和 NS0 细胞, 大鼠骨髓瘤细胞 YB2/0。

可使用任何导入重组载体的方法, 只要所述方法能将 DNA 导入动物细胞即可。所述方法包括例如电穿孔(细胞技术, 3, 133 (1990)), 磷酸钙法(日本公开未审专利 227075/90), 脂质体转染法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987))等。

当将昆虫细胞用作宿主细胞时, 可利用杆状病毒表达系统(杆状病毒表达载体, 实验室手册, W. H. Freeman 和 Company, 纽约(1992), 生物技术, 6, 47(1988))。具体地说, 将 ICAT DNA 插入被称为转移载体的载体之后, 同时
20 时将载体和杆状病毒导入昆虫细胞; 所得同源重组提供了重组杆状病毒, 其中 ICAT DNA 已插入多角体基因启动子的下游, 所述启动子是高效启动子; 然后将重组杆状病毒转染至昆虫细胞, 从而获得 ICAT 表达。

所用杆状病毒包括苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒, 家蚕核型多角体病毒等。所用昆虫细胞可以是得自草地夜蛾的细胞 Sf9 和 Sf21 (杆状病毒表达
25 载体, 实验室手册, 纽约(1992)), 得自粉蚊夜蛾的细胞 High5(Invitrogen)等。或者, 也可以使用幼蚕本身。转移载体含有多角体蛋白启动子和得自杆状病毒, 用于介导同源重组的序列, 以及用于维持和复制载体及插入外源基因的序列(能在大肠杆菌中自我复制的序列和药物抗性基因的序列), 和便于在大肠杆菌中进行基因操作的序列。具体地说, 所述载体包括 pVL1392,
30 pVL1393, pBluebac4(皆得自 Invitrogen)等。

通过使用动物个体可产生 ICAT。例如，可在已根据已知方法(美国临床营养杂志, 63, 639S(1996); 美国临床营养杂志, 63, 627S (1996); 生物技术, 9, 830(1991))导入 ICAT DNA 的动物体中生产 ICAT。

5 可使用任何启动子，只要该启动子能介导动物中的表达即可。例如，可优选使用乳腺细胞特异性的启动子，如 α -酪蛋白启动子， β -酪蛋白启动子， β -乳球蛋白启动子，乳清酸性蛋白启动子等。

当将植物细胞或植物体用作宿主时，可根据已知方法(组织培养, 20(1994); 组织培养, 21(1995); 生物技术趋势, 15, 45(1997))生产 ICAT。

10 可使用任何能表达 ICAT DNA 的启动子，只要该启动子能介导植物细胞中的基因表达即可。所述启动子包括例如花椰菜花叶病毒 35S 启动子，水稻肌动蛋白-1 启动子等。另外，可将玉米醇脱氢酶基因的内含子 1 插入启动子和待表达的 ICAT DNA 之间以增加 ICAT DNA 的表达效力。

宿主细胞可以是得自马铃薯，烟草，玉米，水稻，油菜，大豆，番茄，小麦，大麦，黑麦，苜蓿，亚麻等的植物细胞。

15 可以使用任何能导入重组载体的方法，只要所述方法能将 DNA 导入植物细胞即可。所述方法包括例如，使用农杆菌，电穿孔(细胞技术, 3, 133(1990))的方法，使用微粒枪(基因枪)的方法等。

20 可使用发酵罐大规模培养其中已导入 ICAT DNA 的植物细胞或器官。也可以再生含有导入基因的植物细胞，以产生其中已导入 ICAT DNA 的植物体(转基因植物)。

可根据一般的培养方法培养含有重组载体的微生物，动物细胞或得自植物细胞的转化体，所述重组载体含有本发明的 ICAT DNA 作为插入物，ICAT 可以在这些细胞中积累，从培养物中回收 ICAT 以生产 ICAT。

25 用于培养通过使用动物细胞作为宿主而获得的转化子的培养基包括常用的 RPMI1640 培养基(美国医学协会杂志, 199, 519 (1967)), Eagle MEM(科学, 122, 501(1952)), DMEM(病毒学, 8, 396(1959)), 199 培养基(生物药物学会会议汇编, 73, 1(1950)), 和含有胎牛血清的这些培养基等。必要时，可在培养基中加入抗生素，例如青霉素或链霉素。通常，可在例如 5% CO₂ 的存在下，于 30 至 40°C，pH6 至 8 的条件下培养 1 至 7 天。

30 用于培养通过使用昆虫细胞作为宿主细胞而获得的转化子的培养基包括常用的 TNM-FH 培养基 (Pharmingen)，Sf-900 II SFM 培养基

(Life-Technologies), ExCell400, ExCell405(皆得自 JRH Biosciences), Grace 昆虫培养基(自然, 195, 788(1962))。在优选的培养条件下, pH 是 6 至 7; 培养温度是 25 至 30℃, 培养一般持续 1 至 5 天。另外, 必要时, 可在培养过程中在培养基中加入抗生素, 如庆大霉素。

5 当转化子是动物个体或植物体时, 可以根据一般方法, 通过饲养或培育转化子, 使 ICAT 在其中积累并从动物个体或植物体中回收 ICAT 来生产 ICAT。

具体地说, 对动物个体而言, 例如, 可以通过饲养含有 ICAT DNA 的非-人转基因动物, 在动物体中产生并积累由重组 DNA 编码的 ICAT, 并从动物中回收 ICAT 来生产 ICAT。动物中生产和积累 ICAT 的位点包括例如动物的乳汁或卵。

对植物体而言, 例如, 可以通过培育含有 ICAT DNA 的转基因植物, 在植物中产生并积累由重组 DNA 编码的 ICAT, 并从植物中回收 ICAT 来生产 ICAT。

15 任何天然培养基和合成培养基都可用于培养以诸如大肠杆菌的原核生物或诸如酵母的真核生物为宿主而获得的转化子, 只要所述培养基含有碳源, 氮源, 无机盐等生物可同化的物质, 转化子可在其中有效培养即可。

可以使用任何生物可同化的碳源, 包括葡萄糖, 果糖, 蔗糖和含有它们的糖蜜; 诸如淀粉和淀粉水解物的碳水化合物; 诸如乙酸和丙酸的有机酸; 诸如乙醇和丙醇的醇类。

可以利用的氮源包括氨, 无机酸的铵盐, 如氯化铵, 硫酸铵, 醋酸铵, 磷酸铵或有机酸的铵盐, 其它含氮化合物, 以及蛋白胨, 肉提取物, 酵母提取物, 玉米浸膏, 酪蛋白水解物, 豆饼和豆饼水解物, 多种发酵微生物及其消化物。

25 所述无机物质包括磷酸二氢钾, 磷酸氢二钾, 磷酸镁, 硫酸镁, 氯化钠, 硫酸铁, 硫酸锰, 硫酸铜, 碳酸钙等。

一般在需氧条件下进行培养, 例如通过振荡培养或深度-需氧搅拌培养。优选在 15 至 40℃ 进行培养, 一般培养 16 至 96 小时。在培养过程中应将 pH 维持在 3.0 至 9.0。通过使用无机或有机酸, 碱溶液, 尿素, 碳酸钙, 氨等进行 pH 的调节。必要时, 可在培养过程中, 在培养基中加入抗生素, 如氨基青霉素或四环素。

在培养被使用诱导型启动子的表达载体转化的微生物时，必要时，可在培养基中加入诱导物。例如，当培养被使用 *lac* 启动子的表达载体转化的微生物时，可在培养基中加入 IPTG 等；当培养被使用 *trp* 启动子的表达载体转化的微生物时，可在培养基中加入吲哚乙酸等。

5 可使用下列分离和纯化蛋白质的一般方法分离和纯化上述转化子培养物中积累的 ICAT。

当细胞分泌 ICAT 时，培养基中积累了 ICAT。因此，在培养完成之后，可通过诸如离心分离的技术仅回收已除去细胞的培养基。通过单独或联合使用分离和纯化蛋白质的一般方法，可从培养基中获得纯化的样品；具体地说，可使用溶剂提取，使用硫酸铵等进行盐析，脱盐，有机-溶剂沉淀，使用诸如 DEAE Sepharose, DIAION HPA-75(三菱化成), Mono-Q(Amersham Pharmacia Biotech) 等树脂的阴离子交换层析，使用诸如 SP Sepharose(Amersham Pharmacia Biotech)等树脂的阳离子交换层析，使用诸如丁基- Sepharose, 苯基-Sepharose 的树脂的疏水层析，使用分子筛的凝胶过
10 滤，亲和层析，层析聚集，诸如等电聚焦等的电泳技术。

当 ICAT 在转化子细胞中积累时，在培养完成之后，通过离心等技术从培养物中回收转化子细胞，随后悬浮于缓冲液中，然后使用超声发生器，弗氏细胞压碎器等破碎细胞，产生无-细胞提取物。当 ICAT 可溶于细胞时，可按照与从上述培养基中纯化和分离蛋白质所用方法相同的方法，在离心
20 无细胞提取物之后，从上清液中获得纯化的样品。或者，当 ICAT 以包涵体的形式存在于细胞中时，可以通过离心来处理无细胞提取物，然后回收作为沉淀组分的 ICAT 包涵体。用蛋白质变性剂溶解所述 ICAT 包涵体，然后透析所得溶液，使其不含蛋白质变性剂，或者进行透析或稀释，以使如此低水平的蛋白质变性剂不能变性蛋白质，从而恢复 ICAT 的天然三级结构。
25 随后，通过按照与上述相同的分离和纯化方法获得纯化的样品。

另外，根据已知方法(生物分子 NMR 杂志, 6, 129-134, 科学, 242, 1162-1164, 生物化学杂志, 110, 166-168(1991)), 通过体外转录-翻译系统生产 ICAT。具体地说，将 ICAT DNA 连接至启动子(如 SP6, T7 或 T3)的下游，使特异于每个启动子的 RNA 聚合酶与所述启动子反应，以在体外合成大量
30 ICAT RNA，然后通过无细胞反应系统，如利用兔网织红细胞裂解物或小麦胚芽提取物的翻译系统生产 ICAT。

可通过蛋白质化学中常用的方法，例如“基因克隆的蛋白质结构分析”（平野久著，东京化学同人发行，1993）中所述的方法进行纯化 ICAT 的结构分析。

5 通过在第 1 节所述酵母双-杂种体系中使用融合蛋白表达载体(所述融合蛋白为转录激活结构域与所述 DNA 编码的每种蛋白的融合蛋白)，以及通过使用 β -连环蛋白的诱饵质粒，可评价是否检测到了报道基因的转录，从而测定由 ICAT 或 ICAT 衍生物(有氨基酸序列的取代，缺失或添加)与 β -连环蛋白和 TCF/Lef 家族的蛋白的复合物的是否进行了结合。或者，在体外直接将 ICAT 或其衍生物与 β -连环蛋白混合，让它们相互结合，或者在细胞中
10 表达 ICAT 或其衍生物并使它们在细胞中结合，然后通过使用抗 β -连环蛋白的抗体对反应溶液或细胞提取物进行免疫沉淀；再通过 Western 印迹等评价沉淀物中 ICAT 或其衍生物的存在，从而测定结合的存在。或者，不使用抗体，而制备融合蛋白，所述融合蛋白由 ICAT 或其衍生物和诸如 GST 的蛋白质或肽组成以便于纯化，使融合蛋白与经标记(如经 ^{35}S 标记)的 β -连环蛋白结合；纯化 ICAT 融合蛋白之后，检测纯化物中经标记 β -连环蛋白的存在
15 以测定结合的存在。

另外，通过使用质粒可以测定是否不仅仅有 ICAT 或其衍生物能结合 β -连环蛋白和属于 TCF/Lef 家族的蛋白质的复合物，并且也能抑制转录激活复合物的活性，所述质粒中的报道基因，如萤光素酶，氯霉素乙酰转移酶
20 或 β -半乳糖苷酶基因被置于启动子的下游，所述启动子含有 TCF 结合序列，使得转录能被 β -连环蛋白和属于 TCF/Lef 家族的蛋白质的复合物激活，所述质粒如 pTOPFLASH 和 pTOPCAT(科学, 275, 1784(1997))。将上述具有报道基因的表达质粒与突变 β -连环蛋白的表达质粒一起导入动物细胞，所述突变 β -连环蛋白总能与属于 TCF/Lef 家族的蛋白质结合，因此可以激活转录，例
25 如其中的丝氨酸残基 33 已被酪氨酸取代的突变 β -连环蛋白；进一步加入或不加 ICAT 或其衍生物的表达质粒，然后分析报道基因的表达水平，并比较这两种情况，从而测定 ICAT 或其衍生物是否能抑制转录激活。

3. 制备识别 ICAT 的抗体

30 (1) 制备多克隆抗体

可将通过上文第2节所述方法获得的全长 ICAT 或蛋白质的部分片段用作抗原，并施用于动物以制备多克隆抗体。

可用于免疫接种的动物包括兔，山羊，大鼠，小鼠，仓鼠等。优选以 50 至 100 μ g/每只动物的接种剂量使用抗原。

- 5 当使用肽进行免疫接种时，优选与诸如 KLH 或牛甲状腺球蛋白的载体蛋白共价相连之后，再将肽用作抗原。

10 在第一次接种之后，以 1 至 2 周的间隔施用抗原 3 至 10 次。每次接种后 3 至 7 天，从眼底静脉丛采集血液。然后通过使用酶免疫测定法(“酶免疫测定法(ELISA)”：医学书院，1976；“抗体：实验室手册”，冷泉港实验室出版社(1988))等来检测血清与免疫用抗原的反应性。

从非-人哺乳动物中收集血清，所述哺乳动物的血清中表现出足够高的抗免疫用抗原的抗体滴度，分离并纯化血清，即可获得多克隆抗体。

15 用于分离和纯化的方法包括离心分离，用 40 至 50%饱和的硫酸铵盐析，用辛酸沉淀(“抗体：实验室手册”，冷泉港实验室出版社(1988))，和单独或联合使用层析方法进行处理的方法，例如，使用 DEAE-Sepharose 柱，阴离子交换柱，A 蛋白或 G 蛋白柱，凝胶过滤柱等。

(2)制备单克隆抗体

(2-1)制备抗体生成细胞

20 将血清中表现出针对(1)中所述免疫所用抗原的足够高抗体滴度的大鼠被用作抗体生成细胞的来源。

给已表现出上述抗体滴度的大鼠最后一次施用抗原物质之后 3 至 7 天，取出大鼠的脾脏。

将脾脏切成小块，置于 MEM 中，用镊子将脾脏压碎。以 1200rpm 离心 5 分钟，然后弃去上清液。

25 用 Tris-氯化铵缓冲液(pH7.65)处理所得的脾细胞沉淀组分 1 至 2 分钟以除去红血细胞，然后用 MEM 将脾细胞洗 3 次。将所制备的脾细胞用作抗体生成细胞。

(2-2)制备骨髓瘤细胞

30 所用骨髓瘤细胞是由小鼠或大鼠建立的细胞系。例如，可以使用的 8-氮鸟嘌呤抗性小鼠(由 BALB/c 衍生得到)骨髓瘤细胞系包括 P3-X63Ag8-U1(P3-U1)(微生物学和免疫学最新观点, 81, 1(1978); 欧洲免疫

学杂志, 6, 511(1976)), SP2/0-Ag14(SP-2)(自然, 276, 269 (1978)), P3-X63-8653(653)(免疫学杂志, 123, 1548(1979)), P3-X63-Ag(X63)(自然, 256, 495(1975))等。在 8-氮鸟嘌呤培养基[含有 1.5mmol/L 谷氨酰胺, 5×10^{-5} mol/L 2-巯基甲醇, 10 μ g/ml 庆大霉素和 10%胎牛血清(CSL)的 RPMI1640 培养基(下文称之为普通培养基) + 15 μ g/ml 8-氮鸟嘌呤]中传代这些细胞系的细胞, 但在细胞融合之前的 3 至 4 天, 在普通培养基中培养细胞。将 2×10^7 或更多的细胞用于融合。

(2-3)制备杂交瘤

用 MEM 或 PBS(1.83g 磷酸氢二钠, 0.21g 磷酸二氢钾, 7.65g 氯化钠, 1L 蒸馏水; pH7.2)充分洗涤按(2-1)所述制备的抗体生成细胞和(2-2)中的骨髓瘤细胞, 以抗体生成细胞数目:骨髓瘤细胞数目 = 5 至 10:1 的比例将细胞相互混合。以 1200rpm 离心混合物 5 分钟, 弃去上清液。

充分分散制备自沉淀组分的混合细胞。于 37 $^{\circ}$ C 搅拌细胞, 同时在细胞混合物中加入 0.2 至 1ml(每 10^8 个抗体生成细胞)由 2g PEG-1000, 2ml MEM 和 0.7ml DMSO 组成的溶液; 然后以 1 至 2 分钟的间隔, 在其中几次加入 1 至 2ml MEM。

加入之后, 进一步加入 MEM 以制备细胞直至总体积为 50ml。

以 900rpm 离心所制备的悬浮液 5 分钟, 然后弃去上清液。

小心分散所得沉淀组分中的细胞, 然后用测量用的移液管小心吸取, 将细胞悬浮于 100ml HAT 培养基(在普通培养基中加入 10^{-4} mol/L 次黄嘌呤, 1.5×10^{-5} mol/L 胸腺嘧啶和 4×10^{-7} mol/L 氨基碟呤的培养基)。

将 100 μ l 悬浮液的等分试样分散于 96 孔培养板的每个孔中。然后在含 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 温箱中将细胞培养 7 至 14 天。

培养完成之后, 根据“抗体 - 实验室手册”(冷泉港实验室出版社, 第 14 章(1988))中所述的酶免疫测定法, 取培养物上清液的等分试样来选择与免疫所用抗原特异性反应的杂交瘤, 以获得上述抗体生成细胞。

酶免疫测定法的具体例子如下:

用作为免疫用抗原的本发明全长蛋白质或其部分片段的纯化样品包被适当的培养板。在培养板中, 将杂交瘤培养物上清液或按照下文(2-4)所述得到的纯化抗体作为第一抗体进行反应, 再将经生物素, 酶, 化学发光物质, 放射性化合物等标记的抗-大鼠免疫球蛋白抗体作为第二抗体进行反应。

随后，根据标记物进行反应，将表现出与本发明蛋白质的特异反应性的细胞选定为能生产抗本发明蛋白质的单克隆抗体的杂交瘤。

5 通过有限稀释法将杂交瘤克隆两次[第一次克隆用 HT 培养基(不含氨基碟呤的 HAT 培养基)，第二次克隆用普通培养基]。将稳定表现出高抗体滴度的细胞选定为能生产抗本发明蛋白质的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

(2-4)制备单克隆抗体

10 将(2-3)中所得的能生产抗本发明蛋白质的单克隆抗体的杂交瘤细胞腹膜内注射(5 至 20×10^6 个细胞/每只小鼠)至 8-10 周龄的小鼠或裸鼠，在此之前，已给所述小鼠或裸鼠腹膜内注射过 0.5ml 降植烷(2, 6, 10, 14-四甲基五癸烷)并饲喂了 2 周。在 10 至 21 天后，杂交瘤形成腹水瘤。

从具有腹水瘤的每只小鼠体内收集腹水，然后以 3000rpm 离心 5 分钟以除去固体物。

通过与制备多克隆抗体相同的方法，从所得上清液中纯化和制备单克隆抗体。

15 使用小鼠或大鼠单克隆抗体分型试剂盒进行抗体亚型的分型。根据 Lowry 法或通过使用 280nm 处的光吸收值即可计算出蛋白质的量。

4.使用 ICAT DNA，ICAT 蛋白质和识别 ICAT 的抗体

20 (1)可将本发明的 ICAT DNA 用作探针，通过使用提取自组织和细胞的 RNA 进行 Northern 印迹杂交(J. Sambrook 等，“分子克隆，实验室手册，第 2 版”，冷泉港实验室出版社(1989))，籍此检测或定量组织或细胞中 ICAT 基因的 mRNA。通过比较多个组织中 mRNA 的表达水平，可以揭示出 ICAT 表达的组织分布。

25 另外，可将具有与本发明 ICAT DNA 的核苷酸序列或其部分核苷酸序列相同或互补的核苷酸序列的寡核苷酸用作特异于 ICAT DNA 的引物，以通过使用提取自组织或细胞的 RNA 进行 RT-PCR 来检测或定量组织或细胞中的 mRNA。

30 可将具有与本发明 ICAT DNA 的核苷酸序列或其部分核苷酸序列相同或互补的核苷酸序列的寡核苷酸用作探针以进行组织切片的原位杂交，给出与表达分布相关的更详细的信息，例如鉴定出组织中表达 ICAT 的细胞。

通过这些方法提供的,有关何种组织或细胞表达 ICAT 的信息或有关何种细胞刺激物能改变细胞表达水平的信息可用于研究 ICAT,例如涉及 ICAT 的,由 β -连环蛋白/TCF-4 介导的信号传导机制。因此,这些 DNA 可用作研究 ICAT 的试剂。

5 另外,具有突变的癌症细胞因 ICAT 基因的突变而降低了 ICAT 表达水平,并且不再能抑制 β -连环蛋白/TCF-4 的活性,因此,这些 DNA 可用作诊断试剂以分析所述癌症中的 ICAT 基因表达。

10 (2)通过使用具有与 ICAT DNA 或其部分核苷酸序列相同或互补的核苷酸序列的寡核苷酸,可以检测异常,例如 ICAT 基因的缺失,拷贝数的变化,染色体易位,和基因核苷酸序列中的突变,如取代,缺失,添加等。

检测诸如 ICAT 基因的缺失,拷贝数变化和染色体易位之类的异常的方法包括 Southern 杂交。具体地说,可将 ICAT DNA 用作探针,通过 Southern 杂交研究经适当限制性酶消化的染色体 DNA,以测定异常,例如 ICAT 基因的缺失,拷贝数变化和染色体易位。

15 检测 ICAT 基因核苷酸序列中的取代,缺失和添加突变的方法包括 Southern 杂交,PCR 和 SSCP(单链构象多态性)(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2766(1989))。

当如取代,缺失和添加的突变位于基因的限制性酶位点时,可通过 Southern 杂交检测 ICAT 基因核苷酸序列中的突变。

20 可通过 PCR 检测 ICAT 基因核苷酸序列中的突变,在所述 PCR 中,通过 ICAT 寡核苷酸扩增染色体 ICAT 基因以测定扩增片段的核苷酸序列。

根据因核苷酸序列改变而引起的电泳迁移率差异,可通过 SSCP 检测单个核苷酸的差异,其中在非-变性的聚丙烯酰胺凝胶中电泳得自 PCR 扩增片段的单链 DNA。

25 当存在一般出现于癌症细胞的突变时,可使用能与突变位点杂交的寡核苷酸探针,通过 Southern 杂交分析染色体 DNA 以诊断这种癌症。

(3)可通过辐射-杂合体法(科学, 250, 245(1990))或原位杂交(人类遗传学 年刊, 45, 135(1981), 细胞, 52, 51(1988))测定 ICAT DNA 的染色体位置。

30 辐射-杂合体法是指定精确染色体位置的方法,其中进行 PCR 以将 ICAT 基因特异性地扩增为很多组含有人染色体片段(通过使用染色体标记已鉴定出实验组片段的染色体位置)的 DNA,例如 Gene-Bridge 4, 并分析扩增结果。

在原位杂交中，首先，使用作探针的人 ICAT DNA 与人染色体样品杂交，然后检测信号，将信号作图于样品上。这样就可以鉴定出 ICAT 基因在染色体上的物理位置以及相应的染色体编号。探针已被放射性同位素 ^3H 或生物素标记。当使用 ^3H 标记时，可通过放射自显影检测信号；或者，当使用生物素标记时，可用经荧光染料 FITC 标记的抗生物素蛋白检测信号。

另外，当用另一种方法替代上述直接检测 ICAT 基因染色体位置的方法时，通过在 STS 数据库中检索与 ICAT DNA 核苷酸序列的同源性，发现 STS(序列-标记位点：其具有与衍生自多种 EST 的核苷酸序列的引物，使用引物扩增的染色体 DNA 片段，以及片段的染色体位置相关的信息)含有与 ICAT DNA 的一部分相同的核苷酸序列，该 STS 可对应于染色体上的 ICAT 基因，因此，可以认为 STS 的染色体位置对应于 ICAT 基因的染色体位置。

与所获得的经鉴定的 ICAT 基因染色体位置相关的信息可用于研究疾病和 ICAT 基因之间的关系。例如，LOH (杂合性缺失：在成对基因之一中发现的染色体缺失)的热点区域，作为很可能存在肿瘤抑制基因的癌症相关染色体区域，已在其中鉴定出癌症(一个肿瘤抑制基因已通过另一染色体上对应于该 LOH 区中肿瘤抑制基因的等位基因的额外突变而灭活，这导致癌症的发生)；当所述区域与 ICAT 基因的染色体位置恰好重合时，ICAT 就可能参与在该区域具有 LOH 的癌症的发生。此时，当通过分析 ICAT 基因的突变和表达水平，证实 ICAT 参与癌症发生时，可以使用 ICAT DNA 和 ICAT 或 ICAT 抗体来诊断和治疗这种类型的癌症。

(4)通过第 2 节中所述的方法，使用 ICAT DNA 可产生和获得 ICAT。

(5)在 APC 基因， β -连环蛋白基因或 ICAT 基因已突变的癌症细胞，如结肠癌中，据认为不能抑制 β -连环蛋白/TCF-4 所致的转录激活与癌症的发生有关。由于通过施用 ICAT，ICAT 可抑制由 β -连环蛋白/TCF-4 介导的转录激活，因此可将 ICAT 用作这些癌症的治疗剂，在所述癌症中，对 β -连环蛋白/TCF-4 介导的转录激活的抑制作用已经受损。

对于含有上述 ICAT 的治疗剂而言，蛋白质可单独作为治疗剂被施用，但一般优选先将蛋白质与一种或多种可药用的载体混合，再以通过制药学技术领域任何众所周知的方法制备的药物制品形式提供蛋白质。优选使用无菌溶液，其中蛋白质已溶解于水或含水载体，如氯化钠，甘氨酸，葡萄糖，人白蛋白等的水溶液中。另外，可以添加可药用的添加剂，如尽可

能与制品溶液的生理条件接近的缓冲试剂和等渗试剂，例如，醋酸钠，氯化钠，乳酸钠，氯化钾，柠檬酸钠等。或者，可以冻干保存，使用时将其溶解于适当溶剂中，然后再用。优选使用能最有效地进行治疗的给药途径，通常，这种有效的给药途径是非肠道途径，例如皮下，肌内，静脉内，支气管内途径等。

(6)除了按照(5)所述，从外部施用 ICAT 外，可替代地，还可通过给患者施用已插入 ICAT DNA 的基因治疗载体，并使 ICAT DNA 在靶细胞中表达来治疗癌症。

(7)可通过第 3 节中所述的方法，使用 ICAT 作为抗原，生成能识别 ICAT 的抗体。

(8)通过使用识别 ICAT 的抗体可检测 ICAT。具体地说，该方法包括以下检测方法：如使用微滴板的 ELISA，荧光抗体法，Western 印迹或免疫组织染色。

(9)通过使用识别 ICAT 的抗体可定量 ICAT。具体地说，该方法包括：夹心 ELISA，所述 ELISA 使用了两类能与液相中的 ICAT 反应，并具有不同表位的单克隆抗体；放射-免疫测定法，该方法使用了经放射性同位素，如 ^{125}I 标记的 ICAT 和识别 ICAT 的抗体等。

附图简述

图 1A 显示了小鼠 ICAT cDNA 和人 ICAT cDNA 中的 ORF 位置。图 1B 显示了小鼠 ICAT 和人 ICAT 之间的氨基酸序列比较。

图 2 显示了小鼠组织中 ICAT mRNA 的 Northern 印迹结果。从左开始为：睾丸，肾脏，骨骼肌，肝脏，肺，脾脏，脑，心脏；和第 7 天，第 11 天，第 15 天，第 17 天胎儿。右边显示的数字对应于链长标记的位置。

图 3 显示了用抗-ICAT 抗体免疫沉淀之后进行的 Western 印迹结果。左边的两个泳道含有小鼠脑提取物；右边的两个泳道含有 COS-7 细胞样品，所述细胞中已导入了 ICAT 表达载体。Ag+意味着泳道含有样品，其中在用抗原肽处理之后使用了抗-ICAT 抗体。

图 4 显示了经 ^{35}S -标记的蛋白质与 GST/ICAT 或 GST 的结合。自左边起，各个蛋白质是 β -连环蛋白， β -连环蛋白的 N 末端部分(残基 1 至 140 的氨基酸序列)， β -连环蛋白的犹猴结构域(残基 141 至 664 的氨基酸序列)， β -

5 连环蛋白的 C 末端部分(残基 665 至 782 的氨基酸序列), DVL-1, GSK-3 β , APC, Axin 和 TCF-4。最上方的一组实验显示了对体外翻译中所得产物进行 SDS-PAGE 后的放射自显影模式; 箭头表示目的蛋白质的位置。中间的一组实验显示了对与 GST/ICAT 结合的组分进行 SDS-PAGE 后的放射自显影模式; 最下方的一组实验显示了对与 GST 结合的组分进行 SDS-PAGE 后的放射自显影模式。右边的数字表示以 kDa 计的分子量标记的位置。

10 图 5 表示用抗-ICAT 抗体或抗- β -连环蛋白抗体免疫沉淀之后的 Western 印迹结果。最上方和最下方实验组的样品是小鼠脑提取物, 中间一组实验使用的样品是 COS-7 细胞, 其中已导入了 ICAT 表达载体。左边两个泳道含有与抗-ICAT 抗体的免疫沉淀物; 右边两个泳道含有与抗- β -连环蛋白抗体的免疫沉淀物。在上方, 中间或下方实验组中, 分别将抗- β -连环蛋白抗体, 抗-ICAT 抗体或抗-TCF-4 抗体用作第一抗体, 这些实验组中显示出 Western 印迹。

15 图 6 显示了在 293 细胞中使用萤光素酶报道质粒 pTOPtkLuciferase 检测 β -连环蛋白/TCF-4-介导的转录激活的结果。上方 4 个泳道中不使用 S33Y 突变 β -连环蛋白; 其余 4 个泳道表达了 S33Y 突变 β -连环蛋白。泳道 1 和 5 仅含有对照载体; 泳道 2 和 6 含有导入的 ICAT 表达载体; 泳道 3 和 7 含有导入的 ICAT(13-81)表达载体; 泳道 4 和 8 含有导入的 ICAT(E37-39A)表达载体。

20 图 7 显示了在 DLD-1 细胞(上方的一组实验)和 HCT116 细胞(下方的一组实验)中使用萤光素酶报道质粒 pTOPtkLuciferase 检测与 β -连环蛋白/TCF-4-相关的转录激活的结果。左边一组显示了 ICAT 表达载体的实验结果; 中间一组显示了 ICAT(13-81)表达载体的实验结果; 右边一组显示了 ICAT(E37-39A)表达载体的实验结果。从上往下, 是使用 0, 0.1, 0.25, 0.5 或
25 1 μ g 各种 ICAT 或突变 ICAT 的表达载体所获得的结果。

实施本发明的最佳模式

以下将参照实施例详细描述本发明。

30 实施例 1 克隆 ICAT cDNA

通过酵母双-杂种体系克隆编码能结合小鼠 m β -连环蛋白臂区的蛋白质的基因。

(1)制备 m β -连环蛋白臂区的诱饵质粒

小鼠 β -连环蛋白 cDNA 的核苷酸序列和由该 cDNA 编码的小鼠 β -连环蛋白的氨基酸序列是公知的(GenBank 登录号为 M90364, 科学, 257, 1142(1992))。小鼠 β -连环蛋白在其氨基酸序列的残基 141 至 664 区域含有被称为狢狢结构域的重复序列(m β -连环蛋白臂区)。通过使用小鼠细胞的 cDNA 为模板进行 PCR, 扩增并分离编码该 m β -连环蛋白臂区部分的小鼠 β -连环蛋白 DNA 片段。根据编码上述 m β -连环蛋白臂区的 cDNA 部分的核苷酸序列设计 PCR 引物。测序经扩增的 DNA 片段, 以证实其编码 m β -连环蛋白臂区, 然后将该片段插入载体 pGBT9(Clontech)的 BamHI/SalI 位点之间, 以制备表达 GAL4- β -连环蛋白融合蛋白的质粒, 其中 β -连环蛋白与 GAL4 BD 融合。

(2)使用双-杂种体系进行筛选

用 MATCHMAKER 小鼠胚胎(Swiss Webster/NIH 小鼠; 17 天龄的胚胎)cDNA 文库进行筛选, 所述文库是用于双-杂种体系的文库, 是由 Clontech 提供的。该 cDNA 文库含有具有 cDNA 插入物的载体 pGAD10(Clontech), 所述载体含有参与酵母亮氨酸生物合成的基因 LEU2 作为选择标记, 通过利用 ADH1 启动子, 所述载体可表达 GAL4 AD 和 cDNA-编码蛋白质的融合蛋白。根据购自 Clontech 的文库中所附手册所用的具体筛选方法如下:

具体地说, 将双-杂种体系所用的小鼠胎 cDNA 文库和(1)中制备的质粒 GAL4- β -连环蛋白导入酿酒酵母 HF7C 菌株(Clontech)。HF7C 菌株是色氨酸-, 亮氨酸-和组氨酸-营养缺陷型的酵母菌株, 在其染色体上, 具有参与组氨酸生物合成的基因 HIS3 作为报道基因, 所述基因已被连接至可结合 GAL4 BD 的 GAL1 启动子的下游, 还具有得自大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因 lacZ, 该基因已被连接至可结合 GAL4 BD 的核苷酸序列的下游(基因, 212, 197(1998))。含有质粒 GAL4- β -连环蛋白和能结合 m β -连环蛋白臂区的蛋白质的 cDNA 克隆, 并能表达各个融合蛋白的转化子为非组氨酸营养缺陷型, 并且为 β -半乳糖苷酶活性阳性, 这是因为 m β -连环蛋白臂区 和结合蛋白质之间的结合使得 GAL4 BD 被置于与 GAL4 AD 相邻的位置, 位于可结合 GAL4 BD 的核苷酸序列下游的 HIS3 基因和 lacZ 基因的转录因而被激活。

最后从 2.3×10^7 个在不含任何亮氨酸，组氨酸和色氨酸的培养基上生长的转化子中选择 4 个 β -半乳糖苷酶活性阳性克隆。

从这些克隆中回收质粒 DNA，测定插入 cDNA 的核苷酸序列。这 4 个克隆享有相同的 cDNA 序列。在核苷酸序列数据库中检索与该核苷酸序列的同源性。尽管有一些小鼠 EST 的核苷酸序列与该序列相同，但未发现有已知的基因与该核苷酸序列相同。因此，可以证实通过双-杂种体系分离的上述 cDNA 是得自新基因的 cDNA。由该新基因编码的蛋白质被称为 ICAT。

在所发现的 EST 核苷酸序列中，一部分序列与通过双-杂种体系获得的 cDNA 相比，在 5' 侧延长。因此，根据其中一个 EST (GenBank 登录号为 AA017805) 的 5' 末端的核苷酸序列制备 PCR 有义引物，再根据小鼠 EST (GenBank 登录号为 AA253623) 的核苷酸序列制备反义引物，所述小鼠 EST 具有与上述 ICAT cDNA 相同的核苷酸序列。使用这些引物，并使用小鼠胎 cDNA 文库 (Clontech) 为模板，经 PCR 扩增含有在 5' 侧延长的核苷酸序列的 cDNA 片段，然后测序。通过连接经双-杂种体系制备的 cDNA 克隆的核苷酸序列和经 PCR 揭示的 cDNA 核苷酸序列，得到 SEQ ID NO:3 所示的小鼠 ICAT cDNA 的完整核苷酸序列。在该核苷酸序列中有多个开放阅读框 (ORF)。含有 50 或更多个氨基酸的这种 ORF 是残基 1 至 273 (91 个氨基酸；其中不含起始密码子)；残基 167 至 409 (81 个氨基酸)；残基 447 至 647 (67 个氨基酸)；残基 1122 至 1304 (61 个氨基酸) 和残基 1711 至 2373 (221 个氨基酸) (图 1A)，但仅根据核苷酸序列，仍不清楚哪一个是真正编码 ICAT 的 ORF。最靠近 5'-端起始密码子的 81 个氨基酸的 ORF (SEQ ID NO:6；对应于 SEQ ID NO:1 核苷酸序列中的残基 167 至 409) 被假设为编码 ICAT 的部分。SEQ ID NO:4 中将该 ORF 的氨基酸序列显示为小鼠 ICAT 的氨基酸序列。在氨基酸序列数据库中检索该氨基酸序列的同源性，但未找到具有高同源性的氨基酸序列。

(3) 克隆人 ICAT cDNA

在 GenBank 核苷酸序列数据库中检索与 (2) 中所得小鼠 ICAT cDNA 的核苷酸序列具有同源性的人核苷酸序列，结果表明一些 EST 表现出高同源性。另外，通过检测与这些 EST 或得自同一克隆的 EST (在单个 cDNA 克隆中，一般有两个 EST，即 5' 末端序列和 3' 末端序列的 EST) 共享序列的 EST，来收集据认为得自人 ICAT cDNA 的 EST，根据核苷酸序列分析所得 EST 以

测定每个 EST 对应于人 ICAT cDNA 的哪一部分。为力，通过测定这些 EST 的核苷酸序列是否位于测定核苷酸序列所用 cDNA 克隆的 5' 方向或 3' 方向，可以估计出 cDNA 克隆含有全长人 ICAT cDNA 的哪一部分。根据分析结果，在这些 EST 中选择 GenBank 登录号为 AA478738, W73346 和 AA428913 的 EST，然后从 I. M. A. G. E. consortium 获得用于测定这些 EST 核苷酸序列的亲代 cDNA 克隆，即克隆 IMAGE75366(5' 方向 EST 是 AA478738; 假设该 cDNA 克隆含有人 ICAT cDNA 的 5' 末端), IMAGE344405(3' 方向 EST 是 W73346; 假设该 cDNA 克隆含有人 ICAT cDNA 的中间部分)和 IMAGE759649(5' 方向 EST 是 AA428913; 假设该 cDNA 克隆含有人 ICAT cDNA 的 3' 末端)。通过按下述方法装配这些 cDNA 克隆中所包含的 cDNA，可制备出几乎覆盖了全长人 ICAT cDNA 的 cDNA 克隆 phICAT。

首先进行 PCR，所述 PCR 使用 IMAGE75366 为模板，并使用(a)有义引物，其中在与 cDNA 部分的 5' 末端相邻的核苷酸序列(具体地说，是与 AA478738 的 5' 末端相邻的核苷酸序列，并对应于 SEQ ID NO:1 的第 9 个核苷酸后面的序列)的 5' 方向添加了一个 EcoRI 位点，和(b)反义引物，其含有位于 SEQ ID NO:1 第 742 位的 PstI 位点及其下游核苷酸序列；用 EcoRI 和 PstI 消化约为 760bp 的扩增 DNA 片段以分离该片段。然后用 PstI 和 EcoRI 消化 IMAGE 759649，分离含有载体 pT7T3D-Pac 和人 ICAT cDNA 3' 部分(在位于 SEQ ID NO:1 第 980 位残基的 PstI 之后的部分)的 DNA 片段。用 PstI 消化通过连接这两个部分而制备的质粒(在该质粒的 cDNA 中缺失了 SEQ ID NO:1 的残基 747 至 979 的序列)，然后通过用碱性磷酸酶处理，除去消化所产生的末端磷酸基团以防止自身连接。将该 DNA 与用 PstI 消化 IMAGE344405 之后分离的约 240bp 的 DNA 片段连接。通过测定 PstI 位点附近的核苷酸序列，将在所需方向上已插入 PstI 片段的质粒克隆选定为几乎含有全长人 ICAT cDNA 的 cDNA 克隆，然后将所得克隆称为 phICAT。测定 phICAT 中 cDNA 的完整核苷酸序列以确定人 ICAT cDNA 的核苷酸序列。在该核苷酸序列中，在制备 phICAT 的过程中，已除去 phICAT cDNA 核苷酸序列 5' 末端的 8 个核苷酸(对应于 AA478738 核苷酸序列中的残基 1 至 8)，因此，其中已添加了该段核苷酸序列的一个核苷酸序列在 SEQ ID NO:1 中被表示为全长人 ICAT cDNA 的核苷酸序列。如图 1A 所示，在这一人 ICAT cDNA 的核苷酸序列中，有几个编码 50 或更多个氨基酸的 ORF(残

基 2 至 210(70 个氨基酸; 不含起始密码子); 残基 274 至 516(81 个氨基酸); 残基 545 至 709(55 个氨基酸); 残基 1206 至 1388 (61 个氨基酸), 残基 1822 至 2025(68 个氨基酸); 和残基 2547 至 2864(106 个氨基酸)。然而, 当比较得自人和小鼠的每个 ICAT cDNA 中 ORF 所处的位置及其由 ORF 编码的氨基酸序列时, 只有编码对应于人 ICAT cDNA 的核苷酸残基 274 至 516 的 81 个氨基酸的 ORF 表现出与小鼠 ICAT 氨基酸序列的同源性, 该 ORF 与小鼠 cDNA 中的 ORF 位于相似的位置。该 ORF 对应于(2)中假设的编码小鼠 ICAT 的推定 ORF, 并与后者具有同源性。因此揭示出编码 ICAT 的区域正如所假设的那样, 是 SEQ ID NO:3 所示小鼠 ICAT cDNA 的残基 167 至 409(SEQ ID NO:6)区域, 或 SEQ ID NO:1 所示人 ICAT cDNA 的残基 274 至 516(SEQ ID NO:5)区域。人 ICAT DNA 的核苷酸序列示于 SEQ ID NO:5, 人 ICAT 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:2。人 ICAT 和小鼠 ICAT 氨基酸序列之间的序列比较示于图 1B。人和小鼠 ICAT 之间唯一的差别是 81 个氨基酸中的 2 个氨基酸。

15 实施例 2 通过 Northern 印迹分析 ICAT 基因的表达

使用经随机引物标记法标记的, 实施例 1 中所得小鼠 ICAT cDNA 为探针, 对 MTN BLOT(Clontech)进行 Northern 印迹, MTN BLOT 是印迹有得自多个成年小鼠器官(心脏, 脑, 脾脏, 肺, 肝脏, 骨骼肌, 肾脏和睾丸)和小鼠胎(第 7, 11, 15, 17 天)的 poly(A)⁺ RNA 的滤膜。

20 结果示于图 2。检测到 2.6kb 的 ICAT mRNA 片断。在成年小鼠器官中, mRNA 在心脏, 脑, 肝脏和骨骼肌中以高水平表达, 而在肾脏, 睾丸, 脾脏和肺中的表达水平较低。在整个胎儿阶段, mRNA 以相同的水平表达。

实施例 3 制备抗-ICAT 抗体

25 通过肽合成仪合成肽(氨基酸序列: Ala Phe Ser Arg Ser Glu Thr Glu Asp Arg Arg Gln), 所述肽对应于小鼠和人 ICAT 氨基酸序列 C 末端的第 70 至 81 位残基。通过使用 MBS 为间隔将肽与 KLH 偶联, 然后将其用作抗原来免疫兔。免疫方法如下: 第一次免疫时皮下注射 1mg 抗原, 第二次免疫之后, 以 10 天为间隔皮下注射 0.5mg 抗原。自第三次免疫起, 从兔体内收集血清, 通过 ELISA 检测该血清与上述肽的反应性, 从而测定皮下注射后的抗体滴度。当滴度足够高时, 从兔中收集全血清, 以得到抗-ICAT 的抗血清。对抗-ICAT 血清进行硫酸铵沉淀处理, 然后透析。通过利用亲和柱从透析液中

纯化并得到抗-ICAT 多克隆抗体，在所述亲和柱中，用作抗原的肽已被固定在 EAH-Sepharose(Amersham-Pharmacia Biotech)载体上。下文将纯化的抗-ICAT 多克隆抗体称为抗-ICAT 抗体。下文实施例 4 至 7 中表明该抗体对小鼠 ICAT 具有特定的反应性。

5 实施例 4 在大肠杆菌中表达重组 ICAT 并进行检测

(1)在大肠杆菌中表达 ICAT

将小鼠 ICAT cDNA 亚克隆至大肠杆菌谷胱甘肽-S-转移酶(GST)表达质粒载体 pGEX5X-1(Amersham-Pharmacia Biotech)的 EcoRI/SalI 位点之间，以制备融合蛋白表达质粒，其中 ICAT 在 GST 的 C 末端融合(下文简称为 GST/ICAT)。用该质粒转化大肠杆菌，然后进行培养。为了进行对照，同时还培养用 pGEX5X-1 转化的大肠杆菌(该大肠杆菌仅表达 GST)。

(2)通过免疫沉淀和 Western 印迹检测 ICAT

回收(1)中培养的转化子，然后在其中加入含有 1% Triton X-100 的缓冲液 A(裂解缓冲液 A；缓冲液 A 的组成：10mM Tris-HCl(pH8.0), 140mmol/L NaCl, 1mmol/L EGTA, 10 μ g/ml 亮抑蛋白酶肽, 10 μ g/ml 抑蛋白酶肽)以裂解细菌。于 4 $^{\circ}$ C，使细胞裂解物与实施例 3 中所得的抗-ICAT 抗体反应 1 小时，以在 GST/ICAT 和抗体之间形成复合物，然后在反应溶液中加入具有结合 IgG 之特性的 G 蛋白-Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia Biotech)以吸附免疫复合物。用裂解缓冲液 A 充分洗涤 G 蛋白-Sepharose 4B 之后，加入 SDS-PAGE 样品缓冲液以洗脱免疫复合物。将洗脱液用作 SDS-PAGE 的样品，然后转移至 PVDF 膜(Immobilon P; Millipore)。通过使用抗-ICAT 抗体作为第一抗体，并使用与碱性磷酸酶缀合的抗-兔 IgG 抗体(山羊)作为第二抗体，用上述膜检测 ICAT。

结果表明：在表达 GST/ICAT 的大肠杆菌中，GST/ICAT 和抗-ICAT 抗体之间发生反应，结果可检测到一条带，而在表达 GST 的对照大肠杆菌中未检测到条带。由此揭示出实施例 3 中所得的抗-ICAT 抗体可能就是能与 ICAT 特异性反应的抗体，正因为它是这样一种抗体，因而才能在免疫沉淀和 Western 印迹中都能检测到 ICAT。

实施例 5 在动物细胞中表达和检测重组 ICAT

30 将实施例 1 中所得的小鼠 ICAT cDNA 亚克隆至动物细胞表达质粒载体 pMKITneo(Nakamura 等, Genes to Cells, 3, 395(1998))的 EcoRI/ SalI 位点之

间，以制备动物细胞中的 ICAT 表达质粒。用 Lipofect-AMINE(Life Technologies)将质粒 DNA 导入猴肾细胞系 COS-7 (ATCC: CRL-1651)。48 小时之后，回收细胞，按照与实施例 4 中相同的方法制备细胞裂解物，然后在用抗-ICAT 抗体免疫沉淀之后，通过 Western 印迹进行检测。如图 3 所示，结果显示检测到 9-kDa 的蛋白质带。9kDa 的分子量类似于由 ICAT 的氨基酸序列估计出的分子量。另外，当预先使抗-ICAT 抗体与免疫所用的 ICAT 部分肽反应，然后再进行免疫沉淀反应时，就检测不到 ICAT 带，因此抗体和 ICAT 之间的反应受到抑制。

实施例 6 通过体外翻译系统合成 ICAT 并用抗体进行检测

10 在体外，通过使用 TNT-网织红细胞裂解物系统(Promega)，由小鼠 ICAT mRNA 翻译并合成 ICAT。在按照与实施例 4 所述相同的方法，使用抗-ICAT 抗体进行免疫沉淀之后，对合成的 ICAT 进行 Western 印迹，检测到 ICAT 带。因此，由体外翻译系统合成的 ICAT 也能与抗-ICAT 抗体结合，并与之形成免疫复合物。

15 实施例 7 使用抗体检测小鼠脑中的 ICAT

在裂解缓冲液 A 中，使用 Dounce 匀浆仪破碎 49 天龄小鼠的大脑以制备裂解物。在按照与实施例 4 所述相同的检测方法，使用抗-ICAT 抗体进行免疫沉淀之后，对裂解物进行 Western 印迹。如图 3 所示，结果表明检测到 9-kDa 的蛋白质带。由于实施例 5 中也检测到 9-kDa 的蛋白质，因此大脑中的 ICAT 基因产物被认为是 9-kDa 的蛋白质。另外，由此揭示出实施例 3 中所得的抗-ICAT 抗体是能与组织中的 ICAT 反应的抗体，正因为它是这样一种抗体，因而才能在免疫沉淀和 Western 印迹中都能检测到 ICAT。

实施例 8 分析 ICAT 和 β -连环蛋白之间的结合

(1)体外检测直接结合

25 按下述证实 ICAT 和 β -连环蛋白的直接结合。

在体外，通过使用 ^{35}S -标记的甲硫氨酸 TNT-网织红细胞裂解物系统 (Promega)，由小鼠 β -连环蛋白 mRNA 翻译并合成 ^{35}S -标记的 β -连环蛋白。培养实施例 3 中制备的表达 GST/ICAT 的大肠杆菌以及表达 GST 的对照大肠杆菌，得到各自的细菌裂解物。在这些细菌裂解物中加入谷胱甘肽-Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia Biotech)，GST/ICAT 或 GST 吸附于其上，对其分离，于 4 $^{\circ}\text{C}$ ，在含有 0.1% Triton X-100 的缓冲液 A 中，使吸附

有 GST/ICAT 或 GST 的谷胱甘肽- Sepharose 4B 与上述经 ^{35}S -标记的 β -连环蛋白反应 2 小时。用缓冲液 A 充分洗涤谷胱甘肽- Sepharose 4B, 然后在其中加入 SDS-PAGE 样品缓冲液以将结合的蛋白质洗脱至样品缓冲液中。将洗脱液用作凝胶浓度为 15% 的 SDS-PAGE 的样品, 然后通过放射自显影肉眼观察凝胶。结果表明: 在表达 GST/ICAT 的大肠杆菌中, 检测到经 ^{35}S -标记的 β -连环蛋白带, 而在表达 GST 的大肠杆菌中未检测到该带。由此证实 GST/ICAT 在体外与 β -连环蛋白直接结合, 负责结合 β -连环蛋白的位点位于 GST/ICAT 的 ICAT 组成成分内。

(2) 负责与 ICAT 结合的 β -连环蛋白区域

按下述测定负责与 ICAT 结合的 β -连环蛋白区域。通过 PCR 扩增编码小鼠 β -连环蛋白的狢狢结构域(氨基酸序列中的残基 141 至 664), N 末端部分(氨基酸序列中的残基 1 至 140)和 C 末端部分(氨基酸序列中的残基 665 至 782)区域的 DNA 片断。通过使用 DNA, 合成 mRNA, 并在经 ^{35}S -标记的甲硫氨酸的存在下, 通过 TNT-网织红细胞裂解物系统(Promega)体外翻译所述 mRNA, 以合成对应于各个区域的经 ^{35}S -标记的部分 β -连环蛋白。通过按照与上述相同的方法进行免疫沉淀, 检测各个经 ^{35}S -标记的部分 β -连环蛋白与 GST/ICAT 的体外结合情况。如图 4 所示, 用狢狢结构域部分观察到与 GST/ICAT 的结合, 但用 N 末端或 C 末端部分未检测到结合。由此证实 ICAT 可直接结合 β -连环蛋白的狢狢结构域。这一事实与实施例 1 中小鼠 ICAT cDNA 作为编码能与小鼠 β -连环蛋白的狢狢结构域结合的蛋白质的 DNA 被获得的事实相符。

(3) ICAT 与 β -连环蛋白的结合特异性

按下述方法证实 ICAT 特异性结合 β -连环蛋白。

按照与(1)中相同的方法, 在经 ^{35}S -标记的甲硫氨酸的存在下, 通过体外翻译系统合成除 β -连环蛋白外的蛋白质 APC, DVL-1, GSK-3 β , Axin 和 TCF-4(对 APC 而言, 仅合成 APC 氨基酸序列的残基 453 至 767)。按照与上述相同的方法, 检测各个经 ^{35}S -标记的蛋白质与 GST/ICAT 的体外结合情况。结果示于图 4。GST/ICAT 不能结合除 β -连环蛋白外的这些蛋白质。因此, 可以证明 ICAT 与 β -连环蛋白的结合具有特异性。

据报道, TCF-4 和 β -连环蛋白相互结合形成复合物。当将通过体外翻译系统合成的经 ^{35}S -标记的 β -连环蛋白和经 ^{35}S -标记的 TCF-4 加入上述系统,

并与 GST/ICAT 反应时，能同时检测到 β -连环蛋白，TCF-4 和 GST/ICAT。由此证明 ICAT 可直接结合 β -连环蛋白/TCF-4 复合物(下文称之为 β -连环蛋白/TCF-4)。

(4)细胞中 ICAT 和 β -连环蛋白之间的结合

5 在使用实施例 5 制备的，表达小鼠 ICAT 的 COS-7 细胞进行免疫沉淀和 Western 印迹以检测 ICAT 的实验中，用抗- β -连环蛋白单克隆抗体(Transduction Laboratory; 用于免疫的动物是小鼠)替代抗-ICAT 抗体进行免疫沉淀，用抗-ICAT 抗体作为第一抗体进行 Western 印迹以进行检测。结果示于图 5 的中间一组图。检测到 ICAT 条带，由此证实在细胞中 ICAT 能与
10 β -连环蛋白结合。然而，在此实验中，在免疫沉淀中使用了预先已与 GST/ β -连环蛋白反应的抗- β -连环蛋白抗体，由于对免疫沉淀的抑制作用，因而检测不到 ICAT 条带。

在使用实施例 6 中的小鼠脑裂解物进行免疫沉淀和 Western 印迹以检测 ICAT 的实验中，用抗-ICAT 抗体进行免疫沉淀，然后用抗- β -连环蛋白单克
15 隆抗体(Transduction Laboratory; 用于免疫的动物是小鼠)作为第一抗体进行 Western 印迹以进行检测。结果示于图 5 上方的一组图，检测到 β -连环蛋白条带，由此证实在小鼠活体中 ICAT 也能与 β -连环蛋白结合。然而，在此实验中，在免疫沉淀中使用了预先已与 GST/ICAT 反应的抗-ICAT 抗体，由于对免疫沉淀的抑制作用，因而检测不到 β -连环蛋白条带。

20 另外，当在相同的实验中，使用抗-TCF-4 抗体(通过按照与制备抗-ICAT 抗体相同的方法，用含有对应于 TCF-4 C 末端 20 个氨基酸的氨基酸序列的部分肽免疫兔，然后测定滴度而制备的纯化抗体)作为第一抗体进行 Western 印迹时，可检测到 TCF-4 条带(图 5 下方的一组图)。由于已揭示出如(3)中所示，ICAT 不能直接结合 TCF-4，据认为，在小鼠活体中，ICAT 经由
25 β -连环蛋白与 β -连环蛋白/TCF-4 结合。

实施例 9 ICAT 的亚细胞定位

通过双重荧光抗体法检测人结肠癌细胞系 SW480 中的 ICAT 和 β -连环蛋白。具体地说，使细胞与抗-ICAT 抗体和抗- β -连环蛋白抗体反应，然后，与作为第二抗体的经 FITC-标记的抗-兔 IgG 抗体(Cappel; 能与抗-ICAT 抗
30 体结合)和经 RITC-标记的抗-小鼠 IgG 抗体(Cappel; 能与抗- β -连环蛋白抗体

结合)反应; 在荧光显微镜(奥林巴斯; AH2-FL)中分别检测细胞中的 ICAT 和 β -连环蛋白。结果表明 ICAT 和 β -连环蛋白都位于核中。

实施例 10 由 ICAT 介导的对 β -连环蛋白和 TCF 所致转录激活的抑制作用

5 如实施例 8 所示, 已阐明 ICAT 能与 β -连环蛋白/TCF-4 结合。 β -连环蛋白/TCF-4 具有经由与靶基因结合而激活靶基因转录的活性(下文将该活性称为转录激活活性)。因此, 研究了 ICAT 对 β -连环蛋白/TCF-4 所介导的转录激活活性的影响。具体按下述进行研究。

10 β -连环蛋白可被 GSK-3 β 磷酸化。在一些结肠癌细胞系和黑素瘤细胞系中, 在 β -连环蛋白基因内的位点发现了突变, 所述位点对应于被磷酸化的位点。据报道, 这些细胞系中的 β -连环蛋白很难被降解, 因此, β -连环蛋白/TCF-4 的转录激活活性升高。当通过利用下述报道基因在细胞中表达无磷酸化的突变 β -连环蛋白时, 可构建一个系统来检测 β -连环蛋白/TCF-4 的转录激活活性, 然后再研究 ICAT 对此系统的作用。

15 首先, 制备质粒以表达突变的 β -连环蛋白 S33Y(下文简称为 S33Y), 其中被 GSK-3 β 磷酸化的第 33 位残基丝氨酸已被酪氨酸取代。然后, 将 0.5 μ g 质粒 pTOPtkLuciferase, 1.0 μ g S33Y 表达质粒, 2.0 μ g 载体 MKITneo, 0.05 μ g 质粒 pRL-TK(Promega)共转染至 6×10^5 个人肾细胞系 293(ATCC: CRL-1573) 的细胞, 然后在培养皿(直径为 60mm)中培养细胞, 其中通过
20 pTOPtkLuciferase, 可在启动子(此启动子所致的转录激活受 β -连环蛋白/TCF-4 的影响)的调节下表达作为报道基因的萤光素酶基因, 在所述启动子中, 3 个 TCF-结合位点(核苷酸序列为 CCTTTGATC)被插入胸苷激酶基本启动子的上游, 在所述基本启动子中, 除了启动子外不含调节位点, 质粒 pRL-TK 被用作对照, 作为基因导入效率的指标。使用由 Promega 提供的
25 萤光素酶检测系统试剂盒导入 40 小时后, 通过检测报道基因产物, 即萤光素酶的活性, 测定由启动子介导的转录水平。另外, 通过使用 3.0 μ g MKITneo 替代 S33Y 表达质粒, 同时对对照进行相同的萤光素酶活性测定以比较转录水平。在此比较中, pRL-TK 的表达水平被用作基因导入的效率以使萤光素酶活性标准化。当导入 S33Y 表达质粒时, 与对照相比, 萤光素酶活性, 即
30 转录水平有所提高。由此表明突变型 β -连环蛋白 S33Y 具有组成型激活转录的特性(图 6)。使用质粒 pFOPTkLuciferase 而不是 pTOPtkLuciferase 作为阴

性对照，进行相同的萤光素酶活性检测，在 pFOPtkLuciferase 中，上述 pTOPtkLuciferase 中所含的 TCF 结合位点已转变为 TCF 不能结合的核苷酸序列(CCTTTGGCC)。在此条件下，尽管导入了 S33Y 表达质粒，也未提高转录水平，因此，可以证实转录水平是通过 TCF 结合位点提高的。

5 在上述 β -连环蛋白/TCF-4 的转录激活活性检测系统中，以连续增加的量，即 0, 0.1, 0.25, 0.5 或 1 μ g 同时导入 ICAT 表达质粒。导入的 ICAT 表达质粒 DNA 量的增加导致对转录水平升高的抑制作用，最终，转录水平降低至与仅导入载体 MKITneo 时相同。

10 制备使用小鼠乳腺癌细胞系 C57MG 而不是 293 细胞作为宿主的检测系统，以测定 β -连环蛋白/TCF-4 的转录激活活性。与在 293 细胞中的情形相同，在此系统中导入 S33Y 表达质粒也会使报道基因的转录水平提高。在上述系统中，所用 TCF-4 是细胞内源性 TCF-4。然而，当在此系统中再导入 TCF-4 表达质粒时，能进一步提高转录水平。当在此检测系统中导入 ICAT 表达质粒以表达 ICAT 时，与在 293 细胞中的情形一样，转录水平的增加受到抑制。由此说明 ICAT 抑制 β -连环蛋白/TCF-4 介导的转录激活的作用不依赖于细胞类型。

15 在因基因突变致使 APC 功能受损的结肠癌细胞系中，据认为由于 β -连环蛋白的稳定化，组成型出现 β -连环蛋白/TCF-4 介导的转录激活。因此，在缺乏 S33Y 表达质粒时，使用人结肠癌细胞系 SW480(ATCC: CCL-228)，20 DLD-1(ATCC: CCL-221)，SW48(ATCC: CCL-231)或 HCT116，而不是 293 细胞作为宿主细胞(因为利用了组成型激活的内源性 β -连环蛋白/TCF-4)，来构建上述 β -连环蛋白/TCF-4 的转录激活活性检测系统。在这些系统中导入 ICAT 表达质粒以表达 ICAT，与上述情况相同，观察到对转录水平增加的抑制作用。DLD-1 和 HCT116 的结果示于图 7。如图 7 所示，发现 ICAT 也具有抑制转录的活性，所述转录是由因 APC 突变的存在而被组成型激活的 β -25 连环蛋白/TCF-4 介导的。

根据上述发现，认为 ICAT 可经由与细胞中的 β -连环蛋白/TCF-4 结合并抑制转录来调节细胞中与 β -连环蛋白/TCF-4 相关的信号传导。另外，关于上述检测系统，在因 APC 或 β -连环蛋白发生突变而由 β -连环蛋白/TCF-4 介导组成型转录激活的系统中，强行表达 ICAT 导致对转录的抑制作用。因此，30 可以认为当癌细胞具有 APC 或 β -连环蛋白突变，细胞中由 β -连环蛋白/TCF-4

介导的转录激活为组成型时，通过施用 ICAT 或通过细胞中强行表达 ICAT，以调节癌细胞中的转录即可治疗癌症。

实施例 11 制备 ICAT 突变体并评价它与 β -连环蛋白的结合特性

(1)与同 β -连环蛋白的结合相关的区域

5 按下述通过双-杂种体系测定 ICAT 缺失突变体和 β -连环蛋白之间的结合，从而估计出参与结合 β -连环蛋白的 ICAT 区域。

通过将经 PCR 扩增的，编码各个小鼠 ICAT 突变体的部分 DNA 片段插入载体 pGAD424(Clontech)，制备可被双-杂种体系利用的，用于表达下述 ICAT 缺失突变体的质粒，所述突变体被表达成 GAL4 AD 融合蛋白。

10 (a) ICAT(1-61); (b) ICAT(1-41); (c) ICAT(13-81); (d) ICAT(21-81); (e) ICAT(42-81); (f) ICAT(42-61); (g) ICAT(21-61); (h) ICAT(13-41)和 (i) ICAT(13-61): 括号中的数字对应于在 ICAT 序列中被表达的区域氨基酸编号; 例如, ICAT(1-61)表示含有序列的第 1 至 61 位氨基酸残基的 ICAT 衍生物。

15 另外, 由于负责与 β -连环蛋白结合的所有区域富含其它能与 β -连环蛋白结合的蛋白质, 如钙粘着蛋白, APC 和 TCF-4 中的酸性氨基酸, 通过 PCR 扩增编码 ICAT 突变体((j)ICAT(E37-39A))的 DNA, 其中, 位于第 37, 38 和 39 位残基的谷氨酸残基被转变为丙氨酸, 在所述 PCR 利用的引物中, 对应于第 37, 38 和 39 位残基的谷氨酸残基原始密码子(GAG 或 GAA)中第 2 位的
20 腺嘌呤核苷酸被转变为胞嘧啶核苷酸(转变为丙氨酸的密码子 GCG 或 GCA)。将此 DNA 插入载体 pGAD424(Clontech), 以制备 GAL4 AD 与 ICAT(E37-39A)的融合蛋白的表达质粒, 所述质粒可用于双-杂种体系。

按照与实施例 1 相同的方法, 将这些 GAL4 AD-ICAT 突变体融合蛋白表达质粒中的每一个与 m β -连环蛋白臂区的诱饵质粒 GAL4- β -连环蛋白一起
25 导入酵母 HF7C 菌株, 然后根据转化子中 β -半乳糖苷酶活性的存在来评价每种 ICAT 突变体与 β -连环蛋白的结合。结果表明: (a)ICAT(1-61), (c)ICAT(13-81)和(i)ICAT(13-61)与 β -连环蛋白结合, 但其余的缺失突变体不与 m β -连环蛋白臂区结合。因此说明 N 末端的 12 个氨基酸和 C 末端的 20 个氨基酸都不参与结合, 具体地说, 氨基酸序列中的残基 13 至 61 区域对于
30 于与 β -连环蛋白的结合而言是至关重要的。另外, (j)ICAT(E37-39A)不与 m β -

连环蛋白臂区结合。因此说明连续的谷氨酸残基 37 至 39 对于与 β -连环蛋白的结合而言是至关重要的。

另外，按照与实施例 8 相同的方法，在大肠杆菌中将 ICAT (E37-39A) 表达为 GST 融合蛋白，以评价与 β -连环蛋白的体外结合，结果表明它不与 β -连环蛋白结合。另外，按照与实施例 5 相同的方法制备动物细胞表达质粒，在所述质粒中，编码 ICAT(E37-39A)的 DNA 被亚克隆至载体 pMKITneo，然后在 COS-7 细胞中表达该质粒。按照与实施例 8 相同的方法评价与 β -连环蛋白的体内结合，结果表明未检测到结合。此外，当在按实施例 10 所述制备的 β -连环蛋白/TCF-4 转录激活活性检测系统中，使用 ICAT(E37-39A) 突变体替代 ICAT 时，ICAT(E37-39A)也不能抑制 β -连环蛋白/TCF-4 的转录激活活性(图 7)。

(2)ICAT(13-81)突变体对 β -连环蛋白/TCF-4-介导的转录激活的作用

在按实施例 10 所述制备的 β -连环蛋白/TCF-4 转录激活活性检测系统中，表达 ICAT(13-81)突变体以替代 ICAT。尽管如(1)中所示，该 ICAT(13-81)突变体能结合 β -连环蛋白，但该突变体不能抑制 β -连环蛋白/TCF-4 的转录激活活性(图 7)。该结果表明 N 末端的 12 个氨基酸对于 ICAT 对 β -连环蛋白/TCF-4 的转录激活活性的抑制作用是至关重要的，与 β -连环蛋白的结合不足以抑制 β -连环蛋白/TCF-4 的转录激活活性。此外，ICAT(13-81)突变体与 β -连环蛋白结合，但与 ICAT 不同，它不具有抑制由 β -连环蛋白介导的转录激活的作用；因此，可认为当存在于细胞中时，该突变体作为与 ICAT 拮抗的，抑制 ICAT 作用的拮抗剂起作用。

实施例 12 β -连环蛋白中与同 ICAT 的结合相关的位点

实施例 8 中证实了 m β -连环蛋白臂区和 ICAT 之间的结合。按下述测定 m β -连环蛋白臂区(由 12 个狢狢单位组成的重复序列；下文将每个重复单位用 R1 至 R12 表示)的哪个区域与同 ICAT 的结合相关。

首先，通过 PCR 制备编码下述 m β -连环蛋白臂区缺失突变体(6 种含有 m β -连环蛋白臂区的一部分的缺失突变体；(a)R1 至 R9, (b)R6 至 R12, (c)R10 至 R12, (d)R10 的后一半至 R12, (e)R10, (f)R11 至 R12)的 DNA，然后将每种 DNA 插入载体 pGBT9 以提供缺失突变体的诱饵质粒。将该突变体与双杂种体系中的小鼠正常 ICAT 表达质粒一起导入酵母 HF7C 菌株。根据转化子中 β -半乳糖苷酶活性的存在来评价 ICAT 与 m β -连环蛋白臂区缺失突变

体之间的结合。结果表明当表达了(b)R6至R12, (c)R10至R12, 或(d)R10的后一半至R12的各个 β -连环蛋白区域时, 发现了与ICAT的结合, 这说明ICAT与 $m\beta$ -连环蛋白臂区中R10的后一半至R12区域结合, 而R1至R9不参与结合。

5 实施例 13 人 ICAT 基因的染色体位置

根据实施例 1 所得的人 ICAT cDNA 的核苷酸序列检索 STS 数据库, 揭示出编号为 WI-9616, WI-16661 和 SHGC-30730 的 STS 具有与 ICAT 相同的序列。另外, 在 Unigene 数据库中检索 EST, 揭示出 stSG22813 和 stSG2532 是该区域的 STS。根据数据库中的描述, 通过一些诸如辐射-杂合体法的方法, 证实这 5 个 STS 的所有染色体位置对应于人染色体 1 上的标记 DIS214 和 DIS244 之间的区域。该标记的位置对应于 1p36.1。因此, 可认为人 ICAT 基因位于人染色体 1p36.1。在成神经细胞瘤, 黑素瘤, 嗜铬细胞瘤, 肺癌, 肝癌, 结肠癌等中, 在 1p35-36 上有一些染色体缺失, 因此, 这是据认为存在肿瘤抑制基因的染色体区域(基因染色体&癌症 16, 211(1996))。当考虑到 ICAT 能抑制由 β -连环蛋白/Tcf-4 介导的转录刺激活性这一事实时, 可以认为 ICAT 作为肿瘤抑制基因起作用, 因此可用于癌症的诊断和基因治疗。

工业实用性

本发明提供了一种蛋白质, 其具有与 β -连环蛋白结合并抑制转录激活的活性, 所述转录激活是由 β -连环蛋白与属于 TCF/Lef 家族的蛋白质形成复合物而诱导的, 本发明还涉及编码该蛋白质的 DNA, 识别该蛋白质的抗体, 含有所述蛋白质或 DNA 的治疗剂, 和含有所述抗体的诊断试剂。

序列表

<110> 协和发酵工业株式会社(KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD)

<120> 转录激活抑制蛋白

<130> 11207W01

<140>

<141>

<150> JP 99/120266

<151> 1999-4-27

<160> 6

<170> PatentIn 2.0

<210> 1

<211> 2997

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (274)..(516)

<400> 1

ggccgctcct gctgctgcta ctgccgccgc cgcagcggct gtcgggctg agcacgcccc 60

ggaacaggcc gccgcgcgct gcgcgccgga cccgctgccc ctgccggccc ggccgggtcg 120

ggcggcccag ggaccgacag acttgacaac ggtgacagca ctggggcggc accttctac 180

ttctgcccag ccacagcct cccctcacag ttgagcacct gttgcctga agttaatttc 240

cagaagcagg agtccccaga gccaggcagg ggg atg aac cgc gag gga gct ccc 294

Met Asn Arg Glu Gly Ala Pro

1

5

ggg aag agt ccg gag gag atg tac att cag cag aag gtc cga gtg ctg 342

Gly Lys Ser Pro Glu Glu Met Tyr Ile Gln Gln Lys Val Arg Val Leu

10

15

20

ctc atg ctg cgg aag atg gga tca aac ctg aca gcc agc gag gag gag 390
 Leu Met Leu Arg Lys Met Gly Ser Asn Leu Thr Ala Ser Glu Glu Glu
 25 30 35

ttc ctg cgc acc tat gca ggg gtg gtc aac agc cag ctc agc cag ctg 438
 Phe Leu Arg Thr Tyr Ala Gly Val Val Asn Ser Gln Leu Ser Gln Leu
 40 45 50 55

cct ccg cac tcc atc gac cag ggt gca gag gac gtg gtg atg gcg ttt 486
 Pro Pro His Ser Ile Asp Gln Gly Ala Glu Asp Val Val Met Ala Phe
 60 65 70

tcc agg tcg gag acg gaa gac cgg agg cag tagctgcaaa gcccttggaa 536
 Ser Arg Ser Glu Thr Glu Asp Arg Arg Gln
 75 80

caccttgat gctgttgaag ggccaagaga tctgtgtggc tctgggccc gctgaatggc 596

agcagecccc cttgccccac ctcccccttc cctacccaac cctgccctgc cccacccccac 656

ctcacagcta ctcagtgggg ctggcatcaa gggagacacc agtgggtcgt ttataattgg 716

cttaaaggga tggacttgtg attggctgca ggaagaaact tttttatttt ttaaactctg 776

accaacagaa accttttatt tttatttctg actcttattt tttaaaaaat ttgcgcctcg 836

gtatctggct tccctggaag ctctccgagc tctgggtgctt tagttaggtc atttttttag 896

aatgtgaag aggtctgatt ggctgcttaa actggaaagg gactgtgatt ggctggttaa 956

tgggaaacgg ttttttctt tggctgcagg tgttctgctg atatcaacag cttccctatt 1016

ttgaatgcag aaaacagggt ctgggacatt agtcgttata tttgacttga aaagaaagaa 1076

accaagtgcg ctttgcaata tttattacac aaagaacttg ctgctgcctt cacatttggg 1136

gtttgtgttt gattggcttt cgatgcgigl gtttggttcc ccattggttc acctgtgact 1196

cctgttgcca tggattcacc cccctctget gccggctctg ggctgaggg tccacctgga 1256

gagtacatt gctttaatga gtgcacctgc ctccaccagc aaggggaccc cgagaacctt 1316

gagcagggtc cacagctgga aagttgggcc cctgaggagc tttgtgtcgt cttgaacgag 1376

cagcccaggg cctagaggta accgttaggc gggatttatg tgcactgcct gcatgagctg 1436
gcaaccagcc agcgtccctt ggtgagaaag ggattgctga ggcaccgtcc aggccccacc 1496
ggccaggccg cgcccagcag aggcgtacta cccagctctg tctctttggc catccttctg 1556
tgtaccactt cctgaggcct cattttgggg gtcactttgg aaaggggagg agcttctccc 1616
agtgtgagac cccaaagact ctggaggtea tctggcggag gtctctggga gcccagaacc 1676
cacataaaag ccccagcttg gtcacaagg cccaggagac ctccagctaa acaccaaccc 1736
ctgacctacc ccagccaggc tctacctgt ctgctgccag cacagtaggt cccggccagc 1796
tctggagtic tctcatcgga ggcccatgcc ctccactcca ctgccittgg aagggtctct 1856
ctccaggtea gcctggaagg gacagtatcg ttigtattatg aaatgccact gggacagctg 1916
gctgggcctt caccaagcaa gtcccttcag actggccctt aagccaaact caggcccaga 1976
attgcagtic agaatggcag tcttgagggc aggggggtgag gggcaggctt agtgttctctg 2036
caccaaactt aagtccttc acctgccacc ccttccctg ggaggagggt gtcctccta 2096
tctccctggc tcactggcag gtgtgggatc tggggagagc ggctggagaa agatgcagtc 2156
ctcaggaagg gggccgccac cctcccctat gctggtagat gctgaggccc ctaggtgccc 2216
agggccagtg ggacctctc agaaccaaat ctttcccctt tctcggggct tggggctcgg 2276
gccgtagggg ctctgagtg tcatgaagtg cacaggagcc aaatgaccga gccctggaga 2336
gccccatggt gggtaggtgg ttcgtgctgt gctctggcac catcagcctg ttccagaagg 2396
aggattcgag catcaggeta agacctgtg tctccacca tgcactcacc cctagcccctg 2456
gltagctgac agtcagctgt ggggaacaca gctacaacce taccctggca gggacctgag 2516
agcatctcag gaggggcagc gcatgtgtgc atgtgctgtg tgagtgagca caccctgtgtg 2576
cacactcata cacatgtgea cacacagca ctctccccgc tcaggggcct ggaggtcttg 2636
ctgagcccct ggggaaaggt gatttcttc alctccctcc tccaggctcg agtgcctgga 2696

gtcaggtgtc gaggccacat tgctggctgc ccctctttg tagctcctat aaaggccca 2756
 cacctgggtg atacctggtt gagcgtgtgg tctctgcccc agcctgtcct tgtcagatc 2816
 acaggccttg cttttgtaac aatgatgacc cggcctgtc tcatcttctg aagaggaaaa 2876
 gtcaaagtgt tgctgtggct ccatatttca actaaaaata tatctgttgg agaaagaaat 2936
 taacaataaa gaattttcat aggttaaaaa aaaaaanaa aaagaaaaaa aaaaaaaaaa 2996
 a 2997

<210> 2
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 2
 Met Asn Arg Glu Gly Ala Pro Gly Lys Ser Pro Glu Glu Met Tyr Ile
 1 5 10 15
 Gln Gln Lys Val Arg Val Leu Leu Met Leu Arg Lys Met Gly Ser Asn
 20 25 30
 Leu Thr Ala Ser Glu Glu Glu Phe Leu Arg Thr Tyr Ala Gly Val Val
 35 40 45
 Asn Ser Gln Leu Ser Gln Leu Pro Pro His Ser Ile Asp Gln Gly Ala
 50 55 60
 Glu Asp Val Val Met Ala Phe Ser Arg Ser Glu Thr Glu Asp Arg Arg
 65 70 75 80
 Gln

<210> 3
 <211> 2606
 <212> DNA
 <213> 小鼠(Mouse musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (167)..(409)

<400> 3

caggccgccc cgctccggac ccgcagcccc cggcgccgcg cgttcgggcg gccagggcg 60

gcaccttget attttttctc aggcgcggtc ctccccttag agttgagcat ctgtttgcct 120

gaagtgaatt tccagaagca ggtgtcccca gaactgggcc aggggg atg aac cgc 175
Met Asn Arg
1

gag gga gca ccc ggg aag agt ccg gag gag atg tac att caa cag aag 223
Glu Gly Ala Pro Gly Lys Ser Pro Glu Glu Met Tyr Ile Gln Gln Lys
5 10 15

gtc cgc gtg ctg ctc atg ctg agg aag atg ggg tca aac ctg acc gcc 271
Val Arg Val Leu Leu Met Leu Arg Lys Met Gly Ser Asn Leu Thr Ala
20 25 30 35

agt gag gag gaa ttt ctg cgc acc tat gct ggg gtc gtc agc agc cag 319
Ser Glu Glu Glu Phe Leu Arg Thr Tyr Ala Gly Val Val Ser Ser Gln
40 45 50

ctc agc cag ctg cca cag cac tcc atc gac cag ggt gca gag gac gtg 367
Leu Ser Gln Leu Pro Gln His Ser Ile Asp Gln Gly Ala Glu Asp Val
55 60 65

gtg atg gcg ttt tcc aga tcg gag acg gaa gac cgg agg cag 409
Val Met Ala Phe Ser Arg Ser Glu Thr Glu Asp Arg Arg Gln
70 75 80

tagctggaag ccctcggaa ctccctggaa gctgcagatg gccagagat ctgtgtggct 469

cctctgccgg ttgagtggta gcaaaccacc gtctttctac cctttgcacc ccttacccca 529

tccgaccctc cccaccage cgccactcag cagggtggc atcaaggtgg tttgtgattg 589

gcttaaaggg atggacttga gattggctge aggaagaaac ctttttattt ttaaattcttg 649

actaacggaa accttttatt tttatttctg actctttatt tttttaaca tttgcgcctc 709

ggtatctggc ttccccggaa gctctccgag ctctgggtgct ttatttaggt catttttagg 769

aatgtgaaga ggccctgattg gttgcttaaa ctggaaaagg gttatgattg gctggctagt 829
gggacgtggg cttttctttg attggctata ggtgttctgt tcacatcacc gacttctct 889
gttctgaaag cagaaaacgg ggtttgggat attgttatat ttgacttgaa aaaaaaaaaa 949
aaagaaagaa atgaagtgag ctttcaata ttattacac aaagagctgg ctgctgcctt 1009
cacgtagtgg gtttgtgttt ggatttgatt ggacagtaaga tgcgggtttg gtttccatt 1069
ggctcacccc tgactcccgt tgctatggtc tttctccac tctgctggtt acatgaggcc 1129
tgagggtaca cctggagaat gcacgtgctt taatgaccac acctgcctcc accagcgaag 1189
ggaccccagg gacgcgagcg cgagcggggg ccacagctgg agaacaggcc cccaaggggc 1249
tttgtgttct cctgagccag cagcccagag ctcaggggtg accgggaggc aggattgatg 1309
tactcagttc taagagctgg cagccagcca gtttctgga gcgaatggat tgtgcagagc 1369
tcttcaggcc tttctggcca gccatgcta agtacaggag tgttgaccgg cagctccagc 1429
ctctctgctg cccccigtgt ctcacttccc caggtcttgg catccccaga tctgaaggt 1489
tatgaggggt ctttactgga gccttgaacc caagcagata cccagtttc acttctagaa 1549
ccccagaggt ttcaaacttg gctccaagca caacctagcc aggcctcca gggtcattg 1609
ccagtggctg tagttcccgg atagcagatg tgttctacct gagcccaggc cccattaca 1669
ccgtgtatca ccctgtgtgt cagcatagaa gggggagtag catggcttat ttattaggaa 1729
gcacccactt ggaagaccag ctagactttc acacagtagg ccccacaggc tactcagatc 1789
cagcccaagg gtcacatttt agagcagcga ctgagaagaa agatatgggt ggtcgtccca 1849
tgcccacat gccttcctg ggagtgagag aaacggtgac ggccctttct ggtcctgggc 1909
accatgatec ggaaaacact ggagcatctt ttcccttctt ggggcttcgg cctcccgtgt 1969
ggcagggagt gtgcaggatg ccagtgccag caggtcttga gttcaagccc tggggcacct 2029
ccctgttggg ggacggttca agcttcccag acatgtccca ggaggagaat gtgaacatct 2089

ggtccctcag cacatcgcc ctgtagctg acagtaacat gctcgcttig gccattgagc 2149
 tccagggagc aaggacagtg gagaatcagc tccccaacc ccagcctgac cagcaagagc 2209
 ctgagaggag agcgtcattg ctggggagga gcagcgtgtg tgagcaggca cggtatgagc 2269
 tcacactgac tgacagacgc gtgcttgttc tgctggcgca gtgtggcctg gagatgtggc 2329
 tgggcccgtg ggcagagatg gggtcattca gtcttctccc cctgtgagat tgtatctaaa 2389
 gtcggtgtt gccagcttca gttggttctt gtgactgcct cgaggccaag ccctggtgat 2449
 ggtgtgtgct ctgtcttagc agtggttctc ggctcagcct ctgagggaaa aagatgcaag 2509
 tatcgatgtg gcttcttatt ctaactgaaa gtctatctaa tggagaaaaa aaataacaat 2569
 aaagattttt cacagctaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 2606

<210> 4
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mouse musculus)

<400> 4
 Met Asn Arg Glu Gly Ala Pro Gly Lys Ser Pro Glu Glu Met Tyr Ile
 1 5 10 15
 Gln Gln Lys Val Arg Val Leu Leu Met Leu Arg Lys Met Gly Ser Asn
 20 25 30
 Leu Thr Ala Ser Glu Glu Glu Phe Leu Arg Thr Tyr Ala Gly Val Val
 35 40 45
 Ser Ser Gln Leu Ser Gln Leu Pro Gln His Ser Ile Asp Gln Gly Ala
 50 55 60
 Glu Asp Val Val Met Ala Phe Ser Arg Ser Glu Thr Glu Asp Arg Arg
 65 70 75 80
 Gln

<210> 5

<211> 243
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (243)

<400> 5
atg aac cgc gag gga gct ccc ggg aag agt ccg gag gag atg tac att 48
Met Asn Arg Glu Gly Ala Pro Gly Lys Ser Pro Glu Glu Met Tyr Ile
1 5 10 15

cag cag aag gtc cga gtg ctg ctc atg ctg cgg aag atg gga tca aac 96
Gln Gln Lys Val Arg Val Leu Leu Met Leu Arg Lys Met Gly Ser Asn
20 25 30

ctg aca gcc agc gag gag gag ttc ctg cgc acc tat gca ggg gtg gtc 144
Leu Thr Ala Ser Glu Glu Glu Phe Leu Arg Thr Tyr Ala Gly Val Val
35 40 45

aac agc cag ctc agc cag ctg cct ccg cac tcc atc gac cag ggt gca 192
Asn Ser Gln Leu Ser Gln Leu Pro Pro His Ser Ile Asp Gln Gly Ala
50 55 60

gag gac gtg gtg atg gcg ttt tcc agg tcg gag acg gaa gac cgg agg 240
Glu Asp Val Val Met Ala Phe Ser Arg Ser Glu Thr Glu Asp Arg Arg
65 70 75 80

cag 243
Gln

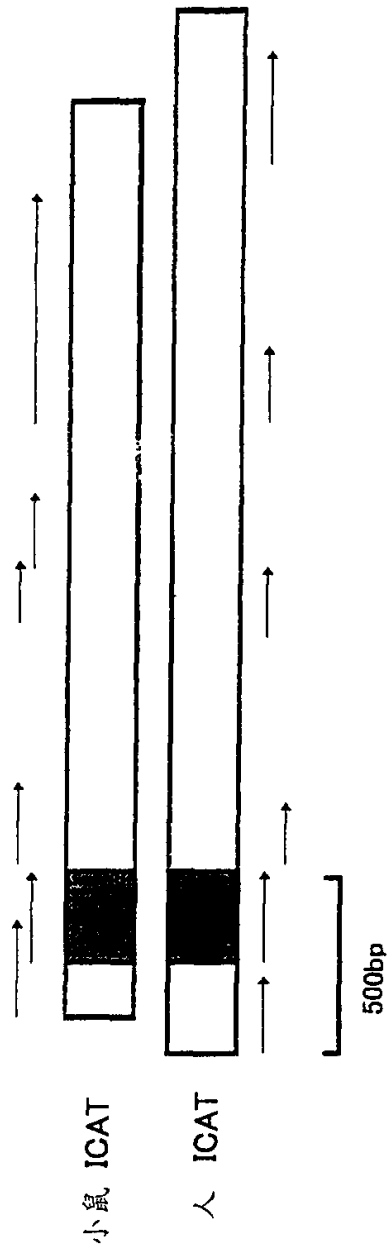
<210> 6
<211> 243
<212> DNA
<213> 小鼠(Mouse musculus)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (243)

<400> 6
atg aac cgc gag gga gca ccc ggg aag agt ccg gag gag atg tac att 48

Met	Asn	Arg	Glu	Gly	Ala	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Glu	Glu	Met	Tyr	Ile	
1				5					10						15	
caa	cag	aag	gtc	cgc	gtg	ctg	ctc	atg	ctg	agg	aag	atg	ggg	tca	aac	96
Gln	Gln	Lys	Val	Arg	Val	Leu	Leu	Met	Leu	Arg	Lys	Met	Gly	Ser	Asn	
			20						25				30			
ctg	acc	gcc	agt	gag	gag	gaa	ttt	ctg	cgc	acc	tat	gct	ggg	gtc	gtc	144
Leu	Thr	Ala	Ser	Glu	Glu	Glu	Phe	Leu	Arg	Thr	Tyr	Ala	Gly	Val	Val	
			35					40					45			
agc	agc	cag	ctc	agc	cag	ctg	cca	cag	cac	tcc	atc	gac	cag	ggc	gca	192
Ser	Ser	Gln	Leu	Ser	Gln	Leu	Pro	Gln	His	Ser	Ile	Asp	Gln	Gly	Ala	
		50				55					60					
gag	gac	gtg	gtg	atg	gcg	ttt	tcc	aga	tcg	gag	acg	gaa	gac	cgg	agg	240
Glu	Asp	Val	Val	Met	Ala	Phe	Ser	Arg	Ser	Glu	Thr	Glu	Asp	Arg	Arg	
65					70					75					80	
cag																243
Gln																

A



B

人	10	20	30	40	50	60	70	80	81
	MNREGAPGKS	PEEMYIQQKV	RVLLMLRKMKG	SNLTASEEEF	LRTYAGVWSS	QLSQLPQHSI	DQGAEDVWMA	FSRSETEDRR	Q
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*
小鼠	MNREGAPGKS	PEEMYIQQKV	RVLLMLRKMKG	SNLTASEEEF	LRTYAGVWNS	QLSQLPPIHSI	DQGAEDVWMA	FSRSETEDRR	Q

图 1

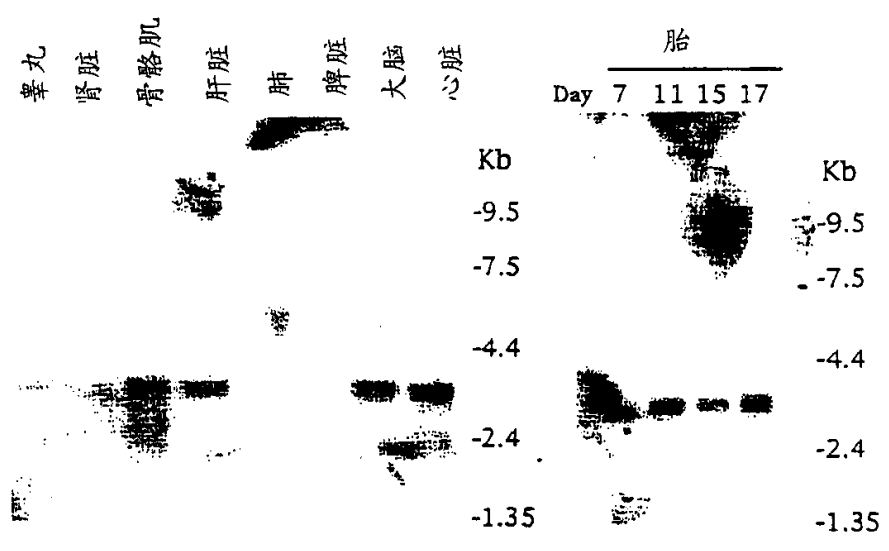


图 2

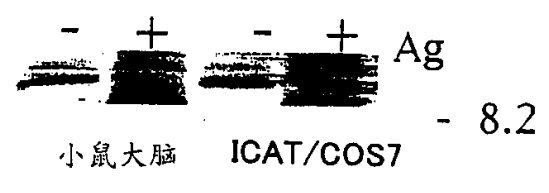


图 3

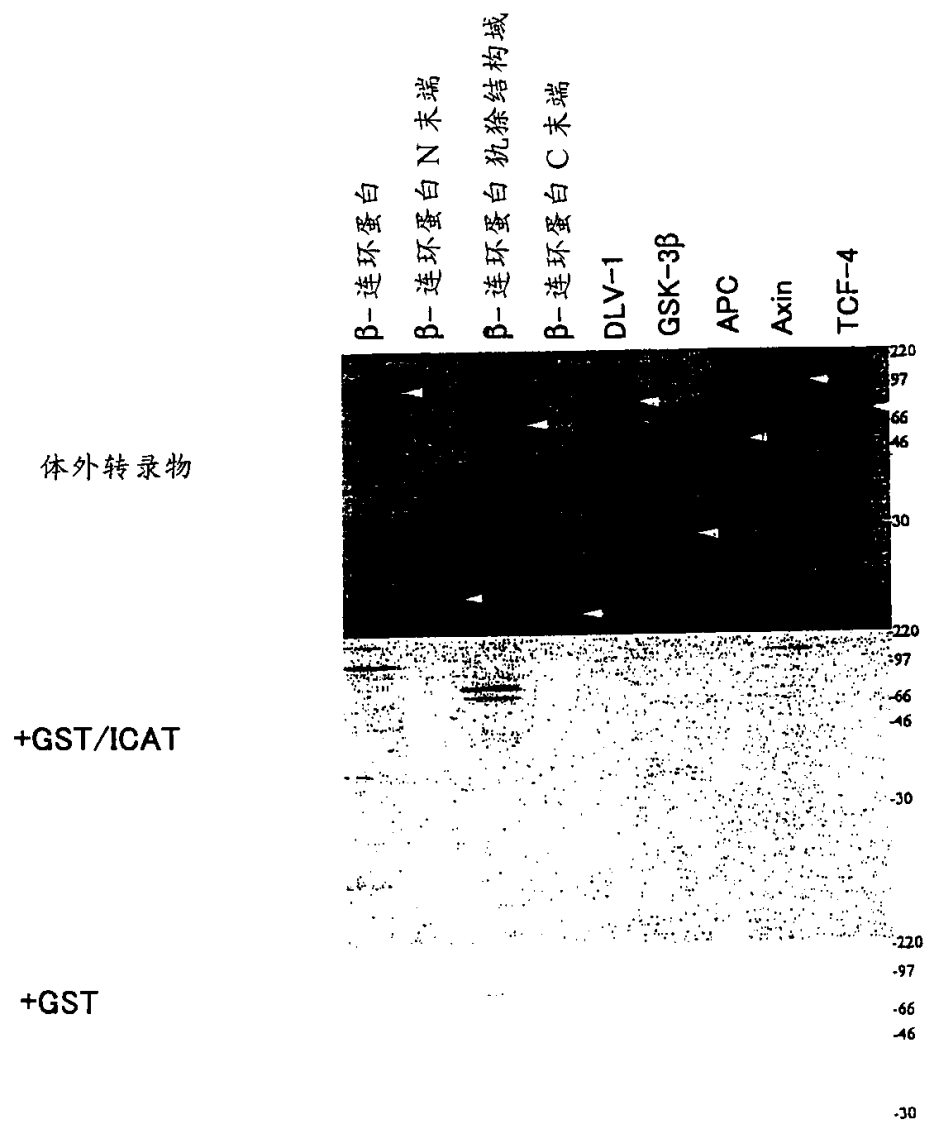
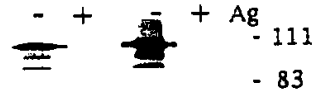
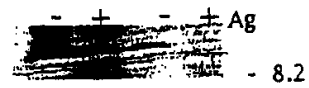


图 4

小鼠大脑 第一抗体：抗-β-连环蛋白抗体
 免疫沉淀：抗-ICAT-抗体 抗-β-连环蛋白抗体



ICAT/COS7 第一抗体：抗-ICAT-抗体
 免疫沉淀：抗-ICAT-抗体 抗-β-连环蛋白抗体



小鼠大脑 第一抗体：抗-TCF-4抗体
 免疫沉淀：抗-ICAT-抗体



图 5

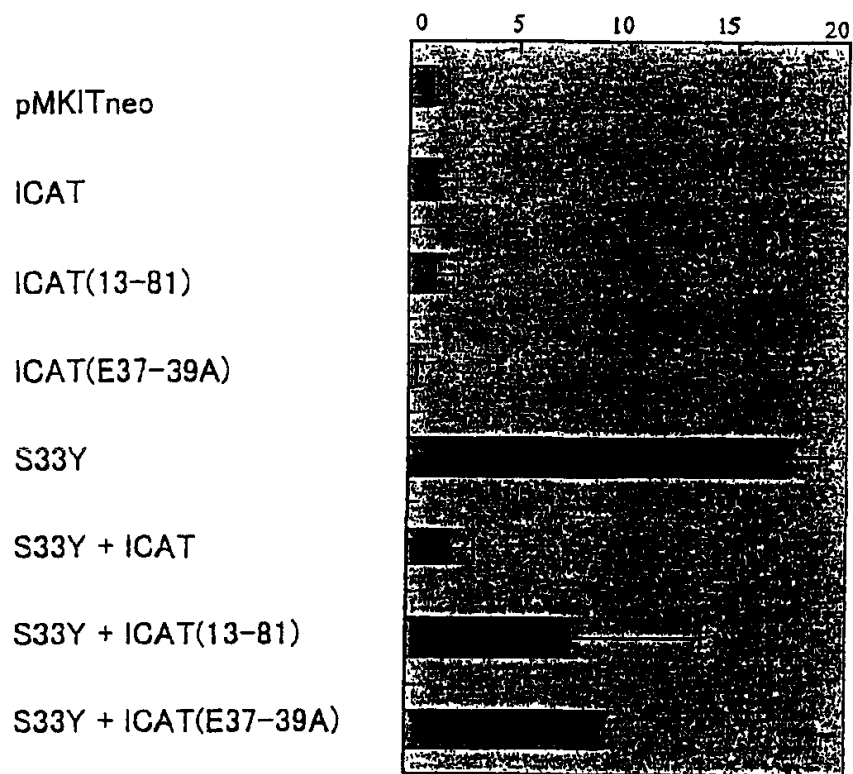


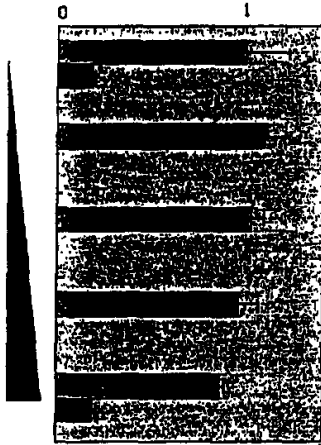
图 6

DLD-1

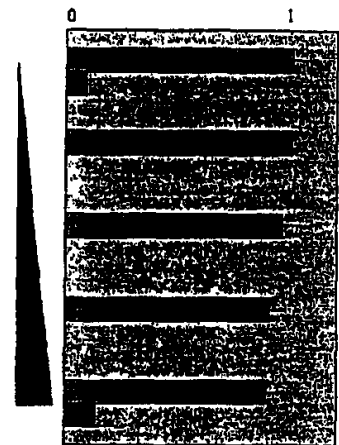
ICAT



ICAT(13-81)

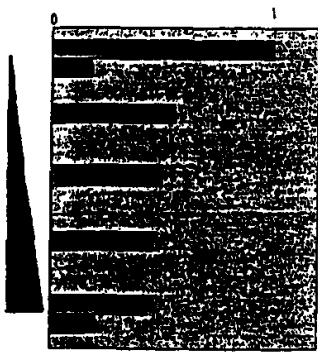


ICAT(E37-39A)

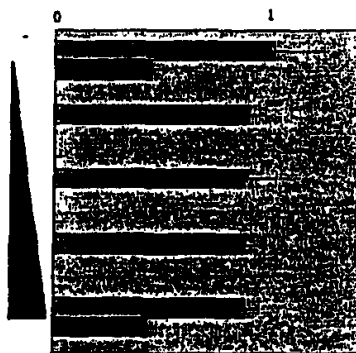


HCT116

ICAT



ICAT(13-81)



ICAT(E37-39A)

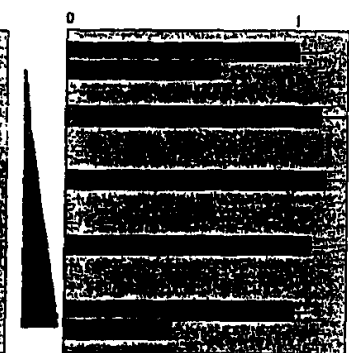


图 7

专利名称(译)	转录激活抑制蛋白		
公开(公告)号	CN1364172A	公开(公告)日	2002-08-14
申请号	CN00809228.1	申请日	2000-04-26
申请(专利权)人(译)	协和发酵工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和发酵工业株式会社		
[标]发明人	秋山彻 中村勉 多胡贤一		
发明人	秋山彻 中村勉 多胡贤一		
IPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 C07K14/47 C12N1/21 C12N15/12 C12P21/08 C12N5/10 C12P21/02 A61K38/17 C07K16/18 A61K39/395 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/577		
CPC分类号	A61K48/00 A61K38/00 C07K14/4703		
优先权	1999120266 1999-04-27 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种蛋白质,其能与β - 连环蛋白结合,因而能抑制转录激活,所述转录激活是由β - 连环蛋白与属于TCF/Lef家族的蛋白质形成复合物而诱导的,本发明还涉及编码该蛋白质的DNA,识别该蛋白质的抗体,含有所述蛋白质或DNA的治疗剂,和含有所述抗体的诊断试剂。

A

