

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-173679

(P2004-173679A)

(43) 公開日 平成16年6月24日(2004.6.24)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
C O 7 K 14/47	C O 7 K 14/47	4 B O 6 3
C O 7 K 16/18	C O 7 K 16/18	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
	審査請求 有 請求項の数 24 O L	(全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-270839 (P2003-270839)	(71) 出願人	503360115 独立行政法人 科学技術振興機構
(22) 出願日	平成15年7月3日 (2003.7.3)		埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(31) 優先権主張番号	特願2002-330972 (P2002-330972)	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(32) 優先日	平成14年11月14日 (2002.11.14)	(72) 発明者	審良 静男 大阪府高槻市辻子1-7-16
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	竹田 潔 大阪府箕面市小野原東2-7-10
		(72) 発明者	山本 雅裕 大阪府箕面市小野原東4-19-36-2 05
		Fターム(参考)	2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37 FB02 FB03 FB05
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるシグナル伝達タンパク質及びその遺伝子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質、その遺伝子、及びそれらの利用方法を提供すること。

【解決手段】 ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードするDNA、及び該DNAによって発現されるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質からなる。また、本発明は、該DNA及びタンパク質の変異体DNA及び変異体タンパク質、本発明のタンパク質と特異的に結合する抗体、本発明の遺伝子を染色体上で欠損させた非ヒト動物、及び該抗体や非ヒト動物及び本発明の遺伝子プローブを用いた細胞の免疫賦活機能の判定及びインターフェロン誘導シグナル伝達活性物質のスクリーニング方法、からなる。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする DNA。

## 【請求項 2】

インターフェロン誘導シグナル伝達活性が、インターフェロンの誘導シグナル伝達活性であることを特徴とする請求項 1 記載のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする DNA。

## 【請求項 3】

配列表の配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の DNA。 10

## 【請求項 4】

配列表の配列番号 3 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の DNA。

## 【請求項 5】

請求項 3 又は 4 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の DNA。

## 【請求項 6】

インターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質が、以下の (a) 又は (b) のタンパク質であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の DNA。 20

(a) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列表の配列番号 2 に示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、かつインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質

## 【請求項 7】

インターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質が、以下の (a) 又は (b) のタンパク質であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の DNA。

(a) 配列表の配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列表の配列番号 4 に示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、かつインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質 30

## 【請求項 8】

ウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質。

## 【請求項 9】

インターフェロン誘導シグナル伝達活性が、インターフェロンの誘導シグナル伝達活性であることを特徴とする請求項 8 記載のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質。

## 【請求項 10】

配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 8 又は 9 記載のタンパク質。 40

## 【請求項 11】

配列表の配列番号 2 に示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、かつインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質。

## 【請求項 12】

配列表の配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 8 又は 9 記載のタンパク質。

## 【請求項 13】

配列表の配列番号 4 に示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 50

、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の DNA を、発現用ベクターに組込んだことを特徴とするインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質発現組換えベクター。

【請求項 15】

請求項 14 記載のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質発現組換えベクターを宿主細胞へ導入したことを特徴とする形質転換細胞。

【請求項 16】

請求項 8 ~ 13 のいずれか記載のタンパク質と特異的に結合する抗体。

10

【請求項 17】

抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 16 記載の抗体。

【請求項 18】

ウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物。

【請求項 19】

非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項 18 記載のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物。

20

【請求項 20】

ウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の DNA を導入することを特徴とするインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質を発現する細胞の調製方法。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の DNA 又はその部分からなることを特徴とする、ウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子検出用プローブ。

【請求項 22】

請求項 21 記載の遺伝子検出用プローブを用いて遺伝子を検出し、判定することを特徴とする細胞のウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活機能の判定方法。

30

【請求項 23】

請求項 16 又は 17 記載の抗体を用いて、細胞のウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質の発現状態を検出することを特徴とする、細胞のウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活機能の判定方法。

【請求項 24】

請求項 18 記載のウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物に、被検物質を投与し、該非ヒト動物のインターフェロン誘導活性を測定・評価することを特徴とする、細胞のウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性物質のスクリーニング方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるイン

50

ターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質、その遺伝子、及びその利用に関する。

【背景技術】

【0002】

生体は、常に微生物の侵入等の危機に曝されている。このような危機に対する生体防御は、自然免疫と獲得免疫の協調作用により確立される。自然免疫を担当するマクロファージ、樹状細胞などの抗原提示細胞は、Toll-like receptor (TLR) と呼ばれる一群の膜タンパク質を介して、病原体を認識する。この認識により活性化された抗原提示細胞は、IL-12、TNFなどの炎症性サイトカインを産生すると同時に、CD40などの補助機能分子の発現を増強する。補助機能分子の発現は、抗原提示細胞と協同して、獲得免疫を担当するT細胞の増殖を誘導する。また、IL-12は、ナイーブT細胞やインターフェロン(IFN)を産生する1型ヘルパーT(Th1)細胞へと分化誘導し、細胞性免疫を確立させる。したがって、TLRを介したシグナルは、獲得免疫を量的、質的、双方の面から制御していることになる。

【0003】

TLRは、病原体のような微生物の特有の成分を認識するレセプターであるが、TLRには多くのファミリーがあることが確認されている。即ち、TLRレセプターファミリーは、微生物の構成成分のそれぞれ特定の構造を認識することにより微生物の侵入を認識し、本来の免疫活性を引き起こす(Annu Rev Immunol. 20, 197, 2002; Nat. Immunol 2, 675, 2001; Nat. Rev. Immunol. 1, 135, 2001)。TLRレセプターファミリーのうち、TLR4はグラム陰性菌由来のリポ多糖(LPS)のレセプターとして機能している。TLR2は、グラム陽性菌由来のペプチドグリカン及び様々な菌由来のリポタンパク質との応答に必須である。TLR1とTLR6はトリアシル化されたマイクロプラズマのリポタンパク質をそれぞれTLR2とヘテロ二量体を形成することによって認識している(J. Immunol. 169, 10, 2002)。TLR5はフラジエリン(flagellin)を認識する。TLR3とTLR9はそれぞれ二重鎖RNAとCpG DNA(微生物DNA)のレセプターである。TLR7は抗ウイルス化合物の応答に関与している(Nat. Immunol. 3, 196, 2002)。

【0004】

TLRファミリーは、IL-1レセプター(IL-1R)ファミリー(Nat. Immunol 2, 675, 2001)と相同性のある細胞外のロイシンリッチリピート(leucine-rich repeat: LRR)領域とIL-1Rの細胞質内領域と相同性の高い領域(TIR領域)とを含んでいる。IL-1Rに類似し、TLRはIRAKをMyD88アダプター経路で誘導され、TRF6そして最終的にはNF- $\kappa$ Bの活性を誘導する。即ち、TLRファミリーは、上記IL-1Rと同様にアダプタータンパク質であるMyD88を介し、IL-1R結合キナーゼ(IRAK)をリクルートし、TRAF6を活性化し、下流のNF- $\kappa$ Bを活性化することが知られている(J. Exp. Med. 187, 2097-2101, 1998、Mol. Cell 2, 253-258, 1998、Immunity 11, 115-122, 1999)。TLRを介した炎症性サイトカインの産生はMyD88分化細胞においては完全に遮断されている。

【0005】

しかしながら、近年の研究によればそれぞれのTLRを通るシグナル経路がそれぞれ異なり、従って異なる生体反応を生じることが示されている(Nat. Immunol 2, 675, 2001)。事実、TLR4シグナルは、MyD88依存経路と非依存的経路の両方を含んでいる。前者はサイトカインの産生に必須であり、後者はIRF-3の活性化と、その後のインターフェロン(interferon-beta: IFN- $\beta$ )及びIFN-誘導(inducible)遺伝子(J. Immunol. 167, 5887, 2001、Nat. Immunol. 3, 392, 2002、Essential role for TLR4 in activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. Nature in press. 2002)の誘導に関与している。更に、MyD88非依存的経路は樹状細胞(DCs)を機能的に成熟させている(J. Immunol. 166, 5688, 2001)。MyD88非依存的経路はTLR3シグナルでも観察されている(Nature 413, 732, 2001)。

【0006】

10

20

30

40

50

近年、TIRAP/MalがTIR領域に隠れている二番目のアダプター分子として発見された(Nat. Immunol. 2, 835, 2001, Nature 413, 78, 2001)。インビトロでの研究においては、TIRAP/MalがMyD-88非依存的経路でのLPS誘導による活性化に参与していることを示唆している(Nat. Immunol. 2, 835, 2001)。しかしながら、TIRAP欠損マウスにおける研究でTIRAPがTLR2とTLR4経由のMyD-88非依存的シグナル経路内でアダプターとして機能していることが明らかになった(Essential role for TIRAP in activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. Nature in press, 2002)。これらの研究は、TIRを含むいくつかのアダプター分子がTLRを介したシグナル経路に参与し、これらのアダプターの異なる使用がTLRシグナルの特異性をもたらし、さらにMyD-88非依存的経路がTIRAP以外の分子によって介されていることを示唆している。

10

## 【0007】

一方、細菌感染を防御する機構に参与するタンパク質及びその遺伝子に関する開示としては、TLR4分子を介したNF- $\kappa$ B活性化の増加に参与する性質を有するタンパク質及び該タンパク質をコードする遺伝子(特開2000-262290号公報)、及び、細菌感染による過剰なLPS応答を抑制するフィードバック機構に参与していることが示唆される、TLR4遺伝子から選択的にスプライシングの結果生ずるmRNAのコードするタンパク質及び該タンパク質をコードする遺伝子(特開2002-176986号公報)などが開示されている。しかしながら、上記のように、TLRを介したシグナル経路に参与するタンパク質や該タンパク質をコードする遺伝子については、その全容は明らかになっていない。

20

【特許文献1】特開2000-262290号公報

【特許文献2】特開2002-176986号公報

【非特許文献1】J. Immunol. 167, 5887, 2001

【非特許文献2】Nat. Immunol. 3, 392, 2002

【非特許文献3】Nat. Immunol. 2, 835, 2001

【非特許文献4】Nature 413, 78, 2001

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

30

本発明の課題は、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質、その遺伝子、及びそれらの利用方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明者らは、TLR(Toll-like receptor)ファミリーが病原体の構成成分の認識に必須の役割を演じる受容体であることを、遺伝子欠損マウスを作製することにより示してきた。MyD88は、TLRファミリーの細胞質内領域と相溶性の高いTIRドメインをもつアダプターであるが、遺伝子欠損マウスの解析から、全てのTLRファミリーを介した炎症性サイトカインの産生誘導のシグナル伝達に必須であることを示した。しかしながら、リポ多糖を認識するTLR4を介したシグナルの場合には、MyD88欠損マウスでも炎症性サイトカインの反応は認めないにも関わらず、インターフェロン誘導性遺伝子の発現を誘導した。

40

## 【0010】

更に、TLR4に特異的に結合する分子としてTIRAPが同定されたが、遺伝子欠損マウスの解析から、TIRAPがTLR4だけでなくTLR2を介した炎症性サイトカインの産生にも必須であることを示した。TIRAP欠損マウスでも、TLR4を介したインターフェロン誘導性遺伝子の発現は誘導されることから、MyD88、TIRAPに依存しないシグナルの存在が示唆された。

## 【0011】

50

ウイルス由来の二重鎖RNAを認識するTLR3を介したシグナルでも、インターフェロン誘導性遺伝子の発現が誘導されることから、TLR4を介したMyD88、TIRAP非依存性のシグナルとTLR3を介したシグナルには共通の分子の関与が示唆された。そこで、MyD88及びTIRAPと同様にTIRドメインを有する分子を検索した結果、TIRドメインを有する遺伝子TRIF (TIR domain containing adaptor inducing interferon-beta) を見出した。この遺伝子はヒトではコーディング領域 (coding region) が2,136bpで、712のアミノ酸をコードする。マウスでは、2,199bpで、733アミノ酸をコードしている。ヒト、マウスともに、TIRドメインがタンパク質の中央部分に存在している (図2)。

**【0012】**

293細胞 (human embryonic kidney cell) に、インターフェロン (IFN-beta) の遺伝子プロモーター下にルシフェラーゼ (luciferase) を組み込んだプラスミド (plasmid) とともに導入して、この遺伝子を発現させるとルシフェラーゼ活性化を増強した。この結果は、該遺伝子によりコードされるタンパク質が、インターフェロンの発現に関与していることを示している。MyD88、TIRAPを発現させてもインターフェロン遺伝子のプロモーターは活性化されないことから、TIRドメインを有するタンパク質のなかでも、該遺伝子によりコードされるタンパク質がインターフェロンの誘導シグナルに特異的に関与していることを示していた。TIRドメインだけにした本遺伝子によりコードされるタンパク質の変異タンパク質では、本遺伝子によりコードされるタンパク質全長の導入によるインターフェロンの遺伝子プロモーターの活性化をブロックするドミナントネガティブ (dominant negative: 抑制) 効果を有する。

10

20

**【0013】**

293細胞にヒトTLR3 (human TLR3) を発現させた細胞では、二重鎖RNA刺激でインターフェロンの遺伝子プロモーターが活性化される。このことは、TLR3を介したシグナルがインターフェロンの誘導に関わっていることを示唆している。これに、本遺伝子によりコードされるタンパク質のドミナントネガティブ (抑制) 型、該タンパク質-TIRを導入すると、二重鎖RNA刺激によるインターフェロンの遺伝子プロモーターの活性化をブロックした。このブロックはMyD88、TIRAPのTIRドメインでは誘導できないことから、本遺伝子によりコードされるタンパク質がMyD88、TIRAP非依存性のインターフェロン誘導のシグナルに関与していることを示している。

30

**【0014】**

本発明は、上記知見に基づいて完成されたものである。即ち、本発明は、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードするDNA、及び該DNAによって発現されるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質からなる。該DNAは、配列表の配列番号1及び配列番号3に、及び、該タンパク質は、配列表の配列番号2及び配列番号4に示される。また、本発明は該DNA及びタンパク質の変異体DNA及び変異体タンパク質を含む。更に、本発明は、本発明のタンパク質と特異的に結合する抗体、本発明の遺伝子を染色体上で欠損させた非ヒト動物、及び該抗体や非ヒト動物及び本発明の遺伝子プローブを用いた細胞の免疫賦活機能の判定及びインターフェロン誘導シグナル伝達活性物質のスクリーニング方法、等を含むものである。

40

**【0015】**

具体的には本発明は、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードするDNA (請求項1) や、インターフェロン誘導シグナル伝達活性が、インターフェロンの誘導シグナル伝達活性であることを特徴とする請求項1記載のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードするDNA (請求項2) や、配列表の配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むことを特徴とする請求項1又は2記載のDNA (請求項3) や、配列表の配列番号3に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むことを特徴とする

50

請求項 1 又は 2 記載の DNA (請求項 4) や、請求項 3 又は 4 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の DNA (請求項 5) や、インターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質が、以下の (a) 又は (b) のタンパク質であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の DNA、即ち、(a) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は、(b) 配列表の配列番号 2 に示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、かつインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質 (請求項 6) や、インターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質が、以下の (a) 又は (b) のタンパク質であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の DNA、即ち、(a) 配列表の配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は、(b) 配列表の配列番号 4 に示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、かつインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質 (請求項 7) や、ウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質 (請求項 8) や、インターフェロン誘導シグナル伝達活性が、インターフェロンの誘導シグナル伝達活性であることを特徴とする請求項 8 記載のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質 (請求項 9) や、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 8 又は 9 記載のタンパク質 (請求項 10) や、配列表の配列番号 2 に示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、かつインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質 (請求項 11) や、配列表の配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 8 又は 9 記載のタンパク質 (請求項 12) や、配列表の配列番号 4 に示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、かつインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質 (請求項 13) からなる。

10

20

30

40

50

**【0016】**

また本発明は、請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の DNA を、発現用ベクターに組込んだことを特徴とするインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質発現組換えベクター (請求項 14) や、請求項 14 記載のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質発現組換えベクターを宿主細胞へ導入したことを特徴とする形質転換細胞 (請求項 15) や、請求項 8 ~ 13 のいずれか記載のタンパク質と特異的に結合する抗体 (請求項 16) や、抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 16 記載の抗体 (請求項 17) や、ウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物 (請求項 18) や、非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項 18 記載のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物 (請求項 19) や、ウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の DNA を導入することを特徴とするインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質を発現する細胞の調製方法 (請求項 20) からなる。

**【0017】**

さらに本発明は、請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の DNA 又はその部分からなることを特徴とする、ウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子検出用プローブ (請求項 21) や、請求項 21 記載の遺伝子検出用プローブを用いて遺伝子を検出し、判定することを特徴とする細胞のウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活機能の判定方法 (請求項 22) や、請求項 16 又は 17 記載の抗体を用いて、細胞のウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン

誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質の発現状態を検出することを特徴とする、細胞のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活機能の判定方法（請求項23）や、請求項18記載のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物に、被検物質を投与し、該非ヒト動物のインターフェロン誘導活性を測定・評価することを特徴とする、細胞のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性物質のスクリーニング方法（請求項24）からなる。

【発明の効果】

【0018】

本発明により、生物の微生物の侵入に対する生体防御機構に関与する、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質、及び該タンパク質をコードする遺伝子を取得し、同定したことにより、本発明が、ウイルス感染によるインターフェロン誘導の分子機構の解明に大きく貢献できることのみならず、該ウイルス由来二重鎖RNAによる免疫賦活機構に関わる疾病の診断や該疾病を治療する治療薬の創出に有力な手段を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明は、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子からなる。該遺伝子は、配列表の配列番号1又は配列番号3に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNAからなる。本発明のインターフェロン誘導シグナル伝達活性としては、インターフェロンの誘導シグナル伝達活性が挙げられる。

【0020】

また、本発明は、次の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA；  
 (a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質  
 (b)配列番号2に示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る、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質、からなる変異遺伝子を含む。該変異遺伝子を取得するには、本発明の配列表の遺伝子配列情報により、適宜公知の遺伝子工学の手法により変異させて、取得することができる。

【0021】

更に、本発明は本発明の遺伝子（配列表の配列番号1又は配列番号3のDNA）とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつウイルス由来二重鎖RNAによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードするDNA、すなわち、インタクトな遺伝子の変異体を含む。該遺伝子を取得するには、例えば、配列表の配列番号1又は配列番号3に示される塩基配列からDNAプローブを作製し、該DNAプローブを用いて、DNAライブラリーに対してストリンジントな条件下でハイブリダイゼーションし、かつ機械受容チャネル機能を有するものを選択して、取得することができる。該DNAを取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42での洗浄処理を挙げることができ、65でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。

【0022】

本発明の、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質としては、配列表の配列番号2又は配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる、ウイルス由来二重鎖RNAによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質や、配列表の配列

10

20

30

40

50

番号2又は配列番号4に示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るウイルス由来二重鎖RNAによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質の機能を有する変異体タンパク質を具体的に挙げることができる。これらのタンパク質は、それをコードする本発明の遺伝子を用いて遺伝子工学的に、或いは本発明のDNA配列情報に基づき、その配列を組換えて公知の方法により調製することができる。本発明で取得した配列表の配列番号2又は配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質は、いずれも、TIRドメインがタンパク質の中央部分に存在している。本発明のインターフェロン誘導シグナル伝達活性としては、インターフェロンの誘導シグナル伝達活性が挙げられる。

10

**【0023】**

本発明のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質は、本発明の遺伝子を用いて、遺伝子工学的に公知の方法により、製造することができる。即ち、本発明の遺伝子を、本発明のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質を発現するための発現ベクターに組み込み、該組換えベクターを宿主細胞へ導入し、形質転換させて、該細胞を培養することにより、遺伝子を発現させて、本発明のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質を製造することができる。

**【0024】**

上記本発明のタンパク質の遺伝子工学的製造に用いる発現系としては、該本発明のタンパク質を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。これら発現系は、発現を起こさせるだけでなく、発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

20

**【0025】**

また、上記本発明のタンパク質の遺伝子工学的製造に用いる、宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞や、L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞(ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む)、BHK21細胞、HEK293細胞、Bowesメラノーマ細胞、卵母細胞等の動植物細胞など、公知の宿主細胞の中から選択して用いることができる。また、本発明の遺伝子の宿主細胞への導入は、公知の標準的な実験室マニュアルに記載される方法等を用いて実施することができる。

30

**【0026】**

本発明は、本発明のタンパク質と特異的に結合する抗体を含む。該抗体としては、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体等を具体的に挙げることができる。これらは上記本発明のウイルス由来二重鎖RNAによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質を抗原として用いて常法により作製することができる。その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点ではより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の抗体を用いて、細胞のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質の発現状態を検出することにより、細胞のウイルス由来二重鎖RNAによる免疫賦活機能を判定することができる。

40

**【0027】**

上記のような抗体を用いたタンパク質の検出に際して用いる、検出手段としては、適宜

50

公知の手段を用いることができる。例えば、本発明のモノクローナル抗体等に、例えば、FITC（フルオレセインイソシアネート）又はテトラメチルローダミンイソシアネート等の蛍光物質や、<sup>125</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S又は<sup>3</sup>H等のラジオアイソトープや、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ又はフィコエリトリン等の酵素で標識したのものや、グリーン蛍光タンパク質（GFP）等の蛍光発光タンパク質などを融合させた融合タンパク質を用いることによって、抗体の反応を検出し、タンパク質の発現を検知することができる。また免疫学的測定方法としては、RIA法、ELISA法、蛍光抗体法、ブランク法、スポット法、血球凝集反応法、オクタロニー法等の方法を用いることができる。

**【0028】**

本発明は、更に、染色体上で本発明のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能を欠損させ、該遺伝子機能の欠損したノックアウト非ヒト動物を含む。該非ヒト動物を作製するには、配列表の配列番号2又は配列番号4に示されるアミノ酸配列において、その一部のアミノ酸を他のアミノ酸に変換したアミノ酸配列をコードする遺伝子を導入することにより、インターフェロン誘導シグナル伝達活性タンパク質をコードする遺伝子機能を欠損させて行うことができる。また、動物遺伝子の、配列表の配列番号2又は配列番号4に示されるアミノ酸配列において、その一部のアミノ酸配列に相当する部分を欠失させ、インターフェロン誘導シグナル伝達活性タンパク質をコードする遺伝子機能を欠損させて行うことができる。本発明における非ヒト動物としては、トリ、ウサギ、マウス、ラット等の非ヒト動物を具体的に挙げるができるが、実験用として用いる目的からは、マウスが特に好ましい。本発明のインターフェロン誘導シグナル伝達活性タンパク質をコードする遺伝子機能を欠損した非ヒト動物の作製に際して、遺伝子を導入する方法としては、ターゲティングベクターの構築等公知の適宜の方法を用いることができる。

**【0029】**

本発明においては、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、本発明の遺伝子（DNA）を導入することによって細胞機能を修復し、インターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質を発現する細胞を調製することができる。

**【0030】**

また、本発明の遺伝子（DNA）又はその部分からなるDNA配列をウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子検出用プローブとして用いて、遺伝子を検出し、検体中のDNA配列と配列表の配列番号1又は配列番号3のDNA配列とを比較することによって、判定することにより、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活機能の判定を行うことができる。該判定により、ウイルス由来二重鎖RNAによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質の機能又は発現に関連する疾病を診断することができる。

**【0031】**

また、前記のように、本発明の抗体は、細胞のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質の発現状態の検出に用いて、細胞のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活機能の判定に用いることができる。該判定により、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質の機能又は発現に関連する疾病を診断することができる。

**【0032】**

本発明のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子検出用プローブや本発明の抗体は、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによ

10

20

30

40

50

る免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質の機能又は発現に関連する疾病の診断用のキットとして製品化することができる。

#### 【0033】

本発明は、本発明のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物を用いて、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性物質のスクリーニングを行うことができる。該インターフェロン誘導シグナル伝達活性物質のスクリーニングには、被検物質を非ヒト動物に投与し、該非ヒト動物の、例えばインターフェロンのようなインターフェロン誘導活性を測定・評価することにより行うことができる。該インターフェロン誘導シグナル伝達活性物質は、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質の機能又は発現に関連する疾病の治療に用いることができる。

10

#### 【実施例1】

#### 【0034】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

#### 【0035】

この実施例では、TLRを経たシグナル伝達経路を更に明らかにするために、MyD88とTIRAP以外のTIR領域を含むアダプター分子を検索し、データベースによるスクリーニングによりTRIF（インターフェロン-β（interferon-beta）を誘導するTIR領域を含むアダプター）と名づけた新規のアダプター分子を同定した。この実験により、TRIFがMyD88或いはTIRAPではなく、IFN-βのプロモーター及びTRIFのドミナントネガティブ（抑制）型を優位的に活性化し、ポリ（I:C）に介されたTLR3反応を阻害することから、この新規アダプターがTLR3シグナルにおける特異的な役割をもつことを確認した。

20

#### 【0036】

#### [ 遺伝子の同定と機能の解明 ]

#### 材料と方法

#### （免疫沈降と免疫プロット）

293細胞に、発現ベクターに表示されたDNA断片を挿入したプラスミドをトランスフェクションし、一過性発現させた。細胞を0.15%NP-40、20mM トリス-HCL（pH7.5）、150mM NaCl、1mM EDTA、10%グリセロール、10mM -グリセロリン酸塩、1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、及びプロテアーゼ阻害剤（混合物：Roche Diagnostics社製）を含む溶菌バッファー中で溶解した。細胞溶解液をProtein G-sepharose（Amersham社製）で前精製を1時間行い、次に2μgの抗Flag M2抗体（Sigma社製）、2μgの抗Myc PL14抗体（MBL社製）もしくは1μgの抗ヒトIRF-3抗体（SantaCruz社製）及びProtein G-sepharose（Amersham社製）で2時間免疫沈降した。

30

#### 【0037】

免疫沈降物を、溶解液中で洗浄し、SDSサンプルバッファーに溶解し、SDS-PAGEで分離し、ポリフッ化ビニリデン膜（BIO-RAD社製）に移した。Flagがタグされた（Flag-tagged）タンパク質やMycがタグされた（Myc-tagged）タンパク質はHRP標識抗Flag M2抗体もしくはHRP標識抗Myc 9E10抗体（SantaCruz社製）とそれぞれ反応させた。内因性のIRF-3は抗ヒトIRF-3抗体とHRP標識抗ウサギIgG抗体（Amersham社製）と反応させ、抗体によって認識されたバンドをECLシステムによって検出した（PerkinElmer Life Sciences社製）。

40

#### 【0038】

#### [ 実験結果と考察 ]

#### （TRIFの同定）

50

MyD88と、TIR領域のTIRAP以外の分子がTLRを介したシグナル経路に関与していると予測し、TIRドメインを有する配列をexpressed sequence tag (EST) データベース上で検索し、新規のヒトcDNAクローン(アクセッション番号: BC009860、配列番号1)を同定し、TRIFと命名した。この遺伝子はNCBIに登録されているTIR領域(smart00255 TIR)と非常に類似していた(図1a)。この断片をプローブとして、この遺伝子の完全長cDNAを同定した。MyD88(296アミノ酸をコード)とTIRAP/Mal(235アミノ酸)と比較すると、この遺伝子には2136bpの長いオープンリーディングフレームがあり、712アミノ酸(配列番号2)をコードしていた(図1b)。

#### 【0039】

このヒトTRIFアミノ酸配列がコードされたcDNAは未知の機能のマウスTRIF cDNAクローン(アクセッション番号: XM110244、配列番号3)と55%の相同性を示した。この遺伝子産物をTRIF、即ちIFN- $\gamma$ を誘導するアダプターを含むTIR領域とした(図2)。

#### 【0040】

TRIFのTIR領域は、TRIFタンパク質のC末端側に存在した。また、TLR中に保存されTLRを介したシグナルの活性化に必須なプロリン残基がみられた(図1a)(Science 282, 2085, 1998; J. Immunol. 162, 374, 1999; Nature 401, 811, 1999)。TRIFの発現を、ヒトの組織から抽出した全RNAを用いてノーザンハイブリダイゼーションにより解析した。プローブとして、ヒトTRIF cDNAの678~1481番目のcDNA断片を、 $[^{32}\text{P}]$ -dCTPでメガプライムDNAラベリングキット(Amersham社製)を用いてラベルし、human MTN blot(Clontech社製)のExpressHyb solution(Clontech社製)10mlで65 $^{\circ}\text{C}$ 、12時間ハイブリダイズを行った後、 $2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDSで65 $^{\circ}\text{C}$ で30分、0.1% SDSを含む $0.2 \times \text{SSC}$ で65 $^{\circ}\text{C}$ 、30分洗浄し、BioMax MSフィルム(KODAK社製)で現像を行った。その結果、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、骨格筋等多くの組織で観察され、特に肝臓で高発現していた(図1c)。

#### 【0041】

(TRIFによるIFN- $\gamma$ プロモーターとNF- $\kappa$ B誘導活性)

MyD88及びTIRAPの強制発現が、293細胞においてNF- $\kappa$ Bの活性を誘導することを、ヒトELAM-1遺伝子のNF- $\kappa$ B応答性プロモーター(配列番号5)のルシフェラーゼ活性を測定することにより解析した。(図3a、左)。TRIFの発現はMyD88或いはTIRAPを介する誘導と比較して低水準ではあるが、NF- $\kappa$ Bの活性化を誘導した。LPS(TLR4リガンド)及び二重鎖RNA(dsRNA)(TLR3リガンド)は、MyD88非依存的にIFN- $\gamma$ の発現を誘導した(Nat. Immunol. 3, 392, 2002、J. Immunol. 162, 374, 2002、Nature 413, 732, 2001)。次にマウスIFN- $\gamma$ プロモーター(配列番号6)活性をルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて観察した(図3a、右)。レポータープラスミドと共に誘導されたMyD88或いはTIRAPの発現が誘導されたときは、プロモーター活性は観察されなかった。しかしながら、TRIFの発現は、IFN- $\gamma$ のプロモーター活性を劇的に誘導した。

#### 【0042】

TRIFタンパク質内のプロモーターの活性化に必須な領域を同定するために、末端欠損型TRIFを数種類作製した。TIR領域及びTRIFのN末端側半分(1~541番目のアミノ酸)を含むものをC、TIR領域及びTRIFのC末端側半分(380番目~C末端終点までのアミノ酸)を含むものをN、及びTIR領域でのみ構成されているものをNCとした(図3b)。293細胞にNF- $\kappa$ B応答性ルシフェラーゼレポーターを共トランスフェクションさせると、C或いはNの一方が全長TRIFを介する誘導と比較して活性が減少しているものの、ルシフェラーゼ活性を誘導した(図3c、左)。IFN- $\gamma$ プロモーター由来ルシフェラーゼ遺伝子の場合、Cは全長TRIFによる誘導と同程度のプロモーター活性が認められたが、Nでは認められなかった(図3c、右

10

20

30

40

50

）。 N Cにおいては、ルシフェラーゼレポータープロモーターの活性は認められなかった。これらの結果により、TRIFの明確な領域が次に挙げる2種類のプロモーターの活性化の原因となること、即ち、TRIFのN末端の一部分はIFN-プロモーター活性化に必須であり、TRIFのN末端とC末端双方の一部分はNF- $\kappa$ Bの活性化に参与している、ということが示唆された。

#### 【0043】

(TRIF抑制型のTLR経路シグナル伝達経路への影響)

MyD88及びTIRAPの場合と同様に、TRIFのTIR領域(N C)の発現はドミナント阻害因子(dominant inhibitor)として作用した。全長TRIFが誘導したNF- $\kappa$ B及びIFN-プロモーターの活性化はTRIF N Cの発現により顕著に抑制された(図4a)。TRIF N Cを用いて、TRIFがTLR依存性シグナル伝達経路であるかどうかを解析した。293細胞におけるTLR4/MD-2の発現は、この細胞がLPSに応答してNF- $\kappa$ Bレポーターを活性化することを可能にした。TRIF N Cの共発現は、TLR4-に依存したNF- $\kappa$ Bの活性化を阻害(inhibit)した(図4b)。さらに、TLR-2及びTLR-7に依存したNF- $\kappa$ Bの活性化は、TRIF N Cの発現により抑制(prohibit)された(図4c、d)。MyD88及びTIRAPの強制発現は、NF- $\kappa$ Bのリガンド非依存的な活性化をもたらした。TRIF N Cの共発現は、MyD88及びTIRAPを介したNF- $\kappa$ Bの活性化を顕著に阻害した(図4e、f)。これらの結果により、TRIFがMyD88及びTIRAPの下流で多くのTLR仲介シグナル伝達経路に参与していることが示唆された。

#### 【0044】

他のTLRメンバーと比較して、TLR3は、IL-12及びTNF- $\alpha$ (Biochem. Biophys. Res. Commun. 293, 1364, 2002)のような他の炎症性サイトカインよりもさらに優性にIFN- $\gamma$ を誘導する独自のシグナル経路を介している。安定してTLR3を発現している293細胞に、100ngのレポータープラスミドをlipofectamine 2000(Invitrogen社製)を用いてトランスフェクションし、24時間後に50 $\mu$ g/mlのポリ(I:C)で8時間刺激すると、NF- $\kappa$ B及びIFN-プロモーターの両方が活性化された(図4e、f)。MyD88及びTIRAPの抑制型の共発現は、IFN-プロモーター及びNF- $\kappa$ B応答性ELAM-1プロモーターの活性をポリ(I:C)依存的に阻害しなかったことから、TLR-3シグナルは主にMyD-88非依存的経路で構成されていることを示している(図4e、f)。TRIFの強制発現はIFN-プロモーターを優位的に活性化したことから、我々はTLR3シグナルにおけるTRIFの役割に焦点を当てた。MyD88及びTIRAPの抑制型に対する明確な対照として、TRIF N CはTLR3を安定して発現する293細胞において、両プロモーターのポリ(I:C)依存的な活性を阻害した。これらの結果は、TRIFがTLR3シグナルのMyD88非依存的活性化に参与していることを示している。

#### 【0045】

(TRIFによるTLR3及びIRF-3の認識)

TRIFが、TLR3或いはTLR2を認識するかどうかを解析した。ヒト腎細胞293細胞に7 $\mu$ gのFlag-TLR2(FlagがタグされたTLR2:Flag-tagged TLR2)若しくはFlag-TLR3(FlagがタグされたTLR3:Flag-tagged TLR3)と、3 $\mu$ gのMyc-TRIF(MycがタグされたTRIF:Myc-tagged TRIF)をトランスフェクションし、一過性発現させた。mock(対照)群においては、空のベクターを10 $\mu$ gトランスフェクションしたものをを用いた。トランスフェクションの36時間後、細胞を0.15%NP-40、20mM Tris-HCl(pH7.5)、150mM NaCl、1mM EDTA、10%グリセロール、10mM  $\beta$ -グリセロリン酸塩、1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、及びプロテアーゼ阻害剤(混合物はRoche Diagnostics社製)を含む溶菌バッファー中で溶解した。

#### 【0046】

細胞溶解液をProtein G-sepharose(Amersham社製)を用いて前精製を1時間行い、次

10

20

30

40

50

に 2  $\mu$ g の抗 F l a g M 2 抗体 ( anti-Flag M2 antibody : Sigma社製 )、2  $\mu$ g の抗 M y c P L 1 4 抗体 ( anti-Myc PL14 antibody : M B L 社製 ) もしくは 1  $\mu$ g の抗ヒト I R F - 3 抗体 ( anti-human IRF-3 antibody : SantaCruz社製 ) 及び Protein G-sepharose ( Amersham社製 ) で 2 時間免疫沈降を行った ( 図 5 a )。免疫沈降物を、溶解バッファーで洗浄した後、S D S サンプルバッファーに溶解し、S D S - P A G E により分子量別に分離し、ポリフッ化ビニリデン ( P V D F ) 膜 ( B I O - R A D 社製 ) に移した。Flag-Taggedタンパク質及びMyc-Taggedタンパク質は、それぞれH R P 標識抗 F l a g M 2 抗体もしくはH R P 標識抗 M y c 9 E 1 0 抗体 ( SantaCruz社製 ) とそれぞれ反応させた。内因性のI R F - 3 は抗ヒトI R F - 3 抗体及びH R P 標識抗ウサギI g G 抗体 ( Amersham社製 ) と反応させ、抗体によって認識されたバンドをE C L システム ( PerkinElmer Life Science s社製 ) により検出した。 10

#### 【 0 0 4 7 】

既に報告したとおり、M y D 8 8 及びT I R A P のT I R 領域はT L R との相互作用に必須である。そこで、T R I F のT I R 領域 ( N C ) がT L R 3 を認識するかどうかを解析した。F l a g - T L R 3 を安定的に発現させた293細胞に、空のベクター若しくはM y c - T R I F ( N C ) 発現ベクター ( 10  $\mu$ g ) をトランスフェクションし、一過性発現させた。M y c - T R I F N C をF l a g - T L R 3 で免疫沈降した後、上記と同様の方法により免疫プロットを行った。その結果、T R I F がT I R 領域を介してT L R 3 を認識する ( 図 5 b ) ことから、ポリ ( I : C ) . ポリ ( I : C ) に応答してI F N - の誘導を介し、L P S による刺激がI R F - 3 を活性化することを示唆された ( J. Biol. Chem. 274, 35535, 1999、FEBS Lett. 517, 251, 2001 )。 20

#### 【 0 0 4 8 】

さらに、T R I F が、内因性のI R F - 3 を認識するかどうかを解析した。293細胞に5  $\mu$ g のF l a g - G S T もしくはF l a g - T R I F 発現ベクターをトランスフェクションし、一過性発現させた。トランスフェクション24時間後に細胞を溶解し、全細胞溶解物を抗F l a g 抗体、若しくは抗ヒトI R F - 3 抗体と共に免疫沈降した後、抗F l a g 抗体を用いて、上記と同様の方法により免疫プロットを行った。また、内因性I R F - 3 を検出するために、全細胞溶解物 ( whole cell lysate : W C L ) を抗I R F - 3 抗体を用いて免疫プロットした。その結果、T R I F がI R F - 3 に認識されることから、T R I F がI R F - 3 と相互作用することが示唆された ( 図 5 c )。 30

#### 【 0 0 4 9 】

##### [ 考察 ]

本実験において、T I R 領域を含む新規アダプター分子を同定してT R I F と命名し、解析を行った。T R I F の過剰発現は、E L A M - 1 遺伝子のN F - B 応答性プロモーターと同様、I F N - 遺伝子のプロモーターを活性化した。既に公知であるアダプター分子であるM y D 8 8 やT I R A P とは異なり、T R I F はN F - B 応答性プロモーターと比較してI F N - プロモーターを優位的に活性化させた。注目すべき点は、T R I F の抑制型は、M y D 8 8 或いはT I R A P ではなく、完全にT L R 3 を介したシグナルを阻害したことである。このことは、T L R 3 シグナルにおけるT R I F の特異的な役割を示している。さらに、T R I F の抑制型は、T L R 2、T L R 4、或いはT L R 7 を介したN F - B 活性を阻害することから、他のT L R シグナル経路において何らかの役割が存在することが示唆される。それぞれのT L R 応答におけるT R I F の機能的役割がノックアウトマウスの発生の過程で観察されたとしても、T R I F が優位的にI F N - プロモーターを活性化させ、T R I F がI R F - 3 と認識するということは、T R I F がT L R 3 シグナルのM y D 8 8 非依存的経路においてT R I F が関与していることを示している。 40

#### 【 実施例 2 】

#### 【 0 0 5 0 】

Toll-like receptor ( T L R ) の刺激は、炎症性サイトカインの産出を導く共通のM y D 8 8 依存経路、及びI F N - の生成を導き、T L R 3 及びT L R 4 シグナルに独特の 50

MyD88非依存経路の活性化を誘因する。本実施例で、本発明者は、TIRドメインを含むアダプター、TRIFをコードする遺伝子を破壊し、TRIF欠損マウスを作製して、TRIFのTLRを経たシグナル伝達経路における役割について更に明らかにした。

#### 【0051】

すなわち、TRIF欠損マウスには、TLR3及びTLR4を介したIFN- $\gamma$ の発現及びIRF-3の活性化に欠陥があった。更に、TLR4を介した、炎症性サイトカインの産出が、TRIF欠損マクロファージで、消失していた。MyD88及びTRIFの両方が欠損したマウスでは、TLR4刺激に応答したNF- $\kappa$ Bの活性化が完全に喪失していた。これらの結果は、TRIFが、TLR3及びTLR4を介したシグナル経路に必須であることを立証した。

10

#### 【0052】

[TRIF欠損マウスの作製と機能の解明]

材料と方法

(TRIF欠損マウスの作製)

ES細胞(E14.1)のゲノムDNAから、PCR法で、Takara LA TaqTM (Takara社製)を使用して、Trif遺伝子を単離した。TRIF ORF全体をコードする2.1 Kb断片をネオマイシン耐性遺伝子カセット(neo)で置換して、ターゲティングベクターを構築した。負の選択のために、PGKプロモーターにより促進された単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼを、ゲノム断片に挿入した(図1a)。ターゲティングベクターをES細胞に挿入した後、G418及びgancyclovir二重耐性コロニーを選択し、PCR法及びサザンブロット法でスクリーニングした。相同的な組替え体をC57BL/6メスのマウスに注入し、ヘテロF1子をインタークロスして、TRIF欠損マウスを作製した。TRIF欠損マウスとそれらをインタークロスした野生型の同腹子とを実験に使用した。

20

#### 【0053】

(抗体)

R-484は株式会社ジャパンエナジー、医薬バイオ研究所から提供された。CpGオリゴデオキシヌクレオチドを、文献記載に準じて調製した。サルモネラ内毒素Re595からのLPSを、フェノールクロロフォルム石油エーテル抽出過程により調製した。S.aureus(黄色ブドウ球菌)からのPGN及びポリ(I:C)は、それぞれFluka社及びAmersham社から購入した。抗phosphoJNK抗体及び抗ERK1/2抗体は、Cell Signaling社より購入した。抗JNK1抗体は、Santa Cruz社から購入した。免疫沈降又は免疫ブロット用に、TRIFマウスのアミノ酸672~684又は718~732に対するポリクロナール抗TRIF抗体を、それぞれ産出した。IRF-3マウスのアミノ酸131~144に対するポリクロナール抗IRF3抗体を産出した。FACS分析を行った抗IgM抗体は、Jackson ImmunoResearch Laboratoryから購入した。

30

#### 【0054】

(電気泳動度シフト法)

胎児の繊維芽細胞及び肺繊維芽細胞( $1 \times 10^6$ )を、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のLPS、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のポリ(I:C)及び $10 \text{ng}/\text{ml}$  TNF- $\alpha$ で、示された時間刺激した。細胞から核抽出物を精製し、NF- $\kappa$ B DNA結合部位用の特異のプロープとインキュベートし、電気泳動し、文献記載に準じて、オートラジオグラフィで視覚化した(Immunity 9:143,1998)。

40

#### 【0055】

(炎症誘発性サイトカイン濃度の測定)

96 well plateで、PGN、LPS、R-848又はCpG DNAの示された濃度で、チオグリコール酸が誘出した腹腔マクロファージを培養した(well毎に $5 \times 10^4$ 細胞)。腹腔マクロファージが産出したTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12 p40を、製造者の指示に従って、ELISAで測定した(Genzyme社製)。

#### 【0056】

50

## ( B 細胞増殖分析 )

96 well plateで、ポリ ( I : C )、L P S、R - 848又はC p G DNAの示された濃度で、24時間脾細胞 (  $1 \times 10^5$  ) を培養した。1マイクロキュリーの [  $^3\text{H}$  ] チミジンを、後半の12時間パルスし、次に [  $^3\text{H}$  ] 摂取量を、シンチレーション計数器 ( Packard社製 ) で測定した。

## 【 0057 】

## ( フローサイトメトリー分析 )

200万の脾細胞を、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のポリ ( I : C )、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のL P S又は10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の抗I g M抗体で培養した。36時間の培養後、細胞を収集し、P E 共役抗B 220抗体及びビオチン共役抗C D 69抗体、抗C D 86抗体、抗I - A b抗体、その後ストレプトアビジンF I T Cで染色した。染色した細胞はCellQuest software ( Becton Dickison 社製 ) を使用して、F A C S Caliburで分析した。

10

## 【 0058 】

## ( ウェスタンブロット分析 )

肺繊維芽細胞 (  $1 \times 10^6$  ) を、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のL P Sで、示された時間刺激した。次に、1.0% Nonidet-P 40、150 mMのN a C l、20 mMのT r i s - C l ( p H 7.5 )、1 mMのE D T A及びプロテアーゼ抑制カクテル ( Roche社製 ) を含む溶解緩衝液内で、細胞を溶解した。細胞溶解物を、S D S - P A G E法 ( ポリアクリルアミドゲル電気泳動 ) で分解し、P V D F細胞膜 ( BioRad社製 ) 上に移動した。細胞膜は、抗phosphoJ N K抗体又は抗J N K 1抗体でプロットし、強化された化学発光システムにより視覚化した ( N E N Life Science Product社製 ) 。

20

## 【 0059 】

## ( 肺繊維芽細胞の調整 )

マウスの肺を切除し、P B S内で洗浄し、小さく切断し、攪拌し、30分間37 で酵素消化した。消化緩衝液 ( 10 ml / 肺 ) は、400 n MのE D T Aを含む0.25%のトリプシン溶液である。生じた細胞懸濁液に、冷えた完全D M E M培地を加えた。遠心分離 ( 1100 r p m、5分間 ) した後、ペレットを完全培地に再び懸濁し、その後皿で培養した。切除から10日で、肺繊維芽細胞を各実験に使用した。

## 【 0060 】

## ( Native - P A G E分析 : 非還元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 )

肺繊維芽細胞 (  $1 \times 10^6$  ) 及び腹腔マクロファージ (  $5 \times 10^6$  ) を、それぞれ50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のポリ ( I : C ) 及び1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のL P Sで、示された期間刺激し、その後溶解した。native - P A G Eサンプル緩衝液内の細胞溶解物 ( 62.5 mMのT r i s - C l、p H 6.8、15%のグリセロール及び1%のデオキシコラーテ ) を、native - P A G Eで単離し、その後文献記載に準じて、抗I R F - 3抗体で免疫プロットした ( Int. Immunol. 14, 783, 2002 ) 。

30

## 【 0061 】

## [ 実験結果と考察 ]

Toll-like receptor ( T L R ) は、微生物の構成成分の特異なパターンを認識し、M y D 88、T I R A P及びT R I F等のT o l l / I L - 1レセプター ( T I R ) ドメインを有するアダプターを経由した、シグナル伝達経路の活性化を通じて、自然免疫反応を誘発する ( Annu. Rev. Immunol. 20:197,2002; Annu. Rev. Immunol. 21:335,2003 )。M y D 88は、全てのT L Rに共通のアダプターであるが、T I R A PはT L R 2及びT L R 4を介したシグナル経路に特異的に関与している ( Nat. Immunol. 2, 675, 2001、Nature 420, 324, 2002、Nature 420, 329, 2002 )。共通のM y D 88依存経路に加えて、T L R 3及びT L R 4は、I R F - 3の活性化とI F N の誘導を導くM y D 88非依存経路を使用している ( J. Immunol. 167, 5887, 2001、Int. Immunol. 14, 1225, 2002、Immunity 17, 251, 2002 )。I F N - を誘導するT I Rドメインを有するアダプター ( T R I F ) が、I F N - プロモーターを活性化し、T L R 3と関連する、T I Rドメインを有する、第3のアダプターであると同定した ( J. Immunol. 169, 6668, 2002、Nat. Im

40

50

munol. 4, 161, 2003)。

【0062】

TRIFの生理学的な役割を評価するために、本発明者は、胚性幹(ES)細胞内の相同組換えを行って、TRIFが欠損したマウスを作製した。マウスTrif遺伝子は、1つのエクソンで構成されている。本発明者は、1つのエクソン全体をネオマイシン耐性遺伝子(neo)で置換した、ターゲティングベクターを構築した(図6A)。正しくターゲットされたES細胞クローンを使用して、突然変異対立遺伝子を有するマウスを作製した(図6B)。Trif遺伝子を破壊したホモ接合体の突然変異マウスは、想定されたメンデル比で出生し、健康に発育した。ノーザンブロット分析は、突然変異マウスの腹腔マクロファージが、TRIF mRNAを発現しないことを示唆した(図6C)。肺繊維芽細胞の免疫ブロット分析により、Trif遺伝子を破壊すると、TRIFタンパク質の発現が消失することを確認した(図6D)。

10

【0063】

初期のインビトロの研究は、TRIFが、TLR3を介したIFN- $\gamma$ の誘導に参与していることを示唆していた(J. Immunol. 169:6668,2002; Nat. Immunol. 4:161,2003)。したがって、本発明者は、まず、腹腔マクロファージにおいてポリ(I:C)刺激で誘導されるIFN- $\gamma$ 及びRANTES、IP-10、及びMCP-1などの幾つかのIFN誘導性遺伝子のmRNAを分析した(図7A)。TRIF<sup>-/-</sup>マウスのマクロファージでは、ポリ(I:C)に应答したIFN- $\gamma$ 及びIFN誘導性遺伝子の発現が欠陥を示した。これは、TLR3<sup>-/-</sup>マウスで見られた結果と一致した(Nature 413, 732, 2001)。更に、TRIF<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞は、ポリ(I:C)に应答した、増殖に著しい欠陥を示した。しかし、TLR9リガンドCpG DNAには正常に应答した(図7B)。TRIF<sup>-/-</sup>B細胞は、ポリ(I:C)誘導性の、CD69、CD86及びMHCクラスIIの細胞表面上の発現の増加に著しい欠陥があったが、抗IgM抗体誘導性では障害はなかった(図7C)。したがって、TRIF<sup>-/-</sup>マウス及びTLR3<sup>-/-</sup>マウスは、ポリ(I:C)に対する应答に欠陥があり、TRIFが、TLR3を介したシグナル経路に必須であることを示唆した。

20

【0064】

TLR3リガンドに加えて、TLR4リガンドLPSが、IFN- $\gamma$ 及びIFN誘導性遺伝子の発現をMyD88非依存性に誘導することを示した(J. Immunol. 167, 5887, 2001、Int. Immunol. 14, 1225, 2002、Immunity 17, 251, 2002)。本発明者らは、胎児の繊維芽細胞におけるLPS刺激で誘導されるRANTES、IP-10及びMCP-1などのIFN誘導性遺伝子のmRNAを分析した(図8A)。TRIF<sup>-/-</sup>細胞では、LPSが誘導するIFN誘導性遺伝子の発現は著しく減少した。したがって、TRIF<sup>-/-</sup>マウスは、LPSに対するMyD88非依存的应答に欠陥があった。

30

【0065】

次に、MyD88依存性で誘導される、幾つかのTLRリガンドに应答した、炎症性サイトカインの産出を分析した(図8B)。野生型及びTRIF<sup>-/-</sup>のマクロファージは、両方とも、TLR2リガンドペプチドグリカン、TLR7リガンドR-848及びTLR9リガンドCpG DNAに应答して、同程度のレベルのIL-12p40を生成した。

40

【0066】

しかし、LPSが誘導するTNF- $\alpha$ 、IL-6、及びIL-12p40の生成は、TRIF<sup>-/-</sup>マクロファージでは、消失した(図8B、C)。さらに、TRIF<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞は、R-848に应答して、通常通り増殖するにもかかわらず、LPSに应答した増殖では著しい欠陥を示した(図8D)。さらに、LPSが誘導するCD69及びCD89発現の増加は、TRIF<sup>-/-</sup>B細胞では、抗IgM抗体が誘導する発現が通常通りであったにもかかわらず、著しく減少した(図8E)。したがって、TRIF<sup>-/-</sup>マウスは、MyD88依存経路及びMyD88非依存経路が介するLPSに対する应答に欠陥を示した。

【0067】

50

T L R 3 及び T L R 4 を通る M y D 8 8 非依存経路では、I R F - 3 転写遺伝子が活性化されていると報告されていた (J. Immunol. 167, 5887, 2001、Int. Immunol. 14, 1225, 2002、Immunity 17, 251, 2002)。

#### 【 0 0 6 8 】

確かに、native-P A G E 分析 (非還元ポリアクリルアミドゲル電気泳動) は、野生型の肺繊維芽細胞及び腹腔マクロファージでそれぞれ、ポリ ( I : C ) 及び L P S 誘導性の、I R F - 3 二量体が形成されたことを示した (図 9 A、B)。しかし、T R I F<sup>-/-</sup>細胞では、ポリ ( I : C ) 又は L P S 誘導性の I R F - 3 の二量体は形成されなかった。この観察結果は、T L R 3 及び T L R 4 シグナリングにおける M y D 8 8 非依存経路の活性化に、T R I F が必須であることを示している。I R F - 3 に加えて、N F -  $\kappa$  B は、野生型の肺繊維芽細胞で、ポリ ( I : C ) に応答して、活性化した (図 9 C)。T L R 3<sup>-/-</sup>及び T R I F<sup>-/-</sup>細胞で、ポリ ( I : C ) 誘導性 N F -  $\kappa$  B 活性化は著しく低下し、T L R 3 が介するシグナル経路で、T R I F が重要な役割を持つことを示唆した。それとは対照的に、L P S 刺激は、T R I F<sup>-/-</sup>胎児繊維芽細胞でも、N F -  $\kappa$  B 及び M A P キナーゼ J N K のほぼ通常通りの活性化を導いた (図 9 D)。T L R 4 シグナリングでは、M y D 8 8 依存経路は、N F -  $\kappa$  B 及び M A P キナーゼの初期相 (early phase) の活性化を導くが、M y D 8 8 非依存経路は、M y D 8 8<sup>-/-</sup>細胞内の遅延した N F -  $\kappa$  B 及び M A P キナーゼ活性化で立証されているように、N F -  $\kappa$  B 及び M A P キナーゼの、遅延相 (late phase) の活性化を導く (J. Immunol. 167, 5887, 2001、Immunity 11, 115, 1999)。

10

20

#### 【 0 0 6 9 】

そこで、本発明者は、T R I F 依存性の遅延した N F -  $\kappa$  B 及び J N K 活性化の欠陥が、T R I F<sup>-/-</sup>マウスの M y D 8 8 依存性の早期活性化により遮蔽されていると仮定し、T R I F 及び M y D 8 8 の両方が欠損したマウスを作製した。T R I F / M y D 8 8 ダブルノックアウトマウスの胎児繊維芽細胞では、L P S が誘導する N F -  $\kappa$  B 及び J N K の活性化が完全に消失していた (図 9 E)。更に、例えば I P - 1 0、M C P - 1 及び R A N T E S などの I F N 誘導性遺伝子の L P S による誘導は、T R I F / M y D 8 8 ダブルノックアウト細胞では全く観察されなかった (図 9 F)。これらの観察結果は、T L R 4 が介する M y D 8 8 非依存性経路の活性化に、T R I F が必須であることを明確に示した。

30

#### 【 0 0 7 0 】

本発明者は、T R I F<sup>-/-</sup>マウスの分析で明らかになった T R I F の生理学的機能を報告する。T R I F<sup>-/-</sup>マウスは、T L R 3 及び T L R 4 リガンドが誘導する M y D 8 8 非依存性の応答において、著しい欠陥があった。T R I F<sup>-/-</sup>マウスでは、すべてのポリ ( I : C ) 誘導性応答が消失していたので、T R I F は、T L R 3 シグナル経路では、T L R 3 シグナリングに必須のアダプターである。T L R 4 刺激では、T R I F<sup>-/-</sup>マウスは通常の L P S 誘導性 M y D 8 8 依存性 N F -  $\kappa$  B 及び M A P キナーゼ活性化を示したにもかかわらず、L P S 誘導性の炎症性サイトカインの産出には欠陥があった。M y D 8 8 及び T I R A P は、T L R 4 シグナル経路において、重要な役割を持つことが示された。

#### 【 0 0 7 1 】

本発明者の観察結果は、恐らく T L R 4 とこれら 3 つ (又はそれ以上) の T I R ドメインを有するアダプターとの大きな複合体の形成を通じて、T R I F が、M y D 8 8 依存経路にも関与していることを示唆した。I F N -  $\gamma$  プロモーターの活性化には N 末端部分だけが関与していたが、N F -  $\kappa$  B 活性化は、T R I F の N 末端及び C 末端部分の両方が誘導されることを示された (J. Immunol. 169, 6668, 2002)。したがって、T R I F の C 末端部分は、T L R 4 シグナリングの M y D 8 8 依存経路において必要となる可能性がある。本発明者は、ウイルス感染に重要な役割を持つと想定される、M y D 8 8 非依存経路を調節する必須のアダプターを同定した。ウイルス感染への T R I F の関与に関する、T R I F<sup>-/-</sup>マウスの細かな分析は、T L R とウイルス認識との関係に新たな見識を提供する。

40

50

## 【 0 0 7 2 】

[ 実施例 2 における図面の解説 ]

図 6 は、突然変異 Trif 遺伝子の標的欠損について示す図である。

( A ) Trif 遺伝子、ターゲティングベクター、及び予測した欠損遺伝子の構造。塗りつぶしたボックスは、コードしたエクソンを示す。制限酵素：H、Hinc II。

( B ) ヘテロ接合体をインタークロスして出生した子のサザンプロットによる分析。ゲノム DNA を、マウス尾部から抽出し、Hinc II で消化し、電気泳動し、a で示したラジオラベルしたプローブとハイブリダイズした。サザンプロット分析したところ、野生型 ( + / + ) では、単一の 3 . 8 k b バンドを、ホモ接合体 ( - / - ) では、6 . 1 k b バンドを、又、ヘテロ接合体 ( + / - ) では両方を生じた。

( C ) 胎児繊維芽細胞のノーザンプロット分析。胎児の繊維芽細胞から抽出した全 RNA ( 1 0 μ g ) を電気泳動し、ナイロン細胞膜に移動し、T R I F 断片をプローブとして、ハイブリダイズした。同じ細胞膜を、 - アクチンプローブで再度ハイブリダイズした。

( D ) T R I F の内因性発現。胎児の繊維芽細胞から調製した細胞溶解物を、抗 T R I F 抗体で、免疫沈殿した。次に、免疫沈殿物を別の抗 T R I F 抗体で、免疫プロットした。タンパク質発現を調べるために、E R K 1 / 2 に対する抗体で、同じ溶解物にプロットした。

図 7 は、T R I F 欠損細胞内のポリ ( I : C ) 応答の欠陥について示す図である。

( A ) 腹腔マクロファージを、5 0 μ g / m l のポリ ( I : C ) で、示された時間刺激した。全 RNA ( 5 μ g ) を抽出し、I F N - 、I P - 1 0、R A N T E S 及び M C P - 1 の発現を調べるために、ノーザンプロット分析を行った。同じ細胞膜を、 - アクチンプローブで再度ハイブリダイズした。

( B ) ポリ ( I : C ) 又は C p G DNA で刺激した脾細胞の増殖。ポリ ( I : C ) 又は C p G DNA の示された濃度で、脾細胞を 2 4 時間培養した。[ <sup>3</sup>H ] チミジン ( 1 μ C i ) を後半の 1 2 時間パルスした。[ <sup>3</sup>H ] チミジン取り込みを、シンチレーション計数器 ( Packard 社製 ) で測定した。

( C ) 脾臓 B 2 2 0 + 細胞を、5 0 μ g / m l のポリ ( I : C ) 又は 1 0 μ g / m l の抗 I g M 抗体と共に培養した。3 6 時間の培養後、細胞を収集し、ビオチン共役抗 C D 6 9 抗体若しくは抗 C D 8 6 抗体で、又は抗 I - A<sup>b</sup> 抗体に続いてストレプトアビジン P E で染色した。Cell Quest software を使用して、F A C S Calibur で染色した細胞を分析した。

## 【 0 0 7 3 】

図 8 は、T R I F 欠損細胞内の L P S に対する応答の欠陥について示す図である。

( A ) 胎児の繊維芽細胞を、1 0 μ g / m l の L P S で、示された時間刺激した。全 RNA ( 1 0 μ g ) を抽出し、I P - 1 0、R A N T E S 及び M C P - 1 の発現を調べるために、ノーザンプロット分析を行った。同じ組織膜を - アクチンプローブで再度ハイブリダイズした。

( B ) T R I F 欠損マウス又は野生型のマウスからの腹腔マクロファージを、刺激しない状態にしたか、又は 1 0 μ g / m l のペプチドグリカン ( P G N )、1 0 0 n g / m l の L P S、1 0 0 n M の R - 8 4 8、3 0 n g / m l の I F N - の存在下の 1 μ M の C p G DNA で刺激した。E L I S A による I L - 1 2 p 4 0 分析のために、2 4 時間後に、上澄みを収集した。表示値は、平均値 ± 標準偏差の 3 倍である。

( C ) 腹腔マクロファージを、3 0 n g / m l の I F N - の存在下、示された L P S 濃度で、2 4 時間刺激し、上澄みに E L I S A を行い、T N F - 、I L - 6 及び I L - 1 2 p 4 0 を測定した。表示値は、平均値 ± 標準偏差の 3 倍である。

( D ) L P S 又は C p G DNA で刺激した脾細胞の増殖。脾細胞を、L P S 又は C p G DNA の示された濃度で、2 4 時間培養した。[ <sup>3</sup>H ] チミジン ( 1 μ C i ) を後半の 1 2 時間パルスした。[ <sup>3</sup>H ] チミジン取り込みを、シンチレーション計数器 ( Packard 社製 ) で測定した。

( E ) 脾細胞 B 2 2 0 + を、1 0 μ g / m l の L P S 又は 1 0 μ g / m l の抗 I g M 抗体

10

20

30

40

50

で培養した。36時間培養した時点で、細胞を収穫し、ビオチン共役抗CD69抗体又はCD86抗体で染色し、続いてストレプトタビジンPEで染色した。Cell Quest softwareを使用して、FACS Caliburで、染色した細胞を分析した。

【0074】

図9は、TRIF欠損及びTRIF/MyD88ダブルノックアウト細胞におけるシグナルカスケードの活性化(A及びB)について示す図である。

肺繊維芽細胞(A)又は腹腔マクロファージ(B)を、(A)50µg/mlのポリ(I:C)又は(B)1µg/mlのLPSで、示された時間刺激した。細胞可溶物を調製し、native-PAGEを行った。ウェスタンブロット法により、IRF-3の単量体(矢印)又は、二量体(矢頭)を検出した。

(C及びD)(C)50µg/mlポリ(I:C)及び(D)10µg/mlのLPSで、繊維芽細胞を、示された時間刺激した。核抽出物を調製し、NF-κB特異プローブを使用して、EMSAで、NF-κB DNA結合活性化を測定した。矢印及び米印は、誘導されたNF-κB複合体及び非特異バンドを、それぞれ示している(上パネル)。細胞抽出物に対する抗phosphoJNK特異抗体を使用して、LPS刺激細胞のJNK活性化を、ウェスタンブロット法で、測定した(下パネル)。(F)野生型及びTRIF/MyD88DKOマウスの胎児の繊維芽細胞を、10µg/mlのLPSで、示された時間刺激した。全RNA(10µg)を抽出し、IP-10、RANTES及びMCP-1の発現を調べるために、ノーザンブロット法で分析した。同じ細胞膜をアクチンプローブで、再度ハイブリダイズした。

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1】本発明の実施例において同定したヒトTRIF(hTRIF)を示す図である。aは、ヒトTRIFのアミノ酸配列と、既知であるsmart00255 TIRのアミノ酸配列との比較を、bは、TRIF、MyD88、及びTIRAP/Malの構造模式図を、cは、ヒトTRIF mRNAの組織分布をそれぞれ示す。

【図2】本発明の実施例において、ヒトTRIFとマウスTRIFのアミノ酸配列を比較したことを示す図である。枠で囲った配列はTIRドメインを示す。

【図3】本発明の実施例において、TRIFが、INF-プロモーター及びNF-κBの活性を誘導することを示す図である。

【図4】本発明の実施例において、TRIFの抑制型が、TLR経路のシグナル伝達経路の活性化を阻害することを示す図である。

【図5】本発明の実施例において、TRIFのTIR領域が、TLR3及びIRF-3を認識することを示す図である。なお、図中のIPは、免疫沈降に用いた抗体を、IBは、免疫ブロットに用いた抗体をそれぞれ示す。

【図6】本発明の実施例において、突然変異Trif遺伝子の標的欠損について示す図である。

【図7】本発明の実施例において、TRIF欠損細胞内のポリ(I:C)応答の欠陥について示す図である。

【図8】本発明の実施例において、TRIF欠損細胞内のLPSに対する応答の欠陥について示す図である。

【図9】本発明の実施例において、TRIF欠損及びTRIF/MyD88ダブルノックアウト細胞におけるシグナルカスケードの活性化について示す図である。

10

20

30

40

【 1 】

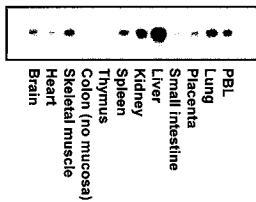
**a**

TRIF: 395 YNFVILHARAD...EHIALRVREKLEALGVDPGATFCEDFQVPGRGELSLQDAIDHSAF 451  
 smart00255 TIR: 2 YDFVISYSGDEDVRNEFLSHLLEQLRGYKL...CVFIDDFEGGDLNIDEAIEKSR1 57  
 \*: \* : : : \* : \* : : \* \* \* : \* : \* : \*  
 TRIF: 452 IILLLTSNF-DCLRLSHQVNGAMSNLTRQGSPOCVIP--FLPLESSPAQLSSDTASLL- 507  
 smart00255 TIR: 58 AIVVLSFNVAEAEWCLDEL-VAALLENALQGG-LRVIPFIVEIIPSDVRKQPGSFRKVKF 115  
 \*: \* : \* : : \* : \* : \* \* \* \* : : \* : :  
 TRIF: 508 -SGLVRLDEHSQIFARKVANT 527  
 Smart00255 TIR: 116 KNYLKWTEDEKDRFWKALYA 136  
 : \* : : \* : \*

**b**



**c**



【 2 】

hTRIF 1 MDNPGPSLRGAFGILGALERDRLTHLKHKLGSLCSGSQSEKLLHAMVLLALGQDTEARVS  
 mTRIF 1 MACTGPSLPSAFDILGAAGQDKLLYLKHKLTPRPGCGQDLHAMVLLALGQDTEARIS

61 LESLKMNTVAQLVAHQWADMETEGPEEPPDLSWTVAIRYLHLLAEENLCPASTROMAYQV  
 61 LEALKADAVARLVARQWAGVDSTEDPEEPPDVSNAVARYLHLLAEKLCPASLRDVAIQE

121 ALRDFASQGDHQLGQLQNEAWDRCSDDIKGDPSCGFPLHSHHGSLQPPSPASPAVTRSQPR  
 121 AVRTLSSRDDHRLGELQDEARNRCWDIAGDPSIRTLCSNLGCLPSSALPSGTRSRLPR

181 PID-TPDWSWGHTLHSTNSTASLASHLEISQSPFLAFSLSHHGTHGSKLNTPLDTQEP  
 181 PIDGVSQWSSGCSLRSTGSPASLASNLEISQSPFMPFLSLHRSHPHGSKLDDPPQASLVP

240 QLVPEGQEQEEISWPPSVETSVSLGLP--HEISVPEVSPPEEASPI LLDALAAPDTSVHC  
 241 EPVPGGQEQEEMSWPPSGEIASPPELPSSPPGLPEVAPDATSTGLPDTAPAPETSTNY

298 PI ECTELSTNSRSPLTSTTESYVGKQWP I TSQRSPQVYVGGDLSLQNTSSSPPAQPSLQA  
 301 PVCTEGSAGPQSLPLP I LEPVKNPCSVKQDTPQLSVEDTTSPTKPCPPTTPE---

358 SPKLPSPSSASSPSSYPAPPTSTSPVLDHSETSDKQFYNFVVIHARADEQVALRI REK  
 358 -TSPVPPPPSSSTPCS AHLTPSSLFPPS-SLESSSEKQFYNFVVIHARADEHI ALRVREK

418 LETLGVDPGATFCEEFQVPRGELHCLQDAIDHSQFT I LLLTASFDCSLSHQI NHALMN  
 416 LEALGVDPGATFCEEFQVPRGELHCLQDAIDHSAF I LLLTSNFDCRLSLHQVNGAMNS

TIRドメイン

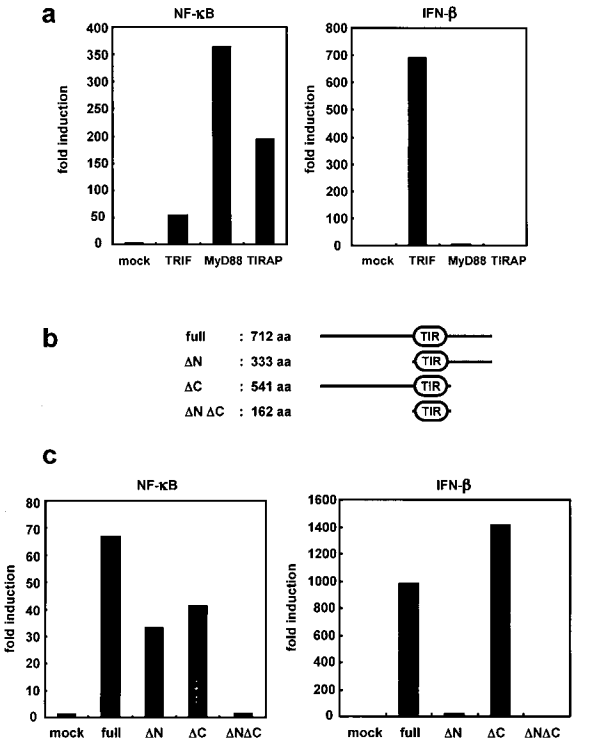
478 SLTQSGRQDCV I PLLPLECSQAQLSPDTRLLHSI VMLDEHSP I FARKVANTFKTKLQA  
 476 NLTRQGSPOCV I PFLPLESSPAQLSSDTASLLSGLVRLDEHSQ I FARKVANTFKPHRLQA

538 QRVRNKKAEARTLKEQS I QLEAERQNVAA I SAAYTAYVHSYRANQAEMLKLVAFGKNL  
 536 RKAMWRKEQDTRALREQSQHLGDERMQAAALNAAYSAYLQSYLSYQAQMEQLQVAFGSHM

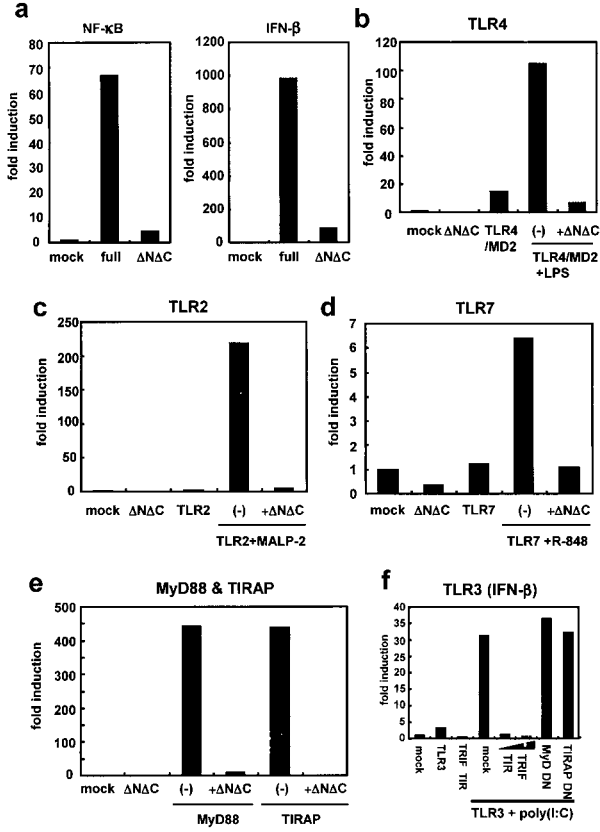
598 SLGTPTP--SWPGCPQPI PSHPQGGTPVFPYSPQPPSPFPQPPCFQPPSPFPQPSPLPP  
 596 SFGTGAPYGARMFPGGQVPLGAPPPFTWPGCPQPPPLHAWAQGTTPPPSPQPAAF-QS

656 VSSPQSQFSPASPAQTPGCPQL I I HHAQMVLQVNNHMHGHTCAQSSDDKTECSENP  
 655 LFPQSPAFPTASPAQPSGLQL I I HHAQMVLQVNNHMHGHTCAQSPEDKTEAE

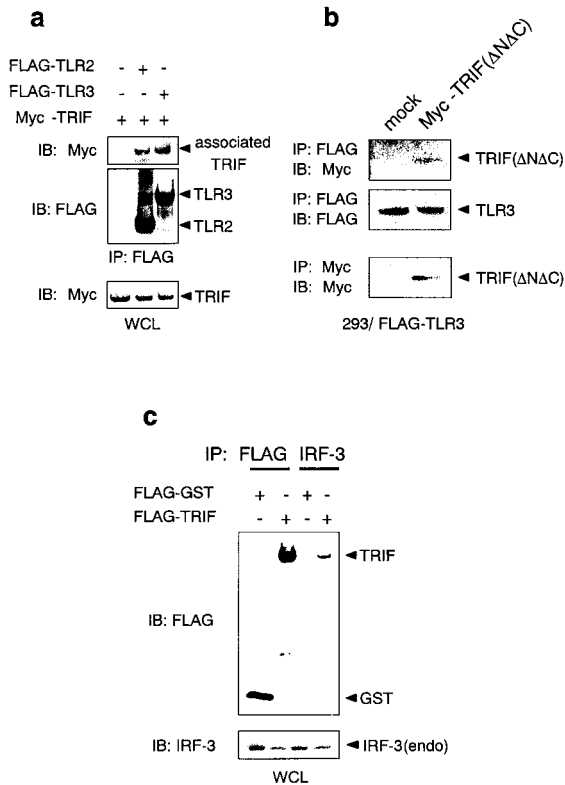
【 3 】



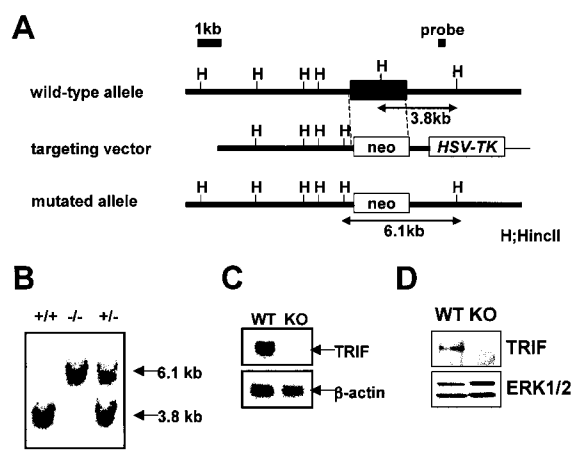
【 4 】



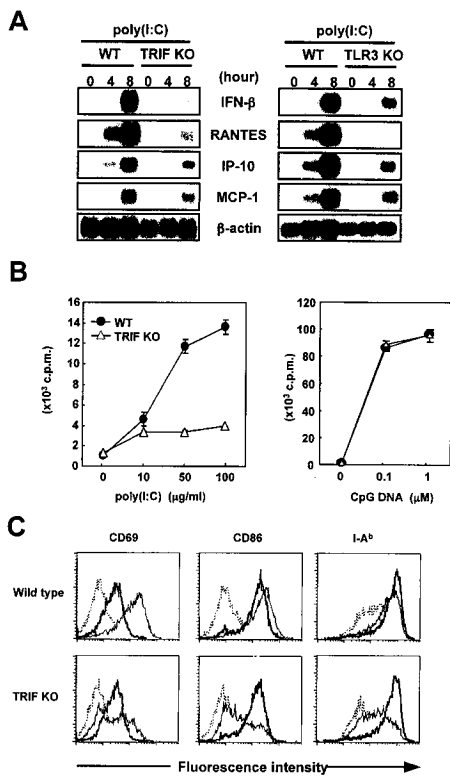
【 5 】



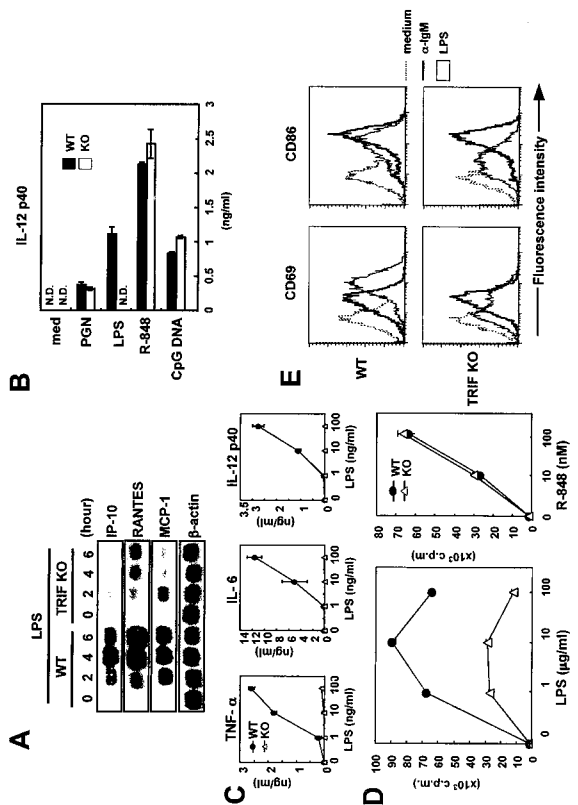
【 6 】



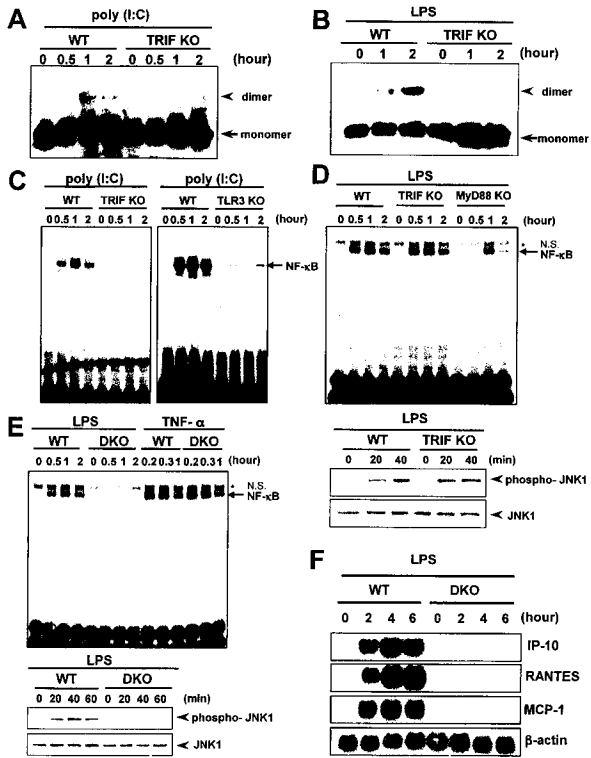
【 7 】



【 8 】



【 図 9 】



【 配列表 】

2004173679000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA01 CA04 CA06 CA09 CA11 CA12 DA03 EA04  
 FA02 FA10 GA13 GA18 HA01  
 4B063 QA01 QA13 QQ08 QQ42 QQ52 QQ96 QR32 QR55 QS32 QX01  
 4B064 AG26 AG27 CC24 DA13  
 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA25 CA24 CA46  
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA00 DA75 DA76 EA50 FA72  
 FA74

专利名称(译)	信号转导蛋白参与病毒衍生的双链RNA和内毒素及其基因的免疫刺激		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004173679A</a>	公开(公告)日	2004-06-24
申请号	JP2003270839	申请日	2003-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人 科学技术振兴机构		
[标]发明人	審良 静男 竹田 潔 山本 雅裕		
发明人	審良 静男 竹田 潔 山本 雅裕		
IPC分类号	A01K67/027 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/705 A01K2217/075 C07K14/47 G01N33/6866 G01N33/6872		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10 C12Q1/02 G01N33/50.P		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA13 4B024/GA18 4B024/HA01 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS32 4B063/QX01 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA25 4B065/CA24 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA00 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4B065/AA29		
优先权	2002330972 2002-11-14 JP		
其他公开文献	JP3886942B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供一种具有干扰素诱导的信号转导活性的蛋白质，其涉及病毒衍生的双链RNA和内毒素的免疫刺激，其基因以及使用它们的方法。 SOLUTION：DNA包含病毒衍生的双链RNA和编码具有内毒素免疫刺激作用的具有干扰素诱导的信号转导活性的蛋白质，以及具有该DNA表达的具有干扰素诱导的信号转导活性的蛋白质的DNA。此外，本发明是DNA和蛋白质的突变体DNA和突变体蛋白质，与本发明的蛋白质特异性结合的抗体，在染色体上缺失了本发明的基因的非人类动物，以及抗体，它包括使用非人类动物和本发明的基因探针确定细胞的免疫刺激功能的方法，以及筛选干扰素诱导的信号转导活性物质的方法。 [选择图]无

(5) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (
<b>C12N 15/09</b>	C12N 15/00 ZNAA	2G045
<b>A01K 67/027</b>	A01K 67/027	4B024
<b>C07K 14/47</b>	C07K 14/47	4B063
<b>C07K 16/18</b>	C07K 16/18	4B064
<b>C12N 1/15</b>	C12N 1/15	4B065
	審査請求 有 請求項の数 24 O L (全 24 頁) 最	

(21) 出願番号	特願2003-270839 (P2003-270839)	(71) 出願人	503360115
(22) 出願日	平成15年7月3日 (2003.7.3)		独立行政法人 科学技術振興機構
(31) 優先権主張番号	特願2002-330972 (P2002-330972)		埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(32) 優先日	平成14年11月14日 (2002.11.14)	(74) 代理人	100107984
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 廣田 雅紀
		(72) 発明者	審良 静男
			大阪府高槻市辻子1-7-16
		(72) 発明者	竹田 深
			大阪府箕面市小野原東2-7-1
		(72) 発明者	山本 雅裕
			大阪府箕面市小野原東4-19-05
		Fターム (参考)	2G045 A440 B03 B320 CB