

(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2004-226418

(P2004-226418A)

(43) 公開日 平成16年8月12日(2004.8.12)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	Z 2GO45
GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15	Z 4HO45
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/53	M
// CO 7 K 14/47	GO 1 N 33/566	
審査請求 有 請求項の数 25 O L (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-128900 (P2004-128900)	(71) 出願人	503360115
(22) 出願日	平成16年4月23日 (2004. 4. 23)		独立行政法人 科学技術振興機構
(62) 分割の表示	特願2002-342683 (P2002-342683)		埼玉県川口市本町4丁目1番8号
	の分割	(74) 代理人	100107984
原出願日	平成14年11月26日 (2002. 11. 26)		弁理士 廣田 雅紀
		(72) 発明者	福井 宣規
			福岡県福岡市早良区高取2-15-16
		(72) 発明者	笹月 健彦
			東京都渋谷区西原1-48-1-108
		Fターム(参考)	2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50
			DA13 DA36 FBO2
			4H045 AA30 BA10 CA40 EA50 FA74

(54) 【発明の名称】 リンパ球遊走に不可欠なDOCK2の機能ドメイン及び会合分子

(57) 【要約】

【課題】 DOCK2とELMO1との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、ELMO1とTiam1との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、これらスクリーニング方法を利用するアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法等を提供すること。

【解決手段】 DOCK2のN末端の504アミノ酸残基を欠失したDOCK2変異体ではRac活性化能が著しく低下し、アクチン重合を惹起できないことを見出し、この領域に結合する分子としてELMO1を同定した。DOCK2はSH3ドメインを介してELMO1に会合していることを見出した。さらに、ELMO1が、Rac特異的なGDP/GTP交換因子(GEF)として機能するTiam1と結合することを見出した。DOCK2はELMO1を介してTiam1をリクルートすることによりRacを活性化していることを見出した。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

E L M O と G D P / G T P 交換因子と被検物質とを接触させ、次いで E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とする E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 2】

E L M O の N 末端領域と G D P / G T P 交換因子と被検物質とを接触させ、次いで E L M O の N 末端領域と G D P / G T P 交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とする E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 3】

E L M O 若しくはその N 末端領域及び / 又は G D P / G T P 交換因子が、他のペプチドと融合していることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 4】

G D P / G T P 交換因子に対する抗体又は G D P / G T P 交換因子と融合した他のペプチドに対する抗体により分画された G D P / G T P 交換因子に、E L M O 若しくはその N 末端領域に対する抗体を作用させ、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 5】

G T P 結合型の活性型 R a c を検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 6】

E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質が、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 7】

E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質が、E L M O と G D P / G T P 交換因子との結合を阻害する物質であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 8】

E L M O が、D O C K 2 と結合した E L M O であることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 9】

E L M O が、E L M O 1 であることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 10】

G D P / G T P 交換因子が、R a c 特異的な G D P / G T P 交換因子であることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 11】

R a c 特異的な G D P / G T P 交換因子が T i a m 1 であることを特徴とする請求項 10 記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 12】

請求項 13 ~ 23 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、G v H、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とする R a c を活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法。

【請求項 14】

D O C K 2 と E L M O と G D P / G T P 交換因子と被検物質とを接触させ、次いで D O C K 2 と E L M O との会合形成の程度、あるいは、E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とする R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 15】

D O C K 2 の S H 3 ドメインと E L M O と G D P / G T P 交換因子と被検物質とを接触させ、次いで D O C K 2 の S H 3 ドメインと E L M O との会合形成の程度、あるいは、E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とする R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 16】

G T P 結合型の活性型 R a c を検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項 14 又は 15 記載の R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 17】

E L M O が、D O C K 2 と結合した E L M O であることを特徴とする請求項 14 ~ 16 のいずれか記載の R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 18】

E L M O が、E L M O 1 であることを特徴とする請求項 26 ~ 29 のいずれか記載の R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 19】

G D P / G T P 交換因子が、R a c 特異的な G D P / G T P 交換因子であることを特徴とする請求項 14 ~ 18 のいずれか記載の R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 20】

R a c 特異的な G D P / G T P 交換因子が T i a m 1 であることを特徴とする請求項 19 記載の R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 21】

請求項 14 ~ 20 のいずれか記載の R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするリンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質の探索方法。

【請求項 22】

請求項 14 ~ 21 のいずれか記載の R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、G v H、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法。

【請求項 23】

請求項 14 ~ 22 のいずれか記載の R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とする R a c を活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法。

【請求項 24】

S H 3 ドメインを含む D O C K 2 の N 末端領域を標的とし、D O C K 2 の S H 3 ドメインと該 S H 3 ドメイン結合タンパク質と被検物質とを接触させ、次いで D O C K 2 と S H 3 ドメイン結合タンパク質との会合形成の程度を評価することを特徴とする D O C K 2 機能阻害物質のスクリーニング方法。

【請求項 25】

完全長 D O C K 2 及び D O C K 2 欠失変異体を発現する遺伝子導入細胞株を用い、これら

10

20

30

40

50

の細胞株における R a c 活性化の程度を測定・評価し、D O C K 2 の機能ドメインを同定し、該機能ドメインと会合する機能ドメイン会合分子を探索し、D O C K 2 の機能ドメインと機能ドメイン会合分子と被検物質とを接触させ、D O C K 2 の機能ドメインと機能ドメイン会合分子との会合形成の程度を評価することを特徴とする D O C K 2 機能阻害物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、欠失変異体を用いた D O C K 2 機能ドメインの同定や、D O C K 2 及び D O C K 2 の S H 3 ドメインとの結合を干渉する物質のスクリーニング、とりわけ D O C K 2 と E L M O との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、E L M O と T i a m 等の G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、これらスクリーニング方法を利用するアレルギー、自己免疫疾患、G v H、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫応答は、生体にとって感染に対する必須の防御機構であり、免疫細胞は、種々の感染源に迅速に対処すべく生体内を常にパトロールしている。このように構成細胞が絶えず動き回るという特徴は、他の生命複雑系においては認められず、免疫系独自に進化したものである。免疫細胞のうち、好中球、マクロファージといった細胞は感染の初期防御において機能する一方、Tリンパ球及びBリンパ球はその抗原受容体を介して外来異物を認識することで抗原特異的な免疫応答を引き起こすことが知られている。上記T及びBリンパ球は、胸腺、骨髄といった1次リンパ組織で分化し、脾臓、リンパ節、パイエル板（小腸のリンパ組織）といった2次リンパ組織の特定のコンパートメントへ移動した後、ここで、種々の組織から集められた抗原を、かかる抗原受容体を介して認識することにより特異的な免疫応答を惹起する。この際、リンパ球が2次リンパ組織の特定の部位に移動することは、免疫応答の成立において極めて重要である。これまで、リンパ球の移動が、種々のケモカインと総称されるタンパク質によって導かれることは知られているが、リンパ球の運動性そのものを制御する分子機構に関しては不明であった。

【0003】

細胞運動には、細胞極性の変化と細胞骨格の再構築が必須であり（例えば、非特許文献1参照。）、これらはいずれも R h o、R a c、C d c 4 2 といった低分子量 G タンパク質によって制御されていることが知られている（例えば、非特許文献2～5参照。）。この中でもとりわけ R a c は、葉状突起と呼ばれるアクチンに富んだ突起を形成することで細胞運動の際の駆動力を提供している（例えば、非特許文献3，6参照。）。他方、線虫（*Caenorhabditis elegans*）、ヒト及びショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）において、C E D 5、D O C K 1 8 0、Myoblast city（M B C）という構造上相同性を示す分子が同定され、これらの分子はその頭文字をとって C D M ファミリー分子と呼ばれており、いずれも R a c の上流で機能することで細胞骨格の再構築に関与すると考えられている（例えば、非特許文献7～12参照。）。上記 C E D - 5 及び Myoblast City が特定タイプの細胞の運動に重要であることが突然変異体を用いた遺伝学的解析から明らかになっているが（例えば、非特許文献8，9，12参照。）、C D M ファミリータンパク質が、哺乳類において生理的にどのように機能するかは未だ不明であった。

【0004】

D O C K 2（K I A A 0 2 0 9；DNA Res. 3, 321-329）は、ヒト造血細胞で特異的に発現する C D M ファミリータンパク質の他のメンバーをコードし、上記 D O C K 2 が 2 9 3 T 腎細胞において R a c に結合し、R a c を活性化することが知られている（例えば、非特許文献13参照。）。一方、本発明者らは、マウス胸腺 c D N A ライブラリーより C D M ファミリーに属する新規遺伝子 H c h を単離し、かかる遺伝子産物が 1 8 2 8 のアミ

ノ酸から成り、そのN末端にはSH3ドメインがコードされていることを見出した(例えば、非特許文献14参照。)。また、マウス組織を用いたノーザンブロット解析において、DOCK180がさまざまな臓器に発現しているのに対して、Hchの発現は胸腺及び脾臓に限局していることや、細胞株を用いた解析より2種類の変異T細胞株を除いて、Hchの発現がT細胞、B細胞、マクロファージのいずれにおいても認められることを確認した。またHchの発現を欠く変異T細胞株にHchを導入することで細胞形態の著明な変化と接着性の亢進が観察されることを明らかにしている。Hchのコードする1828アミノ酸のうち1677アミノ酸はヒトDOCK2と同一であり、HchはマウスDOCK2ホモログと考えられたが、上記DOCK2の生理的機能は不明であった。

【0005】

本発明者らは、上記のようにCDMファミリーに属し、且つリンパ球特異的に発現する分子としてDOCK2を同定し、ノックアウトマウスを作製することで、この分子がリンパ球遊走に不可欠であることを明らかにした(例えば、非特許文献14参照。)。DOCK2欠損リンパ球では種々のケモカイン刺激によっても活性型Racは検出できない。それ故、DOCK2はRacの活性化を介してリンパ球遊走を制御していると考えられる。しかしながら、DOCK2がどのような機序でRacを活性化するのか依然として不明である。Racは分子スイッチとして機能し、GDP/GTP交換因子(GEF)により活性化される。DOCK2はRacと結合するものの、その構造上GEFとして機能するとは考えにくい。それ故、DOCK2は他の分子を介してGEFをリクルートすることによりRacを活性化していると推測される。

【0006】

最近、線虫において、CDMファミリー分子の一種であるCED-5と会合し、細胞骨格を制御する分子であるCED-12が同定され、その哺乳類ホモログとしてELMO1, 2, 3が報告された(例えば、非特許文献15参照。)。また、GDP/GTP交換因子(GEF)としてこれまでに数10種類のもものが知られており、これらGEFの中でも、Rac特異的なGEFとして機能する分子として、胸腺腫細胞株の浸潤を規定するTiam1, 2(例えば、非特許文献16、17参照。)や、T細胞受容体シグナルを制御するVav1(例えば、非特許文献18参照。)の他Vav2、Vav3や、Trio(例えば、非特許文献19参照。)や、STEF(例えば、非特許文献20参照。)や、P-Rex1(例えば、非特許文献21参照。)が知られており、これら5種類はいずれも共通のドメインをもっており、GTPをRacに付与する機能を有している。

【0007】

【非特許文献1】Cell 84, 359-369, 1996

【非特許文献2】Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5027-5031, 1995

【非特許文献3】Science 279, 509-514 1998

【非特許文献4】J. Cell Biol. 141, 1147-1157, 1998

【非特許文献5】Science 287, 1037-1040, 2000

【非特許文献6】Cell 103, 227-238, 2000

【非特許文献7】Mol. Cell Biol. 16, 1770-1776, 1996

【非特許文献8】J. Cell Biol. 138, 589-603, 1997

【非特許文献9】Nature 392, 501-504, 1998

【非特許文献10】Genes Dev. 12, 3331-3336, 1998

【非特許文献11】Genes Dev. 12, 3337-3342, 1998

【非特許文献12】Nature Cell Biol. 2, 131-136, 2000

【非特許文献13】Biochem. Biophys. Acta 1452, 179-187, 1999

【非特許文献14】Nature, 412, 826-831, 2001

【非特許文献15】Cell, 107, 27-41, 2001

【非特許文献16】Cell, 77, 537-549, 1994

【非特許文献17】Nature, 375, 338-340, 1995

【非特許文献18】Nature, 385, 169-172, 1997

10

20

30

40

50

【非特許文献19】J. Cell Science, 113, 729-739, 2000

【非特許文献20】J. Biol. Chem., 277, 2860-2868, 2002

【非特許文献21】Cell, 108, 809-821, 2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

自己免疫疾患や移植片拒絶は、標的組織にリンパ球が浸潤することによりもたらされる。そのため、これらの疾患や病態を治療あるいは予防する上で、DOCK2は格好の標的分子になると考えられる。本発明の課題は、欠失変異体を用いたDOCK2機能ドメインの同定や、DOCK2及びDOCK2のSH3ドメインとの結合を干渉する物質のスクリーニング、とりわけDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、ELMOとTiam等のGEFとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、これらスクリーニング方法を利用するアレルギー、自己免疫疾患、GVH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法等等を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

DOCK2はN末端のSH3ドメインを含む1828アミノ酸残基からなるリンパ球特異的に発現する分子であり、Racを活性化し、細胞骨格を制御することでリンパ球の運動性を規定している。本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、DOCK2のSH3ドメインを含むN末端の504アミノ酸残基を欠失したDOCK2変異体ではRac活性化能が著しく低下し、アクチン重合を惹起できないことを見出し、この領域に結合する分子としてELMO1を同定した。また、SH3ドメインの1アミノ酸変異により、DOCK2とELMO1との結合が完全に阻害されることから、DOCK2はSH3ドメインを介してELMO1に会合していることを見出した。さらに、ELMO1が、Rac特異的なGDP/GTP交換因子(GEF)として機能するTiam1と結合することを見出した。すなわち、DOCK2はELMO1を介してTiam1をリクルートすることによりRacを活性化していることを見出した。したがって、DOCK2のSH3ドメイン、ELMO1、Tiam1という分子間相互作用を阻害することで、リンパ球遊走を人為的に制御しうることを見出した。本発明は、以上の知見に基づいて完成するに至ったものである。

20

30

【0010】

すなわち本発明は、ELMOとGDP/GTP交換因子と被検物質とを接触させ、次いでELMOとGDP/GTP交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とするELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法(請求項1)や、ELMOのN末端領域とGDP/GTP交換因子と被検物質とを接触させ、次いでELMOのN末端領域とGDP/GTP交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とするELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法(請求項2)や、ELMO若しくはそのN末端領域及び/又はGDP/GTP交換因子が、他のペプチドと融合していることを特徴とする請求項1又は2記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法(請求項3)や、GDP/GTP交換因子対する抗体又はGDP/GTP交換因子と融合した他のペプチドに対する抗体により分画されたGDP/GTP交換因子に、ELMO若しくはそのN末端領域に対する抗体を作用させ、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項1~3のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法(請求項4)や、GTP結合型の活性型Racを検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項1~4のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法(請求項5)や、ELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質が、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質であることを特徴とする請求項1~5のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法(請求項6)や、ELMOと

40

50

GDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質が、ELMOとGDP/GTP交換因子との結合を阻害する物質であることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法(請求項7)や、ELMOが、DOCK2と結合したELMOであることを特徴とする請求項1～7のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法(請求項8)や、ELMOが、ELMO1であることを特徴とする請求項1～8のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法(請求項9)や、GDP/GTP交換因子が、Rac特異的なGDP/GTP交換因子であることを特徴とする請求項1～9のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法(請求項10)や、Rac特異的なGDP/GTP交換因子がTiam1であることを特徴とする請求項10記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法(請求項11)や、請求項13～23のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法(請求項12)や、請求項1～12のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするRacを活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法(請求項13)に関する。

10

【0011】

また本発明は、DOCK2とELMOとGDP/GTP交換因子と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とELMOとの会合形成の程度、あるいは、ELMOとGDP/GTP交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とするRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項14)や、DOCK2のSH3ドメインとELMOとGDP/GTP交換因子と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2のSH3ドメインとELMOとの会合形成の程度、あるいは、ELMOとGDP/GTP交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とするRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項15)や、GTP結合型の活性化型Racを検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項14又は15記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項16)や、ELMOが、DOCK2と結合したELMOであることを特徴とする請求項14～16のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項17)や、ELMOが、ELMO1であることを特徴とする請求項26～29のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項18)や、GDP/GTP交換因子が、Rac特異的なGDP/GTP交換因子であることを特徴とする請求項14～18のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項19)や、Rac特異的なGDP/GTP交換因子がTiam1であることを特徴とする請求項19記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項20)に関する。

20

30

【0012】

さらに本発明は、請求項14～20のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするリンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質の探索方法(請求項21)や、請求項14～21のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法(請求項22)や、請求項14～22のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするRacを活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法(請求項23)や、SH3ドメインを含むDOCK2のN末端領域を標的とし、DOCK2のSH3ドメインと該SH3ドメイン結合タンパク質と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とSH3ドメイン結合タンパク質との会合形成の程度を評価することを特徴とする

40

50

DOCK2機能阻害物質のスクリーニング方法(請求項24)や、完全長DOCK2及びDOCK2欠失変異体を発現する遺伝子導入細胞株を用い、これらの細胞株におけるRac活性化の程度を測定・評価し、DOCK2の機能ドメインを同定し、該機能ドメインと会合する機能ドメイン会合分子を探索し、DOCK2の機能ドメインと機能ドメイン会合分子と被検物質とを接触させ、DOCK2の機能ドメインと機能ドメイン会合分子との会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2機能阻害物質のスクリーニング方法(請求項25)に関する。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、DOCK2の分子間相互作用を解明し、DOCK2を標的としたリンパ球遊走制御物質及びリンパ球遊走制御方法を提供することができる。また、本発明によれば、DOCK2の分子間相互作用を阻害することによる、自己免疫疾患や移植片拒絶反応の予防薬又は治療薬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】

【0014】

本発明のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法としては、DOCK2とELMOと被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とELMOとの会合形成の程度を評価する方法や、DOCK2のSH3ドメインとELMOと被検物質とを接触させ、次いでDOCK2のSH3ドメインとELMOとの会合形成の程度を評価する方法や、DOCK2とELMOのC末端領域と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とELMOのC末端領域との会合形成の程度を評価する方法や、DOCK2のSH3ドメインとELMOのC末端領域と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2のSH3ドメインとELMOのC末端領域との会合形成の程度を評価する方法であれば、特に制限されるものではなく、上記、DOCK2若しくはそのSH3ドメイン及び/又はELMO若しくはそのC末端領域として、これらとマーカータンパク質及び/又はペプチドタグとが結合した融合タンパク質又は融合ペプチドとして用いてもよい。また、上記ELMOとしては、ELMO1、ELMO2、ELMO3を具体的に挙げるができるが、中でもELMO1を好適に例示することができる。

【0015】

上記DOCK2のSH3ドメインとしては、ELMOと会合しうる機能を有するDOCK2の変異体で、DOCK2のSH3ドメインの全部又は一部を含むペプチドを例示することができる。具体的には、DOCK2の1位から502位のアミノ酸残基からなるDOCK2Nや、DOCK2の1位から1311位のアミノ酸残基からなるDOCK2Cを挙げることができる。また、上記ELMOのC末端領域としては、DOCK2のSH3ドメインと会合しうる機能を有するELMOの変異体で、ELMOのC末端領域の全部又は一部を含むペプチドを例示することができる。具体的には、ELMO1の147位から727位のアミノ酸残基からなるELMO1-del1や、ELMO1の345位から727位のアミノ酸残基からなるELMO1-del8を挙げることができる。以下、DOCK2と上記DOCK2のSH3ドメインを合わせて「DOCK2等」、ELMO1などのELMOと上記ELMOのC末端領域を合わせて「ELMO等」ということがある。

【0016】

上記DOCK2変異体やELMO変異体は、DOCK2遺伝子やELMO遺伝子を常法により改変することにより調製することができる。DOCK2遺伝子としては、Hch(マウスDOCK2)遺伝子(GenBankアクセッションナンバーAY027438; Nature, Vol412, 23 August, 826-831, 2001)、ヒトDOCK2遺伝子(XM_047961; DNA Res. 3, 321-329)を具体的に挙げるができるが、DOCK2遺伝子の由来はマウス及びヒト等に限られるものではない。また、ELMO1などのELMO遺伝子としては、マウスELMO1遺伝子(AF398883; Cell, Vol.107 (1), 27-41, 2001)、ヒトELMO1遺伝子(AF398885; Cell, Vol.107 (1), 27-41, 2001)の他、ELMO2遺伝子(ヒトAF398886、マウスAF398884)、ELMO3

遺伝子(ヒトNM_024712)を具体的に挙げるができるが、DOCK2遺伝子やELMO遺伝子の由来はマウス及びヒト等に限られるものではない。なお、マウスDOCK2のアミノ酸配列については配列番号1に、ヒトDOCK2のアミノ酸配列については配列番号2に、マウスELMO1のアミノ酸配列については配列番号3に、ヒトELMO1のアミノ酸配列については配列番号4に示す。

【0017】

上記DOCK2等やELMO等と、マーカータンパク質及び/又はペプチドタグとが結合している融合タンパク質や融合ペプチドにおける、マーカータンパク質としては、従来知られているマーカータンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体のFc領域、HRP、GFPなどを具体的に挙げるができる、またペプチドタグとしては、HA、FLAG、Myc等のエピトープタグや、GST、マルトース結合タンパク質、ビオチン化ペプチド、オリゴヒスチジン等の親和性タグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合タンパク質や融合ペプチドは、常法により作製することができる、HAタグに対する特異抗体を利用して、DOCK2等やELMO1等とHAタグとの融合タンパク質や融合ペプチドを分離・分画することができる。

10

【0018】

DOCK2とELMO1などのELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法において、DOCK2等とELMO等と被検物質とを接触させる方法としては、DOCK2等とELMO等との会合形成の程度を評価することができる接触方法であれば特に制限されるものではなく、セルフリー系で被検物質の存在下、DOCK2等とELMO等とを接触させる方法や、DOCK2等発現細胞に、ELMO等やELMO等をコードする遺伝子がインテグレートされた発現ベクターを被検物質と共に導入する方法や、ELMO等発現細胞に、DOCK2等やDOCK2等をコードする遺伝子がインテグレートされた発現ベクターを被検物質と共に導入する方法や、DOCK2等・ELMO等非発現細胞に、DOCK2等やDOCK2等をコードする遺伝子がインテグレートされた発現ベクターと、ELMO等やELMO等をコードする遺伝子がインテグレートされた発現ベクターと、被検物質とを導入する方法を挙げるができる。

20

【0019】

上記被検物質との接触のために用いられる細胞としては、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核細胞や、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を挙げるができるが、動物細胞が好ましい。また、かかる細胞内にDOCK2等やELMO等を導入する方法としては、上記の遺伝子を導入する方法の他に、巨大分子と非共有結合体を形成し、タンパク質等の巨大分子の構造を変化させ、タンパク質等の巨大分子を細胞内にデリバリーすることができるChariot(Active Motif社製)等の細胞毒性のない試薬を用いることもできる。

30

40

【0020】

また、上記発現ベクターとしては、動物細胞用発現ベクターが好ましく、かかる動物細胞用発現ベクターとしては、例えば、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、レンチウイルス、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。また、動物細胞用発現ベクターに代えてリポソームを用いることもできる。そして、かか

50

る動物細胞用発現ベクターの細胞への導入は、Davisら (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986) 及び Sambrookら (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション (transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレーパーローディング (scrape loading)、弾丸導入 (ballistic introduction)、感染等により行うことができる。

【0021】

本発明のDOCK2とELMO1などのELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法において、DOCK2等とELMO等との会合形成の程度を評価する方法としては、分離・分画されたDOCK2等にELMO等に対する抗体を作用させ、あるいは、分離・分画されたELMO等にDOCK2等に対する抗体を作用させ、DOCK2等とELMO等との会合形成の程度を免疫化学的に測定・評価する方法を挙げることができる。DOCK2等やELMO等を分離・分画するには、DOCK2等やELMO等に対する特異抗体、タグ特異的抗体を用いることができる。また、タンパク質-タンパク質間の相互作用を微量のタンパク質を用いてかつ標識することなく検出できる酵母のtwo hybrid systemや、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することができる表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーや、立体構造の変化を検出できるNMR法を使用して、その会合形成の程度を測定・評価する方法を挙げることができる。その他、大腸菌発現系を用いたfar western法、アフィニティクロマトグラフィーを利用する方法等の公知の相互作用するタンパク質の探索法を好適に例示することができる。

【0022】

本発明のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法において、DOCK2等とELMO等との会合形成の程度を評価するもう一つの方法として、GTP結合型の活性型Racを検出する評価方法を挙げることができる。活性型Racの検出には、PAK1 Rac結合ドメインのGST融合タンパク質を用いたプルダウン法を用いることができる。

【0023】

本発明のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法における被検試料としては、例えばペプチド、タンパク質、合成化合物、微生物発酵物、海洋生物抽出物、植物抽出物、原核細胞抽出物、真核単細胞抽出物又は動物細胞抽出物あるいはそれらのライブラリーを挙げることができる。また、本発明のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法において、コントロール実験を併用することができる。コントロールとしては、DOCK2等とELMO等との会合形成に影響を及ぼすことのないネガティブコントロール、及び/又はDOCK2等とELMO等との会合形成に影響を及ぼすポジティブコントロールを用いることができる。

【0024】

上記DOCK2とELMOとの会合に干渉する物質としては、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質、特にDOCK2とELMOとの結合を阻害する物質等のリンパ球遊走制御機能の抑制物質を挙げることができる。リンパ球遊走制御機能としては、DOCK2遺伝子の発現に依拠するリンパ球の運動性を制御する機能であれば特に制限されるものではないが、Racを活性化してRac-GTP結合体とし、細胞骨格の再構築、特にリンパ球におけるアクチン重合を促進する機能や、SLC、SDF-1、BLC等のケモカイン刺激によるリンパ球の遊走機能や、脾臓、リンパ節、パイエル板等の2次リンパ組織へのホーミング機能や、ELCケモカイン刺激に対する成熟胸腺T細胞の末梢血中への移出機能や、SDF-1ケモカイン刺激に対するCD4+CD8+未熟胸腺細胞の遊走機能等を具体的に例示することができる。

【0025】

本発明はまた、ELMOとGDP/GTP交換因子(GEF)との会合に干渉する物質

のスクリーニング方法や、Rac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法に関する。ELMOとGEFとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法としては、ELMOとGEFと被検物質とを接触させ、次いでELMOとGEFとの会合形成の程度を評価する方法や、ELMOのN末端領域とGEFと被検物質とを接触させ、次いでELMOのN末端領域とGEFとの会合形成の程度を評価する方法であれば特に制限されるものではなく、また、Rac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法としては、DOCK2とELMOとGEFと被検物質とを接触させ、あるいは、DOCK2のSH3ドメインとELMOとGEFと被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とELMOとの会合形成の程度、あるいは、ELMOとGEFとの会合形成の程度を評価する方法であれば特に制限されるものではなく、上記ELMOとして、DOCK2と結合したELMOを用いることもできる。 10

【0026】

上記ELMOとしては、ELMO1、ELMO2、ELMO3を具体的に挙げるができるが、中でもELMO1を好適に例示することができ、また、上記GEFとしては、Tiam1、Tiam2、Vav1、Vav2、Vav3、Trio、STEF、P-Rex1などのRac特異的なGDP/GTP交換因子が好ましく、中でもTiam1を好適に例示することができる。上記Tiam1遺伝子としては、マウスTiam1遺伝子(NM_009384; Cell, Vol.77 (4), 537-549, 1994)、ヒトTiam1遺伝子(NM_003253; Oncogene Vol. 10(7), 1371-1376, 1995)を具体的に挙げるができるが、Tiam1遺伝子の由来はマウス及びヒト等に限られるものではない。なお、マウスTiam1のアミノ酸配列を配列番号5に、ヒトTiam1のアミノ酸配列を配列番号6に示す。 20

【0027】

上記ELMOとGEFとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、Rac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法における、ELMOとGEFとの会合形成の程度を評価する方法、DOCK2とELMOとの会合形成の程度を評価する方法、他のペプチドと融合しているELMO又はそのN末端領域やGEFを用いる方法などを含め、前記DOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法における手法を準用することができる。 30

【0028】

以上の本発明のDOCK2とELMO1などELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、ELMOとGEFとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、Rac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法、特にリンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用すると、DOCK2を標的としたアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する予防・治療薬のスクリーニングが可能となる。例えば、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法により得られる抗DOCK2 SH3ドメイン抗体、DOCK2 SH3ドメイン結合分子(低分子化合物を含む)、DOCK2遺伝子のアンチセンス鎖、ELMO1などELMOのC末端領域のDOCK2 SH3ドメイン結合部位を特異的に認識する抗体、ELMO1などELMOのC末端領域のDOCK2 SH3ドメイン結合部位に結合する分子(低分子化合物を含む)、ELMO1などELMOのN末端領域のTiam1などGEF結合部位を特異的に認識する抗体、ELMO1などELMOのN末端領域のTiam1などGEF結合部位に結合する分子(低分子化合物を含む)、ELMO1などELMOのアンチセンス鎖等のリンパ球遊走制御機能の抑制物質は、リンパ球の運動性を人為的に抑制しうることが期待されることから、アレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬となりうる可能性がきわめて大きい。かかる治療薬を医薬品として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができ、通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、 40 50

乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる。

【0029】

また、本発明のDOCK2とELMO1との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、ELMO1とTiam1との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、Rac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法、特にリンパ球遊走制御機能の促進物質のスクリーニング方法を利用すると、Racを活性化して細胞骨格の再構築を促進しうることから、リンパ球遊走抑制に起因する疾病、例えば、各種癌や、薬剤・放射線照射によって引き起こされる免疫不全症などに対する予防・治療薬のスクリーニングが可能となる。

【0030】

さらに、本発明のDOCK2機能阻害物質のスクリーニング方法としては、SH3ドメインを含むDOCK2のN末端領域を標的とし、DOCK2のSH3ドメインと該SH3ドメイン結合タンパク質と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とSH3ドメイン結合タンパク質との会合形成の程度を評価する方法や、完全長DOCK2及びDOCK2欠失変異体を発現する遺伝子導入細胞株を用い、これらの細胞株におけるRac活性化の程度を測定・評価し、DOCK2の機能ドメインを同定し、該機能ドメインと会合する機能ドメイン会合分子を探索し、DOCK2の機能ドメインと機能ドメイン会合分子と被検物質とを接触させ、DOCK2の機能ドメインと機能ドメイン会合分子との会合形成の程度を評価する方法を挙げることができ、被検物質と接触させる方法や会合形成の程度を評価する方法やRac活性化の程度を測定方法などは、上述した方法を用いることができ、DOCK2の機能ドメインの同定方法や完全長DOCK2及びDOCK2欠失変異体を発現する遺伝子導入細胞株の作製は以下の実施例記載の方法を用いることができる。

【実施例】

【0031】

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。

実施例1 (DOCK2のN末端の領域とELMO1との結合)

線虫において最近CED-5と会合し、細胞骨格を制御する分子としてCED-12が同定され、その哺乳類ホモログとしてELMO1が報告された(非特許文献15)。そこで、DOCK2とELMO1とが結合するか否かを検討するために、PcDNA/His maxベクター(Invitrogen社製)を用いてC末端にHAタグ(YPYDVPDYA:配列番号7)を挿入した完全長DOCK2あるいは種々のDOCK2欠失変異体をコードする遺伝子コンストラクト(PcDNA DOCK2-HA、PcDNA DOCK2 N-HA、PcDNA DOCK2 C-HA、PcDNA DOCK2 N-HA)を構築し、PcDNA V5-Hisベクター(Invitrogen社)にELMO1 cDNAを挿入した遺伝子(PcDNA ELMO1-V5)と共に293T細胞(九州大学畠山鎮次博士より分与)に遺伝子導入した。DOCK2コンストラクトは本発明者らが単離した遺伝子(非特許文献14)より、ELMO1コンストラクトはマウス組織cDNAよりPCR法を用いて常法により作製した。使用したDOCK2欠失変異体をコードする遺伝子は以下の通りであり、これを図1Aに模式的に示す。

- 1) PcDNA DOCK2 N-HA; DOCK2の1位から502位のアミノ酸残基をコードする遺伝子
- 2) PcDNA DOCK2 C-HA; DOCK2の1位から1311位のアミノ酸残基をコードする遺伝子
- 3) PcDNA DOCK2 N-HA; DOCK2の505位から1828位のアミノ酸残基をコードする遺伝子

遺伝子導入後48時間で細胞を回収し、Lysis buffer(Cell signaling社製)で溶解した後、total cell lysate及び抗HA抗体(Roche社製)による免疫沈降物を対象に抗V5抗体(Invistorgen社製)を用いたウェスタンブロット法にて解析した。total cell lysateではいずれも抗V5抗体でELMO1に相当する約100KDのバンドが検出された(

10

20

30

40

50

図1B;上段)。しかしながら、免疫沈降物においては、完全長DOCK2、DOCK2 C、DOCK2 Nをコードする遺伝子を導入した場合ELMO1に相当するバンドが認められたが、DOCK2のN末端504位までのアミノ酸残基を欠くDOCK2 Nを発現させた場合は検出できなかった(図1B;中段下段)。このことから、DOCK2はそのN末端の502個のアミノ酸残基の領域でELMO1と会合することが明らかとなった。

【0032】

実施例2(N末端領域を欠失したDOCK2 NでのRacの活性化)

ELMO1との会合がDOCK2の機能にどのような影響を及ぼすかを検討するため、PBJ1ベクターを用いて完全長DOCK2及びDOCK2のN末端504アミノ酸残基を欠失した変異体(DOCK2 N)をコードする遺伝子コンストラクトを構築し、これらをDOCK2遺伝子の発現を欠くT細胞株BE 16-3(National Jewish CenterのPhillippa Marrack博士より分与)に導入した安定遺伝子導入細胞株を樹立した。N3-5はDOCK2を発現する野生型T細胞株であり、17-11(非特許文献14)及び84-3は本発明者らが樹立した、それぞれ完全長DOCK2あるいはDOCK2 Nを発現する遺伝子導入細胞株である。本発明者らが作製した抗DOCK2ポリクロナール抗体を用いたウェスタンブロット解析において、17-11と84-3におけるDOCK2及びDOCK2 Nの発現はほぼ同程度であった(図2A、参考写真1参照。)。そこで17-11と84-3を対象に、これらの細胞株におけるRac活性化をPAK1 Rac結合ドメインのGST融合タンパク質を用いたプルダウン法にて比較解析した。完全長DOCK2を発現する17-11においてはGTP結合型の活性型Racが容易に検出できたが、ELMO1との結合部位を欠くDOCK2 Nを発現する84-3ではRac活性化能が顕著に低下していた(図2B、参考写真1参照。)。17-11と84-3をPI(propidium iodide)で核染色したところ、親株であるBE 16-3と異なり、いずれにおいても核が偏在する-すなわち細胞の極性化が起こっているという所見が得られた(図2C;上段、参考写真1参照。)。しかしながら、これらの細胞をF-アクチンのプローブであるファロイジンで染色した場合、アクチン重合は17-11においてのみ認められ、84-3ではDOCK2の発現を欠くBE 16-3と同様全く検出されなかった(図2C;下段、参考写真1参照。)。このことから、DOCK2とELMO1との会合はRacのfull activationにも、それに伴う細胞骨格の再構築にも極めて重要であることが示唆された。以上のことから、ELMO1との結合に重要なN末端領域を欠失したDOCK2 NではRac活性化能が顕著に低下し、アクチン重合を誘導できないことがわかった。

【0033】

実施例3(DOCK2のSH3ドメインを介してのELMO1との会合)

DOCK2はN末端にはタンパク質-タンパク質相互作用に関与することが知られているSH(Src-homology)3ドメインがコードされている。DOCK2のN末端の502個のアミノ酸残基がELMO1との会合に重要であることを見出したので、これがSH3ドメインを介したものであるのかどうかにつき検討を加えた。SH3ドメインには共通して保存されたアミノ酸残基が存在している。そこで、PcDNA/His maxベクターを用いてC末端にHAタグを挿入した種々のDOCK2 SH3変異体をコードする遺伝子コンストラクトを構築し、PcDNA ELMO1-V5と共に293T細胞に遺伝子導入することで図1Bと同様に解析した。DOCK2 SH3変異体をコードする遺伝子は以下のとおりである。

- 1) PcDNA L27E-HA; DOCK2の27位のロイシンをグルタミン酸に置換した変異体をコードする遺伝子
- 2) PcDNA G32E-HA; DOCK2の32位のグリシンをグルタミン酸に置換した変異体をコードする遺伝子
- 3) PcDNA P60E-HA; DOCK2の60位のプロリンをグルタミン酸に置換した変異体をコードする遺伝子
- 4) PcDNA F63E-HA; DOCK2の63位のフェニルアラニン

酸に置換した変異体をコードする遺伝子

DOCK2 SH3ドメインを含む10位から89位までのアミノ酸配列を図3Aに示す。total cell lysateにおいてはいずれも抗V5抗体でELMO1に相当する約100KDのバンドが検出された(図3B;上段)。しかしながら抗HA抗体を用いた免疫沈降物を対象とした場合、ELMO1に相当するバンドはPcDNA DOCK2-HA及びPcDNA L27E-HAを導入した以外では検出できなかった(図3B;中段)。一方、いずれの遺伝子を導入した場合でもDOCK2及びDOCK2 SH3変異体の発現は同程度であった(図3B;下段)。以上の結果は、SH3ドメインの1アミノ酸置換でDOCK2とELMO1との会合が完全に阻害されることを示すものであり、これらのことから、DOCK2はそのSH3ドメインを介してELMO1に結合していることが明らかとなった。

10

【0034】

実施例4(ELMO1のC末端領域とDOCK2との結合)

次にDOCK2と結合するELMO1の機能ドメインを同定するため、PcDNAV5Hisベクターを用いて、種々のELMO1欠失変異体をコードする遺伝子コンストラクトを構築し、PcDNA DOCK2-HAと共に293T細胞に遺伝子導入することで解析した。ここで使用したELMO1欠失変異体をコードする遺伝子は以下の通りであり、これを図4Aに模式的に示す。

- 1) PcDNA ELMO1-del1-V5; ELMO1の147位から727位までのアミノ酸残基をコードする遺伝子
- 2) PcDNA ELMO1-del8-V5; ELMO1の345位から727位までのアミノ酸残基をコードする遺伝子
- 3) PcDNA ELMO1-del10-V5; ELMO1の1位から613位までのアミノ酸残基をコードする遺伝子

20

total cell lysate においてはいずれも抗V5抗体でELMO1もしくはその欠失変異体に相当するバンドが検出された(図4B;上段)。しかしながら、抗HA抗体による免疫沈降物においては、抗V5抗体に反応するバンドは完全長ELMO1、ELMO1-del1及びELMO1-del8をコードする遺伝子を導入した場合には認められるものの、ELMO1の614位から727位までのアミノ酸残基を欠くPcDNA ELMO1-del10を発現させた場合は検出できなかった(図4B;中段、下段)。このことから、ELMO1の614位から727位までのアミノ酸残基を含むC末端の領域がDOCK2 SH3ドメインとの会合に重要であることが示された。これらのことから、ELMO1はそのC末端の領域でDOCK2に結合していることがわかった。

30

【0035】

実施例5(ELMO1のN末端領域とTiam1との結合)

Tiam1は胸腺腫細胞株の浸潤を規定する分子として同定されたものであり、Rac特異的なGDP/GTP交換因子(GEF)として機能することが知られている(Cell 77, 537-549, 1994, Nature375, 338-340, 1995)。DOCK2とELMO1との会合がRacのfull activationに必要であることから、DOCK2はELMO1を介してTiam1をリクルートしているという可能性が考えられた。この仮説を検証するために、マウス組織cDNAよりPCR法を用いて増幅したTiam1遺伝子を基に、PCIベクター(Promega社製)を用いて、C末端にHAタグを挿入したTiam1をコードするコンストラクト(PCI Tiam1-HA)を構築し、完全長ELMO1あるいは種々のELMO1欠失変異体をコードする遺伝子(PcDNA ELMO1-V5、PcDNA ELMO1-del1PH-V5、PcgDNA ELMO1-del8-V5、PcDNA ELMO1-del1)と共に293T細胞に遺伝子導入し解析した。PcDNA

40

ELMO1-del1PH-V5はELMO1の1位から565位までと695位から727位までのアミノ酸残基をコードする遺伝子であり、ここで使用したELMO1欠失変異体を図5Aに模式的に示す。total cell lysateにおいてはいずれも抗V5抗体でELMO1もしくはその欠失変異体に相当するバンドが検出された(図5B;上段)。抗HA

50

抗体による免疫沈降物においても P c D N A

E L M O 1 - V 5 及び P c D N A E L M O 1 - d e l P H - V 5 を導入した場合、抗 V 5 抗体に反応するバンドが検出された (図 5 B ; 中段、下段)。このことは、T i a m 1 と E L M O 1 とが結合するということを示している。しかしながら、E L M O 1 の N 末端の 1 4 6 位まであるいは 3 4 4 位までのアミノ酸残基を欠失させた変異体ではこのような結合は認められず (図 5 B ; 中段、下段)、これらのことから、E L M O 1 はその N 末端で T i a m 1 と会合していることが示された。

【 0 0 3 6 】

以上より、1) D O C K 2 は S H 3 ドメインを介して E L M O 1 の C 末端の領域に結合すること、2) E L M O 1 はその N 末端の領域を介して T i a m 1 と結合すること、3) E L M O 1 と結合できない D O C K 2 変異体では R a c 活性化能が著しく低下することが明らかとなった。このことから、D O C K 2 は E L M O 1 を介して、R a c の G E F として機能する T i a m 1 をリクルートすることにより R a c を活性化していることが示された (図 6)。

10

【 0 0 3 7 】

自己免疫疾患や移植片拒絶は、標的組織にリンパ球が浸潤することによって惹起されるため、これら疾患や病態を治療あるいは予防する上で D O C K 2 シグナル伝達は格好の標的となる。今回の知見は、D O C K 2、E L M O 1、T i a m 1 という分子間相互作用が細胞運動に不可欠な R a c 活性化を制御しているということを示すものであり、これらの分子間相互作用を遮断することでリンパ球浸潤を阻止し得るものと考えられる。それ故、これら分子間相互作用は自己免疫疾患や移植片拒絶の治療法や予防法の開発に向け今後の創薬の標的になるものと期待される。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 8 】

【 図 1 】 D O C K 2 がその N 末端の領域で E L M O 1 と結合することを示す図である。A は、D O C K 2 及び D O C K 2 欠失変異体の構造を模式的に示す図である。図中、黒塗りは S H 3 ドメインである。B は、2 9 3 T 細胞に D O C K 2 あるいは D O C K 2 欠失変異体をコードする遺伝子を、P c D N A E L M O 1 - V 5 と共にトランスフェクトし、4 8 時間後に細胞を回収し、免疫沈降及びウェスタンブロット法を用いて E L M O 1 との結合を解析した図である。左側に解析に供したサンプルの種類、免疫沈降及びウェスタンブロットに用いた抗体を示す。

30

【 図 2 】 E L M O 1 との結合に重要な N 末端領域を欠失した D O C K 2 N では R a c 活性化能が顕著に低下し、アクチン重合を誘導できないことを示す図である。A は、B E 1 6 - 3、N 3 - 5、及び遺伝子導入細胞株 (1 7 - 1 1、8 4 - 3) における D O C K 2 あるいは D O C K 2 N の発現を、D O C K 2 に対するポリクロナール抗体を用いたウェスタンブロット法にて解析した図である。図中、N S は非特異的なバンドを示す。B は、8 4 - 3、1 7 - 1 1、B E 1 6 - 3 の細胞抽出液を P A K 1 R a c 結合ドメインの G S T 融合タンパク質でプルダウンし、抗 R a c 抗体で染色することにより活性型 R a c を検出した図である。C は、B E 1 6 - 3、1 7 - 1 1、8 4 - 3 を propidium iodide 及びファロイジン (phalloidin) で染色することで細胞の極性化及びアクチン重合につき検討した図である。

40

【 図 3 】 D O C K 2 がその S H 3 ドメインを介して E L M O 1 と会合することを示す図である。A は、D O C K 2 S H 3 ドメインを含む 1 0 - 8 9 のアミノ配列を示す図である。グルタミン酸に置換したアミノ酸残基を太字で示す。B は、2 9 3 T 細胞に D O C K 2 あるいは D O C K 2 S H 3 変異体をコードする遺伝子を、P c D N A E L M O 1 - V 5 と共にトランスフェクトし、4 8 時間後に細胞を回収し、免疫沈降及びウェスタンブロット法を用いて E L M O 1 との結合を解析した図である。左側に解析に供したサンプルの種類、免疫沈降及びウェスタンブロットに用いた抗体を示す。

【 図 4 】 E L M O 1 がその C 末端の領域で D O C K 2 に結合していることを示す図である。A は、E L M O 1 及びこの実験で使用した E L M O 1 欠失変異体の構造を模式的に示す

50

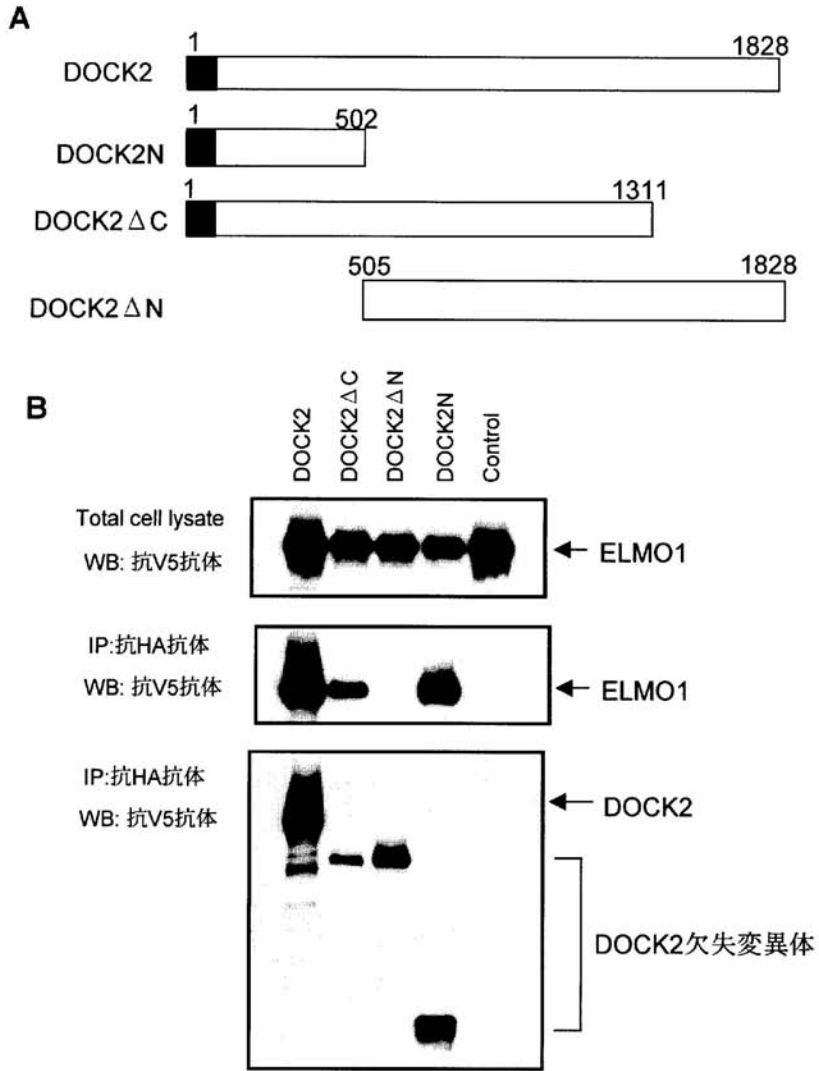
図である。Bは、293T細胞にELMO1及びELMO1欠失変異体をコードする遺伝子を、pCDNA DOCK2-HAあるいはコントロールベクターと共にトランスフェクトし、48時間後に細胞を回収し免疫沈降及びウェスタンブロット法を用いてDOCK2との結合を解析した図である。左側に解析に供したサンプルの種類、免疫沈降及びウェスタンブロットに用いた抗体を示す。

【図5】ELMO1がそのN末端の領域でTiam1に結合していることを示す図である。Aは、ELMO1及びこの実験で使用したELMO1欠失変異体の構造を模式的に示す図である。Bは、293T細胞にELMO1及びELMO1欠失変異体をコードする遺伝子を、pCI Tiam1-HAあるいはコントロールベクターと共にトランスフェクトし、48時間後に細胞を回収し免疫沈降及びウェスタンブロット法を用いてTiam1との結合を解析した図である。左側に解析に供したサンプルの種類、免疫沈降及びウェスタンブロットに用いた抗体を示す。

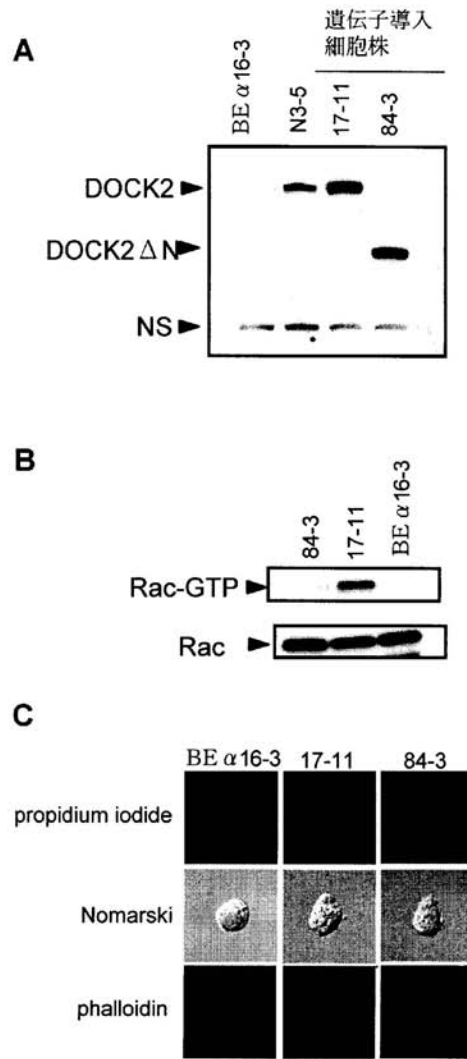
10

【図6】DOCK2によるRac活性化機構の模式図である。DOCK2はELMO1を介して、RacのGEFとして機能するTiam1をリクルートすることでRacを活性化することを示す図である。

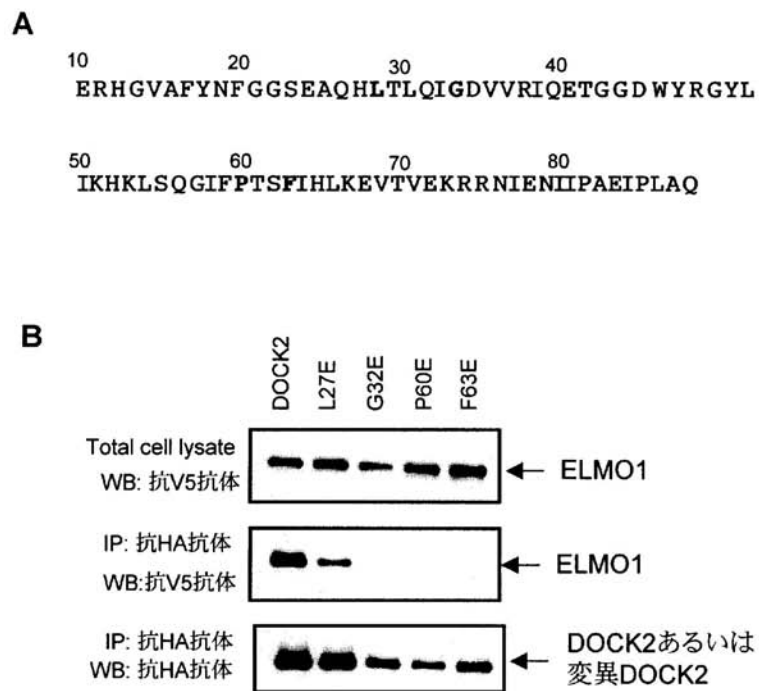
【 図 1 】



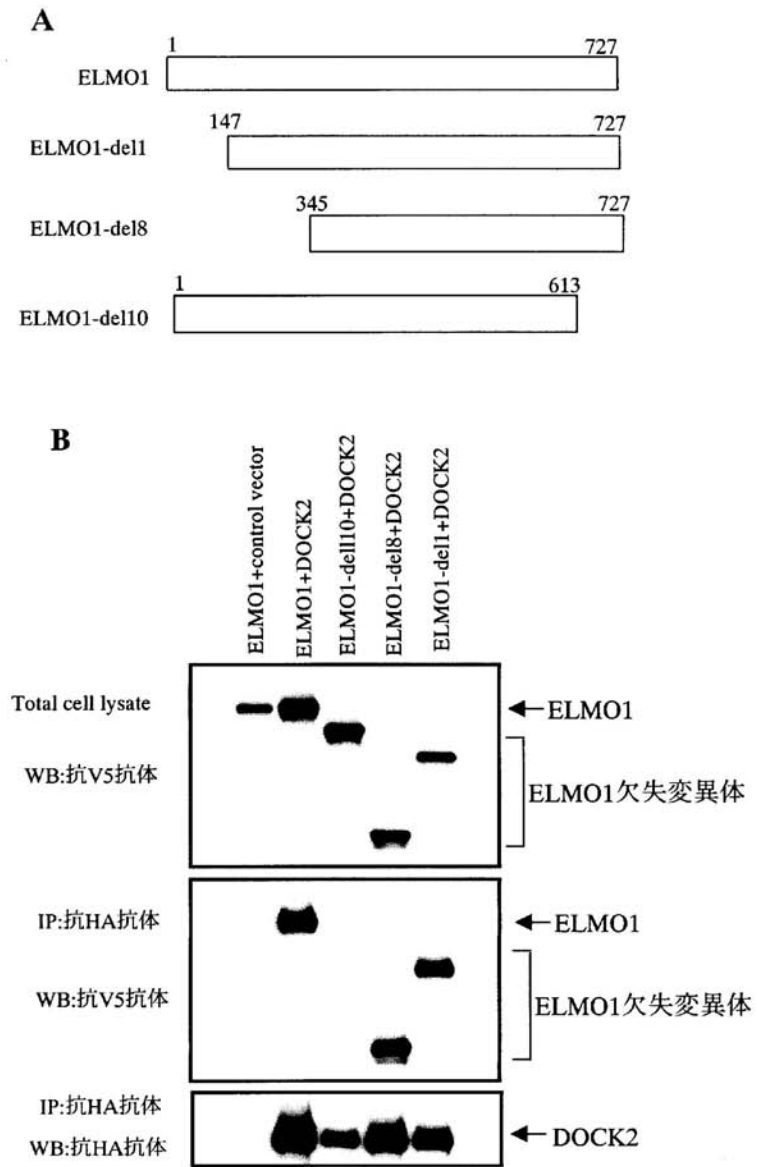
【 図 2 】



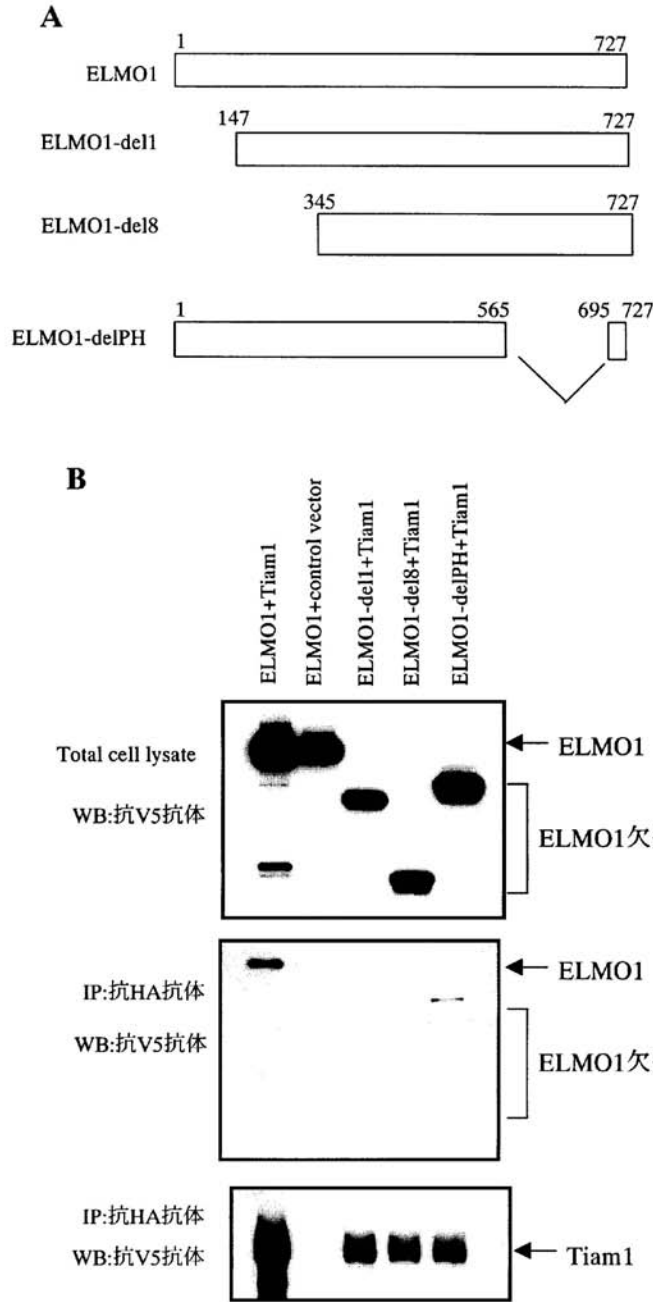
【 図 3 】



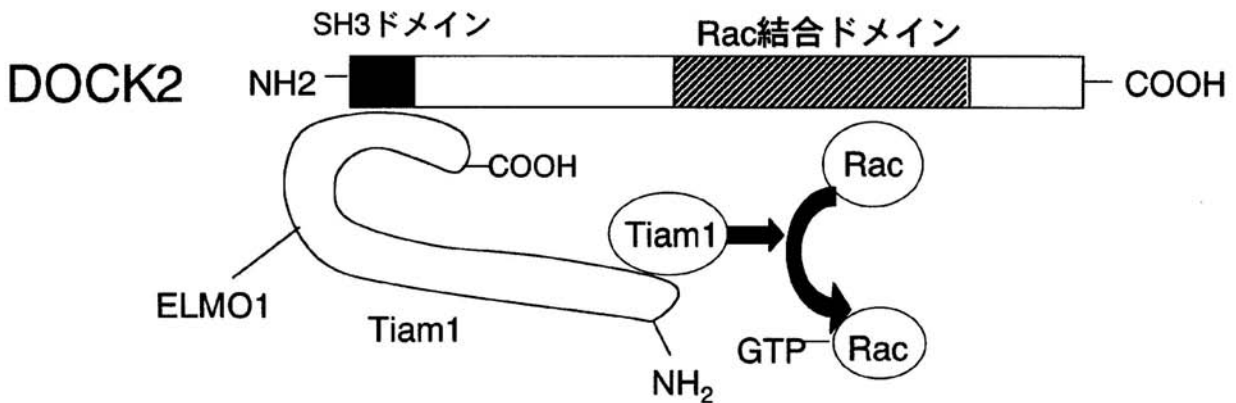
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 配列表 】

2004226418000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

C 0 7 K 14/47 Z N A

专利名称(译)	DOCK2的功能域和关联分子，对淋巴细胞迁移至关重要		
公开(公告)号	JP2004226418A	公开(公告)日	2004-08-12
申请号	JP2004128900	申请日	2004-04-23
[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	福井宣規 笹月健彦		
发明人	福井 宣規 笹月 健彦		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/47 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C07K14/47.ZNA		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA50 4H045/FA74		
其他公开文献	JP3886983B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：筛选会干扰DOCK2与ELMO1缔合的物质，筛选会干扰ELMO1与Tiam1缔合的物质，并将这些筛选方法用于过敏，自身免疫性疾病，GvH和移植排斥。提供一种寻找诸如免疫相关疾病之类治疗剂的方法。SOLUTION：发现缺少DOCK2 N端504个氨基酸残基的DOCK2突变体的Rac活化能力显著降低，并且不能诱导肌动蛋白聚合，并确定ELMO1是与该区域结合的分子。。我们发现DOCK2通过SH3域与ELMO1相关联。此外，我们发现ELMO1与Tiam1结合，后者起Rac特有的GDP / GTP交换因子 (GEF) 的作用。我们发现DOCK2通过ELMO1募集Tiam1激活了Rac。

(1) 出願番号		特願2004-128900 (P2004-128900)		(71) 出願人	503360115 独立行政法人 科学技術振興機構
(2) 出願日		平成16年4月23日 (2004. 4. 23)		埼玉県川口市本町4丁目1番8号	
(62) 分割の表示		特願2002-342683 (P2002-342683)の分割		(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 登紀
原出願日		平成14年11月26日 (2002.11.26)		(72) 発明者	福井 宣規 福岡県福岡市早良区高取2-1-1
				(72) 発明者	笹月 健彦 東京都渋谷区西原1-48-1
				Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA DA13 DA36 FB02 4H045 AA30 BA10 CA40 EA	