

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 18993

(P2003 - 18993A)

(43)公開日 平成15年1月21日(2003.1.21)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テームコード(参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 37/02	4 B 0 2 4
A 6 1 P 37/02		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5
1/19		1/21	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 10数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 198238(P2001 - 198238)

(22)出願日 平成13年6月29日(2001.6.29)

(71)出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 駒野 肇

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化学
学生命科学研究所内

(72)発明者 岩田 誠

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化学
学生命科学研究所内

(74)代理人 100103997

弁理士 長谷川 曉司

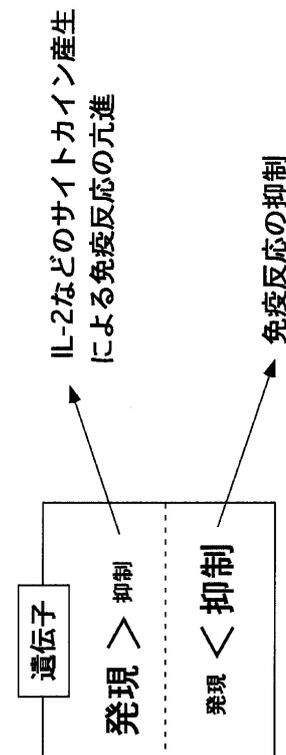
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規DNAおよびその利用

(57)【要約】

【課題】本発明は105遺伝子の発現制御領域DNAを取得し、105遺伝子の発現制御に影響を及ぼす物質のスクリーニング方法などを提供することを目的とする。

【解決手段】このスクリーニングにより得られた物質は、105遺伝子の発現を自由に制御することができるため、治療においては様々な状態の免疫疾患の患者に応じて免疫賦活、または抑制を行うことができる薬剤となる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 で表される塩基配列またはその一部を含有し、且つ有核細胞内において転写制御活性を有する DNA。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ有核細胞内において転写制御活性を有する DNA。

【請求項 3】 DNA が、サイレンサー領域、およびプロモーター領域を有する請求項 1 または 2 に記載の DNA。

【請求項 4】 DNA が、配列番号 1 の塩基番号 1 ~ 776 で表される塩基配列またはその一部からなるサイレンサー領域、および/または配列番号 1 の塩基番号 777 ~ 921 表される塩基配列またはその一部からなるプロモーター領域を含有する請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 5】 請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の DNA を含有する組換えベクター。

【請求項 6】 請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の DNA、およびその転写制御活性の制御下におかれた構造遺伝子を含有する組換え DNA。

【請求項 7】 請求項 6 に記載の組換え DNA を含有する組換え体。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の組換え体を被検物質の存在下で培養し、該組換え体中の構造遺伝子の発現を解析することを特徴とする、有核細胞内における転写制御活性を促進または制御する物質のスクリーニング方法。

【請求項 9】 請求項 6 に記載の組換え DNA を被検物質の存在下で無細胞蛋白質合成系に供し、該系中の構造遺伝子の発現を解析することを特徴とする、有核細胞内における転写制御活性を促進または制御する物質のスクリーニング方法。

【請求項 10】 請求項 8 または 9 に記載のスクリーニング方法を用いて得られる物質を有効成分とする免疫調節剤。

【請求項 11】 請求項 8 または 9 に記載のスクリーニング方法を用いて得られる物質を製剤化することを特徴とする免疫調節剤の製剤化方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は有核細胞内において転写制御活性を有する DNA、およびその利用に関する。この DNA は、生体内においては、T 細胞抗原受容体を介した刺激依存的な IL - 2 プロモーター活性化能を有する 105 遺伝子の転写制御活性を有する DNA であり、該 DNA を含む組換えベクター、該ベクターで形質転換された組換え体、および該組換え体を用いた 105 遺伝子の発現を制御する活性を有する物質のスクリーニング方法等に用いられる。

【0002】

【従来の技術】105 遺伝子は、T 細胞抗原受容体（以下これを「TCR」と称することがある）を介した刺激依存的な、IL - 2 プロモーター活性化能を有するタンパク質をコードする。IL - 2 は、TCR が抗原を認識したことにより活性化された T 細胞から産生され、同抗原と結合する T 細胞を選択的に増殖させる働きがある。IL - 2 の誘導に欠陥があるヒトにおいては、感染に対する感受性が上がるという知見（Weinberg, K. et al., New Engl. J. Med., 322, 1718 (1990)）がある。これは病原体の抗原に対してこの IL - 2 の産生誘導が正しく機能していないために、健康なヒトと比較して、より微量の病原体により感染を起こす状態を示している。

【0003】そこで、上記のような免疫反応性の低下した患者へ、105 遺伝子がコードするタンパク質（以下これを「105 タンパク質」と称することがある）を導入する、または体内での 105 タンパク質の発現量を増加させる治療法が考えられる。105 タンパク質の体内への導入方法としては、DNA を直接体内へ導入する方法（遺伝子治療法）があり、この治療法ではウイルスベクター等を用いて体細胞に遺伝子を導入し、その導入遺伝子を恒常的に発現させることにより、治療効果を得ようとするものが主流である。しかし、この場合、生体内で組換えウイルスができてしまう危険性があり、予期せぬ事態を引き起こしかねない。さらに、導入遺伝子は細胞内で発現し続けることとなり、そのことによる副作用も予知できない。

【0004】このような理由から、必要な時に遺伝子を発現させ、不要になった時点で速やかに発現を抑えられる機構により、体内で発現する 105 タンパク質の量を制御することが望ましい。

【0005】

【本発明が解決しようとする課題】本発明は 105 遺伝子の発現制御領域 DNA を取得し、105 遺伝子の発現制御に影響を及ぼす物質のスクリーニング方法などを提供することを目的としている。このスクリーニングにより得られた物質は、105 遺伝子の発現を自由に制御することができるため、治療においては様々な状態の免疫疾患の患者に応じて免疫賦活、または抑制を行うことができる薬剤となる。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、105 遺伝子の一部を含有するゲノム DNA の 5' 上流を解析し、105 遺伝子の発現制御領域を含む DNA 断片を取得することに成功した。また、この DNA 断片をさらに詳細に解析した結果、該 DNA 断片には、105 遺伝子の転写を抑制する能力を有する部位と、活性化する能力を有する部位が存在することを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて成し遂げられたものである。

【0007】即ち、本発明によれば、(1) 配列番号 1

で表される塩基配列またはその一部を含有し、且つ有核細胞内において転写制御活性を有するDNA、(2)請求項1に記載のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ有核細胞内において転写制御活性を有するDNA、(3)DNAが、サイレンサー領域、およびプロモーター領域を有する上記(1)または(2)に記載のDNA、(4)DNAが、配列番号1の塩基番号1~776で表される塩基配列またはその一部からなるサイレンサー領域、および/または配列番号1の塩基番号777~921で表される塩基配列またはその一部からなるプロモーター領域を含有する上記(1)~(3)のいずれかに記載のDNA、(5)上記(1)~(4)のいずれかに記載のDNAを含有する組換えベクター、(6)上記(1)~(4)のいずれかに記載のDNA、およびその転写制御活性の制御下におかれた構造遺伝子を含有する組換えDNA、(7)上記(6)に記載の組換えDNAを含有する組換え体、(8)上記(7)に記載の組換え体を被検物質の存在下で培養し、該組換え体中の構造遺伝子の発現を解析することを特徴とする、有核細胞内における転写制御活性を促進または抑制する物質のスクリーニング方法、(9)上記(6)に記載の組換えDNAを被検物質の存在下で無細胞蛋白質合成系に供し、該系中の構造遺伝子の発現を解析することを特徴とする、有核細胞内における転写制御活性を促進または抑制する物質のスクリーニング方法、(10)上記(8)または(9)に記載のスクリーニング方法を用いて得られる物質を有効成分とする免疫調節剤、(11)(8)または(9)に記載のスクリーニング方法を用いて得られる物質を製剤化することを特徴とする免疫調節剤の製剤化方法、を提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】(1)遺伝子転写制御活性を有するDNA断片の取得

本発明のDNAとしては、配列番号1で表される塩基配列またはその一部を有し、且つ有核細胞内で遺伝子転写制御活性を有するDNA(以下これを「転写制御DNA」と称することがある)が用いられる。遺伝子転写制御活性を解析する方法としては、それ自体既知の通常用いられる方法が挙げられるが、具体的には該DNAの3'下流に適切なレポーター遺伝子DNAを連結させ、これを有核細胞に導入して培養し、該細胞内のレポーター遺伝子の発現量を測定することにより行うことができる。有核細胞としては、大腸菌等の微生物や動物細胞株等が好ましく用いられる。

【0009】本発明の転写制御DNAは、105遺伝子(特開2001-128687号公報)の一部が含まれるゲノムDNAの5'上流側の断片について、105遺伝子の転写制御活性を解析することによって取得することができる。具体的には、まず適当な生物体からゲノムDNAを取得する。ここで、生物体とはゲノムを保有す

るものであれば如何なるものであってもよいが、例えば、マウス、ラット、ヒト等の哺乳類等が挙げられる。ゲノムDNAの調製方法としては、それ自体既知の通常用いられる方法が挙げられるが、上記生物体の適当な組織から調製することができる。ここで調製されたゲノムDNAから、適当な長さの断片に制限酵素等を用いて切断した後に、適当なベクターに挿入してゲノムDNAライブラリーを作成し、後述のスクリーニングにより本発明の転写制御活性を有するDNAを得ることができる。また、市販のゲノムDNAライブラリー、具体的にはYAC、BACライブラリー等を用いることもできる。これらゲノムDNA断片の集合を、以下「ゲノムDNAライブラリー」と称することがある。

【0010】次に、調製されたゲノムDNAライブラリーの中から、105遺伝子の5'上流のゲノムDNAを含有するDNA断片を選択するためのスクリーニングを行う。このスクリーニングは常法によることができるが、具体的には例えば、105遺伝子が有する塩基配列の一部をプローブとして、上記ゲノムDNAライブラリーをスクリーニングする方法等が挙げられる。

【0011】また、105遺伝子が含まれるゲノムDNA断片を直接取得する方法としては、105遺伝子の一部、好ましくは5'末端の塩基配列をアンチセンスプライマーとして用い、ゲノムが挿入されているベクター上の共通配列をセンスプライマーとして、ゲノムDNAライブラリーを鋳型としたポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)法により増幅断片として取得する方法を用いることもできる。

(2) 転写制御活性の解析

このようにして取得された105遺伝子とその5'上流を含むゲノムDNA断片について、105遺伝子の転写制御活性の解析を行うことにより本発明のDNAを取得することができる。転写制御活性の解析は、105遺伝子とその5'上流を含むゲノムDNA断片にレポーター遺伝子を含むDNAを連結したレポーターユニットDNAを適当な有核細胞に導入した後に培養し、該細胞内でのレポーター遺伝子の発現量を解析することにより行うことができる。

【0012】ここで、レポーター遺伝子としては、通常レポーターアッセイに用いられるものを用いることができるが、検出の簡便性等から蛍光タンパク質をコードする遺伝子が好ましく用いられる。具体的にはルシフェラーゼ遺伝子等が好ましく用いられる。また、レポーターユニットDNAとしては、既にレポーター遺伝子が導入されており、その5'上流に適当なクローニングサイトを有する市販のベクターを用いて作成することができる。このベクターとしては、pGL3-basic(Promega社製)、ピッカジンベシックベクター(東洋インキ社製)等が挙げられる。

【0013】またレポーターユニットDNAを導入する

細胞株としては、通常の細胞内に存在する転写制御因子等を有する細胞であれば如何なるものであってもよいが、具体的には例えば、COS-7細胞(ATCC: CRL1651)、HeLa S3細胞(ATCC: CCL2.2)、Jurkat細胞(ATCC: TIB152)等が挙げられる。このうち、好ましくはリンパ系細胞が用いられる。リンパ系細胞の具体例としては、Jurkat細胞(ATCC: TIB152)、EL4細胞(ATCC: TIB39)、MOLT-4細胞(ATCC: CRL1582)等が挙げられる。

【0014】レポーター遺伝子の上記細胞への導入方法としては、リン酸カルシウム法(Science, 221, 551-(1983))、DEAEデキストラン法(Science, 215, 166-(1982))、電気パルス法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7161-(1984))、インビトロパッケージング法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 581-(1975))、ウィルスベクター法(Cell, 37, 1053-(1984))等が挙げられる。

【0015】上記レポーターユニットDNAを導入した細胞(以下、「導入細胞」と称することがある)の培養方法としては、用いた細胞株に応じ適宜選択されるが、具体的には20%以下のウシ胎仔血清を含有するMEM培地、DMEM培地、RPMI1640培地(SIGMA社製)等により、通常20~45%、CO₂濃度2~10%の範囲で12~20時間培養する。

【0016】レポーター遺伝子の発現量の解析方法としては、上記レポーター遺伝子がコードするタンパク質により適宜選択される。例えば、レポーター遺伝子がルシフェラーゼのような蛍光タンパク質をコードする場合、導入細胞を適当な方法により溶解し、この細胞溶解液の上清中に基質となるルシフェリンを添加した後、適当な蛍光検出機、例えばルーマット(ベルトールド製)等を用いて蛍光を測定し、レポーター遺伝子の発現量とすることができる。また、この反応は適当な市販の検出キット、具体的には、例えばルシフェラーゼアッセイシステム(Promega社製)等を用いて行うこともできる。

【0017】(3) 転写制御活性を有するDNA断片の同定

ここで、105遺伝子とその5'上流を含むゲノムDNA断片から、転写制御活性を有するDNA断片を同定する方法としては、上記ゲノム断片の一部に点突然変異あるいは一部の塩基配列欠失させた後に、上記と同様にして転写制御活性の解析を行う方法が挙げられる。点突然変異を導入する方法としては、例えばサイトダイレクテッドミュータジェネシスキット(TAKARA社製)や、QUICKChange Site-Directed Mutagenesis Kit(STRATAGENE社製)等の市販のキットを用いることができる。また、塩基配列を欠失させる具体的な方法としては、S1

ヌクレアーゼ(TAKARA社製等)を用いる方法や、適当な制限酵素により消化する方法等が挙げられる。

【0018】このような解析により、点突然変異を導入したり塩基配列欠失させた(以下、これらの操作を「改変」と称することがある)とき、レポーター遺伝子の発現量が上昇した場合には、上記で改変したDNA断片には、転写抑制活性があると判断することができ、逆にレポーター遺伝子の発現が減少した場合には、上記で改変したDNA断片には、転写活性化能があると判断することができる。

【0019】(4) 遺伝子転写制御活性を有するDNA断片

かくして取得される本発明の遺伝子転写制御活性を有するDNA断片としては、具体的には、配列番号1で表される塩基配列またはその一部を含有するものが挙げられる。配列番号1に記載の塩基配列は、マウスのものであるが、本発明の転写制御DNAとしては、この配列に限られるものではなく、転写制御活性を有する限り上記配列とストリンジントな条件でハイブリダイズするDNAも含まれる。ここでストリンジントな条件でハイブリダイズするDNAとは、配列番号1で表される塩基配列と70%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有する塩基配列を含むDNAが挙げられる。また、ストリンジントな条件下のハイブリダイゼーションとは、通常用いられるハイブリダイゼーション緩衝液中で、40~70%、好ましくは60~65%で反応を行った後、塩濃度が15~300mM、好ましくは15~60mMの洗浄液中で洗浄を行う方法が挙げられる。またその一部とは、有核細胞において転写制御活性を有するものであれば如何なる断片であってもよく、それらの転写制御活性は上記した方法により解析することができる。

【0020】(5) 組換えベクター、および組換えDNAの構成

本発明の転写制御DNAは、これを適当なベクターに挿入することにより遺伝子発現ベクターとして用いることができる。具体的には例えば、配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAを適当なクローニングベクターに挿入することにより、サイレンサー、およびプロモーター活性を有する転写制御領域に制御を受ける遺伝子発現のためのベクターを作成することができる。

【0021】また、配列番号1の塩基番号777~921で表される塩基配列またはその一部を、上記ベクターに挿入したものは、プロモーター活性を有する転写制御領域により制御を受ける遺伝子発現ベクターとして利用することができる。さらには配列番号1の塩基番号1~776で表される塩基配列またはその一部と、その3'下流にSV40、CMV等の適当なプロモーター配列を連結させたDNAが挿入されているものは、サイレンサー活性を有する転写制御領域に制御を受ける遺伝子発現

ベクターとして用いることができる。ここで適当なクローニングベクターとは、大腸菌等の宿主中で自己を複製する機能を有する塩基配列を有しているものが好ましい。上記いずれのベクターにおいて、発現させる目的の構造遺伝子を有するDNAは挿入した転写制御DNAの3'下流に挿入することができる。ここで、構造遺伝子とは、タンパク質をコードしているDNAであれば如何なるものであってもよい、また該構造遺伝子は、読みとり枠(ORF)の全部であって一部であってよい。このように、本発明の転写制御DNA、およびその3' 10

【0022】(6)組換え体の作成、および構造遺伝子の発現

上記組換えDNAで適当な宿主を形質転換した形質転換体を得、これを培養することにより、該形質転換体内で上記組換えDNAに含まれる構造遺伝子を発現させることができる。適当な宿主とは、宿主の細胞内で本発明の転写制御DNAが機能し得るものであれば如何なるものであってもよいが、好ましくはリンパ系細胞が用いられ 20

リンパ系細胞の具体例としては、Jurkat細胞(ATCC:TIB142)、EL4細胞(ATCC:TIB39)、MOLT-4細胞(ATCC:CRL1582)等が挙げられる。これらの宿主への組換えDNAの導入、および得られた形質転換体の培養は上記(2)に記載した方法と同様にして行うことができる。【0023】また、本発明の組換えDNAを無細胞転写翻訳系に供することによっても、含有する構造遺伝子の発現を行うことができる。ここで、無細胞転写翻訳系とは、DNAからmRNAへの転写、およびmRNAから 30

タンパク質への翻訳に必要な全ての要素を含む系であり、そこに組換えDNAを加えることによって該DNAに含まれる構造遺伝子がコードしているタンパク質が合成されるようなあらゆる系を意味する。無細胞転写翻訳系の具体例としては、真核細胞、およびバクテリア細胞、またはそれらの一部から得られる抽出液に基づいて調製されたものが挙げられ、特に好ましい例としてはウサギ網状赤血球、コムギ胚芽、大腸菌の抽出液(大腸菌S30抽出液)に基づいて調製されたものを挙げられる。上記具体例の細胞抽出液に、本発明の転写制御DN 40

Aを活性化するための因子が含まれていない場合には、これをDNA、RNA、またはタンパク質として添加することが好ましい。かくして得られた組換えDNAに含まれる構造遺伝子がコードする組換えタンパク質は、培養物をそれ自体既知の通常用いられる方法により処理し、抽出、精製して取得することができる。【0024】(7)組換え体を用いた転写制御活性を促進または抑制する物質のスクリーニング方法

上記(6)に記載した組換え体は、これを被検物質の存在下で培養し、該組換え体に導入された組換えDNAが 50

含む構造遺伝子の発現量を解析することにより、本発明の転写制御DNAが有する転写制御活性を促進、または抑制する物質のスクリーニングを行うことができる。ここで、組換え体を作成するための組換え遺伝子、宿主、導入法、培養法については上記(2)に記載のものを用いることができるが、組換え遺伝子に含まれる構造遺伝子は、通常レポーターアッセイに用いられるものが好ましい。具体的には検出の簡便性等から蛍光タンパク質をコードする遺伝子が好ましく、ルシフェラーゼ遺伝子等が好適に用いられる。また、このような遺伝子を構造遺伝子として用いる場合には、組換えDNAを作成する際、すでに上記のようなレポーター遺伝子が導入されており、その5'上流に適当なクローニングサイトを有する市販のベクターに本発明の転写制御DNAを挿入する方法を用いることもできる。このベクターとしては、pGL3-basic(Promega社製)、ピッカジャンベシックベクター(東洋インキ社製)等が挙げられる。

【0025】また、被検物質としては、本発明の転写制御DNAの活性に影響を及ぼす可能性のある物質であれば如何なるものであってもよいが、具体的には例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、低分子化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、動物組織抽出液等が挙げられる。これらの物質は新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよい。低分子化合物のさらに具体的な例としては、ホルモン、あるいはホルモン様物質等が挙げられ、タンパク質としては転写因子等が挙げられる。これらの形質転換体培養物への添加の順序、および添加量等は被検物質の種類によって適宜選択することができる。

【0026】構造遺伝子の発現量の測定は、(2)に記載の方法と同様にして行うことができる。このスクリーニングの対象物としては、形質転換体を被検物質の非存在下で培養した場合の該形質転換体に導入されている組換えDNAに含まれる構造遺伝子の発現量、あるいは該形質転換体について、被検物質を高濃度、または低濃度で存在させて培養を行った場合の該構造遺伝子の発現量等が用いられる。

【0027】(8)免疫調節剤、およびその製造方法

上記(7)のスクリーニング方法を用いて選択された、本発明の転写制御DNAの活性を促進または抑制する物質は、前記被検物質から選択された物質であって、105遺伝子の発現を促進または抑制することにより、T細胞抗原受容体を介した刺激依存的なIL-2プロモーター活性を制御することができる(図2)。このことはT細胞の性質を変化させることにつながるため、上記スクリーニングにより選択された物質は免疫系を調節する薬剤、すなわち免疫調節剤として用いることができる。かくして選択された物質は、さらにそれ自体既知の方法により試験管内、または生体内における薬理的、または

生理学的試験によりその免疫調節作用を調べ、所望の活性を有するものを選択し、実際に医薬として応用可能な物質として得ることができる。またこの免疫調節剤には、上記スクリーニングで選択された物質から誘導される物質も用いることができる。

【0028】上記方法で選択された物質は塩を形成していてもよく、また水和物並びに溶媒和物等であってもよい。該物質の塩としては、例えば無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩等の薬理的に許容し得る塩であれば如何なるものであってもよい。無機塩基との塩の好適な例としては、ナトリウム塩、カリウム塩等の金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、並びにアルミニウム塩、アンモニア塩等が挙げられる。有機塩基との塩の好適な例は、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン等との塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸等との塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸等との塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、アスパラギン酸、グルタミン酸等との塩が挙げられる。また、上記(7)のスクリーニング方法を用いて選択された物質は、それ自体単独で前記の免疫調節剤として投与することができるが、これらの有効成分の1種または2種以上を混合して投与することもできる。

【0029】さらには、上記のスクリーニング方法を用いて、本発明の転写制御DNAの活性を促進または抑制する物質を選択し、該物質を薬理的に許容可能な製剤用添加物等を用いて製剤化する方法も本発明に含まれる。剤形としては、物質の種類等に応じて適宜選択することができるが、具体的には、糖衣を施した錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、マイクロカプセル剤、リポソーム製剤、トローチ、舌下剤、液剤、エリキシル剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。これらの剤形を有する医薬組成物は、経口的に投与することができる。また、無菌の水溶液、あるいは油性液として製造した注射剤、座剤、軟膏、貼付剤として作成された場合には非経口的に使用することができる。

【0030】製剤化方法としては、例えば上記で選択された物質を生理学上認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、あるいは結合剤等とともに一般に認められた製剤実施に要求される単位領域形態で混和し、充填または打錠等の当業界で周知の方法を用いることができる。これらの医薬組成物における有効成分量は、指示された範囲の適当な量が得られるようにする

ものである。ここで、カプセル、錠剤等に混和することのできる添加剤としては、セラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴム等の結合剤、結晶性セルロース等の賦形剤、セルロース、マンニトール、あるいはラクトース等の充填剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギニン酸等の賦形剤、デンプン、ポリビニルポリピロリドン、デンプン誘導体、またはナトリウムデンプングルコラート等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤、ラウリル硫酸ナトリウム等の潤滑剤、ショ糖、乳糖、またはサッカリン等の甘味剤、ペパーミント、アカモノ油、またはチェリー等の香味剤等が挙げられる。さらに錠剤は、必要に応じて脂溶性コーティング剤等を用いてコーティングを施すこともできる。カプセル剤については、前記の添加剤に、さらに油脂のような液状担体を含有することもできる。

【0031】また、例えば注射剤として用いる無菌医薬組成物は、注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻剤、椰子油等の天然産出植物油等に溶解、または懸濁させる等の通常の製剤実施によって作成することができる。注射剤の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やD-ソルビトール、D-マンニトール、あるいは塩化ナトリウム等の補助薬を含む等調液等が用いられる。また、これにアルコール、ポリアルコール、非イオン性界面活性剤等の適当な溶解補助剤を混合して用いることもできる。さらに、リン酸塩緩衝液、または酢酸ナトリウム緩衝液等の緩衝液、塩化ベンザルコニウム、または塩酸プロカイン等の無痛化剤、ヒト血清アルブミン、またはポリエチレングリコール等の安定剤、ベンジルアルコール、またはフェノール等の保存剤、および酸化防止剤等を配合することもできる。

【0032】ここで調製される注射用の水溶液は、通常有効成分を上記媒体に溶解させて濾過滅菌してから、適当な滅菌済みのバイアル、またはアンプルに充填して製造される。安定性を高めるために、該医薬組成物を凍結させた後に、バイアル中の水を真空下で除去してもよい。油性液についても、水溶液の場合と同様に製造できるが、有効成分を上記媒体に懸濁させた後にエチレンオキシド等により滅菌することによって好適に製造することができる。

【0033】かくして得られる医薬組成物は、例えばヒトや、ヒト以外の動物に対して免疫調節剤として投与することができる。該組成物に含まれる前記物質の投与量は、対象疾患、症状、対象臓器、投与対象、投与方法等により適宜選択して決定される。また1日の投与量を1~数回にわけて投与するのが望ましい。

【0034】

【実施例】実施例1 遺伝子転写制御領域の単離

(1) マウスゲノムDNAの単離

129マウスより樹立されたE14TG2a細胞(Thompson, S., et al., Cell, 56, 313-321 (1989))を、

Molecular Cloning A Laboratory Manual (Joseph, Sambrook., et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000))等に記載の常法に従い、52にてプロテアーゼK処理を1晩行った。次に、処理液をフェノール・クロロフォルムにて除タンパクをし、アルコール沈殿により、マウスゲノムDNAを単離した。

(2) ゲノムウォーキング用ライブラリーの調製

上記(1)によって得られたマウスゲノムDNAを制限酵素、DraI、EcoRV、PvuII、ScaI、StuIにより37にて消化し、その消化断片の両末端にゲノムウォーカーアダプターをT4-DNAリガーゼを用いて付加した。これらの操作は全てUniversal Genome Walker Kit (クロンテック社製)に添付の試薬を用い、上記キットに添付のマニュアルに従って行った。これをゲノムウォーキング用ライブラリーとして以下の操作に用いた。

(3) 遺伝子転写制御領域の単離

上記(2)で調製したライブラリーを鋳型として、プライマーAPI (Universal Genome Walker Kit: クロンテック社製) および105遺伝子の5'末端の塩基配列に相補的なプライマー: 105.5 (配列番号2)を用いたポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)を行った。PCRに用いたAdvantage Genomic Polymerase Mix、基質、反応バッファー等は全てUniversal Genome Walker Kit (クロンテック社製)に添付のものを用い、操作もマニュアルに従って行った。

【0035】上記PCR反応液をアガロースゲル電気泳動によりStuI消化した断片を鋳型としたものにおいて、DNA断片(約1000bp)を確認後、pGEM-TEasyプラスミドベクター(Promega社製)に挿入した。これを大腸菌DH5株(TOYOBO社製)に、ヒートショック法を用いて形質転換し、得られた形質転換体から通常のアルカリ法を用いて環状プラスミド(1000/pGEM-TEasy)を精製した。

【0036】このプラスミド中に挿入された約1000bpのDNA断片の塩基配列を、プライマーM13 forward primer、およびreverse primer (Amersham Pharmacia Biotech社製)と、ダイデオキシチエンターミネーション法のシーケンスキット(Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて反応させ、オートDNAシーケンサー: 日立蛍光式DNAシーケンサーSQ3000(日立電子エンジニアリング社製)を用いて解析した。この塩基配列を配列番号1に示す。

【0037】実施例2 転写制御活性の検討

(1) 1000bp DNA断片を含む発現ベクターの作

成

上記実施例1で取得された1000bpのDNA断片(Frg. 1000)を含むプラスミド(1000/pGEM-TEasy)について、MluI、およびNheI(NEB社製)により二重消化し、約1000bpのDNA断片をアガロースゲル電気泳動により確認後、該DNA断片を含むアガロースゲルを切り出し、ゲルをドライアイス上で凍結させ、これを溶解させた上清からエタノール沈殿により抽出、精製した。このFrg. 1000を、MluI、およびNheI(NEB社製)により二重消化したルシフェラーゼ遺伝子を有するpGL3-Basicベクター(Promega社製)にligation kit ver. 2(TAKARA社製)を用いて連結、挿入し、該プラスミド(1000/pGL-Basic)により大腸菌、DH5をヒートショック法を用いて形質転換を行い、形質転換体を取得した。この形質転換体を培養し、培養物からプラスミドDNAを通常のアルカリ法を用いて調製した。

【0038】(2) 230bp DNA断片を含む発現ベクターの作成

上記実施例2(1)で得られたプラスミド(1000/pGL3-Basic)をSmaI(NEB社製)により消化し、約230bpのDNA断片(Frg. 230: 配列番号3)をアガロースゲル電気泳動にて確認し、該DNA断片を含むアガロースゲルを切り出し、ゲルをドライアイス上で凍結させ、これを溶解させた上清からエタノール沈殿により抽出、精製した。このFrg. 230は上記配列番号1の塩基番号777~921で表されるものである。このDNA断片を、SmaIで消化したルシフェラーゼ遺伝子を有するpGL3-Basicベクター(Promega社製)にligation kit ver. 2(TAKARA社製)を用いて連結、挿入し、該プラスミド(230/pGL-Basic)により大腸菌、DH5をヒートショック法を用いて形質転換を行い、形質転換体を取得した。この形質転換体を培養し、培養物からプラスミドDNAを通常のアルカリ法を用いて調製した。

【0039】(3) 発現制御活性の解析

このようにして調製された2種のプラスミド(1000/pGL-Basic、および230/pGL-Basic)をそれぞれ10μg、および内部標準プラスミドとして - ガラクトシダーゼ遺伝子(アマシャムファルマシアバイオテック社製) 0.9μgを、2×10⁶のJurkat細胞に電気パルス法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 7161 (1984))により導入した。また、対照実験として、pGL3-Basicベクター10μgと、上記 - ガラクトシダーゼ遺伝子DNA、0.9μgを同様に2×10⁶のJurkat細胞に電気パルス法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 7161 (1984))により導入した。これらのDNA導入細胞を5%非働化

ウシ血清を含むDMEM培地(SIGMA社製)中で10%CO₂、37℃で12~20時間培養した後、各々の細胞を遠心分離(5,000rpm、1分)により回収し、1×reporter lysis buffer(Promega社製)により処理し、ルーマト(ベルトルト社製)を用いて測定した。この結果を図1に示す。図からも明らかのように、1000/pGL3-Basicにプロモーター活性を認めた。さらに、Frg.1000の5'末端、約700bpを除くことにより、このプロモーター活性は著しく上昇した。以上10のことより、Frg.230にプロモーターが存在し、配列番号1の塩基番号1~776に当たるFrg.700(配列番号4)にはそれを抑制するエレメントが存在することが明らかになった。

【0040】

【発明の効果】本発明の転写制御活性を有するDNAは、これを促進、または抑制する物質の効率的なスクリーニング方法に用いることができる。該スクリーニング方法により選択された物質は、105遺伝子の発現を、促進、または抑制することにより、T細胞抗原受容体を介した刺激依存的なIL-2プロモーター活性を制御することができる。このことはT細胞の性質を変化させることにつながる(図2)ため、上記スクリーニングにより選択された物質は、免疫系を調節する優れた医薬となり得る。

【0041】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Mitsubishi chemical corporation
<120> Regulation element of 105 gene
<130>
<140>
<141>
<160> 4
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 1005
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 1
cctgggcagg ctggcgggtc ctgtggggaa tga
ctttag agccggtgtg caaatggact 60
gtcccaaac cttccgctt ctaccattag gaac
cagcct gaggccaca ggtgtcct 120
gagtgcaggg tgtcagtg atgctcggaa tggc
acacgc agcacagccc tacatgtggc 180
tgtacagagg ggcttctag aggtgtaaa gatc
ctgtgt gaacgtggtt gtgatgcaa 240
cttgccggtg agtgatagtc cctggactct ttgc
cactaa acagccctag gtcaaggaac 300
ccacttgacc ccgagagag gcgctgctgt gtga
ccacc ccctctgttg caggatgcgc 360
atgcagacac acccctgcat tctgcatct ctgc
tggtgc tgggtccagc agcattgttg 420
aagtcctcac cgaggccct ggcatgatg tcac
tgctac caatagccag ggcttcacac 480
tgctacacca tgcattccctc aaggccatg tgct
gtgagt gtgggggttg ggcacactgc 540
tgtcatccag tcttttgacc tactgccagg ctat
cctgat ccagagcact cagtggagtc 600
ttaggaagt cctggacata cctctgtcc caca
gagcag tcaggaagat tcttgcaagg 660

```

<223> Description of Artificial
 Sequence:synthesized
 <400> 2
 gccacatgca gggccgtgtc accctcctcg
 30
 <210> 3
 <211> 144
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 3
 cccggggccac ccaaggccag gaaccagacc aag
 tgggacg tcaaagctga gcctgtgcc 60

atccgtgcc tagggtcgct gtgatgtgaa tgtg
 cggaac cggaagcttc agtctccact 120
 tcatctggct gtacagcagg ccc
 143

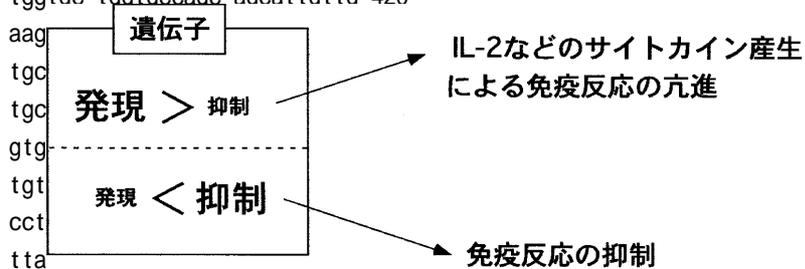
<210> 4
 <211> 776
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 4
 cctgggcagg ctggcgggtc ctgtggggaa tga
 ctttag agccggtgtg caaatggact 60
 gtcccaaac cttcccgctt ctaccattag gaac
 cagcct gaggccaca ggtgtctct 120
 gagtgcaggg tgtgcagtgg atgctcggaa tggc
 acacgc agcacagccc tacatgtggc 180
 tgtacagagg ggcttcttag aggtggtaaa gatc
 ctgtgt gacgtggtt gtgatgtcaa 240

16

【図面の簡単な説明】 1. 転写制御活性を有する遺伝子の発現を抑制する。

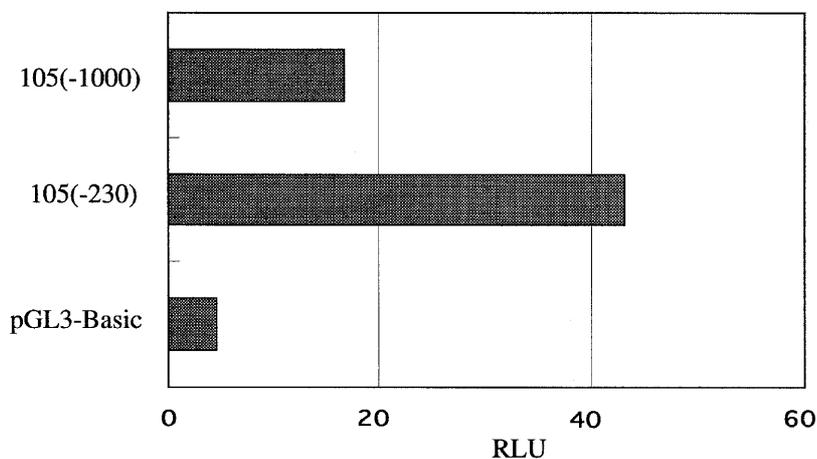
【図1】 Fr g . da t a a c a g c c c a g の転写制御活性を抑制する。 【図2】 本発明の効果を示す概略図である。
 ルシフェラーゼアッセイによる解析の結果を示す図である。

ccacc ccctctgttg caggatgagc 360
 atgcagacac acccctgcat tctgcatctc
 tggtag taatccaac aacattatta 420
 aag
 tgc
 tgc
 gtg
 tgt
 cct
 tta
 gagcag tcaggaagat tcttgcaagg 660
 gcccggcagc tggatgatgc caagaaggag gatg
 gcttta ccgactgca tctggcagcc 720
 ctcaacaacc accgggaggt ggcccaggtc ctaa
 tccgag aggtgggtgc aggggt 777



【図1】

Transient expression analysis of the 105 promoter in Jurkat cells



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード(参考)
C 1 2 N	1/21	C 1 2 Q	1/02
	5/10		1/68
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/15
	1/68		33/50
G 0 1 N	33/15		33/53
	33/50		33/566
	33/53	C 1 2 N	15/00
	33/566		5/00
			Z N A A
			A

F タ-ム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13
 DA14 DA36 FB02
 4B024 AA01 AA11 BA08 CA03 CA20
 DA03 EA04 FA02 FA20 GA14
 HA11
 4B063 QA05 QQ21 QQ22 QQ41 QQ61
 QQ89 QR77 QR80 QS36 QX02
 4B065 AA01X AA58X AA72X AA90X
 AA91Y AB01 AC14 AC20
 BA02 BA03 CA28 CA46
 4C084 AA02 AA17 NA14 ZB071
 ZC192 ZC202 ZC412

专利名称(译)	新型DNA及其用途		
公开(公告)号	JP2003018993A	公开(公告)日	2003-01-21
申请号	JP2001198238	申请日	2001-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学株式会社		
申请(专利权)人(译)	三菱化学株式会社		
[标]发明人	駒野肇 岩田誠		
发明人	駒野肇 岩田誠		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P37/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	A61K45/00 A61P37/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA08 4B024/CA03 4B024/CA20 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA20 4B024/GA14 4B024/HA11 4B063/QA05 4B063/QQ21 4B063/QQ22 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/CA28 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB071 4C084/ZC192 4C084/ZC202 4C084/ZC412		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过获得105个基因的表达控制区DNA，提供筛选影响105个基因的表达控制的物质等的方法。 解决方案：由于通过这种筛选获得的物质可以自由地控制105个基因的表达，可以说在治疗中，根据患有各种免疫疾病的患者进行免疫刺激或抑制它成为一种可以达到的药物。

