

(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2009-77729

(P2009-77729A)

(43) 公開日 平成21年4月16日(2009.4.16)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N	15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/47 (2006.01)		C O 7 K	14/47	4 B O 6 3
C O 7 K 16/18 (2006.01)		C O 7 K	16/18	4 B O 6 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q	1/68 A	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)		C 1 2 N	1/15	
審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 44 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願2008-284139 (P2008-284139)	(71) 出願人	301037914
(22) 出願日	平成20年11月5日 (2008.11.5)		ザ ジョンズ ホプキンス ユニバーシテ
(62) 分割の表示	特願平9-502264の分割		ィー スクール オブ メディシン
原出願日	平成8年6月6日 (1996.6.6)		アメリカ合衆国 2 1 2 0 5 メリーラン
(31) 優先権主張番号	08/480, 473		ド州 ボルチモア, ラットランド ストリ
(32) 優先日	平成7年6月6日 (1995.6.6)		ート 7 2 0
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 低酸素誘導因子-1 および使用方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 低酸素誘導因子1(HIF-1)の精製およびキャラクタリゼーションの提供。

【解決手段】 HIF-1は、HIF-1 およびHIF-1 のサブユニットから成る。精製されたHIF-1 ポリペプチド、そのアミノ酸配列、およびヌクレオチド配列、HIF-1 と二量体を形成して非機能性HIF-1複合体を生成するHIF-1 について、また、H I F - 1 に対する抗体ならびに、低酸素関連疾患の防止および治療の方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 図 10 (配列番号 1) に示された DNA 配列またはその相補的ストランド；
または
(b) (a) で規定された DNA 配列に対してストリンジェント条件下でハイブリダイズを起こす DNA 配列；
によってコードされる単離されたヒト HIF-1 ポリペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 の HIF-1 ポリペプチドおよび HIF-1 からなる、単離された HIF-1。

【請求項 3】

(a) 配列番号 1；
(b) 配列番号 1 に相補的な核酸；
(c) 少なくとも 15 個の塩基の長さであり、かつ配列番号 1 の HIF-1 ポリペプチドをコードするヌクレオチドに対してストリンジェント条件下で選択的にハイブリダイズを起こす (a) または (b) の断片；
から成る群より選ばれるヒト HIF-1 ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記ポリヌクレオチドが哺乳類細胞から単離される請求項 3 のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記哺乳類細胞がヒト細胞である請求項 4 のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 3 のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 7】

前記ベクターがプラスミドである請求項 6 のベクター。

【請求項 8】

前記ベクターがウイルスである請求項 6 のベクター。

【請求項 9】

請求項 6 のベクターを用いて安定に形質転換された宿主細胞。

【請求項 10】

前記細胞が原核細胞である請求項 9 の宿主細胞。

【請求項 11】

前記細胞が真核細胞である請求項 9 の宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 2 の HIF-1 もしくは請求項 1 の HIF-1 ポリペプチドまたはそれらの免疫反応性断片と結合する精製された抗体。

【請求項 13】

前記抗体がポリクローナル抗体である請求項 12 の抗体。

【請求項 14】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項 12 の抗体。

【請求項 15】

配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較して同等の生物学的活性を持つ精製かつ単離されたポリペプチドであって、該生物学的活性が、Hep3B 細胞中においてエリトロポイエチン (EPO)、アルドラーゼ A (ALDA)、ホスホグリセリン酸キナーゼ 1 (PGK1)、ピルビン酸キナーゼ M (PKM)、および血管内皮成長因子 (V-EGF) の合成を促進する、上記ポリペプチド。

【請求項 16】

HIF-1 イソ型と二量体を形成するヒト HIF-1 変種ポリペプチドであって、しかも配列番号 2 のアミノ酸の少なくとも 1 つが他のアミノ酸で置換されている上記ポリペプチド。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

配列番号 4 の配列を有するヒト変種HIF-1 ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、該変種がHIF-1のDNAへの結合を抑制する、上記ポリヌクレオチド。

【請求項 18】

請求項 1 のポリペプチドまたは請求項 3 のポリヌクレオチドの検出方法であって、被検者の試料を該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドに結合する試薬と接触させる工程と、該試薬と該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドとの結合を検出する工程と、を含む上記検出方法。

【請求項 19】

前記試薬が配列番号 1 に相補的なポリヌクレオチドまたはその一部分である請求項 18 の方法。

【請求項 20】

前記試薬が前記ポリペプチドに特異的な抗体である請求項 18 の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の一部分は、連邦政府からの助成金（PHS承認R01-DK39869）を使用して行われた。従って、政府は、本発明に対する所定の権利を有する。

【0002】

本発明は、低酸素関連タンパク質に関し、特に、低酸素状態により誘導される新規な DNA 結合タンパク質に関する。

【背景技術】

【0003】

哺乳動物は、ATP形成時に O_2 が電子受容体として働く酸化的リン酸化などの必須の代謝過程のために酸素分子(O_2)を必要とする。低酸素状態(O_2 の必要量が供給量を上回る状態)により誘発される全身的、局所的、および細胞内ホメオスタシス応答としては、貧血の人または高地に住む人に見られる赤血球形成(非特許文献1)；虚血性心筋における血管新生(非特許文献2)；および低 O_2 圧下で培養される細胞における解糖(非特許文献3)が挙げられる。これらの適応応答により、 O_2 送達量の増大または O_2 を必要としない代謝経路の活性化が起こる。こうした応答に関与する低酸素誘導遺伝子産物としては、エリトロポイエチン(EPO)(非特許文献4に総説が記載されている)；血管内皮成長因子(非特許文献5；非特許文献6；非特許文献7)；および解糖酵素(非特許文献8；非特許文献9)が挙げられる。

【0004】

低酸素状態に対する遺伝子的応答を仲介する分子機構に関する研究が、赤血球形成の制御つまり血液 O_2 運搬能の制御を行う成長因子をコードするEPO遺伝子に対して広範に行われてきた(Jelkmann (1992)上記；Semenza (1994)上記)。低酸素状態に対応した転写の活性化に必要なシス作用性DNA配列は、EPO 3'末端領域中で同定され、エンハンサーに結合するトランス作用性因子である低酸素誘導因子1(HIF-1)は、EPO転写の生理的調節物質としての判定条件を満たした：EPO発現のインデューサー(1% O_2 、塩化コバルト[$CoCl_2$]、およびデスフェリオキサミン[DFX])もまたHIF-1DNA結合活性を誘発し、類似の動態を示した；EPO発現の抑制物質(アクチノマイシンD、シクロヘキシミド、および2-アミノプリン)はHIF-1活性の誘発を阻害した；更に、HIF-1結合を形成しないEPO 3'末端領域の突然変異もまたエンハンサー機能を消失させた(Semenza (1994)上記)。これらの結果もまた、 O_2 圧がヘムタンパク質によって検知されるという仮説(非特許文献10)、ならびに転写、翻訳、およびタンパク質リン酸化の開始に必要なシグナル導入経路が低酸素細胞中におけるHIF-1のDNA結合活性やEPO転写の誘発に関与するという仮説(Semenza (1994)上記)を支持する。

【0005】

EPO発現は細胞タイプ特異性を示すが、多くの哺乳類細胞系統において、1% O_2 、 $CoCl_2$ 、およびDFXによるHIF-1活性の誘発が検出され(非特許文献11)、更に、EPOエンハンサ

10

20

30

40

50

ーは、非EPO産生細胞中に移入されたリポーター遺伝子の低酸素誘発転写を誘導した (Wang & Semenza (1993a) 上記; 非特許文献 1 2)。いくつかの解糖酵素をコードするRNAは、EPO産生Hep3B細胞またはEPO非産生Hela細胞中において、1%O₂、CoCl₂、およびDFXにより誘導されたが、HIF-1結合部位を含有する解糖遺伝子配列は、トランスフェクションアッセイにおいて低酸素誘発転写を仲介した (Firthら(1994) 上記)。これらの実験は、低酸素状態に対するホメオスタシス応答を活性化するHIF-1の役割を支持する。

【非特許文献 1】Jelkmann (1992) *Physiol. Rev.* 72:449-489)

【非特許文献 2】Whiteら(1992) *Circ. Res.* 71:1490-1500

【非特許文献 3】Wolfleら(1983) *Eur. J. Biochem.* 135:405-412

【非特許文献 4】Semenza (1994) *Hematol. Oncol. Clinics N. Amer.* 8:863-884

【非特許文献 5】Shweikiら(1992) *Nature* 359:843-845

【非特許文献 6】Banaiら(1994) *Cardiovasc. Res.* 28:1176-1179

【非特許文献 7】Goldberg & Schneider (1994) *J. Biol. Chem.* 269:4355-4359

【非特許文献 8】Firthら(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6496-6500

【非特許文献 9】Semenzaら(1994) *J. Bio. Chem.* 269:23757-23663

【非特許文献 10】Goldbergら(1988) *Science* 242:1412-1415

【非特許文献 11】Wang & Semenza (1993a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4304-4308

【非特許文献 12】Mazwellら(1993) *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA* 90:2423-2427

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、実質的に精製されたDNA結合タンパク質である低酸素誘導因子-1(HIF-1)に関するものであり、この因子は、構造遺伝子のプロモーター領域がHIF-1結合部位を含有する場合に構造遺伝子発現を活性化することを特徴とする。こうした構造遺伝子としては、例えば、エリトロポイエチン(EPO)、血管内皮成長因子(V-EGF)、および解糖遺伝子が挙げられる。HIF-1は、2つのサブユニット(すなわちHIF-1 およびイソ型のHIF-1)から構成されている。

【0007】

本発明は、実質的に精製されたHIF-1 ポリペプチドおよびHIF-1 をコードするヌクレオチド配列に関する。

【0008】

本発明は、治療上有効量のHIF-1タンパク質を投与することによって、低酸素状態および再灌流に起因した組織障害などの低酸素関連疾患を防止および治療する方法に関する。また、本発明には、HIF-1をコードするヌクレオチド配列を細胞中に導入する遺伝子治療が含まれる。本発明はまた、治療上有効量のHIF-1またはHIF-1をコードするヌクレオチド配列と混合された医薬品として許容しうるキャリアーを含んでなる医薬用組成物を提供する。

【0009】

本発明は更に、*in vivo*においてHIF-1の機能を不活性化する新規なHIF-1 変種ポリペプチドを提供する。本発明は、本発明の有効量のHIF-1 変種を投与することによって、HIF-1の機能的な不活性化に起因したHIF-1媒介疾患または容態を治療する方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

HIF-1結合モチーフを有する構造遺伝子の調節領域(好ましくは、エンハンサー領域)にある領域と結合するDNA結合タンパク質であることを特徴とする実質的に純粋な低酸素誘導因子-1(HIF-1)を提供する。HIF-1により活性化できる構造遺伝子に関与するものとしては、エリトロポイエチン(EPO)、血管内皮成長因子(VEGF)、および低酸素状態に曝露された細胞における解糖遺伝子転写物が挙げられる。精製されたHIF-1の分析により、HIF-1がHIF-1 およびイソ型のHIF-1 のサブユニットから成ることが示される。HIF-1形成時に互いに会合しうるドメイン含まれるほか、HIF-1の サブユニットおよび サブユニ

10

20

30

40

50

ットにはDNA結合ドメインが含まれる。サブユニットはHIF-1中にユニークに存在するが、サブユニット(ARNT)は少なくとも2つの他の転写因子の成分である。

【0011】

本発明は、SDS-PAGEにより測定した場合の分子量が120kDaであり、配列番号2(図10)のアミノ酸配列を有し、かつHIF-1と二量化を起こしてHIF-1を形成することの特徴とする実質的に純粋な低酸素誘導因子-(HIF-1)を提供する。「実質的に純粋」という用語は、本明細書中で使用する場合、他のタンパク質、脂質、炭水化物、またはHIF-1が自然に会合を起こす他の物質を実質的に含まないHIF-1を指す。当業者は、タンパク質精製の標準的な技術を使用してHIF-1を精製することができる。実質的に純粋なポリペプチドは、非還元性ポリアクリルアミドゲル上に単一のバンドを生成する。HIF-1ポリペプチドの純度は、アミノ末端アミノ酸配列分析により測定することもできる。HIF-1タンパク質にはポリペプチドの官能性断片が含まれるが、ただし、HIF-1の活性(例えば、HIF-1と結合する能力)が残存している場合に限られる。HIF-1の生物学的活性を有するより小さなペプチドも本発明に含まれる。

10

【0012】

本発明は、HIF-1ポリペプチド配列番号1(図10)をコードするヌクレオチド配列を提供する。これらのヌクレオチド配列には、HIF-1をコードするDNA、cDNA、およびRNAが含まれる。また、HIF-1の全部または一部分をコードするヌクレオチドはすべて本発明に含まれるものとする。例えば、HIF-1ヌクレオチド配列に位置指定突然変異誘発を起こしてもよい。また、HIF-1のヌクレオチド配列にはアンチセンス配列も含まれる。本発明のヌクレオチド配列には、遺伝暗号の結果が縮重する配列が含まれる。縮重ヌクレオチド配列は、該ヌクレオチド配列によりコードされるHIF-1ポリペプチドのアミノ酸配列が機能的に変化しない限り、本発明に含まれる。

20

【0013】

特に本発明で開示されるものとしては、ヒトHIF-1をコードするDNA配列が挙げられる。この配列には、826個のアミノ酸の長さを有するポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームが含まれる。図10のヌクレオチド位置29~31に示されているヒトHIF-1開始メチオニンコдонは、ヌクレオチド2~4にあるフレーム内終止コдонに続く最初のATGコдонである。好ましくは、ヒトHIF-1アミノ酸配列は、配列番号2である。

【0014】

HIF-1をコードするヌクレオチド配列には、配列番号1、ならびに配列番号1に相補的な核酸配列が含まれる。相補的配列がアンチセンスヌクレオチドを含んでいてもよい。配列がRNAの場合は、配列番号2のデオキシヌクレオチドA、G、C、およびTを、それぞれリボヌクレオチドA、G、C、およびUと置き換える。本発明にはまた、配列番号2のポリペプチドをコードするDNAまたはRNAと生理学的条件下で選択的にハイブリッドを形成するのに十分な長さである少なくとも15塩基を含む先に規定した核酸配列の断片が含まれる。具体的には、断片は、HIF-1をコードするDNAまたはRNAとストリンジェント条件下でハイブリッドを形成する必要がある。

30

【0015】

HIF-1アミノ酸配列に多少の変更を加えても、本明細書中に記載のHIF-1ポリペプチドと比較して実質的に同等な活性を有するタンパク質を生じる場合がある。こうしたタンパク質には、「本質的に配列番号2のアミノ酸配列を有する」という用語により規定されるタンパク質が含まれる。こうした変更は位置指定突然変異誘発などのように意図的なものであってもよいし、偶然的なものであってもよい。こうした変更により生成するポリペプチドはすべて、HIF-1の生物学的活性が残存するかぎり本発明に含まれる。更に、1つ以上のアミノ酸を除去することにより、生物学的活性の有意な変化を起こさないように生成分子の構造を変更することもできる。こうして広範な利用度を有するより小さな活性分子の開発が可能となる。例えば、HIF-1が生物学的活性を呈するうえで必要としないアミノ末端またはカルボキシ末端のアミノ酸を除去することができる。

40

【0016】

50

本発明のヌクレオチド配列によりコードされる本発明のHIF-1 ポリペプチドには、開示されている配列(配列番号2)およびその保存変種が含まれる。「保存変種」という用語は、本明細書中で使用する場合、アミノ酸残基を他の生物学的に類似の残基で置き換えることを意味する。保存変種の例としては、イソロイシン、バリン、ロイシン、もしくはメチオニンなどの1つの疎水性残基と他の残基との置換、または1つの極性残基と他の残基との置換(例えば、リジンをアルギニンに、アスパラギン酸をグルタミン酸に、あるいはアスパラギンをグルタミンに置き換える等)が挙げられる。「保存変種」という用語にはまた、無置換の母核アミノ酸の代わりに置換アミノ酸を使用することが含まれるが、ただし、置換されたポリペプチドに対して生じる抗体もまた、無置換のポリペプチドと免疫反応を起こすものでなければならない。

10

【0017】

本発明のDNA配列は、種々の方法によって得ることができる。例えば、当該技術分野で公知のハイブリダイゼーション法を使用してDNAを単離することができる。これらの方法には、1)ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーと、プローブとのハイブリダイゼーションによる相同的ヌクレオチド配列の検出、2)対象のDNA配列にアニールできるプライマーを使用した、ゲノムDNAまたはcDNA上のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、および3)発現ライブラリーの抗体スクリーニングによる共通構造特性を有するクローン化DNA断片の検出が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0018】

本発明のHIF-1 ヌクレオチド配列は、好ましくは哺乳類組織から、最も好ましくはヒトから誘導される。核酸ハイブリダイゼーションに基づくスクリーニング法により、任意の組織から任意の遺伝子配列を単離することができるが、それは適切なプローブが得られる場合に限られる。対象となるタンパク質をコードする配列の一部に対応するオリゴヌクレオチドプローブは、化学的に合成することができる。このためには、アミノ酸配列の短いオリゴペプチド伸張体が既知である必要がある。タンパク質をコードするDNA配列は遺伝暗号から誘導することができるが、暗号の縮重を考慮する必要がある。配列が縮重している場合、混合付加反応を行うことができる。これには変性二本鎖DNAのヘテロ混合物が含まれる。こうしたスクリーニングのために、一本鎖DNAまたは変性二本鎖DNAのいずれかをを用いてハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。対象のポリペプチドに関連するmRNA配列の量が極端に少ない供給源から誘導されるcDNAクローンの検出には、ハイブリダイゼーションが特に有用である。言い換えると、非特異的な結合を回避するようにしたストリンジェントハイブリダイゼーション条件を使用すれば、例えば、標的DNAとその完全な補体である混合物中の単一プローブとのハイブリッドを形成することによって、特異的なcDNAクローンをオートラジオグラフィーで可視化することが可能である(Sambrookら(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY)。

20

30

【0019】

HIF-1 をコードする特異的DNA配列の開発は、1)ゲノムDNAからの二本鎖DNA配列の単離、2)DNA配列の化学的製造による対象のポリペプチドに必要なコドンの提供、および3)真核供与細胞から単離されたmRNAの逆転写による二本鎖DNA配列のin vitro合成によって行うこともできる。後者の場合、mRNAの二本鎖DNA補体を実際に形成され、一般的にはcDNAと呼ばれている。組換え技術に使用される特異的DNA配列を開発するための3つの上述の方法のうち、ゲノムDNAを単離する方法が最も一般的である。この方法は、特に、イントロンの存在に起因した哺乳類ポリペプチドの微生物発現が望まれる場合に使用されるものである。

40

【0020】

所望のポリペプチド産物のアミノ酸残基の全配列が既知の場合、DNA配列の合成には、しばしば合成方法に選択の余地がある。所望のポリペプチドのアミノ酸残基の全配列が未知の場合、DNA配列の直接的な合成は不可能であり、利用できる方法はcDNA配列を合成する方法である。対象のcDNA配列を単離するための標準的な手順において、対

50

象の遺伝子を高レベルに発現する供与細胞中に豊富に存在するmRNAの逆転写により誘導されるプラスミドおよびファージ担持cDNAライブラリーの作製が行われる。ポリメラーゼ連鎖反応と併用する場合、わずかな発現産物ですらクローン化できる。ポリペプチドのアミノ酸配列のかなりの部分が既知の場合には、標的cDNA中に存在すると推測される配列を複製する標識化された一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAプローブ配列を生成させて、DNA/RNAハイブリダイゼーション法で利用してもよい。この方法は、変性させて一本鎖型に変換されたcDNAのクローン化コピーに関して行われるものである(Jayら(1983) Nucl. Acid Res., 11:2325)。

【0021】

ラムダgt11などのcDNA発現ライブラリーは、HIF-1 に特異的な抗体を用いることによって、少なくとも1つのエピトープを有するHIF-1 ペプチドの間接的なスクリーニングに利用できる。こうした抗体は、ポリクローナル的またはモノクローナル的のいずれで誘導されたものであってもよく、HIF-1 cDNAの存在を示唆する発現産物の検出に利用できる。

【0022】

HIF-1 をコードするDNA配列は、好適な宿主細胞へDNAを移入することによってin vitroで発現させることができる。「宿主細胞」とは、ベクターが繁殖でき、かつそのDNAが発現できる細胞を指す。この用語にはまた、対象宿主細胞の任意の後代が含まれる。複製の際に突然変異が起こる可能性があるので、すべての後代が親細胞と同じである必要はないと考えられる。しかしながら、「宿主細胞」という用語を使用する場合、こうした後代が含まれる。安定な移入(外来DNAが宿主中に常に保持されていることを意味する)を行う方法は、当該技術分野で公知である。

【0023】

本発明において、HIF-1 ヌクレオチド配列を、組換え発現ベクター中に挿入してもよい。「組換え発現ベクター」という用語は、HIF-1 遺伝子配列の挿入すなわち組込によって処理されたプラスミド、ウイルス、または当該技術分野で公知の他の担体を意味する。こうした発現ベクターには、宿主中での挿入遺伝子配列の効率的な転写を促進するプロモーター配列が含まれる。発現ベクターは、典型的には、複製起点、プロモーター、ならびに形質転換された細胞の表現型選択を可能にする特異的遺伝子を含む。本発明に使用するうえで好適なベクターとしては、細菌中で発現させるためのT7を基剤とする発現ベクター(Rosenbergら(1987) Gene 56:125)、哺乳類細胞中で発現させるためのpMSXND発現ベクター(Lee and Nathans (1988) J. Biol. Chem. 263:3521)、および昆虫細胞中で発現させるためのバキュロウイルス誘導ベクターが挙げられるが、これらに限定されるものではない。DNAセグメントは、プロモーター(例えば、T7プロモーター、メタロチオネインIプロモーター、またはポリヘドリンプロモーター)などの調節要素に操作可能に連結されたベクター中に存在させることができる。

【0024】

HIF-1 をコードするDNA配列は、原核生物または真核生物のいずれにおいても発現させることができる。宿主には、微生物、酵母菌、昆虫、および哺乳動物の組織が含まれる。原核生物において、真核生物またはウイルスの配列を有するDNA配列を発現させる方法は、当該技術分野で周知である。宿主における発現および複製が可能な生物学的機能を有するウイルスおよびプラスミドDNAベクターは、当該技術分野で公知である。こうしたベクターを使用して、本発明のDNA配列の取込みが行われる。

【0025】

組換えDNAを用いた宿主細胞の形質転換は、当業者に周知の従来技術により行うことができる。宿主がE. coliなどの原核生物である場合、DNA取込が可能なコンピテント細胞は、指数増殖期の後で収穫された細胞を、収穫後、当該技術分野で周知の手順を利用してCaCl₂法で処理することにより調製することができる。この他、MgCl₂またはRbClを使用することも可能である。必要に応じて、宿主細胞のプロトプラスト形成後に、形質転換を行うこともできる。

10

20

30

40

50

【0026】

宿主が真核生物の場合、リン酸カルシウム共沈法、マイクロインジュクションなどの従来型の機械的方法、電気穿孔法、リボソーム中に包埋されたプラスミドを挿入する方法、またはウイルスベクターを利用する方法などのDNA移入法が利用できる。本発明のHIF-1をコードしたDNA配列および選択可能な表現型をコードした外来DNA分子（例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子）を用いて、真核細胞を同時形質転換することもできる。もう1つの方法は、シミアンウイルス40(SV40)やウシバビローマウイルスなどの真核ウイルスベクターを使用して、真核細胞に一時的に感染させ（すなわち、真核細胞の形質転換を行って）、タンパク質を発現させる方法である（例えば、Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982を参照されたい）。

10

【0027】

本発明により提供される微生物発現ポリペプチドまたはその断片の単離および精製は、例えば、分取クロマトグラフィー分離や免疫学的分離（モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を使用する）などの従来の手段により行うことができる。

【0028】

本発明のHIF-1ポリペプチドを使用して、HIF-1ポリペプチドのエピトープと交差反応するかまたは該エピトープと結合する抗体を生成することができる。こうした抗体を、例えば、標準的なアフィニティー精製技術に利用すれば、HIF-1またはHIF-1を単離することができる。本質的に、異なるエピトープ特異性を有するプールモノクローナル抗体を含む抗体、および種々のモノクローナル抗体製剤が提供される。モノクローナル抗体は、当該技術分野で周知の方法により、タンパク質の断片を含有する抗原から調製される(Kohler,ら(1975) Nature 256:495; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, et al., ed., 1989)。

20

【0029】

本発明の目的のために、HIF-1に特異的な抗体または核酸プローブを使用して、生体液または生体組織中においてHIF-1ポリペプチド配列（抗体を使用する）またはヌクレオチド配列（核酸プローブを使用する）を検出することができる。HIF-1と反応する抗体または核酸プローブは、HIF-1との結合を検出できる化合物で標識化することが好ましい。検出可能な量の抗原またはポリペプチドを含有する任意の試料を使用することができる。種々の検出可能な標識およびアッセイ形態が当業者には周知であり、これらを利用すれば余計な実験をしないで済む。

30

【0030】

細胞成分が核酸の場合、核酸を増幅してからHIF-1特異性プローブと結合させることが必要なこともある。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を利用することが好ましいが、リガーゼ連鎖反応(LCR)、連結活性化転写(LAT)、および核酸配列型増幅(NASBA)などの他の核酸増幅法を利用してもよい。

【0031】

本発明は、HIF-1と二量化を起こして機能的に不活性なHIF-1複合体を形成することを特徴とするHIF-1変種ポリペプチドを提供する。ただし、この複合体は、調節領域中のHIF-1結合モチーフと十分に結合することができず、調節領域の制御下で構造遺伝子の効果的な発現を行うことはできない。本発明は更に、HIF-1変種をコードするヌクレオチドを提供する。特定の1実施態様において、配列番号3のヌクレオチド配列を有する、HIF-1変種をコードするポリヌクレオチドが提供される。野生型アミノ酸を異なるアミノ酸と置換するかまたは野生型配列の一部を除去することによって、HIF-1変種ポリペプチド(配列番号4)が得られる。HIF-1変種アミノ酸配列の変更は本発明に含まれるが、得られるポリペプチドがHIF-1に対して二量化を起こして機能的に不活性なHIF-1複合体を形成する場合に限られる。機能的に不活性とは、HIF-1複合体または二量体がもはや十分にDNAに結合しないという意味である。本発明の好ましい実施態様において、遺伝子工学の技術を利用して、HIF-1とDNAとの結合に関与するアミノ酸の1つ以上を置き換えた特異的HIF-1変種が提供される。

40

50

【 0 0 3 2 】

HIF-1 の特異的ドミナントネガティブ変種型は、HIF-1 NBおよびHIF-1 NB AB(実施例10を参照されたい)である。これらの2つの型は、共通して、DNA結合に必要な基本ドメインを構成するアミノ酸が除去されている(HIF-1 アミノ酸残基17~30; 図10を参照されたい)。基本ドメインの変更によりDNA結合活性が消失してはいるが、HIF-1 がHIF-1 との二量体形成能を保持しているかぎり、ドミナントネガティブ変種として機能する。基本ドメインをコードするヌクレオチド配列のこうした変更には、DNA結合に必要なドメイン内の必須の基本アミノ酸残基の除去または置換が含まれる。タンパク質の更なる修飾を行って、in vivoにおけるドミナントネガティブ作用を促進してもよい。例えば、HIF-1 NB ABは、HIF-1 NBと同じように基本ドメイン中の突然変異を含むが、更に、HIF-1 NB ABは、カルボキシ末端で切断され、in vivoにおけるタンパク質の安定性を向上させている。

10

【 0 0 3 3 】

本発明のHIF-1 変種分子をコードするヌクレオチド配列は、適切な発現ベクター中に挿入して、細胞中で発現させることができる。配列番号4の特異的HIF-1 変種の改良型を作製して、発現させた産物の安定性、産生、精製、または収率を向上させることができる。例えば、HIF-1 変種と異種タンパク質とを含有する融合タンパク質または開裂可能な融合タンパク質の発現を行うことが可能である。こうした融合タンパク質は、アフィニティークロマトグラフィーにより(例えば、異種タンパク質に特異的なカラム上に不動化させることにより)容易に単離することができる。HIF-1 部分と異種タンパク質との間に開裂可能な部位を導入する場合、適切な酵素または開裂部位を切断する薬剤を用いて処理することにより、HIF-1 ポリペプチドをクロマトグラフィーカラムから放出させることができる(Boothら(1988) Immunol. Lett. 19:65-708; Gardellaら(1990) J. Biol. Chem. 265:15854-15859)。

20

【 0 0 3 4 】

本発明は、HIF-1遺伝子発現または活性の調節により改善または軽減されるHIF-1仲介疾患(例えば、低酸素仲介組織障害)の治療方法を提供する。「調節」という用語には、必要に応じて、HIF-1の発現を抑制するか、または適切であれば、HIF-1発現を促進することが含まれる。HIF-1の発現または発現の促進が望まれる場合、その治療方法には、HIF-1の直接的(タンパク質)投与または間接的(ヌクレオチド)投与が含まれる。

30

【 0 0 3 5 】

本発明の方法によれば、実質的に精製されたHIF-1またはHIF-1をコードするヌクレオチド配列が、HIF-1仲介疾患の治療または防止のために患者(ヒト)に投与される。適切な患者(ヒト)は、HIF-1仲介疾患または低酸素関連疾患、例えば、アテローム硬化性冠状動脈疾患または大脳動脈疾患、を患った被検者である。患者をヌクレオチドを用いて治療する場合、このヌクレオチドとして、HIF-1 をコードするヌクレオチド配列およびHIF-1 をコードするヌクレオチド配列が利用できる(例えば、Rayesら、Science, 256:1193-1195, 1992; およびHoffmanら、Science, 252:954-958)。

【 0 0 3 6 】

HIF-1 発現の抑制(例えば、VEGF誘発血管形成により仲介される腫瘍増殖の抑制など)が望まれる場合、翻訳レベルでHIF-1発現を阻害する抑制的核酸配列を使用することができる。この方法では、例えば、アンチセンス核酸、リボザイム、またはトリプレックス薬剤を使用し、トリプレックス薬剤を有するアンチセンス核酸またはDNAを用いてmRNAをマスクするか、またはリボザイムによりヌクレオチド配列を開裂することによって、特異的HIF-1 mRNAまたはDNAの転写または翻訳を妨害する。

40

【 0 0 3 7 】

アンチセンス核酸とは、特異的mRNA分子の少なくとも一部分と相補的であるDNA分子またはRNA分子を指す(Weintraub (1990) Scientific American 262:40)。細胞中において、アンチセンス核酸は、対応するmRNAとハイブリッドを形成し、二本鎖分子となる。細胞は二本鎖のmRNAを翻訳しないので、アンチセンス核酸は、mRNAの翻

50

訳を妨害することになる。約15個のヌクレオチドのアンチセンスオリゴマーが好ましい。なぜなら、こうしたオリゴマーは合成が容易なうえに、標的HIF-1 産生細胞に導入されたときに大きな分子よりも問題を生じにくいからである。

【0038】

オリゴヌクレオチドを使用して転写を停止することは、トリプレックス法と呼ばれている。こう呼ばれるのは、オリゴマーが二重螺旋DNAのまわりに巻き付いて、三本鎖のヘリックスを形成するからである。従って、所定の遺伝子上の特異な部位を認識するように、これらのトリプレックス化合物をデザインすることができる(Maher,ら(1991) *Antisense Res. and Dev.* 1:227; Helene (1991) *Anticancer Drug Design*, 6:569)。

【0039】

リボザイムとは、DNA制限エンドヌクレアーゼと同じ様な方法で他の一本鎖RNAを特異的に開裂させる能力を有するRNA分子を指す。これらのRNAをコードするヌクレオチド配列に改良を加えれば、RNA分子中の特異的ヌクレオチド配列を認識し、これを開裂させる分子を開発することが可能となる(Cech (1988) *J. Amer. Med. Assn.* 260:3030)。この方法の主な利点は、配列特異性があることにより特定の配列を有するmRNAだけが不活性化されることである。

【0040】

リボザイムには2つの基本的なタイプ、すわなち、テトラヒメナタイプ(Hasselhoff (1988) *Nature* 334:585)および「ハンマーヘッド」タイプがある。テトラヒメナタイプのリボザイムは、4個の塩基の長さの配列を認識し、一方、「ハンマーヘッド」タイプのリボザイムは、11個~18個の塩基の長さの塩基配列を認識する。認識配列が長くなるほど、その配列が標的mRNA種中で排他的に存在する可能性が大きくなる。従って、特異的なmRNA種を不活性化するためには、ハンマーヘッドタイプのリボザイムの方がテトラヒメナタイプのリボザイムよりも好ましく、18個の塩基の認識配列の方がそれよりも短い認識配列よりも好ましい。

【0041】

HIF-1機能の抑制はまた、HIF-1 変種ポリペプチド(ドミナントネガティブ変種型)またはHIF-1 変種ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を投与することにより行うこともできる。例えば、HIF-1 の発現により促進される疾患(例えば、VEGF仲介血管形成に対する二次的腫瘍増殖など)の場合、腫瘍に十分な養分を供給するために必要な血管新生を抑制することにより、腫瘍を「餓死」させることが望ましい。HIF-1 変種ポリペプチドまたはこうしたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を投与することにより、HIF-1 と結合してHIF-1二量体を形成することに関して、この変種が野生型HIF-1 と競合するようになり、従って、HIF-1 DNA結合モチーフに効率的に結合できる細胞中のHIF-1二量体の濃度が低下する。

【0042】

本発明はまた、HIF-1ポリペプチドにより改善または軽減される低酸素関連疾患の治療のための遺伝子療法を提供する。この療法では、HIF-1 ヌクレオチドを、単独またはHIF-1 ヌクレオチドと併用して、低酸素状態に曝露された細胞中に導入することにより、その治療効果が得られる。単独またはHIF-1 と併用したHIF-1 の送達は、キメラウイルスなどの組換え発現ベクターまたはコロイド分散系を使用して行うことができる。治療のために配列を送達するうえで特に好ましいのは、標的化リボソームの使用である。

【0043】

本明細書中で教示されているような遺伝子療法に利用できる種々のウイルスベクターとしては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、または好ましくはレトロウイルスなどのRNAウイルスが挙げられる。好ましくは、レトロウイルスベクターは、マウスレトロウイルスまたはトリレトロウイルスの誘導体である。単一外来遺伝子を挿入できるレトロウイルスとしては、例えば、Mooneyマウス白血病ウイルス(MoMuLV)、Harveyマウス肉腫ウイルス(HaMuSV)、マウス乳腺癌ウイルス(MuMTV)、およびラウス肉腫ウイルス(RSV)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

被検者がヒトの場合、テナガザル白血病ウイルスなどのベクターを利用することが好ましい。多数の他のレトロウイルスベクターは複数の遺伝子に取入れることができる。これらのベクターはすべて、選択マーカー用遺伝子の移入または取込を行うことができる。その結果、形質導入された細胞の同定および発生が可能となる。対象のHIF-1 配列を、例えば、特定の標的細胞上の受容体に対するリガンドをコードするもう1つの遺伝子と共に、ウイルスベクター中に挿入することによって、ベクターは標的特異性をもつようになる。例えば、糖、糖脂質、またはタンパク質を結合させることによって、レトロウイルスベクターに標的特異性をもたせることができる。好ましい標的化は、抗体を使用してレトロウイルスベクターを標的化することにより行われる。レトロウイルスゲノムに挿入するかまたはウイルスエンベロープに結合して、HIF-1 ヌクレオチド配列を含有するレトロウイルスベクターの標的特異性送達を可能にする特異的ポリヌクレオチド配列について、当業者は分かるかまたは過度な実験をせずに容易に確認することができるであろう。

10

20

30

40

50

【0044】

組換えレトロウイルスには欠陥があるので、感染性ベクター粒子を産生するための補助が必要である。例えば、LTR内の調節配列の制御下でレトロウイルスの構造遺伝子をすべてコードするプラスミドを含有するヘルパー細胞系統を使用することによって、こうした補助が得られる。これらのプラスミドには、パッケージング機構を働かせて、キャプシドに包むためのRNA転写物の認識を可能にするヌクレオチド配列が含まれていない。パッケージングシグナルが欠落したヘルパー細胞系統としては、例えば、2、PA317、およびPA12が挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの細胞系統では、ゲノムがパッケージされないので、エンブティビリオンが産生される。パッケージングシグナルが無傷であるとともに対象の他の遺伝子により構造遺伝子が置き換えられている細胞へ、レトロウイルスベクターを導入する場合は、ベクターをパッケージしてベクタービリオンを産生することができる。

【0045】

この他、レトロウイルス構造遺伝子gag、pol、およびevをコードするプラスミドを、従来のリン酸カルシウムトランスフェクションを用いてNIH3T3細胞または他の組織培養細胞へ直接に移入することができる。この後で、対象の遺伝子を含有するベクタープラスミドをこれらの細胞へ移入する。こうして得られた細胞は、レトロウイルスベクターを培地へ放出する。

【0046】

HIF-1 ヌクレオチドに対するもう1つの標的化送達系は、コロイド分散系である。コロイド分散系としては、巨大分子複合体、ナノカプセル、微小球、ビーズ、および脂質を基剤とする系（例えば、水中油型エマルション、ミセル、混合ミセル、およびリポソーム）が挙げられる。本発明の好ましいコロイド系はリポソームである。リポソームは、*in vitro*および*in vivo*における送達担体として有用な人工膜ベシクルである。サイズが0.2 μm ~ 4.0 μm の範囲にある大きな単一ラメラベシクル(LW)は、大型巨大分子を含有する水性緩衝剤を実質的なパーセントでカプセル化できることが分かっている。RNA、DNA、および無傷ビリオンを水性の内部にカプセル化して、生物学的に活性な形態で細胞へ送達することができる(Fraley, ら(1981) Trends Biochem. Sci. 6:77)。哺乳類細胞のほかに、植物細胞、酵母菌細胞、および細菌細胞において、ポリヌクレオチドの送達のためにリポソームが使用されてきた。リポソームが有効な遺伝子移入担体であるためには、以下の特性が存在する必要がある：(1)生物学的活性を犠牲にせずに対象の遺伝子が高効率でカプセル化されること、(2)非標的細胞と比べて標的細胞への結合が優先的かつ実質的に行われること、(3)ベシクルの水性内容物が高い効率で標的細胞の細胞質へ送達されること、(4)遺伝情報が正確かつ効果的に発現されること(Mannino, ら(1988) Biotechniques 6:682)。

【0047】

リポソームの組成物は、通常はリン脂質（特に、高相転移温度のリン脂質）の組合せであり、また通常はステロイド（特に、コレステロール）と併用される。他のリン脂質また

は他の脂質もまた使用可能である。リボソームの物理的特性は、pH、イオン強度、および二価カチオンの存在に依存する。

【0048】

リボソーム生成に有用な脂質としては、例えば、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシド、およびガングリオシドなどのホスファチジル化合物が挙げられる。特に有用な脂質はジアシルホスファチジルグリセロールであり、この場合には、脂質部分は14個～18個の炭素原子、好ましくは、16個～18個の炭素原子を有し、かつ飽和されている。代表的なリン脂質としては、卵のホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、およびジステアロイルホスファチジルコリンが挙げられる。

10

【0049】

リボソームの標的化は、解剖学的因子および機構的因子に基づいて分類することができる。解剖学的分類は、選択性のレベル（例えば、器官特異性、細胞特異性、およびオルガネラ特異性）に基づくものである。機構的標的化は、受動的かまたは能動的かに基づいて識別できる。受動的標的化では、洞様毛細血管を含有する器官中の細網内皮系(RES)の細胞へのリボソームの自然な分配傾向を利用する。一方、能動的標的化では、モノクローナル抗体、糖、糖脂質、もしくはタンパク質などの所定のリガンドへリボソームを結合させることによるか、またはリボソームの組成またはサイズを変化させて自然に起こる局在化部位以外のタイプの器官および細胞への標的化を行うことによりリボソームの改変を行う。

20

【0050】

標的化送達系の表面は、種々の方法で改質することができる。リボソーム標的化送達系の場合、リボソームの脂質二重層中へ脂質基を取込んで、リボソーム二重層と共に標的リガンドを安定に保持することができる。種々の連結基を使用して、脂質鎖を標的リガンドに結合させることができる。

【0051】

VEGF、GPO、および解糖酵素の合成を促進するHIF-1の生物学的活性のおかげで、本発明のポリペプチドまたはヌクレオチドを利用する種々の用途が存在する。こうした用途としては、低酸素関連組織障害およびHIF-1仲介疾患の治療が挙げられる。この他、HIF-1は、種々の遺伝子治療法に利用することができる。HIF-1を使用して、低酸素仲介組織障害の防止または修復を行うことができる。重要な用途としては、大脳動脈疾患および冠状動脈疾患の治療が挙げられる。

30

【0052】

これとは逆に、抗HIF-1抗体、抗HIF-1 抗体、またはHIF-1 アンチセンスヌクレオチドのいずれかをを用いてHIF-1作用を妨害すれば、HIF-1作用に起因する疾患(例えば、V-EGF促進腫瘍血管新生)を遅らせるかまたは軽減させることが可能である。HIF-1 ヌクレオチドを送達するための上述の方法は、必要に応じてHIF-1発現および/または活性の特異的阻害を起こすためにHIF-1アンタゴニストの送達に完全に適用することが可能である。HIF-1アンタゴニストは、HIF-1抗体、HIF-1 抗体、HIF-1 アンチセンスヌクレオチド配列、またはHIF-1 変種のポリペプチドもしくはヌクレオチドであってもよい。

40

【0053】

EPO産生Hep3B細胞および非EPO産生HeLa S3細胞からのHIF-1の単離および精製は、実施例1～3に記載されている。HIF-1タンパク質は、DEAEイオン交換およびDNAアフィニティークロマトグラフィーにより11,250倍まで精製された。HIF-1の分析により、91kDa、93kDa、94kDa(HIF-1)、および120kDa(HIF-1)の分子量を有する4つのポリペプチドが明らかになった。グリセロール濃度勾配沈降分析により、HIF-1は、主としてヘテロ二量体として存在し、ヘテロ四量体として少し存在することが示唆される。

【0054】

HIF-1 ポリペプチドを単離し、配列を調べた。PCRによりcDNAを生成し、その配列を決定した。HIF-1 ポリペプチドは、細胞のO₂圧によって発現が制御されるPASドメイン

50

を含有する基本ヘリックス ループ ヘリックス(bHLH)ポリペプチドであることが特徴である(実施例4~7)。

【0055】

HIF-1による解糖酵素をコードする遺伝子の転写の誘発を調べた(実施例9)。この結果、細胞をHIF-1インデューサー(1%O₂、CoCl₂、DFX)に曝露することにより、解糖酵素であるアルドラーゼA(ALDA)、ホスホグリセリン酸キナーゼ1(PGK1)、およびピルビン酸キナーゼM(PKM)が誘導されることが分かった。これらの遺伝子はHIF-1結合部位を有し、HIF-1と特異的に結合することが示された。これらの結果は、細胞および組織の酸素のホメオスタシスの基礎となる低酸素状態に対する適応応答のメディエーターとしてのHIF-1の役割を支持する。

10

【0056】

HIF-1 のドミナントネガティブ変種を生成したが、これはHIF-1がDNAに結合するために必要なタンパク質の基本ドメイン(アミノ酸17~30)が欠落したものである。変種HIF-1 サブユニットは、HIF-1 と二量体を形成することができるが、得られるヘテロ二量体はDNAに結合できない。変種HIF-1 サブユニットを過剰発現する細胞中において、ほとんどのHIF-1 サブユニットは、非機能性ヘテロ二量体の形成に使用され、その結果、HIF-1が機能的に不活性化された。これらの結果から、HIF-1 変種は、in vivoにおいて、HIF-1活性を阻害するうえで有用であることが分かる。

【0057】

以下の実施例は説明を目的とするものであり、本発明を制限するものではない。これらの実施例は利用可能な典型的な例であるが、当業者に公知の他の手順を代わりに使用してもよい。

20

【実施例】

【0058】

実施例1 実験方法

下記のとおりヒトHIF-1を精製し、そのDNA結合活性の特徴を調べた。

【0059】

細胞培養及び核抽出物の調製

ヒトHep3B及びHeLa細胞を維持し、1%O₂及びCoCl₂で処理し(Wang & Semenza(1993a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4304-4308)、核抽出物を既報(Semenza & Wang(1992), Mol. Cell. Biol. 12:5447-5454; Dignamら、(1983)Nucleic Acids Res. 11:1474-1489)に従って調製した。HeLaS3細胞はAmerican Type Culture Collectionから入手したもので5%(W/V)ウマ血清(Quality Biological, Gaithersburg, MD, USA)を添加したスピナー最小基本培地中での懸濁培養に適応させた。その細胞を8X10⁵個/mlの密度となるまで増殖させ、2日ごとに新鮮な完全培地で希釈し、2X10⁵個/mlを維持した。HIF-1のDNA結合活性を誘導するため、HeLaS3細胞を125 μM CoCl₂で37℃4時間処理した後、2,500 X gで10分間遠心して細胞を採取した。細胞ペレットを氷冷した食塩加リン酸緩衝液で2度洗い、2mM ジチオスレイトール(DTT)、0.4mM フェニルメチルスルホニルフルオリド及び1mM Na3VO4を添加した、充填細胞容積の5倍量の緩衝液A(10mM Tris-HCl(pH 7.6)、1.5mM MgCl₂、10mM KCl)中に再懸濁した。氷上で10分間インキュベートした後、2500 X g、5分間遠心して細胞をペレットとし、充填細胞容積の2倍量の緩衝液A中に再懸濁し、ガラス製ダウンスホモゲナイザーでタイプB乳棒を20ストロークさせて細胞を溶解させた。核画分を10,000 X g、10分間遠心してペレットとし充填核画分の3.5倍量の、2mM DTT、0.4mMフェニルメチルスルホニルフルオリド及び1mM Na3VO4を添加した緩衝液C(0.42M KCl、20mM Tris-HCl(pH7.6)、20%グリセロール、1.5mM MgCl₂)で再懸濁した。4℃で30分間攪拌して核タンパク質を抽出した。15,000 X gで30分間遠心した後、上清を緩衝液Z-100(25mM Tris-HCl(pH7.6)、0.2mM EDTA、20%グリセロール、2mM DTT、0.4mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、1mM Na3VO4及び100mM KCl)に対して4℃で透析した。透析物を4℃、100,000 X g、60分間超遠心にかけたものを粗核抽出物とした。この核抽出物を少量ずつ液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。タンパク濃度は市販のキット(Bio-Rad)で、ウシ血清アルブミン(BSA)

30

40

50

を標準品として用い、Bradford(1976)Anal. Biochem, 72:248-254の方法で行った。

【0060】

ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは、結合反応を緩衝液Z-100中で行ったことを除き、既報(Semenza & Wang(1992) Mol.Cell.biol. 12:5447-5454, 本明細書中に参照として特に組み込んでいる)に従って行った。部分精製及びアフィニティー精製したHIF-1標品のゲルシフトアッセイでは0.25mg/mlのBSA及び0.05% Nonidet P-40を結合反応液に加えた。部分精製HIF-1画分の測定には非特異的競合剤である仔牛胸腺DNA(Sigma)を減量して用い、アフィニティー精製HIF-1画分の測定には仔牛胸腺DNAは用いなかった。競合剤を用いた実験では、プローブのDNAを添加する前に、非標識のオリゴヌクレオチドDNAをDEAE-Separoseカラム画分と氷上で5分間インキュベートした。 10

【0061】

0, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500あるいは1000 μ M CoCl_2 の存在下で37 4時間培養したHeLa細胞から調製した核抽出物をW18プローブとインキュベートした。

【0062】

メチル化妨害(阻害)分析

メチル化妨害分析は、結合反応液中に CoCl_2 処理HeLa細胞から調製した核抽出物を100 μ g用いたことを除いては既報(Wang & Smenza(1993b) J.Biol.Chem.268:21513-21518, 本明細書中に参照として特に組み込んでいる)のとおり行った。

【0063】

結果

HIF-1 DNA結合活性を誘導するための CoCl_2 至適濃度を求めるため、HeLa細胞を CoCl_2 で処理した。核抽出物を調製し、プローブとして野生型オリゴヌクレオチドW18(実施例2)を用いてゲルシフトアッセイで分析した。結果を図1に示す。 CoCl_2 によるHIF-1 DNA結合活性の誘導は用量依存性であった。核抽出物中のHIF-1活性は25 μ M CoCl_2 で検出され、250 μ Mでピークに達した。しかし、250 μ Mを超える CoCl_2 濃度では顕著な細胞死が認められ、その結果として、核タンパク質の収率の減少がみられた。このため、これ以降の大規模核抽出物標品の調製には125 μ M CoCl_2 を選んだ。構成性(constitutive)のDNA結合活性、これは0-100 μ M CoCl_2 で処理された細胞中で比較的未変化の状態に残存しているW18プローブ配列と特異的に結合し、250 μ Mを超える CoCl_2 では減少したが、このことは、細胞に対する高 CoCl_2 濃度の副作用を示唆している。非特異的DNA結合活性はこのゲルシフトアッセイではかろうじて検出されるに過ぎず、細胞のタイプ及び用いられた非特異的競合DNAの相対量によって変わる。 30

【0064】

メチル化妨害分析は低酸素性Hep3B細胞から得たHIF-1が、 CoCl_2 処理HeLa細胞から得たものと同じDNA結合性を有するか調べるために行った。図2に示すとおり、コードする鎖のG8又はG10のメチル化はHIF-1結合活性をそれぞれ消失又は大きく減弱させる(図2、左、レーン2)。G10のメチル化は構成性の因子の結合を部分的に妨害するのみであった(図2、左、レーン3及び4)。コードしない鎖に対してはG7又はG11のメチル化はHIF-1のプローブへの結合能をブロックした(図2B、右、レーン2)。G7のメチル化のみが構成性の因子の結合を妨害した(図2B、右、レーン3及び4)。どちらの鎖のDNAをメチル化した場合でも非特異的結合活性は影響を受けなかった(図2A、左、レーン5、及び図2B、右、レーン5)。これらの結果は、(i)HIF-1はDNAヘリックスの主グループを通してコーディング鎖上のG8及びG10及び非コーディング鎖上のG7およびG11と密接に接触しており、(ii)HIF-1及び構成性のDNA結合因子はそれらのDNA結合部位との接触性によって区別しうる、ことを示している。 40

【0065】

実施例2 HIF-1の生化学的精製 DNAアフィニティークラムの調製

DNAアフィニティークラムは多量体化した二重鎖オリゴヌクレオチドをCNBrで活性化 50

させたSeparoseにカップリングさせることにより調製した(Kadonaga & Tijan(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5889-5893)。野生型及び変異型カラムにはマルチマーとしたオリゴヌクレオチドW18(配列番号5)及びM18(配列番号6)(変異箇所を下線で示す)をそれぞれ含む。

W18: 5'-gatcGCCCTACGTGCTGTCTCA-3'

3'-CGGGATGCACGACAGAGTctag-5'

M18: 5'-gatcGCCCTAAAAGCTGTCTCA-3'

3'-CGGGATTTTCGACAGAGTctag-5'

同量の相補的オリゴヌクレオチドをアニーリングし、リン酸化し、連結させた。連結されたオリゴヌクレオチド(60-500 bp)はフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、脱イオン水に再懸濁し、CNBr活性化Separose 4Bに製造者(Pharmacia Biotech Inc.)の説明書に従いカプルさせた。Separose 1mlあたり約50 µgの連結二重鎖オリゴヌクレオチドがカプルされた。

【0066】

H I F - 1 の精製

120LのCoCl₂処理HeLaS3細胞(435ml, 3,040mg)から得られた粗核抽出物を氷上で融解させ、15,000 X g, 10分間遠心して澄清化した。抽出物を36mlのDEAE-Sepharose CL-6Bカラム(Pharmacia)で緩衝液Z-100中でKClの濃度を段階的に増加させて3つのバッチに分画した。活性のピークを示したフラクションをプールし緩衝液Z-100に対して透析した。DEAE-Sepharoseカラムから得た透析物を、4.4 µg/mlの仔牛胸腺DNA(Sigma)と氷上で15分間インキュベートした。15,000 X g, 10分間遠心した後、上清(240ml, 2.3 mg/ml)を、連結されたW18オリゴヌクレオチドで調製した6mlのDNAアフィニティークラムにアブライした。H I F - 1活性を持つフラクションをプールし、緩衝液Z-100に対して透析した。1回目のDNAアフィニティークラムから得た透析物を、2.5 µg/mlの仔牛胸腺DNAと混合し、氷上で15分間インキュベートした。遠心(上述と同様)した後、上清を1.5mlのM18 DNA-Sepharoseカラムにアブライした。M18カラムの流出液を集め、再び第二の2ml W18カラムにアブライした。DNAアフィニティークロマトグラフィーに用いた緩衝液には全て0.05% Nonidet P-40及び5mM DTTが添加されている。アフィニティークラムフラクション中のタンパク含量はSDS-ポリアクリルアミドゲルの銀染色又はニトロセルロース膜(Schleicher & Schuell)のAmido Black(Sigma)染色で、タンパク質サンプルをスポットし既知量のタンパク質標準品(Bio-Rad)と比較して定量した。

【0067】

低酸素処理したHep3B細胞からのH I F - 1の精製のため、核抽出物(95mg)を上述のDEAE-Sepharose CL-6Bカラム4mlを用いて分画した。0.25M KClで溶出するフラクションを緩衝液Z-100に対して透析し、Sephacryl S-300ゲルろ過カラム(50ml, 1.5 X 30cm)にアブライした。H I F - 1活性を有するフラクションをプールし、一重鎖仔牛胸腺DNAをCNBr活性化Sepharose 4Bにカプルさせて製した2mlの仔牛胸腺DNAカラム(0.8mg仔牛胸腺DNA/ml Sepharose)にアブライした。流出液を集め、仔牛胸腺DNA(2.2 µg/ml)と10分間インキュベートした後、上述の0.4mlのW18カラムにアブライし、その後、緩衝液Z-100に対して透析した後、再度0.2mlのW18カラムにかけた。

【0068】

SDS-PAGE及び銀染色

SDS-PAGEはLaemmli(1970) Nature 227:680-685に記載のとおり行った。ゲルは高分子量標準品又は染色済分子量マーカー(Bio-Rad)を用いてキャリブレートした。電気泳動は30mAで行った。銀染色は硝酸銀を用い既知(Switzerら、(1979) Anal. Biochem. 98:231-237)の方法で行った。H I F - 1の分子量の推定は3.2%の架橋結合(アクリルアミド/ビスアクリルアミドを30:1の比で)を有するSDS-ポリアクリルアミドゲルに基づいて行った。

【0069】

結果

低酸素性Hep3B細胞から得たH I F - 1のDNA結合活性とCoCl₂処理HeLa細胞から得た

10

20

30

40

50

ものとの区別は付けられないため(実施例1)、H I F - 1の大規模精製の出発物質としては125 μ M CoCl₂処理したHeLaS3細胞を用いた。H I F - 1をD N Aアフィニティークロマトグラフィーで精製するために構成性のD N A結合活性をまず最初にH I F - 1から分離しなければならなかった。なぜならば、両者とも特異的にW18 D N A配列に結合してしまうからである。各種のイオン交換樹脂及びゲルろ過マトリックスを検討した。H I F - 1は緩衝液Z-100中のDEAE陰イオン交換樹脂上に残存するのに対し、構成性のD N A結合活性は流出液中に認められた。H I F - 1 D N A結合活性は緩衝液Z中250mM KClで溶出された。DEAEクロマトグラフィーは効果的に構成性のD N A結合活性を除去し、H I F - 1を4倍精製する結果となった(図3A, レーン1及び2)。しかしながらこのステップはH I F - 1タンパク質複合体を不安定化させるようであり、速移動型(faster migration form)のH I F - 1とする(図3A, レーン2、2番目の矢印)が、この型はしばしば粗核抽出物標品にも認められる。速移動型は高い塩濃度では遅移動型(slower migration form)に転換するものと思われ、第1回目のD N Aアフィニティークロマトグラフィー後には再びH I F - 1の遅移動型が優勢となる(図3A, レーン10-12)。このことはDEAE-Separose カラムステップではH I F - 1の構成成分は失われていないことを示唆している。H I F - 1の両方の型のプローブ結合は、非標識のW18には競合し得たが(図3B, レーン2-4)、M18オリゴヌクレオチドとは競合し得なかった(図3B, レーン5-7)。それはM18は3つの塩基が置換されているため低酸素性を誘導する転写に介在するEPOエンハンサー能が欠けていたためである。

【0070】

次いで、部分精製H I F - 1フラクションを非特異的競合剤である仔牛胸腺D N Aと、ゲルシフトアッセイでH I F - 1 D N A結合能検出に最適となる濃度でインキュベートし、W18 D N Aアフィニティークラムにアプライした。H I F - 1を含有する溶出フラクション(0.5M KCl, 図3A, レーン10; 1M KCl, 図3A, レーン11)をプールし、緩衝液Z-100に対して透析した。仔牛胸腺D N A競合剤では除去し得ない非特異的D N A結合タンパク質を排除するため、透析物をM18 D N Aカラムにアプライした。流出液にH I F - 1 D N A結合活性が検出され、これを直接第二番目のW18カラムにアプライした。H I F - 1活性は0.5M KClフラクションのみに検出された。W18で2回、M18で1回のカラムクロマトグラフィーで約2,800倍精製された。

【0071】

大規模精製の最終結果は表1に要約されている。HeLa細胞120Lから約60 μ gの高度精製H I F - 1が得られた。精製の総計は11,250倍となり、出発時のH I F - 1 D N A結合活性の約22%が回収された。我々の目的はペプチドマッピングとタンパク質マイクロシーケンシング分析のためのH I F - 1サブユニットの同定とH I F - 1構成成分の単離である。精製ステップをさらに追加した場合にははるかに低い収率しか得られなかったため、我々はそれ以上H I F - 1を均一になるまでの精製は行わなかった。M18カラム流出液からのアリコート(図4a, Load)、及び2回目のW18カラムの0.5M KCl溶出フラクション及び0.25M KCl洗液を6% SDS-PAGE及び銀染色で分析した。0.5M KClフラクションには90-120 kDaの4つのポリペプチドが非常に豊富であり、そのフラクションは、0.25M KClフラクション(H I F - 1活性は非常に低い)と比較すると、高いH I F - 1 D N A結合活性を有していた。しかし、0.5M KClフラクションは、0.25M KClフラクション中に認められる夾雑タンパク質の多くを依然として含んでいた。

【0072】

低酸素状態誘導Hep3B細胞からのH I F - 1の精製の最初のパイロット試験では異なる精製プロトコルが用いられた。Sephacryl S-300カラムによるゲルろ過が、構成性のD N A結合活性からH I F - 1を分離させるのに効果的であることがわかった。さらに、2回のW18アフィニティークロマトグラフィーの前に、仔牛胸腺D N Aカラムを非特異的D N A結合タンパク質を除去するために用いた。2つのD N Aアフィニティークラムのどちらからもその0.5M KClフラクションからH I F - 1活性が検出された。1回目のW18カラムの0.5M KCl溶出フラクション(図4B, Load)のアリコート、及び2回目のW18カラムの0.25M KCl洗液及び0.5M KCl溶出フラクションを7%SDS-PAGE及び銀染色で分析した。CoCl₂処理HeLa

10

20

30

40

50

細胞中の H I F - 1 D N A 結合活性と共精製したときと同程度の分子量を持つ 4 つのポリペプチドが、低酸素状態の Hep3B 細胞からアフィニティー精製した標品中に存在し (図 4B, レーン 3, 矢印)、このことは 2 種類の異なる細胞から得た H I F - 1 が同じポリペプチドサブユニットからなることを示している。ゲルシフトアッセイにおいては CoCl₂ 処理 HeLa 細胞及び低酸素状態 Hep3B 細胞のどちらから得られたアフィニティー精製 H I F - 1 とも特異的に W18 プローブと結合した。

【 0 0 7 3 】

実施例 3 H I F - 1 サブユニットの分析

下記の実験は H I F - 1 D N A 結合複合体の一部であるポリペプチドを同定するために行った。

【 0 0 7 4 】

30 µl のアフィニティー精製 H I F - 1 及びプローブ W18 を用いて、調製的ゲルシフトアッセイを行った。湿潤なゲルをオートラジオグラフィーにかけた後、H I F - 1 及びその周辺を含むゲルの切片を単離した。ゲル切片を 6% SDS- ポリアクリルアミドゲルの重層ゲル上に置き、Laemmli 緩衝液と in situ で 15 分間インキュベートし、電気泳動を 30 µl のアフィニティー精製 H I F - 1 及び分子量マーカーを並行させて行った。二次元変性ゲル電気泳動にはアフィニティー精製 H I F - 1 のアリコート を 2 回取り、5% 架橋結合 (19:1 のアクリルアミド/ビスアクリルアミド比) させた 6% SDS- ポリアクリルアミドゲル上で分解させた。一つのレーンを硝酸銀で染色した。目的とする領域に対応するゲルの切片を未染色レーンから単離した。単離したゲル切片を、3.2% 架橋結合を含む二次元 6% SDS- ポリアクリルアミドゲルの重層ゲル上に直接置き、30 µl のアフィニティー精製 H I F - 1 と並行させて電気泳動を行った。

【 0 0 7 5 】

H I F - 1 サブユニットのペプチドマッピング

アフィニティー精製 H I F - 1 2ml を 10mM 重炭酸アンモニウム、0.05% SDS に対して透析し、凍結乾燥した。溶解溶液 (100mM ショ糖, 3% SDS, 21.25mM Tris-HCl (pH6.9), 1mM EDTA, 5% β-メルカプトエタノール, 0.005% ブロムフェノールブルー) 中に再懸濁した後、タンパク質サンプルを 37℃ 15 分間加熱し、0.2% SDS 含有の 6% ポリアクリルアミドゲル上で分解した。4℃ で電気泳動によりペプチドを 10% 酢酸含有の 0.5 X Towbin 緩衝液 ((Towbin ら、91979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-5354) (96mM グリシン, 12.5mM Tris-HCl (pH8.3)) 中のポリビニリデンジフルオリド膜 (Bio-Rad) に移し、5% 酢酸で脱色し、Milli-Q 水で洗った。120kDa、94/93kDa 及び 91kDa のポリペプチドを含む膜切片を切り取り、ペプチドマッピング (Best ら、Technique in Protein Chemistry V (Crabb, J.W. ed.), pp.205-213, Academic Press, San Diego, CA, USA) を行った。in situ トリプシン分解及び逆相 HPLC は Wistar Protein Microchemistry Laboratory で実施した。

【 0 0 7 6 】

UV 架橋結合分析

UV 架橋結合は 30 µl のアフィニティー精製 H I F - 1 を結合反応に用いたこと以外は既報の方法 (Wang & Semenza (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4304-4308) で行った。アフィニティー精製 H I F - 1 を非標識の W18 又は M18 オリゴヌクレオチドの存在下又は非存在下で W18 プローブとインキュベートした。4℃、15 分間インキュベートした後、反応混液に UV 光線 (312nm: Fisher Scientific) を 30 分間照射し、染色済の分子量マーカーとともに 6% SDS-PAGE で分解し、オートラジオグラフィーで可視化した。

【 0 0 7 7 】

グリセロールグラディエント沈降反応

48 時間 4℃ で Beckman SW40 ローターで遠心するため、100mM KCl、25mM Tris-HCl (pH7.6)、0.2mM EDTA、5mM DTT、及び 0.4mM フェニルメチルスルホニルフルオリドを含有する緩衝液中に 12ml の 10-30% グリセロールでリニアグラディエントを作製した。低酸素状態の Hep3B 細胞から調製した核抽出物 (100 µl, 5mg/ml) を、10% グリセロールを含むグリセロールグラディエント緩衝液の等量と混合し、グラディエントの最上部に重層した。マーカーグ

10

20

30

40

50

ラディエントは並行して沈降させたが、それには各50 µgのサイログロブリン (660kDa)、フェリチン(440kDa)、カタラーゼ(232kDa)、アルドラーゼ(158kDa)、及びBSA(67kDa)(Pharmacia)を加えた。これらのマーカーはサンプルと同量、同グリセロール濃度となるよう調整した。試験管の最上部からフラクションをとり、DNA結合活性をゲルシフトアッセイで測定した。マーカーはSDS-PAGE及び銀染色でアッセイした。

【0078】

結果

HIF-1 DNA結合複合体の一部であるポリペプチドを同定するため、調製的ゲルシフトアッセイをアフィニティー精製HIF-1とW18プローブを用いて行った。HIF-1 DNA複合体を含有するゲル切片を単離し、SDS-ポリアクリルアミドゲルのウエルに直接挿入し、電気泳動でアフィニティー精製HIF-1のアリコートと並行させ分析した(図5A)。HIF-1複合体に存在する4種のポリペプチドは、それぞれ120, 94, 93, 及び91kDaの見かけの分子量の位置に移動した(図5A, HIF-1)。これらのペプチドのうち、同じレーンの他の場所からのゲル切片から検出されたものはなかった。これらの4種のポリペプチドはDNAアフィニティークロマトグラフィーにより、HIF-1 DNA結合活性で共精製して得られたポリペプチドと同位置に移動した(図5A, レーンA)。120kDaのポリペプチド及び91-94kDaポリペプチドは等モル比で存在するようであり、このことは120kDaポリペプチドが91-, 93-, 及び94kDaのポリペプチドのいずれか一つと複合体を形成していることを示唆している。

【0079】

3.2%架橋結合を有する6%SDS-ポリアクリルアミドゲル上で120kDa HIF-1 ポリペプチドはわずかに大きい見かけの分子量を持つ夾雑タンパク質の非常に近傍に移動し(図5A, レーンA)、120kDaポリペプチドの単離を困難にした。この問題は5%架橋結合を有する6%SDS-ポリアクリルアミドゲルでHIF-1 ポリペプチドを分離することによって解決した。120kDaポリペプチドは、より高度に架橋結合したゲル上では116kDaの分子量マーカーよりはるかに速く移動したが、一方夾雑タンパク質のバンド(1)は変化がなかった(図5B, レーンA)。しかし、これらの条件下では91kDaのポリペプチドは、その下の別の夾雑バンド(2)と非常に近接して移動した。それ故、2種類の、異なる架橋結合度を有するポリアクリルアミドゲルシステムが、91-94kDa及び120kDaポリペプチドの単離にはそれぞれ必要であった。

【0080】

この2種のゲルシステムで同定されたHIF-1 ポリペプチドが同一であるか確認するため、二次元変性ゲル電気泳動を行った。アフィニティー精製HIF-1をまず最初に5%架橋結合の6%SDS-ポリアクリルアミドゲル上で分解した(図5B, レーンAに示すとおり)。120kDa, 94/93/91-kDa HIF-1 ポリペプチド、及び2つの夾雑バンドを含むゲルの領域を単離し、3.2%架橋結合の6%SDS-ポリアクリルアミドゲルで、アフィニティー精製HIF-1のアリコートと並行させて電気泳動で分析した。図5Cに示すとおり、単離したHIF-1及び夾雑ポリペプチドは対照としたサンプルではそれぞれの対応するバンドが共に移動したが、このことはそれらの移動の相異がSDS-ポリアクリルアミドゲルの架橋結合の度合いの相異によるものであることを示唆している。

【0081】

HIF-1複合体から得た4種のポリペプチドが固有のタンパク種であるか調べるためトリプシンペプチドマッピングを行った。91kDaバンドは単独で単離されたが93及び94kDaのバンドは電気泳動での分離処理後共に切り取られ、ポリビニリデンジフルオリド膜に移された。タンパク質はin situでトリプシン消化され、消化されたペプチドは逆相HPLCで分離した(図6)。91kDaタンパク質及び93/94タンパク質から由来したトリプシン消化ペプチドの溶出プロファイルはほとんど重ねうるもの(図6)であり、このことはそれらのペプチドが類似のポリペプチドから由来するものであることを示している。120kDa HIF-1 ポリペプチドの単離のために、5%架橋結合の6%ポリアクリルアミドゲル上で、HIF-1のアリコートをもう一度別に分解した。120kDaポリペプチドから由来するトリプシン消化

ペプチドの溶出プロフィールは91-94kDaポリペプチドのものとは明らかに異なっていた。これらの結果はH I F - 1 が2つの異なるサブユニット、120kDa H I F - 1 、及び91/93/94kDa H I F - 1 から構成されていることを示唆している。

【 0 0 8 2 】

D N A 結合性のサブユニットを同定するため、アフィニティー精製 H I F - 1 を W18 プロープとインキュベートした。D N A 結合タンパク質を結合部位のヌクレオチド残基と架橋結合させるための UV 照射の後、反応混液を Laemmli 緩衝液中で煮沸し、SDS-PAGE で分解し、架橋結合されたタンパク質をオートラジオグラフィーで可視化させた。2種の D N A 結合タンパク質が検出された(図7, レーン1)。それらの分子量は約120及び92kDaと見積もられ(プロープ D N A による16kDaの寄与を差し引いた後)、これらは H I F - 1 及び H I F - 1 と同等であった。この2種のタンパク質のプロープへの結合は、非標識野生型 W18 と競合し(図7, レーン2)、変異型の M18 オリゴヌクレオチドとは競合しない(図7, レーン3)ことから配列特異的であった。これらの結果は H I F - 1 及び H I F - 1 が D N A に直接接合することを示唆している。H I F - 1 は H I F - 1 よりはるかに強く D N A と架橋結合した(図7, レーン1及び3)。これらのデータは D N A アフィニティークロマトグラフィーで精製した4種のポリペプチドが H I F - 1 D N A 結合活性の真の構成成分であることをさらに証拠立てている。

【 0 0 8 3 】

H I F - 1 の天然型の大きさを推定するため、低酸素状態の Hep3B 細胞から調製した粗核抽出物についてグリセロールグラディエント沈降分析を行った。H I F - 1 及び構成性の D N A 結合活性をゲルシフトアッセイでモニターした。低酸素状態の Hep3B 核抽出物では、H I F - 1 D N A 複合体は2種の型で存在するが、CoCl₂ 処理の HeLa 細胞では速く移動する型のものが多い。図8に示す結果は H I F - 1 の二重縞の2つのバンドが沈降法で分離可能なことを示している。速く移動する形のは約200-220kDaの分子量を持つと見積もられる。オートラジオグラフにより長時間暴露すると、分子量440kDaであるフェリチンと共に遅く移動するバンドが現れた。2種のタンパク複合体が球状のコンホメーションを持つものと仮定すると、これらの結果は、速く移動する型のは120kDa H I F - 1

サブユニット1個と91-94kDa H I F - 1 サブユニット1個からなるヘテロ二量体複合体で、遅く移動する型のはヘテロ四量体であるという仮説と整合している。しかし、これらの H I F - 1 複合体の正確な性質と化学量論はまだ明らかになっていない。構成性の D N A 結合活性は、分子量としては67kDaのBSAより小さい。UV架橋結合分析では、構成性の因子は約40-50kDaの D N A 結合サブユニットを持つことを示している。構成性の因子はおそらく D N A とモノマーとして結合しているものと考えられる。グリセロールグラディエント沈降分析の結果に整合して、Sephacryl S-300ゲルろ過カラムから H I F - 1 は構成結合活性の前に溶出し、遅く移動する H I F - 1 ゲルシフト活性は速く移動する型のものの前に溶出した。これらの結果は H I F - 1 が溶液中ではヘテロ二量体が多数を占める形で存在し、より高度な(higher order)複合体は頻度が低く、これらの複合体が少なくとも1個の H I F - 1 と1個の H I F - 1 を含有していることを示唆している。

【 0 0 8 4 】

実施例 4 H I F - 1 c D N A 配列の単離と特性 タンパク質ミクロ配列分析

精製 H I F - 1 サブユニットは SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画し、120及び94kDaのポリペプチドをポリビニリデンジフルオリド膜に移し、個々にトリプシンで *in situ* で消化し、ペプチドを逆相高圧液体クロマトグラフィー(Wang & Semenza(1995) J. Bio. Chem. 270:1230-1237, 本明細書に参照として特に組み込んだ)で分画した。タンパク質ミクロ配列分析は Wistar Protein Microchemistry Laboratory, Philadelphia(Bestら、(1994)同上)で行った。

【 0 0 8 5 】

c D N A ライブラリーの構築とスクリーニング

37 16時間、1%O₂/5%CO₂/残りをN₂とした気体を流したチャンバーで培養したHep3B細胞

からポリ(A)+RNAを単離した。cDNAはオリゴ(dT)及びランダムヘキサマープライマーを用いて合成し、バクテリオファージライブラリーは gt11及びUni-ZAP XR(Stratagene, La Jolla, USA)に構築した。cDNAライブラリーは³²P標識cDNAフラグメントでブランクハイブリダイゼーションで文献(Sambrookら、(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 参照として特に組み込んだ)に記載の方法でスクリーニングした。

【0086】

PCR

変性オリゴヌクレオチドプライマーはコドン選択則(codon preference rule)(Lathe (1985) J. Mol. Biol. 183:1-12)を用いてデザインした。F1(5'-ATCGGATCCATCACIGA(A/G)CT(C/G)-ATGGGTTATA-3')(配列番号7)は、HIF-1 ペプチド87-1のアミノ末端の基づいており、順方向のプライマーとして用いられた。2種の入れ子になった(nested)逆行プライマー、R1(5'-ATTAAGCmTGGT(G/C)AGGTGGTCI(G/C)(A/T)GTC-3')(配列番号8)及びR2(5'-ATTAAGCTTGCATGGTAGTA(T/C)TCATAGAT-3')(配列番号9)はペプチド91-1のカルボキシル末端に基づいたものである。108ファージあるいは10ngのファージDNAを95℃で10分間変性させることにより、PCRは、AmpliTaq(Perkin-Elmer)を30℃で添加し、95℃、37℃、及び72℃の3サイクル(各30秒)で増幅した後、95℃、50℃、及び72℃(各30秒)で35サイクル増幅して行った。F1/R1次いでF1/R2との入れ子PCRにより86-bpのフラグメントが得られ、これをpGEM4(Promega)にクローン化した。HIF-1 (ARNT)についてはPCRは上述のとおり、プライマー；5'-ATAAAGCTTGT(C/G)TA(C/T)GT-(C/G)TCIGA(C/T)TCIG-3'(配列番号10)及び5'-ATCGAATTC(C/T)TCI-GACTGIGGCTGGTT-3'(配列番号11)を用いて行い、その結果、予測どおり69-bpの産物を得た。HIF-1 (ARNT)の5'末端を分析するために、Hep3B poly(A)+RNAを5'-RACE kit(Clontech)から入手した試薬を用いて逆転写した。cDNAはARNT cDNA(Hoffmanら、(1991)同上)のnt 54-425の増幅のための鋳型として用いられ、5'-TACGGATCCGCCATGGCGGCGACT-ACTGA-3'(配列番号12)(順行プライマー)、及び入れ子逆行プライマー5'-AGCCAGGGCACTACAGGTGGGTACC-3'(配列番号13)及び5'-GTTCCCGCAAGGACTTCATGTGAG-3'(配列番号14)と共に95℃、60℃、及び72℃(各30秒)で35サイクル行った。PCR産物はヌクレオチド配列分析のため、pGEM4にクローン化した。

【0087】

結果

精製120kDa HIF-1 ポリペプチドをトリプシンで消化し、ペプチドを逆相高圧液体クロマトグラフィーで分画し、フラクション87及び92はマイクロ配列決定法を行った。各フラクションは2種のトリプシン処理ペプチドを含有しており、それらの完全なアミノ酸配列が得られた：ITELMGYEPEELLGR(配列番号15)(87-1), XIILIPSDLAXR(配列番号16)(87-2), SIYEEYHALDSHLTK(配列番号17)(91-1), 及びSFFLR(配列番号18)(91-2)。87-1及び91-1を隣接配列として入力したところ、データベース検索でPER(Drosophila proteins period)、SIM(single-minded)、及び哺乳類のAHR(aryl hydrocarbon receptor)及びARNT(aryl hydrocarbon nuclear translocator)タンパク質、それらは全てPAS(PER-ARNT-AHR-SIM)ドメイン(Hoffmanら、(1991)Science 252:954-958; Citriら、(1987) Nature 326:42-47; Burbachら、(1992) Proc. Natl. Acad. Sci.USA 89:8185-8189; Crewsら、(1988) Cell 52:143-151; Nambuら、(1991) Cell 67:1157-1167)を構成する200-350個のアミノ酸の配列を持っているが、それらとの類似性が見出された。縮退(degenerate)オリゴヌクレオチドは87-1及び91-1配列に基づき合成され、低酸素状態のHep3B細胞から調製したcDNAと共にPCRに用いられた。ヌクレオチド配列分析ではクローン化されたPCR産物が予期したアミノ酸をコードしていることが示され、87-1及び91-1が隣接ペプチドであることが示された。

【0088】

実施例 5 ヌクレオチド配列とデータベース解析

完全長の疑う余地のない二重鎖ヌクレオチド配列が、蛍光標識ジデオキシヌクレオチドをT3, T7及び特別に合成したプライマーを用いて熱サイクルシーケンシング反応に取り

込むことによって得られた。反応はJohns Hopkins UniversityのGenetic Core Resources Facilityで、Applied Biosystems 394 D N A Synthesizer及び373a Automated D N A Sequencersを用いて行った。タンパク質及び核酸のデータベース検索はNational Center for Biotechnology InformationでBLASTPおよびTBLASTN(Altschulら、J. Mol. Biol. 215:403-410)プログラムを用いて行った。H I F - 1 c D N Aヌクレオチド配列及びそれから生ずるアミノ酸配列はGen Bankに提出済である。アクセスNo.はU22431である。

【 0 0 8 9 】

結果

由来するアミノ酸配列がbHLH-PASタンパク質と類似性を有するEST(expressed sequence tag)もデータベース解析によって見出した。我々はESTが由来した3.6-kbのc D N A, hbc025(Takedaら、(1993) Hum. Mol. Genet. 2:1793-1798)を得た。完全長のヌクレオチド配列の分析によってそれが4種のトリプシン処理ペプチドの全てをコードしていることが明らかとなった。別のESTが同定され、それはhbc025と共通の同一性があり、2.0-kbのc D N A hbc120(Takedaら、(1993)同上)によってコードされていた。hbc120の配列分析によってそれがhbc025の3'末端と共直鎖(co-linear)をなし(図9)、ポリ(A)テイルの長さのみ異なることが示された。hbc025の5'末端はHep3B c D N Aライブラリーをスクリーンするために用いられ、その結果、イニシエーターコドンに伸びている、オーバーラップしている3.4-kb c D N A, 3.2-3, が単離された。3720 bpの複合(composite) c D N Aは、翻訳開始コドンを含む2478bpのオープンリーディングフレーム、インフレーム停止コドンを有する28 bpの5'非翻訳領域(5'-UTR)、及び43個のアデニン残基による12bpの後ろの正準(canonical)なポリアデニレーションシグナルで終わる1211 bp 3'-UTRをコードしていた。コンセンサス翻訳開始配列GCC(A/G)CCATGG(配列番号19)(Kozak(1987) Nucleic Acid Res. 15:8125-8132)に比べ、H I F - 1 c D N A配列はTTCACCATGG(配列番号20)であった。H I F - 1 c D N Aオープンリーディングフレームから、新しい826個のアミノ酸のポリペプチド(図10)が予測され、それは93kDaの分子量を持ちそのアミノ末端にbHLH-PASドメインを持つ。94kDa H I F - 1 ポリペプチドから単離された2種のトリプシン処理ペプチドの分析により、部分的なアミノ酸配列が明らかとなった; VVYVSDSVTPVLNQPQSE(配列番号21)、及びTSQFGVGSFQTSSSFSSMXLPGAPTASPGAAAY(配列番号22)。第二のペプチド配列に基づく変性オリゴヌクレオチドを用いて、予測された大きさのPCR産物をHep3B細胞c D N Aから増幅した。データベース解析により、2種のペプチドがARNT配列の中に含まれることがわかった。ARNT配列はbHLH-PASタンパク質で、AHRとヘテロ二量体を形成して機能性ジオキシン受容体となることが知られている(Reyesら、(1992) Science 256:1193-1195)。2つの異なる形のARNTは、45bpの別のエクソンによってコードされる15アミノ酸配列が存在するか否かが異なることが示された(Hoffmanら、(1991)同上)。Hep3B細胞R N Aの逆転写酵素-PCRによる分析では、これらの2種の配列及びさらに別の同型体の存在を明らかにした。これらの一次配列の相異は3種(91, 93, 及び94kDa)の精製を説明しうる(Wang & Semenza (1995)同上)。変性ゲル上でのH I F - 1 とH I F - 1 の見かけの分子量はc D N A配列から予測された分子量より大きい。H I F - 1 については計算値は93kDaであったのに比べ、見かけの分子量は120kDaであり、H I F - 1 サブユニットについては、774個及び789個のアミノ酸を有するARNTの同型体がそれぞれ85及び87kDaなのに対し、見かけの分子量は91-94kDaであった。H I F - 1 とARNT配列はタンパク質リン酸化のための多重コンセンサス部位を有し、H I F - 1 はD N A結合にリン酸化を要することが知られている(Wang & Semenza(1993b), 同上)。

【 0 0 9 0 】

H I F - 1 とH I F - 1 (ARNT)は異なるクラスのbHLHドメインに属しており、隣接D N A結合(b)及び二量体化(HLH)モチーフからなっている。H I F - 1 のbHLHドメインは他のbHLHPASタンパク質であるSIM及びAHR(図11)と最も類似している。H I F - 1 (ARNT)は、5'-CACGTG-3'(配列番号23)(Dangら、(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:599-603)、この配列はH I F - 1 [5'-(G/Y)ACGTGC(G/T)-3'(配列番号24)(Semenzaら、(1994)同上)]及びジオキシンレセプター[5'-(TIG)NGCGTG(A/C)-(G/C)A-3'(配列番号25)(Luskaら、(1

993) J. Biol. Chem. 286:6575-6580) 結合部位に似ているが、その配列と結合する一連の哺乳類(MI, USF, L-MYC)及び酵母(CP-1)のタンパク質に認められるbHLHドメインに非常に似ている。これらの転写因子は、異なる二量体化コンテキストで生じる関連配列のbHLHドメインを共有する: MI、L-MYC、及びUSFはbHLH-ロイジンジッパータンパク質であり、ARNTはbHLH-PASタンパク質であり、CP-1はbHLHドメインのみを含んでいる。

【0091】

PASドメインはリガンド結合及びタンパク質二量体化に関係があるが(Huangら、(1993) Nature 364:259-262; Dolwickら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8566-8570; Reisz-Porszaszら、(1994) Mol. Cell. Biol. 14:6075-6086)、このドメインの分析により H I F - 1 がSIMと最もよく似ていることが明らかとなった。我々のアライメントでは、これまでに報告されたことのないモチーフで、全てのPASタンパク質のA及びBリピートに存在するモチーフであるHXXD(図12)を含むコンセンサス配列を設けた。また、我々はBacillus subtilisのKinA(PEREGOら、(1989) J. Bacteriol. 171:6187-6196)がアミノ末端にPASドメインを含みそれ故にこのタンパク質ファミリーの原核生物の最初のメンバーであることを見出したが、このことは進化における保存が非常に顕著であることを示している。KinAはPERと同様にPASを有しているがbHLHは持たないため、DNAと結合するとは考えられない。B. Subtilisは悪い環境条件に反応して芽胞形成を行い、KinAはカルボキシル末端のキナーゼドメインを経由してシグナルを伝達するセンサーとして機能する(Burbulysら、(1991) Cell 64:545-552)。

【0092】

実施例 6 R N A プロットハイブリダイゼーション

H I F - 1 D N A 結合活性のインデューサーに反応して起こる H I F - 1 R N A の発現を下記のように分析した。

【0093】

総 R N A を 2.2 M ホルムアルデヒド / 1.4 % アガロースゲル電気泳動で分画し、ニトロセルロース膜に移し、68 °C で Quik-Hyb (Staratagene) 中で ³²P 標識 H I F - 1 または ARNT c D N A とハイブリダイズした。ゲルを臭化エチジウムで染色し、等量のローディングとトランスファーが各レーンで行われたか確認するため、トランスファー前後で R N A を紫外線照射で可視化した。同一ゲル上の R N A のサイズのマーカー (BRL-GIBCO) に基づき、H I F - 1 R N A のサイズは 3.7 ± 0.1 kb と見積もられた。2 種の ARNT R N A が既報 (Hoffman ら、(1991) 同上) のとおり同定された。

【0094】

結果

Hep3B 細胞を 1% O₂ に暴露させた場合には、H I F - 1 及び H I F - 1 (ARNT) R N A レベルは 1-2 時間でピークに達し、8 時間でほぼ基底レベルまで減少し、16 時間の連続低酸素状態で二次的な増加が認められた (図 13A)。75 μM の CoCl₂ に応じて H I F - 1 R N A は 4 時間でピークに達し、8 時間で減少し、16 時間で再上昇した (図 13B)。130 μM のデスフェリオキサミンで処理した細胞では、1-2 時間で単一のピークが認められた (図 13C)。細胞を 1% O₂ で 4 時間インキュベートし、次いで 20% O₂ に戻した場合には H I F - 1 及び H I F - 1 の R N A は 5 分以内 (アッセイしうる最も早い時点) で両方とも基底レベル以下に減少した (図 13D)。これらの結果は H I F - 1 D N A 結合活性の場合 (Wang & Semenza (1993b) 同上) と同様に H I F - 1 R N A レベルは細胞への O₂ の圧によって調節されていることを示している。低酸素状態後の H I F - 1 R N A の顕著な不安定性は、8 つの AUUUA 配列 (図 13E)、その配列は半減期の短い R N A に見出され、ヘテロの R N A に導入された場合には不安定性を示す配列であるが (Shaw & Kamen (1986) Cell 46:659-667)、その配列を含む 3' - 非翻訳領域が関係している可能性がある。H I F - 1 の AUUUA 配列のうちの 7 つは、R N A 不安定性エレメント 5' - UUAUUUA (U/A) (U/A) - 3' (配列番号 26) (Lagnado ら、(1994) Mol. Cell. Biol. 14:7984-7995) のよりストリンジェントなコンセンサスと整合する。

【0095】

実施例 7 抗体産生

H I F - 1 タンパク質の発現を分析するため、H I F - 1 及びH I F - 1 に対するポリクローナル抗血清を下記のとおり作製した。

【 0 0 9 6 】

H I F - 1 の329-531、又はARNTの496-789のアミノ酸にグルタチオン-S-トランスフェラーゼを融合させた遺伝子組換えタンパク質でウサギを免疫した。H I F - 1 に対する抗体を産生させるため、hbc025からの0.6kb EcoRIフラグメントをpGEX-3X(Pharmacia)にクローンし、E.coli DH5 細胞(GIBCO-BRL)を形質転換した。細菌(OD600=0.8)を0.1mM IPTGに対して室温で1時間暴露し、50mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA、1mM EGTA、1mM フェニルメチルスルホニルフルオリド中で超音波処理し、上清を1% NP-40存在下でグルタチオンアガロース(Pharmacia)と4 で1時間インキュベートし、5mM 還元型グルタチオン、50mM Tris-HCl(pH8.0)、150mM NaClで溶出させてGST/H I F - 1 融合タンパク質を単離した。H I F - 1 に対する抗体を産生させるために、Hep3B c D N A からARNT nt 1542-2428をTaqポリメラーゼで、順行プライマーとして5'-ATAGGATCCTCAGGTCAGCTGGCACCCAG-3' (配列番号27)及び逆行プライマーとして5'-CCAAAGCTTCTATTCTGAAAAGGGGGG-3' (配列番号28)を用いてPCRで増幅した。ARNT nt 1542-2387に対応するフラグメントを得るため、PCR産物をBamHI及びEcoRIで消化し、pGEX-2T(Pharmacia)にクローン化した。融合タンパク質の単離は、その誘導を1mM IPTGで2時間誘導し、グルタチオンアガロースへの結合をNP-40ではなく1% Triton X-100で行ったこと以外は上述のとおり行った。融合タンパク質を10% SDS/ポリアクリルアミドゲルから切り取り、ニュージーランド白色種ウサギ(HRP Inc., Denver PA, USA)を試験施設で許可されたプロトコールに従って免疫した。H I F - 1 に対して作製した抗体を、CNBr活性化Sepharose 4B(Pharmacia)にカプルされたGST/H I F - 1 と結合させてアフィニティー精製した。

10

20

【 0 0 9 7 】

結果

クローン化されたH I F - 1 c D N A 及びARNTでコードされるタンパク質がH I F - 1 D N A 結合活性の構成成分であることを示すために抗血清を用いた(図14A)。低酸素状態の細胞から得た粗核抽出物をプローブD N A と両方の抗血清と共にインキュベートすると、抗血清非存在下で認められたH I F - 1 / D N A 複合体が、より遅く移動するH I F - 1 / D N A / 抗体複合体に置き換わるが、免疫前血清の添加ではH I F - 1 / D N A 複合体に影響がなかった。

30

【 0 0 9 8 】

実施例 8 イミューノプロット分析

核タンパク抽出物の15 µgを6% SDS/ポリアクリルアミドゲル上で分解し20mM Tris-HCl (pH8.0)、150mM グリシン、20% メタノール中でニトロセルロース膜に移した。その膜を5% ミルク/TBS-T[20mM Tris-HCl(pH7.6), 137mM NaCl, 0.1% Tween-20]でブロックし、アフィニティー精製H I F - 1 抗体又はH I F - 1 抗血清をそれぞれ1:400、1:5000に希釈したものとインキュベートし、洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ-抗イムノグロブリンコンジュゲート(1:5000希釈)とインキュベートし、洗浄し、ECL試薬(Amersham)で展開し、オートラジオグラフィーにかけた。上記の各インキュベーションは5%ミルク/TBS-T中で1時間行い、各洗浄は室温でTBS-t中で合計30分間行った。

40

【 0 0 9 9 】

結果

イミューノプロット分析で、低酸素状態のHep3B又はCoCl₂処理HeLa細胞からの粗核抽出物中にあり、精製H I F - 1 タンパク質標品中に存在するポリペプチドと共に移動するポリペプチドを、抗血清が検出したことが示された(図14B)。1%O₂に暴露したHep3B細胞から調製した核及び細胞質抽出物の分析により、H I F - 1 D N A 結合活性の誘導キネティックス(Wang & Semenza(1993) J.Biol.Chem.268:21513-21518)と同様に、連続低酸素状態の4-8時間目の核抽出物中にH I F - 1 及びH I F - 1 のピークレベルがあることを示した。H I F - 1 では、遅い時点で多数を占めるタンパク種がゲルでは早い時点に存在するタンパク質よりも高い位置に移動することは、翻訳後のH I F - 1 の修飾が起こってい

50

る可能性を示唆している。H I F - 1 では、94-及び93kDa種はそれら相互から由来したのではなく91kDa型から由来しており、移動時のシフトはみられなかった。H I F - 1 タンパク質の低酸素状態後の崩壊は極めて速く(図14D)、このことはR N Aの場合と同様、これらのタンパク質が低酸素状態後の細胞では不安定なことを示している。H I F - 1 及びARNTの両者において、そのアミノ酸の31%はプロリン、グルタミン酸、セリン、又はトレオニン(PEST)でありそれらのアミノ酸はタンパク質の不安定性に関連がある(Rogers ら,(1986)Science 234:364-368)。H I F - 1 では2つの20個のアミノ酸の配列(499-518 及び581-600;図10)はそれぞれ15個のPEST残基を含んでいる。H I F - 1 (ARNT)では、核コンパートメントと細胞質コンパートメント間の再分配も、核タンパク質レベルの誘導と崩壊の双方に、ある役割を担っているものと考えられる。

10

【 0 1 0 0 】

H I F - 1 に関する我々のこれまでの研究と合わせると、この結果は、H I F - 1 が、91-94kDaのH I F - 1 (ARNT)同型体と複合体を形成する120kDaのH I F - 1 サブユニットからなるヘテロ二量体bHLH-PAS転写因子であることを示している。ARNTはH I F - 1 及びジオキシンレセプターの両者に用いられている一連の共通サブユニットをコードするが、それは各種のbHLHタンパク質とE2A遺伝子産物とのヘテロ二量体化(Murreら,(1989) Cell 58:537-544)と類似している。これらの結果と、H I F - 1 及びSIMのbHLH-PASドメイン内における類似性に基づけば、ARNTもSIMとヘテロ二量体を形成している可能性がある。D rosophilaでは、数種のSIM-調節遺伝子が、1-5コピーの5'-(G/A)(T/A)ACGTG-3'配列(配列番号29)(Whartonら,(1994)Development 120:3563-3569)を含むエンハンサーエレメントによって特徴づけられている。H I F - 1、ジオキシンレセプター、及びSIM結合部位が5'-CGTG-3'配列を共有しているという観察はARNTがH I F - 1、AHR、及びSIMと組み合わせて会合するという仮説を支持している。なぜならばこの半部位は、ARNTと非常によく似たbHLHドメインを持つ転写因子類によって認識されるからである。

20

【 0 1 0 1 】

実施例 9 解糖酵素をコードする遺伝子のH I F - 1 による転写調節

低酸素状態の細胞における解糖酵素類をコードする遺伝子の転写調節へのH I F - 1 の関与を下記のように検討した。

【 0 1 0 2 】

R N A 分析

総 R N A をHep3B細胞及びHeLa細胞から単離した(Chomczynski & Sacchi(1987)Anal. Biochem 162:156-159)。R N A 濃度は260nmの吸光度で求めた。アガロースゲル電気泳動を行いその後、臭化エチジウムで染色し、UV照射下で28及び18Sr R N A を可視化し、異なる標品からの一定量が同量のインタクトな総 R N A を含んでいるか確認した。P.Maire(Institut Cochin de Genetique Moleculaire, Paris)から提供を受けたプラスミドN-KS⁺及びH-KS⁺をHindIII消化により直線化した。アンチセンス R N A を ⁻³²PIATPの存在下でT3ポリメラーゼを用いて合成した。10 µgの総細胞 R N A を、HまたはNリボプローブ(3 X 10⁵ cpm)と66 3時間ハイブリダイズし、RNase AおよびT1で消化し、防護されたフラグメントを8 M尿素、8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Semenzaら,(1990) Mol.Cell.Biol. 10:930-938)で分析した。American Type Culture Collectionから入手したプラスミドpHPGK-7e(Michelsonら,(1985)Proc. Natl. Acad. Sci.USA 82:6965-6969)から得たヒトホスホグリセリン酸キナーゼ1(PGKI) c D N A、及びT.Noguchi(Osaka University Medical School, Osaka, Japan)より提供を受けたプラスミドpM2PK33(Noguchiら,(1986) J.Biol.Chem. 261:13807-13812)から得たラットPKM c D N A を、QuikHyb(Atratagene)中で68 1時間のプロットハイブリダイゼーションのランダム標識プローブとして用い、次いで15mM塩化ナトリウム、1.5mM クエン酸ナトリウム、0.1% SDSで50 で洗浄した。オートラジオグラムのデンシトメーターによる分析はLKM Ultrosan XLレーザーデンシトメーターで、コンピューター化ピークインテグレーションを用いて行った。

30

40

【 0 1 0 3 】

電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)

50

粗核抽出物標品、プローブの調製条件、結合反応、及びゲル分析は全て上述した。二重鎖オリゴヌクレオチドは、各オリゴヌクレオチドがその5'末端に5'-GATC-3'配列、それは相補的オリゴヌクレオチドとアニーリングしたとき一重鎖の5'オーバーハングを形成するものであるが、その配列を各オリゴヌクレオチドが含んでいること以外は表2に示す配列に従って合成した。W18及びM18オリゴヌクレオチドのセンス鎖配列は上述した。H I F - 1は50LのCoCl₂処理HeLa細胞から、粗核抽出物標品、DEAE-Separoseクロマトグラフィー、MonoQ 迅速タンパク質液体クロマトグラフィー、及びD N Aアフィニティークロマトグラフィーによって部分精製した。粗核抽出物及び部分精製H I F - 1のインキュベーションはそれぞれ100及び1ngの変性仔牛胸腺D N Aを共存させて行った。競合実験は5ngの非標識W18又はM18オリゴヌクレオチドを用いて行った。

10

【0104】

組織培養

Hep3B細胞及びHeLa細胞は培養液中で維持し、1%O₂、CoCl₂、DFX、及びシクロヘキシミド(CHX)で、上述のとおり処理した。

【0105】

一過性発現アッセイ(Transient Expression Assay)

psvcatレポータープラスミド(pCAT プロモーター, Promega)は、SV40早期領域プロモーター、バクテリアのクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)をコードする配列、SV40スプライス、及びポリアデニル化シグナルを含んでいる。オリゴヌクレオチドは5'及び3'にそれぞれ位置しているBglII及びBamHI部位に、転写ユニットに向かってクローン化した。pNMHcat及びpHcatプラスミド(Concordetら,(1991) Nucleic Acid res. 19:4173-4180)は、CATをコードする配列と直接融合したヒトアルドラーゼA遺伝子配列を含んでおり、P.Maireから供給を受けた。pSV gal(Promega)はSV40早期領域プロモーター及びエンハンサーによってドライブされる、バクテリアのlacZをコードする配列を含んでいる。プラスミドはアルカリ融解と2回の塩化セシウム密度グラデーション遠心処理によって精製した。Hep3B細胞はGene Pulser(Bio-Rad)で260V, 960 µFで電気穿孔法によってトランスフェクトした。電気穿孔法を2回行い、それをプールし、8mlの培地を容れた10cmの組織培養皿(Corning) 2皿に分けた。細胞は24時間、5%CO₂、95%空気インキュベーターで37 °Cで回収し、培地を交換し、デュプリケートのプレートのうちの1セットを取り除いてモジュラーインキュベーターチャンバー(1%O₂, 5%CO₂, 残りはN₂の組成の気体を流している)に移し、封をし、37 °Cに置いた。細胞をトランスフェクションの72時間後に集め、CAT及びガラクトシダーゼ活性のための抽出物を調製した。

20

30

【0106】

結果

ヒトアルドラーゼA遺伝子(hALDA)は4個のコードしないエクソン、N1、N2、M、及びHを含んでいる(Maireら,(1987) J.Mol.Biol. 197:425-438)。筋肉以外の多くの組織では転写はN1及びHエクソンから開始される。20%又は1%O₂に16時間暴露されたR N Aのリボヌクレアーゼ防護アッセイでは、1%O₂に暴露されたHep3B細胞及びHeLa細胞でエクソンHから開始されたALDA R N Aは3.0倍及び2.9倍高いレベルを示したが、低酸素状態のHep3B細胞及びHeLa細胞でエクソンN1から開始されたR N Aの増加はそれぞれ1.7倍及び1.1倍にすぎず、このことは低酸素状態に対するプロモーター特異的な反応性を示唆している。

40

【0107】

次いで我々は1%O₂に1-16時間暴露させたHep3B細胞におけるALDAとホスホグリセリン酸キナーゼ1(PGK1)の発現を比較した。ALDAおよびPGK1 R N Aの双方ともそれらの誘導が最大となるキネティクスは遅延を示し、これは誘導の際にタンパク質合成が必要であることを示唆しており、このことはHep3B細胞を100 µMのCHXで処理すると低酸素状態の細胞におけるALDA及びPGK1 R N Aの誘導が6.1倍及び8.2倍から1.6倍及び1.4倍へとそれぞれ減少することによって確認された。

【0108】

Hep3B細胞を16時間75 µM CoCl₂又は130 µM DFXで処理すると、ALDAの転写がエクソンH

50

から優先的に開始されてALDA及びPGK1 R N Aが誘導された。同じR N AサンプルをPKM用のプローブを用いて分析したところ、PKM R N Aも1%O₂、CoCl₂、又はDFXにHep3B細胞を暴露させることによって誘導されることが明らかとなった。ALDA、PGK1、及びPKMのR N AもHeLa細胞を1%O₂、CoCl₂、又はDFXで処理することによって誘導された。PFKL R N AはHep3B細胞又はHeLa細胞では検出可能なレベルでは発現されていなかった。これらのR N A分析は、既にEPO R N A及びH I F - 1活性の誘導で示したように(Semenza & Wang(1992) Mol.Cell.Biol.12:5447-5454)、EPO-産生Hep3B細胞及び非産生HeLa細胞においてEPO R N A及びH I F - 1活性を誘導する物質は、ALDK、PGK1、及びPKMのR N Aをも、デノボ(de novo)のタンパク質合成を必要とはするが、誘導することを示している。

【0109】

10

GenBankに存在する解糖酵素をコードする遺伝子のヌクレオチド配列で、H I F - 1結合部位の可能性のあるものを、検索にかけられる配列として5'-ACGTGC-3'を用いて検索した。そのヌクレオチド配列は、D N Aの主グループ内にあるH I F - 1と接触する4個のグアニン残基を有する(Wang & Semenza(1993b)同上)。二重鎖オリゴヌクレオチドは、ヒトPGK1(hPGK1)、ヒトエノラーゼ1(hENO1)、及びマウスLDHA(mLDHA)の5'-フランキング配列(5'-FS)、hPGK1の5'-非翻訳配列(5'-UT)、及びhALDA及びmPFKL遺伝子の介在配列(IVS)に対応して合成した。これらのオリゴヌクレオチドはH I F - 1部位の可能性のあるものとして、5'-TACGTGCT-3'(配列番号30)、5'-GACGTGCG-4'(配列番号31)(これはhEPO 5'-FSにも見出される)、及び5'-CACGTGCG-3'(配列番号32)を含んでいる。最初の配列は既に同定したEPOエンハンサーのH I F - 1結合部位の配列と同一のものであるが(Semenza & Wang (1992)同上)、後の2種の配列は最初と最後のヌクレオチドが異なっている。これらのオリゴヌクレオチドのH I F - 1結合能はEMSAで調べた。

20

【0110】

1%O₂に4時間暴露されたHep3B細胞から調製した核抽出物とインキュベートした時、各プローブは、hEPO 3'-FSのヌクレオチド1-18に対応するプローブW18を用いて作られたH I F - 1複合体と類似の移動度と強度を有するD N Aタンパク質複合体を生成した。これに対して、EMSAパターンは低酸素状態の細胞から得た核抽出物で得られたパターンと類似してはいたが、これらのプローブはどれも、20%O₂で維持された細胞から得た核抽出物中のH I F - 1複合体を検出しなかった。低酸素状態の核抽出物をアッセイした場合(非低酸素のものとの比較で)には、H I F - 1複合体の下に移動するD N Aタンパク質複合体の強度はより低いものであった。我々は以前にこの複合体がH I F - 1と同じD N A配列を認識する構成性に発現する因子であることを示している(Wang & Semenza(1993b)同上)。構成性の因子の結合の減少は低酸素性抽出物中のH I F - 1との結合での競合の結果として起こるものである。

30

【0111】

CoCl₂処理HeLa細胞から、DEAE-セルロース、MonoQ、及びD N Aアフィニティークロマトグラフィーで約600倍に精製されたH I F - 1標品についてもEMSAを行った。各プローブは、W18を用いて形成した複合体と定性的及び定量的に類似したやり方でH I F - 1と結合した。H I F - 1のこれらのプローブとの結合は、非標識W18の過剰によって競合しえたが、変異体オリゴヌクレオチドであるM18、それは3カ所のヌクレオチド置換(H I F - 1との結合及び低酸素状態を誘導しうるエンハンサー機能を排除することが以前に示されている)を含んでいるが、そのヌクレオチドでは競合し得ないので、配列特異的であった。W18及びM18の競合実験を低酸素状態のHep3B細胞から得た粗核抽出物で行ったところ、同様な結果が得られた。これらの結果から、ALDA、ENO1、PFKL、及びPGK1をコードする遺伝子中、及びhEPO 5'-FS中の新規のH I F - 1結合部位が同定された。H I F - 1と特異的に結合することが示された8種のオリゴヌクレオチド(表8)は、コンセンサス5'-(C/G/T)ACGTGC(G/T)-3'(配列番号33)で表される3つの異なる結合部位配列を有している。確認のためのバイアスされた方法では、H I F - 1がこのコンセンサスで表していない他の配列を認識することはありうる。解糖関連遺伝子からの6個のH I F - 1部位に加えて、5'-CACGTGCT-3'配列(配列番号34)もhENO1 5'-FSの786から793に存在するが(Gialongoら,(1990) Eur.J.Bioc

40

50

hem.190:567-573)、それについてはH I F - 1 結合性は調べられていない。総計7箇所のH I F - 1 部位と考えられる部位が、これら5種の解糖関連遺伝子の故にGenBankに報告された20.7kbのヌクレオチドの配列中に同定された。これに対して5種のランダムに選んだ遺伝子、AFP、BUP4、CREB、DHFR、及びEPOR(Gibbsら,(1987)Biochemistry 26:1332-1343; Kuriharaら,(1993)Biochem.Biophys.Res.Commun.192:1049-1056; Meyerら,(1993)Endocrinology 132:770-780; Mitchellら,(1986)Mol.Cell.Biol.6:425-440; Noguchiら,(1991)Blood 78:2548-2556)のヌクレオチド配列からなる総計43.5kb中のどちらのD N A 鎖にもコンセンサスH I F - 1 部位と適合する配列は認められなかった。

【 0 1 1 2 】

これらのH I F - 1 結合部位が機能的な重要性を有するか調べるため、上述のレポーター遺伝子を用いて一過性発現アッセイを行った。レポータープラスミドはHep3B細胞にpSVgalとコトランスフェクトさせた。pSVgalはトランスフェクション効率の変動を調べるための対照としてここに含めた。トランスフェクトした細胞をデュプリケート測定プレートに分け、1%又は20%O₂中で48時間培養し、レポータープラスミド及び対照プラスミドの転写後に合成されたCAT及び ガラクトシダーゼタンパク質を細胞抽出物から定量した。ベーサルレポーターpsvcat中ではCATをコードする配列はSV40早期領域プロモーターでドライブされているが、psvcatは1%O₂及び20%O₂で培養された細胞中で同程度のCAT/ - ガラクトシダーゼ値を示した。33塩基対のhEP0 3'-FSエンハンサーの1個(psvcatEP01)又は2個(psvcatEP02)のコピーを3'から転写ユニットに向かってクローン化した場合には、1%O₂で培養した細胞中のCAT/ - ガラクトシダーゼの発現はそれぞれ4.9倍及び17倍となり、これは以前に報告した結果(Semenza & Wang(1992)同上)と整合するものであった。

【 0 1 1 3 】

解糖関連遺伝子から得たH I F - 1 結合部位配列を同じアッセイで分析した。mPFLK IVS-1 及び hPFLK1 5'-FSオリゴヌクレオチドが、hEP0 3'-FS中のH I F - 1 部位と同一又はそれから分岐した配列を持ち、かつそれぞれ3'又は5'に位置し転写開始部位に向かうため、それらを選択した。24塩基対のhPGK1 5'-FSオリゴヌクレオチドの2つのコピーを、hPGK1中の位置と同様に、5'にpsvcat転写ユニットに向けてクローン化した(図15A)。低酸素性細胞ではpPGK2svcatの発現は5.6倍誘導された(図15B)。26塩基対のmPFLK1 IVS-1オリゴヌクレオチドの3つのコピーを5'にpsvcat転写ユニットに向けてクローン化した。低酸素性細胞ではpPFLK3svcatは47倍の誘導をもたらしした(図15B)。

【 0 1 1 4 】

また、我々は天然のプロモーター機能を分析し、内因性R N A 発現データとトランスフェクションアッセイにおける誘導に必要な配列との相関を調べるため、hALDA遺伝子配列での実験も行った。プラスミドpNMHcat(Concordetら,(1991)同上)、このプラスミドではhALDAの5'末端から3.5kbがCATをコードする配列と融合されているが(図15A)、このプラスミドは低酸素性細胞で5.5倍の誘導をもたらしした(図15B)。プラスミドpHcatは、pNMHcatの3'末端と共直鎖をなし、IVS-4の中から開始し、5'からエクソンHへと伸びている0.76kbのhALDA配列を含んでいる(図15A)。エクソンN1、N2、及びMと、それらのフランキング配列を除去するとCAT発現レベルが20倍増加するが、1%O₂における相対的な発現には、pHcatが低酸素性Hep3B細胞で5.4倍誘導されたような顕著な影響は与えなかった(図15B)。これらの結果は次の観察結果、すなわち(i)hALDA転写の特異的誘導はエクソンHから開始されたこと、及び(ii)IVS4の5'末端のH I F - 1 結合部位の存在はpNMHcat及びpHcatの内部であったこと、と整合するものである。mPFLK、hPGK1、及びhALDA遺伝子から得たH I F - 1 部位を含む配列は、天然型又は異種プロモーターと併用して、低酸素状態で誘導されうる転写をもたらす。

【 0 1 1 5 】

実施例 1 0 優性形質を持たないH I F - 1 変異体の構築

H I F - 1 の機能不活化を調べるためにH I F - 1 の変異体を構築した。

【 0 1 1 6 】

原構築物はH I F - 1 c D N A 3.2-3をプラスミドpBluescript SKにクローン化したも

のである。このプラスミドを制限エンドヌクレアーゼNcoI及びBglIIで、アミノ酸2-28をコードする配列を削除するために消化した。NcoI及びBglII末端を持つ二重鎖オリゴヌクレオチドを挿入し、T4DNAリガーゼの存在下で、プラスミドを再環化させた。この結果得られた構築物はアミノ酸1-3をコードし、その後には野生型HIF-1の対応する位置には存在しない3つのアミノ酸(イソロイシン、アラニン、及びグリシン)があり、その後ろにはHIF-1の28-826アミノ酸が続いている。この構築物(pBluescript/HIF-1 3.2T7 NB)はin vitroでの転写(T7 RNAポリメラーゼを用いて)及びHIF-1変異体(HIF-1 NB)(配列番号35)の翻訳が可能である。

【0117】

哺乳類組織培養細胞で、優性形質を持たないHIF-1を作り出すために、変異体cDNAをコードするKpnI-NotIフラグメントをpBluescriptベクターから切り取り、哺乳類の発現ベクターpCEP4にクローン化した。そのプラスミドをAflIII及びBamHIで消化し、Klenow型のDNAポリメラーゼで処理して平滑端を作り、T4DNAリガーゼで再環化した。この結果としてできたプラスミド(pCEP4/HIF-1 NB AB)(配列番号3)はアミノ酸1-3をコードし、その後には野生型HIF-1の対応する位置には存在しない3つのアミノ酸(イソロイシン、アラニン、及びグリシン)があり、その後ろにはHIF-1の28-391アミノ酸が続き、その後ろに野生型HIF-1の対応する位置には存在しない3つのアミノ酸(イソロイシン、グルタミン、及びトレオニン)が続く。アミノ酸392-826は変異体タンパク質(HIF-1 NB AB)の細胞内での安定性を向上させるために除去した(図16)。

【0118】

結果

25 µgのレポーター遺伝子psvcatEP02、これは上述のとおりヒトエリスロポエチン遺伝子から得た33-bpのエンハンサー配列のコピーを2つ含んでいるが、この遺伝子で、Hep3B細胞を一過性にトランスフェクトした。このプラスミドは、細胞を1%O₂で培養した場合には20%O₂の場合に比べ9倍高いレベルのCATタンパク質を発現した。細胞をpsvcatEP02及びpCEP4/HIF-1 NB ABでトランスフェクトした場合には1%O₂でCAT発現の用量依存性の阻害が認められた。表3は細胞中にトランスフェクトされたpCEP4/HIF-1 NB ABの量(µg)を関数とした相対誘導量(1%O₂における発現を20%O₂における発現で割ったもの)を示している。結果は3回の実験の平均値で示している。

【0119】

変異体HIF-1の発現は、低酸素性細胞で産生される内因性HIF-1によるレポーター遺伝子の発現の活性化を妨害した。40 µgの変異体のトランスフェクションで見られる残存している活性化は、psvcatEP02を取り上げ、pCEP4/HIF-1 NB ABを取り上げなかった細胞を表しているのかもしれない。これらの結果は優性形質を持たない変異体はin vivoでのHIF-1機能を妨害することを示している。

【0120】

この変異体タンパク質は、EP0エンハンサーから得たHIF-1結合部位を含む二重鎖オリゴヌクレオチドプローブへの結合の電気泳動移動度シフトアッセイで用いられた。pBluescript/HIF-1 3.2T7 NBはin vitroでの転写及び翻訳の鋳型として用いられた。野生型HIF-1及びHIF-1の一定量の鋳型を含む反応液にpBluescript/HIF-1 3.2T7 NBを増量しつつ添加するにつれて、DNA結合性の用量依存性阻害が認められたが、これはpBluescript/HIF-1 3.2T7 NBが野生型の鋳型pBluescript/HIF-1 3.2T7より16倍過剰に存在した場合にはHIF-1のDNA結合性が排除されることとなるように阻害するものであった。

【0121】

これらのin vitro及びin vivo実験は、HIF-1の基本ドメインの削除は、DNA結合を阻害することによりHIF-1活性をブロックするタンパク質の産生を招くことを示している。

10

20

30

40

表 1 HIF-1 の生化学的精製

精製過程	液量 (ml)	タンパク質 (mg)	HIF-1活性	比活性	収率 (%)	精製度
HeLa 細胞核抽出物	435	3,040	608,000	0.2 U/ μ g	100	1
DEAE-Sephrose	240	550	440,000	0.8 U/mg	72	4
W18 DNA T74ニテ1-(1回目)	25	2.5	400,000	160	66	800
M18 DNAカラム	40	1.4	226,000	190	44	950
W18 DNA T74ニテ1-(2回目)	9	0.06	135,000	2,250	22	11,250

【表 1】

【表 2】

表 2 EPO及び解糖酵素遺伝子から得たオリゴヌクレオチド配列

配列	位置	座標
gccc TACGTGCT gtctcacacagcctgctga	hEPO 3'-FS	+3065/+3097
ccgggcagctggcg TACGTGCT gcag	mPFKL IVS-1	+336/+361
ggggctgctgca GACGTGCG ctg	hEPO 5'-FS	-155/-178
gtga GACGTGCG gcttccgctctg	hPGK1 5'-FS	-172/-194
ctgcc GACGTGCG ccccgag	hPGK1 5'-UT	+31/+11
gtgggagccacagcg GACGTGCG ggaa	mLDHA 5'-FS	-75/-50
ggc CACGTGCG ccgctgagcctg	hENO1 5'-FS	-585/-610
ctt CACGTGCG gggaccagggacgc	hALDA IVS-4	+125/+150

10

【表 3】

表 3 HIF-1 α 変異体の存在下でのレポーター遺伝子の相対的誘導

変異体 (μ g)	低酵素状態での相対的誘導
0	9.09
5	6.06
10	4.10
20	2.81
40	2.31

20

【図面の簡単な説明】

【0122】

【図 1】図1は、 CoCl_2 によるHIF-1のDNA結合活性の用量依存的誘発を示すオートラジオグラフである。37℃において0、5、10、25、50、75、100、250、500、および1000 μM の CoCl_2 の存在下で4時間培養されたHeLa細胞から調製された核抽出物を、W18プローブを用いてインキュベートし、ゲルシフトアッセイにより分析した。レーン1~8および9~12は、2つの別々の実験から調製された抽出物を表す。矢印は、HIF-1、構成DNA結合活性(C)、非特異的活性(NS)、および遊離プローブ(F)を指している。

30

【図 2】図2は、 CoCl_2 処理HeLa細胞から得られた核抽出物を用いたメチル化干渉分析の結果を表すオートラジオグラフである。W18を、コード鎖または非コード鎖上の5'末端で標識化し、部分的にメチル化し、各抽出物と共にインキュベートした。HIF-1、構成DNA結合活性(C1およびC2)、および非特異的活性(NS)に対応するDNAタンパク質複合体(下図)を、遊離プローブ(F)(図示せず)と共に、分離ゲルシフトアッセイにより単離した。DNAを精製し、ピペリジンで切断し、15%変性ポリアクリルアミドゲルを用いて解析した(上図)。その結果は、コード鎖については左側に、また非コード鎖については右側にまとめられている。W18プローブ上の位置に従ってグアニン残基が番号付けされている。HIF-1結合部位は矩形で囲んだ。HIF-1結合を有する完全メチル化干渉体は白丸で示され；構成DNA結合活性を有する部分的および完全メチル化干渉体はそれぞれ黒の四角形および白の四角形で示されている。

40

【図 3 A】図3Aは、HIF-1のDNA結合活性に対するカラム画分のゲルシフトアッセイ分析を表すオートラジオグラフである。核抽出物をDEAE-セファロースクロマトグラフィーにより分画し、HIF-1活性を有する画分をW18 DNAアフィニティーカラムにかけた。5 μg のタンパク質を0.1 μg の子ウシ胸腺DNAと共にインキュベートし、粗製の核抽出物(粗製NE；レーン1)およびDEAE-セファロースカラムから得られたHIF-1活性画分(DEAE；レーン2)のゲルシフト分析を行った。W18カラムから得られた画分(レーン3~13)に対しては、1 μl のアリコートに5ngの子ウシ胸腺DNAと共にインキュベートした。2つのHIF-1パン

50

ド、構成活性(C)、非特異的活性(NS)、および遊離プローブ(F)の位置が示されている。FT(流出)、0.25M、0.5M、1M、および2Mは、緩衝剤Z中に指定の濃度のKClを含有させたときに溶離された画分である。

【図3B】図3Bは、図3Aについての説明文中に記載した部分的に精製された画分の配列特異的DNA結合を示すオートラジオグラフである。DEAE-セファロースカラムから得られた画分の5 μ gアリコート、競合体なし、10倍モル過剰(レーン2および5)、50倍モル過剰(レーン3および6)、または250倍モル過剰(レーン4および7)の非標識化W18(W、レーン2~4)またはM18(M、レーン5~7)オリゴヌクレオチドの存在下で、W18プローブと共にインキュベートした。

【図4A】図4Aは、CoCl₂処理HeLa S3細胞から得られたHIF-1の精製を示すオートラジオグラフである。M18 DNAカラムから得られた流出画分(充填物、レーン1)、ならびに第2のW18 DNAアフィニティークラムから得られた0.25M KCl画分および0.5M KCl画分(レーン2および3)を分析した。各画分のアリコート(5 μ gの充填物画分または1 μ gのアフィニティークラム画分)を6%SDS-PAGEにより分離させ、銀染色した。レーン2および3のHIF-1ポリペプチドは、図の右側の矢印で示されている。

【図4B】図4Bは、低酸素Hep3B細胞から得られたHIF-1の精製を示すオートラジオグラフである。第1のW18カラムから得られたHIF-1画分(充填物、レーン1)、ならびに第2のW18カラムから得られた0.25M KCl画分および0.5M KCl画分(レーン2および3)を分析した。各画分のアリコート(50 μ l)を7%SDS-PAGEにより分離させ、銀染色した。分子質量マーカーは、ミオシン(200kDa)、 α -ガラクトシダーゼ(116kDa)、ホスホリラーゼ(97kDa)、DSA(66kDa)、およびオボアルブミン(45kDa)である。レーン2および3のHIF-1ポリペプチドは、図の右側の矢印で示されている。

【図5A】図5Aは、HIF-1ポリペプチドを同定するオートラジオグラフである。アフィニティー精製されたHIF-1のアリコートを、6%SDS-ポリアクリルアミドゲル(架橋度3.2%)上で、分離未変性ゲルシフトアッセイにより単離されたHIF-1タンパク質複合体(HIF-1)と共に分離させた。MWは図の左側に示されているサイズ(kDa)をもつ分子質量マーカーの分子量であり、図の右側の数値は、HIF-1ポリペプチドの見掛けの分子量を表している。

【図5B】図5Bは、6%SDS-ポリアクリルアミドゲル(架橋度5%)上のHIF-1成分を示すオートラジオグラフである。アフィニティー精製されたHIF-1のアリコートを、6%SDS-ポリアクリルアミドゲル上で、分離未変性ゲルシフトアッセイにより単離されたHIF-1タンパク質複合体(HIF-1)と共に分離させた。120kDaポリペプチド、94/93/91kDaポリペプチド、および2つの不純物タンパク質(*1および*2)が示されている。

【図5C】図5Cは、異なる架橋度を有する2つのゲル系上で同定されたHIF-1成分の並びを示すオートラジオグラフである。6%SDS-ポリアクリルアミドゲル(架橋度5%)から切り出された、120kDaポリペプチド、94/93/91kDaポリペプチド、および2つの不純物タンパク質(*1および*2)に対応する切片を、アフィニティー精製されたHIF-1(図5A)のアリコート(30 μ l)と一緒に、6%SDS-ポリアクリルアミドゲル(架橋度3.2%)上で分離させた。

【図6】図6は、91kDa HIF-1ポリペプチド(上)、93/94kDaポリペプチド(中)、およびトリプシン(下)から誘導されたトリプシンペプチドの215nmにおける吸収プロファイルである。

【図7】図7は、250倍モル過剰の非標識化W18(レーン2)またはM18(レーン3)オリゴヌクレオチドの不存在下または存在下におけるアフィニティー精製されたHIF-1およびプローブW18を用いたUV架橋分析を示すオートラジオグラフである。結合反応混合物にUV照射し、6%SDS-ポリアクリルアミドゲル上で分析した。分子質量標準は左側に示されている。

【図8】図8は、グリセロール濃度勾配沈降分析の結果を示すオートラジオグラフである。1%O₂に4時間曝露したHep3B細胞から調製された核抽出物(充填物)を、10%~30%の直線的グリセロール濃度勾配にかけて沈降させた。各画分からのアリコート(10 μ l)をゲルシフトアッセイにより分析した。上側の矢印は、フェリチン(440kDa)、カタラーゼ(232kDa)、アルドラーゼ(158kDa)、およびBSA(67kDa)に対するピーク泳動を示している。

【図9】図9は、HIF-1 をコードするcDNA配列の線図である。太線は、下に示されている全長RNAコード配列に対するクローンhbc120、hbc025、および3.2-3の範囲を示し

10

20

30

40

50

ている。矩形領域はアミノ酸コード配列を示し、細線は非翻訳配列を示し、bHLHは基本的ヘリックス ループ ヘリックスドメインを示し、AおよびBはPASドメイン内の内部相同ユニットを示している。

【図10】図10は、HIF-1 のヌクレオチド配列および誘導アミノ酸配列である。クローン3.2-3(nt 1-3389)、hbc025(nt 135-3691)、およびhbc120(nt 1739-3720)に対して測定された完全ヌクレオチド配列から複合配列が誘導された。精製されたHIF-1 120kDaポリペプチドから得られた4つのトリプシンペプチドの配列には下線が引かれている(2つのペプチドは連続している)。

【図10-1】図10-1は、HIF-1 のヌクレオチド配列および誘導アミノ酸配列である。クローン3.2-3(nt 1-3389)、hbc025(nt 135-3691)、およびhbc120(nt 1739-3720)に対して測定された完全ヌクレオチド配列から複合配列が誘導された。精製されたHIF-1 120kDaポリペプチドから得られた4つのトリプシンペプチドの配列には下線が引かれている(2つのペプチドは連続している)。

【図10-2】図10-2は、HIF-1 のヌクレオチド配列および誘導アミノ酸配列である。クローン3.2-3(nt 1-3389)、hbc025(nt 135-3691)、およびhbc120(nt 1739-3720)に対して測定された完全ヌクレオチド配列から複合配列が誘導された。精製されたHIF-1 120kDaポリペプチドから得られた4つのトリプシンペプチドの配列には下線が引かれている(2つのペプチドは連続している)。

【図10-3】図10-3は、HIF-1 のヌクレオチド配列および誘導アミノ酸配列である。クローン3.2-3(nt 1-3389)、hbc025(nt 135-3691)、およびhbc120(nt 1739-3720)に対して測定された完全ヌクレオチド配列から複合配列が誘導された。精製されたHIF-1 120kDaポリペプチドから得られた4つのトリプシンペプチドの配列には下線が引かれている(2つのペプチドは連続している)。

【図10-4】図10-4は、HIF-1 のヌクレオチド配列および誘導アミノ酸配列である。クローン3.2-3(nt 1-3389)、hbc025(nt 135-3691)、およびhbc120(nt 1739-3720)に対して測定された完全ヌクレオチド配列から複合配列が誘導された。精製されたHIF-1 120kDaポリペプチドから得られた4つのトリプシンペプチドの配列には下線が引かれている(2つのペプチドは連続している)。

【図10-5】図10-5は、HIF-1 のヌクレオチド配列および誘導アミノ酸配列である。クローン3.2-3(nt 1-3389)、hbc025(nt 135-3691)、およびhbc120(nt 1739-3720)に対して測定された完全ヌクレオチド配列から複合配列が誘導された。精製されたHIF-1 120kDaポリペプチドから得られた4つのトリプシンペプチドの配列には下線が引かれている(2つのペプチドは連続している)。

【図10-6】図10-6は、HIF-1 のヌクレオチド配列および誘導アミノ酸配列である。クローン3.2-3(nt 1-3389)、hbc025(nt 135-3691)、およびhbc120(nt 1739-3720)に対して測定された完全ヌクレオチド配列から複合配列が誘導された。精製されたHIF-1 120kDaポリペプチドから得られた4つのトリプシンペプチドの配列には下線が引かれている(2つのペプチドは連続している)。

【図10-7】図10-7は、HIF-1 のヌクレオチド配列および誘導アミノ酸配列である。クローン3.2-3(nt 1-3389)、hbc025(nt 135-3691)、およびhbc120(nt 1739-3720)に対して測定された完全ヌクレオチド配列から複合配列が誘導された。精製されたHIF-1 120kDaポリペプチドから得られた4つのトリプシンペプチドの配列には下線が引かれている(2つのペプチドは連続している)。

【図10-8】図10-8は、HIF-1 のヌクレオチド配列および誘導アミノ酸配列である。クローン3.2-3(nt 1-3389)、hbc025(nt 135-3691)、およびhbc120(nt 1739-3720)に対して測定された完全ヌクレオチド配列から複合配列が誘導された。精製されたHIF-1 120kDaポリペプチドから得られた4つのトリプシンペプチドの配列には下線が引かれている(2つのペプチドは連続している)。

【図11】図11は、bHLHドメインの分析である。各配列の最初の残基の位置およびHIF-1またはHIF-1 (ARNT)とのアミノ酸の一致度が、それぞれ左右の余白のカッコ内に示さ

10

20

30

40

50

れている。ハイフンは最大の並びに合わせるために配列中に導入されたギャップである。ただし、コンセンサスのところに示されたハイフンは不一致を意味する。コンセンサスとは、所定の位置で同等または類似の残基を有するタンパク質が少なくとも3つあることを意味する。1: F、I、L、M、またはV; 2: SまたはT; 3: DまたはE; 4: KまたはR。不変残基は太字で示されている。

【図12】図12は、PASドメインの分析である。PASのA(上)サブドメインおよびB(下)サブドメインの並びが示されている。コンセンサスとは、所定の位置で同等または類似の残基を有するタンパク質が少なくとも4つあることを意味する。GenBankアクセス番号: ARNT, M69238; AHR, L19872; SIM, M19020; MI, Z23066; USF, X55666; L-MYC, X13945; CP-1, M34070; PER, M30114; KinA, M31067。

10

【図13A】図13Aは、Hep3B細胞を1%O₂に0時間、1時間、2時間、4時間、8時間、および16時間曝露した後のHIF-1 およびHIF-1 R N A 発現を示すオートラジオグラフである。

【図13B】図13Bは、Hep3B細胞を75 μM CoCl₂に0時間、1時間、2時間、4時間、8時間、および16時間曝露した後のHIF-1 およびHIF-1 R N A 発現を示すオートラジオグラフである。

【図13C】図13Cは、Hep3B細胞を130 μM デスフェリオキサミン (DFX) に0時間、1時間、2時間、4時間、8時間、および16時間曝露した後のHIF-1 およびHIF-1 R N A 発現を示すオートラジオグラフである。

【図13D】図13Dは、Hep3B細胞を1%O₂に4時間曝露し、更に、この細胞をR N A 単離前に20%O₂に0分間、5分間、15分間、30分間、および60分間曝露した後のHIF-1 およびHIF-1 R N A 発現を示すオートラジオグラフである。

20

【図13E】図13Eは、HIF-1 3'-UTRから得られたAUUUA含有要素の表である。第1のヌクレオチドは、複合c D N A 配列に従って番号付けされている。

【図14A】図14Aは、低酸素Hep3B細胞から得られた核抽出物のオートラジオグラフである。ただし、該細胞をオリゴヌクレオチドプローブW18と共に10分間インキュベートし、免疫血清を添加し(レーン2および5)、氷上で20分間インキュベートし、更にポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。免疫前血清(レーン3および5)および抗血清(レーン2および4)はそれぞれ、GST/HIF-1 (レーン2および3)またはGST/HIF-1 (レーン4および5)を用いた免疫処理の前と後のウサギから採取したものである。HIF-1、構成(C) D N A 結合活性、非特異的(NS) D N A 結合活性、遊離プローブ(F)、およびスーパーシフトHIF-1/D N A /抗体複合体(S)が示されている。

30

【図14B】図14Bは、精製されたタンパク質調製物および粗製タンパク質抽出物中に存在するHIF-1サブユニット抗血清認識を示す免疫プロットである。未処理(レーン1)または1%O₂に4時間曝露処理(レーン2)したHep3B細胞ならびに未処理(レーン6)または75 μM CoCl₂に4時間曝露処理(レーン7)したHeLa細胞から得られた核抽出物を、CoCl₂処理HeLa細胞から得られたアフィニティー精製HIF-1(1 μl、2 μl、および5 μl)(レーン3~5)と一緒に、6% SDS/ポリアクリルアミドゲル上で分別した。タンパク質をニトロセルロース膜に移し、HIF-1 (上)またはHIF-1 (下)に対する抗血清と共にインキュベートした。

【図14C】図14Cは、低酸素細胞中におけるHIF-1 タンパク質およびHIF-1 タンパク質の誘導速度論を示す免疫プロットである。Hep3B細胞を1%O₂に0時間~16時間曝露した後、核(N.E.)抽出物および細胞質(C.E.)抽出物を調製し、HIF-1 (上)またはHIF-1 (下)に対する抗血清と共に免疫プロット分析を行った。

40

【図14D】図14Dは、低酸素状態後の細胞中のHIF-1 ポリペプチドおよびHIF-1 ポリペプチドの減少速度論を示す免疫プロットである。Hep3B細胞を1%O₂に4時間曝露し、更に20%O₂に戻して0分間~60分間経過させた後、抽出物を調製し、免疫プロット分析を行った。矢印の先端により、HIF-1サブユニットと正体不明の交差反応タンパク質とを区別している。

【図15A】図15Aは、ヒトアルドラーゼ(hALDA)遺伝子、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ1(hPGK1)遺伝子、およびマウスホスホフルクトキナーゼL(mPFKL)遺伝子中のHIF-1結合部位の機能分析に使用したリポーター遺伝子構成体の構造の線図である。矢印は転写開始

50

部位を表し；矩形は、EPO 3'-FS(斜線部分)、hPGK1 5'-FS(斑点部分)、またはmPFLK IVS-1(縞部分)のオリゴヌクレオチドを表している(配列は表3に示した通りである)。pNMHcatおよびpHcat中のhALDA遺伝子の5'末端から得られたDNA断片は、それぞれ3.5kbおよび0.76kbであり、CATコード領域と直接的に融合されている3'末端において共直線性が存在する。

【図15B】図15Bは、20%O₂(白地の棒)または1%O₂(黒地の棒)に曝露された形質転換細胞におけるCAT/-ガラクトシダーゼ発現(相対的CAT活性)を表す棒グラフである。いずれの結果に対しても、上側の目盛を使用してプロットされているが、pHcatのデータだけは下側の目盛を用いてプロットされている。1%O₂/20%O₂についての相対的CAT活性を表す誘導は、各実験ごとに計算し、平均および平均の標準誤差(SEM)は、n回の独立した実験から得られた結果を用いて決定した。

【図16】図16は、HIF-1の野生型およびドミナントネガティブ変種のアミノ末端(上)およびカルボキシ末端(下)のアミノ酸配列である。

【図1】

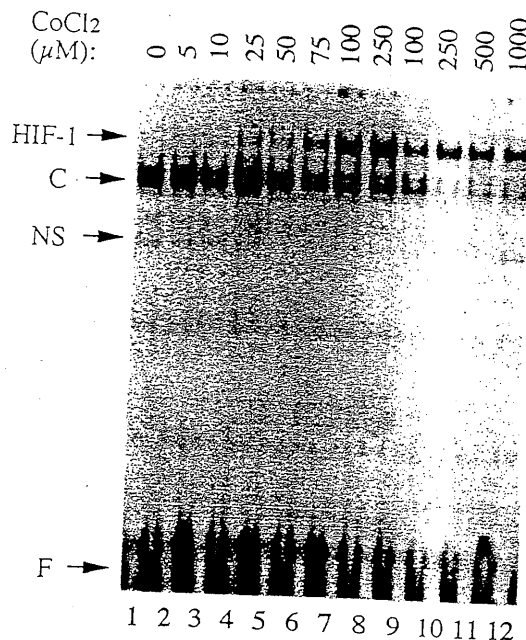


FIG. 1

【図2】

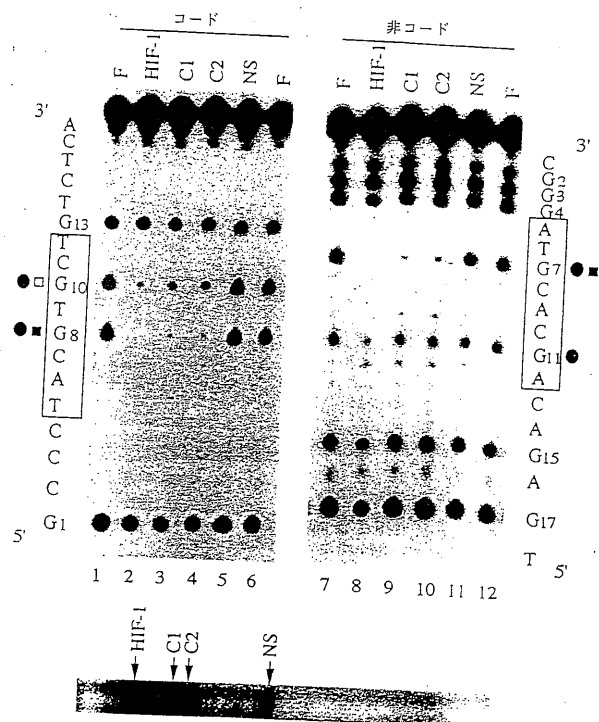


FIG. 2

【図 3 A】

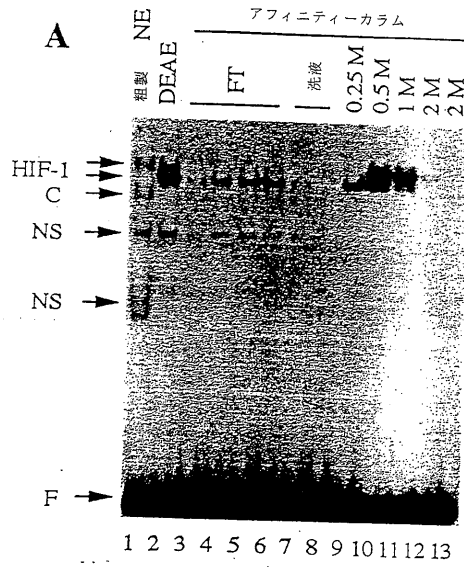


FIG. 3A

【図 3 B】

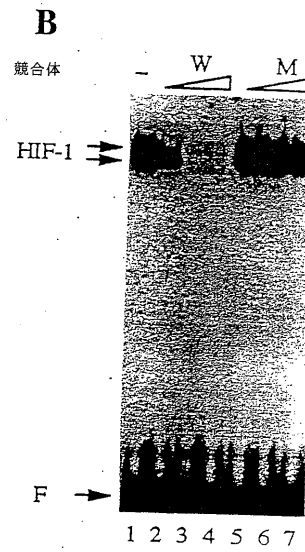


FIG. 3B

【図 4 A】

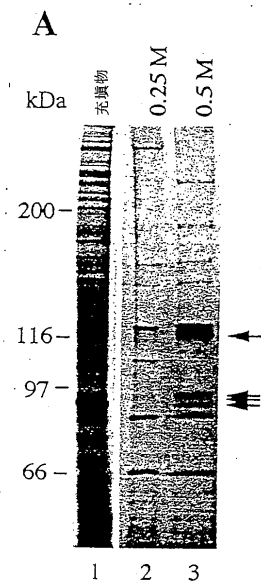


FIG. 4A

【図 4 B】

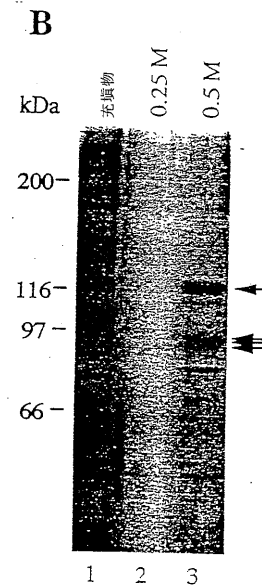


FIG. 4B

【図 5 A】

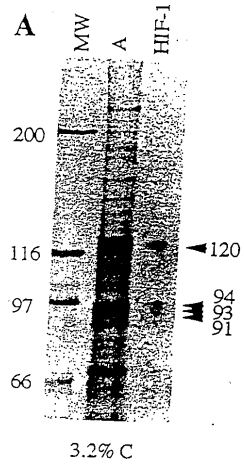


FIG. 5A

【図 5 B】

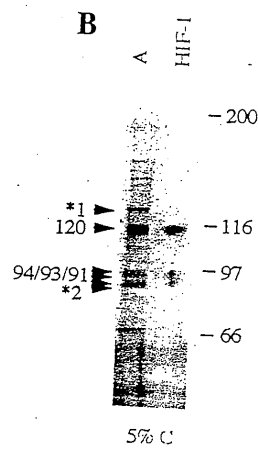


FIG. 5B

【図 5 C】

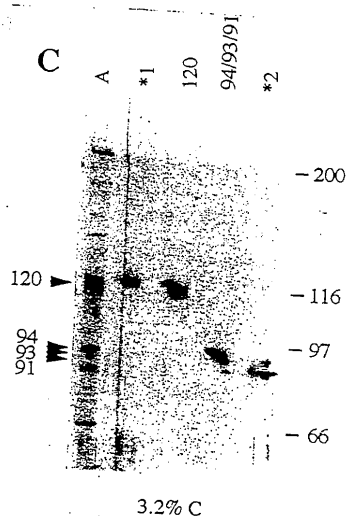


FIG. 5C

【図 6】

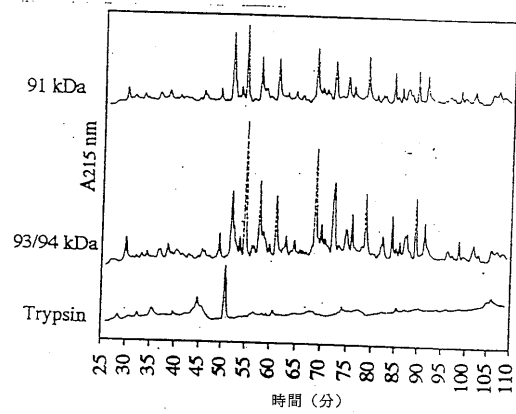


FIG. 6

【 図 7 】

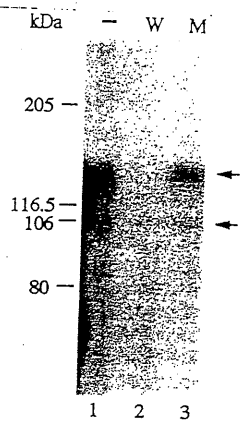


FIG. 7

【 図 8 】

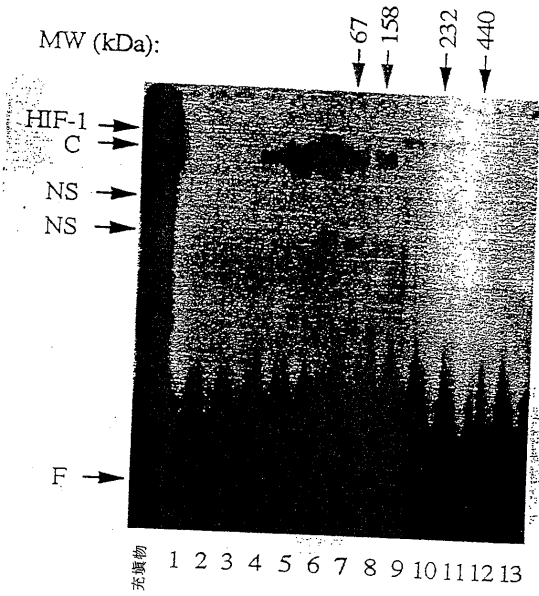


FIG. 8

【 図 9 】

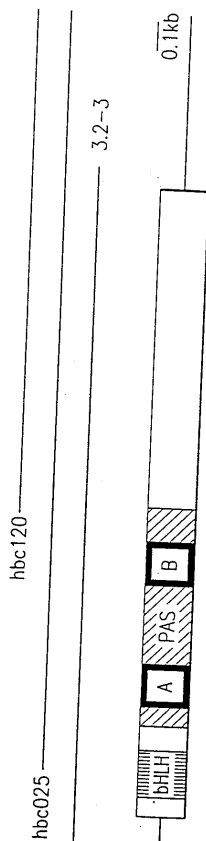


FIG. 9

【 図 10 】

FIG. 10-1	FIG. 10-2	FIG. 10-3	FIG. 10-4
FIG. 10-5	FIG. 10-6	FIG. 10-7	FIG. 10-8

FIG. 10

【 図 1 0 - 1 】

FIG. 10-1

1
1
62 AAG ATA AGT TCT GAA CGT CGA AAA GAA AAG
12 lys ile ser ser glu arg arg lys glu lys
182 TCG CAT CTT GAT AAG GCC TCT GTG ATG AGG
52 ser his leu asp lys ala ser val met arg
302 TAT TTG AAA GCC TTG GAT GGT TTT GTT ATG
92 tyr leu lys ala leu asp gly phe val met
422 GTG TTT GAT TTT ACT CAT CCA TGT GAC CAT
132 val phe asp phe thr his pro cys asp his
542 AAG TGT ACC CTA ACT AGC CGA GGA AGA ACT
172 lys cys thr leu thr ser arg gly arg thr
662 TAT AAG AAA CCA CCT ATG ACC TGC TTG GTG
212 tyr lys lys pro pro met thr cys leu val
782 TTT TCT TAT TGT GAT GAA AGA ATT ACC GAA
252 phe ser tyr cys asp glu arg ile thr glu
902 CAT GAT ATG TTT ACT AAA GGA CAA GTC ACC
292 his asp met phe thr lys gly gln val thr
1022 CCA CAG TGC ATT GTA TGT GTG AAT TAC GTT
332 pro gln cys ile val cys val asn tyr val
1142 ACT CAG CTA TTC ACC AAA GTT GAA TCA GAA
372 thr gln leu phe thr lys val glu ser glu
1262 GAT TTT GGC AGC AAC GAC ACA GAA ACT GAT
412 asp phe gly ser asn asp thr glu thr asp
1382 CCA TTA CCC ACC GCT GAA ACG CCA AAG CCA
452 pro leu pro thr ala glu thr pro lys pro

【 図 1 0 - 2 】

FIG. 10-2

TCT CGA GAT GCA GCC AGA TCT CGG CGA AGT
ser arg asp ala ala arg ser arg arg ser
CTT ACC ATC AGC TAT TTG CGT GTG AGG AAA
leu thr ile ser tyr leu arg val arg lys
GTT CTC ACA GAT GAT GGT GAC ATG ATT TAC
val leu thr asp asp gly asp met ile tyr
GAG GAA ATG AGA GAA ATG CTT ACA CAC AGA
glu glu met arg glu met leu thr his arg
ATG AAC ATA AAG TCT GCA ACA TGG AAG GTA
met asn ile lys ser ala thr trp lys val
CTG ATT TGT GAA CCC ATT CCT CAC CCA TCA
leu ile cys glu pro ile pro his pro ser
TTG ATG GGA TAT GAG CCA GAA GAA CTT TTA
leu met gly tyr glu pro glu leu leu
ACA GGA CAG TAC AGG ATG CTT GCC AAA AGA
thr gly gln tyr arg met leu ala lys arg
GTG AGT GGT ATT ATT CAG CAC GAC TTG ATT
val ser gly ile ile gln his asp leu ile
GAT ACA AGT AGC CTC TTT GAC AAA CTT AAG
asp thr ser ser leu phe asp lys leu lys
GAC CAG CAA CTT GAG GAA GTA CCA TTA TAT
asp gln gln leu glu glu val pro leu tyr
CTT CGA AGT AGT GCT GAC CCT GCA CTC AAT
leu arg ser ser ala asp pro ala leu asn

【 図 1 0 - 3 】

FIG. 10-3

GTGAAGACATCGCGGGACCGATTTCACC ATG
met
AAA GAA TCT GAA GTT TTT TAT GAG CTT GCT
lys glu ser glu val phe tyr glu leu ala
CTT CTG GAT GCT GGT GAT TTG GAT ATT GAA
leu leu asp ala gly asp leu asp ile glu
ATT TCT GAT AAT GTG AAC AAA TAC ATG GGA
ile ser asp asn val asn lys tyr met gly
AAT GGC CTT GTG AAA AAG GGT AAA GAA CAA
asn gly leu val lys lys gly lys glu gln
TTG CAC TGC ACA GGC CAC ATT CAC GTA TAT
leu his cys thr gly his ile his val tyr
AAT ATT GAA ATT CCT TTA GAT AGC AAG ACT
asn ile glu ile pro leu asp ser lys thr
GGC CGC TCA ATT TAT GAA TAT TAT CAT GCT
gly arg ser ile tyr glu tyr tyr his ala
GGT GGA TAT GTC TGG GTT GAA ACT CAA GCA
gly gly tyr val trp val glu thr gln ala
TTC TCC CTT CAA CAA ACA GAA TGT GTC CTT
phe ser leu gln gln thr glu cys val leu
AAG GAA CCT GAT GCT TTA ACT TTG CTG GCC
lys glu pro asp ala leu thr leu leu ala
AAT GAT GTA ATG CTC CCC TCA CCC AAC GAA
asn asp val met leu pro ser pro asn glu
CAA GAA GTT GCA TTA AAA TTA GAA CCA AAT
gln glu val ala leu lys leu glu pro asn

【 図 1 0 - 4 】

FIG. 10-4

GAG GGC GGC GGC GGC GCG AAC GAC AAG AAA
glu gly ala gly gly ala asn asp lys lys
CAT CAG TTG CCA CTT CCA CAT AAT GTG AGT
his gln leu pro leu pro his asn val ser
GAT GAC ATG AAA GCA CAG ATG AAT TGC TTT
asp asp met lys ala gln met asn cys phe
TTA ACT CAG TTT GAA CTA ACT GGA CAC AGT
leu thr gln phe glu leu thr gly his ser
AAC ACA CAG CGA AGC TTT TTT CTC AGA ATG
asn thr gln arg ser phe phe leu arg met
GAT ACC AAC AGT AAC CAA CCT CAG TGT GGG
asp thr asn ser asn gln pro gln cys gly
TTC CTC AGT CGA CAC AGC CTG GAT ATG AAA
phe leu ser arg his ser leu asp met lys
TTG GAC TCT GAT CAT CTG ACC AAA ACT CAT
leu asp ser asp his leu thr lys thr his
ACT GTC ATA TAT AAC ACC AAG AAT TCT CAA
thr val ile tyr asn thr lys asn ser gln
AAA CCG GTT GAA TCT TCA GAT ATG AAA ATG
lys pro val glu ser ser asp met lys met
CCA GCC GCT GGA GAC ACA ATC ATA TCT TTA
pro ala ala gly asp thr ile ile ser leu
AAA TTA CAG AAT ATA AAT TTG GCA ATG TCT
lys leu gln asn ile asn leu ala met ser
CCA GAG TCA CTG GAA CTT TCT TTT ACC ATG
pro glu ser leu glu leu ser phe thr met

【 図 10 - 5 】

1502 CCC CAG ATT CAG GAT CAG ACA CCT AGT CCT
 492 pro gln ile gln asp gln thr pro ser pro
 1622 AAG TTG GAA TTG GTA GAA AAA CTT TTT GCT
 532 lys leu glu leu val glu lys leu phe ala
 1742 TTC CAG TTA CGT TCC TTC GAT CAG TTG TCA
 572 phe gln leu arg ser phe asp gln leu ser
 1862 GCT AAT GCC ACC ACT ACC ACT GCC ACC ACT
 612 ala asn ala thr thr thr ala thr thr
 1982 ACT AGT GCC ACA TCA TCA CCA TAT AGA GAT
 652 thr ser ala thr ser ser pro tyr arg asp
 2102 TCT GTC GCT TTG AGT CAA ACA ACT ACA GTT
 692 ser val ala leu ser gln arg thr thr val
 2222 GTA GGA ATT GGA ACA TTA TTA CAG CAG CCA
 732 val gly ile gly thr leu leu gln gln pro
 2342 ATT TTA ATA CCC TCT GAT TTA GCA TGT AGA
 772 ile leu ile pro ser asp leu ala cys arg
 2462 CTA CTG CAG GGT GAA GAA TTA CTC AGA GCT
 812 leu leu gln gly glu glu leu leu arg ala
 2605 CTACAATACGCAAACTTGGTTAGTTCAATTTTGTAT
 2764 TTAATAAATGACACCTTTTATTTATTTTGGCTAG
 2923 TTTTACATAAATAAATGCTTTTGGCAGCAGTACGCT
 3082 CTGGAACATGACATTTGTTAATCATATAAATGATTCIT
 3241 TCTGATGTTTCTATAGTACATTTTGGCAGCTCAAAAGAAA
 3400 AAAATCATGATCTCTTAGCAAAATGCGCTAGTATGTTAA
 3559 CAGTAAATATCTTGTTTTTCTATGTACATTTGTACAAAT

FIG. 10-5

【 図 10 - 6 】

TCC GAT GGA AGC ACT AGA CAA AGT TCA CCT
 ser asp gly ser thr arg gln ser ser pro
 GAA GAC ACA GAA GCA AAG AAC CCA TTT TCT
 glu asp thr glu ala lys asn pro phe ser
 CCA TTA GAA AGC AGT TCC GCA AGC CCT GAA
 pro leu glu ser ser ser ala ser pro glu
 GAT GAA TTA AAA ACA GTG ACA AAA GAC CGT
 asp glu leu lys thr val thr lys asp arg
 ACT CAA AGT CGG ACA GCC TCA CCA AAC ACA
 thr gln ser arg thr ala ser pro asn arg
 CCT GAG GAA GAA CTA AAT CCA AAG ATA CTA
 pro glu glu glu leu asn pro lys ile leu
 GAC GAT CAT GCA GCT ACT ACA TCA CTT TCT
 asp asp his ala ala thr thr ser leu ser
 CTG CTG GGG CAA TCA ATG GAT GAA AGT GGA
 leu leu gly gln ser met asp glu ser gly
 TTG GAT CAA GTT AAC TGA GCITTTTCTTAATTT
 leu asp gln val asn OPA
 CCCCCTTCTTCTTAAATTTACATTTAATGCTCTTTTTTAGTA
 GCAGTTTATCCCTTTTTTGAATTTATTTTAAAGAGATGCC
 AGCCACAATTGCAAAATATATTTTCTTAAAAATACACGC
 AAATGCTGTATGGTTTATTTTAAATGGGTAAGCCATT
 ACAATACCCCTATGTAGTTGTGGAAGTTTATGCTAATATTG
 TTTGCTCAAAATACAATGTTTGAATTTTATGACATTTTGCG
 TTTTCATTCTTTTGTCTTTTGTGGTTGATCTAACACTA

FIG. 10-6

【 図 10 - 7 】

GAG CCT AAT AGT CCC AGT GAA TAT TGT TTT
 glu pro asn ser pro ser glu tyr cys phe
 ACT CAG GAC ACA GAT TTA GAC TTG GAG ATG
 thr gln asp thr asp leu asp leu glu met
 AGC GCA AGT CCT CAA AGC ACA GTT ACA GTA
 ser ala ser pro gln ser thr val thr val
 ATG GAA GAC ATT AAA ATA TTG ATT GCA TCT
 met glu asp ile lys ile leu ile ala ser
 GCA GGA AAA GGA GTC ATA GAA CAG ACA GAA
 ala gly lys gly val ile glu gln thr glu
 GCT TTG CAG AAT GCT CAG AGA AAG CGA AAA
 ala leu gln asn ala gln arg lys arg lys
 TGG AAA CGT GTA AAA GGA TGC AAA TCT AGT
 trp lys arg val lys gly cys lys ser ser
 TTA CCA CAG CTG ACC AGT TAT GAT TGT GAA
 leu pro gln leu thr ser tyr asp cys glu
 CATTCTTTTTTTTGGACACTGGTGGCTCACTACCTAAGC

TGTTCTTTAATGCTGGATCAGACAGCTCATTTTCTCAGT
 AATATATTTTTTGTAAAGAGGAGTAACCTTTCATCATGAT
 AGTTACATGGAATATATTTCTGGTTTATAAACTAGTTT
 TACATAATATAGAAAGATATGCATATATCTAGAAGGTATGT
 TGTAACATGATATTAACCTTAAATGTTCTGCTACCTGTTG
 CTATTAACATCTTTTTTTTCTATGATTTTCAATATTTGAG
 ACTGTATTGTTTTTGTATCAATAAACAATCTTCTGTGA

FIG. 10-7

【 図 10 - 8 】

TAT GTG GAT AGT GAT ATG GTC AAT GAA TTC
 tyr val asp ser asp met val asn glu phe
 TTA GCT CCC TAT ATC CCA ATG GAT GAT GAC
 leu ala pro tyr ile pro met asp asp asp
 TTC CAG CAG ACT CAA ATA CAA GAA CCT ACT
 phe gln gln thr gln ile gln glu pro thr
 CCA TCT CCT ACC CAC ATA CAT AAA GAA ACT
 pro ser pro thr his ile his lys glu thr
 AAA TCT CAT CCA AGA AGC CCT AAC GTG TTA
 lys ser his pro arg ser pro asn val leu
 ATG GAA CAT GAT GGT TCA CTT TTT CAA GCA
 met glu his asp gly ser leu phe gln ala
 GAA CAG AAT GCA ATG GAG CAA AAG ACA ATT
 glu gln asn gly met glu gln lys thr ile
 GTT AAT GCT CCT ATA CAA GGC AGC AGA AAC
 val asn ala pro ile gln gly ser arg asn
 AGTCTATTTTATATTTTCTACATCTAATTTTAGAAGCCCTGG

TTTTTGGTATTTAAACCATTTGCTATGCTAGTATCATTT
 CATAGGCAGTTGAAAAATTTTTTACACCTTTTTTTTTCACA
 TTAAGAAGAAATTTTTTTTGGCCATGAAATTTGTTAAAC
 GGCATTTATTTTGGATAAAATTTCTCAATTCAGACAATCA
 GTATAAGATATTTTGTAGCAGACTGTAAACAAGAAAAA
 TAAATTTTAGAAGCATTTATTTTGGAAATATATAGTTGTCA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIG. 10-8

【図 1 1】

HIF-1α:	(17)	RRKESRDAARRR	SKSEVFYELAHQL	PLPHNVSSHLD	KASVMRLTISYLRVR	
ARNT:	(90)	ARENHSEI-ERRRR	NKMTAYTELSDM	PTCSALARKPD	KLTLIRMAVSHMKS	(24%)
SIM:	(1)	MKEKSKWAARTR	EKENTFCELAKLL	PLPAAITSQLD	KASVIRLTTSYLMKR	(62%)
AHR:	(27)	AEGIKSNPS-KRHR	DRLNTELDRLASLL	PFPQDVINKLD	KLSVRLSVTYLRAK	(35%)
コンセンサス:		-----R-RR	-K1-----1-ELA-1L	PIP--1---LD	K-SVIRL2-SYL4-4	
		基本	ヘリックス	ループ	ヘリックス	
ARNT:	(90)	ARENHSEIERRRR	-NKMTAYITELSDM	PTCSALARKPD---	KLTLIRMAVSHMKS	
MI:	(205)	KKDNHNLIRRRR	-FNI NDRIKELGTLI	PKSNDPDMRW---	KGTLKASVDYIRKL	(32%)
USF:	(200)	RAQHNEVERRRR	-DKINNIWVQLSKII	PDCSMESTKSGQS	KGGLSKACDYIOEL	(38%)
L-MYC:	(286)	KRKHNFLERRRR	-NDLRSRFLALRDQV	PTL-ASCSKAP---	KWILSKALEYLOAL	(39%)
CP-1:	(223)	RKDSHKEVERRRR	ENINTA-INVLSDLL	PVR--ESSKAA---	---ILARAAEYIQKL	(37%)
コンセンサス:		433-HNETERRRR	---1---1---LS011	P-----K----	K--IL-4A13YIQ-L	

FIG. 11

【図 1 2】

HIF-1α:	(106)	DGDMYISDNVNMKMGTLQFELTGHSHVDFTHPCDHEEMREML--	THRNLGLVK	
ARNT:	(183)	TGRWYVSDSVTPVLNPOSEWFGSTLYDQVHPDDVDKLEQL--	STSENALT	(29%)
AHR:	(130)	DALFYASSTIQDYLGFGQSDVIHQSVYELIHTEDEAFQRLHWALNPSQCT		(23%)
SIM:	(97)	DGKIMYSETASVHLGSLQVELTGNISFHYHNYDQDEMNAIL--	SLHPHINQ	(37%)
PER:	(286)	DGIVLYTTPSITDVLGYPRDMWLGSRFIDFVHLKDRATFASQI--	TTGIPIAE	(22%)
kinA:	(24)	NGRIIMISANSKHLGLYLQGEIMGCSFLKTLFHEEDQFLVESFYNEHLMPCCT		(26%)
コンセンサス:		DG-11YIS-21---LG--Q-E11G-S1-31IH--0---1---L---2-----		
HIF-1α:	(249)	DMKFSYCDERITELMGYPEPELLGR-SNYEYHALDSHLTK--THDMFTKGG		(35%)
ARNT:	(370)	EGIFTVDHRCVATVGYQPOELLGK-NIVEFCHPEDQQLLRDSFQQWKLKGG		(31%)
AHR:	(288)	DFTPGCDKAGRVLGYTEAELCTRGSGYQFIHAADMLYCAE-SHIRMIKTGE		(39%)
SIM:	(263)	DMKLIFDARVSQLTGYPEQDLIEK-TLYQYHAADIMAMRC-SHOILLYKGG		(33%)
PER:	(336)	TGIISHVDSAAVSALGPLQDLIGR-SIMDFYHEDLSVMKE-TYETVMKKGG		(19%)
kinA:	(288)	WVFMNESGISLFEAATYE--DLICK-NIYDQLHPCOHEDVKERIGNIAEQKTE		
コンセンサス:		31-1---0-4-----1GY-P-3L1G4-2TY3--H--D---143-2---11-KGG		

FIG. 12

【図 1 3 A】

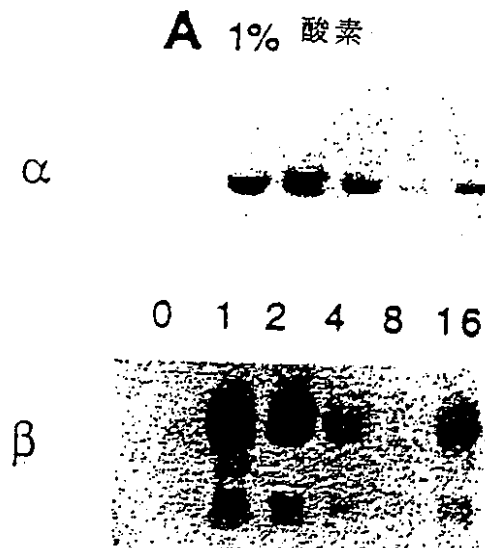


FIG. 13A

【図 1 3 B】

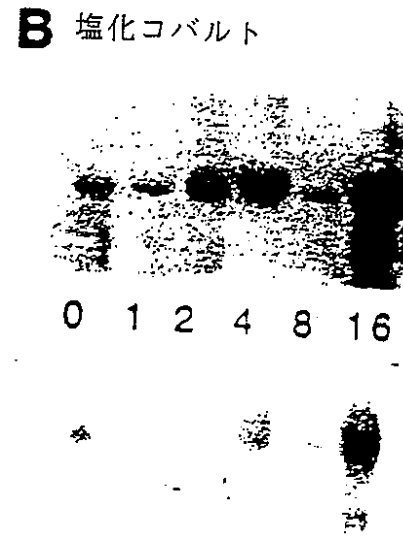


FIG. 13B

【図 13 C】

C デスフェリオキサミン

FIG. 13C

【図 13 D】

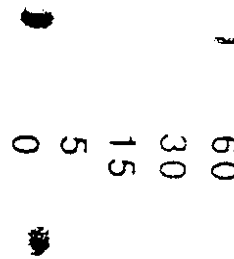
D 低酵素状態後

FIG. 13D

【図 13 E】

E 3'-非翻訳配列

2568 CU AUUUA UA
 2656 UA AUUUA CA
 2731 GU AUUUA AA
 2781 UU AUUUA UU
 2785 UU AUUUA UU
 3138 UU AUUUA AA
 3156 CC AUUUA CA
 3203 GC AUUUA UU

FIG. 13E

【図 14 A】

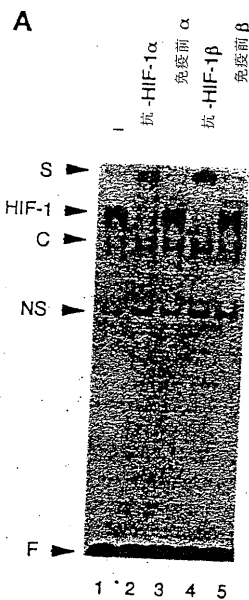


FIG. 14A

【図 14 B】

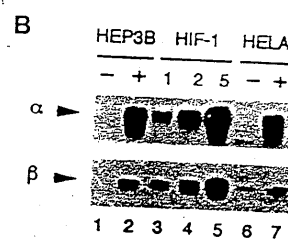


FIG. 14B

【図 14 C】

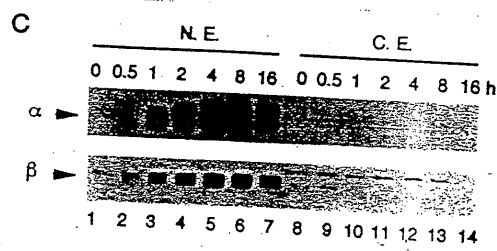


FIG. 14C

【図 14 D】

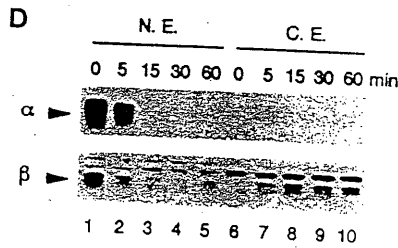


FIG. 14D

【図 15 B】

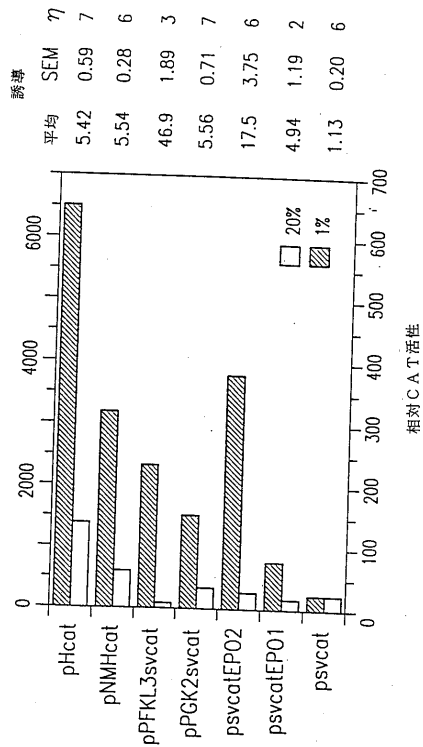


FIG. 15B

【図 15 A】

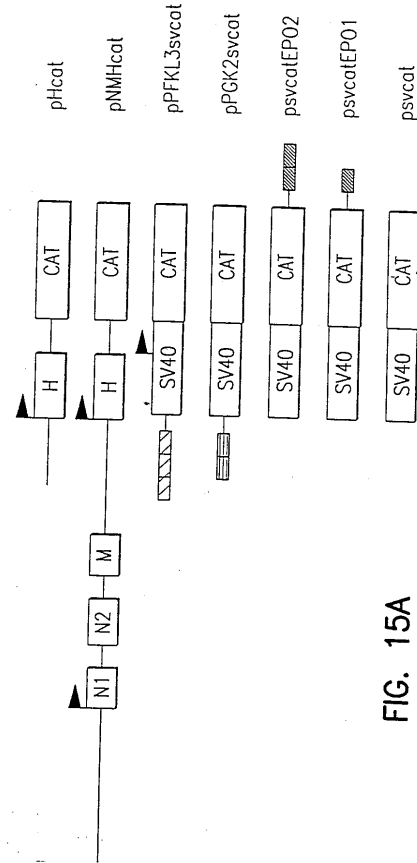


FIG. 15A

【図 16】

HIF-1αの野生型およびドミナントネガティブ突然変異型のアミノ末端アミノ酸配列(基本ドメインを含む)

HIF-1α: 1/MEGAGGANDKKISSERRRKEKSRDAPRR/30

HIF-1αΔNB: 1/MEGAG-----SRR/30

HIF-1αΔNBΔAB: 1/MEGAG-----SRR/30

HIF-1αの野生型およびドミナントネガティブ突然変異型のカルボキシ末端アミノ酸配列

HIF-1α: 390/LKKEPDALT/400/820/RALDQW/826

HIF-1αΔNB: 390/LKKEPDALT/400/820/RALDQW/826

HIF-1αΔNBΔAB: 390/LKIQT-----/395

FIG. 16

【配列表】

2009077729000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53
				A
				D
				M

(72)発明者 セメンザ, グレグ エル.

アメリカ合衆国 2 1 2 8 6 メリーランド州 トーソン, スカーレット ドライブ 7 1 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA04 CA20 DA06 EA04 GA11
 4B063 QA01 QA08 QQ52 QR32 QR56 QS03 QS16 QS34 QX07
 4B065 AA26X AA93Y AB01 AC14 AC16 BA01 BD01 BD14 CA24 CA44
 4H045 AA10 AA11 BA09 CA40 DA75 EA27 FA74 GA26

专利名称(译)	缺氧诱导因子-1和使用方法		
公开(公告)号	JP2009077729A	公开(公告)日	2009-04-16
申请号	JP2008284139	申请日	2008-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	医学的约翰霍普金斯大学医学院		
申请(专利权)人(译)	医学的约翰霍普金斯大学医学院		
[标]发明人	セメンザグレッグエル		
发明人	セメンザ, グレッグ エル.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 A61K38/00 A61K48/00 A61P7/00 C07K7/06 C07K7/08 C12N15/12 C12P21/02		
CPC分类号	A61K38/00 A61P7/00 C07K14/4702		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A G01N33/53.D G01N33/53.M C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QS03 4B063/QS16 4B063/QS34 4B063/QX07 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC16 4B065/BA01 4B065/BD01 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA44 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA27 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	08/480473 1995-06-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供缺氧诱导因子1 (HIF-1) 的纯化和表征。HIF-1由HIF-1 α 和HIF-1 β 的亚基组成。纯化的HIF-1 α 多肽，其氨基酸序列和核苷酸序列，用于与HIF-1 β 二聚形成非功能性HIF-1复合物的HIF-1 α ，以及HIF-1预防和治疗缺氧相关疾病的抗体和方法。[选择图]无

材料名	濃度 (mM)	分子量 (kDa)	ED ₅₀ (ng)	活性 (IC ₅₀)	分子量 (kDa)	濃度 (mM)
HIF-1 α	100	40	1.4	226,000	190	44
HIF-1 β	25	2.5	400,000	160	66	000
HIF-1 α (HIF-1 β)	240	550	440,000	0.8 0/10g	72	4
HIF-1 α (HIF-1 β)	405	1,000	600,000	0.2 0/10g	100	1
HIF-1 α (HIF-1 β)	9	0.06	135,000	2,350	22	11,250