

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 535596

(P2003 - 535596A)

(43)公表日 平成15年12月2日(2003.12.2)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (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 15/16	4 B 0 2 4
A 6 1 P 15/16		35/00	4 B 0 5 0
35/00		C 0 7 K 16/40	4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/40		C 1 2 N 9/10	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全115数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 502161(P2002 - 502161)

(86)(22)出願日 平成13年6月8日(2001.6.8)

(85)翻訳文提出日 平成14年12月9日(2002.12.9)

(86)国際出願番号 PCT/EP01/06520

(87)国際公開番号 W001/094621

(87)国際公開日 平成13年12月13日(2001.12.13)

(31)優先権主張番号 00112479.1

(32)優先日 平成12年6月9日(2000.6.9)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 00112345.4

(32)優先日 平成12年6月9日(2000.6.9)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 ベーリンガー インゲルハイム インター  
ナショナル ゲゼルシャフト ミット ベ  
シュレンクテル ハフツング  
ドイツ連邦共和国 デー-55216 インゲルハ  
イム アム ライン ポストファッハ 20  
0

(72)発明者 イェヌヴァイン トーマス  
オーストリア アー1030 ヴィーン バリ  
ツヒガッセ 21/27

(72)発明者 レイ スティーブン  
アイルランド カウンティ ギャルウェイ  
ヘッドフォード ブリッジ ストリート

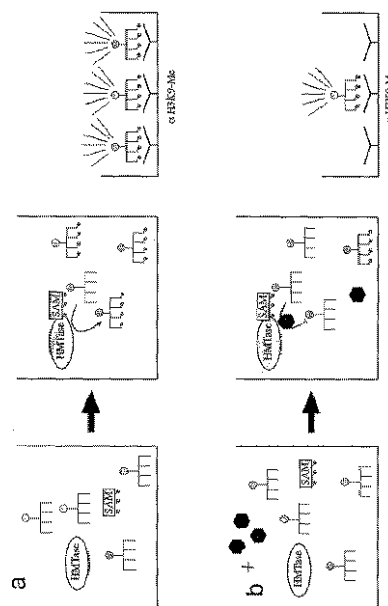
(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外8名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 S U V 3 9 H 2 メチルトランスフェラーゼのモジュレーターのスクリーニング法

(57)【要約】

マウス及びヒトSuv39h2ポリペプチド及びそれを  
コードしているDNA分子。Suv39h2は新規なS  
uv3-9遺伝子ファミリー種である。Suv39h2  
は新規な減数分裂高次クロマチン成分である。ヒストン  
メチルトランスフェラーゼ活性を有し、Suv39h1  
と組合わせて雄性配偶子形成に必要である。Suv39  
h2は、がん治療や雄性避妊に用いられる、メチルトラ  
ンスフェラーゼ活性のモジュレーターを同定するスクリ  
ーニング法に使用し得る。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 配列番号2に示されたアミノ酸配列、又は配列番号1に示されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドに対してストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされたアミノ酸配列を有するマウスSuv39h2ポリペプチド。

【請求項2】 マウスSuv39h2ポリペプチドをコードしている配列番号1に示されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含んでいる単離したDNA分子、又は配列番号1に示されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドに対してストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを含んでいるマウスSuv39h2をコードしている単離したDNA分子。

【請求項3】 ヒトEST受託番号AQ173625(配列番号3)及び/又はAQ494637(配列番号4)及び/又はAQ691972(配列番号5)及び/又はAQ554070(配列番号6)の配列を有するポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドに対してストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされたヒトSUV39H2ポリペプチド。

【請求項4】 ヒトEST受託番号AQ173625(配列番号3)及び/又はAQ494637(配列番号4)及び/又はAQ691972(配列番号5)及び/又はAQ554070(配列番号6)の配列を有するポリヌクレオチド、又は単離したDNA分子を含んでいるヒトSUV39H2ポリペプチドをコードしている単離したDNA分子。

【請求項5】 マウスSuv39h2に対する抗体。

【請求項6】 ヒトSUV39H2に対する抗体。

【請求項7】 哺乳動物雄性配偶子形成をモジュレートする能力を有する化合物を同定する方法であって、雄性配偶子形成に必要とされる1種以上のSuv39h/SUV39H相同体を、Suv39h/SUV39Hのヒストンメチルトランスフェラーゼ活性用基質の存在下及びメチル供与体の存在下に試験化合物とインキュベートし、該Suv39h/SUV39H相同体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性に対する該試験化合物のモジュレーティング作用を測定する、前記方法。

【請求項8】 Suv39h様活性を有するメチルトランスフェラーゼにより、リシン9においてヒストンH3をメチル化する、請求項7記載の方法。

【請求項9】 該メチルトランスフェラーゼがSuv39h2/SUV39H2である、請求項8記載の方法。

【請求項10】 第1段階では、該Suv39h/SUV39H相同体がSuv39h2/SUV39H2であり、Suv39h2/SUV39H2のインヒビター又はアクチベーターとして同定された化合物が、第2段階ではSuv39h1/SUV39H1ヒストンメチルトランスフェラーゼ活性のインヒビター又はアクチベーターでもあることが確認される、請求項7記載の方法。

【請求項11】 該基質が、リシン9のメチル化部位を有するヒストンH3又はそのN末端断片である、請求項7～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】 該ヒストンH3 N末端断片が配列番号7に示されたアミノ酸配列を有する、請求項11記載の方法。

【請求項13】 該メチル供与体がメチオニン又はS-アデノシル-L-メチオニンである、請求項7～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】 該メチル供与体のメチル基が検出可能標識をもっている、請求項7～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】 該メチル供与体が色素生産性標識をもち、及び該メチル基が該基質に転移するときの色の变化を測定することにより該メチルトランスフェラーゼ活性を測定する、請求項14記載の方法。

【請求項16】 該メチル供与体が放射性標識をもち、及び該メチル基が転移するときに該基質に転移した放射能を測定することにより該メチルトランスフェラーゼ活性を測定する、請求項14記載の方法。

【請求項17】 メチル化部位に特異的な抗体が該基質へ結合する量を定量することにより、該メチルトランスフェラーゼ活性を免疫学的に測定する、請求項7～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】 該基質が検出可能標識をもっている、請求項17記載の方法。

【請求項19】 がんの治療に用いられる請求項7～18のいずれか1項に記載の方法で同定された化合物。

【請求項20】 避妊に用いられる請求項7～18のいずれか1項に記載の方法

で同定された化合物。

【請求項21】 一時雄性避妊に用いられる請求項20記載の化合物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、新規な本発明Su(var)3-9相同体、Suv39h2の単離と機能確認、及びその使用に関する。

真核生物においては、遺伝子発現の制御や染色体の機能体制は、高次クロマチンに依存している(Paro & Harte, 1996; Karpen & Allshire, 1997)。体細胞のほかに、高次クロマチンは減数分裂での染色体の動態にも関係している(Dernburg et al., 1996)。減数分裂染色体の凝縮や対合は進化的に高度に保存されるが、異形染色体XとYが転写サイレンシングに付随する任意のヘテロクロマチニゼーションを受けることから転写雄性哺乳動物の減数分裂は例外的である(Handel & Hunt, 1992)。いわゆるXY体又は性小胞(Solari, 1974)の出現によって細胞学的に定義される雄性染色体のこの選択的不活性化は、非相同染色体間の乱交雑対合又は組換えを制限し、よって異数性の危険を減少させることが提唱された(Handel & Hunt, 1992)。実際に、XY体の特殊クロマチン構造を形成することができないと、精子形成の成功が妨げられる(Kot & Handel, 1990; Matsuda et al., 1991)。

Su(var)遺伝子は、はじめには、ドロソフィラ・メラノガスター(*Drosophila melanogaster*)(Reuter & Spierer, 1992)及びシゾサッカロマイセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)(Allshire et al., 1995)においてセントロメア位置効果に対する遺伝子スクリーンによって同定された。Su(var)遺伝子は位置効果の斑入り(variegation)(PEV)を抑制する(suppress)ので、遺伝子産物は抑制クロマチンドメインの体制に関係した(Henikoff, 1997)。実際に、単離したファミリー種はクロマチンを修飾し得る染色体タンパク質か又は酵素をコードしている(Wallrath, 1998)。

## 【0002】

ドロソフィアSu(var)3-9又はそのS. ポンベcIR4相同体は、遺伝子産物が特徴的なクロモドメインとSETドメインがいっしょになったわずかに修飾している部位である。60アミノ酸クロモドメイン(Paro & Hogness, 1991; Aasland & Stewart, 1995; Koonin et al., 1995)が古いヒストン様折りたたみ(Ball et al., 19

97)に似ているタンパク質特異的相互作用表面(Messmer et al., 1992; Platero et al., 1995)を表しているが、130アミノ酸SETドメイン(Jenuwein et al., 1998)の構造はまだはっきりしていない。しかしながら、ヒストンH3のリシン9に特異的である、Suv39h1のSETドメインが固有のHMTase活性を含んでいることが最近わかった(Rea et al., 2000)。これらのデータは、Suv39h1相同体がヒストンH3メチル化を経たクロマチン構造の体制によって機能を及ぼすことを示している。

対応しているマウス(Suv39h1)とヒト(SUV39H1)Su(var)3-9相同体が同定され、SUV39H1はトランスジェニックハエにおいてSu(var)3-9の機能的哺乳動物相同体を表していることが証明された(Aagaard et al., 1999)。哺乳動物細胞における内在Suv39h1又はSUV39H1タンパク質の免疫局在によって、間期中の異質染色性フォーカスの強化された分布と減数分裂中のセントロメア位置の一時的蓄積が示された(Aagaard et al., 2000)。更に、Suv39h1又はSUV39H1はM31(HP1)、ドロソフィラHP1の哺乳動物相同体と結合し、哺乳動物SU(VAR)タンパク質複合体の存在が示されている(Aagaard et al., 1999)。更に、脱調節的SUV39H1は異所性ヘテロクロマチンを誘導し得るとともに内在M31(HP1)を再配分し得る(Melcher et al., 2000)。これらのデータから、体細胞において哺乳動物の高次クロマチンの構造的体制に関係する新規な異質染色性HMTaseタンパク質としてSuv39h1又はSUV39H1が特定された。

#### 【0003】

本発明の目的は、他の哺乳動物のSu(var)3-9相同体を同定すること及びマウスにおいて遺伝子発現、タンパク質免疫局在分析及び遺伝子破壊技術によって機能を調べることであった。

本発明の基礎にある問題を解決するために、次の方法を用いた。

哺乳動物Su(var)3-9相同体を更に同定するために、マウスSuv39h1又はヒトSUV39H1cDNA(Aagaard et al., 1999)との配列類似性研究(Bassett et al., 1995; Altshul et al., 1997)によって、追加のSu(var)3-9相同体の存在がわかった。Suv39h1と相似しているこの新規な遺伝子をSuv39h2(Su(var)3-9相同体2として)と称した。複合コーディングSuv39h2 cDNAのヌクレオチド配列(~1.5 kb)と概念解読枠(477アミノ酸)が図1に示されている。

Suv39h2とSuv39h1又はドロソフィラSU(VAR)3-9(Tschiersch et al., 1994)、S . ポンベCLR4(Ivanova et al., 1998)又はC.エレガンス(C15H11.5; 受託番号Z81035)の推定オープンリーディングフレーム(ORF)のようなSU(VAR)3-9タンパク質ファミリーの他の代表種との交差種を比較すると、非常に似た配列同一性と系統発生的関係(図2)が示される。

#### 【0004】

Suv39h2 mRNAのサイズを測定するために、胚幹細胞(ES細胞)と、胚形成と生後(P1-P4)発達の各段階(E10.5日目-E17.5日目)からのマウス胚由来の全RNAを含むRNAプロットをSuv39h2コード配列(アミノ酸143-477)とほぼ全長のSuv39h1 cDNAプローブを含んでいる980 bp cDNAプローブとハイブリダイズした。この領域内で、Suv39h2 cDNAはSuv39h1ヌクレオチド配列と約60%同じであり、Suv39h1転写物とクロスハイブリダイズしない(図3参照)。このSuv39h2特異的cDNAプローブによって、分析した段階のほとんどのRNA標品において約2.7 kbの目立ったmRNAが検出された(図3A、中央のパネル)。大部分のSuv39h2転写物のサイズは、数種のマウスやヒト細胞系にも見られる2.7 kb mRNAと一致しているが、E10.5日目にのみ小さなサイズ(1.7 kb)の転写物が検出された。

Suv39h1とSuv39h2双方の発現分析から、胚形成での潜在的オーバーラッピング機能がわかった。Suv39h1とSuv39h2の胚発現プロファイルを測定するためにノーザンプロットと全載RNAインサイチュ分析を用いた。両遺伝子とも胚形成で偏在して発現している。

発現分析から、成体マウスにおいてSuv39h1とSuv39h2双方の異なる潜在的機能が示された。胚発現プロファイルと対照的に、Suv39h2とSuv39h1転写物の存在量が成体組織ではかなり異なっている。Suv39h1は14の成体組織を含んでいるRNA標品のパネルでは広範囲の発現を示すが、Suv39h2の発現は精巢にほとんど限定されたままであり、mRNAは2.7 kbと1.7 kbの転写物である。

#### 【0005】

Suv39h2発現を生化学レベルで確認するために、マウスSuv39h2のアミノ酸157-477を含んでいる組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質に対して高めたポリクローナルウサギ抗血清を作成した。抗Suv39h2抗体は、PME

Fと精巣双方において約53 kDaの内在タンパク質を認識する。Suv39h2内在タンパク質のサイズは、Suv39h2 cDNAのコード配列から予想される遺伝子産物とよく一致している(図1参照)。

雄性配偶子形成においてSuv39h2の潜在的機能を解明するために、精巣綿棒標品の核におけるSuv39h2内在タンパク質の垂核局在を、抗Suv39h2抗体を用いた間接免疫蛍光により分析した(材料及び方法を参照されたい)。Suv39h2は、減数分裂ヘテロクロマチン成分と中太糸期でのXY体である。

Suv39h2と性染色体との特異的蓄積を証明するために、Suv39h2とSCP3、Suv39h2とXmr、及びSuv39h2とH1tに対する二重免疫蛍光分析を行った。これらの分析から、中-後太糸期から複糸期までSuv39h2と性染色体の特異的結合がわかった。

#### 【0006】

同時実験において、Suv39h1のSETドメインが固有のHMTase活性を含んでいることがわかった。従って、他のSU(VAR)3-9ファミリー種、特にSuv39h2か又は他のSETドメインタンパク質がHMTase活性を示しているかを分析した。GST-SUV39H1(82-412)に対応するマウスSuv39h2、S.ポンベCLR4(Ivanova et al., 1998)、ヒトEZ H2(Laible et al., 1997)及びヒトHRX(Tkachuk et al., 1992)の伸長したSETドメインのGST融合産物を作成し、HMTase活性を分析した。おもしろいことに、GST-Suv39h2(157-477)とGST-CLR4(127-490)はHMTase活性を示した。これらのデータから、減数分裂クロマチン、XY体の新規成分及び減数分裂ヒストンH3MTaseとしてのSuv39h2が同定される。

Suv39h1とSuv39h2を哺乳動物ヒストンH3リシン9特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼ(Suv39h HMTase)として同定した後、これらのHMTaseが減数分裂でセントロメアに一時的に蓄積するヘテロクロマチン強化酵素であることがわかった(Aagaard et al., 1999; Aagaard et al., 2000)。更に、リシン9のヒストンH3(H3-K9)のメチル化によりHP1タンパク質の高親和性結合部位がつくられることがわかった(Lachner et al., 2001; Bannister et al., 2001)。これによりSUV39H1-HP1メチル化システムがヘテロクロマチンの構築と増殖の重要な調節メカニズムとして定義される(Jenuwein, 2001)。ヒトSUV39H1の過剰発現により異所性ヘテロクロマチンが誘導され、結果として哺乳動物細胞系において染色体の誤分

離が生じる(Melcher et al., 2000)。

#### 【0007】

上記不可欠な減数分裂機能のほかに、ヘテロクロマチンは減数分裂染色体の動的再体制に重要である。減数分裂は核の内腔から核のエンベロープへ染色体が移動することにより始まり、そこで染色体が狭セントロメアサテライト配列によってクラスター形成する(Hawley et al., 1992; Scherthan et al., 1996)。減数分裂前期に、染色体が凝集し、続いて母性染色体と父性染色体間の相同体対合と組換え(太糸期において)が行われる。減数分裂の分裂の発生の前に、不对合、染色体凝集及び狭セントロメアヘテロクロマチンでヒストンH3リン酸化が行われる(Cobb et al., 1999)。特に雄性生殖細胞については、最後には、精子細胞を延長する際に1つの異質染色性ブロックの中に半数体ゲノム含量が形成される。ドロソフィラにおいては、ヘテロクロマチンとその結合サテライト配列は、類似の高次構造に沿って染色体を配向させることにより最初の減数分裂染色体移動と相同対合を援助することが提唱された(Hawley et al., 1992; Karpen et al., 1996; Dernburg et al., 1996b)。哺乳動物の生殖細胞においては、太糸期のチェックポイント(de Vries et al., 1999)によって誤整列の対合していな染色体がモニターされ、減数分裂前期の細胞が停止し、よって異数体配偶子の生産が妨げられる。

#### 【0008】

本発明の目的は、更に、稔性、特に雄性稔性を含む症状の薬剤標的としてタンパク質を用いるために胚の発達や精子形成におけるSuv39h1とSuv39h2の役割を分析することであった。

配偶子形成においてSuv39h機能、特にSuv39h2機能の生体内重要性を調べるために、Suv39h1もSuv39h2も共に欠損したマウス系統を標準法に従って作成した。ターゲティング戦略を図9に示し、また、Suv39h1とSuv39h2双方のヌルアレレの生産が証明されている。両方の遺伝子の突然変異によって、両遺伝子座間の機能の重複性の結果として生存可能な稔性マウスが得られた。従って、Suv39h1とSuv39h2の欠損系統を相互交差してSuv39h二重欠損マウスを作製した。二重変異マウスがメンデル未満の比率で生まれ、約20%の予想された二重変異体が見られ、不

稔性である。

【0009】

他の実験から、更に、マウスSuv39hヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMTase)が狭セントロメアヘテロクロマチンでのヒストンH3リシン9メチル化を調節すること、また、その修飾が有糸分裂や減数分裂で染色体の安定性に不可欠であることがわかった。マウス生殖系においてSuv39h1とSuv39h2のHMTaseを複合破壊すると、結果として、生存性が激しく損なわれ、完全に精子形成不全となる。体細胞や初期減数分裂細胞における狭セントロメアH3リシン9のメチル化は、Suv39h HMTaseの存在しないときに消失する。Suv39h二重ヌル(dn)初代マウス胚線維芽細胞は、染色体不安定性-Suv39h変異マウスにおいてB細胞リンパ腫の発生によって反映する表現型が高められる。第2に、Suv39h dn精母細胞の初期の減数分裂前期においては、染色体はセントロメア領域まで非相同相互作用に関係し、シナプシスが遅れる。減数分裂I細胞の重要な画分は、誤分離した二価染色体を含み、高異質染色性Y染色体は、X染色体と対合することができない。合わせると、実施例11~17で得られたデータから、有糸分裂や減数分裂で染色体機能やゲノム安定性を保護する‘異質染色性受容能’を調節する際にSuv39hによるH3リシン9メチル化の役割が確立される。

【0010】

本発明の知見は、有糸分裂又は減数分裂/雄性配偶子形成で染色体動態における高次哺乳動物クロマチンの必須調節遺伝子としてSuv39h1とSuv39h2を同定することである。従って、第1態様においては、Suv39h1遺伝子とSuv39h2遺伝子は、染色体誤分離によって異常遺伝子発現やゲノム不安定性を妨害する標的であるので、新しいがん治療の基礎となる。更に、本発明の実験から、Suv39h2が雄性不稔性の治療での新規な標的として、また、可逆的雄性避妊の標的として同定される。

第1態様においては、本発明は、配列番号2に示されたアミノ酸配列、又は配列番号1に示されたヌクレオチド配列をもつポリヌクレオチドに対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされたアミノ酸配列を有するマウスSuv39h2ポリペプチドに関する。

本明細書に用いられる“ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件”とは、50%ホルムアミド、5×SSC(1×SSC=150 mM NaCl、15 mMクエン酸三ナトリウム)、50 mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハート溶液、10%硫酸デキストラン、及び20 µg/ml変性せん断サケ精子DNAを含んでいる溶液中42 °Cで一晩インキュベートし、次にフィルターを0.1×SSC中約65 °Cで洗浄すること、又は等価条件を意味する。

#### 【0011】

態様においては、更に、本発明は、マウスSuv39h2ポリペプチドをコードしている配列番号に示されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含んでいる単離したDNA分子、又は配列番号1に示されたヌクレオチド配列をもつポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを含んでいるマウスSuv39h2をコードしている単離したDNA分子に関する。

好適実施態様においては、本発明は、ヒトEST受託番号AQ173625(配列番号3)及び/又はAQ494637(配列番号4)及び/又はAQ691972(配列番号5)及び/又はAQ554070(配列番号6)の配列を有するポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされたヒトSUV39H2ポリペプチドに関する。

態様においては、更に、ヒトEST受託番号AQ173625(配列番号3)及び/又はAQ494637(配列番号4)及び/又はAQ691972(配列番号5)及び/又はAQ554070(配列番号6)の配列を有するポリヌクレオチド、又は単離したDNA分子を含んでいるヒトSUV39H2タンパク質をコードしている単離したDNA分子に関する。

EST AQ173625、AQ494637、AQ691972及びAQ554070における配列情報は、ヒトSUV39H2を部分的に特定している。対応するヒトSUV39H2 cDNAは、AQ173625、AQ494637、AQ691972及びAQ554070における配列情報を用いて容易に単離し得る。EST又はESTの一部は、精巢ライブラリーのような適切なファージcDNAライブラリーをスクリーニングするプローブとして使用し得る。そうでなければ、上記ESTにおける配列情報は、SUV39H2を単離するPCR(RT-PCR又はRACE増幅)による戦略を設計するために使用し得る。

#### 【0012】

以下、特にことわらない限り、“Suv39h2”はマウスSUV39H2とヒトSUV39H2の双方を意味する。

本Suv39h2タンパク質の相同体には、翻訳後修飾に耐性があり、タンパク質の酵素活性も変えるポリペプチドの変異体が含まれている。Suv39h2ポリペプチドは、配列番号2で表される全長タンパク質を含んでもよく、その断片又は変異体を含んでもよい。

DNAのほかに、本発明は、mRNAのようなRNAの形の核酸分子に関する。DNA分子には、クローニングにより得られた又は合成で作製したcDNA又はゲノムDNAが含まれている。DNAは、二本鎖又は一本鎖であってもよい。一本鎖DNA又はRNAは、センス(又は+)鎖として知られるコーディング鎖でもよく、アンチセンス(又は-)と呼ばれる非コーディング鎖であってもよい。

“単離した”核酸分子とは、天然環境から取り出した核酸分子、DNA又はRNAを意味する。ベクターに含まれている組換えDNA分子は、本発明のために単離されたとみなされる。単離したDNA分子の例としては、更に、異種宿主細胞に維持された組換えDNA分子、又は組換えDNAで作製されたとしても合成化学法で作製されたとしても溶液から精製(部分的に又はかなり)されたDNA分子が挙げられる。単離したRNA分子には、本発明のDNA分子の生体内又は試験管内RNA転写物が含まれている。しかしながら、本明細書に用いられる“単離した”には、cDNAライブラリー又はSuv39h2遺伝子又はその一部を有する精製又は単離したゲノムDNAの標品に1種以上の他のcDNA分子又はDNA断片と混合して存在するSuv39h2 cDNAが含まれていないことを意味する。

#### 【0013】

本発明の核酸分子には、更に、下記のプロモーター又はエンハンサーのようなDNA調節配列(異種の調節配列であってもよい)に作用可能に結合した1種以上のSuv39h2 DNA配列を含んでいる遺伝子構築物が含まれ、ここで、これらのDNA配列が宿主細胞、好ましくは細菌、真菌(酵母を含む)、植物又は動物(昆虫又は哺乳動物を含む)細胞中で発現するときに、1種以上のSuv39h2ポリペプチドが作製される。そのような構築物においては、調節配列は成熟Suv39h2ポリペプチド又は本明細書に記載されるその変異体、前駆体、断片又は誘導体のいずれかをコード

しているSuv39h2ポリヌクレオチドに作用可能に結合してよく、配列番号1、3、5又は6に示された核酸配列を有する核酸の全部又は一部に相補的な核酸配列を有する1種以上のポリヌクレオチドが含まれてもよい。本明細書に用いられる核酸分子又はポリペプチドの“部分”又は“断片”という用語は、参照ポリヌクレオチド又はポリペプチド(例えば、下で特に特定されなければ配列番号1、2又は3と4に示されるそれぞれポリヌクレオチドとポリペプチド)の少なくとも15、更に好ましくは少なくとも20の相接するヌクレオチド又はアミノ酸を含んでいるポリヌクレオチド又はポリペプチドのセグメントを意味する。

#### 【0014】

配列番号1を示したものに対応するヌクレオチド配列、又は配列番号3及び/又は4及び/又は5及び/又は6の配列を含んでいるヌクレオチド配列を有するDNA分子のほかに、本発明は、上記のものとはかなり異なる配列を含んでいるが、遺伝暗号の縮重のためになおSuv39h2マウス又はヒトポリペプチドをコードしているDNA分子に関する。遺伝暗号が当該技術において周知であるので、当業者が過度に実験せずに上記縮重変異体を作製することは通常のことである。

更に、本発明は、治療又はスクリーニング分析に用いるのに望ましい性質をもつSuv39h2誘導体又は断片又はペプチドである場合には、アミノ酸の同類置換による、配列番号2に示された配列又は配列番号3及び/又は4及び/又は5及び/又は6の配列を有するポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドからずれたSuv39h2ポリペプチドに関する。本発明は、また、配列番号1から配列が変化しているポリヌクレオチド配列を有する誘導体又は断片をコードしている単離したDNA分子、又は配列が配列番号3及び/又は4及び/又は5及び/又は6の配列を有するポリヌクレオチドから配列が変化している単離したDNA分子に関する。

#### 【0015】

Suv39h2ポリペプチドをコードしている本発明の核酸分子又はその誘導体又は断片には、転写(例えば、リボソーム結合部位又は転写因子結合部位によって)、mRNAプロセッシング(例えば、スプライシングシグナルやポリアデニル化シグナル)又はmRNAの安定性に役割を果たすことができる転写された非翻訳領域(UTR)又は他のフランキング配列のような、例えば、イントロン又は非コード5'及び3'配

列を含む追加の非コード配列と共に、ポリペプチドのアミノ酸配列をそれだけでコードしているもの、調節DNA配列、特にプロモーター又はエンハンサーのような異種の調節DNA配列に作用可能に結合したSuv39h2ポリペプチドのコード配列、又は機能性を追加するアミノ酸をコードする1種以上のコード配列に結合したSuv39h2ポリペプチドのコード配列が含まれてもよいが、これらに限定されない。従って、ポリペプチドをコードしている配列は、融合ポリペプチドの精製を容易にするペプチドをコードしている配列のようなマーカー配列に融合することができる。本発明のこの態様のある実施態様においては、マーカーアミノ酸配列は、特に、その多くが市販されているpQEベクター(Qiagen, Inc.)に付けられたタグのようなヘキサヒスチジンペプチドであってもよい。例えば、Gentz et al., 1989に記載されている。“HA”タグは、Wilson et al., 1984に記載されたインフルエンザ赤血球凝集素タンパク質から得られたエピトープに対応する精製に用いられる他のペプチドである。Suv39h2の精製の促進に用いられる他のマーカーペプチドは、pGEX融合ベクターによってコードされたグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)である(例えば、Winnacker, From Genes to Clones, New York: VCH Pub., pp. 451-481(1987))。後述される他の融合タンパク質には、N末端又はC末端で免疫グロブリンに融合したSuv39h2が含まれる。

#### 【0016】

本発明の他の態様は、更に、Suv39h2ポリペプチドのエピトープと特異的に反応する抗体又は抗体標品に関する。

ポリクローナル抗体は、慣用的には、抗原Suv39h2又はその断片を注入することにより動物、特にウサギを免疫し、続いて免疫グロブリンを精製することにより得られる。

モノクローナル抗Suv39h2抗体は、Koehler & Milstein, 1975に記載された原理に従って行われる標準法により、動物、特にマウスを免疫し、次に免疫した動物からの抗体産生細胞を不死化することにより、例えば、ミエロマ細胞と融合し、モノクローナル抗Suv39h2抗体の免疫学的標準分析によって得られたハイブリドーマの上清をスクリーニングすることにより得ることができる。ヒトにおける治療又は診断用には、これらの動物抗体は、慣用的方法でキメラ化(Neuberger

et al., 1984, Boulianne et al., 1984)、又は人間化(Riechmann et al., 1988, Graziano et al., 1995)されてもよい。

【0017】

Suv39h2特異抗体は、高次クロマチン仲介染色体動態を理解するために、また、Suv39h2仲介病理学のヒト条件をスクリーニングするために使用し得る。

本発明は、また、トランスジーンを有するトランスジェニック非ヒト動物、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、カエル又はブタ、例えば、本明細書に記載されるSuv39h2遺伝子の異種形態を含む(好ましくは発現する)動物、又は内在Suv39h2遺伝子を誤発現する動物、例えば、1種以上のSuv39h2遺伝子の発現が破壊されている動物が特徴である。そのような動物は、突然変異又は誤発現Suv39h2対立遺伝子を含んでいる細胞疾患や組織疾患を研究するためのモデル又は薬剤スクリーニングのためのモデルとしての働きをし得る。

本発明の他の態様は、被検者、例えば、ヒト患者が望まない細胞増殖又は異常な分化制御を特徴とする疾患の恐れがあるかを決定する方法を提供するものである。該方法は、被検者の組織においてSuv39h2遺伝子の突然変異又は誤発現を特徴とする遺伝的病変を検出する段階を含んでいる。好適実施態様においては、遺伝的病変を検出する段階には、Suv39h2遺伝子からの1種以上のヌクレオチドの少なくとも1つの欠失の存在を断定すること；1種以上のヌクレオチドの遺伝子への付加、1種以上のヌクレオチドの遺伝子への置換、遺伝子の染色体交差再配列；遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルでの変化；遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在；又はタンパク質の非野生型レベルが含まれている。

【0018】

本発明において行われる発現と免疫局在実験は、減数分裂の高次クロマチンの新規成分としてのSuv39h2とXY体を同定することである。Suv39h2相同体Suv39h1とSuv39h2がヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMTase)活性を有すること及びSuv39h2によって、おそらくSuv39h1と協同して供給されるSuv39h2機能は雄性配偶子形成の絶対要件であることがわかった。本発明の実験は、雄性配偶子形成の可逆的阻止の新規戦略の標的としてSuv39h2相同体Suv39h2、及び任意によりSuv39h1を

同定することである。K9特異的ヒストンH3 HMTaseとして、また、雄性配偶子形成の要求として同定するために、Suv39h2相同体は有糸分裂や減数分裂で高次クロマチン依存性染色体安定性をモジュレートする能力、特に哺乳動物雄性配偶子形成をモジュレートする能力を有する化合物を同定する方法に有効である。この方法は、1種以上のSuv39h相同体をHMTase活性用基質の存在下及びメチル供与体の存在下に試験化合物とインキュベートする段階、及びHMTase活性に対する試験化合物のモジュレーティング効果を測定する段階で確認される。

#### 【0019】

好適実施態様においては、Suv39h2は一次スクリーンに、好ましくは組換え体で用いられる。次の段階で、Suv39h2のモジュレーター、例えば、インヒビターであると一次スクリーンで同定された化合物は、雄性配偶子に必要とされるSuv39h相同体をモジュレート、例えば、阻害する能力を二次スクリーンで分析する。この二次スクリーンは、上記Suv39h2と同じである。

Suv39h相同体は、適切なホスト、例えば、細菌、酵母、昆虫又は真核細胞中で発現させることにより標準法に従って組換えで作製され、例えば、GSTでタグ標識された場合にはグルタチオン-アガロースカラムで精製し得る。

Suv39h活性に対する影響を化合物について試験する場合、分析は、不可欠な特徴として、K9、メチル供与体、例えば、メチオニン又はS-アデノシル-L-メチオニンを含むヒストンH3タンパク質又はヒストンH3 N末端断片をSuv39h2を含有する標品とインキュベートする段階及び試験基質の存在又は不在下で活性のHMTaseを測定する段階を含んでいる。

用いられる基質は、天然に存在する基質、例えば、生化学的に精製したヒストンH3、組換えで作製したヒストンH3、又はK9メチル化部位を有するヒストンH3ペプチドに等価なもの又はミミックしたものであってもよい。

好ましくは、ヒストンH3断片ARTKQTARKSTGGKAPRKQL(配列番号7)が用いられる。

#### 【0020】

また、MTaseが高親和性/活性を有する修飾ペプチドを用いることができる。そのようなペプチドは、アミノ酸を置換及び/又は付加及び/又は欠失させ、MTase

親和性/活性の連続実験で基質を試験することにより設計し得る。

メチル供与体のメチル基は、好ましくは、基質に転移したときに定量し得る検出可能な標識、例えば、放射能又は色素生産性標識をもっている。

好ましくは、メチル供与体は、放射能標識したメチオニン又はS-アデノシル-L-メチオニンである。

標識したメチル供与体を用いる代わりに、酵素によるメチル化の際の基質は、特異抗体によって認識されたので標準免疫分析法、例えば、ELISAにより定量し得るエピトープとしての働きをするために用いられる。抗原としてメチル化基質、好ましくは小ペプチド、例えば、配列番号7に示される配列を有するペプチドを用い、標準法に従ってポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を得ることにより、このタイプの分析に用いられる抗体を得ることができる。ヒストンH3リシン9位に対するメチル特異抗体の作成と精製は、材料及び方法の項に記載されている。適切なH3-K9メチル抗体は、Nakayama et al., 2001にも記載された。

#### 【0021】

代替的实施態様においては、本発明のスクリーニング法は、ヒストンH3をリシン9でメチル化するとHP1タンパク質の抗親和性結合部位がつくられるという事実を用いる。この実施態様においては、メチル化の際、基質はHP1に結合することができ、次に標識した抗HP1抗体とインキュベートする。試験化合物の不在又は存在下での反応間の標識の強さの差は、MTaseに対する化合物のモジュレーション効果を表している。

HP1は、好ましくは組換え体で用いられる。HP1 cDNA配列の情報(Jones et al., 2000; 受託番号BC006821)に基づき、HP1を標準技術に従って組換えで作製する。組換えタンパク質又はその断片は、本分析方式に用いられるポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を作成するために用いられる。

好適実施態様においては、本発明の方法は、高スループットスケールで行われる。この実施態様の場合、主要な分析成分、特にSuv39h2は組換え体で用いられる。

高スループット方式の場合、MTaseインヒビターを同定する発明のスクリーニング法は、標準分析法に従って行われる。そのような分析は、Suv39h2又はSuv39

h変異体によって仲介された、メチル基の供与体から基質、例えば、ヒストンH3ペプチドへの触媒転移に基づくものである。これを達成するために、基質、例えば、ヒストンH3又はその変異体又は断片をキャリア、通常はマイクロタイタープレートに固定化し、組換えSuv39h2とメチル供与体とインキュベートする。

#### 【0022】

メチル供与体のメチル基は、標識、好ましくは色素原又は放射性標識をもっている。

蛍光又は放射性標識又は高スループットスケールで酵素反応を行う他の試薬は、市販されており、供給業者の説明書に従って使用し得る(例えば、モレキュラープローブ、ワラック)。適切な蛍光標識の例は、クマリン誘導体、例えば、7-アミノ-4-メチルクマリン又は7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリンである。放射性標識は $^{14}\text{C}$ 又は $^3\text{H}$ 原子であってもよい。Suv39h2によるメチル基の基質への転移の際に、色素原試薬の場合には、メチル供与体の色が定量し得る色に変化する。放射性メチル供与体を用いる場合には、メチル基は基質に転移し、直接定量し得る。

特定の分析設計は、種々のパラメーター、例えば、用いられる基質のサイズに左右される。短いペプチドを用いる場合には、蛍光消光法又は蛍光共鳴エネルギー転移法が下記のように適切な分析技術の例である。

#### 【0023】

基質は、例えば、ビオチンで標識されてもよく、そのとき反応は溶液中で行われ、次にストレプトアビジン被覆マイクロタイタープレート、例えば、放射性メチル基の場合には、シンチラントを含有している“フラッシュ”プレート、又はシンチラントで被覆されたプレートに移される。従って、基質のメチル化レベルは、適切なシンチレーションマシーン/リーダーで定量し得る。また、ビオチニル化基質がプレートにすでに結合されているストレプトアビジン被覆“フラッシュ”プレートで分析が行われ得る。このタイプの分析は、いわゆる“異種の分析”(中間の転移と洗浄段階を必要としない分析タイプ)の形で、例えば、ビオチニル基質が結合しているシンチラントとストレプトアビジンで被覆されたマイクロピースを用いることにより行うことができる。

ビオチンと同様に、タグ特異的抗体で被覆されたプレートに基質を固定化するのに適した他の一般に用いられるタグ、例えば、Flag、Myc、HA、GSTも上記分析に用いることができる。

変異体においては、この分析は、ELISA型の分析で行われる。この場合、メチル特異抗体は、プレートに結合したメチル化基質の量を検出するために用いられる。

#### 【0024】

また、プレートは、メチル化基質を捕捉するためにメチル化基質に対する抗体で被覆される。基質はタグか又は色素生産性標識され、結合したメチル化タグ標識/標識基質の量はタグ特異抗体によるか又は色素生産性標識レベルを測定することにより定量し得る。一例として、基質は直鎖又は分枝鎖ペプチド、例えば、色素生産性標識、例えば、ユウロピウムで標識されている[TARKST]<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>-K-cysであり、Suv39h2様MTaseでメチル化する際にはキャリア(例えば、マイクロタイタープレート)上に固定化されたLys9-メチル特異抗体(材料及び方法を参照されたい)のエピトープである。捕捉していない基質を洗い流してからユウロピウム標識を切断し、蛍光の増強と蛍光レベルを時間分割蛍光によって算出する。蛍光レベルは、メチル化基質レベルに直接関係している(図19)。

代替的实施態様は、ペプチドのメチル化がプロテアーゼによる切断に対する感受性を変えることができるという原理に基づいている。この原理を用いて、ペプチド基質のメチル化量を測定するために蛍光消光(共鳴エネルギー転移“RET”)分析を用いることができる。第1段階では、Suv39hペプチド基質は、メチル化部位と、認識/切断部位、例えば、トリプシン又はLysCの修飾(具体的な例では、リシンのメチル化)に感受性のある特定のプロテアーゼの認識/切断部位を有する。ペプチドは、一端近くに蛍光供与体、もう一端近くに受容体をもっている。切断していない基質においては、供与体と受容体間に残っている分子間RETにより基質の蛍光が消える。プロテアーゼによる(メチル化されていない)基質の切断の際に、切断産物がRET消光から遊離し、蛍光シグナルが生じる。基質のメチル化は、基質を切断するプロテアーゼの能力を破壊する。従って、プロテアーゼ活性の破壊(メチル化に比例する)は、シグナル抑制、全プロテアーゼ阻害の場合には、

基礎レベルまでの全シグナル抑制によって反映する。

#### 【0025】

このタイプの分析は次のように行うことができる。分析バッファー中の標識基質(例えば、一端に4-[[4'-(ジメチルアミノ)フェニル]アゾ]安息香酸(DABCYL)でもう一端に5-[(2'-アミノエチル)アミノ]ナフタレンスルホン酸(EDANS)で標識されたペプチド、又は一端にベンジルオキシカルボニルでもう一端に4-アミノメチルクマリンで標識されたペプチド)の溶液を黒い96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに移す。試験物質を特定の濃度で添加した後、ウェルにMTaseとメチル供与体を加える。反応条件下、メチル化反応に十分な時間、例えば、室温で40分間インキュベートした後、プロテアーゼ、例えば、トリプシンを添加し、適切な条件下で反応させ、最後に蛍光を蛍光光度計で励起波長、例えば、340 nmで発光波長、例えば、485 nmで測定する。

FRET分析を用いる場合においては、次の市販の標識対：ユウロピウム(Eu)とアロフィコシアニン(APC)、EuとCy5、EuとPE(ワラック、ツルク、フィンランド)が本発明の方法に適している。試験物質がMTase活性のモジュレーターである場合には、検出システムによっては、また、試験物質が阻害作用があるか活性化作用があるかによっては、試験物質の不在下の対照試料に比べて検出可能なシグナルの減弱又は増強がある。高スループット方式においては、Suv39h MTase活性のモジュレーティング効果を有する化合物は、試験物質を既知の分析原理に従って化合物ライブラリーからスクリーニングすることにより、例えば、マイクロタイタープレート上の自動システムにおいて同定し得る。

#### 【0026】

Suv39h2モジュレーターとして上記方法で同定された化合物は、有糸分裂や減数分裂で高次クロマチン依存性染色体安定性をモジュレートする能力を有する。

Suv39h2 HMTase活性を阻害する化合物は、ゲノム安定性の低下をもたらし、分裂する細胞、特に高増殖性腫瘍細胞を標的にする治療に使用し得る。好ましくは、他のゲノム脱安定剤、例えば、チューブリン結合剤のような有糸分裂インヒビター(タキサン、例えば、タキソール、パクリタキセル、又はエピテロン)と組合わせて投与される。SUV39H2インヒビターは、従来の腫瘍治療、例えば、放射線

療法又は化学療法、特にDNA損傷物質と一緒に又は腫瘍細胞を前感作するために前に用いることもできる。細胞のゲノムを脱安定化することにより、SUV39Hインヒビターは、細胞を同時/後続治療に更に感受性にする。

SUV39H2インヒビターは、好ましくは併用治療に用いられ、連続治療や一時治療に適用される。Suv39h二重ヌルマウスにおけるB細胞リンパ腫の発症だけが遅発性で起こるので(即ち、生後9ヶ月)、SUV39H2インヒビターによる一時治療によって、腫瘍の恐れが増加がすぐに引き起こされず、むしろ著しく増殖している細胞のゲノム安定性全体を弱めるにちがいない。

#### 【0027】

同様に、Suv39h2HMTase活性を高める物質は、本質的に不安定な細胞のゲノムを安定化するために用いることができ、増殖促進突然変異を得る傾向を小さくする。

Suv39h2モジュレーターとして同定された化合物の効力によって、正の対照としての働きをするSuv39h二重ヌル細胞による哺乳動物細胞における生体内効力が試験し得る。がん治療に有効な化合物は、染色体の安定性や分離を妨害しなければならず、これは核型により、例えば、FACS又は細胞学的標準技術によってDNA含量を分析することにより測定することができる。治療使用の可能性が二次スクリーンで確認された物質は、腫瘍細胞に対する効果を更に試験することができる。腫瘍細胞増殖の阻止を試験するために、初代ヒト腫瘍細胞をスクリーンで同定された化合物とインキュベートし、腫瘍細胞増殖の阻止を慣用の方法、例えば、プロモデスオキシウリジン又は<sup>3</sup>Hチミジン取り込みにより試験する。これらの分析において抗増殖作用を示す化合物は、腫瘍動物モデルで更に試験され、腫瘍の治療に用いることができる。

雄性配偶子形成に必要とされるSuv39h2のヒストンH3メチルトランスフェラーゼ活性をモジュレートすることにより、上記方法で同定された化合物は、雄性配偶子形成をモジュレートする能力を有する。従って、雄性不稔性の治療(SUV39H2 MTase活性を高める化合物を用いる)や可逆的雄性避妊(SUV39H2 MTase活性を阻害する化合物を用いる)に用いることができる。

#### 【0028】

Suv39h2モジュレーターとして同定された化合物の効力によって、哺乳動物において精子形成をモジュレートする生体内効力が試験し得る。化合物が成体雄マウスに投与され、稔性が分析され得る。

雄性稔性適用に企図された化合物は、Vigil et al., 1985に記載された動物モデル、Weinbauer et al., 2001に記載されたヒト精子形成の実験的研究に開発された動物モデル、又はLamb & Niederberger(1994)に記載されたヒト雄生殖欠損をミミックしている動物モデルで試験し得る。ヒト生殖疾患の評価に対する動物データの正しい適用に対するガイダンスは、Working, 1988に示されている。

本発明の方法により薬剤候補として同定された化合物の毒性と治療効果は、 $IC_{50}$ 、 $LD_{50}$ 、 $ED_{50}$ を測定するために細胞培養実験や動物実験を行うことが含まれる標準医薬手順によって決定し得る。得られたデータは、剤形(錠剤、カプセル剤、エアゾールスプレー剤、アンプル剤等)や投与経路(経口、バツカル、経鼻、非経口、直腸又は一時雄性避妊適用の場合には、局所徐放性剤形適用、例えば、生殖腺に又は隣接して植え込まれる徐放性マイクロペレット)に左右されるヒト投与量範囲を測定するために用いられる。有効成分として化合物を含む医薬組成物は、1種以上の生理学的に活性なキャリアや賦形剤を用いて慣用の方法で処方され得る。そのような製剤の製造方法は、手引き書、例えば、“レミントンの製剤化学”に見ることができる。

#### 【0029】

Suv39h2は安定な核型を維持するために必要であるので、腫瘍抑制剤-遺伝子としてみなすことができる。SUV39H突然変異がヒトにおける細胞形質転換事象の基礎にある因子であることがわかり、B細胞リンパ腫を発症する際にSuv39h二重ヌルマウスの分析によって強く示される場合には、遺伝子治療による野生型Suv39h遺伝子の再導入によりがん進行を遅らせ或いは抑えるゲノム安定性が増大することになることが予想され得る。

更に、機能研究のSuv39h消失から、Suv39hが雄性配偶子形成の機能に不可欠であることが証明される。Suv39h機能の消失は、ヒトにおける雄性稔性例のサブセットの基礎にあるものである。Suv39h2又はSuv39h1遺伝子を発育している配偶子に再導入するとこれらの欠損を調整する可能性がある。

遺伝子治療については、Suv39h DNA分子を投与することができ、好ましくはプラスミドに組換え体で直接又は組換えウイルス又は細菌の一部として含めることができる。要するに、生体内でも生体外でもSuv39h組換えDNAを適用するために遺伝子治療の方法を用いることができる。

生体内投与の例は、筋肉内経路によるか又は遺伝子ガンを用いて“裸の”DNAを直接注入することである。組換え生物の例は、ワクシニアウイルス又はアデノウイルスである。更に、Suv39h2ポリペプチドをコードしている核酸分子を生体内投与するために、核酸の合成キャリア、例えば、カチオン脂質、マイクロスフェア、マイクロペレット又はリポソームを用いることができる。

#### 【0030】

##### 材料及び方法

##### a) マウスSuv39h2の分子クローニング

210 bp EST DNAプローブ(Suv39h2のアミノ酸219-289をコードしている、図1を参照されたい)を、Suv39h2-ESTプライマー5' GGGGATGATATTTGTTGAAAACAC(配列番号8)と5' GGTTGGATTTTAATTTGTTGCTTC(配列番号9)を用いてマウスB細胞特異的(J558LとS194)cDNAライブラリーからPCR増幅した。このSuv39h2-EST DNAプローブを、E11.5日マウス胚 gt11 cDNAライブラリー(クロンテック)と 129/Svゲノムライブラリー(ストラタジーン)に対してスクリーニングし、結果として6つのcDNAと3つのゲノムクローンを単離した。最長cDNA(1kb; 4-Suv39h2)とゲノム(14kb)単離物を自動シーケンサー(アプライドバイオシステムズ)によるプライマーウォーキングによりシーケンシングした。配列分析により、cDNAがアミノ酸132-477をコードし、ゲノム配列がGENEファインダーで予想されるようにエキソン1-3を含んでいることが示された。Suv39h2 cDNAの失われた5' 配列をネストされたRACE増幅(マラソンcDNA増幅キット; クロンテック)によりJ558LとS194 cDNAライブラリーからエキソン3特異的プライマー5' GCCCTCCAAGTCAACAGTG(配列番号10)と5' GTGTTGAGGTAATCTTGCCATC(配列番号11)を用いて伸長した。RACE増幅によりエキソン2(アミノ酸83-131)が同定された。開始ATGを含むエキソン1をエキソン2に正しくスプライシングしたEST(受託番号AA959164)から推定し、その配列情報をゲノム配列と比較することにより確認した。

## 【0031】

## b) RNAの単離と分析

RNAの単離と分析を以前に記載されているように行った(Laible et al., 1997; Aagaard et al., 1999)。膜をストリンジェントなチャーチ条件(Sambrook et al., 1989)下で全長に近いSuv39h1を含む1.6 kb EcoRI cDNA断片又はSuv39h2のアミノ酸143~477をコードしている980 bp cDNA PCRアンプリコンと連続してハイブリダイズした。RNA標品の品質に制御するために、プロットをガドフ(Gadph)配列に特異的なDNAプローブと再ハイブリダイズした(Dugaiczyk et al., 1983)。

## 【0032】

## c) RNAプローブによるSuv39h1とSuv39h2発現のインサイチュ分析

Suv39h1とSuv39h2特異的リボプローブを得るために、PCR変換SalI/BamHI DNA断片を、SP6とT7 RNAポリメラーゼにより試験管内転写を可能にするpGEM-3Zf(プロメガ)のポリリンカーの中へクローン化した。Suv39h1のアミノ酸113-237をコードしている395 bp DNA内部断片と同様に、Suv39h2のアミノ酸186-290をコードしている325 bp DNA内部断片を用いた。この領域内のSuv39h1とSuv39h2ヌクレオチド配列は約53%しか同じでなく、交差ハイブリダイズしない。インサイチュRNAプローブを、SP6(EcoRIライン生成プラスミドのアンチセンスプローブ)又はT7 RNAポリメラーゼ(BamHIライン生成プラスミドのセンスプローブ)で転写することによりDIG-UTP(ベーリンガーマンハイム)で内部標識した。

全組織標品胚又は5 µm切片のパラフィン包埋精巢のインサイチュハイブリダイゼーションを65~70 °Cで行い、高ストリンジェンシーのもとで洗浄し、抗DIGアルカリホスファターゼ結合抗体と色素原基質としてBMパープル(ベーリンガーマンハイム)とインキュベートした後に検出処理した。

## 【0033】

## d) 核抽出液とタンパク質プロット分析

マウス精巢由来の核の単離を、記載されたプロトコールに従って行った(Bunic k et al., 1990; Motzkus et al., 1999)。精巢、HeLa細胞クローン又はPMEF由来の約30 µgの核抽出液を、抗myc、抗M31(HP1) (Wreggett et al., 1994)、最近報告された抗Suv39h1抗体と抗Suv39h2抗体(Aagaard et al., 1999)によるタン

パク質プロットで分析した。

【0034】

e) ウサギポリクローナル抗Suv39h2特異抗体の作成と精製

アミノ酸157-477を含むSuv39h2コード配列を、PCR増幅によりBamHI-EcoRI DNA断片の中へ変換し、細菌発現ベクター-pGEX-2T(ファルマシア)中でN末端グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)と枠内に合わせた。cDNAタンパク質の精製とGST-Suv39h2によるウサギの免疫化を記載されているように行った(Aagaard et al., 1999)。IgG画分をウサギ#2218の粗血清から調製し、GST-Suv39h1グルタチオン-セファロースビーズ(Aagaard et al., 1999)に対してバッチ前吸収し、GST-Suv39h2を装填したグルタチオン-セファロース(ファルマシア)により抗Suv39h2抗体をアフィニティー精製した。100 mMグルシンpH2.5で溶離した後、抗体を1/10容量の2 MヘプスpH7.9で中和した。これらのアフィニティー精製した抗Suv39h2抗体(濃度~0.5 mg/ml)を1:250又は1:500希釈度でタンパク質プロット分析に又は1:10~1:20希釈度で間接免疫蛍光に用いた。

【0035】

f) 精巣浮遊細胞の免疫蛍光分析

生後3~6ヶ月のC57B16/129マウスから精巣を外科的に切除し、プロテアーゼインヒビター(ロッシュバイオケミカルズ)を含有する冷MEM培養液(ギブコ)中に小刀の刃で細かく刻んだ。構造的に保存された浮遊細胞を、記載されている交差結合固定により調製した(Pandita et al., 1999)。精巣浮遊細胞を同量のPBS緩衝化(pH7.2)3.7%ホルムアルデヒド、0.1 Mスクロースと混合し、シラン化スライドガラスに載置し、スクロースの薄層で被覆されるまで乾かした。

Suv39hエピトープの間接免疫蛍光(IF)については、スクロース包埋細胞をPBSで簡単に洗浄し、0.2%トライトンX-100、PBSで30分間抽出し、PTBG(PBS、0.1% トゥイーン20、0.2% BSA、0.1%ゼラチン)に希釈したウサギポリクローナル抗Suv39h1(1:20;(Aagaard et al., 1999))又はウサギポリクローナル抗Suv39h2(1:20)抗体と40/Nでインキュベートした。PTBG中で3分間洗浄した後、CY3結合ヤギ抗ウサギ二次抗体(ベクターラボラトリーズ)又はヤギ抗ウサギビオチニル化二次抗体(1:500; ダイアナバ)と37°Cで45分間インキュベートし、アビジン-FITC(1

:1,000; シグマ)により第3インキュベートした後に可視化した。PBS、0.1%トウイン20中での3回の最後の洗浄後に、4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール(0.5 mg/ml)(DAPI; シグマ)を含有するアンチフェード溶液(ベクターラボラトリーズ)中の標品にした。染色の特異性を一次抗体の不在下で対照IF分析により確認した。個々のマウス精子形成細胞のステージングをSCP3正軸コアの展開とヘテロクロマチンの個々の分布によって求めた(Scherthan et al., 1996)。

#### 【0036】

二重標識実験については、試料をまず抗Suv39h2(1:10)抗体とインキュベートし、抗ウサギビオチニル化抗体とアビジン-CY3又はアビジン-FITCでサンドイッチ検出した。PBS中の1%ホルムアルデヒドで簡単に固定した後、SCP3又はH1tエピトープをウサギポリクローナル抗SCP3(1:1,000; (Lammers et al., 1994))又はウサギポリクローナル抗H1t(1:1,000; (Moens, 1995))抗体で検出し、二次ヒツジ抗ウサギFITC結合又はヒツジ抗ウサギCY3結合(共にダイアナバ)抗体で可視化した。同様に、Suv39h2をビオチンとアビジン-CY3で三重標識した後、試料をマウスモノクローナル抗Xmr(1:1,000; (Calenda et al., 1994)抗体とインキュベートし、二次ヤギ抗マウスFITC結合抗体(ダイアナバ)で検出した。

処理した試料を、63×と100×平面ネオ蛍光レンズと、赤色、緑色、青色蛍光励起用一重及び二重バンドパスフィルター(クロマテクノロジー、バトルボロー、バーモント州)を備えたツァイスアキシオホトエピ蛍光顕微鏡を用いて評価した。冷却したCCDカメラ(浜松)でデジタル白黒画像を記録し、ISIS蛍光画像分析システム(メタシステムズ)でRGB画像と組み合わせ、アドビホトショップ3.0で処理した。

#### 【0037】

##### g) GST融合タンパク質の作成及び精製

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質としてpGEX-2Tベクター(ファルマシア)から発現したGST-Suv1(82-412)産物が記載されている(Aagaard et al., 1999)。BamHI-EcoRI PCRアンプリコンをSUV39H1(82-412)、Suv39h2(157-477)、CLR4(127-490)(Ivanova et al., 1998)、EZH2(382-747)(Laible et al., 1997)及びHRX(3643-3969)(Tkachuk et al., 1992)の枠内融合をコードして

いるpGEX-2Tに転移することによりGST構築物を更に作成した。すべての構築物をシーケンシングにより確認した。

組換えタンパク質をE. coli株BL21の11培養物中で発現させ、10 mlのRIPAバッファ[フルセットのプロテアーゼインヒビター(ベーリンガーマンハイム)とリゾチーム(5 mg/ml; シグマ)を含有する(20 mMトリスpH7.5、500 mM NaCl、5 mM EDTA、1% NP-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム)に液体N<sub>2</sub>中で凍結解凍することにより可溶化した。可溶性タンパク質を遠心分離により透明にし、800 µlグルタチオンセファロースビーズ(ファルマシア)で精製し、RIPAバッファで2回洗浄した。タンパク質濃縮物をSDS-PAGEゲルのクーマシー染色で求めた。マトリックス結合融合タンパク質を試験管内HMTase分析に直ちに用いるか4 で貯蔵した。

#### 【0038】

##### h) 試験管内ヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMTase)分析

試験管内HMTase反応を、記載されているプロトコール(Strahl et al., 1999)に基づいて変更し、基質として10 µgの遊離ヒストン(H1、H3、H2B、H2A及びH4の混合物; ベーリンガーマンハイム)を含有する50 µlのメチラーゼ活性バッファ(MAB: 50 mMトリスpH8.5、20 mM KCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM -ME、250 mMスクロース)とメチル供与体として300 nCi S-アデノシル-[メチル-<sup>14</sup>C]-L-メチオニン(25mCi/ml)(アマシャム)の量において行った。通常、10 µgのマトリックス結合GST融合タンパク質を用い、HMTase活性を分析した。37 で60分間インキュベートした後、SDS充填バッファ中で煮沸することにより反応を止め、15%~18%SDS-PAGAでタンパク質を分離し、クーマシー染色とフルオログラフィーで可視化した。

#### 【0039】

##### i) 遺伝子ターゲティングによるSuv39h1とSuv39h2欠損マウスの作成

Suv39h1はX染色体に位置する。クローン化した部分Suv39h1ゲノム部位を用いてターゲティング構築物を作成した。プライマー-gM3-9(S11)とgM3-9(R1)により作成した1.2 kb Pfu PCRアンプリコンを相同の短い腕として用い、pGNA-Tベクターのnls-lacZ遺伝子と枠内でクローン化した。これを枠内のエキソン2の最初

の8アミノ酸に入れ、nls-lacZ遺伝子が標的部位からSuv39h1とlacZの最初の8アミノ酸の融合タンパク質を作成する。相同の長い腕としてSuv39h1ゲノムサブクローニングSuv39h1 #18からの5.4 kb SacI (フィルドイン)断片を用いた。

Suv39h2は常染色体であり、染色体2に位置する。クローン化した部分Suv39h2ゲノム部位を用いてターゲッティング構築物を作成した。プライマーSuv2S11とSuv2R1により作成した1.4 kb Pfu PCRアンプリコンを相同の短い腕として用い、pGNA-Tベクターのnls-lacZ遺伝子と枠内でクローン化した。これを枠内のエキソン2の最初の113アミノ酸に入れ、nls-lacZ遺伝子が標的部位からSuv39h2とlacZの最初の113アミノ酸の融合タンパク質を作成する。部位を不活性化する相同の長い腕としてSuv39h2ゲノムサブクローニングSuv39h2 #18からの4.9 kb MluI/ApaI (フィルドイン)断片を用いた。

これらの構築物をNotIで線状にし、R1 ES細胞(Suv39h1)とE14.1 ES細胞(Suv39h2)へエレクトロポレートし、G418選択によってES細胞を入れ、G418耐性コロニーについてPCRとサザンブロット分析により相同組換えをスクリーニングした。標的フィーダー依存性ES細胞をC57BL/6マウスの胎盤胞に注入し、偽妊娠雌に植え込み、キメラ子孫を作製した。キメラ雄とC57BL/6雌間の戻し交雑後に生殖系列伝達を得た。ヘテロ接合マウスを品種間育種してSuv39h1とSuv39h2の欠損マウスを得た。次にSuv39h1とSuv39h2の欠損マウスを品種間育種してSuv39h二重欠損マウスをつくった。

#### 【0040】

##### j) 胚幹細胞におけるSuv39h1とSuv39h2の遺伝子座のターゲッティング

Suv39h1座(X染色体)とSuv39h2座(染色体2)の部分的ゲノムクローン(O'Carroll et al., 2000)を用いて相同の短い腕と長い腕を作成し、戦略として -ガラクトシダーゼ(LacZ)が核局在シグナル(nls)で修飾されたSuv39h1の最初の40アミノ酸又はSuv39h2の最初の113アミノ酸の枠内融合タンパク質を作製した。ターゲッティングについては、1.2 kb Pfu PCRアンプリコンと5.4 kb SacI DNA断片はゲノムサブクローニングSuv39h1 #18に由来し、1.3 kb Pfu PCRアンプリコンと5.0 kb MluI/ApaI DNA断片をゲノムサブクローニングSuv39h2 #28から調製した(図11Aを参照されたい)。pGNA由来ターゲッティングカセットは、正の選択としてRSV-ネオ

マイシン(neo)遺伝子と2つのポリアデニル化部位を含有した。ジフテリア毒素A(DTA)遺伝子をMCIプロモーターの制御下に用いてランダムな組込みに対して選択し、3'の相同の長い腕を挿入した。NotIで線状にした後、Suv39h1及びSuv39h2のターゲティング構築物をフィーダー依存性R1及びE14.1(129/Sv)胚幹(ES)細胞にエレクトロポレートした。

#### 【0041】

選択した後、G418耐性ES細胞コロニーについて、Suv39h1(PCR1: 5'-ATGGGGGCGGGTTTTTCGGGTAGAC、配列番号12; PCR2: 5'-AAATGGTATTTGCAGGCCAC-TTCTTG、配列番号13)又はSuv39h2(PCR1: 5'-GAAAAGGTTGTTCTCCAGCTC、配列番号14; PCR2: 5'-GGATGGGATGGTGG-AATGGTTTTTAT、配列番号15)の短い腕の外部のプライマーとlacZ遺伝子(LacZ-PCR1: 5'-AACCCGTCGGATTCTCCGTGGGAAC、配列番号16; LacZ-PCR2: 5'-CTCAGGAA-GATCGCACTCCAGCC、配列番号17)内のプライマーを用いたネストされたPCRによって相同組換えをスクリーニングした。

プライマー-g24r(5'-GACTGC-CTAGTCTGGCACTGAACT、配列番号18)とg13(5'-GATCACTGCGTACATATAC-ACTGAT、配列番号19)で作成した、~500 bp外部Suv39h1イントロンプローブを有するPvuII消化ES細胞DNA、又はプライマー-P1f(5'-TAGACTT-CTACTACATTAACG、配列番号20)とP1r(5'-GATGTCAGTGGCTATGAATG、配列番号21)で作成した、~500 bp外部Suv39h2エキソン/イントロンプローブを有するHindIII消化ES細胞DNAのサザンブロット分析により満足すべきターゲティングを確認した。これらのDNAプローブは、野生型Suv39h1対立遺伝子からの4.5 kb断片と標的対立遺伝子からの4.0 kb断片、又はSuv39h2野生型と標的対立遺伝子からの11 kbと6.1 kbの断片を検出する。

#### 【0042】

##### k) Suv39h1欠損マウスとSuv39h2欠損マウスの作成と遺伝子型別

数種の独立した標的ES細胞クローンにより、突然変異が生殖系列を通り抜けるキメラマウスを生じた。Suv39h1<sup>-/-</sup>とSuv39h2<sup>-/-</sup>マウスを相互交差して複合Suv39h突然変異マウス(例えば、Suv39h1<sup>-/-</sup>、Suv39h2<sup>+/-</sup>; ヌル/het2)を作成し、番わせてSuv39h二重ヌル(dn)マウスを作成した。この実験に記載されたマウスはすべて129/SvとC57B1/6J由来の混合遺伝的背景が維持された。

突然変異マウスの遺伝子型別は、上記サザンブロット分析により行った。-Suv39h1抗体と-Suv39h2抗体によるマウス精巣からの核抽出液のタンパク質ブロット分析を以前に記載されているように行った(O'Carroll et al., 2000)。

#### 【0043】

##### l) Suv39h二重ヌル初代マウス胚線維芽細胞(PMEF)の作成及び分析

Suv39h1-/-/Suv39h2+/-複合突然変異マウスを相互交差した後に得られたE12.5日Suv39h二重ヌル胚からPMEFを得た。対照として、同じ遺伝的背景の野生型胚からPMEFを調製した。細胞周期プロファイルと増殖曲線分析については、記載されているように継代2のPMEFを分析した(Xu et al., 1999)。PMEF間期クロマチンの-phosH3(Hendzel et al., 1997)抗体による染色を記載されているように透過性を上げていない細胞において行った(Melcher et al., 2000)。生化学分析については、全核抽出液をポンソー染色で前調整し、-H3(アップステートバイオテクノロジー)抗体と-phosH3(Hendzel et al., 1997)抗体で免疫ブロットし、強化した化学蛍光(ECL)(アマシャム)を用いてペルオキシダーゼ染色により可視化した。

#### 【0044】

##### m) PMEFの増殖曲線及びFACS

野生型と突然変異細胞の増殖可能性を分析するために、PMEFを10 cm<sup>2</sup>皿に播種した。次の30継代に対して、3×10<sup>5</sup>細胞を30日毎に新しい10 cm<sup>2</sup>皿に連続して播種し(3T3プロトコール)、倍加率を求めた。継代3と継代8PMEF培養物のDNAプロファイルは、内部標準としてニワトリ赤血球核(ベクトンディキンソン)を用いてエタノール固定及びプロピジウム-ヨウ素染色細胞のFACSによって得た。

#### 【0045】

##### n) B細胞リンパ腫細胞の骨髄培養物及びFACS分析

wtとSuv39h dnのマウスからの骨髄細胞を、IL-3(10 ng/ml)、IL-6(5 ng/ml)、SCF(100 ng/ml)、FLT3リガンド(20 ng/ml)、GM-CSF(1 ng/ml)(すべてR&Dシステムズ製)、10 μMデキサメタゾン(シグマ)及びIGF-1(40 ng/ml)(シグマ)で補足したStemPro-34 SFM培養液(ライフテクノロジーズ)中で2週間培養した。培養物は、~3×10<sup>6</sup>細胞/mlの密度で増殖し、フィコール-バック比重遠心(ファルマシア)

により分化した細胞や死滅した細胞から精製した。

初代リンパ腫細胞を脾臓やリンパ節から70 $\mu$ mナイロンセルストレイナー(ベク トンディキンソン)を用いて得、5%熱失活ウシ胎児血清、2 mMグルタミン及び1 %ペニシリン-ストレプトマイシン(すべてギブコ-BRL)で補足したイスコブ変法 ダルベッコ培地(IMDM)中で培養した。単個細胞浮遊液を、 $\beta$ -メルカプトエタノール及びJ558L細胞を産生するrIL-7からの5%調整上清を更に含有している培地 中0/N増殖した。

個々の細胞表面マーカーを検出する抗体を用いたFACS分析により、腫瘍細胞の 同定を求めた。腫瘍細胞はすべて、B細胞マーカーB220-low(RA3-6B2)とCD19(1D3 )については二重の正であるが、T細胞マーカーCD3(145-2C11)、CD4(RM4-5)、CD8 (53-6.7)、又は顆粒球/マクロファージマーカーGr-1(RB6-8C5)、Mac-1(M1/70)と 赤芽球系列、Ter-119のマーカーについては負であった。大多数のB細胞リンパ腫 細胞も、CD43(S7)とIgM(R6-60.2)については二重の正であるが、一部のクローナ ル培養物はCD5(53-7.3)に対して反応性を示した。これらのFACSプロファイルに よって、ヒトにおける慢性リンパ系白血病と似ているSuv39h仲介腫瘍が確認され る(Foon & Gale, 1995)。

#### 【0046】

##### o) 染色体拡散と核型分析

PMEFと腫瘍細胞核型を、以前に記載されているようにコルヒチン停止中期染色 体拡散とギムザ染色中期染色体拡散について分析した(Czvitkovich et al., 200 1)。

精原細胞と精母細胞の中期拡散を、1%クエン酸ナトリウムでRTにおいて10分 間低張で膨潤し、カルノイ溶液(75%メタノール、25%酢酸)で4 0/Nで固定し た単離した輸精管断片から調製した。輸精断片を60%酢酸中で2分間インキュベ ートした後、単個細胞浮遊液をピペット添加を繰り返して作成し、予熱(60 )ス ライドガラス上に移し、ホッケー型ガラス棒で機械的にせん断することにより細 胞を拡散させた。

#### 【0047】

##### p) $\beta$ -methH3-K9抗体の作成と精製

ヒストンH3リシン9位に対するメチル特異抗体を作成するために、ジメチル化リシン(バケム)と末端システインを有する6量体ペプチド、 $-TARK(Me)_2ST-cys$ を作成した。抗原性と免疫原性を高めるために、リシン残基によってC末端に結合している4つの $-TARD(Me)_2ST-$ ‘フィンガー’からなる‘分枝鎖’ペプチドを合成した。この‘分枝鎖’ペプチドの配列は、 $[TARK(Me)_2ST]_4-K_2-K-cys$ である。ペプチドをKLHに結合し、ウサギポリクローナル抗血清を高め、‘分枝鎖’ペプチドが線状ペプチドより免疫原性が非常に大きいことを示した。

2つの正のウサギ(#2233と#2236)からの粗抗血清は‘分枝鎖’であるが修飾していない対照ペプチドに対してバッチ吸収し、続いてPoros(登録商標)カラムに架橋したジメチル化‘分枝鎖’抗原に対してアフィニティ精製した(Lachner et al., 2001)。結合した抗体を100 mMグリシンpH2.5で溶離し、1/10容量の2MヘプスpH7.9で中和した。抗体のメチル特異性は、修飾していない又はK9ジメチル化ヒストンH3ペプチドやwt又はSuv39h dn PMEFからの核抽出液を有するタンパク質プロットで確認した。アフィニティ精製  $-methH3-K9$ 抗体(濃度 $\sim 0.6$  mg/ml)は、タンパク質プロット分析については1:1,000で又は間接免疫蛍光については1:1,000 $\sim$ 1:5,000で使用し得る。

#### 【0048】

##### q) 間期クロマチンと中期染色体の免疫蛍光

継代6 PMEFを、2%p-FAで10分間氷上で固定し、洗浄し、阻止溶液(PBS、2.5% BSA、10%ヤギ血清及び0.1%トゥイーン20)とRTで30分間インキュベートし、 $-methH3-K9$ 抗体で4 0/Nにおいて染色した。0.2%BSAと0.1%トゥイーン20を含有するPBSで数回洗浄した後、一次抗体をAlexa Fluor488結合ヤギ  $-ウサギ$ 抗体(モレキュラープローブ)で検出した。DNAを4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)で対比染色し、試料をベクタシールド(ベクターラボラトリーズ)に埋め込んだ。

中期染色体の調製については、骨髓細胞又は一次腫瘍細胞を、コルキシン処理(0.5 mg/ml)(シグマ)により2.5時間停止させ、続いて0.6% KCl又はPBSバッファー(10 mMトリスHCl pH7.4; 10 mM NaCl; 5 mM  $MgCl_2$ )に37 °Cで15分間低張膨潤させ、サイトスピン(シャンドン)において2000 rpmで8分間遠心した。拡散した

細胞を直ちにPBS中氷冷2%p-FAで固定し、2回洗浄し、上記のように -methH3-K9抗体で染色した。

#### 【0049】

##### r) 精巣組織学

生体マウスから精巣を解剖し、ブインズ液(75%飽和ピクリン酸、5%氷酢酸、9.3%ホルムアルデヒド)で固定し、ヘマトキシリン/エオジンで染色した。輸精管のステージングをOakberg(1956)とRussel et al.(1990)に従って行った。マウス主要付随DNAプローブによるFISH分析を、最近記載されているように行い(Scherthan et al., 1996)、DeadEndアポトーシス検出システム(プロメガ)を用いて行った。更に、精巣凍結切片(O'Carroll et al., 2000)を -Scp、 -Hp1、 -phosH3及び -meth H3-K9抗体による免疫組織化学で分析した。

#### 【0050】

##### s) 生殖細胞の免疫蛍光及び減数分裂染色体拡散

精細胞の染色体拡散を、Peters et al.(1997a)を少し変更して調製した。単離した輸精管を機械的に破壊することによりDMEM培養液中で単個生殖細胞浮遊液を得た。数回洗浄し、ハイポバッファー(30 mMトリスHCl pH8.2、50 mMスクロース、17 mMクエン酸ナトリウム)にRTで10分間低張膨潤させた後、細胞を100 mMスクロース、15 mMトリスHCl pH8.2に再懸濁し、5 mMホウ酸塩pH9.2と0.15%トライトンX-100を含有する1%p-FAの薄膜で被覆した予めきれいにしたスライド上に拡散した。スライドを湿気のあるチャンバ内で~2時間徐々に乾燥し、-80 で貯蔵した。記載されている常染色体と性染色体の形態学の変化に従って減数分裂サブステージの分類を行った(Peters et al., 1997b)。

これらの生殖細胞標品の二重標識免疫蛍光を、ウサギポリクローナル -methH3-K9抗体及びヤギ -ウサギAlexa568結合二次抗体と連続インキュベートすることにより行った。1%p-FAに簡単に固定した後、試料をウサギポリクローナル -Scp3抗体(Lammers et al., 1995)とインキュベートし、ヤギ -ウサギAlexa488結合二次抗体で可視化した。更に、 -Scp3と -Scp1(Offenberg et al., 1991)、 -Scp3と -HP1 (Wreggett et al., 1994)、及び -Scp3と -phosH3(Hendzel et al., 1997)の抗体で共染色した(図16A-Cを参照されたい)。

## 【0051】

## t) EM分析

拡散した生殖細胞(上記)からのSC複合体の調製と銀染色をPeters et al.(1997 a)に従って行い、試料をジェオルEKII透過型電子顕微鏡で分析した。

## 【0052】

## 実施例1

## Suv39h2 cDNAのコード部分と概念的読み枠

哺乳動物Su(var)3-9相同体を更に同定するために、マウスSuv39h1又はヒトSUV39H1 cDNA(Aagaard et al., 1999)による配列類似性調査(Bassett et al., 1995; Altschul et al., 1997)により、DDBJ/EMBL/GenBankデータベースに関連する異なる発現配列タグ(EST)の存在することがわかった。特に、マウスESTは、Suv39h1/SUV39H1に相同であるか又は第2哺乳動物Su(var)3-9相同体を示している2つのカテゴリーに該当する。この2番目の種類のSuv39h-ESTに特異的なオリゴヌクレオチドを用いて、内部(クロモ及びSETドメイン保存配列を欠いている)DNAプローブをマウスcDNAからPCR増幅し、マウス胚生11.5日のcDNAライブラリーに対してスクリーニングした(材料及び方法を参照されたい)。6つの正の単離物の中から、最長の挿入断片をサブクローン化とシーケンシングし、クロモとC末端SETドメインを含んでいるほぼ全長のオープンリーディングフレームがわかった。しかしながら、マウスB細胞特異的細胞系J558Lと失われた5'端を伸長したS194からのcDNA鋳型によるRACE-増幅は、出発ATGを検出しなかった。より多くの配列情報を得るために、約14 kbの部分的Suv39h2ゲノムクローンを単離した(材料及び方法を参照されたい)。Suv39h1関連遺伝子の用いるゲノムcDNAとEST配列の比較によって、枠内停止コドンの前に共通配列を有するとともにエキソン2に正しくスプライシングし得るエキソン1(材料及び方法を参照されたい)の定義を可能にした。Suv39h1と相似しているこの新規な遺伝子をSuv39h2(Su(var)3-9 homolog 2として)と称した。複合コードSuv39h2 cDNAのヌクレオチド配列(~1.5 kb)と概念的読み枠(477アミノ酸)を図1に示す。

## 【0053】

図1は、Suv39h2 cDNAのコード部分の~1.5 kbヌクレオチド配列と概念的読み

枠を示す図である。枠内停止コドン(星印)の前にある出発ATGを含むエキソン1は、ゲノムSuv39h2配列と、エキソン2に正しくスプライシングしたESTから得られた。用いるゲノム配列から、エキソン1-3を同定することができ、それぞれのエキソン/イントロンの境界はヌクレオチド位置278、424及び1083に矢印で示されている。477アミノ酸Suv39h2タンパク質は、クロモドメイン(点線の囲み)、SETドメイン(下のグレイ)及びC末端尾部(濃いグレイのバー)を含む数種の保存配列モチーフを有する。N末端拡張断片の塩基性アミノ酸はグレイの塩で強調されている。更に、Suv39h1に保存されているシステイン残基は丸で囲まれている。推定核局在シグナルは下線がひかれている(図1)。

#### 【0054】

#### 実施例2

#### S.ポンベ、C.エレガンス、ドロソフィラ又はマウスSU(VAR)3-9関連タンパク質の保存ドメイン

477アミノ酸タンパク質の長さに対して、Suv39h2はSuv39h1と59%が同じである(412アミノ酸; (Aagaard et al., 1999))。Suv39h2は、Suv39h1に存在しない182アミノ酸の非常に塩基性(20.7%)のN末端拡張断片を有するが、非常に塩基性のN末端はC15H11.5 ORFにも見られる。プロタミンと明らかに似ているほかに、Suv39h2 N末端は、塩基性残基に制限されないリンカーヒストンH1のC末端の半分と中程度に配列が同じである(23.2%)。この伸長したN末端を除いて、Suv39h2はSuv39h1が以前に示した他の保存ドメインすべてを維持している(Aagaard et al., 1999)。例えば、いずれのタンパク質も130アミノ酸SETドメインコア(75.2%)と、3つの保存システイン残基をもつ特徴的なC末端尾部(69.6%)に同一性が高い。60アミノ酸クロモドメイン(62.7%)、SET結合システインを多く含む領域(54.9%)及び‘SU(VAR)3-9特異的’N末端(45.0%)もほとんど同じである。Suv39h1と一致しているSuv39h2は、635アミノ酸ハエタンパク質と比べて著しく短い。全部で5つの代表的SU(VAR)3-9関連タンパク質のアラインメントにより、これらの保存配列モチーフの中で特徴的なクロモドメインとSETドメイン及びC末端尾部だけがファミリー種によって共有されている。対照的に、SET結合システインは、C.エレガンスC15H11.5 ORFになく、SET隣接のシステインを多く含む領域の1/2未満が

保存されていると思われる。最も大きな変化はN末端に見られ、155アミノ酸拡張断片を有するSU(VAR)3-9は推定GTP結合部位を含み(Tschiersch et al., 1994)を含み、CLR4はクロモドメインの前にある配列を欠き、Suv39h2とC15h11.5 ORFは塩基性であるが異なるN末端拡張断片をコードしている。

#### 【0055】

図2は、マウスSuv39h1(412アミノ酸)、マウスSuv39h2(477アミノ酸)、ドロソフィラSU(VAR)3-9(635アミノ酸)、S.ポンベCLR4(490アミノ酸)及びC.エレガンスORF C15H11.5(503アミノ酸)の系統的關係を示す図である。タンパク質の全長に対して、Suv39h1は、Suv39h2と同一が59%、SU(VAR)3-9と同一が41%、CLR4と同一が35%、及びC15H11.5と同一が18%である。同様に、Suv39h2は、Suv39h1と同一が59%、SU(VAR)3-9と同一が39%、CLR4と同一が37%、及びC15H11.5と同一が22%である。高度に保存された配列モチーフが示され、クロモ(縦線の囲み)ドメインとSET(黒)ドメインと、C15H11.5内に一部だけ有するSET結合システインを多く含むクラスター(グレイ)を含んでいる。更に、SU(VAR)3-9ではマウスとハエのタンパク質(Aagaard et al., 1999)、推定GTP結合ドメイン(点の囲み)(Tschiersch et al., 1994)で共有されたN末端領域(横線の囲み)及びSuv39h2とC15H11.5では塩基性N末端(対角線の囲み)が強調されている。

#### 【0056】

##### 実施例3

##### マウス発育中のSuv39h1とSuv39h2の発現

Suv39h2特異的転写物の存在量は、ES細胞、試験管内分化胚様体(EB)及びE10.5日目~E15.5日目にあり、胚発現は約E10.5日目がピークである。対照的に、Suv39h2転写物はE17.5日目にほとんどダウンレギュレートし、生後の発育ではほとんどない。非常に似た動的発現プロファイルは、ES細胞と胚様体でのSuv39h1転写物の相対存在量がSuv39h2転写物と比べて減少していることを除いてSuv39h1にも見られる(図3、上のパネル)。Suv39h2とSuv39h1の空間的発現プロファイルを調べるために、Suv39h2特異的リボプローブとSuv39h1特異的リボプローブによる全組織標品インサイチュハイブリダイゼーション(材料及び方法を参照されたい)をE8.5日目とE9.5日目のマウス胚で行った。Suv39h2対照センスプローブにおいて

は残存している染色だけが認められるが、Suv39h2アンチセンスプローブには全部の胚全体にむしろ均一な発現が示されている。同様に、Suv39h1アンチセンスプローブは、転写物の広い分布を検出し、E12.5日目の胚の矢状切片に関する以前のインサイチュハイブリダイゼーションにおけるSuv39h1の偏在する発現と一致している(Aagaard et al., 1999)。胚組織のほかに、間充織由来尿膜は、Suv39h1アンチセンスプローブによって著しく染色されている。上記RNAプロットと合わせて、この比較分析からSuv39h1とSuv39h2の Maus 発育での著しい共発現と重なっている潜在的機能が示される。

図3は、未分化のCCE胚幹細胞(ES)、CCE細胞のレチノイン酸誘導試験管内分化後に得られた胚様体(EB)、及び胚生(E10.5-E17.5)と生後の発育(P1-P4)の種々の段階の全胚から調製された15  $\mu$ gの全RNAにおいてSuv39h1及びSuv39h2の転写物を検出するRNAプロット分析を示す図である。RNAの特性の対照として、RNAプロットはGapdh配列に特異的なプローブと再ハイブリダイズした。

【0057】

#### 実施例4

##### Suv39h2の精巣特異的発現

Suv39h2とSuv39h1の転写物の存在量は成体組織では非常にことなっている。Suv39h1は14成体組織を含むRNA標品のパネルでは広い発現を示すが、Suv39h2の発現は精巣にほとんど限定されたままであり、mRNAは2.7 kbと1.7 kb転写物として存在している。他の組織のほかに、卵巣でもSuv39h2転写物は著しくダウンレギュレートする。この精巣特異的発現を更に詳しく分析するために、成体精巣の切片についてインサイチュハイブリダイゼーションを行った。Suv39h2とSuv39h1アンチセンスプローブは輸精管の最外部細胞層において特異的発現が示され、対応する対照のセンスプローブは陰性であった。Suv39h2特異的転写物は、Suv39h1と比べて高レベルで生じる。拡大が大きくなると、B型精原細胞と前細糸期精母細胞の染色が支配的になる。Suv39h2特異的転写物は、いくつかの太糸期細胞と有糸分裂に不活性なセルトリ細胞が低レベルで検出される。合わせると、これらのデータは、精子形成の初期には男性生殖細胞におけるSuv39h2転写物の著しい発現を意味し、男性配偶子形成におけるSuv39h2の機能を示している。

図4は、腎臓(KI)、骨格筋(SM)、心臓(HA)、肝臓(LI)、胃(ST)、腸(IN)、肺(LU)、脳(BR)、脾臓(SP)、胸腺(TH)、精巣(TE)、卵巣(OV)、子宮(UT)又は胎盤(PL)を含む成体129/Sv組織から調製された15 µgの全RNAにおいてSuv39h1とSuv39h2を検出するRNAプロット分析を示す図である。

【0058】

#### 実施例5

##### Suv39h2に特異的な抗血清の作成

Suv39h2発現を生化学レベルで確認するために、マウスSuv39h2のアミノ酸157-477を含む組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質に対して高められたポリクローナルウサギ抗血清を作成した。この血清を関連のGST-Suv39h1抗原(Aagaard et al., 1999)に対して前吸収し、アフィニティ精製した(材料及び方法を参照されたい)。試験管内翻訳Suv39h2とヒトSUV39H1(マウスSuv39h1と95%が同じである; (Aagaard et al., 1999))のウェスタンプロット分析から、抗Suv39h2抗血清はSuv39h2遺伝子産物を特異的に認識したが種々の哺乳動物細胞系において内在タンパク質をほとんど検出できなかったことが示された。従って、初代マウス胚性線維芽細胞(PMEF)や成体精巣からの核抽出液を含むタンパク質プロットは、抗Suv39h1抗体や抗Suv39h2抗体でプローブされた。特異性とサイズの対照として、(myc)<sub>3</sub>-SUV39H1(HeLa-B55; 40)又はSuv39h2 cDNAのアミノ酸83-477をコードしている対応する(myc)<sub>3</sub>-Suv39h2構築物(HeLa-S2/5)を‘安定に’過剰発現するHeLa細胞系からの核抽出液を含めた(材料及び方法を参照されたい)。抗Suv39h1抗体によるイムノプロットングにより、HeLa-B55核抽出液におけるエピトープ(myc)<sub>3</sub>-SUV39H1(55 kDa)と内在SUV39H1(48 kDa)の存在が示された。しかしながら、内在Suv39h1は、PMEFでは検出できず、精巣では少量しか存在しなかった(図5、中のパネル)。対照的に、抗Suv39h2抗体はPMEFと精巣共に約53 kDaの内在タンパク質を認識し(図5、下のパネル)、HeLa-S2/5核抽出液においては異所性(myc)<sub>3</sub>-Suv39h2(83-477)と共泳動している。結論としては、Suv39h2はPMEFや精巣においてはSuv39h1より強く発現し、内在Suv39h2タンパク質のサイズはSuv39h2 cDNAのコード配列から予想される遺伝子産物とよく一致していることである。

## 【0059】

図5に示されている実験においては、HeLa-B55、HeLa-S2/5、初代マウス線維芽細胞(PMEF)及び成体精巢(TE)からの約30 µgの核抽出液を抗myc、抗Suv39h1、抗Suv39h2及び抗M31(負荷対照)抗体でイムノブロットした。HeLa-B55は、(myc)<sub>3</sub>-SUV39H1(3-412)を過剰発現し、HeLa-S2/5は(myc)<sub>3</sub>-Suv39h2(83-477)を過剰発現する。これらの異所性タンパク質は、矢印で示されている。内在Suv39h2(53 kDa)は、(myc)<sub>3</sub>-Suv39h2(83-477)と共泳動する。抗Suv39h1と抗Suv39h2抗体は、それぞれのエピトープに特異的であり、交差反応しない。

## 【0060】

## 実施例6

## 精子形成のほとんどの段階でのSuv39h2の動的ヘテロクロマチン結合

精巢綿棒標品の核における亜核局在内在Suv39h2タンパク質を、抗Suv39h2抗体による間接免疫蛍光により分析した(材料及び方法を参照されたい)。初期から後期までの精子形成を含む構造的に保存された浮遊細胞において起こりうる染色体結合を調べた。内在Suv39h2は、前減数分裂核において分散した分布として、またすべての前細糸期核においては顆粒状染色として見られる(図6、左の核)。細糸期から複糸期までの精母細胞の発育の間、明るいDAPI対比染色によって可視化されたヘテロクロマチンのブロックに弱い異なるSuv39h2染色が現れる。驚くべきことに、中太糸期でのXY体内に有する性染色体に著しいSuv39h2シグナルが蓄積する(下記を参照されたい)。減数分裂後、半数体精細胞の凝縮している異質染色性フォーカスにSuv39h2が豊富なままである(図6、右の核)が、成熟精子においてはもはや検出できない。

図6は、抗Suv39h2抗体による精巢浮遊細胞の間接免疫蛍光を示す図である。DNAをDAPIで対比染色した(下のパネル)。個々のマウス精細胞のステージングを材料及び方法に記載されるように求め、前細糸期精原細胞(PL)、初期、中期及び後期精母細胞(eSP、mSP、ISP)、複糸期精母細胞(dSP)、及びラウンド精細胞(rST)が含まれた。

## 【0061】

## 実施例7

Suv39h2はX-Y体に存在する性染色体において蓄積する

Suv39h2の性染色体による特異的蓄積を証明するために、Suv39h2とSCP3、及びSuv39h2とXmrの二重免疫蛍光分析を行った。SCP3は、常染色体の相同対合で形成される対合複合体の軸コアを染色する(Lammers et al., 1994)。対照的に、Xmrタンパク質は性染色体の軸とクロマチンと結合し(Calenda et al., 1994)、細糸期の中にXY体に封入され、対合が常染色体と相対して遅れる。これらの共局在の結果から、Suv39h2シグナルの濃縮が性染色体の不对軸の周りの拡散SCP3染色と重なるが、対常染色体のSCと重なっていないことがわかる(図7、上のパネル)。更に、Suv39h2は、Xmr染色と性染色体の不对軸コアの存在によって特定されるようにXY体と共局在する(図7、中央パネル)。これらのデータは、減数分裂Iの後前期において性染色体のクロマチンと特異的に蓄積することを意味する。Suv39h2が性染色体と蓄積するタイミングと分化段階を明確に測定するために、この分析はSuv39h2の2重免疫蛍光と精巣特異的ヒストンH1変異体H1tによって拡張される(Meistrich, 1987)。H1tは中太糸期に現れ、半数体精細胞が伸長段階に達するまで検出される。従って、精母細胞を発育する際に、H1tは中太糸期から複糸期までの精母細胞Iを特定する(Moens, 1995)。H1t染色太糸期核の分析により、Suv39h2-正のXY体が同時に存在することがわかり、中後太糸期から複糸期までにSuv39h2と性染色体との特異的結合が示された。

図7は、成体精巣浮遊液の中太糸期から複糸期の精母細胞におけるSuv39h2とSCP3(上のパネル)、Xmr(中央パネル)、又はヒストンH1t(下のパネル)の二重標識間接免疫蛍光の結果を示す図である。

【0062】

#### 実施例8

Suv39h2はHMTase活性を含んでいる

SU(VAR)3-9タンパク質ファミリーのSETドメインは、6種の植物MTaseによる重要な配列と二次構造を共有している(Rea et al., 2000)。SETドメインはクロマチン調節遺伝子に最も保存されたタンパク質モチーフの1つであることから(Stassen et al., 1995; Jenuwein et al., 1998)、SU(VAR)3-9ファミリー種か又は他のSETドメインタンパク質がHMTase活性を含んでいるかを分析した。GST-SUV39H1

(82-412)に対応するマウスSuv39h2、S.ポンベCLR4(Ivanova et al., 1998)、ヒトEZH2(Laible et al., 1997)及びヒトHRX(Tkachuk et al., 1992)の伸長したSETドメインのGST融合産物を作成し、HMTase活性を分析した。分析したSU(VAR)3-9ファミリー種、SUV39H1、Suv39h2及びCLR4はHMTase活性を示した。対照的に、GST-EZH2(382-747)とGST-HRX(3643-3966)は共に遊離ヒストンに対するHMTase活性を検出できなかった(図8b)。

図8Aは、CLR4、Suv39h2、SUV39H1、EZH2及びHRXタンパク質のドメイン構造を示す図であり、矢印はGSTへのN末端融合の境界である。システインを多く含む領域はグレイの点描で示されている。

図8Bの実験においては、S.ポンベCLR4[GST-CLR4(127-490)]、マウスSuv39h2[GST-Suv2(157-477)]、ヒトEZH2[GST-EZH2(382-747)]、ヒトHRX[GST-HRX(3643-3969)]及びヒトSUV39H1[GST-SUV1(82-402)]をコードしている約10 µgの指示融合タンパク質を、材料及び方法に示された遊離ヒストンとの試験管内HMTase反応に用いた。

## 【0063】

### 実施例9

#### マウス生殖系列におけるSuv39h1とSuv39h2の部位のターゲッティング

マウスSuv39h遺伝子は2つの遺伝子座、Suv39h1とSuv39h2でコードされている。Suv39h機能とSuv39h依存性K9 H3メチル化の生体内有意性を調べるために、Suv39h1とSuv39h2双方を欠損したマウス株を標準法に従って作成した。ターゲッティング戦略を図9に示すとともにSuv39h1とSuv39h2双方のヌルアレレの作製が示されている。両遺伝子の突然変異により、両部位間の機能的重複性の結果として生存可能マウスと稔性マウスが得られる。それ故、Suv39h1とSuv39h2の欠損株を相互交差してSuv39h二重欠損マウスを作製した。二重突然変異マウスはメンデル未満の割合で生まれ、約20%の予想二重突然変異体が見られた。

図9は、X結合Suv39h1部位を失活させるために用いられる慣用のターゲッティング戦略を示す図である。図9Bは、野生型の脾臓(Sp)、肝臓(Li)、腎臓(Ki)、及び脳(Br)由来のSuv39h1のノーザンプロット分析を示す図である。図9は、常染色体Suv39h2部位を失活させるために用いられる慣用のターゲッティング戦略を示

す図である。(下のパネル)野生型とSuv39h2ヌル精巢に由来するタンパク質抽出液に対する抗Suv39h2抗体によるウェスタンブロット分析。

【0064】

#### 実施例10

Suv39h2機能は雄性配偶子形成に必要である

行われた実験においては、生存二重突然変異体は増殖を遅らせ、アポトーシス精原細胞に付随した性腺機能不全(図10a)を示すことが認められた。いくつかの生存精細胞においては、精子形成で生じるセントロメアの漸進的クラスター形成が致命的に損なわれる。二重突然変異精巢の組織学的分析によって、Suv39h2二重欠損マウスを不稔にする成熟精子を欠く非常に異常な細管が示されている。

図10は、野生型とSuv39h二重ヌルマウスから単離した精巢を示す図である。図10Bは、野生型とSuv39h二重ヌルマウスから単離した精巢の組織学的分析を示す図である。精細管の切片が示されているように、Suv39h二重ヌル細管は成熟精子を欠いている。

【0065】

#### 実施例11

a) Suv39h二重欠損マウスの作成

マウスSuv39h HMTaseは、X染色体(Suv39h1)又は染色体2(Suv39h2)においてセントロメア基部位置に地図作製した2つの遺伝子座によってコードされている(0' Carroll et al., 2000)。両遺伝子座を、細菌LacZ遺伝子とRSVネオマイシン選択カセットを有する進化的に保存されたクロモドメインの一部を置換する慣用のターゲティング法を用いて胚幹(ES)細胞において相同組換えにより独立して破壊した(図11a)。これらのターゲティング戦略により、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を維持するSuv39h1の最初の40アミノ酸又はlacZを有するSuv39h2の最初の113アミノ酸の枠内融合タンパク質が作製される。成功したターゲティングES細胞クローンを用いて突然変異Suv39h1又はSuv39h2対立遺伝子を生殖系列まで伝達したキメラマウスを作成した(図11b)。野生型、Suv39h1欠損又はSuv39h2欠損マウス由来精巢核抽出液の $\beta$ -Suv39h2特異抗体によるタンパク質ブロット分析により、それぞれのタンパク質がないことが示され、両遺伝子について機能不全対立遺伝

子を生じたことが証明された(図11c)。

【0066】

b) Suv39h二重ヌルマウスの障害生存度

Suv39h1か又はSuv39h2の欠損したマウスは正常な生存度と稔性を示すが、明らかな表現型を示さず、両遺伝子がマウス発育中に機能的に不必要になってしまうことが示されている(0'Carroll et al., 2000)。それ故、Suv39h1<sup>-/-</sup>とSuv39h2<sup>-/-</sup>マウスを相互交差して複合Suv39h突然変異体を作成し、これらを用いてSuv39h二重ヌル(dn)マウスを得た。数種の異なる相互交差から得られたSuv39h dnマウス(表I)はメンデル未満の割合で生まれ、発育が遅れ(図11d)、雄の性腺機能不全を特徴とする。例えば、全部で197匹のマウスのうち46匹が二重ヌルであると予想されたが(表I)、15匹のSuv39h dnマウス(~33%)が生まれたにすぎなかった。マウス胚形成の分析により、E12.5日目までSuv39h dn胎児の正常な発育が示されたが、後の段階ではSuv39h dn胎児は小さくなり、再吸収と出生前致死性の割合が増える。合わせると、これらの結果から、Suv39h遺伝子が正常な生存度、及び出生前と出生後の発育には必要であることが証明される。

【0067】

図11は、次のSuv39h1欠損マウスとSuv39h2欠損マウスのターゲッティングと遺伝子型別を示す図である。(A)Suv39h1とSuv39h2ゲノム遺伝子座の概略図、置換ベクター及びターゲッティングした対立遺伝子。エキソンは黒い囲みで示され、数字はそれぞれのエキソンの開始アミノ酸位置を意味する(0'Carroll et al., 2000)。識別制限部位とサザンプロット分析に用いられる外部プローブも図示されている。pAはポリアデニル化シグナルを意味する。(B)Suv39h1<sup>+/-</sup>又はSuv39h2<sup>+/-</sup>異型接合相互交差の子孫から単離したPvuII消化DNA又はHindIII消化DNAのサザンプロット分析。(C)野生型(wt)、Suv39h1<sup>-/-</sup>(Suv<sup>-/-</sup>)及びSuv39h2<sup>-/-</sup>(Suv2<sup>-/-</sup>)マウス由来精巣核抽出液の<sup>-</sup>Suv39h1抗体と<sup>-</sup>Suv39h2抗体によるタンパク質プロット分析。Suv39h1又はSuv39h2のタンパク質のサイズは矢印で示されている。(D)Suv39h二重ヌル(dn)マウスは出生と成体期に成長が遅れている。

【0068】

実施例12

### Suv39h dn胚線維芽細胞における染色体誤分離

Suv39h依存性欠失を更に詳しく調べるために、初代マウス胚線維芽細胞(PMEF)をE12.5日目の胎児から得た。最初の20継代に対する3T3プロトコールにおける野生型(wt)とSuv39h dn PMEF間の比較発育曲線から、Suv39h dn PMEFが継代12まで倍加率が大きいことが示された(図12a)。後の継代では、Suv39h dn PMEFは特徴的なヘイフリック発症を生存した不死化wt PMEFより増殖可能性がわずかに低下したように見える。Suv39h dn PMEFが大核や多核のような異常核形態をもつ細胞の重要な画分を含み、障害有糸分裂や染色体誤分離を連想させることが最近わかった(Rea et al., 2000)。それ故、継代3と継代8のwtとSuv39h dn PMEFのDNA含量をFACSにより分析した。FACSプロファイルの異数体の肩によって示されるように、Suv39h dn PMEFは4N DNA含量より大きい細胞を既に含有している(図12B、上のパネル)。継代8においては、wt PMEFは主に老化する。対照的に、Suv39h dn PMEFは増殖を続けるが、多くの細胞は八倍体DNA含量を示している(図12B、下のパネル)。

#### 【0069】

ゲノム不安定性を更に確認するために、継代8 PMEFによる核型分析を行った(図12C)。特に、2つの独立したwtと2つのSuv39h dn PMEF培養物の各々の45核型を調べてた。図12Dに示されるように、wt核型の主な画分は非二倍体であり、染色体数は25~82の範囲にある。異数性はSuv39h dn核型において著しく増加し、染色体数38~162を含んでいた。特に、wt PMEFはランダム配列の異数体核型を有し、Suv39h dn PMEFは主に低四倍体又は低八倍体である。Suv39h dn PMEFの染色体は、正常形態に見え、ロバートソン融合は認められなかった。結論としては、Suv39h機能がないことにより、主にすべての組の染色体の分離を損なうことによりゲノム不安定性が生じることであった。

図12は、次のSuv39h dn PMEFにおける染色体不安定性を示す図である。(A)最初の20継代に対する3T3プロトコールで求めたwtとSuv39h dn PMEFの相対倍加率。(B)継代3と継代8におけるwtとSuv39h dn PMEF集団培養のDNA含量。(C)wtの染色体の二倍体数( $n = 40$ )とSuv39h dn PMEFの染色体の高四倍体数( $n = 82$ )を示している中期拡散。(D)継代8における2つのwt培養物と2つのSuv39h dn PMEF培養物に

よる統計核型分析。各培養について、45の中期を評価した。

【0070】

実施例13

Suv39h突然変異マウスにおけるB細胞リンパ腫の発症

次に、Suv39h突然変異マウスについて腫瘍発生の出現率を分析した。大多数のSuv39h dnマウスが生存可能でないことから、Suv39h1か又はSuv39h2の遺伝子量が異なるはっきりしたSuv39h遺伝子型を調べた。例えば、X結合Suv39h1遺伝子のランダムX失活は、ほとんどの成体組織において著しくダウンレギュレーションするSuv39h2の機能コピーの存在下にでき、Suv39h1+/-マウスにおける腫瘍の恐れを増しうる事が予想された(0'Carroll et al., 2000)。実際に、異型接合する(het)か又はSuv39h1部位のない98マウスの試験により、生後9~15ヶ月の間に発生した腫瘍形成の浸透度~28%が示された(表II)。これらの腫瘍は、ヒトにおけるヒジキンリンパ腫を徐々に進行するFACSプロファイリング(材料及び方法を参照されたい)が似ている主としてB細胞リンパ腫(図13A)である(Foon & Gale, 1995)。遅い発症のB細胞リンパ腫の腫瘍出現率は、少しの生存可能なSuv39h dnマウス(n=6)において~33%であった。対照的には、Suv39h2+/-又はSuv39h2-/-マウスはわずか5%の浸透度でB細胞リンパ腫を発症し(n=21)、対照の野生型マウスでの腫瘍形成は認められなかった。

【0071】

初代培養物は、Suv39h dnとSuv39h1-/-、Suv39h2+/(null1/het2)腫瘍マウスのリンパ節に由来し、B細胞リンパ腫細胞の核型を分析した。上記Suv39h dn PMEF集団培養に記載された異数体と一致して、これらの腫瘍細胞は、主に二倍体であるが高四倍体核型を含んでいた(図13B)。驚くべきことに、いくつかの独立したB細胞リンパ腫で調べたSuv39h dn腫瘍核型は、末端セントロメア領域まで結合したままである不分離染色体によって確認される(図13C)。これらの‘チョウ’染色体は、Suv39h HMTase活性がないと、中期染色体間の持続的相互作用を高めることにより狭セントロメアヘテロクロマチンの特性と機能が損なわれるという興味ある可能性を生じる。実際に、新しく開発された抗体によるH3-K9メチル化の分析は、Suv39h null1/het2 B細胞リンパ腫細胞に由来する腫瘍染色体の狭セン

トロメアヘテロクロマチンにmethH3-K9染色のないことを示している。

図13は、次のSuv39h突然変異マウスにおけるB細胞リンパ腫の発症を示す図である。(A)生後11ヶ月のSuv39h dn腫瘍マウスと野生型対照マウスの脾臓とリンパ節。(B)腫瘍関連Suv39h dn(null11/null12)とSuv39h1-/-、Suv39h+/(null11/het2)マウスのリンパ節に由来する4つの独立した初代培養物の核型分析。(C)末端セントロメア領域まで結合したままである‘チョウ’染色体を示している初代Suv39h dn B細胞リンパ腫細胞由来の中期拡散。

【0072】

#### 実施例14

Suv39h dnヘテロクロマチンにおけるH3-K9メチル化の不在

PMEFと腫瘍細胞に対する上記核型分析により、全染色体補体の分離が狭セントロメアクロマチン体制におけるSuv39h依存性欠失によって損なわれてしまう一般メカニズムが示された。ヒストンメチル化とヘテロクロマチン形成においてSuv39h HMTaseの役割を直接評価するために、リシンでのジメチル化のときに(-methH3-K9)ヒストンH3を特異的に認識するウサギポリクローナル抗血清を高めた。図14Aに示されるように、この抗血清は、DAPIを多く含むヘテロクロマチンとほとんど重なるwt PMEFにおいて限局染色を検出する。1つのSuv39h1欠損又はSuv39h2欠損マウスに由来するPMEFにおいては、~75%の細胞が-methH3-K9抗体による異質染色性フォーカスにポジティブ染色する。重要なことに、methH3-K9の異質染色性染色はSuv39h dn PMEFにおいては消失した(図14A、右の列)。

【0073】

骨髄細胞由来の有糸分裂染色体を、-methH3-K9抗血清により分析した。wt拡散においては、狭セントロメアヘテロクロマチンを選択的に可視化し(図14Bの挿入部分を参照されたい)、Suv39h dn拡散では残存している染色だけを検出した。従って、活性セントロメアにおけるSUV39H1の局在と一致している(Aagaard et al., 2000)これらのデータから、両Suv39h酵素が体細胞の狭セントロメアヘテロクロマチンにおいてH3-K9をメチル化する主なHMTaseであることが証明される。更に、これらの結果から、ヘテロクロマチンの新規な細胞学的マーカーとして-methH3-K9抗体が確認され、MATとCEN領域でのH3-K9メチル化の濃縮が機能的Clr

4酵素に依存していることがわかった最近のS.ポンベ研究が確証される (Nakayama et al., 2001)。

図14は、次の狭セントロメアヘテロクロマチンにおけるSuv39h依存性H3-K9メチル化を示す図である。(A)野生型(wt)、Suv39h1<sup>-/-</sup>、Suv39h2<sup>-/-</sup>、及びSuv39h dn PMEFの間期クロマチンに対するDAPIとmethH3-K9染色。%は異質染色性フォーカスにおけるH3-K9メチル化を示す間期核を意味する。(B)試験管内培養したwtとSuv39h dn骨髄細胞から調製した有糸分裂染色体に対するDAPIとmethH3-K9。

【0074】

#### 実施例15

##### a) Suv39h dnマウスにおける性腺機能不全と完全精子形成不全

Suv39h遺伝子の発現パターンは、精子形成で重要な役割を示している (O'Carroll et al., 2000)。実際に、Suv39h dn雄(n=7)は不稔であり、成熟精子を含まず、それらの精巣重量はwt雄に比べて1/3~1/10に減少した(図15A)。精子形成不全を更に詳しく調べるために、組織学的切片を行い、分裂で増殖する精原細胞(Sg)から減数分裂精母細胞(Sc)への特徴的分化と減数分裂後半数体精細胞(St)を示す正常に発育した輸精管が証明される(図15A)。対照的に、精子形成はSuv39h dnマウスにおいて致命的に損なわれ、初期~後期精母細胞間の転移で分化停止が明らかであり、結果として非常に空胞化した輸精管が生じる(図15A)。

マウス主サテライトDNAプローブによるFISH分析とTUNEL分析を用いてSuv39h依存性精子形成障害を確認した。精原細胞の有糸分裂増殖は正常に見え、前細糸期精母細胞の%の3~10倍増加が認められた。これらの前細糸期精母細胞はしばしば拡大した。これらの結果から、有糸分裂前期への侵入はSuv39h機能不在で遅れることが示される。この遅れにもかかわらず、中太糸期までの減数分裂前期までの進行は正常に見えた。しかしながら、中~後太糸期の間、ほとんどの精母細胞はアポトーシスし、結果として後太糸期精母細胞をほとんど欠きかつ半数体精細胞を含んでいないIV-VI期細管が生じる。結論は、Suv39h遺伝子機能がないと、減数分裂前期への侵入遅延を誘起し、中~後太糸期間に精母細胞の著しいアポトーシスの引き金になることであった。

【0075】

### b) 減数分裂ヘテロクロマチンにおけるH3-K9メチル化

Suv39h依存性精子形成不全が減数分裂ヘテロクロマチンの異なる障害と関係づけられるかを調べるために、精巣拡散標品と凍結切片を -methH3-K9抗体により分析した。wt標品においては、-methH3-K9抗体は精原細胞(B-Sg)や前細糸期精母細胞(preL-Sc)内の異質染色性フォーカスを装飾する(図15B、左の画像、上のパネル)。初期減数分裂前期(Zyg-Sc)と初期太糸期においては、-methH3-K9染色はヘテロクロマチンを除外しないが、真性染色質に広がった。中太糸期から複糸期までと移動期には、-methH3-K9染色は、伸長精細胞中のヘテロクロマチンの1つのブロックに凝縮する異質染色性クラスターに制限された(図15B、上のパネル)。ヒストンがプロタミンで置換されている伸長精細胞と成熟精子中のMethH3-K9シグナルは検出しなかった。この染色パターンの確実性は、対合複合体(Offenberg et al., 1991; Lammers et al., 1995)、HP1 (Motzkus et al., 1999)及びphosH3(Cobb et al., 1999)を認識する抗体による共同在分析で確認された(Cobb et al., 1999)。従って、上記PMEFの体細胞染色と同じように、これらの結果は、H3-K9のメチル化が雄精生殖細胞を分化する際に減数分裂ヘテロクロマチンに特異的なマーカーであることを意味する。

【0076】

### c) Suv39h dn精子における障害H3-K9メチル化と異数性

Suv39h dn精巣拡散由来標品においては、精原細胞と前細糸期精母細胞にはH3-K9メチル化は存在しない(図15B、左の画像、下のパネル)。減数分裂前期の発生において初期精母細胞(Zyg-Sc)を確認する著しい真性染色質の染色は認められなかった。H3-K9メチル化の障害は、~60%のSuv39h dn精原細胞におけるphosH3の分散分布に付随した。対照的に、HP1はwtとSuv39h dn精原細胞双方にほとんど検出されなかった。

驚くべきことに、中太糸期前から、狭セントロメアヘテロクロマチンにおけるmethH3-K9の野生型染色は見られなかった(図15B、下のパネル)。常染色体におけるHP1局在とphosH3シグナルは、Suv39h dn後期精母細胞において普通に生じた。従って、これらの結果から、精原細胞や減数分裂前期の非常に初期においてはSuv39h HMTaseがH3-K9メチル化を選択的に調節することが証明される。PMEFによ

る分析と同様に(上記参照)、四倍体精母細胞を生じる結果となるSuv39h dn精原細胞における完全染色体誤分離の~5倍増加率が認められた(図16C、下を参照されたい)。要するに、これらのデータは、Suv39h HMTaseの初期及びステージ特異的減数分裂の役割を特定し、減数分裂前期、移動期及び精細胞中のヘテロクロマチンをメチル化し得る新規なH3-K9 HMTaseの存在を更に示している。

#### 【0077】

図15は、次のSuv39h dnマウスの生殖細胞における精子形成不全とH3-K9メチル化を示す図である。(A)生後5ヶ月の野生型とSuv39h dnマウス精巢の全体のサイズと組織学。Suv39h dn精巢によって精母細胞(Sc)と精細胞(St)を欠いている多くの輸精管が示される。特に、いくつかの輸精管(1)は接合糸期精母細胞(Zyg-Sc)を含むが、更に進んだ分化段階(2)は太糸期にアポトーシス精母細胞(矢印)を示している。更に後の分化段階では(3)、太糸期精母細胞はほとんど完全に存在しない。一部の細管(4)は、セルトリ細胞(SeC)のみを含んでいる。略号: 中間(In-Sg)及びB型精原細胞(B-Sg); 前細糸期(PreL-Sc)、接合糸期(Zyg-Sc)、中太糸期(mPach-Sc)、後太糸期(IPach-Sc)、複糸期(Diplo-Sc)及び移動期/M-I(M-I-Sc)精母細胞; 丸い(rSt)、伸長している(eISt)及び伸長した(eSt)精細胞; セルトリ細胞(SeC)。

(B)wt(上のパネル)とSuv39h dn(下のパネル)生殖細胞の -methH3-K9抗体(ピンク)と -Scp3(グリーン)抗体による二重標識免疫蛍光。DNAをDAPI(ブルー)で対比染色した。Suv39h dn生殖細胞においては、H3-K9メチル化は増殖している精原細胞(B-Sg)や前細糸期精母細胞(PreL-Sc)に存在せず、接合糸期精母細胞(Zyg-Sc)では非常に減少し、残存しているシグナルだけが狭セントロメアヘテロクロマチン(矢印)で検出される。後の段階では、H3-K9メチル化は野生型染色に見られる(上と下のパネルを比較されたい)が、Suv39h dn性染色体(矢印)は複糸期と移動期で更に強く標識されたままである。二重矢印は、偽常染色体領域(PAR)を示している。

#### 【0078】

##### 実施例16

a) Suv39h dn精母細胞における非相同相互作用と対合遅延

精原細胞と初期精母細胞における狭セントロメアH3-K9メチル化の不在は、減数分裂染色体の最初のアラインメントとクラスター形成に必要とされるものである高次構造を特定する際のSuv39h HMTaseの役割を示している。それ故、染色体対合を、対合複合体(SC)の軸/側方要素と中央要素に特異的な抗体による太糸期拡散の免疫蛍光により分析した(図16A、B)。面白いことに、~15%(n=90)のSuv39h dn精母細胞においては、常染色体間の非相同相互作用が認められた(図16J)。非相同相互作用は、性染色体と常染色体(X/Y-A)間で頻繁になる(~35%)。面白いことに、これらの非正統的結合は、非相同染色体の末端セントロメア端(cen-cen)間で優先的に、セントロメアと末端小粒(cen-tel)間で少し、末端小粒(tel-tel)間ではごくまれに存在した(図16J)。更に、Suv39h dn精母細胞は、対合が遅延する対合していない性染色体(下を参照されたい)と常染色体二価体を含んでいた。常染色体(A-del)の遅延対合は非相同結合の係合とほとんど必ず相関し(図16A)、双方のプロセスが機能的に関係してもよいことが示される。

非正統的結合は、更に透過型電子顕微鏡で確認された(図16D-G)。これらの超微細構造分析により、非相同染色体の末端の間で物理的結合と架橋状構造の存在がわかった(図16D、C、Fの二重矢印)。パートナー交換(図16G)と非相同アラインメントの発生も認められた。これらの異常染色体相互作用は、wt精母細胞由来のEM標品には検出されなかった。

#### 【0079】

##### b) Suv39h dn精母細胞における減数分裂での二価の誤分離

初期前期におけるmethH3-K9の不在は、減数分裂中に染色体動態と分離に影響があるかを測定するために、精巣拡散標品について移動期/中期I(M-I)と中期II(M-II)細胞を分析した。移動期/M-Iにおいて、ほとんどのSuv39h dn精母細胞はwt様形態学を有する二価体であり、染色体凝縮とキアズマ形成が摂動を起こさないことを示した(図17B-Dの下を参照されたい)。しかしながら、M-IIでは~14%の二次精母細胞が四倍体であり、減数第一分裂での二価体すべての分離不全を示した(図16I及び16K)。それ故、狭セントロメアヘテロクロマチンにおけるSuv39h誘導欠失は、減数第一分裂全体で持続し、中期~後期減数分裂で生じるH3-K9メチル化によって‘救済’されないように見える(図15B参照されたい)。

## 【0080】

図16は、次のSuv39h dn減数分裂染色体の非正統的結合と遅延対合を示す図である。(A-C)対合複合体(SC)の軸/側方要素 -Scp3(緑)と中央要素 -Scp1(赤)に特異的な抗体によるSuv39h dn太糸期精母細胞の二重標識免疫蛍光。この共標識により不對合染色体が緑色のような染色で及び対合染色体が橙～赤色で示される。DNAをDAPI(青色)で対比染色し、狭セントロメアヘテロクロマチンが強い青色コントラストで強調される。(A)非相同常染色体(A)間と常染色体と性染色体(X、Y)間に多数の非正統的結合(矢印)を示す2つの中間太糸期精母細胞(mPach-Sc)。いくつかの常染色体は対合が遅延する(Adel)。(B)狭セントロメア領域(矢印)まで非相同相互作用で係合する2つの常染色体を含む後期太糸期(IPach-Sc)精母細胞。更に、性染色体は対合できなかった。(C)Suv39h dn精原細胞の前の有糸分裂における全染色体の完全な誤分離から生じる四倍体精母細胞。

(D-G)非相同染色体結合が、主として、顆粒状の銀染色によって可視化される抗狭セントロメアヘテロクロマチンまで生じることが確認される、Suv39h dn太糸期染色体の透過型電子顕微鏡(矢頭と2つの矢印)。パネルGに示された染色体は、パートナー交換の複数の係合を示している。

(H、I)Suv39h dn細胞の前の減数分裂Iにおける完全な誤分離を示すwtとSuv39h dn二次精母細胞のギムザ中期II染色体。

(J)wt(n=80)とSuv39h dn(n=90)太糸期精母細胞における非相同染色体結合と遅延対合の頻度のヒストグラム。

(K)wt(n=40)とSuv39h dn(n=30)二次精母細胞における染色体二価体の減数分裂I誤分離の頻度のヒストグラム。

## 【0081】

## 実施例17

Suv39h欠失は性染色体分離を妨害する

雄哺乳動物における精子形成は、性小胞又はXY体として知られるユニークなクロマチン領域を形成する異形性染色体の存在によって特殊化される(Solari, 1974)。更に、Y染色体はマウスにおいて最も多い異質染色性染色体である(Pardue & Gall, 1970)。相同体対合や性染色体間の交差は、PARと呼ばれる小さな偽常染

染色体領域の存在に左右される(Burgoyne, 1982)。Suv39h機能の不在は、性染色体のクロマチン体制と分離をいくつかの方法で妨害する。

まず、XY体のmethH3-K9シグナル(図15Bの矢印)はwtと突然変異太糸期精母細胞において匹敵するレベルで検出されたが、Suv39h dn性染色体は複糸期と移動期においては強くメチル化されたままである(図15B、下のパネル)。対応して、複糸期でのXY体への長時間HP1 結合が見られた。第2に、移動期/M-IでのY染色体の長い腕の近位領域は10%のSuv39h dn細胞が低凝縮したと思われる(図17B、E)。更に、突然変異Y染色体は、それらの腕の未熟分離又は2つの姉妹染色分体の完全分離さえも示している(図17D、E)。第3に、H3-K9メチル化は、wtもSuv39h dn染色体も共にPAR(図15Bの二重の矢印)に存在し、PARはHP1 で装飾されている。これらの類似した染色パターンにもかかわらず、性染色体は~15%のSuv39h dn太糸期精母細胞で対合できなかった(図16A、B)。移動期/M-I(図17B、C)で、XY一価体の存在はwt細胞に比べて4倍増加した(図17F)。合わせると、これらのデータから、性染色体、特に高異質染色性Y染色体の特殊化クロマチン構造を共調節する際のSuv39h HMTaseの役割が示される。

図17は、次のSuv39h dn精母細胞の減数分裂でのY染色体の異常機能を示す図である。Y染色体の一価(B、C)、障害凝縮(B、C)及び未熟姉妹染色分体分離を示すwt(A)とSuv39h dn(B-D)一次精母細胞のギムザ染色移動期/中期I染色体。(E)Y染色体の異常凝縮又は未熟姉妹染色分体分離による移動期/M-I細胞の頻度のヒストグラム(wt: n=190; Suv39h dn: n=170)。(F)太糸期(wt: n=80; Suv39h dn: n=80)又は移動期/M-I(wt: n=190; Suv39h dn: n=170)のXY一価の頻度のヒストグラム。

【0082】

#### 実施例18

##### Suv39h2 MTase活性を有するモジュレーターのスクリーニング

すべての段階が自動化され、試験される異なる化合物の位置を後の対照標準のためにコンピュータに登録する。活性をモジュレートする試験される化合物を384ウェルプレートに2回の実験でアリコート分割する。次にMABバッファー中の20~200ナノモルの組換えGSTタグ標識ヒトSUV39H2を反応に添加する。ユウロピウ

ムで標識した20ナノモルの分枝ペプチド([TARKST]<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>-K-cys)、次に100ナノモルのS-アデノシルメチオニンを追加する。この反応を室温で40分間放置してから、-methH3-K9抗体が被覆された第2プレートに移した。次にこの反応を室温で40分間放置して抗体をメチル化基質に結合する。メチル化基質を捕捉した後、非結合非メチル化基質を50 mMトリspH8.5で洗い流した。次にユウロピウムラベルを50 μl pH4.5増強溶液中で25分間ペプチドから切断する。次にキレート化ユウロピウム分子を360 nmで励起し、620 nmの発光した蛍光をポーラスタープレートリーダーにおける時間分割蛍光を用いて計算する。次に結果を自動的にグラフにする。

#### 【0083】

蛍光レベルはMTase活性レベルに直接関係する。MTase活性に対する異なる化合物の効果は、化合物が添加されていない又は酵素が添加されていない対照反応と比べたときのグラフに明らかに見ることができる。

図19は、次の方法のスクリーニング法の原理を示す図である。

a) Suv39h2をS-アデノシルメチオニン(SAM)及び色素原で標識した非修飾ペプチド基質(例えば、分枝ペプチド([TARKST]<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>-K-cys)とインキュベートする。この基質をメチル化した後、基質はマイクロタイタープレートに固定化したLys9-メチル特異抗体のエピトープになる。結合ペプチドレベルは、色素生産性標識からの蛍光レベルにより定量し得る。

b) モジュレーター(例えば、インヒビター、I)の存在下、MTaseによるメチル基の転移は影響され(減少する)、これは固定化された抗体により捕捉された基質量に影響を及ぼし、蛍光レベルによって定量される。阻害作用を有する化合物は、蛍光シグナルの減少をもたらす、増強作用を有する化合物は蛍光シグナルの増加をもたらす。

#### 【0084】

#### 【表1】

表 I

## Suv39h 二重ヌルマウスの生存度

交差	N1H2×H1H2 <sup>a</sup>	N1H2×N1H2	N1H2×H1N2	合計
予想 dn マウス	1:8	1:4	1:4	
出生マウス合計数	81	89	27	197
予想 dn マウス数 <sup>b</sup>	11	27	8	46
実験 dn マウス数	4	8	3	15
生存可能 dn マウス%	36.4	29.6	37.5	32.6

<sup>a</sup>例えば、N1H2×H1H2: ♂♂Suv39h1<sup>-/-</sup>, Suv39h2<sup>+/-</sup> × ♀♀Suv39h1<sup>+/-</sup>, Suv39h2<sup>+/-</sup>

<sup>b</sup>出生前生存度の低下を示さない他の Suv39h1 と Suv39h2 の対立遺伝子組み合わせにより出生したマウス数に基づく。

表 II

## Suv39h 遺伝子量の減少したマウスにおける B 細胞リンパ腫の発生率

遺伝子型	Suv39h 遺伝子量	腫瘍をもつ マウス数	マウスの 合計数	腫瘍をもつ マウス数
W1S2	3	0	57	0
W1H2, W1N2, H1N2	0-2	1	22	4.6
H1W2, N1W2	2-3	8	26	30.8
H1H2, N1H2*	1-2	20	72	27.8
N1N2	0	2	6	33.3

\* 例えば、N1H2: Suv39h1<sup>-/-</sup>, Suv39h2<sup>+/-</sup>

## 参考文献

- Aagaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P.B., Reuter, G. and Jenuwein, T. (1999) Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *Embo J*, **18**, 1923-38.
- Aagaard, L., Schmid, M., Warburton, P. and Jenuwein, T. (2000) Mitotic phosphorylation of SUV39H1, a novel component of active centromeres, coincides with transient accumulation at mammalian centromeres. *J Cell Sci*, **113**, 817-829.
- Aasland, R. and Stewart, A.F. (1995) The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Res*, **23**, 3168-74.
- Adams, R. R., Wheatley, S. P., Gouldsworthy, A. M., Kandels-Lewis, S. E., Carmena, M., Smythe, C., Gerloff, D. L., and Earnshaw, W. C. (2000). INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol*, **10**, 1075-1078.
- Ainsztein, A. M., Kandels-Lewis, S. E., Mackay, A. M., and Earnshaw, W. C. (1998). INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. *J Cell Biol*, **143**, 1763-1774.
- Allshire, R.C., Nimmo, E.R., Ekwall, K., Javerzat, J.P. and Cranston, G. (1995) Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes Dev*, **9**, 218-33.

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-402.
- Ball, L.J., Murzina, N.V., Broadhurst, R.W., Raine, A.R.C., Archer, S.J., Stott, F.J., Murzin, A.G., Singh, P.B., Domaille, P.J. and Laue, E.D. (1997) Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *EMBO J*, **16**, 2473-2481.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120-124.
- Baudat, F., Manova, K., Yuen, J. P., Jasin, M., and Keeney, S. (2000). Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking *spo11*. *Mol Cell*, **6**, 989-998.
- Bassett, D.E., Jr., Boguski, M.S., Spencer, F., Reeves, R., Goebel, M. and Hieter, P. (1995) Comparative genomics, genome cross-referencing and XREFdb. *Trends Genet*, **11**, 372-3.
- Bernard, P., Hardwick, K., and Javerzat, J.P. (1998). Fission yeast Bub1 is a mitotic centromere protein essential for the spindle checkpoint and the preservation of correct ploidy through mitosis. *J Cell Biol*, **143**, 1775-1787.
- Boulianne, G. L., et al., (1984), *Nature* 312: 643-646
- Bunick, D., Johnson, P.A., Johnson, T.R. and Hecht, N.B. (1990) Transcription of the testis-specific mouse protamine 2 gene in a homologous in vitro transcription system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 891-5.
- Burgoyne, P. S. (1982). Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of mammals. *Hum Genet*, **61**, 85-90.

- Calenda, A., Allenet, B., Escalier, D., Bach, J.F. and Garchon, H.J. (1994) The meiosis-specific Xmr gene product is homologous to the lymphocyte Xlr protein and is a component of the XY body. *Embo J*, **13**, 100-9.
- Cobb, J., Miyaike, M., Kikuchi, A., and Handel, M. A. (1999). Meiotic events at the centromeric heterochromatin: histone H3 phosphorylation, topoisomerase II alpha localization and chromosome condensation. *Chromosoma*, **108**, 412-425.
- Cortez, D. and Elledge, S. J. (2000). Conducting the mitotic symphony. *Nature*, **406**, 354-356.
- Csink, A. and Henikoff, S. (1996). Genetic modification of heterochromatic association and nuclear organization in *Drosophila*. *Nature*, **381**, 529-531.
- Cutts, S. M., Fowler, K. J., Kile, B. T., Hii, L. L., O'Dowd, R. A., Hudson, D. F., Saffery, R., Kalitsis, P., Earle, E., and Choo, K. H. (1999). Defective chromosome segregation, microtubule bundling and nuclear bridging in inner centromere protein gene (*Incenp*)-disrupted mice. *Hum Mol Genet*, **8**, 1145-1155.
- Czvitkovich, S., Sauer, S., Peters, A. H. F. M., Deiner, E., Wolf, A., Laible, G., Opravil, S., Beug, H., and Jenuwein, T. (2001). Modulation of higher-order chromatin by the SUV39H1 histone methyltransferase induces altered proliferation and differentiation in transgenic mice. *Mech Dev*, in press.
- Dernburg, A. F., Broman, K. W., Fung, J. C., Marshall, W. F., Philips, J., Agard, D. A., and Sedat, J. W. (1996a). Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell*, **85**, 745-759.
- Dernburg, A.F., Sedat, J.W. and Hawley, R.S. (1996b) Direct evidence for a role of heterochromatin in meiotic chromosome segregation. *Cell*, **86**, 135-146.
- de Vries, S. S., Baart, E. B., Dekker, M., Siezen, A., de Rooij, D. G., de Boer, P., and te Riele, H. (1999). Mouse MutS-like protein Msh5 is required for

proper chromosome synapsis in male and female meiosis. *Genes Dev*, **13**, 523-531.

Dugaiczky, A., Haron, J.A., Stone, E.M., Dennison, O.E., Rothblum, K.N. and Schwartz, R.J. (1983) Cloning and sequencing of a deoxyribonucleic acid copy of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase messenger ribonucleic acid isolated from chicken muscle. *Biochemistry*, **22**, 1605-13.

Ekwall, K., Olsson, T., Turner, B. M., Cranston, G., and Allshire, R. C. (1997). Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell*, **91**, 1021-1032.

Foon, K. A., and Gale, R. P. (1995). Chronic Lymphoid Leukemias. In *Blood: Principles and Practise of Hematology*, R.I. Handin, T.P. Stossel and S.E. Lux, eds. (J.B. Lippincott Company, Philadelphia), pp783–811.

Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:821-824 (1989), hexa-histidine provides for convenient purification of the fusion protein.

Graziano, R.F., et al., (1995), *J. Immunol.* **155**: 4996-5002

Handel, M.A. and Hunt, P.A. (1992) Sex-chromosome pairing and activity during mammalian meiosis. *Bioessays*, **14**, 817-22.

Hawley, R. S., Irick, H., Zitron, A. E., Haddox, D. A., Lohe, A., New, C., Whitley, M. D., Arbel, T., Jang, J., McKim, K., and *et al.* (1992). There are two mechanisms of achiasmate segregation in *Drosophila* females, one of which requires heterochromatic homology. *Dev Genet*, **13**, 440-467.

Heitz, E. (1928). Das Heterochromatin der Moose. *Jhrb. Wiss. Botanik*, **69**, 762-818.

Henikoff, S. (1997) Position effect variegation in *Drosophila*: recent progress. *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. CSHL press.

- Hsu, J. Y., Sun, Z. W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D. K., Grushcow, J. M., Brame, C. J., Caldwell, J. A., Hunt, D. F., Lin, R., Smith, M. M., and Allis, C. D. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, **102**, 279-291.
- Ivanova, A.V., Bonaduce, M.J., Ivanov, S.V. and Klar, A.J. (1998) The chromo and SET domains of the Ctr4 protein are essential for silencing in fission yeast. *Nat Genet*, **19**, 192-5.
- Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R. and Reuter, G. (1998) SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 80-93.
- Jenuwein, T. (2001). Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol*, **11**, 266-273.
- Jones, D. A., Cowell, F. G., and Singh, P. B. (2000). Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays*, **22**, 124
- Kaitna, S., Mendoza, M., Jantsch-Plunger, V., and Glotzer, M. (2000). Incenp and an aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis. *Curr Biol*, **10**, 1172-1181.
- Karpen, G. H., Le, M. H., and Le, H. (1996). Centric heterochromatin and the efficiency of achiasmate disjunction in *Drosophila* female meiosis. *Science*, **273**, 118-122.
- Karpen, G.H. and Allshire, R.C. (1997) The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet*, **13**, 489-496.
- Köhler, G. und Milstein, C. (1975), *Nature* **265**, 495-497.
- Koonin, E.V., Zhou, S. and Lucchesi, J.C. (1995) The chromo superfamily: new members, duplication of the chromo domain and possible role in delivering transcription regulators to chromatin. *Nucleic Acids Res*, **23**, 4229-33.

- Kot, M.C. and Handel, M.A. (1990) Spermatogenesis in XO,Sxr mice: role of the Y chromosome. *J Exp Zool*, **256**, 92-105.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**, 116-120.
- Laible, G., Wolf, A., Dorn, R., Reuter, G., Nislow, C., Lebersorger, A., Popkin, D., Pillus, L. and Jenuwein, T. (1997) Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in *Drosophila* heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomeres. *Embo J*, **16**, 3219-32.
- Lamb DJ, Niederberger CS. (1994) Animal models that mimic human male reproductive defects. *Urol Clin North Am* Aug;21(3):377-87.
- Lammers, J.H., Offenberg, H.H., van Aalderen, M., Vink, A.C., Dietrich, A.J. and Heyting, C. (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol*, **14**, 1137-46.
- Lammers, J. H., van Aalderen, M., Peters, A. H. F. M., van Pelt, A. A., de Rooij, D. G., de Boer, P., Offenberg, H. H., Dietrich, A. J., and Heyting, C. (1995). A change in the phosphorylation pattern of the 30,000-33,000 Mr synaptonemal complex proteins of the rat between early and mid-pachytene. *Chromosoma*, **104**, 154-163.
- Matsuda, Y., Hirobe, T. and Chapman, V.M. (1991) Genetic basis of X-Y chromosome dissociation and male sterility in interspecific hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 4850-4.
- Meistrich, M.L.a.B., W. A. (1987) Proteins of the meiotic cell nucleus. In Moens, P.B. (ed.) *Meiosis*. Academic Press, New York, N.Y.

- Melcher, M., Schmid, M., Aagaard, L., Selenko, P., Laible, G. and Jenuwein, T. (2000) Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression. *Mol Cell Biol*, **20**, 3728-41.
- Messmer, S., Franke, A. and Paro, R. (1992) Analysis of the functional role of the Polycomb chromo domain in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev*, **6**, 1241-54.
- Moens, P.B. (1995) Histones H1 and H4 of surface-spread meiotic chromosomes. *Chromosoma*, **104**, 169-74.
- Motzkus, D., Singh, P.B. and Hoyer-Fender, S. (1999) M31, a murine homolog of *Drosophila* HP1, is concentrated in the XY body during spermatogenesis. *Cytogenet Cell Genet*, **86**, 83-8.
- Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D., and Grewal, S. I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, **292**, 110-113.
- Neuberger, M.S., et al., (1984), *Nature* 312: 604-608
- O'Carroll, D., Scherthan, H., Peters, A. H. F. M., Opravil, S., Haynes, A. R., Laible, G., Rea, S., Schmid, M., Lebersorger, A., Jerratsch, M., Sattler, L., Mattei, M. G., Denny, P., Brown, S. D., Schweizer, D., and Jenuwein, T. (2000). Isolation and characterization of *Suv39h2*, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol*, **20**, 9423-9433.
- Offenberg, H. H., Dietrich, A. J., and Heyting, C. (1991). Tissue distribution of two major components of synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma*, **101**, 83-91.

- Pandita, T.K., Westphal, C.H., Anger, M., Sawant, S.G., Geard, C.R., Pandita, R.K. and Scherthan, H. (1999) Atm inactivation results in aberrant telomere clustering during meiotic prophase. *Mol Cell Biol*, **19**, 5096-105.
- Pardue, M. L., and Gall, J. G. (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, **168**, 1356-1358.
- Paro, R. and Harte, P.J. (1996) *The role of Polycomb group and trithorax group complexes in the maintenance of determined cell states*. Coldspring Harbour Laboratory Press, New York, NY.
- Paro, R. and Hogness, D.S. (1991) The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 263-7.
- Peters, A. H. F. M., Plug, A. W., van Vugt, M. J., and de Boer, P. (1997a). A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res*, **5**, 66-68.
- Peters, A. H. F. M., Plug, A. W., and de Boer, P. (1997b). Meiosis in carriers of heteromorphic bivalents: sex differences and implications for male fertility. *Chromosome Res*, **5**, 313-324.
- Platero, J.S., Hartnett, T. and Eissenberg, J.C. (1995) Functional analysis of the chromo domain of HP1. *Embo J*, **14**, 3977-86.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. and Jenuwein, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593-599.
- Reuter, G. and Spierer, P. (1992) Position effect variegation and chromatin proteins. *BioEssays*, **14**, 605-612.

- Rice, J. C. and Allis, C. D. (2001) Histone methylation versus acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 263-273.
- Riechmann, L., et al., (1988), *Nature* 332: 323-327.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Scherthan, H., Weich, S., Schwegler, H., Heyting, C., Harle, M. and Cremer, T. (1996) Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol*, **134**, 1109-25.
- Solari, A.J. (1974) The behavior of the XY pair in mammals. *Int Rev Cytol*, **38**, 273-317.
- Stassen, M.J., Bailey, D., Nelson, S., Chinwalla, V. and Harte, P.J. (1995) The *Drosophila trithorax* proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins. *Mech Dev*, **52**, 209-23.
- Strahl, B.D., Ohba, R., Cook, R.G. and Allis, C.D. (1999) Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 14967-72.
- Tkachuk, D.C., Kohler, S. and Cleary, M.L. (1992) Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell*, **71**, 691-700.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G. and Reuter, G. (1994) The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *Embo J*, **13**, 3822-31.

- Turner, J. M., Mahadevaiah, S. K., Benavente, R., Offenber, H. H., Heyting, C., and Burgoyne, P. S. (2000). Analysis of male meiotic "sex body" proteins during XY female meiosis provides new insights into their functions. *Chromosoma*, **109**, 426-432.
- Wallrath, L.L. (1998) Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 147-53.
- Weinbauer GF, Aslam H, Krishnamurthy H, Brinkworth MH, Einspanier A, Hodges JK. (2001). Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency. *Biol Reprod*. 2001 Jan;64(1):120-6.
- Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767 (1984).
- Wreggett, K.A., Hill, F., James, P.S., Hutchings, A., Butcher, G.W. and Singh, P.B. (1994) A mammalian homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1) is a component of constitutive heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet*, **66**, 99-103.
- Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E. E., Bronson, R. T., Meyn, M. S., and Baltimore, D. (1996). Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev*, **10**, 2411-2422.
- Yoshida, K., Kandoh, G., Matsuda, Y., Habu, T., Nishimune, Y., and Morita, T. (1998). The mouse RecA-like gene *Dmcl* is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell*, **1**, 707-718.
- Yuan, L., Liu, J. G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., and Hoog, C. (2000). The murine *Scp3* gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol. Cell*, **5**, 73-83.

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図1 : Suv39h2 cDNAのコード部分と概念的読み枠。

【図 2】

図2 : S.ポンベ、C.エレガンス、ドロソフィア及びマウスSU(VAR)3-9関連タンパク質の保存ドメイン。

【図3】

図3 : マウス発育中のSuv39h1とSuv39h2の発現。

【図4】

図4 : Suv39h2の精巣特異的発現。

【図5】

図5 : 内在Suv39h2タンパク質の検出とサイズ。

【図6】

図6 : 精子形成のほとんどの段階でのSuv39h2の動的ヘテロクロマチン結合。

【図7】

図7 : Suv39h2はX-Y体に存在する性染色体と蓄積する。

【図8】

図8 : 哺乳動物Su(var)3-9は固有のHMTase活性を含んでいる。

【図9】

図9 : マウス生殖系列におけるSuv39h1とSuv39h2のターゲティング。

【図10】

図10 : Suv39h機能は雄性配偶子形成に必要である。

【図11】

図11 : Suv39h1欠損マウスとSuv39h2欠損マウスの作成と遺伝子型別。

【図12】

図12 : Suv39h dn PMEFにおける染色体の不安定性。

【図13】

図13 : Suv39h突然変異マウスにおけるB細胞リンパ腫の発症。

【図14】

図14 : 狭セントロメアヘテロクロマチンにおけるSuv39h依存性H3-K9メチル化

。

【図15】

図15 : Suv39h dnマウスの生殖細胞における精子形成不全とH3-K9メチル化。

【図16】

図16：Suv39h<sup>dn</sup>減数分裂染色体の非正統的結合と遅延対合。

【図17】

図17：Suv39h<sup>dn</sup>精母細胞の減数分裂でのY染色体の異常機能。

【図18】

図18：染色体安定性を保護する際の“異質染色性受容能”のモデル。

【図19】

図19：Suv39h2モジュレーターを同定するスクリーニング法の概略図。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Novel Suv3-9 homologue

<130> Case 14/056\_PCT

<140>

<141>

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1452

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> 3'UTR

<222> (1)..(18)

<220>

<221> CDS

<222> (19)..(1452)

<400> 1

```

gaatgaaagc tccgcaag atg gcg acg gcc agg gcc aag gca cgg ggc agt   51
                Met Ala Thr Ala Arg Ala Lys Ala Arg Gly Ser
                1                    5                10

gag gca gga gcg cgg tgt cac cgg gct cca ggt ccg ccc ccg agg ccc   99
Glu Ala Gly Ala Arg Cys His Arg Ala Pro Gly Pro Pro Pro Arg Pro
                15                20                25

aag gcc agg cga acg gcg aga cgc cgc cgc gcg gag acc ctg acg gcg   147
Lys Ala Arg Arg Thr Ala Arg Arg Arg Arg Ala Glu Thr Leu Thr Ala
                30                35                40

cga cgc tcg cgg ccg tct gcg ggc gag agg cgc gcc ggc tcc cag cga   195
Arg Arg Ser Arg Pro Ser Ala Gly Glu Arg Arg Ala Gly Ser Gln Arg
                45                50                55

gcg tgg tcc gga gct cag cgg gcc gcg gtc ttt gcc gac gag tgt gca   243
Ala Trp Ser Gly Ala Pro Arg Ala Ala Val Phe Gly Asp Glu Cys Ala
                60                65                70                75

cga ggt gcc tta ttc aag gcc tgg tgt gtg cct tgc cta gtt tca ctt   291
Arg Gly Ala Leu Phe Lys Ala Trp Cys Val Pro Cys Leu Val Ser Leu
                80                85                90

```

gat act ctc cag gaa tta tgt aga aaa gaa aag ctc aca tgt aaa tcg	339
Asp Thr Leu Gln Glu Leu Cys Arg Lys Glu Lys Leu Thr Cys Lys Ser	
95 100 105	
att gga atc acc aaa agg aat cta aac aat tat gag gtg gag tac ttg	387
Ile Gly Ile Thr Lys Arg Asn Leu Asn Asn Tyr Glu Val Glu Tyr Leu	
110 115 120	
tgt gac tac aag gta gca aag ggt gtg gaa tat tat ctt gta aaa tgg	435
Cys Asp Tyr Lys Val Ala Lys Gly Val Glu Tyr Tyr Leu Val Lys Trp	
125 130 135	
aaa gga tgg cca gat tct aca aac acc tgg gag ccc ttg aga aac ctc	483
Lys Gly Trp Pro Asp Ser Thr Asn Thr Trp Glu Pro Leu Arg Asn Leu	
140 145 150 155	
agg tgt cca cag ctc ctg cgg cag ttc tct gat gac aag aag act tac	531
Arg Cys Pro Gln Leu Leu Arg Gln Phe Ser Asp Asp Lys Lys Thr Tyr	
160 165 170	
tta gct cag gaa agg aaa tgc aag gct gtc aat tca aaa tcc ttg caa	579
Leu Ala Gln Glu Arg Lys Cys Lys Ala Val Asn Ser Lys Ser Leu Gln	
175 180 185	
cct gca att gct gag tat att gta cag aaa gct aag caa aga ata gct	627
Pro Ala Ile Ala Glu Tyr Ile Val Gln Lys Ala Lys Gln Arg Ile Ala	
190 195 200	
ctg cag aga tgg caa gat tac ctc aac aga aga aag aac cat aag ggg	675
Leu Gln Arg Trp Gln Asp Tyr Leu Asn Arg Arg Lys Asn His Lys Gly	
205 210 215	
atg ata ttt gtt gaa aac act gtt gac ttg gag ggc cca cct tta gac	723
Met Ile Phe Val Glu Asn Thr Val Asp Leu Glu Gly Pro Pro Leu Asp	
220 225 230 235	
ttc tac tac att aac gag tac agg cca gct ccc ggg atc agc ata aac	771
Phe Tyr Tyr Ile Asn Glu Tyr Arg Pro Ala Pro Gly Ile Ser Ile Asn	
240 245 250	
agt gaa gcc acc ttt gga tgt tca tgt aca gac tgc ttc ttt gac aag	819
Ser Glu Ala Thr Phe Gly Cys Ser Cys Thr Asp Cys Phe Phe Asp Lys	
255 260 265	
tgt tgt cct gct gaa gct gga gtt gtg btg gct tat aat aag aag caa	867
Cys Cys Pro Ala Glu Ala Gly Val Val Leu Ala Tyr Asn Lys Lys Gln	
270 275 280	
caa att aaa atc caa cca ggc act ccc atc tac gaa tgc aac tca agg	915
Gln Ile Lys Ile Gln Pro Gly Thr Pro Ile Tyr Glu Cys Asn Ser Arg	
285 290 295	
tgt cga tgt gga cct gaa tgt ccc aat agg att gta caa aaa ggc aca	963
Cys Arg Cys Gly Pro Glu Cys Pro Asn Arg Ile Val Gln Lys Gly Thr	
300 305 310 315	

caa tat tca ctg tgc atc ttt aaa act agc aat ggc tgt ggt tgg ggt 1011  
 Gln Tyr Ser Leu Cys Ile Phe Lys Thr Ser Asn Gly Cys Gly Trp Gly  
 320 325 330

gta aaa acc ctt gtg aag att aaa aga atg agt ttt gtc atg gaa tat 1059  
 Val Lys Thr Leu Val Lys Ile Lys Arg Met Ser Phe Val Met Glu Tyr  
 335 340 345

gtt gga gag gtg atc aca agt gaa gag gcc gag aga cgg gga cag ttc 1107  
 Val Gly Glu Val Ile Thr Ser Glu Glu Ala Glu Arg Arg Gly Gln Phe  
 350 355 360

tat gac aac aaa ggg atc acc tac ctc ttt gac ctg gac tac gag tct 1155  
 Tyr Asp Asn Lys Gly Ile Thr Tyr Leu Phe Asp Leu Asp Tyr Glu Ser  
 365 370 375

gat gag ttc aca gtg gat gca gct cga tat gga aac gta tcc cat ttt 1203  
 Asp Glu Phe Thr Val Asp Ala Ala Arg Tyr Gly Asn Val Ser His Phe  
 380 385 390 395

gtg aat cat agt tgt gac cca aat ctt cag gtg ttt agt gtt ttc atc 1251  
 Val Asn His Ser Cys Asp Pro Asn Leu Gln Val Phe Ser Val Phe Ile  
 400 405 410

gat aac ctt gat act cgg ctg ccc agg ata gca ttg ttc tct aca aga 1299  
 Asp Asn Leu Asp Thr Arg Leu Pro Arg Ile Ala Leu Phe Ser Thr Arg  
 415 420 425

acc ata aac gct gga gaa gag ctg act ttt gac tat caa atg aaa ggt 1347  
 Thr Ile Asn Ala Gly Glu Glu Leu Thr Phe Asp Tyr Gln Met Lys Gly  
 430 435 440

tct gga gaa gca tct tca gac tcc att gac cac agc cct gcc aaa aaa 1395  
 Ser Gly Glu Ala Ser Ser Asp Ser Ile Asp His Ser Pro Ala Lys Lys  
 445 450 455

agg gtc aga acc caa tgt aaa tgt gga gcc gag act tgc aga ggt tac 1443  
 Arg Val Arg Thr Gln Cys Lys Cys Gly Ala Glu Thr Cys Arg Gly Tyr  
 460 465 470 475

ctc aac tga 1452  
 Leu Asn

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 477

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 2

Met Ala Thr Ala Arg Ala Lys Ala Arg Gly Ser Glu Ala Gly Ala Arg  
 1 5 10 15

Cys His Arg Ala Pro Gly Pro Pro Pro Arg Pro Lys Ala Arg Arg Thr  
 20 25 30

Ala Arg Arg Arg Arg Ala Glu Thr Leu Thr Ala Arg Arg Ser Arg Pro  
35 40 45

Ser Ala Gly Glu Arg Arg Ala Gly Ser Gln Arg Ala Trp Ser Gly Ala  
50 55 60

Pro Arg Ala Ala Val Phe Gly Asp Glu Cys Ala Arg Gly Ala Leu Phe  
65 70 75 80

Lys Ala Trp Cys Val Pro Cys Leu Val Ser Leu Asp Thr Leu Gln Glu  
85 90 95

Leu Cys Arg Lys Glu Lys Leu Thr Cys Lys Ser Ile Gly Ile Thr Lys  
100 105 110

Arg Asn Leu Asn Asn Tyr Glu Val Glu Tyr Leu Cys Asp Tyr Lys Val  
115 120 125

Ala Lys Gly Val Glu Tyr Tyr Leu Val Lys Trp Lys Gly Trp Pro Asp  
130 135 140

Ser Thr Asn Thr Trp Glu Pro Leu Arg Asn Leu Arg Cys Pro Gln Leu  
145 150 155 160

Leu Arg Gln Phe Ser Asp Asp Lys Lys Thr Tyr Leu Ala Gln Glu Arg  
165 170 175

Lys Cys Lys Ala Val Asn Ser Lys Ser Leu Gln Pro Ala Ile Ala Glu  
180 185 190

Tyr Ile Val Gln Lys Ala Lys Gln Arg Ile Ala Leu Gln Arg Trp Gln  
195 200 205

Asp Tyr Leu Asn Arg Arg Lys Asn His Lys Gly Met Ile Phe Val Glu  
210 215 220

Asn Thr Val Asp Leu Glu Gly Pro Pro Leu Asp Phe Tyr Tyr Ile Asn  
225 230 235 240

Glu Tyr Arg Pro Ala Pro Gly Ile Ser Ile Asn Ser Glu Ala Thr Phe  
245 250 255

Gly Cys Ser Cys Thr Asp Cys Phe Phe Asp Lys Cys Cys Pro Ala Glu  
260 265 270

Ala Gly Val Val Leu Ala Tyr Asn Lys Lys Gln Gln Ile Lys Ile Gln  
275 280 285

Pro Gly Thr Pro Ile Tyr Glu Cys Asn Ser Arg Cys Arg Cys Gly Pro  
290 295 300

Glu Cys Pro Asn Arg Ile Val Gln Lys Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Cys  
305 310 315 320

Ile Phe Lys Thr Ser Asn Gly Cys Gly Trp Gly Val Lys Thr Leu Val  
325 330 335

Lys Ile Lys Arg Met Ser Phe Val Met Glu Tyr Val Gly Glu Val Ile  
                   340                                  345                                  350  
 Thr Ser Glu Glu Ala Glu Arg Arg Gly Gln Phe Tyr Asp Asn Lys Gly  
                   355                                  360                                  365  
 Ile Thr Tyr Leu Phe Asp Leu Asp Tyr Glu Ser Asp Glu Phe Thr Val  
                   370                                  375                                  380  
 Asp Ala Ala Arg Tyr Gly Asn Val Ser His Phe Val Asn His Ser Cys  
 385                                  390                                  395                                  400  
 Asp Pro Asn Leu Gln Val Phe Ser Val Phe Ile Asp Asn Leu Asp Thr  
                   405                                  410                                  415  
 Arg Leu Pro Arg Ile Ala Leu Phe Ser Thr Arg Thr Ile Asn Ala Gly  
                   420                                  425                                  430  
 Glu Glu Leu Thr Phe Asp Tyr Gln Met Lys Gly Ser Gly Glu Ala Ser  
                   435                                  440                                  445  
 Ser Asp Ser Ile Asp His Ser Pro Ala Lys Lys Arg Val Arg Thr Gln  
                   450                                  455                                  460  
 Cys Lys Cys Gly Ala Glu Thr Cys Arg Gly Tyr Leu Asn  
 465                                  470                                  475

<210> 3  
 <211> 543  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(543)  
 <223> EST Acc. No.173625

<400> 3

```

ggccatgtgg ttgancccoct ggntttaccn nnccntggnn ggnnttgann cccttagat 60
tatagtccag aatcattggt gtcataaac tgccctcacc tticagcttc gtcacttgtg 120
attacctttc caacttattc catgacaaaa cttattcttt taatcttcac atgggttttt 180
acaccccagc catggtcatt gatactgtga aagatgcaaa gtgaattact gtgtgccttt 240
ttgtacaatc ctattggtac agtgagggcc acattgacag attgagatgc atttatagat 300
gggagtaaca ggtgggattt taatttggtg gtttttacta taagcaaaaa gaattccagc 360
ttcaccaaga caacattttt catagaagca atctgtgcat gaacaacaaa aggtagcttc 420
atttactaag ctgattccag gagctggttt gtattcatca atatagcaga agtctgaagg 480
tgggccttct aagtgaacc tattntcaac aaatatcact cctttattat tctgtcttct 540
gcg

```

<210> 4  
 <211> 579  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(579)  
 <223> EST Acc. No. AQ494637

<400> 4

```

gcttctcata catgatacgt gttcngctct gnnngntntng tttangaata cntaaaaanaa 60
aaggngaggg ngncntttga ttcgtgtgat tccatagatg cactcatatg gaactgtatt 120
tcattntgtg aatcatagta gtgacccaaa tcttcatatg ttctatgntn tccactgataa 180
cttgacaactg gccttcccta tatagctctg tgttccatga gaactataaa tgctggagaa 240
gagttgattt ttgacaatca aacaaaaagt tctggggata tatcttcaga gtttattgac 300
cacagctcag ccaaaaagag ggtcagaact gtatgtaaat gtggagctgt gacttgcaga 360
ggttgcctca aatgaatttt caggaaatag aaatgatgat aattggtagt tgtttctttt 420
ttctaagtgt atcattctaa aaataagtat ttggaactct cttttcatat tatcaagatt 480
attactatgt taaattgaca tncatggttc aaggcattta ccanatgcat tactgatgcc 540
tcttgagaga gggccactgt gttgcataga ctgatctga 579

```

<210> 5  
 <211> 565  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(565)  
 <223> EST Acc. No. AQ691972

<400> 5

```

agaggatgag catggatcnt cgctatagca aaccacanat anaatccac ctgttactcc 60
catctataaa tgcatotcaa tctgtcaatg tggaccitac tgtaccaata ggattgtaca 120
aaaaggcaca cagtaattca ctttgcattt ttcacagtat caatgacat ggctgggggtg 180
taaaaacca tggaagatt aaaagaataa gttttgtcat ggaataagtt ggaaggtaa 240
tcacaagtga cgaagctgaa agatgagggc agttatatga caacaaatga tctggactat 300
gaatctgatg aattcacaga ggatgcagct caatatggaa ctgtatttca ttntgtgaat 360
cataagtagt gaccaaaact tcatatgttc aatgtnntca ttgataactt gacactggcc 420
tttcttaat agctctgtgt tccatgagaa ctataaatgc tggagaagaa gtgatttttg 480
acatcaacaa aagttctggg attatottca aagttattgc cacagttacc aaaagaagggc 540
aaactgttgt aatgtgagct gtact 565

```

<210> 6  
 <211> 535  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(535)  
 <223> EST Acc. No. AQ554070

&lt;400&gt; 6

```

tcagactcat agtccagatc aaagagattc tgtgattccc ttgttgcac agaactgtcc 60
tcgtctttca gcttcttcac ttgtgattac ctaaacagaa aaaactgtaa gtatattacg 120
tagctactga accaaagaag cattcatcta cctatctact aatatgcaa tacctacaaa 180
tatttaaaaa gtaagaaatt cagggtgcat caaagcaaac attcacacaa actaagactc 240
agatgcaaag aggtgggaaa atgaggggaa gaaaaatgat aatgcaaaag actgatgacc 300
tttttttttt aaacagggtc tcactctgtc actcaggcta gaatggggtg gtgccatcat 360
gactccctgt atcctttaac tcctgggato aagcgatctt cctgcctcag cctcctgact 420
agctggatca cagggtcata ccgccatgcc cagctaata ttagtctttt atagagatgt 480
ggggtctcac tatgttgcct acaactgtct ggaactcctg ggctcaagtg agcct 535

```

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

```

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
  1           5           10           15
Arg Lys Gln Leu
          20

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 8

```

GGGGATGATA TTTGTTGAAA ACAC 24

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 9

```

GGTTGGATTT TAATTGTTG CTTC 24

```

<210> 10  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Primer

<400> 10

GCCCTCCAAG TCAACAGTG

19

<210> 11  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Primer

<400> 11

GTGTTGAGGT AATCTTGCCA TC

22

<210> 12  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 12

atgggggcag ggttttcggg tagac

25

<210> 13  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 13

aaatggtatt tgcaggccac ttcttg

26

<210> 14  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer  
  
 <400> 14  
 aaatggtatt tgcaggccac ttcttg 26  
  
  
 <210> 15  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer  
  
 <400> 15  
 ggatgggatg gtggaatggt ttttat 26  
  
  
 <210> 16  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer  
  
 <400> 16  
 aaatggtatt tgcaggccac ttcttg 26  
  
  
 <210> 17  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer  
  
 <400> 17  
 aaatggtatt tgcaggccac ttcttg 26  
  
  
 <210> 18  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer  
  
 <400> 18  
 gactgcctag tctggcactg aact 24

<210> 19  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 19  
gatcactgcg tacatataca ctgat 25

<210> 20  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 20  
tagaacttcta ctacattaac g 21

<210> 21  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 21  
gatgtcagtg gctatgaatg 20

Fig. 1/1

1	tgaccgcygccagtttgaatgnaaagctcccgcaagatgaccgaccgccaaggccaaaggcaccg	60
	* . . . . . *	
	M A T A R A K A R	9
61	ggcagttaggcaggaccgctggttcaccgggctccaggtccgccccgaggcccaaggcc	120
	G S E A G A R C H R A P G P P R P K A	29
121	aggcgaaccggcggagaccgcccggcggcggagaccctgaccggcggaccgctcggcggcct	180
	K R T A R R R R A E T L T A R R S R P S	49
181	gcggcgagaggcggccggctcccaaggcagcgtggtccggagctccgccccggcggctc	240
	A G E R R A G S Q R A W S G A P R A A V	69
241	tttggcgaccgagtggtgcaccgaggtgccttattcaaggccctggtggtgcttgccctagt	300
	F G D E C A R G A L F K A W C V P C L V	89
301	tcacttgatfactctcccaaggaaattatgtagaanaagaaagctcacatgtaaatcgattgga	360
	S L D T L Q E L C R K E K I T C K S I G	109
361	atcaccaaaaaggaaatctaaacaaattatgaggtggagttacttgggtgactacaaaggtagca	420
	I T K R N L N N Y E V E Y L C D Y K V A	129
421	aagggtgtggaatatttacttgtaaaaatggaagatggccagattctaacaaacaccctgg	480
	K G V E Y Y L V K W K G W P D S T N T W	149
481	E P L R N L R C P Q L L R Q F S D D K K	540
		169

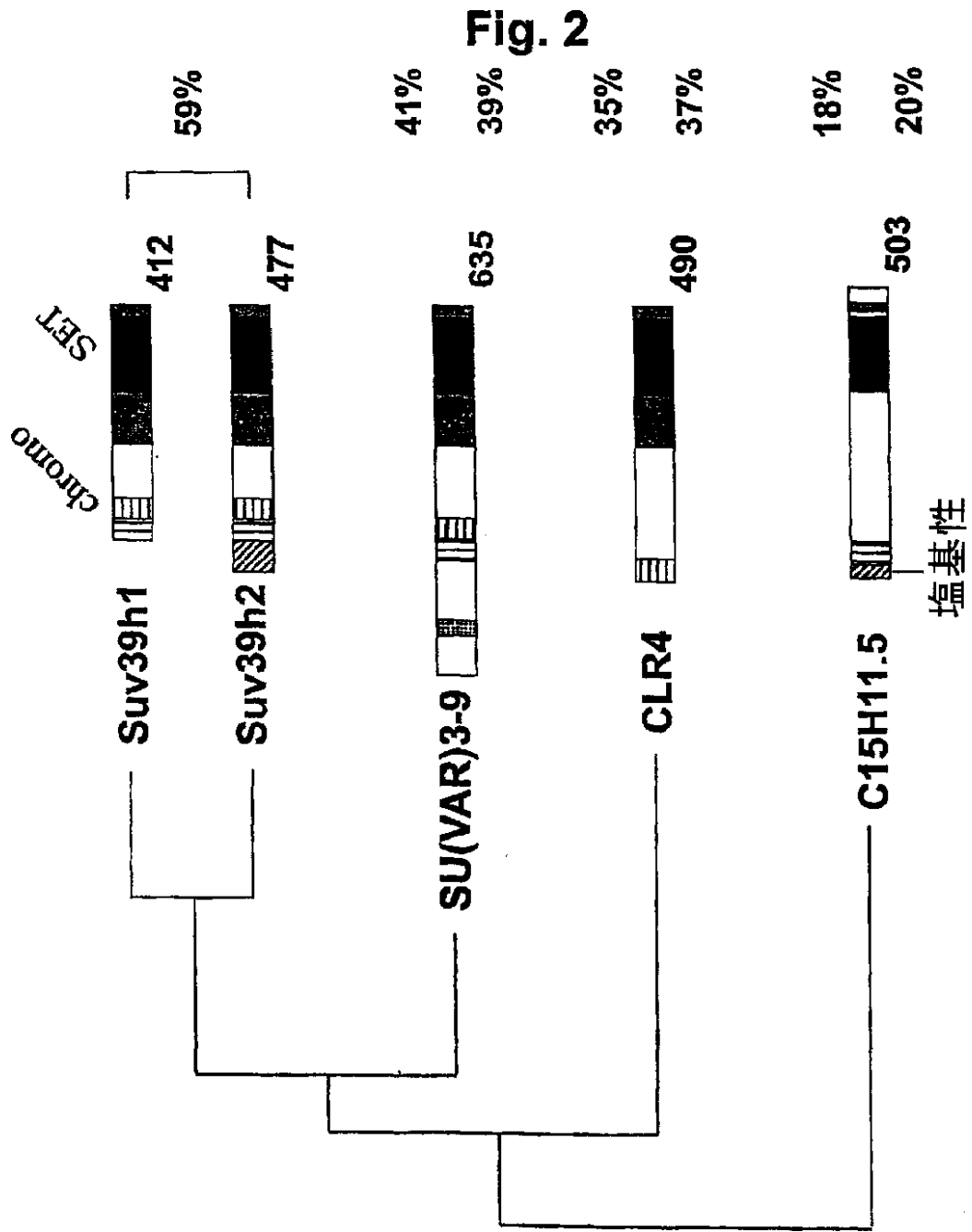
Fig. 1/2

541	ACTTACTTAACTCAGGAAGAATGCAAGGCTGTCAATTCCAATCCTTGCAACCTGCA	600
	T Y L A Q E R K C K A V N S K S L Q P A	189
601	ATTGCTGAGTATATTGTACAGAAAGCTAAAGCAAAAGATAGCTCTGCAGAGATGGCAAGAT	660
	I A E Y I V Q K A K Q R I A L Q R W Q D	209
661	TACCTCAACAGAAAGAAAGAACCATTAAGGGATGATATTGTTGAAAACACTGTTGACTTG	720
	Y L N R R K N H K G M I F V E N T V D L	229
721	GAGGCCCACTTTAGACTTCTACTACATTAACGAGTACAGGCCAGCTCCCGGGAATCAGC	780
	E G P P L D F Y Y I N E Y R P A P G I S	249
781	ATAAACAGTGAAGCCACCCTTTGGATGTTCAATGTACACAGACTGGCTTCTTGGACCAAGTGTGT	840
	I N S E A T F G <b>(C)</b> S <b>(C)</b> T D <b>(C)</b> F F D K <b>(C)</b> <b>(C)</b>	269
841	CCTGCTGAAGCTGAGTGTGTGGCTTATATAAAGCAACAAATTAATAATCCAACCA	900
	P A E A G V V L A Y N K K Q Q I K I Q P	289
901	GGCACTCCCATCTAAGATGCAACTCAAGGTGTGATGTGGACCCTGAATGTCCCAATAGG	960
	G T P T Y E <b>(C)</b> N S R <b>(C)</b> R <b>(C)</b> G P E <b>(C)</b> P N R	309

Fig. 1/3

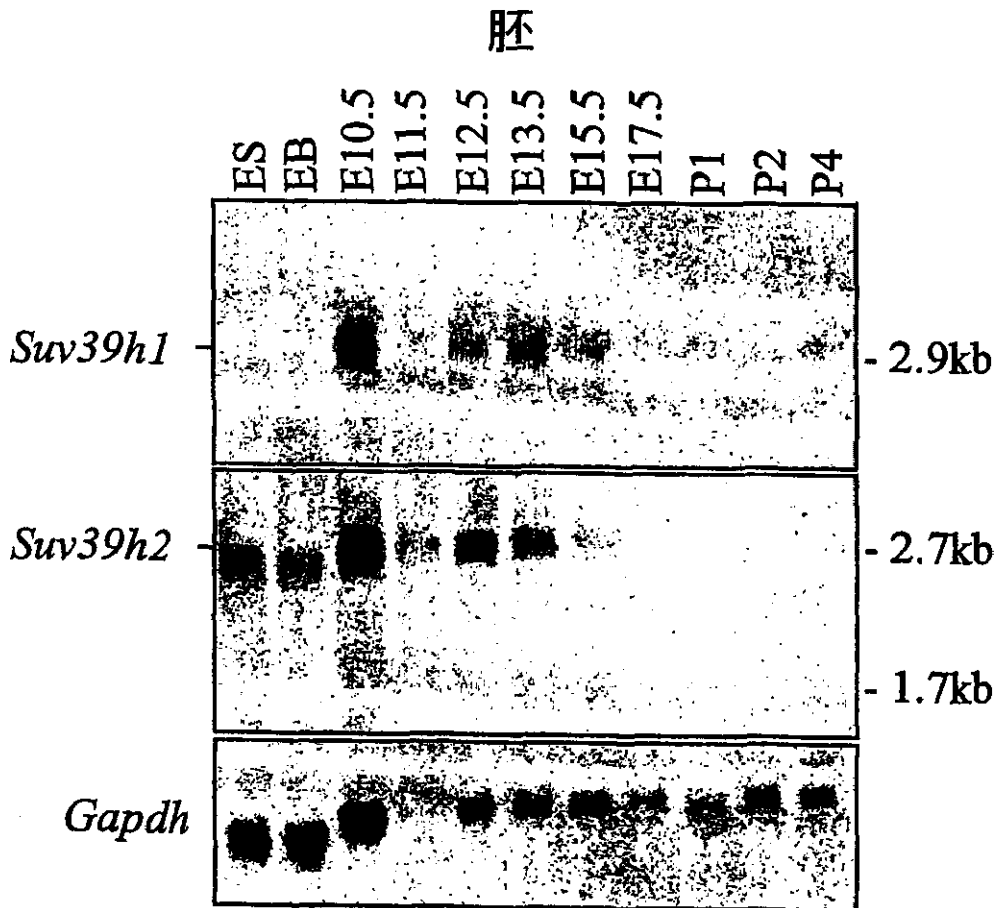
961	ATTGTACA...AAGGCACACATATTTACTGTGCATCTTTAAACTAGCAATGGCTGTGGT	1020
	I V Q K G T Q Y S L C I F K T S N G C G	329
1021	TGGGGTGTAA...AAGCCCTTGTGAAGANTTAAAGANTGAGTTTGTTCATGGAAATATGTGGAA	1080
	W G V K T L V K I K R M S F V M E Y V G	349
1081	GAGGTGATCA...AAGTGAAGAGGCCGAGAGACGGGACAGTTCTATGACAAACAAGGATC	1140
	E V I T S E E A E R R G Q F Y D N K G I	369
1141	AGGTACCTCT...TGACCCTGGACTAACAGTCTGATGAGTTCAAGTGAATGCAAGCTCGAAT	1200
	H Y L F D L D Y E S D E F T V D A A R Y	389
1201	GGAAACGTA...PCCCATTTTGTGATCAATGAGTTTGAACCCAAATCTTCAGGTGTTTLAGTGT	1260
	G N V S H F V N H S C D P N L Q V F S V	409
1261	TTGATCGATA...CCCTTGATTACTCGCTGCGCCAGATAGCAITMPTTCTTACAGAAACCAATA	1320
	F I D N L D I R L P R I A L F S T R T I	429
1321	AAGCTGGA...AAGAGCTGACTTTTGACTATTCATGAAATGAAAGGTTCTTGAGAGCAATCTTCA	1380
	N A G H E E L T F D Y Q M K G S G E A S S	449
1381	GACTCCATT...GACCACAGCCCTGCCAAAAAAGGGTCAAGAACCCCAATGTAATAATGTGAGGCC	1440
	D S I D H S P A K K R	469
1441	GAGACTTG...CAGAGGTTTACCTCAACTGAAGTgtcggyaaacg	1481
	477	

【图2】



【图3】

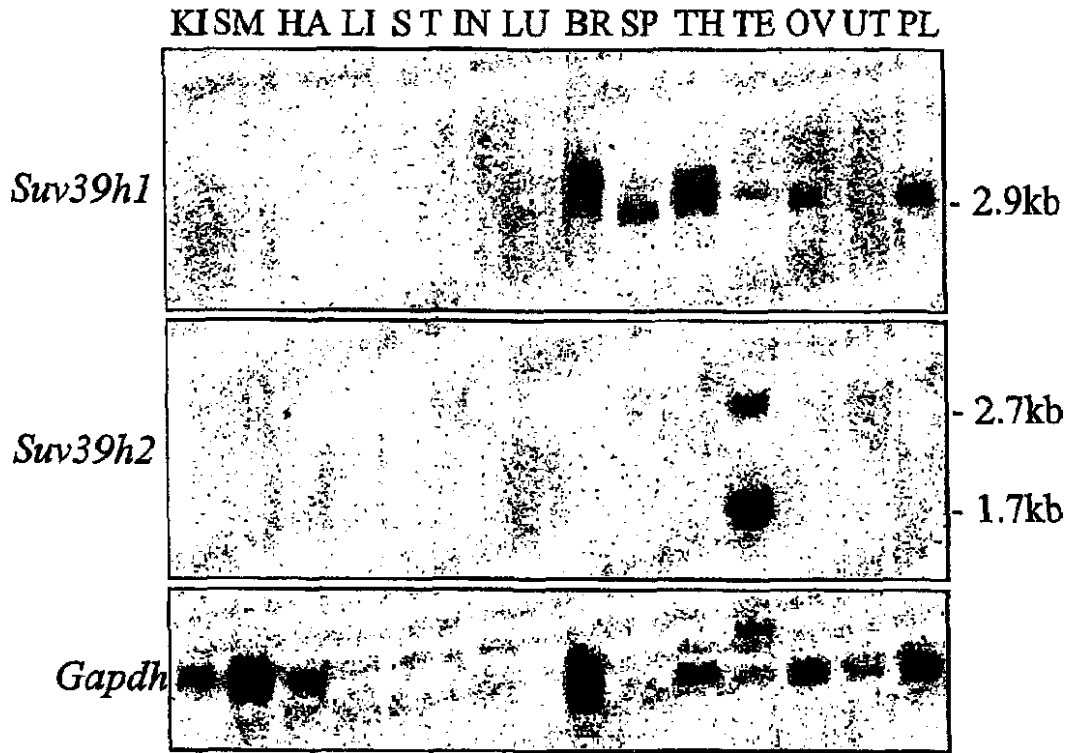
Fig. 3



【図4】

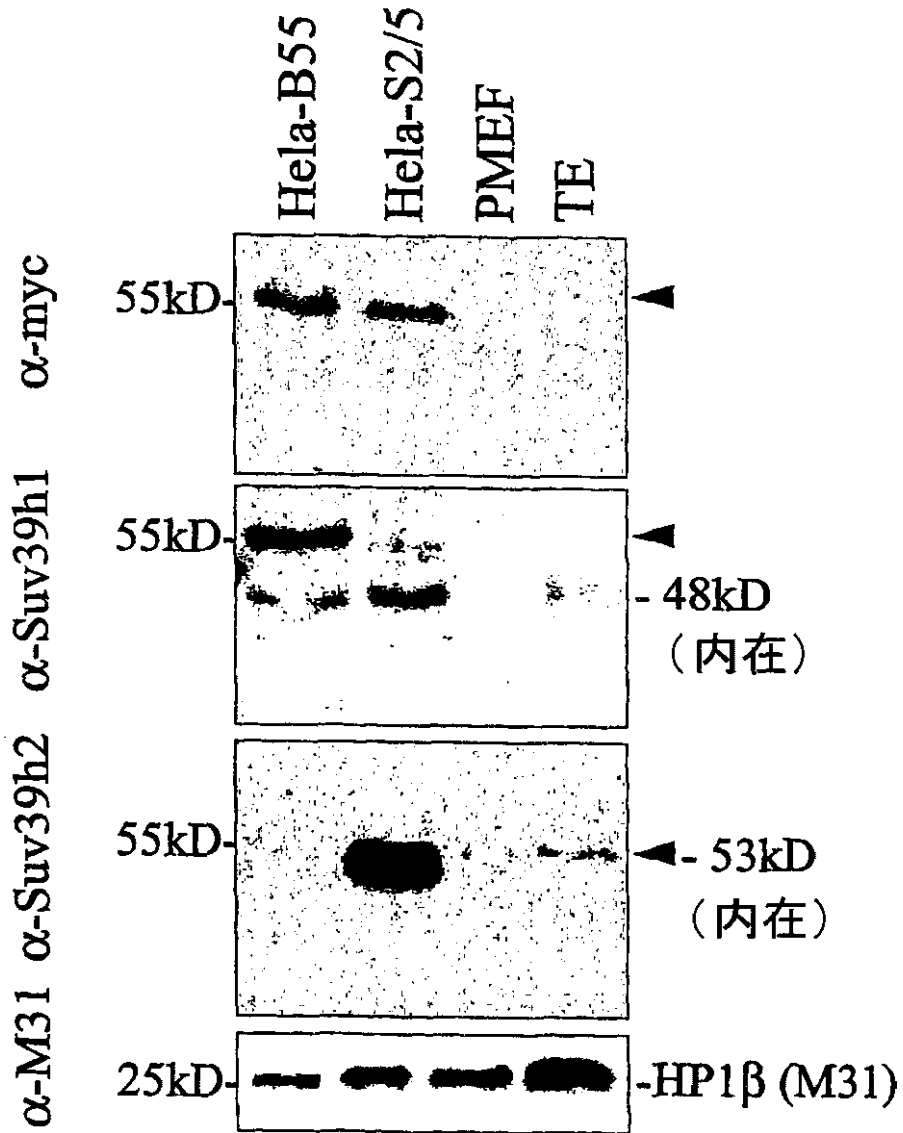
Fig. 4

成体



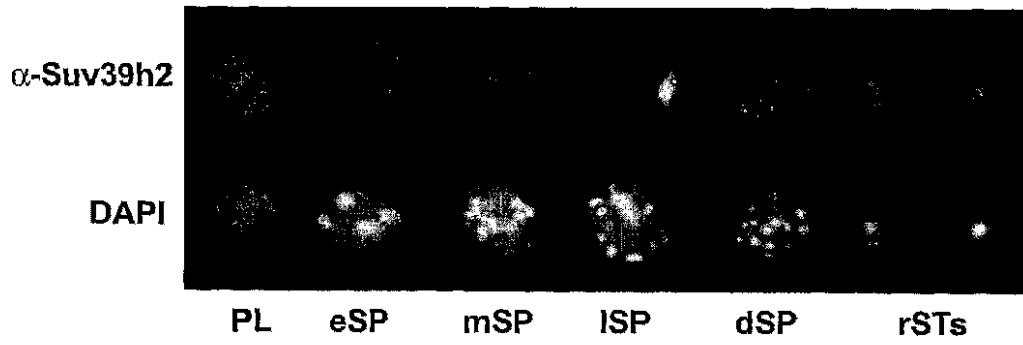
【图5】

Fig. 5



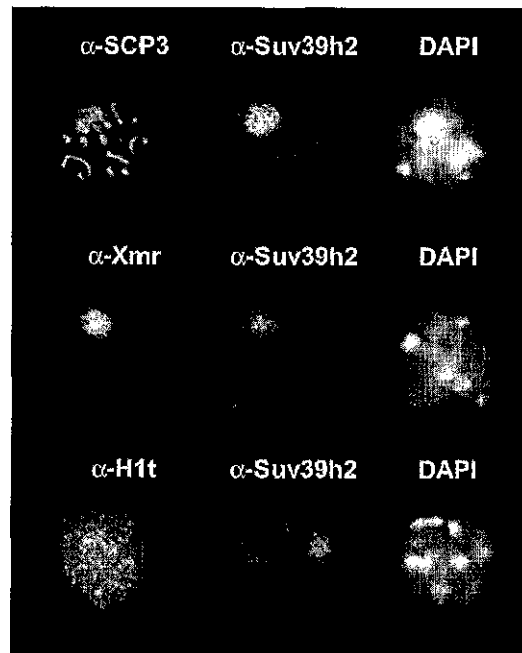
【図6】

Fig. 6



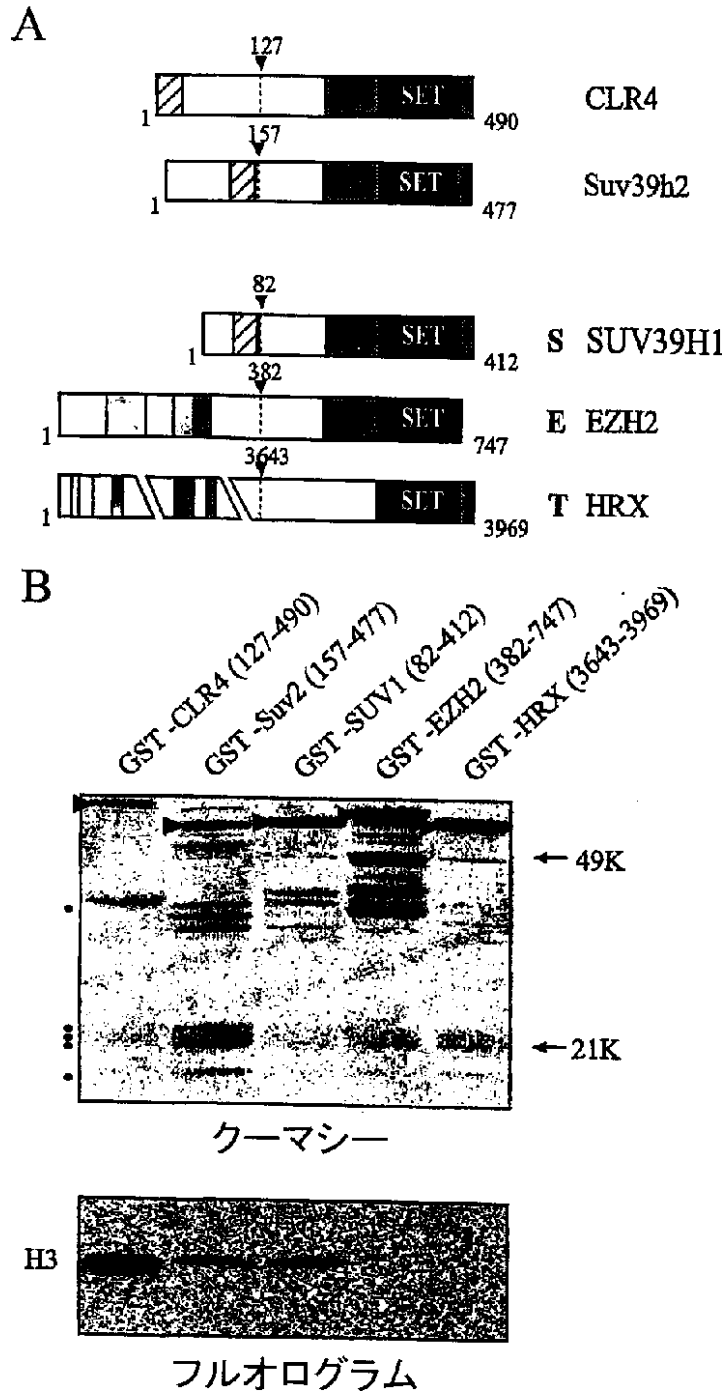
【図7】

Fig. 7



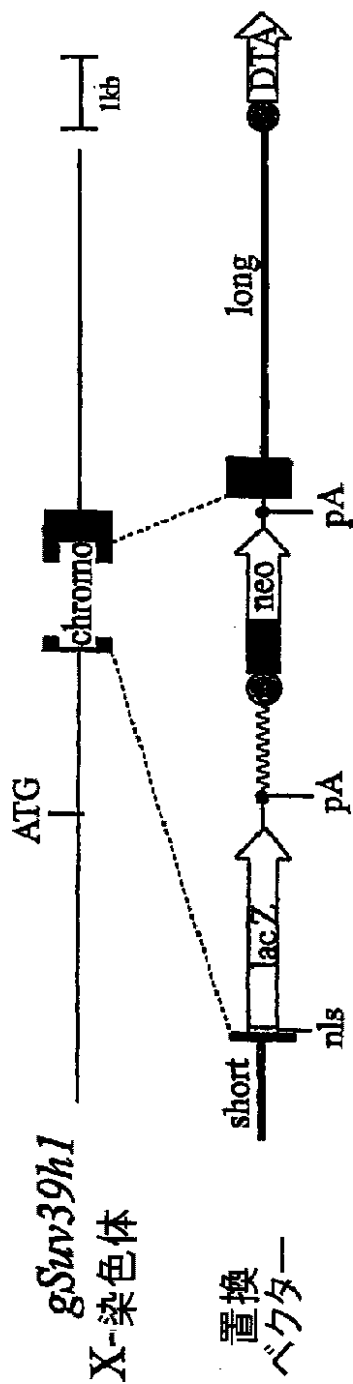
【図8】

Fig. 8



【図9A】

Fig. 9A



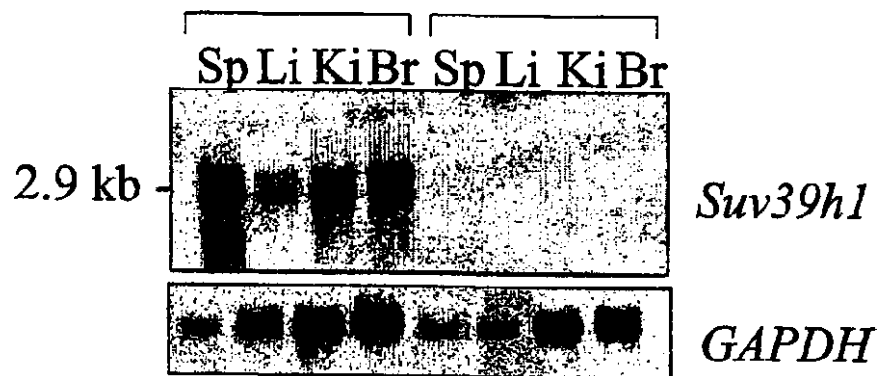
【図9B】

**Fig. 9B**

B

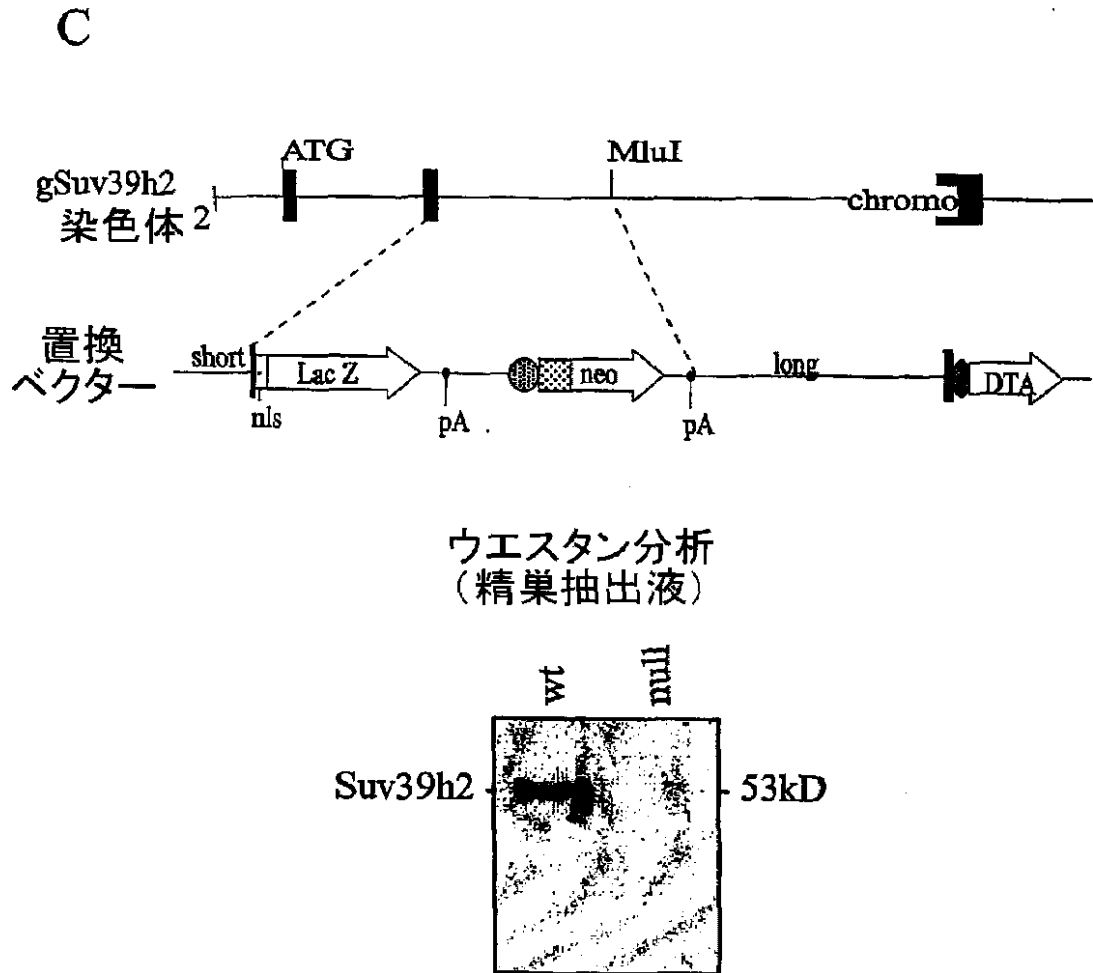
ノーザン分析

野生型(wt)    ノル(null)



【図9C】

Fig. 9C



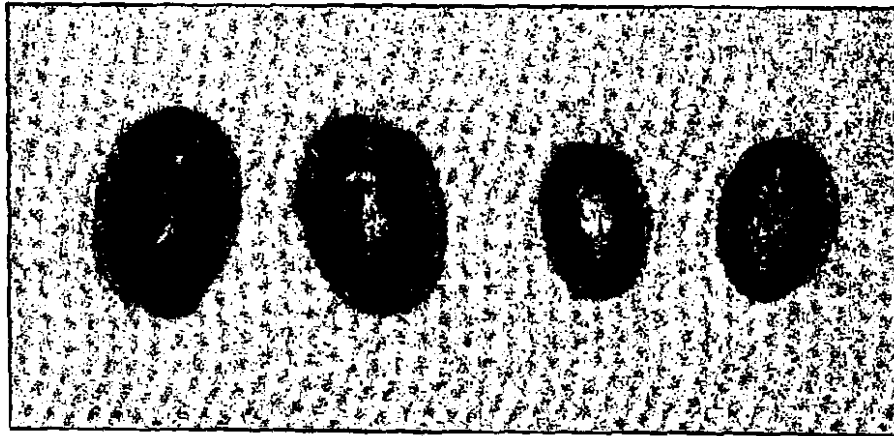
【図10】

Fig. 10

A

野生型(wt)

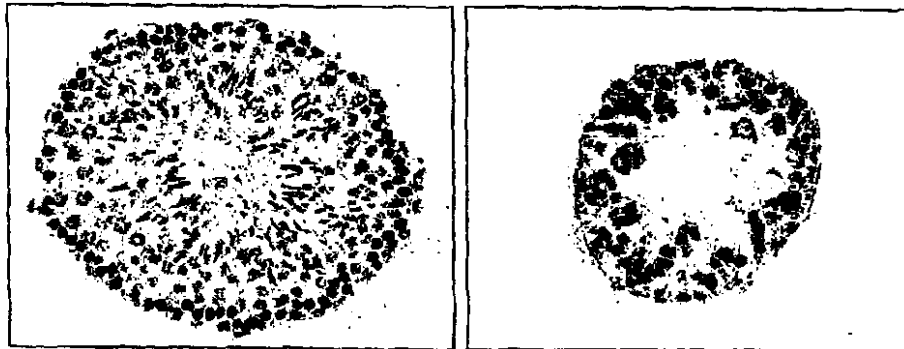
二重 (double  
ヌル null)



B

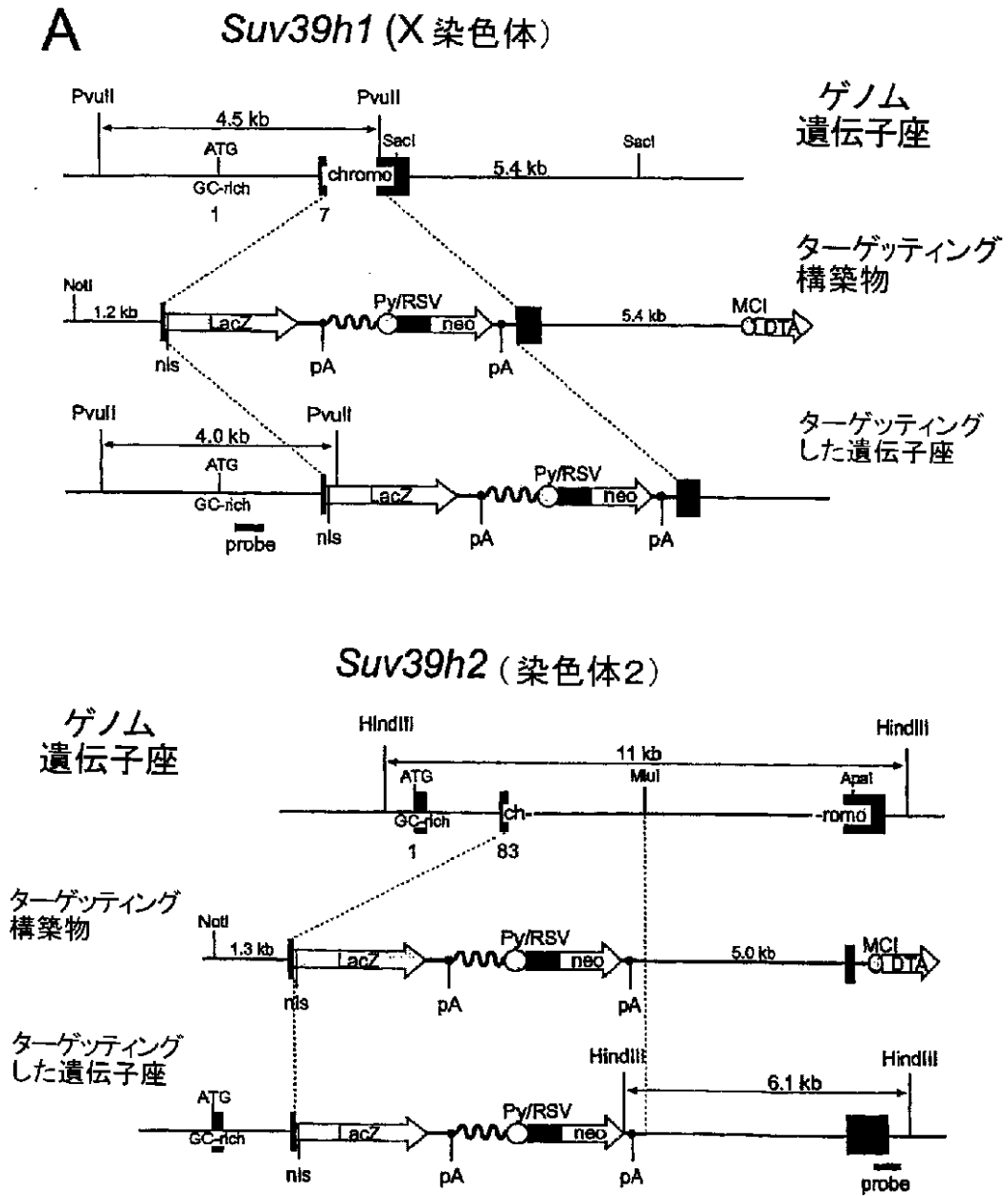
野生型(wt)

二重 (double  
ヌル null)



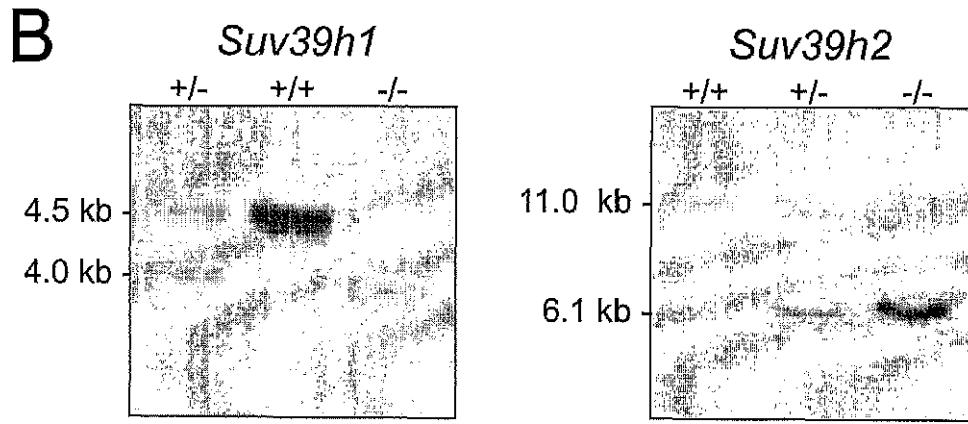
【図11A】

Fig. 11A



【図11B】

Fig. 11B




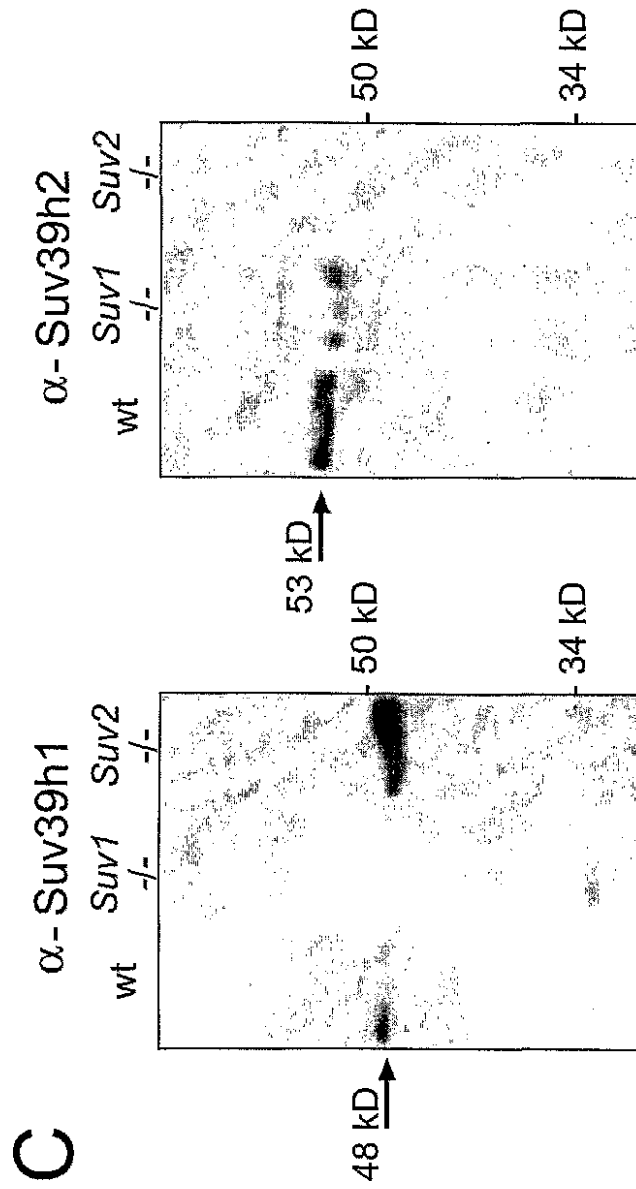
【 11C】

Fig. 11C



【図11D】

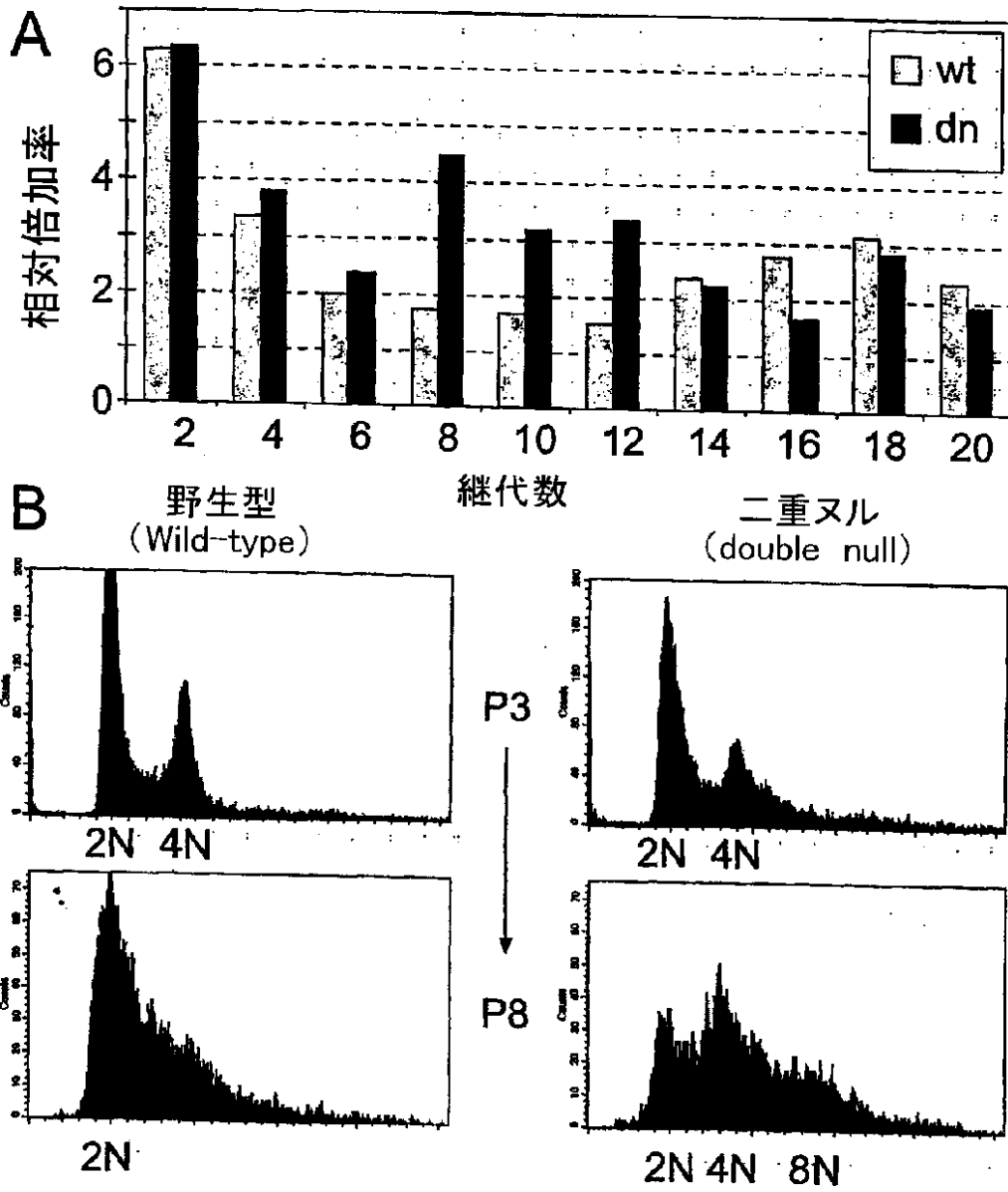
Fig. 11D

D



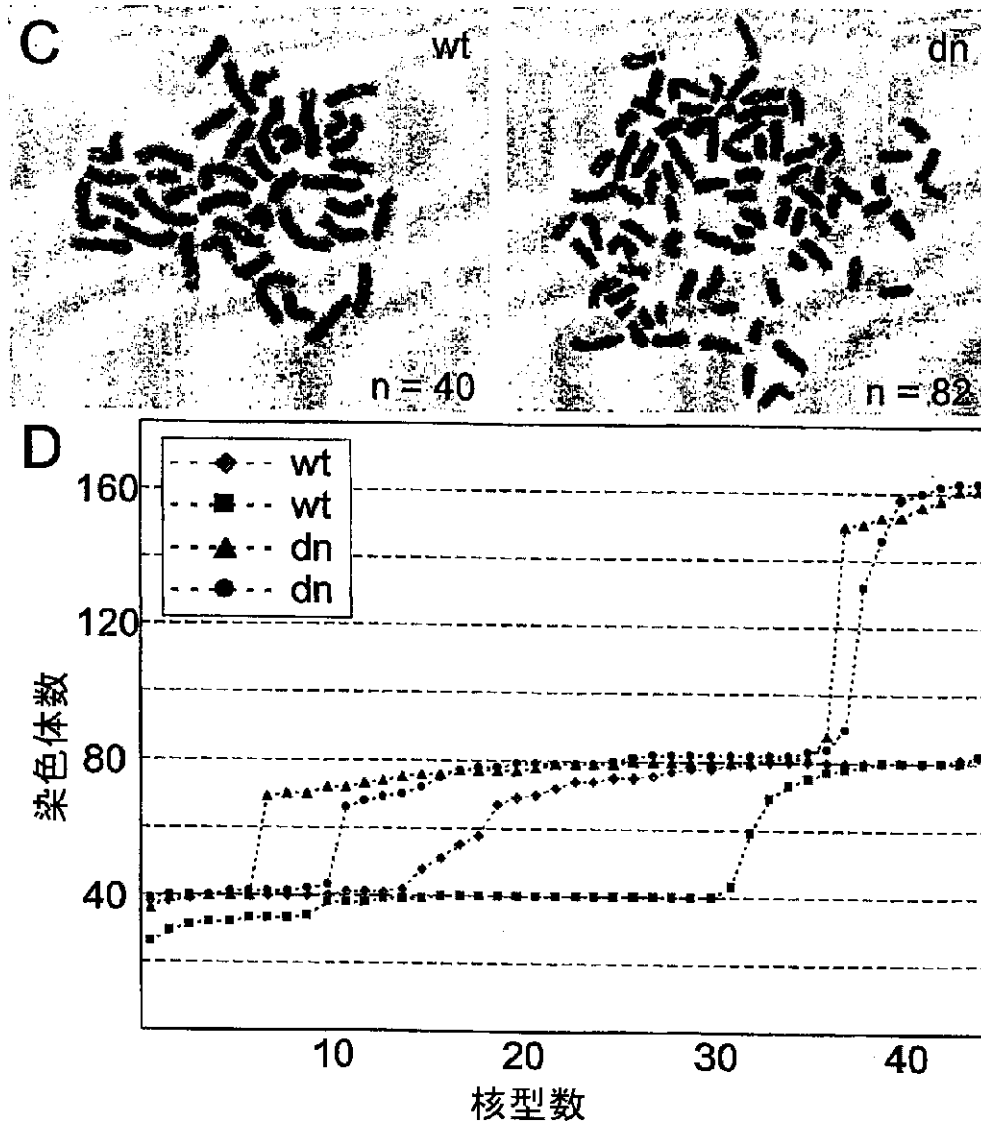
【図12A, B】

Fig. 12A,B



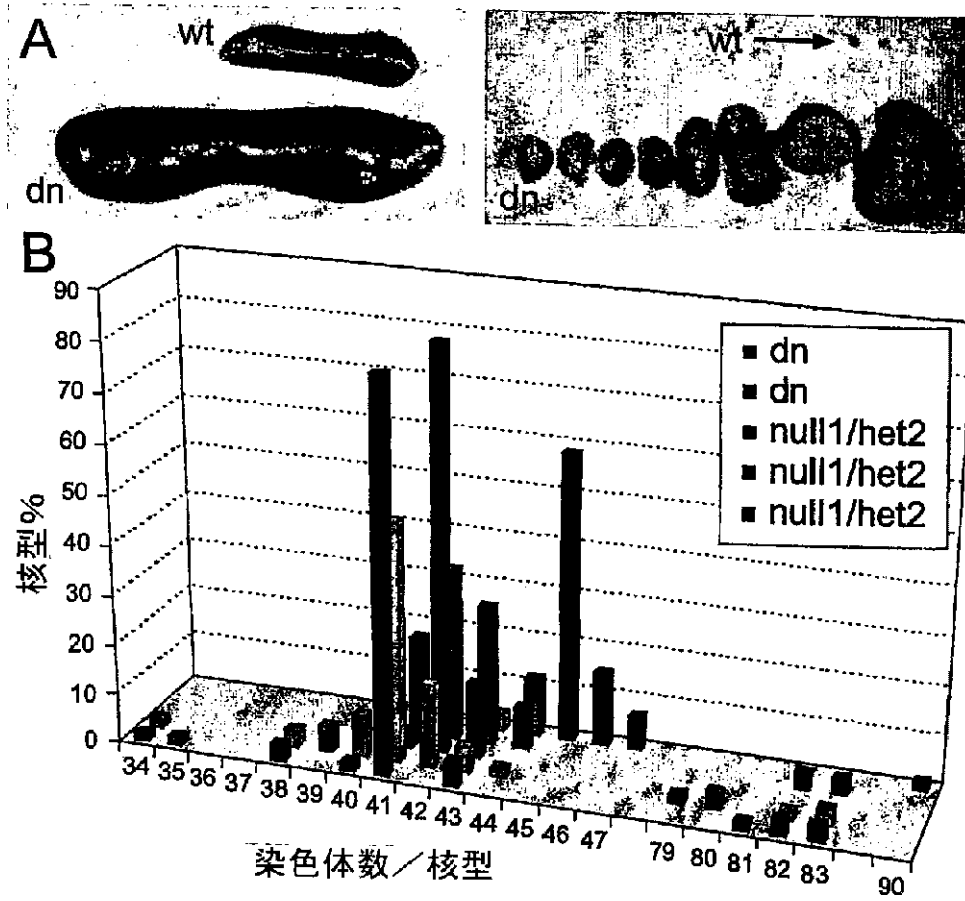
【图12C, D】

Fig. 12CD



【图13A, B】

Fig. 13A,B




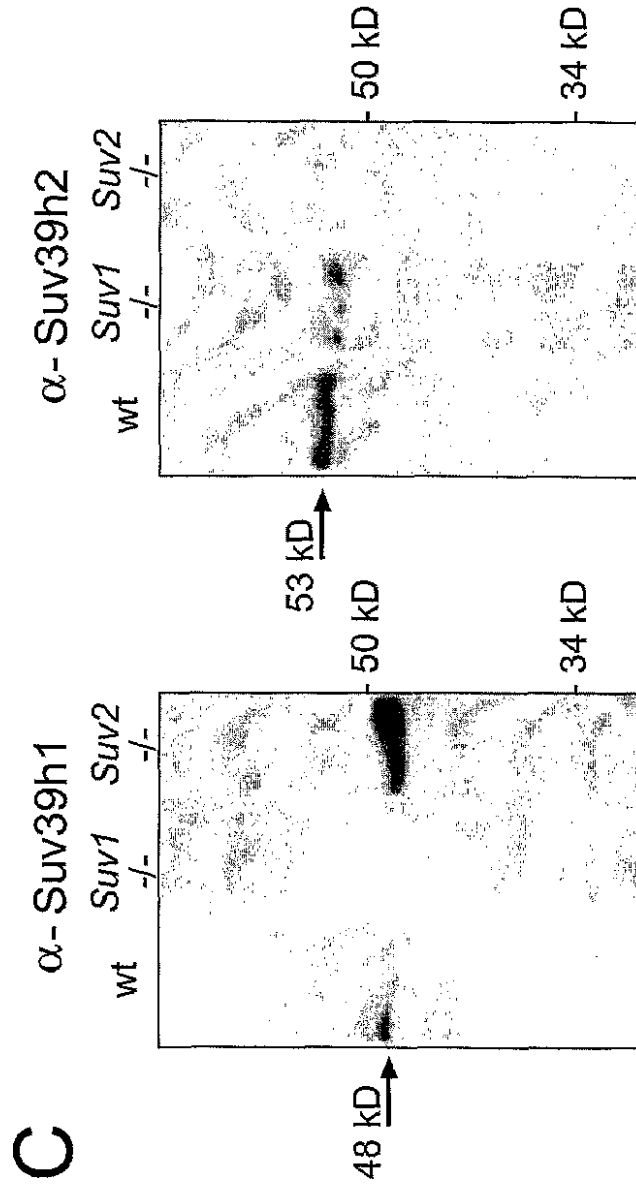
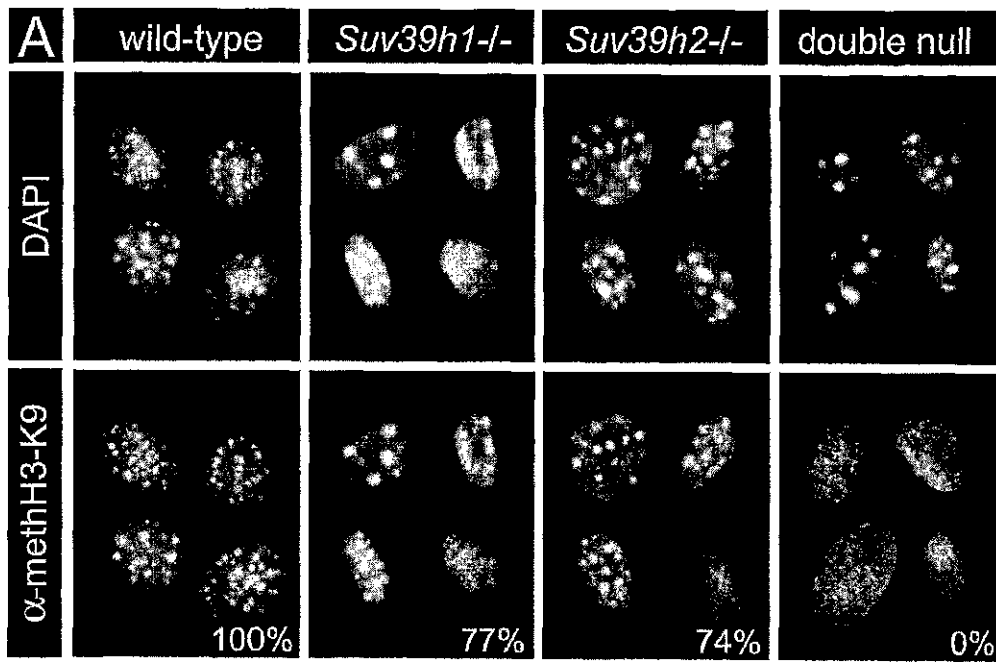
【 13C】

Fig. 13C



【図14A】

Fig. 14A




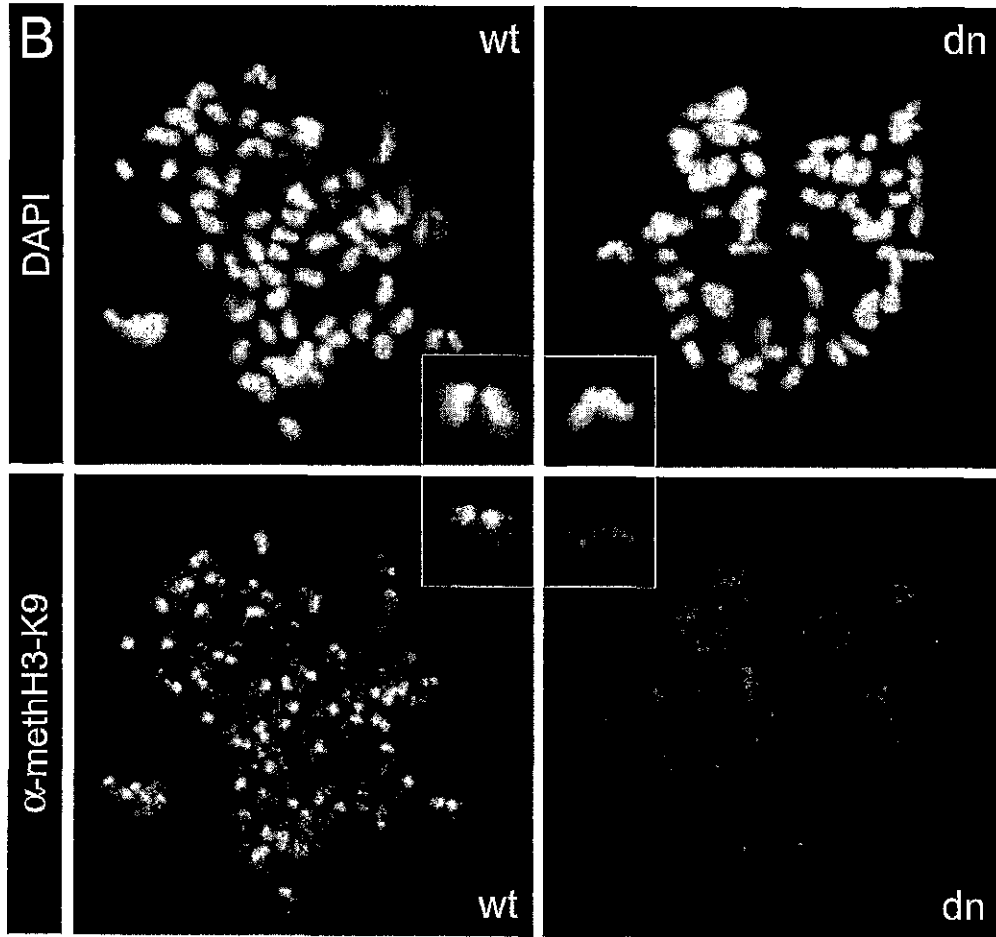
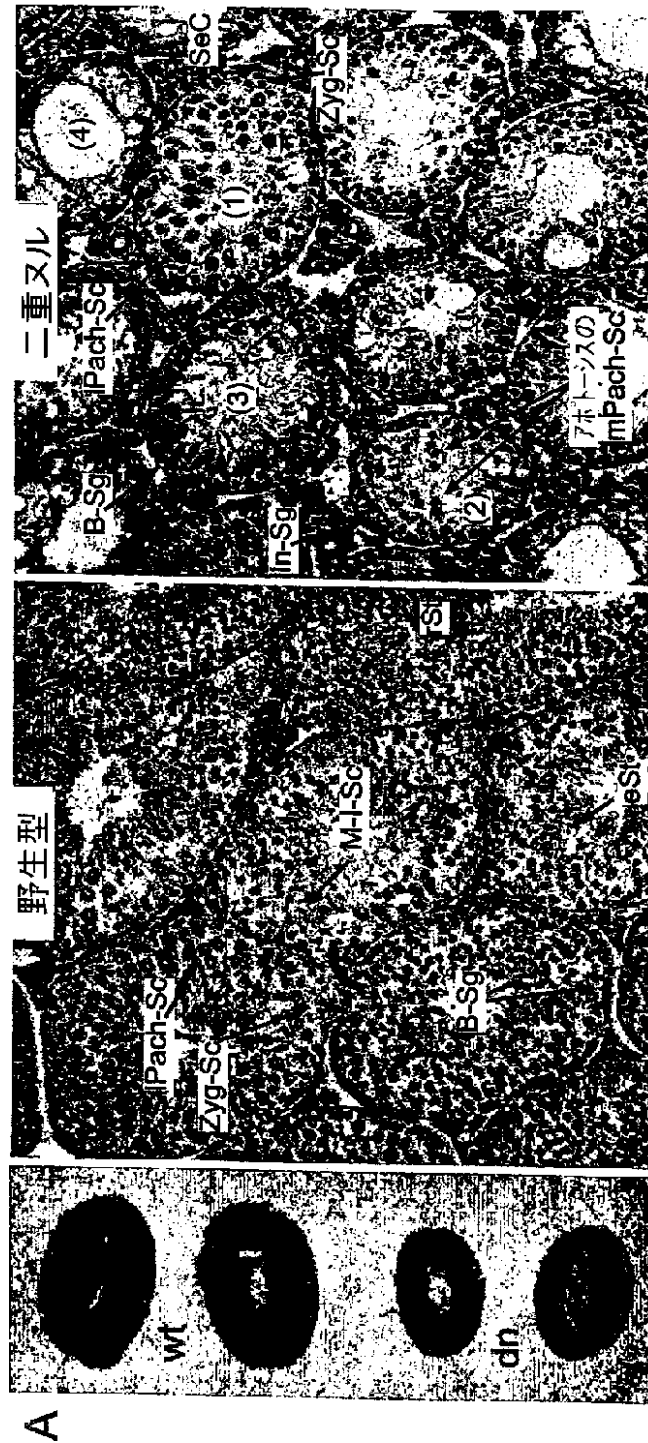
【 14 B】

Fig. 14B



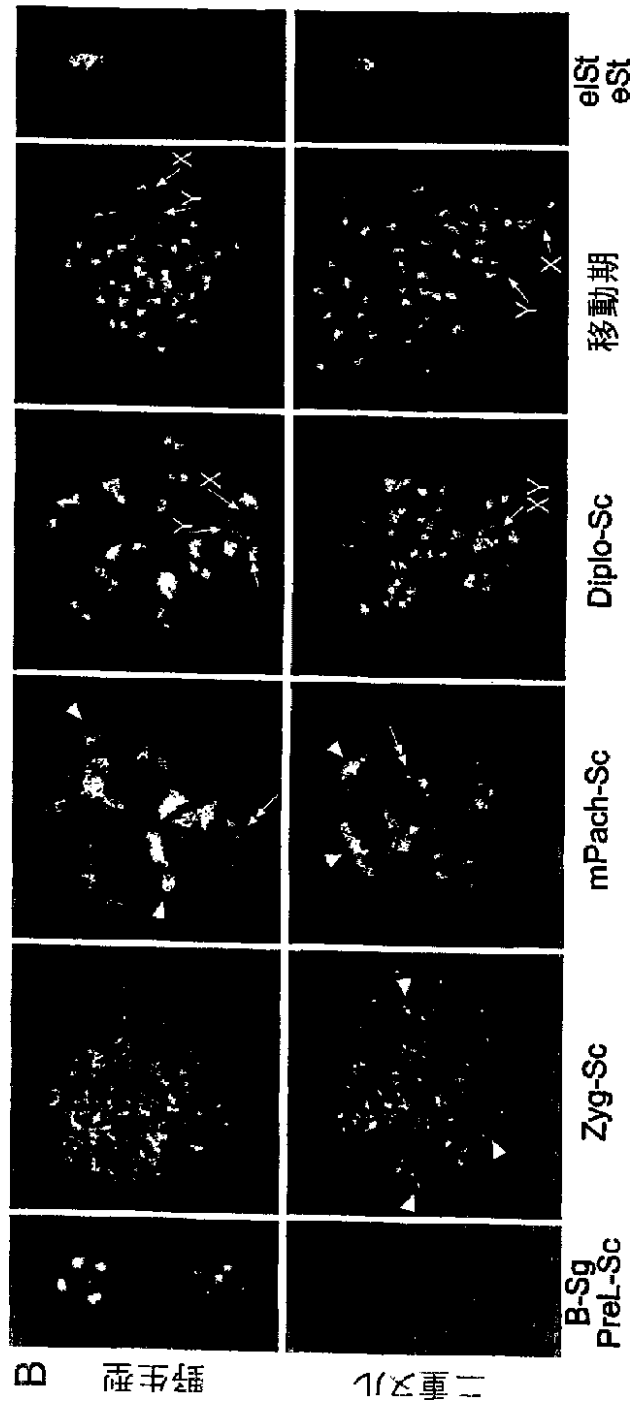
【図15A】

Fig. 15A



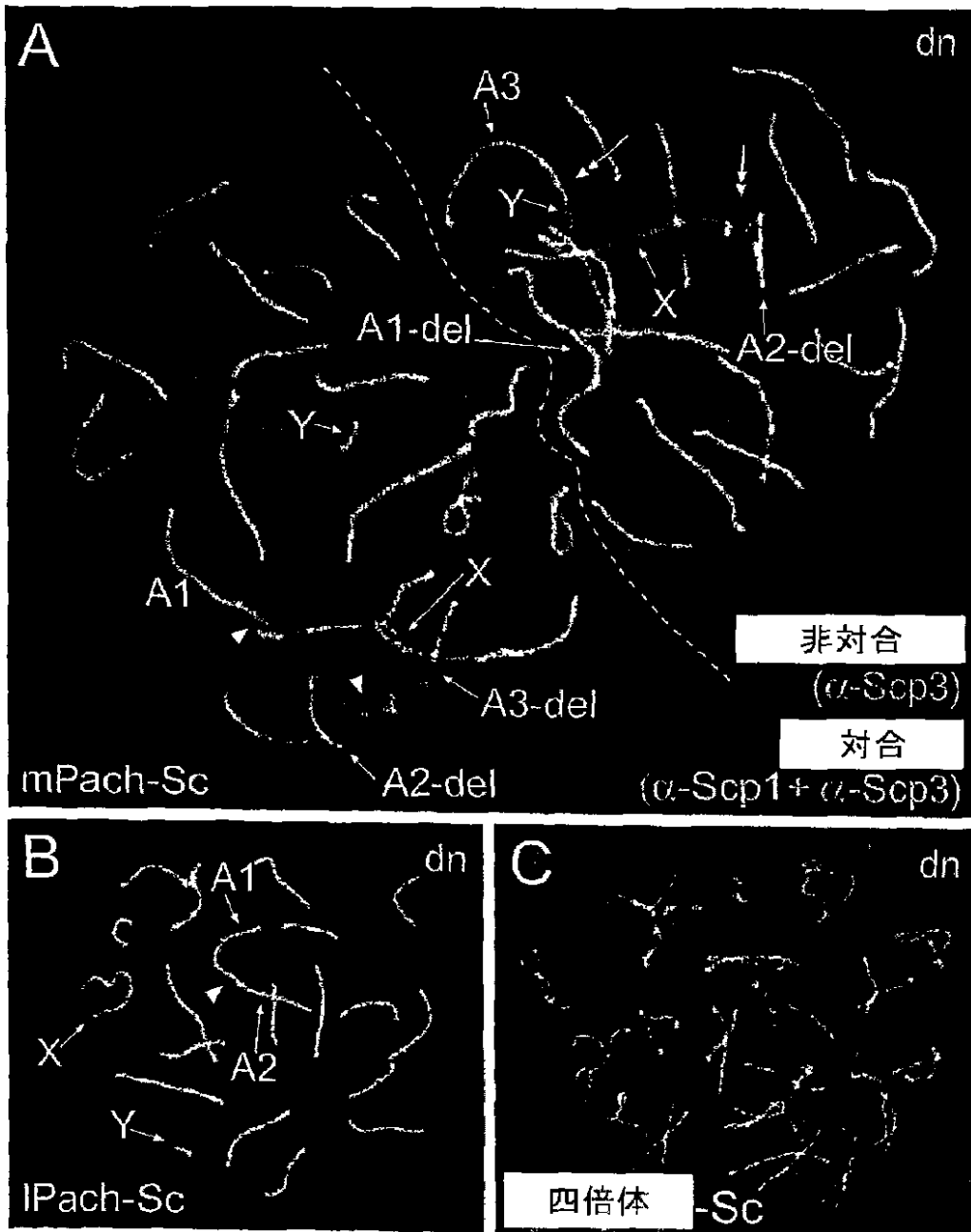
【図15B】

Fig. 15B



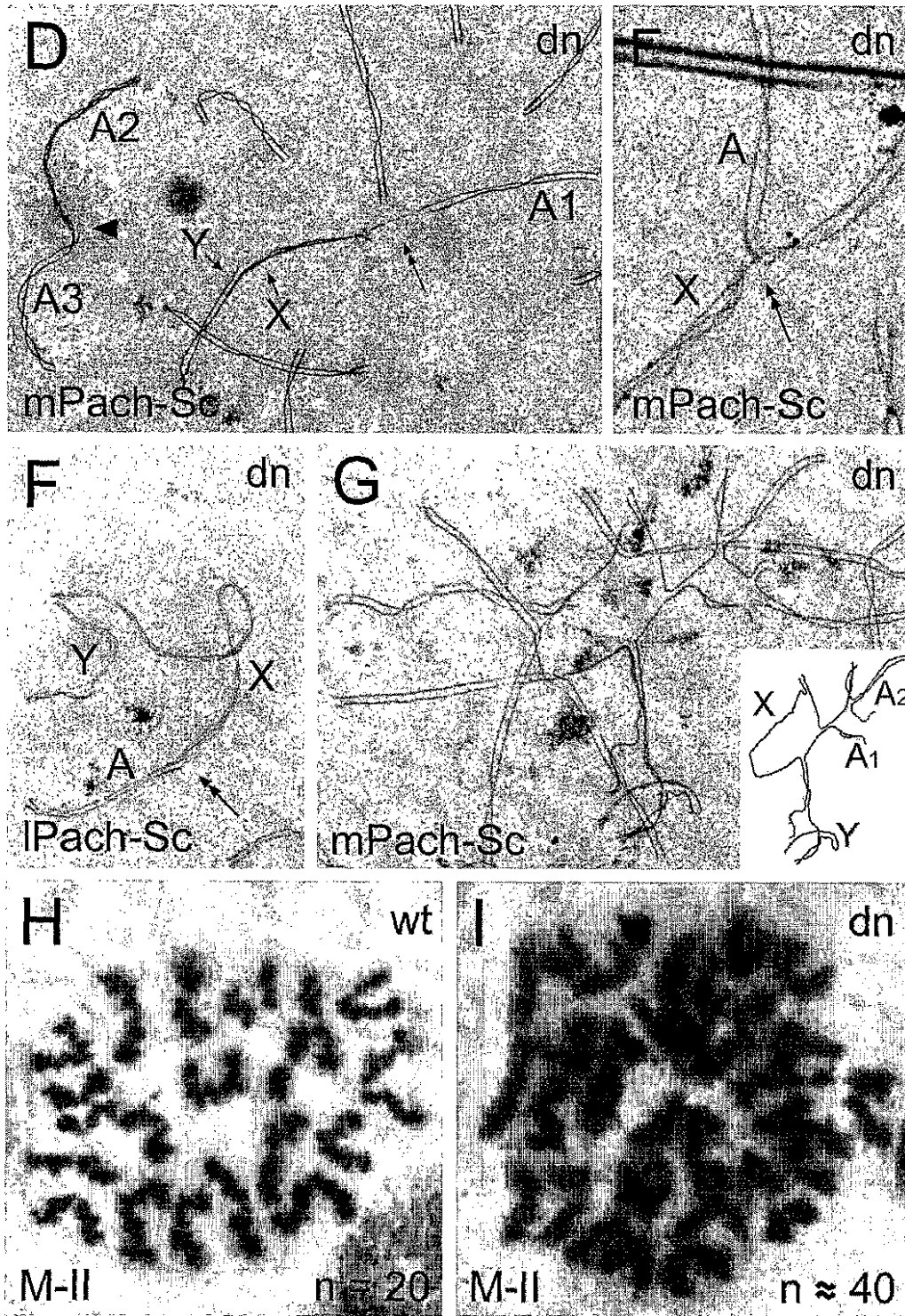
【图16A-C】

Fig. 16 A-C



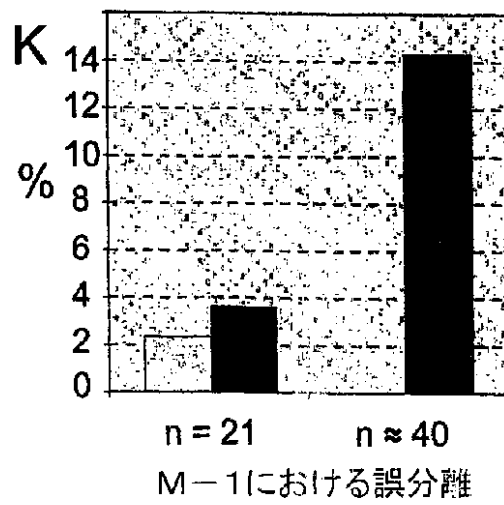
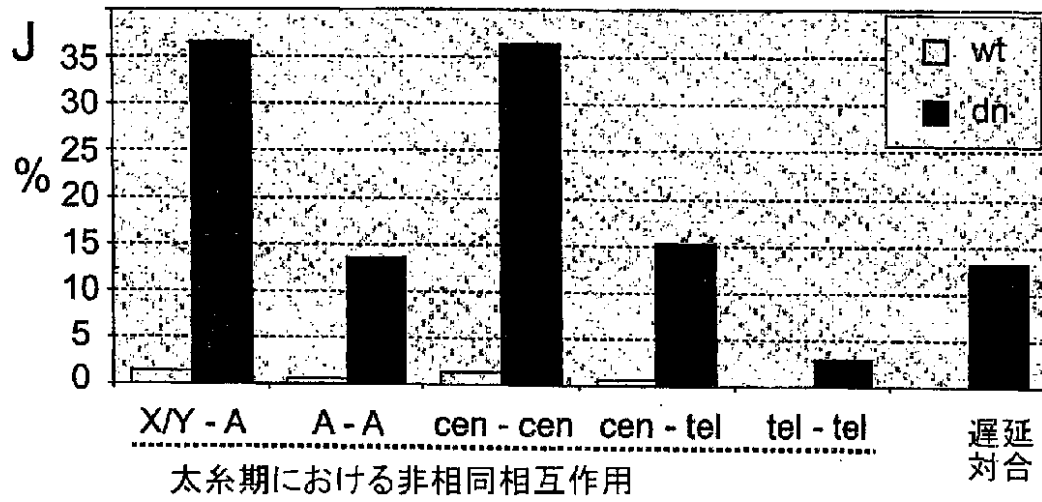
【图 16 D - I】

Fig. 16 D-I



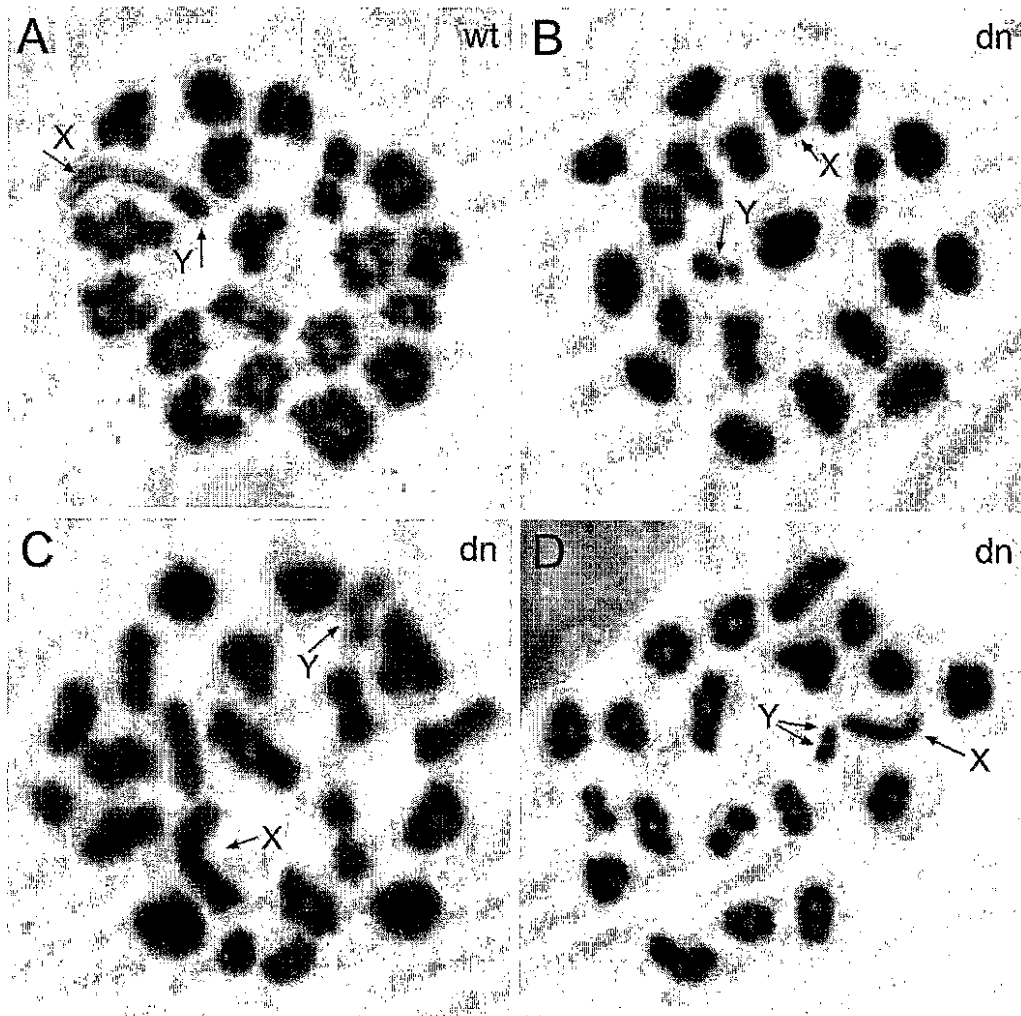
【図16J, K】

Fig. 16 J,K



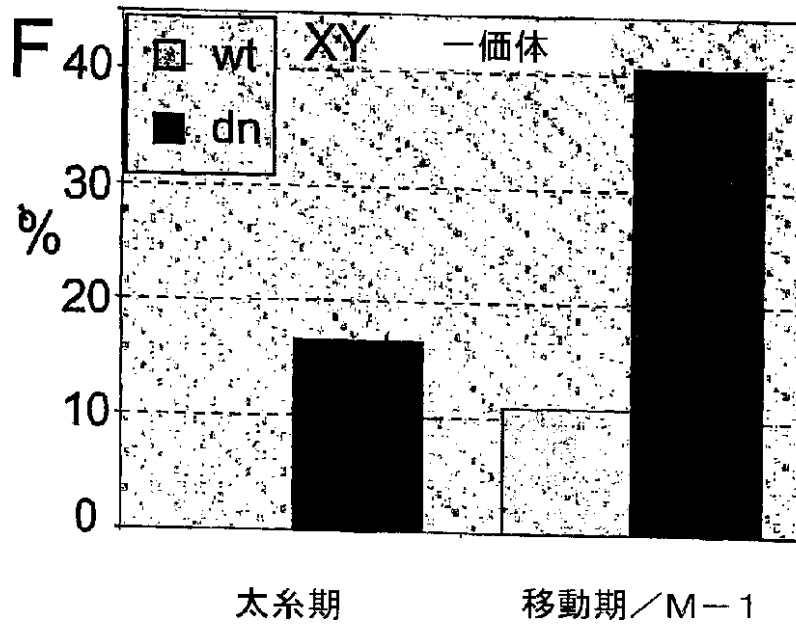
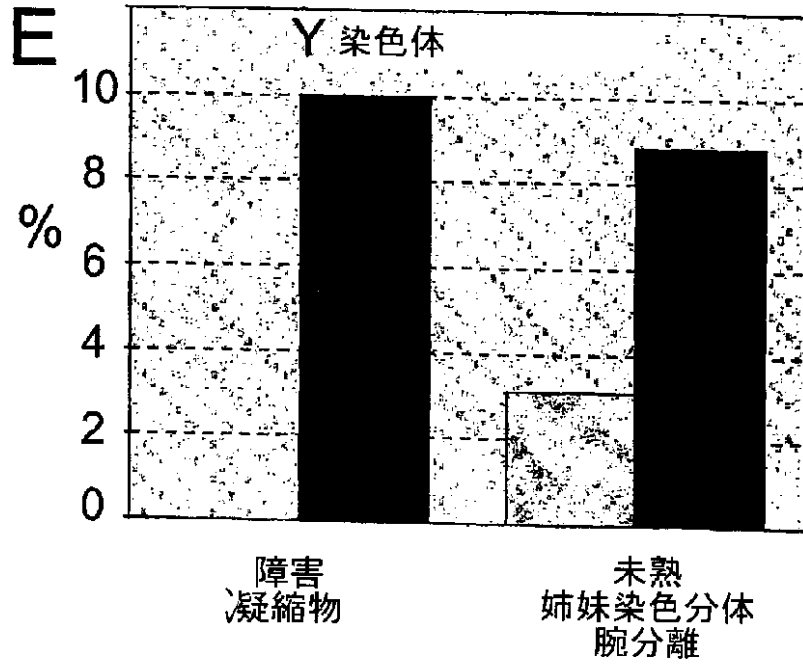
【图17A-D】

Fig. 17 A-D



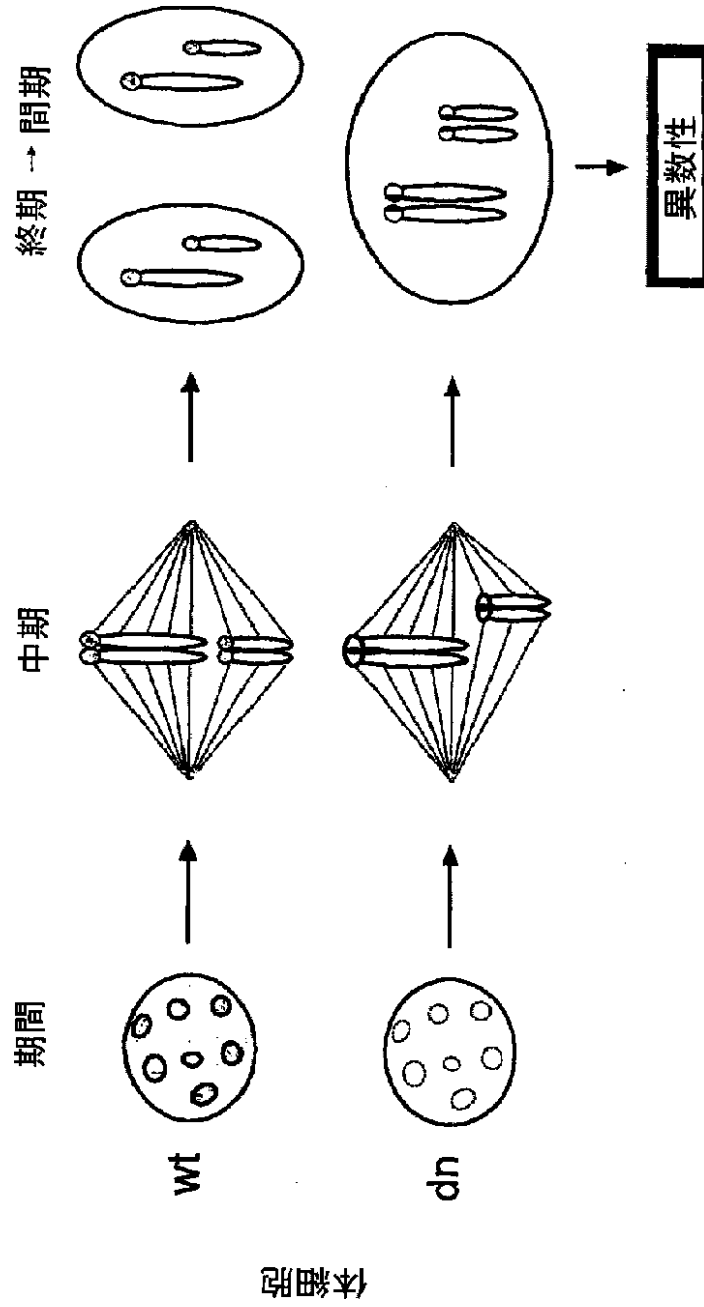
【図17E, F】

Fig. 17 E, F



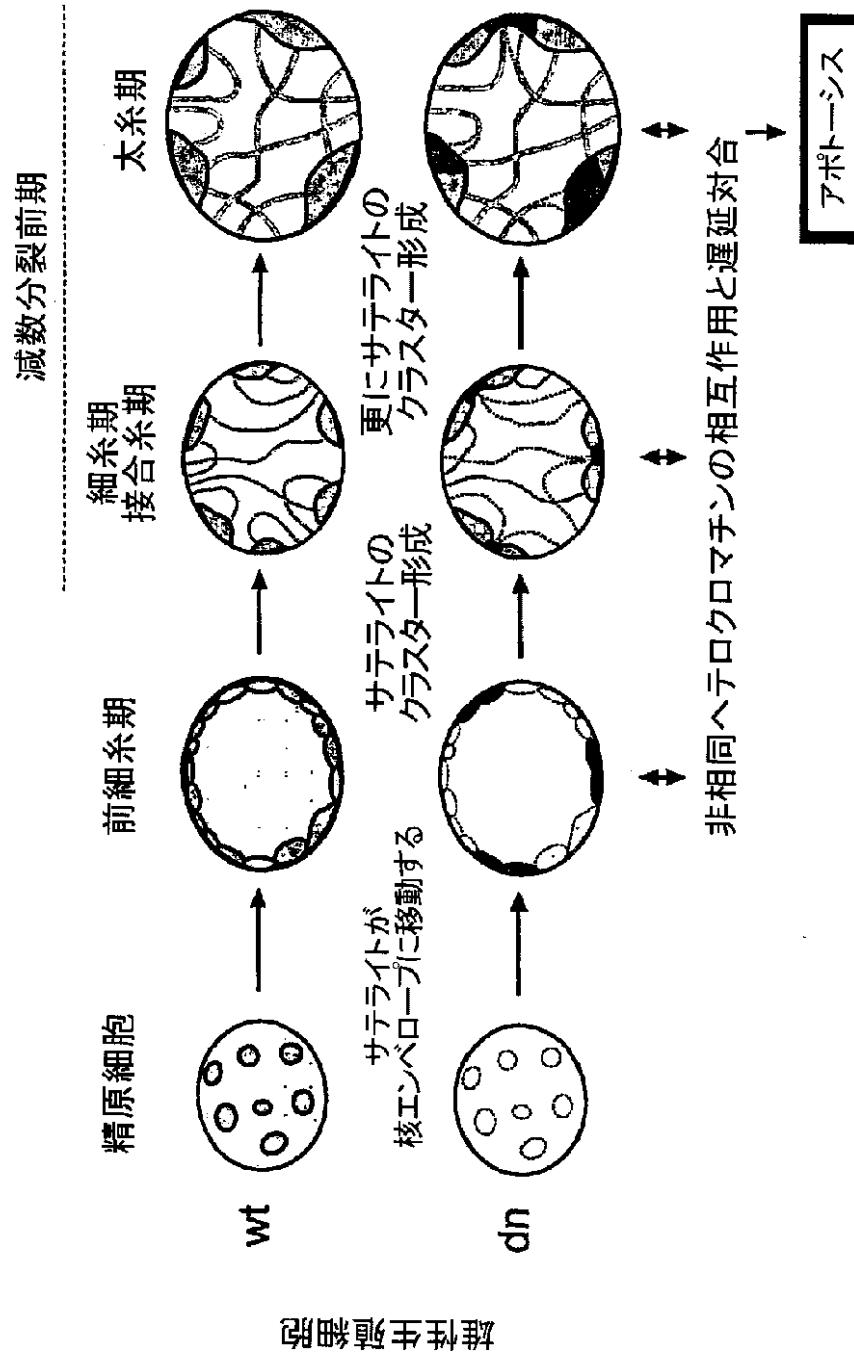
【圖18/1】

Fig. 18/1



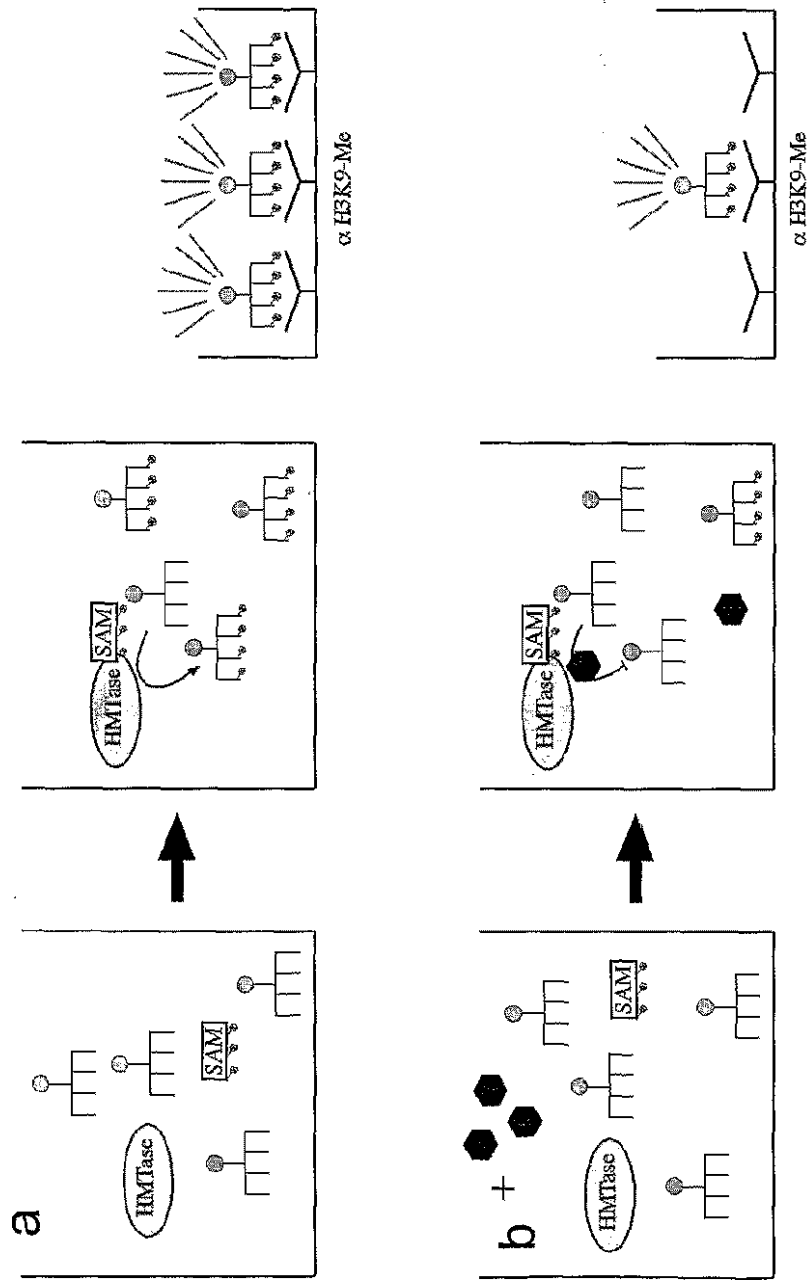
【図18/2】

Fig. 18/2



【図19】

Fig. 19



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 01/06520

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/48 G01N33/68 C07K7/02 C07K16/44 C12N9/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q G01N C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPD-Internal, EMBL, BIOSIS, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Ac No. : AF149204, 2 June 2000 (2000-06-02) O'CARROLL D ET AL.: "Suv maps to chromosome 2" XP002155318 the whole document	1-6
A	DATABASE EMBL 'Online! Ac No. : AA066708, 27 September 1996 (1996-09-27) MARRA M ET AL.: "The WashU-HHMI Mouse EST Project" XP002155319 the whole document	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
23 October 2001	07/11/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2230 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Tuyman, A	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 01/06520

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>STRAHL BRIAN D ET AL: "Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 96, no. 26, 21 December 1999 (1999-12-21), pages 14967-14972, XP002154904 ISSN: 0027-8424 cited in the application page 14967, left-hand column, line 27 -right-hand column, line 1 page 14967, right-hand column, line 32 -page 14968, left-hand column, line 21</p>	7,8, 11-14,16
A	<p>MACFARLEN J O ET AL: "COLORIMETRIC ASSAY FOR GUAIACOL O METHYL TRANSFERASE" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION. WASHINGTON, US, vol. 65, no. 11, 1976, pages 1689-1690, XP002156114 ISSN: 0022-3549 the whole document</p>	7,13-16
A	<p>WO 99 11667 A (RAYMACKERS JOSEPH ;UNION ANN (BE); INNOGENETICS NV (BE); MEHEUS LY) 11 March 1999 (1999-03-11) abstract page 4, line 15 - line 22 page 5, line 27 -page 6, line 4</p>	7,17,18
P,X	<p>REA STEPHEN ET AL: "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 406, no. 6796, August 2000 (2000-08), pages 593-599, XP002154907 ISSN: 0028-0836 cited in the application abstract page 596, left-hand column, line 9 -right-hand column, line 22 page 598, right-hand column, line 42 -page 599, left-hand column, line 6</p>	7-14,16
P,A	<p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-6,17, 18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 01/06520

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	O'CARROLL D ET AL: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SUV39H2, A SECOND HISTONE H3 METHYLTRANSFERASE GENE THAT DISPLAYS TESTIS-SPECIFIC EXPRESSION" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 20, no. 24, December 2000 (2000-12), pages 9423-9433, XP000979898 ISSN: 0270-7306 cited in the application the whole document figure 1 page 9429, right-hand column, line 6 -page 9430, left-hand column, line 18 page 9432, left-hand column, line 3 - line 49	1-6
P,A	-----	7-14,16
P,X	NAKAYAMA JUN-ICHI ET AL: "Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 292, no. 5514, 2001, pages 110-113, XP002177964 ISSN: 0036-8075 cited in the application page 111, middle column, line 7 - line 24	7,8,11,17
P,X	-& NAKAYAMA JUN-ICHI ET AL.: SCIENCE-SUPPLEMENTAL DATA, 'Online! 6 April 2001 (2001-04-06), XP002177965 Retrieved from the Internet: <URL:www.sciencemag.org/cgi/content/full/1060118/DC1> 'retrieved on 2001-09-20! the whole document -----	7,8,11,17

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 19-21

Present claims 19-21 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely being identifiable in a method defined in any one of claims 7 to 18.

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides no support within the meaning of Article 6 PCT nor disclosure within the meaning of Article 5 PCT for such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has not been carried out for these claims.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 01/06520

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9911667	A	11-03-1999	AU 9438798 A	22-03-1999
			WO 9911667 A1	11-03-1999
			EP 0944649 A1	29-09-1999
			JP 2001505785 T	08-05-2001

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)		
C 1 2 N	9/10	C 1 2 Q	1/48	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 Q	1/48	G 0 1 N	33/15	Z	
G 0 1 N	33/15		33/50	Z	
	33/50		33/573	A	
	33/573	C 1 2 N	15/00	Z N A A	

(81)指定国 E P ( A T , B E , C H , C Y ,  
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I  
 T , L U , M C , N L , P T , S E , T R ) , O A ( B F  
 , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W ,  
 M L , M R , N E , S N , T D , T G ) , A P ( G H , G  
 M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z  
 , U G , Z W ) , E A ( A M , A Z , B Y , K G , K Z ,  
 M D , R U , T J , T M ) , A E , A L , A M , A T ,  
 A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C  
 H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E  
 , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R ,  
 H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K  
 P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U  
 , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X ,  
 N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S  
 G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z  
 , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W

(72)発明者 オーキャロル ドーナル  
 アイルランド カウンティ ウィックロー  
 グレイストーンズ カーラン ニュー  
 ロード

F タ-ム(参考) 2G045 AA40 FB01 FB03 FB07 FB08  
 4B024 AA01 BA10 CA04 DA02 DA03  
 HA17  
 4B050 CC03 DD11 LL01  
 4B063 QA18 QQ08 QQ26 QQ80 QR06  
 QR49 QR77 QX01 QX07  
 4C084 AA06 AA07 AA13 AA17 CA53  
 CA56 CA59 MA52 MA55 NA14  
 ZA861 ZB261 ZC611 ZC781  
 4H045 AA11 DA75 FA74

专利名称(译)	SUV39H2甲基转移酶调节剂的筛选方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003535596A</a>	公开(公告)日	2003-12-02
申请号	JP2002502161	申请日	2001-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	百灵佳殷格翰国际股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	勃林格殷格翰国际法理社会手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	イエヌヴァイントーマス レイステイーブン オーキャロールドーナル		
发明人	イエヌヴァイン トーマス レイ ステイーブン オーキャロール ドーナル		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P15/16 A61P35/00 C07K7/02 C07K16/18 C07K16/40 C07K16/44 C12N9/10 C12N15/09 C12Q1/48 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/573 G01N33/68		
CPC分类号	A61P15/16 C07K16/40 C12N9/1007 C12Q1/48 G01N33/6875 G01N2333/91011 G01N2500/00		
FI分类号	A61K45/00 A61P15/16 A61P35/00 C07K16/40 C12N9/10 C12Q1/48.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/573.A C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/BA10 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/HA17 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ26 4B063/QQ80 4B063/QR06 4B063/QR49 4B063/QR77 4B063/QX01 4B063/QX07 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/NA14 4C084/ZA861 4C084/ZB261 4C084/ZC611 4C084/ZC781 4H045/AA11 4H045/DA75 4H045/FA74		
优先权	2000112479 2000-06-09 EP 2000112345 2000-06-09 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

小鼠和人类Suv39h2多肽以及编码它们的DNA分子。Suv39h2是一个新的Suv3-9基因家族物种。Suv39h2是一种新型的减数分裂高阶染色质组件。它具有组蛋白甲基转移酶活性，是与Suv39h1结合产生雄性配子所必需的。Suv39h2可用于筛选方法，以确定用于癌症治疗和男性避孕的甲基转移酶活性调节剂。

レーターのスクリーニング法

