

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-81216

(P2004-81216A)

(43) 公開日 平成16年3月18日(2004.3.18)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C12N 15/00  
C07K 14/82  
C07K 16/32  
C12N 1/19  
C12N 1/21

F I

C12N 15/00 ZNAA  
C07K 14/82  
C07K 16/32  
C12N 1/19  
C12N 1/21

テーマコード(参考)

4B024  
4B064  
4B065  
4H045

審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-286331(P2003-286331)  
(22) 出願日 平成15年8月4日(2003.8.4)  
(62) 分割の表示 特願平5-116254の分割  
原出願日 平成5年5月18日(1993.5.18)  
(31) 優先権主張番号 07/979,156  
(32) 優先日 平成4年11月20日(1992.11.20)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

特許法第30条第1項適用申請有り 1992年12月、「Molecular and Cellular Biology」第12巻, 12号」に発表

(71) 出願人 501100582  
ザ ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバーシティ オブ テキサス システム  
アメリカ合衆国 テキサス 78701,  
オースティン, ウェスト 7ティーエイチ  
ストリート 201  
(74) 代理人 100078282  
弁理士 山本 秀策  
(74) 代理人 100062409  
弁理士 安村 高明  
(74) 代理人 100113413  
弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

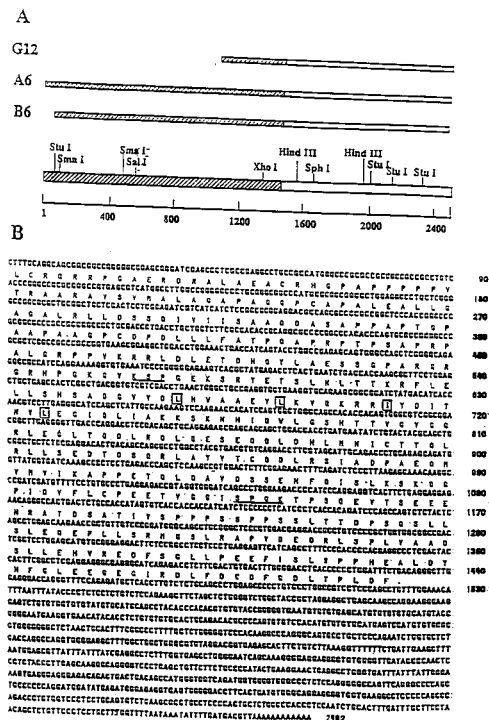
(54) 【発明の名称】 網膜芽腫-関連タンパク質をコードする細胞性遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 網膜芽種遺伝子の細胞内関係部分を同定し特徴づけること。

【解決手段】 網膜芽腫-関連タンパク質をコードする単離した核酸分子、および転写因子E2Fの生物学的活性およびR-B-結合活性を有する単離されたタンパク質。網膜芽腫-関連タンパク質をコードする単離された核酸分子を含むベクター。 ; そのようなベクターを含む哺乳動物細胞。 ; 網膜芽腫-関連タンパク質に対する抗体 ; およびそのようなタンパク質に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマライン。ならびに、そのような抗体を診断におよび予知に用いる方法。

【選択図】 図4



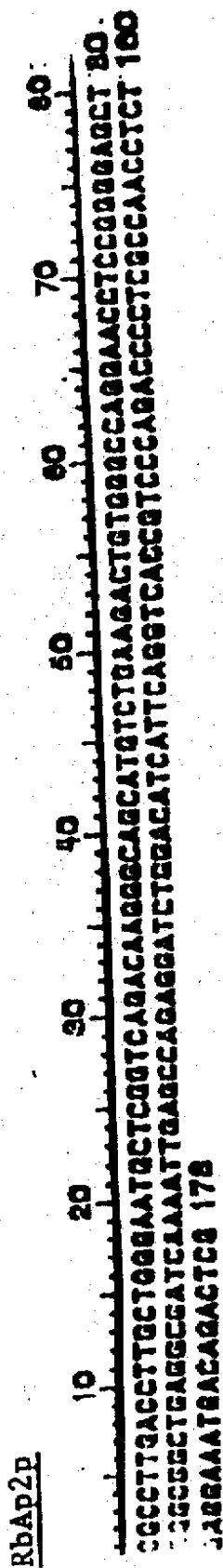
【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離された核酸分子であって、該核酸分子は、ストリンジェントな条件下で、以下：

1) R b A p 2 p

【化1】



10

20

30

40

2) R b A p 2 r

50

【化 2】

Rbap2f

10  
 20  
 30  
 40  
 50  
 60  
 70  
 80  
 90  
 100

TTTTACTTATTTAAAGCCCTTGTGTGCAAGAAATATAGTGTAAATCAATTGGAAAACCTAAAGGCATCGATACAT 80  
 ATCCGAATACATTTTGTACATAAATTACATTTCCCTTATAGTCTTCTGAGTGAAGTCTGATTCAGTACT 151

10

20

30

40

【化 3】

RbAp8p

10  
 20  
 30  
 40  
 50  
 60  
 70  
 80

YTTACGACAGAGCACTATTECCAAAGCGTTCAAATGCAGCCACCATTAAAGTAACACAAAAGGATCTGCGAAGACTGTAT 89  
 CTACTGCTAAAGCGAGGAGTGAACACACCAGAAAGGAGTCAAGTTAAGGAAAGATATGTATGTCAGTBAACCTGAGTAC 189  
 CATAAGGAGCAATAGAAAGGTGCAAGCCGCAAAATGCGGACAAATTAAGTGGATACCTGAAAGTATCAGTGTCTTCAAGTCATT 289  
 CTTCAAGTGTCACTT 255

10

20

30

40

【化 4】

RbAp8I

10:                    20:                    30:                    40:                    50:                    60:                    70:                    80:

GAATTCAACTGTAGCTTGGTTTCCAAAGTATCTGGATCTAGTATTTTCAGTCTTTTGTCTTTCAGCAGACATTTTA-80-  
 CACAGACATATTCTTTTGTCTCGCCCATCTGCTGTGAGAAAGTTAACCCAAACAAATCAGCATGAAACCAG-160-  
 TCATCAGATCTCCACAGCCAAAGCAAACTGTTGATGTTTTCAGAAAGCAGCACTGTTGCTGAGTCCACATATATTCGT-240-  
 TCAAT 246

10

20

30

40

[ 化 5 ]

RbAp10

10 20 30 40 50 60 70 80  
 GAATCCGGCCGGAATTAATCCGGGATTTCTGGGAAATCAGGAAGATATCCATAATCTTCAACTGGGTTAAAGAG 80  
 ACATCAAAATGAGAAATTTGAGATTACTTTCATBTGATAGAGACCCTGACAGAAAGTTGAAGTTTCTAAATGAAATGAA 160  
 AGAATTAGACTCAAAAGCTCCATTTACAGGAGGTACAACTAATGACCAAAATTTGAAGCATGATAGAAATTTGAAAAAATAG 240  
 TTGGGAACTTAAGAAAGAAACTCAGATTTAGTGAATAATTTCTTTGATCACCAGGAGTTACTCCAG 320  
 AGAGTAGAAACTTCTGAAGGCTCAATTTCTGATTTAGAAATGATGCAGATAAATCATCAGTGAAGATATTGGAGATAA 400  
 410 420 430 440 450 460 470 480  
 TGTGCCAAGTGAATGACAGCTGGAAAGGAGAAATTTCTTGAATGTGAAAAATGAGCTGAGTAGGATCAGATCCGAGAAAG 480  
 CTAGCATTGAGCATGAAAGCCCTCTACCTGGAGGCTGACTTAGAGCTAGTTCAACAGAGAAAGCTATGTTTABAATAAGAGAC 560  
 AATGAAAAATAGCAGAAAGTTATGTCTGCTTGAAGAAAGAACTCTCAGTGTCCACAAGTGAAGAAACCCAGCTTCGTGG 640  
 AGAATTAGATACTATGTCAAAAAAACCAGCCAGTGGATCAGTTGTCTGAAAAAATGAAAGGAAAAACACAGAGGCTTG 720  
 AGTCTCATCAAAGTGAATGTTCTCCATTTGATTCAGGTTGACAGGCAAGGTAAGAAAAAGACGGAAGCTCTTCAGAGCT 800  
 810 820 830 840 850 860 870 880  
 TTGTCCTCTGATGTGAGTGAGCTGTTAAAGACAAACTCATCTCCAGAAAAAGCTGACAGAGTTTGAATAAGGACTCACA 880  
 GGCACBTCTTTGACAAAAATGTGAGCTGAAAGCCAAATTCACAACTGAAATAAGAGAAAGAAATTCCTTGTCAAGGAAT 960  
 CTGAAAGCCTGCAGGCCCACTGAGTGAATCAGATTGAAAAGCTGAATGTCTCCAAAGCCCTTGGAGGCCCACTGGTG 1040  
 GAGAAAGGTGAGTTCCCATTTGAGGCTGAGCTCAACACAGGAGGAAAGTGCATCAGCTGAGAGAGGCAATCGAGAAACTGAG 1120  
 AGTTCCGATTGAGGCCGATGAAAAGGAGCAGCTGCACATCCAGAGAAACTGAAAGACCCGAGCGGAGAAATGATTCAC 1200

10 20 30 40

(RbAp10のコード)

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280  
 TTAAGCATAAAGTTGAGAACCTTGAAGGGAATTCCAGATGTCASAGAAACCCAGGCTABTGATTCCTTGATGCCGAG 1280  
 AATTCCAAAGCAGAGTAGAGACTTAAACACACAATAGAGAGATEGCCAGAGCCTGAAAGTTTTTGAATTAGACCT 1360  
 TGTCACGTTAAGGCTGAAAAGAAATCTGACAAAACAATACAGAAACAAGGTCAGTTGTCAGAACTAGACAAGT 1440  
 TACTCTCTTCATTTAAAGTCTGTTAGAAAGAAAGGAGCAGCAGATACAGATCAAGAAGAAATCTAAAACCTGCAGTG 1620  
 GAGATGCTTCAGAAATCAGTTAAGGAGCTAATGAGGCTAGCCAGCTTGTGTGTTGACCAAGAAATATGAAAGCCAC 1900  
 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680  
 AGAACAGAGTCTAGACCACCAATAGAGGAAAGAGCATCAGCTGAGAAATAGCATTGAAAAGCTGAGAGCCCECTAQAAG 1680  
 CTGATGAAAAGAGGAGCTCTGTCTTTACACAAAGTGAAGGAAAGTGGCATCATGGAGATTTACTTAAAGGTTAQAAGT 1760  
 GAGAACCTTGAAGAGAGCTAGAGATAGCCAGGACAACCAAGABCAATGACGCTCTTGAGGACAGAAATCCCAAGGAGA 1840  
 GGTAGAGACCTAAAACCAAAAATAGAGGATGACCCAAAGTCTGAGAGGCTGGAATTAGATGTTGTTACTATAAGGT 1920  
 CAGAAAAGAAAACTGACAAAATGAAATTAACAAAAGAGCAAGAGGAAATATCTGAAATTAAGAAATAAATTCATCATTT 2000  
 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080  
 GAAAATATTTGCAAGAAAAGAGCAGAGAAAGTACAGATGAAGAAATAATCAAGCACTGCCATGGAGATGCTTCAAAC 2080  
 ACAATTAAGAGGCTCAATGAGAGAGTGGCAGCCCTGGCATAAATGACCAAGAGGCTGTAAAGCCAAAGAGCAGAAATCTTA 2160  
 GTAGTCAAGTAGAGTGTCTTGAACCTTGAAGAGGCTCAGTTGCTACAAGGCTTGTATGAGGCCAAAATAATTAATTTGTT 2240  
 TTGCAATCTTCAGTCAATGGCCCTCATTCAGGAGTABAAGATGCGAAGCAGAAACTGGAGAGAGAGGATGAAGAAATCAG 2320  
 TAGACTGAAAAATCAAAATTCAGGACCAAGAGGCTTGTCTCTAAACTGTCCAGGTGGAAAGGAGAGCACAACCTTTTGG 2400  
 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480  
 AGGAGCAAAACTTAGAACTGAGAAAATCTGACAGTGGAAATGAGGAGAGATCCAAAGTGGCTACAATCCAAAATGCCTCT 2480  
 TTGCAGGACACATTAAGAGTGTGACAGTTCTTACAGAAATCTAGAGAAATGAGCTTGAATGACAAAATGGACAAAAT 2560  
 GTCCCTTTGTTGAAAAGTAAACAAAATGACTGCAAGGAAACTGAGCTGACAGAGGAAATGCAATGAGATGGCACAGAAA 2640  
 CAGCAGAGCTGCAAGAGAACTCAGTGGAGABAAAATAGGCTAGCTGGAGAGTTGCAGTTACTGTTGGAAAGAAATAAG 2720  
 AGCAGCAAGATCAATGAAAGGAGCTCACACTAGAAAATAGTGAATGAGAGAGGAGCTAGATTGCAATGCACAAGACCA 2800

10  
20  
30  
40



(RbAp10aの続き)

4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080  
A8AGGCTGAGGTCAGGCGCCGGCGAGTTGTCCCAAGCCCAAGCTGAGTGGAGTCCAGGECAGTGGAGAACTGTA 4080  
AGGTCCAGTGAAGGCACCTTTGTGTGTTCAGTACCCCTGGGAGGTGCCAGTCAATGAAATAGATAAGGCTGTCCCTACAGGAC 4160  
TTCTCTTTAGTCAGGCGCATGCTTTATAGTGGAGGAAACAATCCCTAGAAATGCTTAAATGCTTAAATGCTTAAATGCTTAAAT 4240  
CTCCCATGTGTAGGTATTGAAAGGTTTGGAAAGCTGATCAGCTGTAGCAATTCCTCTACTGCAATGTAATA 4320  
GTATAAGCTATGTATATAAGCTTTTGGTAAATATATATTACAAATTAATAATGCAAGCAGTATATACAAATGCTTGTGT 4400  
1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240  
ATGTGGTTTTACACTAAAAAATGCAAAACAGCATTTTATTCTTAATTAACAGCTCCCTAGBAAAATGTAGACTTTTGC 4480  
TTTATGATATCTATCTGTAGTATGAGGCAATGAAATAGTTTTGTATCGGAAATTTCTCAGAGCTGAGTAAATGAGGAA 4560  
AAGCATGTTATGTGTTTTAAGGAAATGTGCACACATATACATGTAGGAGTGTATCTTTCTCTTACAAATCTGTTTTA 4640  
GACATCTTTGCTTATGAAAGCTGTACATATGTGTGTGTTATTTCCAGTGAAGGCTGCAGGCTTCCCTAGA 4720  
GGTGTGCTATACCATGCGTCTGTGCTTTTCTGTTTTAGACCAATTTTTTACAGTTCTTTTGGTAAGCATTGT 4800  
4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880  
CGTATCTGCTGATGGATTACATATAGGCTTTGTTTTCTAATAAATAAGTGGCTTCGTAATAAAAAA 4888

10  
20  
30  
40

【化6】

RbAp15p

10 20 30 40 50 60 70 80  
 GAATTCAGTGGACCCAGTGAAGGTCCAGGAGAAAGABCCATTGACTCCATCAGTTCCTATAAATAAAGTCCCAACC-30-  
 TAAAGAGGAGAGAAAGGAGGCTGGTACCAGAGTGAAGAAACACCTACATCTGTBTAAACCTAGTCCAAAGAAAGTGA-160-  
 AGAAACGGAAATCCTTGGTCAGATGATGAATCCAAATCAGAAAGTGAATTTGAAACACAGAACCTGTGTATTCCAAAGAA-240-  
 GATTCTTTGCTTAGGAGAGCCAGCAGGCGAAAGACCTAAATACACATTTAATTTCTCAGAGAGAGAGGATGATGATGCTGA-320-  
 TGAT-400-  
 410 420 430 440 450 460 470 480  
 TTGTTCCCTCAGATGGTTAGATAAAGATGAAATATACATTTCCAGCAGGCAAAATCAAAAGGCTECCAGAAAATCTTTG-490-  
 CATGACAAAAGAAAGTCAAGATTTTGGAAATCTGTTCTCATTTGCTTCATAATCTCAGAAAGTCAAGAGATGATTCAGCTAA-580-  
 ATTTGACAGTAAATGAGAGAGATTCTGCTTCTGTTTTTCCAGCATCTTTGCTGTAAACAGACAGATAAAGTTCCAAAGTA-640-  
 AAGCGTAACTGCTAAAAGGGGAAACCGTCTTCAGATACAGTCCCTA-688

10

20

30

40

および、

7) R b A p 1 5 r

【化7】

RbAp15r

10 20 30 40 50 60 70 80  
 GCAATGTTTAATTAACTGCGGAAAGAGCACAACAACATTTTTCACAAATACTTGTGTTGTCCTTTTGTCTCTGCTCA 60  
 GACCTTTTGTACATCTGGCTTATTTTAAATGTGATGATGTAATTGACCGTTTTTTTATTATTGTTGTTAGGCTTTTAAACATT 100  
 TTGTTCTTAGACATACAGTTTTTATGCTCTTTTACTCATTTGMAATGTCAGGTACTGTCTGATTTGCTTGTAGAATTGAT 240  
 TATAGACTGCGGTGCATTAGCAGAGATTTTAAATTGTCATGTTTACAACTACAGACCTGCTTTTTGAAATGAAATTTAAA 320  
 CATTAAAAATGGAAGTGTGAAAAA 348

10

20

30

40

からなる群より選択される配列を有する核酸分子またはそれらの相補体に対してハイブリダイズし、かつRBタンパク質に結合する活性を有するポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

【請求項2】

請求項1に記載の単離された核酸分子であって、該核酸分子が、RbAp10

[ 化 8 ]

RbAp10

10 20 30 40 50 60 70 80  
 GAATCCGGCCGGAATTAATCCGGGATTTCCGGGAAATCAGBAAGATATCCATAATCTTCAACTGEGGCTAAAGAG 80  
 ACATCAAAATGAGAAATTTGAGATTACTTCAATGTGATAGAGACCGTGCAGAAAAGTTGAAAGTTTCTCTAAATGAAATGAA 180  
 AGAATTAGACTCAAAAGTCCATTTACAGGAGGTACAACATAATGACCAAAATTCAGACATGCATAGAAATTCGAAAATAAG 240  
 TTGGGAACTTAAGAAAGAAACTCAGATTTAAGTGAAAATTTGAAATTTTTCTTGTGATCACCCAGGATTTACTCCAG 320  
 AGAGTAGAAACTTCTGAAGGCTCAATTCGTGATTTAGAAATGATGCAGATAAATCATCACGTGAAGATATTGAGATAA 400  
 410 420 430 440 450 460 470 480  
 TGTGCCAAGGTGAATGACAGCTGGAAGGAGGAAATTTCTGATGTCGAAAATGAGCTGAGTAGGATCAGATCGGAGAAAG 480  
 CTAGCATTGAGCATGAAAGCCCTCTACCTGGAGGCTGACTTAGAGGTAGTTCAACACAGAGAGCTATGTTTAGAAAAGAGAC 580  
 AATGAAAATAGCAGAAAGTTATTGTCTECCITGAAAGAAAGACTCTCAGTGGTCACAAAGTGCAGAAAACCAAGCTTCGTGG 640  
 AGAATTAGATACTATGTCAAAATAAACCCAGCCACTGGATCAGTTGCTGAAAATAAGAAAGAAAACACAGAAAGCTTG 720  
 AGTCTCATCAAAGTGAATGCTCTCCATTCAGGTGGCAGAGGTCAGGTAAGGAAAAGAGGAACTCTTCAGACT 800  
 810 820 830 840 850 860 870 880  
 TTGTCTCTGATGTGAGTGAGCTGTTAAAGACAAAACCTCATCTCCAGGAAAAGCTGCAGAGTTTGGAAAAGACTCACA 880  
 GGCACGTCTTTGACAAAATGTGAGCTGAAAAGCCAAATTCACAACTGAATAAGAGAAAAGAAATTCCTTGTCAAGGAAT 980  
 CTGAAGCCTGCAGGCCAGACTGAGTGAAATCAATATGAAAAGCTGAATGCTCCAAAGCCCTTGGAGGCCCACTGGTG 1040  
 GAGAAAGGTGAGTTCCCATTTGAGGCTGAGCTCAACACAGGAGGAAAGTGCATCAGCTGABAAGAGGCAATCGABAAC 1120  
 AGTTCGCATTTGAGGCCGATGAAAAGAGGAGCAGCTGCACATCCAGAGAACTGAAAAGAGCCGCGGAGAAATGATTCCAC 1200

10 20 30 40

(RbAp10のc15)

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280  
TTAAGCATAAAGTTGAGAACCTTGAAGGGAAATTGCAGATGTCAGAGAAACCAGGAGCTAGTATTCTTGATGCCGAG 1280  
AATCCAAAGCAGAAAGTAGABACTCTAAAACACAAAATAGAAAGATGCCAGAGCCCTGAAAGTTTTTGAATTAGACCT 1360  
TGTCACGTTAAGGCTGAAAAGAAAATCTGACAAAACAAAATACAAGAAAACAAGGTCAGTTGTCAGAACTAGACAAGT 1440  
TACTCTCTTCATTTAAAAGTCTGTTAGAAAAGGAGCAAGCAGATACAGATCAAGAGAAATCTAAAACACTGCAGTG 1520  
GAGATGCTTCAGAAATCAGTTAAAGGAGCTAAATGAGGCGTAGCAGCCTTGTGTGACCAAGAAAATTTAGAAAGGCCAC 1600  
1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680  
AGAACAGAGTCTAGACCACCAATAGAGGAGGATCAGCTBAGAAATAGCATTTGAAAAGCTGAGAGCCGCCCTADAAG 1680  
CTGATGAAAAGAGCCAGCTCTGTGCTTACAAGCACTGAGGAAAGTGAGCATCATGCAGATTTACTTAAAGGATAGAGT 1760  
GAGAACCTTGAAGAGAGCTAGAGATAGCCAGGACAACCAAGAGCATGCAGCTCTTGAAGCAGAGAAATTCCAAAGGAGA 1840  
GGTAGAGACCCCTAAAAGCAAAAATAGAAAGGATGACCCAAAGCTGAGAGGCTGGAATTAGATGTTGTTACTATAAGGT 1920  
CAGAAAAGAAAATCTGACAAAATGAAATACAAAAGAGCAAGAGCGAATATCTGAATTAGAAAATAAATTCATCATT 2000  
2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080  
GAAAATATTTGCAAGAAAAGAGCAAGAGAACAGTACAGATGAAAGAAAATCAAGCAGCTGCCATGGAGATGCTTCAAAC 2080  
ACAAATTAAGAGCTCAATGAGAGAGTGGCAGCCCTGCATAATGACCAAGAGCCCTGTAAGGCCAAAGAGCAGAAATCTTA 2160  
GTAGTCAAGTAGAGTGTCTTGAAGTTGAGAGGCTCAGTTGCTACAAGCCCTTGAAGGCCAAAATAATTAATTTGTT 2240  
TTGCCAATCTTCAGTGMATGCCCTCATTCAGAGAGTAGAAGATGCCAAGCAGAAACTGAGAGAGAGGATGAGAAATCAG 2320  
TAGACTGAAAATCAAATTCAGGACCAAGAGCAGCTTGTCTCTAAACTGTCCAGGTTGAAAGGAGAGCACCACCTTTTGA 2400  
2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480  
AGGAGCAAAACTTAGAACTGAGAAAATCTGACAGTGGAAATGAGCAGAGATCCAAAGTGCACAAATCCAAAATGCTCT 2480  
TTGCCAGGACACATTAGAAGTCTGCAGAGTTCTTACAGAAATCTAGAGAAATGAGCTTGAATGACAAAATGACAAAAT 2560  
GTCCCTTGTGAAAAGTAAACAAAATGACTGCCAAGGAAACTGAGCTGCAGAGGAAATGCATGAGATGCCACAGAAA 2640  
CAGCAGAGCTGCCAAGAGAACTCAGTGGAGAGAAAATAGGCTAGCTGAGAGTTGCAGTTACTGTTGGAAGAAATAAG 2720  
AGCAGCAAGATCAATGAAAGGAGCTCACACTAGAAAATAGTGAATTGAAGAGAGCCTAGATTGCATGCACAAAGACCA 2800

10  
20  
30  
40



(RbAp10aの配列)

4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080

ABAAGGCTGAGGGTCAAGCGCGCCGCTTGTCCCAAGCCCAAGCTGGACTGGAGTCCCAAGGCGAGTGGAACTGTGTA 4080  
 AGGTCCAGTGAAGGCACCTTTGTGTGTCAGTACCCTGGGAGGTGCCAGTCAATGAATAGATAAGGCTGTGCCCTACAGGAC 4100  
 TTCTCTTTAGTCAGGCGCATGCTTTATTTAGTGGAGGAAACAAATCCCTAGAAAGTCTTAAATATAATGACATGAAAT 4120  
 CTCCATGCTGTAGRTATTGAAAGGTTTGGAAAGCACTGATCAGCTGTTAGCATTGCCATTCCTCTACTGCAATGTAATA 4140  
 GTATAAGCTATGTATATAAGGCTTTTGTGTAAATATATATTTACAATTAATAATGACAAGCACTATATCACAATCTCTGTTTGT 4160  
 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240

ATGTGGTTTTTACACTAAAATAATGCAAAAGCAGATTTTATCTTCTAATTAACAGCTCCTAGBAAAATGTAGACTTTTGC 4180  
 TTTATGATATTTCTATCTGTAGTATGAGGCATGGAATAGTTTGTATCGGGAATTTCTCAGAGCTGAGTAAAATGAAAGAA 4200  
 AAGCATGTTATGTGTTTTAAGGAAATGTGCACACATATACATGTAGGAGTGTATCTTTCTCTTACAATCTGTTTTA 4220  
 GACATCTTTGCTTATGAAAGCTGTACATATGTGTGTGTGTTATTTCCAGTGGGCTGCAAGCTTCCCTAGA 4240  
 GGTGTGCTATACCATGCGTCTGTCGTTTCTGTTTTTAGACCAATTTTTTTACAGTTCTTTGGTAAGCATTTGT 4260  
 4270 4280 4290 4300 4310 4320 4330 4340

CGTATCTGGTGTGGATTAAACATATAGCCCTTTGTTTCTAATAAAATAGTCCCTTCGTAATAAAAAA 4280  
 4300 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380

10  
20  
30  
40

の配列を有し、かつR Bタンパク質に結合する活性を有するポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

【請求項3】

1または数個のヌクレオチドの付加、欠失または置換によって、請求項2に記載の単離された核酸分子から誘導された、単離された核酸分子であって、該核酸分子は、R Bタンパク質に結合する活性を有するポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

【請求項4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の単離された核酸分子であって、該単離された核酸分子が、以下：

a) E 2 F 認識配列に対して特異的に結合する能力；

b) E 2 F 認識配列を有するプロモーターをトランス活性化する能力；および

c) E 2 F 認識配列に対して特異的に結合し、かつ E 2 F 認識配列を有するプロモーターをトランス活性化する能力

からなる群より選択される能力を有するポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

【請求項 5】

哺乳動物 c D N A ライブラリーから得られる単離された核酸分子であって、該核酸分子は 10  
、ストリンジェントな条件下で、以下：

1) R b A p 2 p

【化 9】

RbAp2P

60  
 70  
 80  
 90  
 100  
 110  
 120  
 130  
 140  
 150  
 160  
 170  
 180

CGCCTTGACCTTGCCTGGAAATGCTCAGTCAAGACAAAGGCGAGCATGTCCTAAGAGACTGTGGCCAGGAACTCCGGGAGCT 30  
 TGGCCTGAGGCGGATC1AAATGAGCCAGAGGATCTGGACATCAATTCAGGTCAGCCGTCGCCAGACCCCTGCGCAACTCT 100  
 TGGAAATGACAGACTG 178

10

20

30

40

2) R b A p 2 r

【化 1 0】

RbAp2f

10  
 20  
 30  
 40  
 50  
 60  
 70  
 80  
 90  
 100

TTTTACTTATTTAAAGCCCTTGTGCAAGAAATATAGTGTAAATCAATTGGAAAACCTAAAGGCATCGATACAT 80  
 ATCCGAATACATTTTGTACATAAATTACATTTCCCTTATAGTCTTCTGAGTGAAGTCTGATTCAGTACT 151

10

20

30

40

3 ) R b A p 8 p

【化 1 1】

RbAp8p

10  
 20  
 30  
 40  
 50  
 60  
 70  
 80

TTTACGACAGAGCACTATTCCCAAGCGTTCAAAATGCAGCCACCATTAAAGTAACACAAAAGGATCTCGGAAGACTGTAT 89  
 CTACTGCTAAAGCAGCAGCAGTGAACACACCAGAAAGGAGTCAAGTTAAGGAAAGATATGTATGTCTAGTBAACCTGAGTAC 189  
 CATAAGGAGCAATAGAAAGGTGCAAGCCGCAAAATGCGGACAAATTAAGTGGATACCTGAAAGTATCAGTGTCTTCAAGTCATT 289  
 CTTCAAGTGTCACTT 255

10

20

30

40

4) R b A p 8 r

【化 1 2】

RbAp8I

10:                    20:                    30:                    40:                    50:                    60:                    70:                    80:

GAATTCAACTGTAGCTTGGTTTCCAAAGTATCTGGATCTAGTATTTTCAGTCTTTTGTCTTTCAGCAGACATTTTA-80-  
 CACAGACATATTCTTTTGTCTCGCCATCTGCTGTGAGAAAGTTAACCCAAACAAATCAGCATGAAACCAG-160-  
 TCATCAGATCTCCACAGCCAAAGCAAACTGTTGATGTTTTCAGAAAGCAGCACTGTTGCTGAGTCCACATATATTCGT-240-  
 TCAAT 246

10

20

30

40



(RbAp10のコード)

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280  
TTAAGCATAAAGTTGAGAACCTTGAAGGGAATTCCAGATGTCASAGAAACCCAGGCTABTGATTCCTTGATGCCGAG 1280  
AATTCCAAAGCAGAGTAGAGACTCTAAAACACAAATAGAGAGATGECCECAAGCCTGAAAGTTTTTGAATTAGACCT 1360  
TGTCACGTTAAGGCTGAAAAGAAATCTGACAAAACAATACAGAAACAAGGTCAGTTGTCAGAACTAGACAAGT 1440  
TACTCTCTTCATTTAAAAGTCTGTTAGAAAGAAAGGAGCAGCAGATACAGATCAAGAAGAAATCTAAAACCTGCAGT 1620  
GAGATGCTTCAGAAATCAGTTAAGGAGCTAAATGAGGCGTAGCCAGCTTGTGTGTCACCAAGAAATATGAAAGCCAC 1900  
1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680  
AGAACAGAGTCTAGACCACCAATAGAGGAAAGAGCATCAGCTGAGAAATAGCATTGAAAAGCTGAGAGCCCECCTAGAAG 1680  
CTGATGAAAAGAGGAGGCTCTGTCTTTACACAAAGTGAAGGAAAGTGGCATTCATGGCAGATTTACTTAAAGGTAGAGTG 1760  
GAGAACCTTGAAGAGAGCTAGAGATAGCCAGGACAACCAAGABCAAGCAGCTCTTGAGGCGAGAGAAATCCCAAGGAGA 1840  
GGTAGAGACCTAAAACCAAAAATAGAGGATGACCCAAAGTCTGAGAGGCTGGAATTAGATGTTGTTACTATAAGGT 1920  
CAGAAAAGAAAACTGACAAAATGAAATTAACAAAAGAGCAGAGGGAATATCTGAAATTAAGAAATAATAATTCATCATTT 2000  
2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080  
GAAAATATTTGCAAGAAAAGAGCAGAGAAAGTACAGATGAAGAAATAATCAAGCAGCTGCCATGGAGATGCTTCAAAC 2080  
ACAATTAAGAGGCTCAATGAGAGAGTGGCAGCCCTGCAATAATGACCAAGAGGCTGTAAAGCCAAAGAGCAGAAATCTTA 2160  
GTAGTCAAGTAGAGTGTCTTGAAGTCTGAGAAAGGCTCAGTTGCTACAAGGCTTGTATGAGGCCAAAATAATTAATTTGTT 2240  
TTGCAATCTTCAGTCAATGGCCCTCATTCAGGAGTABAAGATGCGAAGCAGAAACTGGAGAGAGGATGAAGAAATCAG 2320  
TAGACTGAAAAATCAAAATTCAAAGCCAAAGAGCAGCTTGTCTCTAAACTGTCCAGGTGGAAAGGAGAGCACAACCTTTGGA 2400  
2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480  
AGGAGCAAAACTTAGAACTGAGAAAATCTGACAGTGGAAATGAGAGCAGAGATCCAAAGTGGCTACAATCCAAAATGCCTCT 2480  
TTGCAGGACACATTAAGAGTGTGACAGTTCTTACAAGAAATCTAGAGAAATGAGCTTGAATGACAAAATGGACAATAAT 2560  
GTCCCTTTGTTGAAAAGTAAACAAAATGACTGCAAGGAAACTGAGCTGCAGAGGAAATGCATGAGATGGCACAGAAA 2640  
CAGCAGAGCTGCAAGAGAACTCAGTGGAGABAAAATAGGCTAGCTGGAGAGTTGCAGTTACTGTTGGAAAGAAATAAG 2720  
AGCAGCAAGATCAATGAAAGGAGCTCACAGTAGAAAATAGTGAATGAGAGAGGAGCTAGATTGCAATGCACAAGACCA 2800

10  
20  
30  
40



(RbAp10aの続き)

4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080  
A8AGGCTGAGGTCAGGCGCCGGCGAGTTGTCCCAAGCCCAAGCTGAGTGGAGTCCAGGECAGTGGAGAACTGTA 4080  
AGGTCCAGTGAAGGCACCTTTGTGTGTTCAGTACCCTGGGAGGTGCCAGTCAATGAAATAGATAAGGCTGTCCCTACAGGAC 4160  
TTCTCTTTTAGTCAGGCGCATGCTTTATAGTGGAGGAAACAATCCCTAGAAATGCTTAAATGCTTAAATGCTTAAAT 4240  
CTCCCATGTGTAGGTATTGAAAGGTTTGGAAAGCTGATCAGCTGTAGCAATTCCTCTACTGCAATGTAATA 4320  
GTATAAAGCTATGTATATAAAGCTTTTGGTAAATATATATTACAAATTAATAAGCAAGCTATATACAAATCTCTGTTTGT 4400  
4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240  
ATGTGGTTTTACACTAAAAAATGCAAAACAGCATTTTATTCTTAATTAACAGCTCCCTAGBAAAATGTAGACTTTTGC 4480  
TTTATGATATCTATCTGTAGTATGAGGCAATGAAATAGTTTTGTATCGGAAATTTCTCAGAGCTGAGTAAATGAAAGAA 4560  
AAGCATGTTATGTGTTTTAAGGAAATGTGCACACATATACATGTAGGAGTGTATCTTTCTCTTACAAATCTGTTTA 4640  
GACATCTTTGCTTATGAAAGCTGTACATATGTGTGTGTTTATTTCCAGTGAAGGCTGCAGGCTTCCCTAGA 4720  
GGTGTGCTATACCATGGCTGTGTGCTTTTCTGTTTTAGACCAATTTTTTACAGTTCTTTTGGTAAGCATTGT 4800  
4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880  
CGTATCTGCTGATGGATTACATATAGGCTTTGTTTTCTAATAAATAAGTGGCTTCGTAATAAAAAA 4888

10  
20  
30  
40

【化 1 4】

RbAp15p

10 20 30 40 50 60 70 80  
 GAATTCAGTGGACCCAGTGAAGGTCCAGGAGAAAGABCCATTGACTCCATCAGTTCCCTATAATAAAGTCCCAACC-30-  
 TAAAGAGGAGAGAAAGGAGGCTGGTACCAGAGTGAAGAAACACCTACATCTGTBTAAACCTAGTCCAAAGAAAGTGA-160-  
 AGAAACGGAAATCCTTGGTCAGATGATGAATCCAAATCAGAAAGTGAATTTGAAACACAGAACCTGTGTATTCCAAAGAA-240-  
 GATTCTTTGCTTAGGAGAGCCAGCAGGCGAAAGACCTAAATACACATTTAATTTCTCAGAGAGAGAGGATGATGATGCTGA-320-  
 TGAT-400-  
 410 420 430 440 450 460 470 480  
 TTGTTCCCTCAGATGGTTAGATAAGATGAAATATACATTTCCAGCAGGCAATCAAAAGGCTECCAGAAAATCTTTG-490-  
 CATGACAAAAGAAAGTCAAGATTTTGGAAATCTGTTCTCATTTGCTTCATAATCTCAGAAAGTCAAGAGATGATTCAGCTAA-580-  
 ATTTGACAGTAAATGAGAGAGATTCCTGCTTCTGTTTTTCCAGCATCTTTGCTGTAAACAGACAGATAAAGTTCCAAAGTA-640-  
 AAGCGTAACTGCTAAAAGGAAAGCCGCTCTTCAGATACAGTCCCTA-688

10  
20  
30  
40

および、  
7) R b A p 1 5 r

【化 1 5】

RbAp15r

10 20 30 40 50 60 70 80  
 GCAATGTTTAATTAACTGCGGAAAGAGCAGCAAAACATTTTTCACAAATACTTGTGTTGTCCTTTTGTCTCTGCTCA 80  
 GACCTTTTGTACATCTGGCTTATTTTAAATGTGATGTAATGACCGTTTTTATTTATTTGTTGTTAGCCCTTTTAAACATT 160  
 TTGTTCTTAGACATACAGTTTTTATGCTCTTTTACTCATTTGMAATGTCAGGTACTGTCGATTTGCTTGTAGAAATTGAT 240  
 TATAGACTGCGGTGCATTAGCAGAGATTTTAAATTGTCATGTTTACAACTACAGACCTGCTTTTTGAAAATGAAAATTTAAA 320  
 CATTAAAAATGGAAGTGTGAAAAA 348

10

20

30

40

からなる群より選択される配列を有する核酸分子またはそれらの相補体に対してハイブリダイズし、かつRBタンパク質に結合する活性を有するポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

【請求項6】

前記核酸分子が、DNA分子、cDNA分子、またはRNA分子である、請求項1～5のいずれか1つに記載の単離された核酸分子。

【請求項7】

請求項1～5のいずれか1つに記載の核酸分子によってコードされた、単離および精製されたポリペプチド。

【請求項8】

50

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の単離された核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のベクターを含む、プラスミド。

【請求項 10】

請求項 8 に記載のベクターを含む、ウイルス。

【請求項 11】

請求項 8 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の宿主細胞であって、該宿主細胞が細菌、酵母細胞、または哺乳動物細胞である、宿主細胞。

10

【請求項 13】

請求項 7 に記載のポリペプチドに特異的に結合し得る、抗体。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の抗体の、免疫学的に活性なポリペプチドフラグメント。

【請求項 15】

請求項 13 に記載の抗体であって、該抗体がモノクローナル抗体である、抗体。

【請求項 16】

請求項 13 に記載の抗体であって、該抗体が検出可能なマーカで標識された、抗体。

【請求項 17】

請求項 15 または 16 に記載の抗体を産生する、ハイブリドーマセルライン。

20

【請求項 18】

試料中において、請求項 7 に記載のポリペプチドを検出する方法であって、該方法は、以下の工程：

a . 抗体 - 抗原複合体を形成させる条件下で、請求項 13 に記載の抗体を該試料と接触させる工程；

b . 形成された任意の複合体の存在を検出する工程；

c . 該複合体の存在が、該試料中における請求項 7 に記載のポリペプチドの存在を示す工程

を包含する、方法。

【請求項 19】

請求項 7 に記載のポリペプチドを組換えにより産生する方法であって、該方法は、該ポリペプチドを産生する好適な条件下で請求項 11 に記載の宿主細胞を増殖する工程、およびそのようにして得られた該ポリペプチドを回収および精製する工程を包含する、方法。

30

【請求項 20】

請求項 19 に記載の方法によって組換え産生された、ポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、網膜芽腫 - 関連タンパク質をコードする細胞性遺伝子の分子クローニングに関する。より特定の局面では、本発明は転写因子 E 2 F の特性を有する遺伝子の同定に

40

【背景技術】

【0002】

本出願を通じて、種々の出版物をカッコ内の部分的な引用によって参照する。これらの出版物の開示は全体として、本発明が属する技術の状態をより完全に記載するために本出願中に参考として援用される。

【0003】

網膜芽種遺伝子 (RB) は、同定された最初の腫瘍抑制遺伝子であり、脊椎動物に遍在的に発現する核リンタンパク質をコードする (Friendら、1986; Leeら、1987b; Fungerら、1987)。この遺伝子の正常な機能を不活性化する突

50

然変異は100%の網膜芽種においてのみならず、小細胞性肺癌(Harbourら、1988; Yokotaら、1988)、骨肉種(Toguchidaら、1988)、膀胱癌(Horowitzら、1989)、前立腺癌(Booksteinら、1990a)および胸部癌(Leeら、1988)を含む多くの他の成人癌においても発見されていた。多様なRB-欠乏腫瘍細胞と野生型RBとの再構成は、ヌードマウスに腫瘍を形成させる能力を含むその新生物表現型を抑制する(Huangら、1988; Sumeigiraら、1990; Booksteinら、1990b; Leeら、1990; Goodrichら、1992; Takahashiら、1991; Chenら、1992)。これらの結果は、RBタンパク質が信頼し得る腫瘍抑制剤であるという直接的な証拠を提供する。

10

## 【0004】

RBは、細胞周期の初期G1/G0期においていくつかの観察により実証された機能を成し遂げる：第一に、おそらくはCdkキナーゼファミリーの一構成部によるRBのリン酸化(Linら、1991; Leeら、1991)が細胞周期でのゆらぐこと(Chenら、1989; Buchkovichら、1989; DeCaprioら、1989); 第二に、未リン酸化型RBがG0/G1期において支配的に存在すること(Chenら、1989; DeCaprioら、1989); 第三に、未リン酸化型RBの初期G1期にある細胞内へのマイクロインジェクションが、それらのS期への進行を妨げること(Goodrichら、1991)。これらの観察は、RBが細胞周期内への侵入の臨界的な調節因子として働き得、そして正常細胞におけるその不活性化は不規則な増殖を導くことを示す。

20

## 【0005】

RBがどのように機能するかが、真剣な調査の主題である。RBタンパク質の2つの既知の生化学的特性が、記載されていた；一つは、そのC-末端300アミノ酸残基に位置した固有のDNA結合活性である(Leeら、1987b; Wangら、1990b); 他はその、DNA腫瘍ウィルスのいくつかの腫瘍タンパク質と相互作用する能力である(DeCaprioら、1988; Whyteら、1988; Dysonら、1989)。この相互作用は、T-結合ドメインとして示されるアミノ酸379-545および575-678において、2つの不連続な領域に位置づけられた(Huら、1990; Huangら、1990)。興味深いことに、腫瘍中のRBタンパク質の突然変異は、しばしばこれらの同じ領域に位置していた(BooksteinおよびLee、1991)。これらの結果はRBタンパク質のT-結合ドメインが機能的に重要でありそしてRBとこれら腫瘍タンパク質との相互作用が深遠な生物学的意義を有し得ることを意味する。TのRBへの結合を模倣する細胞性タンパク質の同定により、潜在的に複雑なネットワークがしめされた。c-myc(Rustgiら、1991)、Rb-p1, p2(Defeo-Jonesら、1991)を含むいくつかのタンパク質、および8-10の他のタンパク質(Kaelinら、1991; Leeら、1991; Huangら、1991)が、in vitro でRBに結合することが示された。

30

## 【発明の開示】

40

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

前記が証明するように、網膜芽種遺伝子の細胞内関係部分を緊急に同定し特徴づけることが必要なことは明白である。本発明はこの要求を満たし、関連する長所を同様に提供する。

## 【0007】

本発明は、網膜芽腫-関連タンパク質をコードする単離された核酸分子、および、転写因子E2F生物学的活性およびRB-結合活性を有する単離されたタンパク質を提供する。

## 【0008】

50

本発明はさらに、細菌細胞、酵母細胞、または哺乳動物細胞での発現に適合した網膜芽腫 - 関連タンパク質をコードするDNA分子を含むプラスミドおよびウイルスのようなベクターを提供する。

【0009】

本発明は、網膜芽腫 - 関連タンパク質をコードするDNA分子を含む哺乳動物の細胞を提供する。

【0010】

本発明は、網膜芽腫 - 関連タンパク質に特異的に結合可能な抗体を提供する。本発明はまた、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマセルラインおよびこれらの抗体を診断および予知に用いる方法を提供する。

10

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明によれば、網膜芽腫 - 関連ポリペプチドをコードする、単離された核酸分子が提供される。

【0012】

好適な実施態様に於いては、コードされた網膜芽腫 - 関連ポリペプチドが転写因子E2Fの生物学的活性を有する、単離された核酸分子が提供される。

【0013】

さらに好適な実施態様に於いては、コードされた網膜芽腫 - 関連ポリペプチドがRB結合活性を有する、単離された核酸分子が提供される。

20

【0014】

さらに好適な実施態様に於いては、前記核酸分子が、DNA分子、cDNA分子、またはRNA分子である、単離された核酸分子が提供される。

【0015】

さらに好適な実施態様に於いては、ストリンジェント条件下でハイブリッド形成して、単離された核酸分子を形成する、核酸分子が提供される。

【0016】

さらに好適な実施態様に於いては、網膜芽腫 - 関連ポリペプチドをコードする、単離された核酸分子によってコードされた、単離および精製されたポリペプチドが提供される。

【0017】

さらに好適な実施態様に於いては、コードされた網膜芽腫 - 関連ポリペプチドが転写因子E2Fの生物学的活性を有する、単離された核酸分子によってコードされた、単離および精製されたポリペプチドが提供される。

30

【0018】

さらに好適な実施態様に於いては、コードされた網膜芽腫 - 関連ポリペプチドがRB結合活性を有する、単離された核酸分子によってコードされた、単離および精製されたポリペプチドが提供される。

【0019】

さらに好適な実施態様に於いては、網膜芽腫 - 関連ポリペプチドをコードする、単離された核酸分子を含む、ベクターが提供される。

40

【0020】

さらに好適な実施態様に於いては、前記ベクターを含む、プラスミドが提供される。

【0021】

さらに好適な実施態様に於いては、前記ベクターを含む、ウイルスが提供される。

【0022】

さらに好適な実施態様に於いては、前記ベクターを含む、宿主細胞が提供される。

【0023】

さらに好適な実施態様に於いては、前記宿主細胞が細菌、酵母細胞、または哺乳動物細胞である、宿主細胞が提供される。

【0024】

50

さらに好適な実施態様に於いては、前記細胞核内にある、網膜芽種 - 関連ポリペプチドに特異的に結合し得る、抗体が提供される。

【0025】

さらに好適な実施態様に於いては、前記抗体の、免疫学的に活性なポリペプチドフラグメントが提供される。

【0026】

さらに好適な実施態様に於いては、前記抗体がモノクローナル抗体である、抗体が提供される。

【0027】

さらに好適な実施態様に於いては、前記抗体が検出可能なマーカーで標識された、抗体が提供される。 10

【0028】

さらに好適な実施態様に於いては、検出可能なマーカーで標識された、前記抗体を産生する、ハイブリドーマセルラインが提供される。

【0029】

さらに好適な実施態様に於いては、以下の a、b および c を含む試料中の網膜芽種 - 関連タンパク質を検出する方法が提供される：

a . 抗体 - 抗原複合体を形成させる条件下で、請求項 14 の抗体を試料と接触させる方法； b . 形成されたすべての複合体の存在を検出する方法； c . 該複合体の存在が試料中の網膜芽種 - 関連タンパク質の存在を指示する方法。 20

【0030】

さらに好適な実施態様に於いては、網膜芽種 - 関連タンパク質を組換えにより産生する方法であって、該タンパク質を産生する好適な条件下で前記ベクターを含む、宿主細胞を増殖し、およびそのようにして得られた該タンパク質を回収および精製する方法を包含する、方法が提供される。

【0031】

さらに好適な実施態様に於いては、組換えにより産生した、網膜芽種 - 関連タンパク質が提供される。

【発明の効果】

【0032】

本発明によれば、前記が明白に証明するような、網膜芽種遺伝子の細胞内関係部分を緊急に同定し特徴づけることの必要性を満たし、関連する長所が同様に提供される。 30

【発明を実施するための最良の形態】

【0033】

網膜芽種タンパク質は多くの細胞性タンパク質と相互作用して、正常な生理的機能に対して決定的であり得る複合体を形成する。これらのタンパク質を同定するために、9つの異なる遺伝子 cDNA を、精製した RB タンパク質をプローブとして用いる cDNA 発現ライブラリーの直接スクリーニングによりクローンした。これらのクローンの仮の特徴づけは、これらの遺伝子の大部分が新規のタンパク質をコードすることを示す。それらの1つ、Ap12 は、細胞周期依存型の 2.8 Kb mRNA を発現する。 40

【0034】

Ap12 の最長 cDNA の単離物は、転写因子に特徴的ないくつかの特徴をもつ 476 のアミノ酸からなる推定タンパク質をコードする。Ap12 の C - 末端の 114 アミノ酸は未リン酸化 RB と、T - 抗原が結合して転写活性化活性を有するのと類似の領域で結合する。

【0035】

N - 末端付近の領域は、塩基性残基と側面を接する推定ロイシンジッパーを含み、E2F と同起源の配列に特異的に結合可能である。サル腎臓 CV1 細胞における Ap12 の発現は、E2F - 依存性転写活性を著明に増強した。E2F 遺伝子がクローンされておらず、その同一性が特異的な DNA を認識して結合する能力のみに基づいているにもかかわらず 50

ず、これらの結果は新規なクローン転写因子 E 2 F の既知の特性を有し R B に結合するタンパク質をコードすることを確立する。

【0036】

それゆえに、本発明は網膜芽腫 - 関連タンパク質をコードする単離された核酸分子を提供する。ここで用いる、用語「単離された核酸分子」は、自然界には発生しない形態の核酸分子に関する。ヒト網膜芽腫核酸分子を単離する1つの手段は、当業者に公知の方法 (Maniatisら、(1989)参照、ここに参考として援用される) を用いて、自然のまたは人為的に設計された網膜芽腫に対する抗体でヒト cDNA 発現ライブラリーをプローブすることである。ヒト網膜芽腫 - 関連ポリペプチドをコードする DNA および cDNA 分子は、ヒト、哺乳類または他の動物起源の相補ゲノムの DNA、cDNA または R 10

【0037】

本発明は、DNA 結合および R B 結合活性を有する可溶性の網膜芽腫 - 関連ポリペプチドを提供する。例示の目的だけのために、このポリペプチドをコードする核酸配列が図 4 および 10 - 15 において同定される。可溶性の網膜芽腫 - 関連ポリペプチドをコードする核酸配列は、図 4 および 10 - 15 に示される配列中に含まれる。

【0038】

ここで用いる「網膜芽腫 - 関連ポリペプチド」は、DNA 結合活性と R B - 結合活性とを有するポリペプチドを意味する。網膜芽腫 - 関連ポリペプチドの例は、図 4 に示される 20 クローン Ap 12 のアミノ酸配列、またはクローン Ap 2, 4, 8, 10 および 15、またはそれらの活性フラグメントの核酸配列によりコードされたアミノ酸配列と、実質的に同一である。ここで用いる「活性フラグメントまたは生物学的 - 活性フラグメント」は、図 4 に示す網膜芽腫 - 関連ポリペプチド、または図 10 - 15 に示すクローン Ap 2, 4, 8, 10 および 15 によりコードされたポリペプチドのすべての部分に関する。ポリペプチドが R B に結合し得るかどうかを検定する方法は当業者に知られており、例えば、本出願に示される。

【0039】

ここで用いる、用語「精製した」は、本来のまたは自然の環境に通常伴う汚染物質を実質的に含まない分子または化合物を意味する。ここで開示した精製したポリペプチドは、 30 可溶性ポリペプチドを含む。例えば、精製した可溶性ポリペプチドは、多くの方法によって得られ得る。タンパク質の精製に有用な方法は、沈澱、ゲル濾過、イオン交換、逆相およびアフィニティークロマトグラフィーを含む。他の公知の方法は、Deutscherら、Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology, Vol. 182, (Academic Press 1990) に記載されており、ここに参考として援用する。その代わりに、本発明の精製したポリペプチドはまた、例えば、ここに参考として援用した Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第 2 版 (Cold Spring Harbor Laboratory 1989) に記載されているような公知の組換え法によっても得られ得る。この、可溶性網膜芽腫 - 関連 40 ポリペプチドを調製する手段の一つの例は、網膜芽腫 - 関連ポリペプチドをコードする核酸を細菌、酵母または哺乳動物細胞のような好適な宿主細胞中に、公知の技術を用いて発現することであり、発現した可溶性タンパク質を、再び公知の技術を用いて回収することである。可溶性ポリペプチドおよびその生物学的に活性なフラグメントは化学合成によっても生成され得る。合成ポリペプチドは、Applied Biosystems, Inc. 製 Model 430A または 431A 自動ポリペプチドシンセサイザーおよび業者によって提供される化学を用いて生成し得る。可溶性ポリペプチドはまた、以下にさらに詳細に記載する発現ベクターによって形質転換された細胞から直接単離し得る。

【0040】

本発明はまた、図に示す核酸分子とは異なるが同じ表現型の効果のある核酸分子を含む 50

。これらの変性した、しかし表現型としては等価の核酸分子を、「等価の核酸分子」と呼ぶ。本発明はまた、本願上記記載の核酸分子と比較したときそれによって産生されるポリペプチドの表現型を変性しない、非-コード化領域における変化によって特徴づけられた核酸分子を含む。本発明はさらに、ハイブリッド化して本発明の核酸分子を形成する核酸分子を含む。ここで用いる用語「核酸」は、一本鎖および二本鎖のDNAおよびcDNAと同様にRNAを含む。加えて、ここで用いる用語「ポリペプチド」は、人工的な組換え型と同様にすべての自然発生の対立遺伝子変異体を含む。

#### 【0041】

本発明はさらに、他の調節配列と同様に、RNA転写のプロモーターに作動的に連鎖した単離核酸分子を提供する。ここで用いる用語「作動的に連鎖した」は、プロモーターがRNA転写を指示して核酸分子を離すようにする状態で位置することを意味する。そのようなプロモーターの例は、SP6、T4、およびT7である。プロモーターおよび挿入DNA片がそのプロモーターに作動的に連鎖したクロニング部位の両方を含むベクターは、当業者に知られている。好ましくは、これらのベクターは*in vitro*または*in vivo*でのRNA転写をなし得る。そのようなベクターの例は、pGEMシリーズ(Promega Biotech; Madison, WI)である。

#### 【0042】

本発明は、網膜芽腫-関連ポリペプチドをコードする単離核酸分子を含むベクターを提供する。ベクターの例は、バクテリオファージ、バキュロウイルスおよびレトロウイルスのようなウイルス、コスミド、プラスミドまたは他の組換えベクターである。核酸分子を当業者に知られる方法でベクターゲノム中に挿入する。例えば、挿入物およびベクターDNAを双方とも制限酵素に当て、両分子の相補的末端にそれぞれ対をなす塩基を作り出させて、次にリガーゼと結合させる。その代わりに、合成核酸リンカーをベクターDNAの制限部位に対応する挿入DNAに結合させ得、次に特別なヌクレオチド配列を認識する制限酵素で消化する。その他に、終止コドンを含むオリゴヌクレオチドおよび適切な制限部位を、以下のいくつかまたはすべてを含むベクター内に挿入するために、結合し得る。そのようなベクターとは例えば：哺乳動物細胞における安定または一過性トランスフェクタントを選択するネオマイシン遺伝子のような選択マーカー遺伝子；ヒトサイトメガロウイルス(CMV)の即時初期遺伝子から得た高レベルの転写のためのエンハンサー/プロモーター配列；mRNA安定性のためのSV40から得た転写終止およびRNAプロセッシングシグナル；SV40ポリオーマの複製起点および正しいエピソーム複製のためのCoIE1；多用途多重クロニング部位；およびセンスおよびアンチセンスRNAの*in vitro*転写のためのT7およびSP6 RNAプロモーター。用い得る他の手段は当業者に公知である。

#### 【0043】

また、細菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞および他の動物細胞中で発現するように適合した、ヒト網膜芽腫-関連ポリペプチドをコードするDNA分子を包含するベクターを提供する。このベクターは他に、細菌、酵母、哺乳類または他の動物細胞中のDNAを発現するのに必要で、かつ網膜芽腫-関連ポリペプチドをコードするDNAを発現するようそのDNAに関連して位置づけられた調節成分を含む。発現に必要な調節成分は、RNAポリメラーゼに結合するプロモーター配列およびリボソーム結合の転写開始配列を含む。例えば、細菌性発現ベクターは、lacプロモーターのようなプロモーターおよび転写開始のためのShine-Dalgarno配列および開始コドンAUG(Maniatisら、前記、1989)を含む。同様に、真核性発現ベクターは、RNAポリメラーゼIIの異種または同種プロモーター、下流ポリアデニル化シグナル、開始コドンAUG、およびリボソーム剥離の終止コドンを含む。そのようなベクターは、商業的に入手されるかまたは当業者に知られる方法、例えば一般的にベクターを構築するための上記の方法に記載された配列によって集められ得る。発現ベクターはポリペプチドを発現する細胞を産生するのに有用である。

#### 【0044】

10

20

30

40

50

本発明は、宿主細胞、例えばヒト網膜芽腫 - 関連ポリペプチドをコードする核酸分子を含む哺乳動物細胞を、提供する。例えば哺乳動物細胞中で発現するために適合したプラスミドを含む哺乳動物細胞である。プラスミドは、網膜芽腫 - 関連ポリペプチドをコードする核酸分子およびポリペプチドの発現に必要な調節成分を有する。例えば、マウス繊維芽細胞 NIH3T3、CHO細胞、HeLa細胞、Ltk-細胞などを含む、種々の哺乳動物細胞が宿主として有用であり得る。上に記載されたような発現プラスミドを、リン酸カルシウム沈降、DEAE-デキストラン、電気穿孔法またはマイクロインジェクションのような当業者に知られた方法で哺乳動物細胞をトランスフェクトするのに用い得る。

#### 【0045】

また、抗-Ap12抗体またはすべての網膜芽腫 - 関連ポリペプチドと特異的な反応性を有する抗体のような、本発明の網膜芽腫 - 関連ポリペプチドと特異的な反応性を有する抗体を提供する。抗体の免疫学的に活性なフラグメントは、「抗体」の定義中に含まれる。免疫学的に活性なフラグメントの同定は、例えば以下に記載するように行い得る。本発明の抗体は、当業者に知られたどの方法によっても産生し得る。例えば、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体が、以下に記載する当業者に知られた方法、例えば、ここに参考として援用したHarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory 1988)にある方法によって産生し得る。ポリペプチド、特に本発明の網膜芽腫 - 関連ポリペプチドは、そのような抗体の生成において免疫抗原として用い得る。キメラ性、ヒト型、CDR-移植または二機能性抗体のような変性抗体もまた、当業者によって知られる方法によって産生し得る。そのような抗体は、例えばManiatisらによってここに参考として援用した上に記載された中の、ハイブリドーマ、化学合成または組換え法によっても産生し得る。これらの抗体は、本発明の網膜芽腫 - 関連ポリペプチドの存在を決定するため、または精製のために使用され得る。そのようなポリペプチドに関しては、これらの抗体を、in vitro 診断または機能性RBタンパク質の喪失を伴う病理の診断または予知のためのin vivo イメージング法に用い得る。

#### 【0046】

試料中の標的とする網膜芽腫 - 関連ポリペプチドのin vitro 検出に有用な免疫学的方法は、検出可能な抗体を用いるイムノアッセイを含む。そのようなイムノアッセイは、例えば、当業者に知られるELISA、Pandexマイクロフルオロメトリックアッセイ、凝集反応アッセイ、フローサイトメトリー、血清診断アッセイおよび免疫組織化学的染色法を含む。抗体は、当業者に知られる種々の方法によって検出可能となる。例えば、検出可能なマーカーを、直接または間接に抗体に取り付け得る。有用なマーカーは、例えば、放射性核種、酵素、発蛍光団、色原体、および化学発光ラベルを含む。

#### 【実施例】

#### 【0047】

(実施例1: RB-関連タンパク質の同定)

RB機能の最も簡単なモデルは、細胞機能において中心的な役割を演ずる相対的にごく僅かな標的分子が網膜芽腫タンパク質によって調節されることである。リン酸化(Chenら、1989; DeCaprioら、1989)、突然変異(Shewら、1990)または癌タンパク質摂動(DeCaprioら、1988; Goodrichら、1991; Whyteら、1988)、の3つの方法のうちのいずれか1つによるRBの不活化は、潜在的にRB結合を分離し、不規則な増殖へ導き得た。この報告までは、無論、機能未知の2つのタンパク質、p1およびp2、mycタンパク質および8-10の他の未同定タンパク質のような、限られた数の分子がRBと相互作用し得ることが知られるのみであった。遺伝学的および生化学的にRBネットワークを分析するために、RBの相互作用相手をコードする遺伝子をできるだけ多く同定することが不可欠である。クロニングの可能性を最大にするため、2つの異なるアプローチを企てた。一つのアプローチでは、Fieldsおよび彼の同僚によって開発された(FieldsおよびSung、1989)in vivoでのタンパク質-タンパク質相互作用を選択する酵母GAL4系に基づい

た 2 - ハイブリッド法を用いる。ここに記載した他のアプローチでは、 g t 1 1 c DNA 発現ライブラリーをスクリーンする R B - サンドイッチを用いた。このワン - ステップ R B - サンドイッチ法を用いることの利点は、簡単であること、直接的なことにあり、単離されたクローンは、潜在する架橋タンパク質なしに直接 R B と相互作用する融合タンパク質をコードし得た。スクリーニングは、 S V 4 0 ラージ T 抗原を陽性対照として用いて行った。 T 抗原を発現する g t 1 1 ファージを、この目的のために構成し、そして R B および T の会合体は本法により容易に検出され得る。

#### 【 0 0 4 8 】

このアプローチを用いて、 9 つのクローンを単離した。これらのクローンによりコードされたすべてのタンパク質を、核内に配置した。これは、生物学的に重要な方法で R B と相互作用し得るすべてのタンパク質に対する重要な基準である。なぜなら相互作用は、おそらくは核内で起こるから ( L e e ら、 1 9 8 7 b ) である。

10

#### 【 0 0 4 9 】

( 実施例 2 : R B タンパク質による調節の標的としての転写因子 )

R B の細胞機能が細胞の G 1 への侵入を制限すること ( G o o d r i c h ら、 1 9 9 1 ) であるならば、 G 1 進行および S 期への進入に対して重要な遺伝子は、 R B によって直接または間接に調節されなければならない。転写因子 E 2 F は、細胞周期依存性の方法で、 G 0 / G 1 期には優勢であるが S 期または M 期には優勢でないタイトな会合体で R B に会合することが知られている ( M u d r y j ら、 1 9 9 1 ; S h i r o d k a r ら、 1 9 9 2 )。 m y c、 D H F R、 および m y b を含むいくつかの遺伝子が、 E 2 F 転写制御に

20

#### 【 0 0 5 0 】

この簡単な R B 機能のモデルを支持する証拠は増加しており、 9 つの新しくクローンされた R B 関連タンパク質の収集において、一つはリボソーム RNA プロモーターを認識して結合し、 S L 1 との協同的な相互作用を通して RNA ポリメラーゼに仲介される転写を

30

#### 【 0 0 5 1 】

( 実施例 3 : A p 1 2 は、推定 b Z I P 転写因子をコードする )

この遺伝子の予備特性付けから、最も長いオープンリーディングフレームから推定された推定タンパク質は、開始メチオニンはまだ判明していないが、 4 7 6 アミノ酸の長さである。この推定タンパク質の予測分子量は約 5 1 k d であり、これは、抗 A p 1 2 抗体により免疫沈降される 6 0 k d のタンパク質に近い。 R B タンパク質に結合し、トランス活性化活性を有する A p 1 2 の C 末端領域は、非常に酸性であり、 G A L 4 および V P 1 6 ( S a d o w s k i ら、 1 9 8 8 ; M i t c h e l l および T j i a n , 1 9 8 9 ) のような、いくつかの公知の転写因子のトランス活性化ドメインの特徴である。 DNA 結合ドメインは、塩基性アミノ酸範囲によって両端に隣接されている、推定上のロイシンジッパーモチーフを特徴づけるタンパク質中央の領域に位置していると考えられる。 A p 1

40

50

2は、E2Fの特徴であるほとんどの特徴を有するので、E2FかE2F族のタンパク質のいずれかをコードすると考えられ得る。従って、E2Fはまた細胞増殖（例えば、fosおよびjun）および分化（例えば、C/EBP）に密接に関連する一クラスの転写因子であるので、E2Fはまた、興味のあるbZIPタンパク質であるようだ。bZIP族のもう一つの特徴は、E2Fの制御に調節の新しい層を加える、メンバー中のヘテロ二量体会合体の多様な配列を形成する傾向である。

#### 【0052】

この多様な配列の可能性は、細胞周期の完ぺきな制御にかかわるタンパク質を複雑に調節するために、細胞に対してほとんど無限の機会を提供する。Ap12/E2Fクローンの有用性は、RB、E2Fおよび細胞増殖間の関係の解明を、さらに容易にする。

10

#### 【0053】

RBの細胞関連物の同定、およびRB相互に作用する細胞ネットワークの解明を始めるために、RB関連タンパク質をコードする遺伝子をクローン化するいくつかの研究がなされた。本明細書に記載されている事は、これらの研究のうちの一つからの結果、すなわちプローブとしてRBを用いたgt11発現ライブラリーのスクリーニングである。9つの個別の遺伝子をクローン化し、その一つであるのAp12は、転写因子E2Fをコードすることを示唆する特徴を有する。クローンAp2、4、8、10、12、および15は全てRB関連タンパク質をコードし、およびすべて細胞周期の制御にかかわる。

#### 【0054】

（実施例4：RB関連タンパク質（RbAps）の同定）

20

2つのgt11 cDNA発現ライブラリーを構築し、T-結合ドメインおよびプローブとして完全なC末端領域（Leeら、1991）の両方を含む、精製p56-RBタンパク質（アミノ酸376-928）を用いてスクリーニングした。このプローブは、RBタンパク質、ウサギ抗RB抗体、（0.47）（Wangら、1990a）、およびアルカリホスファターゼ複合体化ヤギ抗ウサギIgGを含むので、RB-サンドイッチと呼ばれる。（材料および方法参照。）図1は、サンドイッチスクリーニング法の図式を説明する（1Aおよび1B）。RBとSV40 T抗原との関係は、十分に引照付けられているので（DeCaprioら、1988）、gt11 ファージ発現T抗原を構築し、RB-サンドイッチを用いてスクリーニングし、正の制御として使用した（図1-Dに示す）。例のように（図1-C）、この方法によって、クローンの一つ（Ap12）の融合生成物を容易に検出した。各フィルターの半分をRB-サンドイッチ結合用に、そして残りの半分をRBタンパク質欠損サンドイッチ結合用に使用した。後者のプローブは、RB抗体あるいはヤギ抗ウサギ抗体の、細菌タンパク質とのあらゆる交差反応のためにバックグラウンド結合の対照として使用した。1 x 10<sup>4</sup>の組換えファージのスクリーニングを5回行った後、12のクローンがRB関連タンパク質をコードする候補的遺伝子として出現した。これらのクローンを、RbAp1、2、4、6、8、9、10、11、12、13、14、15と呼ぶ。

30

#### 【0055】

これらの12の推定RbAp cDNAをpGEMプラスミドにサブクローン化して、各クローンから500から600bpの部分配列を得た。GENBANKデータベースにある公知の遺伝子配列と比較して、RbAp1、2、4、8、10、12、13、14、15は、公知のいかなる遺伝子に対しても重要な相同性を含まない新規遺伝子である。しかし、3つのクローンが以前に同定されている遺伝子と一致した。RbAp6は、核ラミンC（McKeon、1986；Fisher、1986）と同一であり；RbAp9は、Gタンパク質のサブユニットと部分的に相同の生成物をコードし（Guillemontら、1989）；そして、RbAp11は、リボソームRNA遺伝子プロモーターに結合する上流の結合因子（UBF）をコードする（Jantzenら、1990）。クロスハイブリッド形成および配列決定データは、RbAp1、10、13、および14が同一であることを示した。表1に、クローン化された全てのRbAp類の予備特徴付けを要約する。

40

50

## 【 0 0 5 6 】

R b A p クローン 2、4、8、10、12、および 15 は、細胞周期制御での、R B、p 1 1 0<sup>R S</sup>、結合、および全機能に対する標的である。R b A p クローンによってコードされる網膜芽腫関連タンパク質は、細胞増殖に対する正の要素であることは可能である。R b は、これらのクローンのタンパク質生成物に結合し、それゆえに、これらの増殖機能を阻害する。結果として、R b A p タンパク質生成物は、正には機能し得ないので、従って細胞周期の進行を促進し得ない。R b A p の R B に結合する能力の変質で、発ガン性の影響を生じ得る。このような変質および / あるいは変異を検出するアッセイは、過増殖性疾患を診断する手段として、悪性および機能を測定し得る。過増殖性の病状の例には、限定はされないが、甲状腺過形成、乾せん、乳癌を含む L i - F r a u m e n i 症候群、肉腫および他の新生物、膀胱癌、結腸癌、肺癌、良性前立腺肥大、ならびに種々の白血病およびリンパ腫が含まれる。本発明はまた、癌および他の過増殖性病状の治療に使用する、このような変質および / あるいは変異 R b A p の拮抗薬を提供する。

10

## 【 0 0 5 7 】

表 1 . R B 関連タンパク質の最初の特徴付け :

各クローンの c D N A の大きさは、ファージ D N A を E c o R I により消化した後に、アガロースゲルの E t B r 染色により決定した。m R N A の大きさは、マーカーに 2 8 s および 1 8 s r R N A を用いた R N A プロットアッセイにより測定した。各クローンからの部分配列を、クローンの同一性の決定のために G E N B A N K データベースのサーチに使用した。核の局在化を免疫染色法および細胞分画 ( データは示していない ) により測定した。n d は測定していないことを示す。

20

## 【 0 0 5 8 】

## 【 表 1 】

RbAp	cDNAの長さ (kb)	mRNAの大きさ (kb)	イソトク結合	同一性	細胞以外の局在
1,10,13,14	2.8	7.1	+	新規	核
2	1.6	3.6	nd	新規	nd
4	1.7	6.7	+	新規	核
6	1.5	2.1	+	Lamin C	核
8	1.8	6.9	nd	新規	nd
9	0.7	1.3	+	GB-like	核および膜
11	1.5	3.2	+	UBF	核
12	1.4	2.8	+	新規	nd
15	1.5	6.5	+	新規	核

30

40

( 実施例 5 : インビトロにおける R b A p 類の R B への結合 )

R B タンパク質の R b A p 類との関連を確認するために、クローン化した c D N A 挿入断片をプラスミド p F L A G ( I B I ) にサブクローン化した。このプラスミドを、細菌での融合体のフラッグセグメントに対する抗体を使用して検出し得る、フラッグ - 融合タンパク質の発現用に当てた。結合アッセイを促進するために、p 5 6 - R B を、グルタチオン S - トランスフェラーゼ ( G s t ) 遺伝子と融合させ、発現させて、そしてグルタチオンアガロースクロマトグラフィー ( G s t - R B ) ( S m i t h および J o h n s o n ,

50

1988)により精製した。RB-結合アッセイを行うために、FLAG-Ap溶解産物を、Gst-RBあるいはGstビーズのみ(RBを含まない)と混合した。付加された負の制御として、FLAG-BAP(細菌アルカリホスファターゼ)を、GstおよびGst-RBビーズとさらに混合した。広範囲にわたる洗浄後、結合された融合タンパク質を溶出し、抗FLAGモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングにより分析した。結果は、実験した全てのRbAp類はGst-RBビーズには結合し得るが、対照のGstビーズには結合し得ないことを立証した(図2)。これらのクローンでは、結合親和性には、最も弱いAp15から最も強いAp12まで様々であった。

#### 【0059】

Ap12 mRNAレベルは、細胞周期中に調節される。Ap12は、スクリーニング中に、最も強い結合シグナルを一貫して示したので、さらなる研究用に選択した。このクローンは、約1.0 kbの非翻訳領域を伴った1.4 kbの挿入断片、および114アミノ酸のオープンリーディングフレームを有する。RNAプロット分析をおこなって、mRNAの大きさおよび細胞周期の進行中の発現の様式を決定した。正常なサル(CV1腎細胞を、10%血清を含む新鮮培地にプレートして、ロバスタチンの存在下で36時間培養する(細胞をG1期で停止させるために)(Jakobisiskら、1991; Keyomarsiら、1991)か、あるいはアフィジコリン(aphidicolin)(10 μg/ml)の存在下に16時間培養(細胞をG1/S境界期で停止させるために)し、次に、4時間放置する(細胞をS期で同調させるために)か、あるいはナコダゾール(nacodazole)の存在下にさらに16時間インキュベートする(細胞をM期に進めるために)(Goodrichら、1991)。各期からの全てのRNAを、Ap12 cDNAをプローブとして用いたプロット分析のために調製した。2.8 kbのmRNAを、G1/S境界期およびS期において検出したが、G1の初期あるいはM期では検出しなかった(図3)。対照として、細胞周期中のAp9の発現の様式は変えなかった。この観察と一致して、Ap12 mRNA発現の増加は、血清刺激後の2から6時間の間に観察された。これらの結果は、Ap12が細胞周期の進行にかかわり得ることを証明する。

#### 【0060】

(実施例6: Ap12の配列決定)

最初のAp12 cDNAクローン(G12)は、相当するmRNAの大きさにより短かったことは明かである。cDNAライブラリーを再度スクリーニングして、その中からいくつかのより長いクローンを単離し、A6およびB6の2つのクローンについて、もとのクローン(G12)とともにさらに特徴付けを行った(図4)。2,492ヌクレオチドからの最も長いオープンリーディングフレームは、476アミノ酸の推定タンパク質をコードする。推定タンパク質の特有の特徴には、非常に酸性であるC末端の100アミノ酸、および15のプロリン残基に占められるN末端の43アミノ酸領域が含まれる。プロリン高含有領域の後ろに、典型的なロイシン繰返し体(Landschulzら、1988; Vinsionら、1989)があり、塩基性アミノ酸の範囲により両端に隣接されて、ポテンシャルDNA結合ドメインを示唆している。これらの特徴は、真核生物の転写因子のいくつかの異なるクラスを示している。さらに、389-411位のアミノ酸の範囲(LXSXE---DED)は、RBタンパク質への結合に応答可能なT抗原の配列に類似している(DeCaprioら、1988)。さらに、アミノ酸159-161(KSP)および346-349(SPGK)に、Cdkキナーゼに対する2つの潜在的なリン酸化部位が存在し、これは、このタンパク質の機能を調節し得る。

#### 【0061】

(実施例7: Ap12は、SV40 T抗原の結合に要求される領域に類似した領域で、RBの低リン酸化形態にのみ結合する)

Ap12のRB-結合特性を分析するために、もとのクローン(G12)をGst-融合タンパク質(P3)として発現させ、グルタチオンアガロースクロマトグラフィーにより精製した。この融合タンパク質を、Ap12タンパク質の、Molt4細胞の細胞溶解

産物から調製した全長のRBへの結合を試験するために使用した。このMolt 4細胞は、RBタンパク質の高リン酸化形態および低リン酸化形態の両方を発現する。この実験に、2つの付加された制御が含まれた。1つは、正の制御としてのGst-T抗原融合タンパク質であり、他方は、負の制御としてのGstのみであった。図5Aに示すように、P3タンパク質は、低リン酸化形態にのみ結合し、結合親和性は、Tの親和性に非常に類似している。Gstのみでは、検出可能なRBタンパク質に結合しない。RBのどのドメインがAp12に結合するかを限定するために、細菌pET-T7発現系(Studierら, 1990)で発現させたRB変異体パネルをP3ビーズと混合するか、あるいは平行に、Gst-Tビーズと混合した。ビーズに結合された野生型あるいは変異RBタンパク質の量を、モノクローナル抗RB抗体(mAb245)を用いたウエスタンブロット分析により測定した。図5Cおよび5Dに示すように、Tへの結合に欠ける変異RBもまた、Ap12には結合しない。これらの結果は、Ap12およびTの両方が、同様の領域で、RBのリン酸化されていない形態に結合することを示し、このことは、Ap12-RB関連が生物学的に重要であることを示している。

10

#### 【0062】

(実施例8: Ap12のC末端領域は、RBへの結合に要求される)

Ap12の114アミノ酸を含有する最初のP3融合タンパク質は、RBに結合するので、付加された実験は、RBへの結合に要求されるAp12の領域をマップするために当てられた。N末端あるいはC末端の異なる欠失のある、4つのGst-Ap12融合タンパク質を構築し、XH9は、Ap12 cDNAの完全なコーディング配列を含み、SH5(Sma IからHind IIIまで)は、C末端の314アミノ酸を含む。XX4およびSX4は、それぞれ、XH9およびSH5由来であり、C末端で21アミノ酸を欠失している。細菌で発現されたRBタンパク質(pETRbc)を、これらのGst-Ap12誘導体と混合して、上記のようにウエスタンブロットティングにより分析した。XH9、SH5、およびP3は、同様の親和性でRBに結合し、このことは、Ap12のN末端配列が、ほとんどRB結合に寄与しないことを示唆している。しかし、XX4およびSX4は、両方ともC末端から21アミノ酸を欠失し、そして(LXSXE---DDE)配列(DeCaprioら, 1988; Phelpsら, 1992)を含むが、RBには結合しない(図6)。これらの結果から総合して、Ap12のC末端領域がRB結合に必要とされ、(LXSXE---DDE)配列のみでは結合には十分でないことが示され、このことは、RB-Ap12相互作用の様式は、RB-TあるいはRB-E1A相互作用の様式とは異なり得ることを示唆する。

20

30

#### 【0063】

(実施例9: Ap12は、E2F認識配列に特異的に結合する)

RBは転写因子E2Fと複合体を形成すること(Bagchiら, 1991; Bandaraら, 1991; Chellappanら, 1991)、およびAp12が潜在的なDNA結合ドメインを有することが示されているので、Ap12が、E2F結合部位と相互作用し得るかどうかを決定するために実験を行った。細菌で発現させたGst-Ap12(SH5)融合タンパク質を、以前に記載された条件(Yeeら, 1989)を用いて、2つのE2F認識部位を含むDNAフラグメントのDNA移動度変位分析に使用した。図7Aに示すように、SH5は、特異的にそのプローブと結合する。なぜなら、その複合体は、野生型E2F同系配列を含む無標識DNAと効果的に競合するが、たった2つのヌクレオチドによって野生型とは異なる変異配列(Yeeら, 1989)とは競合しないからである。正の制御としての、HeLa細胞由来の部分精製E2Fタンパク質は、予測通りにDNAプローブに特異的に結合する。

40

#### 【0064】

RBがAp12-DNA配列特異複合体と相互作用し得るかを決定するために、精製p56-RBタンパク質を、DNA移動度変位分析に含有した。実験を2つの方法で行い、いずれかのSH5をRBと混合し、次に、E2Fプローブに加えるか、あるいはその融

50

合タンパク質を、まず E 2 F プローブに結合させ ( 図 7 B、レーン 3 )、その後、R B を加えた ( 図 7 B、レーン 6 )。いずれの場合においても、A p 1 2 - D N A 複合体は、R B の添加により過変位して位置はより遅く移動した。このことは、R B が特異 A p 1 2 - D N A 複合体と相互作用する能力を有することを示す。これらの結果は、A p 1 2 タンパク質が、E 2 F に示される活性と同様の D N A 結合活性および R B 結合活性を有することを示している。

#### 【 0 0 6 5 】

ロイシン繰返し体を含む領域が、D N A 結合に必要であるかどうかを決定するために、3 つの G s t - A p 1 2 融合タンパク質、P 3、S H 5 および X H 9 を、D N A 移動度変位分析用に選択した。図 7 C に示すように、推定ロイシンジッパーおよび塩基性アミノ酸残基の範囲 ( b Z I P ) ( V i n s o n ら、1 9 8 9 ) を含む S H 5 および X H 9 は、E 2 F 認識配列に結合するのに対して、A p 1 2 ( P 3 ) の C 末端領域は結合しなかった。さらに、他のいくつかの対照、A p 9、A p 1 5 および G s t 単独もまた試験では陰性であった。この結果は、推定 b Z I P モチーフを含む領域は、A p 1 2 - D N A 特異相互作用に必要であることを立証する。

10

#### 【 0 0 6 6 】

( 実施例 1 0 : A p 1 2 の C 末端は、トランス活性化ドメインとして機能し得る )

高度に酸性で、両親媒性のヘリックス領域は、通常は、真核生物の転写因子の活性化ドメインとして作用する ( M i t c h e l l および T j i a n , 1 9 8 9 を再参照 )。A p 1 2 の C 末端領域もまた、これらの特徴を示した。このことは、同様の様式で機能し得ることを示唆する。このことを試験するために、アミノ酸 2 2 - 4 7 6 あるいは C 末端の 1 1 4 アミノ酸 ( 3 6 2 - 4 7 6 ) のいずれかをコードする A p 1 2 の配列を、酵母発現ベクター上に存在する、酵母 G A L 4 タンパク質の D N A 結合ドメインに対応する配列 ( アミノ酸 1 - 1 4 7 ) ( K e e g a n ら、1 9 8 6 ) と融合した。この G A L 4 フラグメントは、特異的にその認識部位 ( U A S<sub>G</sub> ) ( K e e g a n ら、1 9 8 6 ) に結合し得るが、活性化ドメインを欠いている。従って、U A S<sub>G</sub> を有するプロモーターから転写を命令する手段として、活性化機能を提供するために、キメラタンパク質は、融合セグメントをたよる。哺乳動物の活性化因子を含むこのような融合体のいくつかは、p 5 3 を含めて、酵母では機能性であることが示された ( F i e l d s および J a n g , 1 9 9 0 )。図 8 に示すように、U A S<sub>G</sub> 制御下での、E . c o l i l a c Z 遺伝子を有する酵母株の形質転換の後、G A L 4 - A p 1 2 両融合体は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性により明白になる、リポーターの転写を活性化し得たが、それに対して G A L 4 - R B 対照は、活性化し得なかった。この結果は、A p 1 2 が活性化ドメインを含むこと、および C 末端の 1 1 4 アミノ酸がこの機能に対して十分であることを示す。

20

30

#### 【 0 0 6 7 】

( 実施例 1 1 : C V 1 細胞での A p 1 2 発現は、E 2 F 認識配列を有するプロモーターをトランス活性化する )

A p 1 2 が E 2 F 結合部位依存の様式で転写を活性化し得るかどうかを決定するために、2 つのプラスミド、C M V - A p 1 2 - S t u および C M V - A p 1 2 - R H を構築して、A p 1 2 を、サイトメガロウイルス ( C M V ) - I E プロモーター ( N e i l l ら、1 9 9 1 ) ( 図 9 A ) の制御下に、哺乳動物の細胞中で発現させた。2 つのリポータープラスミド、C A T リポーター遺伝子上流に 2 つの E 2 F 部位を有する p E 2 F A<sub>10</sub> C A T、および、E 2 F 部位を含まない p A<sub>10</sub> C A T を ( Y e e ら、1 9 8 9 ) このアッセイに使用した。図 9 B は、p A<sub>10</sub> C A T ではなく p E 2 F A<sub>10</sub> C A T をともにトランスフェクトしたときには、C M V - A p 1 2 - S t u あるいは C M V - A p 1 2 - R H の発現が、著しく C A T 活性を高めたことを示した。C M V - E 4 の発現には、リポータープラスミドのみによってトランスフェクトされた対照細胞に比較しても明かな効果はない。これらのデータは、A p 1 2 が、E 2 F 認識配列を有するプロモーターを活性化する、機能性転写因子をコードすることを示唆した。

40

#### 【 0 0 6 8 】

50

## (実施例12: RB関連タンパク質をコードする細胞遺伝子の単離)

2つのcDNAライブラリーを、以前に記載されている方法(Maniatisら、1982)により、HeLa細胞およびSaos2細胞から単離したポリA<sup>+</sup>RNAから構築した。二本鎖cDNAをセファロースC1-4Bクロマトグラフィーを使ってサイズ分画し、gt11アームに連結した。インビトロでパッケージしたライブラリーの大きさは、HeLa細胞では $2.0 \times 10^7$ 組換え体であり、Saos2細胞では $1.5 \times 10^7$ であり、挿入断片の平均の大きさは1.6 kbであった。そのcDNAライブラリーを100個の150mmディッシュに、ディッシュあたり $1-2 \times 10^4$ 組換え体をプレートし、42°Cで、プラークがちょうど目に見える時点(3.5時間)までインキュベートし、次に、37°Cで一晩IPTG(10 mM)で飽和したニトロセルロースフィルターに移した。そのフィルターを変性し、6M グアニジンHCl中で再生して、結合緩衝液(25 mMヘベス、pH 7.5、50 mM NaCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM DTT、0.1% NP-40、5%ミルク、1 mg/ml BSA)中で、4°Cで4時間、RB-サンドイッチプローブとインキュベートした。RB-サンドイッチは、結合緩衝液1mlあたり、1 µgの精製細菌発現p56-RB(Huangら、1991)、100 µlの予め吸収させたポリクローナル抗RB抗体(抗-RB 0.47、1:100希釈)と、1 µlアルカリホスファターゼ複合の二次抗体とを混合し、4°Cで2時間インキュベートして調製した。RBを含まない対照のサンドイッチは、RB抗体と二次抗体とを混合して調製し、クローンと抗RB抗体との交差反応を抑制する対照として使用した。結合されたフィルターを、次に、TBST(20 mM Tris-HCl、pH 7.5、150 mM NaCl、0.05% Tween-20)中で、各3分間で5回洗浄し、BCIP/NBP(Promega, WI)中で発色させた。最初のスクリーニングで陽性であったクローンを取り出して、第二回および第三回スクリーニングを行った。次に、RBを含まないサンドイッチではなく、RB-サンドイッチで一貫して陽性シグナルを示したクローンを、それから第4回および第5回スクリーニングのために、低密度で対照のファージと混合してプレートし、続いてバックグラウンドに対して強い陽性シグナルを与える均質な単離物を選抜した。

## 【0069】

## (実施例13: プラスミドの構築および融合タンパク質の発現)

RbApsクローンのcDNA挿入断片を、配列決定分析用にpGEM1にサブクローン化した。インビトロにおいて、RbAp融合タンパク質を発現させるために、cDNA挿入断片をpFLAG融合タンパク質発現系(IBI)にフレームをあわせて再構築した。FLAG融合タンパク質の発現を0.2 mM IPTGで誘導し、細菌溶解産物を、凍結-解凍、その後の溶解緩衝液B(50 mM Tris-HCl、pH 7.5、100 mM NaCl、5 mM DTT、0.2% NP-40、1 mM PMSF、1 µg/ml ロイペプチン、5 µg/ml アプロチニン(Aprotinin)、1 µg/ml アンチパイン)中での音波処理を2回繰り返して調製し、そして遠心分離により透明にした。インビトロでRBタンパク質を発現させるために、RB cDNAフラグメントのp56型を、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質pGEX-2T(SmithおよびJohnson、1988)を発現するプラスミドにサブクローン化し、細菌で発現されたGST-RB融合体を調製して、GSTアガロースビーズを用いて精製した。

## 【0070】

## (実施例14: インビトロ結合アッセイ)

FLAG-RbApsを約0.5 µg含む細菌溶解産物(100 µl)を、1-2 µgの融合タンパク質を有する20 µlのGST-RBビーズあるいはGSTビーズと、400 µlの溶解緩衝液B中で、4°Cで60分間混合した。結合されたビーズを、1 ml PBS/0.2% NP-40中で連続して5回洗浄し、タンパク質複合体をSDS負荷緩衝液中で煮沸した。結合されたFLAG融合タンパク質を、次にSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により

分析し、イムノプロットを行い、抗FLAGモノクローナル抗体（IBI）で精査した。

【0071】

（実施例15：細菌pET-T7系で発現される変異RBタンパク質の構築）

pETRbc、pETM6およびpETM9（Huangら、1991）に加えて、pETB2、pETssp、およびpETM8を、pB2、pSsp、およびpM8（Huangら、1990）からのAhaII-BamHIフラグメントを対応のpET発現ベクターにクローン化して構築した。細菌溶解産物を前章に記載のように調製した。

【0072】

（実施例16：GST-RbAp12融合タンパク質の構築）

RbAp12クローン由来のDNAフラグメントを、GST融合プラスミドにサブクローン化した。GST-P3を、もとのC末端の1.3kbのcDNA（G12）からのEcoRI-SphIフラグメントを、pGEX-2T（Smith, 1988）からの誘導体であるpGEPK（Chen, 未発表）にクローン化して構築した。GST-SH5は、クローンB6からのSmaI-HindIIIフラグメントを含有し、GST-XH9は、クローンA6のEcoRI-HindIIIフラグメントを含有し、このフラグメントは、完全なコーディング配列を含んでいる。GST-SX4およびGST-XX4は、それぞれ、GST-SH5およびGST-XH9由来であるが、C末端XhoI-HindIIIフラグメントは欠失している。

【0073】

（実施例17：RNAプロット分析）

グアニジンイソシアネート-CsCl法（Maniatisら、1982）により抽出した全てのRNAを、50%ホルムアミド、2.2Mホルムアルデヒド、20mMホウ酸ナトリウム（pH 8.3）中で変性し、1.0%アガロースゲル電気泳動により分析した。次に、RNAをハイボンドペーパー（Amersham）に移し、プロットをUV交差結合により保持させた。プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを、50%ホルムアミド、5xSSPE、5xデンハルト（Denhardt's）、1%SDS、および100μg/mlサケ精子DNA中で実施し、ハイブリダイゼーションは、<sup>32</sup>P標識の1.3kbRbAp12挿入断片DNAの存在下に45分で18時間行った。最初の洗浄は、2xSSC、0.1%SDS中で室温で行い、最終の洗浄は、0.1xSSC、0.1%SDS中で、65°Cにおいて45分間行った。

【0074】

（実施例18：DNAゲル移動度変位分析）

2つのE2F認識配列（TTTCGCGC - - - GCGCGAAA）を含有するプラスミドからの挿入断片を、ゲル移動度変位分析用のプローブとして使用し、また競合因子として作用させた。変異E2F部位（TTTAGCGC - - - GCGCTAAA）を有するプラスミド（Huangら、1992）もまた、これはE2Fには結合しないが、競合因子として使用した。分析は、以前に記載（Yeeら、1989）されたように実施した。希釈したGST-Ap12細菌溶解産物（SH5およびXH9融合タンパク質に対して20ng、P3、Gst、GstAp9、およびGstAp15に対して200ng）を、1x結合緩衝液（20mMヘセス、pH 7.6、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.1mM EGTA、40mM KCl、10%グリセロール）、0.1%NP40、1mg/mlサケ精子DNAと、室温で、15分間インキュベートし、そして<sup>32</sup>P末端標識（Klenowによって充填）プローブを加えてさらに30分間インキュベートした。タンパク質-DNA複合体を、4x、0.25xTBE緩衝液中の4%アクリルアミドゲル電気泳動により分析した。

【0075】

（実施例19：酵母の発現ベクターおよび菌株）

酵母に使用する発現ベクターは、pAS1ベクターに基づいた。簡単には、そのプラスミドは、GAL4 DNA結合ドメインの発現を差動するADH1プロモーターと、その

10

20

30

40

50

後下流にポリリンカーを含む。ベクターは、さらに、2  $\mu$ 複製起点および酵母での維持および選択用のTRP1遺伝子を有する。pAS/G12は、G12から単離したEcoRIフラグメントをpAS1の単一のEcoRI部位にサブクローン化して構築した。同様に、pAS/12B6は、p12B6からのEcoRIフラグメントを用いて、pAS1 EcoRI部位にサブクローン化して構築した。pASRb2は、ほかにも記載される(Durfeeら、未発表)。

#### 【0076】

使用した*Saccharomyces cerevisiae*株は、Y153(MATa, trp1-901, leu2-3, -112, ade2-101, ura3-52::URA3(GAL1-lacZ), MEL(GAL1-lacZ); (Durfeeら、未発表)であった。 10

#### 【0077】

(実施例20：酵母の形質転換および $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイ)

酵母の形質転換を、以前に記載(SchiestlおよびGietz, 1989)のLiOAc法により実施した。形質転換後、細胞を、トリプトファンを含まない合成ドロップアウト培地にプレートし、プラスミドの存在を選択した。その後、30°Cで2-3日増殖させ、各形質転換からの単一コロニーを他の選択プレート上に線状に移し、さらに24時間増殖させた。次に、コロニーの色による $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性アッセイは、細胞を透過可能にするために、ニトロセルロースフィルターを液体窒素中に約30-60秒浸漬したこと以外は、記載(BreedenおよびNasmyth, 1985)通りに実施し、次に、LacZ-X-Gal溶液(BreedenおよびNasmyth, 1985)で飽和したWhatmanフィルター上に重層する前に、室温で解凍した。AP12クローンの場合には、約20分以内に発色した。pAS/Rb2クローンでは、一晩感光しても色の変化は認められなかった。 20

#### 【0078】

(実施例21：一過性のトランスフェクションアッセイ)

トランスフェクションは、従来のリン酸カルシウム沈降法により、CV1細胞を用いて行った。プラスミドpCMVAp12Stuを、クローンA6からのStuIフラグメントをpCMVのSmaI部位にクローン化して構築し、そしてプラスミドpCMVAp12RHは、クローンB6からのEcoRI-HindIIIフラグメントを含有する。プラスミドpCMVE4を対照として使用した。CMV構築物を、プラスミドpE2FA<sub>1</sub>。CAT(2つのE2F結合部位を有する)と、pA<sub>10</sub>CAT(E2F結合部位を含まない)とを用いて、同数(5  $\times$  10<sup>6</sup>)の細胞を使用して共にトランスフェクトし、CAT活性を、以前に記載(Gormanら、1982)のように48時間後に測定した。 30

#### 【0079】

本発明は、網膜芽腫-関連タンパク質をコードする単離した核酸分子、および転写因子E2Fの生物学的活性およびRB-結合活性を有する単離されたタンパク質を、提供する。本発明はまた、網膜芽腫-関連タンパク質をコードする単離された核酸分子を含むベクター、そのようなベクターを含む哺乳動物細胞、網膜芽腫-関連タンパク質に対する抗体およびそのようなタンパク質に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマラインを、提供する。本発明はさらに、そのような抗体を診断および予知に用いる方法を提供する。 40

#### 【0080】

本発明はまさに好ましい実施態様を参考として記載しているが、種々の改変が、本発明の範囲を逸脱することなくなされ得ることを理解されるべきである。従って、本発明は、下記の特許請求の範囲によってのみ限定される。

#### 【0081】

本発明は国立衛生研究所発行の許可No. EY 05758および対WHLタバコ研究委員会許可の下に、部分的に政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明において何 50

らかの権利を有し得る。

【0082】

<引用文献>

Bagchi, S., Weinmann, R. and Raychaudhuri, P. (1991). The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell*. 65, 1063 - 1072.

【0083】

Bandara, L.R., Adamczewski, J.P., Hunt, T. and LaThangue, N.B. (1991). Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor. *Nature*. 352, 249 - 251. 10

【0084】

Bookstein, R. and Lee, W.-H. (1991). Molecular genetics of the retinoblastoma suppressor gene CRC. *Crit. Rev. Oncogenesis*. 2, 211 - 227.

【0085】

Bookstein, R., Rio, P., Madreperia, S., Hong, F., Allred, C., Grizzie, W.E. and Lee, W.-H. (1990a). Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 87: 7762 - 7766. 20

【0086】

Bookstein, R., Shew, J.-Y., Chen, P.-L., Scully, P. and Lee, W.-H. (1990b). Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene. *Science*. 247, 712 - 715. 30

【0087】

Breedon, L. and Nasmyth, K. (1985). Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50, 643 - 650.

【0088】

Buchkovich, K., Duffy, L.A. and Harlow, E. (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*. 58, 1097 - 1105. 40

【0089】

Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M. and Nevins, J.R. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*. 65, 1053 - 1061.

【0090】

Chen, P.-L., Chen, Y., Shan, B., Bookstein, R., Lee, W.-H. (1992). Stability of RB expression determines the tumorigenicity of rec 50

onstituted retinoblastoma cells. Cell Growth Diff. 3, 119 - 125.

【0091】

Chen, P. - L., Scully, P., Shew, J. - Y., Wang, J. Y. - J. and Lee, W. - H. (1989). Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. Cell. 58, 1193 - 1198.

【0092】

DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J. - Y., Huang, C. - M., Lee, W. - H., Marsillo, E., Paucha, E. and Livingston, D. M. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. Cell. 54, 275 - 283.

【0093】

DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Lynch, D., Furukawa, Y., Griffin, J., Pawlita, H., Huang, C. - M. and Livingston, D. M. (1989). The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. Cell. 58, 1085 - 1095.

【0094】

DeFeo-Jones, D., Huang, P. S., Jones, R. E., Haskell, K. M., Vuocolo, G. A., Hanobik, M. G., Huber, H. E. and Oliff, A. (1991). Cloning of cDNAs for cellular proteins that bind to the retinoblastoma gene product. Nature. 352, 251 - 254.

【0095】

Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K. and Harlow, E. (1989). The human papilloma virus - 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science. 243, 934 - 937.

【0096】

Fields, S., Jang, S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. Science. 249, 1046 - 1051.

【0097】

Fields, S. and Sung, O - K. (1989). A novel genetic system to detect protein - protein interactions. Nature. 340, 245 - 246.

【0098】

Fisher, D. Z., Chaudhary, N., Blobel, G. (1986). cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament p

roteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 6450 - 6454.

【0099】

Friend, S. H., Bernards, R., Rogeij, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M. and Dryja, T. P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature (London). 323, 643 - 646.

【0100】

Fung, Y. K. T., Murphree, A. L., Tang, A., Qian, J., Hinrichs, S. H. and Benedict, W. F. (1987). Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. Science. 236, 1657 - 1661.

【0101】

Goodrich, D. W., Chen, Y., Scully, P. and Lee, W. - H. (1992). Expression of the retinoblastoma gene product in bladder carcinoma cells associates with a low frequency of tumor formation. Can. Res. 52, 1968 - 1973.

【0102】

Goodrich, D. W., Wang, N. P., Qian, Y. - W., Lee, E. Y. - H. P. and Lee, W. - H. (1991). The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. Cell. 67, 293 - 302.

【0103】

Gorman, C. M., Moffat, L. F., Howard, B. H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. Mol. Cell Biol. 2, 1044 - 1051.

【0104】

Gullemont, F., Billault, A., Auffray, C. (1989). Physical linkage of guanine nucleotide-binding protein-related gene to the chicken major histocompatibility complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 4594 - 4598.

【0105】

Harbour, J. W., Lai, S. - H., Whang - Peng, J., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Kaye, F. J. (1988). Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. Science. 241, 353 - 357.

【0106】

Hiebert, S. W., Lipp, M., Nevins, J. R. (1989). E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 3594 - 3598.

10

20

30

40

50

## 【0107】

Horowitz, J. M., Yandell, D. W., Park, S. H., Canning, S., Whyte, P., Buchkovich, K., Harlow, E., Weinberg, R. and Dryja, T. (1989). Point mutational inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene. *Science*. 243, 937 - 940.

## 【0108】

Hu, Q., Dyson, N. and Harlow, E. (1990). The regions of the retinoblastoma protein needed for binding to adenovirus E1A or SV40 T antigen are common sites for mutations. *EMBO J.* 9, 1147 - 1155. 10

## 【0109】

Huang, H.-J.S., Yee, J.-K., Shew, J.-Y., Chen, P.-L., Bookstein, R., Friedmann, T., Lee, E.Y.-H.P. and Lee, W.-H. (1988). Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the retinoblastoma gene product in human cancer cells. *Science*. 242, 1563 - 1566.

## 【0110】

Huang, S., Shin, E., Sheppard, K.-A., Chokroverty, L., Shan, B., Qian, Y.-W., Lee, E.Y.-H.P., Yee, A.S. (1992). The retinoblastoma protein region required for interaction with the E2F transcription factor includes the T/E1A binding and C-terminal sequences. *DNA and Cell Biology*. in press. 20

## 【0111】

Huang, S., Lee, W.-H. and Lee, E.Y.-H.P. (1991). Identification of a cellular protein that competes with SV40 T antigen for binding to the retinoblastoma gene product. *Nature*. 160 - 162. 30

## 【0112】

Huang, S., Wang, N.-P., Tseng, B.Y., Lee, W.-H. and Lee, E.Y.-H.P. (1990). Two distinct and frequently mutated regions of retinoblastoma protein are required for binding to SV40 T antigen. *EMBO J.* 9, 1815 - 1822.

## 【0113】

Jakobisiak, M., Bruno, S., Skierski, J.S. and Darzynkiewicz, Z. (1991). Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 88, 3628 - 3632. 40

## 【0114】

Jantzen, H.-M., Admon, A., Bell, S.P., Tjian, R. (1990). Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature*. 344, 830 - 836. 50

## 【0115】

Kaelin, W. G. J., Pallas, D. C., DeCaprio, J. A., Kaye, F. J. and Livingston, D. M. (1991). Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell*. 64, 521-532.

## 【0116】

Keegan, L., Gill, G. and Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science*. 231, 699-704.

## 【0117】

Keyomarsi, K, Sandoval, L., Band, V. and Pardoll, A. B. (1991). Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Can. Res.* 51, 3602-3609.

## 【0118】

Landschulz, W. H., Johnson, P. F., McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.

## 【0119】

Lau, L. F., Nathans, D. (1991). Genes induced by serum growth factors. The Hormonal control regulation of gene transcription edited. P. Cohen & J. G. Foulkes. Elsevier Science Publishers. pp257-293.

## 【0120】

Lee, E. Y. - H. P., To, H, Shew, J. - Y., Bookstein, R, Scully, P. and Lee, W. - H. (1988). Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science*. 241, 218-221.

## 【0121】

Lee, W. - H., Hollingsworth, R. E., Qian, Y - W., Chen, P - L., Hong, F., Lee, EY - HP. (1991). The RB Protein as a Cellular 'Corral' for Growth-Promoting Proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.: Cell Cycle*. 61, 211-217.

## 【0122】

Lee, W. - H., Bookstein, R, Hong, F., Young, L. - J., Shew, J. - Y. and Lee, E. Y. - H. P. (1987a). Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence *Science*. 235, 1394-1399.

## 【0123】

Lee, W. - H. , Shew, J. - Y. , Hong, F. , Sery, T. , Donoso, L. A. , Young, L. J. , Bookstein, R. and Lee, E. Y. - H. P. (1987b). The retinoblastoma susceptibility gene product is a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature*. 329, 642 - 645.

## 【0124】

Lees, J. A. , Buchkovich, K. J. , Marshak, D. R. , Anderson, C. W. and Harlow, E. (1991). The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2. *EMBO J.* 10, 4279 - 4290. 10

## 【0125】

Lin, B. T. , Gruenwald, S. , Moria, A. O. , Lee, W. - H. and wang, J. Y. (1991). Retinoblastoma cancer suppressor gene product is a substrate of the cell cycle regulator cdc2 kinase. *EMBO J.* 10, 857 - 864.

## 【0126】

McKeon, F. , Kirschner, M. , Caput, D. (1986). Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature*. 319, 463 - 468. 20

## 【0127】

Mitchell, P. J. and Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*. 245, 371 - 378. 30

## 【0128】

Mudryj, M. , Hiebert, S. W. , Nevins, J. R. (1990). A role for the adenovirus inducible E2F transcription factor in a proliferation dependent signal transduction pathway. *EMBO J.* 9, 2179 - 2184.

## 【0129】

Mudryj, M. , Devoto, S. H. , Hiebert, S. W. , Hunter, T. , Pines, J. , Nevins, J. R. (1991). Cell cycle regulation of the E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A. *Cell*. 28, 1243 - 1253. 40

## 【0130】

Neill, S. D. , Nevins, J. R. (1991). Genetic analysis of the adenovirus E4 6/7 trans activator interaction with E2F and induction of a stable DNA-protein complex are critical for activity. *J. Virol.* 65, 5364 - 5373.

## 【0131】

50

Phelps, W. C., Munger, K., Yee, C. L., Barnes, J. A., Howley, P. M. (1992). Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J. Virol.* 66, 2418 - 2427.

【0132】

Rustgi, A. K., Dyson, N. and Bernards, R. (1991). Amino-terminal domains of c-myc and N-myc proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product. *Nature.* 352, 541 - 544. 10

【0133】

Sadowski, L., Ma, J., Triezenberg, S., Ptashne, M. (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature.* 335, 563 - 564.

【0134】

Schiestl, R. H. and Gietz, R. D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 16, 339 - 346. 20

【0135】

Shenoy, S., Choi, J.-K., Bagrodia, S., Copeland, T. D., Maller, J. L. and Shalloway, D. (1989). Purified maturation promoting factor phosphorylates pp60c-src at the sites phosphorylated during fibroblast mitosis. *Cell.* 57, 763 - 774.

【0136】

Shew, J.-Y., Lin, B., Chen, P.-L., Tseng, B. Y., Yang-Feng, T. L. and Lee, W.-H. (1990). C-terminal truncation of the RB protein leads to functional inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6 - 10. 30

【0137】

Shirodkar, S., Ewen, M., Decaprio, J. A., Morgan, J., Livingston, D. M., Chittenden, T. (1992). The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell.* 68, 157 - 166. 40

【0138】

Smith, D. B., Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *E. coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 67, 31 - 40.

【0139】

Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes 50

es. Methods in Enzymology. 185, 60 - 89.

【0140】

Sumegi, J., Uzvolgyi, E. and Klein, G. (1990). Expression of the RB gene under the control of MuLV-LTR suppresses tumorigenicity of WERI-Rb-27 retinoblastoma cells in immunodeficient mice. Cell Growth Differ. 1, 247 - 250.

【0141】

Takahashi, R., Hashimoto, T., Hong-Ji, X., Hu, S.-X., Matsui, T., Miki, T., Bigo-Marshall, H., Aaronson, S.A. and Benedict, W.F. (1991). The retinoblastoma gene functions as a growth and tumor suppressor in human bladder carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 5257 - 5261. 10

【0142】

Toguchida, J., Ishizaki, K., Sasaki, M.S., Ikenaga, M., Sugimoto, M., Kotoura, Y. and Yamamoto, T. (1988). Chromosomal-reorganization for the expression of recessive mutation of retinoblastoma susceptibility gene in the development of osteosarcoma. Cancer Res. 48, 3939 - 3943. 20

【0143】

Vinson, C.R., Sigler, P.B., McKnight, S.L. (1989). Scissors-Grip Model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. Science. 246, 911 - 916.

【0144】

Wang, N.-P., Chen, P.-L., Huang, S., Donoso, L.A., Lee, W.-H. and Lee, E.Y.-H.P. (1990a). DNA-binding activity of retinoblastoma protein is intrinsic to its carboxyl-terminal region. Cell Growth Diff. 1, 233 - 239. 30

【0145】

Wang, N.P., Qian, Y., Chung, A.E., Lee, W.-H. and Lee, E.Y.-H.P. (1990b). Expression of the human retinoblastoma gene product pp110RB in insect cells using the baculovirus system. Cell Growth Diff. 1, 429 - 437. 40

【0146】

Whyte, P., Buchkovich, K.J., Horowitz, J.M., Friend, S.H., Raybuck, M., Weinberg, R.A. and Harlow, E. (1988). Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. Nature. 334, 124 - 129.

【0147】

Yee, A.S., Raychaudhuri, P., Jakoi, L., Nevins 50

, J. R. (1989). The adenovirus-inducible factor E2F stimulates transcription after specific DNA binding. *Mol. Cell Biol.* 9, 578-585.

【0148】

Yokota, J., Akiyama, T., Fung, Y.-K.T., Benedict, W.F., Namba, Y., Hanaoka, M., Wada, M., Terasaki, T., Shimosato, Y., Sugimura, T. and Terada, M. (1988). Altered expression of the retinoblastoma (RB) gene in small-cell carcinoma of the lung. *Oncogene.* 3, 471-475. 10

【図面の簡単な説明】

【0149】

【図1】図1は、RB-サンドイッチスクリーニングの結果を示す。gt11 cDNA発現ライブラリーをプレートして、精製したp56-RB、抗RB抗体、およびアルカリホスファターゼを抱合した第二の抗体を含むRB-サンドイッチを用いてスクリーニングした。AおよびBは、RB-サンドイッチスクリーニングの図解である。CおよびDは、RB-サンドイッチ(フィルターの左半分)を伴うハイブリッド化したフィルターであり、そこにおいて正の記号はRbAp-RB複合体(C)またはT-抗原-RB複合体(D)を示す。フィルターの右半分はRB-マイナスサンドイッチをプローブとした。 20

【図2】図2は、*in vitro*でのRbApのRBとの結合を示す。それぞれのクローン(Ap4, 6, 9, 10, 11, 12, 15)によるcDNA挿入物をpFLAGプラスミド中にサブクローンし、FLAG-Ap融合タンパク質の溶解物をGST-RBビーズ(R)またはGSTビーズ単独(C)と混合した。次に結合タンパク質を抗-FLAGモノクローナル抗体を用いる免疫プロットにより分析した。矢印は、抗-FLAG抗体により検出された、GST-RBビーズに結合したFLAG-Apsを示す。BAP=FLAG細菌性アルカリホスファターゼ融合タンパク質。

【図3】図3は、Ap12の細胞周期依存性発現を示す。CV1細胞から得た、細胞周期の種々の段階に同調させた全RNAを変性し、ホルムアルデヒドゲル電気泳動により分析した。RNAプロットを<sup>32</sup>P-標識 Ap12 cDNA挿入物(G12)とハイブリッド化した。レーン1はG1初期;レーン2はG1/S境界;レーン3はS期(アフィジコリン放出4時間後);レーン4はS期(飢餓細胞再プレート18時間後);レーン5はM期である。mRNA(矢印で示す)の大きさは、RNA試料に隣合う平行レーンを走るrRNA 28Sおよび18Sの移動により測定した。 30

【図4】図4は、Ap12の制限マップおよび核酸およびアミノ酸配列を示す。クローンA6, 2, 492ヌクレオチドの完全な配列が得られた。A: 最長オープンリーディングフレームを有するAp12(A6)の制限マップ。G12はRB-サンドイッチスクリーニングで得られた最初のAp12クローンである。A6およびB6をcDNAライブラリーの再スクリーニングにより単離した。Ap12誘導体の構築において使用した制限部位のみを示す。B: Ap12の配列および予測されたアミノ酸配列。四角はロイシンの反復を示す。2つの推定されたCdkリン酸化部位をアンダーラインで示す。 40

【図5】図5は、Ap12がRBの低リン酸化型とT類似部位で特異的に結合することを示す。A、レーン1:モノクローナル抗-RB抗体、mAb11D7を用いたMolt4溶解物免疫沈降物。レーン2:分子マーカー。レーン3-5:Molt4細胞溶解物( $5 \times 10^6$  cells)を、GSTビーズ(レーン3)、GST-Ap12(レーン4)およびGST-T(レーン5)ビーズと混合した。洗浄後、GST融合物に結合したRBをモノクローナル抗-RB抗体、mAb11D7を用いる免疫プロットニングにより分析した。B: 細菌性pET-T7発現系で発現したRB変異タンパク質のパネル。T-結合ドメインを強調する。C-D:細菌性に発現した野生型(pETRbc)または変異RBタンパク質(pETB2, Ssp, Xs, M8, M6, M9, Nm)を、GST-Ap1 50

2 (C) または GST-T (D) ビーズと混合し、そして結合タンパク質をモノクローナル抗-RB抗体、mAb 245を用いるウェスタンブロット分析により測定した。

【図6】図6は、RB結合にAp12のC-末端領域が必要であることを示す。一連のGST-Ap12誘導体、P3、SH5、XH9、SX4、およびXX4、を構築し(パネルBに示す)、そしてRB結合に使用した。細菌性に発現したpETRbc(野生型RB)をGST-Ap12ビーズと混合して、モノクローナル抗-RB抗体、mAb 245を用いるウェスタンブロットにより分析した。P3に対する領域をコードするポリペプチドはアミノ酸362-476; SH5に対してはアミノ酸162-476; XH9に対してはアミノ酸1-476; SX4に対してはアミノ酸162-455; XX4に対してはアミノ酸1-455である。矢印はp110-RBの位置を示す。

10

【図7】図7は、Ap12がE2F認識配列に特異的に結合することを示す。細菌性に発現したGST-Ap12の誘導体(p3, SH5, XH9)から調製した溶解物、およびGST-Ap9、GST-Ap15、および単独のGSTをDNA移動度シフトアッセイに用いた。プローブはKlenowの補欠反応により<sup>32</sup>P-末端-標識した、2つのE2F認識部位を含むDNAフラグメントで(材料と方法を参照)あった。A: GST-Ap12 SH5はE2F-特異性配列に結合する。陽性対照として、HeLa細胞から得られる部分的に精製したE2Fタンパク質も同様に用いた。野生型E2F部位または変異型E2F部位のいずれかを含むDNAフラグメントを競合物として用いた(材料と方法を参照)。レーン1: プローブ単独; レーン2: E2F + プローブ; レーン3: E2F + プローブ + wt競合物; レーン4: E2F + プローブ + 変異株競合物; レーン5: SH5 + プローブ; レーン6: SH5 + プローブ + wt競合物; レーン7: SH5 + プローブ + 変異株競合物。B: RBはAp12-E2F DNA複合体と相互作用する。レーン1: プローブ単独; レーン2: SH5 + プローブ; レーン3: SH5 + p56-RB (0.25 μg)、15分間インキュベートした後、プローブを添加した; レーン4: p56-RB + プローブ; レーン5: SH5 + プローブ; レーン6: SH5 + プローブで15分間、次にp56-RBを添加した。C: Ap12のDNA結合ドメインは潜在するbZIPモチーフを含む領域に位置する。レーン1: P3, 200 ng; レーン2: P3, 400 ng; レーン3: SH5, 20 ng; レーン4: SH5, 40 ng; レーン5: XH9, 20 ng; レーン6: XH9, 40 ng; レーン7: GST単独, 200 ng; レーン8: GST-Ap9, 200 ng; レーン9: GST-

20

30

【図8】図8は、Ap12のC-末端が、酵母中のGAL4 DNA結合ドメインと融合させたときに活性化ドメインとして役立つことを示す。GAL4(アミノ酸1-147)およびG12(AP12、アミノ酸362-476)、12B6(AP12、アミノ酸22-476)、またはRb2(RB、アミノ酸301-928)のいずれかの融合タンパク質を、材料および方法の中に詳細に記載したようにして酵母中で発現した。プラスミドを用いて、Y153をトリプトファン要求株に形質転換し、それぞれの形質転換体の単一コロニーをトリプトファン欠乏ドロップアウト培地上に筋状に植え付けた。30で1日間培養した後、コロニーリフトアッセイを用いて細胞の-ガラクトシダーゼ活性を分析した。

40

【図9】図9は、Ap12がE2F認識部位を伴うプロモーターをトランス作用活性化することを示す。A: Ap12 cDNA発現ベクターの図解。PA、ポリ(A)。B: E2F認識配列を伴うプロモーターの転写活性化。pA<sub>1</sub>、CATまたはpE2FA<sub>1</sub>、CATのいずれかの10 μgを、CMV-Ap12-StuまたはCMV-Ap12-RHの10 μgとともにサル腎臓CV1細胞中に共トランスフェクションした。48時間後、細胞を取り出してCAT活性を測定した。CMV-E4をリポータープラスミドと共トランスフェクションして、リポータープラスミド単独の場合と同様に対照として用いた。

【図10】図10は、クローンAp2の核酸配列の一部を示す。p = 5'配列; r = 3'配列。

【図11】図11は、クローンAp8の核酸配列の一部を示す。p = 5'配列; r = 3'

50

配列。

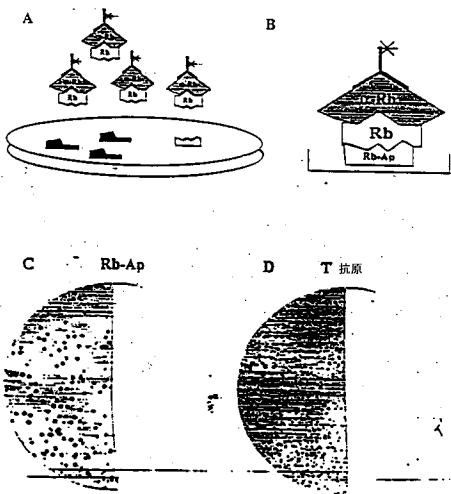
【図12】図12は、クローンAp15の核酸配列の一部を示す。p = 5'配列；r = 3'配列。

【図13】図13は、クローンAp4の核酸の全配列を示す。

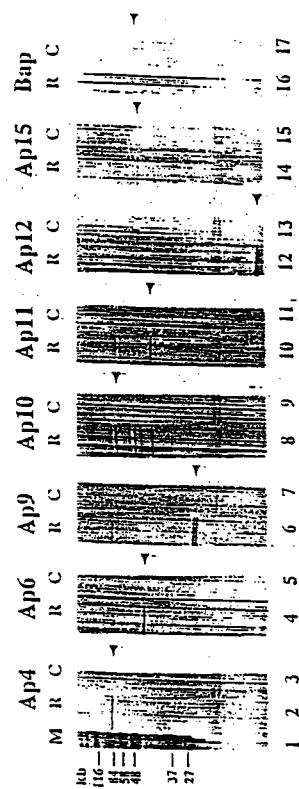
【図14】図14は、クローンAp10の核酸の全配列を示す。

【図15】図15は、クローンAp10の核酸の全配列を示す。

【図1】



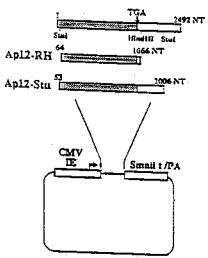
【図2】



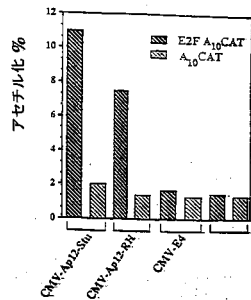


【 9 】

A



B



【 10 】

RbAp2p

```

10 20 30 40 50 60 70 80
CGCTTACCTTGCCTGGAATGCTGCTCAGACAAAGGCGCAGCATGCTGTAAGACTGTGCGCCAGCACTCCGCGAGCT 80
CGGCTGAGCCATCAAAATTAAGCCACAGAGATCTGACATCACTCAGGTGCGGTCGCCAACCCCTCGCAACCTCT 100
AGAAATACAGACTCG 178
  
```

RbAp2r

```

10 20 30 40 50 60 70 80
TTTCTTACTTATTAAGAGCCCTTGTGCGCAGAAATATGATGTAAAATCATTTGAAAAAATCAAAAAGCATCATGATCAT 80
ATCCAAATATACATTTGTACATAAATACATTTCTTCTTATGCTTCTGAGTGAAGGCTGCTGATTCAGTACT 161
  
```

【 13 】

RbAp4

```

10 20 30 40 50 60 70 80
GAATCCGGGCAAGAGCTTAAGCAAAAAACAACCTGTAATAAGGGAGAAAAAAGAAAAAGAAAACTGAAGA 80
AAAAGCGTAATAAAGATTGAGCTCTTCAATGAAAATCTCGAACTAAGTCACTGAAATAGTGAACCACTCAC 150
CAAGCGCAAAATGGAGCTGACTGCAAAAAATGGATAGGACCCCTGAAAAAGCAAAAATTTCTTAACTGCGGAGCC 240
AAAAAATCAAACTCAACAAGAAATGGGAGAAAATTTGGAGTACAGAAAATATCAAAACAAGAAAGCCCTCTGA 320
AAATTGGATCAACTCTAGCAAAATTAACAAGAAAATCAAAAGAAAGTCAAGCAAAAAAGTCACTGGAATGAAG 400
410 420 430 440 450 460 470 480
GATCAGCTCAACTCTGGTGAATTCAGCGTACGAGCTCACTGGAGGAGTCTCTGCGAAAATCTGAGAAAAAACA 480
GATACAAAGCACTCTGATTAAGCGATGGAAGAAATAAATGCAATACCCGCCACTGGAAGATGTTATCATTA 560
TTTCAAGTCTCACTCAAAATGGGATAAAGATGCTTTGAACTGAGAAAGAGATGTTAAATCCACAGCCCTATAT 640
AAGTGAAGAAACCTGCTAGTCTTAATAAAATAGTGTAGTCAAAAGCCATCAAAATATGCTCAAGTCTCTGGAAGAA 720
ATGACCCATCGCAAAAAATCAAGAAATTCACAAAGAGCTGAGCATGAAATCAACAATGAGGTTAAAGTTCAAA 800
810 820 830 840 850 860 870 880
AAACTCTGACTGTGAAAAAGGAAAAACAAGATCGAGATTAATCACTGTTGAAAAAGGAAAGCCCTGAAAAAGCA 880
AGACAACACTCGCCAGCAAGAGAGATTAATTTGACCGCTGAAATGAAAGGAAATTTAAAGTCTGCTCAATCT 960
TCCAAAGAGGTAGAACTGATGATTAATCTGCTGCTCTCAAAATAAGACTCTCACTCCCAATAGAGACA 1040
AAAAACTGACTAGACAACAGAGATTAATGATTTCAAAAGTGAAGTAAAGAAAGTAAATGATCAAGCAAAACA 1120
CTCCTCTCGGAAATAAGATTTGCTGTCGACAGAAAAATAACCAAGGGAAGAGAGATTTGCTTAAAAAGGAACA 1200
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
GGAGATCCAAAAAAGTAACTGATGCTCCAGCAAGCAAAAACTCATGATCAAAAGCCACTTATGATCAAAAGC 1280
GCCAAATGAAGAGCAAAATCTGATGATAAAATCTTTAAAGGATGAGAGACATGATTTGAAAGCAAGGAAATA 1360
AAGAGTCAAGTGGCAATAAAGCTGTTATATCTTAAAGCAAGAGAGAGAGGTTGAAAGAGCAAAATTAATCTGGCAA 1440
ATTGACAAAGTACTGCAAAAGCCAAAGCCAGTAAAGTCTCTGACTGACTTCTGACTTAACTGAGAACTCA 1520
TGAAGTCTTTTGAACAGACTAATGAAAGTGCAGTGAAGTAAATGTTCTTGAAGAAAGAGGAACTCTCGAGAA 1600
1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
CATTTCTAAGCACTGAAAGTAAATAATGAGAAAGGAAAAAGAGGCTGGACAAGAGCAGTGTGCAAGTGGC 1680
ATAAGCGAATCAAGAGCCAGCAAGCCAGGCTCAGCCAGCAAGAGCCAGATCTCTGAGAGCCAGACCCAG 1760
CCAGATGACGCTGACAGTCAAGCAAAAGTCCAGCAGC 1800
  
```

【 11 】

RbAp8p

```

10 20 30 40 50 60 70 80
TTTACGACAGAGCTATTTCCACAGCTTCAAATGCGACACCCATTAAGTAAACAAAAAGGATCTGCGAAGACTGTAT 80
CTACTGCTAAGACAGAGTGAACACACCAAGAAAGBACAGCTTAAAGAAAGATATATATGCTACTGAACCTGAAATG 160
CATAAGACATAGAAAGTCCAGCCGAAATAGCGACAAATTAAGATGATACCTGAAATATCAGTCTCTCAAGCTATT 240
CTTCAGTGTACTT 288
  
```

RbAp8r

```

10 20 30 40 50 60 70 80
GAATTCAGCTGATGCTTGTGTTTCCAAAGTATCTGATCTAGTATTTCACTCTTTTCTCTCTTCAGCAGCAGATTTA 80
CACAGCATATCTTTGCTCTCTGCGCCATCTGCTGTCTTGAABAACTTAACCCACAGCAATCACCATAAAGCCAG 160
TCATCAGATCTCCACAGCCAACTAAATGCTGATGCTTTTCCAAACACACTTCTGATGATCAGATATATCTG 240
TCAAT 246
  
```

【 12 】

RbAp15p

```

10 20 30 40 50 60 70 80
GAATTCAGTGCAGCCAGTAAAGGTGCAAGGAAAGGACCTGACTGCTCACTGCTTCTTAATAAATAGAGTCCAAAGC 80
TAAGAGGCAAGAAAGAGGCTGCTGACAGAGTGAAGAAACACCTACATCTGTAAGCTATGTCAGCAAGATGTA 160
AGAAACCGAATCCTTGTCTCAGATGATGATGCAAGTCAAGTCAAGAGGATTTGAAAGAAAGCAAGCTGTGTATTCCAA 240
GTATCTTCTTGTAGBAGAGCAGCCCAAGAGCTAAATACACATTTAATTTCTCAGAAAGAGGATGATGATGCTGA 320
GTATGATGATGACATTAATTAATTAAGGAATTAAGATTAAGGATTTAAAGCATCTCCATAAGCAAAATGATGAGGA 400
410 420 430 440 450 460 470 480
TTGTCTCTGAAGTGGTATGATAAAGATGAATACATTTTCAGCAGCAAACTAAAGGCTGACCAAAAAATCTTT 480
CATGACAAAAAATGAGGATTTTGAATGCTTCTCAATTTCTGCTATTTCTCAGAAATCAGAAATGATGATG 560
TTTTCAGATTAAGAAATTTTCTCTCTTTTCCACTTCTTTTCCACTTCTTTGCAACAGCAAGATTAATTTCAAG 640
AAAGCTGCTGCTAAAAAGGAAAGCCCTGCTCAGATACAGCTCA 688
  
```

RbAp15r

```

10 20 30 40 50 60 70 80
GCAATGTTAATAAAGTGGAAAGCCACAAACATTTTCAACAAATCTGTGTTGCTTTTCTCTCTGCTCA 80
GCTTTTGTACACTGCTCTTTTAAATGATGATGATTAATGACCTTTTATTTATTTGATGATGATGATGATGAT 160
TTGCTTACACATACATTTTCTCTCTTTTACTGATTAAGATGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 240
TATAGACTGCTGCTTACACAGATTTTAAATGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 320
CATTAAGATGCACTGAAAAAGGAAAGCCCTGCTCAGATACAGCTCA 384
  
```

【 14 】

RbAp10

```

10 20 30 40 50 60 70 80
GAATTCAGCCGCAATTAATTCGGGATTCCTGCGAATCAAGAAATGCAATGCTCACTGCGGTAAGAAAG 80
ACATCAATAGAAATTTGAGATTAATTCATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 160
TTGCGGAACTTGAAGAAAGTCAATTCAGAGAGTCAAGAAAGTGAAGTTGCTAAATGAAATGAA 240
AGATGAGAAATCTGAGAGGCTCAATTCGATTAAGAAATGCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 320
410 420 430 440 450 460 470 480
TGCGCAGTGAATGACAGCTGGAAGGAGATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 480
GTAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 560
AGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 640
AGTCTATCAAGTGAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 720
810 820 830 840 850 860 870 880
TTGCTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 880
GCTACTGCTTGAAGAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 960
GAGAAAGTGAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1040
AGTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1120
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
TTAAGATAAAGTTGAGAACTTGAAGGAAATGCAAGATGCAAGAAAGAAAGCAAGTAAATGATGATGATGAT 1280
AATTCAGAGCAAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1360
ATGACTTTTGAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAG 1440
TACTCTTCTGATTAAGATGCTTTGAGAAAGAGGCAAGCAGATACAGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1520
GAGATGCTTCAAGATGATTAAGAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1600
1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
AAGCAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1680
CTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1760
GATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1840
CAGAAAGAAAGTCAAGAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1920
2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080
GAAATTTTGAAGAAAGGCAAGGAAAGTACAGATGAAAGAAAGTAAAGCAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG 2080
ACATTAAGAGCTCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 2160
GATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 2240
TCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 2320
TAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 2400
2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480
AGAGCAAACTTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAA 2480
TTGAGAGCAGATTAAGATGCTGAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 2560
GCTCTTTTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGT 2640
AGCAGAGCTCAAGAGAGTCTGATGAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAAAGTGAAGAA 2720
AGCAGCAAGATCAATTAAGAGCTGACACTGAGAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 2800
  
```



## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/00	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 N 7/00	C 1 2 P 21/02	
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	B
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 ウェン - ホワ リー

アメリカ合衆国 テキサス 9 2 1 2 2 , サン アントニオ , ジャービス ドライブ 1 1 7 1 8

(72)発明者 ベイ シャン

アメリカ合衆国 テキサス 7 8 2 4 5 , サン アントニオ , ナンバー 5 0 1 , オミクロン ドライブ 1 4 8 2 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA80 CA02 CA04 CA11 DA02 DA05 DA12 EA04

GA05

4B064 AG01 AG27 CA19 CA20 CC24 DA05 DA14

4B065 AA01 AA72 AA90 AA95 AB01 BA02 CA24 CA44 CA46

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 DA76 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	编码视网膜母细胞瘤相关蛋白的细胞基因		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004081216A</a>	公开(公告)日	2004-03-18
申请号	JP2003286331	申请日	2003-08-04
申请(专利权)人(译)	校董德州大学系统董事会，		
[标]发明人	ウェンホワリー ベイシヤン		
发明人	ウェン-ホワリー ベイシヤン		
IPC分类号	A61K38/00 A61K39/395 A61P35/00 C07K14/00 C07K14/435 C07K14/47 C07K14/82 C07K16/00 C07K16/18 C07K16/32 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12R1/865 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 C07K14/4738 C07K14/82 C07K2319/23 C07K2319/43 C07K2319/73 C07K2319/81		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/82 C07K16/32 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12P21/02 G01N33/53.D C12N5/00.B C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/10 C12N7/01		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024 /DA05 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA05 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA01 4B065/AA72 4B065/AA90 4B065/AA95 4B065 /AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	07/979156 1992-11-20 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供编码视网膜母细胞瘤相关蛋白的分离的核酸分子，并提供具有转录因子E2F和RB-亲合力的生物活性的分离的蛋白质。解决方案：提供了编码视网膜母细胞瘤相关蛋白的分离的核酸分子和具有转录因子E2F和RB-亲合力的生物活性的分离的蛋白质。提供了含有编码视网膜母细胞瘤相关蛋白的分离的核酸分子的载体。提供了含有载体的哺乳动物细胞，抗视网膜母细胞瘤相关蛋白的抗体和产生针对该蛋白的单克隆抗体的杂交瘤系。提供了一种用于诊断和预测抗体的方法。之

