

(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 - 514579

(P2003 - 514579A)

(43)公表日 平成15年4月22日(2003.4.22)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/705	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/705		C 1 2 N 1/21	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/21		C 1 2 P 21/02	C 4 B 0 6 4
5/10		G 0 1 N 33/15	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/02		33/50	Z 4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 64数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 540156(P2001 - 540156)

(86) (22)出願日 平成12年11月22日(2000.11.22)

(85)翻訳文提出日 平成14年5月22日(2002.5.22)

(86)国際出願番号 PCT/FR00/03248

(87)国際公開番号 W001/038393

(87)国際公開日 平成13年5月31日(2001.5.31)

(31)優先権主張番号 99/14633

(32)優先日 平成11年11月22日(1999.11.22)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシエル
ルシュ・シャンティフィク
CENTRE NATIONAL DE
LA RECHERCHE SCIE
NTIFIQUE

フランス国、75794 パリ・セデックス 1
6、リュ・ミシエル・アンジュ 3

(72)発明者 モラ, ディノ
フランス国、エフ - 67450 ランベルテム、
リュ・ドゥ・フルグリシエム 38

(74)代理人 弁理士 津国 肇 (外 1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ビタミンD核内受容体から誘導されるポリペプチドおよび特にビタミンD類似体のスクリーニングのためのその使用

(57)【要約】

本発明は、ビタミンD核内受容体から誘導されたポリペプチドに関し、該核内受容体は、リガンド結合ドメイン、すなわちLBDを含み、該LBDは、可撓性挿入ドメインを含む。該ポリペプチドは、LBD可撓性挿入ドメインが少なくとも30アミノ酸の置換又は抑制によって修飾されていることを特徴とする。本発明は、特に合成ビタミンD類似体を素スクリーニングするため、例えばGal4と融合したポリペプチドを含む構築物を用いるビタミンD受容体と干渉する別のタンパク質(アクチベーター、リプレッサー等)を同定するための産生試験(2重又は3重ハイブリッド)のため、又は結晶学又はNMRによる該ポリペプチドと特定分子との間に形成された複合体の3次元構造を解析するための使用にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ビタミンD核内受容体を有するヒトまたは異なる動物種におけるビタミンD核内受容体から誘導されたポリペプチドであって、核内受容体は、リガンド結合ドメインすなわちLBDを含み、このLBDは、可撓性挿入ドメインを含み、

該誘導されたポリペプチドが、下記：

- 該核内受容体のペプチド配列：

* LBDの可撓性挿入ドメインが、少なくとも約30アミノ酸のか、更に好ましくは少なくとも約40アミノ酸のか、またはこの挿入ドメインを含むすべてのアミノ酸の置換または抑制によって修飾され、

* および、適切な場合には、該VDRのペプチド配列の位置1～約125に、特に位置1～117または123に位置する1以上またはすべてのアミノ酸が、置換または抑制によって修飾され、

該誘導されたポリペプチドが、下記：

* ビタミンD受容体のリガンド結合およびLBDトランス活性化特性が、保存され、

* それらは、安定であり、すなわち、特にpH7の100mM NaCl中で少なくとも約1週間で不安定な非修飾LBDとは対照的に、LBDの上述した特性に影響を及ぼさずに保存することができ、

* 懸濁液滴蒸気拡散法によって、特に4で、それらを水性溶媒中で結晶化でき、

* それらが、水性溶媒中で可溶性である、

という特徴を有する、ペプチド配列、

- または、1以上のアミノ酸の特に抑制、付加または置換によって、上で定義されるペプチド配列から誘導されるペプチド配列であって、該誘導された配列が、該誘導されたポリペプチドの上述の特性を有する、ペプチド配列、

を含むことを特徴とする、誘導されたポリペプチド。

【請求項2】 区切られたペプチド断片が、抑制される、ビタミンD核内受容体のペプチド配列を含有することを特徴とする、請求項1記載の誘導されたポ

リペプチドであって、

- 一方では、ヒトまたは動物起源のビタミンD核内受容体のペプチド配列の位置155～175の1つにほぼ位置するアミノ酸により、更に詳細には、これらの配列の位置159～168の1つに位置するアミノ酸により、

- および、他方では、ヒトまたは動物起源のビタミンD核内受容体のペプチド配列の位置204～225の1つにほぼ位置するアミノ酸による、

誘導されたポリペプチド。

【請求項3】 - ヒトまたは動物起源のVDRのペプチド配列の位置118および427、または位置124および427の位置に位置するアミノ酸によって区切られ、VDRの該ペプチド配列の位置165～215に残基が位置している、アミノ酸配列、

- または、特に1以上のアミノ酸の抑制、付加または置換によって上述のアミノ酸配列から誘導されたペプチド配列であって、誘導された配列が、請求項1記載の該誘導されたペプチドの上述の特徴を有するペプチド配列

を含むポリペプチドから選択される、請求項1または2記載の誘導されたポリペプチド。

【請求項4】 配列番号4、配列番号6および配列番号8のポリペプチドから選択される、請求項1～3いずれか一項記載の誘導されたポリペプチド。

【請求項5】 場合により、ビタミンD、または作用性もしくは拮抗性ビタミンD類似体と結合し、請求項1～4いずれか一項記載のポリペプチドを含む結晶。

【請求項6】 請求項1～4いずれか一項記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列。

【請求項7】 下記ヌクレオチド配列：

- 配列番号3、配列番号5および配列番号7の配列、

- または、上述のヌクレオチド配列の遺伝的コードの変性によって誘導され、請求項4記載のhVDRから誘導されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

- または、特に1以上のヌクレオチドの置換、抑制または付加によって上述のヌ

クレオチド配列から誘導され、上で定義したhVDRから誘導されるポリペプチドから誘導されるペプチド配列をコードし、請求項1記載の上述した該誘導されたペプチドの特徴を有するヌクレオチド配列、

から選択される、請求項6記載のヌクレオチド配列。

【請求項8】 本配列の転写に必要な要素、特に転写プロモーターまたはターミネーターと結合した、請求項6または7記載のヌクレオチド配列を含む組換えヌクレオチド配列。

【請求項9】 請求項6～8のいずれか一項記載のヌクレオチド配列を含むベクター、特にプラスミド。

【請求項10】 バキュロウィルスによって感染可能な、特にバクテリア例えば大腸菌、または昆虫細胞から選択される、請求項9記載のベクターによって形質転換された宿主細胞。

【請求項11】 下記工程：

- 請求項9記載の組換えベクターによる細胞の形質転換、
- このようにして形質転換された細胞の培養および該細胞によって産生された該ポリペプチドの、場合により精製後の回収、

を含むことを特徴とする、請求項1～4いずれか一項記載のポリペプチドの調製方法。

【請求項12】 ビタミンD類似体のスクリーニング方法を実施するための、請求項1～4いずれか一項記載のポリペプチドまたは請求項5記載の結晶の使用。

【請求項13】 特に癌性症状、乾癬、自己免疫疾患、骨形成異常症、または骨粗鬆症の処置における医薬組成物に使用可能な作用性または拮抗性ビタミンD類似体のスクリーニング方法を実施するための、請求項12記載の使用。

【請求項14】 下記工程：

- 試験済みの類似体による、有利には固体担体に結合された、請求項1～4いずれか一項記載のポリペプチド、または請求項5記載の結晶の導入であって、有利には該誘導されたポリペプチドまたはビタミンD類似体の1つが、特に蛍光、放射性または酵素マーカーによってマーキングされている導入、

- 特に前工程で使用した担体をすすいだ後に、使用したマーカ-を測定することによる、該ポリペプチドまたは該結晶と試験済みの類似体との間のいずれかの結合の検出、

を含むことを特徴とする、ビタミンD類似体のスクリーニング方法。

【請求項15】 該ポリペプチドまたは該結晶と特定分子との間で形成された複合体の三次元構造を解析する方法を実施するための、請求項1～4いずれか一項記載のポリペプチド、または請求項5記載の結晶の使用。

【請求項16】 請求項1～4いずれか一項記載のポリペプチドまたは請求項5記載の結晶と特定分子との間で形成された複合体の三次元構造を解析する方法であって、下記工程：

- 特定分子を含む、該誘導されたポリペプチドまたは該結晶の導入、
- 該誘導されたポリペプチドまたは該結晶と特定分子との間で形成された複合体の、特に蒸気拡散による結晶化、および該複合体の、特に分子置換による三次元解析、
- または特にNMRによる、可溶相における該複合体の三次元解析、
を含む方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明はビタミンD核内受容体から誘導されるポリペプチド、これらのポリペプチドのヌクレオチド配列コード化、および特に合成ビタミンD類似体のスクリーニングでの、または、例えばGa14によって融合されるポリペプチドを含む構築物を使用した、ビタミンD受容体と相互作用する他のタンパク質（活性体、抑制体など）を識別する試験（例えば2倍または3倍ハイブリッドなど）の実施での、または結晶学またはNMR技術によって該ポリペプチドおよび特定の分子の間で形成される複合体の三次元構造の解析での、これらのポリペプチドの使用に関する。

【0002】

ビタミンD受容体（VDR）は、核内受容体（NR）の、スーパーファミリーに属するリガンド依存性の転写レギュレーターである（Mangelsdorf et al., 1995）。

【0003】

本科のメンバは、高度に保存されたDNA結合ドメイン（DBD）およびより可変的なリガンド結合ドメイン（LBD）を備えた同じモジュラー構造を有する（Mangelsdorf et al., 1995; Wurtz et al., 1996）。

【0004】

VDRは、レチノイン酸X受容体（RXR）を備えたヘテロダイマー形の標的遺伝子のプロモーター領域において、タイプDR3の対応する応答要素に結合し、転写コファクターおよび基底転写機構との相互作用によって、転写の活性化または抑制に至る（DeLuca&Zierold, 1998）。

【0005】

ビタミンD代謝産物は、骨形成異常症、骨粗鬆症、乾癬、癌および自己免疫疾患に対する各種の治療で使用されるか、使用されることができる（Bouillon et al., 1995）。

【0006】

ビタミンD（または1,25-ジヒドロキシビタミンD₃または1,25（

OH)₂ D₃)によって生じる過カルシウム血症は、これらの臨床応用への天然リガンドの使用を制限し、二次効果を低減させることができる類似体の開発に至っている。

【0007】

hVDRのLBD配列は、ヒトレチノイン酸受容体(hRAR)およびヒトレチノイン酸X受容体(hRXR)の配列と比較すると、不完全に保存されている(それぞれ25%および17%がhVDRと同一)。

【0008】

ヘリックスH1およびH3を結合しているVDRのLBDでの挿入ドメインの存在は、VDRの代表的な特性を示す。本結合領域のサイズは、VDRのファミリーにおいて72~81の間の残基で変動するが、他の核内受容体においては、15~25の間の残基で変動する。

【0009】

以下において、各種VDRのペプチド配列に使用するアミノ酸ナンバリングシステムが、ヒトVDRのアミノ酸ナンバリングと一致することを強調する必要がある。本ナンバリングシステムは、以下の図1aで示すアライメントに基づいて、ヒトVDR以外の配列に明確に拡張することができる。

【0010】

本挿入ドメインの配列保存率は、非常に低い(hVDRのアミノ酸157-215の間で9%の同一性)。本領域は、プロテアーゼに接近可能であり、そして位置208のセリンのレベルでのリン酸化部位を含み、それについての機能的役割を明確にすることができていない。

【0011】

本ドメインの存在は、VDRのLBDの結晶化においてこれまでに発生した問題を説明することができた。実際には本ドメインは、かなり低い統計量を用いてごくわずかな短鎖を予測する二次構造解析で示すように、乏しく構造化されており、負に荷電した残基を非常に高いパーセンテージで含む。これらの2つの係数は、本ループへのコンフォーマーの数を増加させることができ、そのためにタンパク質の安定性に影響を及ぼし、結晶化プロセスを妨げる非特異的接触を促す。

【0012】

本発明は、可溶性のビタミンD核内受容体から誘導され、結晶化可能であるポリペプチドを提供することを目的としている。

【0013】

本発明は、提供することを意図するこれらの誘導されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、および該ヌクレオチド配列を用いた適切な細胞の形質転換によって誘導される該ポリペプチドの調製の方法を提供することも目的としている。

【0014】

本発明は、ビタミンD類似体化合物をスクリーニングする新規方法および/またはこれらのポリペプチドおよび特定の分子との間で形成される複合体の三次元構造の分析を提供することも目的としており、該方法は、上述の誘導されたポリペプチドによって実施される。

【0015】

本発明は、上述の方法を実現するためのキットを提供することも目的としている。

【0016】

本発明は、ビタミンD核内受容体を有するヒトまたは異なる動物種におけるビタミンD核内受容体から誘導されたポリペプチドであって、核内受容体は、リガンド結合ドメインすなわちLBDを含み、このLBDは、可撓性挿入ドメインを含み、

該誘導されたポリペプチドが、下記：

- 該核内受容体のペプチド配列：

* LBDの可撓性挿入ドメインが、少なくとも約30アミノ酸のか、更に好ましくは少なくとも約40アミノ酸のか、またはこの挿入ドメインを含むすべてのアミノ酸の置換または抑制によって修飾され、

* および、適切な場合には、該VDRのペプチド配列の位置1～約125に、特に位置1～117または123に位置する1以上またはすべてのアミノ酸が、置換または抑制によって修飾され、

該誘導されたポリペプチドは、下記：

* ビタミンD受容体のリガンド結合およびLBDトランス活性化特性が、保存され、

* それらは、安定であり、すなわち、特にpH7の100mM NaCl中で少なくとも約1週間で不安定な非修飾LBDとは対照的に、LBDの上述した特性に影響を及ぼさずに保存することができ、

* 懸濁液滴蒸気拡散法によって、特に4 で、それらを水性溶媒中で結晶化でき、

* それらが、水性溶媒中で可溶性である、
という特徴を有する、ペプチド配列、

- または、1以上のアミノ酸の特に抑制、付加または置換によって、上で定義されるペプチド配列から誘導されるペプチド配列であって、該誘導された配列が、該誘導されたポリペプチドの上述の特性を有する、ペプチド配列、

を含むことを特徴とする、誘導されたポリペプチドに関する。

【0017】

本発明は更に詳細には、上で定義したヒトまたは動物起源のVDRから誘導されるポリペプチドに関し、該誘導されたポリペプチドは、区切られたペプチド断片が抑制される該核内受容体のペプチド配列を含むという点を特徴とする：

- 一方では、ヒトまたは動物起源のビタミンD核内受容体のペプチド配列の位置155～175の1つにほぼ位置するアミノ酸によって、詳細には図1aに示すVDRのペプチド配列によって、更に詳細には、これらの配列の位置159～168の位置の1つに位置するアミノ酸による。

- および他方では、ヒトまたは動物起源のビタミンD核内受容体のペプチド配列の位置204～225のほぼ1つに位置するアミノ酸によって、詳細には図1aに示すVDRのペプチド配列による。

【0018】

本発明は更に詳細には、上で定義したような誘導されたポリペプチドに関し、該誘導されたポリペプチドは、

- ヒトまたは動物起源のVDRのペプチド配列の、特に図1aに示すVDRの

ペプチド配列の、位置118および427に位置するか、または位置124および427に位置するアミノ酸によって区切られ、VDRの該ペプチド配列の位置165～215に位置する残基が抑制された、アミノ酸配列、

- または、特に1以上のアミノ酸の抑制、付加または置換によって、上述のアミノ酸配列によって誘導されるペプチド配列であって、該誘導ポリペプチドの上述の特性を有する該誘導された配列、

を含むポリペプチドから選択される。

【0019】

本発明は、更に詳細には、

- ヒト起源のVDRから誘導され、位置165および215に位置するアミノ酸によって区切られているペプチド断片が抑制されている、配列番号：4ポリペプチド、

- ヒト起源のVDRから誘導され、位置1および117に位置するアミノ酸によって区切られるペプチド断片、および位置165および215に位置するアミノ酸によって区切られるペプチド断片が抑制されている、配列番号：6のポリペプチド〔hVDR(118-427 165-215)とも称される〕、

- ヒト起源のVDRから誘導され、位置1および123に位置するアミノ酸によって区切られるペプチド断片、および位置165および215に位置するアミノ酸によって区切られるペプチド断片が抑制されている、配列番号：8ポリペプチド〔hVDR(124-427 165-215)とも称される〕、

から選択される、上で定義したような誘導ポリペプチドに関する。

【0020】

本発明は、上で定義したように誘導されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にも関する。

【0021】

本基本に基づく本発明は、更に詳細には、下記：

- 図6、7および8によってそれぞれ表される、配列番号：3、配列番号：5および配列番号：7の配列、

- または、上述のヌクレオチド配列の遺伝的コードの縮退によって誘導され、

上で定義したhVDRから誘導されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

- または、特に1以上のヌクレオチドの置換、抑制または付加によって、上述のヌクレオチド配列から誘導され、上で定義したhVDRから誘導されるポリペプチドから誘導されるペプチド配列をコードし、該誘導されたポリペプチドの上述の特性を有するヌクレオチド配列、

から選択されるヌクレオチド配列に関する。

【0022】

本発明は、後者の配列の転写に必要な要素、特に転写プロモーターおよびターミネーターに結合して、上で定義したヌクレオチド配列を含む組換えヌクレオチド配列にも関する。

【0023】

本発明は、上で定義したヌクレオチド配列を含むベクター、特にプラスミドまたはバキュロウィルスなどのウィルスにも関する。

【0024】

本発明は、上述したベクターによって形質転換される宿主細胞にも関し、該細胞は、特に、バキュロウィルスによる感染が可能な大腸菌などのバクテリアまたは昆虫細胞から選択される。

【0025】

本発明は、上で定義した誘導ポリペプチドの調製方法にも関し、該方法は、下記工程：

- 上で定義した組換えベクターによる細胞の形質転換、
 - そのように形質転換された細胞の培養および該細胞によって産生される該ポリペプチドの、場合により精製後の回収、
- を含む。

【0026】

本発明は、ビタミンDに、またはビタミンD類似体、特に、高親和性、すなわち約 10^{-6} Mを超える親和性を有する該ポリペプチドに結合可能な任意のリガンドに結合した、上で定義したビタミンD核内受容体から誘導されるポリペプチド

にも関する。

【0027】

本発明は、場合によりビタミンDまたはビタミンD類似体に結合し、上で定義したビタミンD核内受容体によって誘導されるポリペプチドまたはそれ自体結晶形で表されるポリペプチドにも関する。

【0028】

有利なことに、本発明の上述の結晶は、特に沈殿剤としての硫酸アンモニウムが存在下で、または他の沈殿剤の存在下で、蒸気拡散によって得られる。

【0029】

なお有利なことに、本発明の結晶は、X線結晶技術に使用できる。

【0030】

上述の結晶は、25 未満のX線結晶学によって測定される分解能を達成することが可能であり、これにより、標的分子と受容体との間の相互作用の情報が原子レベルで提供される。

【0031】

本発明は更に詳細には、 $a = 45.193$ 、 $b = 52.443$ 、 $c = 133.286$ 、 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ による斜方晶系の空間群($P2_12_12_1$)に属することを特徴とする、 $1,25(OH)_2D_3$ との複合されたhVDR($118-427$ 165-215)の結晶に関する。

【0032】

本発明は、合成ビタミンD類似体をスクリーニングする方法を実施するための、場合により上述した結晶の形の、上で定義したポリペプチドの使用にも関する。

【0033】

本発明は、特に癌性症状、骨形成異常症、骨粗鬆症、乾癬および自己免疫疾患の治療の薬学組成物で使用可能な作用性または拮抗性ビタミンD類似体をスクリーニングする方法を実施するための、選択的に上述した結晶の形の、上で定義したポリペプチドの使用にも関する。

【0034】

本発明は、下記工程：

- 試験を行う類似体またはコファクターによって有利に担体に結合した、場合により上述した結晶の形の、上で定義した誘導されるポリペプチドの導入であって、該の誘導されたポリペプチドまたはビタミンD誘導体の1つが、特に蛍光、放射性または酵素マーカーによって有利にマーキングされており、

- 特に前の工程で使用した担体をすすいだ後の、使用するマーカーを測定することによる該誘導されたペプチドと試験された類似体間での任意の結合の検出、を含む、ビタミンD類似体または補助因子をスクリーニングする方法に関する。

【0035】

本発明は、該ポリペプチドと特異性分子の間で形成された複合体の三次元構造の解析方法を実施するために、選択的に上述した結晶の形の、上で定義したポリペプチドの使用にも関する。

【0036】

これに基づいて、本発明は更に詳細には、選択的に上述した結晶の形の、上で定義したように誘導されたポリペプチドと、特定分子との間で形成された複合体の三次元構造の解析方法に関し、該方法は、下記工程：

- 特定分子による、場合により上述した結晶の形の、上で定義したように誘導されたポリペプチドの導入、

- 特に蒸気拡散による、該誘導されたポリペプチドと特定分子との間で形成された複合体の結晶化、および特に分子置換による、該複合体の三次元解析、

- または、特にNMRによる、溶液中での該複合体の三次元解析、を含む。

【0037】

本発明は、上で定義したように、作用性または拮抗性となりうるビタミンD化合物の設計に上述の解析方法を応用することにも関する。

【0038】

本発明は更に詳細には、上述のスクリーニングプロセスの実施によって得られる作用性または拮抗性ビタミンD類似体はもちろんのこと、許容可能な医薬品ピ

ヒクルとともに、これらの類似体を含む医薬組成物にも関する。

【0039】

本発明は、上述のスクリーニング方法または解析方法を実施するためのキット（またはパッケージ）にも関し、該キットは、上述のプロセスまたは方法を実施するための1つ以上の試薬とともに、場合により上述の結晶形の、上述のように誘導されたポリペプチドを含む。

【0040】

本発明は、hVDR誘導ポリペプチド（118 - 427 165 - 215）の以下に示す詳細な説明、そして結晶構造の解析およびそのように得られた誘導ポリペプチドの特性によって更に明らかにされる。

【0041】

図7に示す誘導ペプチド（VDR LBD突然変異体とも呼ばれる（残基118 - 427 165 - 215）とも称される）は、hVDR残基165～215を抑制し（図1a）、ヘリックスH1およびH3を結合するために約30の残基を残すことによって、その可撓性挿入ドメイン内に調製された。

【0042】

VDR LBD突然変異体（残基118 - 427 165 - 215）は、大腸菌において過剰発現され、後述する方法に従って、親和性およびイオン交換クロマトグラフィにより、およびゲル濾過によって精製された。

【0043】

A) VDR LBD突然変異体118 - 427 165 - 215の発現および精製

突然変異VDR受容体（残基118 - 427 165 - 215）は、ヘキサヒスチジンタグを有するペプチドの形で過剰産生された。PCRによって増幅されたcDNAは、ベクターpET 15b（Novagen）のNdeI - BamHI部位にサブクローニングされた。次にプラスミドは、XL-1ブルー大腸菌バクテリア内で増幅され配列を検査し、過剰発現のためにBL21DE3大腸菌バクテリアに導入された。200 µg アンピシリン/mlを含む200mlのLBの予備培養物を、200 µg アンピシリン/mlを含む6 x 1 LのLBに接種した。細

胞は、0.6の吸光度まで37℃にて培養し、次いで、培養物に1mMのIPTGを添加して、20℃にて6時間、タンパク質の発現を誘動させた。細胞を、超遠心分離によって分離し、-80℃にて保管した。

【0044】

1Lの培養物を意味する細胞残留物は、20mM Tris pH8.0、250mM NaCl、5mMイミダゾール、5%グリセリン、0.5µg/mlプロテアーゼ阻害剤混液、1mM β-メルカプトエタノールおよび1mM PMSFを含む25mlの緩衝液に入れられた。細胞の溶解は、超音波処理によって実施され、粗抽出物は、1時間30分、45Kでの超遠心分離によって得られた。精製は、3つの工程で実施された。最初に粗抽出物を、金属親和性カラム (Talon, Clonetechnology) に詰め、洗浄後、20mM Tris pH8.0、250mM NaCl、150mMイミダゾールおよび5%グリセリンを含む緩衝液によってタンパク質を溶出させた。次にタンパク質を、Centiprep 30によって濃縮し、20mM Tris pH7.5、50mM NaClおよび5mM DTTを含む4倍の体積の緩衝液で希釈した。サンプルを、次にアニオン性交換カラムQ15 (Sartorius) に詰め、NaCl勾配 (0.1M) によって溶出させた。ヘキサヒスチジンタグを切断するために、タンパク質を、5mM CaCl₂の存在下で、4℃で12時間、トロンピンによって消化させた (タンパク質1mgにつき1単位)。最後にタンパク質を、10mM Tris pH7.0、100mM NaCl、10mM DTTによって平衡させたSuperdex 75 16/60 濾過ゲル (Pharmacia) に加え、同じ緩衝液で溶出させた。次にリガンドを過剰に添加し、4℃にて12時間、タンパク質とともにインキュベートした。次いで複合体を、結晶化のためにCentricon 30によって濃縮した。

【0045】

精製されたタンパク質の量は、2mg/lの培養物であった。タンパク質の品質および均一性を、変性および未変性条件での電気泳動によって分析した。タンパク質は、95%を越えて純粋であり、単一バンドが未変性ゲルで観察された。タンパク質は、ゲル濾過の溶出および光拡散測定によって単一であった。タンパク質濃度を、ブラッドフォード方法におよび分光測定法によって測定した。サンプルは、光拡散測定によって単分散であった。

【0046】

B) VDR 118-427 165-215の解析および特性。

1, 25(OH)₂ D₃に結合する突然変異タンパク質の量を、組換タンパク質の粗抽出物を使用して、スキャッチャード法によって測定した。(図2a: スキャッチャード解析を、デキストラン/炭素に対して実施した; 野生型または突然変異体hVDR/pET 15bを発現するBL21大腸菌(DE3)の粗抽出物を、1000倍に希釈し、20mM Tris、250mM NaCl、5mMジチオスレイトール(DTT)、10%グリセリン中で(³H-26, 27, Amersham) 1, 25(OH)₂ D₃の量を増加させながら、4 にて16時間インキュベートした; インキュベーションの後、25 μlのデキストラン/炭素(1.5%)を、25 μlのタンパク質混合物に添加した; 5分後に、管を13,000 rpmにて5分間遠心分離した; 結合リガンド(B)の濃度を、上清に対する液体シンチレーション計数法によって測定した; リガンド総濃度を、デキストラン/炭素の添加前に、15 μlタンパク質混合物に対する液体シンチレーション計数法によって測定した; Uは、未結合リガンドを示す; 各点は、3つの値の平均を示す; 結果を、Claire et al., 1978が述べた方法による、最小2乗非線形法によって解析した; 実線による曲線および点線の曲線はそれぞれ、誘導突然変異ポリペプチドと野生型タンパク質で得られた実験結果に相当し、誘導突然変異ポリペプチドのパラメータとして $N = 0.073 \pm 0.006 \text{ nM}$, $K_d = 0.37 \pm 0.05 \text{ nM}$, $\chi^2 = 0.058 \pm 0.002$ を、野生型タンパク質のパラメータとして $N = 0.10 \pm 0.01 \text{ nM}$, $K_d = 0.55 \pm 0.08 \text{ nM}$, $\chi^2 = 0.051 \pm 0.003$ 、更に $N =$ 部位数、 $K_d =$ 解離定数および $\chi^2 =$ 非特異性結合を用いた。実験は、2回繰り返した。

【0047】

有意な変化は、野生型および突然変異体のVDR解離定数の間では見られず、値は受容体全体について以前に述べられた値と類似していた(Bouillon et al., 1995)。2つのタンパク質のトランス活性化特性を比較するために、野生型および突然変異体LBDを、GAL4酵母活性体DNA結合ドメインで融合した。キメラタンパク質を、Cos細胞への形質移入によって発現させ、そして、トラ

ンス活性化をGAL4に対応する適切なリポータによって測定した。2つのタンパク質は、本系において匹敵するトランス活性化特性を有する(図2b:野生型または突然変異体VDRのLBDは、ベクターPXJ440のXhoI-BamHI部位への、cDNAのクローン化によって、GAL4(1-147)酵母活性体DNA結合ドメインにて融合された(Xiao et al., 1991);Cos細胞は、2µgの17m5-TATA-CATリポータ遺伝子およびβ-ガラクトシダーゼを発現する2µg内部制御組換え体pCH1-10lacZ(Pharmacia)およびhVDRの野生型または突然変異体LBDを含むベクター(250ng)を用いて、Xiao et al., 1991、が述べた方法によって形質移入して、DNA支持体と合わせて合計20µgになった。細胞を、EtOHまたは1,25(OH)₂D₃ 10⁻⁷Mによって処理した。β-ガラクトシダーゼの同じ単位で標準化したCAT活性は、1,25(OH)₂D₃の存在下で、野生型VDRによって誘起されるCAT活性(100%)について発現された。

【0048】

結果的に、挿入ドメインの欠損は、リガンド結合、RXRのLBDによるトランス活性化または二量体化に対して大きな影響を及ぼさなかった。

【0049】

VDR LBDにおける可撓性挿入ドメインの抑制によって、より可溶性のタンパク質が生成し、それは1,25(OH)₂D₃との複合体の形で結晶化できる。沈殿剤として硫酸アンモニウムを使用する蒸気拡散技術によって、結晶を得ることが可能である。結晶構造は、部分的なRAR模型を用いた、分子置換の組合せ(Renaud et al. 1995; Klaholz et al., 1998)および水銀誘導体による同一構造置換によって解明された。得られた結果を、以下の表1に要約した。

【0050】

【表1】

表 1

	天然化合物	チオメルサル誘導体
データ群	ハンブルグBW7B	研究所
X線源	0.8345 Å	1.5418 Å
波長	20.0-1.8 Å	20.0-2.9 Å
分解能	29434	6404
単反射完全性	97.4%	84.9%
多重度	4.1	2.8
Rsym ^a	6.1%	9.8%
最終分解セクション		
部位数	24%, 5.06%, 93.3%	20.6%, 3.2, 71.4%
位相合せ力(c/a)		4
R中心因子		1.33 / 1.72
		53%
精製		
遊離R因子(10%反射) ^b	21.4%	
R因子	19.1%	
非水素原子の数		
タンパク質	1994	
リガンド	30	
水分子	166	
結合距離のRmsD(Å)	0.004	
結合角のRmsD(Å)	1.083	
非水素原子のB因子の平均(Å ²)		
タンパク質	31.0	
リガンド	22.3	
水	45.6	

【0051】

表1：結晶化実験は、懸濁した液滴蒸気拡散法を用いて4にて実施した；タンパク質を、4~10mg/mlに濃縮した；1,25(OH)₂D₃と複合したhVDR結晶(118-427 165-215)を、0.7M硫酸アンモニウム、硫酸アンモニウム1.4M Mes 0.1M pH=6.0を含むリザーバーに対して平衡にされた緩衝液Mes 50mM pH6.0, Tris 5mM, DTT 5mMを含む溶液から、4日後に得られた；結晶は、a=45.193、b=52.433、c=133.286、 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ 、斜方晶系空間群(P2₁2₁2₁)に属した；非対称単位は、モノマーを1個含んだ；結晶の溶媒含有率は、48%であった；ウィルソン方法を使用して推定されたB-因子は、29であった。重原子誘導体を、チメロサル(エチル水銀チオサリチル酸ナトリウム

)に結晶を4日間浸漬することによって得た;天然結晶のX線拡散の結果を、ハ
ンブルグシンクロトンビームラインBW7Bで、4にて測定した;結果を、
DENZOおよびSCALEPACKソフトウェアを使用して処理した(Otwinski et al., 1997);初期位相は、初期モデルとしてRARを使用して、A
MOREによる分子置換によって得た(Navaza et al., 1994);本モデルは、
保存されたヘリックスH1、H3-H5、H7-H10を含んだ(図1a);A
MORE剛体置換の後、溶液は、31%の相関および53.6%のR因子を有し
た;回折データが4にて研究所のMar Research二次元画像検出器に登録されて
いる水銀誘導体を使用して得られた位相によって完了された;誘導された部位が
発見され、SOLVEソフトウェアを使用して純化された(Tervilliger et al.
, 1987)。

【0052】

合わせた相によって得られたマップを、溶媒補正を使用した3の分解能で計
算した。純化を、CNSソフトウェアを用いて実施した(Brunnger et al., 199
8)。Oソフトウェア(Jones et al., 1991)および最小2乗最小化を用いたモ
デル構築サイクルの後には、最終モデルに至る個別のB因子異方性純化が続いた
。20および1.8の間の結果はすべて、カットオフ域値なしの純化に含まれ
た。第1水和層における溶媒分子を、CNSソフトウェアを用いて、3でF_c
-F_oマップに配置された。最大のB-因子の値(40-50)は、H1前のル
ープ内の残基、接合およびループH9-H10およびH11-H12内の残基に
一致する。最終モデルの品質を、PROCHECKソフトウェアを使用して解析
した(Laskowski et al., 1993)。Ramachadranの角度分布は、92.4%の最
も好都合のコンホメーションと7.6%の認可されたコンホメーションを示す。

【0053】

最終モデルは、250個の残基、166個の水分子および1個のリガンド分子
を含む。最初の2個のN末端残基および最後の4個のC末端の残基には、明確な
密度は観察されなかった。3個の追加の残基、H9-H10ループ内の375~
377は、本領域の電子密度マップが中位の品質であるため、純化に含まれな
かった。

【0054】

VDR LBD (図1b)の全体的なトポロジーは、核内受容体の他のLBDと同様であり、13個のヘリックスが3つの層と3個の鎖を持つシートに挟まれている。命名は、hRXRの構造に基づく(Bourguet et al., 1995)。ヘリックスH1およびH3を結合しているドメインは、2個の小さなヘリックスH2およびH3nを含む。新規のヘリックスH3nは、構造の基部を形成し、RARの構造内のループにとって代わる。接合点に位置する3個のグリシン残基(162-164)の固有の可撓性は、穏やかな適合を示す。

【0055】

3個の残基のこの断片は、リガンドからむしろ遠く、結果的にリガンド結合での役割を果たすとは思えない。VDR構造は、作用物質と複合したRARの構造により近い。タンパク質は、179個の残基(Cに対する2.5のカットオフ域値)上に、1.2のrmsdが重ね合わされ、除外された領域は、H3にH1を結合しているペプチド、2鎖、H6ヘリックスおよび一部の結合ループである。

【0056】

最も顕著な相違は、ヘリックスH1とH3との間の結合のレベルで発見され、RARにおいてはシートを包囲し、VDRにおいては、ERのそれと同一である、H3とシート末端との間の経路に続く(Brzozowski et al., 1997)。結果的に、シートの末端は、外側に代わり、ビタミンD結合空洞(図3aおよび3b)を拡大する。すべての鎖は、リガンドと接触する残基を有する。1鎖において、VDR受容体に特異的なTrp 286は、リガンドの位置決めで重要な役割を奏する。それ自体は水素結合によって、Gln 317およびMet 272のカルボニルに結合されるSer 275を含む、水素結合ネットワークの一部を形成する。このようにシートの末端は、ヘリックスH2およびH3nとの間の結合ループの、Glu 292およびLys 294、ならびにArg 158の間のカルボニル基の間の水素結合によって安定する。

【0057】

位置決めが同時活性化およびトランス活性化結合にとって重要であるヘリックス

スH12は、作用物質位置にある(図3c)。ヘリックスは、疎水性接点(H5のIle 268およびH12のPhe 422)および極性相互作用によってこの方向で安定化される。これらの最後の相互作用は、保存されたLys 264-Glu 420のブリッジならびにH3のSer 235とThr 415との間の水素結合を含む。更に、H11-H12ループのMet 412およびLeu 414のカルボニル基はH結合によって、それ自体でAsp 232(H3)とのH結合を形成するArg 154(H12の末端)に結合される。これらの残基はすべて、VDR受容体に保存される。塩類ブリッジを確立する残基Lys 264およびGlu 420の誘導された突然変異誘発は、これらの突然変異がリガンドに依存したトランス活性化を抑制するが、リガンド結合、RXRまたはDNA結合によるヘテロ二量体化に対する影響を及ぼさないことが示されている(Nakajima et al., 1998)。

【0058】

強い結晶性接点は、ヘリックスH3nならびに対称結合分子のヘリックスH3、H4およびH12との間で見られる(図3d)。H3nは、PPARの三元複合体で見られたペプチドSRC1の接点を模倣しているが(Nolte et al., 1998)、大半の活性化補助因子で見られるモチーフLXXLLを含まない。このヘリックスは、H3n(Ser 216, Val 217およびThr 218)のN末端領域とGlu 420(H12)との間のH結合にわたる極性接点によって固定される。ヘリックスH3nのC末端の領域で、Ser 222はLys 246(ヘリックスH3の末端)に、水素結合によって結合される。この溶解素の機能的な重要性は、トランス活性化に強い影響を及ぼすグリシン内への突然変異によって証明された(Whitfield et al., 1995)。残基Lys 246およびGlu 420との間に、ヘリックスH3、H4およびH12によって、疎水性空洞が形成される。ヘリックスH3n(Val 217、Thr 218、Leu 219、Leu 221およびSer 222)の残基は、ファンデルワールス結合によって、Ile 242(H3)、Ile 260(H4)、Leu 417およびVal 421(H12)に接触している。この観察結果は、核内受容体の認識プロセスにおいて、LXXLL以外の配列を考慮する必要があるこ

とを示している。

【0059】

天然リガンドへのVDRの結合の構造により、活性ビタミンDのコンホメーションに関する多くの曖昧点や疑問の解明が可能となってきた。ビタミンDの自由分子の結晶学的構造との比較 (Suwinska et al., 1996) によって、2個のリガンドが核A、CおよびDについて同一のコンホメーションを有することが示されている (図4a)。最も評価できる相違は、複合体における共役トリエンの非平面形状であり、その形状は受容体に固定するために必要なリガンドの、湾曲した形によるものである。リガンド結合ポケットには、支配的な疎水性残基が接している (図4bおよび4c)。伸張されたリガンドは、ヘリックスH5のC末端に向けられた核A (図3bおよび3c) とヘリックスH7およびH11の近くにヒドロキシル25基を備えたヘリックスH3を含む。メチル27基は、ヘリックスH12 (Val 418) との、弱い相互作用を生じる。核Aのヒドロキシル基、1-OHおよび3-OHのヒドロキシル-25部分を隔てている距離はそれぞれ、13 および15.4 である。

【0060】

複合体において、核Aは、それぞれ赤道方向および軸方向の基1-OHおよび3-OHによってひとまとめにされたコンホメーションBをとる。位置1のヒドロキシル部は、Ser 237 (H3) およびArg 274によって2個のH結合を形成するが、基3-OHはSer 278 (H5) および哺乳類のみで保存されるTyr 143によって2個のH結合を形成する。Arg 274は、H1末端に水分子およびThr 142のカルボニルを有する、H結合の堅固なネットワークに含まれている (図4c)。

【0061】

核AおよびCを結合している共役トリエン (図4a) は、片側はSer 275 (H5 - ループ) およびTrp 286 (1)、反対側はLeu 233 (H3) で挟まれた疎水性管内に位置している。単結合C6-C7は、平面形状から30%編位しているトランスコンホメーションを有する。この編位は、結合C6-C7のトランスまたはシス立体コンホメーションを有する類似体に生物活

性が欠けていることを説明する (Norman et al., 1997)。疎水性残基は、排他的な方法でこの鎖を囲む。ヒドロキシル25基は、H結合によって、His 305 (H6 - H7ループ) およびHis 397 (H11) に結合する (図4)。ヒスチジン残基周囲のH結合ネットワークは、His 305 およびHis 397 がそれぞれH結合受容体および供与体であることを示している。Ser 306を除く、H結合ネットワークに含まれるすべての残基は、VDR内で保存される。ビタミンD耐性くる病素因に見られる天然突然変異体、Arg 273 Leu およびHis 305 Gln (Kristjansson et al., 1993) は、それぞれ1-OH および25-OHの固着に關与する、Arg 274 およびHis 305 のリガンドへの結合に關する役割が不可欠であることを確認する。

【0062】

リガンド1, 25(OH)₂ D₃がエストラジオール、プロゲステロンおよびすべてのトランスレチノイン酸より大きいという事実により、VDRリガンド結合ポケットは、ER (369³)、PR (427³) およびRAR (421³) のものよりも大きい (697³) (図4d)。しかし、それぞれ、63%、67% および66%であるエストラジオール、プロゲステロンおよびすべてのトランスレチノイン酸と比較すると、1, 25(OH)₂ D₃はVDRリガンド結合のわずか56%しか占めていないため、サイズの増大は比例していない。

【0063】

VDR空洞の接近できる体積は、核Aの位置2の近くでポケットの膨張を示しており、2個の水分子に占有され、40³を示す。この付加的空間は、実際に天然リガンドより4倍大きな結合親和性を有する合成リガンド2-メチル1, 25(OH)₂ D₃の、巨大なメチル基を受容することができる (Fujishima et al., 1998)。更に、脂肪族鎖の周囲に更に隙間があるため、異なる鎖長に適應することが可能である。

【0064】

いくつかのビタミンD類似体は、共活性体のトランス活性化および動員に関して、天然リガンドとは異なる挙動を示している (Takeyama et al., 1999; Rachez et al., 1998)。この特異性を理解するために、予備的なリガンドモデル化研

究を実施した。位置17に、MC 903などの(22エン-26, 27-シクロプロピル-1, 24S(OH)₂ D₃またはEB 1089(22, 24ジエン-24, 26, 27, トリホモ1, 25(OH)₂ D₃)(それぞれ1個または2個の二重結合)かなり堅固な脂肪族鎖を有する合成リガンドは、1, 25(OH)₂ D₃の形状をごくわずかに調整することによって、結合ポケットに適應することができる。核CおよびDは、EB 1089の位置26および27のメチル基またはMC 903のシクロプロピル核を収容するために、置換のみが必要である。類似体20-エピ-1, 25(OH)₂ D₃およびRH 1060の場合、C20周囲の左の逆コンホメーションを有する、低エネルギーコンホマーのみが適用できる。このような形状によって、C21のメチル基は、天然リガンドと同じ空洞内に向いているが、残りの鎖は、C20-C22の逆コンホメーションおよびC20のエピマー化の組合せによって、結合空洞の反対側に接している。このようなパス変化は、2個のエピマーの異なる接点を生じさせる。1-ヒドロキシル部から25-ヒドロキシル部への距離は、20-エピ類似体においてよりも短いため、その長鎖はKH 1060の場合と同様に適用できる。より長い脂肪族鎖を備えたりガンドは、より小型のコンホメーションをとり、結合空洞ともに更なるファンデルワールス接点を形成し、この接点が次に、位置H12のヘリックスを安定させ、および/またはH6-H7ループのように、結合ポケットのあまり堅固でない領域に影響を及ぼすことができる。

【0065】

かなり堅固な結合空洞とのこれらの各種接点は、半減期および転写活性の相違を説明することができる。

【0066】

ビタミンDの構造は、ここ10年間、多数の研究の主題であった。本発明は、活性コンホメーションにおける1, 25(OH)₂ D₃像を初めて提供する。1, 25(OH)₂ D₃の天然側鎖は今まで、新しい特異的な作用性リガンドを発見する目的とした化学修飾の主要な標的であった。

【0067】

リガンド結合能を失わずに、核A、Dで構成された骨格を修飾することは、不

可能であった。Cおよび/またはD核全体を欠いているが、ヒドロキシル基の正常間隔を有する類似体は、結合ポケット内部で正常接点を形成でき、それらの正常な生物学的能力を説明している (Verstuyf et al., 1998)。

【0068】

本発明による複合体は、 $1, 25(OH)_2 D_3$ の周囲の結合ポケットの三次元配列を開示し、原骨格の設計に関する新しい展望を提供する。

【0069】

【表2】

参考文献

Bouillon, R., Okamura, W.H. & Norman, A.W. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr. Rev.* **16**, 200-257 (1995)

Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Moras, D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature* **375**, 377-382 (1995)

Brünger, A.T. *et al.*, Crystallography & NMR System; a new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D* **54**, 905-921 (1998)

Brzozowski, A.M. *et al.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**, 753-758 (1997)

Claire, M. *et al.* Statistical test of models and computerised parameter estimation for aldosterone binding in rat kidney. *FEBS Lett.* **88**, 295-299 (1978)

DeLuca H.F. & Zierold C. Mechanisms and functions of vitamin D. *Nutr. Rev.* **56**, 54-75 (1998)

Fujishima, T. *et al.* Synthesis and biological activity of 2-methyl-20-epi analogues of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 2145-2148 (1998)

Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst. A* **47**, 110-119 (1991)

Klaholz, B.P. *et al.* Conformational adaptation of agonists to the human receptor RAR γ . *Nature Struct. Biol.* **5**, 199-202 (1998)

Kristjansson, K., Rut, A.R., Hewison, M., O'Riordan, J.L.H. & Hughes, M.R. Two mutations in the hormone binding domain of vitamin D receptor cause tissue resistance to 1 α , 25 - dihydroxyvitamin D₃. *J. Clin. Invest.* **92**, 12-16 (1993)

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structure coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283-291 (1993)

Mangelsdorf, D.J. *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839 (1995)

Nakajima, S., Yamagata, M., Sakai, N. & Ozono, K. Characterization of the activation function-2 domain of the human 1α , 25 – dihydroxyvitamin D₃ receptor. *Mol. Cell. Endocr.* **139**, 15-24 (1998)

Navaza, J. Amore: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst. A* **50**, 157-163 (1994)

Norman *et al.* Comparison of 6-s-cis- and 6-s-trans-locked analogs of 1α , 25 – dihydroxyvitamin D₃ indicates that the 6-s-cis conformation is preferred for rapid nongenomic biological responses and that neither 6-s-cis- nor 6-s-trans-locked analogs are preferred for genomic biological responses. *Mol. Endocr.* **11**, 1518-1531 (1997)

Nolte, R.T. *et al.* Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Nature* **395**, 137-143 (1998)

Otwinowski, Z & Minor, W. Processing X-ray data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology* 307-326 (1997)

Rachez, C. *et al.* A novel protein complex that interacts with vitamin D₃ receptor in a ligand-dependant manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes & Dev.* **12**, 1787-1800 (1998)

Renaud, J.P. *et al.* Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor RAR γ complexed with all-trans retinoic acid. *Nature* **378**, 681-689 (1995)

Suwińska, K. & Kutner, A. Crystal and molecular-structure of 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Acta Cryst. B* **52**, 550-554 (1996)

Takeyama, K.I. et al. Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1049-1055 (1999)

Verstuyf, A. et al. The biological activity of nonsteroidal vitamin D hormone analogs lacking both the C-rings and D-rings. *J. Bone Miner. Res.* **13**, 549-558 (1998)

Whitfield, G.K., et al. A highly conserved region in the hormone-binding domain of the human vitamin D receptor contains residues vital for heterodimerization with retinoid X receptor and for transcriptional activation. *Mol. Endocr.* **9**, 1166-1179 (1995)

Wurtz, J.M. et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Struct. Biol.* **3**, 87-94 (1996)

Xiao, J.H., Davidson, I., Matthes, H., Garnier, J.M. & Chambon, P. Cloning expression and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* **65**, 551-568 (1991)

【配列表】

LISTE DE SEQUENCES

<110> CNRS

<120> POLYPEPTIDES DERIVES DU RECEPTEUR NUCLEAIRE DE LA
VITAMINE D, ET LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT DANS LE
CADRE DU CRIBLAGE D'ANALOGUES DE LA VITAMINE D

<130> WOB 99 CNR VID3

<140>
<141>

<150> FR9914633
<151> 1999-11-22

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 1284
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1281)

<400> 1
atg gag gca atg gcg gcc agc act tcc ctg cct gac cct gga gac ttt 48
Met Glu Ala Met Ala Ala Ser Thr Ser Leu Pro Asp Pro Gly Asp Phe
1 5 10 15
gac cgg aac gtg ccc cgg atc tgt ggg gtg tgt gga gac cga gcc act 96
Asp Arg Asn Val Pro Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr
20 25 30
ggc ttt cac ttc aat gct atg acc tgt gaa ggc tgc aaa ggc ttc ttc 144
Gly Phe His Phe Asn Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe
35 40 45
agg cga agc atg aag cgg aag gca cta ttc acc tgc ccc ttc aac ggg 192
Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly
50 55 60
gac tgc cgc atc acc aag gac aac cga cgc cac tgc cag gcc tgc cgg 240
Asp Cys Arg Ile Thr Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg
65 70 75 80
ctc aaa cgc tgt gtg gac atc ggc atg atg aag gag ttc att ctg aca 288
Leu Lys Arg Cys Val Asp Ile Gly Met Met Lys Glu Phe Ile Leu Thr
85 90 95
gat gag gaa gtg cag agg aag cgg gag atg atc ctg aag cgg aag gag 336
Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile Leu Lys Arg Lys Glu
100 105 110
gag gag gcc ttg aag gac agt ctg cgg ccc aag ctg tct gag gag cag 384
Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln
115 120 125

cag cgc atc att gcc ata ctg ctg gac gcc cac cat aag acc tac gac	432
Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp	
130 135 140	
ccc acc tac tcc gac ttc tgc cag ttc cgg cct cca gtt cgt gtg aat	480
Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn	
145 150 155 160	
gat ggt gga ggg agc cat cct tcc agg ccc aac tcc aga cac acc ccc	528
Asp Gly Gly Gly Ser His Pro Ser Arg Pro Asn Ser Arg His Thr Pro	
165 170 175	
agc ttc tct ggg gac tcc tcc tcc tcc tgc tca gat cac tgt atc acc	576
Ser Phe Ser Gly Asp Ser Ser Ser Ser Cys Ser Asp His Cys Ile Thr	
180 185 190	
tct tca gac atg atg gac tgc tcc agc ttc tcc aat ctg gat ctg agt	624
Ser Ser Asp Met Met Asp Ser Ser Ser Phe Ser Asn Leu Asp Leu Ser	
195 200 205	
gaa gaa gat tca gat gac cct tct gtg acc cta gag ctg tcc cag ctc	672
Glu Glu Asp Ser Asp Asp Pro Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu	
210 215 220	
tcc atg ctg ccc cac ctg gct gac ctg gtc agt tac agc atc caa aag	720
Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys	
225 230 235 240	
gtc att ggc ttt gct aag atg ata cca gga ttc aga gac ctc acc tct	768
Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser	
245 250 255	
gag gac cag atc gta ctg ctg aag tca agt gcc att gag gtc atc atg	816
Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met	
260 265 270	
ttg cgc tcc aat gag tcc ttc acc atg gac gac atg tcc tgg acc tgt	864
Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys	
275 280 285	
ggc aac caa gac tac aag tac cgc gtc agt gac gtg acc aaa gcc gga	912
Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly	
290 295 300	
cac agc ctg gag ctg att gag ccc ctc atc aag ttc cag gtg gga ctg	960
His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu	
305 310 315 320	
aag aag ctg aac ttg cat gag gag gag cat gtc ctg ctc atg gcc atc	1008
Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile	
325 330 335	
tgc atc gtc tcc cca gat cgt cct ggg gtg cag gac gcc gcg ctg atc	1056
Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile	
340 345 350	
gag gcc atc cag gac cgc ctg tcc aac aca ctg cag acg tac atc cgc	1104
Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg	
355 360 365	

tgc cgc cac ccg ccc ccg ggc agc cac ctg ctc tat gcc aag atg atc 1152
 Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile
 370 375 380

cag aag cta gcc gac ctg cgc agc ctc aat gag gag cac tcc aag cag 1200
 Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln
 385 390 395 400

tac cgc tgc ctc tcc ttc cag cct gag tgc agc atg aag cta acg ccc 1248
 Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro
 405 410 415

ctt gtg ctc gaa gtg ttt ggc aat gag atc tcc tga 1284
 Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser
 420 425

<210> 2

<211> 427

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Ala Met Ala Ala Ser Thr Ser Leu Pro Asp Pro Gly Asp Phe
 1 5 10 15

Asp Arg Asn Val Pro Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr
 20 25 30

Gly Phe His Phe Asn Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe
 35 40 45

Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly
 50 55 60

Asp Cys Arg Ile Thr Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg
 65 70 75 80

Leu Lys Arg Cys Val Asp Ile Gly Met Met Lys Glu Phe Ile Leu Thr
 85 90 95

Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile Leu Lys Arg Lys Glu
 100 105 110

Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln
 115 120 125

Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp
 130 135 140

Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn
 145 150 155 160

Asp Gly Gly Gly Ser His Pro Ser Arg Pro Asn Ser Arg His Thr Pro
 165 170 175

Ser Phe Ser Gly Asp Ser Ser Ser Ser Cys Ser Asp His Cys Ile Thr
 180 185 190

Ser Ser Asp Met Met Asp Ser Ser Ser Phe Ser Asn Leu Asp Leu Ser
 195 200 205

Glu Glu Asp Ser Asp Asp Pro Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu
 210 215 220
 Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys
 225 230 235 240
 Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser
 245 250 255
 Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met
 260 265 270
 Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys
 275 280 285
 Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly
 290 295 300
 His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu
 305 310 315 320
 Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile
 325 330 335
 Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile
 340 345 350
 Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg
 355 360 365
 Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile
 370 375 380
 Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln
 385 390 395 400
 Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro
 405 410 415
 Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser
 420 425

<210> 3
 <211> 1131
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: séquence
 nucléotidique codant un polypeptide dérivé du
 récepteur nucléaire de la vitamine D humain

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1128)

<400> 3
atg gag gca atg gcg gcc agc act tcc ctg cct gac cct gga gac ttt 48
Met Glu Ala Met Ala Ala Ser Thr Ser Leu Pro Asp Pro Gly Asp Phe
1 5 10 15
gac cgg aac gtg ccc cgg atc tgt ggg gtg tgt gga gac cga gcc act 96
Asp Arg Asn Val Pro Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr
20 25 30
ggc ttt cac ttc aat gct atg acc tgt gaa ggc tgc aaa ggc ttc ttc 144
Gly Phe His Phe Asn Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe
35 40 45
agg cga agc atg aag cgg aag gca cta ttc acc tgc ccc ttc aac ggg 192
Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly
50 55 60
gac tgc cgc atc acc aag gac aac cga cgc cac tgc cag gcc tgc cgg 240
Asp Cys Arg Ile Thr Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg
65 70 75 80
ctc aaa cgc tgt gtg gac atc ggc atg atg aag gag ttc att ctg aca 288
Leu Lys Arg Cys Val Asp Ile Gly Met Met Lys Glu Phe Ile Leu Thr
85 90 95
gat gag gaa gtg cag agg aag cgg gag atg atc ctg aag cgg aag gag 336
Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile Leu Lys Arg Lys Glu
100 105 110
gag gag gcc ttg aag gac agt ctg cgg ccc aag ctg tct gag gag cag 384
Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln
115 120 125
cag cgc atc att gcc ata ctg ctg gac gcc cac cat aag acc tac gac 432
Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp
130 135 140
ccc acc tac tcc gac ttc tgc cag ttc cgg cct cca gtt cgt gtg aat 480
Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn
145 150 155 160
gat ggt gga ggg agc gtg acc cta gag ctg tcc cag ctc tcc atg ctg 528
Asp Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu
165 170 175
ccc cac ctg gct gac ctg gtc agt tac agc atc caa aag gtc att ggc 576
Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly
180 185 190
ttt gct aag atg ata cca gga ttc aga gac ctc acc tct gag gac cag 624
Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser Glu Asp Gln
195 200 205
atc gta ctg ctg aag tca agt gcc att gag gtc atc atg ttg cgc tcc 672
Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg Ser
210 215 220
aat gag tcc ttc acc atg gac gac atg tcc tgg acc tgt ggc aac caa 720
Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys Gly Asn Gln
225 230 235 240

Leu Lys Arg Cys Val Asp Ile Gly Met Met Lys Glu Phe Ile Leu Thr
 85 90 95
 Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile Leu Lys Arg Lys Glu
 100 105 110
 Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln
 115 120 125
 Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp
 130 135 140
 Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn
 145 150 155 160
 Asp Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu
 165 170 175
 Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly
 180 185 190
 Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser Glu Asp Gln
 195 200 205
 Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg Ser
 210 215 220
 Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys Gly Asn Gln
 225 230 235 240
 Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly His Ser Leu
 245 250 255
 Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu Lys Lys Leu
 260 265 270
 Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile Cys Ile Val
 275 280 285
 Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile Glu Ala Ile
 290 295 300
 Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg Cys Arg His
 305 310 315 320
 Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile Gln Lys Leu
 325 330 335
 Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr Arg Cys
 340 345 350
 Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro Leu Val Leu
 355 360 365
 Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser
 370 375

<210> 5

<211> 780

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
nucléotidique codant un polypeptide dérivé du
récepteur nucléaire de la vitamine D humain

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

<400> 5

gac agt ctg cgg ccc aag ctg tct gag gag cag cag cgc atc att gcc	48
Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala	
1 5 10 15	
ata ctg ctg gac gcc cac cat aag acc tac gac ccc acc tac tcc gac	96
Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp	
20 25 30	
ttc tgc cag ttc cgg cct cca gtt cgt gtg aat gat ggt gga ggg tct	144
Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn Asp Gly Gly Ser	
35 40 45	
gtg acc cta gag ctg tcc cag ctc tcc atg ctg ccc cac ctg gct gac	192
Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp	
50 55 60	
ctg gtc agt tac agc atc caa aag gtc att ggc ttt got aag atg ata	240
Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile	
65 70 75 80	
cca gga ttc aga gac ctc acc tct gag gac cag atc gta ctg ctg aag	288
Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys	
85 90 95	
tca agt gcc att gag gtc atc atg ttg cgc tcc aat gag tcc ttc acc	336
Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr	
100 105 110	
atg gac gac atg tcc tgg acc tgt ggc aac caa gac tac aag tac cgc	384
Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg	
115 120 125	
gtc agt gac gtg acc aaa gcc gga cac agc ctg gag ctg att gag ccc	432
Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro	
130 135 140	
ctc atc aag ttc cag gtg gga ctg aag aag ctg aac ttg cat gag gag	480
Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu	
145 150 155 160	
gag cat gtc ctg ctc atg gcc atc tgc atc gtc tcc cca gat cgt cct	528
Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro	
165 170 175	
ggg gtg cag gac gcc gcg ctg atc gag gcc atc cag gac cgc ctg tcc	576
Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser	
180 185 190	

aac aca ctg cag acg tac atc cgc tgc cgc cac ccg ccc ccg ggc agc 624
 Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser
 195 200 205

cac ctg ctc tat gcc aag atg atc cag aag cta gcc gac ctg cgc agc 672
 His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser
 210 215 220

ctc aat gag gag cac tcc aag cag tac cgc tgc ctc tcc ttc cag cct 720
 Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro
 225 230 235 240

gag tgc agc atg aag cta acg ccc ctt gtg ctc gaa gtg ttt ggc aat 768
 Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn
 245 250 255

gag atc tcc tga 780
 Glu Ile Ser

<210> 6

<211> 259

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
 nucléotidique codant un polypeptide dérivé du
 récepteur nucléaire de la vitamine D humain

<400> 6

Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala
 1 5 10 15

Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp
 20 25 30

Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn Asp Gly Gly Gly Ser
 35 40 45

Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp
 50 55 60

Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile
 65 70 75 80

Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys
 85 90 95

Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr
 100 105 110

Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg
 115 120 125

Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro
 130 135 140

Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu
 145 150 155 160

Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro
 165 170 175

Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser
 180 185 190

Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser
 195 200 205

His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser
 210 215 220

Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro
 225 230 235 240

Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn
 245 250 255

Glu Ile Ser

<210> 7

<211> 762

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
 nucléotidique codant un polypeptide ndérivé du
 récepteur de la vitamine D humain

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(759)

<400> 7

ctg tct gag gag cag cag cgc atc att gcc ata ctg ctg gac gcc cac 48
 Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His
 1 5 10 15

cat aag acc tac gac ccc acc tac tcc gac ttc tgc cag ttc ogg cct 96
 His Lys Thr Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro
 20 25 30

cca gtt cgt gtg aat gat ggt gga ggg agc gtg acc cta gag ctg tcc 144
 Pro Val Arg Val Asn Asp Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser
 35 40 45

cag stc tcc atg ctg ccc cac ctg gct gac ctg gtc agt tac agc atc 192
 Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile
 50 55 60

caa aag gtc att ggc ttt gct aag atg ata cca gga ttc aga gac ctc 240
 Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu
 65 70 75 80

acc tct gag gac cag atc gta ctg ctg aag tca agt gcc att gag gtc 288
 Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val
 85 90 95

atc atg ttg cgc tcc aat gag tcc ttc acc atg gac gac atg tcc tgg 336
 Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp
 100 105 110

acc tgt ggc aac caa gac tac aag tac cgc gtc agt gac gtg acc aaa 384
 Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys
 115 120 125

gcc gga cac agc ctg gag ctg att gag ccc ctc atc aag ttc cag gtg 432
 Ala Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val
 130 135 140

gga ctg aag aag ctg aac ttg cat gag gag gag cat gtc ctg ctc atg 480
 Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met
 145 150 155 160

gcc atc tgc atc gtc tcc cca gat cgt cct ggg gtg cag gac gcc gcg 528
 Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala
 165 170 175

ctg atc gag gcc atc cag gac cgc ctg tcc aac aca ctg cag acg tac 576
 Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr
 180 185 190

atc cgc tgc cgc cac ccg ccc ccg gcc agc cac ctg ctc tat gcc aag 624
 Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys
 195 200 205

atg atc cag aag cta gcc gac ctg cgc agc ctc aat gag gag cac tcc 672
 Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser
 210 215 220

aag cag tac cgc tgc ctc tcc ttc cag cct gag tgc agc atg aag cta 720
 Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu
 225 230 235 240

acg ccc ctt gtg ctc gaa gtg ttt gcc aat gag atc tcc tga 762
 Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser
 245 250

<210> 8

<211> 253

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
 nucléotidique codant un polypeptide ndérivé du
 récepteur de la vitamine D humain

<400> 8

Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His
 1 5 10 15

His Lys Thr Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro
 20 25 30

Pro Val Arg Val Asn Asp Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser
 35 40 45

Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile
 50 55 60

```

Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu
 65                               70                               75                               80

Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val
                               85                               90                               95

Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp
                               100                              105                              110

Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys
                               115                              120                              125

Ala Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val
 130                               135                               140

Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met
 145                               150                               155                               160

Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala
                               165                              170                              175

Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr
                               180                              185                              190

Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys
 195                               200                              205

Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser
 210                               215                              220

Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu
 225                               230                              235                              240

Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser
                               245                              250

```

【図面の簡単な説明】

【図1 a】

異なる種のVDRのペプチド配列のアライメント (hVDR : hom sapiens [ヒト] のVDR ; bVDR : bos taurus [ウシ] のVDR ; gVDR : gallus gallus [ニワトリ] のVDR ; rVDR : ratus norvegicus [ラット] のVDR ; mVDR : mus musculus [マウス] のVDR ; cVDR : cotumic japonica [ウズラ] のVDR ; xVDR ; xenopus laevi [アフリカツメガエル] のVDR と、ヒトRXR [hRXR] およびヒトRAR (hRAR) 配列。抑制されたVDRの挿入ドメインは、ボックス内である。

【図1 b】

hVDRのリガンド結合ドメインのドメインの一般的コンホメーション ; ヘリックスを円筒によって表し、シートを矢印によって表す。

【図2 a】

1, 25 (OH)₂ D₃ の、野性型hVDRのLBDに対する結合 (118 -

427 ; 三角形で示される点線の曲線) および hVDR から誘導される突然変異体の LBD に対する結合 (118 - 427 165 - 215 ; 菱形によって示される完全な曲線) の、スキッチャード分析 ; 1, 25 (OH)₂D₃ のマークがついた結合の量は、横軸に nM で表され、結合 (B) または未結合 (U) 野生型 LBD の間の B / U 比は縦軸に示される。

【図 2 b】

野生種 hVDR のおよび突然変異体 hVDR の CAT 活性 ; これらの活性は、パーセンテージとして縦軸に示される ; カラム 1 は、野生型 (野生類) hVDR のおよび突然変異体 (断端) hVDR の、ビタミン D (VD) の不在下で測定される CAT 活性と一致する ; カラム 2 は、VD の存在下、ならびに野生型 hVDR および突然変異体 hVDR の不在下で測定された CAT 活性に一致する ; カラム 3 は、野生型 hVDR の存在下、ならびに VD および突然変異体 hVDR の不在下で測定された CAT 活性に一致する ; カラム 4 は、VD および野生型 hVDR の存在下、ならびに突然変異体 hVDR の不在下で測定される CAT 活性に一致する ; カラム 5 は、突然変異体 hVDR の存在下、ならびに VD および野生型 hVDR の不在下で測定される CAT 活性に一致する ; カラム 6 は、突然変異体 hVDR ならびに VD の存在下、ならびに野生型 hVDR の不在下で測定される CAT 活性に一致する。

【図 3 a】

RAR の シート領域の表示、

【図 3 b】

上記の RAR の シート領域との同じ方向の VDR の シート領域の表示、

【図 3 c】

VDR のヘリックス H12 の分子内相互作用の表示、

【図 3 d】

VDR の LBD および対称的に、結合された分子のヘリックス H3n との間の界面。

【図 4 a】

1, 25 (OH)₂D₃ の図、

【図4b】

hVDRリガンド結合ポケットの線図、

【図4c】

1 で電子密度の輪郭を描いたビタミンD、

【図4d】

リガンドの空洞。

【図5】

野生型hVDRをコードするヌクレオチド配列(配列番号:1)、および野生型hVDR(配列番号:2)のペプチド配列

【図6】

hVDR(1-427 165-215)より誘導された突然変異体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列(配列番号:3)、および該ポリペプチドのペプチド配列(配列番号:4)、

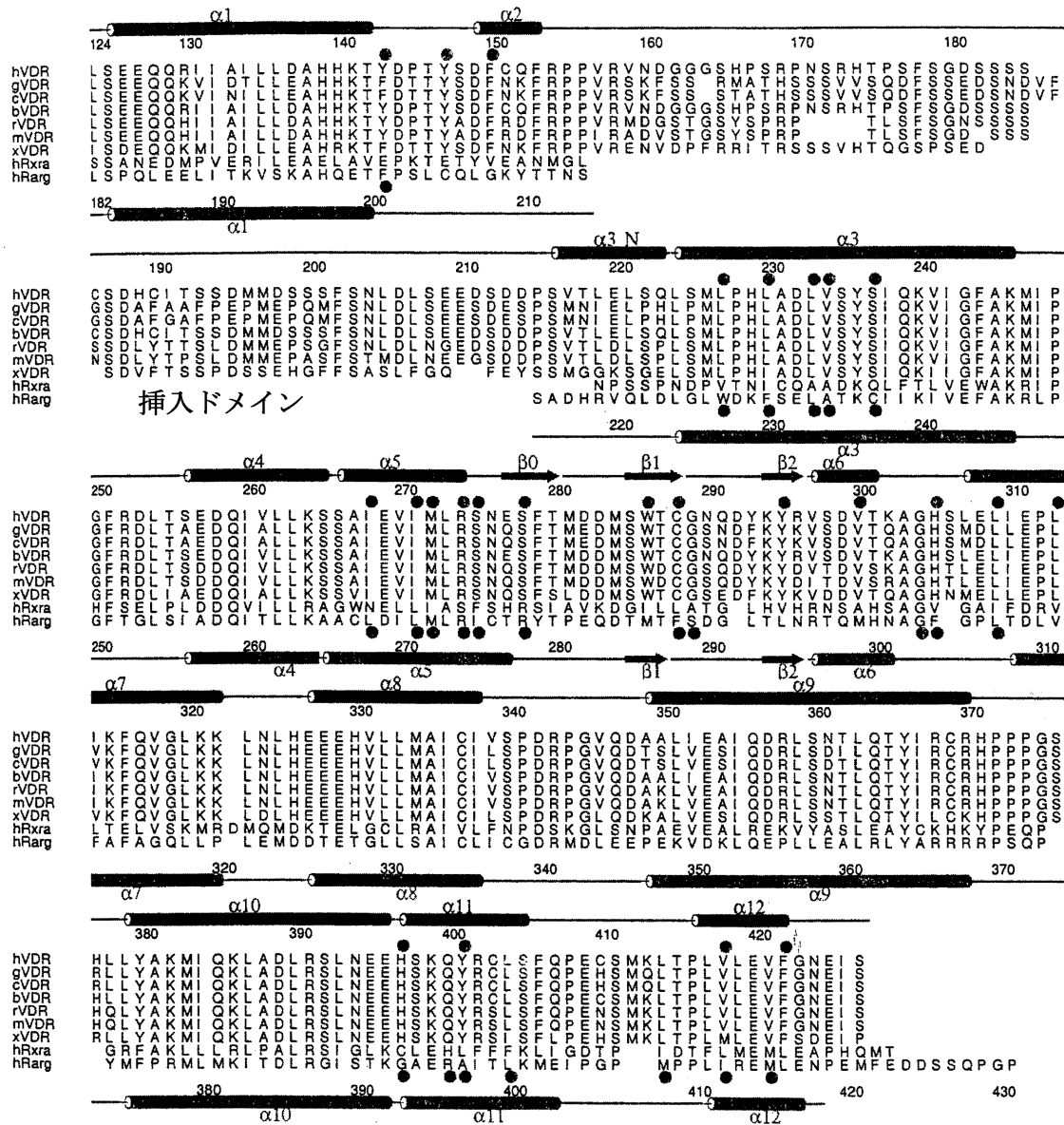
【図7】

hVDR(118-427 165-215)より誘導された突然変異体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列(配列番号:5)、および該ポリペプチドのペプチド配列(配列番号:6)、

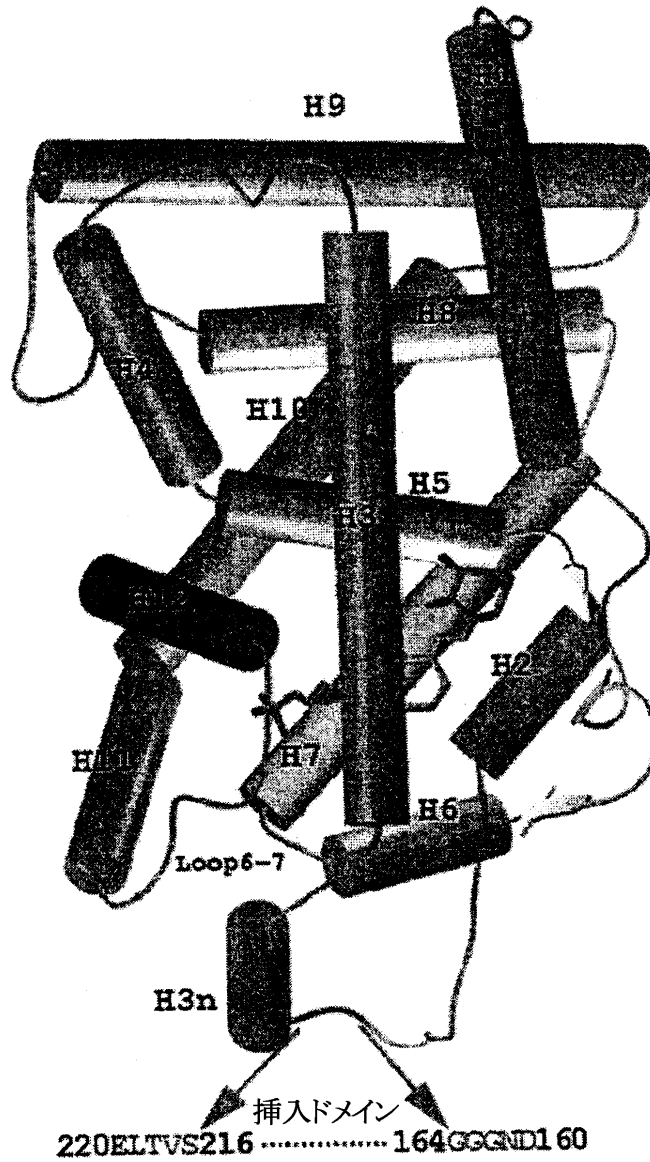
【図8】

hVDR(124-427 165-215)より誘導された突然変異体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列(配列番号:7)、および該ポリペプチドのペプチド配列(配列番号:8)。

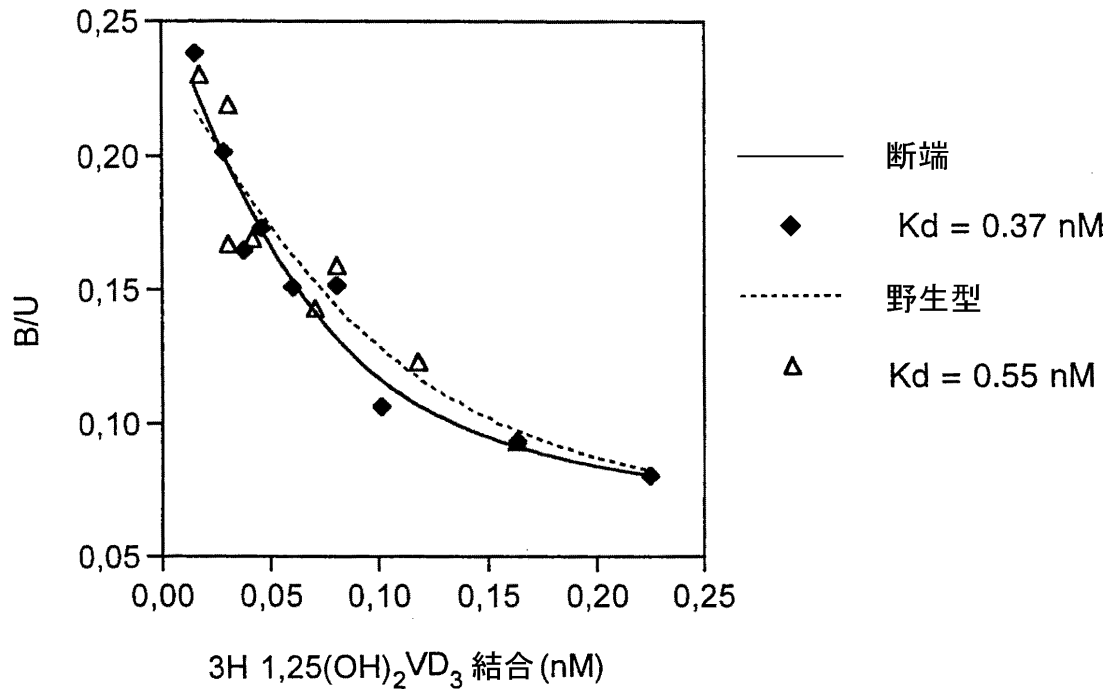
【図1a】



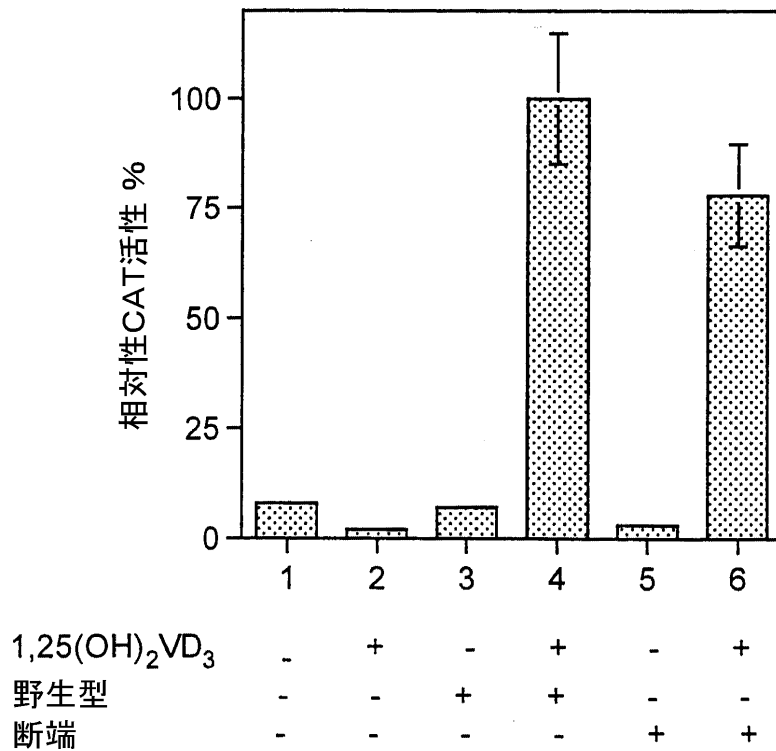
【図1b】



【図2 a】

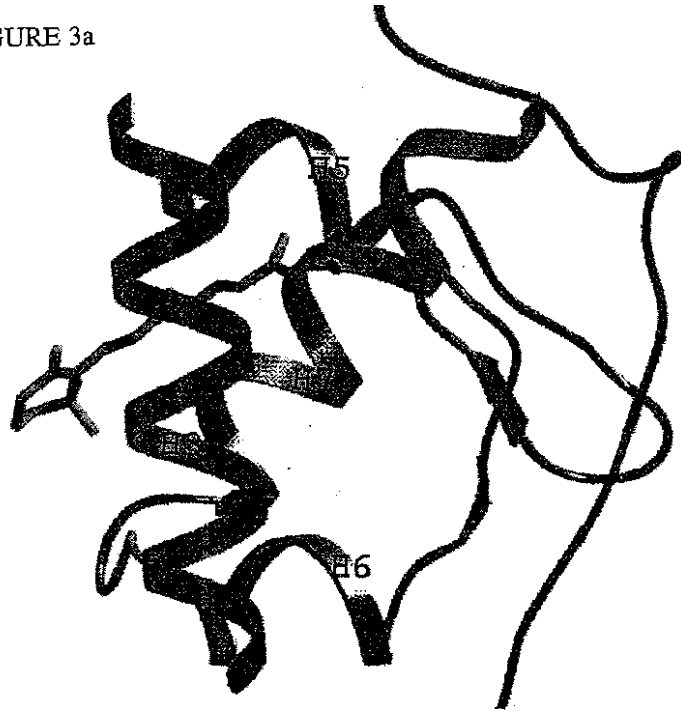


【図2 b】



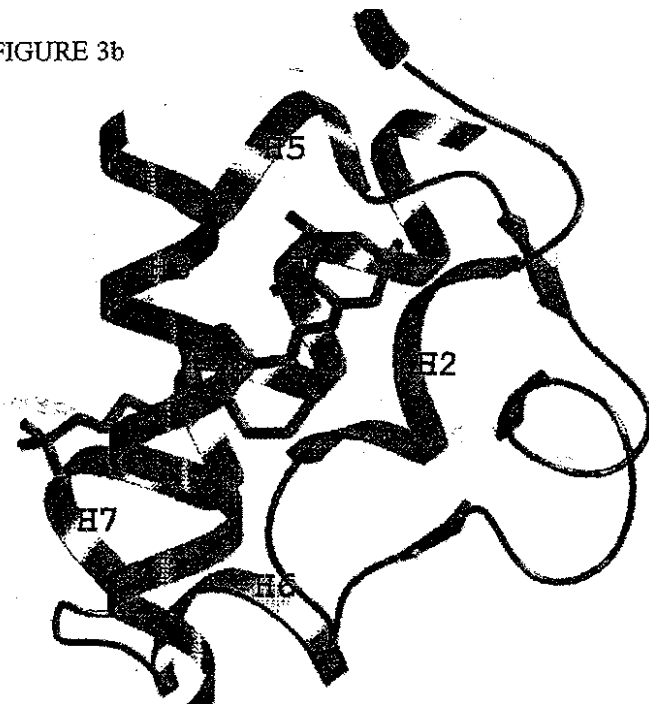
【図3a】

FIGURE 3a



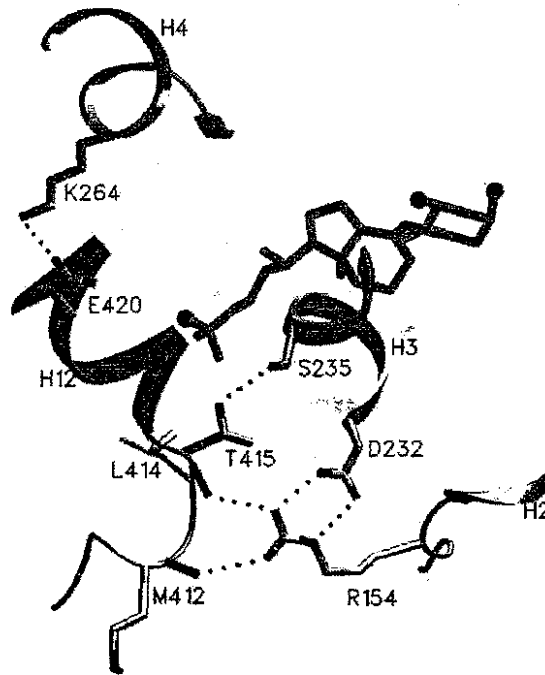
【図3b】

FIGURE 3b



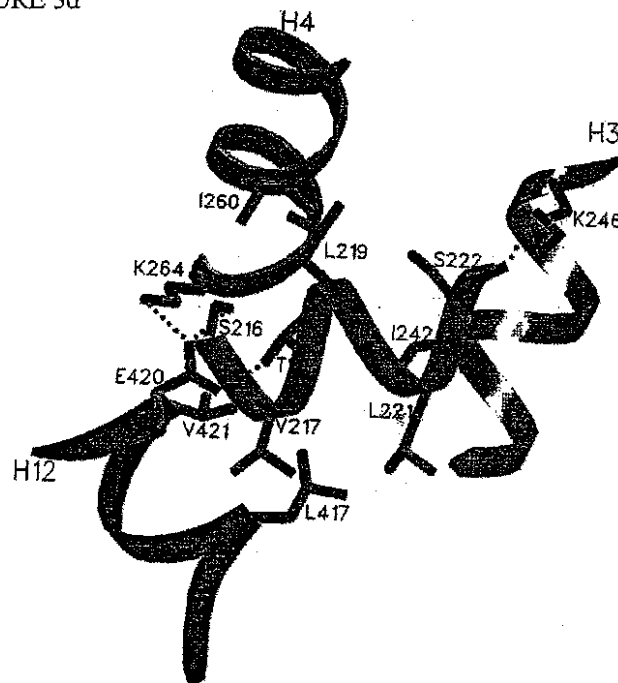
【図3c】

FIGURE 3c



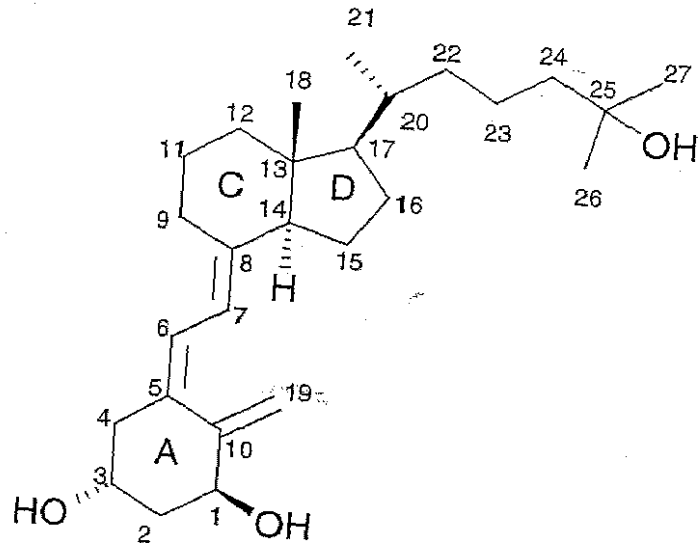
【図3d】

FIGURE 3d



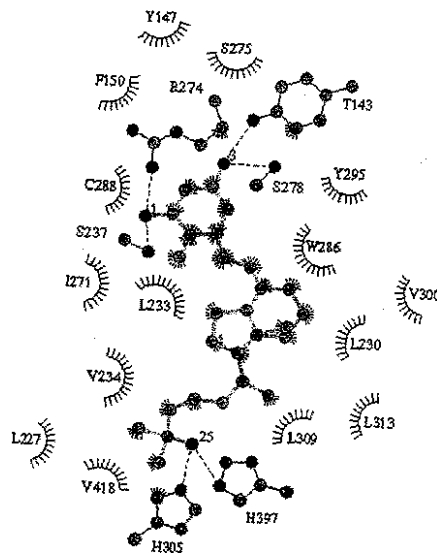
【図4a】

FIGURE 4a



【図4b】

FIGURE 4b




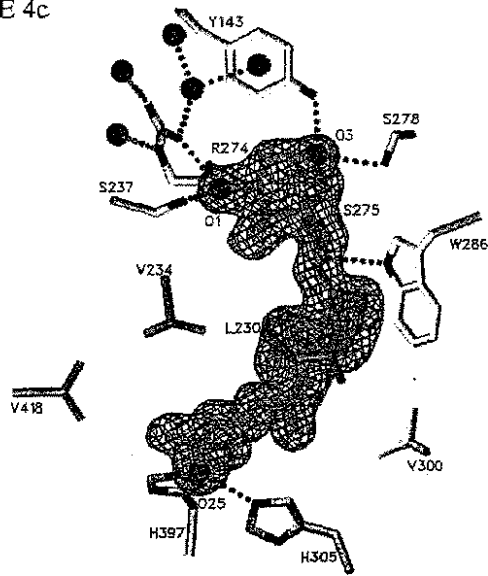
【 4 c】

FIGURE 4c




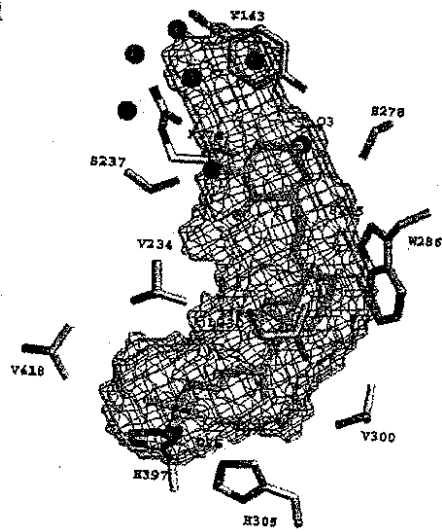
【 4 d】

FIGURE 4d



【图5】

atg gag gca atg gcg gcc agc act tcc ctg cct gac cct gga gac ttt	48
Met Glu Ala Met Ala Ala Ser Thr Ser Leu Pro Asp Pro Gly Asp Phe	
1 5 10 15	
gac cgg aac gtg ccc cgg atc tgt ggg gtg tgt gga gac cga gcc act	96
Asp Arg Asn Val Pro Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr	
20 25 30	
ggc ttt cac ttc aat gct atg acc tgt gaa ggc tgc aaa ggc ttc ttc	144
Gly Phe His Phe Asn Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe	
35 40 45	
agg cga agc atg aag cgg aag gca cta ttc acc tgc ccc ttc aac ggg	192
Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly	
50 55 60	
gac tgc cgc atc acc aag gac aac cga cgc cac tgc cag gcc tgc cgg	240
Asp Cys Arg Ile Thr Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg	
65 70 75 80	
ctc aaa cgc tgt gtg gac atc ggc atg atg aag gag ttc att ctg aca	288
Leu Lys Arg Cys Val Asp Ile Gly Met Met Lys Glu Phe Ile Leu Thr	
85 90 95	
gat gag gaa gtg cag agg aag cgg gag atg atc ctg aag cgg aag gag	336
Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile Leu Lys Arg Lys Glu	
100 105 110	
gag gag gcc ttg aag gac agt ctg cgg ccc aag ctg tct gag gag cag	384
Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln	
115 120 125	
cag cgc atc att gcc ata ctg ctg gac gcc cac cat aag acc tac gac	432
Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp	
130 135 140	
ccc acc tac tcc gac ttc tgc cag ttc cgg cct cca gtt cgt gtg aat	480
Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn	
145 150 155 160	
gat ggt gga ggg agc cat cct tcc agg ccc aac tcc aga cac act ccc	528
Asp Gly Gly Gly Ser His Pro Ser Arg Pro Asn Ser Arg His Thr Pro	
165 170 175	
agc ttc tct ggg gac tcc tcc tcc tcc tgc tca gat cac tgt atc acc	576
Ser Phe Ser Gly Asp Ser Ser Ser Ser Cys Ser Asp His Cys Ile Thr	
180 185 190	
tct tca gac atg atg gac tcg tcc agc ttc tcc aat ctg gat ctg agt	624
Ser Ser Asp Met Met Asp Ser Ser Ser Phe Ser Asn Leu Asp Leu Ser	
195 200 205	

Figure 5

【図5 - 1】

gaa gaa gat tca gat gac cct tct gtg acc cta gag ctg tcc cag ctc	672
Glu Glu Asp Ser Asp Asp Pro Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu	
210 215 220	
tcc atg ctg ccc cac ctg gct gac ctg gtc agt tac agc atc caa aag	720
Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys	
225 230 235 240	
gtc att ggc ttt gct aag atg ata cca gga ttc aga gac ctc acc tct	768
Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser	
245 250 255	
gag gac cag atc gta ctg ctg aag tca agt gcc att gag gtc atc atg	816
Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met	
260 265 270	
ttg cgc tcc aat gag tcc ttc acc atg gac gac atg tcc tgg acc tgt	864
Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys	
275 280 285	
ggc aac caa gac tac aag tac cgc gtc agt gac gtg acc aaa gcc gga	912
Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly	
290 295 300	
cac agc ctg gag ctg att gag ccc ctc atc aag ttc cag gtg gga ctg	960
His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu	
305 310 315 320	
aag aag ctg aac ttg cat gag gag gag cat gtc ctg ctc atg gcc atc	1008
Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile	
325 330 335	
tgc atc gtc tcc cca gat cgt cct ggg gtg cag gac gcc gcg ctg atc	1056
Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile	
340 345 350	
gag gcc atc cag gac cgc ctg tcc aac aca ctg cag acg tac atc cgc	1104
Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg	
355 360 365	
tgc cgc cac ccg ccc ccg ggc agc cac ctg ctc tat gcc aag atg atc	1152
Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile	
370 375 380	
cag aag cta gcc gac ctg cgc agc ctc aat gag gag cac tcc aag cag	1200
Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln	
385 390 395 400	
tac cgc tgc ctc tcc ttc cag cct gag tgc agc atg aag cta acg ccc	1248
Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro	
405 410 415	
ctt gtg ctc gaa gtg ttt ggc aat gag atc tcc tga	1284
Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser	
420 425	

Figure 5 (suite 1)

【图6】

atg gag gca atg gcg gcc agc act tcc ctg cct gac cct gga gac ttt	48
Met Glu Ala Met Ala Ala Ser Thr Ser Leu Pro Asp Pro Gly Asp Phe	
1 5 10 15	
gac cgg aac gtg ccc cgg atc tgt ggg gtg tgt gga gac cga gcc act	96
Asp Arg Asn Val Pro Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr	
20 25 30	
ggc ttt cac ttc aat gct atg acc tgt gaa ggc tgc aaa ggc ttc ttc	144
Gly Phe His Phe Asn Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe	
35 40 45	
agg cga agc atg aag cgg aag gca cta ttc acc tgc ccc ttc aac ggg	192
Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly	
50 55 60	
gac tgc cgc atc acc aag gac aac cga cgc cac tgc cag gcc tgc cgg	240
Asp Cys Arg Ile Thr Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg	
65 70 75 80	
ctc aaa cgc tgt gtg gac atc ggc atg atg aag gag ttc att ctg aca	288
Leu Lys Arg Cys Val Asp Ile Gly Met Met Lys Glu Phe Ile Leu Thr	
85 90 95	
gat gag gaa gtg cag agg aag cgg gag atg atc ctg aag cgg aag gag	336
Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile Leu Lys Arg Lys Glu	
100 105 110	
gag gag gcc ttg aag gac agt ctg cgg ccc aag ctg tct gag gag cag	384
Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln	
115 120 125	
cag cgc atc att gcc ata ctg ctg gac gcc cac cat aag acc tac gac	432
Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp	
130 135 140	
ccc acc tac tcc gac ttc tgc cag ttc cgg cct cca gtt cgt gtg aat	480
Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn	
145 150 155 160	
gat ggt gga ggg agc gtg acc cta gag ctg tcc cag ctc tcc atg ctg	528
Asp Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu	
165 170 175	
ccc cac ctg gct gac ctg gtc agt tac agc atc caa aag gtc att gcc	576
Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly	
180 185 190	
ttt gct aag atg ata cca gga ttc aga gac ctc acc tct gag gac cag	624
Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser Glu Asp Gln	
195 200 205	

Figure 6

【図6-1】

atc gta ctg ctg aag tca agt gcc att gag gtc atc atg ttg cgc tcc	672
Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg Ser	
210 215 220	
aat gag tcc ttc acc atg gac gac atg tcc tgg acc tgt ggc aac caa	720
Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys Gly Asn Gln	
225 230 235 240	
gac tac aag tac cgc gtc agt gac gtg acc aaa gcc gga cac agc ctg	768
Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly His Ser Leu	
245 250 255	
gag ctg att gag ccc ctc atc aag ttc cag gtg gga ctg aag aag ctg	816
Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu Lys Lys Leu	
260 265 270	
aac ttg cat gag gag gag cat gtc ctg ctc atg gcc atc tgc atc gtc	864
Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile Cys Ile Val	
275 280 285	
tcc cca gat cgt cct ggg gtg cag gac gcc gcg ctg atc gag gcc atc	912
Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile Glu Ala Ile	
290 295 300	
cag gac cgc ctg tcc aac aca ctg cag acg tac atc cgc tgc cgc cac	960
Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg Cys Arg His	
305 310 315 320	
ccg ccc ccg ggc agc cac ctg ctc tat gcc aag atg atc cag aag cta	1008
Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile Gln Lys Leu	
325 330 335	
gcc gac ctg cgc agc ctc aat gag gag cac tcc aag cag tac cgc tgc	1056
Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr Arg Cys	
340 345 350	
ctc tcc ttc cag cct gag tgc agc atg aag cta acg ccc ctt gtg ctc	1104
Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro Leu Val Leu	
355 360 365	
gaa gtg ttt ggc aat gag atc tcc tga	1131
Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser	
370 375	

Figure 6 (suite 1)

【图7】

gac agt ctg cgg ccc aag ctg tct gag gag cag cag cgc atc att gcc	48
Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala	
1 5 10 15	
ata ctg ctg gac gcc cac cat aag acc tac gac ccc acc tac tcc gac	96
Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp	
20 25 30	
ttc tgc cag ttc cgg cct cca gtt cgt gtg aat gat ggt gga ggg tct	144
Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn Asp Gly Gly Gly Ser	
35 40 45	
gtg acc cta gag ctg tcc cag ctc tcc atg ctg ccc cac ctg gct gac	192
Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp	
50 55 60	
ctg gtc agt tac agc atc caa aag gtc att ggc ttt gct aag atg ata	240
Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile	
65 70 75 80	
cca gga ttc aga gac ctc acc tct gag gac cag atc gta ctg ctg aag	288
Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys	
85 90 95	
tca agt gcc att gag gtc atc atg ttg cgc tcc aat gag tcc ttc acc	336
Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr	
100 105 110	
atg gac gac atg tcc tgg acc tgt ggc aac caa gac tac aag tac cgc	384
Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg	
115 120 125	
gtc agt gac gtg acc aaa gcc gga cac agc ctg gag ctg att gag ccc	432
Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro	
130 135 140	
ctc atc aag ttc cag gtg gga ctg aag aag ctg aac ttg cat gag gag	480
Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu	
145 150 155 160	
gag cat gtc ctg ctc atg gcc atc tgc atc gtc tcc cca gat cgt cct	528
Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro	
165 170 175	
ggg gtg cag gac gcc gcg ctg atc gag gcc atc cag gac cgc ctg tcc	576
Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser	
180 185 190	
aac aca ctg cag acg tac atc cgc tgc cgc cac ccg ccc ccg ggc agc	624
Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser	
195 200 205	

Figure 7

【図7 - 1】

cac ctg ctc tat gcc aag atg atc cag aag cta gcc gac ctg cgc agc	672
His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser	
210	215
220	
ctc aat gag gag cac tcc aag cag tac cgc tgc ctc tcc ttc cag cct	720
Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro	
225	230
235	240
gag tgc agc atg aag cta acg ccc ctt gtg ctc gaa gtg ttt ggc aat	768
Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn	
245	250
255	
gag atc tcc tga	780
Glu ile Ser	

Figure 7 (suite 1)

【图8】

ctg tct gag gag cag cag cgc atc att gcc ata ctg ctg gac gcc cac	48
Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His	
1 5 10 15	
cat aag acc tac gac ccc acc tac tcc gac ttc tgc cag ttc cgg cct	96
His Lys Thr Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro	
20 25 30	
cca gtt cgt gtg aat gat ggt gga ggg agc gtg acc cta gag ctg tcc	144
Pro Val Arg Val Asn Asp Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser	
35 40 45	
cag ctg tcc atg ctg ccc cac ctg gct gac ctg gtc agt tac agc atc	192
Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile	
50 55 60	
caa aag gtc att ggc ttt gct aag atg ata cca gga ttc aga gac ctg	240
Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu	
65 70 75 80	
acc tct gag gac cag atc gta ctg ctg aag tca agt gcc att gag gtc	288
Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val	
85 90 95	
atc atg ttg cgc tcc aat gag tcc ttc acc atg gac gac atg tcc tgg	336
Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp	
100 105 110	
acc tgt ggc aac caa gac tac aag tac cgc gtc agt gac gtg acc aaa	384
Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys	
115 120 125	
gcc gga cac agc ctg gag ctg att gag ccc ctg atc aag ttc cag gtg	432
Ala Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val	
130 135 140	
gga ctg aag aag ctg aac ttg cat gag gag gag cat gtc ctg ctg atg	480
Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met	
145 150 155 160	
gcc atc tgc atc gtc tcc cca gat cgt cct ggg gtg cag gac gcc gcg	528
Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala	
165 170 175	
ctg atc gag gcc atc cag gac cgc ctg tcc aac aca ctg cag acg tac	576
Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr	
180 185 190	
atc cgc tgc cgc cac ccg ccc ccg ggc agc cac ctg ctg tat gcc aag	624
Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys	
195 200 205	

Figure 8

【図8 - 1】

atg atc cag aag cta gcc gac ctg cgc agc ctc aat gag gag cac tcc	672		
Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser			
210	215	220	
aag cag tac cgc tgc ctc toc ttc cag cct gag tgc agc atg aag cta	720		
Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu			
225	230	235	240
acg ccc ctt gtg ctc gaa gtg ttt ggc aat gag atc tcc tga	762		
Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser			
	245	250	

Figure 8 (suite 1)

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

					Interns Application No PCT/FR 00/03248	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER						
IPC 7	C07K14/705	C12N15/10	C12N15/12	C12N15/63	G01N33/53	
	A61K38/17	A61P33/14	A61P35/00	A61P3/14		
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 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) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, STRAND						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT						
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages					Relevant to claim No.
Y	WURTZ J -M ET AL: "A CANONICAL STRUCTURE FOR THE LIGAND-BINDING DOMAIN OF NUCLEAR RECEPTORS" NATURAL STRUCTURAL BIOLOGY, vol. 3, 1996, pages 87-94, XP000610199 cited in the application page 88, right-hand column, paragraph 2 -page 93, left-hand column, paragraph 1 ---					1,11-15
Y	RENAUD JEAN-PAUL ET AL: "Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid." NATURE (LONDON), vol. 378, no. 6558, 1995, pages 681-689, XP000885365 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document ---					1,11-15
-/--						
<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			*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			
E earlier document but published on or after the international filing date			*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			
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)			*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.			
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			*Z* document member of the same patent family			
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed						
Date of the actual completion of the international search 12 March 2001			Date of mailing of the international search report 19/03/2001			
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer Mateo Rosell, A.M.			

I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/03248

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BAKER A R ET AL: "CLONING AND EXPRESSION OF FULL-LENGTH COMPLEMENTARY DNA ENCODING HUMAN VITAMIN D RECEPTOR" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 85, no. 10, 1988, pages 3294-3298, XP000982874 1988 ISSN: 0027-8424 the whole document ---	4,7
X	GOTO H ET AL: "A SINGLE RECEPTOR IDENTICAL WITH THAT FROM INTESTINE-T47D CELLS MEDIATES THE ACTION OF 1 25 DIHYDROXYVITAMIN D-3 IN HL-60 CELLS" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1132, no. 1, 1992, pages 103-108, XP000991535 ISSN: 0006-3002 the whole document ---	4,7
A	WO 98 31835 A (UNIV MARYLAND ;HAGBERG JAMES M (US); UNIV PITTSBURGH (US); FERRELL) 23 July 1998 (1998-07-23) SEQ.ID.N.15 page 3, line 4-9 page 20, line 26 -page 21, line 7 ---	4
A	BRZOZOWSKI A ET AL: "Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor" NATURE,GB,MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, no. 389, 16 October 1997 (1997-10-16), pages 753-758, XP002075907 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document ---	1,11,13
A	HAUSSLER M R ET AL: "THE VITAMIN D HORMONE AND ITS NUCLEAR RECEPTOR: MOLECULAR ACTIONS AND DISEASE STATES" JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY,GB,BRISTOL, vol. 154, no. 154, September 1997 (1997-09), pages S57-S73-S73, XP000867746 ISSN: 0022-0795 the whole document ---	1,11-15

-/--

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 00/03248

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	POULJOL N ET AL: "3D model of the androgen receptor (AR) ligand-binding (LBD): Validation by artificial and naturally occurring mutations of the androgen receptor gene." HORMONE RESEARCH (BASEL), vol. 50, no. SUPPL. 3, 1998, page 7 XP000933935 37th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology; Florence, Italy; September 24-27, 1998 ISSN: 0301-0163 abstract ---	1,11-15
A	WO 99 19354 A (BERKENSTAM ANDERS ; PHARMACIA & UPJOHN AB (SE); DAHLBERG MATS (SE)) 22 April 1999 (1999-04-22) page 3, line 15 -page 12, line 10 ---	1-4,6-12
A	WO 99 50658 A (GREENE GEOFFREY L ; AGARD DAVID A (US); ARCH DEV CORP (US); KUSHNER) 7 October 1999 (1999-10-07) abstract page 5, line 13 -page 7, line 10; examples ---	1,11-15
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199907 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1999-080898 XP002146587 & WO 98 56908 A (CHUGAI SEIYAKU KK), 17 December 1998 (1998-12-17) abstract ---	1-4,6-12
A	WO 99 16872 A (CROFTS LINDA ANNE ; GARVAN INST MED RES (AU); EISMAN JOHN A (AU); H) 8 April 1999 (1999-04-08) abstract page 2, line 19 -page 6, line 20; figure 6 ---	1-4,6-12
A	MANGELSDORF DAVID J ET AL: "The nuclear receptor superfamily: The second decade." CELL, vol. 83, no. 6, 15 December 1995 (1995-12-15), pages 835-839, XP000929729 ISSN: 0092-8674 cited in the application the whole document ---	1

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/03248

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	ROCHEL N ET AL: "The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand." MOLECULAR CELL., vol. 5, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 173-179, XP000929728 ISSN: 1097-2765 the whole document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/03248

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9831835 A	23-07-1998	AU 6012798 A	07-08-1998
		EP 0966543 A	29-12-1999
WO 9919354 A	22-04-1999	AU 9013198 A	03-05-1999
		CN 1279689 T	10-01-2001
		EP 1023323 A	02-08-2000
WO 9950658 A	07-10-1999	AU 3457199 A	18-10-1999
		AU 5769099 A	06-12-1999
		EP 1068529 A	17-01-2001
		WO 9960014 A	25-11-1999
WO 9856908 A	17-12-1998	AU 3107097 A	30-12-1998
WO 9916872 A	08-04-1999	AU 9331198 A	23-04-1999
		EP 1019504 A	19-07-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)		
G 0 1 N	33/15	G 0 1 N	33/53	S	4 H 0 4 5
	33/50		33/566		
	33/53	A 6 1 K	45/00		
	33/566	A 6 1 P	3/14		
G 0 1 R	33/465		7/00		
// A 6 1 K	45/00		17/06		
A 6 1 P	3/14		19/08		
	7/00		19/10		
	17/06		35/00		
	19/08		37/02		
	19/10		43/00		1 1 1
	35/00	C 1 2 N	15/00		Z N A A
	37/02		5/00		B
	43/00	G 0 1 N	24/08		5 1 0 Q
(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 G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , 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 , M Z , 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	ロシエル - ギベルト , ナターシャ フランス国、エフ - 67300 シルティゲム、 リュ・アンジマシュ 10				
(72)発明者	ヴェルツ , ジャン - マリー フランス国、エフ - 67410 ドリュゼネム、 プラス・ドゥ・レグリーズ 1				

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 DA13 DA36 FA36
FB02
4B024 AA11 BA63 CA04 DA02 DA06
EA02 EA04 GA11 GA18 GA19
HA03 HA11 HA20
4B064 AG20 CA02 CA10 CA19 CC24
CE02 CE11 CE12 CE14 CE15
DA13 DA20
4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01
AC14 BA02 CA24 CA46 CA60
4C084 AA02 AA06 AA17 BA44 NA14
ZA892 ZA962 ZA972 ZB072
ZB262 ZC212 ZC232 ZC412
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA18
BA19 BA20 BA21 CA40 DA50
EA60 FA74 GA15 GA23 GA26
GA30 GA40

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003514579A5	公开(公告)日	2008-01-24
申请号	JP2001540156	申请日	2000-11-22
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	中心法国国家, 香提网络点击		
当前申请(专利权)人(译)	中心法国国家, 香提网络点击		
[标]发明人	モラディノ ロシエルギベルトナターシャ ヴュルツジャンマリー		
发明人	モラ,ディノ ロシエル-ギベルト,ナターシャ ヴュルツ,ジャン-マリー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/705 C12N1/21 C12P21/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12N5/10 G01R33/465 A61K45/00 A61P3/14 A61P7/00 A61P17/06 A61P19/08 A61P19/10 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00		
CPC分类号	C07K14/70567 A61P3/14 A61P7/00 A61P17/06 A61P19/08 A61P19/10 A61P33/14 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.S G01N33/566 C12N5/00.B G01N24/08.510.Q A61K45/00 A61P3/14 A61P7/00 A61P17/06 A61P19/08 A61P19/10 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00.111		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA36 2G045/FB02 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA11 4B024/HA20 4B064/AG20 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE02 4B064/CE11 4B064/CE12 4B064/CE14 4B064/CE15 4B064/DA13 4B064/DA20 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4B065/CA60 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/NA14 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB072 4C084/ZB262 4C084/ZC212 4C084/ZC232 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/BA20 4H045/BA21 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA60 4H045/FA74 4H045/GA15 4H045/GA23 4H045/GA26 4H045/GA30 4H045/GA40		
优先权	1999014633 1999-11-22 FR		
其他公开文献	JP4124592B2 JP2003514579A		

摘要(译)

本发明涉及衍生自维生素D核受体的多肽, 该核受体包含配体结合结构域或LBD, 其包含柔性插入结构域。该多肽的特征在于, LBD柔性插入结构域通过取代或抑制至少30个氨基酸而被修饰。本发明通过使用包含与Gal4融合的多肽的构建体, 例如使用合成维生素D类似物的基本清洗, 来特异性鉴定干扰维生素D受体的其他蛋白质(活化剂, 阻遏物等)。用于生产测试(双重或三重杂交)或用于通过晶体学或NMR分析在多肽和特定分子之间形成的复合物的三维结构。

