(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2011-4744
(P2011-4744A)
(43)公開日　平成23年1月13日(2011.1.13)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
C07K 14/51	(2006.01)	C07K	14/51		4B024
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B063
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B065
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4C084

審査請求 有　請求項の数 48　ＯＬ　（全 188 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-146427 (P2010-146427)
(22)出願日　平成22年6月28日 (2010.6.28)
(62)分割の表示　特願2002-588919 (P2002-588919)の分割
原出願日　平成14年5月13日 (2002.5.13)
(31)優先権主張番号　60/290,071
(32)優先日　平成13年5月11日 (2001.5.11)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/291,311
(32)優先日　平成13年5月17日 (2001.5.17)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/353,058
(32)優先日　平成14年2月1日 (2002.2.1)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　501419705
オシエント　ファーマシューティカルズ　コーポレイション
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４１５、ウォルサム、ウィンター　ストリート　１０００、スウィート　２２００
(71)出願人　309040701
ワイス・エルエルシー
アメリカ合衆国　０７９４０　ニュージャージー州　マジソン、ファイブ　ジラルダ　ファームズ（番地なし）
(74)代理人　100099623
弁理士　奥山　尚一
(74)代理人　100096769
弁理士　有原　幸一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】骨量および脂質レベルを調整するＨＢＭ変異型

(57)【要約】　（修正有）
【課題】動物細胞およびトランスジェニック動物中のＨＢＭ、ＬＲＰ５、またはＬＲＰ６由来のＨＢＭ様ポリペプチドを発現させるために使用する方法および材料、また、ＨＢＭ様ポリペプチドを発現するトランスジェニック動物を提供する。
【解決手段】特定のコード配列、オリゴヌクレオチドプライマー、およびプローブを含む核酸、タンパク質、クローニングベクター、発現ベクター、形質転換された宿主。医薬組成物の開発方法、骨発達に関与する分子の同定方法、ならびに骨発達および脂質調整に関与する疾患の診断および治療方法。好ましい実施形態では、骨粗鬆症の治療、診断、および予防方法。
【選択図】図２９

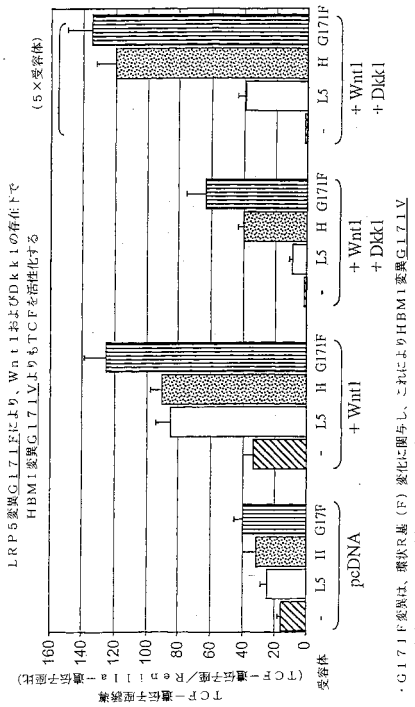


FIG. 29

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞中で発現された場合にＨＢＭ様表現型を示すＬＲＰ５またはＬＲＰ６中に変異を含む核酸であって、前記ＨＢＭ様表現型により骨量および／または脂質レベルが調整される核酸。
【請求項２】
細胞中で発現された場合に表２もしくは３の少なくとも１つの変異を含むか、Ｇ１７１Ｖ、Ａ２１４Ｖ、Ａ６５Ｖ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｆ、Ｇ１７１Ｉ、Ｇ１７１Ｑ、Ｌ２００Ｖ、Ｔ２０１Ｖ、Ｉ２０２Ｖ、またはＳ１２７Ｖの１つの変異となるＬＲＰ５核酸であって、被験体中での前記核酸の発現により骨量および／または脂質レベルが調整される、ＬＲＰ５核酸。
【請求項３】
細胞中で発現された場合に表２もしくは３の少なくとも１つの変異を含むか、Ｇ１７１Ｖ、Ａ２１４Ｖ、Ａ６５Ｖ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｆ、Ｇ１７１Ｉ、Ｇ１７１Ｑ、Ｌ２００Ｖ、Ｔ２０１Ｖ、Ｉ２０２Ｖ、またはＳ１２７Ｖの１つの変異となるＬＲＰ６核酸であって、ＬＲＰ５と等価の位置でＬＲＰ６の変異が起き、被験体中での前記核酸の発現により骨量および／または脂質レベルが調整されることを特徴とするＬＲＰ６核酸。
【請求項４】
プロペラ１中で少なくとも１つのアミノ酸変異をコードするＬＲＰ５核酸。
【請求項５】
前記核酸が、Ｇ１７１Ｖ、Ａ２１４Ｖ、Ａ６５Ｖ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｆ、Ｇ１７１Ｉ、Ｇ１７１Ｑ、Ｌ２００Ｖ、Ｔ２０１Ｖ、Ｉ２０２Ｖ、およびＳ１２７Ｖからなる群から選択される少なくとも１つの変異をコードする、請求項４のＬＲＰ５核酸。
【請求項６】
プロペラ１中で少なくとも１つのアミノ酸変異をコードするＬＲＰ６核酸。
【請求項７】
前記核酸が、Ｇ１７１Ｖ、Ａ２１４Ｖ、Ａ６５Ｖ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｆ、Ｇ１７１Ｉ、Ｇ１７１Ｑ、Ｌ２００Ｖ、Ｔ２０１Ｖ、Ｉ２０２Ｖ、およびＳ１２７Ｖからなる群から選択される少なくとも１つの変異をＬＲＰ６中の等価の位置でコードする、請求項６のＬＲＰ６核酸。
【請求項８】
前記変異が、ＬＲＰ５中またはＬＲＰ６中の等価のドメイン中のＧ１７１Ｖ、Ａ２１４Ｖ、Ａ６５Ｖ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｆ、Ｇ１７１Ｉ、またはＧ１７１Ｑである、請求項１～７のいずれか１項に記載の核酸。
【請求項９】
細胞中で発現した場合に前記ポリペプチドがＷｎｔシグナル伝達、Ｄｋｋ活性、ＬＲＰ５活性、および／またはＬＲＰ６活性を調整する、請求項１～８のいずれか１項に記載の核酸によってコードされたポリペプチド。
【請求項１０】
被験体中で発現した場合に前記ポリペプチドが骨量および／または脂質レベルを調整する、請求項９のポリペプチド。
【請求項１１】
請求項１～８のいずれか１項に記載の核酸を含むベクター。
【請求項１２】
請求項１１のベクターを含む細胞。
【請求項１３】
癌細胞、肝細胞、または骨細胞である、請求項１２の細胞。
【請求項１４】

表２、Ｇ１７１Ｖ、Ａ２１４Ｖ、Ａ６５Ｖ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｆ、Ｇ１７１Ｉ、Ｇ１７１Ｑ、Ｌ２００Ｖ、Ｔ２０１Ｖ、Ｉ２０２Ｖ、またはＳ１２７Ｖの少なくとも１つのアミノ酸変化を含む、ＬＲＰ５由来のポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメント。

【請求項１５】

前記タンパク質またはその生物学的に活性なフラグメントが、Ｇ１７１Ｖ、Ａ２１４Ｖ、Ａ６５Ｖ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｆ、Ｇ１７１Ｉ、Ｇ１７１Ｑ、Ｌ２００Ｖ、Ｔ２０１Ｖ、Ｉ２０２Ｖ、またはＳ１２７Ｖの少なくとも１つのアミノ酸変化を含む、請求項１４のポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメント。

【請求項１６】

ＬＲＰ６中の等価の位置でアミノ酸の変化が発現された場合に、表２、Ｇ１７１Ｖ、Ａ２１４Ｖ、Ａ６５Ｖ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｆ、Ｇ１７１Ｉ、Ｇ１７１Ｑ、Ｌ２００Ｖ、Ｔ２０１Ｖ、Ｉ２０２Ｖ、またはＳ１２７Ｖの少なくとも１つのアミノ酸変化を含む、ＬＲＰ６由来のポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメント。

【請求項１７】

前記タンパク質またはその生物学的に活性なフラグメントが、Ｇ１７１Ｖ、Ａ２１４Ｖ、Ａ６５Ｖ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｆ、Ｇ１７１Ｉ、Ｇ１７１Ｑ、Ｌ２００Ｖ、Ｔ２０１Ｖ、Ｉ２０２Ｖ、またはＳ１２７Ｖの少なくとも１つのアミノ酸変化を含む、請求項１６のポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメント。

【請求項１８】

被験体中で発現した場合にプロペラ１中に少なくとも１つのアミノ酸変異を含むＨＢＭ様表現型を有するが、前記変異は、前記ＨＢＭ様表現型を維持する第２の変異も存在するＧＶ１７１である、ポリペプチドまたは生物学的に活性なフラグメント。

【請求項１９】

前記ポリペプチドが、ＬＲＰ５、ＬＲＰ６、またはＨＢＭ由来である、請求項１８のポリペプチドまたは生物学的に活性なフラグメント。

【請求項２０】

前記アミノ酸変化が、ＬＲＰ５またはＬＲＰ６中の等価の位置のＧ１７１Ｖ、Ａ２１４Ｖ、Ａ６５Ｖ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｆ、Ｇ１７１Ｉ、もしくはＧ１７１Ｑである、請求項１４～１９のいずれか１項に記載のポリペプチドまたは生物学的に活性なフラグメント。

【請求項２１】

請求項１４～２０のいずれか１項に記載のポリペプチドまたはその抗原フラグメントに結合する、抗体またはその免疫原性フラグメント。

【請求項２２】

前記抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、primatized（登録商標）抗体、ヒト抗体、または標識抗体である、請求項２１の抗体またはその免疫原性フラグメント。

【請求項２３】

ＬＲＰ５の^{208}ＫＬＹＷＡＤＡＫＬＳＦＩＨＲＡＮ^{223}、^{277}ＡＬＹＳＰＭＤＩＱＶＬＳＱＥＲ^{291}、^{61}ＧＬＥＤＡＡＡＶＤＦＱＦＳＫＧＡ^{73}、^{234}ＥＧＳＬＴＨＰＦＡＬＴＬＳＧ^{247}、^{249}ＴＬＹＷＴＤＷＱＴＲＳＩＨＡＣＮ^{264}、^{144}ＶＬＦＷＱＤＬＤＱＰＲＡＩ^{156}、^{194}ＩＹＷＰＮＧＬＴＩＤＬＥＥＱＫＬＹ^{210}、^{34}ＬＬＬＦＡＮＲＲＤＶＲＬＶＤ^{47}、^{75}ＧＡＶＹＷＴＤＶＳＥＥＡＩＫＱ^{89}、^{121}ＫＬＹＷＴＤＳＥＴＮＲＩＥＶＡ^{135}、またはＬＲＰ６の等価のドメイン、またはその変異型を含むポリペプチドに結合する抗体。

【請求項２４】

ＬＲＰ５の^{969}ＬＩＬＰＬＨＧＬＲＮＶＫＡＩＤＹＤＰＬＤＫＦＩＹＷ^{993}、^{989}ＫＦＩＹＷＶＤＧＲＱＮＩＫＲＡＫＤＤＧＴＱＰＦＶＬ^{1013}、^{1009}ＱＰＦＶＬＴＳＬＳＱＧＱＮＰＤＲＱＰＨＤＬＳＩＤＩ^{1033}、^{1029}ＬＳＩＤＩＹＳＲＴＬＦ

ＷＴＣＥＡＴＮＴＩＮＶＨＲＬ^{1053}、^{1049}ＮＶＨＲＬＳＧＥＡＭＧＶＶＬＲＧＤＲＤＫＰＲＡＩＶ^{1073}、^{1253}ＣＧＥＰＰＴＣＳＰＤＱＦＡＣ^{1266}、^{1278}ＷＲＣＤＧＦＰＥＣＤＤＱＳＤＥＥＧＣ^{1295}、^{1316}ＲＣＤＧＥＡＤＣＱＤＲＳＤＥＡＤＣ^{1332}、^{1370}ＣＥＩＴＫＰＰＳＤＤＳＰＡＨ^{1383}、またはＬＲＰ６の等価のドメイン、またはその変異型を含むポリペプチドに結合する抗体であって、前記抗体がＬＲＰ５、ＨＢＭ、ＬＲＰ６、またはその変異型のＤｋｋへの結合を調整する抗体。

【請求項２５】

（Ａ）被験体から生体サンプルを得るステップと、

（Ｂ）前記サンプルを請求項２１～２４のいずれか１項に記載の抗体または免疫原性フラグメントに曝露するステップと、

（Ｃ）前記抗体が前記被験体由来の生体サンプル由来のタンパク質に結合したかどうかを検出して、前記被験体がＨＢＭ様表現型を有するかどうかを決定するステップと

を含む、被験体のＨＢＭ様表現型の診断方法。

【請求項２６】

治療有効量の請求項２１～２４のいずれか１項に記載の抗体および薬学的に許容可能なキャリアを含む、被験体の骨量および／または脂質レベルを調整するための組成物。

【請求項２７】

前記抗体またはその免疫原性フラグメントが、（１）ＬＲＰ５とＨＢＭ様タンパク質とを区別すること、（２）ＬＲＰ６とＨＢＭ様タンパク質とを区別すること、または（３）ＨＭＢとＨＢＭ様タンパク質とを区別することができる、請求項２１～２４のいずれか１項に記載の抗体またはその免疫原性フラグメント。

【請求項２８】

請求項１～８のいずれか１項に記載の核酸に作動可能に連結された動物細胞および／またはヒト細胞中でタンパク質発現を指示するプロモーター領域を含む核酸を含む体細胞および／または生殖細胞を有するトランスジェニック動物であって、前記トランスジェニック動物が前記核酸の発現によって調整される少なくとも３つの骨パラメータを有するトランスジェニック動物。

【請求項２９】

前記プロモーター領域が、ＣＭＶ、ＲＳＶ、ＳＶ４０、およびＥＦ－１ａ、ＣＭＶβｂアクチン、ヒストン、Ｉ型コラーゲン、ＴＧＦβ１、ＳＸ２、ｃｆｏｓ／ｃｊｕｎ、Ｃｂｆａ１、Ｆｒａ／Ｊｕｎ、Ｄｌｘ５、オステオカルシン、オステオポンチン、骨シアロタンパク質、およびコラゲナーゼのプロモーター領域からなる群から選択される、請求項２８のトランスジェニック動物。

【請求項３０】

請求項９または１０のポリペプチドをコードする配列を含む核酸を含む体細胞および／または生殖細胞を有するトランスジェニック動物であって、前記核酸が動物細胞および／またはヒト細胞中でタンパク質発現を指示する作動可能に連結されたプロモーター領域をさらに含み、前記トランスジェニック動物が前記核酸の発現によって調整される少なくとも３つの骨パラメータを有するトランスジェニック動物。

【請求項３１】

請求項１～８のいずれか１項に記載の核酸に作動可能に連結された動物細胞および／またはヒト細胞中でタンパク質発現を指示するプロモーター領域を含む核酸を含む動物胚。

【請求項３２】

請求項１～８のいずれか１項に記載の核酸に作動可能に連結された動物細胞および／またはヒト細胞中でタンパク質発現を指示するプロモーター領域を含む核酸でトランスフェクトした動物細胞またはヒト細胞。

【請求項３３】

ヒトＨＢＭ様タンパク質を発現し、ヒトＨＢＭ様遺伝子がその子孫に受け継がれる、請求項２８のトランスジェニック動物。

【請求項３４】

請求項３３のトランスジェニック動物またはその子孫から産生されたトランスジェニック動物。
【請求項３５】
請求項２８のトランスジェニック動物から構成される第１の動物群および第２のコントロール動物群を含む、骨密度の調整および／または脂質レベルの調整を研究するための動物モデル。
【請求項３６】
前記トランスジェニック動物群が、ヒトＨＢＭ様タンパク質またはその生物学的に活性なポリペプチドフラグメントをコードする核酸を含む細胞を有する、請求項３５の動物モデル。
【請求項３７】
請求項３０のトランスジェニック動物から構成される第１の動物群および第２のコントロール動物群を含む、骨密度の調整を研究するための動物モデル。
【請求項３８】
（ａ）請求項１１のベクターで細胞をトランスフェクトするステップと、
（ｂ）ステップ（ａ）のトランスフェクトした細胞を化合物に曝露するステップと、
（ｃ）前記化合物がＨＢＭ様核酸の活性を調整するかどうかを決定するステップと
を含む、ＨＢＭ様核酸の活性を調整する薬剤の同定方法。
【請求項３９】
（ａ）請求項１１のベクターで細胞をトランスフェクトするステップと、
（ｂ）ステップ（ａ）のトランスフェクトした細胞を化合物に曝露するステップと、
（ｃ）前記化合物がＨＢＭ様タンパク質の活性を調整するかどうかを決定するステップと
を含む、ＨＢＭ様タンパク質の活性を調整する薬剤の同定方法。
【請求項４０】
前記化合物が、ホルモン、成長因子、ペプチド、ＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ＤＮＡ、無機物、ビタミン、天然産物、または合成有機化合物である、請求項３９の方法。
【請求項４１】
（ａ）細胞を請求項１～８に記載の核酸を含む構築物でトランスフェクトするステップと、
（ｂ）Ｗｎｔ応答プロモーターに連結されたレポーターエレメントの発現の変化を評価するステップと、
（ｃ）Ｄｋｋ構築物のみでトランスフェクトした細胞と比較して、レポーター遺伝子発現が変化した化合物を、Ｄｋｋ／Ｗｎｔ相互作用調整化合物として同定するステップと
を含む、ＤｋｋのＷｎｔシグナル伝達経路との相互作用を調整する化合物の同定方法。
【請求項４２】
前記細胞が、癌細胞、肝細胞、または骨細胞である、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記細胞が、Ｕ２－ＯＳ、ＨＯＢ－０３－ＣＥ６、またはＨＥＫ２９３細胞である、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記使用されたレポーターエレメントが、ＴＣＦ－ルシフェラーゼ、ｔｋ－Ｒｅｎｉｌｌａ、またはその組み合わせである、請求項４１に記載の方法。
【請求項４５】
（Ａ）被験体から生体サンプルを得るステップと、
（Ｂ）ＨＢＭ表現型が得られるヌクレオチド変化の存在をアッセイするステップと
を含む、表２または３のヌクレオチド変化を含む核酸を発現する被験体の診断方法。
【請求項４６】
（Ａ）請求項３２に記載の細胞を得るステップと、
（Ｂ）前記細胞を試験化合物に曝露するステップと、

（Ｃ）ＬＲＰ５、ＬＲＰ６、またはＨＢＭの発現をそれぞれ測定するステップと
を含む、ＬＲＰ５、ＬＲＰ６、またはＨＢＭを調整する薬剤の同定方法。
【請求項４７】
前記薬剤が、骨量および／または脂質レベルをさらに調整するかどうかを決定するステップをさらに含む、請求項４２の薬剤の同定方法。
【請求項４８】
請求項４６または４７の方法によって同定された薬剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、一般に、遺伝学、ゲノム科学、および分子生物学分野に関する。本発明は、高骨量遺伝子および対応する野生型遺伝子ならびにその変異体の単離、検出、および配列決定で使用する方法および材料に関する。本発明はまた、高骨量（ＨＢＭ）遺伝子、対応する野生型遺伝子、およびその変異体に関する。本発明で同定された遺伝子は、骨発達のオントロジーおよび生理学に関与する。本発明はまた、核酸、タンパク質、クローニングベクター、発現ベクター、形質転換された宿主、医薬組成物の開発方法、骨発達に関与する分子の同定方法、ならびに骨発達および脂質調整に関与する疾患の診断および治療方法を提供する。本発明は、さらに、ＨＢＭ表現型および関連する変異表現型、ＨＢＭ遺伝子およびその変異型の作用機構、ならびに正常および異常な骨条件に影響を与える因子および治療を研究するためのトランスジェニック動物に関する。好ましい実施形態では、本発明は、骨粗鬆症などの代謝性骨疾患を含む骨の正常および異常な条件の治療、診断、予防、およびスクリーニング方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
最も一般的な２つの骨粗鬆症型は、閉経後骨粗鬆症および老人性骨粗鬆症である。骨粗鬆症は、女性と同様に男性も罹患し、他の骨の異常を併発すると、高齢者の健康危険度がさらに増す。最も一般的な骨粗鬆症型は、閉経に関連するものである。ほとんどの女性は、閉経後３～６年以内に骨梁区画の骨量が２０～６０％喪失する。この急速な喪失は、一般に、骨吸収および骨形成の増加に関連する。しかし、より骨吸収周期のほうがより優勢であり、正味の骨量が喪失する。骨粗鬆症は、閉経後の女性で一般的且つ重篤な疾患である。米国のみでこの疾患を罹患した女性は２５００万人と予測されている。骨粗鬆症の結果は個人的に有害なだけでなく、慢性であり、疾患の後遺症による大規模且つ長期的な援助（入院および老人ホームでの介護）が必要となるために大きな経済的損失の原因となる。これは、特に、より高齢の患者で真である。さらに、骨粗鬆症は、一般に生命を脅かす病態と考えられていないが、高齢の女性の股関節骨折の死亡率は２０～３０％である。この死亡率の大部分は閉経後骨粗鬆症に直接関連し得る。合衆国での骨粗鬆症治療にのみ関連する費用は年間１００億ドル～１５０億ドルである。骨粗鬆症による股関節骨折の世界的にみた症例数は１７０万を超える。
【０００３】
閉経後骨粗鬆症の影響に対して最も脆弱な骨組織は、骨梁である。この組織は、しばしば海綿質と呼ばれ、関節付近の骨の末端付近および脊椎の椎骨中に特に集中している。骨梁組織は、互いに内部接続された小さな構造物ならびに骨の外層および中心の軸を形成するように凝集して密度の高い皮質組織によって特徴付けられる。この骨梁の十字ネットワークは、外側の皮層構造に対して外壁を保持し、構造全体の生化学的強度に重要である。閉経後骨粗鬆症は主に骨の不全および骨折を引き起こす正味の吸収および骨梁の喪失である。閉経後の女性における骨梁喪失に照らして、最も一般的な骨折は、骨梁支持に高度に依存する骨（例えば、脊椎、大腿骨頸、および大腿骨）に関する骨折であることは驚くべきことではない。実際、股関節骨折、コリーズ骨折、および脊椎粉砕骨折は、閉経後骨粗鬆症の指標である。
【０００４】

一般的に最も初期に受け入れられている閉経後骨粗鬆症の治療方法の１つは、エストロゲン置換療法であった。この治療法は成功率が高いが、主に慢性エストロゲン治療の望ましくない副作用のために患者の承諾が低い。エストロゲン置換治療で頻繁に挙げられる副作用には、生理の再発、膨満感、うつ病、および乳癌または子宮癌の恐れが含まれる。子宮摘出を受けた女性における子宮癌に対する既知の恐れを抑えるために、エストロゲンおよびプロゲスチン周期治療プロトコールがしばしば使用される。このプロトコールは、産児制限投薬計画で使用されるものと類似しており、プロゲスチンに特徴的な副作用のためにしばしば女性に受け入れられない。より最近では、本来は乳癌治療のために開発された一定の抗エストロゲンが、閉経後骨粗鬆症の実験モデルで有効であることが示された。これらの薬剤には、ラロキシフェン（米国特許第５，３９３，７６３号およびＢｌａｃｋら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．、９３、６３～６９、１９９４を参照のこと）が含まれる。さらに、タモキシフェン（乳癌治療で広く使用されている治療薬）が乳癌を罹患した閉経後の女性において骨中無機質密度が増加することが示されている（Ｌｏｖｅら、Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．、３２６、８５２～８５６、１９９２）。

【０００５】

閉経後骨粗鬆症治療のための別の治療法は、カルシトニンの使用である。カルシトニンは、骨吸収を阻害し、この用途で多数の国で許可されている天然に存在するペプチドである（Ｏｖｅｒｇａａｒｄら、Ｂｒ．Ｍｅｄ．Ｊ．、３０５、５５６～５６１、１９９２）。しかし、カルシトニンの使用はいくらか制限されている。骨中無機質密度の増加効果は非常に穏やかであり、治療は非常に高価である。別の閉経後骨粗鬆症治療法は、二リン酸塩の使用である。この化合物は、本来パジェット病および悪性抗カルシウム血症のために開発された。これらは骨吸収を阻害することが示されている。このクラスの化合物の１つであるアレンドロン酸塩は、閉経後骨粗鬆症治療で承認されている。これらの薬剤は、骨粗鬆症治療で有益であるが、これらの薬剤はまた、骨軟化症（非常に長い骨の半減期（２年超））および「固着骨症候群（ｆｒｏｚｅｎ　ｂｏｎｅ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）」（例えば、正常な骨再造形の停止）の可能性を含む潜在的な欠点を有する。

【０００６】

老人性骨粗鬆症は、骨中無機質密度の喪失およびそれによる骨折率の増加、罹患率、および関連する死亡率によって特徴付けられるという点で閉経後骨粗鬆症に類似している。一般に、これは更年期（すなわち、７０歳以降）で発症する。歴史的には、老人性骨粗鬆症は、女性に共通していたが、より高齢の男性の出現に伴い、この疾患は両方の性で重要な要因となりつつある。テストステロンまたはエストロゲンなどのホルモンがいくらかでもこの疾患でどのような役割を果たすかは明らかではなく、その病因は不明確である。この疾患の治療はあまり満足ではなかった。ホルモン治療（女性ではエストロゲン、男性ではテストステロン）による結果はあいまいであるが、カルシトニンおよび二リン酸塩はいくらか有用なようである。

【０００７】

成熟時の骨量のピークは、主に遺伝子の制御下にある。２つの研究により、成人一卵性双生児における骨量の不一致は、二卵性双生児よりも小さいことが示されており（Ｓｌｅｍｅｎｄａら、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．、６、５６１～５６７、１９９１；Ｙｏｕｎｇら、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．、６、５６１～５６７、１９９５；Ｐｏｃｏｃｋら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．、８０、７０６～７１０、１９８７；Ｋｅｌｌｙら、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．、８、１１～１７、１９９３）、骨量不一致の６０％までまたはそれ以上が遺伝すると評価されている（Ｋｒａｌｌら、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．、１０、Ｓ３６７、１９９３）。ピーク骨量は、高齢者における最も強力な骨量決定要因であるが（Ｈｕｉら、Ａｎｎ．Ｉｎｔ．Ｍｅｄ．、１１１、３５５～３６１、１９８９）、成人および高齢者における加齢性骨量減少率もまた強力な決定要因である（Ｈｕｉら、Ｏｓｔｅｏｐｏｒｏｓｉｓ　Ｉｎｔ．、１、３０～３４、１９９５）。骨量は骨折リスクの主な測定可能な決定要因であるので、成人時に達成された遺伝性ピーク骨量は、個体の高齢期の骨折リスクの重要な決定要因である。したがって

、骨量の遺伝的根拠の研究は、骨粗鬆症による骨折の病因学において非常に関心が寄せられている。

【０００８】

最近、骨粗鬆症分野でピーク骨量の遺伝子制御に強い関心が寄せられている。正常範囲内の骨量のばらつきとの関連を試験するための適切な多型を有する候補遺伝子について注目されているか、骨粗鬆症患者で見出された低骨量範囲に関連する遺伝子および遺伝子座の実験が注目されている。ビタミンＤ受容体遺伝子座（ＶＤＲ）（Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３６７、２８４～２８７、１９９４）、ＰＴＨ遺伝子（Ｈｏｗａｒｄら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ．、８０、２８００～２８０５、１９９５；Ｊｏｈｎｓｏｎら、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．、８、１１～１７、１９９５；Ｇｏｎｇら、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．、１０、Ｓ４６２、１９９５）、およびエストロゲン受容体遺伝子（Ｈｏｓｏｉら、Ｊ．Ｂｏｎｅ．Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．、１０、Ｓ１７０、１９９５；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３６７、２８４～２８７、１９９４）が、この研究で最も顕著と判断されている。骨量（表現型）が連続的、定量的、多遺伝子の形質であり、環境要因（栄養、合併疾患、年齢、身体活動など）および他の要因と混同するので、これらの研究は困難である。また、この研究のデザインは、多数の被験体を必要とする。特に最近のＶＤＲの研究結果は、混乱かつ矛盾している（Ｇａｒｎｅｒｏら、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．、１０、１２８３～１２８８、１９９５；Ｅｉｓｍａｎら、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．、１０、１２８９～１２９３、１９９５；Ｐｅａｃｏｃｋ、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．、１０、１２９４～１２９７、１９９５）。さらに、この研究によって機構についてはほとんど解明されていないので、遺伝子の影響が骨量に影響を与える。

【０００９】

ピーク骨量は環境要因よりもむしろ遺伝子によって決定されることが周知であるが、骨量のばらつきに関連する遺伝子座（および最終的に遺伝子）を決定する研究は、困難且つ高価である。連鎖解析（例えば、同胞対解析および複合家族(extended family)解析）の検出力を使用した研究デザインは、一般に、単純な関連性研究よりも情報量が多いが、後者のほうが価値がある。しかし、骨量を含む遺伝子連鎖研究は、２つの主要な問題によって阻まれている。第１の問題は、上記で簡単に考察した表現型である。骨量は、連続的且つ定量的形質であり、個別の表現型の確立は困難である。測定用の各解剖部位は、いくつかの遺伝子から影響を受け、その多くが部位ごとに異なり得る。第２の問題は、表現型の年齢による影響である。個体が低骨量と同定することができるまでに、彼らの両親または前の世代の他のメンバーが死亡しているので研究に利用することができず、より若い世代はピーク骨量まで達することができず、その表現型分類により遺伝子分析が不正確になる。

【００１０】

それと無関係に、連鎖解析を使用して、遺伝性「疾患」の原因遺伝子の位置を見出すことができるが、疾患の生化学的性質についていかなる知識も必要ない（すなわち、疾患を引き起こすと考えられる変異タンパク質を知る必要がない）。伝統的なアプローチは、評価される候補として公知のタンパク質が関与する疾患過程に関する仮定に依存する。連鎖解析を使用した遺伝子局在化アプローチを使用して、欠損遺伝子が存在する遺伝子の染色体領域を最初に見出し、その後領域のサイズを段階的に減少させてできるだけ正確に特異的変異遺伝子の位置を決定することができる。遺伝子自体が候補領域内で発見された後に伝令ＲＮＡおよびタンパク質を同定し、ＤＮＡと共に変異についてチェックする。

【００１１】

疾患の原因となる変化した遺伝子が見出される前でさえも出生前診断に疾患の位置を使用することができるので、遺伝子局在化アプローチは実用性がある。連鎖解析により、家族および病気の子供を持たない多くの家族でさえも疾患遺伝子のキャリアであるかどうかを知り、分子診断により胎児の状態を評価することができる。次いで、家族内での疾患の伝達を使用して、欠陥遺伝子を見出すことができる。本明細書中で使用される、「高骨量

」（ＨＢＭ）の基準は、病態の基準と類似しているにもかかわらず、実用的見地から、高骨量は、被験体を骨粗鬆症として既知の疾患からの回避を実際に補助することができる。

【００１２】

親から子孫への染色体遺伝の性質により、連鎖解析が可能である。減数分裂時に、２つの親の相同体が対合してその適切な分離を娘細胞に伝える。これらが一列に並べられる一方で、２つの相同体がこの事象で「交差」または「組換え」と呼ばれる染色体の一片と交換される。得られた染色体はキメラである（すなわち、両方の親の相同体を起源とする部分を含む）。２つの配列が共に染色体上のより近くに存在するほどこれらの配列の間で組換えが起こる可能性が低く、より密接に結合する。連鎖解析実験では、組換え頻度を決定するためにある世代から次の世代までの染色体上の２つの位置を得る。遺伝性疾患の研究では、疾患遺伝子またはその正常な対応物によって１つの染色体位置をマークする（すなわち、個体が疾患の兆候を示すかどうかの試験により染色体領域の遺伝を決定することができる）。保有する「マーカー」配列のコピーに基づいて２つの相同体を区別することができるように集団中の天然のばらつきを示すＤＮＡ配列によって他の位置をマークする。各家族において、遺伝子マーカー配列の遺伝を、病態の遺伝と比較する。家族内で高骨量などの常染色体優性疾患を保有する場合、各罹患個体は同一形態のマーカーを保有し、全ての非罹患個体は少なくとも１つの異なる形態のマーカーを保有し、疾患遺伝子およびマーカーが互いに密接して存在する可能性が非常に高い。この方法で、既知のマーカーを使用して染色体を体系的にチェックし、病態と比較することができる。異なる家族から得たデータを合わせ、統計的方法を使用したコンピュータによってこれらを分析する。結果は、遺伝子マーカー間の連鎖の可能性およびマーカー間の距離が異なる疾患を示す情報である。正の結果は疾患がマーカーに非常に近いことを意味し、負の結果は疾患が染色体上で離れているか完全に異なる染色体上に存在することを示す。

【００１３】

所与のマーカー遺伝子座での罹患家族の全メンバーの分類およびマーカープローブでの特定の病態の同時遺伝の評価およびそれによる２つの疾患の同時遺伝の頻度の決定によって連鎖解析を行う。組換え頻度を、２つの遺伝子座間の遺伝距離の基準として使用することができる。組換え頻度１％は１地図単位または１センチモルガン（ｃＭ）と等価である（およそ１，０００ｋｂのＤＮＡと等価である）。この関係は、約２０％または２０ｃＭの頻度まで保持される。

【００１４】

全ヒトゲノムは、３，３００ｃＭ長である。マーカー遺伝子座の５～１０ｃＭ以内の未知の疾患遺伝子を見出すために、全ヒトゲノムを、約１０ｃＭの間隔をあけた約３３０個の情報マーカー遺伝子座を使用して検索することができる（Ｂｏｔｓｔｅｉｎら、Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．、３２、３１４～３３１、１９８０）。連鎖結果の信頼性を、多数の統計法の使用によって確立する。ヒトの連鎖解析で最も一般的に使用されている方法は、コンピュータプログラムＬＩＰＥＤ（Ｏｔｔ、Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．、２８、５２８～５２９、１９７６）に組み込まれたＬＯＤスコア法である（Ｍｏｒｔｏｎ、Ｐｒｏｇ．Ｃｌｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｓ．、１４７、２４５～２６５、１９８４；Ｍｏｒｔｏｎら、Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．、３８、８６８～８８３、１９８６）。ＬＯＤスコアは、２つの遺伝子座が所与の距離で連鎖している可能性と連鎖していない可能性（５０ｃＭ超離れている）の比の対数である。対数値使用の平均は、同一の疾患を罹患した家族間で合計することができるものである。これにより必要なヒト家族は比較的小規模となる。

【００１５】

慣例により、＋３．０を超える総ＬＯＤスコア（すなわち、特定の組換え頻度での連鎖の確率は非連鎖確率の１０００倍である）を、特定の組換え頻度での連鎖についての有意な証拠と見なす。－２．０未満の総ＬＯＤスコア（すなわち、非連鎖の確率が特定の頻度での連鎖の確率の１００倍である）を、検討する２つの遺伝子座が特定の組換え頻度で連鎖しないという強力な証拠と見なす。最近まで、ほとんどの連鎖解析を、検討する疾患と

特定の遺伝子マーカーとの間の関係である二点データに基づいて行っていた。しかし、最近の数年間のヒトゲノムマッピングにおける急速な進歩および付随するコンピュータ方法論の進歩の結果として、多点データを使用した連鎖解析が可能になりつつある。多点分析により、マーカー間の組換え距離が既知の場合に疾患といくつかの関連する遺伝子マーカーとの間の連鎖が同時に分析される。

【００１６】

多点分析は、２つの理由で有利である。第１に、家系の有益性が通常増大する。各家系は、マーカー遺伝子座にヘテロ接合性の親の数および家族内の罹患個体数に依存する一定量の潜在的情報を有する。しかし、これらの全個体において有益なように十分に多型のマーカーはほとんどない。複数のマーカーが同時に考慮される場合、個体が少なくとも１つのマーカーについてヘテロ接合性である可能性は非常に増加する。第２に、マーカー中の疾患遺伝子の位置の表示を決定することができる。これにより隣接マーカーを同定可能であり、最終的に疾患遺伝子が存在する小領域の単離が可能である。Ｌａｔｈｒｏｐら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８１、３４４３～３４４６、１９８４は、多点分析用の最も広範に使用されているコンピュータパッケージ（ＬＩＮＫＡＧＥ）を記載している。

【００１７】

高骨量表現型に関連する遺伝子の同定が当分野で必要である。高骨量遺伝子および表現型の研究用ツールもまた必要である。より一般的には、診断ツールおよび治療方法の開発が必要である。本発明は、これらならびに他の重要な目的に関する。

【発明の概要】

【００１８】

本発明の目的は、細胞中で発現された場合にＨＢＭ様表現型を示し、前記ＨＢＭ様表現型により骨量および／または脂質レベルが調整される、ＬＲＰ５またはＬＲＰ６中に変異を含む核酸を提供することである。別の実施形態は、変異がプロペラ１に存在することを意図する。別の実施形態では、核酸は、細胞中で発現された場合に表２もしくは３の少なくとも１つの変異を含むか、Ｇ１７１Ｖ、Ａ２１４Ｖ、Ａ６５Ｖ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｆ、Ｇ１７１Ｉ、Ｇ１７１Ｑ、Ｌ２００Ｖ、Ｔ２０１Ｖ、Ｉ２０２Ｖ、またはＳ１２７Ｖの１つの変異をコードし、被験体中での前記核酸の発現により骨量および／または脂質レベルが調整される。ＬＲＰ６の場合、変異は、被験体中での核酸の発現により骨量および／または脂質レベルが調整されるようなＬＲＰ５に等価な位置に存在する。別の実施形態では、ＬＲＰ５の好ましい変異は、Ｇ１７１Ｖ、Ａ２１４Ｖ、Ａ６５Ｖ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｆ、Ｇ１７１Ｉ、もしくはＧ１７１Ｑであるか、ＬＲＰ６を取り扱う場合、等価の位置に存在する。

【００１９】

本明細書中で意図する別の実施形態は、細胞中で発現した場合にＷｎｔシグナル伝達、ＬＲＰ５活性、および／またはＬＲＰ６活性を調整する任意の上記核酸によってコードされるポリペプチドである。ポリペプチドは、さらにまたは代替的に被験体中で発現した場合に骨量および／または脂質レベルを調整することができる。これらのポリペプチドまたはその生物学的活性なフラグメントは、好ましくは、ＬＲＰ５中またはＬＲＰ６中の等価の位置に表２、Ｇ１７１Ｖ、Ａ２１４Ｖ、Ａ６５Ｖ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｆ、Ｇ１７１Ｉ、Ｇ１７１Ｑ、Ｌ２００Ｖ、Ｔ２０１Ｖ、Ｉ２０２Ｖ、もしくはＳ１２７Ｖの任意の変異を含み得る。最も好ましい変異は、ＬＲＰ５中またはＬＲＰ６中の等価の位置のＧ１７１Ｖ、Ａ２１４Ｖ、Ａ６５Ｖ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｆ、Ｇ１７１Ｉ、またはＧ１７１Ｑである。

【００２０】

さらに別の実施形態は、これらのタンパク質に結合する抗体およびその免疫原性フラグメントを意図する。意図される抗体には、モノクローナル抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、primatized（登録商標）抗体、ヒト抗体、または標識抗体が含まれる。好ましくは、いくつかの抗体は、野生型および変異形態のＬＲＰ５およびＬＲＰ６を区

別することができる。

【００２１】

別の実施形態は、ＬＲＰ５の^{208}ＫＬＹＷＡＤＡＫＬＳＦＩＨＲＡＮ^{223}、^{277}ＡＬＹＳＰＭＤＩＱＶＬＳＱＥＲ^{291}、^{61}ＧＬＥＤＡＡＡＶＤＦＱＦＳＫＧＡ^{73}、^{234}ＥＧＳＬＴＨＰＦＡＬＴＬＳＧ^{247}、^{249}ＴＬＹＷＴＤＷＱＴＲＳＩＨＡＣＮ^{264}、^{144}ＶＬＦＷＱＤＬＤＱＰＲＡＩ^{156}、^{194}ＩＹＷＰＮＧＬＴＩＤＬＥＥＱＫＬＹ^{210}、^{34}ＬＬＬＦＡＮＲＲＤＶＲＬＶＤ^{47}、^{75}ＧＡＶＹＷＴＤＶＳＥＥＡＩＫＱ^{89}、^{121}ＫＬＹＷＴＤＳＥＴＮＲＩＥＶＡ^{135}、ＬＲＰ６の等価のドメイン、またはその変異型を含むポリペプチドに結合する抗体を意図する。

【００２２】

上記の抗体を、治療有効量の抗体または免疫原性フラグメントおよび薬学的に許容可能なキャリアを含む被験体の骨量および／または脂質レベルを調整するための組成物で使用することもできる。

【００２３】

本発明は、さらに、（Ａ）被験体から生体サンプルを得るステップと、（Ｂ）前記サンプルを記載の抗体または免疫原性フラグメントの１つに曝露するステップと、（Ｃ）前記抗体が前記被験体由来の生体サンプル由来のタンパク質に結合したかどうかを検出して前記被験体がＨＢＭ様表現型を有するかどうかを決定するステップとを含む、被験体のＨＢＭ様表現型の診断方法を意図する。

【００２４】

別の実施形態は、本明細書中に任意の記載の核酸に作動可能に連結された動物細胞および／またはヒト細胞中でタンパク質発現を指示するプロモーター領域を含む核酸を含む体細胞および／または生殖細胞を有するトランスジェニック動物であって、前記トランスジェニック動物が前記核酸の発現によって調整される少なくとも３つの骨パラメータを有する、トランスジェニック動物を意図する。プロモーター領域を、ＣＭＶ、ＲＳＶ、ＳＶ４０、およびＥＦ－１ａ、ＣＭＶβｂアクチン、ヒストン、Ｉ型コラーゲン、ＴＧＦβ１、ＳＸ２、ｃｆｏｓ／ｃｊｕｎ、Ｃｂｆａ１、Ｆｒａ／Ｊｕｎ、Ｄｌｘ５、オステオカルシン、オステオポンチン、骨シアロタンパク質、およびコラゲナーゼのプロモーター領域からなる群から選択することができる。

【００２５】

本発明のさらなる実施形態は、任意の記載のトランスジェニック動物から構成される第１の動物群および第２のコントロール動物群を含む、骨密度の調整および／または脂質レベルの調整を研究するための動物モデルを意図する。

【００２６】

別の実施形態は、（Ａ）請求項１１のベクターで細胞をトランスフェクトするステップと、（Ｂ）ステップ（Ａ）のトランスフェクトした細胞を化合物に曝露するステップと、および（Ｃ）前記化合物がＨＢＭ様核酸の活性を調整するかどうかを決定するステップとを含む、ＨＢＭ様核酸の活性を調整する薬剤の同定方法を提供する。このような薬剤には、ホルモン、成長因子、ペプチド、ＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ＤＮＡ、無機物、ビタミン、天然産物、または合成有機化合物を含み得る。

【００２７】

本発明の別の態様は、（Ａ）細胞を任意の記載の核酸を含む構築物でトランスフェクトするステップと、（Ｂ）Ｗｎｔ応答プロモーターに連結されたレポーターエレメントの発現の変化を評価するステップと、および（Ｃ）Ｄｋｋ構築物のみでトランスフェクトした細胞と比較してレポーター遺伝子発現が変化した任意の化合物を、Ｄｋｋ／Ｗｎｔ相互作用調整化合物として同定するステップとを含む、ＤｋｋのＷｎｔシグナル伝達経路との相互作用を調整する化合物の同定方法を提供する。細胞は、好ましくは、癌細胞、肝細胞、または骨細胞である。使用レポーターエレメントは、ＴＣＦ－ルシフェラーゼ、ｔｋ－Ｒｅｎｉｌｌａ、またはその組み合わせである。

【００２８】

さらに別の実施形態は、（Ａ）被験体から生体サンプルを得るステップと、および（Ｂ）ＨＢＭ表現型が得られるヌクレオチド変化の存在をアッセイするステップとを含む、表２または３のヌクレオチド変化または任意の他の変異を含む核酸を発現する被験体の診断方法を含む。

【００２９】

本発明はまた、Ｗｎｔ活性、Ｄｋｋ活性、骨量、および／または脂質レベルを調節する上記方法によって同定される薬剤を提供する。

【図面の簡単な説明】

【００３０】

【図１】遺伝子連鎖研究で使用した個体の家系図を示す。各個体の下にＩＤ番号（脊髄ＢＭＤについてのＺスコア）を記し、対立遺伝子は第１１染色体上の重要なマーカーを示す。黒べたの記号は、「罹患」個体を示す。「Ｎ」を含む記号は、「非罹患」個体である。３７人の個体由来のＤＮＡの遺伝子型を同定した。クエスチョンマークは、未知の遺伝子型または遺伝子型を特定していない個体を示す。

【図２】１１ｑ１３．３中のＨＢＭ領域のＢＡＣ／ＳＴＳ含有物理的地図を示す図である。遺伝子、ＥＳＴ、マイクロサテライト、ランダム配列、およびＢＡＣ末端配列由来のＳＴＳマーカーを、長い横線の上に示す。ＧＤＢ中に存在するマーカーについては、同一の用語を使用した。遺伝子座名（Ｄ１１Ｓ＃＃＃＃）を、利用可能な場合、最初の名称の後に括弧内に列挙する。ＢＡＣ末端配列由来のＳＴＳを、ＢＡＣ名の直後にクローンの左末端および右末端についてそれぞれＬまたはＲと列挙する。２つの大きな矢印は、ＨＢＭ重要領域を定義する遺伝子マーカーを示す。ＳＴＳの下の横線は、９ゲノム分のＢＡＣライブラリーのＰＣＲベースのスクリーニングによって同定されたＢＡＣクローンを示す。白丸は、ライブラリースクリーニング時にマーカーが対応するＢＡＣライブラリーアドレスを増幅しなかったことを示す。クローン名は、以下の順で使用する。ＢＡＣを示すＢ、プレート、行、および列のアドレス、ＨＢＭプロジェクトを示すＨ（すなわち、Ｂ３６Ｆ１６－Ｈ）。

【図３】隣接するイントロン配列を含むＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）のゲノム構造を示す図である。エクソン１中の下線を引いた「ＡＴＧ」によって翻訳が開始される。ＨＢＭ遺伝子中の多型部位はエクソン３中に存在し、下線を引いた「Ｇ」で示し、それによりこのヌクレオチドは、ＨＢＭ遺伝子中の「Ｔ」である。エクソン２３内のｍＲＮＡの３’翻訳領域に下線を引いている（エクソン１、配列番号４０；エクソン２、配列番号４１；エクソン３、配列番号４２；エクソン４、配列番号４３；エクソン５、配列番号４４；エクソン６、配列番号４５；エクソン７、配列番号４６；エクソン８、配列番号４７；エクソン９、配列番号４８；エクソン１０、配列番号４９；エクソン１１、配列番号５０；エクソン１２、配列番号５１；エクソン１３、配列番号５２；エクソン１４、配列番号５３；エクソン１５、配列番号５４；エクソン１６、配列番号５５；エクソン１７、配列番号５６；エクソン１８、配列番号５７；エクソン１９、配列番号５８；エクソン２０、配列番号５９；エクソン２１、配列番号６０；エクソン２２、配列番号６１；およびエクソン２３、配列番号６２）。

【図４】ＹＷＴＤスペーサー、細胞外結合部位、ＬＤＬおよびカルシウムの結合部位、システインリッチ成長因子反復、膜貫通ドメイン、ＣＫ－ＩＩリン酸化部位を含む理想的なＰＥＳＴ領域、および内在化ドメインを含むＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）のドメイン組成を示す図である。図４はまた、ＨＢＭタンパク質を出現するグリシンからバリンに変化する部位を示す。シグナルペプチドはアミノ酸１～３１に存在し、細胞外ドメインはアミノ酸３２～１３８５に存在し、膜貫通セグメントはアミノ酸１３８６～１４１３に存在し、細胞質ドメインはアミノ酸１４１４～１６１５に存在する。

【図５】ＨＢＭ遺伝子に関するＢＡＣコンティグＢ５２７Ｄ１２およびＢ２００Ｅ２１の略図である。

【図６】野生型遺伝子Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）のヌクレオチド（配列番号１）およびアミノ酸（配列番号３）を示す図である。ヌクレオチド５８２での塩基対置換（グアニン→チ

ミン）（配列番号２および４）の位置に下線を引いている。対立遺伝子変異型は、ＨＢＭ遺伝子である。ＨＢＭ遺伝子は、１７１位でグリシンからバリンにアミノ酸置換したタンパク質をコードする。５’非翻訳領域（ＵＴＲ）の境界は塩基１～７０であり、３’ＵＴＲの境界は塩基４９１６～５１２０である。

【図７】種々の組織中でのＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）の発現を示すノーザンブロット分析を示す図である。

【図８】ＰＣＲ産物の分析を示す図である。

【図９】Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）エクソン３変異の対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド検出を示す図である。

【図１０】センスおよびアンチセンスプローブを使用した倍率１００でのIn situハイブリダイゼーションによるマウスＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）の細胞中の位置を示す図である。

【図１１】センスおよびアンチセンスプローブを使用した倍率４００でのIn situハイブリダイゼーションによるマウスＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）の細胞中の位置を示す図である。

【図１２】センスおよびアンチセンスプローブを使用した倍率４００での骨内膜中の骨芽細胞のIn situハイブリダイゼーションによるマウスＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）の細胞中の位置を示す図である。

【図１３】ＭＣ－３Ｔ３細胞中でのＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）発現のアンチセンス阻害を示す図である。

【図１４】野生型Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）対立遺伝子（左側のパネル、Ｇ特異的オリゴ、５５℃での洗浄）と比較したＨＢＭ対立遺伝子（右側のパネル、Ｔ特異的オリゴ、５８℃での洗浄）の希少性を示すＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）エクソン３対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）アッセイを示す図である。右側のパネルで認められる陽性スポットは、正の対照を示す。

【図１５】接着斑シグナル伝達におけるＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）の潜在的役割を示すモデルを示す図である。

【図１６】内因性マウスＺｍａｘのノックアウトまたはＨＢＭ多型の条件的ノックインのための２つのＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子ターゲティングベクターの略図である。Ｂ、Ｘ、およびＲは、それぞれＤＮＡ　ＢＡＣ４７３５Ｐ５中のＢａｍＨＩ、ＸｂａＩ、およびＥｃｏＲＩ部位を示す。エクソン３、４、および５を黒四角で示す。Ｇ→Ｔ塩基変化をエクソン３の塩基２４で操作してＨＢＭ多型を産生させる。ネオマイシン耐性遺伝子および合成休止配列を含むＬｏｘＰ隣接カセットならびにＥＳ細胞クローンのスクリーニングおよび特徴づけで使用するプローブの位置も示す。

【図１７】トランスジェニック（すなわち、ＨＢＭＭＣＢＡおよびＨＢＭＭＴＩＣ）および野生型（すなわち、ＺｍａｘＷＴＣＢＡおよびＺｍａｘＷＴＴＩＣ）プラスミド構構築物による発現の確認を示す図である。これらの構築物を、ＨＯＢ－０２－０２細胞に一過性にトランスフェクトし、ＴａｑＭａｎ（登録商標）定量ＰＣＲを使用してｍＲＮＡレベルを決定した。ＨＢＭＭＣＢＡおよびＺｍａｘＷＴＣＢＡを左の列（すなわち、ＣＭＶβアクチン）に示し、ＨＢＭＭＴＩＣおよびＺｍａｘＷＴＴＩＣを右の列（すなわち、Ｉ型コラーゲン）に示す。

【図１８】ヒトおよびマウスＴａｑＭａｎ（登録商標）プライマー／プローブセットの比較を示す図である。ＨＯＢ（ＨＯＢ－０３－Ｃ５）およびマウス（ＭＣ－３Ｔ３－Ｅ１）骨芽細胞ｍＲＮＡを、プローブおよびプライマーを使用して分析した。

【図１９】ＴａｑＭａｎ（登録商標）プライマー／プローブセットを使用して混合ヒトおよびマウスＲＮＡバックグラウンドで発現したヒトＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）ｍＲＮＡの定量を示す図である。結果は、測定したヒトＺａｍｘ１（ＬＲＰ５）ｍＲＮＡ（ｎｇ）に対する付加したヒトＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）ｍＲＮＡ（ｎｇ）で示す。

【図２０】ＴａｑＭａｎ（登録商標）によって分析したｍＲＮＡ発現に基づくトランスジェニックマウス中でのＨＢＭの発現を示す図である。

【図２１】パネルＡ～Ｃは、脊椎（図２１Ａ）、大腿（図２１Ｂ）、および全身（図２１Ｃ）中にＨＢＭＭＣＢＡ構築物を発現する種々のトランスジェニックマウス系統の分析を

示す。パネルＤ～Ｆは、脊椎（図２１Ｄ）、大腿（図２１Ｅ）、および全身（図２１Ｆ）中にＨＢＭＭＴＩＣ構築物を発現する種々のトランスジェニックマウス系統の分析を示す。

【図２２】in vivo　ｐＤＸＡ＊分析を使用した５週間のＨＢＭトランスジェニックマウス（すなわち、ＨＢＭＭＣＢＡおよびＨＢＭＭＴＩＣ構築物）におけるＢＭＤの変化を示す図である。５週齢のみの野生型動物と比較したＢＭＤの変化を示す。

【図２３】in vivo　ｐＤＸＡ＊分析を使用した９週間のＨＢＭトランスジェニックマウス（すなわち、ＨＢＭＭＣＢＡおよびＨＢＭＭＴＩＣ構築物）におけるＢＭＤの変化を示す図である。９週齢のみの野生型動物と比較したＢＭＤの変化を示す。

【図２４】（Ａ～Ｄ）ベクターにサブクローン化した遺伝子の挿入断片ＨＢＭＧＩ＿２ＡＳの配列（配列番号７５９）を示す図である。

【図２５】（Ａ～Ｄ）ベクターにサブクローン化した遺伝子の挿入断片ＺＭＡＸＧＩ＿３ＡＳの配列（配列番号７６０）を示す図である。

【図２６】（Ａ～Ｃ）ヒト（配列番号７６１）およびマウス（配列番号７６２）のＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）アミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

【図２７】（Ａ～Ｃ）ヒトＬＲＰ５（Ｚｍａｘ１）（配列番号７６３）およびＬＲＰ６（配列番号７６４）のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

【図２８】Ｗｎｔシグナル伝達経路の構成要素の略図である。略図は、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｓｔａｎｆｏｒｄ．ｅｄｕ．／～ｍｕｓｓｅ／ｐａｔｈｗａｙｓ／ｃｅｌｌ２．ｈｔｍｌから得た。

【図２９】ＬＲＰ５中の変異Ｇ１７１ＦによりＨＢＭ活性と一致するＬＲＰ５よりもＷｎｔ経路が活性化されることを示す図である。

【図３０】ＬＲＰ５中の変異Ｍ２８２ＶによりＵ２ＯＳ細胞中のＨＢＭ活性と一致するＷｎｔ経路が活性化されることを示す図である。

【図３１】Ｄｋｋ－１ベイト配列を使用してＹ２Ｈスクリーニングで同定されたタンパク質の表である。これらのタンパク質を、核酸およびアミノ酸のアクセッション番号によって同定する。

【図３２】ＬＲＰ５およびＨＢＭウイルス感染細胞中にＨＢＭ変異を含む配列（アミノ酸１６５～１７７）に対して作製した抗体の異なる結合を示す図である。

【図３３】Ｗｎｔ活性についてのアフリカツメガエル胚アッセイの略図である。

【図３４】アフリカツメガエル胚アッセイにおけるＷｎｔシグナル伝達に対するＺｍａｘ／ＬＲＰ５およびＨＢＭの効果を示す図である。

【図３５】アフリカツメガエル胚アッセイにおける二次軸形成の誘導に対するＺｍａｘ／ＬＲＰ５およびＨＢＭの効果を示す図である。

【図３６】標準的なＷｎｔ経路の抑制に対するヒトＤｋｋ－１の効果を示す図である。

【図３７】Ｚｍａｘ／ＬＲＰ５およびＨＢＭ媒介Ｗｎｔシグナル伝達に対するヒトＤｋｋ－１の効果を示す図である。

【図３８】ＬＲＰ５リガンド結合ドメインベイト配列を使用したＹ２Ｈスクリーニングで同定されたペプチドアプタマー挿入断片配列の表である。

【図３９】ＬＲＰ５結合ペプチドアプタマー、Ｄｋｋ－１ペプチド、およびコントロール構築物のヌクレオチド配列を含むｐｃＤＮＡ３．１構築物名を示す図である。

【図４０】ＬＲＰ５を使用したＤｋｋ－１の最小相互作用ドメインマッピングスクリーニングの結果を示す図である。上：シグナル配列ならびにシステインリッチドメイン１および２の位置を示すＤｋｋ－１の地図。下：ＬＲＰ５　ＬＢＤベイト、ＬＢＤ１およびＬＢＤ４を使用して試験したドメインの範囲。右：実験で認められた結合の結果のスコア表示。

【図４１】ＨＯＢ０３ＣＥ６細胞での補助受容体ＬＲＰ５、ＨＢＭ、およびＬＲＰ６を使用したＷｎｔ１シグナル伝達に対するＤｋｋ－１およびＤｋｋ－２の効果を示す図である。

【図４２】ＨＯＢ０３ＣＥ６細胞での補助受容体ＬＲＰ５、ＨＢＭ、およびＬＲＰ６を使

用したＷｎｔ３ａシグナル伝達に対するＤｋｋ－１およびＤｋｋ－２の効果を示す図である。
【図４３】ＬＲＰ５－ＬＢＤペプチドアプタマー２６２がＵ２ＯＳ細胞中でＷｎｔ３ａの存在化でＷｎｔシグナル伝達を活性化することを示す図である。
【図４４】図３９の対応するＬＲＰ５結合ペプチド、Ｄｋｋ－１ペプチドアプタマー、およびコントロール構築物のアミノ酸配列を示す図である。
【図４５】高処理スクリーニング用の細胞ベースのレポーター遺伝子アッセイを使用して、Ｄｋｋ－１がＵ２ＯＳ骨細胞でのＷｎｔ３ａ媒介Ｗｎｔシグナル伝達を示す図である。
【図４６】Ｗｎｔ１－ＨＢＭ作製シグナル伝達がＵ２ＯＳ骨細胞中でＤｋｋ－１によって阻害されない一方で、ＬＲＰ５およびＬＲＰ－６媒介シグナル伝達は高処理スクリーニングのために細胞ベースのレポーター遺伝子アッセイを使用することを示す図である。
【図４７】高処理スクリーニングのための細胞ベースのレポーター遺伝子アッセイにおけるＴＣＦシグナルを、ＷｎｔＤＮＡトランスフェクションを行わずにＤｋｋ－１およびＤｋｋ－１－ＡＰによって調整することができることを示す図である。
【図４８】Ｗｎｔシグナル伝達を活性化するためのＬＲＰ５－ＬＢＤ由来のアプタマー２６１および２６２を使用したアフリカツメガエルアッセイにおける形態学の結果を示す図である。
【図４９】ＬＲＰ５－ＬＢＤアプタマー２６１および２６２は他のＬＲＰ５アプタマーを超えるＷｎｔシグナル伝達を誘導することを示す図である。
【図５０】ＬＲＰ５ドメイン構造を示す図である。右上に記号を定義している。構造ドメインを、プロペラ１、ＥＧＦ様ドメイン１、プロペラ２、ＥＧＦ様ドメイン２（以下同様）としてタンパク質のＮ末端からＣ末端に対応して上から下に連続番号をつけている。Ｓｐｒｉｎｇｅｒら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ、２８３、８３７～６２に記載のモチーフおよび用語を使用して構造を決定した。
【図５１】ヒト（ａｆ０７７８２０ｈ）およびマウス（ａｓ０６４９８４ｍおよびａｆ０７７８４７ｍ）由来のＬＲＰ５、ヒト（ａｆ０７４２６４ｈ）およびマウス（ａｆ０７４２６５ｍ）由来のＬＲＰ６のβプロペラセグメントとモデル化６ブレードβプロペラ：ニワトリＬＲＰ１（１ｌｐｘ）およびヒトニドゲン（１ｎｄｘ）を含むタンパク質由来の配列とのＣＬＵＳＴＡＬＷ（１．８）多配列アラインメントを示す図である。ＬＲＰについては、最後につけた文字は４つのプロペラドメインのうちのどの配列に由来するかを示す（ａ→プロペラ番号１、ｂ→プロペラ番号２など）。最後の４行は、このアラインメントで与えられた全配列についてＤＳＣによって予想される二次構造の割り当てを示し（Ｈ＝ヘリックス、Ｅ＝鎖、およびＣ＝コイル）、各位置での各構造型に０（最も確率が低い）から９（最も確率が高い）のスケールで重みを割り当てた。Ｓｐｒｉｎｇｅｒモデルの標準的な位置に対応する配列に下線を引き、この位置に属する６つブレードを色分けする。プロペラの幾何学では、別のループが、円盤型ドメインに対面して存在する。「上」面上のループ（すなわち、侵入点の反対側および構造由来の鎖の出口）を赤に着色する。Ｇ１７１Ｖ変異の位置に「＊」で印をつける。
【図５２】野生型Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）タンパク質と比較したＨＢＭタンパク質の側鎖相互作用に対する変異の機能的効果を示す図である。Ｇ１７１Ｆ（ＨＢＭ様変異型）の側鎖相互作用も示す。
【図５３】ＯＰＰＧ変異対野生型Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）による構造の変化を示す図である。パネルＡは、ＬＲＰ５の第２のプロペラドメインのホモロジーモデルを示し、パネルＢは、第３のプロペラドメインを示し、パネルＣは、２つの変異を有する第２のプロペラドメインを示す。
【発明を実施するための形態】
【００３１】
１．定義
明細書および特許請求の範囲の理解を助けるために、以下の定義を提供する。
【００３２】

「遺伝子」は、その鋳型または伝令ＲＮＡによって特定のペプチドに特徴的なアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列をいう。用語「遺伝子」には、介在領域、非コード領域、ならびに調節領域が含まれ、および５’および３’末端を含み得る。

【００３３】

「核酸」は、一本鎖および二本鎖核酸（ＤＮＡ、ＴＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ）、ｃＤＮＡ、組換えＤＮＡ（ｒＤＮＡ）、ｒＲＮＡ、アンチセンス核酸、オリゴヌクレオチド、ならびにオリゴマーおよびポリヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない）が含まれることを意味する。この用語には、ＲＮＡおよび／またはＤＮＡの三本鎖領域または二本鎖ＲＮＡ：ＤＮＡハイブリッドなどのハイブリッドも含み得る。この用語はまた、修飾核酸（ビオチン化核酸、トリチル化核酸、フルオロフォア標識核酸、イノシンなどが含まれるが、これらに限定されない）が含まれることが意図される。

【００３４】

「遺伝子配列」は、遺伝子を含む非転写または非翻訳配列を含むＤＮＡが含まれる核酸分子をいう。この用語はまた、同一のＤＮＡ分子上に存在する遺伝子、遺伝子フラグメント、非転写配列、または非翻訳配列の任意の組み合わせを含むことが意図される。

【００３５】

本発明の核酸配列は、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、合成ＤＮＡ、合成ＲＮＡ、またはこれらの組み合わせを含む種々の供給源に由来し得る。このような配列は、天然に存在するイントロンを含んでも含まなくてもよいゲノムＤＮＡを含み得る。さらに、このようなゲノムＤＮＡを、プロモーター領域および／またはポリ（Ａ）配列と関連して得ることができる。配列（ゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡ）を、任意のいくつかの方法で得ることができる。ゲノムＤＮＡを、当分野で周知の手段によって適切な細胞から抽出および精製することができる。あるいは、ｍＲＮＡを細胞から単離し、これを使用して逆転写または他の手段によってｃＤＮＡを産生することができる。

【００３６】

「ｃＤＮＡ」は、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ（逆転写酵素）の作用によってＲＮＡテンプレートから産生された相補ＤＮＡまたはコピーＤＮＡをいう。したがって、「ｃＤＮＡクローン」は、一方の鎖がクローニングベクター中に含まれるかＰＣＲで増幅される目的のＲＮＡ分子である二重鎖ＤＮＡ配列を意味する。ｃＤＮＡはまた、逆転写酵素による最初の鎖合成後の一本鎖であり得る。この形態で、有用なＰＣＲテンプレートであり、クローニングベクター中に含まれる必要はない。この用語には、介在配列が除去された遺伝子が含まれる。したがって、用語「遺伝子」は、しばしば一般的に使用されるように、ｃＤＮＡおよびｃＤＮＡクローンを含む核酸分子を含み得る。

【００３７】

「組換えＤＮＡ」は、in vitroでのｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ配列のスプライシングまたはＰＣＲ変異誘発などの方法による配列の変化によって操作された分子を意味する。

【００３８】

「クローニング」は、特定の遺伝子または他のＤＮＡ配列をベクター分子に挿入するin vitro組換え技術の使用をいう。所望の遺伝子を首尾よくクローニングするために、ＤＮＡフラグメントの作製方法、フラグメントのベクター分子への連結方法、複合ＤＮＡ分子の複製可能な宿主細胞への移入方法、およびレシピエント宿主細胞から標的遺伝子を有するクローンの選択方法を使用する必要がある。

【００３９】

「ｃＤＮＡライブラリー」は、特定の組織または細胞供給源中で発現する遺伝子レパートリーの全体または一部を共に含むｃＤＮＡ挿入断片を含む組換えＤＮＡ分子集団をいう。このようなｃＤＮＡライブラリーを、当業者に公知であり、例えば、Ｃｏｗｅｌｌ ａｎｄ Ａｕｓｔｉｎ、「ｃＤＮＡライブラリープロトコール」、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、１９９７に記載されている方法によって調製することができる。

【００４０】

「クローニング送達体」は、宿主細胞中で複製することができるプラスミドまたはファージＤＮＡまたは他のＤＮＡ配列をいう。この用語には、ＢＡＣおよびＹＡＣなどの人工染色体を含み得る。クローニング送達体は、このようなＤＮＡ配列が形質転換細胞の同定での使用に適切なマーカーを含み得る、ＤＮＡの不可欠な生物学的機能を喪失することなく決定的な様式で切断することができる１つまたは複数のエンドヌクレアーゼ認識部位によって特徴付けられる。

【００４１】

「発現」は、最終遺伝子産物を産生するための遺伝子配列の転写およびその後のプロセシングステップ（得られたｍＲＮＡの翻訳など）を含むプロセスをいう。最終産物は、タンパク質（酵素または受容体など）または核酸（ｔＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、または他の調節因子など）であり得る。用語「発現調節配列」は、これらの遺伝子が作動可能に連結された場合に構造遺伝子の発現を調節または制御するヌクレオチド配列をいう。これらには、例えば、ｌａｃ系、ｔｒｐ系、λファージの主要なオペレーターおよびプロモーター領域、ｆｄコートタンパク質の調節領域、および原核細胞または真核細胞中の遺伝子発現を調節することが公知の他の配列が含まれる。発現調節配列は、ベクターが原核宿主または真核宿主中で作動可能に連結された遺伝子を発現するようにデザインされているかどうかによって変化し、この配列は、エンハンサーエレメントなどの調製エレメント、終結配列、組織特異性配列、および／または翻訳阻害および終結部位を含み得る。

【００４２】

「発現送達体」は、クローニング送達体に類似しているが、宿主への形質転換後に発現送達体にクローニングされた遺伝子を発現することができる送達体またはベクターをいう。クローン化遺伝子は、通常、発現調節配列の調節下におかれる（すなわち、これに作動可能に連結されている）。

【００４３】

「オペレーター」は、特異的リプレッサーと相互作用して隣接遺伝子の転写を調節することができるＤＮＡ配列をいう。

【００４４】

「プロモーター」は、ＲＮＡポリメラーゼによって認識することができるＤＮＡ配列をいう。このような配列の存在によって、ＲＮＡポリメラーゼに結合し、作動可能に連結された遺伝子配列の転写が開始される。

【００４５】

「プロモーター領域」は、プロモーターおよび転写開始に必要とすることができる他の遺伝子配列を含むことが意図される。プロモーター領域の存在は、作動可能に連結された遺伝子配列の発現に十分である。用語「プロモーター」は、一般にプロモーター領域を含むようにしばしば当分野で使用される。一定の細胞型における遺伝子発現を指示する多数の異なるプロモーターが当分野で公知である。組織特異的プロモーターは、一定の組織型の細胞中での発現レベルを増加（または減少）させる核酸配列を含み得る。

【００４６】

「作動可能に連結された」は、プロモーターが遺伝子発現の開始を調節することを意味する。プロモーターは隣接ＤＮＡ配列に作動可能に連結されて、宿主細胞に移入された場合に隣接ＤＮＡ配列の１つまたは複数のＲＮＡ種への転写を決定する。プロモーターがＤＮＡ配列の転写を開始することができる場合に、プロモーターはＤＮＡ配列に作動可能に連結される。

【００４７】

「原核生物」は、真の核を含まない全ての生物（細菌を含む）をいう。

【００４８】

「真核生物」は、真の核を有する生物および細胞（哺乳動物細胞を含む）をいう。

【００４９】

「宿主」には、酵母および糸状菌ならびに植物および動物細胞など原核生物および真核生物が含まれる。この用語には、複製可能な発現伝達体のレシピエントである生物または

細胞が含まれる。

【００５０】

用語「動物」は、本明細書中で、ヒト以外の全ての脊椎動物を含むために使用される。動物には、胚および胎児段階を含む全発生段階の各動物も含まれる。好ましい動物には、鳥類、げっ歯類（例えば、マウス、ウサギ、ラット、チンチラ、モルモット、ハムスターなど）などの高等真核生物、および哺乳動物が含まれる。好ましい哺乳動物には、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、バッファロー、ヒト、および霊長類が含まれる。

【００５１】

「トランスジェニック動物」は、意図的な遺伝子操作または細胞内レベルで操作した先祖からの遺伝子の遺伝（組換えウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス）での微量注入または感染など）によって直接または間接的に受けた遺伝情報を有する１つまたは複数の細胞を含む動物である。この移入したＤＮＡ分子を染色体内に組み込むか、ＤＮＡを染色体外で複製することができる。

【００５２】

本明細書中で使用される、「胚性幹細胞」または「ＥＳ細胞」は、通常、未分化細胞である多能性の胚由来の細胞または細胞株である。これらの細胞はまた、相同組換えおよびその後の宿主胚に組み込まれた場合の体内の任意の組織への発生によって外因性ＤＮＡを組み込むことができる。当分野で十分に理解されている方法によって胚組織以外の供給源から多能性細胞を単離することが可能である。

【００５３】

マウス中の胚性幹細胞により、研究者らは、トランスジェニック細胞を選択し、遺伝子ターゲティングを行うことができる。これにより、他のトランスジェニック技術よりも多数の遺伝子操作が可能である。例えば、マウスＥＳ細胞は、コロニーとしてin vitroで比較的容易に成長する。細胞を、標準的な手順によってトランスフェクトし、抗生物質耐性によってトランスジェニック細胞をクローニングによって選択することができる。例えば、Ｄｏｅｔｓｃｈｍａｎら、１９９４、Ｇｅｎｅ ｔｒａｓｆｅｒ ｉｎ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ、Ｐｉｎｋｅｒｔ編、「トランスジェニック動物テクノロジー：実験ハンドブック」、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１１５～１４６頁を参照のこと。さらに、このプロセスの効率は、相同組換えのための第２の選択を行うためのトランスジェニッククローン（数百から数千）を産生することができるほど十分である。次いで、マウスＥＳ細胞を、正常な宿主胚と合わせ、これらはその潜在性を保持しているので、生殖細胞を含む獲得キメラ動物中の全組織に発生することができる。次いで、トランスジェニック修飾を、その後の世代に伝えることができる。

【００５４】

初期移植前マウス胚からin vivoで胚性幹（ＥＳ）細胞を誘導する方法は周知である。例えば、Ｅｖａｎｓら、１９８１、Ｎａｔｕｒｅ、２９、１５４～６およびＭａｒｔｉｎ、１９８１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７８、７６３４～８を参照のこと。線維芽細胞の支持細胞層または分化阻害供給源が存在する場合、ＥＳ細胞を未分化状態で継代することができる。

【００５５】

用語「体細胞」は、精子細胞や卵細胞ではないか、精子や卵細胞になることができない任意の動物またはヒト細胞を示す。用語「生殖細胞」または「生殖系列細胞」は、精子または卵細胞のいずれかであるか、精子または卵細胞に成長することができ、それによりその遺伝子情報が子孫に継代される任意の細胞をいう。用語「生殖細胞系列トランスジェニック動物」は、遺伝情報が生殖系列細胞に組み込まれて、情報を子孫に伝達する能力が付与されたトランスジェニック動物をいう。このような子孫が実際に情報のいくらかまたは全部を有する場合、これらもトランスジェニック動物である。

【００５６】

遺伝情報遺伝子の変化は、属するレシピエントの動物種に対して外来であるか、特定の各レシピエントのみに対して外来であり得る。最終的に、変化または移入された遺伝子を、天然の遺伝子と異なって発現することができる。

【００５７】

遺伝子の「フラグメント」は、遺伝子配列の任意の部分をいう。「生物学的に活性なフラグメント」は、この遺伝子の少なくとも１つの生物活性を保持する遺伝子の任意の部分をいう。例えば、フラグメントは、おそらく、その同起源の配列とハイブリダイゼーションすることができ、由来する遺伝子によってコードされるポリペプチドフラグメントに翻訳することができる。

【００５８】

「変異型」は、遺伝子全体または遺伝子のフラグメントと構造および生物活性または免疫学的特長が実質的に類似している遺伝子をいう。２つの遺伝子が類似の活性を有する場合、コードされたアミノ酸残基の配列が同一でないとしても、これらを本発明で使用される用語としての変異型とみなす。好ましくは、本明細書中で使用される（特記しない限り）、「変異型」は、ＬＲＰ５、ＨＢＭ、またはＬＲＰ６のうちの１つである。変異型は、好ましくは、ＨＢＭ様表現型（すなわち、骨量を増大させ、そして／または脂質レベルを調整する）が得られるものである。これらの変異型には、ミスセンス変異、一塩基多型（ＳＮＰ）、遺伝子または核酸によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を変化させる変異、およびその組み合わせ、ならびにＨＢＭ遺伝子のエクソンドメインのコムおよびＨＢＭ様表現型が得られるＬＲＰ５もしくはＬＲＰ６の変異が含まれる。

【００５９】

「核酸の増幅」は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、ライゲーション増幅（またはリガーゼ連鎖反応、ＬＣＲ）などの方法およびＱ－βレプリカーゼの使用に基づく増幅方法をいう。これらの方法は当分野で周知であり、例えば、米国特許第４，６８３，１９５号および同第４，６８３，２０２号に記載されている。ＰＣＲ用の試薬およびハードウェアは、市販されている。ＨＢＭ領域由来の配列の増幅に有用なプライマーは、ＨＢＭ領域またはＨＢＭ中の標的領域に隣接する領域中の配列に相補的であり、且つ特異的にハイブリダイゼーションすることが好ましい。増幅によって作製されたＨＢＭ配列を、直接配列決定することができる。あるいは、増幅配列を、配列決定前にクローニングすることができる。

【００６０】

「抗体」はＨＢＭタンパク質およびそのフラグメントまたはＨＢＭ領域（特に、ＨＢＭ遺伝子座またはその一部）由来の核酸配列に結合することができるポリクローナルおよび／またはモノクローナル抗体ならびにそのフラグメント、およびその免疫結合等価物をいうことができる。好ましい抗体には、ＬＲＰ５、ＬＲＰ６、およびＨＢＭ変異型に結合することができる抗体も含まれる。用語「抗体」は、同質の分子または複数の異なる分子から作製された血清産物などの混合物の両方をいうために使用される。タンパク質を、タンパク質合成機で調製し、キャリア分子に結合させ、数ヶ月間にわたりウサギに注射することができる。ウサギ血清を、ＨＢＭタンパク質またはフラグメントに対する免疫反応性について試験する。マウスのタンパク質またはそのフラグメントへの注射によってモノクローナル抗体を作製することができる。モノクローナル抗体を、ＥＬＩＳＡによってスクリーニングし、ＨＢＭタンパク質またはそのフラグメントとの特異的免疫反応性について試験する。Ｈａｒｌｏｗら、「抗体：実験マニュアル」、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９８８および「抗体の使用：実験マニュアル」、Ｈａｒｌｏｗ Ｅｄ ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ｄａｖｉｄ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、１９９９）。これらの抗体は、アッセイおよび医薬品として有用である。「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、多特異性抗体、primatized（商標）抗体を含むことを意味する。

【００６１】

「ＨＢＭタンパク質」は、グリシン１７１がバリンに変化していること以外はＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）タンパク質と同一のタンパク質をいう。ＨＢＭタンパク質を、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）の真のホモログをコードする任意の有機体と定義する。例えば、マウスＨＢＭタンパク質は、グリシン１７１がバリンに置換されたマウスＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）タンパク質をいう。

【００６２】

「ＨＢＭ様」は、細胞中で発現した場合に骨量、脂質レベル、Ｄｋｋ活性、および／またはＷｎｔ活性を調整することができるＬＲＰ５、ＬＲＰ６、またはＨＢＭの変異型を意味する。

【００６３】

本発明の１つの実施形態では、「ＨＢＭ遺伝子」は、配列が配列番号４に記載のタンパク質をコードする場合にＨＢＭの特徴または表現型を示す個体中に見出されるゲノムＤＮＡ配列をいう。ＨＢＭ遺伝子およびＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子は対立遺伝子である。ＨＢＭ遺伝子によってコードされるタンパク質は、骨量を増加させる特性を有し、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子によってコードされるタンパク質はこの特性を示さない。ＨＢＭ遺伝子およびＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子は、ＨＢＭ遺伝子が５８２位にチミンを有し、Ｚｍａｘ１遺伝子が５８２位にグアニンを有するという点で異なる。ＨＢＭ遺伝子は、配列番号２に示す核酸配列を示す。ＨＢＭ遺伝子はまた、「ＨＢＭ多型」をいうことができる。他のＨＢＭ遺伝子は、以下の第３節に記載のサイレント変異をさらに有し得る。

【００６４】

本発明の別の実施形態では、「ＨＢＭ遺伝子」はまた、ＨＢＭ表現型が得られるＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）またはＬＲＰ６の任意の対立遺伝子変異型をいうことができる。このような変異型には、本明細書中に記載の野生型タンパク質コード配列の変化および／またはＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）の発現調節配列の変化を含み得るか、得られたタンパク質が骨量を増大させ、そして／または脂質レベルを調整するようにＬＲＰ５またはＬＲＰ６のアミノ酸変異を含む。このような変異型の好ましい例は、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）タンパク質の発現を増大させる内因性Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）プロモーター領域の変化である。

【００６５】

「正常」、「野生型」、「非罹患」、「Ｚｍａｘ１」、「Ｚｍａｘ」、「ＬＲ３」、および「ＬＲＰ５」は、全て配列番号３に示すタンパク質をコードするゲノムＤＮＡ配列をいう。ＬＲＰ５はまた、マウスにおけるＬＲＰ７をいう。Ｚｍａｘ１、ＬＲＰ５、およびＺｍａｘを、明細書全体で交換可能に使用することができ、異なる生物中の遺伝子のみに関連する同一の遺伝子であることを意味する。Ｚｍａｘ遺伝子は、ヒト配列中の５８２位にグアニンを有する。ヒトのＺｍａｘ１遺伝子は、配列番号１に示す核酸配列を含む。「正常」、「野生型」、「非罹患」、「Ｚｍａｘ１」、および「ＬＲＰ５」は、骨量増加に寄与しないタンパク質をコードするゲノム配列の対立遺伝子変異型をいう。Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子は、ヒト集団で共通しているが、ＨＢＭ遺伝子は稀である。

【００６６】

「５ＹＷＴＤ＋ＥＧＦ」は、５つのＹＷＴＤ反復およびその後のＥＧＦ反復からなるＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）タンパク質で見出される反復単位をいう。

「骨発達」は、一般に、例えば、正常な発達、疾患時に生じる変化、および加齢による変化を含む長期にわたる骨の変化に関与する任意の過程をいう。これは、成長率、吸収率、および骨修復率などの動的比率における構造変化をいうことができる。「骨発達疾患」は、特に、骨発達における任意の疾患をいい、例えば、疾患中に生じる変化および加齢によって生じる変化が含まれる。骨発達は、本質的に進行性または周期的であり得る。発達時に変化し得る骨の態様には、例えば、鉱化作用、特異的解剖学的特徴の形成、および種々の細胞型の相対数もしくは絶対数が含まれる。

【００６７】

「骨調整」または「骨形成の調整」は、当業者に認識される骨再造形に関連する任意の生理学的過程（例えば、骨吸収および骨付加成長、特に、破骨細胞および骨芽細胞活性が

含まれるが）に影響を与える能力をいい、本明細書中に使用のいくつかまたは全ての骨形成および成長を含み得る。

【００６８】

骨は、継続的な適応ならびに破骨細胞による古いか不必要な骨の除去による骨自体の更新および骨芽細胞による新規の骨の再構築を行う動的組織である。これらの過程を組み合わせる性質は、成長中の骨の造形ならびに機械的な使用における毎日の要求を満たすための再造形および修復による成人骨格完全の維持の両方を担う。骨吸収および形成との間の均衡の崩壊に起因する多数の骨疾患が存在する。加齢により、骨代謝回転の「生理学的」均衡が段階的に崩壊し、これは特に更年期のエストロゲン支持の喪失により女性で悪化し、骨喪失が進行する。骨量の減少および骨構築の変質により、自発的骨折に対する骨の脆弱性および感受性が増大する。１０％毎の骨喪失により骨折リスクが２倍になる。脊椎または近位大腿骨中の骨中無機質密度（ＢＭＤ）が正常なピーク骨量よりも２．５またはそれ以上の標準偏差で低い個体は、骨粗鬆症と分類される。しかし、正常な個体よりもＢＭＤが１と２．５との間の標準偏差で低い骨粗鬆症患者は、明らかに骨喪失関連疾患の罹患リスクがある。

【００６９】

骨調整を、骨中無機質密度（ＢＭＤ）およびｐＤＸＡ　Ｘ線法による骨中無機質含有率（ＢＭＣ）、Ｘ線によって測定した骨のサイズ、厚さ、または体積、例えばカルセイン標識によって測定した骨形成率、ｐＱＣＴおよび／またはｍＣＴ法によって測定した全身、骨梁、および密度、ｍＣＴ法によって測定した結合性、他の組織学的パラメータ、好ましくは大腿骨および椎骨でそれぞれ測定した機械的曲げ強さおよび圧縮強度などのパラメータの測定によって評価することができる。当業者に認識されるように、これらの測定法の性質により、それぞれ所与の条件で幾分適切であり得る。さらに、骨折、骨形状、および骨形態学、結合性、正常な組織学、骨折修復率、および他の骨質パラメータが存在しない病歴などのパラメータおよび方法論が当分野で公知であり、且つ使用されている。最も好ましくは、骨質を、このような測定が適切な場合に椎骨の圧縮強度によって評価することができる。様々なパラメータにおける変化率によって、骨変調も評価される。最も好ましくは、１年を超えて骨調整を評価する。

【００７０】

「正常骨密度」は、ＨＢＭ連鎖研究の状況におけるＺスコア０の標準偏差２以内の骨密度をいう。一般的な状況では、正常骨密度パラメータ範囲を、日常的な統計法によって決定する。正常なパラメータは、年齢および性の正規化パラメータの１または２標準偏差以内、好ましくは約２標準偏差以内である。有意味性の統計的基準は、関連する測定が平均と有意に異なる尤度を示すことができるＰ値である。有意なＰ値は、Ｐ＜０．０５、０．０１、０．００５、および０．００１、好ましくは少なくともＰ＜０．０１である。

【００７１】

「ＨＢＭ」は、「高骨量」をいうが、この用語を骨密度、無機質含有量、およびサイズの用語で示すこともできる。

【００７２】

「ＨＢＭ表現型」および「ＨＢＭ様表現型」を、１、２、３、４、５、またはそれ以上の骨調整、好ましくは骨密度および無機質含有量の定量的パラメータならびに骨強度パラメータにおける約２またはそれ以上の標準偏差の増加、より好ましくは２、２．５、３、またはそれ以上の標準偏差の増加（このパラメータについての年齢および性の基準を超える）によって特徴付けることができる。ＨＢＭ表現型およびＨＢＭ様表現型を、少なくとも１つのパラメータ、好ましくは少なくとも２つのパラメータ、より好ましくは少なくとも３つまたはそれ以上のパラメータの統計的に有意な増加によって特徴付ける。ＨＢＭ表現型およびＨＢＭ様表現型を、１つまたは複数の骨質パラメータの増加によっても特徴付けることができ、最も好ましくは、パラメータの増加は、いかなる骨量パラメータの減少にも付随しない。最も好ましくは、骨調整パラメータおよび／または骨質測定の増加を１年を超えて観察する。ＨＢＭ表現型およびＨＢＭ様表現型には、脂質レベル、Ｗｎｔ活性

、および／またはＤｋｋ活性の変化も含まれる。

【００７３】

「Ｚｍａｘ１系」または「ＬＲＰ５系」は、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）が正常形態または変異形態で存在する精製タンパク質、細胞抽出物、細胞、動物、ヒト、または任意の他の物質の組成物をいう。

【００７４】

用語「単離した」および「精製した」は、天然の環境からヒトの手によって変化させた物質をいう。単離ペプチドは、例えば、実質的に純粋な形態であるか単離細胞株もしくはトランスジェニック動物中での発現などによるその天然の環境から置き換えられた形態であり得る。単離配列は、例えば、実質的に純粋な形態であるか、少なくとも１つの単離配列の末端が天然で連続している配列と連続しないようにその天然の環境から置き換えられた形態であり得る。

【００７５】

「代理マーカー」は、ＨＢＭ遺伝子と相関するか骨量を増加させるかその両方を行うが、骨密度よりも測定が容易な細胞、組織、ヒト、または動物中に認められる診断の指標、症状、徴候、または他の特徴をいう。代理マーカーの一般概念は、診断薬で十分に認められている。

【００７６】

本発明は、それぞれ配列番号１および３で示した形態のＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子およびＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）タンパク質、および他の密接に関連する変異型、ならびにその正確な発現に必要なＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）の隣接染色体領域を含む。好ましい実施形態では、本発明は、配列番号１の核酸配列の少なくとも１５個の連続するヌクレオチドに指向する。

【００７７】

本発明は、さらに、骨量を増大させ、そして／または脂質を調整し、そして／またはＷｎｔシグナル伝達経路を調整するＬＲＰ６遺伝子の変異型およびその対応するタンパク質を含む。

【００７８】

「生物学的に活性な」は、保存的に置換された変異型（野生型タンパク質またはポリペプチドの生物学的および／または免疫学的活性を保持するタンパク質またはタンパク質のポリペプチドフラグメントをコードする遺伝子の対立遺伝子）を含むタンパク質およびポリペプチドの形態をいう。好ましくは、活性は、Ｄｋｋまたは別のリガンド結合パートナーを含むＤｋｋ（例えば、図３１に示すものなどのＤｋｋ－１相互作用タンパク質を含むＤｋｋ－１）とのＬＲＰ５もしくはＬＲＰ６またはその変異型の相互作用の阻害などのＬＲＰ５、ＬＲＰ６、またはＤｋｋ活性の変化を誘導する活性である。「生物学的に活性な」はまた、Ｗｎｔシグナル伝達を調整する任意の形態を含むことを意味する。

【００７９】

「調整する」および「調節する」は、酵素、インヒビター、シグナル伝達物質、受容体、転写活性化物質、および補因子などの野生型活性を増加または減少させる方法、条件、または薬剤を意味する。この活性の変化は、ｍＲＮＡ翻訳、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡ転写、および／またはｍＲＮＡもしくはタンパク質分解の増加または減少であり、同様に生物活性の増加または減少に対応し得る。

【００８０】

「活性の調整」および「活性の調節」は、タンパク質の生物学的に活性な形態によって調整される任意の活性、病態、疾患、または表現型を意味する。生物学的に活性なタンパク質の濃縮または細胞内局在化（すなわち、発現もしくは分解の調節または例えば阻害、活性化、結合、基質の放出、化学的もしくは構造的修飾などの直接的な作動的または拮抗的効果、またはさらなる因子を含み得る直接もしくは間接的相互作用）によって生じることができる。

【００８１】

「有効量」、「用量有効量」、または「治療有効量」は、本発明のポリペプチドの生物活性を調整する薬剤の量を意味する。

【００８２】

「免疫学的に活性な」は、抗原を認識して結合する任意の免疫グロブリンタンパク質またはそのフラグメントを意味する。

【００８３】

「Ｄｋｋ」は、Ｄｋｋ（Ｄｉｃｋｋｏｐｆ）ファミリーメンバーの核酸およびタンパク質をいう。これには、Ｄｋｋ－１、Ｄｋｋ－２、Ｄｋｋ－３、Ｄｋｋ－４、Ｓｏｇｇｙ、および関連Ｄｋｋタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。Ｄｋｋ－１は、本発明の好ましい実施形態である。しかし、Ｄｋｋタンパク質は実質的な相同性を有し、当業者は、Ｄｋｋ－１を使用した本発明の全実施形態を他のＤｋｋタンパク質と共に使用することもできることを認識する。

【００８４】

「Ｄｋｋ－１」は、Ｄｋｋ－１タンパク質およびＤｋｋ－１タンパク質をコードする核酸をいうことを意味する。Ｄｋｋ－１はＤｉｃｋｋｏｐｆ－１をいい、アフリカツメガエルでは、少なくともＤｋｋ－２、Ｄｋｋ－３、およびＤｋｋ－４に関する（Ｋｒｕｐｎｉｋら、１９９９、Ｇｅｎｅ、２３８、３０１～３１３を参照のこと）。アフリカツメガエルでＤｋｋ－１が最初に同定された（Ｇｌｉｎｋａら、１９９８、Ｎａｔｕｒｅ、３９１、３５７～６２）。Ｄｋｋ－１は、ＢＭＰ経路の阻害の存在下での異所性頭部形成を誘導することができる因子として認識された。Ｄｋｋ－１はまた、Ｗｎｔシグナル伝達の細胞外アンタゴニストとしての作用によりいくつかのアフリカツメガエルＷｎｔ分子の軸誘導活性を阻害することが見出された。Ｄｋｋ－１、Ｄｋｋ－２、Ｄｋｋ－３、Ｄｋｋ－４、およびｓｏｇｇｙを含む哺乳動物ホモログが見出されている（Ｆｅｄｉら、１９９９、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７４、１９４６５～７２；およびＫｒｕｐｎｉｃｋら、１９９９）。ヒトＤｋ－１はまた、ｓｋともいう（Ｆｅｄｉら、１９９９）。本明細書中で使用される、「Ｄｋｋ－１」は、Ｄｋｋ－１と相互作用するＷｎｔ経路を有する任意の種由来のタンパク質を含むことを意味する。哺乳動物種（例えば、マウス、ヤギ、イヌ、ウシ、ネコ、ウマ、霊長類、ヒツジ、およびブタなど）が特に好ましく、特に好ましい哺乳動物はヒトである。Ｄｋｋ－１をコードする核酸配列には、ヒトＤｋｋ－１（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＨ００９８３４、ＸＭ＿００５７３０、ＡＦ２６１１５８、ＡＦ２６１１５７、ＡＦ１７７３９４、ＡＦ１２７５６３、およびＮＭ＿０１２２４２）、Ｍｕｓ ｍｕｓｃｕｌｕｓのｄｉｃｋｋｏｐｆホモログ１（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿０１００５１）、およびＤａｎｉｏ ｒｅｒｉｏのｄｉｃｋｋｏｐｆ－１（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＦ１１６８５２およびＡＢ０２３４８８）が含まれるが、これらに限定されない。エクソンアノテーションを行ったゲノム配列は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＦ２６１１５７およびＡＦ２６１１５８である。Ｗｎｔ経路でＤｋｋ－１活性を有するこれらの配列のホモログも意図される。Ｄｋｋ－１アミノ酸配列には、ヒトｄｉｃｋｋｏｐｆホモログ１（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＡＧ１５５４４、ＢＡＡ３４６５１、ＮＰ＿０３６３７４、ＡＡＦ０２６７４、ＡＡＤ２１０８７、およびＸＰ＿００５７３０）、Ｄａｎｉｏ ｒｅｒｉｏ（ゼブラフィッシュ）ｄｉｃｋｋｏｐｆ１（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＢＡＡ８２１３５およびＡＡＤ２２４６１）、およびマウスｄｉｃｋｋｏｐｆ－１（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｏ５４９０８およびＮＰ＿０３４１８１）が含まれるが、これらに限定されない。Ｄｋｋ－１と呼ぶ場合、Ｄｋｋ－１活性を有するこれらの配列の変異型およびホモログもまた含まれる。

【００８５】

「ＬＲＰ５媒介」、「ＬＲＰ６媒介」、および「Ｄｋｋ媒介」障害、病態、または疾患は、ＬＲＰ５、ＬＲＰ６、および／またはＤｋｋ活性を含む任意の異常な状態である。異常な状態を、環境への曝露または薬物投与によって誘導することができる。あるいは、疾患または障害は、遺伝子欠損に起因し得る。Ｄｋｋ媒介疾患、障害、および病態には、骨量障害または病態ならびに脂質障害および病態が含まれるが、これらに限定されない。例

えば、Ｄｋｋ、ＬＲＰ５、および／またはＬＲＰ６によって媒介され得る骨量障害／病態／疾患には、加齢性骨損失、骨折（例えば、股関節骨折、コリーズ骨折、脊椎粉砕骨折）、軟骨形成異常症、薬物誘導性障害（例えば、糖質コルチコイドもしくはヘパリン投与による骨粗鬆症および水酸化アルミニウム、抗痙攣薬、もしくはグルテチミド投与による骨軟化症）、高骨代謝回転、高カルシウム血症、骨化過剰症、変形性関節症、骨形成不全症、骨軟化症、骨髄炎、骨粗鬆症、パジェット病、およびくる病が含まれるが、これらに限定されない。

【００８６】

Ｄｋｋ、ＬＲＰ５、および／またはＬＲＰ６によって媒介され得る脂質障害／疾患／病態には、家族性リポ蛋白リパーゼ欠損症、家族性アポ蛋白ＣＩＩ欠損症、家族性３型高リポ蛋白血症、家族性高コレステロール血症、家族性高トリグリセリド血症、多発性リポ蛋白型高脂血症、透析および／または糖尿病による脂質レベルの上昇、および未知の原因による脂質レベルに上昇が含まれるが、これらに限定されない。

【００８７】

用語「認識して結合する」は、アンチセンスヌクレオチドまたはｓｉＲＮＡ（ｓｍａｌｌ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ　ＲＮＡ）の標的配列との相互作用の定義に使用する場合、特定のアンチセンスまたはｓｍａｌｌ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ　ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）配列が標的配列と実質的に相補性を示し、それによりポリペプチドをコードするｍＲＮＡの一部と特異的に結合することを意味する。したがって、典型的には、配列はｍＲＮＡ標的配列と高度に相補的であり、配列全体での塩基ミスマッチは１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個しかない。多くの例では、正確に適合することが望ましい（すなわち、オリゴヌクレオチドが特異的に結合して配列に完全に相補的であり、それにより相補的ストレッチのミスマッチがゼロである）。したがって、高度の相補的な配列は、典型的には、ｍＲＮＡの標的領域に非常に特異的に結合し、それにより標的ｍＲＮＡ配列のポリペプチド産物への翻訳を非常に有効に減少および／またはさらに阻害する。

【００８８】

実質的に相補的なオリゴヌクレオチド配列は、オリゴヌクレオチドと特異的に結合する対応ｍＲＮＡ標的配列と約８０％を超えて相補的（または「％正確な適合」）であり、より好ましくはオリゴヌクレオチドと特異的に結合する対応ｍＲＮＡ標的配列と約８５％を超えて相補的である。一定の態様では、上記のように、本発明の実施においてさらにより実質的に相補的なオリゴヌクレオチド配列を有することが望ましく、このような場合、オリゴヌクレオチド配列は、オリゴヌクレオチドと特異的に結合する対応ｍＲＮＡ標的配列と約９０％を超えて相補的であり、一定の実施形態では、オリゴヌクレオチドと特異的に結合する対応ｍＲＮＡ標的配列と約９５％を超えて相補的であり、デザインされたオリゴヌクレオチドが特異的に結合する標的ｍＲＮＡと９６％、９７％、９８％、９９％まで、さらに１００％正確に適合し得る。

【００８９】

開示の配列の類似性％または相補性％を、例えば、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ（ＵＷＧＣＧ）から利用可能なＧＡＰコンピュータプログラム（バージョン６．０）を使用した配列情報の比較によって決定することができる。ＧＡＰプログラムは、をＮｅｅｄｌｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｗｕｎｓｃｈ（１９７０）のアラインメント方法を使用する。簡単に述べれば、ＧＡＰプログラムは、類似するアラインメント記号の数（すなわち、ヌクレオチドまたはアミノ酸）をより短い２配列の総記号数で割ったものとして類似性を定義する。ＧＡＰプログラムの好ましいデフォルトパラメータには、以下が含まれる。（１）ヌクレオチドの単項比較行列（同一には１および非同一には０の値を含む）およびＧｒｉｂｓｋｏｖ　ａｎｄ　Ｂｕｒｇｅｓｓ（１９８６）の加重比較行列、（２）各ギャップについて３．０のペナルティーおよび各ギャップ中の各記号についてさらに０．１０のペナルティー、および（３）末端ギャップについてはペナルティーなし。

【００９０】

「模倣（ｍｉｍｅｔｉｃ）」は、模倣した化合物と機能が同一であるか挙動が類似の化合物または分子を意味する。

【００９１】

「レポーターエレメント」は、スクリーニングアッセイで検出することができるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。レポーターエレメントによってコードされるポリペプチドの例には、ｌａｃＺ、ＧＦＰ、ルシフェラーゼ、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼが含まれるが、これらに限定されない。

【００９２】

２．緒言

本発明はまた、それぞれ配列番号２および４で示した形態のＨＢＭ遺伝子およびＨＢＭタンパク質、他の密接に関連する変異型、ならびにその正確な発現に必要なＨＢＭ遺伝子の隣接染色体領域を含む。好ましい実施形態では、本発明は、配列番号２の核酸配列の少なくとも１５個の連続するヌクレオチドに指向する。より好ましくは、本発明は、配列番号２の核酸配列の少なくとも１５個の連続するヌクレオチドであって、１５個の連続するヌクレオチドの１つがヌクレオチド５８２でチミンであるヌクレオチドに指向する。

【００９３】

本発明はまた、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子領域のヌクレオチド配列およびＨＢＭ領域のヌクレオチド配列に関する。より詳細には、好ましい実施形態は、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子領域Ｂ２００Ｅ２１－ＨおよびＢ５２７Ｄ１２－Ｈのセグメントを含むＢＡＣクローンである。好ましい実施形態は、配列番号５～１２からなるＢＡＣクローンのヌクレオチド配列である。

【００９４】

本発明はまた、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子およびＨＢＭ遺伝子のＤＮＡプローブを同定するためのヌクレオチド配列、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子およびＨＢＭ遺伝子を増幅するためのＰＣＲプライマー、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子およびＨＢＭ遺伝子中のヌクレオチド多型、ならびにＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子およびＨＢＭ遺伝子の調節エレメントの使用に関する。

【００９５】

本発明は、ゲノムマーカーＤ１１Ｓ９８７とＳＮＰ＿ＣＯＮＴＩＧ０３３－６との間の染色体１１ｑ１３．３上のＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子およびＨＢＭ遺伝子の染色体位置のさらなる局在化ならびにＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子およびＨＢＭ遺伝子のＤＮＡ配列を記載する。染色体位置を、遺伝子地図作成に使用するマッピングパネルへのより多数の遺伝子マーカーの付加およびより多数の個体を含めるための家系図の拡大によって精密化した。遺伝子型同定した新規の個体が領域を狭める極めて重要な組換えを有するので、家系図の拡大は極めて重要であった。１１ｑ１３．３上の領域中の遺伝子を同定するために、この染色体領域を含むＢＡＣクローン組を同定した。ゲノムＤＮＡ配列のテンプレートとしておよび直接的ｃＤＮＡ選択によるコード配列同定用試薬としてもＢＡＣクローンを使用した。ゲノム配列決定および直接ｃＤＮＡ選択を使用して、１５０万塩基対を超える１１ｑ１３．３由来のＤＮＡを特徴付けた。この領域内のＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子を同定し、罹患および非罹患個体の変異分析後にＨＢＭ遺伝子が発見された。

【００９６】

遺伝子が特定の染色体領域に遺伝学的に局在化された場合、この領域中の遺伝子を、重複クローン組中の全ＤＮＡ領域をクローニングする（物理的マッピング）ステップと、直接ｃＤＮＡ選択、エクソントラッピング、およびＤＮＡ配列決定（遺伝子同定）の組み合わせによるこれらのクローンによってコードされる遺伝子を特徴付けるステップと、およびＨＢＭ家系の罹患および非罹患メンバーの比較ＤＮＡ配列決定によるこれらの遺伝子の変異を同定する（変異分析）ステップを含む一連のステップによって分子レベルで特徴付けることができる。

【００９７】

目的の染色体領域中の固有の分子標識点を増幅するようにデザインされたＰＣＲを使用

した大腸菌または酵母菌（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｅａｅ）中で増殖させたベクター中でクローニングしたヒトＤＮＡライブラリーのスクリーニングによって物理的マッピングを行う。ＨＢＭ候補領域の物理地図を作成するために、細菌人工染色体（ＢＡＣ）中にクローン化したヒトＤＮＡライブラリーを、ヒトゲノム計画の研究によって染色体１１ｑ１２－ｑ１３に先にマッピングされた配列タグ化部位（ＳＴＳ）マーカー組でスクリーニングした。

【００９８】

ＳＴＳは、ＰＣＲによってアッセイすることができるヒトゲノム中の固有の分子標識点である。ヒトゲノム計画研究の組み合わせにより、２２個の常染色体および２個の性染色体上の数千のＳＴＳの位置が決定された。遺伝子マッピングに使用したマーカーを物理マッピングのＳＴＳとして使用することもできるので、位置クローニング研究のために物理地図を遺伝子地図と関連付ける。ゲノムマーカー由来のＳＴＳ、遺伝子、およびランダムＤＮＡフラグメントの組み合わせでのＢＡＣライブラリーのスクリーニングにより、目的に染色体領域中の全ＤＮＡを示す重複クローンから構成される物理地図を構築することができる。

【００９９】

ＢＡＣは、大腸菌中で増殖する巨大な（８０ｋｂ～２００ｋｂ）ヒトセグメントまたは他のＤＮＡ用のクローニングベクターである。ＢＡＣを使用して物理地図を構築するために、ＢＡＣクローンのライブラリーをスクリーニングして所与のＳＴＳまたはＳＴＳ組に対応するＤＮＡ配列を保有する各クローンを同定する。ほとんどのヒトゲノムを通して、ＳＴＳマーカーは約２０～５０ｋｂ間隔で存在し、その結果各ＢＡＣクローンは典型的に少なくとも２つのＳＴＳマーカーを含む。さらに、スクリーニングされるＢＡＣライブラリーは、ヒトゲノムを６倍以上カバーするのに十分なクローン化ＤＮＡを含む。したがって、各ＳＴＳは、典型的には、１つを超えるＢＡＣクローンを同定する。約５０ｋｂの間隔があけられた一連のＳＴＳマーカーを使用した６倍カバーするＢＡＣライブラリーのスクリーニングにより、任意のヒトゲノム領域用に一連の重複ＢＡＣクローン（すなわち、ＢＡＣコンティグ）を含む物理地図を構築することができる。物理地図の調製に使用した多数のＳＴＳマーカーもまた遺伝子マーカーであるので、この地図は遺伝子地図と密接に関連している。

【０１００】

物理地図の構築時に、ゲノムのＳＴＳ地図中にギャップが存在して、所与の位置で重複したＢＡＣクローンを同定することができなくなることがしばしば起こる。典型的には、公的に利用可能な文献およびワールドワイドウェブリソースによって同定されたＳＴＳ組から最初に物理地図を構築する。最初の地図は、未知の分子距離のギャップによって分離されたいくつかの個別のＢＡＣコンティグからなる。これらのギャップを満たすＢＡＣクローンを同定するために、ギャップのいずれかの末端のクローン末端から新規のＳＴＳマーカーを開発する必要がある。ギャップに隣接するＢＡＣの末端２００～３００塩基対の配列決定および１００またはそれ以上の塩基対配列を増幅するためのＰＣＲアッセイの開発によってこれを行う。末端配列がヒトゲノム内で固有であることを示す場合、新規のＳＴＳを使用してＢＡＣライブラリーをスクリーニングし、物理地図中のギャップ由来のＤＮＡを含むさらなるＢＡＣを同定する。ＨＢＭ候補領域（２，０００，０００またはそれ以上の塩基対）のサイズ領域をカバーするＢＡＣコンティグを構築するために、しばしばいくつかのクローンの末端由来の新規のＳＴＳマーカーを開発する必要がある。

【０１０１】

ＢＡＣコンティグの構築後、この重複クローン組を、染色体領域中にコードされた遺伝子の同定用のテンプレートとして使用する。遺伝子同定を多数の方法によって行うことができる。一般に、以下の３つの方法を使用する。（１）全染色体領域を示すためにＢＡＣコンティグから選択したＢＡＣ組を配列決定することができ、コンピュータ法を使用して全遺伝子を同定することができること、（２）ＢＡＣコンティグ由来のＢＡＣを直接ｃＤＮＡ選択と呼ばれる方法によって領域中にコードされた遺伝子に対応するｃＤＮＡをクロ

ーン化するための試薬として使用することができること、または（３）ＢＡＣコンティグ由来のＢＡＣを使用してエクソントラッピングと呼ばれる手順による特異的ｃＤＮＡ配列モチーフの選択によりコード配列を同定することができること。本発明は、最初の２つの方法によって同定された遺伝子を含む。

【０１０２】

ＨＢＭ候補領域を示す全ＢＡＣコンティグを配列決定するために、プラスミドベクターへのサブクローニング用およびその後のこれらのサブクローンのＤＮＡ配列決定用のＢＡＣ組を選択した。ＢＡＣ中にクローン化したＤＮＡがゲノムＤＮＡを示すので、この配列をｃＤＮＡ配列決定と区別するために「ゲノム配列決定」という。目的の染色体領域のゲノム配列決定を開始するために、いくつかの非重複ＢＡＣクローンを選択する。各ＢＡＣクローンのＤＮＡを調製し、クローンを無作為な小フラグメントに切断し、その後ｐＵＣ１８などの標準的なプラスミドベクターにクローン化する。プラスミドクローンを成長させてより小さなフラグメントを増殖させ、これらは配列決定用のテンプレートである。ＢＡＣ　ＤＮＡ配列の適切な適用範囲および配列の質を確認するために、十分なプラスミドクローンを配列決定して６倍の適用範囲のＢＡＣクローンを得る。例えば、ＢＡＣが１００ｋｂ長である場合、ファージミドを配列決定して６００ｋｂの配列を得る。ファージミドベクター中でのクローニング前にＢＡＣ　ＤＮＡが無作為に切断された場合、６００ｋｂの未処理のＤＮＡ配列を、コンピュータによる方法によって配列コンティグと呼ばれる重複ＤＮＡ配列に構築することができる。コンピュータによる方法による最初の遺伝子同定目的のために、適用範囲が６倍の各ＢＡＣは、１０００塩基対～２０，０００塩基対の１０～２０個の配列コンティグを得るのに十分である。

【０１０３】

本発明で使用した配列決定ストラテジーは、ＨＢＭ候補領域中のＢＡＣコンティグ由来の「種」ＢＡＣを最初に配列決定することであった。「種」ＢＡＣ配列を使用して、コンティグ由来の重複ＢＡＣを最低限同定し、その後これらを配列決定した。この様式では、各ＢＡＣ中に残存するいくつかの小配列ギャップを含む全候補領域を配列決定した。この配列を、コンピュータによる遺伝子同定のテンプレートとして使用した。１つのコンピュータによる遺伝子同定方法は、ＢＡＣコンティグ配列と公的に利用可能なｃＤＮＡおよびゲノム配列のデータベース（例えば、ｕｎｉｇｅｎｅ、ｄｂＥＳＴ、ＧｅｎＢａｎｋ）とを比較することである。典型的には、コンピュータアルゴリズムおよびプログラムのＢＬＡＳＴファミリーを使用してこれらの比較を行う（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２１５、４０３～４１０、１９９０）。ＢＡＣ配列を、タンパク質配列に翻訳することもでき、このタンパク質配列を使用し、タンパク質配列を分析するためにデザインされたＢＬＡＳＴバージョンを使用して公的に利用可能なタンパク質データベースを検索することができる（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９７、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、２５、３３８９～３４０２）。別の方法は、全エクソンに共通の特異的ＤＮＡ配列モチーフの存在およびヒトタンパク質コード配列に典型的なコドン使用頻度の存在を基本として配列中のエクソンの位置を予想する、ＭＺＥＦ（Ｚｈａｎｇ、１９９７、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９４、５６５～５６８）およびＧＲＡＩＫ（Ｕｂｅｒｂａｃｈｅｒら、１９９６、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．、２６６、２５９～２８１）などのコンピュータアルゴリズムを使用する。

【０１０４】

コンピュータによる方法による遺伝子同定に加えて、直接ｃＤＮＡ選択によって遺伝子も同定した（Ｄｅｌ　Ｍａｓｔｒｏら、１９９５、Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．、５（２）、１８５～１９４）。直接ｃＤＮＡ選択では、目的の組織由来のｃＤＮＡプールを調製し、候補領域由来のＢＡＣを液体ハイブリダイゼーションアッセイで使用してＢＡＣ中のコード領域に対して塩基対を形成するｃＤＮＡを捕捉する。本明細書中に記載の方法では、ポリＡＲＮＡ由来の第１のｃＤＮＡ鎖のランダムプライミング、標準的方法による第２のｃＤＮＡ鎖の合成、およびｃＤＮＡフラグメントの末端へのリンカーの付加によっていくつかの異なる組織由来のｃＤＮＡプールを作製した。リンカーを使用して、ｃＤＮＡプール

を増幅する。ＢＡＣクローンをin vitroＤＮＡ合成用のテンプレートとして使用してＢＡＣ　ＤＮＡのビオチン標識コピーを作製する。ＢＡＣ　ＤＮＡのビオチン標識コピーを変性させ、過剰量のＰＣＲ増幅したリンカー付加変性ｃＤＮＡプールとインキュベートする。ＢＡＣＤＮＡおよびｃＤＮＡを溶液中でアニーリングし、そしてＢＡＣおよびｃＤＮＡ間のヘテロ二重鎖を、ストレプトアビジン被覆磁性ビーズを使用して単離する。ＢＡＣによって捕捉されたｃＤＮＡを、リンカー配列に相補的なプライマーを使用して増幅させ、第２ラウンドのためにハイブリダイゼーション／選択プロセスを繰り返す。２ラウンドの直接ｃＤＮＡ選択後、ｃＤＮＡフラグメントをクローン化し、これらの直接選択フラグメントのライブラリーを作製する。

【０１０５】

直接選択によって単離されたｃＤＮＡクローンを、２つの方法によって分析する。ＨＢＭ候補領域由来のＢＡＣプールを使用してゲノムＤＮＡ配列を得るので、ｃＤＮＡを各ＢＡＣに対してマッピングしなければならない。マイクロタイター皿中のＢＡＣの整列および高密度グリッドでのこれらのＤＮＡの複製によってこれを行う。次いで、各ｃＤＮＡクローンを、グリッドとハイブリダイゼーションさせて、直接選択に使用したセット由来の各ＢＡＣに対して配列同一性を有することを確認し、ＢＡＣの配列同一性を決定する。各ＢＡＣに対応することが確認されたｃＤＮＡクローンを配列決定する。直接選択によって単離されたｃＤＮＡクローンがすでに同定した遺伝子に対して配列同一性または類似性を共有するかどうかを決定するために、ＤＮＡおよびタンパク質コード配列を、ＢＬＡＳＴファミリープログラムを使用して公的に利用可能なデータベースと比較する。

【０１０６】

ＢＡＣ配列決定および直接ｃＤＮＡ選択によって得られたゲノムＤＮＡ配列とｃＤＮＡ配列との組み合わせにより、領域中に最初の推定遺伝子リストが得られる。領域中の遺伝子は、全てＨＢＭ遺伝子座の候補であった。各遺伝子をさらに特徴付けるために、ノーザンブロットを行って各遺伝子に対応する転写物のサイズを決定し、推定エクソンが共に転写されて各遺伝子を作製するかどうかを決定した。各遺伝子のノーザンブロット分析のために、プローブを、直接選択されたｃＤＮＡクローンから調製するか、ゲノムＤＮＡまたは目的の推定遺伝子をコードするＢＡＣ由来の特定のフラグメントを増幅させるＰＣＲによって調製した。ノーザンブロットにより、転写物のサイズおよび転写物が発現する組織に関する情報が得られた。あまり発現しない転写物について、反応のテンプレートとして目的の組織由来のＲＮＡを使用した逆転写ＰＣＲアッセイを行う必要な場合があった。

【０１０７】

コンピュータによる方法および直接ｃＤＮＡ選択による遺伝子の同定により、染色体領域中の遺伝子についての固有の情報が得られる。遺伝子が同定された場合、各遺伝子の変異について異なる個体を試験することが可能である。

【０１０８】

本発明はまた、それぞれ配列番号２および４で示した形態のＨＢＭ遺伝子およびＨＢＭタンパク質、他の密接に関連する変異型、ならびにその正確な発現に必要なＨＢＭ遺伝子の隣接染色体領域を含む。好ましい実施形態では、本発明は、配列番号２の単離核酸配列およびその変異型に関する。変異型には、ＨＢＭ様表現型が得られる配列番号１の変更形態が含まれる。このような変異型の例は、以下の第３節および実施例でさらに考察する。これらの変異型は、好ましくは、配列番号１もしくは２の核酸配列またはその生物学的に活性なフラグメントと少なくとも約９０％、好ましくは少なくとも約９５％、またはより好ましくは少なくとも約９８％またはそれ以上類似または同一である。したがって、配列番号１もしくは２またはその生物学的に活性なフラグメントと９６％、９７％、および９９％またはそれ以上類似の配列もまた、本明細書中に含まれる。

【０１０９】

ＢＬＡＳＴもしくはＦＡＳＴＡまたは標準的なデフォルトパラメータを使用した他の適切なアルゴリズムを使用して、高骨量（ＨＢＭ）変異型間の変動性を決定することができる。好ましくは、配列番号１～２のコード領域について同一性を決定したが、非コードド

メインも含み得る。さらに、アラインメントプログラムを使用して、異なる動物種で保存された配列または潜在的なモチーフを同定することができる。アラインメントプログラムを使用して、関連する遺伝子およびこれらがコードするタンパク質の核酸および／またはタンパク質配列を整列させることもできる。好ましいアラインメントプログラムには、ＣＬＵＳＴＡＬＷ、ＰＩＬＥＵＰ、およびＧＡＰが含まれ、これらはデフォルトパラメータを使用することが好ましい。例えば、このようなプログラムを使用して、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）、ＨＢＭ、およびＬＤＬ受容体関連タンパク質６（ＬＲＰ６）の配列ならびにこれらに関連する配列を整列させることができる。

【０１１０】

例えば、ポリペプチドをコードする基準ヌクレオチド配列と少なくとも９０％「類似」するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドにより、ポリヌクレオチド配列が基準ヌクレオチド配列の各１００ヌクレオチドあたり１０個までの点変異を含み得ること以外はポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が基準配列と同一であることが意図される。基準配列のこれらの変異は、配列番号１もしくは２またはＬＲＰ６遺伝子中の任意の位置で起こり得る。変異はサイレントであり得る。

【０１１１】

別の実施形態は、配列番号１または２のこのようなポリヌクレオチド変異型が配列番号１または２の少なくとも１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、３００、４００、または５００個の連続したヌクレオチドである核酸配列を含むことを意図する。より好ましくは、このようなポリヌクレオチド変異型は、コードされるポリペプチドが被験体に投与された場合に骨量および／または脂質レベルを調整する変異を含む、配列番号２または配列番号１もしくは２の他の変異型のヌクレオチド５８２での多型（Ｇ→Ｔ置換）に対応する連続核酸配列を有する。意図する配列番号１または２の全変異型は、被験体に投与した場合に骨調整が誘導されるタンパク質またはポリペプチドをコードする特徴を有する。被験体に投与した場合に骨量の調整を担い得るさらなる変異型は、ＨＢＭ多型を含むことが公知のドメインの範囲内であり、βプロペラドメイン（ＹＷＴＤモチーフ）をコードする。あるいは、被験体の高骨量を調整するＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）の他の変異型は、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）の任意の他の保存ドメイン（図４に記載の変異など（例えば、ＲＧＤ細胞外結合部位、ＬＤＬおよびカルシウムの結合部位、システインリッチな成長因子反復、理想的なＰＥＳＴ領域、および内在化ドメイン））をコードする核酸配列の変異に起因し得る。骨量および／または脂質調整を増強することができるさらなる変異については、第３節および以下の実施例を参照のこと。

【０１１２】

意図するＨＢＭポリヌクレオチドおよびＨＢＭ様変異体には、ストリンジェントな条件下で配列番号２とハイブリダイゼーションするものが含まれる。ハイブリダイゼーション方法は当分野で公知であり、以下が含まれるが、これらに限定されない。（ａ）５０℃で０．１×ＳＳＰＥ（０．６２Ｍ　ＮａＣｌ、０．０６Ｍ　NaH_2PO_4・H_2O、０．０７５Ｍ　ＥＤＴＡ（ｐＨ７．４））および０．１％ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）を使用した洗浄、（ｂ）４２℃で５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（０．７５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０７５Ｍクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ６～８）、０．１％ピロリン酸ナトリウム、５×Ｄｅｎｈａｒｄｔ液、超音波処理サケ精子ＤＮＡ（５０μｇ／ｍｌ）、０．１％ＳＤＳ、および１０％硫酸デキストランを使用した洗浄およびその後の４２℃で０．２×ＳＳＣおよび０．１％ＳＤＳを使用した洗浄、および（ｃ）６５℃で０．５Ｍ　$NaPO_4$、７％ＳＤＳを使用した洗浄およびその後の６０℃で０．５×ＳＳＣおよび０．１％ＳＤＳを使用した洗浄。配列番号２またはその核酸フラグメントとのハイブリダイゼーションによってＨＢＭ変異型を単離することができるさらなる条件を、ハイブリダイゼーション温度の変化によって得ることができる。高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、配列番号２またはそのフラグメントの融解温度（Ｔｍ）よりも約２０℃低い温度で行う条件である。好ましいストリンジェンシーを、配列番号

２またはそのフラグメントのT_mより約５～１０℃低い温度で行う。さらなるハイブリダイゼーション条件を、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、「分子クローニング：実験マニュアル」、１９８９の第１１章に記載されているか、当業者に公知のように調製する。

【０１１３】

あるいは、哺乳動物ライブラリー（例えば、ウマ、霊長類、ヤギ、ウシ、ヒツジ、ネコ、ブタ、およびイヌ）を変性プライマーおよびポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術を使用して探索し、配列番号２またはそのフラグメントの変異型を同定することができる。好ましくは、ストリンジェントな条件下で配列番号２の読み取り枠またはこの配列の非コード部分とハイブリダイゼーションするプライマーを使用する。より好ましくは、このようなプライマーは、配列番号２内の保存ドメインとハイブリダイゼーションする。例えば、保存ドメインには、ＹＷＴＤβプロペラドメインまたは他のドメイン（図４に列挙のドメイン）をコードするものが含まれる。好ましいプライマーは、典型的には１５ヌクレオチド長であるが、少なくとも約１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３５、４０、または５０（およびこの間の任意の範囲）のヌクレオチド長で変化することができる。異種ハイブリダイゼーションは、変性ＰＣＲプライマーを使用して標的遺伝子または核酸配列を増幅することである。配列番号２およびこれにコードされるポリペプチドの変異型のプローブを、対応するアミノ酸配列（例えば、配列番号４、そのフラグメント）をコードすることができる全ての可能なヌクレオチド配列を示す１０、好ましくは１５またはそれ以上のヌクレオチド長の混合オリゴヌクレオチドの調製によって得ることができる。この方法は、Ｇｏｕｌｄら、１９８９、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８６（６）、１９３４～８に明確に記載されている。

【０１１４】

別の実施形態には、配列番号４およびそのフラグメントに少なくとも約９０％類似し、被験体に投与した場合に被験体の骨量を調整するＨＢＭポリペプチドまたはＨＢＭ様変異型をコードする核酸が含まれる。ＨＢＭ変異型は、配列番号４の１７１位（Ｇｌｙ→Ｖａｌ置換）もしくはマウスホモログの１７０位、またはプロペラ１もしくは骨量を増加させそして／または脂質を調整するタンパク質中の他の場所のアミノ酸変化を有し得る。他の好ましい実施形態には、骨量を増加させそして／または脂質を調整する配列の変異を含む少なくとも約１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、５００個またはそれいじょうの連続した配列番号３または４のアミノ酸を有する高骨量ポリペプチドが含まれる。このような意図する連続配列は、好ましくは、高骨量に対応する多型（配列番号４のバリン１７１）、プロペラ１中の他の変異と重複するか、実施例に記載のモデルから予想される。少なくとも１つの変異（例えば、バリン１７１または類似の変異）を含む、配列番号３または４およびそのフラグメントと少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれ以上類似するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた意図される。

【０１１５】

別の実施形態では、配列番号４のアミノ酸は変化しないが、配列番号４をコードするおそらく得られる合成ポリヌクレオチドが配列番号２と少なくとも約５０％類似するものであるように核酸配列がコードの縮重に基づいて保存的に置換された配列番号４をコードする合成核酸が意図される。あるいは、配列番号４は、以下の第３節で同定された任意のサイレント変異を含み得る。

【０１１６】

配列番号３または４の基準アミノ酸配列もしくはそのフラグメントに、例えば少なくとも９５％「同一」のアミノ酸配列を有するポリペプチドにより、ポリペプチド配列が配列番号３または４の基準アミノ酸配列の各１００アミノ酸あたり５個までのアミノ酸変化を含んでよく、ＨＢＭ様表現型を有すること以外はポリペプチドのアミノ酸配列は基準配列と同一であることが意図される。言い換えれば、基準アミノ酸配列と９５％同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、基準配列中の５％までのアミノ酸残基が欠失するか別のアミノ酸と置換されるか、基準配列中の全アミノ酸残基の５％までのアミノ酸

数を基準配列に挿入することができる。基準配列のこれらの変化は、基準アミノ酸配列のアミノ末端位置もしくはカルボキシ末端位置またはこれらの末端位置の間のどこかで起こるか、基準配列中もしくは基準配列内の１つまたは複数の連続する基中の残基のいずれかにそれぞれ散在し得る。

【０１１７】

アミノ酸残基が保存的に置換されたさらなるＨＢＭポリペプチドおよびＨＢＭポリペプチドをコードする核酸が意図される。例えば、表現型がサイレントなアミノ酸置換の作製に関するガイダンスは、Ｂｏｗｉｅら、「タンパク質配列におけるメッセージの解析：アミノ酸置換耐性」、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４７、１３０６～１０、１９９０に記載されており、著者は、アミノ酸配列変化の耐性研究についての２つの主なアプローチが存在することを示している。第１の方法は、変異が自然淘汰によって許容または拒絶される進化過程に依存する。第２のアプローチは、クローニングされた遺伝子の特定の位置にアミノ酸変化を導入するための遺伝子操作、機能性を保持する配列を同定するための選択またはスクリーニングを使用する。これらの研究により、驚いたことに、タンパク質はアミノ酸置換に耐性を示すことが明らかとなった。著者は、さらに、アミノ酸の変化は一定のタンパク質の位置で寛容である可能性があることを示している。多数の表現型置換がＢｏｗｉｅら、前出および本明細書中で引用した引例（その全体が本明細書中で参照することによって組み込まれる）に記載されている。好ましい置換は、種を超えて保存が不十分であり、構造的または機能的に重要なドメイン（例えば、結合部位、触媒部位、またはβプロペラもしくは図４に記載の他のドメイン）に対応しないドメイン中に存在する。

【０１１８】

最近の研究により、ＬＲＰ５はＷｎｔシグナル伝達経路に関与することが示されている。Ｗｎｔ経路は、肢の初期発生学的発生で極めて重要である。最近公開されたＷｎｔシグナル伝達の構成要素のスケッチを、図２８に示す（Ｎｕｓｓｅ、２００１、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｓｔａｎｆｏｒｄ．ｅｄｕ／～ｒｎｕｓｓｅ／ｐａｔｈｗａｙｓ／ｃｅｌｌ２．ｈｔｍｌ）（Ｎｕｓｓｅ、２００１、Ｎａｔｕｒｅ、４１１、２５５～６；およびＭａｏら、２００１、Ｎａｔｕｒｅ、４１１、３２１～５も参照のこと）。

【０１１９】

簡単にまとめると、Ｗｎｔタンパク質は、膜貫通タンパク質Ｆｒｉｚｚｌｅｄ（Ｆｚ）と相互作用する分泌タンパク質である。ＬＲＰ５およびＬＲＰ６などのＬＲＰタンパク質は、Ｆｚとの複合体においてＷｎｔシグナルを調整すると考えられている（Ｔａｍａｉら、２０００、Ｎａｔｕｒｅ、４０７、５３０～５）。Ｗｎｔ経路は、Ｄｉｓｈｅｖｅｌｅｄタンパク質（Ｄｓｈ）によって細胞内で作用し、その後グリコーゲンシンテターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）をβカテニンリン酸化から阻害する。リン酸化されたβカテニンは、ユビキチン化後に迅速に分解される。しかし、安定化βカテニンが蓄積して核に移動し、Ｔ細胞因子（ＴＣＦ）転写アクチベーター複合体として作用する。

【０１２０】

タンパク質ｄｉｃｋｋｏｐｆ－１（Ｄｋｋ－１）は、Ｗｎｔ経路のアンタゴニストであることが報告されている。Ｄｋｋ－１は、初期発生における頭部形成に必要である（Ｇｌｉｎｋａら、１９９８、Ｎａｔｕｒｅ、３９１、３５７～６２）。Ｄｋｋ－１およびＷｎｔ経路でのその形成は、Ｋｒｕｐｎｉｋら、１９９９、Ｇｅｎｅ、２３８、３０１～１３；Ｆｅｄｉら、１９９９、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７４、１９４６５～７２に記載されており、Ｄｋｋ－１およびＷｎｔ経路については、Ｗｕら、２０００、Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．、１０、１６１１～４；Ｓｈｉｎｙａら、２０００、Ｍｅｃｈ．Ｄｅｖ．、９８、
３～１７；Ｍｕｋｈｏｐａｄｈｙａｙら、２００１、Ｄｅｖ．Ｃｅｌｌ．、１、４２３～４３４；およびＰＣＴ国際公開番号ＷＯ００／５２０４７、およびこれらで引用されている参考文献も参照のこと。Ｄｋｋ－１はＤｓｈの上流で作用することが公知であるが、Ｄｋｋ－１による阻害機構の性質は解明され始めたばかりである。Ｄｋｋ－１は、マウス胚の肢芽で発現し、その破壊により、他の発生異常のうちで肢の形態が異常になる（Ｇｏｔ

ｅｗｏｌｄら、１９９９、Ｍｅｃｈ．Ｄｅｖ．、８９、１５１～３；およびＭｕｋｈｏｐａｄｈｙａｙら、２００１、Ｄｅｖ．Ｃｅｌｌ．、１、４２３～３４）。

【０１２１】

関連する米国特許出願番号６０／２９１，３１１号（その全体が本明細書中で参照することによって組み込まれる）は、Ｄｋｋ－１（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＸＭ００５７３０）とＬＲＰ５との間の新規の相互作用を開示した。Ｄｋｋ－１とＬＲＰ５との間の相互作用は、ＬＲＰ５のリガンド結合ドメインと相互作用するタンパク質についての酵母２ハイブリッド（Ｙ２Ｈ）スクリーニングによって発見された。２ハイブリッドスクリーニングは、当分野で一般的な手順であり、例えば、Ｇｉｅｔｒｚら、１９９７、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１７２、６７～７９；Ｙｏｕｎｇ、１９９８、Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．、５８、３０２～１１；Ｂｒｅｎｔら、１９９７、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．、３１、６６３～７０４；およびＬｕら編、「酵母ハイブリッド技術」、Ｅａｔｏｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ、Ｎａｔｉｃｋ ＭＡ、２０００に記載されている。より最近では、他の研究により、Ｄｋｋ－１がＬＲＰの結合パートナーであり、ＬＲＰとの直接結合を介してＷｎｔ経路を調整することが確認されている（Ｒ．Ｎｕｓｓｅ、２００１、Ｎａｔｕｒｅ、４１１、２５５～６；Ｂａｆｉｃｏら、２００１、Ｎａｔ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．、３、６８３～６；Ｓｅｍｅｎｏｖ、２００１、Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．、１１、９５１～６１；Ｍａｏ、２００１、Ｎａｔｕｒｅ、４１１、３２１～５、２００１；Ｚｏｒｎ、２００１、Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．、１１、Ｒ５９２～５；およびＬｉら、２００２、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７７、５９７７～８１）。

【０１２２】

Ｍａｏ ａｎｄ ｃｏｌｌｅａｇｕｅｓ（２００１）は、ＬＲＰ６のリガンドとしてＤｋｋ－１を同定した。Ｍａｏらは、ＤｋｋタンパクがＬＲＰ６のＷｎｔ補助受容体機能を阻害する場合にＤｋｋ－１およびＬＲＰ６は拮抗的に相互作用すると示唆している。免疫共沈を使用して、このグループは、Ｄｋｋ－１／ＬＲＰ６相互作用が直接的であると評価した。Ｄｋｋ－２もまた、ＬＲＰ６に直接結合することが見出された。仮出願６０／２９１，３１１に含まれるデータと対照的に、Ｍａｏらは、ＤｋｋタンパクとＬＲＰ５との間にはいかなる相互作用も検出されず、同様にＬＤＬＲ、ＶＬＤＬＲ、ＡｐｏＥＲ、またはＬＲＰとの相互作用も存在しないと報告している。さらに、Ｍａｏらは、ＬＲＰ６は市販のＴＣＦ－ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ（ＴＯＰＦＬＡＳＨ）を使用してＤｋｋ－１のＷｎｔシグナル伝達阻害効果を滴定することができることを証明していた。アフリカツメガエル胚での類似の研究から類似の結論が導かれた。ＬＲＰ６機能ドメインの検出分析により、ＥＧＦ反復（βプロペラ）３および４はＤｋｋ－１結合に必要であり、ＬＲＰ６のリガンド結合ドメインはＤｋｋ－１結合に対する効果はないことが明らかとなった。Ｍａｏらの所見は、酵母におけるＤｋｋ－１結合のためにＬＲＰ５のリガンド結合ドメインが必要且つ十分であるという本発明者らの指摘によって得られたデータと相反している。古典的な生化学的リガンド－受容体研究を使用して、Ｍａｏらは、Ｄｋｋ－１／ＬＲＰ６についてＫｄ＝０．３４ｎＭおよびＤｋｋ－２／ＬＲＰ６についてＫｄ＝０．７３ｎＭと決定していた。

【０１２３】

Ｓｅｍｅｎｏｖら（２００１）は、Ｍａｏグループの結果を評価し、免疫共沈によってＤｋｋ－１がＷｎｔまたはＦｒｉｚｚｌｅｄに直接結合せずにむしろＬＲＰ６と相互作用することを確認した。そのＳｃａｔｃｈａｒｄ分析により、Ｄｋｋ－１／ＬＲＰ６のＫｄ＝０．５ｎＭが見出された。Ｓｅｍｅｎｏｖらはまた、Ｄｋｋ－１がＬＲＰ５／Ｆｒｉｚｚｌｅｄ８複合体を消滅させることを証明し、これは、Ｄｋｋ－１はＬＲＰ５との相互作用を介してＷｎｔシグナル伝達を抑制することもできることを意味する。システイン２２０がアラニンに変化したＤｋｋ－１変異体によりＬＲＰ６結合が消滅し、Ｗｎｔシグナル伝達を抑制できなかった。アフリカツメガエル胚での研究により、この結果が確認され、Ｄｋｋ－１／ＬＲＰ６の機能的因果関係（Ｗｎｔシグナル伝達の抑制）が明らかとなった。かれらのアフリカツメガエル研究により、Ｗｎｔ平面内細胞極性経路と対照的に、ＬＲ

Ｐ６／Ｄｋｋ－１は標準的なβカテニン媒介Ｗｎｔ経路に特異的であり得ることが示唆された。

【０１２４】

Ｂａｆｉｃｏら（２００１）は、ＬＲＰをＫｄ＝０．３９ｎＭのその唯一の膜受容体としてＬＲＰ６を同定するために^{125}Ｉ標識Ｄｋｋ－１分子を使用した。また、Ｄｋｋ－１を極めて低い濃度（３０ｐＭ）で添加した場合でさえもＤｋｋ－１／ＬＲＰ６相互作用の機能的因果関係は、標準的なＷｎｔシグナル伝達の抑制であった。

【０１２５】

理論に拘束されることを望まないが、本発明は、Ｗｎｔ経路のＤｋｋ－１阻害機構の説明およびＷｎｔ経路を調整することができる機構を提供すると考えられる。本出願および関連米国特許出願番号６０／２９１，３１１号（その全体が本明細書中で参照することによって組み込まれる）は、Ｄｋｋ－１／ＬＲＰ相互作用を記載し、ＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭとＤｋｋとの間の相互作用を、同化骨治療のためのＷｎｔ経路の介入点または脂質代謝のモジュレーターとして方法で使用することができることを証明している。

【０１２６】

実施例で詳述するように、Ｄｋｋ－１は、ＬＲＰ５媒介Ｗｎｔシグナル伝達を抑制することができるが、ＨＢＭ媒介Ｗｎｔシグナル伝達を抑制することができない。ＬＲＰ５におけるＨＢＭ変異は機能または活性化変異の獲得であるので、この所見は特に興味深い。すなわち、標準的経路を介したＷｎｔシグナル伝達は、ＨＢＭ対ＬＲＰ５で増大する。したがって、他のＨＢＭ様変異もまた同様に機能する。本発明のデータにより、この機能的活性化機構（Ｄｋｋ－１がＨＢＭ媒介Ｗｎｔシグナル伝達を抑制できないこと）が示唆される。他のＷｎｔまたはＤｋｋファミリーメンバーのさらなる調査により、特定の細胞または組織で発現するＬＲＰ／Ｄｋｋ／Ｗｎｔ／Ｆｒｉｚｚｌｅｄレパートリーに依存して行うことができるＷｎｔシグナル伝達の複雑性および変動性を示す標準的Ｗｎｔ経路における異なる活性が示される。これは、ヒトおよびＨＢＭトランスジェニック動物におけるＨＢＭまたはＨＢＭ様表現型の明らかな骨特異性の証拠となり得る。

【０１２７】

さらに、本発明のデータにより、ＬＲＰ５の第１のβプロペラドメインの潜在的構造の混乱についての重要性および機能的因果関係が明らかとなる。本発明者らのデータにより、Ｄｋｋ－１との相互作用領域としてのＬＲＰ５のリガンド結合ドメインが同定され、Ｍａｏらの文献により、ＬＲＰ６／Ｄｋｋ－１研究におけるプロペラ３および４の機能的役割が証明された。本発明では、本発明者らは、残基１７１でのＨＢＭ変異を介したＤｋｋ－１媒介Ｗｎｔ経路において機能的因果関係を有する第１のβプロペラドメインが関連すると考える。プロペラ１の１７１位のＤｋｋ－１との関与は、直接的であっても間接的であってもよい。直接的関与は、Ｄｋｋ－１が結合できなくなるＨＢＭ細胞外ドメインの三次元構造の混乱から惹起され得る。あるいは、プロペラ１の残基１７１は、Ｄｋｋ－１と直接的に相互作用し得るが、これ自他では結合に不十分であり、他のＬＲＰ５ドメインが必要である。Ｄｋｋ－１酵母２ハイブリッド実験でタンパク質における潜在的な間接的候補分子を同定することができる。

【０１２８】

Ｄｋｋ活性の崩壊はＤｋｋのＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭへの結合の増強または阻害によって必ずしも媒介されないかもしれない。１つを超える機構が関与し得る。実際、Ｄｋｋ－１がＬＲＰ５、ＬＲＰ６、およびＨＢＭに結合することが認められた。ＬＲＰ６を効果的に阻害でき、そしてＬＲＰ５活性の度合いが少し減り得る。さらに、Ｄｋｋファミリーの異なるメンバーのＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ活性に与える影響は異なることが認められた。例えば、Ｄｋｋ－１はＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ活性を阻害する一方で、ＤｋｋはＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ活性を増大させることができる。考察の終点は、単純に結合するだけではないＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ活性の調整である。

【０１２９】

本発明の開示は、Ｄｋｋ－１／ＬＲＰ５相互作用調整の標的がＨＢＭまたはＨＢＭ様模

倣薬剤の介入点であることを示す。本発明の治療薬は、小分子、ペプチドもしくは核酸アプタマー、抗体、または他のペプチド／タンパク質などであり得る。Ｄｋｋ－１発現の減少方法もまた、ＲＮＡ干渉（すなわち、ｓｉＲＮＡ）、小ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、モルホリノオリゴヌクレオチド、ＰＮＡ、Ｄｋｋ－１もしくはＤｋｋ－１相互作用タンパク質に対する抗体、デコイまたはスカベンジャーＬＲＰもしくはＬＲＰ６受容体、ならびにＤｋｋ－１もしくはＤｋｋ－１相互作用物質転写のノックダウンなどの方法を使用した治療であり得る。小ヘアピンＲＮＡの考察については、Ｙｕら、２００２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９９、６０４７～５２；Ｔｕｓｃｈｌ、２００２、Ｎａｔｕｒｅ、Ｂｉｏｔｅｃｈ．、２０、４４６～８；Ｌｅｅら、２００２、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．、１９、５００～５；Ｐａｄｄｉｓｏｎら、２００２、Ｇｅｎｅｓ＆Ｄｅｖｅｌ．、１６、９４８～５８；およびＢｒｕｍｍｅｌｋａｍｐら、２００２、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２９６、５５０～３を参照のこと。

【０１３０】

本発明の実施液形態では、Ｄｋｋ－１活性またはＤｋｋ－１相互作用タンパク質活性を、例えば、本発明のペプチドアプタマーとの結合によって調整することができる。別の実施形態では、ＬＲＰ５活性を、本発明によって得られた試薬（例えば、ペプチドアプタマー）によって調整することができる。別の実施形態では、Ｄｋｋ－１／ＬＲＰ５相互作用を、本発明の試薬（例えば、図３１で同定されたＤｋｋ－１相互作用タンパク質など）によって調整することができる。別の実施形態では、Ｗｎｔシグナル伝達経路を、１つまたは複数の上記方法の使用によって調整することができる。本発明の好ましい実施形態では、Ｗｎｔ経路のＤｋｋ－１媒介活性を、１つまたは複数の上記方法によって特異的に調整することができる。本発明の別の好ましい実施形態では、Ｗｎｔシグナル伝達経路を、Ｄｋｋ－１相互作用タンパク質活性のダウンレギュレーションによって刺激することができ、このようなダウンレギュレーションにより、例えば、より多くのＬＲＰ５活性を得ることができる。さらに好ましい実施形態では、ＬＲＰ５活性の刺激により、骨量調節をより最適なレベルに修復または維持するように刺激することができる。別の好ましい実施形態では、ＬＲＰ５活性の刺激により、脂質代謝をより最適なレベルに修復または維持するように刺激することができる。別の実施形態は、骨量障害または脂質代謝障害の修正に関する候補薬物および治療のスクリーニング方法を提供する。本発明の好ましい実施形態は、本発明の試薬および／または方法の使用によって開発される薬物および治療を提供する。当業者は、本発明は有効な骨粗鬆症モデルの開発、骨量および脂質調整の理解、ならびに骨量および脂質代謝の調整のための重要な研究ツールを提供すると理解する。Ｄｋｋ－１およびＤｋｋ－１相互作用タンパク質調整に関するより詳細な記述については、米国特許出願番号６０／３６１，２９３号（その全体が本明細書中で参照することによって組み込まれる）を参照のこと。

【０１３１】

３．ＨＢＭ活性を有するＬＲＰ５／ＬＲＰ６の別の変異型

ＬＲＰ５／Ｚｍａｘ１の第１のβプロペラモジュールの構造モデルを、Ｓｐｒｉｎｇｅｒら、１９８８、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２８３、８３７～８６２のモデル予測に基づいて作製した。このモデルに基づいて、ＬＲＰ５／ＨＢＭＺｍａｘ１の重要な変異型として一定のアミノ酸残基を同定した。モデルおよびその修飾形態については、実施例でより詳細に考察する。以下の３つのカテゴリーにより、このような変異型の例が得られる。

【０１３２】

βプロペラの形状は、内部が傾斜した側面および中央に穴の開いたディスクに類似している。残基１７１は、プロペラモジュール１のブレード４中のドメインの外面または上面のループ中に存在する。したがって、他のブレード中の構造的に等価な位置で変化した残基および結合ポケットに対してわずかにより内側（しかし、依然として表面と接近可能）の残基を含む変異型は、ＬＲＰ５／ＨＭＢによる骨量調整の研究、骨量障害のための医薬品および治療方法の開発、ならびに本発明の他の目的のための本発明の重要な実施形態である。以下の表は、このような変異型の例を含む。

【０１３３】
【表１】

変異型	変異の効果
A214V	プロペラ1のブレード5中の171に等価な位置；アラニンは他のプロペラ中で保存されていない
E128V	プロペラ1のブレード3中の171に等価な位置；グルタミン酸は他のプロペラ中で保存されていない
A65V	プロペラ1のブレード2中の171に等価な位置；アラニンはプロペラ1～3中で保存されているが、4中では保存されていない
G199V	プロペラ1のブレード5中の接近可能な内部の位置；グリシンはプロペラ1～3中で保存されているが、4中では保存されていない
M282V	プロペラ１のブレード1中の接近可能な内部の位置；メチオニンはプロペラ1～3中で保存されているが、4中では保存されていない

【０１３４】
以下の実施例１１で考察および記載されたより精密化されたモデルに基づいて、これらの変異をさらに分析した。
【０１３５】
ＬＲＰ５／Ｚｍａｘ１は、４つのプロペラ構造を有し、最初の３つのβプロペラモジュールは、ヒトＬＲＰ５／Ｚｍａｘ１中の残基１７１に対応する位置にグリシンが保存されている。したがって、他のプロペラ中の等価な位置にバリンを有する変異型は、本発明の重要な実施形態である。以下の変異型は、ＬＲＰ５／ＨＭＢによる骨量調整の研究、骨量障害のための医薬品および治療方法の開発、ならびに本発明の他の目的に有用である。配列番号３のＧ４７９Ｖ、Ｇ７８１Ｖ、およびＱ１０８７Ｖ（プロペラ１がＨＢＭまたはＨＢＭ様効果の重要な決定要因であることが証明されている）。
【０１３６】
Ｇ１７１Ｖ　ＨＢＭ多型（配列番号４）により、開いた結合ポケットに突出して潜在的にリガンド／タンパク質相互作用を変化させるバリン残基由来の側鎖を有するβプロペラ１の「占有空間」が得られる。グリシン残基は、ＬＲＰ５／Ｚｍａｘ１プロペラ１、２、３で保存されているが、プロペラ４ではグルタミンが保存されている。したがって、以下のＬＲＰ５／ＨＢＭの変異型は、ＬＲＰ５／ＨＭＢによる骨量調整の研究、骨量障害のための医薬品および治療方法の開発、ならびに本発明の他の目的で重要である。
Ｇ１７１Ｋ：変化した側鎖が導入されている
Ｇ１７１Ｆ：環状側鎖が導入されている
Ｇ１７１Ｉ：分岐した側鎖が導入されている
Ｇ１７１Ｑ：プロペラ４残基が導入されている
【０１３７】
配列番号３のプロペラ１の他の領域中に置換を含むこれらの置換（すなわち、Ａ２１４ＶおよびＭ２８２Ｖ）は、ＴＣＦアッセイによってＨＢＭ様効果が得られることを示した（図２９および３０）。したがって、プロペラ１ドメイン中のこれらの置換により、同様に、ＴＣＦアッセイによって容易にアッセイ可能なＨＢＭ様表現型が産生されると予想される。
【０１３８】
さらに、ＬＲＰ６は、ＬＲＰ５／Ｚｍａｘ１の最も密接なホモログである。ＬＲＰ６は、Ｚｍａｘ１と同一でない場合に類似すると予想されるβプロペラ構造を有する。ヒトＬＲＰ５／Ｚｍａｘ１のグリシン１７１に対応する位置は、ヒトＬＲＰ６のグリシン１５８

である。したがって、ＬＲＰ６の対応する変異型はＬＲＰ５／Ｚｍａｘ１のその関連するファミリーメンバーの特異性の研究、骨量障害のための医薬品および治療方法の開発、ならびに本発明の他の目的のための本発明の重要な実施形態である。詳細には、例えば、ヒトＬＲＰ６の構造的に等価な位置（残基１５８）でのグリシンからバリンへの置換および他の種のＬＲＰ６ホモログの類似の変異型は、重要な研究ツールを提供する。

【０１３９】

ＬＲＰ５の部位特異的変異誘発を、製造者のプロトコールに従ったＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　ＸＬ部位特異的変異誘発キット（カタログ番号２００５１６、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）を使用して全長ヒトＬＲＰ５ｃＤＮＡで作製した。以下の相補合成オリゴヌクレオチドを使用して、変異配列を移入した。

【化１】

変異	相補オリゴ
A65V:	5'-TGGTCAGCGGCCTGGAGGATGTGGCCGCAGTGGACTTCC-3' 5'-GGAAGTCCACTGCGGCCACATCCTCCAGGCCGCTGACCA-3'
E128V	5'-AAGCTGTACTGGACGGACTCAGTGACCAACCGCATCGAGG-3' 5'-CCTCGATGCGGTTGGTCACTGAGTCCGTCCAGTACAGCTT-3'
G171K	5'-ATGTACTGGACAGACTGGAAGGAGACGCCCCGGATTGAGCG-3' 5'-CGCTCAATCCGGGGCGTCTCCTTCCAGTCTGTCCAGTACAT-3'
G171F	5'-ATGTACTGGACAGACTGGTTTGAGACGCCCCGGATTGAGCG-3' 5'-CGCTCAATCCGGGGCGTCTCAAACCAGTCTGTCCAGTACAT-3'
G171I	5'-ATGTACTGGACAGACTGGATTGAGACGCCCCGGATTGAGCG-3' 5'-CGCTCAATCCGGGGCGTCTCAATCCAGTCTGTCCAGTACAT-3'
G171Q	5'-ATGTACTGGACAGACTGGCAGGAGACGCCCCGGATTGAGCG-3' 5'-CGCTCAATCCGGGGCGTCTCCTGCCAGTCTGTCCAGTACAT-3'
G199V	5'-CGGACATTTACTGGCCCAATGTACTGACCATCGACCTGGAGG-3' 5'-CCTCCAGGTCGATGGTCAGTACATTGGGCCAGTAAATGTCCG-3'
A214V	5'-AGCTCTACTGGGCTGACGTCAAGCTCAGCTTCATCCACCG-3' 5'-CGGTGGATGAAGCTGAGCTTGACGTCAGCCCAGTAGAGCT-3'
M282V	5'-GAGTGCCCTCTACTCACCCGTGGACATCCAGGTGCTGAGCC-3' 5'-GGCTCAGCACCTGGATGTCCACGGGTGAGTAGAGGGCACTC-3'
G479V	5'-CATGTACTGGACAGACTGGGTAGAGAACCCTAAAATCGAGTGTGC-3' 5'-GCACACTCGATTTTAGGGTTCTCTACCCAGTCTGTCCAGTACATG-3'
G781V	5'-CATCTACTGGACCGAGTGGGTCGGCAAGCCGAGGATCGTGCG-3' 5'-CGCACGATCCTCGGCTTGCCGACCCACTCGGTCCAGTAGATG-3'
Q1087V	5'-GTACTTCACCAACATGGTGGACCGGGCAGCCAAGATCGAACG-3' 5'-CGTTCGATCTTGGCTGCCCGGTCCACCATGTTGGTGAAGTAC-3'
G158V of LRP6	5'-GTACTGGACAGACTGGGTAGAAGTGCCAAAGATAGAACGTGC-3' 5'-GCACGTTCTATCTTTGGCACTTCTACCCAGTCTGTCCAGTAC-3'

【０１４０】

全構築物は、確実に遺伝子中に操作修飾のみが存在することが立証された配列であった。一旦立証されると、各変異型を、Ｕ２ＯＳ細胞におけるＴＣＦ－ルシフェラーゼアッセイで機能的に評価した（本質的に実施例６に記載）。アフリカツメガエル胚アッセイ（本質的に実施例５と同一）またはＷｎｔシグナル伝達、Ｄｋｋ調整、もしくは同化作用による骨への影響を解明するための他のアッセイなどの他の機能評価を行うことができる。これらの変異体のＤｋｋ、ＬＲＰ相互作用タンパク質、Ｄｋｋ相互作用タンパク質、または任意の前記物質に対するペプチドアプタマーへの結合を、２ハイブリッド系（本出願に記

載されている酵母など）または他の方法などの種々の方法で調査することもできる。

【０１４１】

図２９は、ＬＲＰ５のプロペラ１におけるＧ１７１Ｆ変異の効果を示す。この変異は、ＨＢＭのＧ１７１Ｖ置換と同一の位置に存在する。Ｇ１７１Ｆの発現により、ＨＢＭ効果が得られる。すなわち、Ｗｎｔの存在下では、Ｇ１７１Ｆは、ＴＣＦ－ルシフェラーゼレポーター構築物を活性化することができる。実際、この変異は、ＬＲＰ５またはＨＢＭよりも広範にレポーターを活性化することができる。さらに、Ｄｋｋ１およびＷｎｔ１の存在下で、Ｇ１７１Ｆは、ＬＲＰ５よりもＤｋｋによる調整に対する感受性が低い。これらのデータは、Ｇ１７１Ｆ変異型がＨＢＭと類似の様式で哺乳動物でのＷｎｔシグナル伝達を調整することを例証する。さらに、このデータにより、ＨＢＭの１７１のバリン残基のみがＨＢＭ効果を得ることができる１７１での修飾ではないことが確認される。これらのデータをあわせて、Ｗｎｔ経路活性の調整、Ｄｋｋ調整に対する反応、およびＨＢＭ効果を得る能力におけるＬＲＰ５プロペラ１の重要な役割が支持される。

【０１４２】

図３０は、ＬＲＰ５のプロペラ１中のＭ２８２Ｖ変異の効果を示す。Ｍ２８２発現により、ＨＢＭ効果が得られる。すなわち、Ｗｎｔの存在下で、Ｍ２８２はＴＣＦ－ルシフェラーゼレポーター構築物を活性化することができる。さらに、Ｄｋｋ１およびＷｎｔ１の存在下で、Ｍ２８２Ｖは、Ｄｋｋによる調整に対してＬＲＰ５より感受性が低い。これらのデータにより、Ｍ２８２Ｖ変異型は、ＨＢＭと類似の様式でＷｎｔシグナル伝達を調整することが示される。さらに、このデータにより、ＬＲＰ５のプロペラ１中の他の残基の修飾により、ＨＢＭ効果を得ることができることが確認される。

【０１４３】

これらのデータは、プロペラ１中のＨＢＭ変異の「空間占有」モデルを支持し、プロペラ１の多数の変異によりＨＢＭ効果を得ることができ、元のＧ１７１Ｖ　ＨＢＭ変異はこの能力において固有ではないことを示す。さらに、プロペラ１の種々の混乱によりＤｋｋ活性を調整することができる。

【０１４４】

これらのデータは、これらのデータは、ＬＲＰシグナル伝達のＤｋｋ調整の分子機構を例示する。本明細書中および米国特許出願番号６０／２９０，０７１号で開示の方法を使用して、総括的変異パネルの作製により、Ｗｎｔシグナル伝達のＤｋｋ調整で機能するＬＲＰ中の残基が明らかとなる。Ｄｋｋ活性を調整するＬＲＰ５およびＬＲＰ６のこのような変異型ならびにこれらの変異型とＬＲＰ５およびＬＲＰ６を区別する残基は、小分子化合物、抗体、ペプチドアプタマー、または他の薬剤による治療介入点である。さらに、各ＨＢＭ－効果変異／多型モデルを、ＨＢＭ模倣薬の合理的な薬物デザインで使用することができる。

【０１４５】

これらおよび以下で得られた例は、本発明をより良好に説明するために提供したわずかな例である。アッセイにおいてＨＢＭ活性を示したＬＲＰ５の変異型には、Ａ６５Ｖ、Ｇ１７１Ｉ、Ｇ１７１Ｖ（ＨＢＭ）、Ｇ１７１Ｆ、Ｍ２８２Ｖ、Ｇ１７１Ｋ、Ｇ１７１Ｑ、およびＡ２１４Ｖが含まれる。明らかに、本発明の範囲内で他の変異型を意図することができる。さらに、本発明の方法の至る所でＨＢＭが引用されているが、ＨＢＭ様生物活性を証明するＬＲＰ５またはＬＲＰ６の任意のこのような別の変異型もまた特許請求の範囲に含まれると理解すべきである。

【０１４６】

さらなる変異体により、上記および以下の実施例に記載のような立体配座の変化を得ることもできる。これらの変異により、発現した場合にＨＢＭ様表現型を得ることもできる。以下の変異は、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）のエクソンの家族遺伝学に基づいて表２に同定した。

【０１４７】

【表２】

表２： LRP5のエクソンの変異

エクソン	位置 (nt1としてのATG)	基準	変化	AA1としてのMet	AAの変化
2	249	CGAGGAGGCCATC	C/T	S83	なし
2	266	AGACCTACCT	A/G	Q89	G→R
3	512	GTGAGACGCC	G/T	G171	G→V
6	1199	CGTACCTGGACGGG	C/T	A400	A→V
8	1647	CGGGTTCACGCTGC	C/T	F549	なし
9	1932	GGCCTTCTTGGTCT	G/A	E644	なし
9	1999	GTGGCCATCCCGCT	G/A	V667	V→M
10	2220	CAGAATCGAAGTG	C/T	N740	なし
14	3107	GGACACTGTT	G/A	R1036	R→Q
15	3297	CGGCACCGAGCG	C/T	D1099	なし
15	3357	AGACAACACACTG	A/G	V1119	なし
16	3564	GACTCGCATC	G/A	R1188	なし
18	3989	CGGACTGTGA	C/T	A1330	A→V
20	4137	CAGCCCGGCCCAC	C/T	D1379	なし
20	4248	GGGGGCCAACGG	G/A	A1416	なし
20	4565	CGGCCACTGC	C/T	P1522	P→L
23	4635	CGACGTGTGACA	C/T	T1545	なし

【０１４８】
例えば、「Ｃ／Ｔ」はＣからＴへの変異を意味する。
【０１４９】
イントロンにおけるさらなる変異も同定し、以下の表３にスプライス変異型を得ることができる。
【０１５０】

【表３】

表３： LRP5のイントロンの変異

エクソン	エクソンに関するヌクレオチドの位置	下線を引いたSNP位置が存在する配列	ヌクレオチド
2	+53	CTCTCTCTCGAATT	C/T
5	−4	TCAGTCCACACTCG	T/C
5	+8	GGGCGGGGGCTGGG	G/A
7	−50	GCAGAGACCAGAC	G/A
8	−118	TGCTCTTGGGCATT	T/G
9	−131	TGGGGGTGAGTCCT	T/C
10	+6	TGTTTGCCTGTCCC	T/C
11	−173	ATGTGTGTGGCAG	A/G
11	−152	CGTCTCGCCCTTC	G/A
11	−49	CGGTGAGAGCAGAC	C/T
11	+37	CGGGGCAGCCGGG	C/T
11	+78	GTACCCTGTGGCCT	G/A
12	+80	CTCATCTGGGGTTC	C/G
12	+141	ATGATGCTACCTGG	A/G
15	−166	CGGGAATTTGGAGA	C/T
15	−149	TTGTTCAACTAGTA	T/C
15	−52	TCCGAGGAGACGC	T/G
17	−213	TTGTTTCCGGCATC	T/C
17	−82	CATTTGGCCCCTA	C/T
18	−72	GCCCAGTCAC	G/A
18	−63	CGCCATTGCC	C/T
18	−30	GTGTGATGTT	G/A
18	+23	TGATCTGGAGGAGG	T/C
18	+47	GTCTGGGCAGCTTT	G/C
18	+54	CACCGTCAGTGCT	C/A
22	−118	GGCACCTGCC	G/A

【０１５１】

これらのスプライス変異型はまた、ＨＢＭ様効果を付与することができる変化した表現型を産生することもできる。

【０１５２】

これらの変異を、正方向プライマーの５’末端に結合したＭ１３Ｆ（（ＴＧＴＡＡＡＡＣＧＡＣＧＧＣＣＡＧＴ）または逆方向プライマーの５’末端に結合したＭ１３Ｒ（ＡＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴ）を含む表４に示すプライマーを使用してＰＣＲ増幅した８０ｎｇのゲノムＤＮＡを使用して同定した。４μｌのＰＣＲ反応物を、最終体積１００μｌまで水で希釈した。ＥＴ、Ｍ１３Ｆ、およびＭ１３Ｒプライマーを使用するか、示したネスト化配列決定プライマーを使用したＡＢＩ－ＰＲＩＳＭ（登録商標）Ｂｉｇ－Ｄｙｅ（商標）法によって配列決定を行った。構築した配列を、適切な基準配列と比較する。

【０１５３】

以下のＰＣＲ混合物を使用する。
Ｐｒｏｍｅｇａ：５０ｍＭ ＫＣｌ、１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ９．０）、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、１．５ｍＭ $MgCl_2$
Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｄ：６０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）、１５ｍＭ（$NH_4)_2SO_4$、３．５ｍＭ $MgCl_2$
Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｊ：６０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ９．５）、１５ｍＭ（$NH_4)_2SO_4$、２．０ｍＭ $MgCl_2$
Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｍ：６０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ１０．０）、１５ｍＭ（$NH_4)_2SO_4$、１．５ｍＭ $MgCl_2$
全ＰＣＴ混合物に、１２０μＭの４つ全てのｄＮＴＰを添加し、０．４μＭの正方向および逆方向プライマー、８０ｎｇゲノムＤＮＡ、１ＵのＡｍｐｌｉＴａｑ（登録商標）ＤＮＡポリメラーゼ、ならびに１．１ＵのＴａｑＳｔａｒｔ抗体（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を添加した。ＰＣＲ反応を以下のように行う。９４℃、２分；（９４℃、３０秒；Ｘアニーリング温度、３０秒；７２℃、２分）を３５サイクル、および７２℃で３分。
【０１５４】

【表４】

表４：正方向及び逆方向プライマー

エクソン	Ｆ－プライマー（ＰＣＲ）	Ｒ－プライマー（ＰＣＲ）	アニーリング生成物の温度	大きさ	ＰＣＲ緩衝液	Ｆ－プライマー（配列決定）	Ｒ－プライマー（配列決定）
1	GAGACGCGGCGCGGCTTC	CGCCCCAACTCGCTCCCAAC	2-cycle-68	429	dmso	TCCCGCGCGCCCAGCTC	TCGCCAAGTCGCTTCCG
2	AAGGAACTGGAGGTCTTG	CAGAGTCACACCCTTTTTC	62	670	promega	GGCATGGGCAGGGCAGT	TGAAAAACAACTTGGGCTC
3	CCAAGTTCTGAGAAGTCC	AATACCTGAAACCATACCTG	58	523	promega	TGCATTCCTCAGGGCCC	TTGGTTATTTCCGATGGG
4	GGCGTAGTGGTGGGCATCAG	CCCAGCCAGCCACACACCTC	62	680	dmso	ACTGTCGGGGGACCCTC	ATTGCAGCAGGTACCCC
5	GGGAAATTGCAGGCCGTCTG	CTGAGGACCAAGGCGGAGAG	58	633	promega	AGGCTGAGGGCCCCATG	CAGGATTGACCTCCTGG
6	CACCTAACATCACCAGCC	GATGCAAGACAGTGTCCC	62	672	promega	CCTGGCTGAGTATTTCC	TCAATCTCCCTCTCGCC
7	ACACCGACATTTACGAGCAC	AAATAGCAGAGCACAGGCAC	58	484	promega+10% dmso	CGACATTTACTGACACCA	CCATCGGTGCCTCGCCA
8	TCTCAAACAAACAAACAAACAAAAA	TCCTTGGCCAGATACTGTCAC	60	638	promega	ACAAACAAACAAAGCGTCA	CTTTCCTGTCCTGCCCT
9	TGTGTGGCGGGAATAAAG	TTGAGGCAGGAACAGAGG	60	648	promega	CTGTGCACATTGGAGCT	CAAGGTTTTCCCATAAAGG
10	ATGTCTACAAAACACGCTG	CTAATCACTGAGGGCCAC	60	744	promega	GTTCTGGCCTGGCGTGG	ACGGACAGCCTGCCACC
11	TCACCTTACGAGTGAGCC	AGCCTCTCCCGACATAAC	60	677	promega	ACTGTGGGAATTCAGGG	TGCAGCAAAGGCACCCA
12-1	GAAAACCAGCAAAAGCCC	TGTCCATCACGAAGTCCAG	60	677	promega	ATGAGGGCGGCCATGTG	GCGGTTCCGGCCGCTAG
12-2	ACAGCGATTATATCTACTGGAC	ATGGAAAGCACTCAGCAC	60	622	promega	AGACTGGAATCTGCACAG	TGTGCTGGCAGTATGAG
13	AGAATGAAATTCCCCATAGCG	AGACAAAAGTCCTGTGGGGTC	52	676	Invitrogen D	TCCCGTGGACCTCCAGC	ACAACGGGGAAACCCAG
14	GAGAGACCCCCACACCAATAC	CAGGTGGAAAGTCTCCCCAG	63	571	promega	TGGGATTTGACTTTCAGG	CCTGTGAGAGGCTGGCA
15	CAGTTGGATTTAGGGCCTACC	CAGCTGTCAGTGTGAGGACAA	60	656	promega	CTCACCCATTGTGGTCG	AACACGCTACACACAAAG
16	AACTGATGGCCTTCATCCC	TCTTAAAACGCTGTTCGTGGT	60	699	promega	GAGCCCAGCCCAGGTGG	GATTTGTTCTGCGGCAAAAG
17	AGACTGATGGTATGGGCACAG	ATTTGTGAGATGCAGGAAACG	60	662	promega	TAGAGACTGGTGCAGAC	CAGTACTTAGAGGAAAATTC
18	ATTCTCCCAGCCTCTCTTCTG	GCAGGAAGGTGAGATAGACCC	58	722	promega	GGTTGGGGCTGGAGGTG	TCACAGTCTGCCTTCAAG
19	GGGGTCTGTTACTCCTTGCAT	CAGCTCACAGTCTGTCCTCCT	60	645	promega	GGCGTAGACCTCCCCAC	CCGCTGCCCTGGGAAAG
20	ACGTTACCCTGAGGTTGGC	AGGCCTCTGTGTTGAAGGATT	60	640	promega	AGGCTCCCCAGGCCTAG	CTGATGCCAAGCACAGG
21	TTGGAGGAGGTACCATGTGTC	GGTGGATTTGGGTGAGATTTT	55	643	Invitrogen J	TCCCGTTTCACAGATGAG	CAGATTATCCACAATCAAC
22	TTCTGCTGATTTCTGAACCC	TTGCCTTTCACTGAGATGAC	58	558	promega+10%dmso	AACATGCAGTGCCCGCT	CTTCGGGGCAGGTGGCT
23	GGCCTGCATCTTCTGGAGC	CATTCCCTCCACGGGGAC	62	683	promega	TGGCCAGTGGACAGGCC	ACACAACTCAAATGCACAC

【０１５５】

４．マイクロサテライトマーカーの遺伝子型同定

Ｊｏｈｎｓｏｎら、１９９７、Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．、６０、１３２６～１３３２によって最初に報告されたものよりも小さな領域に遺伝子間隔を狭めるために、染色体１１ｑ１２－１３上のさらなるマイクロサテライトマーカーを分類した。新規のマーカーには、以下が含まれる。Ｄ１１Ｓ４１９１、Ｄ１１Ｓ１８８３、Ｄ１１Ｓ１７８５、Ｄ１１Ｓ４１１３、Ｄ１１Ｓ４１３６、Ｄ１１Ｓ４１３９（Ｄｉｂら、１９９６、Ｎａｔｕｒｅ、３８０、１５２～１５４）、ＦＧＦ３（Ｐｏｌｙｍｅｒｏｐｏｌｏｕｓら、１９９０、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ．Ｒｅｓ．、１８、７６４８）、ならびにＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿１、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿２、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿３、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿４、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿５、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿６、およびＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿７（図２を参照のこと）。

【０１５６】

瀉血専門医によって遠心分離血液（２０ｍｌ）をラベンダーキャップ（ＥＤＴＡ含有）チューブに採取した。ＤＮＡ抽出まで血液を冷蔵した。冷蔵室で７日目まで保存した血液では質または収量が減少することなくＤＮＡが抽出された。離れた場所で採血した被験体については、１２を超えるケースで輸送プロトコールを首尾よく使用した。血液サンプルを、冷却用フリーザーパックを同封した発砲スチレンコンテナ中での夜行の宅急便で輸送した。ラベンダーキャップチューブを、各プラスチック輸送チューブに入れ、「ジップロック」バイオハザードバックに入れた。翌日のサンプル到着直後に、ＤＮＡ抽出処理を行った。

【０１５７】

ＤＮＡ抽出手順には、Ｇｅｎｔｒａ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、Ｍｉｎｎｅｓｏｔａ）から購入したキットを使用した。簡単に述べれば、この手順は、全血への３体積の赤血球溶解緩衝液の添加を含む。室温で１０分間のインキュベーション後、溶液をＢｅｃｋｍａｎ卓上遠心分離機にて２，０００×ｇで１０分間遠心分離した。白血球ペレットを、細胞溶解緩衝液中に再構成した。一旦ペレットが完全に再構成されて細胞凝集がなくなると、溶液をＲＮａｓｅにて３７℃で１５分間消化した。タンパク質を、提供されたタンパク質沈殿溶液の添加によって沈殿させ、遠心分離によって除去した。ＤＮＡを、イソプロパノールの添加によって沈殿させて上清から取り出した。この方法は、簡単且つ迅速で、１～２時間を要し、何十ものサンプルを同時に処理可能である。ＤＮＡの収量は、２０ｍｌの全血サンプルについておよそ８ｍｇ超であり、分子量は５０ｋｂ超であった。ＤＮＡを、コード化した５０μｇアリコートのエタノール沈殿物としての－８０℃での保存によって保存した。

【０１５８】

１つの蛍光標識オリゴヌクレオチドプライマーおよび１つの非標識オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、ＤＮＡの遺伝子型を同定した。標識および非標識オリゴヌクレオチドを、ＩｎｔｅｇｒａｔｅｄＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ，Ｉｏｗａ）から得た。マイクロサテライト遺伝子型同定用のすべての他の試薬を、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ－Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．（「ＰＥ－ＡＢＩ」）（Ｎｏｒｗａｌｋ、Ｃｅｎｎｅｃｔｉｃｕｔ）から購入した。ＰＥ－ＡＢＩに記載のようにＡｍｐｌｉＴａｑ（商標）ＤＮＡポリメラーゼを使用して各マーカーについて各ＰＣＲ反応を行った。反応物に、脱イオン化ホルムアミド、ブルーデキストラン、およびＴＡＭＲＡ３５０サイズ標準（ＰＥ－ＡＢＩ）を含む３．５μｌのローディング緩衝液を添加した。ＤＮＡを変性させるための９５℃で５分間の加熱後、Ｍｏｄｅｌ３７７　ＤＮＡシークエンサー（ＰＥ－ＡＢＩ、Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）の操作マニュアルに記載のようにサンプルをロードし、電気泳動を行った。ゲル電気泳動後、ＰＥ－ＡＢＩ　ＧＥＮＥＳＣＡＮ（商標）およびＧＥＮＯＴＹＰＥＲ（商標）ソフトウェアを使用してデータを分析した。第１に、ＧＥＮＥＳＣＡＮ（商標）ソフトウェアにより、第１の分析ステップ前にレーントラッキングを手動で最適化した。ゲルレーンデータの抽出後、各レーンの検量線プロフィールを試験し、線形性およびサイズコーリングについて評価した。これらのパラメータのいずれかを含む問題を有するレーン

を、再トラッキングして評価した。一旦全レーンがトラッキングされると、サイズ標準が正確に同定され、データを対立遺伝子同定用のＧＥＮＯＴＹＰＥＲ（商標）にインポートした。対立遺伝子コーリング（瓶化）を迅速に処理するために、Ｇｕｙ　Ｖａｎ　Ｃａｍｐ博士のインターネットウェブサイト（ｈｔｔｐ：／／ａｌｔ．ｗｗｗ．ｕｉａ．ａｃ．ｂｅ／ｕ／ｄｎａｌａｂ／ｌｄ．ｈｔｍｌ）のプログラムＬｉｎｋａｇｅ　Ｄｅｓｉｇｎｅｒを使用した。このプログラムにより、ＧＥＮＯＴＹＰＥＲ（商標）によって得られたデータの家系図作成プログラムＣｙｒｉｌｌｉｃ（バージョン２．０、Ｃｈｅｒｗｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｌｉｍｉｔｅｄ、Ｏｘｆｏｒｄ、Ｇｒｅａｔ　Ｂｒｉｔａｉｎ）へのインポートおよびその後のプログラムＬＩＮＫＡＧＥ（Ｌａｔｈｒｏｐら、１９８５、Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．、３７、４８２～９８）を使用した連鎖解析が容易になる。

【０１５９】

５．連鎖解析

図１は、本発明の遺伝子連鎖研究で使用した個体の家系図を示す。詳細には、プログラムＬＩＮＫＡＧＥ（Ｌａｔｈｒｏｐら、１９８５、Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．、３７、４８２～９８）のＭＬＩＮＫおよびＬＩＮＫＭＡＰコンポーネントを使用して二点連鎖分析を行った（Ｌａｔｈｒｏｐら、１９８５　Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．，３７：４８２～９８）。家系図／マーカーデータを、プレファイルとしてＣｙｒｉｌｌｉｃからＭａｋｅｐｅｄプログラムにエクスポートし、連鎖解析のために適切なペッドファイルに変換した。

【０１６０】

以下の３つのモデルを使用して元の連鎖解析を行った。（ｉ）完全な浸透率の常染色体優性モデル、（ｉｉ）浸透率が減少した常染色体優性モデル、および（ｉｉｉ）定量的形質モデル。巨大で拡大した家系の２２人のメンバー由来の連鎖マーカーについてのＤＮＡ分析によって、ＨＢＭ遺伝子座を染色体１１ｑ１２－１３にマッピングした。２２個の常染色体の距離を６～２２ｃＭの範囲の間隔とした３４５個の蛍光マーカーのパネルを使用した高度の自動化したテクノロジーを使用した。第１１染色体上のこの領域由来のマーカーのみが連鎖の証拠を示した（ＬＯＤスコア約３．０）。二点分析および多点分析によって得られた最も高いＬＯＤスコア（５．７４）は、Ｄ１１Ｓ９８７（図２の地図上の位置は５５）であった。９５％の信頼区間は、マーカーＤ１１Ｓ９０５とＤ１１Ｓ９３７との間のＨＢＭ遺伝子座に存在する（図２の地図上の位置は４１～７１）。ハプロタイプ分析もまた、この同一の領域中にＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子を位置付ける。マーカーＤ１１Ｓ９８７、Ｄ１１Ｓ９０５、およびＤ１１Ｓ９３７のさらなる説明を、Ｇｙａｐａｙら、１９９４、Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、第７巻に見出すことができる。

【０１６１】

本発明では、本発明者らは、マーカーＤ１１Ｓ９８７とＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿５との間の領域へのＨＢＭ間隔の縮小を報告する。これら２つのマーカーは、元の分析由来の範囲決定マーカー（Ｄ１１Ｓ９０５およびＤ１１Ｓ９３７）の間に存在し、互いに約３ｃＭ離れている。マーカーＤ１１Ｓ４１９１、Ｄ１１Ｓ１８８３、Ｄ１１Ｓ１７８５、Ｄ１１Ｓ４１１３、Ｄ１１Ｓ４１３６、Ｄ１１Ｓ４１３９（Ｄｉｂら、１９９６、Ｎａｔｕｒｅ、３８０、１５２～１５４）、ＦＧＦ３（Ｐｏｌｙｍｅｒｏｐｏｌｏｕｓら、１９９０、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ．Ｒｅｓ．、１８、７４６８）（遺伝子マーカーに関する情報を、Ｇｅｎｏｍｅ　Ｄａｔａｂａｓｅのインターネットサイトｈｔｔｐ：／／ｇｄｂｗｗｗ．ｇｄｂ．ｏｒｇ／で見出すことができる）、ならびにマーカーＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿１、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿２、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿３、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿４、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿５、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿６、およびＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿７由来の遺伝子型データを使用して間隔の縮小を行った。

【０１６２】

図１に示すように、上記遺伝子マーカーを使用したハプロタイプ分析により、Ｚｍａｘ

１（ＬＲＰ５）遺伝子が局在する第１１染色体の間隔が有意に精密化された個体９０１９および９０２０の組換え事象（乗換え）が同定される。個体９０１９は、ＨＢＭ遺伝子を有する母方の染色体由来の第１１染色体の一部および第１１染色体ホモログ由来の一部を引き継ぐＨＢＭ罹患個体である。ＨＢＭ遺伝子保有染色体から受け継がれた部分には、マーカーＤ１１Ｓ９３５、Ｄ１１Ｓ１３１３、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿４、Ｄ１１Ｓ９８７、Ｄ１１Ｓ１２９６、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿６、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿２、Ｄ１１Ｓ９７０、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿３、Ｄ１１Ｓ４１１３、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿１、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿７、およびＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿５が含まれる。Ｄ１１Ｓ４１３６に由来し、かつテロメアテロメア方向であり続ける部分は、非ＨＢＭ染色体由来である。このデータを、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子のＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿５に対してセントロメア側の位置に記録する。個体９０２０は、極めて重要な組換え事象を示す非罹患個体である。この個体は、ＨＢＭ遺伝子を保有する父親（個体０１１５）の染色体１１ホモログ由来のマーカーＤ１１Ｓ９３５、Ｄ１１Ｓ１３１３、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿４、Ｄ１１Ｓ９８７、Ｄ１１Ｓ１２９６、およびＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿６ならびにＨＢＭ遺伝子を保有しない父親の染色体１１ホモログ由来のマーカーＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿２、Ｄ１１Ｓ９７０、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿３、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿１、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿７、ＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿５、Ｄ１１Ｓ４１３６、Ｄ１１Ｓ４１３９、Ｄ１１Ｓ１３１４、およびＤ１１Ｓ９３７を含む組換え父系染色体を受け継ぐ。マーカーＤ１１Ｓ４１１３は、個体０１１５のホモ接合性により情報価値がない。この組換え事象を、マーカーＤ１１Ｓ１２９６とＤ１１Ｓ９８７との間のＨＢＭ領域のセントロメア境界に記録する。

【０１６３】

二点連鎖解析もまた使用して、第１１染色体上のＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子の位置を確認した。完全な浸透率のモデルにおける二点連鎖解析の連鎖結果を、以下の表５に示す。この表は、第１の列にゲノムマーカーを列挙し、表の上に組換え比を列挙する。列の各細胞は、最初の行で示した組換え比でのＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子に対する連鎖について試験した各マーカーのＬＯＤスコアを示す。例えば、ピークＬＯＤスコア７．６６はマーカーＤ１１Ｓ９７０に存在し、ハプロタイプ分析で定義した間隔の範囲内である。

【０１６４】

【表５】

マーカー	0.0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4
D11S935	－無限大	0.39	0.49	0.47	0.41	0.33	0.25	0.17	0.10
D11S1313	－無限大	2.64	2.86	2.80	2.59	2.30	1.93	1.49	1.00
D11S987	－無限大	5.49	5.18	4.70	4.13	3.49	2.79	2.03	1.26
D11S4113	4.35	3.99	3.62	3.24	2.83	2.40	1.94	1.46	0.97
D11S1337	2.29	2.06	1.81	1.55	1.27	0.99	0.70	0.42	0.18
D11S970	7.66	6.99	6.29	5.56	4.79	3.99	3.15	2.30	1.44
D11S4136	6.34	5.79	5.22	4.61	3.98	3.30	2.59	1.85	1.11
D11S4139	6.80	6.28	5.73	5.13	4.50	3.84	3.13	2.38	1.59
FGF3	0.59	3.23	3.15	2.91	2.61	2.25	1.84	1.40	0.92
D11S1314	6.96	6.49	5.94	5.34	4.69	4.01	3.27	2.49	1.67
D11S937	- 無限大	4.98	4.86	4.52	4.06	3.51	2.88	2.20	1.47

【０１６５】

一塩基多型（ＳＮＰ）により、ＨＢＭ領域をさらに定義する。このＳＮＰは、ＳＮＰ＿コンティグ０３３－６と呼ばれ、遺伝子マーカーＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿５に対して２５ｋｂセントロメア側に位置する。このＳＮＰは、遺伝子マーカーＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿７に対してテロメア側である。ＳＮＰ＿コンティグ０３３－６は、ＨＢＭ罹患個体０１１３に存在する。しかし、０１１３の息子であるＨＢＭ罹患個体９０１９は、この

ＳＮＰを保有しない。したがって、これは、乗換えはこのＳＮＰに対してセントロメア側であることを示す。遺伝子マーカーＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿５およびＧＴＣ＿ＨＢＭ＿マーカー＿７のプライマー配列を、以下の表６に示す。

【０１６６】

【表６】

マーカー	プライマー（正方向）	プライマー（逆方向）
GTC_HBM_ マーカー_5	TTTTGGGTACACAATTCAGTCG （配列番号63）	AAAACTGTGGGTGCTTCTGG （配列番号65）
GTC_HBM_ マーカー_7	GTGATTGAGCCAATCCTGAGA （配列番号64）	TGAGCCAAATAAACCCCTTCT （配列番号66）

【０１６７】

記載の家系は、非常に興味深いいくつかの特徴を有し、とくに、その骨は、非常に高密度であるが、絶対的に正常な形状である。ＨＢＭ罹患個体の骨格の外のり寸法は正常であるが、髄腔が存在し、造血を妨害する。ＨＢＭ罹患メンバーは、骨折に耐性を示すようであり、神経学的症状はなく、試験されたメンバーにおいていかなる器官または系機能の障害の症状も認められない。家系のＨＢＭ罹患メンバーは過度の疾患または障害を罹患することなく高齢まで生存している。さらに、ＨＢＭ表現型は、骨粗鬆症、偽神経膠腫を伴う骨粗鬆症、エンゲルマン病、リビング病、高ホスファターゼ血症、ヴァン・ビューレン病、メロレオストーシス、大理石骨病、ピクノディスオストーシス、骨硬化症、骨斑紋症、末端肥大症、パジェット病、線維性骨異形成、管狭窄、骨形成不全症、副甲状腺機能低下症、偽性甲状腺機能低下症、偽性偽性甲状腺機能低下症、原発性および二次性副甲状腺機能亢進症および関連症候群、高カルシウム尿症、甲状腺の髄様癌、骨軟化症、ならびに他の疾患などの他の骨障害と適合しない。明らかに、この家族のＨＢＭ遺伝子座は、骨密度調節において非常に強力且つ実質的な役割を果たし、その同定は、骨密度および骨粗鬆症などの疾患の病因を調節する経路の理解において重要なステップである。

【０１６８】

さらに、ＨＢＭ遺伝子を保有する（したがって、ＨＢＭタンパク質を発現する）より老齢の個体は、正常な個体に特徴的な骨量の喪失を示さない。言い換えれば、ＨＢＭ遺伝子は、骨粗鬆症のサプレッサーである。本質的に、ＨＢＭ遺伝子を保有する個体にＨＢＭタンパク質を投与すると、結果として、骨粗鬆症を発症しない。このin vivo所見は、正常な個体のＨＢＭ遺伝子もしくはタンパク質またはそのフラグメントでの治療により骨粗鬆症が改善することを強力に証明する。

【０１６９】

６．物理マッピング

ＨＢＭ遺伝子座のクローニングおよび特徴づけのための試薬を提供するために、上記の遺伝子マッピングデータを使用して、染色体１１ｑ１３．３上にＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）を含む領域の物理地図を構築した。物理地図は、順序をつけた分子ランドマークセット、染色体１１ｑ１３．３由来のＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子領域を含むＢＡＣクローンセットからなる。

【０１７０】

種々の公的に利用可能なマッピング供給源を利用して、ＨＢＭ領域中に存在するＳＴＳマーカー（Ｏｌｓｏｎら、１９８９、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４５、１４３４～５）を同定した。この供給源は、ＧＤＢ（Ｗｈｉｔｅｈｅａｄ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｇｅｎｏｍｅ Ｃｅｎｔｅｒ、ｄｂＳＴＳ ａｎｄ ｄｂＥＳＴ（ＮＣＢＩ）、１１ｄｂ、ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｔｅｘａｓ Ｓｏｕｔｈｗｅｓｔｅｒｎ ＧＥＳＴＥＣ、ｔｈｅ Ｓｔａｎｆｏｒｄ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍｅ Ｃｅｎｔｅｒ）およびいくつかの参考文献（Ｃｏｕｒｓｅａｕｘら、１９９７、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、４０、１３～２３；Ｃｏｕｒｓｅａｕｘら、１９９６、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、３７、３５４～６５；Ｇｕｒｕら、１

９９７、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、４２、４３６～４５；Ｈｏｓｏｄａら、１９９７、Ｇｅｎｅｓ　Ｃｅｌｌｌｓ、２、３４５～５７；Ｊａｍｅｓら、１９９４、Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．、８、７０～７６；Ｋｉｔａｍｕｒａら、１９９７、ＤＮＡ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、４、２８１～９；Ｌｅｍｍｅｎｓら、１９９７、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、４４、９４～１００；およびＳｍｉｔｈら、１９９７、Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．、７、８３５～４２）を含んでいた。地図を手動で組み込んで、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）を含む領域をマッピングするマーカーを同定した。

【０１７１】

ＧＤＢまたは参考文献から得た既存のＳＴＳのプライマーを以下の表６に列挙する。したがって、表７は、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子領域の物理地図の作成で使用したＳＴＳマーカーを示す。

【０１７２】

【表７Ａ】

TABLE 7: HBM STS Table

STS Name	Locus Name	Type	GDB Access. #	Size (kb)	SEQ ID NO: Forward Primer	SEQ ID NO: Reverse Primer	Gene Name
ACTN3		Gene	GDB:197568	0.164	67: CTGGACTACGTGGCCTTCTC	68: TTCAGAAGCACTTGGCTGG	Actinin, alpha 3 - skeletal muscle
PC-B/PC-Y		Gene	GDB:197884	0.125	69: CTCAGTGCCATGAAGATGGA	70: CAAGATCACTCGATCCTCCAGG	Pyruvate Carboxylase
	D11S2161E	Gene		0.322	71: GTTTCAGGAGACTCAGAGTC	72: TTCTGCAGGTTGCTGTTGAG	Adenosine Receptor (A2) Gene
ADRBK1		Gene	GDB:4590179	0.117	73: TTATTGTGATTTCCCGTGCC	74: GCCCTCTGTCCTGACTTCAGG	Beta-adrenergic receptor kinase
PSANK3		GENE		0.259	75: GAGAAGAAATAAGGGACC	76: TGCTTTGTAAAGCACTGAGA	stm. to Human endogenous retrovirus mRNA long terminal repeat
PP1(1/2)/PP1(2/2)		Gene	GDB:197566	0.208	77:GAAGTACGGGCAGTTCAGTGGCCT	78: ATACACCAAGGTCCATGTTCCCCGT	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform
GSTPL/PCR1		Gene	GDB:270086	0.19	79:AGCCTGGGCCAGAGCGTGAGACTACGT	80: TCCCGGAGCTTGCACACCCCTTCACA	Glutathione S-transferase pi
NDUFV1		Gene		0.521	81:CATGTGCCCACCTCATTCAT	82: CAAGATTCTGTAGCTTCTGG	NADH dehydrogenase, (ubiquinone) flavoprotein 1 (51kD)
PSANK2		GENE		0.157	83: CAGAGAAGTCAAGGAGCTTG	84: ATCCTCTCACATCCCACACT	Aldehyde Dehydrogenase 8 (ALDH8)
PSANK1		EST		0.3	85: CAAGGCTAAAAGCAGAAAAA	86: TCAGGAGCATTTCATCTCTTTT	Human ribosomal protein L37 (PSANK1) pseudogene.
UT5620	D11S1917	MSAT	GDB:314521	0.211	87: AAGTCGAGGCTGCAAGGAG	88: GCCCTGTGTTCCTTTCAGTA	
AFM289ye9	D11S1337	MSAT	GDB:199805	0.287	89: AAGGTGTGAGGATCACTGG	90: AGCTCATCGGGGCTATT	
GALN		Gene		0.322	91: GCTTCTCCGAGTGTATCAAC	92: ATGGCAGAGGAGCTTAGAACA	Preprogalanin (GAL1)
pHS51	D11S97	VNTR	GDB:177850		93: GATCAGCGAACTTCCTCTCGGCTC	94: TCCACATTGAGGACTGTGGGAACG	
BCL1(1)/BCL1(2)				0.205	95: GCTAATCACAGTCTAACCGA	96: TTGCACTGTCTTGGAGTGCA	B-cell CLL/lymphoma 1 - Cyclin D1 (PRAD1 gene)
COND1		Gene	GDB:4590141	0.248	97: GCACAGTGTAGTGGGGTTCTAGGC	98: CAGGCCCAAAGGACATGCACAGCGC	Cyclin D1
FGF4		Gene	GDB:4590133	0.549	99: CACCGATGAGTGCACGTTCAAGGAG	100: CAGACGAAGATGCTCCACGCCATAC	Fibroblast growth factor 4
FGF3_PCR1		Gene	GDB:188627	0.161	101: TTTCTGGGTGTGTCTGAAT	102: ACACAGTTGCTCTAAAGGGT	Fibroblast growth factor 3
AFM164ZF12	D11S913	MSAT	GDB:188151	0.22	101: CATTTGGGAAATCCCAGAAGA	104: TAGGTGTCTTATTTTTGTTGCTTC	
AFM419OTD5		MSAT	GDB:1222329	0.275	105: GACATACCATGAACACTATAAGAGG	106: CAACCCATACCAGGGATAAG	
SHGC-15295	D11S4889	STS	GDB:740690	0.147	107: GAACAGAGGGGGTAAGTTGGC	108: TGAGGACACAGATACTGATGGG	
SHGC-3094	D11S4540	STS	GDB:740102	0.167	109: GAAGTGTTCCCTCTTAAATTCTTG	110: GAACTATATTGTAGTTAGTGAGGAG	
SHGC-14407	D11S4664	STS	GDB:740516	0.158	111: CCTGTAACCCCCAGTCCC	112: TCTTGCTTCCTAAGTTTCTCCGG	
SHGC-10946	D11S4327	Gene	GDB:674522	0.311	113: ACTCCATCCACCTCATCACTG	114: TGCTGTTTGCCTCATCTGAC	Choline Kinase
5515	D11S703	STS	GDB:196290	0.166	115: GTGGACAGGCATTAGCTGAGG	116: TGTTCACTCTCTGCCTGCAG	
AFM147XD10	D11S1889	MSAT	GDB:307895	0.183	117: AGCTGGACTCTCACAGAATG	118: CAAGAGGCTGGTAGAAGGTG	
AFMA131YE5	D11S987	MSAT	GDB:195002	0.082	119: GACTCCAGTCTGGGCAATAAAAGC	120: GGTGGCAGCATGACCTCTAAAG	
AFMb358ad9	D11S4178	MSAT	GDB:611922	0.237	121: CAGGCCCAGTCTCTTG	122: CGTGTCCAGATGAAAGTG	
AFMa272yb5	D11S4113	MSAT	GDB:608115	0.218	123: ACCTCACGGTGTAATCCC	124: CTTGAAGCCCATCTTTGC	
WI-17803		EST	GDB:4581644	0.15	125: TATTTGCAAAGCTTGAGACTTCT	126: AATCACTGTGCTTTGTTGCC	
SGC31923		EST	GDB:4578606	0.126	127: ACTTTATTGTCAGCGTGGGC	128: ACTCCCTCGATGGCCTTCC	Transformation-sensitive protein IEF SSP 3521
WI-7741	D11S4364	GENE	GDB:671652	0.324	129: GAGCAGGGGAGAGAAGGC	130: CCCAACTGGCTTGTTTTATTG	ZNF162 - splicing factor 1
SGC35223		EST	GDB:4582598	0.13	131: AGCCACTTTATTGTTATTTTGATGC	132: AGAGTGAACAAAAGCAAACATACC	
WI-16754	D11S4418	EST	GDB:4578377	0.15	133: GTGGAGTGTGGGAATTGGG	134: TACTGTTCTGATAAGTATGTCGGC	
WI-6315		EST	GDB:678804	0.224	135: ATGCTTTTGCATGATTCTAATTATT	136: TCCCCAAAAGAATGTAAAGG	
WI-16915		EST	GDB:4584055	0.125	137: CTGGTCTTCCTTGTGTCTG	138: ATCACCCAGGCCAGGGAT	Nitrogen inducible gene (MIIG-2)
SGC30608		EST		0.128	139:TCAGAGCAGAACTGTTTTTACA	140: CCTGCTTGAAAGTTCTAGAGCC	
WI-17663		EST	GDB:4583346	0.126	141: CAAGCCGGGTTTTATTGAAA	142: GATGCCAGGACCATGGAC	
WI-6383		Gene	GDB:1222237	0.199	143: GCATATAGAAACAATTATTGCCAG	144: CTCTGAAGCAGGGAGCCAGAG	Human tat interactive protein (TIP60)
SGC31567		Gene	GDB:4584032	0.207	145: CTACCACACCCAGGGCTTC	146: CAAGCGAAAGCTGCCTTC	Calcium activated neutral protease large subunit, muCANP, calpain
SGC30658		EST	GDB:4584037	0.15	147: GTTGTCTTGACTTCAGGTCTGTC	148: TTTTCCTTCAACAATCACTACTCC	
SGC34590		EST		0.13	149: GCGTGGGGATATAGAGTCA	150: TACGTGGCCAGAAGCTAGG	
SGC33927		EST	GDB:4582382	0.15	151: TAATATATCCCCAGTCTAAGGCAT	152: AGCTTGCAGATGGAGCCC	
WI-8671		EST	GDB:1222235	0.124	153: TGGTTTTAAACCTTTAATGAGAAA	154: TGTTGATCTATACCCTGTTTCCG	
WI-12334		EST	GDB:1222257	0.127	155: AATTATTTAAAAGAGGAAAGGCA	156: TGGCTGTGAACTTCCTCTCTGA	
WI-18402		EST	GDB:4581874	0.113	157: GGTTACAGAAAAACATTTGAGAGAT	158: TGAGCTTTAGTTCCTCTCTCTG	
WI-18671		EST	GDB:4584947	0.131	159: TTGAAAAACCATTTATTTCACCG	160: TCTGGGCTGTTTGGATTT	Hark
WI-12856		EST	GDB:4576606	0.209	161: TTGAAAACCATTTATTTCACCG	162: TGTTCTCTTCTCCCAGCAGG	Hark
SGC33767		EST	GDB:4581106	0.15	163: CTTTATTGAAAACATTGAGTGCA	164: TTGTCAAATTCCCCCCAAAA	
AFM343YB5		MSAT	GDB:1222332	0.181	165: AAACCACGAGCCNCCAA	166: CCCTGGAAAGGTAAGATGCT	
SGC33744		EST	GDB:4575826	0.15	167: CTTTTGGTAGAGCAAGGTCTCA	168: TATCTGTCTGTAGTGCTTCAAATGT	
SGC32272		EST	GDB:4581592	0.135	169: GACGAAGGTGATTCCAGGGC	170: ACTGAAGAACTCTTGTCCT	
SGC34148	1	EST	GDB:4583084	0.1	171: CAGATAAAAGAGTCACTATGGCTCA	172: CACTTCTCCCACTTTGTCCC	
WI-18546		EST	GDB:4574598	0.133	173: TTATTGATAAGCATTAGTGAACCCC	174: TGGCAAGTTAGGCAACAGTCA	Human 1.1 kb mRNA upregulated in retinoic acid treated HL-60 neutrophilic cells
SGC31103		EST	GDB:4567265	0.1	175: CTATGCCCAGAGATGAACAGG	176: TCCACTTAGGGCTATGTGGC	
SGC30028		Gene	GDB:4580505	0.128	177: GCCAGCTTTATTGAGTAAACTTCC	178: CACTGGAGACTACAAGTGGTGG	Human pyruvate carboxylase precursor
WI-2875	D11S4407	STS	GDB:678546	0.125	179: CATCCCAACCATCACTCAGT	180: GGGGACTAGCTTACAGATTTGA	
SGC36985		Gene	GDB:4577182	0.223	181: AGACTACATTTTGGAACCAGTGG	182: TGAAAGGATATTTATACCCTGGA	LAR-interacting protein 1b
GCT16907	D11S4270	STS	GDB:626245	0.137	183: GAAGGTTTTGTCCCTGATC	184: TGAGGGTTGGGAAGATCATA	
WI-6504	D11S3974	EST	GDB:586142	0.174	185: CCTCATAGCCAACCCG	186: CAGCTAACTGTTGACATGCCA	
SGC31049		EST	GDB:4580093	0.15	187: TCTTTACTGTGCTTACAACTTTCCT	188: CAACAGTGCAGTGGGTATCG	
TIGR-A002217		EST	GDB:1222193	0.199	189: AGATCAGCAAGCAGATAG	190: CATTCCACATGGAATAGAC	NDUFV1
WI-5996	D11S2382	EST	GDB:458683	0.1	191: CATACTATGAGGTGTGCTACAGG	192: GCATTTTCTCATCCTCCTTGC	amplaxin (EH51)
WI-16987		EST	GDB:4575848	0.15	193: TTACAGCCACCAAGGTTTCC	194: AGGTGTGTGTGCCAGGTTGA	Nuclear mitotic apparatus protein 1, NUMA
SGC31912		EST	GDB:4567868	0.101	195: CACTGTTATCTCATTAACTGTGAGG	196: TTTGATTTTGTGTCTCCAAA	

【表７Ｂ】

TABLE 7: HBM STS Table

STS Name	Locus Name	Type	GDB Access. #	Size (kb)	SEQ ID NO: Forward Primer	SEQ ID NO: Reverse Primer	Gene Name
WI-13500		EST	GDB:4577893	0.15	197: CCCCACTCCCACTTTTATTT	198: CCAGTCACCTTTACTAGTCCTTTG	
CHLC.GATA1B01.P7933	D11S971	MSAT	GDB:684255	0.103	199: AGGACACAGCCTGCATCTAG	200: ACCAGCATTGCACTAAAAG	
SGC35519		Gene	GDB:4577180	0.134	201: GATGGGTCACACTACCTGTCA	202: ACATTTATATTTGGACATGCAACC	LAR-interacting protein 1a mRNA
WI-11974		EST	GDB:1222355	0.108	203: AGCATCTTTAATGTTGTCAGGCA	204: ATGTGCTGGGCTGGAAAG	Carnitine palmitoyl transferase 1
WI-15744		Gene	GDB:4574740	0.108	205: TCACATTCAAAATGGGCAA	206: CTGCTGTGTGGTGTGTCGC	Beta-adrenergic receptor kinase 1, ADRB1
WI-17496		EST	GDB:5883336	0.131	207: TGTTTTATTTCTCAGTACAAAGCCA	208: GACCTCCTGTGTGACACACG	
WI-9159	D11S4381	EST	GDB:678144	0.111	209: CCACAAATTATTTATAGTTCTGCG	210: GTAAGATTCTCCACTGTTGCACC	FGF4
WI-4232		STS	GDB:1222150	0.175	211: CCTATAATGGGCTGGACCAA	212: ACTCCTCATGTGAAGTCACCG	
SHGC-4167		EST	GDB:4566789	0.161	213: CAGTGTGCAGTTTTCTAATTT	214: CAGCATCTTCAGCACTTACC	Human DNA helicase gen (SHBP2)
WI-14303		EST	GDB:4576938	0.15	215: CTGCATTTATTATTAGAAATCAACAG	216: TGCTGCTGGGAGTCAGAGATC	
WI-16597		EST	GDB:4585666	0.13	217: CAGGGCACTGAGATACACTTACC	218: AAGGATCAAGCAGGCATTTG	Human DNA helicase gen (SHBP2)
RC2951CATTFOR/RC2951CATTREV	D11S970	MSAT	GDB:191084	0.15	219: ACACATCTCTCTGTGCCCC	220: TGAACCCTGGAGGCAGAG	
UT979	D11S1296	MSAT	GDB:198525	0.362	221: CATTCCCCAGTTTGCAGAC	222: GTGCTGGGATTACAGGTGT	Nuclear mitotic apparatus protein 1, NUMA
128U1282	D11S1959E	EST	GDB:3352116	0.07	223: GCAGAGAAGTCCTGTTAGCC	224: CCATGCTAGAGAAGCAGCAAC	High sulphur keratin, KRH
D11S468	D11S468	STS		0.096	225: AGTGTGGGGCAGGACCTCTG	226: CAGACAGATAGCCCTGGGTTC	
D11S668	D11S668	STS	GDB:179349	0.143	227: TCCCTCATCCCCCTTGTCTGT	228: AGCCCCCCTGGGGATAATC	protein phosphatase 2A , PP2A
RH18048		Gene	GDB:4572853	0.188	229: GATGCTTACCTACCACGGC	230: AGCATTCCTATCTGGCCTATG	Amplaxin
IGHMBP2		Gene	GDB:4590087	0.699	231: TGGCAGACCATGCTCCGCCT	232: GAGAAGCCGGGAGGCTCTG	Aldehyde dehydrogenase (ALDH8)
NUMA		Gene	GDB:4590244	0.277	233: CTCCATCACACCAGATTTGAGGCT	234: GGGTGTGAGCTGCTGCTGAAGG	Human DNA helicase gen (SHBP2)
KRN1		Gene	GDB:4590232	0.228	235: AGTGGCAAACCTCAGGTACTCCCGA	236: CAGTTTGGCTCAGACATATGGGGCA	Nuclear mitotic apparatus protein 1, NUMA
Cda1f06	D11S2302E	EST	GDB:4453887	0.091	237: CATTAAGTATGGGGGGAGAG	238: CAAAGGGACAGTGAGTTAGGG	High sulphur keratin, KRH
RH10753		Gene	GDB:4563588	0.194	239: GGAGTAGACCATGATTACTCTG	240: CATGGTCTATTTATTCTCTG	
EPS1		Gene	GDB:4590016	0.64	241: CGCCCTGGATCTCACACTACA	242: GGGCCATCAGGGGATGGGTAGA	protein phosphatase 2A , PP2A
SHGC-11098	DXS9736	Gene	GDB:737674	0.137	243: GCTCCTATCTGTTGTTTGAATGG	244: CCGTGGCATAAGATAAGTAAACG	Amiloxin
TNPM1		Gene	GDB:4590093	0.382	245: CTTGGAGCGCTATGAGGAGGGC	246: ATGGCAACTGACCTTCCGTCCTG	Androgen Receptor
RH18051		EST	GDB:4572859	0.195	247: TTGGAGTCACAGGGGC	248: CAGCACTATCCTTGGGG	S1C protein,Inositol polyphosphate phosphatase-like 1
Cda1cc11	D11S2297E	EST	GDB:443869	0.1	249: AACAAAGCTGCTTAGCACCTG	250: GATGAGGACCAACTGGTGTGAC	NOF1
12749/1250	D11S1957E	EST	GDB:3352110	0.247	251: TTTTTCCAATAATGTGACTTTC	252: CAATCCCAACCGTAACAGGGC	
NDUFV1	D11S2245E	EST	GDB:445695	0.64	253: CTTGATCTCCCCCAGGAAC	254: GCTCGCTGAAGGATGAAGAC	NDUFV1
AFM003zg5	DXS9736	Gene	GDB:737674	0.137	243: GCTCCTATCTGTTGTTTGAATGG	244: CCGTGGCATAAGATAAGTAAACG	
AFM059xg9	D11S4136	MSAT	GDB:609546	0.19	255: GAATCGCTTGAACCCAG	256: CCAGGTGATCTTAACGG	
Cda17d2	D11S4196	MSAT	GDB:614025	0.2	257: GAAGGTNTTCATGTAGGCGT	258: TAATGGTTCGCTGGTCCC	
SHGC-1364	D11S2288E	EST	GDB:445842	0.158	259: AGGGAAAATGGTATGTGGGAG	260: GCAGTTGTTGTGAAGGCAGG	
RH17410	D11S951E	EST	GDB:4502765	0.137	261: AGTGGACAAATGAGGAAAACAGG	262: CCAACCAGTTTGCTCACATGCC	
RH17414		EST	GDB:4571587	0.126	263: TGACATCTTTGCATTATGCC	264: AGTTATTCCACCCTGATACCG	
RH17770		EST	GDB:4571595	0.121	265: AGCTCTTGCTTCTCTAGTCCA	266: CAAAGTTGTTCTTGTTGTTGTTC	
SEA		EST	GDB:4572301	0.267	267:GCCTCTCAAGTAGTTGGAACC	268: TGTGTATCCATAGTGCAAACAG	
RH10589		EST	GDB:4590169	0.13	269: CTCAAGCCAGCCATCACT	270: GGACTCTTCCATGCCAGTG	S13 avian erythroblastosis oncogene homolog
TIGR-A006P20		EST	GDB:4587692	0.107	271: AATGATGATCTCAACTCTG	272: ACTGTAAGAACTCTTGTTCCT	
TIGR-A007D15		EST	GDB:4588398	0.236	273: GACATCTGTTAGTCTCATAATTC	274: GGTAACAGTTGTCTTGCTT	
TIGR-A008B14		EST	GDB:4588882	0.24	275: CTATGTACAAAACAGGAAGAG	276: ATCCTAGTTTCCTCTCCTCT	
TIGR-A008K11		EST	GDB:4589094	0.141	277: GTAAATGAGAACAGACAAATGA	278: CTATTGGATGTGTAATATTGTTATGG	Merlin gene (MEN1)
TIGR-A008P15		EST	GDB:4589662	0.203	279: AAGTAGAACAAAATGAGGGAC	280: CCTACCCCAAGTAACAG	
TIGR-A008T11		EST	GDB:4589278	0.182	281: ACTTCCTATAAATTGGAGGTGAG	282: GAGGAGCTTCAAGAGGAA	
TIGR-A008U48		EST	GDB:4589364	0.138	283: CATACTCCTAGACTCAAGGAATC	284: GAATGATGTACATCGAATTCTTTG	
TIGR-A008X45		EST	GDB:4589838	0.107	285: GTGTTGAGGAGAAAGCAACT	286: CTCCGAGTAGTCACATTCC	
SHGC-11839	D11S4611	Gene	GDB:740339	0.242	287: CAAGTTACAAATACTTAAGCCG	288: CAAGACCCTATCTCTACAAAAAC	
RH81242	D11S4929E	EST	GDB:3888276	0.151	289: TTTATTAGAAGTGACTCTTGGCCC	290: GACTACCTGCCCTCACCTTG	Folate receptor 2 (FBP2)
SHGC-13599	D22S1553	Gene	GDB:737558	0.149	291: TTCTCATGTACAAAGCGGTC	292: CCACTGGCTTCCTCTCTTTTT	cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE2A3 (PDE2A)
SHGC-11867	D11S4331	Gene	GDB:674684	0.147	293: CACCAGAAGGTTGGGGGTG	294: ACTATTACGAATGTGAGCGGG	Macrophage Migration Inhibitory factor
SHGC-15349	D22S124	EST	GDB:740819	0.14	295: CTCATGCTGGATGACCCC	296: TTGCCTTTCTTGAAACTTAATTCC	P2U Purinoceptor
BosMat05	D11S1235E	EST	GDB:445662	0.141	297: TCACAGCCTTGTCAGAGG	298: ACATGCTGTGGCCACAATG	
Bos9m07	D11S1238E	EST	GDB:445674	0.095	299: CCTGAGCTACTGCCAGAG	300: CCCTGACTTGGACAGTGTCC	
fdr1		Gene	GDB:197840	0.09	301: TCAGAGTCACTCCTGCCC	302: CAAATTCAAGCTCATCCAGACC	Folate receptor2 (FBP2)
NIB1738	D11S4284	EST	GDB:626260	0.3	303: CGGCATTTCATCCAAGGAC	304: GGTGTTAGGAGGTGCGACAAT	
WI-7351	D11S413	Gene	GDB:679143	0.173	305: TTTCATTTATTGAGCACCTG	306: CTTAAGCCCACTGTTGTTTGG	Folate receptor3 (FBP3)
WI-14325		EST	GDB:4578507	0.324	307: CCTCCTACCTTGCAAAGC	308: TGGAAGACCCCAGAGGAC	
WI-15192		EST	GDB:4575806	0.132	309: AAAGCAAAAGTAACAGCAACA	310: GTGTGTGGCCACAATATTG	
WI-17872		EST	GDB:4577492	0.15	311: AGAGCACCTTTCCTCAGCAC	312: AGAATCTCATCCAGGGCCG	
SHGC-30732		EST	GDB:4567830	0.141	313: AAAAGGACAGTGTCTAAAATTTGA	314: AATTGTTTTTGTTTGTTTTTTGAGT	
stSG4288		EST	GDB:4566057	0.105	315: GATTTAGGGAGTACAAGTGCGG	316: GGGGACAAATTATACTTTATTCAGG	
WI-13814		EST	GDB:4579290	0.123	317: CCATCATCATATTGGTGTGACC	318: TGGCTGCCCAAGAGAAG	
WI-14122		Gene	GDB:4576114	0.15	319: TTAAGATGCCATTAAACTCATGAC	320: CCAAGGAGATGACCAAGTGG	(DRES9
2729/2730	D11S4057	EST	GDB:596509	0.126	321: CCATCTCTTTATCAGGGTTGG	322: CTCTGTGCAAGTAAGCATCTTACA	Human VEGF related factor isoform VRF-186 precursor (VRF)
SHGC-31329		EST	GDB:4567386	0.118	323: CGACTGTGTAATTTTCCACAG	324: AGAAGCCCATATCAATGCAC	
				0.15	325: AGCTTAAAGTAGGAACAACCATTGG	326: GGATGCTTCACTCCCAGAAAG	

【表７Ｃ】

TABLE 7: HBM STS Table

STS Name	Locus Name	Type	GDB Access. #	Size (kb)	SEQ ID NO: Forward Primer	SEQ ID NO: Reverse Primer	Gene Name
SGC33858		EST	GDB:4578600	0.127	327: TGTTGTTTATTTCCACCTGCC	328: AGAGTGGCTGCAGGCCAG	
WI-12191		EST	GDB:1222208	0.15	329: TTTTTTTTTTACACGAATTGAGG	330: TGAGGAAGTAAAAACAGGGTCATC	
WI-13701		EST	GDB:4574892	0.15	331: ATGAAATCTTAAGCAGAATCCCA	332: CACAGAGTCCCAGGGTCTGT	
WI-14069		EST	GDB:4584373	0.15	333: AAAGGCCTTTATTTATCTCTCCTG	334: GCCTCAGAGCTGGTGGGT	
WI-14272		EST	GDB:4578525	0.125	335: GCTTCTAAGTCTTAGAGTCAGCTGG	336: AGCCCACAGTGAGCCTACC	
WI-17347		EST	GDB:4578523	0.127	337: TTGGTTAAATGATGCCCAGA	338: TGGTCCCACTCACATCCC	
stSG61561		EST	GDB:4564415	0.215	339: ACACAGCATGCAGGGAGAG	340: ATCCCTGGTGCTTAGGTGG	
stSG61938		EST	GDB:4564568	0.137	341: GATGGAAGTAGTCCTCTCCTGGG	342: GGAAGGCCAGCAAGTACTACC	
stSG62759		EST	GDB:4565137	0.141	343: CCGGTGCTTGGAAAGATG	344: GAAGTGTCTCTGTTGGGGGA	
NH97		EST	GDB:4559690	0.17	345: TTACAGGCATGAGTCACTACGC	346: ACCACTCTCACAGCCCTTACA	
stSG4794		EST	GDB:4573113	0.141	347: CCCTCCCTCCACACAC	348: GCTCACTGAACTTTCAGGGC	
stSG4957		EST	GDB:4590051	0.171	349: AGATACGGGCAAAACACTGG	350: GTTGAATATAGAGCAGGGCCC	
stSG4974		EST	GDB:4569063	0.166	351: TTCTGAGGTCAGGGCTGTCT	352: AGCTTGGAAAATCTCGTGTCA	
stSG8144		EST	GDB:4573137	0.17	353: ACTCAGTCCCTCCCACCC	354: TCCTCTCACTCCTTCCCAGA	
stSG9275		EST	GDB:4569999	0.19	355: GTGATCACGGCTCAACTTG	356: TGGAGGACTGCTTGAGCC	
SHGC-10667	D1154583	Gene	GDB:740246	0.277	357: CTGCAGCTGCCTCAGTTTC	358: TCAAAAGTGCTGGTGATGACAGC	Human protein kinase (MLK-3)
SHGC-11930		Gene	GDB:1231223	0.21	359: ATTTCCAGAGCCAGCTCAAA	360: CTTTAATGTTGTGATGACACAAAGC	FGF3
SHGC-32786		EST	GDB:4567878	0.125	361: GATCATGCACTGTTGACCAC	362: TACATTTGAAACATTTAAACCTGA	
FKBP2		Gene		0.064	363: AACTGAGCTGTAACCAGACTGGGA	364: TGGACAGTCTGTCTCTGATGG	FK506 Binding Protein Precursor (FKBP-13)
WI-13116		EST	GDB:4585099	0.202	365: TTATCCCTTTATTGTTTCTCCTTTG	366: TGGTCACCTGTATTATTGCTAGG	
MDU1		Gene	GDB:4590064	0.859	367: TCTTCAAAGCCTCTGCAGTACC	368: CTCATCTCCAACTGTCTAACC	4F2 Cell-Surface Antigen Heavy Chain (4F2HC)
S453	D11S579	STS	GDB:196276	0.108	369: GTGGCTGCAGCTAATGTAGACAC	370: CAGCAGAGACAATGGCGTAAGTCC	
STS1-cSRL-112e11	D11S3866	STS	GDB:547681	0.135	371: CTGATTGAGAACCAGAACAG	372: TAAAGCCCTATAACCTCTCC	
STS1-cSRL-44a3	D11S3830	STS	GTC:547609	0.118	373: TAGTAAGGGACCTTCACCAG	374: AGATGTTTGGTATGACTTGG	
STS1-cSRL-31b12	D11S2439	STS	GDB:459728	0.123	375: GATGATTAAACTCTCCTGGC	376: GAGACAGCTAAGCACTCATG	
cSRL-4f9	D11S1137	STS	GDB:197824	0.196	377: GAGGTGCTGGCAACTGTA	378: AGAGGGGAGGAACAACACTT	Folate receptor2 (FBP2)
SHGC-10323	D11S4351	Gene	GDB:676135	0.141	379: GACCAGAGTCTGCCCAGAAG	380: TCCCCAGCTCTATCCCAAC	Collagen binding protein 2, collagin-2 gene (CBP2)
WI-9219		Gene	GDB:678179	0.1	381: GGAGGGATGGACAAGTCTGA	382: GTCCAGCTCGCTGACTATCC	Retinal outer segment membrane protein 1, ROM1
GTC_ZNF		EST		0.172	383: TCAAAACAGTCATCTCCA	384: GCAAAGCCTTACCATATTG	ZNF126
APHa15Zyh1	D11S4087	MSAT	GDB:603797	0.158	385: GCTCAGCACCCCCATT	386: TCCCTGCTCGGGAAAC	
APHa8311zh5	D11S4162	MSAT	GDB:611241	0.163	387: GTTCTCCAGAGAGCAGCAC	388: GAGAGCAACACTATTGCCC	
APHa038yh9	D11S4139	NSAT	GDB:609621	0.151	389: TATAGACTTCAGCCCTGCTGC	390: CCTCTGTTAGGATGCAGTTGG	
APH212xe3	D11S1314	MSAT	GDB:199292	0.209	391: TTGCTACGCACTCCTCTACT	392: GTGAAGGCAGGAAATGTGTAC	Serine/threonine kinase
WI-18813		EST		0.13	393: ATCCTTAGACCAGAGGAGCCC	394: CTCCCCCTGGTCCAGTTATT	
WI-19549		EST		0.252	395: AACTTTCATTTGCCAAGGGA	396: AGCAGATCTGCTCTTGCGAT	
WI-20154		EST		0.25	397: bACAGTTGTCATCGGGTAGGCA	398: AAAGTAATGAATGGGATGGAGC	
WI-22393		EST	GDB:4583084	0.142	399: GTGCAGGTGGCGTTTATTTT	400: CCCTATATCTCCGTGTGCTCC	DRES9
WI-7587		EST	GDB:1223732	0.274	401: GCTCTAGTGGGAAACCTCAGG	402: GAATTCCAGGCTCTTGCTTG	Ultra high-sulphur keratin protein (KRN1)
EST455579		EST		0.273	403: GGTTTGGTCTCAAAGGCAAA	404: CCAGTACATGGTGGTCACCA	
WI-21134		EST		0.293	405: GCTGCCTTGGAATTTCTGTT	406: GTGCTGTGGTGGGGAAAG	Fas-associating death domain-containing protein, FADD
WI-21698		EST		0.25	407: ATTCAAGCTCATCCAGACCC	408: GGACTGGCCCCTTTGAAACTC	
SHGC-7373	D11S4567	STS	GDB:740192	0.225	409: ATATTGACCGTGCACAAATAGG	410: AGACCTGGGAAAAGTGGAGAA	
SHGC-36533		STS		0.125	411: ATTGGCAGTGGAAAATGCTT	412: TTAATCTTTTGTCAACTTCCTGATT	
ARDX		Gene		0.242	413: tcgtccctttaccggaagc	414: ggtaaagaaccgcgtcgtggtga	Arix homeodomain protein, neuroendocrine specific, tx factor
CLCL PCR		Gene	GDB:626263		415: TCAGGGCCTCTGTTGTGCCGCACTCTG	416: AGCGATGTAAAGGGTACCAGTGCCGAGG	Chloride channel current inducer, ICLN gene
B188N21-HL		STS			417: AGGCATGCAAGCTTCTTA	418: CCGGGAGGAGACATCTAT	
B234C17-HR		STS			419: TGGTAAGCAGCAGAAATGC	420: AATGGATGGGGGGATTATT	
B256G10-HR		STS			421: CTGGACGTTATGTCTGCC	422: AGAGGCCCAGTCCACAGAT	
B247F23-HR		STS			423: ATCACTCTGAACTGGCACT	424: CCCTTCTGTTTTTCTGTTTT	
B337H24-HL		STS			425: CAAGCTTTGAAGGAAGAG	426: TAGGAAGTTAAGTGAGGAC	
B337L5-HL		STS			427: GCTCTGGAGTGGGTAAAA	428: ACTCTCCAAGACTGTGCG	
B382N10-HR		STS			429: CCCTTTCTGAGCCAAGAT	430: GACCACCTGGGAGAAAC	
B121I1-HR		STS			431: CGCTAATGAGTTCCCATCTG	432: GATCAGCTGCAATGAAGG	
B180D17-HR		STS			433: TTGAGTACACGGGGTGAC	434: CGCAGGACTGAAAGATGA	
B236E6-HR		STS			435: ACCTGTCTCCTCCTGTGG	436: TGCTTTTCTTCTGTGGGA	
B278E2-HR		STS			437: ATGACCAGCAAGCATTGT	438: GTACTGGGATTACAGGCG	
B112F1-HR		STS			439: GCAGAAGGTCCTTTGGAT	440: TTTGCAGGATTCATGCTT	
B337H24-HR		STS			441: CGACATTCTTTCTGGAGG	442: ACCTTTGCATGTTGGTTTT	
B358M9-HR		STS			443: GCACTTTCCCTTCCTTGC	444: TGCTTTGCTTTCTTCTGG	
B148N18-HL		STS			445: ACAGCTCCAGAGAAGGA	446: GCAGTCACTTGAAACCAGA	
B172N12-HL		STS			447: AGGCATCAAGCTTTCCTT	448: GGTTTAGAGACCGAGCC	
B172N12-HR		STS			449: GTGGTGCTGCAAGTTACC	450: GGAATCCCTTCTTTCCA	
B215I11-HR		STS			451: GACCATTTGTTACCCAGC	452: GATGGGTGTGAATGAACAA	
B223E5-HR		STS			453: CTCAAGCTTCTGTTCATGC	454: GCTGTGACTGTCTTGGCT	
B312B3-HR		STS			455: TACAGAAAACCGCAGCTC	456: GCCACAAAGGAAAGATT	

【表７Ｄ】

TABLE 7: HBM STS Table

STS Name	Locus Name	Type	GDB Access. #	Size (kb)	SEQ ID NO: Forward Primer	SEQ ID NO: Reverse Primer	Gene Name
B328G19-HL		STS			457: AAAGGAGGGAATCATGG	458: TCACTTAGCAGGAGGCAG	
B328G19-HR		STS			459: CTGAGCATCCGATGAGAC	460: GTGCAAAATGAGCAGCTT	
B329I10-HL		STS			461: TCTAACCCTTACTGGGC	462: TCCTCAAACTGGGAATGA	
B329I10-HR		STS			463: TTTACACAGGACCAGGGA	464: ATCTCCCCACTCAGAAG	
B366G19-HL		STS			465: GTCCACGGGCTTTATTCT	466: TGAGCATAAATTTCATTAGCTG	
B366G19-HR		STS			467: GGAAGAGCAAAATAAATCCA	468: GGTGCAGAGATTGTTCAT	
B36F16-HL		STS			469: AGCAGCTATTTCATGG	470: GTAACACAGCAGGGACA	
B250K11-HR		STS			471: TCCTGCTGCATTATGGAT	472: GGGGGTTGAGAAGTAGGAA	
B338D17-HR		STS			473: ATGGGGATTAAATACGGG	474: AGCTAGCATTGGCCTCTT	
B368I23-HL		STS			475: CTGAGGAGAAGAGGCCTGG	476: CGCCTTACAAGGCAAGTA	
B368I23-HR		STS			477: AGGATGCTTGCTAGGGTT	478: CACAAGTGTCTGGAAGGC	
B371E15-HR		STS			479: GGTCTCAGGAGCCCCTTTA	480: ACATGCCACTCTTCTCACTAA	
B312F21-HL		STS			481: ACTTAACCAAGGATGGGGG	482: CAACCCACGAGCATAAGA	
B338D17-HL		STS			483: TAGGCTCTGCACTCTTGG	484: ACCCACGGAGTCTCTCTC	
B369H19-HL		STS			485: TAAAGGCGGTGAAGTGAG	486: CTACCCACTCTCCTACGCT	
B369H19-HR		STS			487: TGGGGCCAGATAATTCTT	488: CTGGTGTTTGGTGGTGTT	
B444M11-HR		STS			489: AAGGAAGGGTCACCAGG	490: CACAAATTCCATTTCCCA	
B169L23-HL		STS			491: TCAATAGGTGATCCCAACATTT	492: AAAGTCCCACAAAGGGTC	
B250K11-HL		STS			493: GGGTAGGGGGATCTTTTT	494: TGTTGGAACATTGATTGGC	
B169L23-HR		STS			495: GTCCTGGGAAAGATGGAA	496: TCAAAGCGTCTCCCATAA	
B364H4-HL		STS			497: TCTTTCCCTGTTACTTGGC	498: TGGGAGGTCAGAGTGATG	
B364H4-HR		STS			499: GGACAGTGTATGTTGTGGG	500: AGGCAGCTGTTTTGTTGA	
B473O3-HR		STS			501: CTTCTTGAGTCCCGTGTG	502: CAACCGAGAATCCTCTAGC	
B180D17-HL		STS			503: GCTGGGAGAGAATCACAA	504: GCTTTGCAGAAGAGACCA	
B200E21-HL		STS			505: ACGCTGTCAAGTCACACT	506: GGAGGAATGCTCAAGTGAT	
B250K11-HL		STS			507: TAGGGGATCTCTTTTCCA	508: GAGCAATTTGAAAAGCCA	
B14L15-HR		STS			509: ATGGTCCAGCTCCTCTGT	510: ATAGAGCACCCATCTCC	
B442P6-HR		STS			511: AACATTGCTGTTAGCCCA	512: GCAATCGAAACAGCATTC	
B180N21-HR		STS			513: ATGAGTTGGCAGCTGAAG	514: AATGAAGGTCTTGCCTCC	
GTC-AR8B1		Gene		0.067	515: GAGGAGAAGATCCACAAGCG	516: TCTCTGGGGCATACTGAACC	Beta-arrestin-1
B500A5-HL		STS			517: CTGAGCTTTTGGCAACTGT	518: CTGCTAGGTGACAGCAAGG	
B36F16-HR		STS			519: TGTATGAGTCTGGAGGGTGT	520: ACACCTGGCTGAGGAAAT	
B117N18-HL		STS			521: GCAGGGGAGCTGATAATA	522: TTTTGCTTCTACAATGC	
B14L15-HL		STS			523: AAATTGTGAGCACTCTCC	524: TTTATATTTAAAGTGGCTTTGTT	
B21K22-HL		STS			525: GTGCAAGCCCACAGTAT	526: AGGAAAATGCAAGAGCAG	
B21K12-HR		STS			527: CCACTGAATTGCATACTTTG	528: TCTGGGTCCAGTCTGCTA	
B223E5-HL		STS			529: AGATTTTGGGGAGTCAGG	530: GCGCTCAAGCAATTCGTC	
B278E22-HL		STS			531: CAAGCCCAAAGTAGTCA	532: GAATCATCCAATCCAAGCA	
B444M11-HL		STS			533: AGCCTCCAGGTGACTACC	534: GAAGGACATGGTCAGCAG	
B543O19-HR		STS			535: ATGCTTTCAGCATTTTCG	536: TGATCCGTGGTAGGGTTA	
B117N18-HR		STS			537: GTCGGATTGGTTTCACAA	538: TTTTATGGGAATTTCAGCC	
B543O19-HL		STS			539: TTTGGAAAAGAACAGAATGT	540: GGCTAGTCTTTCCTGAACC	
B442P6-HL		STS			541: CCTTAATGCCCCTGATTC	542: GCGTTTCAACTGTAGGA	
B367H4-HR		STS			543: TCAAGCTTGCTTTCTCAA	544: GTAGCCCAGCAAGTGTCT	
B250E21-HR		STS			545: CCTGGCTGGAGATAGGAT	546: CTTCCCCTCCTGCCTATGT	
B250E21-HL		STS			547: GGCAGTTACTTCCTACCA	548: GGTGCTTCTTCTAGAGGAA	
B248C16-HR		STS			549: ACCCAGGCTGGTGTGT	550: ACTGAGTTAATTATCACTCCCCT	
B248C16-HL		STS			551: GATGCATTTTGCTTCAGC	552: TCTGCTTTTAGAGCTGTTAGC	
B160D8-HR		STS			553: TCAAGCTTCAAAGACAGA	554: GGAGTACATCCCAGCACC	
B539L7-HR		STS			555: TGGTGCTTTTAAATCCAGA	556: CTCCCTTACTTACTTGCATTG	
B473O3-HL		STS			557: TCTTCTCCCAGGGAATCT	558: TTTATGTCCCCTGAGCAC	
AFM218w190xd9	D1154095	STS	GDB:606064	0.193	559: TCCCTGCCTATCTTGAATC	560: CTTGACTGGGTCCACG	
AR0B1(2)		STS			561: CGAGACGCAGTAGATACCA	562: CATCTCCATGCCTTTCAGT	
AR0B1(1)		STS			563: AGTCCAGAGAACGAGACGC	564: CTTGTCATCCTCCATGCCTT	
P102F3S		STS	GDB:6054145		565: GAGCCTGAGAGGTTGAGGAG	566: AACCAAACTCCAGACGCACC	
N172A		STS	GDB:6054146	0.208	567: CTGAACCACTACCTGTATGACCTG	568: CTAACTACTTACTCCTACAGGGCCC	
H60A		STS	GDB:6054147	0.23	569: GAAGCATTTCAATACTTTTACTG	570: CCACTCCAGTGCACCCAATC	
cC111-44A		STS	GDB:6054148	0.239	571: CTTCTCCTGGCCACCTCTGAC	572: GGTTTACCTTTGAATCCCAGC	
CN1677-2A		STS	GDB:6054149	0.271	573: TCAGGATGAATGACACACATAGG	574: TTTGTTGGTCCATTGAGTAGGC	
cC111-524B		STS	GDB:6054150	0.221	575: AGGGGAAGGAATGTGCTTGG	576: TTCCGCTGAGCGGGCAGTGT	
P117F3T		STS	GDB:6054151	0.168	577: ATTGAAGGTCCTCCAAAGAATGCTGCAGC	578: AGAACGTCAACATATCTTTTGGGGGACAC	
AR0B1(3)		Gene			579: TTGTATTTGAAGGACTTTGCTCG	580: CGGTACCATCCTCCTCTTCC	
B215J11-HL		STS		0.122	581: TTTTTGCCTCATCTATGCCC	582: GGGTGACAGCCAAGACTCC	
B317G1-HR		STS			583: TTGCTCAAGTTCTCCTGG	584: ACCTTGTTTCTGAGGGGAG	
B317G1-HL		STS			585: CTTGGCTATTTGGACAGC	586: GGGCATTTACTCACTTGC	

【表７Ｅ】

TABLE 7: HBM STS Table

STS Name	Locus Name	Type	GDB Access. #	Size (kb)	SEQ ID NO: Forward Primer	SEQ ID NO: Reverse Primer	Gene Name
B292J18-HR		STS			587: CTTGTGTCAGTTGTCAGGG	588: TGGAATTGTTGTGTCTTGG	
B10A18-HL		STS			589: CCAGTTCCACTGGATGTT	590: ATGGGCTGTGTTTCTCAA	
B10A18-HR		STS			591: CTGCCTATCCCTGGACTT	592: AGTTTGTCCCTAGTGCCC	
B527D12-HL		STS			593: CAACACGTCTGACATCCAT	594: GGATAGTGCACACCCA	
B372J11-HR		STS			595: TGGGTGGTACTATTGTTCCCAT	596: AGTTCCAGCCCCCTTACCAG	
B372J11-HL		STS			597: GGCCACTATCATCCCTGTGT	598: TTTCACATGGGAAGAACACG	
B37E17-HR(GS)		STS			599: ACAGTGACACTAGGGACGGG	600: TGCCAGGATGGAGATTACCA	
B37E17-HL(GS)		STS			601: CCTGTGGCACATATCACC	602: ACAACCAAGAATGGAGCCAC	
B34F22-HR(GS)		STS			603: TGCTGTGTAACAAGTCCCCA	604: TGAACGGAGGAGCTTACCAAG	
B34F22-HL(GS)		STS			605: GCAGGGTCCGACTCACTAAG	606: GCTGTGAGTTCCCTTTACGC	
B648P22-HR1		STS			607: ACAGTGGGGACAAAGACAGG	608: TACAGGGCACCTCCCAGTAG	
B82A4-HR2		STS			609: TCTTCTGTTAAGGTTTCCCCC	610: TGTCTCAAACCTCCCTCTGC	
B648P22-HL		STS			611: AACATATTTCCTCCCCAGCC	612: CAGTCCCAGCCAATGAGAAC	
B82L11-HL (GS)		STS			613: CTCCTCTGCATGGGAGAATC	614: AGACCTGGGACCAGTCTGTG	
B86J13-HL (GS)		STS			615: GGGGAGACGAGTCACAAGAT	616: TGATGTTGGGAAGATGGTGA	
144A24-HL		STS			617: CAGGCATCTTCTATGTGCCA	618: GGGAGGCACAAGTTCTTTCA	
B82L11-HR (GS)		STS			619: ACTTCGTGGCACTGAGTGTG	620: CCTTTCTTACGGATGAGGCA	
B86J13-HR (GS)		STS			621: GGCTGCTGAGCTCTTCTGAT	622: TGGGTCTCTCTGCCTGACTT	
B82L11-HL2(GS)		STS			623: TCACCTACTTCCAGCTTCCG	624: AGACCTGGGACCAGTCTGTG	
B82L11-HL3(GS)		STS			625: CTCCTCTGCATGGGAGAATC	626: AATTCAGGGAGACCTGGGACC	

【０１７３】

公的に利用可能なゲノム配列または配列由来のＢＡＣ挿入断片末端のいずれかから新規のＳＴＳを開発した。ベクターおよびＣｒｏｓｓ＿ｍａｔｃｈ（Ｐ．Ｇｒｅｅｎ、Ｕｎｉｖ．ｏｆ　Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ）を使用した反復的配列作製を自動で実行するスクリプトおよびＰｒｉｍｅｒ３（Ｒｏｚｅｎ、Ｓｋａｌｅｔｓｋｙ（１９９６、１９９７））を使用したその後のプライマー選択を使用してプライマーを選択した。プライマー３は、ｗｗｗ．ｇｅｎｏｍｅ．ｗｉ．ｍｉｔ．ｅｄｕ／ｇｅｎｏｍｅ＿ｓｏｆｔｗａｒｅ／ｏｔｈｅｒ／ｐｒｉｍｅｒ３．ｈｔｍｌで利用可能である。

【０１７４】

各プライマー対についてのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）条件を、$MgCl_2$濃度に関して最初に最適化した。標準的な緩衝液は、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．３）、５０ｍＭ　ＫＣｌ、$MgCl_2$、０．２ｍＭの各ｄＮＴＰ、０．２μＭの各プライマー、２．７ｎｇ／μｌヒトＤＮＡ、０．２５単位のＡｍｐｌｉＴａｑ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）、および濃度１．０ｍＭ、１．５ｍＭ、２．０ｍＭ、または２．４ｍＭの$MgCl_2$であった。サイクリング条件には、９４℃で２分間の最初の変性をし、その後９４℃で１５秒間、５５℃で２５秒間、および７２℃で２５秒間４０サイクルし、その後７２℃で３分間の最後の伸長することを含んだ。最初の最適化ラウンドの結果に依存して、必要に応じて条件をさらに最適化した。変化するものとしては、５８℃から６０℃へのアニーリング温度の上昇、４２回へのサイクル数の増加、３０秒へのアニーリングおよび伸長時間の延長、およびＡｍｐｌｉＴａｑ（商標）Ｇｏｌｄ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）の使用が含まれた。

【０１７５】

目的のＳＴＳマーカーを含むＢＡＣクローン（Ｋｉｍら、１９９６、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、３２、２１３～８およびＳｈｉｚｕｙａら、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９、８７９４～７）を、Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓから購入した全ヒトＢＡＣライブラリー由来のＤＮＡプールのＰＣＲベースのスクリーニングによって得た。ヒトＤＮＡの９つのゲノム等価物に対応するライブラリープレート１～５９６由来のＤＮＡプールを使用した。最初のスクリーニングプロセスは、スーパープール（すなわち、８個の３８４ウェルライブラリープレート由来の全ＢＡＣクローン由来のＤＮＡの混合物）に対する各マーカーのＰＣＲ反応を含んでいた。各陽性のスーパープール（プレート（８）、列（１６）、および行（２４））について、プールをスクリーニングして固有のライブラリーアドレスを同定した。ＰＣＲ産物を、０．５μｇ／ｍｌ臭化エチジウムの１×ＴＢＥ溶液を含む２％アガロースゲル（Ｓｉｇｍａ）にて１５０ボルトで４５分間電気泳動した。使用した電気泳動ユニットは、Ｏｗｌ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｒｏｄｕｃｔ製のＭｏｄｅｌ　Ａ３－１システムであった。典型的には、ゲルは、列あたり５０ウェルの１０列からなるレーンを含んでいた。分子量マーカー（１００ｂｐラダー、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）をゲルの両端にロードした。Ｋｏｄａｋ　ＤＣ４０　ＣＣＤカメラを使用してゲルの画像をキャプチャーし、Ｋｏｄａｋ　１Ｄ　ソフトウェアを使用して処理した。ゲルデータを、タブ区切りテキストファイルとしてエクスポートし、ファイル名は、スクリーニングしたライブラリーの情報、ゲル画像ファイル、およびスクリーニングしたマーカーを含んでいた。これらのデータを、データの保存および分析のために、カスタマイズしたＰｅｒｌスクリプトを使用してＦｉｌｅｍａｋｅｒ（商標）ＰＲＯ（Ｃｌａｒｉｓ　Ｃｏｒｐ．）データベースに自動でインポートした。不完全または不明瞭なクローンアドレス情報が得られた場合、さらなる実験を行って、固有且つ完全なライブラリーアドレスを回復させた。

【０１７６】

ライブラリー由来のクローンＢＡＣ培地の回収は、１２．５μｇ／ｍｌクロラムフェニコール（Ｓｉｇｍａ）を含むＬＢ寒天（Ｍａｎｉａｔｉｓら、「分子クローニング：実験マニュアル」、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９８２）上のライブラリーウェルからのサンプルの画線を含んでいた。２つの各コロニーおよび最初の画線による四分円の一部を、検

証のために適切なＳＴＳマーカーを使用したコロニーＰＣＲによって試験した。陽性クローンを、７０℃の１２．５μｇ／ｍｌクロラムフェニコールおよび１５％グリセロールを含むＬＢブロス中で保存した。

【０１７７】

ＢＡＣ　ＤＮＡ単離のためにいくつかの異なる型のＤＮＡ調製方法を使用した。以下に列挙した手動アルカリ溶解ミニプレッププロトコール（Ｍａｎｉａｔｉｓら、１９８２）を、ほとんどの用途（制限マッピング、ＣＨＥＦゲル分析、ＦＩＳＨマッピング）で首尾よく使用したが、末端配列決定では首尾のよい再現性は得られなかった。特に末端配列決定目的のＢＡＣ　ＤＮＡ調製のためにＡｕｔｏｇｅｎおよびＱｉａｇｅｎのプロトコールを使用した。

【０１７８】

５０ｍｌコニカルチューブ中に１２．５μｇ／ｍｌのクロラムフェニコールを含む１５ｍｌのＴｅｒｒｉｆｉｃＢｒｏｔｈにて３００ｒｐｍで浸透しながら３７℃で２０時間細菌を成長させた。培養物を、３０００ｒｐｍ（約１８００×ｇ）のＳｏｒｖａｌｌ　ＲＴ６０００Ｄにて４℃で１５分間遠心分離した。次いで、上清をできるだけ完全に吸引した。いくつかの場合、このステップで細胞ペレットを－２０℃で最大２週間まで冷凍した。次いで、ペレットをボルテックスして細胞をホモジナイズし、凝集を最小にした。２５０μｌのＰ１溶液（５０ｍＭグルコース、１５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８）、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ、および１００μｇ／ｍｌ　ＲＮａｓｅＡ）を添加し、混合物をピペッターを上下させて混合した。次いで、混合物を、２ｍｌのエッペンドルフチューブに移した。次いで３５０μｌのＰ２溶液（０．２Ｎ　ＮａＯＨ、１％ＳＤＳ）を添加し、混合物を徐々に混合し、室温で５分間インキュベートした。３５０μｌのＰ３溶液（３ＭＫＯＡｃ、ｐＨ５．５）を添加し、白色沈殿が形成されるまで混合物を徐々に混合した。溶液を氷上で５分間インキュベートし、次いで微量遠心分離にて４℃で１０分間遠心分離した。上清を注意深く（白色沈殿を避けて）新しい２ｍｌエッペンドルフチューブに移し、０．９ｍｌのイソプロパノールを添加し、溶液を混合し、氷上で５分間放置した。サンプルを１０分間遠心分離し、上清を注意深く除去した。ペレットを、７０％エタノールで洗浄し、５分間風乾した。ペレットを２００μｌのＴＥ８（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、１．０ｍＭ　ＥＤＴＡ）中に再懸濁し、ＲＮａアーゼＡ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）を添加して１００μｇ／ｍｌとした。サンプルを、３７℃で３０分間インキュベートし、次いで０．５Ｍまでの$C_2H_3O_2Na$／$3H_2O$の添加および２体積のエタノールの添加によって沈殿させた。サンプルを１０分間遠心分離し、ペレットを７０％エタノールで洗浄し、その後に風乾して５０μｌＴＥ８に溶解した。このＤＮＡ調製物の典型的な収量は３～５μｇ／１５ｍｌ細菌培地であった。ＨｉｎｄＩＩＩ制限分析に１０～１５μｌを使用し、ＮｏｔＩ消化およびＣＨＥＦゲル電気泳動によるクローン挿入断片のサイジングに５μｌ使用した。

【０１７９】

ＢＡＣを、５０ｍｌコニカルチューブ中の１２．５μｇ／ｍｌクロラムフェニコールを含む１５ｍｌの２×ＬＢブロスに接種した。各クローンに４本のチューブを接種した。培養物を、激しく撹拌しながら（３００ｒｐｍ超）３７℃で一晩（約１６時間）成長させた。Ａｕｔｏｇｅｎ７４０の製造者が推奨するＢＡＣ　ＤＮＡ単離の標準的な条件に従った。３ｍｌの培地サンプルを、全部で６０ｍｌまたはクローンあたり２０チューブでＡｕｔｏｇｅｎチューブに入れた。サンプルを、最終的に、Ａｕｔｏｇｅｎプロトコールの一部として１００μｌＴＥ８中に１５秒間撹拌しながら溶解した。Ａｕｔｏｇｅｎプロトコールの終了後、ＤＮＡ溶液を各チューブから移し、２ｍｌエッペンドルフチューブにプールした。大量の破片を含むチューブ（破片ペレット化ステップからの引継ぎ）を回避した。次いで、チューブを０．５ｍｌのＴＥ８で連続的にすすぎ、この溶液をプールした物質に添加した。ＤＮＡ溶液を４℃で保存した（－２０℃での冷凍では凝集する傾向がある）。このＤＮＡを制限マッピング、ＣＨＥＦゲル分析、またはＦＩＳＨマッピングに直接使用するか、末端配列決定反応での使用のために下記のようにさらに精製した。

【０１８０】
ＤＮＡ溶液の体積をＴＥ８で２ｍｌに調整し、サンプルを徐々に混合し、６５℃で１０分間加熱した。次いで、ＤＮＡ溶液を４℃で５分間遠心分離し、上清を１５ｍｌのコニカルチューブに移した。次いで、ＮａＣｌ濃度を０．７５Ｍ（２ｍｌのサンプルに対して約０．３ｍｌの５Ｍ　ＮａＣｌ）に調整した。次いで、全体積をＱｉａｇｅｎカラム平衡化緩衝液（ＢｕｆｆｅｒＱＢＴ）で６ｍｌに調整した。次いで、ＤＮＡを含む上清を、カラムに適用し、重力流によって投入した。カラムを、１０ｍｌのＱｉａｇｅｎ　Ｂｕｆｆｅｒ　ＱＣで２回洗浄した。次いで、結合したＤＮＡを、６５℃に保持した４回の１ｍｌアリコートのＢｕｆｆｅｒ　ＱＦで溶離した。ＤＮＡを、０．７体積のイソプロパノール（約２．８ｍｌ）で沈殿させた。次いで、各サンプルをそれぞれ４つの２．２ｍｌエッペンドルフチューブに移し、室温で２時間または一晩インキュベートした。サンプルを、微量遠心分離機にて４℃で１０分間遠心分離した。上清を注意深く除去し、１ｍｌの７０％エタノールを添加した。サンプルを再度遠心分離し、この段階でＤＮＡペレットがしばしば緩むので、上清を注意深く除去した。サンプルを再度遠心分離して、マイクロピペットチップで除去した残存液体を濃縮した。次いで、ＤＮＡペレットをデシケーターで１０分間乾燥させた。２０μｌの滅菌蒸留脱イオン水を各チューブに添加し、その後４℃で一晩置いた。各クローンあたり４つの２０μｌのサンプルをプールし、チューブを別の２０μｌの滅菌蒸留脱イオン水で最終的に１００μｌ体積分すすいだ。次いで、サンプルを６５℃で５分間加熱し、その後徐々に混合した。ＮｏｔＩ消化および非切断λＤＮＡとの比較によって評価したところ、典型的な収量は２～５μｇ／６０ｍｌ培地であった。

【０１８１】
１２．５μｇ／ｍｌのクロラムフェニコールを含む３ｍｌのＬＢブロスを、オートクレーブしたＡｕｔｏｇｅｎチューブに分注した。各クローンにつき１つのチューブを使用した。接種のために、－７０℃の貯蔵所からグリセロールストックを取り出し、ドライアイス上に置いた。グリセロールストックの小部分を、滅菌楊枝で元のチューブから取り出しＡｕｔｏｇｅｎチューブに移し、楊枝を廃棄前に少なくとも２分間Ａｕｔｏｇｅｎチューブに放置した。接種後、チューブをテープでカバーして確実に固く密封した。全サンプルを接種する場合、チューブユニットをＡｕｔｏｇｅｎラックホルダーに移し、２５０ｒｐｍの回転式震盪培養機に３７℃で１６～１７時間置いた。成長後、製造者が定義するＢＡＣ　ＤＮＡ調整物の標準的な条件を使用して、Ａｕｔｏｇｅｎをプログラミングした。プログラムの一部としてサンプルをＴＥ８中に溶解せず、ＤＮＡペレットを乾燥させた。プログラムの終了後、チューブをアウトプットトレイから取り出し、３０μｌの滅菌蒸留脱イオン水をチューブの底に直接添加した。次いで、チューブを、２～５秒間徐々に震盪し、パラフィルムで覆い、室温で１～３時間インキュベートした。次いで、ＤＮＡサンプルをエッペンドルフチューブに移し、配列決定に直接使用するか、後に使用するまで４℃で保存した。

【０１８２】
７．物理マッピングのためのＢＡＣクローンの特徴づけ
制限フラグメントサイズの分析のために手動のアルカリ溶解またはＡｕｔｏｇｅｎプロトコールのいずれかによって調製したＤＮＡサンプルをＨｉｎｄＩＩＩで消化した。このデータを使用して、クローン間での重複範囲を比較した。典型的には、各反応に１～２μｇを使用した。反応混合物は以下を含んでいた。最終体積２５μｌの１×Ｂｕｆｆｅｒ２（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）、０．１ｍｇ／ｍｌウシ血清アルブミン（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）、５０μｇ／ｍｌのＲＮａｓｅＡ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）、および２０単位のＨｉｎｄＩＩＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）。消化物を、３７℃で４～６時間インキュベートした。ＣＨＥＦゲル分析（以下を参照のこと）による挿入のサイズの評価のためにＢＡＣ　ＤＮＡをＮｏｔＩでも消化した。反応条件は、２０単位のＮｏｔＩを使用する以外はＨｉｎｄＩＩＩの条件と同一である。電気泳動前にブロモフェノールブルーおよびキシレンシアノールを含む６μｌの６×Ｆｉｃｏｌｌローディング緩衝液を添加した。

【０１８３】
０．６％アガロース（Ｓｅａｋｅｍ、ＦＭＣ　Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ）の０．５μｇ／ｍｌ臭化エチジウムを含む１×ＴＢＥ溶液にてＨｉｎｄＩＩＩ消化物を分析した。ＭｏｄｅｌＡ４電気泳動ユニット（Ｏｗｌ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）にて５０ボルトで２０～２４時間ゲル（２０ｃｍ×２５ｃｍ）を電気泳動した。分子量サイズマーカーは、未消化λＤＮＡ、ＨｉｎｄＩＩＩ消化λＤＮＡ、およびＨａｅＩＩＩ消化＿Ｘ１７４ＤＮＡを含んでいた。ゲルへのローディング前に分子量マーカーを６５℃で２分間加熱した。Ｋｏｄａｋ　ＤＣ４０　ＣＣＤカメラで画像をキャプチャーし、Ｋｏｄａｋ　１Ｄソフトウェアで分析した。

【０１８４】
ＮｏｔＩ消化物を、製造者の推奨に従って、ＣＨＥＦ　ＤＲＩＩ（ＢｉｏＲａｄ）電気泳動ユニットで分析した。簡単に述べれば、１％アガロースゲル（ＢｉｏＲａｄパルスフィールドグレード）を０．５×ＴＢＥ中で調製し、１４℃にて３０分間電気泳動ユニット中で平衡化し、６ボルト／ｃｍで１４時間循環させながら電気泳動した。スイッチング時間を、１０秒から２０秒に延長した。電気泳動後にゲルを０．５μｇ／ｍｌの臭化エチジウムで染色した。分子量マーカーは、未消化λＤＮＡ、ＨｉｎｄＩＩＩ消化λＤＮＡ、λラダーＰＦＧラダー、および低レンジＰＦＧマーカー（全てＮｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ製）を含んでいた。

【０１８５】
手動のアルカリ溶解またはＡｕｔｏｇｅｎプロトコールのいずれかによって調製したＢＡＣ・ＤＮＡを、ＦＩＳＨ分析のために少し修正した製造者の推奨にしたがってＢｉｏｐｒｉｍｅ標識キット（ＢｉｏＲａｄ）を使用して標識した。各５０μｌの反応物あたり約２００ｎｇのＤＮＡを使用した。３μｌを２％アガロースゲルで分析して、標識範囲を決定した。反応物を、In situハイブリダイゼーション前にＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ５０スピンカラムを使用して精製した。記載のように分裂中期ＦＩＳＨを行った（Ｍａら、１９９６、Ｃｙｔｏｇｅｎｅｔ．Ｃｅｌｌ　Ｇｅｎｅｔ．、７４、２６６～７１）。

【０１８６】
８．ＢＡＣ末端配列決定
ＢＡＣ挿入断片末端の配列決定には、上記の２つの方法のいずれかによって調製したＤＮＡを使用した。ＡｍｅｒｓｈａｍのＤＹＥｎａｍｉｃエネルギー移動プライマーおよびＤｙｎａｍｉｃ　Ｄｉｒｅｃｔサイクル配列決定キットを、配列決定反応に使用した。Ｔ７　ＢＡＣベクター末端についてはＭ１３－４０正方向配列決定プライマーを含む既製品の配列決定混合物（カタログ番号ＵＳ７９７３０）を使用し、ＳＰ６　ＢＡＣベクター末端についてはＭ１３－２８逆方向配列決定プライマー（カタログ番号ＵＳ７９３３９）と混合した。配列決定反応混合物は、４つの蛍光標識色素プライマーの１つ、４つのジデオキシ末端混合物の１つ、複数のｄＮＴＰ、反応緩衝液、およびＴｈｅｒｍｏｓｅｑｕｅｎａｓｅを含んでいた。各ＢＡＣ　ＤＮＡサンプルについて、３μｌのＢＡＣ　ＤＮＡサンプルを４つのＰＣＲストリップチューブに等分した。その後２μｌの４つの色素プライマー／末端混合物の組み合わせの１つを、４つの各チューブに添加した。次いで、チューブを密封し、ＰＣＲ前に短時間遠心分離した。サーモサイクリング条件は、９５℃で１分間の変性、４５℃１５秒間のアニーリング、および７０℃で１分間の伸長を全部で３５サイクルを含んでいた。サイクリング後、プレートを短時間遠心分離して、全ての液体をチューブの底に集めた。次いで、５μｌの滅菌蒸留脱イオン水を各チューブに添加し、プレートを密封し、再度短時間遠心分離した。次いで、各ＢＡＣにつき４つのサンプルを一緒にプールした。次いで、ＤＮＡを、各チューブへの１．５μｌの７．５Ｍ　NH_4OAcおよび１００μｌの２０℃の１００％エタノールの添加によって沈殿させた。サンプルを、１回のピペッターの上下によって混合した。次いで、プレートを密封し、氷上で１０分間インキュベートした。プレートを、４０００ｒｐｍ（３，２９０×ｇ）の卓上Ｈａｒａｅｏｕｓ遠心分離機にて４℃で３０分間遠心分離して、ＤＮＡを回収した。上清を除去し、過剰な液体を、ペーパータオル上にブロットした。１００μｌの－２０℃の７０％エタノ

ールの各チューブへの添加および４℃で１０分間の４０００ｒｐｍ（３，２９０×ｇ）での再遠心分離によってペレットを洗浄した。上清を除去し、過剰な液体を、ペーパータオルへのブロッティングによって再度除去した。プレートをペーパータオル上に裏返して置き、遠心分離が８００ｒｐｍに達するまでのみの遠心分離によって、残存する微量の液体を除去した。次いで、サンプルを、室温で３０分間乾燥させた。チューブに蓋をし、電気泳動まで－２０℃で保存した。電気泳動の直前に、ＤＮＡを、１．５μｌのＡｍｅｒｓｈａｍローディング色素に溶解した。次いで、プレートを密封し、２０００ｒｐｍ（８２５×ｇ）で電気泳動した。次いで、プレートをプレート震盪機で１～２分間ボルテックスした。次いで、サンプルを、２０００ｒｐｍ（８２５×ｇ）で短時間再度遠心分離した。次いで、サンプルを６５℃で２分間加熱し、その直後に氷上に置いた。製造者の推奨にしたがって、ＡＢＩ３７７蛍光シークエンサーにて標準的なゲル電気泳動を行った。

【０１８７】

９．ＨＢＭ　ＢＡＣ　ＤＮＡのサブクローニングおよび配列決定

Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子領域の物理地図により、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子およびＨＢＭ遺伝子内に含まれるＢＡＣクローン組が得られる。この領域由来のいくつかのＢＡＣのＤＮＡ配列決定を完了した。ＤＮＡ配列データは、当業者がＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子およびＨＢＭ遺伝子の同定またはこれらの遺伝子を同定するためのプローブの調製、またはこれらの遺伝子を同定するＤＮＡ配列多型の同定に使用することができるデータを含む固有の試薬である。

【０１８８】

ＢＡＣ　ＤＮＡを２つのプロトコール（ＢＡＣ　ＤＮＡのＱｉａｇｅｎ精製（Ｑｉａｇｅｎ，Ｉｎｃ．、製品の印刷物に記載）またはプラスミドＤＮＡの標準的なアルカリ溶解／塩化セシウム調製物の修飾である手動の精製（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら、「現代の分子生物学プロトコール」、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、１９９７を参照のこと）のいずれか）のうちの１つにしたがって単離した。手動プロトコールについて簡単に述べれば、細胞をペレット化し、ＧＴＥ（５０ｍＭグルコース、２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌ（ｐＨ８）、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ）およびリゾチーム（５０ｍｇ／ｍｌ溶液）中に再懸濁し、ＮａＯＨ／ＳＤＳ（１％ＳＤＳ／０．２Ｎ　ＮａＯＨ）を添加し、次いで氷冷３Ｍ　ＫＯＡｃ（ｐＨ４．５～４．８）溶液を添加する。濾過上清にＲＮａｓｅＡを添加し、その後プロテイナーゼＡおよび２０％ＳＤＳを添加した。次いで、ＤＮＡをイソプロパノールで沈殿させ、乾燥させ、ＴＥ（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０））中に再懸濁した。ＢＡＣ　ＤＮＡを、塩化セシウム密度勾配遠心分離（Ａｕｓｕｂｅｌら、１９９７）によってさらに精製した。

【０１８９】

単離後、ＨＰＬＣを使用してＢＡＣ　ＤＮＡを流体力学的に２０００～３０００ｂｐの挿入断片サイズに剪断した（Ｈｅｎｇｅｎ、１９９７、Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．、２２、２７３～４）。剪断後、ＤＮＡを濃縮し、標準的な１％アガロースゲルで分離した。近似サイズに対応する１つの画分をゲルから切り出し、電気的溶出によって精製した（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、「分子クローニング：実験マニュアル」、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ、ＮＹ、１９８９）。

【０１９０】

精製したＤＮＡフラグメントを、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼを使用して平滑末端にした。次いで、平滑末端化ＤＮＡを、固有のＢｓｔＸＩ－リンカーアダプターにライゲートした（１００～１０００倍モル過剰の５’－ＧＴＣＴＴＣＡＣＣＡＣＧＧＧＧ－３’および５’－ＧＴＧＧＴＧＡＡＧＡＣ－３’（それぞれ配列番号６２７および６２８））。これらのリンカーはＢｓｔＸＩ切断ｐＭＰＸベクター（本発明者らが構築）に相補的であり、オーバーハングは自己相補的ではなかった。したがって、リンカーは、連結も切断ベクターと容易に再ライゲーションすることもない。リンカー適合挿入断片を、１％アガロースゲルによって単一組み込みリンカーから分離し、ＧｅｎｅＣｌｅａｎ（ＢＩＯ１０１，Ｉ

ｎｃ．）を使用して精製した。次いで、リンカー適合挿入断片を、修飾ｐＢｌｕｅＳｃｒｉｐｔベクターにライゲートして、「ショットガン」サブクローンライブラリーを構築した。ベクターは、アダプター－二量体がクローン化される事象でインフレームとなるクローニング部位にフレーム外のｌａｃＺ遺伝子を含んでおり、その青色によってこれらの遺伝子を回避可能である。

【０１９１】

その後の全ステップは、ＡＢＩ３７７自動化ＤＮＡ配列決定法による配列決定に基づいた。プロトコールの主要な修正形態のみを強調する。簡単に述べれば、次いでライブラリーをＤＨ５αコンピテント細胞（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ、ＤＨ５α形質転換プロトコール）に形質転換した。これを、アンピシリンおよびＩＰＴＧ／Ｘｇａｌを含む抗生物質プレートへのプレーティングによってアッセイした。プレートを、３７℃で一晩インキュベートした。次いで、クローンのプレーティングおよび配列決定用の選択のために首尾のよい形質転換体を使用した。培養物を、３７℃で一晩成長させた。シリカビーズＤＮＡ調製法（Ｎｇら、１９９６、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、２４、５０４５～７）を使用してＤＮＡを精製した。この様式で、クローンあたり２５μｇのＤＮＡを得た。

【０１９２】

次いで、これらの精製ＤＮＡサンプルを、ＡＢＩダイターミネーター法を使用して配列決定した。ＡＢＩダイターミネーター配列の読み取りをＡＢＩ３７７マシンで行い、データをゲルのレーントラッキング後にＵＮＩＸマシンに直接転送した。全ての読み取りを、デフォルトパラメータおよびクオリティースコアを使用したＰＨＲＡＰ（Ｐ．Ｇｒｅｅｎ、Ａｂｓｔｒａｃｔｓ ｏｆ ＤＯＥ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍｅ Ｐｒｏｇｒａｍ Ｃｏｎｔｒａｃｔｏｒ－Ｇｒａｎｔｅｅ Ｗｏｒｋｓｈｏｐ Ｖ、１９９６年１月、１５７頁）を使用してアセンブルした。ゲノムの６倍で最初のアセンブリを行い、平均８～１５個のコンティグを得た。最初のアセンブリ後、見落とされたメート（１つの鎖のみが読み取られたクローン由来の配列）を同定し、ＡＢＩテクノロジーを使用して配列決定し、さらなる重複コンティグを同定した。クローン末端付近のゲノム治療プログラムＰｉｃｋ＿プライマーを使用してギャップ閉鎖を促進するようにウォーキング用プライマーを選択した。選択したクローンおよびプライマーを用いて、これらのウォーキングを配列決定した。ＰＨＲＡＰを使用してデータを配列コンティグに再度アセンブルした。

【０１９３】

１０．コンピュータを利用した方法による遺伝子の同定

コンティグへのＢＡＣ配列のアセンブリ後、コンティグをコンピュータを使用した分析に供してコード領域および既知の遺伝子とＤＮＡ配列類似性を有する領域を同定した。このプロトコールには、以下のステップを含む。

【０１９４】

１．コンティグの脱ギャップ：配列コンティグはしばしば各ＡＢＩ配列読み取りが挿入または欠失を有する位置を表す記号（ピリオド記号で示す）を含む。コンティグの自動化コンピュータ使用による分析前に、ピリオドを除去した。元のデータを、さらなる参照のために保持した。

【０１９５】

２．プログラムｃｒｏｓｓ ｍａｔｃｈ（Ｐｈｉ Ｇｒｅｅｎ、ｈｔｔｐ：＼＼ｃｈｉｍｅｒａ．ｂｉｏｔｅｃｈ．ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ．ｅｄｕ＼ＵＷＧＣ）の使用によって、ＢＡＣベクター配列を配列内に「マスク」した。上記で詳述のショットガンライブラリー構築により、ショットガンライブラリー中にいくつかのＢＡＣベクターが得られるため、このプレグラムを使用してＢＡＣコンティグとＢＡＣベクターの配列を比較し、その後のステップ前に任意のベクター配列をマスクした。マスクした配列を、配列ファイル中で「Ｘ」によってマスクし、その後の分析時には不活性のままだった。

【０１９６】

３．ＢＡＣ配列が夾雑した大腸菌配列を、ＢＡＣコンティグと全大腸菌ＤＮＡ配列との

比較によってマスクした。

【０１９７】

４．ヒトゲノムで共通であることが公知の反復エレメントを、ｃｒｏｓｓ ｍａｔｃｈを使用してマスクした。このｃｒｏｓｓ ｍａｔｃｈの実行では、ＢＡＣ配列をヒト反復エレメントのデータベース（Ｊｅｒｚｙ Ｊｅｒｋａ、Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ、ＣＡ）と比較した。マスクした反復を、Ｘでマークし、配列分析時に不活性のままにした。

【０１９８】

５．配列内のエクソンの位置を、ＭＺＥＦコンピュータプログラム（Ｚｈａｎｇ、１９９７、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９４、５６５～８）を使用して予想した。

【０１９９】

６．この配列を、ｂｌａｓｔｎ２アルゴリズム（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９７、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、２５、３３８９～３４０２）を使用して公的に利用可能なｕｎｉｇｅｎｅデータベース（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、３８Ａ、８Ｎ９０５、８６００ Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ Ｐｉｋｅ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ、２０８９４；ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ）と比較した。この検索のパラメータは以下であった。Ｅ＝０．０５、ｖ＝５０、Ｂ＝５０（Ｅは予想される確率スコアカットオフであり、Ｖは結果報告において戻されたデータベースエントリー数であり、Ｂは結果報告において戻された配列アラインメント数である）（Ａｌｕｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２１５、４０３～４１０、１９９０）。

【０２００】

７．６つ全ての読み取り枠について配列をタンパク質に翻訳し、タンパク質配列をＧｅｎｐｅｐｔ Ｓｗｉｓｓｐｒｏｔ ＰＩＲ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、３８Ａ、８Ｎ９０５、８６００ Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ Ｐｉｋｅ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ、２０８９４；ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ）からコンパイルされた非重複タンパク質データベースと比較した。この検索についてのパラメータは、以下であった。Ｅ＝０．０５、ｖ＝５０、Ｂ＝５０（Ｅ、Ｖ、およびＢは上記で定義されている）。

【０２０１】

８．ＢＡＣ ＤＮＡ配列を、ｂｌａｓｔｎ２（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９７）を使用した直接選択実験（下記）由来のｃＤＮＡクローンのデータベースと比較した。この検索についてのパラメータは、以下であった。Ｅ＝０．０５、ｖ＝２５０、Ｂ＝２５０（Ｅ、Ｖ、およびＢは上記で定義されている）。

【０２０２】

９．ＢＡＣ配列を、ｂｌａｓｔｎ２（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９７）を使用して、染色体１１ｑ１２－１３上のＨＢＭ領域由来の他の全てのＢＡＣ配列と比較した。この検索についてのパラメータは、以下であった。Ｅ＝０．０５、ｖ＝５０、Ｂ＝５０（Ｅ、Ｖ、およびＢは上記で定義されている）。

【０２０３】

１０．ＢＡＣ配列を、ｂｌａｓｔｎ２（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９７）を使用して、染色体１１ｑ１２－１３上のＨＢＭ領域由来のＢＡＣ末端由来の配列と比較した。この検索についてのパラメータは、以下であった。Ｅ＝０．０５、ｖ＝５０、Ｂ＝５０（Ｅ、Ｖ、およびＢは上記で定義されている）。

【０２０４】

１１．ＢＡＣ配列を、ｂｌａｓｔｎ２（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９７）を使用して、ＧｅｎＢａｎｋデータベース（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ

Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、３８Ａ、８Ｎ９０５、８６００ Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ Ｐｉｋｅ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ、２０８９４；ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ）と比較した。この検索についてのパラメータは、以下であった。Ｅ＝０．０５、ｖ＝５０、Ｂ＝５０（Ｅ、Ｖ、およびＢは上記で定義されている）。

【０２０５】

１２．ＢＡＣ配列を、ｂｌａｓｔｎ２（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９７）を使用して、ＧｅｎＢａｎｋデータベースのＳＴＳ区分（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、３８Ａ、８Ｎ９０５、８６００ Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ Ｐｉｋｅ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ、２０８９４；ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ）と比較した。この検索についてのパラメータは、以下であった。Ｅ＝０．０５、ｖ＝５０、Ｂ＝５０（Ｅ、Ｖ、およびＢは上記で定義されている）。

【０２０６】

１３．ＢＡＣ配列を、ｂｌａｓｔｎ２（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９７）を使用して、発現配列（ＥＳＴ）タグＧｅｎＢａｎｋデータベース（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、３８Ａ、８Ｎ９０５、８６００ Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ Ｐｉｋｅ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ、２０８９４；ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ）と比較した。この検索についてのパラメータは、以下であった。Ｅ＝０．０５、ｖ＝２５０、Ｂ＝５０（Ｅ、Ｖ、およびＢは上記で定義されている）。

【０２０７】

（１１．直接ｃＤＮＡ選択による遺伝子同定）骨髄、頭蓋骨、大腿骨、腎臓、骨格筋、精巣、および全脳から最初にリンカーを含むｃＤＮＡプールを調製した。頭蓋冠骨組織および大腿骨組織からポリ（Ａ）＋ＲＮＡを調製し（Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉら、１９８７、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１６２、１５６～９およびＤ’Ａｌｅｓｓｉｏら、１９８７、Ｆｏｃｕｓ、９、１～４）、残りのｍＲＮＡをＣｌｏｎｔｅｃｈ（Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）から購入した。同一の組織からオリゴ（ｄＴ）およびランダムプライミングｃＤＮＡプールを作製するために、一方の反応で２．５μｇのｍＲＮＡをオリゴ（ｄＴ）プライマーと混合し、他方の反応で２．５μｇのｍＲＮＡをランダム六量体と混合し、この両方を製造者の推奨にしたがって（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）第１および第２のｃＤＮＡ鎖に変換した。対合したリン酸化ｃＤＮＡリンカー（以下の配列を参照のこと）を、６５℃で５分間、１：１の比（各１０μｇ）での混合によって互いにアニーリングし、室温に冷却した。

［対合したリンカーオリゴ１／２］

オリゴ１： ５’－ＣＴＧ ＡＧＣ ＧＧＡ ＡＴＴ ＣＧＴ ＧＡＧ ＡＣＣ－３’（配列番号１２）

オリゴ２： ５’－ＴＴＧ ＧＴＣ ＴＣＡ ＣＧＴ ＡＴＴ ＣＣＧ ＣＴＣ ＧＡ－３’（配列番号１３）

［対合したリンカーオリゴ３／４］

オリゴ３： 5'－ＣＴＣ ＧＡＧ ＡＡＴ ＴＣＴ ＧＧＡ ＴＣＣ ＴＣ－3'（配列番号１４）

オリゴ４： 5'－ＴＴＧ ＡＧＧ ＡＴＣ ＣＡＧ ＡＡＴ ＴＣＴ ＣＧＡ Ｇ－３’（配列番号１５）

［対合したリンカーオリゴ５／６］

オリゴ５： 5'－ＴＧＴ ＡＴＧ ＣＧＡ ＡＴＴ ＣＧＣ ＴＧＣ ＧＣＧ－3'（配列番号１６）

オリゴ６： 5'－ＴＴＣ ＧＣＧ ＣＡＧ ＣＧＡ ＡＴＴ ＣＧＣ ＡＴＡ ＣＡ－3'（配列番号１７）

［対合したリンカーオリゴ７／８］

オリゴ７： 5'－ＧＴＣ ＣＡＣ ＴＧＡ ＡＴＴ ＣＴＣ ＡＧＴ ＧＡＧ－3'

（配列番号１８）
　オリゴ８：　５'－ＴＴＧ　ＴＣＡ　ＣＴＧ　ＡＧＡ　ＡＴＴ　ＣＡＧ　ＴＧＧ　ＡＣ－３'（配列番号１９）
［対合したリンカーオリゴ１１／１２］
　オリゴ１１：　５'－ＧＡＡ　ＴＣＣ　ＧＡＡ　ＴＴＣ　ＣＴＧ　ＧＴＣ　ＡＧＣ－３'（配列番号２０）
　オリゴ１２：　５'－ＴＴＧ　ＣＴＧ　ＡＣＣ　ＡＧＧ　ＡＡＴ　ＴＣＧ　ＧＡＴ　ＴＣ－３'（配列番号２１）

【０２０８】
製造者の説明書にしたがって（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）、リンカーを全オリゴ（ｄＴ）およびランダムプライミングｃＤＮＡプール（以下を参照のこと）にライゲートした。

【０２０９】
オリゴ１／２を、骨髄から調製したオリゴ（ｄＴ）およびランダムプライミングｃＤＮＡプールにライゲートした。オリゴ３／４を、頭蓋冠骨から調製したオリゴ（ｄＴ）およびランダムプライミングｃＤＮＡプールにライゲートした。オリゴ５／６を、骨格筋から調製したオリゴ（ｄＴ）およびランダムプライミングｃＤＮＡプールにライゲートした。オリゴ７／８を、腎臓から調製したオリゴ（ｄＴ）およびランダムプライミングｃＤＮＡプールにライゲートした。オリゴ１１／１２を、大腿骨から調製したオリゴ（ｄＴ）およびランダムプライミングｃＤＮＡプールにライゲートした。

【０２１０】
１μｌの１倍、１０倍、および１００倍希釈のライゲーション反応物をそれぞれ使用したＰＣＲ増幅によって、ｃＤＮＡプールを長さの分布について評価した。ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ９６００でＰＣＲ反応を行い（１μｌのＤＮＡ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．３）、５０ｍＭ　ＫＣｌ、１．５ｍＭ　$MgCl_2$、０．００１％ゼラチン、２００ｍＭの各ｄＮＴＰ、１０μＭプライマー、および１単位のＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｐａｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を含む各２５μｌの反応物）、以下の条件下で増幅させた。９４℃で３０秒、６０℃で３０秒、および７２℃で３０秒を３０サイクル。増幅ｃＤＮＡプールの長さの分布を、１％アガロースゲルでの電気泳動によって評価した。最も良好な表示のランダムプライミングおよびオリゴ（ｄＴ）プライミングしたｃＤＮＡプールが得られたＰＣＲ反応を、約２～３μｇの各ｃＤＮＡプールが産生されるようにスケールアップした。直接選択反応のための開始ｃＤＮＡは、０．５μｇのオリゴ（ｄＴ）プライミングｃＤＮＡと混合した０．５μｇのランダムプライミングｃＤＮＡから構成される。

【０２１１】
直接ｃＤＮＡ選択手順で使用した５４個のＢＡＣ由来のＤＮＡを、製造者（Ｔｈｅ　Ｎｅｓｔ　Ｇｒｏｕｐ，Ｉｎｃ．）によって記載されたＮｕｃｌｅｏｂｏｎｄ　ＡＸカラムを使用して単離した。

【０２１２】
等モル量のＢＡＣをプールし、製造者の説明書（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）に従ったニック翻訳によって１μｇの単離ゲノムＤＮＡをビオチン１６－ＵＴＰで標識した。ビオチン組み込みを、当業者によって実施可能な方法（Ｄｅｌ　Ｍａｓｔｒｏら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ　Ｉｎｃ．、ＮＪ、１９９６）によってモニターした。

【０２１３】
当業者によって実施可能な方法（Ｄｅｌ　Ｍａｓｔｒｏら、１９９６）を使用して、直接ｃＤＮＡ選択を行った。簡単に述べれば、以下の２つの個別の反応によるｃＤＮＡプールを多重化した。一方の反応では、骨髄、頭蓋冠骨、脳、および精巣由来のｃＤＮＡプールを混合し、他方の反応では、骨格筋、腎臓、および大腿骨由来のｃＤＮＡプールを混合した。２０のＣｏｔに対してｃＤＮＡプール中の反復配列、酵母配列、およびプラスミド

の抑制を行った。１００ｎｇのビオチン化ＢＡＣ　ＤＮＡを抑制ｃＤＮＡと混合し、溶液中で２００のＣｏｔとハイブリダイゼーションさせた。ビオチン化ＤＮＡおよび同族ｃＤＮＡを、ストレプトアビジン被覆常磁性ビーズ上に捕捉した。ビーズを洗浄し、最初に選択したｃＤＮＡを溶離した。これらのｃＤＮＡをＰＣＲ増幅し、第２ラウンドの直接選択を行った。第２ラウンドの直接選択の産物を、二次選択材料と呼ぶ。以前に１１ｑ１２－１３にマッピングすることが示されたゼラチンｃＤＮＡクローン（Ｅｖａｎｓ、１９９３、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、１８、４７３～７）を使用して、２ラウンドの選択時に濃度をモニターした。

【０２１４】

骨髄、頭蓋冠骨、大腿骨、腎臓、骨格筋、精巣、および全脳由来の二次選択材料を、下記のオリゴ１、３、５、７、および１１の修飾プライマーを使用してＰＣＲ増幅させ、製造者の推奨に従って、ＵＤＧベクターｐＡＭＰ１０（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）にクローン化した。

修飾プライマー配列：

【化２】

プライマー	配列番号	配列
オリゴ1	22	5'-CUA CUA CUA CUA CTG AGC GGA ATT CGT GAG AC C-3'
オリゴ3	23	5'-CUA CUA CUA CUA CTC GAG AAT TCT GGA TCC TC-3'
オリゴ5	24	5'-CUA CUA CUA CUA TGT ATG CGA ATT CGC TGC GC G-3'
オリゴ7	25	5'-CUA CUA CUA CUA GTC CAC TGA ATT CTC AGT GA G-3'
オリゴ11	26	5'-CUA CUA CUA CUA GAA TCC GAA TTC CTG GTC AG C-3'

【０２１５】

各組織供給源由来のクローン化二次選択材料を、製造者によって推奨されるＭＡＸ　ＥｆｆｉｃｉｅｎｃｙＤＨ５ａコンピテント細胞（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）に形質転換した。３８４個のコロニーを、各形質転換供給源から取り出し、４つの９６ウェルマイクロタイタープレートに整列させた。

【０２１６】

全ての二次選択ｃＤＮＡクローンを、Ｍ１３色素プライマーターミネーターサイクル配列決定キット（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）およびＡＢＩ３７７自動化蛍光シークエンサー（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）によって収集したデータを使用して配列決定した。

【０２１７】

ＢＬＡＳＴＮ、ＢＬＡＳＴＸ、およびＦＡＳＴＡプログラムを使用して全配列を分析した（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２１５、４０３～４１０、１９９０およびＡｌｔｓｃｈｕｌら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、２５、３３８９～３４０２）。ｃＤＮＡ配列を、ヒト反復、ミトコンドリアＤＮＡ、リボゾームＲＮＡ、大腸菌ＤＮＡ由来の配列を含むデータベースと比較して、プログラムｃｒｏｓｓ＿ｍａｔｃｈを使用したデータセット由来のバックグラウンドクローンを除去した。公知の遺伝子（ＧｅｎＢａｎｋ）およびＨＢＭ領域由来のＢＡＣ配列に対して、プログラムＢＬＡＳＴＮ２を使用してさらなる比較ラウンドも行った。これらの配列と９０％を超えて相同なｃＤＮＡを、さらなる分析のためのデータベースに保存した結果およびデータにしたがってファイルした。ＨＢＭ領域由来の同定されたがＢＡＣ配列と有意な類似性を有さないかｃｒｏｓｓ／ｍａｔｃｈによって除去されたｃＤＮＡ配列を、ＨＢＭ領域由来のＢＡＣを含むナイロンメンブレンにハイブリダイゼーションさせ、標的にハイブリッドするかどうかを確認し

た。
【０２１８】
ハイブリダイゼーション分析を使用して、選択されたＢＡＣ標的にｃＤＮＡクローンをマッピングした。ＨＢＭ領域から同定されたＢＡＣを整列させ、９６ウェルマイクロタイタープレートで成長させた。２５μｇ／ｍｌのカナマイシンを含むＬＢ寒天を、９６ウェルマイクロタイタープレートの蓋に注いだ。一旦、寒天が固化すると、プレカットＨｙｂｏｎｄＮ＋ナイロンメンブレン（Ａｍｅｒｓｈａｍ）を、寒天の上部に置き、手持ち式の９６ウェルレプリカプレーター（Ｖ＆Ｐ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．）を使用してメンブレン上に２連でスタンプした。プレートを、３７℃で一晩インキュベートした。製造者の推奨に従ってメンブレンを処理した。
【０２１９】
ハイブリダイゼーションによってマッピングする必要があるｃＤＮＡを、このクローンを増幅させる関連プライマー（オリゴ１、３、５、７、および１１）を使用してＰＣＲ増幅させた。このＰＣＲ増幅のために、オリゴヌクレオチドの５’にリンカーを含むジゴキシゲニン分子を含むようにプライマーを修飾した。ｃＤＮＡプールの調製（上記）と同一の条件下でＰＣＲ増幅を行った。ＰＣＲ産物を、５μｌのＰＣＲ反応物のローディングによる１％アガロースゲルでの電気泳動によって質および量について評価した。スタンプしたＢＡＣを含むナイロンメンブレンを、それぞれ１０ｍｌのハイブリダイゼーション溶液（５×ＳＳＰＥ、０．５×Ｂｌｏｔｔｏ、２．５％ＳＤＳ、および１ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０））を含む５０ｍｌコニカルチューブで予備ハイブリダイゼーションを行った。５０ｍｌコニカルチューブを、回転式オーブン（Ｒｏｂｂｉｎｓ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中に６５℃で２時間置いた。２５ｎｇの各ｃＤＮＡプローブを変性させ、ナイロンメンブレンおよびハイブリダイゼーション溶液を含む各５０ｍｌコニカルチューブに添加した。６５℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを以下の各溶液中で６５℃で２０分間洗浄した。３×ＳＳＰＥ、０．１％ＳＤＳ；１×ＳＳＰＥ、０．１％ＳＤＳ；および０．１×ＳＳＰＥ、０．１％ＳＤＳ。
【０２２０】
５０ｍｌコニカルチューブからメンブレンを取り出し、皿に置いた。各メンブレンの間にアセテートシートを置いて、互いに張り付くことを防いだ。製造者の推奨（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）にしたがって、メンブレンのＡｎｔｉ－ＤＩＧ－ＡＰおよびＣＤＰ－Ｓｔａｒとのインキュベーションを行った。メンブレンをサランラップで包み、Ｋｏｄａｋ　Ｂｉｏ－ＭａｘＸ線フィルムに１時間露光した。
【０２２１】
（１２．ｃＤＮＡクローニングおよび発現分析）公的に利用可能なデータベースと比較した直接ｃＤＮＡ選択およびゲノムＤＮＡ配列決定によって同定された遺伝子の発現を特徴付けるために、一連の実験を行ってＨＢＭ領域中の遺伝子をさらに特徴付けた。第１に、ｃＤＮＡ、ＥＳＴ、またはゲノムＤＮＡの一部がＤＮＡ分子（ｃＤＮＡライブラリー）またはＲＮＡ集団（ＲＴ－ＰＣＲおよびＲＡＣＥ）のプールから増幅することができるように、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）用のオリゴヌクレオチドプライマーをデザインした。ゲノムＤＮＡを含む反応でＰＣＲプライマーを使用して、これらのプライマーによってゲノム（ＢＡＣ）配列に基づいて予想されるサイズの産物が得られるかを検証した。特異的ｃＤＮＡまたはＥＳＴの存在について多数のｃＤＮＡライブラリーを試験した。特定のｃＤＮＡライブラリー中の転写単位のフラグメントの存在は、同一の転写単位のさらなる部分が同様に存在する確率が高いことを示す。
【０２２２】
新規の遺伝子の特徴づけに必要なきわめて重要なデータの一部は、ヌクレオチド中のプロセシングされた転写物または伝令ＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の長さである。当業者は、最初に、ノーザンブロットハイブリダイゼーションによってｍＲＮＡの長さを決定する（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、「分子クローニング：実験マニュアル」、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９

８９）。臨界領域中の配列決定されたＢＡＣに対して有意な配列類似性を示すＥＳＴおよび直接選択ｃＤＮＡクローンの群を、便宜上約３０ｋｂ単位にグループ分けした。各３０ｋｂ単位以内に、１個から５０個までのＥＳＴおよび１つまたは複数の独立した転写単位から構成される直接選択ｃＤＮＡクローンが存在した。１つまたはそれ以上のＥＳＴまたは直接選択ｃＤＮＡをハイブリダイゼーションプローブとして使用し、製造者が推奨する条件下で市販の試薬（Ｍｕｌｔｉｐｌｅ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｎｏｒｔｈｅｒｎ　ｂｌｏｔ；Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）を使用して種々の組織中のｍＲＮＡの長さを決定した。

【０２２３】

大腿骨および頭蓋冠骨組織由来の定方向クローン化ｃＤＮＡライブラリーを、当業者に周知の方法によって構築した（例えば、「自動化ＤＮＡ配列決定および分析」、Ａｄａｍｓ，Ｆｉｅｌｄｓ　ａｎｄ　Ｖｅｎｔｅｒ編、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ、１１０～１１４、１９９４）。最初に骨をハンマーで砕き、小片を液体窒素中で凍結し、組織粉砕機（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ）で粉末にした。ポリトロンホモジナイザー（Ｂｒｉｎｋｍａｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を使用した標準的な酸グアニジンチオシアネートーフェノールークロロホルム抽出緩衝液（例えば、Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉら、１９８７、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１６２、１５６～９）との骨粉の均一化によって、ＲＮＡを骨粉から抽出した。さらに、ヒトの脳および肺の総ＲＮＡを、Ｃｌｏｎｔｅｃｈから購入した。製造者の推奨にしたがってｄｙｎａｂｅａｄｓ－ｄＴ（Ｄｙｎａｌ，Ｉｎｃ．）を使用してポリＡ　ＲＮＡを総ＲＮＡから単離した。第１のｃＤＮＡ鎖分析を、配列：５’-ＡＡＣＴＧＧＡＡＧＡＡＴＴＣＧＣＧＧＣＣＧＣＡＧＧＡＡＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴ　ＴＴ-３’（配列番号２７）のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して開始した。このプライマーを、ｃＤＮＡの３’末端のＮｏｔＩ制限部位（下線）に移入する。製造者（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）による記載の「１チューブ」ｃＤＮＡ分析キットを使用して、第１および第２の鎖分析を行った。二本鎖ｃＤＮＡをＴ４ポリヌクレオチドキナーゼで処理して、分子末端が平滑末端であることを確認し（Ｓｏａｒｅｓ、「自動化ＤＮＡ配列決定および分析」、Ａｄａｍｓ，Ｆｉｅｌｄｓ　ａｎｄ　Ｖｅｎｔｅｒ編、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ、１１０～１１４、１９９４）、次いで平滑末端ｃＤＮＡをＢｉｏｇｅｌカラム（Ｈｕｙｎｈら、「ＤＮＡクローニング」、第１巻、Ｇｌｏｖｅｒ編、ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ、Ｏｘｆｏｒｄ、４９～７８、１９８５）またはｓｉｚｅ－ｓｅｐ４００Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ、カタログ番号２７－５１０５－０１）でサイズ選択を行った。４００ｂｐまたはそれ以上のｃＤＮＡのみをその後のステップで使用した。次いで、ＥｃｏＲＩアダプター（配列：５’ＯＨ-ＡＡＴＴＣＧＧＣＡＣＧＡＧ-ＯＨ　３’（配列番号２８）および５’ｐ-ＣＴＣＧＴＧＣＣＧ-ＯＨ　３’（配列番号２９））を、当業者に周知の方法（Ｓｏａｒｅｓ、１９９４）によって二本鎖ｃＤＮＡにライゲートした。次いで、ＥｃｏＲＩアダプターを、ＮｏｔＩでの消化によってｃＤＮＡの３’末端から除去した（Ｓｏａｒｅｓ、１９９４）。次いで、ｃＤＮＡをプラスミドベクターｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（登録商標）ＩＩ　ＫＳ＋（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）にライゲートし、ライゲーション物質を、当業者に周知のエレクトロポレーション法（Ｓｏａｒｅｓ、１９９４）によって大腸菌宿主ＤＨ１０ＢまたはＤＨ１２Ｓに形質転換した。３７℃で一晩の成長後、ＤＮＡを、Ｍｅｇａ－ｐｒｅｐキット（Ｑｉａｇｅｎ、Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）によるプロセシングによってプレートの掻き取り後に大腸菌コロニーから回収した。ｃＤＮＡライブラリーの質を、最初の全形質転換体数の一部の計数および平均挿入断片サイズおよびｃＤＮＡ挿入断片を含まないプラスミドの割合の決定を評価した。さらなるｃＤＮＡライブラリー（ヒトの全脳、心臓、腎臓、白血球、および胎児の脳）を、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤから購入した。

【０２２４】

ｃＤＮＡライブラリー（プライミングした両オリゴ（ｄＴ）およびランダム六量体（Ｎ

６））を、ＨＢＭ領域（ヒトの骨、脳、腎臓、および骨格筋）内に転写されたｃＤＮＡクローンの単離で使用した（骨格筋（ｄＴ）および腎臓（ｄＴ）ｃＤＮＡライブラリー以外は全ｃＤＮＡライブラリーを本発明者らが作製した）。各ｃＤＮＡライブラリーの４つの１０×１０アレイを、以下のように調製した。ｃＤＮＡライブラリーを、最初の形質転換体を使用して力価を２．５×１０^{6}にした。適切な体積の凍結ストックを使用して、２ＬのＬＢ／アンピシリン（１００ｍｇ／ｍｌ）を接種した。接種した液体培養物を各４ｍｌの４００本のチューブに等分した。各チューブは、約５０００ｃｆｕ含んでいた。チューブを、徐々に撹拌しながら３０℃で一晩インキュベートした。培養物を、ＯＤが０．７～０．９まで成長させた。１００μｌの培養物および３００μｌの８０％グリセロールの分注によって各培養物の凍結ストックを調製した。ストックを、ドライアイス／エタノール浴中で凍結し、－７０℃で保存した。残りの培養物は、製造者の説明書にしたがってＱｉａｇｅｎ（Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ、ＣＡ）スピンミニプレップキットを使用して調製したＤＮＡであった。４００個の培養物由来のＤＮＡを、８０個の行列プールにプールした。ｃＤＮＡライブラリーは、ＰＣＲによって目的のＨＢＭ　ｃＤＮＡクローンを含むと判断された。推定エクソンを増幅するようにマーカーをデザインした。一旦、標準的なＰＣＲ最適化を行って特定のｃＤＮＡライブラリーが目的のｃＤＮＡクローンを含むと判断されると、マーカーを使用して整列させたライブラリーをスクリーニングした。ｃＤＮＡクローンの存在を示す陽性アドレスを、同一のマーカーを使用した第２のＰＣＲによって確認した。

【０２２５】

一旦、ｃＤＮＡライブラリーがＨＢＭ領域由来の目的の特異的転写物に対応するｃＤＮＡクローンを含む可能性があると同定されると、このライブラリーを目的のＥＳＴまたは直接選択ｃＤＮＡと同一のｃＤＮＡ挿入断片を含む一つまたは複数のクローンを単離するように操作した。標準的な「コロニースクリーニング」法（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、「分子クローニング：実験マニュアル」、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ、ＮＹ、１９８９）の修正形態によってこれを行った。詳細には、２０枚の１５０ｍｍＬＢ＋アンピシリン寒天プレートに２０，０００コリニー形成単位（ｃｆｕ）のｃＤＮＡライブラリーを広げて、コロニーを３７℃で一晩成長させた。コロニーをナイロンフィルター（ＡｍｅｒｓｈａｍのＨｙｂｏｎｄまたは等価物）に移し、本質的に（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、「分子クローニング：実験マニュアル」、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ、ＮＹ、１９８９）に記載のように２つのフィルターを互いにプレスすることによって複製を調製した。次いで、「マスター」プレートをさらに６～８時間インキュベートしてコロニーを元に戻るまで成長させた。次いで、変性溶液（０．５Ｎ　ＮａＯＨ、１．５Ｍ　ＮａＣｌ）で２分間、中和溶液（０．５Ｍ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌ（ｐＨ８．０）、１．５Ｍ　ＮａＣｌ）で２分間（２回）でのフィルターを連続処理することによって細菌コロニー由来のＤＮＡをナイロンフィルターに貼り付けた。ティッシュペーパーでこすりながら２×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ溶液で１分間の洗浄することによって細菌コロニーをフィルターから取り出した。フィルターを風乾し、８０℃で１～２時間真空でベーキングした。

【０２２６】

ランダム六量体標識（Ｆｉｎｅｂｅｒｇ　ａｎｄ　Ｖｏｇｅｌｓｔｅｉｎ、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１３２、６～１３、１９８３）または反応物中に遺伝子特異的プライマーを含めるがランダム六量体を含めないこと（小フラグメント用）によってｃＤＮＡハイブリダイゼーションプローブを調製した。比活性を計算し、５×１０^{8}ｃｐｍ超／１０^{8}μｇのｃＤＮＡであった。次いで、コロニーメンブレンを、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌ（ｐＨ８．０）、１Ｍ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．１％ＳＤＳにて５５℃で３０分間予備洗浄した。予備洗浄後、フィルターを、２ｍｌ超／フィルターの６×ＳＳＣ、５０％脱イオンホルムアミド、２％ＳＤＳ、５×Ｄｅｎｈａｒｄｔ液、および１００ｍｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡにて４２℃で３０分間予備ハイブリダイゼーションさせた。次いで、フィルターを、変性α^{32}Ｐ－ｄＣＴＰ標識ｃＤＮＡプローブを含むハイブリダイゼ

ーション溶液（６×ＳＳＣ、２％ＳＤＳ、５×Ｄｅｎｈａｒｄｔ液、１００ｍｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡ）に移し、４２℃で１６～１８時間インキュベートした。

【０２２７】

１６～１８時間のインキュベーション後、２×ＳＳＣ、２％ＳＤＳにて室温で２０分間の攪拌、その後６５℃で各１５分間の洗浄（２回）によってフィルターを洗浄した。０．５×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳにて６５℃で１５分間第２の洗浄を行った。次いで、フィルターをプラスチックラップで包み、放射線用フィルムに数時間から一晩露光した。フィルムの現像後、アンピシリンを含む１ｍｌのＬＢブロス溶液中に選択することができるようにプレート上の各コロニーをオートラジオグラフで整列させた。３７℃で１～２時間の震盪後、二次スクリーニングのために溶液のアリコートを１５０ｍｍのプレートにプレートした。二次スクリーニングは、各コロニーが選択のために明確に同定することができるように約２５０個のコロニーを含むプレートで行うこと以外は最初のスクリーニング（上記）と同一であった。

【０２２８】

放射性標識プローブを使用したコロニースクリーニングによってｃＤＮＡクローンを得た後、元のプローブと単離クローンとの間の配列同一性を確認するためにクローンを制限エンドヌクレアーゼ切断、ＰＣＲ、および直接配列決定によって特徴付けた。全長ｃＤＮＡを得るために、同定したクローンの末端由来の新規の配列を使用して、再度ライブラリーを探索した。クローン化したｃＤＮＡの長さがノーザンブロット分析によって全長であると評価されることに合致するまでこのプロセスを繰り返した。

【０２２９】

全長クローンの別の単離方法としてＲＴ－ＰＣＲを使用した。「Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　Ｏｎｅ　Ｓｔｅｐ　ＲＴ－ＰＣＲ」キット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）を使用して、ｃＤＮＡを合成および増幅した。この手順は、１．５μｇｌのＲＮＡに、$MgSO_4$およびｄＮＴＰ、１μｌセンスプライマー（１０μＭ）および１μｌアンチセンスプライマー（１０μＭ）を含む登録商標緩衝液混合物を有する提供された２５μｌの緩衝液混合物、提供された１μｌ逆転写酵素およびＴａｑＤＮＡポリメラーゼ混合物、ならびに提供されたＴａｑＤＮＡにオートクレーブした水で全反応混合物を５０μｌにしたものを添加するステップを含んでいた。次いで、反応物を、サーモサイクラーで１ｋｂ当だけ１分間の目的産物について５０℃で１５～３０分を１サイクル、次いで９４℃で１５秒間、５５～６０℃で３０秒間、および６８～７２℃で１分間、ならびに最後に７２℃で５～１０分を１サイクル行った。サンプルを、アガロースゲルで分析した。産物をゲルから切り出し、ゲル（ＧｅｎｅＣｌｅａｎ、Ｂｉｏ　１０１）で精製した。精製産物を、ｐＣＴＮＲ（Ｇｅｎｅｒａｌ　Ｃｏｎｔｒａｃｔｏｒ　ＤＮＡ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ、５Ｐｒｉｍｅ－３Ｐｒｉｍｅ，Ｉｎｃ．）でクローン化および配列決定してクローンが目的の遺伝子に特異的であるかを検証した。

【０２３０】

Ｍａｒａｔｈｏｎ　ｃＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ、ＣＡ）を使用し、製造者の説明書にしたがってｃＤＮＡ末端の迅速な増幅（ＲＡＣＥ）を行った。最初の鎖合成（総ＲＮＡサンプルを修飾オリゴ（ｄＴ）プライマーと混合し、７０℃に加熱し、氷上で冷却し、その後５×第１の標準緩衝液、１０ｍＭｄＮＴＰ混合物、およびＡＭＶ逆転写酵素（２０Ｕ／μｌ）を添加する）によって総ＲＮＡからｃＤＮＡプールを調製した。チューブを、４２℃で１時間インキュベートし、次いで反応チューブを氷上に置いた。第２の鎖合成のために、以下の成分（５×第２の標準緩衝液、１０ｍＭ　ｄＮＴＰ混合物、滅菌水、２０×第２の鎖の酵素カクテル）を反応チューブに直接添加し、反応チューブを１６℃で１．５時間インキュベートした。反応チューブにＤＮＡポリメラーゼを添加し、１６℃で４５分間インキュベートした。ＥＤＴＡ／グリコーゲン混合物の添加によって第２の鎖合成を停止させた。サンプルをフェノール／クロロホルム抽出および酢酸アンモニウム沈殿に供した。サイズ分布用のアガロースゲルでの分析によって質についてｃＤＮＡプールをチェックした。次いで、ｃＤＮＡ末端

上にＭａｒａｔｈｏｎ　ｃＤＮＡアダプター（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）をライゲートした。特異的アダプターは、選択された遺伝子特異的プライマー（ＧＳＰ）の方向に依存して５’または３’末端を増殖可能なプライミング部位を含んでいた。二本鎖ｃｄＮＡのアリコートを、以下の試薬に添加した。１０μＭのＭａｒａｔｈｏｎ　ｃＤＮＡアダプター、５×ＤＮＡライゲーション緩衝液、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼ。反応物を１６℃で一晩インキュベートした。反応物を、熱で不活化して反応を停止させた。以下の希釈二本鎖ｃＤＮＡプールへの添加によってＰＣＲを行った。１０×ｃＤＮＡ　ＰＣＲ反応緩衝液、１０μＭ　ｄＮＴＰ混合物、１０μＭ　ＧＳＰ、１０μＭ　ＡＰ１プライマー（キット）、５０×Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ｃＤＮＡポリメラーゼ混合物。熱サイクリング条件は、９４℃で３０秒間、９４℃で５秒間および７２℃で４分間を５サイクル、９４℃で５秒間および７０℃で４分間を５サイクル、９４℃で５秒間および６８℃で４分間を２３サイクルであった。ＧＳＰを用いて第１ラウンドのＰＣＲを行って、アダプター末端を伸長し、アダプタープライマー結合部位を作製した後、目的の特異的ｃＤＮＡの指数関数的増幅を観察した。通常は、第２のネスト化ＰＣＲを行って特異的ｃＤＮＡを確認する。ＲＡＣＥ産物をアガロースゲルで分析し、次いでゲルから切り出して精製した（ＧｅｎｅＣｌｅａｎ、ＢＩＯ　１０１）。次いで、ＲＡＣＥ産物をｐＣＴＮＲ（Ｇｅｎｅｒａｌ　Ｃｏｎｔｒａｃｔｏｒ　ＤＮＡ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ、５’－３’，Ｉｎｃ．）にクローン化し、このクローンを検証するために決定したＤＮＡ配列は、目的の遺伝子に特異的である。

【０２３１】

１３．変異分析

上記の手順を使用して比較遺伝子を同定し、各遺伝子由来のエクソンを、変異検出分析に供した。比較ＤＮＡ配列決定を使用して、染色体１１ｑ１２－１３由来のＨＢＭ候補遺伝子中の多型を同定した。候補遺伝子のＤＮＡ配列を、患者のリンパ芽球細胞株から増幅した。

【０２３２】

本発明者らは、本発明者らは、原因となる多型を検索するための候補領域から増幅させたＰＣＲ産物の直接ＤＮＡ配列決定分析基づいた方法を開発した。この手順は、分離多型を見出すためのＨＢＭファミリーの異なるサブセットおよび多型の頻度を評価するための集団パネルを使用した３つの段階からなった。家族の源は、全罹患個体が同一の原因となる多型を共有するという仮定を導く１人の創始者に起因する。

【０２３３】

発端者、娘、その母、父、および兄弟からなるＨＢＭファミリーのサブセットにおける候補領域を最初にスクリーニングした。一染色体基準配列を同時に産生し、比較に使用した。母および娘は、この核家族中にＨＢＭ多型を保有しており、多型伝播をモニターする能力を提供する。正味の結果は、ＨＢＭ染色体および６つの非ＨＢＭ染色体をスクリーニングすることである。これにより、多数の頻繁な対立遺伝子を排除可能である。罹患個体中に排他的に存在する対立遺伝子のみが、次の分析レベルへ通過した。

【０２３４】

この元の家族中のＨＢＭ表現型で排他的に分離した多型を、さらなる２つの核家族からなるＨＢＭ家系のより広い部分で再試験した。これらの家族は、５人のＨＢＭ個体および３人の非罹患個体からなった。この群のＨＢＭ個体は、臨界領域のセントロメアおよびテロメア境界が得られる２人の臨界乗換え個体を含んでいた。これらの個体と彼らの罹患した親との間の多型遺伝の追跡により、臨界領域のさらなる精密化が可能であった。この群の全てのＨＢＭ染色体を７個に選別し、全ての非ＨＢＭ染色体を１７個に選別した。

【０２３５】

所与の多型を、拡大した群中のＨＢＭ表現型で排他的に分離し続けた場合、次いで集団パネルを試験した。８４人のこのパネルは、正常な骨中無機質密度を有することが公知の４２人の個体および関連がないが分類していない骨中無機質密度を有することが公知の４２人の個体からなった。この目的のために、正常な骨中無機質密度は、ＢＭＤのＺスコア０の標準偏差２以内である。第２の群は、広範に使用したＣＥＰＨパネル個体に由来した

。続けて、この集団中で稀であることが見出された任意の分離多型を、全ＨＢＭ家系およびより巨大な集団で試験した。

【０２３６】

ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して、ＨＢＭ家族のＤＮＡおよび一染色体コントロールから配列決定テンプレートを作製した。各エクソンに隣接するオリゴヌクレオチドおよび各遺伝子の推定５’調節エレメントを使用したＰＣＲを使用して、１１ｑ１２－１３上のＨＢＭ領域内の遺伝子の酵素増幅を行った。各エクソンおよびいずれかのスプライス側の各イントロン内の１５個またはそれ以上の塩基対を増幅するようにプライマーを選択した。色素プライマー配列決定を容易にするために、全ＰＣＲプライマーをキメラとして作製した。合成時にＭ１３－２１Ｆ（５’－ＧＴＡ　ＣＧＡ　ＣＧＧ　ＣＣＡ　ＧＴ－３’）（配列番号３０）および２８ＲＥＶ（５’－ＡＡＣ　ＡＧＣ　ＴＡＴ　ＧＡＣ　ＣＡＴ　Ｇ－３’）（配列番号３１）プライマー結合部位を、正方向および逆方向ＰＣＲプライマーの５’末端上にそれぞれ構築した。２ＵＡｍｐｌｉＴａｑ、５００ｎＭプライマー、および１２５μＭ　ｄＮＴＰを含む５０μｌ　ＰＣＲで１５０ｎｇのゲノムＤＮＡを使用した。緩衝液およびサイクリング条件は、各プライマーセットに特異的であった。ホットスタートＰＣＲでＴａｑＳｔａｒｔ抗体（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を使用して、プライマー二量体形成を最小にした。１０％の産物をアガロースゲルで試験した。適切なサンプルを、配列決定前に脱イオン水で２５倍に希釈した。

【０２３７】

標準的なエネルギー移動プライマー（Ａｍｅｒｓｈａｍ）プロトコールにしたがって、各ＰＣＲ産物を配列決定した。全反応を、９６ウェルトレイ中で行った。各テンプレートについて４つの個別の反応（それぞれ、Ａ、Ｃ、Ｇ、およびＴについて）を行った。各反応物は、２μｌの配列決定反応混合物および３μｌの希釈テンプレートを含んでいた。次いで、プレートをフォイルテープで熱シールし、サーマルサイクラーに入れ、製造者の推奨にしたがってサイクリングした。サイクリング後、４つの反応をプールした。３μｌのプールした産物を、９６ウェルプレートに移し、１μｌの製造者のローディング色素を各ウェルに添加した。９６ウェル全てのピペッティング手順を、Ｈｙｄｒａ９６ピペッティングステーション（Ｒｏｂｂｉｎｓ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＵＳＡ）で行った。１μｌのプールした材料を、４８レーンのゲル上に直接ローディングし、ＡＢＩ　３７７　ＤＮＡシークエンサーにて２．４ｋＶで１０時間運転した。

【０２３８】

Ｃｏｎｓｅｄ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ）で観察するために、Ｐｏｌｙｐｈｒｅｄ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ）を使用して配列セットを構築した。特定の標的領域について、全ての関連する家族のメンバーおよびコントロールを示す群で配列を構築した。３つの各段階で個別にこれを行った。各個体について、一染色体テンプレートおよび色分けした基準配列からの読み取りと共に正方向および逆方向の読み取りを含んでいた。Ｐｏｌｙｐｈｒｅｄは、紫色の旗で潜在的な多型部位を示した。２人の読み取り者は、各アセンブリを独立して観察し、紫色の旗をつけた部位の有効性を評価した。

【０２３９】

成熟ｍＲＮＡ中に存在する全部で２３個のエクソンおよび最初の構築物のいくつかの他の部分を、２人のＨＢＭ罹患個体および２人の非罹患個体からなる核家族において、ヘテロ接合性について評価した。以下の表に記載のように、２５個のＳＮＰが同定された。

【０２４０】

【表８】

表８： Zmax1（LRP5）遺伝子およびその周辺領域中の一塩基多型

エクソン名	位　置	塩基の変化
b200e21-h_コンティグ1_1.nt	69169（309G）	C/A
b200e21-h_コンティグ4_12.nt	27402（309G）	A/G
b200e21-h_コンティグ4_13.nt	27841（309G）	T/C
b200e21-h_コンティグ4_16.nt	35600（309G）	A/G
b200e21-h_コンティグ4_21.nt	45619（309G）	G/A
b200e21-h_コンティグ4_22.nt-a	46018（309G）	T/G
b200e21-h_コンティグ4_22.nt-b	46093（309G）	T/G
b200e21-h_コンティグ4_22.nt-c	46190（309G）	A/G
b200e21-h_コンティグ4_24.nt-a	50993（309G）	T/C
b200e21-h_コンティグ4_24.nt-b	51124（309G）	C/T
b200e21-h_コンティグ4_25.nt	55461（309G）	C/T
b200e21-h_コンティグ4_33.nt-a	63645（309G）	C/A
b200e21-h_コンティグ4_33.nt-b	63646（309G）	A/C
b200e21-h_コンティグ4_61.nt	24809（309G）	T/G
b200e21-h_コンティグ4_62.nt	27837（309G）	T/C
b200e21-h_コンティグ4_63.nt-a	31485（309G）	C/T
b200e21-h_コンティグ4_63.nt-b	31683（309G）	A/G
b200e21-h_コンティグ4_9.nt	24808（309G）	T/G
b527d12-h_コンティグ030g_1.nt-a	31340（308G）	T/C
b527d12-h_コンティグ030g_1.nt-b	32538（308G）	A/G
b527d12-h_コンティグ080C_2.nt	13224（308G）	A/G
b527d12-h_コンティグ087C_1.nt	21119（308G）	C/A
b527d12-h_コンティグ087C_4.nt	30497（308G）	G/A
b527d12-h_コンティグ088C_4.nt	24811（309G）	A/C
b527d12-h_コンティグ089_1HP.nt	68280（309G）	G/A

【０２４１】

表８に示す多型に加えて、２つのさらなる多型もまた配列番号２中に存在し得る。配列番号２の２００２位が変化している。この位置にグアニンまたはアデニンが出現し得る。この多型はサイレントであり、アミノ酸配列中のいかなる変化にも関与しない。第２の変化は、シトシン（Ｃ）からチミン（Ｔ）への変化に対応する配列番号２の４０５９位である。この多型により、対応するアミノ酸でバリン（Ｖ）からアラニン（Ａ）に変化する。表２および３に示すように、候補遺伝子のエクソンおよび隣接するイントロン配列中に他の多型が見出された。表２、３、または８に列挙した多型の任意の１つまたは組み合わせまたは上記の２つもまた、配列番号２中に存在する場合に骨量に対してより低い効果を示し得る。これらはまた、第３節および以下の実施例に記載の他の任意の変異体との組み合わせであり得る。

【０２４２】

本発明は、任意の１つまたはそれ以上の上記で同定した点変異を有する配列番号１の核酸配列を有する核酸配列を含む。

【０２４３】

好ましくは、本発明は配列番号２の核酸を含むか、配列番号２によってコードされたタンパク質（ＨＢＭ表現型）で認められたような変異型を産生する配列番号１の変異である

。詳細には、Ｚｍａｘ１（ＨＢＭ遺伝子）のコード配列中の５８２位でのＧからＴへ変化する塩基対置換が全ＨＢＭ個体でヘテロ接合性と同定されたが、非罹患個体では見出されなかった（すなわち、ｂ５２７ｄ１２－ｈ＿コンティグ０８７Ｃ＿１．ｎｔ）。図６は、Ｂ５２７Ｄ１２中のコンティグの順序を示す。ＨＢＭ遺伝子の転写方向は、左から右にかけてである。Ｂ５２７Ｄ１２のコンティグ３０８Ｇ配列は、ＨＢＭ遺伝子に対してコード領域が逆方向に相補的である。したがって、ＣからＡへの塩基を変化させる置換として表８に示すコンティグ３０８Ｇ中の関連多型は、ＨＢＭ遺伝子中のＧからＴへの置換に相補的である。この変異により、グリシン１７１がバリンに置換される（Ｇ１７１Ｖ）。

【０２４４】

異なる個体群のＤＮＡ配列の試験によってＨＢＭ多型を確認した。ＨＢＭ家系の全メンバー（３８個体）では、罹患（すなわち、高骨量）個体のみでヘテロ接合形態のＨＢＭ多型が認められた（Ｎ＝１８）。非罹患親類（Ｎ＝２０）（ＢＭＤＺ２．０未満）では、ＨＢＭ多型はまったく認められなかった。この多型がＨＢＭ家系以外の個体で以前に認められたかを決定するために、２９７人の表現型同定した個体を、ＨＢＭ遺伝子部位で特徴付けた。ＨＢＭ多型部位でヘテロ接合性の個体は存在しなかった。非表現型同定コントロール群では、６４個体の５８２位でヘテロ接合性は認められなかった。まとめると、これらのデータは、高骨量表現型を示す家系で認められた多型は、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）の５８２位でのＧ→Ｔ多型と強い相関関係を示すことを提供する。さらに、下記のＡＳＯの結果と組み合わせたこれらの結果は、ＨＢＭ多型はＨＢＭ表現型で遺伝的に分離されること、およびＨＢＭ多型および表現型の両方は一般的集団では稀であることを立証している。

【０２４５】

１３．対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）分析

ＨＢＭ多型を含むアンプリコンを、目的のエクソンに特異的なプライマーを使用してＰＣＲ増幅した。適切な個体集団を、以下に記載のように９６ウェルマイクロタイタープレートでＰＣＲ増幅した。１×ＰｒｏｍｅｇａＰＣＲ緩衝液（カタログ番号Ｍ１８８３、１．５ｍＭ $MgCl_2$ を含む）、１００ｍＭ ｄＮＴＰ、２００ｎＭ ＰＣＲプライマー（１８６３Ｆ：５’－ＣＣＡＡＧＴＴＣＴＧＡＧＡＡＧＴＣＣ－３’および１８６４Ｒ：５’－ＡＡＴＡＣＣＴＧＡＡＡＣＣＡＴＡＣＣＴＧ－３’（それぞれ配列番号６２９および６３０））、１Ｕ ＡｍｐｌｉＴａｑ（商標）、および２０ｎｇのゲノムＤＮＡを含むＰＣＲ反応物（２０μｌ）を調製し、以下のＰＣＲ条件下で増幅させた。９４℃で１分間、（９４℃で３０秒間、５８℃で３０秒間、７２℃で１分間を３５サイクル）、７２℃で５分間、４℃で保持。次いで、ローディング色素を添加し、１０μｌの産物を、１μｇ／ｍｌの臭化エチジウムを含む１．５％のアガロースゲルにて１００～１５０Ｖで５～１０分間電気泳動した。ゲルを変性溶液（１．５Ｍ ＮａＣｌ、０．５Ｎ ＮａＯＨ）中で２０分間処理し、水で短時間すすいだ。次いで、ゲルを、１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１．５Ｍ ＮａＣｌ中で２０分間中和し、水ですすいだ。ゲルを、１０×ＳＳＣに２０分間浸漬し、ナイロントランスファーメンブレン（ＨｙｂｏｎｄＮ＋、Ａｍｅｒｓｈａｍ）上に１０×ＳＳＣ中で一晩ブロッティングした。フィルターを、６×ＳＳＣ中で１０分間すすぎ、ＵＶ架橋を行った。

【０２４６】

対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）を、多型を使用してほぼ中央にデザインした。オリゴヌクレオチドは５’末端にリン酸を含まず、ＧｉｂｃｏＢＲＬから購入した。オリゴヌクレオチド配列を以下に示す。

２３２６Ｚｍａｘ１．ＡＳＯ．ｇ： ５’－ＡＧＡＣＴＧＧＧＧＴＧＡＧＡＣＧＣ－３’（配列番号６３１）

２３２７Ｚｍａｘ１．ＡＳＯ．ｔ： ５’－ＣＡＧＡＣＴＧＧＧＴＴＧＡＧＡＣＧＣＣ－３’（配列番号６３２）

【０２４７】

多型ヌクレオチドには下線を引いている。オリゴを標識するために、１．５μｌの１μｇ／μｌのＡＳＯオリゴ（２３２６Ｚｍａｘ１．ＡＳＯ．ｇまたは２３２７Ｚｍａｘ１．

ＡＳＯ．ｔ）、１１μｌ　ｄｄＨ$_2$Ｏ、２μｌ　１０×キナーゼ正方向緩衝液、５μｌγ^{32}Ｐ－ＡＴＰ（６０００Ｃｉ／ｍＭｏｌｅ）、および１μｌ　Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ（１０Ｕ／μｌ）を混合し、反応物を３７℃で３０～６０分間インキュベートした。次いで、反応物を９５℃で２分間置き、３０ｍｌのＨ$_2$Ｏを添加した。Ｇ２５マイクロスピンカラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）を使用して、プローブを精製した。

【０２４８】

１０ｍｌ　５×ＳＳＰＥ、５×Ｄｅｎｈａｒｄｔ液、２％ＳＤＳ、および１００μｇ／ｍｌの変性超音波処理サケ精子ＤＮＡ中にて４０℃で２時間ブロットを予備水素化した。次いで、キナーゼ処理オリゴの全反応混合物を、１０ｍｌの新鮮なハイブリダイゼーション緩衝液（５×ＳＳＰＥ、５×Ｄｅｎｈａｒｄｔ液、２％ＳＤＳ）に添加し、４０℃で少なくとも４時間から一晩ハイブリダイゼーションさせた。

【０２４９】

５×ＳＳＰＥ、０．１ＳＤＳ中で全ての洗浄を行った。第１の洗浄は４５℃で１５分間であり、その後、溶液を交換し、フィルターを５０℃で１５分間洗浄した。次いで、フィルターを、２枚の増感スクリーンを含むＫｏｄａｋ　ｂｉｏｍａｘフィルムに－７０℃で１５分間～１時間露光した。必要に応じて、フィルターを５５℃で１５分間洗浄し、再度フィルムに露光した。ボイルした０．１×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳによる１０分間で少なくとも３回の洗浄によって、フィルターを剥ぎ取った。

【０２５０】

最も良好に捕捉した２つのフィルムおよび２つのＡＳＯを使用した対立遺伝子特異的アッセイを、Ａｄｏｂｅ　ＰｈｏｔｏＳｈｏｐへのスキャニングによってデジタル画像に変換した。これらの画像を、Ｇｒａｐｈｉｃ　Ｃｏｎｖｅｒｔｅｒで互いに重ね合わせ、次いでＦｉｌｅＭａｋｅｒ　Ｐｒｏ４．０に記録および保存した（図９を参照のこと）。

【０２５１】

民族的に多様な集団におけるＨＢＭ対立遺伝子頻度を決定するために、種々の民族群由来の無作為な６７２個体を、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）法によって分類した。この集団は、９６人のＣＥＰＨ祖父母（主に白人）、１９２人の白人個体、１９２人のアフリカ系アメリカ人個体、９６人のヒスパニック系個体、および９６人のアジア系個体を含んでいた。これらのいかなる個体にもＨＢＭ多型の存在は証明されなかった。全体として、全部で９１１個体を直接配列決定またはＡＳＯハイブリダイゼーションのいずれかによって分類し、全員がＨＢＭ多型部位でホモ接合性ＧＧであった（図１４）。この情報は、ＨＢＭ対立遺伝子は種々の民族集団で稀であることを示す。

【０２５２】

したがって、本発明は、ＨＢＭ対立遺伝子を有する個体の迅速な同定方法を提供する。この方法を、骨粗鬆症または他の骨障害に対する感受性についての個体の診断およびスクリーニング領域で使用することができる。このアッセイを使用して、ＨＢＭ対立遺伝子を有するさらなる個体または本明細書中に記載のさらなる多型を同定することもできる。

【０２５３】

１４．Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）の細胞局在化

１４．１非イソ型In situハイブリダイゼーションによるラット脛骨での遺伝子発現

Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ（ＰＡＩ）、Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ、ＭＤによってIn situハイブリダイゼーションを行った。ラット骨中の骨成長および再造形領域で特に顕著にＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子を発現する特異的細胞型を決定するために本研究に着手した。本研究で使用したＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）プローブを、８７％配列同一性を共有するヒト（ＨｕＺｍａｘ１）およびマウス（ＭｓＺｍａｘ１）ｃＤＮＡの両方から作製した。ヒトおよびマウスＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）とラットＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）との相同性は未知である。

【０２５４】

例えば、非イソ型In situハイブリダイゼーションによる遺伝子発現を以下のように行ったが、他の方法も当業者に公知である。二酸化炭素窒息によって安楽死させた６～８週

齢の２匹の雌Ｓｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙラットから脛骨を採取した。死の直後に遠位末端を除去し、液体窒素含むＯＣＴ包埋液中で凍結させた近位脛骨を折った。組織を、－８０℃冷凍庫で保存した。

【０２５５】

ｃＤＮＡ由来のＰＣＲ産物を増幅するためのプローブを以下のように調製した。ｃＤＮＡクローン由来のＰＣＲ産物を増幅するためのプライマーを、ヒトＬＲＰ５（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＢＯ１７４９８）およびマウスＬＲＰ５（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＦ０６４９８４）の両公開配列を使用して選択した。ＬＤＬ受容体ファミリー中の他の遺伝子との交差反応性を最小にするために、ＰＣＲ産物は、タンパク質コード領域の細胞内部分由来であった。テンプレートとしてｃＤＮＡクローンを使用して、５０μｌの反応体積でＰＣＲを行った。ＰＣＲ反応物は、１．５ｍＭ　$MgCl_2$、１単位のＡｍｐｌｉＴａｑ、２００μＭ　ｄＮＴＰ、および２μＭの各プライマーを含んでいた。ＰＣＲサイクリング条件は、９４℃で１分間、その後９４℃で３０秒間、５５℃で３０秒間、７２℃で３０秒間３５サイクルし、その後７２℃で５分間伸長することであった。次いで、反応物を、１．５％のアガロースＴｒｉｓ酢酸ゲルで電気泳動した。アガロースからＤＮＡを溶出し、エタノール沈殿を行い、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）に再懸濁した。マウスおよびヒトｃＤＮＡのためにゲル精製ＰＣＲ産物を調製し、In situハイブリダイゼーションのためにＰａｔｈｏｌｏｇｙ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌに提供した。

【０２５６】

ヒトおよびマウスＰＣＲプライマーおよび産物の配列を以下の示す。

ヒトＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）センスプライマー（ＨＢＭ２５３）

５’－ＣＣＣＧＴＧＴＧＣＴＣＣＧＣＣＧＣＣＣＡＧＴＴＣ－３’（配列番号６３３）

ヒトＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）アンチセンスプライマー（ＨＢＭ４６５）

５’－ＧＧＣＴＣＡＣＧＧＡＧＣＴＣＡＴＣＡＴＧＧＡＣＴＴ－３’（配列番号６３４）

ヒトＺｍａｘ１ＰＣＲ産物

５’－ＣＣＣＧＴＧＴＧＣＴＣＣＧＣＣＧＣＣＣＡＧＴＴＣＣＣＣＴＧＣＧＣＧＣＧＧ
ＧＧＴＣＡＧＴＧＴＧＴＧＧＡＣＣＴＧＣＧＣＣＴＧＣＧＣＴＧＣＧＡＣＧＧＣＧＡＧＧ
ＣＡＧＡＣＴＧＴＣＡＧＧＡＣＣＧＣＴＣＡＧＡＣＧＡＧＧＴＧＧＡＣＴＧＴＧＡＣＧＣ
ＣＡＴＣＴＧＣＣＴＧＣＣＣＡＡＣＣＡＧＴＴＣＣＧＧＴＧＴＧＣＧＡＧＣＧＧＣＣＡＧ
ＴＧＴＧＴＣＣＴＣＡＴＣＡＡＡＣＡＧＣＡＧＴＧＣＧＡＣＴＣＣＴＴＣＣＣＣＧＡＣＴ
ＧＴＡＴＣＧＡＣＧＧＣＴＣＣＧＡＣＧＡＧＣＴＣＡＴＧＴＧＴＧＡＡＡＴＣＡＣＣＡＡ
ＧＣＣＧＣＣＣＴＣＡＧＡＣＧＡＣＡＧＣＣＣＧＧＣＣＣＡＣＡＧＣＡＧＴＧＣＣＡＴＣ
ＧＧＧＣＣＣＧＴＣＡＴＴＧＧＣＡＴＣＡＴＣＣＴＣＴＣＴＣＴＴＣＧＴＣＡＴＧＧ
ＧＴＧＧＴＧＴＣＴＡＴＴＴＴＧＴＧＴＧＣＣＡＧＣＧＣＧＴＧＧＴＧＴＧＣＣＡＧＣＧ
ＣＴＡＴＧＣＧＧＧＧＧＣＣＡＡＣＧＧＧＣＣＣＴＴＣＣＣＧＣＡＣＧＡＧＴＡＴＧＴＣ
ＡＧＣＧＧＧＡＣＣＣＣＧＣＡＣＧＴＧＣＣＣＣＴＣＡＡＴＴＴＣＡＴＡＧＣＣＣＣＧＧ
ＧＣＧＧＴＴＣＣＣＡＧＣＡＴＧＧＣＣＣＣＴＴＣＡＣＡＧＧＣＡＴＣＧＣＡＴＧＣＧＧ
ＡＡＡＧＴＣＣＡＴＧＡＴＧＡＧＣＴＣＣＧＴＧＡＧＣＣ－３’（配列番号６３５）

マウスＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）センスプライマー（ＨＢＭ６５５）

５’－ＡＧＣＧＡＧＧＣＣＡＣＣＡＴＣＣＡＣＡＧＧ－３’（配列番号６３６）

マウスＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）アンチセンスプライマー（ＨＢＭ６５６）

５’－ＴＣＧＣＴＧＧＴＣＧＧＣＡＴＡＡＴＣＡＡＴ－３’（配列番号６３７）

マウス（ＬＲＰ５）１ＰＣＲ産物

５’－ＡＧＣＡＧＡＧＣＣＡＣＣＡＴＣＣＡＣＡＧＧＡＴＣＴＣＣＣＴＧＧＡＧＡＣＴ
ＡＡＣＡＡＣＡＡＣＧＡＴＧＴＧＧＣＴＡＴＣＣＣＡＣＴＣＡＣＧＧＧＴＧＴＣＡＡＡＧ
ＡＧＧＣＣＴＣＴＧＣＡＣＴＧＧＡＣＴＴＴＧＡＴＧＴＧＴＣＣＡＡＣＡＡＴＣＡＣＡＴ
ＣＴＡＣＴＧＧＡＣＴＧＡＴＧＴＴＡＧＣＣＴＣＡＡＧＡＣＧＡＴＣＡＧＣＣＧＡＧＣＣ
ＴＴＣＡＴＧＡＡＴＧＧＧＡＧＣＴＣＡＧＴＧＧＡＧＣＡＣＧＴＧＡＴＴＧＡＧＴＴＴＧ

ＧＣＣＴＣＧＡＣＴＡＣＣＣＴＧＡＡＧＧＡＡＴＧＧＣＴＧＴＧＧＡＣＴＧＧＡＴＧＧＧ
ＣＡＡＧＡＡＣＣＴＣＴＡＴＴＧＧＧＣＧＧＡＣＡＣＡＧＧＧＡＣＣＡＡＣＡＧＧＡＴＴ
ＧＡＧＧＴＧＧＣＣＣＧＧＣＴＧＧＡＴＧＧＧＣＡＧＴＴＣＣＧＧＣＡＧＧＴＧＣＴＴＧ
ＴＧＴＧＧＡＧＡＧＡＣＣＴＴＧＡＣＡＡＣＣＣＣＡＧＧＴＣＴＣＴＧＧＣＴＣＴＧＧＡ
ＴＣＣＴＡＣＴＡＡＡＧＧＣＴＡＣＡＴＣＴＡＣＴＧＧＡＣＴＧＡＧＴＧＧＧＧＴＧＧＣ
ＡＡＧＣＣＡＡＧＧＡＴＴＧＴＧＣＧＧＧＣＣＴＴＣＡＴＧＧＡＴＧＧＧＡＣＣＡＡＴＴ
ＧＴＡＴＧＡＣＡＣＴＧＧＴＡＧＡＣＡＡＧＧＴＧＧＧＣＣＧＧＧＣＣＡＡＣＧＡＣＣＴ
ＣＡＣＣＡＴＴＧＡＴＴＡＴＧＣＣＧＡＣＣＡＧＣＧＡ－３’（配列番号６３８）

【０２５７】

以下のようにリボプローブを合成した。ＰＣＲ産物を、再増幅産物のＴ３プロモーター上流またはＴ７プロモーター下流のいずれかを組み込むようにデザインされたキメラプライマーを使用して再増幅させた。得られたＰＣＲ産物を、in vitro転写（ＩＶＴ）によるジゴキシゲニン標識リボプローブの合成のためのテンプレートとして使用した。アンチセンスおよびセンスリボプローブを、製造者に従ってＭＡＸＩｓｃｒｉｐｔＩＶＴキット（Ａｍｂｉｏｎ）を使用したジゴキシゲニン－１１－ＵＴＰ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ－Ｍａｎｎｈｅｉｍ）の存在下でそれぞれＴ７およびＴ３　ＲＮＡポリメラーゼを使用して合成した。次いで、ＤＮＡをＤＮａｓｅ１で分解し、非組み込みジゴキシゲニンを限外濾過によって除去した。リボプローブの完全性を、変性ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動によって評価した。分子サイズを、１００～１０００塩基対（ｂｐ）のＲＮＡラダー（Ａｍｂｉｏｎ）の電気泳動移動度と比較した。プローブの収量および標識を、ブロット免疫化学によって評価した。リボプローブを、５μｌアリコートにて－８０℃で保存した。

【０２５８】

In situハイブリダイゼーションを以下のように行った。凍結したラット骨をＪｕｎｇ　ＣＭ３０００低温保持装置（Ｌｅｉｃａ）で５μＭの切片に切断し、接着スライド（Ｉｎｓｔｒｕｍｅｄｉｃｓ）に置いた。４％パラホルムアルデビド中で１５分間の後固定前にｍＲＮＡ分解を防止するために全てのスライドを調製するまで切片を低温保持装置中で－２０℃に保持した。後固定後、切片を、１ｎｇ／μｌのアンチセンスまたはＰａｔｈｏｌｏｇｙ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ（ＰＡＩ）カスタマイズハイブリダイゼーション緩衝液中のセンスリボプローブと５８℃で約４０時間インキュベートした。ハイブリダイゼーション後、スライドを一連の後ハイブリダイゼーションストリンジェンシー洗浄に供して、非特異的プローブ結合を減少させた。アルカリホスファターゼに結合させた抗ジゴキシゲニン抗体（ＦＡＢフラグメント）を使用した免疫組織化学によってハイブリダイゼーション物を視覚化した。ニトロブルーテトラゾリウムクロリド／リン酸ブロモクロロインドリル（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ－Ｍａｎｎｈｅｉｍ）（沈殿アルカリホスファターゼ基質）を、色素原として使用して、ハイブリダイゼーション細胞を染色の程度によって紫色からほぼ黒色に染色させた。組織切片を、核ファーストレッドで対比染色した。アッセイコントロールは、プローブを含まないもの、およびプローブおよび抗ジゴキシゲニン抗体を含まないものを含んでいた。

【０２５９】

ｍＲＮＡについての正のハイブリダイゼーションシグナルを示す細胞質および／または核周囲の染色の紫色から黒色への視覚化によって、アンチセンスプローブとのハイブリダイゼーションを証明するために特定の細胞型をアッセイした。各細胞型を、各センスプローブとハイブリダイゼーションした複製切片と比較した。アンチセンスプローブで染色が認められ、センスプローブで染色が認められないかバックグラウンドが弱い場合に、結果を正とみなした。

【０２６０】

各研究プローブについてのハイブリダイゼーションシグナルの細胞局在化を、表９にまとめる。再造形に関与する骨の領域（骨幹端内の骨内膜および骨梁を含む）でＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）のハイブリダイゼーションが最初に検出された。骨膜および骨幹端の選択された裏打ち細胞のハイブリダイゼーションも認められた。骨端成長板内の軟骨細胞、特に

増殖軟骨細胞でも正のシグナルが認められた。In situハイブリダイゼーションの結果についての各写真については、図１０、１１、および１２を参照のこと。

【０２６１】

【表９】

表９： ラット脛骨におけるZmax1 (LRP5) *In situ*ハイブリダイゼーションのまとめ

プローブ	部　位	ISHシグナル
Hu Zmaxl	骨　端	
	骨芽細胞	＋
	破骨細胞	－
	骨端成長板	
	休止期の軟骨細胞	－
	増殖中の軟骨細胞	＋
	肥大軟骨細胞	－
	骨幹端	
	骨芽細胞	＋
	骨芽細胞	＋
	骨　幹	－
	骨内膜	
	骨芽細胞	＋
	骨芽細胞	＋
	骨　膜	－
Ms Zmaxl	骨　端	
	骨芽細胞	＋
	骨芽細胞	－
	骨端成長板	
	休止期の軟骨細胞	－
	増殖中の軟骨細胞	＋
	肥大軟骨細胞	＋
	骨幹端	
	骨芽細胞	＋
	骨芽細胞	＋
	骨　幹	－
	骨内膜	
	骨芽細胞	＋
	骨芽細胞	＋
	骨　膜	＋

注釈：「＋」＝検出されたハイブリダイゼーションシグナル、「－」＝検出されなかったハイブリダイゼーションシグナル、「ISH」－*In situ*ハイブリダイゼーション。

【０２６２】

これらの研究により、骨再造形および骨形成に関与する細胞中での潜在的なＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）発現が確認される。増殖領域ならびに近位骨幹端の骨芽細胞および破骨細胞でのＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）発現により、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子が骨成長および鉱化作用過程に関与することが示唆される。骨芽細胞および破骨細胞の活性および分化は、骨形成の進行中および成長中ならびに骨が継続的に再造形される成人期において密接に調和している。内部骨構造の形成および骨再造形は、活性化した破骨細胞による骨吸収とその後の骨芽細胞による新規の物質の沈着との組み合わせに起因する。Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）は、ＬＤＬ受容体遺伝子に関連するので、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）は、機械的感覚およびその後の骨再造形過程におけるシグナル伝達に関与し得る。したがって、この遺伝子の発現レベルの変化は、骨の再造形速度および鉱化作用の程度に影響を与え得る。

【０２６３】

１５．アンチセンス

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的ＲＮＡに対して相補塩基対を含む短い合成核

酸である。生きた細胞中のＲＮＡのアンチセンスオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより、ＲＮＡ機能が妨害され、最終的にタンパク質発現が遮断される。したがって、部分的配列が公知の任意の遺伝子を、アンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的することができる。

【０２６４】

アンチセンステクノロジーは、広範に使用される研究ツールとなりつつあり、ゲノム配列決定作業によって同定される治療標的の検証および解明で重要な役割をはたしつつある。

【０２６５】

標的遺伝子をコードするｍＲＮＡに相補的なオリゴヌクレオチドの利用によって遺伝子発現を阻害するアンチセンステクノロジーを開発した。アンチセンスオリゴヌクレオチドの阻害効果についていくつかの機構が存在する。これらのうち、ＲＮａｓｅＨによるｍＲＮＡの分解は、タンパク質機能の主要な阻害機構であると見なされる。このテクノロジーを最初に使用して、標的遺伝子の機能が解明されたが、慎重且つ適切にデザインした場合、治療に適用することもできる。

【０２６６】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０ヌクレオチド長であり得る。当分野で公知の手順を使用した化学合成および酵素ライゲーション反応を使用して、本発明のアンチセンス核酸を構築することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）を、天然に発生するヌクレオチドまたは分子の生物学的安定性もしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成された二本鎖（例えば、ホスホロチオエート誘導体）の物理的安定性を増大させるようにデザインされたさまざまに修飾されたヌクレオチドを使用して化学合成し、アクリジン置換ヌクレオチドを使用することができる。アンチセンス核酸の作製に使用することができる修飾ヌクレオチドの例には、５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－ヨードウラシル、ハイポキサンチン、キサンチン、４－アセチルシトシン、５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β－Ｄ－ガラクトシルケノシン、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、Ｉ－メチルグアニン、Ｉ－メチルイノシン、２，２－ジメチルグラニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルケオシン、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ワイブトキソシン、シュードウラシル、ケオシン、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ｔ－メチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル、（ａｃｐ３）ｗ、および２，６－ジアミノプリンが挙げられる。

【０２６７】

さらに、モルホリノオリゴヌクレオチドを使用することができる。モルホリノは、リボース部分がモルホリノ基に修飾されたオリゴマーである。このテクノロジーは、米国特許第５，１８５，４４４号に含まれており、Ｓｕｍｍｅｒｔｏｎら、１９９７、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｖ．、７（３）、１８７～９５に記載されている。本発明のアンチセンス核酸分子を、典型的には、被験体に投与するか、これらがＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）および／またはＨＢＭと相互作用して、例えば転写および／または翻訳の阻害によってタンパク質発現が阻害されるＨＢＭまたはＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）タンパク質をコードする細胞ｍＲＮＡおよび／またはゲノムＤＮＡとハイブリダイゼーションするか、または結合するようにIn situで作製する。従来のヌクレオチド相

補性によって、例えば、ＤＮＡ二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合、二重鎖の主要な溝中の特異的相互作用によってハイブリダイゼーションして、安定な二重鎖を形成することができる。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位への直接注射が挙げられる。あるいは、選択した細胞を標的にして全身投与するようにアンチセンス核酸分子を修飾することができる。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子を、例えば、細胞表面受容体または抗原に結合するペプチドまたは抗体へのアンチセンス核酸分子の連結によって、選択された細胞表面上で発現した受容体または抗原と特異的に結合するように修飾することができる。アンチセンス核酸分子はまた、本明細書中に記載のベクターを使用して細胞に送達することができる。

【０２６８】

さらに別の実施形態では、本発明のアンチセンス核酸分子は、αアノマー核酸分子である。μアノマー核酸分子は、通常のγ単位と対照的に鎖が互いに平行である相補ＲＮＡと特異的に二本鎖ハイブリッドを形成する（Ｇａｕｌｔｉｅｒら、１９８７、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、１５、６６２５～４１）。アンチセンス核酸分子はまた、２’－ｏ－メチルリボヌクレオチド（Ｉｎｏｕｅら、１９８７、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、１５、６１３１～６１４８）またはキメラＲＮＡ－ＤＮＡアナログ（Ｉｎｏｕｅら、１９８７、ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．、２１５、３２７～３３０）を含み得る。さらに別の実施形態では、本発明のアンチセンス核酸は、リボザイムである。リボザイムは、ｍＲＮＡなどの一本鎖核酸を切断することができるリボヌクレアーゼ活性を有し、相補領域を有する触媒ＲＮＡ分子である。したがって、リボザイム（例えば、ハンマーヘッドリボザイム（Ｈａｓｅｌｈｏｆｆら、１９８８、Ｎａｔｕｒｅ、３３４、５８５～５９１に記載））を使用して、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）またはＨＢＭ　ｍＲＮＡ転写物を触媒によって切断し、それによりＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）またはＨＢＭ　ｍＲＮＡの翻訳を阻害することができる。Ｚｍａｘ１またはＨＢＭ　コード核酸に特異性を有するリボザイムを、本明細書中に開示のＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）またはＨＢＭ　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号１または３）に基づいてデザインすることができる。例えば、活性部位のヌクレオチド配列がＨＢＭまたはＺｍａｘ１コードｍＲＮＡ中で切断すべきヌクレオチド配列に相補的であるＴｅｔｒａｈｙｍｅｎａＬ－１９　ＩＶＳ　ＲＮＡの誘導体を構築することができる。例えば、Ｃｅｃｈら、米国特許第４，９８７，０７１号およびＣｅｃｈら、米国特許第５，１１６，７４２号（その両方が本明細書中で参照することによって組み込まれる）を参照のこと。あるいは、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）またはＨＢＭ　ｍＲＮＡを使用して、ＲＮＡ分子プールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒ＲＮＡを選択することができる。例えば、Ｂａｒｔｅｌら、１９９３、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２６１、１４１１～１４１８を参照のこと。あるいは、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）またはＨＢＭ遺伝子発現は、標的細胞中でのＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）またはＨＢＭ遺伝子の転写を防止する三重らせん構造を形成するために、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）またはＨＢＭ遺伝子の調節領域（例えば、Ｚｍａｘ１またはＨＢＭ遺伝子プロモーターおよび／またはエンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列の標的化によって阻害することができる。一般に、Ｈｅｌｅｎｅ、１９９１、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓ．、６（６）、５６９～８４；Ｈｅｌｅｎｅら、１９９２、Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、６６０、２７～３６；およびＭａｈｅｒ、１９９２、Ｂｉｏａｓｓａｙｓ、１４（１２）、８０７～１５を参照のこと。

【０２６９】

Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）、ＬＲＰ６、ＨＢＭ様、およびＨＢＭの遺伝子発現を、ｓｍａｌｌ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）に起因するＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）を使用して阻害することもできる。これは、標的遺伝子活性が同族二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）で特異的に消滅する転写後遺伝子サイレンシング（ＰＴＧＳ）技術である。ｓｉＲＮＡは多くの態様で植物中のＰＴＧＳに類似しており、トリパノゾーマ、ヒドラ、プラナリア、線虫、およびショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）を含む多数の無脊椎動物で検出されている。これは、転移エレメントの移動および抗ウ

イルス状態の形成の調整に関与し得る。哺乳動物系におけるＲＮＡｉは、ＰＣＴ出願ＷＯ００／６３３６４（その全体が本明細書中で参照することによって組み込まれる）に記載されている。Ｅｌｂａｓｈｉｒら、２００１、Ｎａｔｕｒｅ、４１１、４９４～９８もまた参照のこと。基本的に、ｄｓＲＮＡ（標的（Ｚｍａｘ１またはＨＢＭ）に類似）を細胞に移入し、遺伝子活性の配列特異的減少が認められる。

【０２７０】

別の実施形態は、小ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）の使用を意図する。これらの化合物は、Ｙｕら、２００２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９９、６０４７～５２およびＰａｄｄｉｓｏｎら、２００２、Ｇｅｎｅｓ＆Ｄｅｖｅｌ．、１６、９４８～５８にさらに記載されている。

【０２７１】

例として、以下のようにアンチセンスオリゴヌクレオチドを調製することができる。骨芽細胞様マウス細胞株ＭＣ３Ｔ３中でアンチセンステクノロジーを使用して研究に着手した。骨分化配列に沿って発達する様に、これらの細胞を誘発することができる。最初の増殖期間を、分化マーカーの最小の発現および膠原性の細胞外基質の最初の合成によって特徴付ける。コラーゲン基質合成は、分化マーカーのその後の誘導に必要である。一旦、基質合成が開始されると、骨芽細胞マーカー遺伝子は明白な一過性配列中で活性化し、初期にアルカリホスファターゼが誘導され、分化過程で骨シアロプロテインおよびオステオカルシンが出現する。この一過性遺伝子発現配列は、成熟および鉱化過程のモニタリングで有用である。成熟が開始されて数日間まで開始されない基質の鉱化は、細胞層培養プレート境界付近の基質の深部の膠原原線維の上または中の無機質の沈着を含む。培養骨芽細胞によって形成された膠原原線維関連無機質は、in vivoで線維性骨中に見出されるものと類似し、研究試薬として頻繁に使用されている。

【０２７２】

ＭＣ３Ｔ３細胞を、製造者の明細書（米国特許第５，８４９，９０２号）にしたがって、分化の最初の１週間アンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。

【０２７３】

Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）用にデザインしたオリゴヌクレオチドを以下に示す。

１０８７５：　５’－ＡＧＵＡＣＡＧＣＵＵＣＵＵＧＣＣＡＡＣＣＣＡＧＵＣ－３’（配列番号６３９）

１０８７６：　５’－ＵＣＣＵＣＣＡＧＧＵＣＧＡＵＧＧＵＣＡＧＣＣＣＡＵ－３’（配列番号６４０）

１０８７７：　５’－ＧＵＣＵＧＡＧＵＣＣＧＡＧＵＵＣＡＡＡＵＣＣＡＧＧ－３’（配列番号６４１）

【０２７４】

図１３は、ＭＣ３Ｔ３細胞での（ＬＲＰ５）１のアンチセンス阻害の結果を示す。上記の３つのオリゴヌクレオチドを、ＭＣ３Ｔ３にトランスフェクトし、標準的な手順にしたがってＲＮＡを単離した。ノーザンブロット分析は、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）転写物の顕著に低い定常状態を示し、調節遺伝子ＧＡＰＤＨは変化しないままであることを明白に示す。したがって、上記のプライマーを使用したアンチセンステクノロジーにより、骨生物学におけるＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）発現の役割を研究可能である。

【０２７５】

１６．酵母２ハイブリッド

Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）が骨密度の調整に関与するシグナル伝達経路を同定するために、酵母２ハイブリッドタンパク質相互作用テクノロジーを使用した。この技術により、酵母転写系の成分への試験タンパク質の結合によって互いに相互作用するタンパク質の同定が容易になる（Ｆｉｅｌｄｓら、１９８９、Ｎａｔｕｒｅ、３４０、２４５～２４６；Ｆｉｅｌｄｓらに付与された米国特許第５，２８３，１７３号；Ｊｏｈｎｓｔｏｎ、１９８７、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．、５１、４５８～４７６；Ｋｅｅｇａｎら、１９８６、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３１、６９９～７０４；Ｄｕｒｆｅｅら、１９９３、Ｇｅｎｅｓ

Ｄｅｖ．、７、５５５～５６９；Ｃｈｉｅｎら、１９９１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８８、９５７８～９５８２；Ｆｉｅｌｄｓら、１９９４、Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、１０、２８６～２９２；およびＧｙｕｒｉｓら、１９９３、Ｃｅｌｌ、７５、７９１～８０３）。第１に、「ベイト」タンパク質（相互作用タンパク質を捜し求めるタンパク質）を、酵母転写因子のＤＮＡ結合ドメインに融合する。第２に、同一の酵母転写因子の転写活性化ドメインに融合したｃＤＮＡを含むｃＤＮＡライブラリー（これをプレイライブラリーという）を構築する。ベイト構築物およびプレイライブラリーを、酵母細胞に形質転換し、交配して二倍体細胞を作製する。ベイトがｃＤＮＡライブラリー由来の特定のプレイと相互作用する場合、活性化ドメインを、この相互作用を介したプロモーターの近傍に置く。次いで、選択マーカー遺伝子によって転写を駆動し、選択培地での成長は相互作用タンパク質の存在を示す。

【０２７６】

本明細書中で考察された酵母２ハイブリッド実験で使用されるアミノ酸配列は、全細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインの一部からなり、これらを以下に示す（アミノからカルボキシへの方向）。

【化３】

RVVCQRYAGA NGPFPHEYVS GTPHVPLNFI APGGSQHGPF TGIACGKSMM SSVSLMGG
RG GVPLYDRNHV TGASSSSSSS TKATLYPPIL NPPPSPATDP SLYNMDMFYS SNIPA
TVRPY RPYIIRGMAP PTTPCSTDVC DSDYSASRWK ASKYYLDLNS DSDPYPPPPT PH
SQYLSAED SCPPSPATER SYFHLFPPPP
SPCTDSS （配列番号７６５）

【０２７７】

推定膜貫通ドメインの最後の６アミノ酸を太字で示す。推定ＳＨ３ドメインに下線を引く。Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）またはＨＢＭ対立遺伝子によってコードされるいずれかのタンパク質中の５０アミノ酸またはそれ以上のさらなるアミノ酸配列を、ベイトとして使用することもできる。ベイトとして使用するポリペプチドの上のサイズを完全な膜貫通ドメインの存在によってのみ制限し（図４を参照のこと）、酵母２ハイブリッド系でベイトを非機能的にする。これらのさらなるベイトタンパク質を使用して、接着斑シグナル伝達経路またはこれらのＨＢＭまたはＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）タンパク質が作用することができる他の経路でＨＢＭまたはＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）によってコードされるタンパク質と相互作用するさらなるタンパク質を同定することができる。一旦同定されると、接着斑シグナル伝達経路またはＨＢＭが作用する他の経路中でタンパク質を調節する試薬の同定方法を、ＨＢＭおよびＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）タンパク質について本明細書中に記載のように実施することができる。

【０２７８】

細胞質Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）シグナル伝達経路を同定するために、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）の細胞質ドメインを２つのベイトベクターにサブクローン化した。第１のベクターは、脳のスクリーニングに使用するｐＤＢｌｅｕおよびベクターｐＰＣ８６（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）にクローン化したＨｅｌａプレイｃＤＮＡであった。使用した第２のベイトベクターは、ベクターｐＯＰ４６中のＴＥ８５骨肉腫細胞株由来のｃＤＮＡプレイライブラリーのスクリーニングで使用したｐＤＢｔｒｐであった。広範に利用可能な別の適切なベクターは、ｐ８６（Ｇｉｂｃｏ、ｉｅｓｔ（商標）Ｓｙｓｔｅｍ）である。Ｆｉｅｌｄｓ ａｎｄ Ｓｏｎｇ、１９８９、Ｎａｔｕｒｅ、３４０、２４５～２４６；Ｆｉｅｌｄｓ ａｎｄ Ｓｏｎｇに付与された米国特許第５，２８３，１７３号；Ｊｏｈｎｓｔｏｎ、１９８７、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．、５１、４５８～４７６；Ｋｅｅｇａｎら、１９８６、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３１、６９９～７０４；Ｄｕｒｆｅｅら、１９９３、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．、７、５５５～５６９；Ｃｈｉｅｎら、１９９１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８８、９５７８～９５８２；Ｆｉｅｌｄｓら、１９９４、Ｔｒ

ｅｎｄｓ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、１０、２８６～２９２；およびＧｙｕｒｉｓら、１９９３、Ｃｅｌｌ、７５、７９１～８０３に記載の当業者に公知の標準的技術を使用した。ベイト構築物およびプレイｃＤＮＡライブラリーを、標準的手段を使用して酵母に形質転換した。

【０２７９】

タンパク質相互作用スクリーニングを行うために、ベイト酵母株の一晩培養物を、２％グルコースを含む２０ｍｌｎＳＤ選択培地（ｐＤＢＬｅｕ、ＳＤ－Ｌｅｕ培地、ｐＤＢｔｒｐ、ＳＤ－ｔｒｐ培地）中で成長させた。培養物を、３０℃で一晩激しく震盪した。培養物を完全培地（２％グルコースを含むＹＥＰＤ）で１０倍に希釈し、培養物を３０℃で２時間震盪しながらインキュベートした。

【０２８０】

凍結プレイライブラリーを解凍し、酵母細胞を、２％グルコースを含む１５０ｍｌのＹＥＰＤ培地中での成長によって30℃で２時間再活性化した。フィルターユニットを７０％エタノールで滅菌し、滅菌水で洗浄してエタノールを除去した。ベイトおよびプレイ培養物の細胞密度を、６００ｎｍのＯＤの決定によって測定した。１ｍｌでＯＤ６００＝４の各酵母株の細胞数に対応する適切な体積の酵母細胞（ベイトおよびプレイ（ライブラリー））を、５０ｍｌのＦａｌｃｏｎチューブに入れた。次いで、混合物を、滅菌フィルターユニットで濾過した。次いで、フィルターを細胞側を上にして予備加温ＹＥＰＤ寒天プレート上に移し、フィルターの下の全ての気泡を除去した。次いで、プレートを３０℃で６時間インキュベートした。１つのフィルターを５０ｍｌのＦａｌｃｏｎチューブに移し、２％グルコースを含む１０ｍｌのＳＤを添加し、細胞を１０秒間のボルテックスによって再懸濁した。

【０２８１】

ＳＤ－ＴｒｐおよびＳＤ－Ｌｅｕプレート上で成長させたコロニー形成単位数に対する一次二倍体細胞数（ＳＤ－Ｌｅｕ、Ｔｒｐプレート上で成長）を滴定した。異なる希釈物をプレートし、３０℃で２日間インキュベートした。次いで、コロニー形成単位数を計数した。二倍体コロニー数（ＳＤ－Ｌｅｕ、Ｔｒｐプレート上のコロニー）により、プレイ構築物のライブラリー全体を、ベイトを発現する酵母に交配されたかを計算することが可能である。この情報は、スクリーニングの質の判断で重要である。

【０２８２】

１６．１　非直接選択

次いで、５フィルター交配由来の再懸濁細胞をプールし、５０ｍｌのＦａｌｃｏｎチューブ中での遠心分離によって細胞を沈殿させた。次いで、細胞を２％グルコースを含む１６ｍｌのＳＤ培地中に再懸濁した。２ｍｌのこの細胞懸濁液を、滅菌ガラスビーズを含む８枚の角皿（ＳＤ－Ｌｅｕ、Ｔｒｐ）にそれぞれプレートし、３０℃で１８～２０時間のインキュベーションによって二倍体細胞を選択した。

【０２８３】

次いで、細胞を角皿から掻き取り、細胞を遠心分離し、１つの５０ｍｌのＦａｌｃｏｎチューブに合わせた。次いで、細胞ペレットを、２％グルコースを含む２５ｍｌのＳＤ培地中に再懸濁した。次いで、Ｎｅｕｇｅｂａｕｅｒチャンバーでの適切な希釈物（通常、１００倍～１０００倍）の計数によって、細胞数を決定した。約5×10^{7}個の二倍体細胞を、選択培地上にプレートした。無関係のプレイベクターとのベイト株の成長に関する観察は、ライブラリースクリーニングのためにどの選択プレートを選択するかを決定するための一助となる。一般に、全てのスクリーニングを、それぞれＳＤ－Ｌｅｕ、－Ｔｒｐ、－Ｈｉｓ；ＳＤ－Ｌｅｕ、－Ｔｒｐ、Ｈｉｓ、５ｍＭ　３ＡＴを含む１つの角皿にプレートしたが、ＳＤ－Ｌｅｕ、－Ｔｒｐ、－Ｈｉｓ、－Ａｄｅが推奨される。

【０２８４】

次いで、酵母細胞を、滅菌ガラスビーズを使用して均一に広げ、３０℃で４日間インキュベートした。コロニー形成酵母細胞数を、ＳＤ－Ｌｅｕ、－Ｔｒｐプレート上への掻き出した細胞懸濁液の異なる希釈物のプレーティングによって滴定した。通常、１００μｌ

の１０$^{-3}$および１０$^{-4}$希釈物のプレーティングにより、プレートあたり１００～１０００コロニーが得られる。

【０２８５】

１６．２　直接選択

交配酵母細胞を含む５つのフィルターを、それぞれ５０ｍｌ　Ｆａｌｃｏｎチューブに移し、細胞を２％グルコースを含む１０ｍｌのＳＤ培地にそれぞれ再懸濁し、続いて１０秒間ボルテックスした。再懸濁した細胞を組み合わせ、Ｂｅｃｋｍａｎ遠心分離機にて３０００ｒｐｍで遠心分離した。上清を捨て、細胞を２％グルコースを含む６ｍｌのＳＤ培地に再懸濁した。２ｍｌの懸濁液を、それぞれの選択角皿に広げ、３０℃で４～５日間インキュベートした。

【０２８６】

１６．３　コロニーの選択

単離コロニーの酵母細胞を、滅菌楊枝で選択し、９６ウェルプレートの各ウェルに移した。細胞を５０μｌのＳＤ－Ｌｅｕ、－Ｔｒｐ、Ｈｉｓ培地に再懸濁し、３０℃で１日間インキュベートした。次いで、酵母細胞を、９６ウェル形式でＳＤ－Ｌｅｕ、－Ｔｒｐ、Ｈｉｓプレートにスタンプし、３０℃で２日間インキュベートした。酵母細胞を、ＹＥＰＤプレートを覆ったナイロンフィルターにもスタンプし、３０℃で１日間インキュベートした。ナイロンフィルター上の細胞を、β－Ｇａｌレポーター活性の分析に使用した。

【０２８７】

滅菌楊枝でＳＤ－Ｌｅｕ、－Ｔｒｐ、Ｈｉｓプレートから酵母コロニーを掻き取り、必要に応じてβ－Ｇａｌ活性にしたがって再遠心分離し、２０％グリセロールに再懸濁した。これを、－８０℃での保存用のマスタープレートとして使用した。

【０２８８】

ＤＮＡ調製のために、グリセロールストック由来の酵母細胞を、ＳＤ－Ｔｒｐプレート上にスタンプし、３０℃で２日間インキュベートした。インキュベーションから２日後に、酵母コロニーを、コロニーＰＣＲおよび配列決定のために用意した。標準的なコロニーＰＣＲ条件を使用して、相互作用スクリーニングから回収したプレイから挿入断片を増幅させた。標準的な配列決定反応およびＡＢＩ３７７（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）蛍光配列決定マシンを使用して配列決定を行った。

【０２８９】

１６．４　ベイト／プレイ相互作用の検証

目的のプレイのグリセロールストックを解凍し、グルコース－Ｔｒｐを含む１０ｍｌのＳＤ一晩培養物に接種した。一晩の成長後、１０ｍｌの培地を使用したＢＩＯ　１０１　ＲＰＭ酵母プラスミド単離キットを使用してプラスミドＤＮＡ調製を行った。培地を遠心分離し、１．５ｍｌの微量遠沈管に移した。酵母溶解マトリクスをペレットに添加し、２５０μｌのアルカリ溶解液を添加した。次いで、サンプルを、５分間ボルテックスした。２５０μｌの中和溶液を添加し、サンプルを短時間混合した。サンプルを、微量遠心分離機で室温で２分間遠心分離した。上清を、破片を防止するスピンフィルターおよび溶解マトリクスに移した。２５０μｌのガラスミルクスピン緩衝液を添加し、チューブを逆さにして混合した。サンプルを、１分間遠心分離し、Ｃａｔｃｈチューブ中の液体を捨てた。５００μｌの洗浄溶液を添加し、サンプルを１分間遠心分離し、洗浄溶液を捨てた。洗浄ステップを１回反復後、１分間乾燥遠心分離を行ってスピンフィルターから残存液体を除去した。フィルターを新規のＣａｔｃｈチューブに移し、１００μｌの滅菌水を添加し、サンプルを短時間ボルテックスして再懸濁し、３０秒間遠心分離してＣａｔｃｈチューブの底にＤＮＡを集めた。

【０２９０】

標準的な手順および調製したグリセロールストックを使用して、５μｌのＤＮＡをＤＨ１０Ｂ　Ｅｌｅｃｔｒｏｍａｘ細胞に形質転換した。ＭｉｎｉｐｒｅｐＤＮＡを、Ｑｉａｇｅｎ　ＱＩＡｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐキットを使用して調製した。３０μｌのＱｉａｇｅｎＥＢ緩衝液を使用して、ＤＮＡを最終的に溶離した。次いで、１μｌ

のプラスミドＤＮＡサンプルを使用し、標準的な手順を使用して酵母細胞を形質転換した。ＳＤ－ｔｒｐ培地での成長から２日後に、コロニーを選択し、新鮮な培地に押し付けた。同様に、ベイトコロニーを、ＳＤ－Ｌｅｕ培地に押し付けた。これら両方を３０℃で一晩成長させた。

【０２９１】

交配のために、ベイトパッチおよびプレイパッチ由来の細胞を、ＹＡＰＤ培地上に共に広げ、３０℃で１２時間インキュベートした。次いで、このプレートを、ＳＤ寒天－Ｌｅｕ－Ｔｒｐプレート上にレプリカプレートし、３０℃で２日間成長させた。相互作用の強さを試験するために、これらのプレートを、ＳＤ寒天－Ｌｅｕ－Ｔｒｐ－Ｈｉｓ培地、５ｍＭ　３ＡＴおよび１０ｍＭ　３ＡＴを含むＳＤ寒天－Ｌｅｕ－Ｔｒｐ－Ｈｉｓ培地、ＳＤ寒天－Ｌｅｕ－Ｔｒｐ－Ｈｉｓ－Ａｄｅ培地、およびＳＤ寒天－Ｌｅｕ－Ｔｒｐ－Ｕｒａ培地にレプリカプレートし、３０℃で２日間成長させた。

【０２９２】

１６．５　Ｇａｌａｃｔｏｎ　Ｓｔａｒによるβガラクトシダーゼ活性アッセイ

画線および選択プレートへの陽性相互作用物のレプリカプレーティング後、コロニーを２００μｌのＳＤ培地を含む９６ウェル皿に置き、ウェル１および９６をブランクとして放置した。第１の９６ウェル皿由来の１０μｌを、１００μｌのＳＤ培地を含む別の平底９６ウェル皿に置いた。コントロールは、ネガティブコントロールおよび非常に弱い正のコントロールからなる。細胞密度を、OD_{600}（値１は、９６ウェル分光計を使用した1×10^{-7}細胞に相当する）で測定した。ＯＤは、通常、０．０３と０．１０との間であった。照度計に特異的なマイクロプレートを使用して、５０μｌの反応混合物を、各ウェルにピペッティングした。培養物を５０個のマイクロタイタープレートに添加し、ピペットを２回上下させて混合した。反応物を室温で３０分間インキュベートし、その後照度計を使用したＲｅｌａｔｉｖｅ　Ｌｉｇｈｔユニットで測定した。

【０２９３】

図９は、試験した３つのプレイライブラリー由来の酵母２ハイブリッドスクリーニングで同定した遺伝子を列挙する。２つの遺伝子（ザイキシンおよびアクシン）は、３つ全てのスクリーニングで（ＬＲＰ５）１の細胞質ドメインと相互作用することが見出された。３つの遺伝子（αアクチニン、ＴＣＢ、およびＳ１－５）は、３つのスクリーニング中２つと相互作用した。

【０２９４】

細胞－細胞および細胞－基質接触部位（病巣接触／接着斑）で見出される種々のタンパク質は、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）の細胞質ドメインと相互作用することが示された。これらには、αアクチニン、Ｔｒｉｏ、Ｐｉｎｃｈ様タンパク質、およびザイキシンが含まれる。ＰＩＮＣＨは、インテグリン結合キナーゼ（インテグリンおよび成長因子シグナル伝達経路での初期伝達物質）と相互作用することが公知のＬＩＭドメイン含有タンパク質である。酵母２ハイブリッドスクリーニングで密接に関連する遺伝子の発見により、細胞外基質シグナルからのインテグリンシグナル伝達に関連する新規の経路の可能性が増大する。接着斑を局在化させることでも公知のＴｒｉｏは、細胞－基質相互作用および細胞移動に関連する細胞骨格の再整列に重要な役割を果たすと考えられる。ザイキシン（別のＬＩＭドメイン含有タンパク質）を接着斑に局在化し、インテグリンシグナル伝達経路を介してトリガーが伝達された場合に細胞骨格の再組織化に関連すると考えられる。ザイキシンはまた、αアクチニンと相互作用し、本発明者らはＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）との相互作用として同定した。同定されたタンパク質を含む他のＬＩＭドメインには、マウスａｊｕｂａ、ＬＩＭＤ１、および新規のＬＩＭＤ１様タンパク質が含まれる。

【０２９５】

アクシンもまた、２ハイブリッド実験から同定した。このタンパク質は、Ｗｎｔ位シグナル伝達経路の阻害に関与し、腫瘍抑制ＡＰＣと相互作用する。上記の接着斑シグナル伝達と関連がある。２つの経路における１つの共通のステップは、結果としてβカテニン／Ｌｅｆ－１およびＡＰ－１転写因子を活性化するグリコーゲンシンターゼキナーゼ３の阻

害を含む。アクシン／ＡＰＣは、このステップおよびインテグリン関連キナーゼに関与する。Ｗｎｔ経路は、胚形成時の細胞の運命を決定する役割を果たす。不適切に活性化された場合、Ｗｎｔ経路は癌も誘導し得る。Ｗｎｔ経路はまた、細胞骨格の再配列で役割を果たすようである。アフリカツメガエル胚アッセイでは、ＨＢＭとＷｎｔ５ａタンパク質との組み合わせにより、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）とＷｎｔ５ａとの組み合わせよりも非常に広い範囲でＷｎｔ経路を刺激し、これはコントロールおよびＷｎｔ５ａのみのスコアよりもわずかに高い。ＨＢＭおよびＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）細胞外ドメイン（ＥＣＤ）により、Ｗｎｔ５ａの非存在下でＷｎｔシグナル伝達が最も徐々に刺激され、ＨＢＭ　ＥＣＤの存在下でのＷｎｔ５ａの存在によってわずかに増加する。接着斑のシグナル伝達におけるＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）の関与を示すモデルを、図１５に示す。

【０２９６】

他の研究と組み合わせたこのデータにより、インテグリンシグナル伝達経路が機械的ストレスおよび接着に対する細胞応答で役割を果たすことが示唆される。これにより、骨生物学におけるＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）の魅力的な作用機構モデルが得られる。Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）は、機械的ストレスの直接的感知または機械的感知に関連する細胞外基質中の結合分子に関連することが可能である。その後の経路を介したシグナル伝達は、骨細胞の細胞形態学、細胞接着、移動、増殖、分化、およびアポトーシスに対する効果による骨再形成に関連し得る。

【０２９７】

【表１０】

表１０： 酵母2ハイブリッドの結果

遺伝子記号	遺伝子	Genbank アクセッション番号	NT 配列番号	AA 配列番号
ACTN1	αアクチニン	NM_001102	642	
AES	アミノ末端エンハンサー	NM_001130.3	643	
AIP4	アトロフィン１相互作用タンパク質	AF038564.1	644	
Novel	Ajuba		645	
AXIN	Wntシグナル伝達	AF009674.1	646	
CDC23	細胞分裂サイクル23、酵母、ホモログ	NM_004661.1	647	
HSM800944	TRIOに類似	AL117435.1	748	
HSM800936		AL117427.1	649	
Novel	タンパク質1を含むLIMドメインに類似		650	
DEEPEST	紡錘体超らせん関連タンパク質	NM_006461.1	651	
ECM1	細胞外基質タンパク質1	U65932.1	652	
EF1A	伸長因子1-α	X16869.1	653	
FN	フィブロネクチン	X02761.1	654	
HOXB13	ホメオドメインタンパク質	U81599.1	655	
Novel	Glu-Lysリッチタンパク質		656	
LIMD1	LIMドメイン含有1	NM_014240.1	657	
Novel	PINCH様		658	
RANBPM	中心体タンパク質	NM_005493.1	659	
S1-5	細胞外タンパク質	U03877.1	660	
TCB	細胞質ゾル甲状腺ホルモン結合をコードする遺伝子	M26252.1	661	
TID	腫瘍性成虫原基	NM_005147.1	662	
ZYX	ザイキシン	NM_003461.1	663	
TRIO	GTPase	U42390.1	664	
HUMPITPB	ホスファチジルイノシトール輸送タンパク質	D30037.1	665	
ACTIN1	αアクチニン	NP_001093.1		666
AES	アミノ末端エンハンサー	NP_001121.2		667
AIP4	アトロフィン１相互作用タンパク質	AAC04845.1		668
Novel	Ajuba			669
AXIN	Wntシグナル伝達	AAC51624.1		670
CDC23	細胞分裂周期23、酵母ホモログ	NP_004652.1		671
Novel	TRIO CAB55923.1に類似			672
Novel	LIMドメイン含有タンパク質1に類似			673
DEEPEST	紡錘体超らせん関連タンパク質	NP_006452.1		674
ECM1	細胞外基質タンパク質1	AAB05933.1		675
EF1A	伸長因子1-α	CAA34756.1		676
FN	フィブロネクチン	CAA26536.1		677
Novel	Glu-Lysリッチタンパク質			678
HOXB13	ホメオドメインタンパク質B13	AAB39863.1		679
LIMD1	LIMドメイン含有1	NP_055055.1		680
Novel	PICH様			681
RANBPM	中心体タンパク質	NP_005484.1		682
S1-5	細胞外タンパク質	AAA65590.1		683
TCB	細胞質ゾル甲状腺ホルモン結合タンパク質	AAA36672.1		684
TID	腫瘍性成虫原基	NP_005138.1		685
ZYX	ザイキシン	NP_003452.1		686
TRIO	GTPアーゼ	AAC34245.1		687
PTDINSTP	ホスファチジルイノシトール輸送タンパク質βイソ型	P48739		688

【０２９８】

図１５に示すモデルおよび表１０に示す結果に照らして、本発明によって意図される別の態様は、接着斑シグナル伝達の調節による骨密度および骨量障害を調節することである。酵母２ハイブリッド系によって同定された接着斑シグナル伝達経路に関与する任意のメンバーによってコードされるＤＮＡ、ｍＲＮＡ転写物、またはタンパク質の調節によって調節することができる。

【０２９９】
ＨＢＭ酵母２ハイブリッド系によって同定された新規の核酸およびタンパク質もまた意図される。これらには、配列番号６４５（Ａｊｕｂａ）、配列番号６５１（ＬＩＭドメイン含有タンパク質１をコードする遺伝子に類似の遺伝子）、配列番号６５６（Ｇｌｕ－Ｌｙｓリッチタンパク質）、配列番号６５８（ＰＩＮＣＨ様遺伝子）、配列番号６６９（Ａｊｕｂａタンパク質）、配列番号６７２（ＴＲＩＯに類似のタンパク質）、配列番号６７３、配列番号６７８（Ｇｌｕ－Ｌｙｓリッチタンパク質）、および配列番号６８１（ＰＩＮＣＨ様タンパク質）が含まれるが、これらに限定されない。
【０３００】
１７．潜在的機能
Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）およびＬＲＰ６によってコードされるタンパク質は、低密度リポタンパク質受容体（ＬＤＬ受容体）に関連する。Ｇｏｌｄｓｔｅｉｎら、１９８５、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、１、１～３９；Ｂｒｏｗｎら、１９８６、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３２、３４～４７を参照のこと。ＬＤＬ受容体は、低密度リポタンパク質（コレステロールを含む脂質タンパク質凝集体）の取り込みを担う。ＬＤＬ受容体が欠損した個体は、コレステロール除去不全であり、アテローム性動脈硬化症を発症する傾向がある。さらに、コレステロール合成酵素のフィードバック調節の変化が一部起因し、およびこれらの酵素の遺伝子の転写の増加が一部起因するので、欠損ＬＤＬ受容体を含む細胞ではコレステロール生成の増加が認められる。
【０３０１】
したがって、ＬＤＬ受容体は、直接または間接的に、シグナル伝達タンパク質として機能し、遺伝子発現を調節することができる。Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）およびＬＲＰ６がＬＤＬ受容体に関連するので、このタンパク質も骨再造形に影響を与える方法で細胞間のシグナル伝達に関与し得る。
【０３０２】
グリシン１７１アミノ酸は、このアミノ酸がＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）のマウスホモログでも見出されるので、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）の機能に重要である可能性がある。密接に関連したＬＲＰ６（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＪＥ０２７２）タンパク質もまた、対応する一にグリシンを含む（Ｂｒｏｗｎら、１９８８、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．、２４８、８７９～８８）。自然淘汰により重要な位置での副産物由来のアミノ酸が変化する変異の惹起を防止するので、タンパク質の構造または機能に重要なアミノ酸は種間で保存される傾向がある。
【０３０３】
さらに、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）の細胞外ドメインは、５つのＹＷＴＤモチーフおよびその後のＥＦＧモチーフからなる４つの反復を含む。この５ＹＷＴＤ＋ＥＧＦ反復はＬＤＬ受容体および他のＬＤＬ受容体関連タンパク質でも見出されるので、異なる折りたたみタンパク質ドメインを形成する可能性がある。第１の３つの５ＹＷＴＤ＋ＥＧＦ反復は、その構造が非常に類似しており、第４の反復は高度に分岐している。グリシン１７１は、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）中の５ＹＷＴＤ＋ＥＧＦ反復の中心のＹＷＴＤモチーフ中に存在する。ＬＤＬ受容体タンパク質中に５ＹＷＴＤ＋ＥＧＦ反復を含むので、他の２つの類似するＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）の５ＹＷＴＤ＋ＥＧＦ反復もまた、対応する位置にグリシンを含む。しかし、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）中の最初の３つの５ＹＷＴＤ＋ＥＧＦ反復とＬＤＬ受容体中の１つの反復でわずか１７．６％のアミノ酸が同一である。これらの所見は、グリシン１７１はこの反復の機能に不可欠であり、グリシン１７１の変異によりＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）の機能が変化することを示す。ｃＤＮＡおよびペプチド配列を、図６Ａ～６Ｊに示す。５８２位の極めて重要な塩基を、太字および下線で示す。
【０３０４】
ノーザンブロット分析（図７Ａ～Ｂ）により、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）はヒト骨組織および多数の他の組織中で発現することが明らかである。多組織ノーザンブロット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ、ＣＡ）を、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）由来のエクソンで

探索した。図７Ａに示すように、５．５ｋｂのＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）転写物は、心臓、腎臓、肺、肝臓、および膵臓で高度に発現し、骨格筋および脳ではより低いレベルで発現する。図７Ｂに示す第２のノーザンブロットにより５．５ｋｂの転写物サイズが確認され、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）が骨、骨髄、頭蓋冠、およびヒト骨芽細胞株で発現することが示された。

【０３０５】

まとめると、酵母２ハイブリッドの結果とあわせたこれらの結果は、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子中のＨＢＭ多型は、ＨＢＭ表現型を担い、Ｚｍａｘ１遺伝子は骨成長に重要であることを示す。さらに、Ｚｍａｘ１の変異は骨の鉱化および発達を変化させることができるので、Ｚｍａｘ１に結合する分子は通常骨発達を変化することができる可能性がある。このような分子には、例えば、小分子、タンパク質、ＲＮＡアプタマー、およびペプチドアプタマーなどを含み得る。

【０３０６】

１８．核酸、ベクター、形質転換体、および宿主細胞の調製

本発明の大量の核酸を、適切な宿主中での複製によって産生することができる。所望のフラグメントをコードする天然または合成の核酸フラグメントを、原核または真核細胞中に組み込みおよび複製可能な組換え核酸構築物（通常、ＤＮＡ構築物）に組み込む。通常、核酸構築物は、単細胞宿主（酵母または細菌など）中での複製に適切であるが、培養哺乳動物、植物、または他の真核細胞株への移入（ゲノム内への組み込みを含むか含まない）を意図することもできる。本発明の方法によって産生された核酸の精製は、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、「分子クローニング：実験マニュアル」、第２版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９８２またはＡｕｓｕｂｅｌら、「現代の分子生物学プロトコール」、Ｊ．Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、１９９２に記載されている。

【０３０７】

本発明の核酸を、化学合成（例えば、Ｂｅａｕｃａｇｅら、１９８１、Ｔｅｔｒａ．Ｌｅｔｔ．、２２、１８５９～６２に記載のホスホラミダイト法）またはＭａｔｔｅｕｃｃｉら、１９８１、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、１０３、３１８５に記載のトリエステル法によって産生し、市販の自動化オリゴヌクレオチド合成機で行うことができる。二本鎖フラグメントを、相補鎖の合成および適切な条件下での鎖のアニーリングまたはＤＮＡポリメラーゼを使用した相補鎖への適切なプライマー配列の添加のいずれかによる化学合成の一本鎖産物から得ることができる。

【０３０８】

原核生物または真核生物宿主への移入のために調製した核酸構築物は、所望のタンパク質をコードする意図する核酸フラグメントを含む宿主によって認識される複製系を含み得るが、好ましくは、タンパク質コードセグメントに作動可能に連結された転写および翻訳開始調節配列も含む。発現ベクターには、例えば、複製起点もしくは自律複製配列（ＡＲＳ）および発現調節配列、プロモーター、エンハンサー、ならびに必要なプロセシング情報部位（リボゾーム結合部位、ＲＮＡスプライス部位、ポリアデニル化部位など）、転写終結配列、ならびにｍＲＮＡ安定化配列を含み得る。必要に応じて、タンパク質を交差させ、そして／または細胞膜中にとどめて機能的トポロジーが得られる、天然のＨＢＭもしくはＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）タンパク質、他の受容体、または同一もしくは関連する種の分泌タンパク質由来の分泌シグナルも含むことができるか、細胞から分泌することができる。このようなベクターを、当分野で周知であり、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９８９またはＡｕｓｕｂｅｌら、１９９２で考察されている標準的な組換え技術手段によって調製することができる。

【０３０９】

適切なプロモーターおよび他の必要なベクター配列を宿主内で機能するように選択し、適切ならば、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）またはＨＢＭ遺伝子と天然に会合するものを含み得る。細胞株と発現ベクターとの実行可能な組み合わせの例は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９

８９またはＡｕｓｕｂｅｌら、１９９２に記載されている。多数の有用なベクターが当分野で公知であり、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ、およびＰｒｏｍｅｇａ Ｂｉｏｔｅｃｈなどの販売者から入手することができる。ｔｒｐ、ｌａｃ、およびファージプロモーター、ｔＲＮＡプロモーター、および解糖酵素プロモーターなどのプロモーターを、原核生物宿主で使用することができる。有用な酵母プロモーターには、メタロチオネイン、３－ホスホグリセレートキナーゼ、または他の解糖酵素（エノラーゼまたはグリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼなど）、マルトースおよびガラクトース利用を担う酵素などのプロモーター領域が含まれる。酵母発現での使用に有用なベクターおよびプロモーターは、欧州特許特許第７３，６７５号にさらに記載されている。適切な非天然哺乳動物プロモーターには、ＳＶ４０由来の初期または後期プロモーター（Ｆｉｅｒｓら、１９７８、Ｎａｔｕｒｅ、２７３、１１３）またはモロニーマウス白血病ウイルス、マウス腫瘍ウイルス、鳥類肉腫ウイルス、アデノウイルスＩＩ、ウシ乳頭種ウイルス、もしくはポリオーマ由来のプロモーターを含み得る。さらに、多数の遺伝子コピーを作製することができるように、構築物を増幅可能な遺伝子（例えば、ＤＨＦＲ）に連結することができる。適切なエンハンサーおよび他の発現調節配列については、例えば、「エンハンサーおよび真核生物遺伝子発現」、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９８３も参照のこと。

【０３１０】

このような発現ベクターは自律的に複製することができる一方で、当分野で周知の方法による宿主細胞ゲノムへの挿入によって複製することができる。

【０３１１】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、選択マーカー（ベクターで形質転換された宿主細胞の生存または成長に必要なタンパク質をコードする遺伝子）を含む可能性がある。この遺伝子の存在により、挿入断片を発現する宿主細胞のみが確実に成長する。典型的な選択遺伝子は、ａ）抗生物質または他の有毒物質（例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートなど）に耐性を付与するか、ｂ）栄養要求欠損を補足するか、ｃ）天然培地からは利用できない極めて重要な栄養素を供給する（例えば、バチルスのＤアラニンラセマーゼをコードする遺伝子）タンパク質をコードする。適切な選択マーカーの選択は宿主細胞に依存し、異なる宿主に適切なマーカーは当分野で周知である。

【０３１２】

目的の核酸を含むベクターを、in vitroで転写し、得られたＲＮＡを、周知の方法（注入（Ｋｕｂｏら、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｓ．、２４１、１１９、１９８８を参照のこと）など）によって宿主細胞に移入するか、ベクターを細胞宿主の型に依存する当分野で周知の方法（エレクトロポレーション；塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、ＤＥＡＥ－デキストラン、または他の物質を使用したトランスフェクション；遺伝子銃；リポフェクション；感染（レトロウイルスゲノムなどのベクターは感染剤である）および他の方法）によって宿主細胞に直接移入することができる。一般に、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９８９およびＡｕｓｕｂｅｌら、１９９２を参照のこと。上記の方法を含む当分野で公知の任意の方法による核酸の宿主細胞への移入を、本明細書では「形質転換」という。上記の核酸が移入された細胞は、このような細胞の子孫も含むことを意味する。

【０３１３】

大量の本発明の核酸およびタンパク質を、適合性原核生物または真核生物宿主におけるベクターまたは他の発現送達体中でのＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）、ＬＲＰ６、ＨＢＭ、もしくはＨＢＭ様核酸またはその一部の発現によって調製することができる。最も一般的に使用した原核生物宿主は、大腸菌株であるが、枯草菌またはシュードモナスなどの他の原核生物を使用することもできる。

【０３１４】

哺乳動物または他の真核生物宿主細胞（酵母、糸状菌、植物、昆虫、両生類、または鳥類の宿主細胞など）もまた、本発明のタンパク質産生に有用であり得る。培養での哺乳動

物細胞の増殖自体も周知である。Ｊａｋｏｂｙ ａｎｄ Ｐａｓｔａｎ編、「細胞培養」、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、第５８巻、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．、Ｈａｒｃｏｕｒｔ Ｂｒａｃｅ Ｊｏｖａｎｏｖｉｃｈ、ＮＹ、１９７９を参照のこと。一般に使用される哺乳動物宿主細胞株の例は、ＶＥＲＯおよびＨｅＬａ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、およびＷＩ３８、ＢＨＫ、およびＣＯＳ細胞株であるが、例えば、他の細胞株がより高い発現を所望するグリコシル化パターンまたは他の特徴の獲得に適切であり得ることが当業者に認識される。

【０３１５】

ベクター構築様式に依存したマーカーの使用によってクローンを選択する。マーカーは、同一または異なるＤＮＡ分子上に存在することができ、好ましくは同一のＤＮＡ分子上に存在し得る。原核生物宿主では、例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、または他の抗生物質への耐性によって形質転換体を選択することができる。温度感受性に基づいた特定の産物の産生は、適切なマーカーとして使用することもできる。

【０３１６】

本発明の核酸で形質転換された原核細胞または真核細胞は、本発明の核酸およびタンパク質の産生に有用なだけでなく、例えば、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）、ＬＲＰ６、ＨＢＭ、またはＨＢＭ様タンパク質の研究でも有用である。

【０３１７】

当業者に認識されるように、アンチセンス核酸配列は、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）、ＬＲＰ６、ＨＢＭ、またはＨＢＭ様分子の防止または減少に有用である。例えば、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）、ＬＲＰ６、ＨＢＭ、またはＨＢＭ様核酸の全部または一部を含む核酸ベクターを、アンチセンス方向でプロモーターの調節下に置き、細胞に移入することができる。細胞内でのこのようなアンチセンス構築物の発現は、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）、ＬＲＰ６、ＨＢＭ、またはＨＢＭ様転写および／または翻訳および／または複製を妨害する。

【０３１８】

本明細書中に開示のＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）、ＬＲＰ６、ＨＢＭ、またはＨＢＭ様遺伝子配列に基づいたプローブおよびプライマーを使用して、他の種における相同遺伝子配列およびタンパク質を同定する。遺伝子配列およびタンパク質を、単離された種のための本明細書中に記載の診断／予後、治療、および薬物スクリーニング方法に使用することもできる。

【０３１９】

１９．タンパク質発現および精製

本発明のＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）、ＬＲＰ６、ＨＢＭ、またはＨＢＭ様タンパク質の発現および精製を、本質的に以下の概説のように行うことができる（ＨＢＭのみをいう場合、ＬＲＰ５、ＬＲＰ６、およびＨＢＭ様タンパク質も含まれる）。ＨＢＭ遺伝子由来膜および分泌タンパク質のククローニング、発現、および精製を容易にするために、大腸菌における組換えタンパク質のクローニングおよび発現用のｐＥＴ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｎｏｖａｇｅｎ）などの遺伝子発現系を選択した。また、組換えタンパク質産物の精製を容易にするために、ペプチドタグをコードするＤＮＡ配列（Ｈｉｓ－Ｔａｐ）を、目的のＤＮＡ配列の３’末端に融合した。いかなる５’末端シグナル配列の変化も回避するために、融合用に３’末端を選択した。

【０３２０】

例えば、ＨＢＭクローニングのために配列番号１、３、および５～１２に記載の核酸から選択した核酸を、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって調製した。ＨＢＭヌクレオチド配列の５’および３’末端に特異的な合成オリゴヌクレオチドプライマーをデザインし、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）から購入した。全ての正方向プライマー（配列の５’末端に特異的）を、５’末端にＮｃｏＩクローニング部位を含むようにデザインした。これらのプライマーを、ＮｃｏＩ部位内でコードされるメチオニン残基およびその後のバリン残基でタンパク質翻訳を開始し、ＨＢＭＤＮＡ配列によってコードされたタンパク質を産生するようにデザインした。全逆方向プ

ライマー（配列の３’末端に特異的）は、ｐＥＴ－２８ｂの読み取り枠にＨＢＭ配列をクローニングするための５’末端でのＥｃｏＲＩ部位を含んでいた。ｐＥＴ－２８ｂベクターにより、ヒスチジン親和性タグを含む（Ｃ末端に）６つのヒスチジン残基を含むさらなる２０個のカルボキシル末端アミノ酸をコードする配列が得られた。

【０３２１】

ＨＢＭ遺伝子から調製したゲノムＤＮＡを、ＰＣＲ増幅用のテンプレートＤＮＡの供給源として使用した（Ａｕｓｕｂｅｌら、「現代の分子生物学プロトコール」、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、１９９４）。ＨＢＭヌクレオチド配列を含むＤＮＡ配列を増幅するために、ゲノムＤＮＡ（５０ｎｇ）を、２ｍＭ $MgCl_2$、定義したＨＢＭに相補的であり且つ隣接する１μＭ合成オリゴヌクレオチドプライマー（正方向および逆方向プライマー）、０．２ｍＭの各デオキシヌクレオチド三リン酸、ｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＴＴＰ、および２．５単位の熱安定性ＤＮＡポリメラーゼ（ＡｍｐｌｉＴａｑ（商標）、Ｒｏｃｈｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．、Ｂｒａｎｃｈｂｕｒｇ、ＮＪ）を含み、最終体積を１００μｌとした反応バイアルに入れた。

【０３２２】

熱サイクリング反応の際、各増幅ＤＮＡサンプルを、Ｑｉａｑｕｉｃｋ Ｓｐｉｎ ＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）を使用して精製した。全ての増幅ＤＮＡサンプルを、制限エンドヌクレアーゼ（例えば、ＮｃｏＩおよびＥｃｏＲＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ））での消化に供した（Ａｕｓｕｂｅｌら、「現代の分子生物学プロトコール」、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．、１９９４）。次いで、ＤＮＡサンプルを、１．０％ＮｕＳｅｉｖｅ（ＦＭＣ ＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ、Ｒｏｃｋｌａｎｄ、ＭＥ）アガロースゲルでの電気泳動に供した。ＤＮＡを、臭化エチジウムへの曝露および長波ＵＶ照射によって視覚化した。アガロースゲルから単離したスライス中に含まれるＤＮＡを、Ｂｉｏ １０１ ＧｅｎｅＣｌｅａｎキットのプロトコール（Ｂｉｏ １０１、Ｖｉｓｔａ、ＣＡ）を使用して精製した。

【０３２３】

制限エンドヌクレアーゼ（例えば、ＮｃｏＩおよびＥｃｏＲＩ）（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ）での消化によるクローニングのために、ｐＥＴ－２８ｂベクターを調製した（Ａｕｓｕｂｅｌら、「現代の分子生物学プロトコール」、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．、１９９４）。挿入された遺伝子の５’末端に融合することができるヒスチジン親和性タグをコードするｐＥＴ－２８ａベクターを、適切な制限エンドヌクレアーゼでの消化によって調製した。

【０３２４】

消化後、ＤＮＡ挿入断片を、先に消化したｐＥＴ－２８ｂ発現ベクターにクローン化した（Ａｕｓｕｂｅｌら、「現代の分子生物学プロトコール」、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．、１９９４）。次いで、下記のように、ライゲーション反応産物を使用して、大腸菌のＢＬ２１株を形質転換した（Ａｕｓｕｂｅｌら、１９９４）。

【０３２５】

標準的な方法（Ａｕｓｕｂｅｌら、１９９４）にしたがって、コンピテント細菌（大腸菌ＢＬ２１株または大腸菌ＢＬ２１（Ｄ３）株）を、クローン化ＨＢＭ配列を保有する組換えｐＥＴ発現プラスミドで形質転換した。簡単に述べれば、１μｌのライゲーション反応物を５０μｌのエレクトロコンピテント細胞と混合し、高圧パルスに供し、その後にサンプルを０．４５ｍｌ ＳＯＣ培地（０．５％酵母抽出物、２．０％トリプトン、１０ｍＭ ＮａＣｌ、２．５ｍＭ ＫＣｌ、１０ｍＭ $MgCl_2$、１０ｍＭ $MgSO_4$、および２０ｍＭグルコース）にて３７℃で１時間震盪しながらインキュベートした。次いで、サンプルを、一晩成長させるために２５μｇ／ｍｌ硫酸カナマイシンを含むＬＢ寒天プレートに広げた。次いで、下記のようにＢＬ２１の形質転換コロニーを選択および分析してクローニングされた挿入断片を評価した。

【０３２６】

組換えｐＥＴ－２８ｂ　ＨＢＭヌクレオチド配列で形質転換した各ＢＬ２１クローンを、元のＰＣＲ増幅クローニング反応で使用したＨＢＭ配列に特異的な同一の正方向および逆方向プライマーを使用したクローン化挿入断片のＰＣＲ増幅によって分析した。首尾のよい増幅により、発現ベクター中のＨＢＭ配列の組み込みを確認する（Ａｕｓｕｂｅｌら、１９９４）。

【０３２７】

適切にクローン化されたＨＢＭヌクレオチド配列を保有する組換えｐＥＴ－２８ｂベクターの各クローンを選択し、５ｍＬのＬＢブロス＋２５μｇ／ｍｌ硫酸カナマイシン中で一晩インキュベートした。翌日、プラスミドＤＮＡを、Ｑｉａｇｅｎプラスミド精製プロトコール（Ｑｉａｇｅｎ，Ｉｎｃ．、Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ、ＣＡ）を使用して単離および精製した。

【０３２８】

クローニングまたはプラスミド調製の目的で、ｐＥＴベクターを任意の大腸菌　Ｋ－１２株（例えば、ＨＭＳ１７４、ＨＢ１０１、ＪＭ１０９、およびＤＨ５など）で増殖させることができる。発現用宿主には、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子の染色体コピーを含む大腸菌株が含まれる。これらの宿主は、バクテリオファージＤＥ３、ｌａｃＩ遺伝子を保有するλ誘導体、ｌａｃＵＶ５プロモーター、およびＴ７　ＲＮＡポリメラーゼの遺伝子の溶原であった。Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを、イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトシド（ＩＰＴＧ）の添加によって誘導し、ＲＮＡポリメラーゼは、その目的の遺伝子を保有する機能的Ｔ７プロモーター（ｐＥＴ－２８ｂ）を含む任意の標的プラスミドを転写する。株には、例えば、ＢＬ２１（ＤＥ３）（Ｓｔｕｄｉｅｒら、１９９０、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．、１８５、６０～８９）が含まれる。

【０３２９】

組換えＨＢＭ配列を発現するために、上記のように５０ｎｇのプラスミドＤＮＡを単離し、上記のようにコンピテントＢＬ（ＤＥ３）細菌（ｐＥＴ発現キットの一部としてＮｏｖａｇｅｎから提供）を形質転換した。ｌａｃＺ遺伝子（βガラクトシダーゼ）を、ＨＢＭ組換え構築に記載のようにｐＥＴ－Ｓｙｓｔｅｍで発現させる。形質転換細胞を、ＳＯＣ培地中で１時間培養し、培養物を２５μｇ／ｍｌ硫酸カナマイシンを含むＬＢプレート上にプレートした。翌日、細菌コロニーをプールし、硫酸カナマイシン（２５μｇ／ｍｌ）を含むＬＢ培地中で６００ｎＭでＯ．Ｄ．が０．５～１．０の光学密度まで成長させ、この時点で１ｍＭのＩＰＴＧを培地に３時間添加してＨＢＭ組換えＤＮＡ構築物の遺伝子発現を誘導した。

【０３３０】

ＩＰＴＧでの遺伝子発現の誘導後、３５００×ｇのＳｏｒｖａｌｌ　ＲＣ－３Ｂ遠心分離機にて４℃で１５分間の遠心分離によって細菌を回収した。ペレットを、５０ｍｌの冷ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、０．１Ｍ　ＮａＣｌ、および０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ（ＳＴＥ緩衝液）中に再懸濁した。次いで、細胞を、２０００×ｇにて４℃で２０分間遠心分離した。ペレットの湿重量を秤量し、タンパク質精製まで－８０℃で凍結した。

【０３３１】

１９．１　チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）発現系

あるいは、ＨＢＭおよびＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）を、真核細胞中に発現することができる。哺乳動物由来の細胞株などの真核細胞は、ＥＧＦおよびＬＤＬＲモジュールなどのシスチンリッチドメインを含む適切に折りたたまれたタンパク質をより多く発現することができる。

【０３３２】

１９．２　構築物の開発

ＩｇＧ－ＦｃとのＨＢＭおよびＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）細胞外ドメイン融合物（ＥＣＤ）を調製した。ＩｇＧ－Ｆｃドメインへのこれらの ＥＣＤ融合物により、Ｚｍａｘ１／ＨＢＭ受容体の内因性膜貫通部分および細胞質部分が除去され、分泌融合タンパク質が産生されるはずである。Ｆｃドメインが存在しない精製されたＺｍａｘ１またはＨＢＭ　ＥＣ

Ｄタンパク質を得ることができるように、エンテロキナーゼ認識部位によってＦｃ領域をＺｍａｘ１／ＨＢＭ　ＥＣＤから分離する。この構築物のために使用したベクターは、アデノ主要後期プロモーターがｔｅｔオペレーター（Ｇｏｓｓｅｎら、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９、５５４７～５１）の６つの反復に置換されたｐＨＴｏｐ（ｐＥＤの誘導体）（Ｋａｕｆｍａｎら、１９９１、Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、１９、４４８５～９０）であった。このベクターは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ｄｈｆｒ）遺伝子を含み、細胞株ＣＨＯ／Ａ２（下記の説明を参照のこと）に移入された場合に非常に有効に機能する。高発現クローンを、高メトトレキセート（ＭＴＸ）濃度で生存する細胞の単離によって選択することができる。

【０３３３】

ＣＨＯ発現ベクターｐＨＴＯＰ－Ｆｃを、ＳａｌＩおよびＮｏｔＩで消化した。介在配列をアクリルアミドゲルスライスからの電気溶出によって残りのベクターから精製した。ＳａｌＩは、ｐＨＴＯＰ－Ｆｃ中の内因性ミツバチメリチンシグナル配列を５’で切断し、ＮｏｔＩは、コード配列ＩｇＧ１－Ｆｃの５’のみを切断する。得られたＳａｌＩ－ＮｏｔＩ　ｐＨＴＯＰ－Ｆｃベクターは除去されたシグナル配列を有し、ＮｏｔＩクローニング部位は、ＩｇＧ－Ｆｃと５’融合の影響を受けやすい。ｐＣＭＶＳＰＯＲＴ６中の全長Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）およびｐＣＭＶＳＰＯＲＴ６中の全長ＨＢＭを、それぞれＸｍａ１（シグナル配列をコードするＯＲＦ領域内で切断する）およびＢａｍＨＩ（ＯＲＦの内部を切断する）で消化して、Ｚｍａｘ１およびＨＢＭの２２８６ｂｐの５’フラグメントを作製した。ＨＢＭ由来のＺｍａｘ１を区別する変異は、このフラグメント上に存在する。個別に、Ｚｍａｘ１　ＤＮＡを、ＢａｍＨＩおよびＳａｃＩで消化して、Ｚｍａｘ１およびＨＢＭ遺伝子に共通の１８００ｂｐの３’フラグメントを単離した。まとめると、配列「ＳＰＡＨＳＳ」（配列番号６９８）のＫｙｔｅ－Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅプロットから末端までを評価したところ、２つのフラグメントは、ＨＢＭおよびＺｍａｘ１細胞外ドメインのコード配列、より少ないシグナル配列の最初の６個のアミノ酸のコード配列、および細胞外ドメインの末端前の最後の１８個のアミノ酸で構成される。

【０３３４】

合成二重鎖を、開始物質であるメチオニンおよびＫｏｚａｋ配列を含む天然のＸｍａｌ部位の５’Ｚｍａｘ１／ＨＢＭシグナル配列のコード配列を再生するようにデザインした。この二本鎖を、ｐＨＴＯＰ－Ｆｃベクターに上記の遺伝子フラグメントを適合させるための末端に適合させるためのＳａｌＩ（５’）およびＸｍａＩ（３’）付着末端を含むようにデザインした。この合成二重鎖を、以下の２つの部分的相補オリゴヌクレオチドから構築した。

５’－ＴＣＧＡＣＣＡＣＣＡＴＧＧＡＧＧＣＡＧＣＧＣＣＧＣ－３’（配列番号６９９）

３’－ＧＧＴＧＧＴＡＣＣＴＣＣＧＴＣＧＣＧＧＣＧＧＧＣＣ－５’（配列番号７００）

第２の合成二重鎖を、配列「．．．ＳＰＡＨＳＳ」中のセリンの後ろの細胞外ドメインの評価した末端に対して天然のＳａｃＩ部位由来の３’コード配列を再生し、下流ＩｇＧ－Ｆｃにインフレームで融合するようにクローニング部位をコードするようにデザインした。この二重鎖を、ｐＨＴＯＰ－Ｆｃベクターに上記遺伝子フラグメントを適合するためにＳｚｃＩ（５’）およびＮｏｔＩ（３’）付着末端を含むようにデザインした。この合成二重鎖を、以下の配列の２つの部分的相補オリゴヌクレオチドから構築した。

５’－ＣＡＴＧＴＧＴＧＡＡＡＴＣＡＣＣＡＡＧＣＣＧＣＣＣＴＣＡＧＡＣＧＡＣＡＧＣＣＣＧＧＣＣＣＡＣＡＧ　ＣＡＧＴＧＧＣ－３’（配列番号７０１）

３’－ＴＣＧＡＧＴＡＣＡＣＡＣＴＴＴＡＧＴＧＧＴＴＣＧＧＣＧＧＧＡＧＴＣＴＧＣＴＧＴＣ　ＧＧＧＣＣＧＧＧＴ　ＧＴＣＧＴＣＡＣＣＧＣＣＧＧ－５’（配列番号７０２）

【０３３５】

フラグメント、合成二重鎖、およびベクターを、１つの反応で共にライゲートした。Ｚ

ｍａｘ１（ＬＲＰ５）１およびＨＢＭについて個別に反応させた。ライゲーション混合物を使用して、エレクトロコンピテント大腸菌ＤＨ１０Ｂ細胞を形質転換し、得られたコロニーを、プローブとして共通のＳａｃＩ－ＢａｍＨＩ３’フラグメントを使用した放射性コロニーハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。挿入されたＺｍａｘ１またはＨＢＭフラグメントを含むプラスミドを含むコロニーを同定し、プラスミドを複数の候補から単離し、これらの配列を、ＤＮＡ配列決定によって検証した。次いで、検証した構築物を、ＣＨＯ細胞のトランスフェクションに使用した。

【０３３６】

１９．２．１　ＣＨＯ安定性細胞株の確立

ＣＨＯ／Ａ２細胞株は、Ｔｅｔリプレッサーとヘルペスウイルスｖｐ１６転写ドメイン（Ｇｏｓｓｅｎら）との間への転写アクチベーター（ｔＴＡ）（融合タンパク質）の安定な組み込みによってＣＨＯ　ＤＵＫＸＢ１１（Ｕｒｌａｕｂら、１９８０、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７７、４２１６～２０）に由来する。細胞外ＨＢＭ－１．ＦｃおよびＺｍａｘ１．Ｆｃを発現するＣＨＯ細胞株を、ＣＨＯ／Ａ２細胞へのｐＨＴｏｐＨＢＭ－１．Ｆｃのトランスフェクション、およびＣＨＯ／Ａ２細胞へのｐＨＴｏｐＺｍａｘ１．Ｆｃのトランスフェクション（リポフェクションを使用）によって確立した。０．０２μＭメトトレキセート中での細胞培養によって使用し、クローンを選択した。その後クローンを、メトトレキセートの最終濃度０．５μＭまで段階的に増幅させた。

【０３３７】

１９．２．２　ＣＨＯ安定性細胞株のスクリーニング

種々の技術によって複数のクローンをスクリーニングした。クローンを、（マウス）抗ヒトＩｇＧ．Ｆｃ西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）抗体を使用したウェスタンブロットアッセイによってスクリーニングした。同一のクローンを、６時間のパルスまたは１５分間のパルスによって^{35}Ｓ－Ｍｅｔ／Ｃｙｓで代謝標識し、その後放射性標識Ｍｅｔ／Ｃｙｓを含まない培地中で１時間、４時間、または２４時間続けた。馴化培地および細胞抽出物から得たタンパク質に対して免疫沈降を行った。次いで、精製し、当分野で公知のＮ末端配列決定を使用してタンパク質の配列決定を行った。

【０３３８】

１９．２．３　融合タンパク質の精製

Ｚｍａｘ１－ＩｇＧまたはＨＢＭ－ＩｇＧ融合タンパク質を、馴化培地またはＣＨＯ安定性細胞の細胞抽出物から精製することができる。融合タンパク質を、プロテインＡへの親和性結合（例えば、プロテインＡ被覆ビーズまたはカラムを使用）によって単離する。したがって、その後ＩｇＧ－ＦＣドメインを、エンテロキナーゼ消化によってＺｍａｘ／ＨＢＭ１　ＥＣＤタンパク質から切断することができる。

【０３３９】

１９．２．４　細胞株およびタンパク質の潜在的用途

リガンドハンティング、抗体の作製、結晶構造の決定、および競合的結合アッセイで使用するための精製タンパク質の作製に安定な細胞株を使用することができる。

当分野で公知の種々の方法を使用して、単離タンパク質を精製することができる（Ｃｏｌｉｇａｎら、「現代のタンパク質科学プロトコール」、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、１９９５）。例えば、凍結細胞を解凍し、緩衝液に再懸濁し、小体積のマイクロフリューダイザー（モデルＭ－１１０Ｓ、Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｏｒｐ．、Ｎｅｗｔｏｎ、ＭＡ）に数回通して破壊することができる。得られたホモジネートを遠心分離して透明な上清（粗抽出物）を獲得し、濾過後、粗抽出物をカラムで分画する。画分を、OD_{280}ｎｍでの吸光度によってモニターし、ピーク画分を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析することができる。

【０３４０】

精製タンパク質調製物の濃度を、アミノ酸含有量から計算した分子吸光係数を使用して分光学的に定量する（Ｐｅｒｋｉｎｓ、１９８６、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１５

７、１６９～１８０）。タンパク質濃度を、標準としてウシ血清アルブミンを使用したＢｒａｄｆｏｒｄ、１９７６、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、７２、２４８～５４およびＬｏｗｒｙら、１９５１、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、１９３、２６５～２７５の方法によって測定する。

【０３４１】

種々の濃度のＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲルを、ＢｉｏＲａｄ（Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）から購入し、クーマシーブルーで染色した。分子量マーカーには、ウサギ骨格筋ミオシン（２００ｋＤａ）、大腸菌　βガラクトシダーゼ（１１６ｋＤａ）、ウサギ筋肉ホスホリラーゼＢ（９７．４ｋＤａ）、ウシ血清アルブミン（６６．２ｋＤａ）、オボアルブミン（４５ｋＤａ）、ウシ炭酸脱水素酵素（３１ｋＤａ）、ダイズトリプシンインヒビター（２１．５ｋＤａ）、卵白リゾチーム（１４．４ｋＤａ）、およびウシアプロチニン（６．５ｋＤａ）を含み得る。

【０３４２】

一旦十分量の所望のタンパク質が得られると、種々の目的で使用することができる。典型的な用途は、結合に特異的な抗体の産生である。これらの抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってよく、当分野で周知のin vitroまたはin vivo技術によって産生することができる。記載のように同定および単離した任意のペプチドのエピトープに対するモノクローナル抗体を、マウスハイブリドーマから調製することができる（Ｋｏｈｌｅｒ、１９７５、Ｎａｔｕｒｅ、２５６、４９５）。まとめると、２週間にわたりマウスに数μｇのＨＢＭタンパク質を接種する。次いで、マウスを屠殺する。次いで、抗体を産生した細胞を、マウスの脾臓から取り出す。脾細胞を、ポリエチレングリコールを使用してマウス骨髄腫細胞と融合する。首尾よく融合した細胞を、マイクロタイタープレート中で希釈し、培養物を成長させつづける。ウェルあたりの抗体の量を、ＥＬＩＳＡなどの免疫アッセイ法（Ｅｎｇｖａｌｌ、１９８０、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．、７０、４１９）によって測定する。抗体を産生するクローンを拡大し、さらに増殖させてＨＢＭ抗体を産生することができる。他の適切な技術は、リンパ球の抗原ポリペプチドへのin vitro曝露またはファージまたは類似のベクター中での抗体ライブラリーの選択を含む。Ｈｕｓｅら、１９８９、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４６、１２７５～８１を参照のこと。抗体産生に関するさらなる情報については、Ｄａｖｉｓら、「基本的分子生物学法」、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、ＮＹ、Ｓｅｃｔｉｏｎ、２１～２、１９８９を参照のこと。

【０３４３】

精製または単離タンパク質のさらなる使用には、Ｘ線結晶学、および結合アッセイの使用ならびに以下にさらに詳述した使用が含まれる。

【０３４４】

１９．３　Ｚｍａｘ１、ＬＲＰ６、および変異抗体

ヒトＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）（配列番号３）およびＬＲＰ６（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＦ０７４２６４）の両方に対するポリクローナル抗体を開発した。ＨＢＭおよびＨＢＭ様タンパク質およびポリペプチドに対する抗体を、同様に調製することができる。Ｚｍａｘ１アミノ酸配列由来のペプチドを、５つの目的に基づいた免疫原として選択した。１）Ｚｍａｘ１とＬＲＰ６アミノ酸配列との間の相違を最大にすること（７１％アミノ酸同一性）。図２７を参照のこと。配列比較のために、典型的には、１つの配列を基準配列として使用し、これに対して試験配列と比較する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列および基準配列をコンピュータに入力し、その後座標を指定し、必要に応じて配列アルゴリズムプログラムのパラメータを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定したプログラムパラメータに基づいて基準配列と比較した試験配列の配列同一性％を計算する。２）配列アラインメントおよび類似性の検索によって他の公知の遺伝子との潜在的な交差反応性を最小にすること。例えば、Ｓｍｉｔｈら、１９８１、Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．、２、４８２の局所的相同性アルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎら、１９７０、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、４８、４４３のホモロジーアラインメントアルゴリズム、Ｐｅａｓｏｎら、１９８８、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ

、８５、２４４４の類似性の検索、これらのアルゴリズムおよびＷｉｓｃｏｎｓｉｎ ｇｅｎｅｔｉｃｓソフトウェアパッケージ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、５８５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒ．Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）に含まれるプログラム中の他のアルゴリズム、または目視検査によってコンピュータ化された実施による比較のための最適な配列アラインメントを行うことができる（一般に、Ａｕｓｕｂｅｌら、「現代の分子生物学プロトコール」、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、１９９７を参照のこと）。配列同一性％および配列類似性％の決定に適切なアルゴリズムの別の例は、Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９０、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２１５、４０３～１０に記載のＢＬＡＳＴアルゴリズムである。ＢＬＡＳＴ分析実施用ソフトウェアは、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎから公的に利用可能である。３）Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓソフトウェアパッケージ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、５８５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒ．Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩに含まれるソフトウェアプログラムを使用したペプチド構造タンパク質分析によって可能な限り決定された最も高い抗原性指標を有するペプチドの獲得。４）遺伝子ファミリー内の相同性の高いドメイン（例えば、ＥＧＦ様ドメインおよびＬＤＬ受容体反復）と比較したペプチドの位置および遺伝子の細胞外および細胞質領域と比較した位置。５）ヒトＺｍａｘ１特異的抗体について、ヒトアミノ酸配列（配列番号３）をマウスＺｍａｘ１配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＦ０６４９８４）と比較し、２つの種の間の配列類似性の最小化に加えて上記の基準に基づいてペプチドを選択した（図２６を参照のこと）。

【０３４５】

上記の同一の基準を使用して、ＬＲＰ６特異的ペプチドを、ポリクローナル抗体産生のために選択した。表１１は、選択したアミノ酸配列、ヒト配列とマウス配列との間のペプチド内のアミノ酸の相違を列挙している。ペプチド合成およびその後のニュージーランド白ウサギでのポリクローナル抗体産生のために全てのペプチド配列（１２～１８アミノ酸の範囲）を、Ｓｉｇｍａ／Ｇｅｎｏｓｙｓ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）に提供した。各免疫化ウサギの血清由来のＩｇＧ画分を、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｇ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（Ａｍｅｒｓｈａｍ）を使用して単離した。これらのペプチドを使用したポリクローナル抗体の作成を、他の種（例えば、ニワトリ）で行うことができる。これは、ヒト（基準）配列とマウス／げっ歯類配列との間の類似度が高い場合にしばしば有利である。

【０３４６】

【表１１】

表１１

アミノ酸	アミノ酸	配列番号	H/M*相違	コメント
171-187	VETPRIERAGMDGSTRK	703	5	HBM多型を含む
264-278	NKRTGGKRKEILSAL	704	3	細胞外
290-301	ERQPFFHTRCEE	705	2	EGF-IIに隣接、細胞外
532-546	VDGTKRRTLLEDKLP	706	5	細胞外
901-915	DGLNDCMHNNGQCGQ	707	2	EGF-III、細胞外
1010-1021	PFVLTSLSQGQN	708	6	細胞外、ヒト特異的
1415-1429	YAGANGPFPHEYVSG	709	3	細胞質
1452-1464	ACGKSMMSSVSLM	710	5	細胞質、ヒト特異的
1556-1573	RWKASKYYLDLNSDSDPY	711	1	細胞質
888-902	SGWNECASSNGHCSH	712		LRP6特異的
1308-1321	NGDANCQDKSDEKN	713		LRP6特異的

*H/M相違－ヒト配列とマウス配列との間の相違

【０３４７】
ＬＲＰ６、ＨＢＭ、およびＬＲＰ５の変異型に対する抗体も意図される。ＬＲＰ５βプロペラ１の構造モデルの分析に基づいて（実施例にさらに詳述）、プロペラの内部領域を分析した。部位特異的変異誘発実験により、プロペラ１、特にβプロペラ１の内部領域の調整によりＨＢＭ効果を得ることができ、ストラテジーを使用してこれらの領域に特異的にエピトープを含む抗体が作製されることが確認された。野生型ＬＲＰ５受容体に対するこのような抗体は、例えば、リガンド／受容体相互作用（タンパク質－タンパク質相互作用）の変化またはＷｎｔもしくはＤｋｋ活性の調整によってＨＢＭ模倣物として役割を果たすことができる。このような抗体を、例えば、骨粗鬆症の治療薬として使用することができる。

【０３４８】
１つの好ましい抗体セットには、以下が含まれる。
【化４】

ＬＲＰ５アミノ酸	配列
208-223	KLYWADAKLSFIHRAN
277-291	ALYSPMDIQVLSQER
61-73	GLEDAAAVDFQFSKGA
234-247	EGSLTHPFALTLSG
249-264	TLYWTDWQTRSIHACN
144-156	VLFWQDLDQPRAI
194-210	IYWPNGLTIDLEEQKLY
34-47	LLLFANRRDVRLVD
75-89	GAVYWTDVSEEAIKQ
121-135	KLYWTDSETNRIEVA

類似のペプチドを使用し、ＬＲＰ６またはＨＢＭ構造およびそのプロペラ中の提案された変異に基づいて抗体を調製することができる。当業者に容易に認識されるように、実施例で考察された構造モデルに基づいて、他の抗体を容易に調製することができる。

【０３４９】
ＨＢＭ、ＬＲＰ５、ＬＲＰ６、およびＤｋｋと相互作用するこれの変異型状のドメインを標的する別の一連の抗体を調製することができる。このような抗体を、例えば、Ｄｋｋ結合の置換によってＨＢＭ模倣物として役割を果たすことができ、それにより、骨粗鬆症薬として使用することができる。抗体調製に好ましいペプチドには、以下が含まれるが、これらに限定されない。

【化５】

ＬＲＰ５アミノ酸	配列
969-993	LILPLHGLRNVKAIDYDPLDKFIYW
989-1013	KFIYWVDGRQNIKRAKDDGTQPFVL
1009-1033	QPFVLTSLSQGQNPDRQPHDLSIDI
1029-1053	LSIDIYSRTLFWTCEATNTINVHRL
10491073	NVHRLSGEAMGVVLRGDRDKPRAIV
1253-1266	CGEPPTCSPDQFAC
1278-1295	WRCDGFPECDDQSDEEGC
1316-1332	RCDGEADCQDRSDEADC
1370-1383	CEITKPPSDDSPAH

さらなるペプチドは、当業者に容易に明らかである。

【０３５０】

１９．３．１　ファージディスプレイによって開発した一本鎖Ｆｖ分子

ファージディスプレイによって一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）分子をスクリーニングするために、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）配列（配列番号３）からペプチドを選択した。ｓｃＦｖ分子をスクリーニングするために、ＬＲＰ６、ＨＢＭ、およびＨＢＭ様タンパク質の類似のペプチドを選択することができる。以下の考察するように、ＬＲＰ５についての全ての記述はまた、これらの他のタンパク質を含むことを意味する。

【０３５１】

ｓｃＦｖ分子の合成およびその後のファージディスプレイスクリーニングのために、Ｚｍａｘ１配列由来の全部で１７個のペプチドを選択した。全てのペプチド合成およびファージディスプレイ研究を、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＣａＴ）、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫで行った。上記の基準に基づいて、ペプチドを選択した。

【０３５２】

【表１２】

表１２

タンパク質ドメイン	Zmax1残基	LRP6残基	同一性%
スペーサー1（+G171V）	161-181	148-168	76%
スペーサー1（-G171V）	161-181	148-168	76%
EGF 1	301-321	288-308	76%
スペーサー2	401-421	388-408	52%
EGF 2	611-631	598-618	62%
スペーサー3	781-801	768-788	62%
EGF 3	921-941	908-928	10%
スペーサー4	1000-1021	988-1008	26%
EGF 4	1229-1249	1219-1239	76%
LDLR 1	1261-1282	1252-1272	81%
LDLR 2	1300-1320	1290-1310	57%
LDLR 3	1338-1358	1328-1348	48%
細胞質ゾル1	1418-1438	1405-1425	14%
細胞質ゾル1	1516-1536	1503-1525	52%
細胞質ゾル1	1535-1555	1524-1544	81%
細胞質ゾル1	1595-1615	1592-1613	82%
スペーサー2（交差反応）	421-441	408-428	100%

【０３５３】

多数のこれらの領域（例えば、４０１－４２１、４２１－４４１、７８１－８０１、および１２２９－１２４９）は、マウスＬＲＰ５と１００％同一であることに留意のこと（図２６を参照のこと）。したがって、これらを、マウスおよびヒト両方のタンパク質形態に対して使用することができる。Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）およびＬＲＰ６の両方を認識する抗体の作製を容易にするために、ペプチド４２１－４４１を含んでいた（図２７を参照のこと）。ＨＢＭ変異部位（Ｚｍａｘ１残基１６１～１８１）に及ぶ２つのペプチド（一方は、Ｚｍａｘ１配列を含み、他方はＨＢＭ配列を含む）を合成した。

【０３５４】

一旦ｓｃＦｖ分子が単離されると、これらを種々のヒトの正常組織および罹患組織でのＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）タンパク質発現を検出するための免疫化学試薬として使用した。Ｚｍａｘ１の細胞外ドメインのペプチド１０００－１０２１（すなわち、ＩＫＲＡＫＤＤＧＴＱＰＦＶＬＴＳＬＳＱＧＱＮ（配列番号７１４））に対する３つのファージクローンのｓｃＦｖ抗体免疫組織化学分析の詳細は、心筋、腎臓、肺、および肝臓で陽性染色を示した。前立腺癌における発現も検出された。３つの結果は、ｍＲＮＡ組織分布プロフィールおよびＬＲＰ５　ｍＲＮＡ局在化の公開された報告（Ｋｉｍら、１９９８、Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１２４、１０７２～６）と一致している。得られたファージクローンをプールから惹起し、配列決定して分子のＦｖ領域中の潜在的な変異型を同定する。一旦同定されると、インタクト且つ機能的免疫グロブリンγ（ＩｇＧ）分子の最終的なアセンブリのためのＣＯＳ細胞への同時トランスフェクションのために、可変重鎖および可変軽鎖ＤＮＡ構築物に適切なｓｃＦｖをサブクローン化することができる。細胞によって発現されたＩｇＧを、当分野で公知の特異性および反応性についてさらに特徴付けることができる。

【０３５５】

１９．３．２　モノクローナル抗体の開発

例えば、Ｂａｌｂ／ｃマウスの完全な細胞およびアデノウイルス免疫化によってＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）、ＬＲＰ６、ＨＢＭ、もしくはＨＢＭ様タンパク質／ポリペプチドに対するモノクローナル抗体を開発することができる。樹状細胞をＢａｌｂ／ｃマウスの脾臓

から単離することができ、例えば、細胞を、成長因子ＩＬ－４およびＧＭ－ＣＳＦの存在下でin vitroで拡大した。次いで、樹状細胞にＨＢＭまたはＺｍａｘ１アデノウイルス粒子を感染させることができる。次いで、Ｂａｌｂ／ｃマウスへの静脈内注射前に細胞を２４時間培養する。樹状細胞（１×１０^{6}細胞／マウス）を、３ヶ月間にわたり３～４週間ごとに２～３回注射した。

【０３５６】

あるいは、例えば、ｐｃＤＮＡ３．１発現ベクター中の精製ＨＢＭおよびＺｍａｘ　ＤＮＡを、コロイド金粒子に被覆することができる。次いで、これらの粒子を、遺伝子銃テクノロジーを使用して所望のマウスに皮下注射することができる。約５μｇ　ｃＤＮＡ／マウスを注射することができる。約３ヶ月間にわたり２週間ごとに４～６回注射する。

【０３５７】

別の選択肢は、ＨＢＭおよびＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）を過剰発現する細胞（任意の動物種であるが、Ｂａｌｂ／ｃマウス株または非特異的タンパク質に対する抗原応答の制限に関連する使用されたマウス株と同一の種が好ましい）およびその各アデノウイルスを、必要に応じて約１．５～３ヶ月間にわたり２～３週間ごとにマウスに注射することである。マウス由来の血液を、天然および変性タンパク質との反応性についてＥＬＩＳＡ（精製タンパク質またはタンパク質－融合物を使用する）、細胞ベースのＥＬＩＳＡ、免疫組織化学的染色、およびウェスタンブロッティングによって試験することができる。動物由来の血清サンプルを、Ｚｍａｘ１またはＨＢＭアデノウイルスを感染させた細胞を使用したＦＡＣＳ（蛍光標示式細胞分取器）によってスクリーニングすることができる。最も反応性の高いマウス由来の脾臓細胞（抗体産生細胞）を、骨髄腫と融合させて、ハイブリドーマ細胞を作製することができる。次いで、ハイブリドーマ由来の馴化培地を、その後のクローニングのために陽性細胞クローンについてスクリーニングする。次いで、これらのクローン化細胞を、腹水産生のためにマウスの腹腔に注射することができる。

【０３５８】

１９．３．３　ポリクローナル抗体の適用

これらのタンパク質の機能を決定し、種々の組織、細胞、または任意の生体サンプル中の発現パターンおよび発現レベルを分析するために、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）およびＬＲＰ６に指向するポリクローナル抗体を開発した。ＨＢＭおよびＨＢＭ様変異型由来の野生型形態を区別する類似の抗体を調製することができる。

【０３５９】

Ｚｍａｘ１、ＨＢＭ、ＨＢＭ様ポリペプチド、およびＬＲＰ６に対するポリクローナル抗体の使用には、以下が含まれるが、これらに限定されない。骨断面標本分析、組織分布、罹患／非罹患家族メンバーの骨生検サンプル（例えば、骨細胞消化物、骨髄間質細胞培養物の移植片）由来のタンパク質の発現の評価、一過性または安定にトランスフェクトされた細胞におけるタンパク質発現の評価、組織、血清、または体液中のタンパク質濃度の評価、リガンドハンティングおよび機能アッセイ開発のためのこれらのタンパク質の全長またはフラグメントの精製、これらのタンパク質と相互作用するリガンドまたはタンパク質の同定、ならびにＬＲＰ６、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）、ＨＢＭ、および関連変異型のシグナル伝達経路の解明。

【０３６０】

例えば、ｐｃＤＮＡ３．１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）中にＺｍａｘ１をクローン化した。これを使用して、^{35}Ｓ標識したin vitro翻訳（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）Ｚｍａｘ１を作製した。ペプチド免疫原（ＲＷＫＡＳＫＹＹＬＤＬＮＳＤＳＤＰＹ（配列番号７１１））に指向する抗体（１０μｇ／ｍｌ）３１０９および３１１０を、１０μｇ／ｍｌの特異的ペプチド（すなわち、ＲＷＫＡＳＫＹＹＬＤＬＮＳＤＳＤＰＹ（配列番号７１１））または非特異的ペプチド（すなわち、ＳＧＷＮＥＣＡＳＳＮＧＨＣＳＨ（配列番号７１２））の存在下またはペプチドの非存在下で２０μｌのin vitro翻訳産物と組み合わせ、４℃で１．５時間インキュベートした。次いで、プロテインＡＳｅｐｈａｒｏｓｅを、サンプル（網状赤血球で１．５時間予めブロックし

ている）に添加し、サンプルを、４℃で１時間震盪した。プロテインＡＳｅｐｈａｒｏｓｅを、０．５ｍｌのＰＢＳで３回洗浄した。その後結合したタンパク質を、製造者の説明書に従って、４～１２％勾配のＮｕＰＡＧＥゲル（Ｉｎｖｉｔｏｒｇｅｎ）で分離した。ゲルを、８０℃で３０分間乾燥させ、Ｋｏｄａｋ　Ｘ－ＯＭＡＴ－ＡＲフィルムに２４時間～４８時間感光した。^{35}Ｓ標識Ｚｍａｘ１免疫沈降タンパク質についてどちらの抗体と有意に競合するかについて特異的ペプチドを観察した。非特異的ペプチドとの競合は認められなかった。

【０３６１】

これらの抗体を、免疫組織化学に使用することもできる。例えば、ＨＢＭトランスジェニックマウスおよび野生型マウスを、CO_2窒息を使用して屠殺した。マウスの頭蓋冠をインタクトに除去し、柔組織を徐々に解剖した。さらなる処理および分析のために、骨を、１０％リン酸緩衝化ホルマリン中で２４時間固定した。固定後、頭蓋冠を、ＴＢＤ－２脱灰緩衝液（Ｓｈａｎｄｏｎ、Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ、ＰＡ）中で約７～８時間脱灰し、アルコールで段階的に脱水した。次いで、頭蓋冠を、ラムダ縫合および環状縫合に平行な頭頂骨の中央部分を通って矢状縫合に対して垂直に二等分し、パラフィンに埋め込んだ。４～６個の５μｍ厚の各切片に切断した。

【０３６２】

例えば、ウサギポリクローナル抗体Ｚｍａｘ１／ＨＢＭ（すなわち、抗体３１０９および３１１０）は、ＨＢＭトランスジェニックおよび野生型マウス頭蓋冠の両方でＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）を認識する。タンパク質発現の存在量およびパターンを評価するために、抗Ｚｍａｘ１または抗ＨＢＭ抗体を使用して、Ｚｍａｘ１またはＨＢＭタンパク質を検出することができる。抗体の検出可能な物質への結合（すなわち、物理的結合）によって検出を容易にすることができる。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生体発光物質、放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、Ｐ－ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ、適切な補欠分子団の例には、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが含まれ、適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンが含まれ、発光物質の例には、ルミノールが含まれ、生体発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびアクオリエンが含まれ、安定な放射性物質の例には、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓ、および^{3}Ｈが含まれる。あるいは、一次Ｚｍａｘ１ポリクローナル抗体の存在を検出する二次抗体を使用することができる。例は、全てのウサギ免疫グロブリンを認識する抗体である。検出を容易にするために、この二次抗体を上記と同一の様式で結合させることができる。コントロールは、アビジンペルオキシダーゼを含むが抗体を含まないサンプルを含む。縫合領域で間質細胞および間葉細胞の強い陽性染色が認められた。野生型マウスと比較してＨＢＭの頭蓋冠中で抗体３１０９および３１１０を含む骨膜およびいくつかの骨細胞内で、前骨芽細胞および骨芽細胞の染色が認められた。高倍率のＨＢＭトランスジェニックマウスの頭蓋冠組織の切片は、骨細胞および縫合領域内の細胞の明白な細胞膜染色を示した。

【０３６３】

当業者に容易に認識されるように、ＨＢＭ様タンパク質およびポリペプチドに対する類似の抗体を調製することができる。

【０３６４】

２０．使用方法：遺伝子治療

近年、遺伝子疾患および後天性疾患の両方の遺伝子治療分野でテクノロジーが顕著に進歩している（Ｋａｙら、１９９７、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９４、１２７４４～６）。治療目的での意図的なＤＮＡの導入と遺伝子治療を特徴付けることができる。遺伝子導入法の進歩により、種々の疾患型のための遺伝子治療プロトコールの開発が可能である。遺伝子治療はまた、新規の治療遺伝子の同定、ウイルスおよび非ウ

イルス遺伝子送達系の両方の改良、遺伝子調節のより深い理解、ならびに細胞の単離および移植の改良において最近の進歩を活用する。

【０３６５】

前の実験で、骨量増加を付与する優性変異としてＨＢＭ遺伝子を同定した。ＨＢＭタンパク質のプロペラおよび構造に関して本明細書中に記載のモデルおよびデータに基づいてさらなるＨＢＭ様遺伝子を同定可能である。この変異が優性である事実は、ＨＢＭタンパク質の発現により骨量が増加することを示す。ＨＢＭ遺伝子を保有する（したがって、ＨＢＭタンパク質を発現する）より老齢の個体は、骨粗鬆症を罹患しない。これらの個体は、ＨＢＭタンパク質で処置した個体と等価である。これらの所見は、ＨＢＭタンパク質での治療は骨粗鬆症を予防するという強力な実験結果である。骨量を上昇させるＨＢＭ遺伝子活性を、他のＨＢＭ変異型の例において「ＨＢＭ機能」または「ＨＢＭ様表現型」という。

【０３６６】

したがって、本発明によれば、ＨＢＭ機能を間葉系幹細胞に供給する方法も得られる（Ｏｎｙｉａら、１９９８、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．、１３、２０～３０；Ｋｏら、１９９６、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．、５６、４６１４～９）。このような機能の供給により、骨粗鬆症が防御される。ＨＢＭ遺伝子もしくはこの遺伝子の一部または他のＨＢＭ様遺伝子を、遺伝子が染色体外に滞在するようにベクター中に細胞を移入することができる。このような状況では、遺伝子は、染色体外の位置から細胞によって発現される。

【０３６７】

組換えおよび染色体外両方での維持のための遺伝子移入用のベクターは、当分野で公知であり、任意の適切なベクターを使用することができる。エレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈、およびウイルス形質導入などのＤＮＡを細胞に移入する方法ならびに方法を選択は、当業者の能力の範囲内である（Ｒｏｂｂｉｎｓら、「遺伝子治療プロトコール」、Ｈｕｍａｎ　Ｐｒｅｓｓ、ＮＪ、１９９７）。ＨＢＭ遺伝子（またはＨＢＭ様遺伝子）で形質転換された細胞を、骨粗鬆症および骨成長を促進する薬物治療の研究のためのモデル系として使用することができる。

【０３６８】

上記で一般的に考察されるように、ＨＢＭまたはＨＢＭ様遺伝子もしくはその生物学的に活性なフラグメントを、適用可能な場合、遺伝子治療法で使用して、間葉系幹細胞中のこのような遺伝子の発現産物の量を増加させることができる（ＨＢＭ遺伝子およびその同族産物を考察する全ての例では、ＨＢＭ様遺伝子および同族タンパク質もまた意図される）。野生型遺伝子が正常に発現する細胞でさえも、所与のＨＢＭタンパク質またはそのフラグメントの発現レベルの増加にも有用であり得る。遺伝子治療を、例えば、Ｆｒｉｅｄｍａｎ、「遺伝子疾患の治療」、Ｆｒｉｅｄｍａｎ編、Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔ　Ｐｒｅｓｓ、１０５～１２１頁、１９９１に記載の遺伝的に許容される方法にしたがって行う。

【０３６９】

発現調節エレメントに連結したＨＢＭ遺伝子のコピーを含み、且つ間葉系幹細胞内で複製することができるウイルスまたはプラスミドベクターを調製する。適切なベクターは公知であり、例えば、米国特許第５，２５２，４７９号およびＷＯ９３／０７２８２（その開示全体が本明細書中で参照することによって組み込まれる）に記載されている。次いで、ベクターを、患者の骨髄に局所的か全身に（他の部位（すなわち、血液中）に存在する任意の間葉系幹細胞に到達させるため）注射する。トランスフェクトした遺伝子が各標的細胞のゲノムに恒久的に組み込まれない場合、治療を周期的に繰り返さなければならない。

【０３７０】

当分野で公知の遺伝子導入系は、本発明の遺伝子治療方法の実施で有用であり得る。これらには、ウイルスおよび非ウイルス導入方法が含まれる。以下を含む多数のウイルスが遺伝子導入ベクターとして使用されている。ポリオーマ（すなわち、ＳＶ４０）（Ｍａｄ

ｚａｋら、１９９２、Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．、７３、１５３３～６）、アデノウイルス（Ｂｅｒｋｎｅｒ、１９９２、Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５８、３９～６１；Ｂｅｒｋｎｅｒら、１９８８、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、６、６１６～６２９；Ｇｏｒｚｉｇｌｉａら、１９９２、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、６６、４４０７～１２；Ｑｕａｎｔｉｎら、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９、２５８１～２５８４；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら、１９９２、Ｃｅｌｌ、６８、１４３～１５５；Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎら、１９９２、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、２０、２２３３～３９；Ｓｔｒａｔｆｏｒｄ－Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔら、１９９０、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．、１、２４１～２５６）、ワクシニアウイルス（Ｍａｃｋｅｔｔら、１９９２、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２４、４９５～４９９）、アデノ随伴ウイルス（Ｍｕｚｙｃｚｋａ、１９９２、Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５８、９１～１２３；Ｏｈｉら、１９９０、Ｇｅｎｅ、８９、２７９～２８２）、ＨＳＶおよびＥＢＶを含むヘルペスウイルス（Ｍａｒｇｏｌｓｋｅｅ、１９９２、Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５８、６７～９０；Ｊｏｈｎｓｏｎら、１９９２、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、６６、２９５２～６５；Ｆｉｎｋら、１９９２、Ｈｕｍｌ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．、３、１１～９；Ｂｒｅａｋｆｉｅｌｄら、１９８７、Ｍｏｌ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．、１、３３７～３７１；Ｆｒｅｓｓｅら、１９９０、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、４０、２１８９～２１９９）、および鳥類のレトロウイルス（Ｂｒａｎｄｙｏｐａｄｈｙａｙら、１９８４、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．、４、７４９～７５４；Ｐｅｔｒｏｐｏｕｐｌｏｓら、１９９２、Ｊ．Ｖｉｏｌ．、６６、３３９１～３３９７）、マウスのレトロウイルス（Ｍｉｌｌｅｒ、１９９２、Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５８、１～２４；Ｍｉｌｌｅｒら、１９８５、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．、５、４３１～４３７；Ｓｏｒｇｅら、１９８４、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．、４、１７３０～７；Ｍａｎｎら、１９８５、Ｊ．Ｖｉｏｌ．、５４、４０１～７）、およびヒト起源のレトロウイルス（Ｐａｇｅら、１９９０、Ｊ．Ｖｉｏｌ．、６４、５３７０～６；Ｂｕｃｈｓｃｈａｌｃｈｅｒら、１９９２、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、６６、２７３１～９）。ほとんどのヒト遺伝子治療プロトコールは、無能のマウスレトロウイルスに基づいている。

【０３７１】

当分野で公知の非ウイルス遺伝子導入方法には、以下が含まれる。リン酸カルシウム共沈（Ｇｒａｈａｍら、１９７３、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、５２、４５６～６７；Ｐｅｌｌｉｃｅｒら、１９８０、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２０９、１４１４～２２）などの化学的技術、機械的技術（例えば、微量注入）（Ａｎｄｅｒｓｏｎら、１９８０、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７７、５３９９～５４０３；Ｇｏｒｄｏｎら、１９８０、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７７、７３８０～４；Ｂｒｉｎｓｔｅｒら、１９８１、Ｃｅｌｌ、２７、２２３～２３１；Ｃｏｎｓｔａｎｔｉｎｉら、１９８１、Ｎａｔｕｒｅ、２９４、９２～９４）、リポソームを介した膜融合媒介導入（Ｆｅｌｇｎｅｒら、１９８７、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８４、７４１３～７；Ｗａｎｇら、１９８９、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、２８、９５０８～１４；Ｋａｎｅｄａら、１９８９、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６４、１２１２６～９；Ｓｔｅｗｅａｒｔら、１９９２、Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．、３、２６７～２７５；Ｎａｂｅｌら、１９９０、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４９、１２８５～８；Ｌｉｍら、１９９２、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ、８３、２００７～１１）、および直接ＤＮＡ取り込みおよび受容体媒介ＤＮＡ導入（Ｗｏｌｆｆら、１９９０、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４７、１４６５～８；Ｗｕら、１９９１、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、１１、４７４～８５；Ｚｅｎｋｅら、１９９０、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８７、３６５５～９；Ｗｕら、１９８９、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６４、１６９８５～７；Ｗｏｌｆｆら、１９９１、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、１１、４７４～４５；Ｗａｇｎｅｒら、１９９０；Ｗａｇｎｅｒら、１９９１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８８、４２５５～９；Ｃｏｔｔｅｎら、１９９０、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、

８７、４０３３～７；Ｃｕｒｉｅｌら、１９９１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８８、８８５０～４；Ｃｕｒｉｅｌら、１９９１、Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．、３、１４７～５４）。ウイルス媒介遺伝子導入を、周囲の細胞ではなく間葉系幹細胞に対する直接in vivoベクターと組み合わせることができる（Ｒｏｍａｎｏら、１９９８、Ｉｎ Ｖｉｖｏ、１２、５９～６７；Ｇｏｎｅｚら、１９９８、Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、７、１９１３～９）。あるいは、レトロウイルスベクター産生細胞株を、骨髄に注射することができる（Ｃｕｌｖｅｒら、１９９２、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５６、１５５０～２）。産生細胞の注射により、ベクター粒子の供給源が継続的に得られる。この技術は、手術不可能な脳腫瘍を罹患したヒトでの使用で許可されている。

【０３７２】

生物学的および物理学的な遺伝子導入方法を組み合わせるアプローチでは、任意のサイズのプラスミドＤＮＡをアデノウイルスヘキソンタンパク質に特異的なポリリジン結合抗体と組み合わせ、得られた複合体をアデノウイルスベクターに結合する。３分子複合体を使用して、細胞を感染させる。結合したＤＮＡが損傷する前に、アデノウイルスベクターを有効に結合し、内在化し、エンドソームを分解することが可能である。

【０３７３】

リポソーム／ＤＮＡ複合体は、直接in vivo遺伝子導入を媒介することができることが示されている。標準的なリポソーム調製では遺伝子導入過程は非特異的であり、例えば直接In situ投与後に局在化in vivo取り込みおよび発現が報告されている（Ｎａｂｅｌ、Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．、３、３９９～４１０、１９９２）。

【０３７４】

２１．使用方法：研究ツールとしておよび医薬品開発のための形質転換宿主およびトランスジェニック動物

モデル系として使用したＨＢＭ、ＨＢＭ様、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）、またはＬＲＰ６遺伝子を保有する細胞および動物は、治療薬としての潜在性を有する物質の研究および試験のための価値のある研究ツールである（Ｏｎｙｉａら、１９９８、Ｊ．Ｂｏｎｅ Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．、１３、２０～３０；Ｂｒｏｄｅｒら、１９９７、Ｂｏｎｅ、２１、２２５～３５）。これらのうちの１つの考察は、その他（例えば、ＨＢＭの考察はＨＢＭ様変異体を含むことを意味する）などを含むことを意味する。

【０３７５】

この目的のための細胞は、典型的には、培養された間葉系幹細胞である。これらの細胞を、体細胞または生殖系列ＨＢＭ遺伝子を有する個体から単離することができる。あるいは、上記のように、細胞株を、ＨＢＭまたはＨＢＭ様遺伝子を保有するように操作することができる。試験分質を細胞に適用した後、細胞の形質転換された表現型を決定する。形質転換細胞の任意の形質（例えば、培養での骨基質の形成（Ｂｒｏｄｅｒら、１９９７、Ｂｏｎｅ、２１、２２５～２３５）、機械的性質（Ｋｉｚｅｒら、１９９７、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９４、１０１３～８）、マーカー遺伝子の発現、および推定治療薬の適用に対する応答を含む）を評価することができる。

【０３７６】

トランスジェニック修飾動物および細胞株を使用して、治療薬を試験することができる。トランスジェニック修飾には、例えば、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子、ＬＲＰ６、ＨＢＭ遺伝子、またはＨＢＭ様遺伝子、および破壊した相同遺伝子の挿入が含まれる。あるいは、動物のＺｍａｘ１、ＬＲＰ６、ＨＢＭ、および／またはＨＢＭ様遺伝子を、従来技術を使用した他の遺伝子変化の挿入または欠失変異によって破壊することができる（例えば、Ｃａｐｅｃｃｈｉ、１９８９、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４４、１２８８；Ｖａｌａｎｃｕｉｓら、１９９１、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．、１１、１４０２；Ｈａｓｔｙら、１９９１、Ｎａｔｕｒｅ、３５０、２４３；Ｓｈｉｎｋａｉら、Ｃｅｌｌ、６８、８５５、１９９２；Ｍｏｍｂａｅｒｔｓら、Ｃｅｌｌ、６８、８６９、１９９２；Ｐｈｉｌｐｏｔｔら、１９９２、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５６、１４４８；Ｓｎｏｕｗａｅｒｔら、１９９２、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５７、１０８３；Ｄｏｎｅｈｏｗｅｒら、１９９２、Ｎａｔｕｒｅ

、３５６、２１５に記載の技術など）。試験物質を動物に投与した後、骨成長を評価しなければならない。試験物質により骨成長が調整（例えば、増強）された場合、試験物質は候補治療薬である。これらの動物モデルにより、潜在的な治療生成物の非常に重要な送達体が得られる。

【０３７７】

本発明はまた、内因性遺伝子の発現が活性化され、さらに増幅することができ、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）またはＨＢＭタンパク質をコードする外因性ＤＮＡのin vitroでの操作およびトランスフェクションが必要ない動物および細胞株を提供する。これらの方法は、例えば、ＰＣＴ出願ＷＯ９４／１２６５０および米国特許第５，９６８，５０２号（その両方全体が本明細書中で参照することによって組み込まれる）に記載されている。さらに、本発明は、In situ相同組換え、非相同組換え、または非正統的組換え方法によって内因性活性化または過剰発現を行う方法を含む。これらの方法は、例えば、ＰＣＴ出願ＷＯ９９／１５６５９号およびＷＯ００／４９１６２号（その全体が本明細書中で参照することによって組み込まれる）に記載されている。

【０３７８】

２１．１　トランスジェニックおよび遺伝子標的動物の作製

本発明は、ヒトＨＢＭまたはＨＢＭ様表現型を再現する遺伝子修飾動物を提供する。使用したアプローチは、ゲノムに組み込まれたヒトＧ→Ｔヌクレオチド置換を有し、ヒトＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）または骨量が変化した表現型を有する変異型を発現するトランスジェニックおよび遺伝子標的動物の作製を含む。これらのアプローチを、任意の遺伝子（ＨＢＭ、ＨＢＭ様、ＬＲＰ５、およびＬＲＰ６系など）と共に使用することができる。

【０３７９】

２１．１．１　ＨＢＭ多型を過剰発現するトランスジェニックマウス

ヒトＨＢＭ　ｃＤＮＡの発現を駆動するためにＣＭＶｂＡｃｔｉｎまたはＩ型コラーゲンプロモーターのいずれかを使用したプラスミド構築物を調製した。哺乳動物発現に最も一般的に使用されているプロモーターは、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）、サルウイルス４０（ＳＶ４０）、およびＥＦ－１ａ（ヒト伸長因子１ａサブユニット）に由来する。ＣＭＶは、ヒトサイトメガロウイルス前初期ウイルスプロモーター由来である。ＣＭＶは、ほとんどの細胞でＲＳＶまたはＳＶ４０よりも強力なプロモーターである。ＲＳＶプロモーターは、鳥類ウイルスに由来し、鳥類細胞株で強力なプロモーターである傾向がある。ＳＶ４０プロモーターは、巨大Ｔ抗原（ＣＯＳ－１など）を保有する細胞株中で十分に発現する。これらの細胞株では、多数のコピー数を得るためにプラスミドを複製する。ＥＦ－１は、組換えタンパク質発現のためにより広範に使用され始めている。ＥＦ－１は、ヒト伸長因子１ａサブユニット（哺乳動物細胞株で高度で発現し、保存される遺伝子）由来のプロモーターである。

【０３８０】

キメラＣＭＶｂＡｃｔｉｎプロモーターは、骨を含むトランスジェニックマウスにおける遺伝子発現を遍在して産生させることが示されている強力なプロモーターである。このプロモーターを、内因性マウスＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子の報告された広範な発現と一致する様式でＨＢＭの発現を駆動するように選択した。ＨＢＭ表現型は骨で認められるが、ＨＢＭ遺伝子は、他の組織でも直接または間接的な効果を有し得る。したがって、当業者に公知なように、他の強力な遍在性プロモーターを使用することができる。

【０３８１】

Ｉ型コラーゲンプロモーターにより、発現が主として骨に限定される組織制限遺伝子発現が得られる。骨でＨＢＭを発現することができる他の骨特異的プロモーターも利用可能である。例えば、骨芽細胞の増殖に関連するプロモーターには、ヒストン、Ｉ型コラーゲン、ＴＧＦβ１、ＭＳＸ２、ｃｆｏｓ／ｃＪｕｎ、およびＣｂｆａ１が含まれ、これらを使用することができる。アルカリホスファターゼ、ＭＧＰ、Ｃｂｆａ１、Ｆｒａ／Ｊｕｎ、およびＤｌ×５を含む骨基質成熟に関連するプロモーターを使用することができる。オステオカルシン、オステオポンチン、骨シアロタンパク質、およびコラゲナーゼなどの骨

鉱化に関連するプロモーターを使用することもできる。選択したプロモーターを、たとえば、当業者に公知の組織発現および制御可能な調節の程度などによって決定する。例えば、Ｉ型コラーゲンプロモーターを、ＨＢＭが、骨中でのＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）発現の内因性パターンに類似の一過性、空間的、および骨細胞特異的パターンで骨中で確実に発現するように選択した。

【０３８２】

２１．１．２　野生型（ＬＲＰ５）Ｚｍａｘ１遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウス

Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）の発現を駆動するＣＭＶｂＡｃｔｉｎおよびＩ型コラーゲンプロモーターを使用して、プラスミド構築物を調製した。これらの動物は、ＨＢＭ、ＨＢＭ様、およびＬＲＰ６トランスジェニックマウス（これらの全ては、ＬＲＰ５／Ｚｍａｘ１を考察する場合に意図される）のコントロール動物モデルとしての役割を果たすことができる。さらなるコントロールには、遺伝的背景が同一の非トランスジェニック同腹子および野生型動物が含まれる。これらの動物の調製方法は、ＨＢＭ多型を過剰発現するマウスについて考察したものに類似する。

【０３８３】

２１．１．３　ＬＲＰ６遺伝子標的化ノックアウトマウス

ＬＲＰ６遺伝子の最初のイントロンに挿入した遺伝子トラップベクターを保有するＯｍｎｉｂａｎｋ胚性幹（ＥＳ）細胞を使用してＬＲＰ６ノックアウトマウスを作製した。挿入断片の位置を、挿入部位の３’で宿主遺伝子転写物にスプライスした５’遺伝子トラップベクター配列から構成される融合編者物の逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）によって作製したＯｍｎｉｂａｎｋ配列タグ（ＯＳＴ）によってＬＲＰ６遺伝子であることを決定した。遺伝子トラップベクターは、ＬＲＰ転写を防止するＬＲＰ６エクソン１の遺伝子トラップのＩＲＥＳ－ＬａｃＺ－ＰｏｌｙＡエレメントへの強制的なスプライシングによってマウスＬＲＰ６遺伝子を機能的にノックアウトにする。

【０３８４】

ＥＳ細胞を使用し、Ｃ５７ＢＬ／６アルビノ宿主胚盤胞の注射およびその後の偽妊娠雌への導入によってキメラマウスをＯＳＴ３８８０８と同定し、成長させた。生殖系列キメラを、１２９ＳｖＥＶＢｒｄ株マウスに戻し交配して近交系１２９８ＳｖＥｖＢｒｄ遺伝的背景においてＬＲＰ６のノックアウト対立遺伝子を維持した。ＬＲＰ６－ＫＯ対立遺伝子の生殖系列伝達を、遺伝子トラップ特異的配列のＰＣＲ増幅によって同定した。ヘテロ接合性ＬＲＰ６－ＫＯ交配対を、継続的な交配に使用した。ｗｔおよびＬＲＰ６－ＫＯ子孫の遺伝子型を、テールＤＮＡ　ＰＣＲによって決定する。

【０３８５】

９週齢の雌ヘテロ接合性ノックアウトマウスの骨密度の測定により、ｕＣＴで測定したところ、骨体積、骨梁数、および骨梁の厚さが顕著に（ｐ＜０．０５）減少することを示した。これらの結果は、ＬＲＰ６もまた骨密度調整に関与し、治療法および薬物開発の標的であるという仮説と一致する。したがって、ＬＲＰ６トランスジェニック動物およびＬＲＰ６の骨調整変異型を発現するトランスジェニック動物は、本発明の範囲内であることが意図される。

【０３８６】

２１．１．４　ＨＢＭ多型を発現する遺伝子ターゲティングマウス

ＨＢＭもしくはＨＢＭ様ノックイン（ＫＩ）対立遺伝子ならびにＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）ノックアウト（ＫＯ）対立遺伝子を含む動物の作製に使用することができる遺伝子ターゲティング構築物を調製した。遺伝子ターゲティング構築物は、エクソン３中にＨＢＭ多型を含み、転写終結配列に連結し、ｌｏｘＰ部位に隣接するネオマイシン選択カセットを含んでいた。マウスＺｍａｘ１のＨＢＭ多型により、マウスＬＲＰ５ホモログ（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＡＦ０６４９８４）のアミノ酸の１７０位でグリシンがバリンに変化する。相同組換えを使用して、構築物をマウスゲノムに安定に移入する。転写終結配列が修飾Ｚｍａｘ１対立遺伝子の転写を完全に遮断するように機能する場合、機能的Ｚ

ｍａｘ１ノックアウト対立遺伝子が作製される。これにより、Ｚｍａｘ１遺伝子のホモ接合性ノックアウト動物の産生が容易になる。

【０３８７】

ノックイン対立遺伝子を作製するために、Ｃｒｅリコンビナーゼを使用して、修飾エクソン３の後ろで遊離するネオマイシン選択カセットおよびｌｏｘＰ部位の１コピーを切り出すことができる。Ｃｒｅを１細胞受精胚に移入してＨＢＭの遍在発現を容易にするか、動物をトランスジェニックマウスと交配して骨特異的ＨＢＭ発現を得ることができる。ＨＢＭノックイン対立遺伝子のためにホモ接合性動物を作製することができる。あるいは、当分野で公知のように、ホモ接合性動物由来の核を調製した（例えば、除核した）卵母細胞に導入する核導入技術によって動物を作製することができる。例えば、Ｃａｍｐｂｅｌｌら、Ｎａｔｕｒｅ、３８０、６４～８８、１９９６を参照のこと。さらなるノックアウトマウス作製方法には、ＡＴＧ開始コドンが欠失または変異された相同組換えベクターの操作、ベクターのフレームシフト変異操作、プロモーター領域の極めて重要な部分の欠失操作、および／または遺伝子の極めて重要な領域を欠失させるベクターの操作が含まれる。

【０３８８】

ＬＲＰ５、ＬＲＰ６、およびＨＢＭマウスで使用される方法を、同様にこれらの遺伝子の他の変異型に使用することができる。

【０３８９】

２１．２　材料と方法

２１．２．１　Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）プラスミドＺｍａｘ１ＧＩ＿３ＡＳの構築

全長Ｚｍａｘ１　ｃＤＮＡ構築物を、Ｌｉｆｅ　ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのｐＣＭＶＳＰＯＲＴ６．０ベクター（Ｇａｔｅｗａｙクローニング系の一部）のＸｂａＩ－ＮｏｔＩ部位への操作によって、Ｚｍａｘ１ＧＩ＿３ＡＳを作製した。３’末端上のＥｃｏＲＶまたはＥｃｏＲＩのいずれかと共に５’側上のＨｉｎｄＩＩＩまたはＸｂａＩのいずれかでの消化によって挿入断片（５，２７８ｂｐ）をベクターから放出することができる。当業者に自明のＬＲＰ６およびＨＢＭ様核酸のために類似の構築物を調製することができ、これは十分にこの節での考察で意図される。

【０３９０】

Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）構築物を、４つの独立した部分的クローンから作製した。これらのクローンを、Ｚｍａｘ１特異的プライミングｃＤＮＡライブラリーから単離した。内部調査配列決定クローン組中でＬ２３６Ｂ＿Ｐ００４９Ｅ０８として切り出した部分的Ｚｍａｘ１　ｃＤＮＡクローンを、オリゴｄＴプライミングＨｅＬａ細胞ｃＤＮＡライブラリーから単離した。このクローンを、５プライミング末端で短縮した。全長ｃＤＮＡの作製に必要なより多数の５プライミング含有フラグメントを単離するために、Ｃｌｏｎｔｅｃｈヒト肝臓ポリＡ　ｍＲＮＡ（カタログ番号６５１０－１、ロット番号９０６００３２）、およびｃＤＮＡ合成用のＬｉｆｅ　ＴｅｃｈｎｏｌｏｔｉｅｓのＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ（登録商標）プラスミド系およびプラスミドクローニングキット（カタログ番号１８２４８－０１３）からＺｍａｘ１遺伝子特異的ｃＤＮＡライブラリーを作製した。このライブラリーを、Ｌ４０１と呼んだ。以下のように修正した製造者のプロトコールを行った。１）第１および第２の鎖合成反応では、ＤＥＰＣ処理水をα－^{32}Ｐ－ｄＣＴＰに代えた。２）逆転写物を、約１ｋｂ間隔でＺｍａｘ１遺伝子を特異的に選択するオリゴヌクレオチドを使用してプライミングした。これらの配列を、プログラムＢＬＡＳＴを使用して公的なデータベースとチェックしてＺｍａｘ１特異性を確認した。３）２つの個別の逆転写反応を行った。第１の反応（Ａ）を、以下の用のＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）のより３’領域にアニーリングするオリゴヌクレオチドを使用してプライミングした。

【化６】

47114: 5'-CGTACGTAAAGCGGCCGCTTGGCAATACAGATGTGGGA-3' (配列番号715)

47116: 5'-CGTACGTAAAGCGGCCGCAGTAGCTCCTCTCGGTGGC-3' (配列番号716)

47118: 5'-CGTACGTAAAGCGGCCGCGCTCATCATGGACTTTCCG-3' (配列番号717)

47120: 5'-CGTACGTAAAGCGGCCGCGCACTGCTGTTTGATGAGG-3' (配列番号718)

先に言及した４つのオリゴヌクレオチドならびに以下を使用した第２の反応（Ｂ）。

【化７】

47108: 5'-CGTACGTAAAGCGGCCGCGAGTGTGGAAGAAAGGCTGC-3' (配列番号719)

47110: 5'-CGTACGTAAAGCGGCCGCAGTAGAGCTTCCCCTCCTGC-3' (配列番号720)

47112: 5'-CGTACGTAAAGCGGCCGCGTCCATCACGAAGTCCAGGT-3' (配列番号721)

全てのオリゴヌクレオチドは、ＮｏｔＩリンカー配列を含んでおり、０．０２μｇ／μｌの濃度で使用した。４）両方の逆転写反応由来のＳａｌＩ適合ｃＤＮＡを、１％アガロース、０．１μｇ／ｍｌ臭化エチジウム、１×ＴＡＥゲルでの電気泳動によってサイズ分画した。０．６ｋｂと８．０ｋｂとの間の臭化エチジウム染色ｃＤＮＡをゲルから切り出した。ｃＤＮＡを、製造者のプロトコールを使用した電気溶出（ＩＳＣＯ　Ｌｉｔｔｌｅ　Ｂｌｕｅ　Ｔａｎｋ　Ｅｌｅｃｔｒｏｅｌｕｔｏｒ（登録商標））によってアガロースゲルから精製した。反応ＡおよびＢ由来の精製ｃＤＮＡを、互いにプールした。５）サイズ分画ＳａｌＩ適合ｃＤＮＡを、ＮｏｔＩ－ＳａｌＩ消化ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（登録商標）（Ｓｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）にライゲートした。

【０３９１】

ライゲートしたライブラリーｃＤＮＡ（３ｍｌ）を使用して、エレクトロコンピテント大腸菌細胞（ＥｌｅｃｔｒｏＭＡＸ（登録商標）ＤＨ１０Ｂ細胞およびプロトコール、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓカタログ番号１８２９０－０１５、ＢｉｏＲａｄ　大腸菌パルサー、電圧１．８ＫＶ、３～５ｍ秒パルス）を形質転換した。形質転換した細胞を、ＬＢ－アンピシリン（１００μｇ／ｍｌ）寒天プレートにプレートし、３７℃で一晩インキュベートした。約10^6のコロニー形成単位（ｃｆｕ）を、５０，０００ｃｆｕ／１５０ｍｍプレートの密度でプレートした。細胞をＬＢ培地でプレートから洗浄して取り出し、遠心分離によって回収した。プラスミドＤＮＡを、ＱＩＡＧＥＮ　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｇｉｇａキットおよびプロトコール（カタログ番号１２１９１）を使用して２．０５μｇ／μｌの最終濃度で細胞から精製した。

【０３９２】

ライブラリースクリーニング用の２つのプローブを、テンプレートとして１００ｎｇのライブラリーＬ４０１を使用したポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって作製した。標準的なＰＣＲ技術を使用した。反応混合物は、１０ｐｍｏｌの各オリゴプライマー；０．２ｍＭの各ｄＡＴＰ、ｄＴＴＰ、ｄＣＴＰ、およびｄＧＴＰ（ＰＥ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓカタログ番号Ｎ８０８－０２６０）；１．５単位のＥｘｐａｎｄ（商標）Ｈｉｇｈ　Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ、および１×ＰＣＲ反応緩衝液（Ｒｏｃｈｅ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ、カタログ番号７３２－６４１；１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１．５ｍＭ　$MgCl_2$、５０ｍＭ　ＫＣｌ（ｐＨ８．３））を含んでいた。混合物を、９９℃で１分間インキュベートし、その後９６℃で１５秒間、５０℃で３０秒間、７２℃で１分間を３０サイクルおよび７２℃で７分間最終インキュベートした（ＭＪＲｅｓｅａｒｃｈ　ＤＮＡ　Ｅｎｇｉｎｅ（登録商標）Ｔｅｔｒａｔ　ＰＴＣ－２２５）。第１の産物を、Ｚｍａｘ１遺伝子のＮｏｔＩ－ＳａｌＩフラグメントを増幅する以下のオリゴを使用して作製した。

１０７３３５：　５’－ＣＡＧＣＧＧＣＣＴＧＧＡＧＧＡＴＧＣ－３’（配列番号７２２）
１０７３３８：　５’－ＣＧＧＴＣＣＡＧＴＡＧＡＧＧＴＴＴＣＧ－３’（配列番号７２３）
第２の産物を、Ｚｍａｘ１遺伝子のＳａｃＩ－ＫｐｎＩフラグメントを増幅する以下のオリゴを使用して作製した。
１０７３４１：　５’－ＣＡＴＣＡＧＣＣＧＣＧＣＣＴＴＣＡＴＧ－３’（配列番号７２４）
１０７３４２：　５’－ＣＣＴＧＣＡＴＧＴＴＧＧＴＧＡＡＧＴＡＣ－３’（配列番号７２５）

【０３９３】
両ＰＣＲ産物を、Ｑｉａｑｕｉｃｋ（登録商標）キットおよび製造者のプロトコール（Ｑｉａｇｅｎカタログ番号２８１０６）を使用して精製し、製造者のプロトコールに従ってベクターｐＣＲＩＩ－ＴＯＰＯ（登録商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号Ｋ４６００）にサブクローン化した。陽性サブクローンを、精製プラスミドＤＮＡの制限消化（標準的な分子生物学技術を使用）およびその後のＤＮＡ配列分析（ＡＢＩ　Ｐｒｉｓｍ　ＢｉｇＤｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｃｙｃｌｅ（登録商標）配列決定、カタログ番号４３０３１５４、ＡＢＩ３７７装置）によって同定した。プローブＤＮＡを、各配列検証ｐＣＲＩＩ－ＴＯＰＯ（登録商標）クローンのＥｃｏＲＩ制限消化（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｒ０１０１Ｌ）によって単離した。制限フラグメントを、１％アガロース、０．１μｇ／ｍｌ臭化エチジウム、１×ＴＡＥゲルでの電気泳動によってサイズ分画した。挿入断片ＤＮＡをゲルから切り出し、製造者のプロトコールに従ってＣｌｏｎｔｅｃｈ　ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ（登録商標）核酸精製キット（カタログ番号Ｋ３０５１－２）を使用して精製した。精製ＤＮＡフラグメント（２５～５０ｎｇ）を、Ｐｒｉｍｅ－ＩｔＩＩ（登録商標）ランダムプライマー標識キットおよびプロトコール（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、カタログ番号３００３８５）を使用したＲｅｄｉｖｕｅ（登録商標）（α^{32}Ｐ）－ｄＣＴＰ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ、カタログ番号ＡＡ０００５）で標識した。単一で組み込まれたｄＣＴＰを、ＡｍｅｒｓｈａｍのＮＩＣＫ（登録商標）カラムおよびプロトコール（カタログ番号１７－０８５５－０２）を使用して除去した。

【０３９４】
２ラウンドのスクリーニングライブラリーＬ４０１で、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子のフラグメントの単離を開始した。最初に、４３枚の１５０ｃｍ　ＬＢ－１００μｇ／ｍｌアンピシリン寒天プレートに、Ｌ４０１由来の一次形質転換体を約３，０００～４，０００コロニー／プレートの密度でプレートした。このライブラリーを、標準的な分子生物学プロトコールを使用した５００，０００～１，０００，０００ｃｐｍ／ｍｌを超えるハイブリダイゼーション緩衝液で上記の^{32}Ｐ標識プローブ（ＮｏｔＩ－ＳａｌＩフラグメント）を使用してスクリーニングした。Ｚｍａｘ１プローブへの正のハイブリダイゼーションに基づいて、この一次スクリーニングから１３個の単一コロニーを同定した。ＱＩＡｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐキットおよびプロトコール（Ｑｉａｇｅｎ　Ｉｎｃ．、カタログ番号２７１０６）を使用して調製したプラスミドＤＮＡを、上記の制限消化および配列分析によって分析した。ｃＤＮＡクローン番号４４をこのスクリーニングから単離し、この配列が部分的Ｚｍａｘ１クローンを含むことを検証した。

【０３９５】
第２のライブラリースクリーニングでは、１０４枚の１５０ｃｍ　ＬＢアンピシリン１００μｇ／ｍｌ寒天プレートを、Ｌ４０１由来の一次形質転換体を３，０００～４，０００コロニー／プレートの密度でプレートした。このライブラリーを、前述のように^{32}Ｐ標識プローブ（ＳａｃＩ－ＫｐｎＩフラグメント）を正確に使用してスクリーニングした。Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）プローブへの正のハイブリダイゼーションに基づいて、この一次スクリーニングから４８個のコロニーを同定した。これらのコロニーが単一のコロニー

単離物ではなかったので、４８個の各一次単離物を約５００コロニー／プレートの密度でプレートする二次スクリーニングを開始した。次いで、これらのコロニーを、プローブとして標識ＳａｃＩ－ＫｐｎＩフラグメントを使用して一次クローンとして正確にスクリーニングした。４８個の一次クローンのうちの３４個がＺｍａｘ１プローブと正にハイブリダイゼーションし、これらを単一コロニーとして単離した。上記のようにプラスミドＤＮＡを調製および分析した。ｃＤＮＡ単離物番号７１＿２を、このスクリーニングから単離し、配列決定して部分的Ｚｍａｘ１クローンを含むかを検証した。

【０３９６】

全ての場合、任意のＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）単離物の配列を、基準配列（すなわち、ＨＢＭ家系の罹患メンバー由来の野生型Ｚｍａｘ１対立遺伝子配列）と比較した。文献ではこの遺伝子のＤＮＡ多型が報告されているので、この分析は重要であった。この基準配列は、Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＡＦ０７７８２０のポリペプチドをコードすると予想される。

【０３９７】

Ｚｍａｘ１ＧＩ＿３ＡＳの調製に使用した４つの独立した部分的クローンを以下に示す。

【０３９８】

１）塩基１～１３６６：ＸｂａＩ－ＳａｌＩフラグメントを、Ｚｍａｘ１　ｃＤＮＡ構築物ＧＴＣ．Ｚｍａｘ１＿１３から得た。ＧＴＣ．Ｚｍａｘ１＿１３は、ＬＲＰ５の全ＯＲＦを含む５０７５ＢＰ挿入断片を含む。クローンは、ｐＳＴＢｌｅｕ－１のＥｃｏＲＶ部位にクローン化された平滑末端であった。このクローンを、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（商標）ＩＩ誘導体中での骨ランダムプライミングｃＤＮＡライブラリーのスクリーニング由来の５’クローンとｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（商標）ＩＩ中での骨ｄＴプライミングｃＤＮＡライブラリー由来のＰＣＲ産物由来の３’クローンとの融合によって作製した。ＬＲＰ５特異的正方向プライマー５’－ＧＣＣＣＧＡＡＡＣＣＴＣＴＡＣＴＧＧ　ＡＣＣＧＡＣ－３’（配列番号７２６）および逆方向プライマー５’－ＧＣＣＣＡＣＣＣＣＡＴＣＡＣＡＧＴＴＣＡ　ＣＡＴＴ－３’（配列番号７２７）を使用し、ＤＮＡｚｙｍｅポリメラーゼを使用してＰＣＲを行った。得られた３．７ｋｂ　ＰＣＲ産物を、ＰＣＲ－ＸＬ－ＴＯＰＯにクローン化した。全長クリーンを作製するために、５’および３’プラスミドを、Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬのＤＭ１（ｄａｍ－）に形質転換した。５’プラスミドをＸｂａＩで消化し、３’プラスミドをＨｉｎｄＩＩＩで消化した。消化されたプラスミドにＴ４ポリメラーゼを充填して平滑末端を作製し、ＢｃｌＩで切断した。１．７ｋｂの５’フラグメントおよび３．５ｋｂの３’フラグメントをゲル精製し、互いにライゲートし、ｐＳＴＢｌｕｅ－１のＥｃｏＲＶ部位にクローン化した。コード配列が塩基１００から開始される短い５’ＵＴＲが得られる。さらに、５’マルチクローニング部位にいくつかのさらなる制限部位を保有する。このフラグメントはまた、５５８位がＡ（ＡＦ０７７８２０）からＧに変化したＧｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＡＦ０７７８２０配列に対するＤＮＡ多型を含み、この変異によりアミノ酸（Ｐｒｏ）が異なることはない。

【０３９９】

２）塩基１３６７～２４０３：このクローンを、上記の市販のヒト肝臓ＲＮＡから作製したＺｍａｘ１－遺伝子プライミングｃＤＮＡライブラリーから得た。このフラグメントは、単離物番号４４から得たＤＮＡのＳａｌＩ－ＢａｍＨＩ片である。配列は、Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＡＦ０７７８２０と同一である。

【０４００】

３）塩基２４０４～４０１３：このＢａｍＨＩ－ＢｓｓＨＩＩフラグメントを、上記と同一のライブラリー由来の単離物番号７１－２から得た。３４５６位がＧ（ＡＦ０７７８２０）からＡに変化したＤＮＡ多型が存在する。このヌクレオチドの相違により、コードされるアミノ酸（Ｖａｌ）は変化しない。

【０４０１】

４）塩基４０１４～５２７８：このＢｓｓＨＩＩ－ＮｏｔＩフラグメントは、内部クロ

ーンＬ２３６Ｂ＿Ｐ００４９Ｅ０８に由来した。このフラグメントを、オリゴ－ｄＴプライミングＨｅＬａ細胞ｃＤＮＡライブラリーから得た。終止コドンは、塩基４９４７で起こる。クローンは、１２０ｂｐポリＡテールの後にＮｏｔＩ部位を含む、３３１ｂｐの３’ＵＴＲ配列を含む。このサブクローニングステップで使用した３’ＮｏｔＩ部位は、ライブラリーの構築時にポリＡテールの末端に移入した付加リンカーの結果である。ＤＮＡ多型は、塩基４５１５に存在し、これによりＧ（ＡＦ０７７８２０）からＣに変化するが、アミノ酸レベル（Ｌｅｕ）ではサイレントである。

【０４０２】

Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子の５’切片を作製するために、ＸｂａＩ－ＳａｌＩフラグメントおよびＳａｌＩ－ＢａｍＨＩフラグメントを、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（登録商標）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）のＸｂａＩ－ＢａｍＨＩ部位にライゲートした。この遺伝子の３’切片を、Ｌ２３６Ｂ＿Ｐ００４９Ｅ０８由来の１．２６ｂｐ ＢｓｓＨＩＩ－ＮｏｔＩフラグメントへのＺｍａｘ１単離物番号７１＿２由来の１．６１ｋｂ ＢａｍＨＩ－ＢｓｓＨＩＩフラグメントのライゲーションによって得た。これら２つのフラグメントを、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（登録商標）のＢａｍＨＩ－ＮｏｔＩ部位にライゲートした。全長Ｚｍａｘ１ ｃＤＮＡを、ＸｂａＩ－ＢａｍＨＩ５’切片とＢａｍＨＩ－ＮｏｔＩ３’切片とのライゲーションによって、ベクターｐＣＭＶＳＰＯＲＴ６．０（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）のＸｂａＩ－ＮｏｔＩ部位に操作した。得られたプラスミドＺｍａｘＧＩ＿３ＡＳは、ベクターのマルチクローニング部位のＸｂａＩ部位からＮｏｔＩ部位までの５２７８ｂｐの挿入断片を含む。このクローンは、ベクター中に存在するＣＭＶプロモーターに関してアンチセンス方向である。Ｚｍａｘ１コード配列は、塩基１００から始まり、塩基４９４７で終わり、その後に１２０ｂｐポリＡテールを含む３３１ｂｐの３プライミングＵＴＲ配列が続く。この全長ｃＤＮＡは、推定アミノ酸配列を変化させない基準配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＦ０７７８２０）由来の３つのＤＮＡ多型を含む。これらの多型は、プロリン残基を保持する５５８位でのＡからＧへの変化、バリン残基を保持する３４５６位でのＧからＡへの変化、ロイシン残基を保持する４５１５位でのＧからＣへの変化である。

【０４０３】

Ｚｍａｘ１ＧＩ＿３ＡＳ（図２５）の配列はまた、１３３０位でアミノ酸がアラニンからバリンに変化する、Ｃ（配列番号１、およびＧｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＡＢ０１７４９８）からＴに変化した配列番号１の塩基４０８８に対するＤＮＡ多型を含む。これは、ＨＢＭ家系の罹患メンバー由来の野生型対立遺伝子中で決定された配列およびＧｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＡＦ０７７８２０の公開配列と一致する。Ｚｍａｘ１ＧＩ＿３ＡＳはまた、配列番号１に対する５’末端の２９個のさらなる塩基ならびに過剰なＧ、１２０塩基のポリＡ路、およびＮｏｔＩ部位からなる３’末端の１２９塩基を有する。

【０４０４】

２１．２．２ ＨＢＭ変異Ｇ１７１Ｖの作製

アミノ酸１７１での推定アミノ酸がグリシンからバリンに変化するＨＢＭ変異を、ＰＣＲを使用して全長ヒトＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）ｃＤＮＡ（プラスミドＺｍａｘ１ＧＩ＿３ＡＳ）に移入して、６１１でＧからＴに変化させた。Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子の内因性ＮｏｔＩ部位に隣接するオリゴ１０７３３５：（５’－ＣＡＧＣＧＧＣＣＴＧＧＡＧＧＡＴＧＣ－３’（配列番号７２８））および４９５１３：（５’－ＣＧＧＧＴＡＣＡＴＧＴＡＣＴＧＧＡＣＡＧＣ ＴＧＡＴＴＡＧＣ－３’（配列番号７２９））を使用してＨＢＭ変異の移入を行った。この方法は、ＰＣＲ産物の３’末端で新規のＰｖｕＩＩ部位を作製する。産物の５’末端にＳｃａＩ部位が移入され、且つ３プライミング末端にＺｍａｘ１の内因性ＳａｌＩ部位を含むオリゴを使用して、第２のＰＣＲ反応を完了した。ＰＣＲ産物をＱｉａＱｕｉｃｋ（登録商標）手順（Ｑｉａｇｅｎ Ｉｎｃ．）を使用して精製し、上記のベクターｐＣＲＩＩ－ＴＯＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にサブクローン化した。全て上記のように、プラスミドＤＮＡを単一の細菌クローンから精製し、制限消化およびその後の配列分析によって分析した。配列検証ｐＣＲＩＩ－ＴＯＰＯクローンを、

それぞれＮｏｔＩ－ＰｖｕＩＩおよびＳｃａＩ－ＳａｌＩで制限消化した。得られたＤＮＡフラグメントをサイズ分画し、上記のように精製した。次いで、これらの２つのフラグメントを、ＮｏｔＩ－ＳｃａｌＩ消化によって調製したベクターｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（登録商標）にサブクローン化した。二本鎖核酸の消化で使用した場合、ＰｖｕＩＩおよびＳｃａＩの両方により、平滑末端が得られる。したがって、得られたライゲーションフラグメントは、ＰｖｕＩＩ部位やＳｃａＩ部位を作製することができず、新規に移入されたＨＢＭ変異以外はコンセンサスＺｍａｘ１配列のみを含む。全長Ｚｍａｘ１遺伝子に変異を移入するために、この得られたプラスミドをＭｓｃＩおよびＳａｌＩで消化し、Ｚｍａｘ１の５’領域をＺｍａｘ１プラスミドＧＴＣ．Ｚｍａｘ１＿１３のＸｂａＩ－ＭｓｃＩ消化によって得た。これら２つのフラグメントを共にＸｂａＩ－ＳａｌＩ消化ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（登録商標）にライゲートし、事実上類似の１．３６６ｋｂのＸｂａＩ－ＳａｌＩフラグメントを作製した。この構築物は上記のＨＢＭ変異を含むことのみが異なる。次いで、全長ＨＢＭｃＤＮＡを、ＨＢＭ変異を含むこの新規に作製したこのＸｂａＩ－ＳａｌＩフラグメントで置換されたＺｍａｘ１遺伝子について上記のようにｐＣＤＭＶＳＰＯＲＴ６．０に正確に構築した。全ｃＤＮＡ挿入断片を、ＤＮＡ配列分析によって検証し、ＨＢＭ変異の移入を確認した。

【０４０５】

得られたプラスミドＨＢＭＧＩ＿２ＡＳ（図２４）は、ベクターのマルチクローニング部位のＸｂａＩ部位からＮｏｔＩ部位までの５，２７８ｂｐの挿入断片を含む。このクローンは、ベクター中のＣＭＶプロモーターに関してアンチセンス方向である。ＨＢＭコード配列は、塩基１００から始まり、塩基４９４７で終わり、その後に１２０ｂｐポリＡテールを含む３３１ｂｐの３プライミングＵＴＲ配列が続く。この全長ｃＤＮＡは、アミノ酸配列を変化させない基準配列由来の３つのＤＮＡ多型を含む。これらの多型は、プロリン残基を保持する５５８位でのＡからＧへの変化、バリン残基を保持する３４５６位でのＧからＡへの変化、ロイシン残基を保持する４５１５位でのＧからＣへの変化である。さらに、ＨＢＭ変異は６１１位（Ｚｍａｘ１中のＧからＨＢＭ中のＴ）に存在し、ＨＢＭ家系の罹患メンバーで見出されるように、アミノ酸１７１位でグリシンからバリンへのアミノ酸変化が推定される。この挿入断片配列を使用して、ＨＢＭ過剰発現トランスジェニックマウスに使用する構築物を作製した。

【０４０６】

２１．３　導入遺伝子の調製

本明細書中に提供する例は、どのようにしてトランスジェニック動物を調製することができるのかということの例示である。当分野で公知のように、さらなるトランスジェニック動物を調製することができる。例えば、Ｇｌｅｎｎ　Ｍｏｎａｓｔｅｒｓｌｅｙら編、「トランスジェニック動物研究ストラテジー」（Ａｍｅｒ．Ｓｏｃ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ、１９９５）およびその参考文献を参照のこと。

【０４０７】

２１．３．１　ＣＭＶｂＡｃｔｉｎプロモーター－ＨＢＭ　ｃＤＮＡ（ＨＢＭＭＣＢＡ）

ＣＭＶｂａｃｔｉｎ－ＨＢＭ構築物を調製するために、ｐＣＸ－ＥＧＦＰ（キメラＣＭＶｂａｃｔｉｎプロモーターを含むプラスミド）を、４７７８ｂｐ　ＥｃｏＲＩフラグメントとして精製した。次いで、ＨＢＭ　ｃＤＮＡを４９９４ｂｐ　ＸｂａＩ／ＤｒａＩフラグメントとしてＨＢＭＧＩ＿２ＡＳから切り出し、ＤＮＡポリメラーゼのＫｌｅｎｏｗフラグメントで処理し、ＥｃｏＲＩリンカーにライゲートし、ＥｃｏＲＩで消化した。次いで、このフラグメントを、ｐＣＸ－ＥＧＦＰのＥｃｏＲＩ部位に挿入した。ＳｐｅＩ／ＨｉｎｄＩＩＩ７２６５ｂｐ　ＣＭＶｂａｃｔｉｎ－ＨＢＭフラグメントを、マウス胚への微量注入のために精製した。

【０４０８】

２１．３．２　Ｉ型コラーゲンプロモーター－ＨＢＭ　ｃＤＮＡ（ＨＢＭＭＴＩＣ）

ラットＩ型コラーゲンプロモーター－ＨＢＭ構築物を、第１のｐＢＳ（ＳＫ－）（Ｓｔ

ｒａｔａｇｅｎｅ）ポリリンカーのＢＳ（ＳＫ－）Ａ／Ｄと呼ばれる別のポリリンカー（すなわち、Ｋｐｎ１－ＳｐｅＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ－ＢｇｌＩＩ－ＮｄｅＩ－ＳａｌＩ－ＳｍａＩ－ＥｃｏＲＩ－ＰｓｔＩ－ＢａｍＨＩ－ＸｂａＩ－ＳｃａＩ－ＮｃｏＩ－ＣｌａＩ－ＮｏｔＩ－ＳａｃＩＩ－ＳａｃＩを含む）への置換によって作製した。ＳＶ４０スプライスおよびｐｃＤＮＡＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｉｎｃ．）由来のポリ（Ａ）$_{n}$ＸｂａＩ－ＮｃｏＩ領域（７５０ｂｐ）を、ＢＳ（ＳＫ－）Ａ／Ｄに定方向にクローン化した。次に、４９９４ｂｐ　ＥｃｏＲＩ　ＨＢＭ　ｃＤＮＡフラグメント（上記）を、ＥｃｏＲＩ部位にクローン化した。３６４０ｂｐ　ＸｂａＩ（Ｉ型コラーゲンプロモーターフラグメント）を、ＢＳ（ＳＫ－）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）のＸｂａＩ部位にサブクローン化した。次いで、プロモーターフラグメントを、ＳａｃＩＩでＢＳ（ＳＫ－）から切り出し、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼで平滑末端にし、ＳｐｅＩで消化し、ＨＢＭ　ＢＳ（ＳＫ－）Ａ／Ｄ構築物（ＮｄｅＩで消化し、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼで平滑末端にし、ＳｐｅＩで消化したもの）にライゲートした。ＳｐｅＩ／ＣｌａＩ９４３５ｂｐ　Ｉ型コラーゲン－ＨＢＭフラグメントを、マウス胚への微量注入のために精製した。

【０４０９】

２１．３．３　ＣＭＶｂＡｃｔｉｎプロモーター－Ｚｍａｘ１　ｃＤＮＡ（Ｚｍａｘ１ＷＴＣＢＡ）

上記由来のＣＭＶｂＡｃｔｉｎプロモーター－ＨＢＭ　ｃＤＮＡ構築物を使用して、最終プラスミドを作製した。以下の３つのフラグメントを共にライゲートした。ＨＢＭＭＣＢＡ由来の６．３４ｋｐ　ＸｂａＩ－ＫｐｎＩ骨格フラグメント、２）３’末端にｂＡｃｔｉｎプロモーターおよび５’末端にＨＢＭ　ｃＤＮＡを含むＨＢＭＭＣＢＡ由来の０．６４ｋｂ　ＸｂａＩ－ＳａｐＩフラグメント、および３）野生型配列を含むＺｍａｘ１　ｃＤＮＡ由来の２．８ｋｂ　ＳａｐＩ－ＫｐｎＩフラグメント。７．２ｋｂ　ＳｐｅＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ　ＣＭＶｂＡｃｔｉｎ－Ｚｍａｘ１フラグメントを、マウス胚への微量注入のために精製した。

【０４１０】

２１．３．４　Ｉ型コラーゲンプロモーター－Ｚｍａｘ１　ｃＤＮＡ（Ｚｍａｘ１ＷＴＴＩＣ）

上記由来のＩ型コラーゲン－ＨＢＭ　ｃＤＮＡ構築物を使用して、最終プラスミドを作製した。ＨＢＭＭＴＩＣプラスミドを、ＨｉｎｄＩＩＩで線状化し、ＳａｌＩで切断して８．５２ｋｂ　ＨｉｎｄＩＩＩ－ＳａｌＩフラグメントを得るか、ＳａｐＩで切断して２．９８ｋｂ　ＳａｐＩ－ＨｉｎｄＩＩＩフラグメントを得る。野生型配列を含むＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）ｃＤＮＡ由来の２．８ｋｂ　ＳａｐＩ－ＳａｌＩフラグメントを、上記の２つのフラグメントにライゲートして最終プラスミドを得た。９．４ｋｂ　ＳｐｅＩ－ＣｌａＩ　Ｉ型コラーゲン－Ｚｍａｘ１フラグメントを、マウス胚への微量注入のために精製した。

【０４１１】

２１．４　in vitroでの導入遺伝子発現の確認

プラスミド構築物ＨＢＭＭＣＢＡ、ＨＢＭＭＴＩＣ、Ｚｍａｘ１ＷＴＣＢＡ、およびＺｍａｘ１ＷＴＴＩＣを、ヒト骨芽（ＨＯＢ）細胞に一過性にトランスフェクトして、機能試験としてのｍＲＮＡ発現を測定した。

【０４１２】

２１．４．１　一過性トランスフェクション

ＨＯＢ－０２－０２細胞は、ＨＯＢ－０２－Ｃ１細胞由来のクローン老化後クローン細胞株である（Ｂｏｄｉｎｅら、１９９６、Ｊ．Ｂｏｎｅ．Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．、１１、８０６～８１９）。親細胞株のように、ＨＯＢ－０２０－０２細胞は、温度感受性ＳＶ４０巨大Ｔ抗原変異体ｔｓＡ２０９を発現する。したがって、これらの細胞が増殖する許容温度は３４℃であるが、３７℃またはそれ以上の非許容温度で分裂が停止する。親細胞株と同様に、ＨＯＢ－０２０－０２細胞を、成長培地（１０％熱不活化ウシ胎児血清、１％ペニシリン－ストレプトマイシン、および２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ－１を含むＤ－ＭＥ

Ｍ／Ｆ－１２）と共に５％CO_2／９５％加湿インキュベーター（Ｆｏｒｍａ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｍａｒｉｅｔｔａ、ＯＨ）にて３４℃で培養する。

【０４１３】

一過性トランスフェクションのために、ＨＯＢ－０２－０２細胞を、成長培地と共に４００，０００細胞／ウェルで６ウェルプレートに播種し、３４℃で一晩インキュベートした。細胞を、製造者の説明（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、Ｍｄ）にしたがってＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ２０００トランスフェクション試薬を使用して、０．３ｍｇ／ウェルのＣＭＶβＡｃｔｉｎ０－ＨＢＭ発現プラスミド、Ｉ型コラーゲン－ＨＢＭ発現プラスミド、または対応する空のベクターのいずれかでトランスフェクトした。３４℃で２４時間のインキュベーション後、培地を交換し、細胞を３９℃で２４時間さらにインキュベートした。この最後のインキュベーション後、細胞をＨａｎｋ緩衝化塩溶液ですすいだ。次いで、製造者（ＧｉｂｃｏＢＲＩ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）の説明にしたがってＴＲＩｚｏｌ（登録商標）を使用して、全細胞ＲＮＡを単離した。前述のように、ＲＮＡを無ＲＮａｓｅＤＮａｓｅで処理して、含有するＤＮＡを除去した（Ｂｏｄｉｎｅら、１９９７、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、６５、３６８～３８７）。

【０４１４】

２１．４．２　ｍＲＮＡ発現用ＴａｑＭａｎ（登録商標）アッセイ

ＴａｑＭａｎ（登録商標）プライマーおよびプローブを、ヒトおよびマウスＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）ｃＤＮＡ配列に基づいて選択した。選択した配列を、図２６に記載のヒトおよびマウスＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）配列のアラインメント分析によって遺伝子特異的になるようにデザインした。

【０４１５】

以下のプライマーおよびプローブ組を使用し、製造者（ＰＥ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ、ＣＡ）によって記載されるようにヒト細胞から単離したＲＮＡのＴａｑＭａｎ（登録商標）定量逆転写酵素－ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）分析を行った。

ヒトＺｍａｘ－１－１／ＨＢＭ－１：

正方向プライマー：　５’－ＧＴＣＡＧＣＣＴＧＧＡＧＧＡＧＴＴＣＴＣＡ－３’（配列番号７３０）

逆方向プライマー：　５’－ＴＣＡＣＣＣＴＴＧＧＣＡＡＴＡＣＡＧＡＴＧＴ－３’（配列番号７３１）

プローブ：　６－ＦＡＭ－５’－ＣＣＣＡＣＣＣＡＴＧＴＧＣＣＣＧＴＧＡＣＡ－３’（配列番号７３２）

【０４１６】

実験プライマー／プローブ組からの結果を、ＰＥ　Ａｐｐｌｉｅｄ　ＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓのヒトＧＡＰＤＨコントロールキットを使用した多重プロトコールを使用して、ヒトＧＡＰＤＨに正規化した。以下のプライマーおよびプローブ組を使用して、マウス細胞および組織から単離したＲＮＡの種特異的ＴａｑＭａｎ（登録商標）定量ＲＴ－ＰＣＲ分析を製造者（ＰＥ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ、ＣＡ）が記載のように行った。

ヒトＺｍａｘ－１／ＨＢＭ－１：

正方向プライマー：　５’－ＣＧＴＧＡＴＴＧＣＣＧＡＣＧＡＴＣＴＣ－３’（配列番号７３３）

逆方向プライマー：　５’－ＴＴＣＣＧＧＣＣＧＣＴＡＧＴＣＴＴＧＴ－３’（配列番号７３４）

プローブ：　６－ＦＡＭ－５’－ＣＧＣＡＣＣＣＧＴＴＣＧＧＴＣＴＧＡＣＧＣＡＧＴＡＣ－３’（配列番号７３５）

マウスＺｍａｘ－１／ＨＢＭ－１：

正方向プライマー：　５’－ＣＴＴＴＣＣＣＣＡＣＧＡＧＴＡＴＧＴＴＧＧＴ－３’

（配列番号７３６）
　逆方向プライマー：　５’－ＡＡＧＧＧＡＣＣＧＴＧＣＴＧＴＧＡＧＣ－３’（配列番号７３７）
　プローブ：　６－ＦＡＭ－５’－ＡＧＣＣＣＣＴＣＡＴＧＴＧＣＣＴＣＴＣＡＡＣＴＴＣＡＴＡＧ－３’（配列番号７３８）
【０４１７】
実験プライマー／プローブ組からの結果を、ＰＥ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓの１８ＳリボゾームＲＮＡコントロールキットを使用した多重プロトコールを使用して、１８ＳリボゾームＲＮＡレベルに正規化した。これらの結果のまとめを、図１７～２０に示す。
【０４１８】
２１．５　トランスジェニックマウス産物
２１．５．１　ＤＮＡ微量注入
微量注入用の導入遺伝子フラグメントを、Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ　ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのＧＥＬａｓｅプロトコールにしたがって、最初に１％アガロースゲルで精製した。次いで、フラグメントを、塩化セシウム密度勾配でさらに精製し、５ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．４）および０．１ｍＭ　ＥＤＴＡに対して広範に透析した。
【０４１９】
線状化ＤＮＡを、標準的な手順にしたがってマウス胚に微量注入した。ＤＮＡを、最初に受精Ｃ５７ＢＬ／６Ｔマウス胚の雄前核に注入した。注射した胚（ｎ＝２０～３５）を、交配０．５日後の偽妊娠Ｓｗｉｓｓ　Ｗｅｂｓｔｅｒ胚レシピエントの卵管（片側のみ）に導入した。１０～１４日齢の子孫の尾生検を行い、遺伝子型を同定した。
【０４２０】
２１．６　遺伝子標的トランスジェニックマウスの産生
２１．６．１　遺伝子ターゲティングベクターおよびプローブ
胚性幹（ＥＳ）細胞中でのＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）遺伝子修飾のために２つの遺伝子ターゲティングベクターを構築した。Ｚｍａｘ１－ＫＩ／ＫＯ　ＡおよびＢと呼ぶ図１６に示す２つの構築物を、ＨＢＭ家系のマウスモデル（すなわち、マウスＺｍａｘ１におけるグリシン１７０からバリンへのアミノ酸置換）を作製するための２つの変異型（Ｚｍａｘ１遺伝子のノックアウト（ＫＯ）およびヌクレオチド置換のＣｒｅ組換え依存性ノックイン（ＫＩ））を作製するようにデザインした。
【０４２１】
マウスＺｍａｘ１遺伝子の最初の５つのエクソンを含むマウスゲノムＤＮＡ　ＢＡＣクローン４７３Ｐ５（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＡＺ０９５４１３）のゲノムＤＮＡを使用して、両遺伝子ターゲティングベクターを構築した。このクローンを、エクソン３についてのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）スクリーニングを使用し、Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ、ＡＬ）によってマウス１２９ＳｖＪゲノムＢＡＣライブラリーからこのクローンを単離した。正方向および逆方向プライマーを使用してエクソン３をＰＣＲ増幅した。
　正方向：　５’－ＧＡＧＣＧＧＧＣＡＧＧＧＡＴＧＧＡＴＧＧ－３’（配列番号７３９）
　逆方向：　５’－ＡＧＧＴＴＧＧＣＡＣＧＧＴＧＧＡＴＧＡＡＧＣ－３’（配列番号７４０）
【０４２２】
以下のサーマルサイクラー条件を使用した。３０サイクルについて、９５℃で０．５分間の５５℃で１分間および７２℃で１分間。このクローンのマウスＺｍａｘ１との同一性を、テンプレートとしてＢＡＣクローンＤＮＡを使用したエクソン３の配列決定によって確認した。ＰＣＲ産物を、ｐＧＥＭ－Ｔ－ｅａｓｙＴ／Ａクローニングキットを使用してクローン化した。
【０４２３】

２１．６．２　Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）ノックイン／ノックアウトベクター

ゲノムＢＡＣクローン４７３Ｐ５の組織化を、プローブとしてのサブクローン化エクソン１、エクソン２、およびエクソン３を使用したサザンブロット分析およびエクソン１からエクソン５に及ぶ領域の配列決定によって特徴付けた。Ｚｍａｘ１　ＫＩ／ＫＯターゲティングのために２つの異なる構築物を調製した。これらの構築物（ＡおよびＢ）は、隣接アームの相同性のみが異なる。構築物（Ａ）は、６．５ｋｂ　ＢｓｔＥＩＩ－ＸｂａＩ５’相同アームおよび１ｋｂ　ＸｂａＩ－ＥｃｏＲＩ３’相同アームを含み、構築物（Ｂ）は、１ｋｂ　５’相同アームおよび６．０ｋｂ　３’相同アームを含む。構築物を、ネオマイシン耐性遺伝子（ＭＣ１－Ｎｅｏ、Ｓｔｒａｔａｇｅｅｎ）および合成転写中止配列（Ｐｒｏｍｅｇａ）を含むカセットに隣接するＬｏｘＰに相同な短アームおよび長アームのライゲーションによって調製した。

【０４２４】

Ｚｍａｘ１－ＫＩ／ＫＯターゲティングベクター（ＡおよびＢ）を、エクソン３でＧ１７０Ｖアミノ酸置換をコードするＧからＴへのヌクレオチド置換に修飾した。これらの修飾を、テンプレートとして相同な短アームの野生型配列を使用した重複ＰＣＲ変異誘発によって移入した。さらに、Ｚｍａｘ１－ＫＩ／ＫＯ（Ｂ）ターゲティングベクターの１ｋｂの短アームを、５’末端ＰｍｅＩ制限認識部位を含むように修飾した。以下の正方向プライマーおよび逆方向変異誘発プライマーを使用して、５’重複フラグメントを作製した。

【化８】

正方向：　5'-AAGCTTGTTTAAACTGGGCATGGTGGCACATGGTTGTAAT-3'（配列番号741）

逆方向：　5'-GGGCTTCCACCCAGTCAGTCCAGTACATGTACCT-3'（配列番号742）

３０サイクルのために使用したサーマルサイクリング条件は、９５℃で０．５分間、５５℃で１分間、および７２℃で１分間である。以下の正方向および逆方向プライマーを使用して、３’フラグメントを作製した。

【化９】

正方向：　5'-CTGACTGGGTGGAAGCACCCCGGATCGAGC-3'（配列番号743）

逆方向：　5'-GAATTCATCGGTACCTGTGCGGCCGCTTCATTG-3'（配列番号744）

【０４２５】

３０サイクルのために使用したサーマルサイクリング条件は、９５℃で０．５分間、５５℃で１分間、および７２℃で１分間である。最後の重複ＰＣＲは、テンプレートとして１ｍｌの各５’フラグメントおよび３’フラグメントＰＣＲ反応物を使用し、５’および３’フラグメントの正方向および逆方向プライマーならびに同一のサーマルサイクリング条件を使用して増幅を行った。最終ＰＣＲ産物を、ｐＧＥＭ－Ｔ－ｅａｓｙＴ／Ａクローニングキットを使用してクローン化した。変異誘発したエクソン３をＺｍａｘ１－ＫＩ／ＫＯ（Ｂ）から切り出し、６００ｂｐ　ＢｓｍＢＩ－ＸｂａＩフラグメントとしてＺｍａｘ１－ＫＩ／ＫＯ（Ａ）に導入した。

【０４２６】

Ｚｍａｘ１－ＫＩ／ＫＯ（Ａ）遺伝子ターゲティングＥＳ細胞クローンのスクリーニングよび特徴づけのためのプローブを、ＢＡＣクローン４７３Ｐ５の制限フラグメントのサブクローニングによって調製する。外側の５’プローブは、４００ｂｐ　Ｎｄｅ－ＢｓｔＥＩＩフラグメントであり、外側の３’プローブは、５００ｂｐ　ＥｃｏＲＩ－ＢｓｔＸＩフラグメントである。

【０４２７】

Ｚｍａｘ１－ＫＩ／ＫＯ（Ｂ）の外側のプローブを、相同なターゲティングベクター領域に隣接するかすぐ隣のゲノムフラグメントのＰＣＲクローニングによって調製する。Ｚｍａｘ１－ＫＩ／ＫＯ（Ｂ）に使用された外側５’プローブは、配列（５’－ＴＧＡＧＡＴＧＴＣＣＴＧＴＣＴＧＴＧＧＣ－３’（配列番号７４５））の正方向プライマーおよび配列（５’－ＴＣＣＴＴＣＣＴＴＣＣＣＴＡＣＡＧＴＴＧ－３’（配列番号７４６））の逆方向プライマーを使用して作製した４９８ｂｐのフラグメントである。３０サイクルのためのこれらのプローブを使用したサーマルサイクリング条件は、９５℃で０．５分間、５５℃で１分間、および７２℃で１分間である。外側の３’プローブは、配列（５’－ＣＣＴＡＡＧＧＡＴＣＴＣＣＴＴＧＴＧＴＣＴＧＴＧＧ－３’（配列番号７４７））の正方向プライマーおよび配列（（５’－ＣＴＧＣＡＧＣＡＧＧＴＣＡＧＴＡＧＣＣＴＧＣ－３’（配列番号７４８））の逆方向プライマーを使用して作製した６００ｂｐフラグメントである。３０サイクルのためのこれらのプローブを使用したサーマルサイクリング条件は、９５℃で０．５分間、５５℃で１分間、および７２℃で１分間である。両プローブは、ゲノムサザン分析においてＺｍａｘ１遺伝子に特異的である。ＰＣＲプローブを、ｐＧＥＭ－Ｔ－ｅａｓｙＴ／Ａクローニングキットを使用してクローン化する。

【０４２８】

Ｚｍａｘ１　ｍＲＮＡ構造および転写レベルのリボヌクレアーゼ保護分析用プローブを、エクソン３からエクソン４を含むｃＤＮＡフラグメントのＰＣＲクローニングによって調製した。ＰＣＲ反応では、テンプレートとしての完全なｃＤＮＡ、配列（５’－ＴＧＡＧＡＴＧＴＣＣＴＧＴＣＴＧＴＧＧＣ－３’（配列番号７４９））の正方向配列、配列（５’－ＴＣＣＴＴＣＣＴＴＣＣＣＴＡＣＡＧＴＴＧ－３’（配列番号７５０））逆方向プライマー、および３０サイクルのためのサーマルサイクリング条件（９５℃で０．５分間、５５℃で１分間、および７２℃で１分間）を使用した。ＰＣＲ産物を、ｐＧＥＭ－Ｔ－ｅａｓｙＴ／Ａクローニングキットを使用してクローン化する。

【０４２９】

当業者は、他の操作ＫＩ対立遺伝子の作製に類似のプロトコールを使用して、ＨＢＭ様表現型を有するトランスジェニック動物を産生することができる。

【０４３０】

２１．６．３　ＥＳ細胞における遺伝子ターゲティング

遺伝子ターゲティングのために、胚性幹（ＥＳ）細胞を、５０ｍｇの線状化ターゲティングベクターを使用してエレクトロポレーションを行い、エレクトロポレーション開始から７～１０日後に２００ｍｇ／ｍｌ　Ｇ４１８中で選択した。Ｇ４１８耐性コロニーを選択肢、拡大し、低温保存した。耐性クローンを、それぞれ４ｋｂおよび５ｋｂのフラグメントとしてＺｍａｘ１の野生型および標的対立遺伝子を検出する、外側の５’プローブを使用したＥｃｏＲＩゲノムサザン制限フラグメント長分析によって相同組換えについてスクリーニングした。遺伝子ターゲティングＥＳ細胞クローンを解凍し、拡大し、９ｋｂおよび８ｋｂのフラグメントとしてＺｍａｘ１の野生型および標的対立遺伝子を検出する、外側の３’プローブを使用したＳｃａＩゲノム制限フラグメント長分析によって特徴付けた。遺伝子ターゲティングクローンを、ＧからＴへの置換が相同組換えに含まれることを確認するためのＺｍａｘ１エクソン３の配列分析によっても特徴付ける。

【０４３１】

２１．６．４　胚盤胞注射による遺伝子ターゲティングマウスの産生

キメラマウスを作製するために、遺伝子ターゲティングＥＳ細胞クローンを解凍し、拡大し、交配後（ｐ．ｃ．）３．５日の宿主Ｃ５７ＢＬ／６胚盤胞の胞胚腔に９～１４個のＥＳ細胞を注射した。次いで、注射された胚盤胞（１２～１７個）を、２．５ｐ．ｃ．偽妊娠Ｓｗｉｓｓ　Ｗｅｂｓｔｅｒ胚レシピエントの子宮の片側に導入し、所定期間成長させる。キメラ雄を１２９ＳｖＥｖ雌と戻し交配し、ネオマイシン耐性遺伝子に特異的プライマーを使用したＰＣＲ遺伝子型同定によってターゲティングした対立遺伝子の伝達について試験した。

【０４３２】

２１．６．５　Ｃｒｅリコンビナーゼによるネオマイシン耐性カセットのin vitro欠失
Ｚｍａｘ１　ＫＩ／ＫＯマスス由来のＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）ＫＩマウスを作製するために、ネオマイシン耐性（ＫＯ）カセットを、Ｚｍａｘ１　ＫＩ／ＫＯ融合前接合子の雄前核へのＣｒｅ発現プラスミド（２ｍｇ／ｍｌ）の微量注入によって欠失させた。カセット挿入部位のＰＣＲ分析によって、ＫＯカセットの欠失を確認した。

【０４３３】

２１．６．６　遺伝子型同定トランスジェニックマウス
５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．２）、５０ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）、０．５％ＳＤＳ、および０．８ｍｇ／ｍｌプロテイナーゼＫを含む５００μｌの緩衝液中での消化によって、マウスの尾の切れ目からゲノムＤＮＡを単離した。サンプルを、５５℃で一晩撹拌しながらインキュベートした。１０μｌアリコートを、９９℃で５分間熱不活化し、水で２０倍に希釈した。ＰＣＲのために、１μｌの希釈ＤＮＡを、以下の条件下で増幅した。変性：９６℃で４．５分間；４５サイクル：９６℃で３０秒間、６３℃で１分間、７２℃で１分間；伸長：７２℃で５分間；４℃で保持。

【０４３４】

遺伝子型同定のために以下のプライマー組を使用した。
ＨＢＭＭＣＢＡ：
５’プライマー：２９６ｂｐフラグメント（それぞれ配列番号７５１～７５２）
正方向：　５’－ＧＣＴ　ＴＣＴ　ＧＧＣ　ＧＴＧ　ＴＧＡ　ＣＣＧ　ＧＣＧ－３’
逆方向：　５’－ＧＣＣ　ＧＣＡＣＡＧ　ＣＧＣ　ＣＡＧ　ＣＡＧ　ＣＡＧ　Ｃ－３’
３’プライマー：４００ｂｐフラグメント（それぞれ配列番号７５３～７５４）
正方向：　５’－ＣＡＣ　ＣＣＡ　ＣＧＣ　ＣＣＣ　ＡＣＡ　ＧＣＣ　ＡＧＴ　Ａ－３’
逆方向：　５’－ＡＴＴ　ＴＧＣ　ＣＣＴ　ＣＣＣ　ＡＴＡ　ＴＧＴ　ＣＣＴ　ＴＣＣ－３’
ＨＢＭＭＴＩＣ：
５’プライマー：３８２ｂｐフラグメント（それぞれ配列番号７５５～７５６）
正方向：　５’－ＴＴＣ　ＣＴＣ　ＣＣＡ　ＧＣＣ　ＣＴＣ　ＣＴＣ　ＣＡＴ　ＣＡＧ－３’
逆方向：　５’－ＧＣＣ　ＧＣＡ　ＣＡＧ　ＣＧＣ　ＣＡＧ　ＣＡＧ　ＣＡＧ　Ｃ－３’
３’プライマー：５２４ｂｐフラグメント（それぞれ配列番号７５７～７５８）
正方向：　５’－ＧＡＡ　ＴＧＧ　ＣＧＣ　ＣＣＣ　ＣＧＡ　ＣＧＡ　Ｃ－３’
逆方向：　５’－ＧＣＴ　ＣＣＣ　ＡＴＴ　ＣＡＴ　ＣＡＧ　ＴＴＣ　ＣＡＴ　ＡＧＧ－３’

【０４３５】

２１．６．７　サザン分析による遺伝子型の確認
マウスゲノムＤＮＡを、ＥｃｏＲＩで消化し、Ｚｍａｘ１　ｃＤＮＡ由来の１．０ｋｂＳａｌＩ－ＢａｍＨＩ制限フラグメントで探索した。プローブは、導入遺伝子陽性動物中の５ｋｂフラグメントにハイブリダイゼーションする。

【０４３６】

２１．７　遺伝子型同定
in vivoおよびex vivoアッセイの両方を使用して、トランスジェニックマウス中の遺伝子型を評価する。野生型マウスの２つの株（すなわち、Ｃ５７ＢＬ／６および１２９ＳｖＥｖ）を、トランスジェニックマウスおよび遺伝子ターゲティングマウスにおける表現型評価のためのコントロールデータを得るために研究する。さらに、トランスジェニック同腹子動物を、コントロールとして使用する。

【０４３７】

２１．７．１　in vivo分析

Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ（Ｏｍａｈａ、Ｎｅｂｒａｓｋａ）でのＮｏｒｌａｎｄ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓの濃度計（Ｎｏｒｌａｎｄ ＸＲ２６００濃度計、二重エネルギーＸ線吸収法、ＤＸＡ）を使用したＤＸＡによって、脊髄骨中無機質含有量（ＢＭＣ）および骨中無機質密度（ＢＭＤ）を測定した。他の位置での脊髄ＢＭＣおよびＢＭＤは、機械を利用可能である。米国で現在使用されている８００ＤＸＡマシンで評価する。最も大きな市は、ＤＸＡ能力（通常、ＬｕｎａｒまたはＨｏｌｏｇｉｃのマシン）を有するオフィスまたは画像センターを有する。ＢＭＤ測定のための目的の領域を検証するためのマシンからのプリントアウトのコピーを含む脊髄ＢＭＣおよびＢＭＤデータを提供するそれぞれの場所を適切に選択した。完全な病歴および骨のＸ線写真を得た。

【０４３８】

ヒトおよび動物被験体（好ましくは、ヒト）のＨＢＭ表現型（およびＨＢＭ表現型を考察する場合に含まれるＨＢＭ様表現型）を、非常に高い脊髄ＢＭＤ；任意の公知の高骨量症候群を欠く病歴；および四肢骨の正常な形状を示す骨Ｘ線写真などの基準を使用して記載することができる。

【０４３９】

ｐＤＸＡ：野生型およびトランスジェニックマウスを麻酔し、秤量し、ＬＵＮＡＲ小動物用ＰＩＸＩｍｕｓデバイスを使用して骨格の全身をＸ線スキャンで作製する。マウスが乳離れした時（すなわち、３週齢）にスキャンを開始し、２週間間隔で繰り返す。野生型動物を、３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２７、および２９週目にスキャンする。トランスジェニック動物のスキャニングを、１７週目まで行う。スキャンを、ＢＭＤ（骨中無機質密度）、ＢＭＣ（骨中無機質含有量）、ＴＴＭ（総組織質量）、および種々の身体領域の脂肪％について分析する。

【０４４０】

ＦａｘｉｔｒｏｎＸ線写真：麻酔動物のｐＤＸＡスキャニング後、骨サイズを測定するＦａｘｉｔｒｏｎデバイスを使用してさらなるＸ線写真を撮影した。

【０４４１】

カルセイン標識：２つの連続した場合について動物に１５ｍｇ／ｋｇカルセインを腹腔内投与した。骨形成速度を測定するために、第１の投与は安楽死の９日前であり、第２の投与は安楽死の２日前であった。

【０４４２】

２１．７．２　ex vivo分析

ＲＮＡ単離：ｍＲＮＡ発現を決定するために、ＴＲＩｚｏｌ（登録商標）を使用して脛骨および他の組織から全ＲＮＡを単離した。

【０４４３】

ｐＱＣＴ：遠位骨幹端の全ておよび骨梁の密度ならびに中心軸の皮質密度の決定のために、右大腿骨の柔組織を除去して７０％のエタノールで保存した。

【０４４４】

ＭｉｃｒｏＣＴ：右大腿骨を使用して、遠位骨幹端の骨梁指標を決定した。

【０４４５】

Ｈｉｓｔｏｌｏｇｙ：右大腿骨を使用して、遠位骨幹端の骨領域ならびに静電気的および動的パラメータを決定した。

【０４４６】

曲げ強さ：左大腿骨の柔組織を除去し、中心軸の３点曲げ強さの分析前に－２０℃で保存した。

【０４４７】

椎骨の圧縮強度：Ｔ１０－Ｌ６－７から脊髄全体を取り出した。柔組織が残され、分析まで脊髄を－２０℃で凍結した。Ｌ５椎骨で圧縮強度を測定した。

【０４４８】

血清：動物を安楽死させ、総コレステロール、トリグリセリド、オステオカルシン、および他の生化学的マーカーを測定するために血液から血清を調製した。

【０４４９】
溶解：例には、骨形成マーカーのIn situハイブリダイゼーションおよびアポトーシスを起こした細胞のＴＵＮＥＬ染色などの免疫細胞化学が含まれる。
【０４５０】
２１．８　結果
２１．８．１　トランスジェニックプラスミド構築物由来の発現の確認
ＨＢＭ（ＨＢＭＭＣＢＡおよびＨＢＭＭＴＩＣ）および野生型（Ｚｍａｌ１ＷＴＣＢＡおよびＺｍａｘ１ＷＴＴＩＣ）プラスミド構築物を、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）の内因性発現レベルが非常に低いＨＯＢ－０２－０２細胞に一過性にトランスフェクトした。トランスフェクションから２日後、ＲＮＡを単離し、ＴａｑＭａｎ（登録商標）定量ＲＴ－ＰＣＲを行って、細胞中のＺｍａｘ１／ＨＢＭのｍＲＮＡレベルを決定した。夾雑プラスミドＤＮＡを制御するために、事前にＲＴステップを行うか行わないでＰＣＲを行い、ＲＴステップを行わない場合、非常に低レベルのＺｍａｘ１／ＨＢＭ　ｍＲＮＡが検出された。しかし、ＲＴステップを行った場合、ＣＭＶ－ｂ－ガラクトシダーゼコントロールでトランスフェクトした細胞と比較して、ＣＭＶｂＡｃｔｉｎ－プロモーター構築物でトランスフェクトした細胞ではＨＢＭおよびＺｍａｘ１　ｍＲＮＡは１０００倍増加した。Ｉ型コラーゲンプロモーター構築物は、ＨＢＭおよびＺｍａｘ１　ｍＲＮＡは約１０倍増加し、これは、ＣＭＶβＡｃｔｉｎプロモーターと比較したこのプロモーターのより脆弱な性質と一致する。図１７を参照のこと。
【０４５１】
２１．８．２　ＨＢＭ／Ｚｍａｘ１発現用の種特異的ＴａｑＭａｎ（登録商標）試薬
Ｚｍａｘ１／ＨＢＭのための種特異的ＴａｑＭａｎ（登録商標）プライマーおよびプローブ組を開発した。ＨＯＢ細胞およびマウスＭＣ－３Ｔ３－Ｅ１骨芽細胞を使用した一連の実験では、マウスバックグラウンドおよびその逆でのＺｍａｘ１／ＨＢＭ　ｍＲＮＡを測定した。これらの試薬は、種特異的発現の検出および定量に有用である。図１８に示すように、プライマー組は、マウスおよびヒト細胞株で種特異的である。さらに、図１９は、マウスＲＮＡのバックグラウンドにおけるヒトＺｍａｘ１　ＲＮＡの定量測定を示す。これらのＴａｑＭａｎ（登録商標）組を使用して、マウストランスジェニック株で発現したヒトまたはマウスのＨＢＭまたはＺｍａｘ１（または他のＨＢＭ様変異型）のメッセージを決定することができる。
【０４５２】
種特異的ＴａｑＭａｎ（登録商標）試薬は、トランスジェニックマウス組織中の内因性Ｚｍａｘ１　ｍＲＮＡレベルおよびヒトＺｍａｘ１／ＨＢＭ　ｍＲＮＡレベルの特徴づけのための新規のツールである。これらのツールは、ノーザンハイブリダイゼーションおよび標準的なＲＴ－ＰＣＲなどの他の従来の方法を超えるいくつかの利点を有する。これらの利点のうちのいくつかを以下に示す。（１）特異性（小領域（１００ｂｐ未満）は増幅プライマーであり、プローブを交差反応性を示さないか最小と予測される領域を配列決定するように選択するので）；（２）スピード（この手順はあまり手間がかからないので）；（３）正確（真に定量的なので）；および（４）感受性（少量の出発材料（すなわち、ＲＮＡ）しか必要とせず、シグナル対ノイズ比が高いので）。これらの利点は、骨由来のｍＲＮＡを大量に得ることが困難であるので、骨中のｍＲＮＡレベルの分析でとくに重要である。したがって、ＨＢＭおよびＺｍａｘ１発現のＴａｑＭａｎ（登録商標）分析のために開発したプライマー組は、本発明の重要な実施形態である。当業者は、本明細書中に記載のプライマーは好ましい実施形態であり、プライマーの伸長もしくは短縮または塩基置換などの修飾は、得られた核酸が実質的に同一の機能を果たしつづける限り、本発明の範囲内であることを認識する。
【０４５３】
２１．８．３　トランスジェニックマウス中でのＨＢＭ発現
ＣＭＶｂＡｃｔｉｎ（ＨＢＭＭＣＢＡ）構築物のために８匹のトランスジェニック創始動物を産生し、系統を確立するために交配プログラムを開始した。図２０に示したＴａｑ

Ｍａｎ（登録商標）分析によって決定したｍＲＮＡ発現は、４系統における種々の骨発現レベルを示した。脛骨では、発現レベル（ＨＯＢ－０３－Ｃ５細胞における内因性Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）と比較）を、以下の範囲を示した。系統１８（１０～１１倍）；系統２（７～１０倍）；系統１３（１～２倍）；および系統２８（１倍）。公知のプロモーター活性に基づいて予想したところ、他の組織でも発現が検出された。系統２および１３について、心臓で最も高いＨＢＭ発現レベルが見出された。ＴａｑＭａｎ（登録商標）遺伝子型同定アッセイは、潜在的なホモ接合性動物についてスクリーニングする。

【０４５４】

Ｉ型コラーゲン（ＨＢＭＭＴＩＣ）構築物のために６匹のトランスジェニック創始動物を産生し、系統を確立するために交配プログラムを開始した。最初に試験した２つの系統でｍＲＮＡの発現が認められた。系統１９では、脛骨および大腿骨において、ＨＯＢ－０３－Ｃ５細胞におけるＺｍａｘ１よりもそれぞれ７～８倍および１９～２０倍の発現が認められた。系統３５では、脛骨および大腿骨で低レベルの発現が認められた。

【０４５５】

２１．９　ＨＢＭトランスジェニックマウスにおけるin vivo ＤＸＰ

２１．９．１　ＨＢＭＭＣＢＡ構築物

図２１（Ａ～Ｃ）に示す５週間および９週間の測定点での限定数のマウスの最初の分析では、その時点まで試験した１つの系統はコントロールと比較してＢＭＤ値が高いことを示した。５週間では、大腿骨、脊髄、および全身におけるＨＢＭＭＣＢＡ系統２（ｎ＝１１）ＢＭＤは、野生型コントロールと比較してそれぞれ２１％、２２％、および１０％高かった。９週間（ｎ＝３）では、これらのＢＭＤの増加は、それぞれ１９％、３２％、１２％であった。

【０４５６】

２１．９．２　ＨＢＭＭＴＩＣ構築物

図２１（Ｄ～Ｆ）に示す５週間および９週間の測定点での限定数のマウスの最初の分析では、その時点まで試験した２つの系統はコントロールと比較してＢＭＤ値が高いことを示した。５週間では、大腿骨、脊髄、および全身におけるＨＢＭＭＴＩＣ系統１９（ｎ＝５）ＢＭＤは、野生型コントロールと比較してそれぞれ６３％、７０％、および４１％高かった。９週間（ｎ＝２）では、これらのＢＭＤの増加は、それぞれ５２％、６４％、３７％であった。

【０４５７】

５週間では、大腿骨、脊髄、および全身におけるＨＢＭＭＴＩＣ系統３５（ｎ＝１）ＢＭＤは、野生型コントロールと比較してそれぞれ４％、４７％、および６％高かった。９週間（ｎ＝３）では、これらのＢＭＤの増加は、それぞれ３２％、４３％、１８％であった。

【０４５８】

これらの結果は、この時点まで分析した系統は高骨量表現型を示すことを示す。この時点での限定数の系統および動物由来のｍＲＮＡ発現とＢＭＤ表現型との間に明らかな相関関係はないようであった。例えば、ＨＢＭＭＣＢＡ系統２およびＨＢＭＭＴＩＣ系統１９は、脛骨において類似のＨＢＭ　ｍＲＮＡレベルを示すが、表現型は系統１９でより明らかである。また、ＨＢＭＭＴＩＣ系統３５は、ＨＢＭＭＣＢＡ系統２と比較した場合は発現レベルは非常に低いが、ＨＢＭＭＴＩＣ系統３５はより強力な表現型を有するようである。これらの所見は、表現型に影響を与え得る細胞発現が異なる可能性を示す。

【０４５９】

概して、トランスジェニックマウス由来のＢＭＤの結果は、ＨＢＭ罹患家系で認められた表現型と類似の程度を示す（Ｊｏｈｎｓｏｎら、１９９７、Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、６０、１３２６～１３３２）。例えば、罹患個体で測定された脊椎ＢＭＤは、非罹患家族メンバーよりも約３４～６３％高い。トランスジェニック動物由来の脊椎ＢＭＤデータは、９週齢の正常な動物よりも約３０～７０％高い。

【０４６０】

２１．９．３　トランスジェニック動物のex vivo分析

非侵襲性骨画像による動物のモニタリングによる選択されたトランスジェニック系統で検出された骨密度の増加をさらに試験するために、直接骨密度測定分析および組織学的分析のための５週齢および９週齢のこれらの系統の動物で剖検を行った。左大腿骨を単離し、きれいにし、ＸＣＴ　Ｒｅｓｅａｒｃｈの末梢型定量性コンピュータ断層装置（ｐＱＣＴ；Ｓｔｒａｄｔｅｃ　Ｍｅｄｉｚｉｎｔｅｃｈｎｉｋ、Ｐｆｏｒｚｈｅｉｍ、Ｇｅｒｍａｎｙ）に置いた。大腿骨の遠位末端を置き、全身および骨梁測定のためのためにこの点から２．５ｍｍ近位からｐＱＣＴスキャニングを開始した。皮層測定のためのｐＱＣＴスキャンを、最初のスキャンから３．５ｍｍ近位（すなわち、遠位末端から６ｍｍ近位）で開始した。ｐＱＣＴスキャンは０．５ｍｍ厚であり、ボクセル（すなわち、三次元ピクセル）サイズ０．０７ｍｍであり、スライスを通して３６０枚の投影図からなった。スキャンの完了後、画像をモニタ上にディスプレイし、各スキャンについて大腿骨全体を含む目的の領域の輪郭を示した。柔組織を反復アルゴリズムを使用して自動的に除去し、第１のスライス中の残りの骨の密度（総密度）を決定した。骨の外側の５５％を、同心らせん状に剥ぎ取り、第１のスライスの残存する骨の密度（骨梁密度）を、ｍｇ／ｃｍ^{3}で報告した。第２のスライスでは、皮層と骨梁との間の境界を、反復アルゴリズムを使用して決定し、皮層骨の密度を決定した。

【０４６１】

系統２Ｆ１　ＣＭＶｂＡｃｔｉｎ－ＨＢＭ５週齢トランスジェニック動物の分析により、総密度、骨梁密度、および皮質密度が、非トランスジェニック雄マウスに対するトランスジェニック雄マウスでそれぞれ２０％、３７％、および４％高いことが明らかとなった。５週齢の１９系統Ｉ型コラーゲン－ＨＢＭトランスジェニックマウスでは、その非トランスジェニック同腹子を超えるなおさらなる劇的な骨密度の増加が明らかであった。総密度、骨梁密度、および皮質密度は、それぞれ５３％、１０４％、および５％高かった。系統１９動物では、表現型は９週齢で維持されることが見出され、総密度、骨梁密度、および皮質密度は非トランスジェニック同腹子よりも４４％、１０１％、および６％高かった。１７週では、総密度および骨梁密度は、それぞれ４６％および２０２％増加した。３つ全ての測定点での系統１９の全骨梁密度に対する効果は、統計的に有意に高かった（ｐ＜０．００１）。骨表現型発現のいくらか異なるパターンは、Ｉ型コラーゲン－ＨＢＭトランスジェニック３５系統の雄から明らかであった。５週齢では、総密度、骨梁密度、および皮質密度は、わずかに高かった（それぞれ７％、４％、および４％）。しかし、９週齢では、これらのパラメータの明白且つ統計的に有意な（それぞれＰ＜０．０５、０．００５、および０．００１）増加が明らかとなった（すなわち、２５％、３７％、および４％）。特に、骨細胞分裂段階に影響を受ける「骨特異性」Ｉ型コラーゲン導入遺伝子ををを使用した表現型の年齢関連発現パターンの相違は予想外である。５週齢の系統２動物および系統１９動物は共に、脛骨サンプル中でＨＢＭ　ｍＲＮＡ発現レベルが類似しており、これらのレベルは、この年齢で明らかな骨表現型を示さない他の系統よりも有意に高かった（７～８倍超）。Ｉ型コラーゲンプロモーターによって駆動される系統１９は、系統２と異なり、骨以外での組織中での導入遺伝子の発現が非常に低い。５週齢では、系統３５動物は、骨では発現レベルは低く、他の組織では発現しない。ＨＢＭ／Ｚｍａｘ１特異的抗体を使用した頭蓋骨切片の免疫組織化学により、５週齢の系統２および１９ならびに９週齢の系統３５由来のトランスジェニック動物の骨細胞で非トランスジェニック同腹子と比較してはるかに強い染色が明らかである。

【０４６２】

ｐＱＣＴ分析によって明らかとなった所見を、μＣＴ装置（Ｓｃａｎｃｏ）を使用してより高い分解能でさらに試験した。画像化される領域が約４ｍｍ近位の大腿骨遠位末端を含み、軟骨性連結軸に対して垂直となるように大腿骨を置いた。骨端成長板への重複が最小で２００スキャンスライス分（９ｍｍ厚）近位に延長するようにμＣＴ測定開始の基準線を引いた。μＣＴ測定の完了後、関節丘が完全に融合した第１のスライスを同定した。目的の領域を、最大量の骨梁空間を含む一方で、皮質を除外するように輪郭を示した。第

１の３０スライスについて、目的の領域を、５スライス毎に描写および融合した。残りの１０５スライスについて、目的の領域を１０～２０スライス毎に描写した。骨梁空間が規則正しいほど、目的の領域を描写する頻度は低くなる。描写後、目的の各領域を、前の描写と融合した。１３５スライス全てについての目的の領域が確立した後、３５０の閾値設定を使用して、三次元評価を行った。

【０４６３】

ｐＱＣＴによって同定された骨密度の増加を確認し、μＣＴによって骨構造エレメントを含むように拡大した。系統２トランスジェニック動物では、μＣＴ骨体積／総体積、連結密度、および骨梁の厚さは、それぞれ５０％、８３％、および１２％高かった。連結密度および骨梁の厚さの指標により、密度の増加は構造強度の増加にも関連することが示唆される。骨表面／骨体積は、トランスジェニック雄で１７％低く、再吸収表面および小窩がより小さいことが示唆され得る。骨梁応答を、非脱灰Ｇｏｌｄｎｅｒ染色切片の組織学的評価によってさらに確認したところ、トランスジェニック雄の遠位大腿骨の骨幹端中の骨中無機質領域が３６％広いことが明らかとなった。動的組織形態測定分析により、カルセイン二重標識によって決定した骨無機質付加率（＋１００％）における増加に関しては、トランスジェニックにおける骨の増大を部分的に担い得ることが明らかとなった。系統１９における骨梁に対するｐＱＣＴによって明らかな劇的効果は、骨量／総体積、骨梁数、骨梁の厚さ、および連結密度がトランスジェニック雄でそれぞれ１３０％、４５％、３０％、および１２１％高いというμＣＴ評価によって支持された。系統２で示されるように、骨表面／骨体積は、トランスジェニック雄で低かった（－３６％）。これらの全ての効果は、ｐ＜０．０１で統計的に有意であった。５週齢の系統１９で認められた骨表現型は９週齢動物で保持され、骨量／総体積、骨梁数、および連結密度は非トランスジェニック同腹子よりも１２５％、３８％、および１１０％高かった。

【０４６４】

系統３５トランスジェニックのμＣＴ分析により、他の２つの系統よりもいくらかパターンが異なることが明らかとなった。系統３５由来の５週齢雌におけるｐＱＣＴによって同定された密度が控えめにしか増大しなかったことと対照的に、画像分解能がより高く、且つより大量のサンプルが含まれるｍＣＴを使用すると統計的に有意な（ｐ＜０．０１）効果が認められた。骨量／総体積、骨梁の厚さ、および連結密度は、３５％、９％、および２７％高かった。系統３５由来の５週齢雄で類似の結果が得られ、骨量／総体積および連結密度の３７％および４５％の増加はμＣＴ分析によって明らかとなり、ｐＱＣＴではわずかな増加しか認められなかった。系統３５の雄トランスジェニックとその非トランスジェニック同腹子との間の相違は年齢とともに増加するようであり、総密度（２５％）および骨梁密度（３７％）の統計的に有意な増加は、９週齢のｐＱＣＴによって明らかとなった。μＣＴの結果は、この系列における骨表現型の年齢に関連する相違を支持し、骨量／総体積および連結密度の観点からのトランスジェニック動物と非トランスジェニック動物との間の相違は、５週間で認められた値のほぼ２倍である（それぞれ７０％および８３％）ことを示す。トランスジェニック動物で認められた骨体積の増加は、ＨＢＭ家系の成体雄罹患メンバー由来の骨生検サンプルで検出されたこのパラメータの有意な増加と一致する。トランスジェニック系統で影響を及ぼすことが認められた他のパラメータは、マウスのこの株で１７～２０週齢で起こるピーク／成体骨量を増加させる変化を反映し得る。

【０４６５】

過剰発現トランスジェニック系統で認められる骨密度および骨構造の変化により、潜在的により高い生体機械的強度が示唆される。これを、５週齢の１９系統雄由来の大腿骨の３点曲げ強さの評価によって直接試験した。大腿骨から柔組織を除去し、デジタルカリパスを使用して大腿骨の長さを測定した。骨膜および骨内膜の外周ならびに皮層の厚さを、ｐＱＣＴを使用して骨の遠位末端から６ｍｍを測定した。次いで、中心軸の中央が５ｍｍ間隔で置かれた固定支持物から等間隔となるように大腿骨を準備台に置いた。Ｉｎｓｔｒｏｎ５５４３負荷デバイスのクロスバーを中心軸上に置き、骨折するまで１ｍｍ／分のスピードで負荷をかけた。負荷対置換曲線を作成し、Ｉｎｓｔｒｏｎ　Ｍｅｒｌｉｎソフト

ウェアを使用してピーク負荷を決定した。強度が７５％増加し（ｐ＜０．０１）、これは皮質厚さの増加に対する骨膜の外周の増加によると考えられる。したがって、ＨＢＭトランスジェニック動物で認められる骨密度および骨幾何学が変化して生体機械的強度が増加したようである。

【０４６６】

ＬＤＬ関連受容体タンパク質のクラス内のＨＢＭ／Ｚｍａｘ１の関連を考慮して、変異が脂質プロフィールに影響を与えるかを決定することは興味深い。実際、ＨＢＭ家系（すなわち、８人の罹患メンバーおよび７人の非罹患メンバー）における脂質研究により、罹患メンバーでトリグリセリドレベルおよびＶＬＤＬレベルが実質的に低いことが明らかとなっている。トランスジェニック系統由来の血清サンプルを、Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ（コレステロール用）およびＲｏｃｈｅ（トリグリセリド用）の試薬を使用してＨｉｔａｃｈｉ９１１装置で分析した。コレステロールを、ｏ－キノンイミン色素（コレステロールとの酵素反応後の形成される）を介して３７℃で５０５ｎｍで側光した。酵素によるトリグリセリド測定法は、トリグリセリドと脂肪酸との加水分解後のトリグリセリドのグリセロール部分の決定に基づく。酵素反応の最終色素生成物を５０５ｎｍで測定した。５週齢の雄系統２トランスジェニックでは、血清コレステロールがわずかしか減少しないにもかかわらず、血清トリグリセリドレベルは、トランスジェニックでその非トランスジェニック同腹子と比較して２６％減少した。限定数の９週齢の系統２動物サンプルでは、トリグリセリドレベルは２０％低いままであった。同様に、５週齢では、系統１９由来の雄トランスジェニックにおけるトリグリセリドレベルは３２％低かった。対照的に、５週齢では、系統３５の雄および雌トランスジェニックは共にトリグリセリドレベルは低くなかった。５週齢の系統３５動物が統計的により高い骨体積／総体積を有するという事実により、脂質の変化は骨表現型に直接関連しないことが示唆される。これは、９週齢の系統３５動物のトリグリセリドレベルの減少はわずかしかないが（１１％）、５週齢よりも実質的に骨密度がより高いという事実によって支持されるようである。これらの系統における導入遺伝子発現の異なるレベルおよび部位のために、本発明者らは、血清脂質レベルがＨＢＭ／Ｚｍａｘ１による骨表現型に優先的に影響を与える薬剤の代理マーカーとして役立つことができるという可能性を排除することができない。

【０４６７】

ＨＢＭまたはＨＢＭ様遺伝子に基づいたこれらおよび他のトランスジェニック系統は、骨ホメオスタシスの性質を調査するための価値のあるモデルとして役に立つ。全種の骨密度は、その習慣的に負荷される条件に適応する。ＨＢＭ家系およびトランスジェニック系統では、骨格のセンサー／エフェクターシステムはより高い負荷シグナルを感知し、骨密度がより高くなる。骨負荷の増加により骨密度が増加することおよび非負荷または不使用により骨密度が喪失することを示す実験モデルを確立した。これらの実験模範におけるトランスジェニック動物の骨格の組織学的、生化学的、および遺伝学的応答の評価により、骨ホメオスタシスを担うセンサー／エフェクターシステムに関する多くの情報が得られる。骨代謝回転の変化（ステロイド欠損誘導性骨減少症および加齢関連骨減少症が含まれるが、これらに限定されない）に関する他の確立されたモデルにおけるトランスジェニック動物の適用により、骨ホメオスタシスにおけるＺｍａｘ１の役割およびＨＢＭ変異によって誘導される好ましい変化の性質が洞察される。

【０４６８】

２１．９．４　ＨＢＭ遺伝子ターゲティング

Ｚｍａｘ１　ＫＩ／ＫＯ遺伝子ターゲティングベクターを、１２９ＳｖＥｖ、Ｃ５７ＢＬ／６　ＥＳ細胞および１２９ＥＳ細胞にエレクトロポレーションする。ゲノムＤＮＡの制限フラグメント長分析およびＰＣＲ増幅フラグメントの配列決定を使用して、遺伝子ターゲティングしたクローンを同定することができる。遺伝子ターゲティングベクターのノックインバージョンにより、マウスゲノムへの影響を最小にしながら内因性Ｚｍａｘ（ＬＲＰ５）ゲノム遺伝子座にＨＢＭ変異を移入可能である。これにより、より天然の環境で（すなわち、トランスジェニックマウスまたはトランスフェクトした細胞株などの過剰発

現モデル中ではない）ＨＢＭタンパク質を産生可能である。遺伝子ターゲティングベクターのノックアウトバージョンを、１つの機能的ＬＲＰ５対立遺伝子を喪失させる可能性がある転写終止配列を含むように操作した。この変異を有するヘテロ接合性動物の交配により、ヌル対立遺伝子にホモ接合性の胚が産生される。遺伝子ターゲティングベクターの異なるデザインでは、内因性ＬＲＰ５遺伝子の条件的ノックアウトの産生を容易にする方法でｌｏｘＰ部位を位置付けることができる。Ｃｒｅリコンビナーゼの存在下で、ｌｏｘＰ部位の間のＬＲＰ５遺伝子の臨界領域を欠失させることにより、１つの機能的対立遺伝子が潜在的に喪失する。動物交配を使用して、ヌル対立遺伝子を有するホモ接合体を作製する。他のリコンビナーゼ酵素系（同族ｆｒｔ部位と組み合わせたｆｌｐリコンビナーゼなど）を使用して、欠失させることができる。リコンビナーゼを先に記載された多数の方法（胚へのプラスミド注入およびＣｒｅを発現するトランスジェニック動物の使用が含まれる）で投与することができる。ＬＲＰ５遺伝子が至る所または組織特異的に欠失されて条件的ノックアウトが得られる様式で、Ｃｒｅ発現の駆動に使用するプロモーターを選択することができる。さらなる実施形態では、Ｃｒｅ酵素自体の発現を、ＧｅｎｅＳｗｉｔｃｈおよびテトラサイクリン模範などの誘導系を使用して条件付にすることができる。

【０４６９】

２１．９．５　トランスジェニック動物および細胞の使用

本発明のトランスジェニック動物および細胞は、ＨＢＭ表現型の代理マーカーの同定方法における有用なツールである。本発明によって提供される代理マーカーはまた、見込みのある治療法の評価およびスクリーニングのための有用なツールである。ＨＢＭ遺伝子を保有する個体は、骨量が多い。ＨＢＭ遺伝子は、骨発達に関与する他の分子の活性、レベル、発現パターン、および修飾状態の変化によってこの表現型を出現させる。種々の確立された技術を使用して、その活性、レベル、発現パターン、および修飾状態がＺｍａｘ１遺伝子を含む系とＨＢＭ遺伝子を含む系との間で異なる分子、好ましくはタンパク質またはｍＲＮＡを同定可能である。このような系は、例えば、無細胞抽出物、細胞、組織、または生きた生物（マウスまたはヒトなど）であり得る。Ｚｍａｘ１の変異形態について、Ｚｍａｘ１の完全な欠失、タンパク質の細胞外または細胞内部分を欠く変異、またはＺｍａｘ１遺伝子中の任意の他の変異を使用することができる。Ｚｍａｘ１タンパク質の産生を阻害するためにアンチセンスＺｍａｘ１　ＲＮＡまたはオリゴヌクレオチドの発現を使用することも可能である。ＨＢＭの変異形態について、ＨＢＭの完全な欠失、ＨＢＭタンパク質の細胞外または細胞内部分を欠く変異、またはＨＢＭ遺伝子中の任意の他の変異を使用することができる。ＨＢＭタンパク質の産生を阻害するためにアンチセンスＨＢＭＲＮＡまたはオリゴヌクレオチドの発現を使用することも可能である。

【０４７０】

Ｚｍａｘ１系とＨＢＭ系との間の比較によって同定される分子を、医薬品開発またはヒトもしくは動物の骨疾患の診断における代理マーカーとして使用することができる。あるいは、このような分子を、骨疾患の治療で使用することができる。Ｓｃｈｅｎａら、１９９５、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２７０、４６７～７０を参照のこと。

【０４７１】

例えば、マウスホモログ遺伝子座中にＨＢＭ遺伝子またはＨＢＭ様変異型を保有するトランスジェニックマウスを構築する。遺伝子型ＨＢＭ／＋のマウスは健康に生存可能であり、骨量が増加する。骨量の増加についての代理マーカーを同定するために、ＨＢＭ／＋（すなわち、ヘテロ接合性）および同系＋／＋（すなわち、野生型）マウスを屠殺する。骨組織ｍＲＮＡを、各動物から抽出し、＋／＋個体で発現したｍＲＮＡに対応する「遺伝子チップ」を構築する。異なる組織由来のｍＲＮＡを各遺伝子型の動物から単離し、逆転写し、蛍光標識し、固体支持体に固定した遺伝子フラグメントとハイブリダイゼーションさせる。２つの集団の蛍光強度の比は、＋／＋およびＨＢＭ／＋動物における特異的ｍＲＮＡ相対吸光度の指標である。あるいは、ｍＲＮＡを、野生型およびトランスジェニック動物から単離することができる。これらのサンプルから調製したｃＤＮＡをin vitroで転写して、特注またはＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘによって製造された市販の遺伝子アレイチップ

用の標識ｍＲＮＡが得られる。表現型の機能として発現が変化した遺伝子組を、種々の日常的なコンピュータ分析によって同定することができる。野生型コントロールと比較して過剰および過小発現したｍＲＮＡをコードする遺伝子は、ＨＢＭ遺伝子またはＨＢＭ様遺伝子によって同格に調節される遺伝子の候補である。

【０４７２】

すでに発見されたタンパク質と同一のシグナル伝達カスケードの一部である新規のタンパク質の同定のための１つの標準的手順を以下に示す。細胞を放射性リンで処理し、すでに発見されたタンパク質の活性を増減するように操作する。次いで、細胞中の他のタンパク質のリン酸化部位を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびオートラジオグラフィーまたは類似の技術によってモニターする。公知のタンパク質の活性レベルを、多数の方法（例えば、薬物もしくは抗体などの特異的インヒビターを使用した野生型変異タンパク質の比較、公知の細胞外タンパク質の単純な添加または無添加、または公知のタンパク質発現のアンチセンスインヒビターの使用が含まれる）によって操作することができる（Ｔａｍｕｒａら、１９９８、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２８０、１６１４～７；Ｍｅｎｇ、１９９８、ＥＭＢＯ Ｊ．、１７、４３９１～４０３；Ｃｏｏｐｅｒら、１９８２、Ｃｅｌｌ、１、２６３～７３）。

【０４７３】

別の例では、異なるレベルでリン酸化したタンパク質を、Ｚｍａｘ１のセンスまたはアンチセンスｃＤＮＡのいずれかを発現するＴＥ８５骨肉種細胞で同定する。ＴＥ８５細胞は、通常、高レベルのＺｍａｘ１を発現する（Ｄｏｎｇら、１９９８、Ｂｉｏｃｈｅｍ．＆Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．、２５１、７８４～９０）。センス構築物を含む細胞は、さらにより高いレベルのＺｍａｘ１を発現し、アンチセンス構築物を発現する細胞は低レベルで発現する。細胞を、^{32}Ｐの存在下で成長させ、回収し、溶解し、溶解物をＳＤＳポリアクリルアミドゲルで溶解してタンパク質を分離し、ゲルをオートラジオグラフィーに供する（Ａｕｓｕｂｅｌら、「現代の分子生物学プロトコール」、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、１９９７）。センス細胞株とアンチセンス細胞株との間で強度が異なるバンドはリンタンパク質を示し、そのリン酸化状態または絶対的レベルは、Ｚｍａｘ１レベルに応答して変化する。^{32}Ｐ標識の代替物として、非標識タンパク質を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、プローブとして市販の抗リンチロシン抗体を使用した免疫ブロッティングに供することができる（Ｔｈｏｍａｓら、１９９５、Ｎａｔｕｒｅ、３７６、２６７～７１）。アンチセンスＲＮＡ発現の代替物として、化学修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドでのトランスフェクションを使用することができる（Ｗｏｏｌｆら、１９９０、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１８、１７６３～９）。

【０４７４】

骨粗鬆症などの多数の骨障害は、発症が遅く、治療に対する応答が遅い。したがって、骨発達および鉱化についての代理マーカーの開発が有用である。このようなマーカーは、骨障害の治療および骨障害の後の発症リスクを示し得る患者の診断で有用であり得る。好ましいマーカーの例は、例えば、米国特許第５，４５５，１７９号、同第５，６４１，８３７号、および同第５，６５２，１１２号（その開示全体が本明細書中で参照することによって組み込まれる）に記載のＮ末端およびＣ末端テロペプチドマーカーである。ＨＩＶ疾患領域では、ＣＤ４数およびウイルス量は、疾患進行の有用な代理マーカーである（Ｖｌａｈｏｖら、１９９８、ＪＡＭＡ、２７９（１）、３５～４０）。骨疾患領域では類似の代理マーカーが必要である。

【０４７５】

代理マーカーは、試験が容易であり、非特異的影響に対して比較的感受性を示さない任意の特徴を有し得る。例えば、代理マーカーは、組織または血清中のタンパク質またはｍＲＮＡなどの分子であり得る。あるいは、代理マーカーは、苦痛に対する感受性または反射反応などの診断の徴候であり得る。

【０４７６】

さらに別の例では、骨量増加の代理マーカーを、ＨＢＭ遺伝子またはＨＢＭ様遺伝子を

保有するヒトの家系を使用して同定する。ＨＢＭ遺伝子またはＨＢＭ様遺伝子を保有する３個体および保有しない密接に関連する３個体から血液サンプルを採取する。これらの個体由来の血清中のタンパク質を、一方の次元でタンパク質をサイズで分離し、他方の次元でタンパク質を等電点で分離する二次元ゲルシステムで電気泳動する（Ｅｐｓｔｅｉｎら、１９９６、Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ、１７、１６５５～７０）。タンパク質に対応するスポットを同定する。正常な親類と比較してＨＢＭ個体のいくつかのスポットは、量が異なるか位置がわずかに異なると予想される。これらのスポットは、候補代理マーカーであるタンパク質に対応する。タンパク質の同一性を微量配列決定によって決定し、タンパク質に対する抗体を、診断試験手順用の標準的方法によって産生することができる。ＨＢＭタンパク質または他の候補代理マーカーの診断アッセイには、ヒトの体液、膜、骨、細胞、組織、またはその抽出物中のＨＢＭを検出するための本発明に記載の抗体およびレポーター分子の使用が含まれる。抗体を、検出可能なシグナルを提供する物質との共有結合または非共有結合によって標識することができる。多数の科学論文および特許書類では、放射性核種、酵素、蛍光物質、化学発光物質、または色原体を含む種々のレポーター分子または標識が記載されている（米国特許第３，８１７，８３７号、同第３，８５０，７５２号、同第３，９３９，３５０号、同第３，９９６，３４５号、同第４，２７７，４３７号、同第４，２７５，１４９号、および同第４，３６６，２４１号）。トランスジェニック動物および遺伝子改変動物もまた、代理マーカー同定法で役立つことができる。

【０４７７】

これらの抗体を使用して、正常な個体および骨障害（骨粗鬆症、偽神経膠腫を伴う骨粗鬆症、エンゲルマン病、リビング病、高ホスファターゼ血症、ヴァン・ビューレン病、メロレオストーシス、大理石骨病、ピクノディスオストーシス、骨硬化症、骨斑紋症、末端肥大症、パジェット病、線維性骨異形成、管狭窄、骨形成不全症、副甲状腺機能低下症、偽性甲状腺機能低下症、偽性偽性甲状腺機能低下症、原発性および二次性副甲状腺機能亢進症および関連症候群、高カルシウム尿症、甲状腺の髄様癌、骨軟化症、ならびに他の疾患など）を罹患した患者における候補代理マーカーのレベルを測定する。抗体を使用した薬物使用状況における血清中のタンパク質レベルの測定技術は十分に確立されている。特定の疾患または疾患型の個体における高レベルまたは低レベルで一貫して存在するタンパク質は、有用な代理マーカーである。

【０４７８】

代理マーカーを、骨障害の診断で使用することができる。例えば、頻繁に骨折して医師に診断される子供について考慮する。基本的な原因は、幼児虐待、子供の不適切な挙動、または骨障害であり得る。骨障害を迅速に試験するために、上記の抗体を使用して代理マーカータンパク質レベルを測定する。

【０４７９】

開発された薬物が有効である可能性の指標として代理マーカーの修飾状態のレベルを測定することができる。骨の発達または鉱化は長期の観察が必要であり得るので、骨障害治療における代理マーカーの使用は特に便利である。例えば、「ＨＢＭ誘導性ｍＲＮＡ組」と呼ばれる骨ｍＲＮＡ組は、上記のように＋／＋マウスと比較してＨＢＭ／＋マウスで過剰発現することが認められる。この組の発現を、代理マーカーとして使用することができる。詳細には、＋／＋マウスの化合物での処置によりＨＢＭ誘導性ｍＲＮＡ組が過剰発現する場合、この化合物を、さらなる開発のための有望な候補とみなす。

【０４８０】

本発明は、任意の種々の薬物スクリーニング技術におけるＺｍａｘ１タンパク質、ＨＢＭタンパク質、ＨＢＭ様タンパク質、またはその結合フラグメントの使用による化合物のスクリーニングに特に有用である。

【０４８１】

このような試験で使用されるＺｍａｘ１タンパク質、ＨＢＭタンパク質、またはそのフラグメントは、溶液中で遊離していても、固体支持体に結合されていても、細胞表面上に存在していてもよい。１つの薬物スクリーニング法は、好ましくは競合結合アッセイでタ

ンパク質またはフラグメントを発現する組換え核酸で安定に形質転換された真核生物または原核生物の宿主を使用する。生きているか固定形態のこのような細胞を、標準的に結合アッセイに使用することができる。例えば、Ｚｍａｘ１タンパク質、ＨＢＭタンパク質、またはそのフラグメントと試験される薬剤との間の複合体の形成を測定することができるか、Ｚｍａｘ１タンパク質、ＨＢＭタンパク質、またはフラグメントと公知にリガンドとの間の複合体の形成が試験する薬剤によって妨害される程度を試験することができる。

【０４８２】

したがって、本発明は、このような薬剤をＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）タンパク質、ＨＢＭタンパク質、またはそのフラグメントに接触させるステップと、当分野で周知の方法によって（ｉ）薬剤とＺｍａｘ１タンパク質、ＨＢＭタンパク質、またはフラグメントとの間の複合体の存在、または（ｉｉ）Ｚｍａｘ１タンパク質、ＨＢＭタンパク質、またはフラグメントとリガンドとの間の複合体の存在をアッセイするステップとを含む、薬物スクリーニング法を提供する。このような競合結合アッセイでは、Ｚｍａｘ１タンパク質、ＨＢＭタンパク質、またはフラグメントを、典型的には標識する。遊離のＺｍａｘ１タンパク質、ＨＢＭタンパク質、またはフラグメントをタンパク質：タンパク質複合体中の存在から分離し、遊離（すなわち、非複合体化）標識の量は、それぞれ試験される薬剤のＺｍａｘ１もしくはＨＢＭへの結合またはＺｍａｘ１もしくはＨＢＭ：リガンド結合の妨害の基準である。

【０４８３】

別の薬物スクリーニング技術は、Ｚｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質に対して適切な結合親和性を有する化合物の高処理スクリーニングを提供し、ＷＯ８４／０３５６４に詳述されている。簡単に述べれば、多数の異なる小ペプチド試験化合物を、固体基質上（プラスチックピンまたはいくつかの他の表面）で合成する。ペプチド試験化合物を、Ｚｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質と反応させ、洗浄する。次いで、結合したＺｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質を、当分野で周知の方法によって検出する。精製したＺｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質を、上記の薬物スクリーニング技術用のプレート上に直接被覆することができる。しかし、タンパク質に対する非中和抗体を使用して、固相上にＺｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質を固定するための抗体を捕捉することができる。

【０４８４】

本発明はまた、Ｚｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質に特異的に結合することができる中和抗体が、Ｚｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質またはそのフラグメントへの結合について化合物と競合する競合的薬物スクリーニングアッセイの使用を意図する。この様式では、抗体を使用して、Ｚｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質の１つまたは複数の抗原決定基を共有する任意のペプチドの存在を検出することができる。

【０４８５】

さらなる薬物スクリーニング技術は、非機能的Ｚｍａｘ１遺伝子またはＨＢＭ遺伝子を有する真核生物宿主細胞株または細胞（上記のものなど）の使用を含む。これらの宿主細胞株または細胞は、Ｚｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質レベルで欠損している。宿主細胞株または細胞を、薬物化合物の存在下で成長させる。宿主細胞の成長速度を測定して、化合物がＺｍａｘ１またはＨＢＭ欠損細胞の成長を調節することができるかどうかを決定する。

【０４８６】

合理的な薬物デザインの目的は、例えば、より活性または安定なタンパク質形態であるか例えばin vivoでタンパク質機能を増強または妨害する薬物を構築するための目的の生物学的に活性なタンパク質またはこれらが相互作用する小分子（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、インヒビター）の構造アナログを産生することである。例えば、Ｈｏｄｇｓｏｎ、１９９１、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、９、１９～２１を参照のこと。１つのアプローチでは、第１に、Ｘ線結晶学、コンピュータモデリング、最も典型的には、アプローチの組み合わせによって、目的のタンパク質（例えば、Ｚｍａｘ１タンパク質また

はＨＢＭタンパク質）または、例えば、Ｚｍａｘ１またはＨＢＭの受容体またはリガンド複合体の三次元構造を決定する。頻度は低いが、タンパク質構造に関する有用な情報を、相同タンパク質の構造に基づくモデリングによって得ることができる。合理的な薬物デザインの例は、ＨＩＶプロテアーゼインヒビターの開発である（Ｅｒｉｃｋｓｏｎら、１９９０、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４９、５２７～３３）。さらに、ペプチド（例えば、Ｚｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質）を、アラニンスキャンによって分析する（Ｗｅｌｌｓ、１９９１、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、２０２、３９０～４１１）。この技術では、アミノ酸残基を、Ａｌａに置換し、ペプチド活性に対するその効果を決定する。ペプチドの各アミノ酸残基をこの様式で分析して、ペプチド重要な領域を決定する。

【０４８７】

機能アッセイによって選択した標的特異的抗体を単離し、その結晶構造を解明することも可能である。原則的には、このアプローチにより、その後の薬物デザインを基本とすることができるファーマコアが得られる。タンパク質結晶学を回避すること（要するに、機能的な薬理学的に活性な抗体に対する抗イディオタイプ抗体（抗ｉｄｓ）を作製すること）が可能である。鏡像の鏡像として、抗ｉｄｓの結合部位は、元の受容体のアナログであると予想される。抗ｉｄを使用して、化学的または生物学的に産生したペプチドバンクのバンクからペプチドを同定および単離することができる。その後ファーマコアとして選択されたペプチドが作用され得る。

【０４８８】

したがって、Ｚｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質の活性または安定性が改良されているか、Ｚｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質活性のインヒビター、アゴニスト、アンタゴニストなどとして作用する薬物をデザインすることができる。クローン化Ｚｍａｘ１またはＨＢＭ配列の利用可能性によって、Ｘ線結晶学などの分析研究に利用可能な十分量のＺｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質を作製することができる。さらに、本明細書中で提供されたＺｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質配列の知識により、Ｘ線結晶学に代わるかこれに加えてコンピュータモデリング技術が得られる。

【０４８９】

同定された薬物候補（「リード」として公知）を、トランスジェニック動物の使用によってさらに研究することができる。本発明のトランスジェニック動物は、薬物リードの試験および絞込みに使用することができる骨密度調整の動物モデルの作製に有用である。上記のトランスジェニック動物は、本明細書中で意図されるＺｍａｘ１およびＨＢＭまたはＨＢＭ様トランスジェニック動物の１つの例を示す。当業者は、本発明を特定の目的に適用する変形形態および検討材料に気づいている。トランスジェニック動物モデルの開発例は、例えば、「トランスジェニック動物科学におけるストラテジー」（１９９５、Ｍｏｎａｓｔｅｒｓｋｙ ａｎｄ Ｒｏｂｌ編、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣ、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ）およびその参考文献（その全体が本明細書中で参照することによって組み込まれる）に記載されている。

【０４９０】

例として、ある群がＨＢＭを発現し、別の群がＺｍａｘ１を発現するように上記のように少なくとも２つのトランスジェニック動物群を作製することができる。これらの動物を、数日から動物の残りの寿命までに及ぶいくらかの期間候補薬物で処置することができる。動物を、骨量および／またはＨＢＭ表現型の代理マーカーの変化をモニターする。このような研究で使用されるトランスジェニック動物は、ヒトＨＢＭタンパク質およびＺｍａｘ１タンパク質または各種で定義された相同ＨＢＭおよびＺｍａｘ１タンパク質またはその変異型を発現することができる。発現を、公知の遍在プロモーターまたは骨特異的プロモーターによって駆動することができる。異なるプロモーターを使用した動物群の比較は有益である。

【０４９１】

本発明の方法のトランスジェニック動物はまた、ＨＢＭまたはＺｍａｘ１を発現するか

、動物の天然のプロモーターの調節下ではないノックイン（ＫＩ）および／またはノックアウト（ＫＯ）動物（マウスなど）を含み得る。このような動物を、上記（または、例えば、米国特許第６，１８７，９９１号および同第６，１８７，９９２号ならびにこれらの参考文献（その全体が本明細書中で参照することによって組み込まれる）などの技術論文のどこかに記載されている）のようにＥＳ細胞の相同組換えによって作製することができる。候補薬物で処置したトランスジェニック動物の実験群を、非侵襲性手段、上記の代理マーカーのモニタリング、および／または所与の測定点での屠殺動物由来の骨のex vivo分析によってモニターすることができる。

【０４９２】

同様に、食事制限（例えば、ビタミン、無機質、タンパク質、脂質などの摂取の変化）、卵巣切除、精製ＨＢＭまたはＺｍａｘ１タンパク質の全部または一部の直接投与、アンチセンスヌクレオチド、Ｚｍａｘ１に対する抗体の投与、または成体における遺伝子治療などの処置の効果を、本発明のトランスジェニック動物への治療薬の全身投与によって調査することができる。このような治療には、エストロゲン、タモキシフェン、ラロキシフェン（または他の選択性エストロゲンモジュレーター、ＳＥＲＭ）、ビタミンＤアナログ、カルシトニン、カテプシンＫインヒビター、スタチン（例えば、シムバスタチン、プラバスタチン、およびロバスタチン）、二リン酸塩、副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）、米国特許第６，１９０，８８０号および同第５，８６６，３６４号に記載の骨形態形成タンパク質（ＢＭＰ）、ならびに上記化合物の組み合わせの投与を含み得る。

【０４９３】

ＺｍａｘｌとＬＲＰ６との間の相同性、ＬＤＬ受容体、および心臓の健康についてのマーカーの更なる所見がＨＢＭ被験体で調整されることを考慮して、本発明の態様は、骨調整効果について公知の心臓保護治療をスクリーニングするために本明細書に開示された新規の研究方法を使用することである。それにより、本発明は、心臓保護であり且つ骨の質が改良される治療方法を提供する。モデルは、Ｚｍａｘ１、ＬＲＰ６、ＨＢＭ、およびＨＢＭ様タンパク質ならびに核酸に関連する薬物の試験および脂質調整効果の研究に有用である。

【０４９４】

Ｚｍａｘ１、ＨＢＭ、およびＨＢＭ様遺伝子の種々の変異効果を、このような変異を含む本発明のトランスジェニック動物の更なる系統の作製によって調査することができる。骨発達または代理マーカーの直接測定の比較により、本発明の実施形態は、遺伝子治療試薬、候補薬物治療のスクリーニングおよび骨発達調整の分子機構の解明のための有用な研究ツールを提供する。当業者は、これらの目的を達成するためにどのようにして本発明方法を使用するかを理解している。

【０４９５】

本発明は、見込みのある遺伝子治療を試験するための方法および有用な研究ツールを提供する。トランスジェニックノックアウトマウスは、見込みのある遺伝子治療の試験に有用である。内因性Ｚｍａｘ１またはＨＢＭを発現しないマウスなどのトランスジェニックノックアウト動物を上記のように作製する。ＣＭＶβＡｃｔｉｎプロモーターによって駆動するヒトＨＢＭタンパク質をコードする組換え複製欠損アデノウイルスの静脈内注射などの見込みのある遺伝子治療を投与する。骨密度および／または代理マーカーのパラメータを、治療後長期にわたりモニターする（Ｉｓｈｉｂａｓｈｉら、１９９３、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．、９２、８８３～９３）。上記のＴａｑＭａｎ（登録商標）プライマーを使用して、トランスジェニックＨＢＭの発現を測定することができる。当業者は、ノーザンブロット法などの代替法を理解している。生殖系列トランスジェニック動物、ノックアウト（ヌル対立遺伝子）バックグラウンド、および野生型内因性Ｚｍａｘ１バックグラウンド動物の群内および群間での処置および非処置動物の比較により、遺伝子治療の種々の様相の相対的有効性を評価するための相補的コントロールが得られる。

【０４９６】

本明細書中で意図されるトランスジェニック動物モデルの使用には、以下が含まれるが

、これらに限定されない。（１）骨細胞（例えば、骨芽細胞および破骨細胞）機能および数を研究するためのトランスジェニック動物の頭蓋冠由来の骨細胞培養物作製用供給源；（２）トランスジェニック動物の卵巣切除（ｏｖｘ）によるエストロゲン喪失効果を研究するためのモデル；（３）骨の機械的負荷試験および他のストレス／強度試験用のモデル；（４）骨異常を表示する他の遺伝子改変または天然に存在する変異動物と交配させる交配モデル（Ｃｈｉｐｍａｎら、１９９３、ＰＮＡＳ、９０、１７０１～０５；Ｐｈｉｌｌｉｐｓら、２０００、Ｂｏｎｅ、２７、２１９～２６；Ｋａｊｋｅｎｏｖａら、１９９７、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｍｉｎ．Ｒｅｓ．、１２、１７７２～７９；Ｊｉｌｋａら、１９９６、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．、９７、１７３２～４０；Ｔａｋａｈａｓｈｉら、１９９４、Ｂｏｎｅ　ａｎｄ　Ｍｉｎｅｒａｌ、２４、２４５～５５）；（５）体重負荷または重力効果を試験するための骨誤使用／不使用モデル；（６）骨代謝を調整し得るか調整することが公知の試薬（例えば、ＰＴＨ、エストロゲン、ビタミンＤアナログ、二リン酸塩、スタチン、レプチン、ＢＭＰ、ａｐｏＥ）の同定およびスクリーニング用モデル；（７）骨折修復を改善するための見込みのある治療を調査するためのモデル。

【０４９７】

トランスジェニック動物モデルを、ｐＤＥＸＡ、ｐＱＣＴ、およびミクロＣＴによる骨デンシトメトリー；組織学、分子マーカー分析、アポトーシス、細胞増殖、細胞周期、鉱化、血清生化学、および転写プロファイリングなどの方法（これらに限定されない）を使用して分析することができる。

【０４９８】

２２．使用方法：鳥類および哺乳動物の畜産

Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）ＤＮＡおよびＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）タンパク質ならびに／またはＨＢＭ　ＤＮＡおよびＨＢＭタンパク質（またはＬＲＰ６もしくはＨＢＭ様核酸もしくはタンパク質もまた本明細書中で意図される）を、脊椎動物、および好ましくはヒトの治療薬ならびに鳥類および哺乳動物用動物薬（家畜交配用を含む）のために使用することができる。鳥類（例えば、ニワトリ、雄鳥、雌鳥、シチメンチョウ、ダチョウ、アヒル、キジ、およびウズラが含まれる）は、高骨量の遺伝子および経路の同定に有利であり得る。文献（例えば、ＭｃＣｏｙら、１９９６、Ｒｅｓ．Ｖｅｔ．Ｓｃｉ．、６０、１８５～６）から引用した多数の例では、畜産条件による骨の脆弱化は、ケージ病、骨粗鬆症、および高死亡率の原因である。鳥類における骨粗鬆症または他の骨障害を治療するためのさらなる治療薬は、鳥類の快適な生活および畜産業（例えば、精肉および産卵を含む）の経済的条件に対して非常に有利な効果を有し得る。

【０４９９】

２３．使用方法：骨発達に影響を与える遺伝子の変化の検出のためのＺｍａｘ１特異的オリゴヌクレオチドを使用した診断アッセイ

骨発達の変化または疾患がＺｍａｘ１、ＬＲＰ６、ＨＢＭ、またはＨＢＭ様遺伝子の変化を含むことが疑われる場合、特異的オリゴヌクレオチドを構築し、これを使用して、骨組織または骨発達に影響を与える別の組織におけるＺｍａｘ１　ｍＲＮＡまたはＨＢＭ　ｍＲＮＡをそれぞれ評価することができる。

【０５００】

例えば、ヒトが骨密度に影響を与えるＨＢＭ遺伝子を有するかを試験するために、ポリメラーゼ連鎖反応を使用することができる。２つのオリゴヌクレオチドを、標準的な方法によって合成するか、特注のオリゴヌクレオチドの販売者から入手する。長さおよび塩基組成を、Ｏｌｉｇｏ４．０プライマーピッキングプログラム（Ｗｏｊｃｈｉｃｈ　Ｒｙｃｈｌｉｋ、１９９２）を使用した基準または任意の適切な代替物によって決定する。オリゴヌクレオチドの１つを、使用したＰＣＲ条件下でＨＢＭ　ＤＮＡとのみハイブリダイゼーションするようにデザインする。他のオリゴにヌクレオチドを、これらのオリゴヌクレオチドプライマーを使用したＤＮＡ増幅により都合よく同定されたＤＮＡフラグメントが得られるようにＺｍａｘ１ゲノムＤＮＡのセグメントとハイブリダイゼーションするようにデザインする。例えば、プライマー対ＣＣＡＡＧＴＴＣＴＧＡＧＡＡＧＴＣＣ（配列番

号３２）および　ＡＡＴＡＣＣＴＧＡＡＡＣＣＡＴＡＣＣＴＧ（配列番号３３）は、以下の条件を使用した場合にＤＮＡサンプルから５３０ｂｐのＤＮＡフラグメントを増幅する。ステップ１：９５℃で１２０秒間；ステップ２：９５℃で３０秒間；ステップ３：５８℃で３０秒間；ステップ４：７２℃で１２０秒間（ステップ２～４を３５回繰り返す）。組織サンプルを、毛包、全血、または口腔前庭から得ることができる。

【０５０１】

上記手順によって作製したフラグメントを、標準的な技術によって配列決定する。ＨＢＭ遺伝子にヘテロ接合性の個体は、グリシン１７１のコドン中の第２の位置で等量のＧおよびＴを示す。正常またはホモ接合性野生型個体は、この位置でＧのみを示す。類似の日常的手順を使用して、本発明の他の多型および変異型のアッセイを開発することができる。

【０５０２】

ＰＣＲに加えて他の増殖技術（ライゲーション媒介ＰＣＲまたはＱ－βレプリカーゼを含む技術など）を代替法として使用することができる（Ｃａｈｉｌｌら、Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．、３７（９）、１４８２～５、１９９１）。例えば、オリゴヌクレオチド５’－ＡＧＣＴＧＣＴＣＧＴＡＧＣＴＧ　ＴＣＴＣＴＣＣＣＴＧＧＡＴＣＡＣＧＧＧＴＡＣＡＴＧＴＡＣＴＧＧＡＣＡＧＡＣＴＧＧＧＴ－３’（配列番号３４）およびＴ５’－ＧＡＧＡＣＧＣＣＣＣＧＧＡＴＴＧＡＧＣＧＧＧＣＡＧＧＧＡＴＡＧＣＴＴＡＴＴＣＣＣＴＧＴＧＣＣＧＣＡ　ＴＴＡＣＧＧＣ－３’（配列番号３５）を、ＤＮＡリガーゼで処理した変性ヒトＤＮＡサンプルにハイブリダイゼーションし、プライマーオリゴヌクレオチド５’－ＡＧＣＴＧＣＴＣＧＴＡＧＣＴＧＴＣＴＣＴＣＣＣＴＧＧＡ－３’（配列番号３６）および５’－ＧＣＣＧＴＡＡＴＧＣＧＧＣＡＣＡＧＧＧＡＡＴＡＡＧＣＴ－３’（配列番号３７）を使用したＰＣＲ増幅に供することができる。第１の２つのオリゴヌクレオチドでは、外側の２７塩基はプライマー結合部位に対応するランダム配列であり、内側の３０塩基はＺｍａｘ１遺伝子中の配列に対応する。第１のオリゴヌクレオチドの末端のＴはＨＢＭ遺伝子に対応する。第１の２つのオリゴヌクレオチドは、ＨＢＭ遺伝子を保有するヒトＤＮＡとハイブリダイゼーションした場合のみライゲートし、１１４ｂｐのＤＮＡフラグメントが増幅形成される。

【０５０３】

増幅産物を、アガロースゲル電気泳動、定量的ハイブリダイゼーション、または分子生物学分野の当業者に公知の等価な核酸検出技術によって検出することができる（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、「分子クローニング：実験マニュアル」、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ、ＮＹ、１９８９）。

【０５０４】

Ｚｍａｘ１遺伝子またはＨＢＭ遺伝子（または本明細書中で意図されるＬＲＰ６もしくはＨＢＭ様核酸）の他の変化を、同一の増幅検出手順型、この変化を同定するようにデザインされたオリゴヌクレオチドの使用によって診断することができる。これらの手順を、動物およびヒトで使用して、骨発達に影響を与えるＺｍａｘ１またはＨＢＭの変化を同定することができる。

【０５０５】

骨組織中でのＺｍａｘ１またはＨＢＭの発現を、遺伝子操作脊椎動物細胞用のベクターの状況におけるＺｍａｘ１またはＨＢＭのｃＤＮＡの骨特異的プロモーターへの融合によってそれぞれ行うことができる。ＤＮＡ構築物を、ＤＮＡのウイルスキャプシドへのパッケージング、カチオン性リポソームの使用、エレクトロポレーション、またはリン酸カルシウムトランスフェクションによって細胞に移入する。トランスフェクトした細胞（好ましくは、骨芽細胞）を培養で研究するか、骨への直接注入または骨芽細胞の静脈内注射およびその後の骨組織への組み込みによって動物の骨組織に移入することができる（Ｋｏら、１９９６、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．、５６、４６１４～９）。例えば、骨芽細胞中で特異的に活性なオステオカルシンプロモーターを使用して、Ｚｍａｘ１遺伝子またはＨＢＭ遺伝子の転写を指示することができる。レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクタ

ー、またはカチオン性リポソームを使用したトランスフェクション後に維持されるベクター、または本明細書中に記載の他の方法およびベクターなどの任意のいくつかのベクターおよびトランスフェクション方法を使用することができる。

【０５０６】

機能的Ｚｍａｘ１タンパク質およびＨＢＭタンパク質レベルの変化は、骨鉱化レベルに影響を与える。機能的Ｚｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質レベルの操作により、骨発達に影響を与え、骨鉱化レベルを増減することが可能である。例えば、骨粗鬆症患者の骨鉱化の増加に有用であり得る。あるいは、大理石骨病またはパジェット病患者の骨鉱化の減少に有用であり得る。Ｚｍａｘ１レベルまたはＨＢＭレベルの変化を、研究ツールとして使用することもできる。特に、そのレベルまたは修正状態がＺｍａｘ１またはＨＢＭの機能レベルの変化に応答して変化するタンパク質、ｍＲＮＡ、および他の分子を同定することが可能である。骨障害の病理学および病因は公知であり、例えば、Ｒｕｂｉｎ ａｎｄ Ｆａｒｂｅｒ編、「病理学」、第２版、Ｓ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｃｏ．、Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ、ＰＡ、１９９４に記載されている。

【０５０７】

種々の技術を使用して、Ｚｍａｘ１またはＨＢＭの機能レベルを変化させることができる。例えば、Ｚｍａｘ１もしくはその変異体またはＨＢＭもしくはその変異体の細胞外部分の静脈内または骨内注射により、処置したヒト、動物、または鳥類の体内でＺｍａｘ１活性またはＨＢＭの活性レベルが変化する。Ｚｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質の短縮バージョンを注射して、Ｚｍａｘ１タンパク質またはＨＢＭタンパク質の機能レベルをそれぞれ変化させることもできる。一定のＺｍａｘ１またはＨＢＭ形態により、内因性タンパク質の活性が増強される一方で、他の形態は阻害される。

【０５０８】

好ましい実施形態では、ＨＢＭタンパク質を使用して、骨粗鬆症、骨折、または他の骨障害を処置する。さらに好ましい実施形態では、ＨＢＭまたはそのフラグメント（例えば、Ｄｋｋ結合ドメイン）タンパク質の細胞外部分を使用する。このＨＢＭタンパク質を、細胞表面にタンパク質を接着させる部分の添加によって任意選択的に修飾することができる。タンパク質を、薬学的に許容可能な溶液中で調製し、許容可能な薬物動態学および分布を達成する注射または別の方法によって投与する。

【０５０９】

本方法の第２の実施形態では、Ｚｍａｘ１、ＨＢＭ、ＨＢＭ変異型、および／またはＬＲＰ６レベルを、遺伝子治療技術によって増減する。Ｚｍａｘ１またはＨＢＭレベルを増大させるために、骨芽細胞または別の有用な細胞型を、上記のように高レベルのＺｍａｘ１またはＨＢＭを発現するように遺伝子操作する。あるいは、Ｚｍａｘ１またはＨＢＭレベルを減少させるために、Ｚｍａｘ１またはＨＢＭ ｍＲＮＡの翻訳レベルを特異的に減少させるアンチセンス構築物を使用することができる。一般に、ＣＭＶプロモーターまたは発現ベクター中に見出される市販の別のプロモーターなどの組織非特異的プロモーターを使用することができる（Ｗｕら、１９９６、Ｔｏｘｉｃｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、１４１、３３０～９）。好ましい実施形態では、Ｚｍａｘ１ ｃＤＮＡまたはそのアンチセンスを、オステオカルシンまたは別のプロモーターなどの骨特異的プロモーターによって転写して、骨組織中で特異的発現が得られる。この方法では、Ｚｍａｘ１発現ＤＮＡ構築物またはＨＢＭ発現構築物が非骨組織に移入された場合、発現しない。

【０５１０】

本方法の第３の実施形態では、Ｚｍａｘ１、ＬＲＰ６、ＨＢＭ様、またはＨＢＭに対する抗体を使用してその機能を調整する。このような抗体は、本明細書中で同定されている。

本方法の第４の実施形態では、Ｚｍａｘ１機能またはＨＢＭ機能のアゴニストまたはアンタゴニストである薬物を使用する。このような薬物は本明細書中に記載されており、医薬品開発分野の当業者に周知の医化学技術によって至適化される。

【０５１１】

ＺｍａｘｌおよびＨＢＭは、ＡｐｏＥなどのいくつかのタンパク質と相互作用する。ＺｍａｘｌまたはＨＢＭとＡｐｏＥまたは他の結合パートナーとの間の相互作用を阻害する分子は、骨発達および鉱化を変化させると予想される。このようなインヒビターは、骨粗鬆症、大理石骨病、または他の骨鉱化疾患の治療薬として有用であり得る。このようなインヒビターは、低分子量化合物、タンパク質、または他の分子型であり得る。Ｋｉｍら、１９９８、Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．（Ｔｏｋｙｏ）、１２４、１０７２～１０７６を参照のこと。

【０５１２】

ＺｍａｘｌまたはＨＢＭと相互作用タンパク質との相互作用のインヒビターを、標準的な薬物スクリーニング技術によって単離することができる。例えば、Ｚｍａｘｌタンパク質（またはそのフラグメント）またはＨＢＭタンパク質（またはそのフラグメント）を、マイクロタイターウェルのベースなどの固体支持体上に固定することができる。ＡｐｏＥなどの第２のタンパク質またはタンパク質フラグメントを、例えばフルオレセインでの検出を支援するように誘導化する。ＺｍａｘｌまたはＨＢＭのこのタンパク質－タンパク質ドメインをそれぞれ特異的に阻害することができる候補化合物の存在下でＺｍａｘｌまたはＨＢＭにヨウ素またはビオチンを添加して、その後膜貫通セグメントに関する問題を回避する。この薬物スクリーニング型は、医薬品開発分野の当業者に周知である。

【０５１３】

ＺｍａｘｌおよびＨＢＭは骨発達に関与するので、ＺｍａｘｌおよびＨＢＭに結合するタンパク質もまた骨発達に関与すると予想される。このような結合タンパク質を、免疫共沈、同時分画、または２ハイブリッドスクリーニングなどの標準的な方法によって同定することができる（Ａｕｓｕｂｅｌら、「現代の分子生物学プロトコール」、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、１９９７）。例えば、２ハイブリッド系を使用してＺｍａｘｌ相互作用タンパク質またはＨＢＭ相互作用タンパク質を同定するために、ＺｍａｘｌまたはＨＢＭの細胞外ドメインをＬｅｘＡに融合させて、酵母ベクターｐＥＧ２０２（「ベイト」）で発現させるか、酵母ＥＧＹ４８株で発現させる。酵母株は候補相互作用タンパク質に融合したガラクトース誘導性転写活性化配列をコードする適切なベクター中での「プレイ」ライブラリーで形質転換する。本方法によって最初に選択し、その後相互作用タンパク質を検証する技術は、分子生物学分野の当業者に周知である（Ａｕｓｕｂｅｌら、１９９７）。

【０５１４】

好ましい実施形態では、ＨＢＭと相互作用するがＺｍａｘｌと相互作用しないタンパク質を、種々の上記手順を使用して同定する（Ｘｕら、１９９７、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９４、１２４７３～８）。２ハイブリッド系のこの変形形態は、２つのベイトを使用し、ＺｍａｘｌおよびＨＢＭをそれぞれＬｅｘＡおよびＴｅｔＲに融合する。あるいは、ＨＢＭと相互作用するがＺｍａｘｌと相互作用しないタンパク質も単離する。これらの手順は、分子生物学分野の当業者に周知であり、標準的な２ハイブリッド手順の簡単な変形形態である。

【０５１５】

ＺｍａｘｌまたはＨＢＭと相互作用する物質の別の単離方法として、生化学的アプローチを使用する。Ｚｍａｘｌタンパク質もしくはそのフラグメント（細胞外ドメインなど）またはＨＢＭタンパク質もしくはそのフラグメント（細胞外ドメインなど）を、Ｓｅｐｈａｒｏｓｅビーズに化学的に結合させる。ＺｍａｘｌまたはＨＢＭ結合ビーズを、カラムに注ぐ。骨生検の上清中の脂質画分、血清タンパク質、タンパク質などの生物学的抽出物、または徐々に溶解した骨芽細胞由来の細胞内容物を、カラムに添加する。非特異的結合化合物を溶離し、カラムを低塩緩衝液で数回洗浄し、強く結合した化合物を、高塩緩衝液で溶離することができる。ＺｍａｘｌまたはＨＢＭに結合する候補化合物が存在し、標準的試験およびコントロール実験によって特異的結合を試験することができる。タンパク質結合に使用したＳｅｐｈａｒｏｓｅビーズおよびカップリング方法は市販されており（Ｓｉｇｍａ）、および本明細書中に記載の手順は、タンパク質生化学分野の当業者に周知で

ある。

【０５１６】

上記手順の変形形態として、高塩によってＺｍａｘ１またはＨＢＭ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラムから溶離したタンパク質を、ＨＢＭ－Ｚｍａｘ１－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラムに添加する。吸着せずに流されるタンパク質は、Ｚｍａｘ１に結合するがＨＢＭに結合しないタンパク質である。あるいは、ＨＢＭタンパク質に結合するが、Ｚｍａｘ１タンパク質に結合しないタンパク質を、使用カラムの順序を逆にすることによって単離することができる。

【０５１７】

単離した化合物を、二次元ゲル電気泳動、クロマトグラフィー、および質量分析などの標準的な方法によって同定することができる。

【０５１８】

２４．使用方法：形質転換関連組換え（ＴＡＲ）クローニング

Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）およびＬＲＰ６の新規の対立遺伝子変異型の同定には、個体中の両遺伝子コピーの配列を試験する能力が不可欠である。これを行うために、クローン化すべきＤＮＡの一部に隣接するように、ゲノム配列内の２つの「フック」または有意に類似の領域を同定する。より好ましくは、第１のこれらのフックは、目的の第１のエクソンの５’配列に由来し、第２は目的の最後のエクソンの３’配列に由来する。これらの２つの「フック」を、Ｌａｒｉｏｎｏｖら、１９９７、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９４、７３８４～７などに記載の細菌／酵母シャトルベクターにクローン化する。他の類似のベクター系を使用することもできる。Ｚｍａｘ１遺伝子の全ゲノムコピーを回収するために、２つの「フック」を含むプラスミドを制限エンドヌクレアーゼで線状化するか、ＰＣＲなどの別の方法によって産生する。この線状ＤＮＡフラグメントを、ヒトゲノムＤＮＡと共に酵母細胞に移入する。典型的には、酵母サッカロマイセス・セレヴィシエを宿主細胞として使用するが、Ｋｏｕｒｉｎａら、１９９８、Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．、８、６６６～７２はニワトリ宿主細胞の同様の使用を報告している。形質転換プロセス時およびその後に、内因性宿主細胞は組換え事象によって線状プラスミドを環状に変換し、それにより「フック」に相同なヒトゲノムＤＮＡ領域がプラスミドに挿入される。このプラスミドを、当分野で周知の方法によって回収および分析することができる。明らかに、この反応の特異性は線状フラグメント中に存在する「フック」に類似の配列を認識するための宿主細胞機構が必要である。しかし、Ｋｏｕｐｒｉｎａら、１９９８、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、５３、２１～８に示すように１００％配列が同一である必要はなく、この著者は、げっ歯類／ヒトハイブリッド細胞株のフラグメントを回収するためのヒトゲノム中に共通な縮重反復配列の使用を記載している。

【０５１９】

別の例では、Ｌａｒｉｏｎｏｖら、１９９８、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９５、４４６９～７４に記載のようにたった１つの「フック」しか必要ない。「ラジカルＴＡＲクローニング」と呼ばれるこの実験型のために、組換えを駆動する他の配列類似領域は、ゲノム由来の反復配列に由来する。この方法では、Ｚｍａｘ１遺伝子コード領域に隣接するＤＮＡ領域を回収し、機能に影響を与え得る変化について試験することができる。

【０５２０】

２５．使用方法：ゲノムスクリーニング

ＨＢＭ遺伝子、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）、またはＬＲＰ６に連結する多型遺伝子マーカーの使用は、骨粗鬆症または他の骨疾患に対する感受性の予想に非常に有用である。Ｋｏｌｌｅｒら、１９９８、Ａｍｅｒ．Ｊ．Ｂｏｎｅ Ｍｉｎ．Ｒｅｓ．、１９０３～８は、多型遺伝子マーカーの使用が連鎖解析に有用であることを証明している。同様に、高骨量遺伝子内の多型遺伝子マーカーの同定により、骨発達に影響を与える他の遺伝子病変との連鎖不均衡である特異的対立遺伝子変異型を同定可能である。ＢＡＣ由来のＤＮＡ配列を使用して、ジヌクレオチドＣＡｎ反復を同定し、以下に示すこの反復を含むゲノムＤＮＡ

を増幅する２つの固有のＰＣＲプライマーをデザインし、遺伝子マッピング研究で使用した。

Ｂ２００Ｅ２１Ｃ１６＿Ｌ：　ＧＡＧＡＧＧＣＴＡＴＡＴＣＣＣＴＧＧＧＣ（配列番号３８）

Ｂ２００Ｅ２１Ｃ１６＿Ｒ：　ＡＣＡＧＣＡＣＧＴＧＴＴＴＡＡＡＧＧＧＧ　配列番号３９）

この方法は、当業者によって首尾よく使用されている（例えば、Ｓｈｅｆｆｉｅｌｄら、１９９５、Ｇｅｎｅｔ．、４、１８３７～４４；ＬｅＢｌａｎｃ－Ｓｔｒａｃｅｓｋｉら、１９９４、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、１９、３４１～９；Ｃｈｅｎら、１９９５、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、２５、１～８）。これらの試薬の集団または個体への使用により、骨粗鬆症リスクが予想される。同様に、上記の表４などに示す一塩基多型（ＳＮＰ）を同様に使用して、骨疾患の発症リスクまたはＨＢＭ遺伝子の場合には骨粗鬆症への体制を予想することができる。

【０５２１】

２６．使用方法：組織石灰化のモジュレーター

ヒトの身体組織の石灰化は十分に報告されている。Ｔｏｗｌｅｒら（１９９８、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７３、３０４２７～３４）は、モデル系での発達頭蓋骨の石灰化を調節することが公知のいくつかのタンパク質が石灰化大動脈で発現することを証明した。石灰化脈管組織中でのＭｓｘ２（骨前駆細胞中で転写される遺伝子）の発現は、骨発達に重要な遺伝子は他の組織の石灰化に関与することを示す。

【０５２２】

ＨＢＭタンパク質、ＨＢＭ様タンパク質、およびポリペプチド、ＬＲＰ５、ＬＲＰ６、およびＨＢＭのアゴニスト、またはＤｋｋ－１のアンタゴニストは、証明された骨中無機物密度に対する効果によって石灰化（血管系、象牙質、および頭蓋骨など）を改善する可能性がある。組織石灰化が証明される実験系では、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）活性の過剰発現または抑制により、Ｚｍａｘ１遺伝子によって直接調節される分子を同定可能である。これらの遺伝子は、組織石灰化調整を目的とする治療の潜在的な標的である。例えば、ＬＤＬＲ－／－などの動物では、マウスに高脂肪食を与え、Ｚｍａｘ１を含む組織石灰化マーカーの発現が証明されるかを観察する。次いで、これらの動物をＺｍａｘ１またはＨＢＭタンパク質、Ｚｍａｘ１またはＨＢＭ　ｃＤＮＡに指向するアンチセンスオリゴヌクレオチド、またはＺｍａｘ１またはＨＢＭタンパク質に結合することが公知の化合物またはその結合パートナーもしくはリガンドに対する抗体で処置する。ＲＮＡまたはタンパク質を、脈管組織から抽出し、組織中で発現した相対発現レベルを当分野で周知の方法によって決定する。組織中で調節された遺伝子は、組織石灰化のモジュレーターとしての医薬品開発の潜在的な治療標的である。

【０５２３】

個体に投与すべき本発明の核酸、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、小分子、または他の薬学的に有用な化合物を、当分野で周知の薬学的許容可能なキャリア、賦形剤、または希釈剤との組み合わせ形態で投与することができる。個体は、哺乳動物または鳥類（好ましくは、ヒト）、ラット、マウス、または鳥類であり得る。このような組成物を、薬学的有効量で個体に投与することができる。投与量は、治療条件および処置される患者に依存して変化する。組成物を単独で投与しても、他の治療薬と組み合わせて投与してもよい。

【０５２４】

２７．ＤｋｋおよびまたはＬＲＰ５タンパク質およびまたはＤｋｋ相互作用タンパク質をコードする核酸の発現を調整する薬剤の同定方法

本発明の別の実施形態は、Ｗｎｔ経路の一部であり、且つＬＲＰ５、ＬＲＰ６、およびＨＢＭ（非常に程度が低い）、およびその変異型と相互作用するＤｋｋをコードする核酸の発現を調整する薬剤の同定方法を提供する。このようなアッセイは、本発明の核酸の発現レベルの変化をモニタリングする任意の利用可能な手段を使用することができる。本明細書中で使用される、「薬剤」は、細胞中で核酸（例えば、ｍＲＮＡ）の発現をアップレ

ギュレーションまたはダウンレギュレーションすることができる場合にＤｋｋ発現を調整するものをいう。

【０５２５】

１つのアッセイ形式では、ＤｋｋをコードするＤｎａ（またはＤｋｋの活性を調整するタンパク質）と任意のアッセイ可能な融合パートナーとの間のレポーター遺伝子融合を含む細胞株を調製することができる。多数のアッセイ可能な融合パートナーが公知であり、容易に利用可能であり、これには、ホタルルシフェラーゼ遺伝子およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子が含まれるが、これらに限定されない（Ａｌａｍら、１９９０、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１８８、２４５～５４）。次いで、レポーター遺伝子融合物を含む細胞株を、適切な条件下および時間で試験すべき薬剤に曝露する。薬剤に曝露したサンプルとコントロールサンプルとの間のレポーター遺伝子発現の相違により、ＤｋｋまたはＤｋｋ活性を調整する他のタンパク質をコードする核酸の発現を調整する薬剤を同定する。このようなアッセイを同様に使用して、ＬＲＰ５活性およびさらにＬＲＰ６活性がＤｋｋ活性の調節によって調整されるかどうかを決定することができる。ＨＢＭ変異型を用いてこれを行うこともできる。

【０５２６】

さらなるアッセイ形式を使用して、薬剤がＤｋｋ単独またはＤｋｋおよびＬＲＰ５、および／または図３１などに記載のＤｋｋ相互作用タンパク質をコードする核酸の発現を調整する能力をモニターすることができる。例として、ｍＲＮＡ発現を、本発明の核酸とのハイブリダイゼーションによって直接モニターすることができる。細胞株を、適切な条件下および時間で試験すべき薬剤に曝露し、全ＲＮＡまたはｍＲＮＡを、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）；Ａｕｓｕｂｅｌら、「現代の分子生物学プロトコール」（Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．、ＮＹ、１９９５）；Ｍａｎｉａｔｉｓら、「分子クローニング：実験マニュアル」（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９８２）；および「分子生物学ショートプロトコール：現代の分子生物学プロトコールの方法概論」（Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ Ｍ．、Ａｕｓｕｂｅｌら、４月、１９９９）などに開示の標準的手順によって単離する。

【０５２７】

薬剤に曝露した細胞とコントロール細胞との間のＲＮＡ発現レベルの相違を検出するためのプロトコールを、本発明の核酸から調製することができる。高ストリンジェンシー条件下で標的核酸とのみハイブリダイゼーションするプローブをデザインすることが好ましいが、必要ではない。高ストリンジェンシーな条件下で、高度に相補的な核酸ハイブリッドのみが形成される。したがって、アッセイ条件のストリンジェンシー条件により、ハイブリッドを形成するための２つの核酸鎖の間に存在すべき相補量が決定される。プローブ：標的ハイブリッドと潜在的なプローブ：非標的ハイブリッドとの間の安定性の相違を最大にするようにストリンジェンシーを選択すべきである。

【０５２８】

当分野で公知の方法によって、プローブを本発明の核酸からデザインすることができる。例えば、プローブのＧ＋Ｃ含量およびプローブ長はその標的配列に結合するプローブに影響を与え得る。プローブ特異性を最適にする方法は、市販されている。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）またはＡｕｓｕｂｅｌら（「現代の分子生物学プロトコール」、Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．、ＮＹ、１９９５）を参照のこと。

【０５２９】

ハイブリダイゼーション条件を、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）およびＡｕｓｕｂｅｌら（１９９５）などに記載の公知の方法を使用して各プローブに適切なように修正する。全細胞ＲＮＡまたはポリＡ ＲＮＡを富化したＲＮＡのハイブリダイゼーションを、任意の利用可能な形態で行うことができる。例えば、全細胞ＲＮＡまたはポリＡ ＲＮＡを富化したＲＮＡを固体支持体に固定し、固体支持体を、プローブが特異的にハイブリダイゼーションする条件下で本発明の核酸配列の少なくとも１つまたはその一部を含む少なく

とも１つのプローブに曝露した。あるいは、本発明の配列の少なくとも１つまたはその一部を含む核酸フラグメントを、多孔質ガラスウエハーなどの固体支持体に固定することができる。次いで、ガラスウエハーまたはシリカウエハーを、固定した配列が特異的にハイブリダイゼーションする条件下でサンプル由来の全細胞ＲＮＡまたはポリＡ　ＲＮＡに曝露することができる。このようなガラスウエハーおよびハイブリダイゼーション方法は、広く利用可能である（例えば、Ｂｅａｔｔｉｅ、ＷＯ９５／１１７５５に開示の方法）。所与のプローブが、未処理細胞集団および薬剤に曝露した細胞集団由来のＲＮＡサンプルと特異的にハイブリダイゼーションする能力の試験によって、Ｄｋｋ、Ｄｋｋ相互作用タンパク質、および／またはＬＲＰ５をコードする核酸の発現をアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションする薬剤を同定することができる。

【０５３０】

マイクロアレイテクノロジーおよび転写プロフィールは、推定ＤｋｋまたはＤｋｋ相互作用タンパク質調整化合物の影響の分析に使用することができる方法の例である。転写プロファイリングのために、in vivoで潜在的なＤｋｋ調整剤（本発明で同定されたＤｋｋ相互作用タンパク質（例えば、図３１で同定されたタンパク質）、Ｄｋｋ相互作用タンパク質を調整する薬剤）に曝露された細胞由来のｍＲＮＡならびに薬剤に曝露されていない同一の細胞型由来のｍＲＮＡを、逆転写し、多数の遺伝子由来のＤＮＡを含むチップにハイブリダイゼーションし、それにより薬剤処理および未処理細胞中の遺伝子発現を比較することができる。例えば、推定Ｄｋｋ調整剤が細胞中でのＤｋｋ発現をダウンレギュレーションする場合、一定の患者集団では薬剤の使用は望ましくないであろう。さらなる転写プロファイリング法およびマイクロアレイの使用は、例えば、２０００年にＬｉｚａｒｄｉに付与された米国特許第６，１２４，１２０号で言及されている。

【０５３１】

ＬＲＰ５、ＬＲＰ６、ＨＢＭ、ＨＢＭ変異型、またはＷｎｔ経路の調整に対するＤｋｋおよびＤｋｋ相互作用タンパク質調整化合物の影響またはＤｋｋまたはＤｋｋ相互作用タンパク質の影響のさらなるスクリーニング方法には、ＴａｑＭａｎ（登録商標）ＰＣＲの使用、従来の逆転写酵素ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）、代理マーカー（すなわち、Ｗｎｔ応答遺伝子）の下流の変化、およびタンパク質検出用抗Ｄｋｋウェスタンブロットが含まれる。他の方法は、当業者に明らかである。

【０５３２】

２８．Ｄｋｋ、Ｄｋｋ相互作用タンパク質、またはＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様の少なくとも１つの活性を調整する薬剤の同定方法

本発明の別の実施形態は、Ｄｋｋ、Ｄｋｋ相互作用タンパク質、および／またはＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様タンパク質の少なくとも１つの活性を調整するか、または好ましくはＤｋｋ／Ｄｋｋ相互作用タンパク質複合体、またはＬＲＰ５（またはＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様）／Ｄｋｋ複合体、またはＤｋｋの生物学的に活性なフラグメント（例えば、ＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様を結合するドメインを含む）、またはＤｋｋ相互作用タンパク質複合体の活性を特異的に調整する薬剤を同定する方法を提供する。このような方法またはアッセイは、当分野で公知の所望の活性を調整または検出する任意の手段を使用することができる（例えば、Ｗｕら、２０００、Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．、１０、１６１１～４；Ｆｅｄｉら、１９９、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７４、１９４６５～７２；Ｇｒｏｔｅｗｏｌｄら、１９９９、Ｍｅｃｈ．Ｄｅｖ．、８９、１５１～３；Ｓｈｉｂａｔａら、２０００、Ｍｅｃｈ．Ｄｅｖ．、９６、２４３～６；Ｗａｎｇら、２０００、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ、１９、１８４３～８；およびＧｌｉｎｋａら、１９９８、Ｎａｔｕｒｅ、３９１、３５７～６２を参照のこと）。Ｄｋｋを調整する潜在的な薬剤には、例えば、ｐ５３（Ｄｋｋ－１を誘導することができる腫瘍抑制タンパク質）が含まれる。ＤＮＡ損傷もまた、ｐ５３の安定化および活性化を介したＤｋｋ－１発現のアップレギュレーションが認められた（Ｗａｎｇら、２０００、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ、１９、１８４３～４８；およびＳｈｏｕら、２００２、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ、２１、８７８～８９）。さらに、Ｆｅｄｉら（１９９９）は、Ｄｋｋ－１がＮＩＨ－３Ｔ３細胞のＷｎｔ２誘導癌

遺伝子形質転換を遮断することができるという主旨のことを示した。さらに、Ｄｋｋ発現を、発達中の骨格におけるＢＭＰシグナル伝達によって調整することができることが示唆されている（Ｍｕｋｈｏｐａｄｈｙａｙら、２００１、Ｄｅｖ．Ｃｅｌｌ．、１、４２３～３４；およびＧｒｏｔｅｗｏｌｄら、２００２、ＥＭＢＯ Ｊ．、２１、９６６～７５）。Ｇｒｏｔｅｗａｌｄらは、さらに、ＵＶ照射および他の遺伝毒性刺激を含むストレスシグナルに応答したＤｋｋ発現レベルの変化を記載している。彼らは、Ｄｋｋ発現がプロアポトーシスであることを提案している。本明細書中に記載のＨＢＭＭＴＩＣ動物では、骨芽細胞アポトーシスの減少結果が認められた。したがって、ＨＢＭおよびＨＢＭ様変異型は、プログラム細胞死におけるＤｋｋの役割を調節／変化させることができる。潜在的にＤｋｋ活性を調整する他の薬剤には、図３１で同定されたＤｋｋ相互作用タンパク質が含まれる。

【０５３３】

１つの実施形態では、試験すべき薬剤に曝露した細胞集団のＤｋｋまたはＤｋｋ相互作用タンパク質の相対量を、非曝露コントロール細胞集団と比較する。抗体を使用して、異なる細胞集団におけるタンパク質発現の相違をモニターすることができる。細胞株または細胞集団を、適切な条件下および時間で試験すべき薬剤に曝露する。曝露細胞株もしくは細胞集団およびコントロール、非曝露細胞株もしくは細胞集団から細胞溶解物を調製することができる。次いで、当分野で公知のように、プローブを使用して細胞溶解物を分析する。例えば、Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ、「抗体：実験マニュアル」（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９８８）およびＥｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ、「抗体の使用：実験マニュアル」（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９８８）を参照のこと。

【０５３４】

例えば、ＤｋｋのＮ末端およびＣ末端フラグメントを細菌中で発現させ、これを使用してこれらのフラグメントに結合するタンパク質を検索することができる。ＤｋｋのＮ末端およびＣ末端領域（またはＤｋｋ－１の生物学的に活性なドメイン）または全Ｄｋｋタンパク質へのＨｉｓタグまたはＧＳＴ融合物などの融合タンパク質を調製することができる。これらの融合タンパク質を、例えば、Ｔａｌｏｎまたはグルタチオン－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅビーズと結合させ、細胞溶解物で探索してＤｋｋに結合する分子を同定することができる。溶解前に、細胞を、精製Ｗｎｔタンパク質、ＲＮＡ、Ｗｎｔシグナル伝達を調整することができる薬剤、またはＷｎｔ経路の下流エレメントと相互作用するタンパク質で処理することができる。当分野で公知のように、融合タンパク質に結合する溶解物タンパク質を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって解明し、例えばタンパク質配列決定または質量分析によって単離および同定することができる。例えば、「タンパク質精製への適用：実践アプローチ」（Ｓｉｍｏｎ Ｒｏｅ編、第２版、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖ．Ｐｒｅｓｓ、２００１）および「タンパク質精製ガイド」、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、第１８２巻（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、１９９７）を参照のこと。

【０５３５】

Ｄｋｋ、Ｄｋｋ相互作用タンパク質、またはＤｋｋとＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様との複合体の活性は、ＤｋｋとＤｋｋ相互作用タンパク質（図３１に示すものなど）、および／またはＤｋｋとＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様との複合体との間の相互作用を調整する化合物によって影響を受け得る。本発明は、これの化合物の発見および特徴づけのための方法および研究ツールを提供する。ＤｋｋとＤｋｋ相互作用タンパク質および／またはＤｋｋとＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様との相互作用を、in vivoまたはin vitroでモニターすることができる。Ｄｋｋ－ＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様複合体の安定性を調整する化合物は、潜在的に治療化合物である。in vitroでの方法の例には、プラズモン共鳴分光法での観察用のＢｉａｃｏｒｅ（Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）製などの装置のためにデザインされたセンサーチップへのＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様、Ｄｋｋ、またはＤｋｋ相互作用タンパク質の結合が含まれる。この方法では、Ｄｋｋ、Ｄｋｋ相互作用タンパク質、またはＬＲＰ６５／６の１つを含む

チップを、最初に複合体を形成する条件下で他方に曝露する。次いで、試験化合物を導入し、装置の出力シグナルから試験化合物によって発揮された任意の効果が示される。この方法によって、化合物を迅速にスクリーニングすることができる。別のin vitro法の例は、ＳＡＲ－ｂｙ－ＮＭＲ法（Ｓｈｕｋｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２７４、１５３１～４、１９９６）によって例示される。簡単に述べれば、Ｄｋｋ－１結合ドメインおよび／またはＬＲＰ５または６ＬＢＤを発現させ、標識培地中での発現によって^{15}Ｎ標識タンパク質として精製する。標識化タンパク質を、ＮＭＲサンプルチューブ中の溶液中で複合体形成させる。試験化合物の存在下および非存在下での異核相関スペクトルにより、試験化合物との相互作用および複合体のタンパク質－タンパク質接合の変化に関する各残基レベルでのデータが得られる。当業者は、複合体の調整をモニターし、そして／または複合体形成についての結合親和性を測定することができる多数の他のプロトコール（例えば、親和性キャピラリー電気泳動（Ｏｋｕｎら、２００１、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７６、１０５７～６２；Ｖｅｒｇｎｏｎら、１９９９、Ｍｅｅｔｈｏｄｓ、１９、２７０～７）、蛍光分光学、電子常磁性共鳴など）を理解している。

【０５３６】

Ｄｋｋ／ＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様複合体の調整をモニターするためのin vitroプロトコールには、酵母２ハイブリッドプロトコールが含まれる。酵母２ハイブリッド法を使用して、ＤｋｋとＬＲＰリガンド結合ドメインとの融合タンパク質の複合体の形成によって活性化された遺伝子発現のモニタリングによって複合体調整をin vivoでモニターすることができる。相互作用ＤｋｋおよびＬＲＰ　ＬＢＤドメインをコードする本発明の核酸を、ベイトおよびプレイプラスミドに移入する。１つまたは複数の化合物の存在下で、Ｙ２Ｈプロトコールを行う。複合体の調整は、複合体活性化遺伝子発現の変化によって認められる。試験化合物をアッセイに直接添加するか、タンパク質の場合、ベイトおよびプレイ化合物中で同時発現させることができることが当業者に認識される。同様に、ＤｋｋとＤｋｋ相互作用タンパク質との融合タンパク質をＹ２Ｈスクリーニングで使用して、Ｄｋｋ／Ｄｋｋ相互作用タンパク質複合体を調整する他のタンパク質を同定することもできる。

【０５３７】

これらなどのアッセイプロトコールを方法で使用して、Ｄｋｋ／Ｄｋｋ相互作用タンパク質および／またはＤｋｋ／ＬＲＰ５／６複合体を調整する（このような調整が競合的結合、結合部位でのＬＲＰ５／６またはＤｋｋのいずれかの構造の変化、またはタンパク質－タンパク質境界の安定化もしくは不安定化によって調整される）化合物、薬物、治療薬をスクリーニングすることができる。ペプチドアプタマーが競合的に結合することができるが、立体効果による結合部位構造の変化の誘導も可能であることが認識される。

【０５３８】

２８．１　抗体および抗体フラグメント

ＤｋｋまたはＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様に結合するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体ならびにフラグメントを、当分野で公知のように調製することができる。例えば、安定な宿主動物を、適切な免疫化プロトコールおよび本発明のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を使用して免疫化することができる。免疫化用のペプチドは、典型的には、約８～４０残基長である。必要に応じてまたは所望ならば、ポリペプチド免疫原を、適切なキャリアに結合させることができる。ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）、または他のキャリアタンパク質などのキャリアとの免疫原性結合物の調製方法は、当分野で周知である（Ｈａｒｌｏｗら、１９８８を参照のこと）。いくつかの環境では、例えばカルボジイミド試薬を使用した直接結合が有効であり得る；他の例では、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬなどから供給される結合試薬がポリペプチドまたはハプテンに対する接近性の獲得に望ましい。ハプテンペプチドを、アミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかがシステイン残基で拡大し、または例えば、キャリアへの結合を容易にするためにシステイン残基を散在させることができる。一般に、当分野で理解されているように、適切

な期間で適切なアジュバントを使用した注射によって免疫原を投与する。免疫化スケジュールの間、抗体形成の妥当性を決定するために抗体の力価を測定する。

【０５３９】

抗ペプチド抗体を、合成ペプチド（例えば、任意のＤｋｋ配列由来のペプチド（Ｄｋｋ－１を含む）またはＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様）を使用して作製することができる。合成ペプチドは、２～３アミノ酸長ほどの小ささであり得るが、好ましくは３、５、１０、または１５、またはそれ以上のアミノ酸残基長である。このようなペプチドを、ＤＮＡＳｔａｒなどのプログラムを使用して決定することができる。標準的な方法を使用してペプチドをＫＬＨに結合し、ウサギなどの動物を免疫化することができる。次いで、ポリクローナル抗ＤｋｋまたはＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様ペプチド抗体を、例えば、共有結合ペプチドを含むＡｃｔｉｇｅｌビーズを使用して精製することができる。

【０５４０】

この方法で産生したポリクローナル抗血清は、いくつかの適用を満たすことができるが、医薬組成物については、モノクローナル調製物の使用が好ましい。所望のモノクローナル抗体を分泌する不死化細胞株を、一般的に知られているように、リンパ球または脾臓細胞の不朽化をもたらすＫｏｈｌｅｒ　ａｎｄ　Ｍｉｌｓｔｅｉｎの標準的な方法または修正形態を使用して調製することができる（例えば、Ｈａｒｌｏｗら、１９８８および１９９８を参照のこと）。所望の抗体を分泌する不死化細胞株を、抗原がペプチド、ハプテン、ポリペプチド、またはタンパク質である免疫アッセイによってスクリーニングすることができる。所望の抗体を分泌する適切な不死化細胞培養物が同定された場合、細胞をｉｎ ｖｉｔｒｏまたは腹水中での産生によるいずれか培養することができる。

【０５４１】

次いで、所望のモノクローナル抗体を、培養上清または腹水上清から採取する。免疫学的に有意な部分を含むモノクローナル抗体フラグメントを、Ｄｋｋ活性のアゴニストまたはアンタゴニストとして使用することができる。これらのフラグメントは一般に免疫グロブリン全体よりも免疫原性が低いので、特に治療状況での免疫反応フラグメント（Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ’、またはＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントなど）の使用がしばしば好ましい。

【０５４２】

抗体またはフラグメントを、現代のテクノロジー（組換え手段）を使用して産生することもできる。ＤｋｋまたはＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様の所望の領域に特異的に結合する領域を、キメラ状況において複数の種起源を使用して産生することもできる。このようにして作製した抗体試薬は、診断またはＤｋｋ活性の刺激物質もしくはインヒビターとしての使用が意図される。

【０５４３】

１つの実施形態では、Ｄｋｋに対する抗体は、高親和性（すなわち、10^{-5}～10^{-9}の範囲）でＤｋｋに結合する。好ましくは、抗Ｄｋｋ抗体は、キメラ抗体、霊長類抗体、霊長類化（登録商標）抗体、ヒト抗体、またはヒト化抗体を含む。また、本発明は、抗体フラグメント（例えば、Ｆａｂ’、Ｆｖ’、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ）$_2$）およびその凝集体の使用を含む。

【０５４４】

別の実施形態は、ＤｋｋまたはＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様を認識するキメラ抗体を意図する。キメラ抗体は、非ヒト可変領域およびヒト定常領域、最も典型的にはげっ歯類可変領域およびヒト定常領域を有する抗体をいうことが意図される。

【０５４５】

「ｐｒｉｍａｔｉｚｅｄ（霊長類化：登録商標）抗体」は、霊長類可変領域（例えば、ＣＤＲ’）およびヒト定常領域を有する抗体をいう。好ましくは、このような霊長類可変領域は、旧世界ザル由来である。

【０５４６】

「ヒト化抗体」は、実質的にヒトのフレームワークおよび定常領域、ならびに非ヒト相補性決定領域（ＣＤＲ）を有する抗体をいう。「実質的に」は、ヒト化抗体が典型的には（すなわち、ＣＤＲが由来する非ヒト親抗体の）少なくとも数個のドナーフレームワーク残基を保持するという事実をいう。

【０５４７】

キメラ抗体、霊長類抗体、霊長類化（登録商標）抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体の産生方法は、当分野で周知である。例えば、Ｑｕｅｅｎらに付与された米国特許第５，５３０，１０１号、Ｗｉｎｔｅｒらに付与された同第５，２２５，５３９号、ＢｏｓｓらおよびＣａｂｉｌｌｙらにそれぞれ付与された同第４，８１６，３９７号、および同第４，８１６，５６７号（その全体が本明細書中で参照することによって組み込まれる）を参照のこと。

【０５４８】

ヒト定常領域の選択は、被験体の抗ＤｋｋまたはＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様抗体の治療有効性が有意になり得る。好ましい実施形態では、被験体の抗ＤｋｋまたはＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様抗体は、ヒトγ１またはγ３定常領域、およびより好ましくはヒトγ１定常領域を含む。

【０５４９】

ヒト抗体の作製方法も公知であり、例として、ＳＣＩＤマウスでの産生およびin vitro免疫化が含まれる。

【０５５０】

被験体の抗ＤｋｋまたはＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様抗体を、種々の投与経路（典型的には、非経口）で投与することができる。これは、静脈内、筋肉内、皮下、直腸内、膣内を含むことが意図されるが、静脈内注入投与が好ましい。

【０５５１】

抗ＤｋｋまたはＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様抗体を、標準的な方法（例えば、薬学的に許容可能な緩衝液（例えば、滅菌生理食塩水、滅菌緩衝液、プロピレングリコール、およびその組み合わせ）の添加）によって治療用に処方される。

【０５５２】

有効投薬量は、特異的抗体、患者の健康状態、年齢、体重、または任意の他の治療、および他の因子に依存する。典型的には、有効投薬量は、約０．００１～３０ｍｇ／ｋｇ体重、より好ましくは約０．０１～２５ｍｇ／ｋｇ体重、最も好ましくは約０．１～約２０ｍｇ／ｋｇ体重の範囲である。

【０５５３】

このような投与を、投薬量および患者の反応に依存して種々のプロトコール（例えば、１週間毎、２週間毎、または毎月）で行うことができる。また、このような投与の他の治療との組み合わせも望ましいであろう。

【０５５４】

Ｄｋｋ－１相互作用タンパク質（図３１で同定されたものなど）に対する抗体もまた本発明で意図され、上記方法に記載のＤｋｋ－１抗体もまた同様に使用することができる。

【０５５５】

本発明の抗体を、診断試薬として治療組成物中にて実験スクリーニングで使用することができる。

【０５５６】

２８．２　化学ライブラリー

これらの方法によってアッセイした薬剤を、無作為に選択するか、合理的に選択するか、デザインすることができる。本明細書中で使用される、「薬剤」は、薬剤がＤｋｋ－１のみ、Ｄｋｋ－１相互作用タンパク質のみ、またはその関連基質、結合パートナーなどの会合に関与する特異的配列を考慮せずに無作為に選択した場合に無作為に選択されることをいう。無作為に選択された薬剤の例は、化学ライブラリーまたはペプチド組み合わせライブラリー、または生物の成長ブロスである。

【０５５７】
本発明の薬剤は、例として、ペプチド、小分子、ビタミン誘導体、および炭水化物であり得る。当業者は、本発明の薬剤の構造上の性質に制限されないことを容易に認識することができる。
【０５５８】
２８．３　ペプチド合成
本発明のペプチド剤を、当分野で公知の標準的な固相（または液相）ペプチド合成法を使用して調製することができる。さらに、これらのペプチドをコードするＤＮＡを、市販のオリゴヌクレオチド合成装置を使用して合成し、標準的な組換え産生系を使用して組換えにより産生することができる。非核酸コードアミノ酸が含まれる場合には固相ペプチド合成を使用したポリペプチドの産生が必要である。
【０５５９】
２９．Ｄｋｋ、Ｄｋｋ相互作用タンパク質、Ｄｋｋ／Ｄｋｋ相互作用タンパク質複合体、またはＤｋｋ／ＬＲＰ５もしくはＤｋｋ／ＬＲＰ６複合体の少なくとも１つの活性を調整する薬剤の使用
ＬＲＰ５、Ｄｋｋ、およびＤｋｋ相互作用タンパク質のアミノ酸配列を含むタンパク質またはポリペプチドなどの本発明のタンパク質および核酸は、他のＷｎｔ経路媒介活性の骨量調整および脂質調整に関与する。ＤｋｋまたはＤｋｋ相互作用タンパク質の発現を調整する（すなわち、上方またはダウンレギュレーションする）薬剤、またはＤｋｋまたはＤｋｋ相互作用タンパク質の少なくとも１つの活性の薬剤（それぞれアゴニストおよびアンタゴニスト）を使用して、ＤｋｋまたはＤｋｋ相互作用タンパク質の機能および活性に関連する生物学的および病理学的プロセスを調整することができる。
【０５６０】
本明細書中で使用される、被験体は、哺乳動物が本発明のタンパク質によって調整される病理学的または生物学的プロセスの調整に必要である限り、好ましくは任意の哺乳動物でありうる。用語「哺乳動物」は、哺乳綱に属する個体を意味する。本発明は、特に、ヒト被験体の治療で有用である。
【０５６１】
本明細書中で使用されるように、ＤｋｋまたはＤｋｋ相互作用タンパク質によって調整される生物学的または病理学的プロセスには、ＤｋｋのＤｋｋ相互作用タンパク質への結合ＤｋｋのＬＲＰ５またはＬＲＰ６の結合またはそれらからの遊離、ＤｋｋまたはＤｋｋ相互作用タンパク質のｍＲＮＡ合成の阻害または活性化、またはＬＲＰ５またはＬＲＰ６媒介Ｗｎｔシグナル伝達のＤｋｋまたはＤｋｋ相互作用タンパク質媒介阻害の阻害を含み得る。アルカリホスファターゼ活性、オステオカルシン産生、または鉱化などのさらなる骨関連マーカーを認めることができる。
【０５６２】
病理学的プロセスは、欠失効果が得られる生物学的プロセスのカテゴリーをいう。例えば、ＬＲＰ５もしくはＬＲＰ６および／またはＤｋｋおよび／またはＤｋｋ相互作用タンパク質の発現または発現のアップレギュレーションを、一定の疾患または病態と関連付けることができる。本明細書中で使用されるように、薬剤は、薬剤が被験体の基本レベル由来のプロセスを統計的に有意に（ｐ＜０．０５）変化させる場合に病理学的プロセスを調整するものをいう。例えば、薬剤は、薬剤が投与される被験体においてタンパク質によって媒介されるプロセスの程度または重症度を減少させることができる。例えば、疾患または病態を要望することができるか、いくつかの方法で本発明のタンパク質の発現または少なくとも１つの活性を減少または調整する薬剤の投与によって疾患の進行が調整された。
【０５６３】
ＬＲＰ５／６およびＤｋｋが骨量調整に直接および間接的に関与するので、本発明の１つの実施形態は、骨の状態または疾患の診断方法としてＤｋｋまたはＤｋｋ相互作用タンパク質発現を使用することである。一定のマーカーは、特異的Ｗｎｔシグナル伝達条件（例えば、ＴＣＦ／ＬＥＦ活性化）に関連する。骨状態の診断試験には、ＤｋｋまたはＤｋ

ｋ相互作用タンパク質核酸（すなわち、ＤＮＡまたはＲＮＡ）、オリゴマー、もしくはそのフラグメント、またはＴＣＦ／ＬＥＦ調節発現のタンパク質産物の存在についてのサンプルまたは抽出を試験するステップを含み得る。例えば、標準的なIn situハイブリダイゼーションまたは他の画像技術を使用して、Ｗｎｔシグナル伝達産物を観察することができる。当業者に明らかなように、本明細書中に記載の他の診断技術（例えば、血清マーカー）もまた有用である。

【０５６４】

本発明はまた、骨発達または骨喪失条件の調整方法に関する。骨喪失の阻害を、ＬＲＰ５／６媒介Ｗｎｔシグナル伝達経路の変化の阻害または調整によって行うことができる。例えば、ＬＲＰ５活性が存在しないことは、低骨量に関連し得る。ＬＲＰ５活性の増加は、高骨量に関連し得る。したがって、ＬＲＰ５活性の調整はまた、骨発達を調整する。アゴニストおよびアンタゴニストを介したＤｋｋ／ＬＲＰ５／６またはＤｋｋ／Ｄｋｋ相互作用タンパク質複合体の調整は、骨発達調節方法の１つの実施形態である。このような骨発達の調整は、例えば、Ｄｋｋ／ＬＲＰ（５／６）タンパク質複合体、Ｄｋｋ／Ｄｋ相互作用タンパク質複合体の活性の阻害、ＬＲＰ５遺伝子転写制御、またはＤｋｋまたはＤｋｋ相互作用タンパク質ｍＲＮＡの転写または翻訳の阻害に起因し得る。

【０５６５】

本発明の薬剤を、単独、特定の病理学的プロセスを調整する他の薬剤と組み合わせて得ることができる。本明細書中で使用されるように、２つの薬剤は、２つの薬剤を同時投与または薬剤が同時に作用するような様式で独立して投与する場合に組み合わせて投与するものをいう。

【０５６６】

本発明の薬剤緒は、非経口、皮下（ｓｃ）、静脈内（ｉｖ）、筋肉内（ｉｍ）、腹腔内（ｉｐ）、経皮、または口内経路で投与することができる。投薬量は、レシピエントの年齢健康状態、および体重、現在の治療の種類、治療しているならば治療頻度、および所望の効果の性質に依存する。

【０５６７】

本発明は、さらに、本発明のタンパク質の発現または少なくとも１つの活性を調整する１つまたは複数の薬剤を含む組成物を提供する。個体のニーズは様々であるが、有効量の各成分の最適な範囲の決定は、当業者の範囲内である。ＤｋｋまたはＤｋｋ相互作用タンパク質活性を媒介する有効成分の典型的な投薬量は、約０．０００１～約５０ｍｇ／ｋｇ体重を含む。好ましい投薬量は、約０．００１～約５０ｍｇ／ｋｇ体重を含む。最も好ましい投薬量は、約０．１～約１ｍｇ／ｋｇ体重を含む。平均体重が７０ｋｇのヒトでは、この範囲は、約７μｇ～約３．５ｇであり、約０．５ｍｇ～約５ｍｇの範囲が好ましい。

【０５６８】

薬学的に活性な薬剤に加えて、本発明の組成物は、作用部位への送達のために薬学的に使用することができる製剤中の活性化合物の処理を容易にする賦形剤および助剤を含む適切な薬学的に許容可能なキャリアを含み得る。非経口投与に適切な処方物には、水溶性形態の活性化合物の水溶液（例えば、水溶性の塩）が含まれる。さらに、適切な油性注射用懸濁液としての活性化合物の懸濁液を投与することができる。適切な親油性溶媒または賦形剤には、脂肪油（例えば、ゴマ油）または合成脂肪酸エステル（例えば、オレイン酸エチルまたはトリグリセリド）が含まれる。水性注射用懸濁液は、懸濁液の粘度を増加させる物質を含むことができ、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および／またはデキストランが含まれる。任意選択的に、懸濁液は、安定剤も含むことができる。リポソームおよび他の非ウイルスベクターを使用して、細胞送達用薬剤をカプセル化することもできる。

【０５６９】

本発明の全身投与用の薬学的処方物を、経腸、非経口、または局所（ｔｏｐ）投与のために処方することができる。実際、３つ全ての処方物型を、同時に使用して有効成分の全身投与を行うことができる。

【０５７０】
経口投与用の適切な処方物には、硬および軟ゼラチンカプセル、丸薬、コート錠剤を含む錠剤、エリキシル、懸濁液、シロップ、または吸入、および除法形態が含まれる。
【０５７１】
潜在的に、ＤｋｋまたはＤｋｋ相互作用タンパク質に結合するかＤｋｋ／ＬＲＰ５、Ｄｋｋ／ＬＲＰ６、またはＤｋｋ／Ｄｋｋ相互作用タンパク質複合体を調整する任意の化合物は治療化合物であり得る。本発明の１つの実施形態では、本発明のペプチドまたは核酸アプタマーを、治療組成物で使用する。このような組成物は、アプタマーまたは非修飾または修飾されたＬＲＰ５もしくはＬＲＰ６のフラグメントを含み得る。別の実施形態では、治療化合物は、Ｄｋｋ－１相互作用タンパク質またはその生物学的に活性なフラグメントを含む。
【０５７２】
例えば、アプタマーの取り込みを容易にするか安定化させることができるポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などのキャリア分子への化学結合によって核酸アプタマーを組み合わせで使用した。ＲＮＡに結合したジアルキルグリセロール部分を、リポソーム中のアプタマーに組み込み、それにより化合物が安定化する。化学的置換の組み込み（ＲＮＡ中のリボースの２’ＯＨ基の２’ＮＨへの変化によりリボヌクレアーゼ耐性が付与される）およびキャッピングなどにより、破壊を防止することができる。ＲＮＡアプタマーについてのいくつかのこのような技術は、Ｂｒｏｄｙ ａｎｄ Ｇｏｌｄ（Ｒｅｖ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、７４、３～１３、２０００）で考察されている。
【０５７３】
ペプチドアプタマーを、例えば、レトロウイルス送達、送達複合体中のＤＮＡのカプセル化、または単純な裸のＤＮＡの注射などによって罹患組織にアプタマー発現を指示する発現ベクターの移入によって治療に適用することができる。あるいは、アプタマー自体または合成アナログを、薬物として直接使用することができる。ポリマーおよび脂質中へのカプセル化により送達を補助することができる。治療薬および診断薬としてのペプチドアプタマーの使用は、Ｈｏｐｐｅ－Ｓｙｌｅｒ ａｎｄ Ｂｕｔｚ（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．、７８、４２６～４３０、２０００）に概説されている。
【０５７４】
本発明の別の態様では、本発明の制限ペプチドアプタマーの構造を、ＮＭＲまたはＸ線結晶学などによって決定することができる（Ｃａｖａｎａｇｈら、「タンパク質ＮＭＲ分光法：原理と実践」、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、１９９６；Ｄｒｅｎｔｈ、「タンパク質Ｘ線結晶学の原理」、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ、１９９９）。好ましくは、構造を、標的タンパク質との複合体で決定する。次いで、小分子アナログを、アプタマーの三次元構造の機能的エレメントの位置に従ってデザインする（「薬物デザインにおける分子モデリングガイドブック」、Ｃｏｈｅｎ編、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、１９９６；「分子モデリングと薬物デザイン（分子生物学および構造生物学のトピックス）」、Ｖｉｎｔｅｒ ａｎｄ Ｇａｒｄｎｅｒ編、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、１９９４）。したがって、本発明は、Ｄｋｋ、Ｄｋｋ相互作用タンパク質、Ｄｋｋ／Ｄｋｋ相互作用タンパク質複合体、ならびにＤｋｋ／ＬＲＰ複合体の活性を調整する有効且つ特異的な薬物のデザイン方法を提供する。本発明のペプチドアプタマーの小分子模倣物は、本発明の範囲内に含まれる。
【０５７５】
本発明の実施では、本発明の化合物を、単独または組み合わせ、または他の治療薬または診断薬と組み合わせて使用することができる。一定の好ましい実施形態では、本発明の化合物を、一般的に受け入れられている医療行為にしたがってこれらの条件について典型的に記載されている他の化合物と同時投与することができる。例えば、本発明の化合物を、骨喪失治療用の他の治療薬と組み合わせて投与することができる。骨喪失媒介薬には、二リン酸塩（例えば、アレンドロン酸、クロドロニン酸、エチドロン酸、パミドロン酸、リセドロン酸、およびチルドロニン酸）、ビタミンＤおよびビタミンＤアナログ、カテプ

シンＫインヒビター、ホルモン剤（例えば、カルシトニンおよびエストロゲン）などの骨吸収インヒビターならびに選択的エストロゲン受容体モジュレーター（すなわちＳＥＲＭ）（例えば、ラロキシフェン）が含まれる。副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）および骨形態形成タンパク質（ＢＭＰ）などの骨形成薬。

【０５７６】

Ｄｋｋ－１を調節する薬剤と脂質レベルを調節する薬剤との組み合わせ（ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼインヒビター（すなわち、Ｍｅｖａｃｏｒ（登録商標）、Ｌｉｐｉｔｏｒ（登録商標）などのスタチン、およびＢａｙｃｏｌ（登録商標）、Ｌｅｓｃｏｌ（登録商標）、Ｐｒａｖａｃｈｏｌ（登録商標）、およびＺｏｃｏｒ（登録商標）などの他のインヒビター）、胆汁酸金属イオン封鎖剤（例えば、Ｃｏｌｅｓｔｉｄ（登録商標）およびＷｅｌｃｈｏｌ（登録商標））、フィブリン酸誘導体（Ａｔｒｏｍｉｄ－Ｓ（登録商標）、Ｌｏｐｉｄ（登録商標）、Ｔｒｉｃｏｒ（登録商標））、およびニコチン酸など）などがさらに意図される。

【０５７７】

本発明の化合物を、通常脊椎動物、および好ましくはヒト、ヒツジ、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ラット、およびマウスなどの哺乳動物にin vivoで使用するかin vitroで使用することができる。

【０５７８】

３０．ペプチドおよびヌクレオチドアプタマーならびにペプチドアプタマー模倣物

別の実施形態は、Ｄｋｋと相互作用するか、ＤｋｋのＬＲＰ５、ＬＲＰ６、ＨＢＭ、またはＨＢＭ様分子との相互作用を遮断するか、任意の他のＤｋｋリガンド相互作用を遮断するか、Ｄｋｋ相互作用タンパク質（図５に示すものなど）と相互作用する薬剤をスクリーニングするためのペプチドおよびヌクレオチドアプタマーテクノロジーの使用を意図する。ペプチドアプタマーは、足場タンパク質から可変ペプチドドメインが示される分子である。チオレドキシンＡ（ｔｒｘＡ）は、足場として一般的に使用されている。ペプチド挿入断片は、ｔｒｘＡの触媒部位を破壊する。ペプチドアプタマーを拘束および／または提示するための足場タンパク質として多数のタンパク質を使用することもできることが認識される。拘束ペプチドアプタマーを示すことができる他の足場タンパク質には、スタフィロコッカスヌクレアーゼ、プロテアーゼインヒビターエグリンＣ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｔｅｎｄｅａのαアミラーゼインヒビターＴｅｎｄａｍｉｓｔａｔ、Ｓｐ１、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）（Ｈｏｐｐｅ－Ｓｅｙｌｅｒら、２００１、Ｊ．Ｓｔｅｒｏｉｄ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、７８、１０５～１１に概説されている）、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｃｕｓ由来のＳ１ヌクレアーゼ、またはファージディスプレイ用Ｍ１３を含み得る。アプタマーを固定して生物活性立体配座を示すことができる任意の分子が適切である。

【０５７９】

次いで、アプタマーは、所与の標的タンパク質にin vitroおよびin vivoで特異的に結合することができ、その標的タンパク質の機能を選択的に遮断する潜在性を有する。所望の標的タンパク質にin vivoで結合する能力に基づいて、無作為発現ライブラリーからペプチドアプタマーを選択する。簡単に述べれば、標的タンパク質（例えば、Ｄｋｋ、Ｄｋｋ相互作用タンパク質、またはＬＲＰ５／６）を、異種ＤＮＡ結合ドメイン（ＢＤ）に連結し、酵母試験株中でベイトとして発現させる。さらに、異種転写活性化ドメイン（ＡＤ）に連結した足場タンパク質配列中に挿入された無作為配列の異なるペプチド（例えば、１６量体）をコードするライブラリーを、プレイとして発現させる。ペプチドが標的タンパク質に結合する場合、機能的転写因子を再構築し、ＢＤおよびＡＤはタンパク質の相互作用により互いに架橋する。次いで、この転写因子は、比色分析酵素アッセイまたは成長選択によってモニターすることができるマーカー遺伝子のプロモーターを活性化することができる。調製およびスクリーニング法のさらなる変形形態は、例えば、Ｈｏｐｐｅ－Ｓｅｙｌｅｒら、２０００、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．、７８、４２６～４３０に記載されている。

【０５８０】
ヌクレオチドアプタマーは、例えば、Ｂｒｏｄｙら、２０００、Ｔｒｅｎｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、７４、５～１３に記載されている。ヌクレオチドアプタマーを使用したさらなる作製方法には、ＳＥＬＥＸ（すなわち、指数的リガンド連続強化法）が含まれる。ＳＥＬＥＸは、選択された標的分子のオリゴヌクレオチドリガンドの単離プロセスである（Ｔｕｅｒｋ ａｎｄ Ｇｏｌｄ、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４９、５０５～５１０、１９９０；米国特許第５，４７５，０９６号、同第５，５９５，８７７号、および同第５，６６０，９８５号を参照のこと）。Ｔｕｅｒｋ ａｎｄ Ｇｏｌｄに記載のＳＥＬＥＸは、標的分子を種々の配列のオリゴヌクレオチド（例えば、ＲＮＡ）のプールと混合するステップと、標的とオリゴヌクレオチドとの間に形成された複合体を保持するステップと、標的に結合したオリゴヌクレオチドを回収するステップと、ＲＮＡをＤＮＡに逆転写するステップと；ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用してＤＮＡを増幅するステップと、増幅したＤＮＡをＲＮＡに転写するステップと、さらに増大させた結合ストリンジェンシーでサイクルを繰り返すステップとを含む。各サイクルで３つの酵素反応が必要である。通常、標的に対して高い親和性および特異性を示すアプタマーを単離するために前記ステップを１２～１５サイクル行った。アプタマーは、意図する標的物質に結合することができるが、同一の条件下で他の分子に結合することができないオリゴヌクレオチドである。

【０５８１】
別の引例では、Ｂｏｃｋら、１９９０、Ｎａｔｕｒｅ、３５５、５６４～６は、Ｂｏｃｋの方法における核酸ライブラリーはＲＮＡの代わりにＤＮＡから構成されるので、各サイクル（すなわち、ＰＣＲ）に１つの酵素反応のみを必要とするという点でＴｕｅｒｋ ａｎｄ ＧｏｌｄのＳＥＬＥＸ法と異なるプロセスを記載している。Ｂｏｃｋらの方法を使用した高特異性および親和性のアダプターの同定および単離には、クロマトグラフィーカラムでの反復サイクルが依然として必要である。

【０５８２】
他のヌクレオチドアプタマー法には、Ｃｏｎｒａｄら、１９９６、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．、２６７、３３６～３６７に記載の方法が含まれる。Ｃｏｎｒａｄらは、種々のアダプター単離法を記載しており、その全てが標的結合リガンドの富化のために反復サイクルを使用し、大量の精製標的分子を必要とする。より最近に記載されたヌクレオチドアプタマーを使用したアプタマーの作製方法には、米国特許第６，１８０，３４８号、同第６，０５１，３８８号、同第５，８４０，８６７号、同第５，７８０，６１０号、同第５，７５６，２９１号、および同第５，５８２，９８１号に記載の方法が含まれるが、これらに限定されない。

【０５８３】
潜在的に、ＤｋｋまたはＤｋｋ相互作用タンパク質に結合するかＤｋｋ／Ｄｋｋ相互作用タンパク質、またはＤｋｋ／ＬＲＰ５、Ｄｋｋ／ＬＲＰ６、ＤＫｋ／ＨＢＭ、またはＤｋｋ／ＨＢＭ様複合体を調整する任意の化合物は、治療化合物であり得る。本発明の１つの実施形態では、本発明のペプチドまたは核酸アプタマーを、治療組成物で使用する。このような組成物は、アプタマー、または非修飾または修飾されたＬＲＰ５またはＬＲＰフラグメントを含み得る。

【０５８４】
例えば、アプタマーの取り込みを容易にするか安定化させることができるポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などのキャリア分子への化学結合によって核酸アプタマーを組み合わせで使用した。ＲＮＡに結合したジアルキルグリセロール部分を、リポソーム中のアプタマーに組み込み、それにより化合物が安定化する。化学的置換の組み込み（ＲＮＡ中のリボースの２’ＯＨ基の２’ＮＨへの変化によりリボヌクレアーゼ耐性が付与される）およびキャッピングなどにより、破壊を防止することができる。ＲＮＡアプタマーについてのいくつかのこのような技術は、Ｂｒｏｄｙら、２０００、Ｒｅｖ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、７４、３～１３、２０００で考察されている。

【０５８５】
ペプチドアプタマーを、例えば、レトロウイルス送達、送達複合体中のＤＮＡのカプセル化、または単純な裸のＤＮＡの注射などによって罹患組織にアプタマー発現を指示する発現ベクターの移入によって治療に適用することができる。あるいは、アプタマー自体または合成アナログを、薬物として直接使用することができる。ポリマーおよび脂質中へのカプセル化により送達を補助することができる。治療薬および診断薬としてのペプチドアプタマーの使用は、Ｈｏｐｐｅ－Ｓｙｌｅｒら、２０００、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．、７８、４２６～４３０に概説されている。
【０５８６】
本発明の別の態様では、本発明の制限ペプチドアプタマーの構造を、ＮＭＲまたはＸ線結晶学などによって決定することができる（Ｃａｖａｎａｇｈら、「タンパク質ＮＭＲ分光法：原理と実践」、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、１９９６；Ｄｒｅｎｔｈ、「タンパク質Ｘ線結晶学の原理」、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｖｅｒｌａｇ、１９９９）。好ましくは、構造を、標的タンパク質との複合体で決定する。次いで、小分子アナログを、アプタマーの三次元構造の機能的エレメントの位置に従ってデザインする（「薬物デザインにおける分子モデリングガイドブック」、Ｃｏｈｅｎ編、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、１９９６；「分子モデリングと薬物デザイン（分子生物学および構造生物学のトピックス）」、Ｖｉｎｔｅｒ　ａｎｄ　Ｇａｒｄｎｅｒ編、ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ、１９９４）。したがって、本方法は、Ｄｋｋ、Ｄｋｋ相互作用タンパク質、Ｄｋｋ／Ｄｋｋ相互作用タンパク質複合体、ならびにＤｋｋ／ＬＲＰ複合体の活性を調整する有効且つ特異的な薬物のデザインを提供する。本発明のペプチドアプタマーの小分子模倣物は、本発明の範囲内に含まれる。
【０５８７】
実施例
本発明は、以下の実施例を参照して記載されているが、これらは例示を提供し、本発明をいかなる様式によっても制限することを意図しない。当分野で周知の標準的技術または以下に詳述の技術を使用した。
【実施例１】
【０５８８】
医師は発端者について何が骨密度を異常に高くさせているのかの評価のためにＣｒｅｉｇｈｔｏｎ　Ｏｓｔｅｏｐｏｒｏｓｉｓ　Ｃｅｎｔｅｒに問い合わせた。彼女は、１８歳であり、背痛のために２年前に治療にやってきたが、彼女が乗客席に乗っていた乗用車が後ろから追突される交通事故に遭遇していた。彼女の負傷は疼痛および筋肉の圧痛を引き起こす腰の柔組織のみであった。Ｘ線写真では骨折や不全脱臼の証拠は認められなかった。疼痛は２年前から続くが、彼女はフルタイムで通学することができた。彼女がセンターで見かけられるまでには、疼痛はほぼ解決し、彼女は高校生として通常の活動に戻っていた。物理的試験により、身長が６６インチで体重が１２８ポンドの正常で健康な若い女性であることが明らかとなった。骨全体のＸ線写真により、皮質の厚く密度が高い骨が明らかとなった。全ての骨が関与していた。最も重要には、全ての骨の形状が完全に正常でった。脊椎ＢＭＣは、Ｌ１～４で９４．４８ｇであり、脊椎ＢＭＤはＬ１～４で１．６６７ｇｍ／ｃｍ^{2}であった。ＢＭＤは、女性のピーク骨量を超える５．６２標準偏差（ＳＤ）であった。Ｈｏｌｏｇｉｃ２０００～を使用したＤＸＡによって骨を測定した。彼女の母親をスキャンし、腰椎ＢＭＣは５８．０５ｇであり、ＢＭＤは１．５００ｇｍ／ｃｍ^{2}であった。彼女の母親の値は、ピーク骨量が４．１２ＳＤ高く、同世代よりも４．９８ＳＤ高い。彼女の母親は５１歳であり、身長が６５インチであり、体重は１４０ポンドであった。彼女の母親は、非常に健康で、筋骨格の病歴または他の症状は認められなかった。彼女の父親の腰椎ＢＭＣは７５．３３グラムであり、ＢＭＤは１．１１８ｇｍ／ｃｍ^{2}であった。これらの値は男性のピーク骨量より０．２５ＳＤ高い。彼は非常に健康で、身長が７２インチであり、体重は１８７ポンドであった。
【０５８９】

これらの臨床データにより、発端者の形質は彼女の母親から遺伝しているので骨量が非常に高いことが示唆されるが、正常な骨であり、母方の家系に注目した。米国特許第５，６９１，１５３号では、２２人のこれらのメンバーの骨量をＤＸＡで測定した。１つの場合、発端者の母方の祖父は死亡していたが、医療記録、生前の骨のＸ線写真、およびＤＮＡ遺伝子型同定用のパラフィルム包埋胆嚢標本を入手した。祖父のＸ線写真は、大腿骨および脊椎を含む試験に利用可能な全ての骨の密度が明らかに非常に高かったので、祖父を罹患メンバーに含めた。本発明では、家系を、３７人の有益な個体を含めて拡大した。元の研究より加えた１４個体のうち、２個体が重要な重複を示したので、これらの付加は元の親類よりも有意な改善である（Ｊｏｈｎｓｏｎら、Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．６０、１３２６～１３３２、１９９７）。個体１２～１４および１５由来の雄同士の伝達の存在によってＸ連鎖を除外する。

【実施例２】

【０５９０】

本発明は、これらのクローンのアセンブリである以下の表７から明らかなＨＢＭ遺伝子領域由来の２つのＢＡＣクローン由来のＤＮＡ配列を記載する。クローンｂ２００ｅ２１－ｈ（ＡＴＣＣ番号９８０８１２、配列番号１０～１１）を、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）、１０８０１、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｌｖｄ．、Ｍａｎａｓｓａ、ＶＡ２０１１０－２２０９、Ｕ．Ｓ．Ａ．に１９９７年１２月３０日に寄託した。クローンｂ５２７ｄ１２－ｈ（ＡＴＣＣ番号９８０７２０、配列番号５～９）を、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）、１０８０１、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｌｖｄ．、Ｍａｎａｓｓａ、ＶＡ２０１１０－２２０９、Ｕ．Ｓ．Ａ．に１９９８年１０月２日に寄託した。これらの配列は、当業者がＺｍａｘ１遺伝子のＤＮＡプローブ、遺伝子増幅用のＰＣＲプライマー、Ｚｍａｘ１遺伝子中のヌクレオチド多型、またはＺｍａｘ１遺伝子の調節エレメントを同定することができる固有の試薬である。

【実施例３】

【０５９１】

Ｄｋｋ－１のペプチドアプタマー配列の酵母２ハイブリッドスクリーニング

ペプチドアプタマーライブラリー構築。古典的な酵母２ハイブリッド（Ｙ２Ｈ）アッセイを使用して目的のタンパク質標的（またはベイト）に結合するキメラタンパク質を同定するために、ペプチドアプタマーライブラリーＴｐｅｐを構築した。Ｔｐｅｐライブラリーは、大腸菌チオレドキシン（ｔｒｘＡ）のジスルフィドループ内状況で発現する制限ランダムペプチドから構成された、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ Ｇａｌ１４活性化ドメインとのＣ末端融合物としての組み合わせアプタマーライブラリーである。ｔｒｘＡ足場タンパク質を含む制限酵素修飾組換えＹ２Ｈプレイベクター、ｐＰＣ８６（Ｇｉｂｃｏ）を使用して、Ｔｐｅｐライブラリーを作製した。

【０５９２】

アプタマーコード配列の作製。アプタマーコード配列を以下のように産生させた。適切な制限部位に囲まれた約１６個のアミノ酸のランダムストレッチをコードするＤＮＡを、セミランダムオリゴヌクレオチド合成によって作製した。合成オリゴヌクレオチドを、ＰＣＲ増幅し、制限消化し、およびｔｒｘＡ足場タンパク質内の許容部位にクローン化した。クローニングストラテジーは、ランダムオリゴヌクレオチド配列を足場タンパク質コード配列と共にインフレームで挿入して足場タンパク質－アプタマーキメラを発現させることであった。足場タンパク質自体は、アプタマーに適した発現および通常のＹ２Ｈアッセイで機能的なｐＰＣ８６ベクター内でＧａｌ４活性化ドメインとインフレームで存在する。さらなるアプタマーの調製方法は、当業者に自明である。

【０５９３】

ｔｒｘＡコード配列を含む許容組換えｐＰＣ８６ベクターの作製。第１に、ｐＰＣ８６（Ｇｉｂｃｏ）のＧａｌ４活性化ドメイン内に存在するＲｓｒＩＩ制限部位を、部位特異的変異誘発（Ｑｕｉｃｋｃｈａｎｇｅ（商標）キット、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）によって

除去した。Ｇａｌ４活性化ドメインのアミノ酸配列は、この修飾によって変化しなかった。異なるコントロール相互作用の強度は、修飾によって変化しないと評価された。

【０５９４】

第２に、大腸菌コード配列を、ＲｓｒＩＩ修飾ｐＰＣ８６のＳａｌＩおよびＮｏｔＩ部位にクローン化した。次いで、ＥｃｏＲＩおよびＳｐｅＩ部位を、ｔｒｘＡ　ＲｓｒＩＩ部位内に移入した。ペプチドアプタマーをコードするオリゴヌクレオチドを、得られたベクターのＥｃｏＲＩおよびＳｐｅＩ部位にクローン化した。

【０５９５】

【表１３】

表１３

コンティグ	ATCC番号	配列番号	長さ（塩基対）
b527d12-h コンティグ302G	980720	5	3096
b527d12-h コンティグ306G	980720	6	26928
b527d12-h コンティグ307G	980720	7	29430
b527d12-h コンティグ308G	980720	8	33769
b527d12-h コンティグ309G	980720	9	72049
b200e21-h コンティグ1	980812	10	8705
b200e21-h コンティグ4	980812	11	66933

【実施例４】

【０５９６】

抗体の作製

以下の各抗体作製実施例では、これらの線状ペプチドの合成の後に２匹のＮｅｗ　Ｚｅａｌａｎｄ　Ｒａｂｂｉｔに注射する。その後の追加免疫および採血は、標準的な１０週間プロトコールにしたがって行う。エンドユーザは、５ｍｇのペプチド、採血前のアリコート、約８０ｍｌの２匹の各ウサギ由来の粗血清を受け取り、ＥＬＩＳＡ滴定データが得られる。

【０５９７】

ＬＲＰ５多型特異的抗体の作製。ＨＢＭ多型と野生型ＬＲＰ５／Ｚｍａｘ：ＭＹＷＴＤＷＶＥＴＰＲＩＥ（配列番号）（変異ペプチド）およびＭＹＷＴＤＷＧＥＴＰＲＩＥ（配列番号）（負の選択のための野生型ペプチド）とを区別する抗体を得るために以下のペプチドに対する抗体を作製した。免疫蛍光データにより、親和性精製後の抗体はＨＢＭに特異的であり、ＬＲＰ５を認識しないことを確認した（図２３）。

【０５９８】

ＬＲＰ５単一特異性抗体の作製。以下のＬＲＰ５のアミノ酸配列に対するＬＲＰ５単一特異性ポリクローナル抗体を作製した。ペプチド１（アミノ酸２６５～２７７）－ＫＲＴＧＧＫＲＫＥＩＬＳＡ（配列番号：）、ペプチド２（アミノ酸１１７８～１１９４）－ＥＲＶＥＫＴＴＧＤＫＲＴＲＩＱＧＲ（配列番号：）、およびペプチド３（アミノ酸１３５２～１３７５）－ＫＱＱＣＤＳＦＰＤＣＩＤＧＳＤＥ（配列番号：）。免疫蛍光により、作製された抗体はＬＲＰ５を検出することを確認した。

【０５９９】

Ｄｋｋ－１単一特異性ポリクローナル抗体の作製。以下のＤｋｋ－１のアミノ酸配列に対するＤｋｋ－１単一特異性ポリクローナル抗体を作製した。

ヒトＤｋｋ－１の

ペプチド１－ＧＮＫＹＱＴＩＤＮＹＱＰＹＰＣ（配列番号：）、

ペプチド２－ＬＤＧＹＳＲＲＴＴＬＳＳＫＭＹＨＴＫＧＱＥＧ（配列番号：）、

ペプチド３－　ＲＩＱＫＤＨＨＱＡＳＮＳＳＲＬＨＴＣＱＲＨ（配列番号：）、

ペプチド４－ＲＧＥＩＥＥＴＩＴＥＳＦＧＮＤ（配列番号：）、および

ペプチド５－ＥＩＦＱＲＣＧＥＧＬＳＣＲＩＱＫＤ（配列番号：）。ウェスタンブロット

は、ペプチド２および４に対して作製した抗体はＤｋｋ－１に特異的であることを示した。

【実施例５】

【０６００】

アフリカツメガエル胚アッセイにおけるＷｎｔ媒介シグナル伝達に対する外因性Ｄｋｋ－１の効果

アフリカツメガエル胚は有益であり、Ｗｎｔシグナル伝達の改変を解明するためのｉｎ ｖｉｖｏアッセイは十分に確立されている（ＭｃＭａｈｏｎら、１９８９、Ｃｅｌｌ、５８、１０７５～８４；Ｗｏｄａｒｚ ａｎｄ Ｎｕｓｓｅ、１９９８で概説したＳｍｉｔｈら、１９９１）。

【０６０１】

Ｗｎｔシグナル伝達経路の改変を、４～８細胞期に割球腹側へのＲＮＡ注入後の背側化表現型（二胚軸形成）についての胚の試験によって視覚化することができる。分子レベルでは、表現型を、１０．５胚期での種々のマーカー遺伝子発現の探察によって分析することができる。このようなマーカーには、一般的な内胚葉、中胚葉、および外胚葉マーカーならびに種々の組織特異的転写物が含まれる。

【０６０２】

ＲＴ－ＰＣＲ／ＴａｑＭａｎ（登録商標）によって分析を行い、胚組織全体またはより制限された様式（微量解剖）に対して分析を行うことができる。この系はＨＢＭおよび異なるＷｎｔまたはＷｎｔアンタゴニストなどの転写物の組み合わせの注射によって非常に柔軟且つ迅速であるので、Ｗｎｔ経路におけるＨＢＭ機構を解剖することができる。さらに、Ｚｍａｘ／ＬＲＰ５およびＨＢＭが単独または他の成分と組み合わせてＷｎｔシグナル伝達の調整が異なるかどうかを決定するための調査を行う。種々の研究は、ＬＲＰ６のみまたはＬＲＰ５＋Ｗｎｔ５ａがこの系で二胚軸形成（背側化）を誘導することができることを証明した（Ｔａｍａｉら、２０００、Ｎａｔｕｒｅ、４０７、５３０～３５）。

【０６０３】

アフリカツメガエル発現の構築（ベクターｐＣＳ２$^{+}$）。ベクターｐＣＳ２$^{+}$を使用して構築物を調製した。ＤＮＡ挿入断片をベクターＳＰ６プロモーターに関してセンス方向にサブクローン化した。ｐＣＳ２$^{+}$ベクターは、挿入断片の下流にＳＶ４０ウイルスポリアデニル化シグナルおよびＴ３プロモーター（アンチセンスｍＲＮＡの作製用）を含む。

【０６０４】

全長Ｚｍａｘ１／ＬＲＰ５およびＨＢＭ ＯＲＦ ｃＤＮＡ。挿入断片ｃＤＮＡを、ＢｇｌＩＩ－ＥｃｏＲＩ消化によって全長ｃＤＮＡレトロウイルス構築物（至適化Ｋｏｚａｋ配列を含む）から単離し、ｐＣＳ２$^{+}$ベクターのＢａｍＨＩ－ＥｃｏＲＩ部位にサブクローン化した。ＨＢＭ様分子をコードするｃＤＮＡを、ｐＣＳ２$^{+}$ベクターにサブクローン化し、当業者によって同様に処理する。

【０６０５】

全長ＸＷｎｔ８。このｃＤＮＡを、オリゴ１１４４８４（配列番号：）（５’－ＣＡＧＴＧＡＡＴＴＣＡＣＣＡＴＧＣＡＡＡＡＣＡＣＣＡＣＴＴＴＧＴＴＣ－３’）および１１４４８７（配列番号：）（５’－ＣＡＧＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＴＣＡＴＣＴＣＣＧＧＴＧＧＣＣＴＣＴＧ－３’）を使用してアフリカツメガエル胚ｃＤＮＡライブラリーからＰＣＲ増幅した。ＧｅｎＢａｎｋ番号Ｘ５７２３４から決定したところ、コンセンサスＫｏｚａｋ配列の５’でＯＲＦを増幅するようにオリゴをデザインした。以下の条件を使用してＰＣＲを行った。９６℃で４５秒間；６３℃で４５秒間；７２℃で２分間を３０サイクル。得られたＰＣＲ産物を精製し、ｐＣＲＩＩ－ＴＯＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．）にサブクローン化し、配列を検証し、ＢａｍＨＩ／ＸｂａＩで消化した。この挿入断片をベクターにＢａｍＨＩ－ＸｈｏＩ部位にサブクローン化した。

【０６０６】

全長Ｗｎｔ５ａ。マウスＷｎｔ５ａ ｃＤＮＡクローンを、Ｕｐｓｔａｔｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｌａｋｅ Ｐｌａｃｉｄ、ＮＹ）から購入し、ベクターのＥｃｏＲ

Ｉ部位にサブクローン化した。配列決定は挿入断片の方向を確認した。

【０６０７】

全長ヒトＤｋｋ－１。ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＦ１２７５６３のヒトｃＤＮＡは、公的なデータベースで利用可能であった。この配列を使用して、開始ＡＴＧのすぐ上流のコンセンサスＫｏｚａｋ配列を使用して読み取り枠を増幅するようにＰＣＲプロモーターをデザインした。オリゴ１１７１６２（配列番号：）（５’－ＣＡＡＴＡＧＴＣＧＡＣＧＡＡＴＴＣＡＣＣＡＴＧＧＣＴＣＴＧＧＧＣＧＣＡＧＣＧＧ－３’）および１１７１６３（配列番号：）（５’－ＧＴＡＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＴＣＴＡＧＡＴＴＡＧＴＧＴＣＴＣＴＧＡＣＡＡＧＴＧＴＧＡＡ－３’）を使用して、ヒト子宮ｃＤＮＡライブラリーをＰＣＲによってスクリーニングした。得られたＰＣＲ産物を精製し、ｐＣＲＩＩ－ＴＯＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．）にサブクローン化し、配列を検証し、ＥｃｏＲＩ／ＸｈｏＩで消化した。この挿入断片をｐＣＳ２＋ベクターにＥｃｏＲＩ－ＸｈｏＩ部位にサブクローン化した。

【０６０８】

全長ヒトＤｋｋ－２。分子のＤｋｋファミリーとのＺｍａｘ／ＬＲＰ５／ＨＢＭの相互作用の特異性を調査するためにヒトＤｋｋ－２をコードする全長ｃＤＮＡを単離した。Ｚｍａｘ／ＬＲＰ５／ＨＢＭの潜在的結合パートナーとして酵母中でＤｋｋ－１を同定した。Ｄｋｋ－１はまた、文献中でＷｎｔシグナル伝達経路のアンタゴニストであるがＤｋｋ－２はアンタゴニストではないことが示されている（Ｋｒｕｐｎｉｋら、１９９９）。Ｄｋｋ－２全長ｃＤＮＡは、ＤｋｋファミリーＤｋｋ－１、Ｄｋｋ－２、Ｄｋｋ－３、Ｄｋｋ－４、Ｓｏｇｇｙ、そのホモログおよび変異型など）とのＺｍａｘ／ＬＲＰ５／ＨＢＭ相互作用の特性および生物学的優位性を区別するためのツールとして役立つ。Ｄｋｋ－２のヒトｃＤＮＡ配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿０１４４２１）は、公的なデータベースで利用可能である。この配列を使用して、ＰＣＲプライマーを、開始ＡＴＧのすぐ下流のコンセンサスＫｏｚａｋ配列を使用して読み取り枠を増幅するようにデザインした。オリゴ５１４０９（配列番号：）（５’－　ＣＴＡＡＣＧＧＡＴＣＣＡＣＣＡＴＧＧＣＣＧＣＧＴＴＧＡＴＧＣＧＧ－３’）および５１４１１（配列番号：）（５’－ＧＡＴＴＣＧＡＡＴＴＣＴＣＡＡＡＴＴＴＴＣＴＧＡＣＡＣＡＣＡＴＧＧ－３’）を使用して、ヒト胚および脳ｃＤＮＡライブラリーをＰＣＲによってスクリーニングした。得られたＰＣＲ産物を精製し、ｐＣＲＩＩ－ＴＯＰＯにサブクローン化し、配列を検証し、ＢａｍＨＩ／ＥｃｏＩで消化した。この挿入断片をｐＣＳ２＋ベクターにＢａｍＨＩ－ＥｃｏＩ部位にサブクローン化した。

【０６０９】

全長ＬＲＰ６を、ＸｈｏＩ－ＸｂａＩ消化によってｐＥＤ６ｄｐｃ４ベクターから単離した。全長ｃＤＮＡを、ｐＣＳ２＋のＸｈｏＩ－ＸｂａＩ部位に再構築した。挿入断片の方向を、ＤＮＡ配列決定によって確認した。

【０６１０】

ｍＲＮＡ合成および微量注入プロトコール。アフリカツメガエル胚への微量注入用のｍＲＮＡを、テンプレートとして上記のｐＣＳ２＋ベクターでのｃＤＮＡ構築物を使用してin vitro転写によって作製する。ＲＮＡを、Ｓｐ６ポリメラーゼ反応について製造者の説明書に従って、Ａｍｂｉｏｎ　ｍＭｅｓｓａｇｅ　ｍＭａｃｈｉｎｅ高収量キャッピングＲＮＡ転写物キット（カタログ番号１３４０）を使用して合成した。ＲＮＡ産物を、滅菌ガラス蒸留水で最終体積５０μｌにし、製造者の説明書に従って、放射性標識ＲＮＡ精製Ｇ５０－Ｓｅｐｈａｄｅｘのクイックスピンカラム（Ｒｏｃｈｅ、カタログ番号１２７４０１５）で精製した。得られた溶出物を、最後にフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコールで抽出し、標準的なプロトコール（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９８９）を使用してイソプロパノール沈殿を行った。最終ＲＮＡ体積は、約５０μｌであった。ＲＮＡ濃度を、２６０ｎｍおよび２８０ｎｍの吸光度によって決定した。ＲＮＡの完全性を、変性（ホルムアルデヒド）アガロースゲル電気泳動の臭化エチジウム染色によって視覚化した（Ｓａｍｂｒｏｏｋ、１９８９）。種々の量のＲＮＡ（２ｐｇ～１ｎｇ）を、４～８細胞ア

フリカツメガエル胚の割球腹側に注入する。これらのプロトコールは、Ｍｏｏｎら、１９８９、Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ－Ｊ．ｏｆ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｃｅｌｌ＆Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１、７６～８９、およびＰｅｎｇ、１９９１、Ｍｅｔｈ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．、３６、６５７～６２に記載されている。

【０６１１】

二胚軸形成のスクリーニング。in vitro転写ＲＮＡを精製し、４～８細胞期のアフリカツメガエル胚（受精後２時間）の割球腹側に注入した。１０．５期（受精後約１１時間）では、注入した胚を全部で７２時間培養し、二胚軸形成（背側化）の存在についてスクリーニングした（図３３）。正のコントロール（Ｃｈｒｉｓｔｉａｎら、１９９１）ＸＷｎｔ８注入（２～１０ｐｇ）を使用し、ネガティブコントロールとして水注入または非注入胚を使用して、本発明者らは、Ｚｍａｘ（ＬＲＰ５）＋Ｗｎｔ５ａ（それぞれ５００および２０ｐｇ）が二胚軸形成を誘導することができるという公的な所見を繰り返した。Ｗｎｔ５ａ（２０ｐｇ）のみでは二胚軸形成を誘導できない（Ｍｏｏｎら、１９９３が以前に報告している）。ＲＮＡの注入量が胚発達を混乱させないことを示すために、ネガティブコントロールとしてＧＦＰ　ＲＮＡ（１００～７７０ｐｇ）を注入した。明らかに、ＨＢＭ＋Ｗｎｔ５ａ（それぞれ５００および２０ｐｇ）により、Ｚｍａｘ（ＬＲＰ５）＋Ｗｎｔ５ａと比較して約３．５倍を超える表現型の強い応答（フィッシャーの直説法でｐ＝０．０４３）が得られ、ＨＢＭ変異がＷｎｔ経路を活性化することが示唆される（図３４および３５）。ＨＢＭ／Ｗｎｔ５ａ胚はまた、Ｚｍａｘ（ＬＲＰ５）／Ｗｎｔ５ａ胚よりも「前背にある」ようであり、機能変異獲得も示唆される。

【０６１２】

Ｚｍａｘ／ＬＲＰ５およびＨＢＭ媒介Ｗｎｔシグナル伝達のモジュレーターとしてのＤｋｋ－１の役割を調査した。文献での報告は、アフリカツメガエル系における標準的なＷｎｔ経路のアンタゴニストとしての以前に特徴付けられたアフリカツメガエルおよびマウスＤｋｋ－１を含む（Ｇｌｉｎｋａら、１９９８、Ｎａｔｕｒｅ、３９１、３５７～６２）。ヒトＤｋｋ－１構築物を使用して、用量－応答アッセイを行って、本発明者らの構築物が機能的であることを確認し、微量注入のための最適なＲＮＡ量を同定した。２５０ｐｇ／胚のｈＤｋｋ－１　ＲＮＡを使用して、９０％を超える（Ｐ＜０．００１）胚で、発表された報告から予想される増大した前部構造（巨大な頭部）を示すことが認められた（図３６）。

【０６１３】

Ｚｍａｘ／ＬＲＰ５またはＨＢＭの存在下でのＷｎｔシグナル伝達のｈＤｋｋ－１調整機構も調査した。いかなるｈＤｋｋ－１も存在しない場合、ＨＢＭ＋Ｗｎｔ５ａは、Ｚｍａｘ／ＬＲＰ５＋Ｗｎｔ５ａよりもＷｎｔシグナル伝達の強力なアクチベーターであることが確認された（ｐ＜０．０５）。興味深いことに、ｈＤｋｋ－１（２５０ｐｇ）の存在下では、Ｚｍａｘ／ＬＲＰ５媒介Ｗｎｔシグナル伝達は抑制されるが（ｐ＜０．０５）、ｈＤｋｋ－１はＨＢＭ媒介Ｗｎｔシグナル伝達を抑制することができなかった（ｐ＜０．０１）（図３７）。この所見の特異性を、Ｄｋｋファミリーの他のメンバー、他のＷｎｔ遺伝子、ＬＲＰ６、さらなるＺｍａｘ／ＬＲＰ５変異、およびペプチドアプタマーの調査によってさらに取り組むことができる。

【実施例６】

【０６１４】

ＴＣＦ－ルシフェラーゼアッセイにおけるＷｎｔシグナル伝達に対する外因性ＤｋｋおよびＬＲＰ５の効果

Ｗｎｔ活性は、分泌性Ｆｒｉｚｚｌｅｄ関連タンパク質（ＳＦＲＰ）、Ｃｅｒｂｅｒｕｓ、Ｗｎｔ阻害因子１、およびＤｋｋ－１を含む多数のタンパク質によって拮抗することができる（Ｋｒｕｐｎｉｋら、１９９９）。タンパク質のＤｋｋファミリーは、Ｄｋｋ－１－４およびＳｏｇｇｙ、Ｄｋｋ－３－様タンパク質からなる。Ｄｋｋ－１およびＤｋｋ－４は、Ｗｎｔ媒介アフリカツメガエル胚発達を拮抗するが、Ｄｋｋ－２、Ｄｋｋ－３、およびＳｏｇｇｙは拮抗しないことが示された。Ｗｎｔタンパク質との直接相互作用によ

ってＷｎｔ活性を認識するこれらの多くのタンパク質と異なり、Ｄｋｋ－１は、２つの最近同定されたＷｎｔ補助受容体ＬＲＰ５およびＬＲＰ６への結合によって作用する（Ｍａｏら、２００１；Ｂａｆｉｃｏら、２００１）。本発明者らおよびＭａｏらはＬＲＰ６の欠失構築物を使用してこの相互作用の詳細を試験し、ＥＧＦ反復３および４はＤｋｋ－１相互作用に重要であることを証明した。したがって、２つのＤｋｋタンパク質（Ｄｋｋ－１およびＤｋｋ－２）の活性を、種々のＷｎｔメンバー、ＬＲＰ５、ＬＲＰ６、およびＨＢＭと呼ばれるＬＲＰ５の変異形態を使用して調査した。本発明は、Ｗｎｔ媒介シグナル伝達に対するＤｋｋ作用に関するＬＲＰ５とＨＢＭとの間の任意の機能の相違が存在するかどうかを調査する。ＨＢＭ媒介Ｗｎｔシグナル伝達を模倣する因子を同定するために、種々の試薬（Ｄｋｋ－１ペプチド、制限ＬＲＰ５ペプチドアプタマー、制限Ｄｋｋ－１ペプチドアプタマー、およびＤｋｋ－１に対するポリクローナル抗体（上記の実施例４）を含む）を開発した。

【０６１５】

方法。種々のＬＲＰ５制限ペプチドを開発した。詳細には、ＬＲＰ５のＬＢＤと相互作用する４つのペプチド（図３８、図３９の構築物ＯＳＴ２５９～２６２）およびＬＲＰ５の細胞質ドメインと相互作用する３つのペプチド（図３９の構築物ＯＳＴ２６６～ＯＳＴ２６８）。さらに、以下の２つのＤｋｋ－１ペプチドを開発した。図３９のＯＳＴ２６４およびＯＳＴ２６５（Ｄｋｋ－１アミノ酸１３９～２６６および９６～２４５に対応し、ＬＲＰ５と相互作用する最も小さな領域（図４０）を含む）。ＬＲＰ５　ＬＢＤ相互作用ペプチドおよびＤｋｋ－１ペプチドをコードするｃＤＮＡクローンを、分泌のためのペプチドをターゲティングするためのＫｏｚａｋおよびシグナル配列を付加したｐｃＤＮＡ３．１にサブクローン化した。ＬＲＰ５の細胞質ドメインと相互作用する３つのペプチドをコードする構築物もまた、ｐｃＤＮＡ３．１にサブクローン化した。しかし、これらの後者の構築物は、シグナル配列を含まない。

【０６１６】

Ｗｙｅｔｈ　Ａｙｅｒｓｔ（Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ、ＰＡ）によって開発されたＨＯＢ－０３－ＣＥ６骨芽細胞を、２４ウェルプレートに、１０％（ｖ／ｖ）熱不活化ＦＢＳ、１×ペニシリン／ストレプトマイシン、および１×Ｇｌｕｔａｍａｘ－１を含む１ｍｌの成長培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２無フェノールレッド）中の１５０，０００細胞／ウェルで播種し、３４℃で一晩インキュベートした。翌日、細胞を、０．３５μｇ／ウェルのＬＲＰ５、ＨＢＭ、またはコントロールプラスミドＤＮＡ（空のベクターｐｃＤＮＡ３．１）、およびＷｎｔ１またはＷｎｔ３ａプラスミドＤＮＡのいずれかを含むＯｐｔｉＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎｅ）中のＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（登録商標）（製造者に記載、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してトランスフェクトした。ＬＲＰ６プラスミドＤＮＡ（０．３５μｇ／ウェル）またはコントロールｐＥＤｄｐｃ４空のベクターを使用して類似の実験を行った。さらに、これらの各群を、３つの群に分け、０．３５μｇ／ウェル　Ｄｋｋ－１、Ｄｋｋ－２、またはｐｃＤＮＡ３．１コントロールＤＮＡを与えた。全てのウェルを、０．０２５μｇ／ウェルのＣＭＶ　βガラクトシダーゼプラスミドＤＮＡおよび０．３５μｇ／ウェル　１６×ＴＣＦ（ＡＳ）－ルシフェラーゼレポーターＤＮＡ（Ｒａｍｅｓｈ　Ｂｈａｔ、Ｗｙｅｔｈ－Ａｙｅｒｓｔ（Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ、ＰＡ）が開発）でトランスフェクトした。４時間のインキュベーション後、細胞をすすぎ、１ｍｌの新鮮な成長培地を各ウェルに添加した。細胞を３４℃で一晩培養し、その後洗浄し、培地を交換した。細胞を、３７℃でさらに１８～２４時間培養した。次いで、細胞を、５０μｌ／ウェルの１×溶解緩衝液で溶解した。抽出物を、５μｌ抽出物＋５０μｌ　βガラクトシダーゼ希釈物を使用してβガラクトシダーゼ活性（Ｇａｌａｃｔｏ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ　Ｄｉｌｕｅｎｔ＆Ｌｉｇｈｔ　Ｅｍｉｓｓｉｏｎ　Ａｃｃｅｌｅｒａｔｏｒ、Ｔｒｏｐｉｘ）についてアッセイし、２０μｌの抽出物を使用してルシフェラーゼ活性（ルシフェラーゼアッセイ試薬、Ｐｒｏｍｅｇａ）についてアッセイした。

【０６１７】

Ｕ２ＯＳヒト骨肉腫細胞も使用した。Ｕ２ＯＳ細胞（ＡＴＣＣ）を９６ウェルプレートに、１０％（ｖ／ｖ）熱不活化ＦＢＳ、１×ペニシリン／ストレプトマイシン、および１×Ｇｌｕｔａｍａｘ－１を含む２００μｌの成長培地（ＭｃＣｏｙ’ｓ５Ａ）中の３０，０００細胞／ウェルで播種し、３７℃で一晩インキュベートした。翌日、培地を、ＯｐｔｉＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と交換し、細胞を、０．００５μｇ／ウェルのＬＲＰ５、ＨＢＭ、ＬＲＰ６またはコントロールプラスミドＤＮＡ（空のベクターｐｃＤＮＡ３．１）、およびＷｎｔ１（０．００２５μｇ／ウェル）またはＷｎｔ３ａ（０．００２５μｇ／ウェル）プラスミドＤＮＡのいずれかを含むＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（登録商標）（製造者に記載、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してトランスフェクトした。さらに、１６ｘ－（ＡＳ）ＴＣＦ－ＴＫ－ホタルルシフェラーゼおよびコントロールＴＫ－ｒｅｎｉｌｌａルシフェラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．）を、全ての実験でそれぞれ０．３μｇ／ウェルおよび０．０６μｇ／ウェルで同時トランスフェクトした。さらに、これらの各群を異なる群に分け、０．０５μｇ／ウェル　Ｄｋｋ－１、Ｄｋｋ－２、Ｄｋｋ３、Ｄｋｋ１－アルカリホスファターゼ（ＡＰ）、変異体Ｄｋｋ－１（Ｃ２２０Ａ）、Ｓｏｇｇｙ、またはｐｃＤＮＡ３．１コントロールＤＮＡを与えた。他の実験では、細胞を、ＬＲＰ５相互作用アプタマー（０．０５μｇ／ウェル）と共に０．００５μｇ／ウェルのＬＲＰ５、０．００２５μｇ／ウェルのＷｎｔ１またはＷｎｔ３ａ（０．００２５μｇ／ウェルのコントロールｐｃＤＮＡ３．１を使用）で同時トランスフェクトした。細胞を、３７℃でさらに１８～２０時間培養した。培養培地を除去した。細胞を、３７℃でさらに１８～２０時間培養した。培養培地を除去した。次いで、細胞を、Ｄｕａｌ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ｒｅａｇｅｎｔキット（ＤＬＲ－キット－Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．）の１００μｌ／ウェルの１×Ｐａｓｓｉｖｅ　Ｌｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＰＬＢ）で溶解した。２０μｌの溶解物を、ＤＬＲキットのＬＡＲＩＩ試薬と合わせ、ＴｏｐＣｏｕｎｔ（Ｐａｃｋａｒｄ）装置にてＴＣＦ－ホタルルシフェラーゼシグナルについてアッセイした。Ｆｉｒｅｆｌｙ読み取りを測定後、ＤＬＲキットの消光剤およびｒｅｎｉｌｌａルシフェラーゼ基質を含む１００μｌの「Ｓｔｏｐ　ａｎｄ　Ｇｌｏ」試薬を各ウェルに添加した。その直後に、ｒｅｎｉｌｌａルシフェラーゼの読み取りを、ＴｏｐＣｏｕｎｔ（Ｐａｃｋａｒｄ）装置を使用して測定した。ＴＣＦ－ホタルルシフェラーゼとコントロールｒｅｎｉｌｌａ読み取りとの比を、各ウェルについて計算し、全データにおいて３連を超えるウェルの平均の比を示した。

【０６１８】

結果。これらの実験結果は、Ｗｎｔ１およびＬＲＰ５の存在下でのＤｋｋ－１はＴＣＦ－ルシフェラーゼ活性を有意に拮抗することを証明する（図４１）。対照的に、Ｄｋｋ－１はＨＢＭ／Ｗｎｔ１媒介ＴＣＦ－ルシフェラーゼ活性に対する効果を示さなかった（図４１）。類似の実験では、Ｄｋｋ－１はまた、ＬＲＰ５／Ｗｎｔ３ａを拮抗することができるが、ＨＢＭ／Ｗｎｔ３ａ媒介ＴＣＦ－ルシフェラーゼ活性を拮抗できなかった（図４２）。これらの結果は、ＨＢＭ変異体は、ＨＯＢ０３ＣＥ６骨芽細胞におけるＷｎｔ１およびＷｎｔ３ａシグナル伝達のアンタゴニストとして不活性であることを示す。Ｗｎｔ１を使用した他の実験では、Ｄｋｋ－１はＬＲＴ５またはＨＢＭ媒介ＴＣＦ－ルシフェラーゼ活性に対する効果はなかった（図４１）。対照的に、Ｗｎｔ３ａの存在下でＬＲＰ５またはＨＢＭのいずれを使用した場合、Ｄｋｋ－２はＴＣＦ－ルシフェラーゼ活性を認識できなかった（図４２）。これらの後者の結果は、ＨＢＭ変異はＷｎｔ３ａの存在下でＤｋｋ－２作用に対する効果がないことを示す。ＨＯＢ－０３－ＣＥ６細胞中での密接に関連するＬＲＰ６　ｃＤＮＡを使用して実験を行った。これらの実験では、ＬＲＰ６／Ｗｎｔ１およびＬＲＰ６／Ｗｎｔ３ａ媒介ＴＣＦ－ルシフェラーゼを、ＬＲＰ５と同一の様式で調節した。詳細には、Ｄｋｋ－１はＬＲＰ６／Ｗｎｔ１媒介ＴＣＦ－ルシフェラーゼ活性を拮抗し、Ｄｋｋ－２は効果がなかった（図４１）。しかし、Ｄｋｋ－２のＬＲＰ５／Ｗｎｔ３ａとの作用に類似して、Ｄｋｋ－２は、ＬＲＰ６／Ｗｎｔ３ａ媒介ＴＣＦ－ルシフェラーゼ活性を拮抗させることができた（図４２）。

【０６１９】

Ｕ２ＯＳ細胞での結果は、Ｗｎｔ３ａの存在下でＷｎｔシグナル伝達のＯＳＴ２６２ＬＲＰ５ペプチドアプタマー活性化の強力な効果を示す（図４３）。これらの機能の結果を、アフリカツメガエルアッセイにおけるＬＲＰ５ペプチドアプタマーを使用した以下の実施例７に示した結果によって確認する。このような結果は、ＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭシグナル伝達に対する小分子の結果をＴＣＦ－ルシフェラーゼアッセイを使用して検出することができることを肯定的に証明する。

【０６２０】

これらのデータは、Ｄｋｋ－１がＷｎｔ１およびＷｎｔ３ａシグナル伝達を拮抗する能力に関するＬＲＰ５とＨＢＭとの間の機能の相違が存在することを示す。Ｄｋｋ－１がＬＲＰ５と直接相互作用することを示すこれらのデータおよび以前のデータにより、Ｄｋｋ－１がＨＢＭ／Ｗｎｔシグナル伝達を拮抗する能力がないことはＨＢＭ表現型に一部寄与し得ることが示唆される。これらの実験は、ＨＢＭ媒介Ｗｎｔシグナル伝達を模倣するＬＲＰ５リガンドまたはＤｋｋ－１のＬＲＰ５との相互作用を遮断する因子について種々の分子（例えば、小分子、アプタマー、ペプチド、抗体、ＬＲＰ５相互作用タンパク質またはＤｋｋ－１相互作用タンパク質など）を試験する能力をさらに示す。

【０６２１】

これは、２つのＨＢＭ様変異型の応答性を示すために使用されるアッセイであった。図２９および３０を参照のこと。データはまた、これらの変異型は、Ｄｋｋによる調整よりも感受性が低いことを証明する。

【実施例７】

【０６２２】

細胞ベースの高処理機能アッセイ

高処理アッセイを開発するために、実施例６に記載のＴＣＦ－ルシフェラーゼアッセイを、Ｕ２ＯＳおよびＨＥＫ２９３細胞中で低発現レベルの内因性ＬＲＰ５／６を使用して改変した。しかし、ＨＯＢ－０３－ＣＥ６細胞およびＬＲＰ５、ＬＲＰ６、またはＨＢＭが発現されるかどうかに依存してＤｋｋに対して異なる応答を示す任意の他の細胞を発現する。Ｕ２ＯＳ（ヒト骨肉腫）およびＨＥＫ２９３（ＡＴＣＣ）細胞を使用して、ＴＣＦ－ルシフェラーゼおよびｔｋ－Ｒｅｎｉｌｌａレポーターエレメントを、Ｗｎｔ３ａ／１およびＤｋｋと同時トランスフェクトした。内因性ＬＲＰ５／６の使用によって、Ｗｎｔ３ａのみでＴＣＦレポーター遺伝子活性化を刺激することができる。ＤｋｋをＷｎｔ３ａ／Ｗｎｔ１およびレポーター（ＴＣＦ－ｌｕｃｉおよびｔｋ－Ｒｅｎｉｌｌａ）でトランスフェクションした場合、Ｄｋｋはレポーターエレメント活性を抑制する。さらに、Ｗｎｔ３ａ／Ｗｎｔ１およびレポーターを含む細胞にＤｋｋ－富化馴化培地の添加により、Ｗｎｔ３ａ／Ｗｎｔ１で活性化されたＴＣＦ－ｌｕｃｉシグナルを抑制することができる。Ｄｋｋ１の点変異構築物（Ｃ２２０Ａ）によるＴＣＦ－レポーター阻害の欠乏によってアッセイをさらに確認する。

【０６２３】

レポーターのＤｋｋ－１媒介抑制は、トランスフェクトしたＤｋｋ　ｃＤＮＡの濃度またはＤｋｋ馴化培地の添加量に依存する。さらに、Ｄｋｋ媒介レポーター抑制を、Ｕ２ＯＳまたはＨＥＫ２９３細胞中でのＬＲＰ５、ＬＲＰ６、およびＨＢＭ　ｃＤＮＡの同時トランスフェクションによって変化させることができる。一般に、Ｕ２ＯＳ細胞は、ＨＥＫ２９３細胞よりもＤｋｋ媒介レポーター抑制に対する感受性が高い。Ｕ２ＯＳ細胞では、ＬＲＰ５／ＬＲＰ６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様ｃＤＮＡのトランスフェクションにより、Ｗｎｔ３ａ／Ｗｎｔ１トランスフェクションの非存在下でのＴＣＦ－ｌｕｃｉを中程度に活性化する。この活性は、おそらくＵ２ＯＳ細胞中に存在する内因性Ｗｎｔを使用する。この条件下で、Ｄｋｋ１はＴＣＦ－ｌｕｃｉを抑制することができ、ＬＲＰ５とＨＢＭとの間で異なるシグナルを示す。Ｗｎｔ３ａ／Ｗｎｔ１の同時トランスフェクションにより、このアッセイでのＴＣＦ－ｌｕｃｉシグナルの一般化増加が存在する。さらに、ＬＲＰ５およびＨＢＭ　ｃＤＮＡ発現によるレポーターのＤｋｋ媒介抑制の相違およびＬＲＰ５とＬＲＰ６　ｃＤＮＡとの間の相違を検出することができる。発現抑制は、ＬＲＰ６で最大、Ｌ

ＲＰ５で中程度、ＨＢＭ　ｃＤＮＡで最小であった。さらに、アッセイは、ＬＲＰ５相互作用ペプチドアプタマー（図３８）、Ｄｋｋ１相互作用アプタマー、およびＤｋｋ－１の結合ドメイン（図４０：図３９および４４のＯＳＴ２６４およびＯＳＴ２６５）の機能的影響を検出することができる。

【０６２４】

ＤｋｋおよびＷｎｔ３ａの存在による抑制されたＷｎｔ－ＴＣＦシグナルを使用したこの系を使用して、活性化する化合物またはＴＣＦ－ルシフェラーゼレポーターの調査によってＷｎｔシグナル伝達のＤｋｋ調整を変化させ、それによりＷｎｔ経路のＤｋｋ媒介抑制を軽減することができる化合物についてスクリーニングすることができる。同定されたこのような化合物は、潜在的にＨＢＭ－模倣物として役立ち、例えば、骨形成薬として有用であり得る。この高処理スクリーニングから作成したデータを、図４５～４７に示す。図４５は、Ｄｋｋ１がＵ２ＯＳ骨細胞においてＷｎｔ３ａ媒介シグナル伝達を抑制することを示す。図４６は、ＬＲＰ５、ＬＲＰ６、およびＨＢＭとの間の機能の相違を示す。Ｄｋｋ－１は、ＬＲＰ６およびＬＲＰ５を抑制するが、Ｕ２ＯＳ細胞におけるＨＢＭ媒介Ｗｎｔ１シグナル伝達に対する効果はほとんどないかまったくない。図４７は、種々のＤｋｋファミリーメンバーおよび修飾Ｄｋｋ（Ｄｋｋ－１を含む）、変異Ｄｋｋ－１（Ｃ２２０Ａ）、Ｄｋｋ－１－ＡＰ（アルカリホスファターゼでの修飾）、Ｄｋｋ－３、およびＳｏｇｇｙの効果の相違を証明する。

【実施例８】

【０６２５】

Ｄｋｋ／ＬＲＰ５／６／ＨＢＭ／ＨＢＭ様ＥＬＩＳＡアッセイ

ＬＲＰまたはＨＢＭおよびＨＢＭ様ポリペプチドへのＤｋｋ結合を調査するためのさらなる方法は、ＥＬＩＳＡアッセイである。このアッセイの２つの可能な順序を例示する。ＬＲＰ５を、固体表面（組織培養プレートウェルなど）に固定する。当業者は、ナイロンまたはニトロセルロースメンブレン、シリコンチップ、スライドガラス、ビーズなどの他の支持体を利用することができることを認識する。この実施例では、使用したＬＲＰ５の形態は、実際は、ＬＲＰ５の細胞外ドメインがヒトＩｇＧのＦｃ部分に融合した融合タンパク質である。ＬＲＰ５－Ｆｃ融合タンパク質を、安定な細胞株由来のＣＨＯ細胞抽出物中で産生する。ＬＲＰ５－Ｆｃ融合タンパク質を、例えば、抗ヒトＦｃ抗体を介するかプロテインＡまたはプロテインＧ被覆プレートによって固体表面上に固定する。次いで、このプレートを洗浄して、任意の非結合タンパク質を除去する。分泌性Ｄｋｋタンパクまたは分泌性Ｄｋｋ－エピトープタグ化タンパク質（または精製Ｄｋｋもしくは精製Ｄｋｋ－エピトープタグ化タンパク質）を含む馴化培地をウェル中でインキュベートし、ＤｋｋのＬＲＰへの結合を、Ｄｋｋまたはエピトープタグに対する抗体を使用して調査する。Ｄｋｋ－Ｖ５エピトープタグ化タンパク質を、アルカリホスファターゼタグ化抗Ｖ５抗体を使用して検出する。

【０６２６】

あるいは、Ｄｋｋタンパク質を、アルカリホスファターゼなどの検出可能なマーカーに直接融合することができる。ここで、Ｄｋｋ－ＬＲＰ相互作用の検出を、その後の抗体ベースの実験を行うことなく直接調査することができる。結合したＤｋｋを、アルキルホスファターゼアッセイで検出する。Ｄｋｋ－アルカリホスファターゼ融合タンパク質が固定化ＬＲＰ５に結合する場合、アルカリホスファターゼ活性を、色の読み取りによって検出する。結果として、小分子化合物がこの系を用いてＤｋｋのＬＲＰへの結合を変化させる能力をアッセイすることができる。プレートの各ウェルにＤｋｋ（またはエピトープタグ化Ｄｋｋ）と共に添加した場合、化合物を、適切なインキュベーション時間および洗浄後のウェル中に存在する結合ＤｋｋのシグナルＤｋｋとＬＲＰとの間の相互作用を調整する能力について記録することができる。アッセイを、非標識Ｄｋｋまたはエピトープタグ化Ｄｋｋの第２の型を使用した確実な競合試験によって較正することができる。Ｄｋｋ－ＬＲＰ相互作用を調整することができる任意の小分子は、適切な治療候補であり、より好ましくは、骨形成治療候補であり得る。

【実施例９】
【０６２７】
アフリカツメガエルにおけるペプチドアプタマーの機能評価
制限ペプチドアプタマー構築物ＯＳＴ２５８～２６３（２５８はそれ自体がシグナル配列を含み、２６３は無関係の制限ペプチドを含む）（図３９および４４）を使用して、ベクターを制限エンドヌクレアーゼ消化によって線状化し、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを使用してＲＮＡを作製すること以外は実質的に実施例６に記載のＲＮＡを作製した。
【０６２８】
実施例６に記載のプロトコールを使用して、アプタマーＲＮＡを２５０ｐｇ／割球で注射した。胚背側化（二胚軸形成）によって視覚化したところ、アプタマー２６１、より強力には２６２でＷｎｔシグナル伝達を活性化した。このアッセイの結果を、図４８および４９に示す。これらの結果により、アプタマー２６１および２６２はおそらくＬＲＰのＬＢＤへの結合によりＷｎｔシグナルを活性化し、それによりＤｋｋによるＬＲＰ媒介シグナル伝達の調整を防止することができることが示唆される。
【０６２９】
本発明のアプタマーは、ＨＢＭ模倣物として役立つことができる。アフリカツメガエル系では、これら自体によってＷｎｔシグナル伝達を誘導することができる。アプタマーはまた、どのようにしてペプチドがＬＲＰと相互作用し、特定のアミノ酸レベルでＷｎｔシグナル伝達を調整することができるということの理解の向上によって妥当な薬物デザイン用ツールとして役立ち得る。したがって、治療効果を模倣する小分子を治療薬としてデザインすることができる。さらに、このアッセイで陽性と同定されたアプタマーを、治療分子として使用することができる。
【実施例１０】
【０６３０】
均一アッセイ
タンパク質－タンパク質相互作用の混乱を調査するための優れた方法は、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）である。ＦＲＥＴは、蛍光分子（ドナー）のエネルギーが極めて接近した受容体の発色団分子に移動する量子の機械的プロセスである。このシステムは文献でＬＲＰ５とＡｘｉｎとの間の分子間相互作用の特徴づけで首尾よく使用されている（Ｍａｏら、Ｍｏｌｅｃ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．、８０１～９）。このような研究で利用可能な異なる蛍光タグが多数存在し、目的のタンパク質を蛍光でタグ化する方法はいくつか存在する。例えば、ＣＦＰ（シアン蛍光タンパク質）およびＹＦＰ（黄色蛍光タンパク質）を、それぞれドナーおよび受容体として使用することができる。ドナーおよび受容体を使用した融合タンパク質を、操作、発現、および精製することができる。
【０６３１】
例えば、ＣＦＰに融合した精製ＬＲＰタンパク質またはその一部もしくはドメインまたはＹＦＰに融合した精製Ｄｋｋタンパク質またはそれぞれＤｋｋもしくはＬＲＰと相互作用するその一部またはドメインを、標準的なアプローチを使用して作製および精製することができる。ＬＲＰ－ＣＦＰおよびＤｋｋ－ＹＦＰが極めて接近して存在する場合、ＣＦＰからＹＦＰへのエネルギー移動により、ＣＦＰ放出が減少し、ＹＦＰ放出が増加する。エネルギーを４５０ｎｍの励起波長で供給し、エネルギー移動を、４８０ｎｍおよび５７０ｎｍの励起波長で記録する。ＹＦＰ放出とＣＦＰ放出との比により、ＬＲＰとＤｋｋとの間の相互作用の変化についての基準が得られる。この系は、Ｄｋｋ－ＬＲＰのタンパク質－タンパク質相互作用を変化させることができる小分子化合物のスクリーニング可能である。相互作用を破壊する化合物を、ＹＦＰ放出とＣＦＰ放出との比の減少によって同定する。ＬＲＰ　Ｄｋｋ相互作用を調整するこのような化合物を、候補ＨＢＭ模倣分子と見なす。Ｗｎｔシグナル伝達に対する化合物の効果を解明するためにＴＣＦ－ルシフェラーゼまたはアフリカツメガエル胚アッセイを使用して化合物のさらなる特徴づけを行うことができる。
【０６３２】

上記実施例は精製成分を使用した無細胞の液相アッセイを記載する一方で、類似の細胞ベースのアッセイを行うこともできる。例えば、ＬＲＰ－ＣＦＰ融合タンパク質を、細胞中に発現することができる。次いで、Ｄｋｋ－ＹＦＰ融合タンパク質を、精製タンパク質または候補培地として細胞に添加することができる。次いで、ＬＲＰとＤｋｋとの間の相互作用を、上記のようにモニターする。

【実施例１１】

【０６３３】

ＬＲＰ５／Ｚｍａｘ１／ＨＢＭ変異型の同定

ＹＷＴＤ反復はＤｋｋ－１と相互作用するドメインの主要部分を構築するので、このような反復を含むタンパク質折りたたみを調査するために反復から検索を開始した。Ｓｐｒｉｎｇｅｒ、１９９８、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２８３、８３７～６２は、以前に「スペーサー」と記載され、定義された構造を含まないと考えられるこれらのＹＷＴＤ反復は、実際は、高度に構築された６つのブレードを含むβプロペラのプロペラ－ブレードサブドメインであることを提案している。したがって、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ（１９９８）は、このようなＹＷＴＤ反復を含む２つの理論的にモデリングされたタンパク質構造を提案していた。

【０６３４】

モデル。マウスまたはヒト由来のＬＲＰプロペラドメイン配列組を、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ（１９９８）の２つのモデル化ＹＷＴＤ－プロペラ構造（ニワトリ由来のＬＲＰ１　βプロペラドメイン番号７に基づく１１ｐｘ（ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ　ＬＲＰ１＿ＣＨ７）およびヒトニドゲンに基づく１ｎｄｘ（Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ＮＩＤＯ＿ＨＵ１））に対応する配列と共にＣＬＵＳＴＡＬＷを使用してアラインメントを行った。タンパク質構造の論理的根拠および知識に基づいてアラインメントを手動で編集した。図５０は、ＬＲＰ５のモデル略図である。二次構造は、排他的にβ鎖およびターンからなる。二次構造の配置を、予測プログラムＤＳＣ（ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｗｅｂ．ｐａｓｔｅｕｒ．ｆｒ／ｓｅｑａｎａｌ／ｉｎｔｅｒｆａｃｅｓ／ｄｓｃ．ｈｔｍｌで利用可能なタンパク質二次構造クラス識別）によって検証した。エキソン－イントロン境界の予備チェックを手動で行った。テンプレートとして１１ｐｘモデルを使用したヒトＬＲＰ５の三次構造相同モデルを、ＩｎｓｉｇｈｔＩＩ（Ａｃｃｅｌｒｙｓ　Ｉｎｃ．、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）を使用して構築し、ＩｎｓｉｇｈｔＩＩおよびＲａｓｍｏｌ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｕｍａｓｓ．ｅｄｕ／ｍｉｃｒｏｂｉｏ／ｒａｓｍｏｌ／ｉｎｄｅｘ２．ｈｔｍｌで無料で利用可能）由来のグラフィックス標示プログラムを使用して試験した。

【０６３５】

結果。相同性アラインメントおよびモデリングに基づいて、図５０のＬＲＰ５のドメイン図を得た。図５１は、マウスＬＲＰ５およびＬＲＰ６、ヒトＬＲＰ５およびヒトＬＲＰ６、ならびにＳｐｒｉｎｇｅｒ（１９９８）によって構築された２つの理論的モデルに対応する配列のプロペラドメインの完全なアラインメントおよび二次構造の配置を示す。

【０６３６】

良好な第１の概算が良好であったので、配列アラインメントは、ヒトＬＲＰ５中に４つの６ブレードを含むβプロペラドメインが存在するという提案を支持する。このモデルは良好に配列が調整されている（ニワトリＬＲＰプロペラドメインの慎重に構築したモデルに由来するので予想されるはずである）。このドメインの全体の形状は、内側が傾斜した面および中心に穴が開いた円盤に類似している。ポリペプチド鎖は同一の（比較的平面の）「底面」表面から出入りする。アラインメント（図５１）およびいくつかの構造の例に示すように、Ｇ１７１Ｖ変異は、ドメインの外側のループまたは「上面」に分類される。これにより、予想に反して、タンパク質折りたたみ決定において高度に保存されたグリシン残基の役割を仮定すると、変異はドメインの三次構造安定性に対していかなる有意な結果も得られないことがただちに示唆される。変異は、いくつかのリガンド（おそらく高分子）の結合を阻害するか（Ｓｍｉｔｈら、１９９９、Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．、２４、１８１～５）、タンパク質－タンパク質相互作用を変化させる可能性がむ

しろより高い。

【０６３７】

Ｇ１７１の近傍のタンパク質のより綿密な調査は、この残基が、ドメイン上面の外縁上のポケットの下に存在することを示す。さらに、このポケットの片側は、非常に疎水性の高い側鎖の集団からなり、他方の面はより極性の高い基（特に、グルタミン酸１７２）を有する。グリシンの代わりにＶ１７１を有するタンパク質の変異形態では、ポケットは、グリシンの水素側鎖がバリンのイソプロピル基に置換されるので、大部分が存在しなくなる。リガンドがポケット内に正常に突き出ている場合、どのようにしてこのような置換がリガンド結合を非常に破壊するのかということの理解が容易である。同一の論理的根拠により、任意の４つのプロペラ中のこのようなポケットを遮断する任意の他の変異もまたリガンド結合を害する。

【０６３８】

提案されたモデルの妥当性は、Ｓｐｒｉｎｇｅｒの結果およびさらなるデータに基づく。例えば、強力且つ強固な三次構造であるこのようなタンパク質ドメイン（十分に研究されたＹＷＴＤ反復）の典型的な特徴に由来していた。ループの立体配座は、特により長いループの場合はいくらか変化することができるが、タンパク質折りたたみの基本的特徴は、ほぼ確実に十分に予想される。勿論、これらのドメインの１つについて結晶構造が存在する場合、根拠がより確保される。いくつかの興味深い特徴（外側に曝された残基の同一性、推定リガンド結合表面など）を自然に含めることもまた十分に予想される。図５１では、これらの残基をＳｐｒｉｎｇｅｒ（１９９８）に対応する配列上に赤色で強調していることに留意のこと。Ｓｐｒｉｎｇｅｒの想定に依存せずに異なるモデルを構築して、プロペラの異なるトポロジーを導くことがおそらくできるとしても、これによりＧ１７１Ｖ変異が表面ループ中に存在するという考察は変わらない。

【０６３９】

非常に少ないが、モデルは、分子条件におけるこのタンパク質について実験デザインおよび結果の評価の両方を容易にする（すなわち、候補エピトープをより妥当に選択する）ことを考慮する機会が与えられる。図５０の図によって強く導かれる１つの興味深い態様は、どのようにして異なるモジュラープロペラドメインが相互作用するかという質問である。ＥＧＦドメインは、十分に研究されている（何十もの結晶構造およびＮＭＲ構造が存在する。例えば、Ｂｏｒｋら、１９９６、Ｑｕａｒｔ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．、２９、１１９～６７を参照のこと）。ＥＧＦ様ドメインは、主に、ジスルフィド結合によって架橋した１組のβヘアピンからなり、いくつかの場合、これらは強固に結合したカルシウムイオンを有し、これがその構造をさらに安定化しているに違いない。興味深いことに、ＹＷＴＤプロペラと対照的に、ＥＧＦ様ドメインは、片方の末端から侵入し、他方から抜け出したポリペプチド鎖を有する。したがって、機械的には、これらのドメインはスペーサー、さらにスイベル（いずれかの末端から伸長したテール周囲を回転するので）として作用することができる。プロペラのサイズが得られると、ＥＧＦ様ドメインによって連結されるいくつかのより高い次元の構造で構築されるので、ほとんど確かにドメイン間でドメイン相互作用が認められる。プロペラのトポロジーのために、ＥＧＦ様ドメインが突出したＮ末端およびＣ末端伸長によって連結しているので、その「上面」は、外側に面しなければならない。

【０６４０】

βプロペラ構造のより洗練された分析は、ＬＤＬ受容体由来のＸ線結晶データを使用してモデル化した。ＬＲＰ５の種々のβプロペラドメインの一次アミノ酸配列を使用して、以下の方法にしたがってその三次元構造の相同性モデルを開発した。

【０６４１】

（Ａ）適切な構造テンプレートを検索し、標的を使用して配列同一性をチェックする。公知構造の配列との標的配列の全類似性を見出すために、ＢＬＡＳＴＰ２（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９０、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２１５、４０３～１０；Ｈｕａｎｇら、１９９１、Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．、１２、３３７～６７；およびＰｅｉｔｓｃｈ、

１９９５、ＰＤＢ Ｑｕａｒｔ．Ｎｅｗｓｌｅｔｔｅｒ、７２、４）を使用してＥｘＮＲＬ－３Ｄデータベース（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋ（ｈｔｔｐ：／／ｐｄｂ．ｃｃｄｃ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ．／ｐｄｂ／）由来）を検索した。このプログラムは、配列同一性が２５％を超える配列を有する全てのテンプレートを選択し、予想されるモデルサイズ２０残基を越えるものである。このステップはまた、無関係のテンプレートに基づいてモデル化することができるドメインを検出する。このステップの使用により、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋ（ＰＤＢ）の構造１ＩＪＱが選択された（「ＬＤＬ受容体ＹＷＴＤ－ＥＧＦドメイン対の結晶構造」）（Ｊｅｏｎら、２００１、Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．、８、４９９）。

【０６４２】

（Ｂ）ＰｒｏＭｏｄＩＩ（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９０；Ｈｕａｎｇら、１９９１；およびＰｅｉｔｓｃｈ、１９９５）を作製し、ＰｒｏＭｏｄＩＩを使用してモデルを作成する。

【０６４３】

（Ｃ）関連する三次元構造を重ね合わせる。この方法は、配列類似性診断（動的配列アラインメントアルゴリズム）（ＳＩＭ）に基づく（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９０；Ｈｕａｎｇら、１９９１；およびＰｅｉｔｓｃｈ、１９９５）。詳細には、以下のステップを行う。

（ｉ）最初の適合：配列類似性領域を自動で選択し（手動選択も可能）、対応する残基を３つの空間で適合させる。（ｉｉ）最初の適合を、伸長範囲を使用してさらに精密化する。

【０６４４】

（Ｄ）モデル化すべき配列を含む複数のアラインメントを作製する。

【０６４５】

（Ｅ）新規の配列の枠組みを作製する。

【０６４６】

（Ｆ）以下の対応する原子のトポロジーアラインメントに基づく。（ａ）類似の空間部分を占め、新規の構造中の構造対応物を有することが予想される原子を使用して、枠組み座標を計算する（平均の位置）。（ｂ）完全に不正確な幾何学を有する側鎖を除去する。

【０６４７】

（Ｇ）以下のループ軸の幾何学に基づいて欠損したループを再構築する。（ａ）再構築すべきループの軸を使用して、Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋ由来の構造フラグメントのデータベースをスキャンする。最良に適合したフラグメントまたは５つの最良のフラグメントに由来する枠組みのいずれかを、新規のループとして使用するか、または（ｂ）ＣＳＰアプローチ（７つの許容されたΦ－Ψ角の組み合わせ、ループについての空間の割り当て、ループ中の角α炭素についての空間の割り当て）を使用して立体配座空間を検索する。両方法は、ループ周囲と立体障害を起こす場合、α炭素のみを置く。

【０６４８】

（Ｈ）α炭素の位置に基づいて不完全な骨格を再構築し、骨格を、７つの許容されたΦ－Ψ角の組み合わせおよび骨格フラグメントのデータベース（５残基のウィンドウスライディングを全タンパク質配列で行う）のセットを使用して骨格を再構築した。次いで、各重複ペンタペプチドについて最良に適合した骨格フラグメントを保存した。各ペンタペプチドの３つの中心残基の座標のみを使用した主鎖原子の枠組みは、これらのペプチド由来である。

【０６４９】

（Ｉ）以下に記載のようにモデル構造の質を検証し、パッキングをチェックする。

（ｉ）構造の質の検証は、Ｒ．Ｌｕｔｈｙら、１９９２、Ｎａｔｕｒｅ、３５６、８３～８５に記載の方法に基づいた。この方法により、各残基の三次元の状況を分析し、誤折りたたみ領域が同定される。

（ｉｉ）プローブ接近表面（Ｃｏｎｎｏｌｙ表面）計算および構造を通過させる立方

体グリッドに基づいてパッキングをチェックする。内外表面が検出され、各空洞の中心およびサイズを計算する。次いで、誤折りたたみ領域の可能性を検出するために、アルゴリズムでモデルと構造との間のこれらの空洞のサイズおよび分布を計算する。

【０６５０】

（Ｊ）Ｇｒｏｍｏｓ９６にしたがって、力場計算に基づいたエネルギー最小化および分子力学によって構造を精密化する（「分子システムのコンピュータシミュレーションに置ける長期的静電気力での評価方法」、Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｓｉｍｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｔｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ ａｎｄ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、第２巻、１８２～２１２（Ｗ．Ｆ．ｖａｎ Ｇｕｎｓｔｅｒｅｎら編、Ｅｓｃｏｍ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｌｅｉｄｅｎ、Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ、１９９３）；ｖａｎ Ｇｕｎｓｔｅｒｅｎら、１９９０、Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．、２９、９９２～１０２３）；ｖａｎ Ｇｕｎｓｔｅｒｅｎら、１９９２、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、２０４：９４７～９６１；Ｔｏｒｄａ ａｎｄ Ｗ．Ｆ．ｖａｎ Ｇｕｎｓｔｅｒｅｎ、「核磁気共鳴データを使用した分子モデリング」、ｉｎ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、第ＩＩＩ、１４３～１７２（Ｋ．Ｂ．Ｌｉｐｋｏｗｉｔｚら編、ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９９２）；ｖａｎ Ｇｕｎｓｔｅｒｅｎ、「分子力学および確率力学シミュレーション：プライマー」、Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｓｉｍｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｔｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ ａｎｄ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、３～３６；ｖａｎ Ｇｕｎｓｔｅｒｅｎら、「自由エネルギー演算実習：近似および精度制限因子」、ｉｎ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｓｉｍｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｔｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ ａｎｄ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ、３１５～３４８；Ｓｍｉｔｈら、「分子システムのコンピュータシミュレーションに置ける長期的静電気力での評価方法」、ｉｎ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｓｉｍｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｔｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ ａｎｄ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ、１８２～２１２；ｖａｎ Ｇｕｎｓｔｅｒｅｎら、「核磁気共鳴分光法およびＸ線回折データに基づく構造決定における分子移動度の計算」、ｉｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ：Ｎｕｃｌｅａｒ Ｍａｇｎｅｔｉｃ Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ、第２３９巻、６１９～６５４（Ｔ．Ｌ．Ｊａｍｅｓら編、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９９４）；ｖａｎ Ｇｕｎｓｔｅｒｅｎら、１９９４、Ｑｕａｒｔ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃｓ、２７、４３５～４８１；ｖａｎ Ｇｕｎｓｔｅｒｅｎら、１９９５、「生体分子モデリング：立体配座空間の検索およびサンプリングのための方法型の概要」、ｉｎ Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ １ｓｔ Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ ｏｎ Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｐｈｙｓｉｃｓ、Ｃｏｎｆ．Ｐｒｏｃ．、３３０、２５３～２６８；およびｖａｎ Ｇｕｎｓｔｅｒｅｎら、１９９５、Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｐｈｙｓ．Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ、９１、３０５～３１９）。

【０６５１】

（Ｋ）次いで、構造を、Ｄｅｅｐ Ｖｉｅｗ，ｔｈｅ ＳＷＩＳＳ－ＰＤＢ Ｖｉｅｗｅｒ（Ｇｕｅｘら、１９９７、Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ、１８、２７１４～２３）を使用した配列アラインメントおよび構造エレメントに基づいて手動で精密化する。

【０６５２】

構造モデルの使用。タンパク質ドメインの三次元構造モデルを有することにより、三次元空間におけるＨＢＭ変異または他のＨＢＭ様変異の状況を認識することができる。これにより、一方が近位で他方が遠位（配列空間中）のアミノ酸を一次構造のみから予想することができないので、任意の他の方法で不可能な様式での可能な作用機構の予想を容易になる。これにより、機能を予想することもでき、その後、モデルをさらに精密化して標的

を確認するために分子／細胞生物学技術を使用して試験することができる。例えば、Ｇ１７１Ｖ変異の構造モデルにより側鎖－側鎖相互作用の変化を予測できたので、この情報を類似の構造効果を有する他のアミノ酸の類似の変異の予想に首尾よく使用することができる。このモデル上への他の機能データの重ね合わせにより、タンパク質ドメインの他の潜在的に重要な領域が強調される。さらに、このようなモデルは接近可能な残基を示し、この領域を認識および結合する小化合物および抗体などの開発に有用である。

【０６５３】

結果。上記第３節に記載の空間充填仮説に基づいて、ブレード４中の残基１７１と構造的に等価の位置から開始されるプロペラ１のブレード６由来の２つの残基を同定した。したがって、バリンとの置換を操作した。Ｆ２４１ＶおよびＡ２４２Ｖ。

【０６５４】

プロペラの内面に接触可能であると予測される残基を、Ｚｍａｘ１（ＬＲＰ５）のブレード３および５両方中で同定した。Ｓｐｒｉｎｇｅｒモデル由来の最初の予想では、ブレード４（ＨＢＭ）の残基１７１に等価な位置としてブレード５のＧ１９９およびブレード３のＥ１２８が同定された。上記のより洗練したモデルを使用して、Ｇ１９９およびＥ１２８は、ブレード４の残基１７１に等価な位置として予想されない。この新規でより洗練されたモデルに基づいて、以下の残基をバリン置換に選択した。

【表１４】

ブレード番号	変異
5	L200V、T201V および I202V
3	S127V

別の残基Ｔ１２５を、Ｔ１２５Ｓでの保存的置換およびＴ１２５Ｇの低保存的置換について選択した。

【０６５５】

βプロペラ中のＹＷＴＤ反復モチーフの役割を、ブレード４中のこの領域にわたるアラニン置換スキャンの実施によって試験した。これらの反復は、プロペラのβシートブレードを作製すると予想される。このモデルデータに基づいて、プロペラ１中の以下のさらなる変異を調製した。Ｙ１６４Ａ、Ｍ１６５Ａ、Ｙ１６６Ａ、Ｗ１６７Ａ、Ｔ１６８Ａ、およびＤ１６９Ａ。これらの置換は、βプロペラ構造に有害であると予想される。

【０６５６】

空間充填または占有空間モデルを、上記の方法によって予想された残基のプロペラ１の外面（ブレード４）上の残基への変異によってさらに試験した。ＨＢＭ様効果が得られないので、この変異Ｋ２１５Ｖ（２１５位でのＫ－Ｖ）を選択した。

【０６５７】

この情報に基づいて、以下のＨＢＭ　Ｇ１７１Ｖ変異モデルを得た。詳細には、プロペラ１内での特定の位置でのバリンの置換により、プロペラ表面上に疎水性パッチを作製することができる。例えば、残基１７１にＶを含むＨＢＭ変異体は隣接鎖上のＬ１５０に極めて近位となり、野生型Ｇ１７１内では存在しない疎水性パッチが潜在的に作製される。これまたは他の予想の例を、別のファイルに示す（図５２）。

【０６５８】

このモデルに基づいて、この部位で疎水性側鎖を除去するＬ１５０Ｇの変異では、ＨＢＭ効果を得ることができない。さらに、Ｇ１７１Ｖ（ＨＢＭ）およびＬ１５０Ｇの二重変異では、疎水性側鎖の相互作用が消滅するので、ＨＢＭ効果は得ることができない。モデルを使用して、異なるプロペラ１ブレードにおけるこの予想を試験することもできる。置換Ａ２１４Ｖは、ＨＢＭ効果を示した。Ｉ１９４は、ブレード４上のＧ１７１とＬ１５０ととの関係としてのブレード５上のＡ２１４と等価の位置の残基である。Ｉ１９４Ｇのみの変異ではＨＢＭ効果を得ることは予想することができず、Ｉ１９４ＧおよびＡ２１４Ｖ

の二重変異体は、もはや疎水性パッチを形成することはできず、結果としてＡ２１４Ｖで認められたＨＢＭ効果は得られない。疎水性パッチの形成に寄与し得るＡ２１４に近位の残基のさらなる付加により、Ｐ２４０およびＦ２４１が同定された。Ａ２１４Ｖを伴うＰ２４０ＧまたはＦ２４１Ｇのいずれかの変異により、もはや疎水性パッチは形成することができず、Ａ２１４Ｖのみで認められたＨＢＭ効果を消滅することができる。

【０６５９】

最後に、新規のモデルを使用して、他の３つのプロペラの特異的態様を調査した。３つの他のプロペラ中の残基Ｒ４９４、Ｒ５７０、およびＶ６６７の関連性を調査した。ミスセンス変異（Ｒ４９４Ｑ、Ｒ５７０Ｗ、およびＶ６６７Ｍ）を生じる偽神経膠腫を伴う骨粗鬆症の部位であることが報告されているので、これら３つの残基を選択した（Ｇｏｎｇら、２００１、Ｃｅｌｌ、１０７、５１３～５２３）。プロペラ外面上のこれらの残基の構造的位置にもとづいて、モデルは、これらの置換が機能亢進または喪失置換のいずれかであると予想されない（図５３Ａ～Ｃ）。例えば、骨粗鬆症－偽神経膠腫症候群（ＯＰＰＧ）に関連する変異により、患者の骨量は非常に低く、骨折および変形する傾向がある。この遺伝子条件は、現在公知であり、変異ＬＲＰ５に起因する（Ｇｏｎｇら、２００１、Ｃｅｌｌ、１０７、５１３～２３）。この情報に基づいて、この変異を、機能喪失変異と分類した。

【０６６０】

結果として、本発明者らは、機能を試験するための３つの受容体変異型を有する。これら新規の受容体変異型を、以下のオリゴヌクレオチドを使用して上記のように正確に作製した。

【化１０Ａ】

L150GF	GAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACGGTGACCAGCCGAGGGCC
L150GR	GGCCCTCGGCTGGTCACCGTCCTGCCAGAAGAGCACCTTC
I194GF	GATCATTGTGGACTCGGACGGTTACTGGCCCAATGGACTG
I194GR	CAGTCCATTGGGCCAGTAACCGTCCGAGTCCACAATGATC
L200VF	CATTTACTGGCCCAATGGAGTGACCATCGACCTGGAGGAGCAGAAGC
L200VR	GCTTCTGCTCCTCCAGGTCGATGGTCACTCCATTGGGCCAGTAAATG
T201VF	CATTTACTGGCCCAATGGACTGGTCATCGACCTGGAGGAGCAGAAGC
T201VR	GCTTCTGCTCCTCCAGGTCGATGACCAGTCCATTGGGCCAGTAAATG
I202VF	CATTTACTGGCCCAATGGACTGACCGTCGACCTGGAGGAGCAGAAGC
I202VR	GCTTCTGCTCCTCCAGGTCGACGGTCAGTCCATTGGGCCAGTAAATG
T125SF	GGCAAGAAGCTGTACTGGTCGGACTCAGAGACCAACCGCATC
T125SR	GATGCGGTTGGTCTCTGAGTCCGACCAGTACAGCTTCTTGCC
T125GF	GGCAAGAAGCTGTACTGGGGGGACTCAGAGACCAACCGCATC
T125GR	GATGCGGTTGGTCTCTGAGTCCCCCCAGTACAGCTTCTTGCC
S127VF	GAAGCTGTACTGGACGGACGTAGAGACCAACCGCATCGAGGTG
S127VR	CACCTCGATGCGGTTGGTCTCTACGTCCGTCCAGTACAGCTTC
F241VF	CCTGACGCACCCCGTCGCCCTGACGCTCTCCGGGGACACTC
F241VR	GAGTGTCCCCGGAGAGCGTCAGGGCGACGGGGTGCGTCAGG
A242VF	CCTGACGCACCCCTTCGTCCTGACGCTCTCCGGGGACACTC
A242VR	GAGTGTCCCCGGAGAGCGTCAGGACGAAGGGGTGCGTCAGG
K215VF	CTACTGGGCTGACGCCGTGCTCAGCTTCATCCACCGTGCC
K215VR	GGCACGGTGGATGAAGCTGAGCACGGCGTCAGCCCAGTAG
Y164AF	CTTGGACCCCGCTCACGGGGCCATGTACTGGACAGACTGG
Y164AR	CCAGTCTGTCCAGTACATGGCCCCGTGAGCGGGGTCCAAG
M165AF	GGACCCCGCTCACGGGTACGCGTACTGGACAGACTGGGGTG
M165AR	CACCCCAGTCTGTCCAGTACGCGTACCCGTGAGCGGGGTCC
Y166AF	CCCGCTCACGGGTACATGGCCTGGACAGACTGGGGTGAGAC
Y166AR	GTCTCACCCCAGTCTGTCCAGGCCATGTACCCGTGAGCGGG
W167AF	CGCTCACGGGTACATGTACGCGACAGACTGGGGTGAGACGC
W167AR	GCGTCTCACCCCAGTCTGTCGCGTACATGTACCCGTGAGCG

【化１０Ｂ】

T168AF	GCTCACGGGTACATGTACTGGGCAGACTGGGGTGAGACGCC
T168AR	GGCGTCTCACCCCAGTCTGCCCAGTACATGTACCCGTGAGC
D169AF	CACGGGTACATGTACTGGACAGCCTGGGGTGAGACGCCCCG
D169AR	CGGGGCGTCTCACCCCAGGCTGTCCAGTACATGTACCCGTG
R494QF	CAACTTGGATGGGCAGGAGCAGCGTGTGCTGGTCAATGCCTC
R490QR	GAGGCATTGACCAGCACACGCTGCTCCTGCCCATCCAAGTTG
R570WF	GCAGCGCCGCAGCATCGAGTGGGTGCACAAGGTCAAGGCCAG
R570WR	CTGGCCTTGACCTTGTGCACCCACTCGATGCTGCGGCGCTGC
V667MF	CGAGACCAATAACAACGACATGGCCATCCCGCTCACGGGCG
V667MR	CGCCCGTGAGCGGGATGGCCATGTCGTTGTTATTGGTCTCG

【０６６１】

βプロペラを有する他の分子中の点変異は、文献に記載されている。例えば、α４インテグリン（Ｇｕｅｒｒｅｒｏ－Ｅｓｔｅｏら、１９９８、ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒ、４２９、１２３～８）は２つの変異が導入されており、それによりタンパク質機能が変化した（すなわち、Ｇ１３０ＲおよびＧ１９０Ｓ）。これらの両グリセリンは、上面でのβプロペラの異なるブレード上にのみ存在するＬＲＰ５のＧ１７１に構造的に等価な位置である。上記のモデルを使用して、α４インテグリンのこれらの残基をマッピングし、その置換を確認した。α４インテグリンにおけるこれらの置換の結果は、リガンド結合の喪失およびそのヘテロ二量体パートナー（インテグリンβ１）に対する親和性の減少であり、α４β１（α４β１）ヘテロ二量体を形成できない。機能的重大性を有するインテグリンα４中の他の残基の調整の例は、Ｇｕｅｒｒｅｒｏ－Ｅｓｔｅｏら（１９９８）内を参照のこと。したがって、これらのデータは、βプロペラ構造の破壊により、受容体機能に対する有意且つ劇的な効果が得られるという概念を支持する。

【０６６２】

全ての引例は、その全体が本明細書中で参照することによって組み込まれる。以下の出願もまた、その全体が本明細書中で参照することによって組み込まれる。１９９８年１月１３日に提出された米国特許仮出願第６０／０７１，４４９号および１９９８年１０月２３日に提出された同第６０／１０５，５１１号の優先権を主張する、１９９９年１月１３日提出の一部継続出願第０９／２２９，３１９号である、２０００年４月５日に提出された米国特許出願第０９／５４３，７７１号および同第０９／５４４，３９８号。さらに、この出願は、２００１年５月１１提出の米国特許出願第６０／２９０，０７１号、２００１年５月１７日提出の同第６０／２９１，３１１号、２００２年２月１日提出の同第６０／３５３，０５８号、および２００２年３月４日提出の同第６０／３６１，２９３号（この文章全体が全ての目的のために本明細書中で参照することによって組み込まれる）の優先権を主張する。

【図１Ａ】

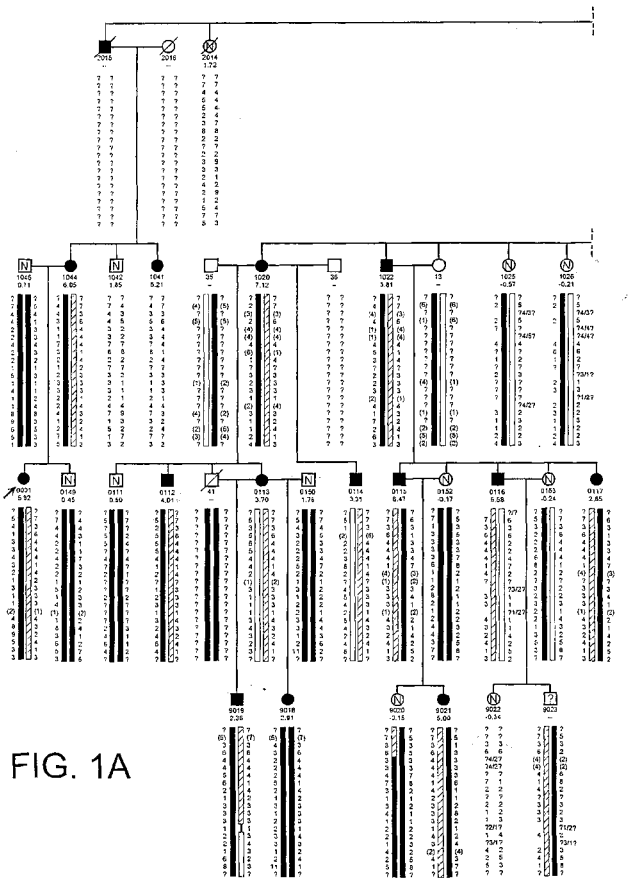


FIG. 1A

【図１Ｂ】

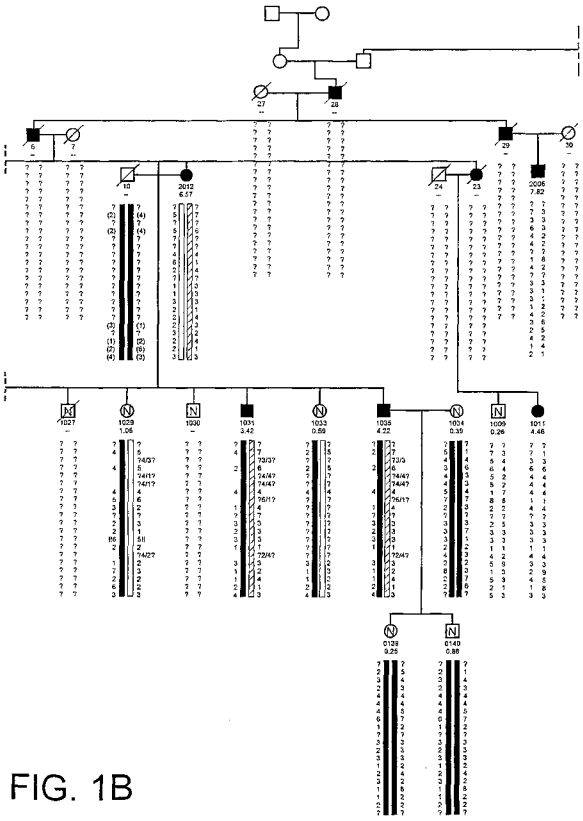


FIG. 1B

【図２Ａ】

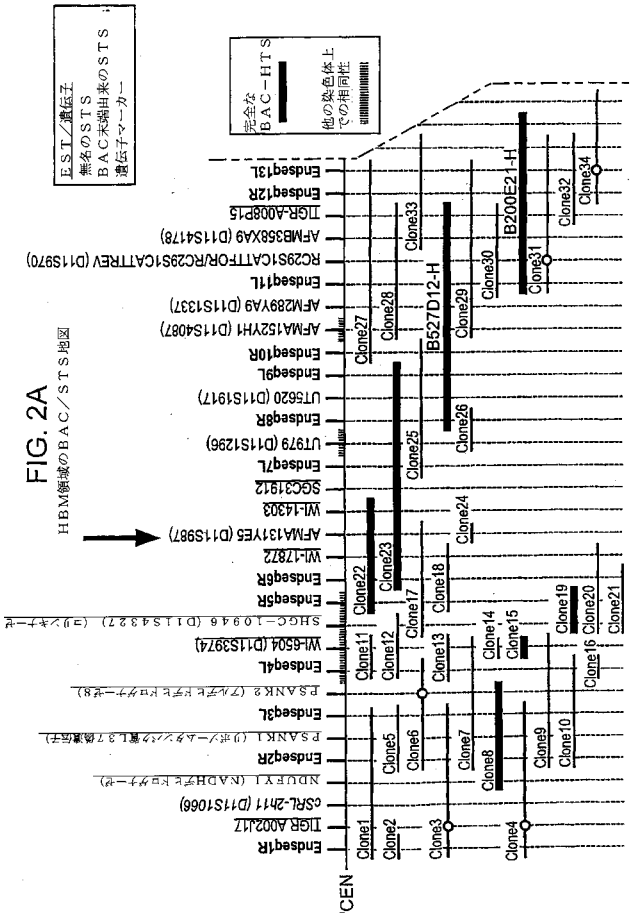


FIG. 2A

【図２Ｂ】

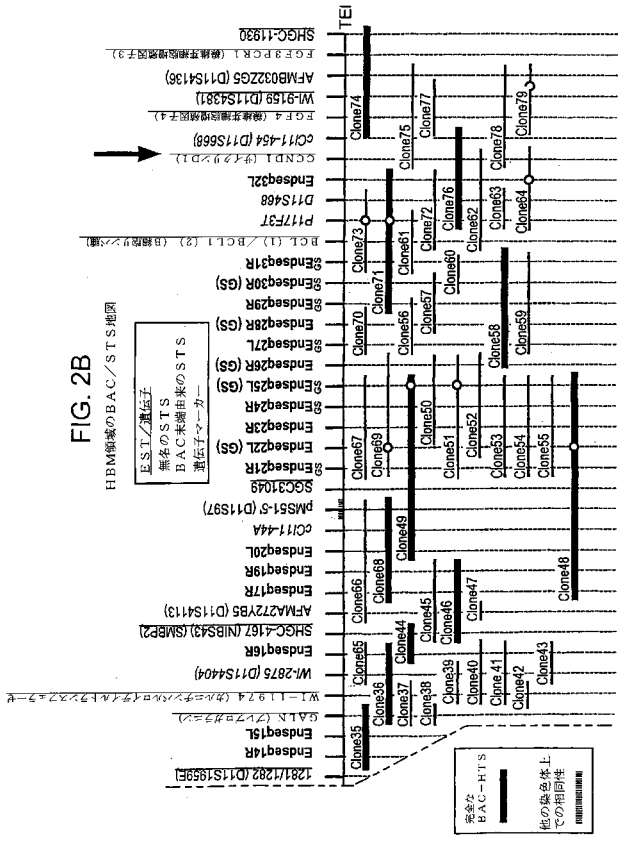


FIG. 2B

【図３Ａ】

Exon 1
ACTAAAGCGCCGCCGCCGCGCCATGGAGCCCGAGTGAGCGCGGCGCG
GGCCCGTCCGGCCGCCGGACAACATGGAGGCAGCGCCGCCCGGGCCG
CCGTGGCCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGCGCTGTGCGGC
TGCCCGGCCCCCGCCGCGGCC

Exon 2 Coordinates: 527d12_Contig308G 30944-30549
gccccacagCCTCGCCGCTCCTGCTATTTGCCAACCGCCGGGACGTACGGC
TGGTGGACGCCGGCGGAGTCAAGCTGGAGTCCACCATCGTGGTCAGC
GGCCTGGAGGATGCGGCCGCAGTGGACTTCCAGTTTTCCAAGGGAGC
CGTGTACTGGACAGACGTGAGCGAGGAGGCCATCAAGCAGACCTACCT
GAACCAGACGGGGGCCGCCGTGCAGAACGTGGTCATCTCCGGCCTGG
TCTCTCCCGACGGCCTCGCCTGCGACTGGGTGGGCAAGAAGCTGTACT
GGACGGACTCAGAGACCAACCGCATCGAGGTGGCCAACCTCAATGGC
ACATCCCGGAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACCTTGACCAGCCGAGGGCC
ATCGCCTTGGACCCCGCTCACGGgtaaaccctgctg

... 9408 nt ...

Exon 3 Coordinates: 527d12_Contig308G 21141-20945
ccccgtcacagGTACATGTACTGGACAGACTGGGGTGAGACGCCCCGGATTG
AGCGGGCAGGGATGGATGGCAGCACCCGGAAGATCATTGTGGACTCG
GACATTTACTGGCCCAATGGACTGACCATCGACCTGGAGGAGCAGAAG
CTCTACTGGGCTGACGCCAAGCTCAGCTTCATCCACCGTGCCAACCTG
GACGGCTCGTTCCGgtaggtacccac

... 6094 nt ...

Exon 4 Coordinates: 527d12_Contig308G 15047-14850
tccctgactgcagGCAGAAGGTGGTGGAGGGCAGCCTGACGCACCCCTTCGCC
CTGACGCTCTCCGGGGACACTCTGTACTGGACAGACTGGCAGACCCGC
TCCATCCATGCCTGCAACAAGCGCACTGGGGGGAAGAGGAAGGAGAT
CCTGAGTGCCCTATACTCACCCATGGACATCCAGGTGCTGAGCCAGGA
GCGGCAGCCTTTCTgtgagtgccgg

... 1827 nt ...

Exon 5 Coordinates: 527d12_Contig308G 13220-13088
tttctcagTCCACACTCGCTGTGAGGAGGACAATGGCGGCTGCTCCCACCTG
TGCCTGCTGTCCCCAAGCGAGCCTTTCTACACATGCGCCTGCCCCACG
GGTGTGCAGCTGCAGGACAACGGCAGGACGTGTAAGGCAGgtgaggcggtgg
gacg

FIG. 3A

【図３Ｂ】

... 20923 nt ...

Exon 6 Coordinates: 527d12_Contig309G 7705-8100
ctccacagGAGCCGAGGAGGTGCTGCTGCTGGCCCGGCGGACGGACCTAC
GGAGGATCTCGCTGGACACGCCGGACTTCACCGACATCGTGCTGCAGG
TGGACGACATCCGGCACGCCATTGCCATCGACTACGACCCGCTAGAGG
GCTATGTCTACTGGACAGATGACGAGGTGCGGGCCATCCGCAGGGCG
TACCTGGACGGGTCTGGGGCGCAGACGCTGGTCAACACCGAGATCAA
CGACCCCGATGGCATCGCGGTCGACTGGGTGGCCCGAAACCTCTACTG
GACCGACACGGGCACGGACCGCATCGAGGTGACGCGCCTCAACGGCA
CCTCCCGCAAGATCCTGGTGTCGGAGGACCTGGACGAGCCCCGAGCC
ATCGCACTGCACCCCGTGATGGGgtaagacgggc

..... 3211 nt .....

Exon 7 Coordinates: 527d12_Contig309G 11311-11482
ttcttctccagCCTCATGTACTGGACAGACTGGGGAGAGAACCCTAAAATCGA
GTGTGCCAACTTGGATGGGCAGGAGCGGCGTGTGCTGGTCAATGCCTC
CCTCGGGTGGCCCAACGGCCTGGCCCTGGACCTGCAGGAGGGGAAGC
TCTACTGGGGAGACGCCAAGACAGACAAGATCGAGgtgaggctcctgtgg

..... 13445 nt .....

Exon 8 Coordinates: 527d12_Contig309G 24927-25143
ccgtcctgcagGTGATCAATGTTGATGGGACGAAGAGGCGGACCCTCCTGGA
GGACAAGCTCCCGCACATTTTCGGGTTCACGCTGCTGGGGGACTTCAT
CTACTGGACTGACTGGCAGCGCCGCAGCATCGAGCGGGTGCACAAGG
TCAAGGCCAGCCGGGACGTCATCATTGACCAGCTGCCCGACCTGATGG
GGCTCAAAGCTGTGAATGTGGCCAAGGTCGTCGgtgagtccgggggtc

....2826 nt .....

Exon 9 Coordinates: 527d12_Contig309G 27969-28256
gttcgcttccagGAACCAACCCGTGTGCGGACAGGAACGGGGGGTGCAGCCA
CCTGTGCTTCTTCACACCCCACGCAACCCGGTGTGGCTGCCCCATCGG
CCTGGAGCTGCTGAGTGACATGAAGACCTGCATCGTGCCTGAGGCCTT
CTTGGTCTTCACCAGCAGAGCCGCCATCCACAGGATCTCCCTCGAGAC
CAATAACAACGACGTGGCCATCCCGCTCACGGGCGTCAAGGAGGCCTC
AGCCCTGGACTTTGATGTGTCCAACAACCACATCTACTGGACAGACGT
CAGCCTGAAGgtagcgtgggc

.....3102.....

FIG. 3B

【図３Ｃ】

Exon 10 Coordinates: 527d12_Contig309G 31358-31582
cctgctgccagACCATCAGCCGCGCCTTCATGAACGGGAGCTCGGTGGAGCA
CGTGGTGGAGTTTGGCCTTGACTACCCCGAGGGCATGGCCGTTGACTG
GATGGGCAAGAACCTCTACTGGGCCGACACTGGGACCAACAGAATCGA
AGTGGCGCGGCTGGACGGGCAGTTCCGGCAAGTCCTCGTGTGGAGGG
ACTTGGACAACCCGAGGTCGCTGGCCCTGGATCCCACCAAGGGgtaagtgtt
tgcctgtc

.....1297 nt.....

Exon 11 Coordinates: 527d12_Contig309G 32879-33064
gtgccttccagCTACATCTACTGGACCGAGTGGGGCGGCAAGCCGAGGATCG
TGCGGGCCTTCATGGACGGGACCAACTGCATGACGCTGGTGGACAAG
GTGGGCCGGGCCAACGACCTCACCATTGACTACGCTGACCAGCGCCTC
TACTGGACCGACCTGGACACCAACATGATCGAGTCGTCCAACATGCTG
Ggtgagggccgggct

.....2069 nt.....

Exon 12 Coordinates: 527d12_Contig309G 35133-35454
gtgttcatgcagGTCAGGAGCGGGTCGTGATTGCCGACGATCTCCCGCACCCG
TTCGGTCTGACGCAGTACAGCGATTATATCTACTGGACAGACTGGAAT
CTGCACAGCATTGAGCGGGCCGACAAGACTAGCGGCCGGAACCGCAC
CCTCATCCAGGGCCACCTGGACTTCGTGATGGACATCCTGGTGTTCCA
CTCCTCCCGCCAGGATGGCCTCAATGACTGTATGCACAACAACGGGCA
GTGTGGGCAGCTGTGCCTTGCCATCCCCGGCGGCCACCGCTGCGGCT
GCGCCTCACACTACACCCTGGACCCCAGCAGCCGCAACTGCAGCCgtaag
tgcctcatggt

.....2006 nt.....

Exon 13 Coordinates: 527d12_Contig309G 37460-37659
gcctcctctaCGCCCACCACCTTCTTGCTGTTCAGCCAGAAATCTGCCATCAG
TCGGATGATCCCGGACGACCAGCACAGCCCGGATCTCATCCTGCCCCT
GCATGGACTGAGGAACGTCAAAGCCATCGACTATGACCCACTGGACAA
GTTCATCTACTGGGTGGATGGGCGCCAGAACATCAAGCGAGCCAAGGA
CGACGGGACCCAGgcaggtgccctgtgg

.....6965 nt.....

FIG. 3C

【図３Ｄ】

Exon 14 Coordinates: 527d12_Contig309G 44624-44832
ctttgtcttacagCCCTTTGTTTTGACCTCTCTGAGCCAAGGCCAAAACCCAGAC
AGGCAGCCCCACGACCTCAGCATCGACATCTACAGCCGGACACTGTTC
TGGACGTGCGAGGCCACCAATACCATCAACGTCCACAGGCTGAGCGG
GGAAGCCATGGGGGTGGTGCTGCGTGGGGACCGCGACAAGCCCAGGG
CCATCGTCGTCAACGCGGAGCGAGGgtaggaggccaac

.....1404 nt.....

Exon 15 Coordinates: 527d12_Contig309G 46236-46427
ccacccctcccgcagGTACCTGTACTTCACCAACATGCAGGACCGGGCAGCCAA
GATCGAACGCGCAGCCCTGGACGGCACCGAGCGCGAGGTCCTCTTCA
CCACCGGCCTCATCCGCCCTGTGGCCCTGGTGGTGGACAACACACTGG
GCAAGCTGTTCTGGGTGGACGCGGACCTGAAGCGCATTGAGAGCTGT
GACCTGTCAGgtacgcgccccgg

.....686 nt.....

Exon 16 Coordinates: 527d12_Contig309G 47113-47322
ggctgcttgcagGGGCCAACCGCCTGACCCTGGAGGACGCCAACATCGTGCA
GCCTCTGGGCCTGACCATCCTTGGCAAGCATCTCTACTGGATCGACCG
CCAGCAGCAGATGATCGAGCGTGTGGAGAAGACCACCGGGGACAAGC
GGACTCGCATCCAGGGCCGTGTCGCCCACCTCACTGGCATCCATGCAG
TGGAGGAAGTCAGCCTGGAGGAGTTCTgtacgtgggggc

.....3884 nt.....

Exon 17 Coordinates: 527d12_Contig309G 51206-51331
ttgtctttgcagCAGCCCACCCATGTGCCCGTGACAATGGTGGCTGCTCCCCACA
TCTGTATTGCCAAGGGTGATGGGACACCACGGTGCTCATGCCCAGTCC
ACCTCGTGCTCCTGCAGAACCTGCTGACCTGTGGAGgtaggtgtgacctaggtgc

....3905 nt.....

Exon 18 Coordinates: 527d12_Contig309G 55236-55472
gttctcctctgtccctccccagAGCCGCCCACCTGCTCCCCGGACCAGTTTGCATGT
GCCACAGGGGAGATCGACTGTATCCCCGGGGCCTGGCGCTGTGACGG
CTTTCCCGAGTGCGATGACCAGAGCGACGAGGAGGGCTGCCCCGTGT
GCTCCGCCGCCCAGTTCCCCTGCGCGCGGGGTCAGTGTGTGGACCTGC
GCCTGCGCTGCGACGGCGAGGCAGACTGTCAGGACCGCTCAGACGAG
GTGGACTGTGACGgtgaggccctcc

.....3052 nt.....

FIG. 3D

【図３Ｅ】

Exon 19 Coordinates: 527d12_Contig309G 58524-58634
tctccttgcagCCATCTGCCTGCCCAACCAGTTCCGGTGTGCGAGCGGCCAGT
GTGTCCTCATCAAACAGCAGTGCGACTCCTTCCCCGACTGTATCGACG
GCTCCGACGAGCTCATGTGTGgtgagccagctt

.....1448 nt.....

Exon 20 Coordinates: 527d12_Contig309G 60082-60319
gtttgtctctggcagAAATCACCAAGCCGCCCTCAGACGACAGCCCGGCCCACA
GCAGTGCCATCGGGCCCGTCATTGGCATCATCCTCTCTCTCTTCGTCAT
GGGTGGTGTCTATTTTGTGTGCCAGCGCGTGGTGTGCCAGCGCTATGC
GGGGGCCAACGGGCCCTTCCCGCACGAGTATGTCAGCGGGACCCCGC
ACGTGCCCCTCAATTTCATAGCCCCGGGCGGTTCCCAGCATGGCCCCT
TCACAGgtaaggagcctgagatatggaa

....1095 nt.....

Exon 21 Coordinates: 527d12_Contig309G 61414-61552
cttccctgccagGCATCGCATGCGGAAAGTCCATGATGAGCTCCGTGAGCCTG
ATGGGGGGCCGGGGCGGGGTGCCCCTCTACGACCGGAACCACGTCAC
AGGGGCCTCGTCCAGCAGCTCGTCCAGCACGAAGGCCACGCTGTACCC
GCCGgtgaggggcggg

.....6513 nt.....

Exon 22 Coordinates: 527d12_Contig309G 68065-68162
ttggctctcctcagATCCTGAACCCGCCGCCCTCCCCGGCCACGGACCCCTCCC
TGTACAACATGGACATGTTCTACTCTTCAAACATTCCGGCCACTGCGA
GACCGTACAGgtaggacatcccctgcag

.....2273 nt.....

FIG. 3E

【図３Ｆ】

Exon 23 Coordinates: 527d12_Contig309G 70435-70901
tcaaacattccggccactgcgagaccgtacagGCCCTACATCATTCGAGGAATGGCGCCCC
CGACGACGCCCTGCAGCACCGACGTGTGTGACAGCGACTACAGCGCC
AGCCGCTGGAAGGCCAGCAAGTACTACCTGGATTTGAACTCGGACTCA
GACCCCTATCCACCCCCACCCACGCCCCACAGCCAGTACCTGTCGGCG
GAGGACAGCTGCCCGCCCTCGCCCGCCACCGAGAGGAGCTACTTCCAT
CTCTTCCCGCCCCCTCCGTCCCCCTGCACGGACTCATCCTGACCTCGGC
CGGGCCACTCTGGCTTCTCTGTGCCCCTGTAAATAGTTTTAAATATGAACAA
AGAAAAAAATATATTTTATGATTTAAAAAATAAATATAATTGGGATTTTAA
AAACATGAGAAATGTGAACTGTGATGGGGTGGGCAGGGCTGGGAGAACTT
TGTACAGTGGAGAAATATTTATAAACTTAATTTTGTAAAACA

FIG. 3F

【図４】

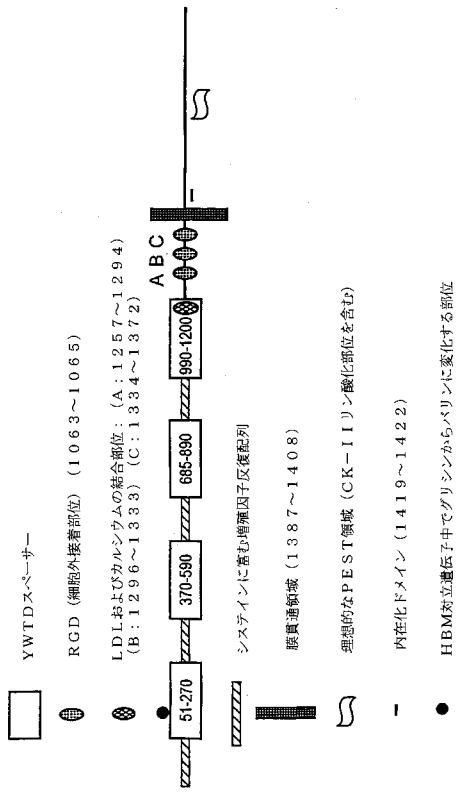


FIG. 4

【図５】

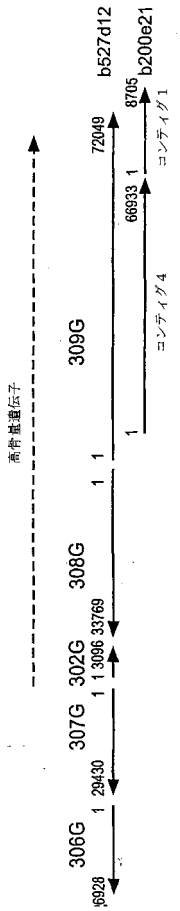


FIG. 5

【図６Ａ】

FIG. 6A

```
1    ACTAAAGCGCCGCCGCCGCGCCATGGAGCCCGAGTGAGCGCGGCGCGGGCCCGTCCGGCC   60
61   GCCGGACAACATGGAGGCAGCGCCGCCCGGGCCGCCGTGGCCGCTGCTGCTGCTGCTGCT  120
1              M  E  A  A  P  P  G  P  P  W  P  L  L  L  L  L  L   17

121  GCTGCTGCTGGCGCTGTGCGGCTGCCCGGCCCCCGCCGCGGCCTCGCCGCTCCTGCTATT  180
18    L  L  L  A  L  C  G  C  P  A  P  A  A  A  S  P  L  L  L  F   37

181  TGCCAACCGCCGGGACGTACGGCTGGTGGACGCCGGCGGAGTCAAGCTGGAGTCCACCAT  240
38    A  N  R  R  D  V  R  L  V  D  A  G  G  V  K  L  E  S  T  I   57

241  CGTGGTCAGCGGCCTGGAGGATGCGGCCGCAGTGGACTTCCAGTTTTCCAAGGGAGCCGT  300
58    V  V  S  G  L  E  D  A  A  A  V  D  F  Q  F  S  K  G  A  V   77

301  GTACTGGACAGACGTGAGCGAGGAGGCCATCAAGCAGACCTACCTGAACCAGACGGGGGC  360
78    Y  W  T  D  V  S  E  E  A  I  K  Q  T  Y  L  N  Q  T  G  A   97

361  CGCCGTGCAGAACGTGGTCATCTCCGGCCTGGTCTCTCCCGACGGCCTCGCCTGCGACTG  420
98    A  V  Q  N  V  V  I  S  G  L  V  S  P  D  G  L  A  C  D  W  117

421  GGTGGGCAAGAAGCTGTACTGGACGGACTCAGAGACCAACCGCATCGAGGTGGCCAACCT  480
118   V  G  K  K  L  Y  W  T  D  S  E  T  N  R  I  E  V  A  N  L  137

481  CAATGGCACATCCCGGAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACCTTGACCAGCCGAGGGCCATCGC  540
138   N  G  T  S  R  K  V  L  F  W  Q  D  L  D  Q  P  R  A  I  A  157

541  CTTGGACCCCGCTCACGGGTACATGTACTGGACAGACTGGGGTGAGACGCCCCGGATTGA  600
158   L  D  P  A  H  G  Y  M  Y  W  T  D  W  G  E  T  P  R  I  E  177
```

【図６Ｂ】

FIG. 6B

```
601  GCGGGCAGGGATGGATGGCAGCACCCGGAAGATCATTGTGGACTCGGACATTTACTGGCC  660
178   R  A  G  M  D  G  S  T  R  K  I  I  V  D  S  D  I  Y  W  P  197

661  CAATGGACTGACCATCGACCTGGAGGAGCAGAAGCTCTACTGGGCTGACGCCAAGCTCAG  720
198   N  G  L  T  I  D  L  E  E  Q  K  L  Y  W  A  D  A  K  L  S  217

721  CTTCATCCACCGTGCCAACCTGGACGGCTCGTTCCGGCAGAAGGTGGTGGAGGGCAGCCT  780
218   F  I  H  R  A  N  L  D  G  S  F  R  Q  K  V  V  E  G  S  L  237

781  GACGCACCCCTTCGCCCTGACGCTCTCCGGGGACACTCTGTACTGGACAGACTGGCAGAC  840
238   T  H  P  F  A  L  T  L  S  G  D  T  L  Y  W  T  D  W  Q  T  257

841  CCGCTCCATCCATGCCTGCAACAAGCGCACTGGGGGGAAGAGGAAGGAGATCCTGAGTGC  900
258   R  S  I  H  A  C  N  K  R  T  G  G  K  R  K  E  I  L  S  A  277

901  CCTCTACTCACCCATGGACATCCAGGTGCTGAGCCAGGAGCGGCAGCCTTTCTTCCACAC  960
278   L  Y  S  P  M  D  I  Q  V  L  S  Q  E  R  Q  P  F  F  H  T  297

961  TCGCTGTGAGGAGGACAATGGCGGCTGCTCCCACCTGTGCCTGCTGTCCCCAAGCGAGCC 1020
298   R  C  E  E  D  N  G  G  C  S  H  L  C  L  L  S  P  S  E  P  317

1021 TTTCTACACATGCGCCTGCCCCACGGGTGTGCAGCTGCAGGACAACGGCAGGACGTGTAA 1080
318   F  Y  T  C  A  C  P  T  G  V  Q  L  Q  D  N  G  R  T  C  K  337

1081 GGCAGGAGCCGAGGAGGTGCTGCTGCTGGCCCGGCGGACGGACCTACGGAGGATCTCGCT 1140
338   A  G  A  E  E  V  L  L  L  A  R  R  T  D  L  R  R  I  S  L  357
```

【図６Ｃ】

FIG. 6C

```
1141 GGACACGCCGGACTTCACCGACATCGTGCTGCAGGTGGACGACATCCGGCACGCCATTGC 1200
358   D  T  P  D  F  T  D  I  V  L  Q  V  D  D  I  R  H  A  I  A  377

1201 CATCGACTACGACCCGCTAGAGGGCTATGTCTACTGGACAGATGACGAGGTGCGGGCCAT 1260
378   I  D  Y  D  P  L  E  G  Y  V  Y  W  T  D  D  E  V  R  A  I  397

1261 CCGCAGGGCGTACCTGGACGGGTCTGGGGCGCAGACGCTGGTCAACACCGAGATCAACGA 1320
398   R  R  A  Y  L  D  G  S  G  A  Q  T  L  V  N  T  E  I  N  D  417

1321 CCCCGATGGCATCGCGGTCGACTGGGTGGCCCGAAACCTCTACTGGACCGACACGGGCAC 1380
418   P  D  G  I  A  V  D  W  V  A  R  N  L  Y  W  T  D  T  G  T  437

1381 GGACCGCATCGAGGTGACGCGCCTCAACGGCACCTCCCGCAAGATCCTGGTGTCGGAGGA 1440
438   D  R  I  E  V  T  R  L  N  G  T  S  R  K  I  L  V  S  E  D  457

1441 CCTGGACGAGCCCCGAGCCATCGCACTGCACCCCGTGATGGGCCTCATGTACTGGACAGA 1500
458   L  D  E  P  R  A  I  A  L  H  P  V  M  G  L  M  Y  W  T  D  477

1501 CTGGGGAGAGAACCCTAAAATCGAGTGTGCCAACTTGGATGGGCAGGAGCGGCGTGTGCT 1560
478   W  G  E  N  P  K  I  E  C  A  N  L  D  G  Q  E  R  R  V  L  497

1561 GGTCAATGCCTCCCTCGGGTGGCCCAACGGCCTGGCCCTGGACCTGCAGGAGGGGAAGCT 1620
498   V  N  A  S  L  G  W  P  N  G  L  A  L  D  L  Q  E  G  K  L  517

1621 CTACTGGGGAGACGCCAAGACAGACAAGATCGAGGTGATCAATGTTGATGGGACGAAGAG 1680
518   Y  W  G  D  A  K  T  D  K  I  E  V  I  N  V  D  G  T  K  R  537
```

【図６Ｄ】

FIG. 6D

```
1681 GCGGACCCTCCTGGAGGACAAGCTCCCGCACATTTTCGGGTTCACGCTGCTGGGGGACTT 1740
538   R  T  L  L  E  D  K  L  P  H  I  F  G  F  T  L  L  G  D  F  557

1741 CATCTACTGGACTGACTGGCAGCGCCGCAGCATCGAGCGGGTGCACAAGGTCAAGGCCAG 1800
558   I  Y  W  T  D  W  Q  R  R  S  I  E  R  V  H  K  V  K  A  S  577

1801 CCGGGACGTCATCATTGACCAGCTGCCCGACCTGATGGGGCTCAAAGCTGTGAATGTGGC 1860
578   R  D  V  I  I  D  Q  L  P  D  L  M  G  L  K  A  V  N  V  A  597

1861 CAAGGTCGTCGGAACCAACCCGTGTGCGGACAGGAACGGGGGGTGCAGCCACCTGTGCTT 1920
598   K  V  V  G  T  N  P  C  A  D  R  N  G  G  C  S  H  L  C  F  617

1921 CTTCACACCCCACGCAACCCGGTGTGGCTGCCCCATCGGCCTGGAGCTGCTGAGTGACAT 1980
618   F  T  P  H  A  T  R  C  G  C  P  I  G  L  E  L  L  S  D  M  637

1981 GAAGACCTGCATCGTGCCTGAGGCCTTCTTGGTCTTCACCAGCAGAGCCGCCATCCACAG 2040
638   K  T  C  I  V  P  E  A  F  L  V  F  T  S  R  A  A  I  H  R  657

2041 GATCTCCCTCGAGACCAATAACAACGACGTGGCCATCCCGCTCACGGGCGTCAAGGAGGC 2100
658   I  S  L  E  T  N  N  N  D  V  A  I  P  L  T  G  V  K  E  A  677

2101 CTCAGCCCTGGACTTTGATGTGTCCAACAACCACATCTACTGGACAGACGTCAGCCTGAA 2160
678   S  A  L  D  F  D  V  S  N  N  H  I  Y  W  T  D  V  S  L  K  697

2161 GACCATCAGCCGCGCCTTCATGAACGGGAGCTCGGTGGAGCACGTGGTGGAGTTTGGCCT 2220
698   T  I  S  R  A  F  M  N  G  S  S  V  E  H  V  V  E  F  G  L  717
```

【図６Ｅ】

FIG. 6E

```
2221  TGACTACCCCGAGGGCATGGCCGTTGACTGGATGGGCAAGAACCTCTACTGGGCCGACAC  2280
 718   D  Y  P  E  G  M  A  V  D  W  M  G  K  N  L  Y  W  A  D  T   737

2281  TGGGACCAACAGAATCGAAGTGGCGCGGCTGGACGGGCAGTTCCGGCAAGTCCTCGTGTG  2340
 738   G  T  N  R  I  E  V  A  R  L  D  G  Q  F  R  Q  V  L  V  W   757

2341  GAGGGACTTGGACAACCCGAGGTCGCTGGCCCTGGATCCCACCAAGGGCTACATCTACTG  2400
 758   R  D  L  D  N  P  R  S  L  A  L  D  P  T  K  G  Y  I  Y  W   777

2401  GACCGAGTGGGGCGGCAAGCCGAGGATCGTGCGGGCCTTCATGGACGGGACCAACTGCAT  2460
 778   T  E  W  G  G  K  P  R  I  V  R  A  F  M  D  G  T  N  C  M   797

2461  GACGCTGGTGGACAAGGTGGGCCGGGCCAACGACCTCACCATTGACTACGCTGACCAGCG  2520
 798   T  L  V  D  K  V  G  R  A  N  D  L  T  I  D  Y  A  D  Q  R   817

2521  CCTCTACTGGACCGACCTGGACACCAACATGATCGAGTCGTCCAACATGCTGGGTCAGGA  2580
 818   L  Y  W  T  D  L  D  T  N  M  I  E  S  S  N  M  L  G  Q  E   837

2581  GCGGGTCGTGATTGCCGACGATCTCCCGCACCCGTTCGGTCTGACGCAGTACAGCGATTA  2640
 838   R  V  V  I  A  D  D  L  P  H  P  F  G  L  T  Q  Y  S  D  Y   857

2641  TATCTACTGGACAGACTGGAATCTGCACAGCATTGAGCGGGCCGACAAGACTAGCGGCCG  2700
 858   I  Y  W  T  D  W  N  L  H  S  I  E  R  A  D  K  T  S  G  R   877

2701  GAACCGCACCCTCATCCAGGGCCACCTGGACTTCGTGATGGACATCCTGGTGTTCCACTC  2760
 878   N  R  T  L  I  Q  G  H  L  D  F  V  M  D  I  L  V  F  H  S   897
```

【図６Ｆ】

FIG. 6F

```
2761  CTCCCGCCAGGATGGCCTCAATGACTGTATGCACAACAACGGGCAGTGTGGGCAGCTGTG  2820
 898   S  R  Q  D  G  L  N  D  C  M  H  N  N  G  Q  C  G  Q  L  C   917

2821  CCTTGCCATCCCCCGGCGGCCACCGCTGCGGCTGCGCCTCACACTACACCCTGGACCCCAG  2880
 918   L  A  I  P  G  G  H  R  C  G  C  A  S  H  Y  T  L  D  P  S   937

2881  CAGCCGCAACTGCAGCCCGCCCACCACCTTCTTGCTGTTCAGCCAGAAATCTGCCATCAG  2940
 938   S  R  N  C  S  P  P  T  T  F  L  L  F  S  Q  K  S  A  I  S   957

2941  TCGGATGATCCCGGACGACCAGCACAGCCCGGATCTCATCCTGCCCCTGCATGGACTGAG  3000
 958   R  M  I  P  D  D  Q  H  S  P  D  L  I  L  P  L  H  G  L  R   977

3001  GAACGTCAAAGCCATCGACTATGACCCACTGGACAAGTTCATCTACTGGGTGGATGGGCG  3060
 978   N  V  K  A  I  D  Y  D  P  L  D  K  F  I  Y  W  V  D  G  R   997

3061  CCAGAACATCAAGCGAGCCAAGGACGACGGGACCCAGCCCTTTGTTTTGACCTCTCTGAG  3120
 998   Q  N  I  K  R  A  K  D  D  G  T  Q  P  F  V  L  T  S  L  S  1017

3121  CCAAGGCCAAAACCCAGACAGGCAGCCCCACGACCTCAGCATCGACATCTACAGCCGGAC  3180
1018   Q  G  Q  N  P  D  R  Q  P  H  D  L  S  I  D  I  Y  S  R  T  1037

3181  ACTGTTCTGGACGTGCGAGGCCACCAATACCATCAACGTCCACAGGCTGAGCGGGGAAGC  3240
1038   L  F  W  T  C  E  A  T  N  T  I  N  V  H  R  L  S  G  E  A  1057

3241  CATGGGGGTGGTGCTGCGTGGGGACCGCGACAAGCCCAGGGCCATCGTCGTCAACGCGGA  3300
1058   M  G  V  V  L  R  G  D  R  D  K  P  R  A  I  V  V  N  A  E  1077
```

【図６Ｇ】

FIG. 6G

```
3301  GCGAGGGTACCTGTACTTCACCAACATGCAGGACCGGGCAGCCAAGATCGAACGCGCAGC  3360
1078   R  G  Y  L  Y  F  T  N  M  Q  D  R  A  A  K  I  E  R  A  A  1097

3361  CCTGGACGGCACCGAGCGCGAGGTCCTCTTCACCACCGGCCTCATCCGCCCTGTGGCCCT  3420
1098   L  D  G  T  E  R  E  V  L  F  T  T  G  L  I  R  P  V  A  L  1117

3421  GGTGGTGGACAACACACTGGGCAAGCTGTTCTGGGTGGACGCGGACCTGAAGCGCATTGA  3480
1118   V  V  D  N  T  L  G  K  L  F  W  V  D  A  D  L  K  R  I  E  1137

3481  GAGCTGTGACCTGTCAGGGGCCAACCGCCTGACCCTGGAGGACGCCAACATCGTGCAGCC  3540
1138   S  C  D  L  S  G  A  N  R  L  T  L  E  D  A  N  I  V  Q  P  1157

3541  TCTGGGCCTGACCATCCTTGGCAAGCATCTCTACTGGATCGACCGCCAGCAGCAGATGAT  3600
1158   L  G  L  T  I  L  G  K  H  L  Y  W  I  D  R  Q  Q  Q  M  I  1177

3601  CGAGCGTGTGGAGAAGACCACCGGGGACAAGCGGACTCGCATCCAGGGCCGTGTCGCCCA  3660
1178   E  R  V  E  K  T  T  G  D  K  R  T  R  I  Q  G  R  V  A  H  1197

3661  CCTCACTGGCATCCATGCAGTGGAGGAAGTCAGCCTGGAGGAGTTCTCAGCCCACCCATG  3720
1198   L  T  G  I  H  A  V  E  E  V  S  L  E  E  F  S  A  H  P  C  1217

3721  TGCCCGTGACAATGGTGGCTGCTCCCACATCTGTATTGCCAAGGGTGATGGGACACCACG  3780
1218   A  R  D  N  G  G  C  S  H  I  C  I  A  K  G  D  G  T  P  R  1237

3781  GTGCTCATGCCCAGTCCACCTCGTGCTCCTGCAGAACCTGCTGACCTGTGGAGAGCCGCC  3840
1238   C  S  C  P  V  H  L  V  L  L  Q  N  L  L  T  C  G  E  P  P  1257
```

【図６Ｈ】

FIG. 6H

```
3841  CACCTGCTCCCCGGACCAGTTTGCATGTGCCACAGGGGAGATCGACTGTATCCCCGGGGC  3900
1258   T  C  S  P  D  Q  F  A  C  A  T  G  E  I  D  C  I  P  G  A  1277

3901  CTGGCGCTGTGACGGCTTTCCCGAGTGCGATGACCAGAGCGACGAGGAGGGCTGCCCCGT  3960
1278   W  R  C  D  G  F  P  E  C  D  D  Q  S  D  E  E  G  C  P  V  1297

3961  GTGCTCCGCCGCCCAGTTCCCCTGCGCGCGGGGTCAGTGTGTGGACCTGCGCCTGCGCTG  4020
1298   C  S  A  A  Q  F  P  C  A  R  G  Q  C  V  D  L  R  L  R  C  1317

4021  CGACGGCGAGGCAGACTGTCAGGACCGCTCAGACGAGGTGGACTGTGACGCCATCTGCCT  4080
1318   D  G  E  A  D  C  Q  D  R  S  D  E  V  D  C  D  A  I  C  L  1337

4081  GCCCAACCAGTTCCGGTGTGCGAGCGGCCAGTGTGTCCTCATCAAACAGCAGTGCGACTC  4140
1338   P  N  Q  F  R  C  A  S  G  Q  C  V  L  I  K  Q  Q  C  D  S  1357

4141  CTTCCCCGACTGTATCGACGGCTCCGACGAGCTCATGTGTGAAATCACCAAGCCGCCCTC  4200
1358   F  P  D  C  I  D  G  S  D  E  L  M  C  E  I  T  K  P  P  S  1377

4201  AGACGACAGCCCGGCCCACAGCAGTGCCATCGGGCCCGTCATTGGCATCATCCTCTCTCT  4260
1378   D  D  S  P  A  H  S  S  A  I  G  P  V  I  G  I  I  L  S  L  1397

4261  CTTCGTCATGGGTGGTGTCTATTTTGTGTGCCAGCGCGTGGTGTGCCAGCGCTATGCGGG  4320
1398   F  V  M  G  G  V  Y  F  V  C  Q  R  V  V  C  Q  R  Y  A  G  1417

4321  GGCCAACGGGCCCTTCCCGCACGAGTATGTCAGCGGGACCCCGCACGTGCCCCTCAATTT  4380
1418   A  N  G  P  F  P  H  E  Y  V  S  G  T  P  H  V  P  L  N  F  1437
```

【図６Ｉ】

FIG. 6I

```
4381  CATAGCCCCGGGCGGTTCCCAGCATGGCCCTTCACAGGCATCGCATGCGGAAAGTCCAT  4440
1438  I  A  P  G  G  S  Q  H  G  P  F  T  G  I  A  C  G  K  S  M   1457

4441  GATGAGCTCCGTGAGCCTGATGGGGGGCCGGGGCGGGTGCCCCCTCTACGACCGGAACCA  4500
1458  M  S  S  V  S  L  M  G  G  R  G  G  V  P  L  Y  D  R  N  H   1477

4501  CGTCACAGGGGCCTCGTCCAGCAGCTCGTCCAGCACGAAGGCCACGCTGTACCCGCCGAT  4560
1478  V  T  G  A  S  S  S  S  S  S  T  K  A  T  L  Y  P  P  I      1497

4561  CCTGAACCCGCCGCCCTCCCCGGCCACGGACCCCTCCCTGTACAACATGGACATGTTCTA  4620
1498  L  N  P  P  P  S  P  A  T  D  P  S  L  Y  N  M  D  M  F  Y   1517

4621  CTCTTCAAACATTCCGGCCACTGCGAGACCGTACAGGCCCTACATCATTCGAGGAATGGC  4680
1518  S  S  N  I  P  A  T  A  R  P  Y  R  P  Y  Y  I  I  R  G  M  A   1537

4681  GCCCCCGACGACGCCCTGCAGCACCGACGTGTGTGACAGCGACTACAGCGCCAGCCGCTG  4740
1538  P  P  T  T  P  C  S  T  D  V  C  D  S  D  Y  S  A  S  R  W   1557

4741  GAAGGCCAGCAAGTACTACCTGGATTTGAACTCGGACTCAGACCCCTATCCACCCCCACC  4800
1558  K  A  S  K  Y  Y  L  D  L  N  S  D  S  D  P  Y  P  P  P  P   1577

4801  CACGCCCCACAGCCAGTACCTGTCGGCGAGGACAGCTGCCCGCCCTCGCCGCCACCGA  4860
1578  T  P  H  S  Q  Y  L  S  A  E  D  S  C  P  P  S  P  A  T  E   1597

4861  GAGGAGCTACTTCCATCTCTTCCCGCCCCCTCCGTCCCCCTGCACGGACTCATCCTGACC  4920
1598  R  S  Y  F  H  L  F  P  P  P  P  S  P  C  T  D  S  S          1615
```

【図６Ｊ】

FIG. 6J

```
4921  TCGGCCGGGCCACTCTGGCTTCTCTGTGCCCCTGTAAATAGTTTTAAATATGAACAAAGA  4980
4981  AAAAAATATATTTTATGATTTAAAAAATAAATATAATTGGGATTTTAAAAACATGAGAAA  5040
5041  TGTGAACTGTGATGGGGTGGGCAGGGCTGGGAGAACTTTGTACAGTGGAGAAATATTTAT  5100
5101  AAACTTAATTTTGTAAAACA  5120
```

【図７】

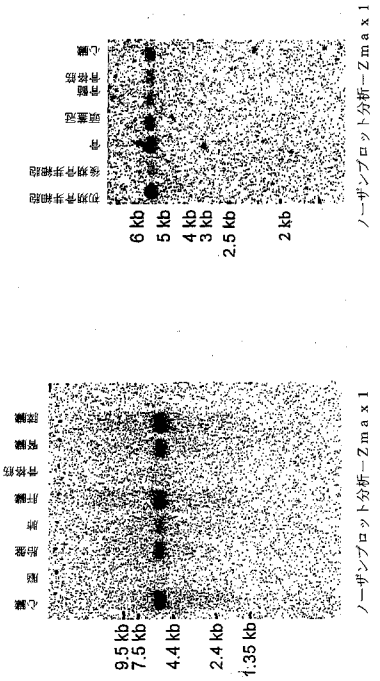


FIG. 7A

FIG. 7B

【図８】

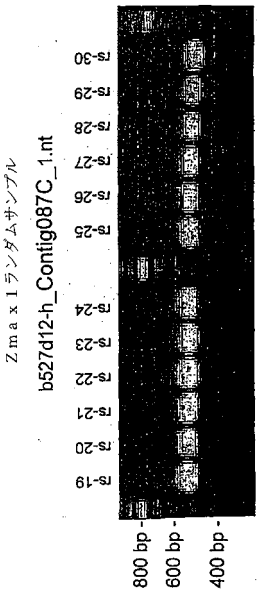


FIG. 8

【図９】

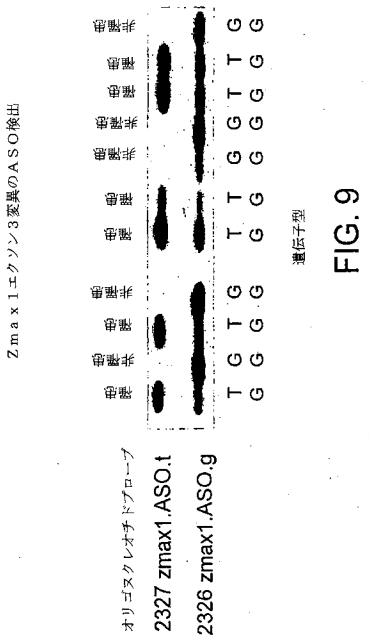


FIG. 9

【図１０】

FIG. 10A

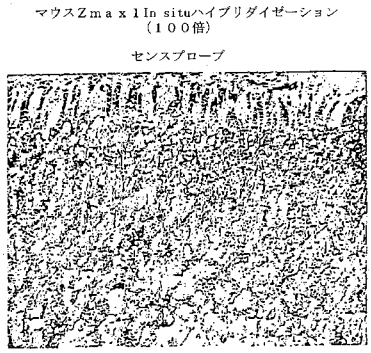


FIG. 10B

【図１１】

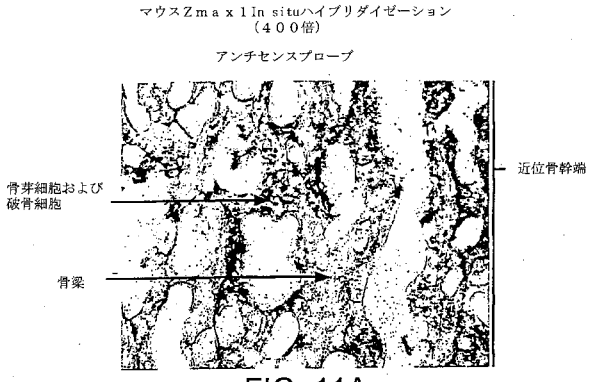


FIG. 11A

FIG. 11B

【図１２】

FIG. 12A

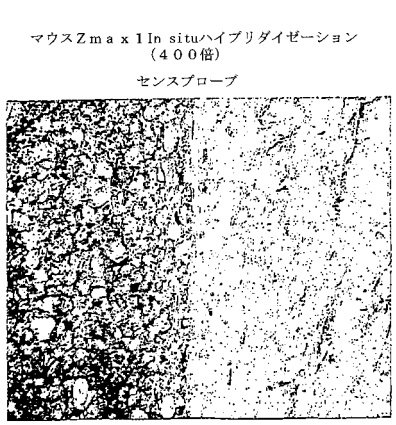


FIG. 12B

【図１３】

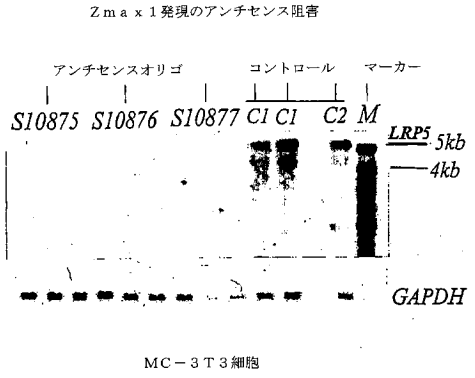


FIG. 13

【図１４】

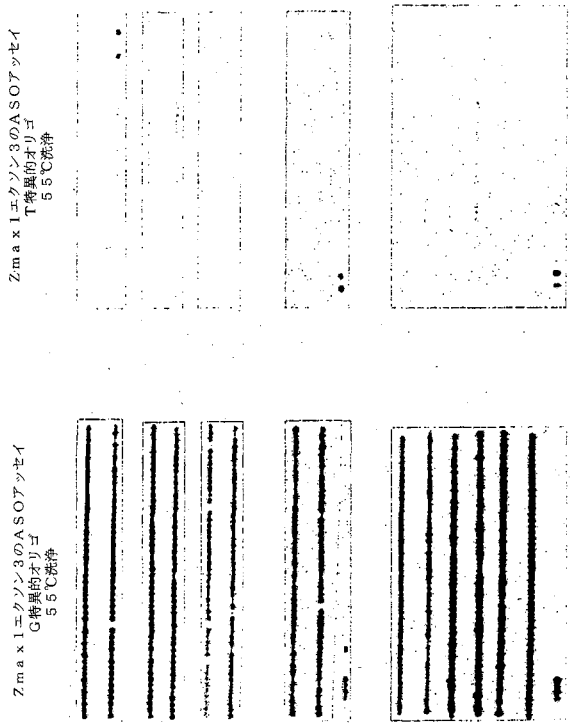


FIG. 14B

FIG. 14A

【図１５】

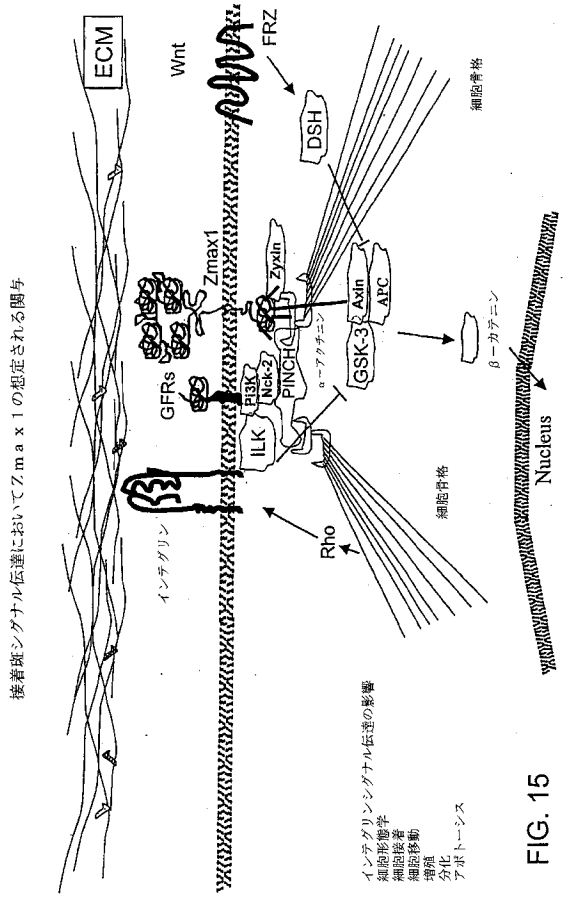


FIG. 15

【図１６】

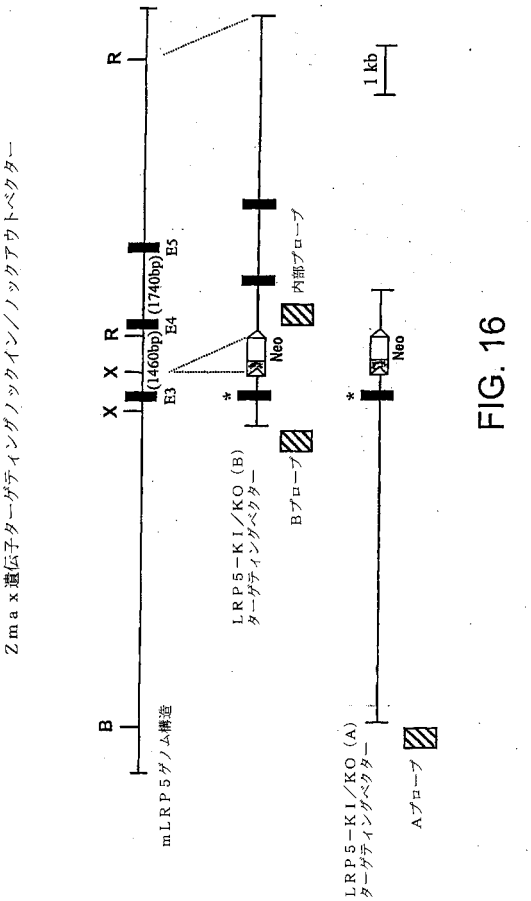


FIG. 16

【図１７】

HBM：トランスジェニックマウス確認用構築物
HOB－０２－０２細胞への一過性トランスフェクション＊

CMVβアクチン		I型コラーゲン	
HBM	Zmax1	HBM	Zmax1
X 1,000	X 1,000	X 10	X 10

＊空のベクターでトランスフェクトした細胞中の
Ｚｍａｘ１と比較した増加倍率

FIG. 17

【図１８】

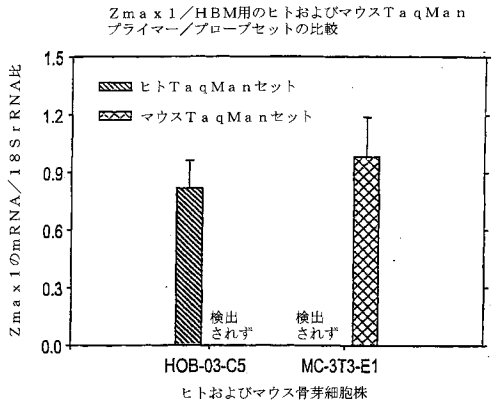


FIG. 18

【図１９】

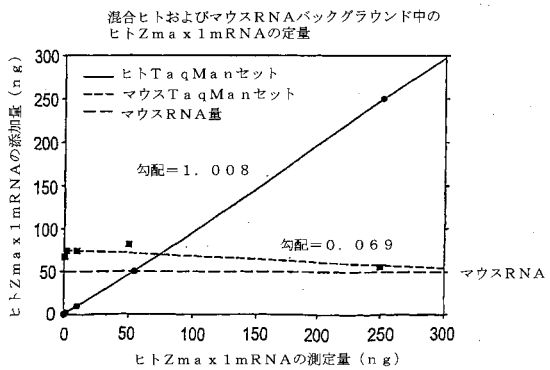


FIG. 19

【図２０】

HBM：Ｔａｑｍａｎ分析による
トランスジェニックマウスｍＲＮＡ発現＊

	組織						
系統	脛骨	大腿	心臓	生殖腺	脳	腎臓	肝臓
HBMMCBA							
2	7-10		20-90	2-30	6-11	5-9	<1
13	1-2		6-7	3-4	5-6	<1	<1
18	10-11						
HBMMTIC							
19	7-8	19-20	1				1
35	1	1	0				0

＊ＨＯＢ－０３－Ｃ５中のＺｍａｘ１との比較

FIG. 20

【図２１Ａ】

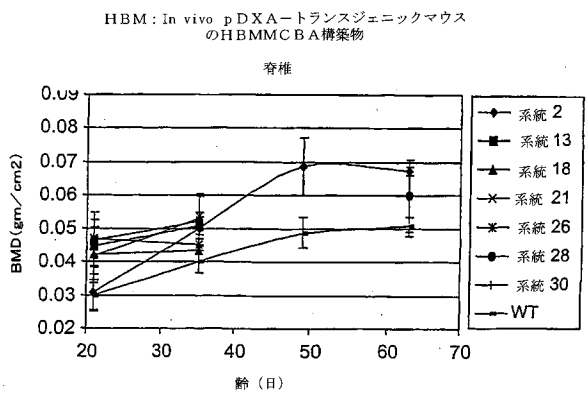


FIG. 21A

【図２１Ｂ】

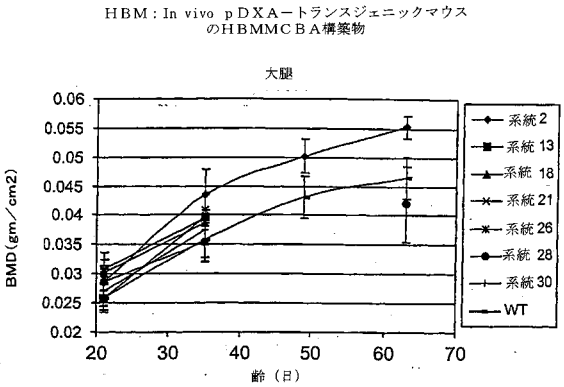


FIG. 21B

【図２１Ｃ】

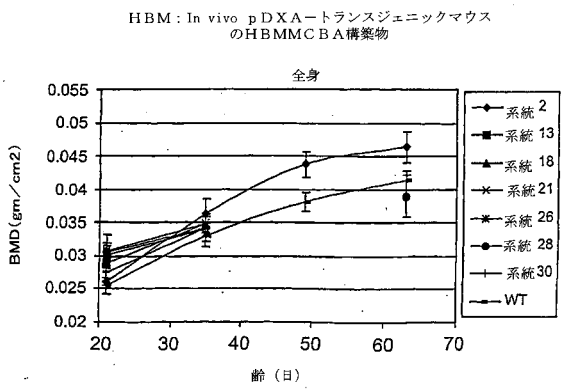


FIG. 21C

【図２１Ｄ】

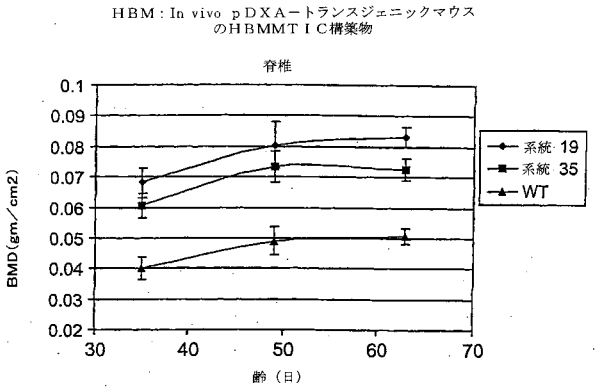


FIG. 21D

【図２１Ｅ】

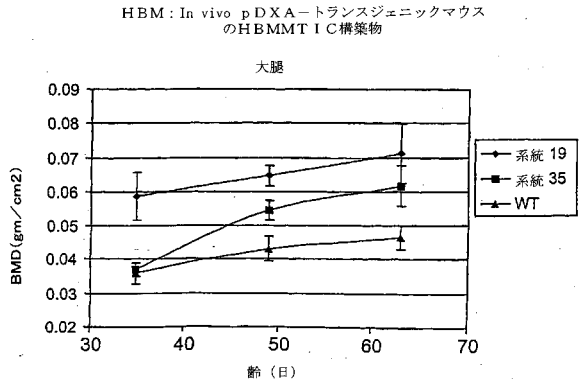


FIG. 21E

【図２１Ｆ】

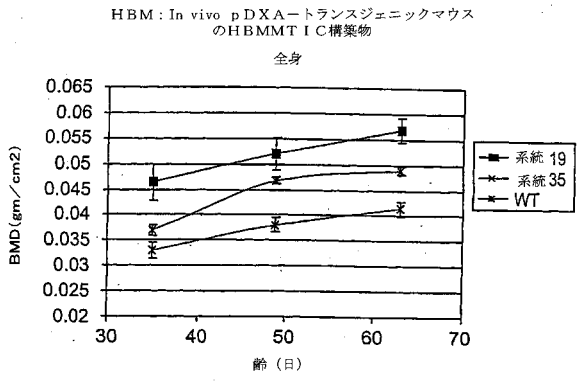


FIG. 21F

【図２２】

HBMトランスジェニックマウス：インビボｐＤＸＡ＊
（５週齢の野生型動物と比較したＢＭＤの変化）

系統	n	大腿	脊椎	全身	脛骨のｍＲＮＡ
HBMMCBA					
2	11	21	24	10	x7-10
13	4	11	27	5	x1-2
18	1	8	9	3	x10-11
21	1	10	12	6	0
28	15	0	30	4	x1
30	7	4	32	4	0
HBMMTIC					
19	5	63	70	41	x7-8
35	1	4	47	6	x1

＊ＣＶ：大腿（２．７％）；脊椎（６．４％）、全身（１．７％

FIG. 22

【図２３】

HBMトランスジェニックマウス：インビボｐＤＸＡ＊
（９週齢の野生型動物と比較したＢＭＤの変化）

系統	n	大腿	脊椎	全身
HBMMCBA				
2	3	19	32	12
HBMMTIC				
19	2	52	64	37
35	3	32	43	18

＊ＣＶ：大腿（２．７％）；脊椎（６．４％）、全身（１．７％

FIG. 23

【図２４Ａ】

FIG. 24A

HBMGI_2AS

TCTAGACTCG AGGCGGCCGC CCATTGTGCA CTAAAGCGCC GCCGCCGCGC CATGGAGCCC
GAGTGAGCGC GGCGCGGGCC CGTCCGGCCG CCGGACAACA TGGAGGCAGC GCCGCCCGGG
CCGCCGTGGC CGCTGCTGCT GCTGCTGCTG CTGCTGCTGG CGCTGTGCGG CTGCCCGGCC
CCCGCCGCGG CCTCGCCGCT CCTGCTATTT GCCAACCGCC GGGACGTACG GCTGGTGGAC
GCCGGCGGAG TCAAGCTGGA GTCCACCATC GTGGTCAGCG GCCTGGAGGA TGCGGCCGCA
GTGGACTTCC AGTTTTCCAA GGGAGCCGTG TACTGGACAG ACGTGAGCGA GGAGGCCATC
AAGCAGACCT ACCTGAACCA GACGGGGGCC GCCGTGCAGA ACGTGGTCAT CTCCGGCCTG
GTCTCTCCCG ACGGCCTCGC CTGCGACTGG GTGGGCAAGA AGCTGTACTG GACGGACTCA
GAGACCAACC GCATCGAGGT GGCCAACCTC AATGGCACAT CCCGGAAGGT GCTCTTCTGG
CAGGACCTTG ACCAGCCGAG GGCCATCGCC TTGGACCCCG CTCACGGGTA CATGTACTGG
ACAGACTGGG TTGAGACGCC CCGGATTGAG CGGGCAGGGA TGGATGGCAG CACCCGGAAG
ATCATTGTGG ACTCGGACAT TTACTGGCCC AATGGACTGA CCATCGACCT GGAGGAGCAG
AAGCTCTACT GGGCTGACGC CAAGCTCAGC TTCATCCACC GTGCCAACCT GGACGGCTCG
TTCCGGCAGA AGGTGGTGGA GGGCAGCCTG ACGCACCCCT TCGCCCTGAC GCTCTCCGGG
GACACTCTGT ACTGGACAGA CTGGCAGACC CGCTCCATCC ATGCCTGCAA CAAGCGCACT
GGGGGGAAGA GGAAGGAGAT CCTGAGTGCC CTCTACTCAC CCATGGACAT CCAGGTGCTG
AGCCAGGAGC GGCAGCCTTT CTTCCACACT CGCTGTGAGG AGGACAATGG CGGCTGCTCC
CACCTGTGCC TGCTGTCCCC AAGCGAGCCT TTCTACACAT GCGCCTGCCC CACGGGTGTG
CAGCTGCAGG ACAACGGCAG GACGTGTAAG GCAGGAGCCG AGGAGGTGCT GCTGCTGGCC
CGGCGGACGG ACCTACGGAG GATCTCGCTG GACACGCCGG ACTTCACCGA CATCGTGCTG
CAGGTGGACG ACATCCGGCA CGCCATTGCC ATCGACTACG ACCCGCTAGA GGGCTATGTC
TACTGGACAG ATGACGAGGT GCGGGCCATC CGCAGGGCGT ACCTGGACGG GTCTGGGGCG
CAGACGCTGG TCAACACCGA GATCAACGAC CCCGATGGCA TCGCGGTCGA CTGGGTGGCC
CGAAACCTCT ACTGGACCGA CACGGGCACG GACCGCATCG AGGTGACGCG CCTCAACGGC

【図２４Ｂ】

FIG. 24B

HBMGI_2AS

ACCTCCCGCA AGATCCTGGT GTCGGAGGAC CTGGACGAGC CCCGAGCCAT CGCACTGCAC
CCCGTGATGG GCCTCATGTA CTGGACAGAC TGGGGAGAGA ACCCTAAAAT CGAGTGTGCC
AACTTGGATG GGCAGGAGCG GCGTGTGCTG GTCAATGCCT CCCTCGGGTG GCCCAACGGC
CTGGCCCTGG ACCTGCAGGA GGGGAAGCTC TACTGGGGAG ACGCCAAGAC AGACAAGATC
GAGGTGATCA ATGTTGATGG GACGAAGAGG CGGACCCTCC TGGAGGACAA GCTCCCGCAC
ATTTTCGGGT TCACGCTGCT GGGGGACTTC ATCTACTGGA CTGACTGGCA GCGCCGCAGC
ATCGAGCGGG TGCACAAGGT CAAGGCCAGC CGGGACGTCA TCATTGACCA GCTGCCCGAC
CTGATGGGGC TCAAAGCTGT GAATGTGGCC AAGGTCGTCG GAACCAACCC GTGTGCGGAC
AGGAACGGGG GGTGCAGCCA CCTGTGCTTC TTCACACCCC ACGCAACCCG GTGTGGCTGC
CCCATCGGCC TGGAGCTGCT GAGTGACATG AAGACCTGCA TCGTGCCTGA GGCCTTCTTG
GTCTTCACCA GCAGAGCCGC CATCCACAGG ATCTCCCTCG AGACCAATAA CAACGACGTG
GCCATCCCGC TCACGGGCGT CAAGGAGGCC TCAGCCCTGG ACTTTGATGT GTCCAACAAC
CACATCTACT GGACAGACGT CAGCCTGAAG ACCATCAGCC GCGCCTTCAT GAACGGGAGC
TCGGTGGAGC ACGTGGTGGA GTTTGGCCTT GACTACCCCG AGGGCATGGC CGTTGACTGG
ATGGGCAAGA ACCTCTACTG GGCCGACACT GGGACCAACA GAATCGAAGT GGCGCGGCTG
GACGGGCAGT TCCGGCAAGT CCTCGTGTGG AGGGACTTGG ACAACCCGAG GTCGCTGGCC
CTGGATCCCA CCAAGGGCTA CATCTACTGG ACCGAGTGGG GCGGCAAGCC GAGGATCGTG
CGGGCCTTCA TGGACGGGAC CAACTGCATG ACGCTGGTGG ACAAGGTGGG CCGGGCCAAC
GACCTCACCA TTGACTACGC TGACCAGCGC CTCTACTGGA CCGACCTGGA CACCAACATG
ATCGAGTCGT CCAACATGCT GGGTCAGGAG CGGGTCGTGA TTGCCGACGA TCTCCCGCAC
CCGTTCGGTC TGACGCAGTA CAGCGATTAT ATCTACTGGA CAGACTGGAA TCTGCACAGC
ATTGAGCGGG CCGACAAGAC TAGCGGCCGG AACCGCACCC TCATCCAGGG CCACCTGGAC
TTCGTGATGG ACATCCTGGT GTTCCACTCC TCCCGCCAGG ATGGCCTCAA TGACTGTATG

【図２４Ｃ】

FIG. 24C

HBMGI_2AS

CACAACAACG GGCAGTGTGG GCAGCTGTGC CTTGCCATCC CCGGCGGCCA CCGCTGCGGC
TGCGCCTCAC ACTACACCCT GGACCCCAGC AGCCGCAACT GCAGCCCGCC CACCACCTTC
TTGCTGTTCA GCCAGAAATC TGCCATCAGT CGGATGATCC CGGACGACCA GCACAGCCCG
GATCTCATCC TGCCCCTGCA TGGACTGAGG AACGTCAAAG CCATCGACTA TGACCCACTG
GACAAGTTCA TCTACTGGGT GGATGGGCGC CAGAACATCA AGCGAGCCAA GGACGACGGG
ACCCAGCCCT TTGTTTTGAC CTCTCTGAGC CAAGGCCAAA ACCCAGACAG GCAGCCCCAC
GACCTCAGCA TCGACATCTA CAGCCGGACA CTGTTCTGGA CGTGCGAGGC CACCAATACC
ATCAACGTCC ACAGGCTGAG CGGGGAAGCC ATGGGGGTGG TGCTGCGTGG GGACCGCGAC
AAGCCCAGGG CCATCGTCGT CAACGCGGAG CGAGGGTACC TGTACTTCAC CAACATGCAG
GACCGGGCAG CCAAGATCGA ACGCGCAGCC CTGGACGGCA CCGAGCGCGA GGTCCTCTTC
ACCACCGGCC TCATCCGCCC TGTGGCCCTG GTGGTAGACA ACACACTGGG CAAGCTGTTC
TGGGTGGACG CGGACCTGAA GCGCATTGAG AGCTGTGACC TGTCAGGGGC CAACCGCCTG
ACCCTGGAGG ACGCCAACAT CGTGCAGCCT CTGGGCCTGA CCATCCTTGG CAAGCATCTC
TACTGGATCG ACCGCCAGCA GCAGATGATC GAGCGTGTGG AGAAGACCAC CGGGGACAAG
CGGACTCGCA TCCAGGGCCG TGTCGCCCAC CTCACTGGCA TCCATGCAGT GGAGGAAGTC
AGCCTGGAGG AGTTCTCAGC CCACCCATGT GCCCGTGACA ATGGTGGCTG CTCCCACATC
TGTATTGCCA AGGGTGATGG GACACCACGG TGCTCATGCC CAGTCCACCT CGTGCTCCTG
CAGAACCTGC TGACCTGTGG AGAGCCGCCC ACCTGCTCCC CGGACCAGTT TGCATGTGCC
ACAGGGGAGA TCGACTGTAT CCCCGGGGCC TGGCGCTGTG ACGGCTTTCC CGAGTGCGAT
GACCAGAGCG ACGAGGAGGG CTGCCCCGTG TGCTCCGCCG CCCAGTTCCC CTGCGCGCGG
GGTCAGTGTG TGGACCTGCG CCTGCGCTGC GACGGCGAGG CAGACTGTCA GGACCGCTCA
GACGAGGCGG ACTGTGACGC CATCTGCCTG CCCAACCAGT TCCGGTGTGC GAGCGGCCAG
TGTGTCCTCA TCAAACAGCA GTGCGACTCC TTCCCCGACT GTATCGACGG CTCCGACGAG
CTCATGTGTG AAATCACCAA GCCGCCCTCA GACGACAGCC CGGCCCACAG CAGTGCCATC

【図２４Ｄ】

FIG. 24D

HBMGI_2AS

GGGCCCGTCA TTGGCATCAT CCTCTCTCTC TTCGTCATGG GTGGTGTCTA TTTTGTGTGC
CAGCGCGTGG TGTGCCAGCG CTATGCGGGG GCCAACGGGC CCTTCCCGCA CGAGTATGTC
AGCGGGACCC CGCACGTGCC CCTCAATTTC ATAGCCCCGG GCGGTTCCCA GCATGGCCCC
TTCACAGGCA TCGCATGCGG AAAGTCCATG ATGAGCTCCG TGAGCCTGAT GGGGGGCCGG
GGCGGGGTGC CCCTCTACGA CCGGAACCAC GTCACAGGGG CCTCGTCCAG CAGCTCGTCC
AGCACGAAGG CCACGCTGTA CCCGCCGATC CTGAACCCGC CGCCCTCCCC GGCCACGGAC
CCCTCCCTGT ACAACATGGA CATGTTCTAC TCTTCAAACA TTCCGGCCAC TGCGAGACCG
TACAGGCCCT ACATCATTCG AGGAATGGCG CCCCCGACGA CGCCCTGCAG CACCGACGTG
TGTGACAGCG ACTACAGCGC CAGCCGCTGG AAGGCCAGCA AGTACTACCT GGATTTGAAC
TCGGACTCAG ACCCCTATCC ACCCCCACCC ACGCCCCACA GCCAGTACCT GTCGGCGGAG
GACAGCTGCC CGCCCTCGCC CGCCACCGAG AGGAGCTACT TCCATCTCTT CCCGCCCCCT
CCGTCCCCCT GCACGGACTC ATCCTGACCT CGGCCGGGCC ACTCTGGCTT CTCTGTGCCC
CTGTAAATAG TTTTAAATAT GAACAAAGAA AAAAATATAT TTTATGATTT AAAAAATAAA
TATAATTGGG ATTTTAAAAA CATGAGAAAT GTGAACTGTG ATGGGGTGGG CAGGGCTGGG
AGAACTTTGT ACAGTGGAGA AATATTTATA AACTTAATTT TGTAAAACAG AAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA GCGGCCGC

【図２５Ａ】

FIG. 25A

ZMAXGI_3AS

TCTAGACTCG AGGCGGCCGC CCATTGTGCA CTAAAGCGCC GCCGCCGCGC CATGGAGCCC
GAGTGAGCGC GGCGCGGGCC CGTCCGGCCG CCGGACAACA TGGAGGCAGC GCCGCCCGGG
CCGCCGTGGC CGCTGCTGCT GCTGCTGCTG CTGCTGCTGG CGCTGTGCGG CTGCCCGGCC
CCCGCCGCGG CCTCGCCGCT CCTGCTATTT GCCAACCGCC GGGACGTACG GCTGGTGGAC
GCCGGCGGAG TCAAGCTGGA GTCCACCATC GTGGTCAGCG GCCTGGAGGA TGCGGCCGCA
GTGGACTTCC AGTTTTCCAA GGGAGCCGTG TACTGGACAG ACGTGAGCGA GGAGGCCATC
AAGCAGACCT ACCTGAACCA GACGGGGGCC GCCGTGCAGA ACGTGGTCAT CTCCGGCCTG
GTCTCTCCCG ACGGCCTCGC CTGCGACTGG GTGGGCAAGA AGCTGTACTG GACGGACTCA
GAGACCAACC GCATCGAGGT GGCCAACCTC AATGGCACAT CCCGGAAGGT GCTCTTCTGG
CAGGACCTTG ACCAGCCGAG GGCCATCGCC TTGGACCCCG CTCACGGGTA CATGTACTGG
ACAGACTGGG GTGAGACGCC CCGGATTGAG CGGGCAGGGA TGGATGGCAG CACCCGGAAG
ATCATTGTGG ACTCGGACAT TTACTGGCCC AATGGACTGA CCATCGACCT GGAGGAGCAG
AAGCTCTACT GGGCTGACGC CAAGCTCAGC TTCATCCACC GTGCCAACCT GGACGGCTCG
TTCCGGCAGA AGGTGGTGGA GGGCAGCCTG ACGCACCCCT TCGCCCTGAC GCTCTCCGGG
GACACTCTGT ACTGGACAGA CTGGCAGACC CGCTCCATCC ATGCCTGCAA CAAGCGCACT
GGGGGGAAGA GGAAGGAGAT CCTGAGTGCC CTCTACTCAC CCATGGACAT CCAGGTGCTG
AGCCAGGAGC GGCAGCCTTT CTTCCACACT CGCTGTGAGG AGGACAATGG CGGCTGCTCC
CACCTGTGCC TGCTGTCCCC AAGCGAGCCT TTCTACACAT GCGCCTGCCC CACGGGTGTG
CAGCTGCAGG ACAACGGCAG GACGTGTAAG GCAGGAGCCG AGGAGGTGCT GCTGCTGGCC
CGGCGGACGG ACCTACGGAG GATCTCGCTG GACACGCCGG ACTTCACCGA CATCGTGCTG
CAGGTGGACG ACATCCGGCA CGCCATTGCC ATCGACTACG ACCCGCTAGA GGGCTATGTC
TACTGGACAG ATGACGAGGT GCGGGCCATC CGCAGGGCGT ACCTGGACGG GTCTGGGGCG
CAGACGCTGG TCAACACCGA GATCAACGAC CCCGATGGCA TCGCGGTCGA CTGGGTGGCC
CGAAACCTCT ACTGGACCGA CACGGGCACG GACCGCATCG AGGTGACGCG CCTCAACGGC

【図２５Ｂ】

FIG. 25B

ZMAXGI_3AS

ACCTCCCGCA AGATCCTGGT GTCGGAGGAC CTGGACGAGC CCCGAGCCAT CGCACTGCAC
CCCGTGATGG GCCTCATGTA CTGGACAGAC TGGGGAGAGA ACCCTAAAAT CGAGTGTGCC
AACTTGGATG GGCAGGAGCG GCGTGTGCTG GTCAATGCCT CCCTCGGGTG GCCCAACGGC
CTGGCCCTGG ACCTGCAGGA GGGGAAGCTC TACTGGGGAG ACGCCAAGAC AGACAAGATC
GAGGTGATCA ATGTTGATGG GACGAAGAGG CGGACCCTCC TGGAGGACAA GCTCCCGCAC
ATTTTCGGGT TCACGCTGCT GGGGGACTTC ATCTACTGGA CTGACTGGCA GCGCCGCAGC
ATCGAGCGGG TGCACAAGGT CAAGGCCAGC CGGGACGTCA TCATTGACCA GCTGCCCGAC
CTGATGGGGC TCAAAGCTGT GAATGTGGCC AAGGTCGTCG GAACCAACCC GTGTGCGGAC
AGGAACGGGG GGTGCAGCCA CCTGTGCTTC TTCACACCCC ACGCAACCCG GTGTGGCTGC
CCCATCGGCC TGGAGCTGCT GAGTGACATG AAGACCTGCA TCGTGCCTGA GGCCTTCTTG
GTCTTCACCA GCAGAGCCGC CATCCACAGG ATCTCCCTCG AGACCAATAA CAACGACGTG
GCCATCCCGC TCACGGGCGT CAAGGAGGCC TCAGCCCTGG ACTTTGATGT GTCCAACAAC
CACATCTACT GGACAGACGT CAGCCTGAAG ACCATCAGCC GCGCCTTCAT GAACGGGAGC
TCGGTGGAGC ACGTGGTGGA GTTTGGCCTT GACTACCCCG AGGGCATGGC CGTTGACTGG
ATGGGCAAGA ACCTCTACTG GGCCGACACT GGGACCAACA GAATCGAAGT GGCGCGGCTG
GACGGGCAGT TCCGGCAAGT CCTCGTGTGG AGGGACTTGG ACAACCCGAG GTCGCTGGCC
CTGGATCCCA CCAAGGGCTA CATCTACTGG ACCGAGTGGG GCGGCAAGCC GAGGATCGTG
CGGGCCTTCA TGGACGGGAC CAACTGCATG ACGCTGGTGG ACAAGGTGGG CCGGGCCAAC
GACCTCACCA TTGACTACGC TGACCAGCGC CTCTACTGGA CCGACCTGGA CACCAACATG
ATCGAGTCGT CCAACATGCT GGGTCAGGAG CGGGTCGTGA TTGCCGACGA TCTCCCGCAC
CCGTTCGGTC TGACGCAGTA CAGCGATTAT ATCTACTGGA CAGACTGGAA TCTGCACAGC
ATTGAGCGGG CCGACAAGAC TAGCGGCCGG AACCGCACCC TCATCCAGGG CCACCTGGAC
TTCGTGATGG ACATCCTGGT GTTCCACTCC TCCCGCCAGG ATGGCCTCAA TGACTGTATG

【図２５Ｃ】

FIG. 25C

ZMAXGI_3AS

CACAACAACG GGCAGTGTGG GCAGCTGTGC CTTGCCATCC CCGGCGGCCA CCGCTGCGGC
TGCGCCTCAC ACTACACCCT GGACCCCAGC AGCCGCAACT GCAGCCCGCC CACCACCTTC
TTGCTGTTCA GCCAGAAATC TGCCATCAGT CGGATGATCC CGGACGACCA GCACAGCCCG
GATCTCATCC TGCCCCTGCA TGGACTGAGG AACGTCAAAG CCATCGACTA TGACCCACTG
GACAAGTTCA TCTACTGGGT GGATGGGCGC CAGAACATCA AGCGAGCCAA GGACGACGGG
ACCCAGCCCT TTGTTTTGAC CTCTCTGAGC CAAGGCCAAA ACCCAGACAG GCAGCCCCAC
GACCTCAGCA TCGACATCTA CAGCCGGACA CTGTTCTGGA CGTGCGAGGC CACCAATACC
ATCAACGTCC ACAGGCTGAG CGGGGAAGCC ATGGGGGTGG TGCTGCGTGG GGACCGCGAC
AAGCCCAGGG CCATCGTCGT CAACGCGGAG CGAGGGTACC TGTACTTCAC CAACATGCAG
GACCGGGCAG CCAAGATCGA ACGCGCAGCC CTGGACGGCA CCGAGCGCGA GGTCCTCTTC
ACCACCGGCC TCATCCGCCC TGTGGCCCTG GTGGTAGACA ACACACTGGG CAAGCTGTTC
TGGGTGGACG CGGACCTGAA GCGCATTGAG AGCTGTGACC TGTCAGGGGC CAACCGCCTG
ACCCTGGAGG ACGCCAACAT CGTGCAGCCT CTGGGCCTGA CCATCCTTGG CAAGCATCTC
TACTGGATCG ACCGCCAGCA GCAGATGATC GAGCGTGTGG AGAAGACCAC CGGGGACAAG
CGGACTCGCA TCCAGGGCCG TGTCGCCCAC CTCACTGGCA TCCATGCAGT GGAGGAAGTC
AGCCTGGAGG AGTTCTCAGC CCACCCATGT GCCCGTGACA ATGGTGGCTG CTCCCACATC
TGTATTGCCA AGGGTGATGG GACACCACGG TGCTCATGCC CAGTCCACCT CGTGCTCCTG
CAGAACCTGC TGACCTGTGG AGAGCCGCCC ACCTGCTCCC CGGACCAGTT TGCATGTGCC
ACAGGGGAGA TCGACTGTAT CCCCGGGGCC TGGCGCTGTG ACGGCTTTCC CGAGTGCGAT
GACCAGAGCG ACGAGGAGGG CTGCCCCGTG TGCTCCGCCGC CCAGTTCCCC TGCGCGCGG
GGTCAGTGTGT GGACCTGCGC CTGCGCTGCG ACGGCGAGGC AGACTGTCAG GACCGCTCA
GACGAGGCGGA CTGTGACGCC ATCTGCCTGC CCAACCAGTT CCGGTGTGCG AGCGGCCAG
TGTGTCCTCAT CAAACAGCAG TGCGACTCCT TCCCCGACTG TATCGACGGC TCCGACGAG
CTCATGTGTGA AATCACCAAG CCGCCCTCAG ACGACAGCCC GGCCCACAGC AGTGCCATC

【図２５Ｄ】

FIG. 25D

ZMAXGI_3AS

```
GGGCCCGTCA TTGGCATCAT CCTCTCTCTC TTCGTCATGG GTGGTGTCTA TTTTGTGTGC
CAGCGCGTGG TGTGCCAGCG CTATGCGGGG GCCAACGGGC CCTTCCCGCA CGAGTATGTC
AGCGGGACCC CGCACGTGCC CCTCAATTTC ATAGCCCCGG GCGGTTCCCA GCATGGCCCC
TTCACAGGCA TCGCATGCGG AAAGTCCATG ATGAGCTCCG TGAGCCTGAT GGGGGGCCGG
GGCGGGGTGC CCCTCTACGA CCGGAACCAC GTCACAGGGG CCTCGTCCAG CAGCTCGTCC
AGCACGAAGG CCACGCTGTA CCCGCCGATC CTGAACCCGC CGCCCTCCCC GGCCACGGAC
CCCTCCCTGT ACAACATGGA CATGTTCTAC TCTTCAAACA TTCCGGCCAC TGCGAGACCG
TACAGGCCCT ACATCATTCG AGGAATGGCG CCCCCGACGA CGCCCTGCAG CACCGACGTG
TGTGACAGCG ACTACAGCGC CAGCCGCTGG AAGGCCAGCA AGTACTACCT GGATTTGAAC
TCGGACTCAG ACCCCTATCC ACCCCCACCC ACGCCCCACA GCCAGTACCT GTCGGCGGAG
GACAGCTGCC CGCCCTCGCC CGCCACCGAG AGGAGCTACT TCCATCTCTT CCCGCCCCCT
CCGTCCCCCT GCACGGACTC ATCCTGACCT CGGCCGGGCC ACTCTGGCTT CTCTGTGCCC
CTGTAAATAG TTTTAAATAT GAACAAAGAA AAAAATATAT TTTATGATTT AAAAAATAAA
TATAATTGGG ATTTTAAAAA CATGAGAAAT GTGAACTGTG ATGGGGTGGG CAGGGCTGGG
AGAACTTTGT ACAGTGGAGA AATATTTATA AACTTAATTT TGTAAAACAG AAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA GCGGCCGC
```

【図２６Ａ】

FIG. 26A

ヒトおよびマウスＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）
アミノ酸配列のアラインメント
（上＝ヒト、下＝マウス）

```
  1 MEA....APPGPPWPLLLLLLLLLLALCGCPAPAAASPLLLFANRRDVRLV 46
    ||.    ||| || |||||:     |:: :.|||||||||||||||||||
  1 METAPTRAPPPPPPPLLLLV.....LYCSLVPAAASPLLLFANRRDVRLV 45

 47 DAGGVKLESTIVVSGLEDAAAVDFQFSKGAVYWTDVSEEAIKQTYLNQTG 96
    ||||||||||||.|||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 46 DAGGVKLESTIVASGLEDAAAVDFQFSKGAVYWTDVSEEAIKQTYLNQTG 95

 97 AAVQNVVISGLVSPDGLACDWVGKKLYWTDSETNRIEVANLNGTSRKVLF 146
    |||:|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 96 AAAQNIVISGLVSPDGLACDWVGKKLYWTDSETNRIEVANLNGTSRKVLF 145

147 WQDLDQPRAIALDPAHGYMYWTDWGETPRIERAGMDGSTRKIIVDSDIYW 196
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
146 WQDLDQPRAIALDPAHGYMYWTDWGEAPRIERAGMDGSTRKIIVDSDIYW 195

197 PNGLTIDLEEQKLYWADAKLSFIHRANLDGSFRQKVVEGSLTHPFALTLS 246
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
196 PNGLTIDLEEQKLYWADAKLSFIHRANLDGSFRQKVVEGSLTHPFALTLS 245

247 GDTLYWTDWQTRSIHACNKRTGGKRKEILSALYSPMDIQVLSQERQPFFH 296
    |||||||||||||||||:|:|:|||||||||||||||||||||||||||
246 GDTLYWTDWQTRSIHACNKWTGEQRKEILSALYSPMDIQVLSQERQPPFH 295

297 TRCEEDNGGCSHLCLLSPSEPFYTCACPTGVQLQDNGRTCKAGAEEVLLL 346
    |.||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
296 TPCEEDNGGCSHLCLLSPREPFYSCACPTGVQLQDNGKTCKTGAEEVLLL 345

347 ARRTDLRRISLDTPDFTDIVLQVDDIRHAIAIDYDPLEGYVYWTDDEVRA 396
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
346 ARRTDLRRISLDTPDFTDIVLQVGDIRHAIAIDYDPLEGYVYWTDDEVRA 395

397 IRRAYLDGSGAQTLVNTEINDPDGIAVDWVARNLYWTDTGTDRIEVTRLN 446
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
396 IRRAYLDGSGAQTLVNTEINDPDGIAVDWVARNLYWTDTGTDRIEVTRLN 445

447 GTSRKILVSEDLDEPRAIALHPVMGLMYWTDWGENPKIECANLDGQERRV 496
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||:|:|
446 GTSRKILVSEDLDEPRAIVLHPVMGLMYWTDWGENPKIECANLDGRDRHV 495

497 LVNASLGWPNGLALDLQEGKLYWGDAKTDKIEVINVDGTKRRTLLEDKLP 546
    |||.||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||:|||||||
496 LVNTSLGWPNGLALDLQEGKLYWGDAKTDKIEVINIDGTKRKTLLEDKLP 545

547 HIFGFTLLGDFIYWTDWQRRSIERVHKVKASRDVIIDQLPDLMGLKAVNV 596
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
546 HIFGFTLLGDFIYWTDWQRRSIERVHKVKASRDVIIDQLPDLMGLKAVNV 595

597 AKVVGTNPCADRNGGCSHLCFFTPHATRCGCPIGLELLSDMKTCIVPEAF 646
    |||||||||| |||||||||||:|||||||||||||||:|||||||||||
596 AKVVGTNPCADGNGGCSHLCFFTPRATKCGCPIGLELLSDMKTCIIPEAF 645

647 LVFTSRAAIHRISLETNNNDVAIPLTGVKEASALDFDVSNNHIYWTDVSL 696
    |||||||.|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
646 LVFTSRATIHRISLETNNNDVAIPLTGVKEASALDFDVSNNHIYWTDVSL 695
```

【図２６Ｂ】

FIG. 26B

ヒトおよびマウスＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）
アミノ酸配列のアラインメント

```
697 KTISRAFMNGSSVEHVVEFGLDYPEGMAVDWMGKNLYWADTGTNRIEVAR 746
    |||||||.|||||||||:|||||||||||||||||||||||||||||||||
696 KTISRAFMNGSSVEHVIEFGLDYPEGMAVDWMGKNLYWADTGTNRIEVAR 745

747 LDGQFRQVLVWRDLDNPRSLALDPTKGYIYWTEWGGKPRIVRAFMDGTNC 796
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
746 LDGQFRQVLVWRDLDNPRSLALDPTKGYIYWTEWGGKPRIVRAFMDGTNC 795

797 MTLVDKVGRANDLTIDYADQRLYWTDLDTNMIESSNMLGQERVVIADDLP 846
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||||||||
796 MTLVDKVGRANDLTIDYADQRLYWTDLDTNMIESSNMLGQERMVIADDLP 845

847 HPFGLTQYSDYIYWTDWNLHSIERADKTSGRNRTLIQGHLDFVMDILVFH 896
    .||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
846 YPFGLTQYSDYIYWTDWNLHSIERADKTSGRNRTLIQGHLDFVMDILVFH 895

897 SSRQDGLNDCMHNNGQCGQLCLAIPGGHRCGCASHYTLDPSSRNCSPPTT 946
    ||||||||||:|.||||||||||||||||||||||||||||||||||.|
896 SSRQDGLNDCVHSNGQCGQLCLAIPGGHRCGCASHYTLDPSSRNCSPPST 945

947 FLLFSQKSAISRMIPDDQHSPDLILPLHGLRNVKAIDYDPLDKFIYWVDG 996
    |||||||.||||||||| ||||:|||||||||||||:|||||||||||||
946 FLLFSQKFAISRMIPDDQLSPDLVLPLHGLRNVKAINYDPLDKFIYWVDG 995

997 RQNIKRAKDDGTQPFVLTSLSQGQNPDRQPHDLSIDIYSRTLFWTCEATN 1046
    ||||||||||||| :||| ||: :|||||||||||||||||||||||||||
996 RQNIKRAKDDGTQPSMLTSPSQSLSPDRQPHDLSIDIYSRTLFWTCEATN 1045

1047 TINVHRLSGEAMGVVLRGDRDKPRAIVVNAERGYLYFTNMQDRAAKIERA 1096
     |||||||.|:|||||||||||||||||.|||||:|||||||:|||||||
1046 TINVHRLDGDAMGVVLRGDRDKPRAIAVNAERGYMYFTNMQDHAAKIERA 1095

1097 ALDGTEREVLFTTGLIRPVALVVDNTLGKLFWVDADLKRIESCDLSGANR 1146
     .||||||||||.|||||||||||||.|||||||||||||||||||||||
1096 SLDGTEREVLFTTGLIRPVALVVDNALGKLFWVDADLKRIESCDLSGANR 1145

1147 LTLEDANIVQPLGLTILGKHLYWIDRQQQMIERVEKTTGDKRTRIQGRVA 1196
     |||||||||:|||:|:|||||||||||||||||||||||:|||||.
1146 LTLEDANIVQPVGLTVLGRHLYWIDRQQQMIERVEKTTGDKRTRVQGRVT 1195

1197 HLTGIHAVEEVSLEEFSAHPCARDNGGCSHICIAKGDGTPRCSCPVHLVL 1246
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1196 HLTGIHAVEEVSLEEFSAHPCARDNGGCSHICIAKGDGTPRCSCPVHLVL 1245

1247 LQNLLTCGEPPTCSPDQFACATGEIDCIPGAWRCDGFPECDDQSDEEGCP 1296
     ||||||||||||||||||.|||||||||||||||||||.||||||||||
1246 LQNLLTCGEPPTCSPDQFACTTGEIDCIPGAWRCDGFPECADQSDEEGCP 1295

1297 VCSAAQFPCARGQCVDLRLRCDGEADCQDRSDEADCDAICLPNQFRCASG 1346
     |||||.|||||||||||||||||||||||||||:|||:|||||||.||
1296 VCSASQFPCARGQCVDLRLRCDGEADCQDRSDEANCDAVCLPNQFRCTSG 1345

1347 QCVLIKQQCDSFPDCIDGSDELMCEITKPPSDDSPAHSSAIGPVIGIILS 1396
     |||||||||||||| ||||||||.|||||| ||||||||||||||||||
1346 QCVLIKQQCDSFPDCADGSDELMCEINKPPSDDIPAHSSAIGPVIGIILS 1395

1397 LFVMGGVYFVCQRVVCQRYAGANGPFPHEYVSGTPHVPLNFIAPGGSQHG 1446
     ||||||||||||:|||.||.|||||||:|.||||||||||||||||||
1396 LFVMGGVYFVCQRVMCQRYTGASGPFPHEYVGGAPHVPLNFIAPGGSQHG 1445
```

【図２６Ｃ】

FIG. 26C

ヒトおよびマウスＺｍａｘ１（ＬＲＰ５）
アミノ酸配列のアラインメント

```
1447 PFTGIACGKSMMSSVSLMGGRGGVPLYDRNHVTGASSSSSSSTKATLYPP 1496
     ||.|||:|:|||:|:|||||||||||||||||||||||||||||||||||
1446 PFPGIPCSKSVMSSMSLVGGRGSVPLYDRNHVTGASSSSSSSTKATLYPP 1495

1497 ILNPPPSPATDPSLYNMDMFYSSNIPATARPYRPYIIRGMAPPTTPCSTD 1546
     |||||||||||||||:|:||||.|||||||||||:|||||||||||||
1496 ILNPPPSPATDPSLYNVDVFYSSGIPATARPYRPYVIRGMAPPTTPCSTD 1545

1547 VCDSDYSASRWKASKYYLDLNSDSDPYPPPPTPHSQYLSAEDSCPPSPAT 1596
     |||||||.||||.|||||||||||||||||||||||||||||:|
1546 VCDSDYSISRWKSSKYYLDLNSDSDPYPPPPTPHSQYLSAEDSCPPSPGT 1595

1597 ERSYFHLFPPPPSPCTDSS 1615
     |||| |||||||||||||
1596 ERSYCHLFPPPPSPCTDSS 1614
```

【図２７Ａ】

FIG. 27A

ヒトＬＲＰ５およびＬＲＰ６のアラインメント

上＝ＬＲＰ５、下＝ＬＲＰ６

下線＝抗体産生に特徴的な領域

類似性％：８３．５４２、同一性％＝７０．９０１

```
  1 MEAAPPGPPWPLLLLLLLLLALCGCPAPAAASPLLLFANRRDVRLVDAGG 50
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
  1 ..........MGAVLRSLLA.CSFCVLLRAAPLLLYANRRDLRLVDATN 38

 51 VKLESTIVVSGLEDAAAVDFQFSKGAVYWTDVSEEAIKQTYLNQTGAAVQ 100
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
 39 GKENATIVVGGLEDAAAVDFVFSHGLIYWSDVSEEAIKRTEFNKTE.SVQ 87

101 NVVISGLVSPDGLACDWVGKKLYWTDSETNRIEVANLNGTSRKVLFWQDL 150
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
 88 NVVVSGLLSPDGLACDWLGEKLYWTDSETNRIEVSNLDGSLRKVLFWQEL 137

151 DQPRAIALDPAHGYMYWTDWGETPRIERAGMDGSTRKIIVDSDIYWPNGL 200
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
138 DQPRAIALDPSSGFMYWTDWGEVPKIERAGMDGSSRFIIINSEIYWPNGL 187

201 TIDLEEQKLYWADAKLSFIHRANLDGSFRQKVVEGSLTHPFALTLSGDTL 250
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
188 TLDYEEQKLYWADAKLNFIHKSNLDGTNRQAVVKGSLPHPFALTLFEDIL 237

251 YWTDWQTRSIHACNKRTGGKRKEILSALYSPMDIQVLSQERQPFFHTRCE 300
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
238 YWTDWSTHSILACNKYTGEGLREIHSDIFSPMDIHAFSQQRQPNATNPCG 287

301 EDNGGCSHLCLLSPSEPFYTCACPTGVQLQDNGRTCKAGAEEVLLLARRT 350
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
288 IDNGGCSHLCLMSPVKPFYQCACPTGVKLLENGKTCKDGATELLLLARRT 337

351 DLRRISLDTPDFTDIVLQVDDIRHAIAIDYDPLEGYVYWTDDEVRAIRRA 400
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
338 DLRRISLDTPDFTDIVLQLEDIRHAIAIDYDPVEGYIYWTDDEVRAIRRS 387

401 YLDGSGAQTLVNTEINDPDGIAVDWVARNLYWTDTGTDRIEVTRLNGTSR 450
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
388 FIDGSGSQFVVTAQIAHPDGIAVDWVARNLYWTDTGTDRIEVTRLNGTMR 437

451 KILVSEDLDEPRAIALHPVMGLMYWTDWGENPKIECANLDGQERRVLVNA 500
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
438 KILISEDLEEPRAIVLDPMVGYMYWTDWGEIPKIERAALDGSDRVVLVNT 487

501 SLGWPNGLALDLQEGKLYWGDAKTDKIEVINVDGTKRRTLLEDKLPHIFG 550
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
488 SLGWPNGLALDYDEGKIYWGDAKTDKIEVMNTDGTGRRVLVEDKIPHIFG 537

551 FTLLGDFIYWTDWQRRSIERVHKVKASRDVIIDQLPDLMGLKAVNVAKVV 600
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
538 FTLLGDYVYWTDWQRRSIERVHKRSAEREVIIDQLPDLMGLKATNVHRVI 587

601 GTNPCADRNGGCSHLCFFTPHATRCGCPIGLELLSDMKTCIVPEAFLVFT 650
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
588 GSNPCAEENGGCSHLCLYRPQGLRCACPIGFELISDMKTCIVPEAFLLFS 637
```

【図２７Ｂ】

FIG. 27B

ヒトＬＲＰ５およびＬＲＰ６のアラインメント

```
651 SRAAIHRISLETNNNDVAIPLTGVKEASALDFDVSNNHIYWTDVSLKTIS 700
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
638 RRADIRRISLETNNNNVAIPLTGVKEASALDFDVTDNRIYWTDISLKTIS 687

701 RAFMNGSSVEHVVEFGLDYPEGMAVDWMGKNLYWADTGTNRIEVARLDGQ 750
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
688 RAFMNGSALEHVVEFGLDYPEGMAVDWLGKNLYWADTGTNRIEVSKLDGQ 737

751 FRQVLVWRDLDNPRSLALDPTKGYIYWTEWGGKPRIVRAFMDGTNCMTLV 800
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
738 HRQVLVWKDLDSPRALALDPAEGFMYWTEWGGKPKIDRAAMDGSERTTLV 787

801 DKVGRANDLTIDYADQRLYWTDLDTNMIESSNMLGQERVVIADDLPHPFG 850
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
788 PNVGRANGLTIDYAKRRLYWTDLDTNLIESSNMLGLNREVIADDLPHPFG 837

851 LTQYSDYIYWTDWNLHSIERADKTSGRNRTLIQGHLDFVMDILVFHSSRQ 900
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
838 LTQYQDYIYWTDWSRRSIERANKTSGQNRTIIQGHLDYVMDILVFHSSRQ 887

901 DGLNDCMHNNGQCGQLCLAIP.GGHRCGCASHYTLDPSSRNCSPPTTFLL 949
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
888 SGWNECASSNGHCSHLCLAVPVGGFVCGCPAHYSLNADNRTCSAPTTFLL 937

950 FSQKSAISRMIPDDQHSPDLILPLHGLRNVKAIDYDPLDKFIYWVDGRQN 999
    :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
938 FSQKSAINRMVIDEQQSPDIILPIHSLRNVRAIDYDPLDKQLYWIDSRQN 987

1000 .IKRAKDDGTQPF.VLTSLSQGQNPDRQPHDLSIDIYSRTLFWTCEATNT 1047
     :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
 988 MIRKAQEDGSQGFTVVVSSVPSQNLEIQPYDLSIDIYSRYIYWTCEATNV 1037

1048 INVHRLSGEAMGVVLRGDRDKPRAIVVNAERGYLYFTNMQDRAAKIERAA 1097
     :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
1038 INVTRLDGRSVGVVLKGEQDRPRAIVVNPEKGYMYFTNLQERSPKIERAA 1087

1098 LDGTEREVLFTTGLIRPVALVVDNTLGKLFWVDADLKRIESCDLSGANRL 1147
     :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
1088 LDGTEREVLFFSGLSKPIALALDSRLGKLFWADSDLRRIESSDLSGANRI 1137

1148 TLEDANIVQPLGLTILGKHLYWIDRQQQMIERVEKTTGDKRTRIQGRVAH 1197
     :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
1138 VLEDSNILQPVGLTVFENWLYWIDKQQQMIEKIDMTGREGRTKVQARIAQ 1187

1198 LTGIHAVEEVSLEEFSAHPCARDNGGCSHICIAKGDGTPRCSCPVHLVLL 1247
     :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
1188 LSDIHAVKELNLQEYRQHPCAQDNGGCSHICLVKGDGTTRCSCPMHLVLL 1237

1248 QNLLTCGEPPTCSPDQFACATGEIDCIPGAWRCDGFPECDDQSDEEGCPV 1297
     :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
1238 QDELSCGEPPTCSPQQFTCFTGEIDCIPVAWRCDGFTECEDHSDELNCPV 1287

1298 CSAAQFPCARGQCVDLRLRCDGEADCQDRSDEADCDAICLPNQFRCASGQ 1347
     :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
1288 CSESQFQCASGQCIDGALRCNGDANCQDKSDEKNCEVLCLIDQFRCANGQ 1337

1348 CVLIKQQCDSFPDCIDGSDELMCEITKPPSDDSPAHSSAIGPVIGIILSI 1397
     :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
1338 CIGKHKKCDHNVDCSDKSDELDCYPTEEP...APQATNTVGSVIGVIVTI 1384
```

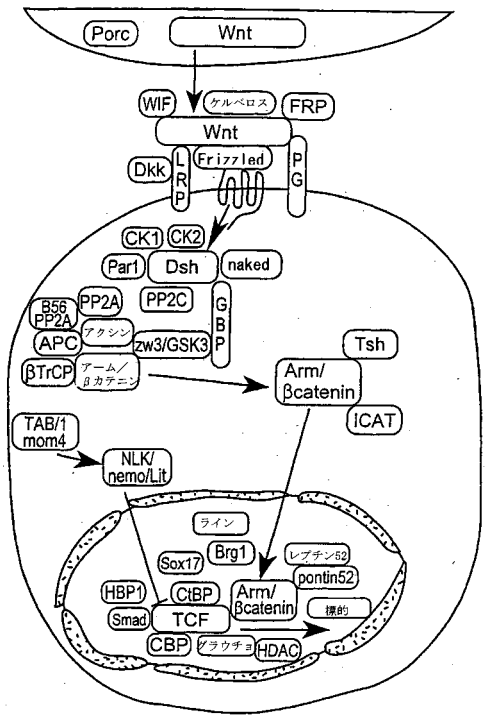
【図２７Ｃ】

FIG. 27C

ヒトＬＲＰ５およびＬＲＰ６のアラインメント

```
1398 FVMGGVYFVCQRVVCQRYAGANGPFPHEYVS.GTPHVPLNEIAPGGSQHG 1446
     :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
1385 FVSGTVYFICQRMLCPRMKGDGETMTNDYVVHGPASVPLGYVPHPSSLSG 1434

1447 PFTGIACGKSMMSSVSLMGGRGGVPLYDRNHVTGASSSSSSSTKATLYPP 1496
     :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
1435 SLPGMSRGKSMISSLSIMGGSSGPP.YDRAHVTGASSSSSSSTKGTYFPA 1483

1497 ILNPPPSPATDPSLYNMDMEYSSNIPATAR..PYRPYIIRGMAPPTTPCS 1544
     :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
1484 ILNPPPSPATERSHYTMEFGYSSNSPSTHRSYSYRPYSYRHFAPPTTPCS 1533

1545 TDVCDSDYSASRWKAS.....KYYLDLNSDSDPYPPPPTPHSQYLSAE.. 1587
     :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
1534 TDVCDSDYAPSRRNTSVATAKGYTSDLNYDSEPVPPPPTPRSQYLSAEEN 1583

1588 .DSCPPSPATERSY.FHLFPPPPSPCTDSS 1615
     :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
1584 YESCPPSPYTERSYSHHLYPPPPSPCTDSS 1613
```

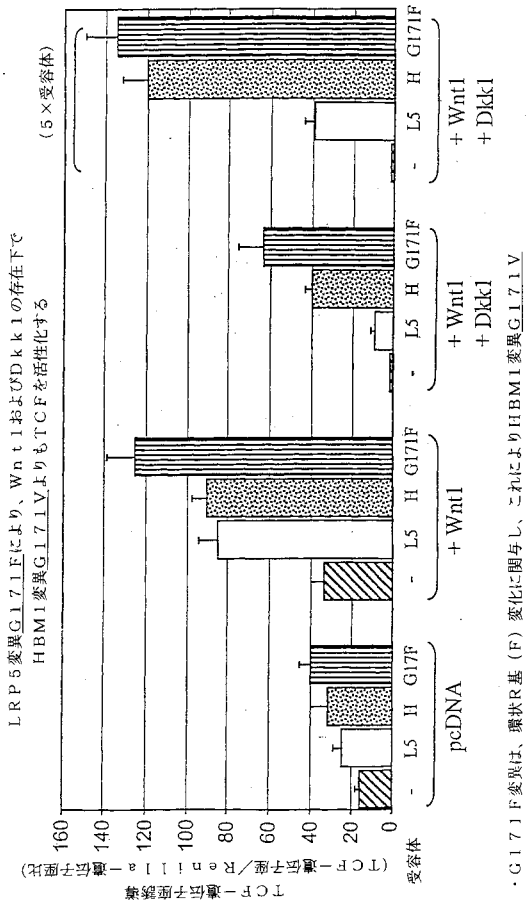
【図２８】



Ｗｎｔシグナル伝達モデル

FIG. 28

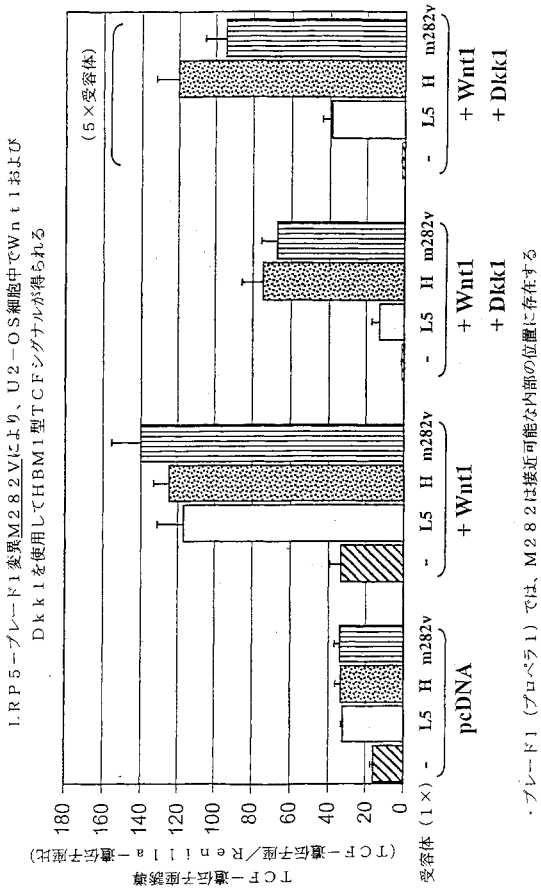
【図２９】



・G171F変異は、環状R基（F）変化に関与し、これによりHBM1変異G171Vよりもわずかにでは、TCF－遺伝子座を活性化する。

FIG. 29

【図３０】



・プレード1（プロペラ1）では、M282は接近可能な内部の位置に存在する
・プロペラ1～3中に保存されている

FIG. 30

【図３１】

遺伝子	Genbank アクセッション番号	Protein アクセッション番号
グラニュリン	M75161	AAA58617
cyc/Hisリッチタンパク質の類似物	BC004544	AAH04544
ＩＧＦ結合タンパク質６	M69054	AAA88070
潜在ＴＧＦｂ結合タンパク質４	AF051344	AAC39879
NOTCH 2	AF315356	AAG37073
フィブリン１	X53743	CAA37772
MDC15 (ADAM15)	U46005	AAC51112
DKFZp761G02121(ノッチ１Ｃａ＋＋結合様)	AL137311	CAB70690
コルジン	AF076612	AAC69835
フィブロネクチン１	U42594	AAD00019
ＭＧ５０（黒色腫関連抗原）	AF200348	AAF06354
未知（ノッチ４様）	AX068260	CAC27245
Slit 1	AB017167	BAA35184
トモレグリン（アガリン反復相同物）	AB004064	BAA90820
sprouty 1	AF041037	AAC39566
sprouty 2	AF039843	AAC04258
NOV1	X96584	CAA65403
アグリン	AF016903	AAC39776
フィブリリン１	L13923	AAB02036
トロンボスポンジン１	X04665	CAA28370
ADAM19	AF134707	AAF22162
Nafi alpha	AJ011895	CAA09855
ラミニンα５	Z95636	CAB09137
CRIM1	AF167706	AAF34409
ニドゲン	M30269	AAA59932
フィブリン－２	X82494	CAA57876
トロンボスポンジン２	L12350	AAA03703
KIAA1323	AB037744	BAA92561
フィブリリン－２	U03272	AAA18950
MEGF9	AB011542	BAA32470
インテグリンβ１	X07979	CAA30790
マトリリン２前駆体	U69263	AAC51260
テネイシン	X56160	A32160

FIG. 31

【図３２】

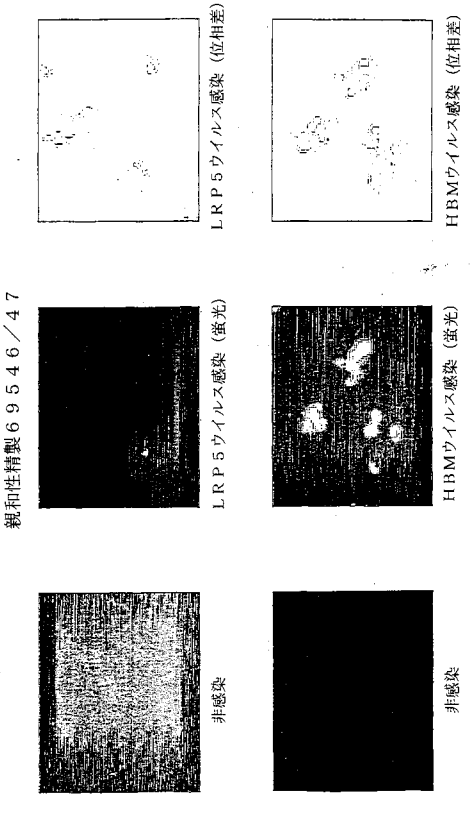


FIG. 32

【図３３】

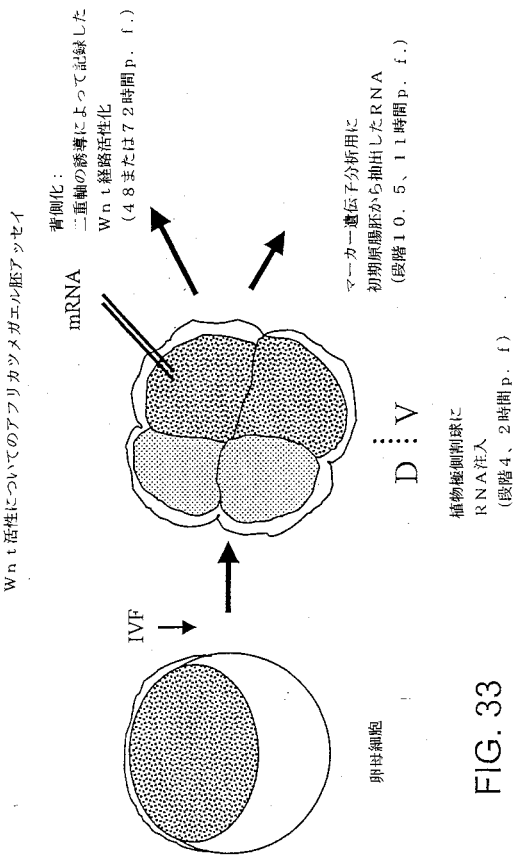


FIG. 33

【図３４】

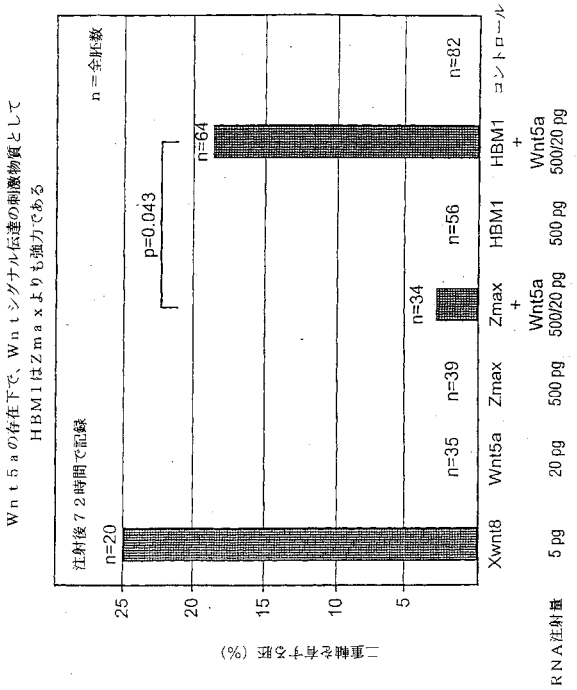


FIG. 34

【図３５】

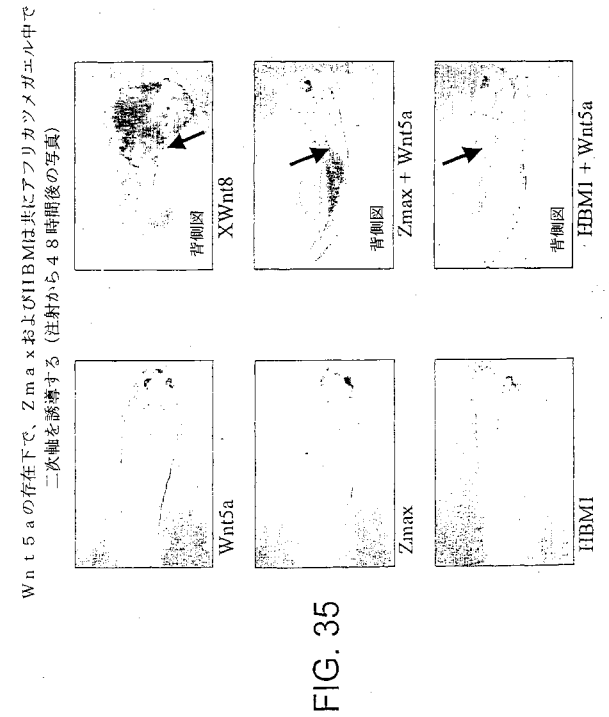


FIG. 35

【図３６】

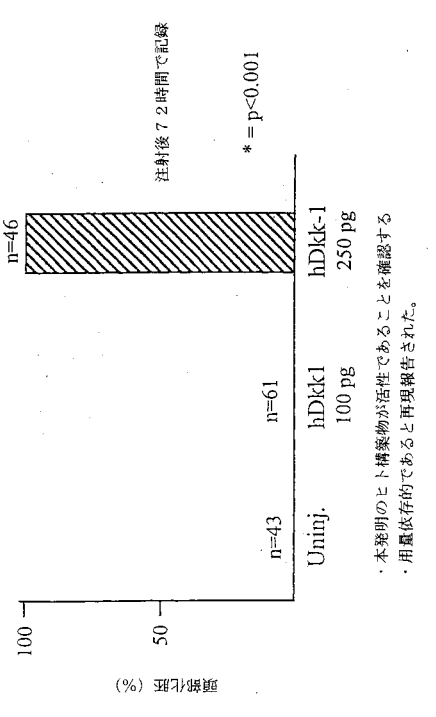


FIG. 36

【図３７】

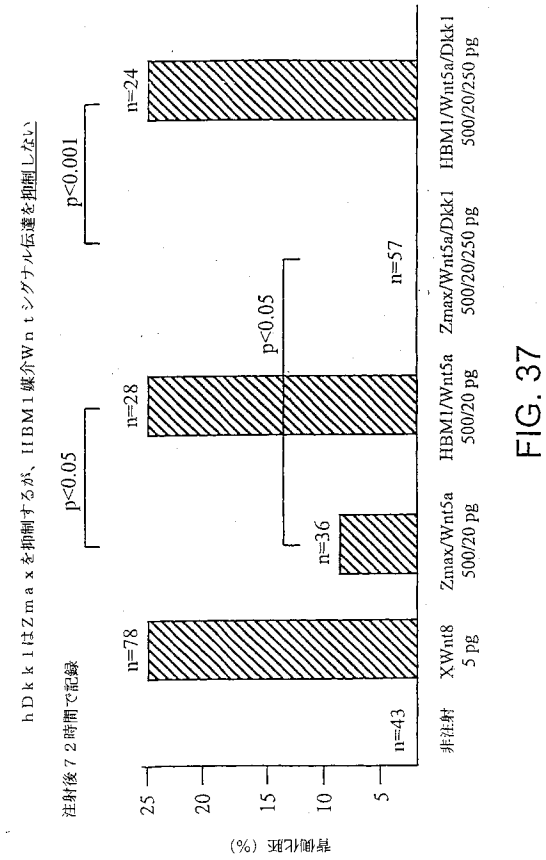


FIG. 37

【図３８】

zmaxLBD
1,4
スクリーンX
ペプチド
ライブラリー

ペプチド番号	ペプチド配列	ヒット数
9	VVLCSRCGRLWRWSCG	1
12	EVRQVTCIRCRRGFLL	1
13	GGGGMWEAWSCYACG	1
14	GWRWCGRCGALWWRRV	3

FIG. 38

【図３９Ａ】

ｐｃＤＮＡ３．１構築物名の後にＤＮＡ配列を示す。

OST258 (control for OST 259-OST262 and OST264,OST265)
AAGCTTGCCACCATGCAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTG
GGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGGATCC

OST259
AAGCTTGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTG
GGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGGATCCATGAGCGATAAAATTATTCACCTGA
CTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTC
GATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGAATTCCGTGGTTCTGTGTTCGCGTTG
TGGGCGTTTGTGGCGGTGGTCGTGTGGGACTAGTGGTCCGTGCAAAATGATCG
CCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACTGACCGTTGCA
AAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGG
TATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGG
GTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCGTAA
GCGGCCGC

OST260
AAGCTTGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTG
GGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGGATCCATGAGCGATAAAATTATTCACCTGA
CTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTC
GATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGAATTCCGGGTGGCGGTGGTGTGGTCG
GTGTGGGGCTTTGTGGTGGCGGCGTGTTACTAGTGGTCCGTGCAAAATGATCG
CCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACTGACCGTTGCA
AAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGG
TATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGG
GTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCGTAA
GCGGCCGC

OST261
AAGCTTGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTG
GGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGGATCCATGAGCGATAAAATTATTCACCTGA
CTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTC
GATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGAATTCCGAGGTGCGGCAGGTTACGTG
TATTAGGTGTCGTCGGGGTTTTCTGTTGACTAGTGGTCCGTGCAAAATGATCG
CCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACTGACCGTTGCA

FIG. 39A

【図３９Ｂ】

AAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGG
TATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGG
GTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCGTAA
GCGGCCGC

OST262
AAGCTTGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTG
GGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGGATCCATGAGCGATAAAATTATTCACCTGA
CTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTC
GATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGAATTCCGGTGGTGGGGGGATGATTTG
GGAGGCTTGGAGTTGTTATGCGTGTGGGACTAGTGGTCCGTGCAAAATGATCG
CCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACTGACCGTTGCA
AAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGG
TATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGG
GTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCGTAA
GCGGCCGC

OST263
AAGCTTGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTG
GGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGGATCCATGAGCGATAAAATTATTCACCTGA
CTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTC
GATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGAATTCCTTGTGGATTGGGCCGGGTGA
TCAGGGTCTGTTTCGGCGTTTTGTTTTTACTAGTGGTCCGTGCAAAATGATCG
CCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACTGACCGTTGCA
AAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGG
TATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGG
GTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCGTAA
GCGGCCGC

OST264
AAGCTTGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTG
GGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGGATCCGTGTCTTCTGATCAAAATCATTTCC
GAGGAGAAATTGAGGAAACCATCACTGAAAGCTTTGGTAATGATCATAGCACC
TTGGATGGGTATTCCAGAAGAACCACCTTGTCTTCAAAAATGTATCACACCAA
AGGACAAGAAGGTTCTGTTTGTCTCCGGTCATCAGACTGTGCCTCAGGATTGT
GTTGTGCTAGACACTTCTGGTCCAAGATCTGTAAACCTGTCCTGAAAGAAGGT
CAAGTGTGTACCAAGCATAGGAGAAAAGGCTCTCATGGACTAGAAATATTCCA
GCGTTGTTACTGTGGAGAAGGTCTGTCTTGCCGGATACAGAAAGATCACCATC
AAGCCAGTAATTCTTCTAGGCTTCACACTTGTCAGAGACACTAAGCGGCCGC

FIG. 39B

【図３９Ｃ】

OST265
AAGCTTGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTG
GGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGGATCCTGCGCTAGTCCCACCCGCGGAGGGG
ACGCGGGCCTGCAAATCTGTCTCGCCTGCAGGAAGCGCCGAAAACGCTGCATG
CGTCACGCTATGTGCTGCCCCGGGAATTACTGCAAAAATGGAATATGTGTGTC
TTCTGATCAAAATCATTTCCGAGGAGAAATTGAGGAAACCATCACTGAAAGCT
TTGGTAATGATCATAGCACCTTGGATGGGTATTCCAGAAGAACCACCTTGTCT
TCAAAAATGTATCACACCAAAGGACAAGAAGGTTCTGTTTGTCTCCGGTCATC
AGACTGTGCCTCAGGATTGTGTTGTGCTAGACACTTCTGGTCCAAGATCTGTA
AACCTGTCCTGAAAGAAGGTCAAGTGTGTACCAAGCATAGGAGAAAAGGCTCT
CATGGACTAGAAATATTCCAGCGTTGTTACTGTGGAGAAGGTCTGTCTTGCTA
AGCGGCCGC

OST266
AAGCTTGCCACCATGGGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGA
CACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGT
GGTGCGGTCCGAATTCCTATGCGTGGTTGTTTTCTTGTAGTAGGTGTAGGTGG
TGGTTGCCTTGGACTAGTGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGA
AATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACTGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATC
AAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTG
CTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGG
TCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCGTAAGCGGCCGC

OST267
AAGCTTGCCACCATGGGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGA
CACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGT
GGTGCGGTCCGAATTCCATTTGTGAGGTTGTGAGGTTGTGGAGTCGGTATCCT
TGGTCTTGGGTGACTAGTGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGA
AATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACTGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATC
AAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTG
CTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGG
TCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCGTAAGCGGCCGC

FIG. 39C

【図３９Ｄ】

OST268
AAGCTTGCCACCATGGGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGA
CACCGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGT
GGTGCGGTCCGAATTCCGGTTGTACTAGTGCGGTGTGGTGCTTGGGCTGAG
GCGGCTAGGTTTTATTGTACTAGTGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCT
GGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACTGACCGTTGCAAAACTGAACA
TCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACT
CTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTC
TAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCGTAAGCGGCCGC

OST269 (irrelevant control peptide for OST266-OST268)
AAGCTTGCCACCATGGGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGA
CACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGT
GGTGCGGTCCGAATTCCTTGTGGATTGGGCCGGGTGATCAGGGTCTGTTTCGG
CGTTTTGTTTTTACTAGTGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGA
AATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACTGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATC
AAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTG
CTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGG
TCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCGTAAGCGGCCGC

FIG. 39D

【図４０】

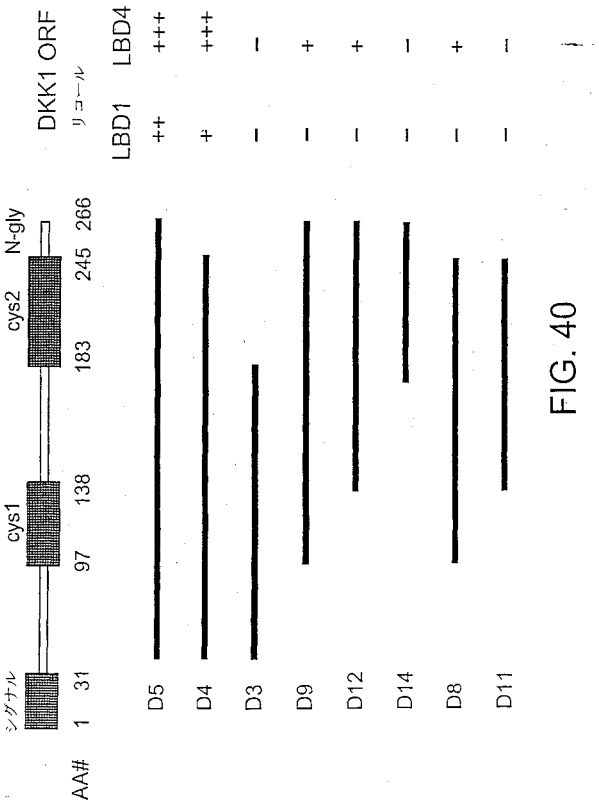


FIG. 40

【図４１】

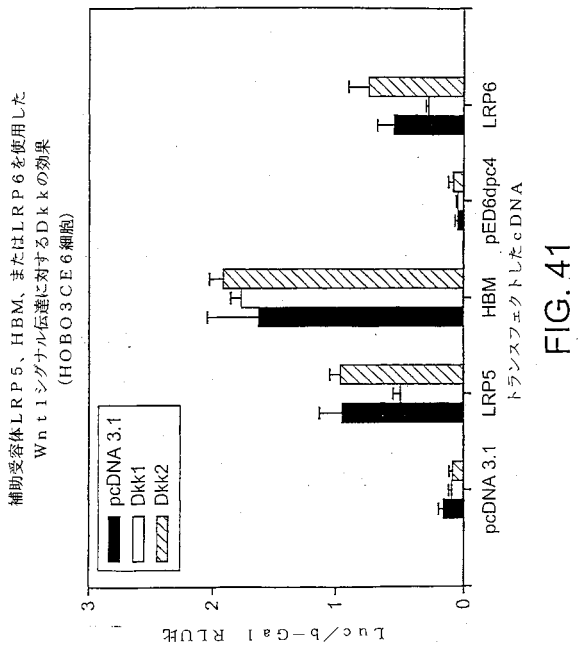


FIG. 41

【図４２】

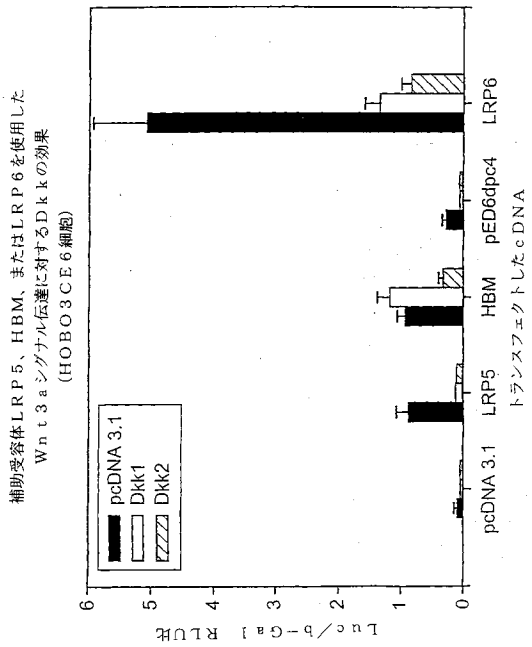


FIG. 42

【図４３】

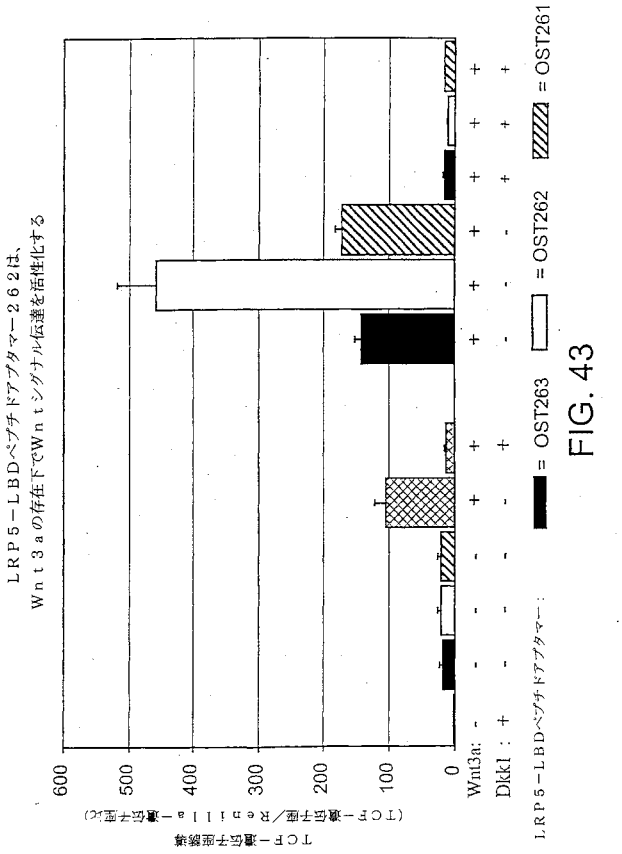


FIG. 43

【図４４Ａ】

付属書類１Ａ中のｐｃＤＮＡ３．１構築物に対応するアミノ酸配列を
以下に示す。

OST258
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGS

OST259
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSMSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWA
EWCGPNSVVLCSRCGRLWRWSCGTSGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNI
DQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA

OST260
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSMSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWA
EWCGPNSGWRWCGRCGALWWRRVTSGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNI
DQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA

OST261
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSMSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWA
EWCGPNSEVRQVTCIRCRRGFLLTSGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNI
DQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA

OST262
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSMSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWA
EWCGPNSGGGGMIWEAWSCYACGTSGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNI
DQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA

OST263
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSMSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWA
EWCGPNSLWIGPGDQGLFRRFVFTSGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNI
DQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA

OST264
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSVSSDQNHFRGEIEETITESFGNDHSTLDGY
SRRTTLSSKMYHTKGQEGSVCLRSSDCASGLCCARHFWSKICKPVLKEGQVCT
KHRRKGSHGLEIFQRCYCGEGLSCRIQKDHHQASNSSRLHTCQRH

FIG. 44A

【図４４Ｂ】

OST265
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSCASPTRGGDAGVQICLACRKRRKRCMRHAM
CCPGNYCKNGICVSSDQNHFRGEIEETITESFGNDHSTLDGYSRRTTLSSKMY
HTKGQEGSVCLRSSDCASGLCCARHFWSKICKPVLKEGQVCTKHRRKGSHGLE
IFQRCYCGEGLSC.

OST266
MGDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPNSYAWLFSCSRCRWWLPW
TSGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKN
GEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA

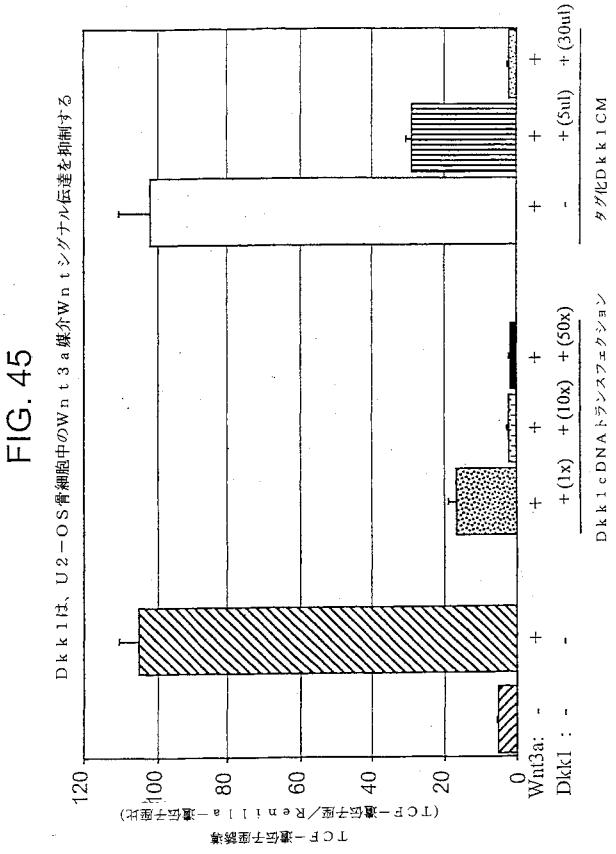
OST267
MGDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPNSICEVVRLWSRYPWSWV
TSGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKN
GEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA

OST268
MGDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPNSGCTSAVCGAWAEAGRF
YCTSGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLF
KNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA

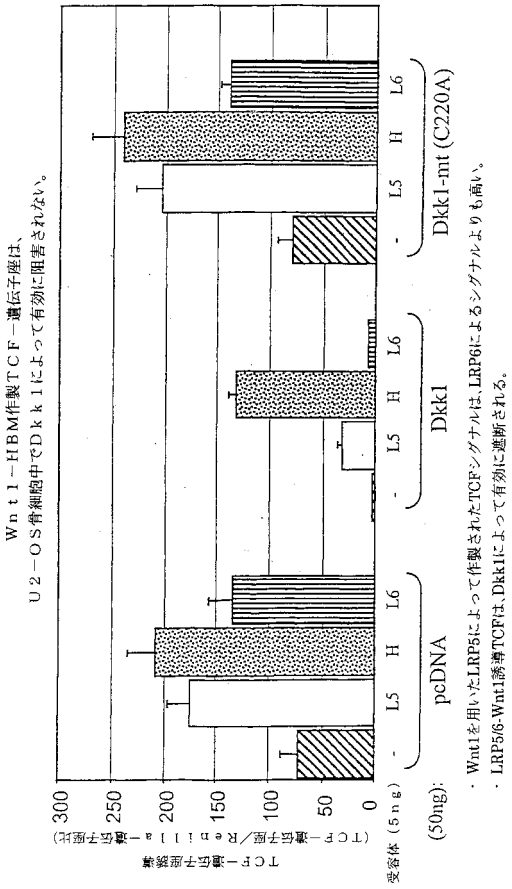
OST269
MGDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPNSLWIGPGDQGLFRRFVF
TSGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKN
GEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA

FIG. 44B

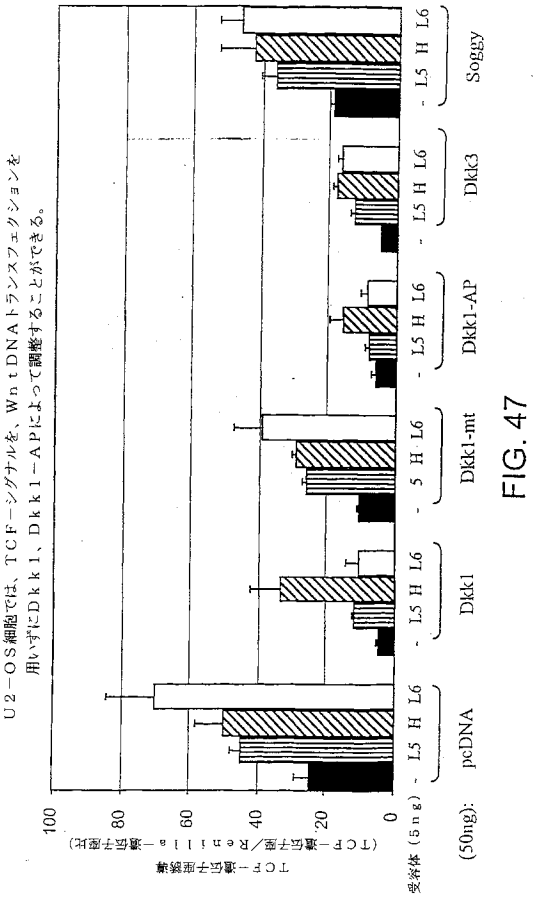
【図４５】



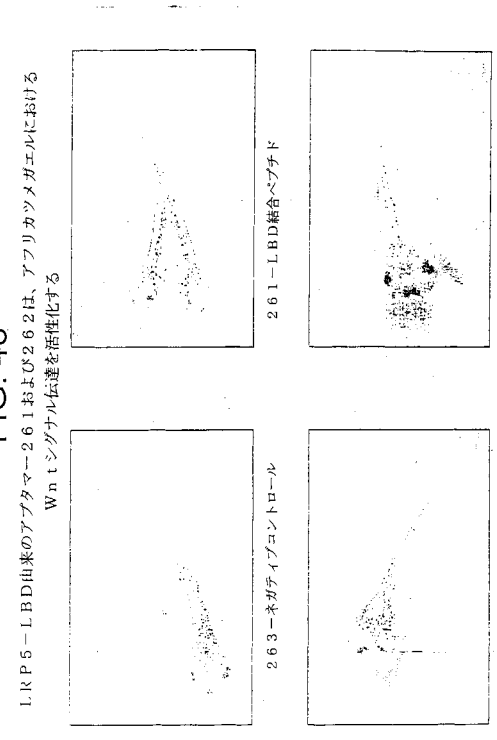
【図４６】



【図４７】

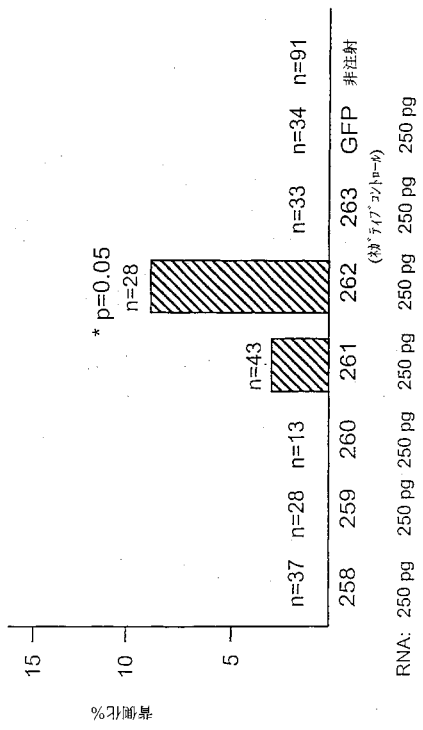


【図４８】



【図４９】

FIG. 49



【図５０】

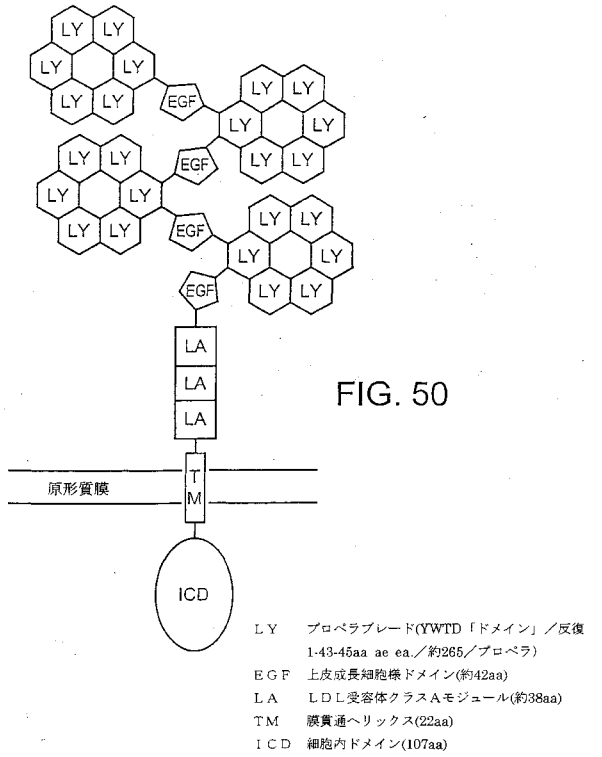


FIG. 50

【図５１Ａ】

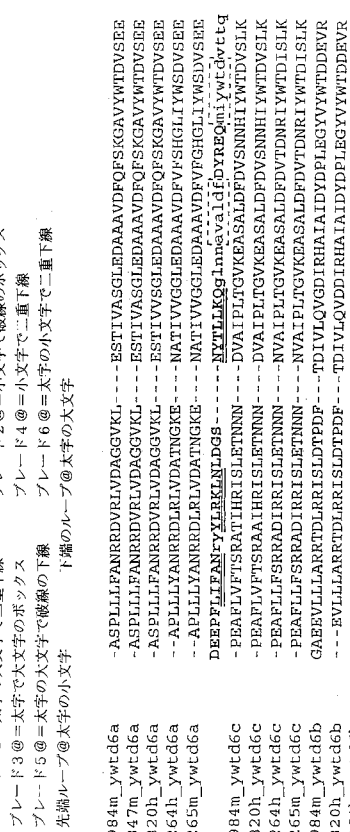


FIG. 51A

【図５１Ｂ】

FIG. 51B

【図51E】

```
PROB_H                  1134443310011112443321121122411012111111110021122111122245 77
PROB_E                  4431111379952212155652100011489632111124566321136664211011 1
PROB_C                  5545556421147786512224779987551135788887544457875333567764 22
AF064984m_ywtd6a        HACNKWTGEQRKEILSALYSPMDIQVLSQERQPPFHT
AF077847m_ywtd6a        HACNKWTGEQRKEILSALYSPMDIQVLSQERQPPFHT
AF077820h_ywtd6a        HACNKRTGGKRKEILSALYSPMDIQVLSQERQPFFHT
AF074264h_ywtd6a        LACNKYTGEGLREIHSDIFSPMDIHAFSQQRQPNA--
AF074265m_ywtd6a        LACNKYTGEGLREIHSNIFSPMDIHAFSQQRQPNA--
llpx                    nrahKTTGanktllistlhrPMDIHIYHPYR------
af064984m_ywtd6c        ERADKTSGRNRTLIQGHLDFVMDILVFHSSRQDGL--
af077820h_ywtd6c        ERADKTSGRNRTLIQGHLDFVMDILVFHSSRQDGL--
af074264h_ywtd6c        ERANKTSGQNRTIIQGHLDYVMDILVFHSSRQSG---
af074265m_ywtd6c        ERANKTSGQNRTIIQGHLDYVMDILVFHSSRQAG---
af064984m_ywtd6b        ERVHKVK-ASRDVIIDQLPDLMGLKAVNVAKVVGT--
af077820h_ywtd6b        ERVHKVK-ASRDVIIDQLPDLMGLKAVNVAKVVGT--
af074264h_ywtd6b        ERVHKRS-AEREVIIDQLPDLMGLKATNVHRVIG---
af074265m_ywtd6b        ERVHKRS-AEREVIIDQLPDLMGLKATSVHRVIG---
1ndx                    valdLAISketdafqphkqtrLYGITTALSQCP----
af064984m_ywtd6d        ERVEKTTGDKRTRVQGRVTHLTGIHAVEEVSLEEFSA
af077820h_ywtd6d        ERVEKTTGDKRTRIQGRVAHLTGIHAVEEVSLEEFSA
af074264h_ywtd6d        EKIDMTGREGRTKVQARIAQLSDIHAVKELNLQEYR-
af074265m_ywtd6d        EKIDMTGREGRTKVQARIAQLSDIHAVKELNLQEYR-
DSC_SEC                 HHHCCCCCCCCCEEEEECCCCCCEEEEECCCCCCCCCC
PROB_H                  7664422112321122322221111123322111101
PROB_E                  1211121001368864322122566663321221111
PROB_C                  2235567997421124466767433324467778898
```

FIG. 51E

【図51C】

```
af074265m_ywtd6d        SIRKAHEDGGQGFNVVANSVANQNLEIQPYDLSIDIYSRYIYWTCEATNVIDVTRLDGRS
DSC_SEC                 HHHHEEECCCC----CCCEEEEEECCCCCCCEEEEECCCCEEEECCCCCEEEEEECCCCC
PROB_H                  99953211111----113100001111111110013322200011111100002211 2
PROB_E                  00135652111----123799996421111257965323367751100169999630001
PROB_C                  11022247888----874211113578888743132465543348899831111259997

AF064984m_ywtd6a        RKVLFWQDLDQPRAIALDPAHGYMYWTDWG-EAPRIERAGMDGSTRKIIVDSDIYWPNGL
AF077847m_ywtd6a        RKVLFWQDLDQPRAIALDPAHGYMYWTDWG-EAPRIERAGMDGSTRKIIVDSDIYWPNGL
AF077820h_ywtd6a        RKVLFWQDLDQPRAIALDPAHGYMYWTDWG-ETPRIERAGMDGSTRKIIVDSDIYWPNGL
AF074264h_ywtd6a        RKVLFWQELDQPRAIALDPSSGFMYWTDWG-EVPKIERAGMDGSSRFIIINSEIYWPNGL
AF074265m_ywtd6a        RKVLFWQELDQPRAIALDPSSGFMYWTDWG-EVPKIERAGMDGSSRFVIINTEIYWPNGL
llpx                    RTVLVNsglrePRALVVDVQNGYLYWTDwg-dhsLIGKIGMDGTNRSVIVdtkitwPNGL
af064984m_ywtd6c        RQVLVWRDLDNPRSLALDPTKGYIYWTEWG-GKPRIVRAFMDGTNCMTLVD-KVGRANDL
af077820h_ywtd6c        RQVLVWRDLDNPRSLALDPTKGYIYWTEWG-GKPRIVRAFMDGTNCMTLVD-KVGRANDL
af074264h_ywtd6c        RQVLVWKDLDSPRALALDPAEGFMYWTEWG-GKPKIDRAAMDGSERTTLVP-NVGRANGL
af074265m_ywtd6c        RQVLVWKDLDSPRALALDPAEGFMYWTEWG-GKPKIDRAAMDGSERTTLVP-NVGRANGL
af064984m_ywtd6b        RKILVSEDLDEPRAIVLHPVMGLMYWTDWG-ENPKIECANLDGRDRHVLVNTSLGWPNGL
af077820h_ywtd6b        RKILVSEDLDEPRAIALHPVMGLMYWTDWG-ENPKIECANLDGQERRVLVNASLGWPNGL
af074264h_ywtd6b        RKILISEDLEEPRAIVLDPMVGYMYWTDWG-EIPKIERAALDGSDRVVLVNTSLGWPNGL
af074265m_ywtd6b        RKILISEDLEEPRAIVLDPMVGYMYWTDWG-EIPKIERAALDGSDRVVLVNTSLGWPNGL
1ndx                    RRVLfetdlvnPRGIVTDSVRGNLYWTDwnrdnpKIETSYMDGTNRRILVqddlglPNGL
af064984m_ywtd6d        MGVVLRGDRDKPRAIAVNAERGYMYFTNMQDHAAKIERASLDGTEREVLFTTGLIRPVAL
af077820h_ywtd6d        MGVVLRGDRDKPRAIVVNAERGYLYFTNMQDRAAKIERAALDGTEREVLFTTGLIRPVAL
af074264h_ywtd6d        VGVVLKGEQDRPRAIVVNPEKGYMYFTNLQERSPKIERAALDGTEREVLFFSGLSKPIAL
```

FIG. 51C

【図52】

側鎖相互作用に対する機能的変異の効果の可能性

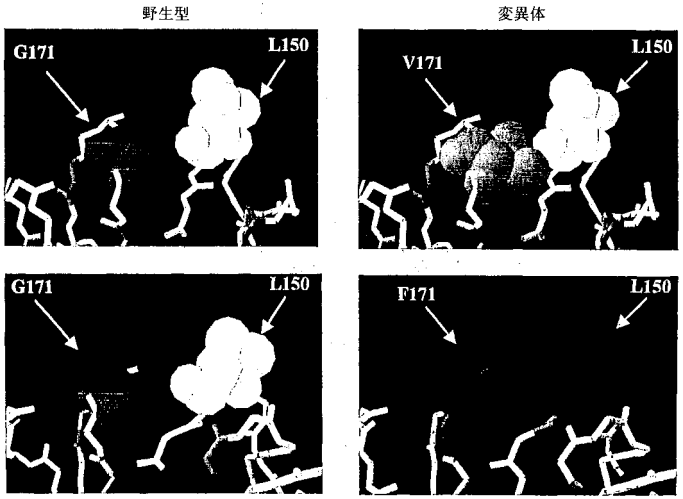


FIG. 52

【図51D】

```
af074265m_ywtd6d        VGVVLKGEQDRPRAIVVNPEKGYMYFTNLQERSPKIERAALDGTEREVLFFSGLSKPIAL
DSC_SEC                 CEEEEECCCCCCCCCEEECCCCCEEEEECCC-CCCHHHHHCCCCCCEEEEEECCCCCCCCC
PROB_H                  3311024332134411112211100011 11-1125475642111220000000001111 2
PROB_E                  3599961110011176511001599962 00-0012323211000149999822211112 3
PROB_C                  4200125668965523487898411137 99-9973312257999741111288898887 5
AF064984m_ywtd6a        TIDLEEQKLYWADAKLSFIHRANLDGSFRQKVVEGSLTHPFALTLSGDTLYWTDWQTRSI
AF077847m_ywtd6a        TIDLEEQKLYWADAKLSFIHHANLDGSFRQKVVEGSLTHPFALTLSGDTLYWTDWQTRSI
AF077820h_ywtd6a        TIDLEEQKLYWADAKLSFIHRANLDGSFRQKVVEGSLTHPFALTLSGDTLYWTDWQTRSI
AF074264h_ywtd6a        TLDYEEQKLYWADAKLNFIHKSNLDGTNRQAVVKGSLPHPFALTLFEDILYWTDWSTHSI
AF074265m_ywtd6a        TLDYQERKLYWADAKLNFIHKSNLDGTNRQAVVKGSLPHPFALTLFEDTLYWTDWNTHSI
llpx                    TLDYINSRIYWADaredYIEFASLDGSNRHTVLSqdiphifaltlFEDyiywtdwetksi
af064984m_ywtd6c        TIDYADQRLYWTDLDTNMIESSNMLGQER-MVIADDLPYPFGLTQYSDYIYWTDWNLHSI
af077820h_ywtd6c        TIDYADQRLYWTDLDTNMIESSNMLGQER-VVIADDLPHPFGLTQYSDYIYWTDWNLHSI
af074264h_ywtd6c        TIDYAKRRLYWTDLDTNLIESSNMLGLNR-EVIADDLPHPFGLTQYQDYIYWTDWSRRSI
af074265m_ywtd6c        TIDYAKRRLYWTDLDTNLIESSDMLGLNR-EVIADDLPHPFGLTQYQDYIYWTDWSRRSI
af064984m_ywtd6b        ALDLQEGKLYWGDAKTDKIEVINIDGTKRKTLLEDKLPHIFGFTLLGDFIYWTDWQRRSI
af077820h_ywtd6b        ALDLQEGKLYWGDAKTDKIEVINVDGTKRRTLLEDKLPHIFGFTLLGDFIYWTDWQRRSI
af074264h_ywtd6b        ALDYDEGKIYWGDAKTDKIEVMNTDGTGRRVLVEDKIPHIFGFTLLGDYVYWTDWQRRSI
af074265m_ywtd6b        ALDYDEGTIYWGDAKTDKIEVMNTDGTGRRVLVEDKIPHIFGFTLLGDYVYWTDWQRRSI
1ndx                    HFDAFSSQLCWVDagtnRAECLNPSQPSRRKALeg-lqypfavtSYGKnlyftdwkmngv
af064984m_ywtd6d        VVDNALGKLFWVDADLKRIESCDLSGANRLTLEDANIVQPVGLTVLGRHLYWIDRQQQMI
af077820h_ywtd6d        VVDNTLGKLFWVDADLKRIESCDLSGANRLTLEDANIVQPLGLTILGKHLYWIDRQQQMI
af074264h_ywtd6d        ALDSRLGKLFWADSDLRRIESSDLSGANRIVLEDSNILQPVGLTVFENWLYWIDKQQQMI
af074265m_ywtd6d        ALDSKLGKLFWADSDLRRIESSDLSGANRIVLEDSNILQPVGLTVFENWLYWIDKQQQMI
DSC_SEC                 CCCCCCCCEEEECCCCCEEEEECCCCCCCCCEEECCCCCCCCCEEECCCCCEEECCCCCHHH
```

FIG. 51D

【図５３Ａ】

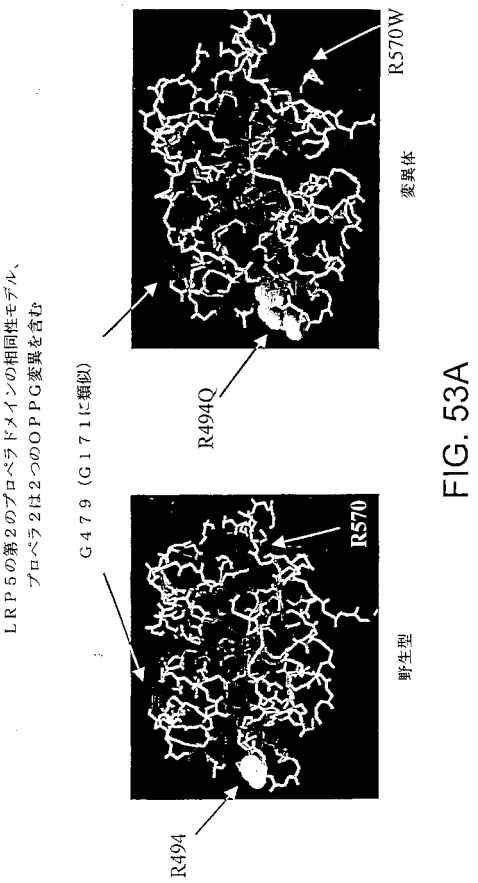


FIG. 53A

【図５３Ｂ】

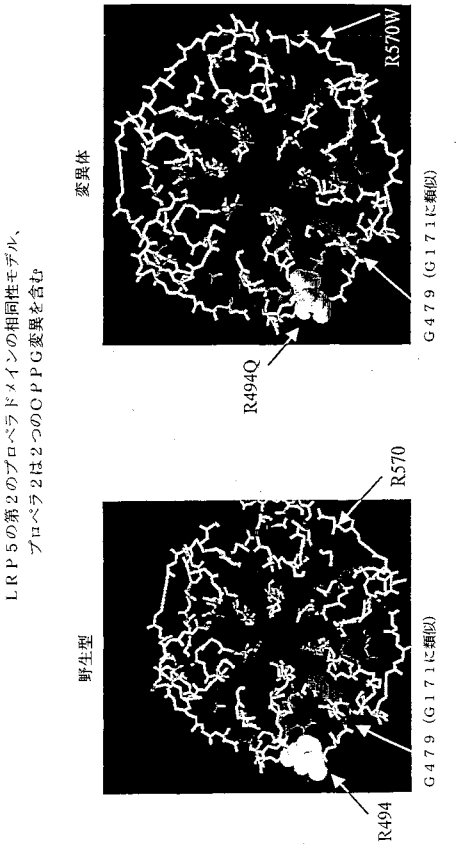


FIG. 53B

【図５３Ｃ】

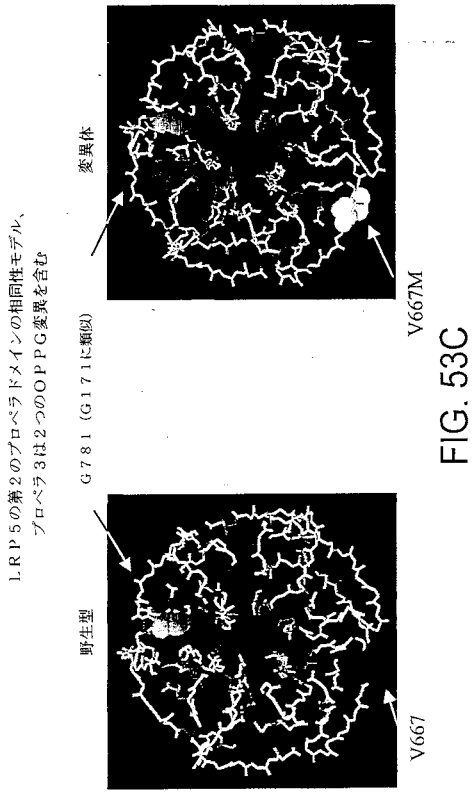


FIG. 53C

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/00	101	4C085
C07K	*16/22*	*(2006.01)*	C07K	16/22		4H045
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/46		
A01K	*67/027*	*(2006.01)*	A01K	67/027		
C12Q	*1/02*	*(2006.01)*	C12N	5/00	102	
C12Q	*1/68*	*(2006.01)*	C12Q	1/02		
C12Q	*1/66*	*(2006.01)*	C12Q	1/68	A	
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	C12Q	1/66		
A61K	*45/00*	*(2006.01)*	A61K	39/395	D	
A61P	*3/14*	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61P	*5/18*	*(2006.01)*	A61K	45/00		
A61P	*5/14*	*(2006.01)*	A61P	3/14		
A61P	*19/10*	*(2006.01)*	A61P	5/18		
A61P	*19/08*	*(2006.01)*	A61P	5/14		
G01N	*33/531*	*(2006.01)*	A61P	19/10		
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	A61P	19/08		
G01N	*33/532*	*(2006.01)*	G01N	33/531	A	
G01N	*33/577*	*(2006.01)*	G01N	33/53	D	
G01N	*33/50*	*(2006.01)*	G01N	33/532	A	
G01N	*33/15*	*(2006.01)*	G01N	33/577	B	
			G01N	33/53	M	
			G01N	33/50	Z	
			G01N	33/15	Z	

(31)優先権主張番号　60/361,293
(32)優先日　平成14年3月4日(2002.3.4)
(33)優先権主張国　米国(US)

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．宅急便
２．ＵＮＩＸ
３．サランラップ

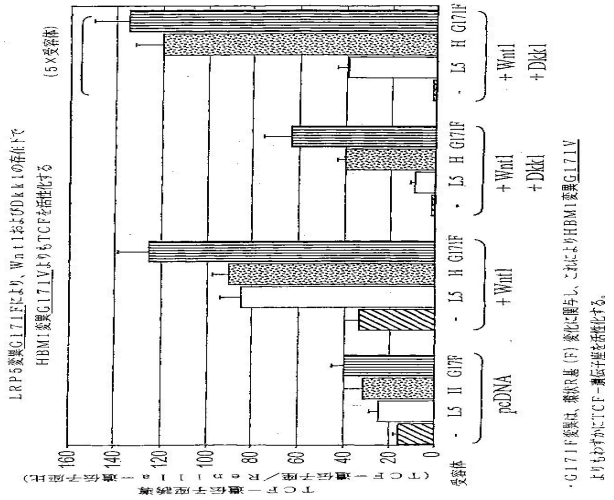
(74)代理人　100107319
弁理士　松島　鉄男
(72)発明者　アレン，クリスティーナ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１７４８－３１０８，ホプキントン，オリヴァー・レイン　１１
(72)発明者　アニソウィッツ，アンソニー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４６５，ウェスト・ニュートン，アッパム・ストリート　５０
(72)発明者　グレアム，ジェイムズ・アール
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４７６，アーリントン，ペアース・ストリート　４０
(72)発明者　モラレス，アルトゥーロ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４７６，アーリントン，シーダー・アヴェニュー　２３０
(72)発明者　ヤウォースキー，ポール・ジェイ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２３７０，ロックランド，ホバート・レイン　１３

(72)発明者　リウ，ウェイ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１７７６，サドベリー，ブラックマー・ロード　７３

Ｆターム(参考) 2G045 AA13 AA25 AA29 AA34 AA35 BA14 BB20 BB22 BB24 CA26
CB01 CB13 CB17 DA13 DA14 DA36 DA60 DA70 DA77 FA16
FA20 FA27 FB01 FB02 FB03 FB07 FB09 FB12 FB13 FB14
FB16 GC06 GC15
4B024 AA11 BA03 CA02 CA12 DA02 DA03 DA06 DA12 EA04 GA11
HA14
4B063 QA18 QQ08 QQ52 QQ79 QR36 QR48 QR56 QR77 QS34 QS38
QX01
4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA46
4C084 AA17 MA17 MA23 MA24 MA35 MA38 MA52 MA57 MA63 MA66
NA14 ZA96 ZA97 ZC06 ZC08 ZC21
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 CC32 DD88 EE01 GG02 GG03 GG04
GG06 GG08 GG10
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA31 EA20 EA50
FA72 FA74

专利名称(译)	调节骨量和脂质水平的hbm变体		
公开(公告)号	JP2011004744A	公开(公告)日	2011-01-13
申请号	JP2010146427	申请日	2010-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	奥什进入制药公司 惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	Oshiento医药有限公司 魏斯，LLC		
[标]发明人	アレンクリスティーナ アニソウィッツアンソニー グレアムジェイムズアール モラレスアルトゥーロ ヤウォースキーポールジェイ リウウェイ		
发明人	アレン,クリスティーナ アニソウィッツ,アンソニー グレアム,ジェイムズ·アール モラレス,アルトゥーロ ヤウォースキー,ポール·ジェイ リウ,ウェイ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/51 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/22 C07K16/46 A01K67/027 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/66 A61K39/395 A61K45/00 A61P3/14 A61P5/18 A61P5/14 A61P19/10 A61P19/08 G01N33/531 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/577 G01N33/50 G01N33/15 A61K35/00 A61K38/00 A61P3/00 A61P19/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/12 C12N15/85 C12P21/08 G01N33/566			
CPC分类号	A01K67/0276 A01K67/0278 A01K2207/15 A01K2217/00 A01K2217/05 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2227/50 A01K2267/02 A01K2267/03 A01K2267/0362 A61K38/00 A61P3/00 A61P3/14 A61P5/14 A61P5/18 A61P9/00 A61P19/00 A61P19/08 A61P19/10 C07K14/51 C07K16/18 C12N15/8509 C12N2800/30 C12N2800/60 C12N2830/00 C12N2830/008 C12N2830/30 C12N2840/105 C12N2840/203 G01N2333/51 G01N2500/00			
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/51 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C07K16/22 C07K16/46 A01K67/027 C12N5/00.102 C12Q1/02 C12Q1/68.A C12Q1/66 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P3/14 A61P5/18 A61P5/14 A61P19/10 A61P19/08 G01N33/531.A G01N33/53.D G01N33/532.A G01N33/577.B G01N33/53.M G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/85.P C12N15/85.Z C12N5/10			
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BA14 2G045/BB20 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB13 2G045/CB17 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA60 2G045/DA70 2G045/DA77 2G045/FA16 2G045/FA20 2G045/FA27 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB09 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB14 2G045/FB16 2G045/GC06 2G045/GC15 4B024/AA11 4B024/BA03 4B024/CA02 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR77 4B063/QS34 4B063/QS38 4B063/QX01 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/MA17 4C084/MA23 4C084/MA24 4C084/MA35 4C084/MA38 4C084/MA52 4C084/MA57 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA96 4C084/ZA97 4C084/ZC06 4C084/ZC08 4C084/ZC21 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/CC32 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085			

	/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA31 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74
优先权	60/290071 2001-05-11 US 60/291311 2001-05-17 US 60/353058 2002-02-01 US 60/361293 2002-03-04 US
外部链接	Espacenet

摘要(译)

种类代码：A1用于在动物细胞和转基因动物以及表达HBM样多肽的转基因动物中表达HBM，LRP5或LRP6衍生的HBM样多肽的方法和材料。 核酸，蛋白质，克隆载体，表达载体，含有特定编码序列的转化宿主，寡核苷酸引物和探针。 用于开发药物组合物的方法，用于识别与骨骼发育有关的分子的方法以及用于诊断和治疗与骨骼发育和脂质调节有关的疾病的方法。 在一个优选的实施方案中，是治疗，诊断和预防骨质疏松症的方法。 [选择图]图29