

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-534504

(P2004-534504A)

(43) 公表日 平成16年11月18日(2004.11.18)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/711	A 6 1 K 31/711	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
		4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 151 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-536336 (P2002-536336)	(71) 出願人	300008988
(86) (22) 出願日	平成13年4月4日 (2001. 4. 4)		アメリカ合衆国
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月18日 (2003. 4. 18)		アメリカ合衆国 メリーランド 2085
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/010981		2-3804, ロックビル, エグゼキュー
(87) 国際公開番号	W02002/032955		ティブ プールバード 6011, スイ
(87) 国際公開日	平成14年4月25日 (2002. 4. 25)		ート 325, オフィス オブ テクノロジ
(31) 優先権主張番号	60/241, 510		ー トランスファー, ナショナル イン
(32) 優先日	平成12年10月18日 (2000. 10. 18)		スティチューツ オブ ヘルス
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100108774
			弁理士 橋本 一憲
		(72) 発明者	ネルソン ローレンス エム.
			アメリカ合衆国 バージニア州 パーク
			ミルゲイト プレイス 9513
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生殖能力に不可欠なヒト遺伝子

(57) 【要約】

本明細書において、生殖能力に不可欠な新規核酸およびタンパク質配列が開示される。特に、ヒト M a t e r c D N A およびタンパク質が提供される。機能的な M A T E R は女性の生殖能力に必要であり、M a t e r 又ル卵母細胞から生ずる接合体は2細胞期を超えて進行することはできない。M a t e r 分子を不妊症および生殖能力低下の診断、予知、および治療に使用するための方法が記載される。M A T E R を避妊薬として用いる方法もまた提供されている。本開示はまた、そのような方法に関係する化合物、およびそのような化合物の同定についても記載する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離ヒトMATERタンパク質であって、

- (a) 配列番号：2；
- (b) 配列番号：4；
- (c) 配列番号：24；
- (d) (a)、(b)、または(c)と65%の配列同一性を有する配列；または
- (e) (a)、(b)、または(c)の保存的変種

に記載のアミノ酸配列の少なくとも一つを含み、

該ヒトMATERタンパク質がMaterial表現型を補完することができる、単離ヒトMATERタンパク質。 10

【請求項 2】

タンパク質が自己免疫性不妊症と関連する自己抗原である、請求項1記載のタンパク質。

【請求項 3】

タンパク質が卵母細胞の細胞質で発現する、請求項1記載のタンパク質。

【請求項 4】

配列番号：2および4に記載のアミノ酸配列を含む、請求項1記載の単離ヒトMATERタンパク質。

【請求項 5】

配列番号：24に記載のアミノ酸配列を含む、請求項1記載の単離ヒトMATERタンパク質。 20

【請求項 6】

配列番号：2、配列番号：4、または配列番号：24と75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1記載の単離ヒトMATERタンパク質。

【請求項 7】

配列番号：2、配列番号：4、または配列番号：24と85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1記載の単離ヒトMATERタンパク質。

【請求項 8】

配列番号：2、配列番号：4、または配列番号：24と95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1記載の単離ヒトMATERタンパク質。 30

【請求項 9】

配列番号：24に記載のアミノ酸配列を含む、単離ヒトMATERタンパク質。

【請求項 10】

請求項1記載のタンパク質をコードする単離核酸分子。

【請求項 11】

請求項10記載の単離核酸分子であって、

- (a) 配列番号：1；
 - (b) 配列番号：3；
 - (c) 配列番号：23；または
 - (d) (a)、(b)、または(c)と少なくとも82%の配列同一性を有する配列
- に記載のヌクレオチド配列を含む、単離核酸分子。 40

【請求項 12】

配列番号：1および3に記載のヌクレオチド配列を含む、請求項10記載の単離核酸分子。

【請求項 13】

配列番号：23に記載のヌクレオチド配列を含む、請求項10記載の単離核酸分子。

【請求項 14】

配列番号：1、配列番号：3、または配列番号：23と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項10記載の単離核酸分子。

【請求項 15】

配列番号：1、配列番号：3、または配列番号：23と少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項10記載の単離核酸分子。

【請求項16】

請求項11記載の核酸分子に機能的に連結したプロモーター配列を含む、組換え核酸分子。

【請求項17】

請求項12記載の組換え核酸分子により形質転換した細胞。

【請求項18】

異常Mater核酸または異常MATER発現またはMATERに対する自己免疫反応と関連した生物学的状態を被検者において検出する方法であって、被検者が異常Mater核酸または異常Mater発現またはMATERに対する自己免疫反応を有するかどうかを判定することを含む方法。 10

【請求項19】

女性の不妊症の原因を評価する、請求項18記載の方法。

【請求項20】

異常Mater核酸または異常Mater発現が、正常レベルと比較した場合にMater核酸またはMATERタンパク質の細胞レベルの変化を含む、請求項18記載の方法。

【請求項21】

生物学的状態が、不妊症もしくは生殖能力低下、または不妊症もしくは生殖能力低下に対する感受性の増加を含む、請求項19記載の方法。 20

【請求項22】

不妊症が自己免疫性不妊症を含む、請求項21記載の方法。

【請求項23】

被検者がMATERタンパク質のエピトープを認識する循環自己抗体を有するかどうかを判定することを含み、そのような自己抗体の存在が、該被検者における不妊症もしくは生殖能力低下、または不妊症もしくは生殖能力低下に対する感受性の増加を示す、請求項21記載の方法。

【請求項24】

異常なMater発現が、被検者において増加したMater発現または減少したMater発現を含む、請求項18記載の方法。 30

【請求項25】

被検者の臨床試料に含まれる少なくとも一つのMater分子を、Mater特異的結合因子を有する試薬と反応させ、Mater：因子複合体を形成させることを含む、請求項18記載の方法。

【請求項26】

Mater分子が、MATERをコードする核酸またはMATERタンパク質である、請求項25記載の方法。

【請求項27】

Mater特異的結合因子が、MaterオリゴヌクレオチドまたはMATERタンパク質特異的結合因子である、請求項25記載の方法。 40

【請求項28】

試料が生殖細胞を含む、請求項25記載の方法。

【請求項29】

不妊症または生殖能力低下の素因を検出するため、または不妊症もしくは生殖能力低下に対する個体の前症状をスクリーニングするために使用される、請求項18記載の方法。

【請求項30】

異常Mater核酸を検出する前に、Mater核酸をインビトロ増幅することをさらに含む、請求項18記載の方法。

【請求項31】

Mater核酸が、MATERタンパク質コード配列由来の少なくとも一つのオリゴヌク 50

レオチド・プライマーによってインビトロ増幅される、請求項 18 記載の方法。

【請求項 32】

少なくとも一つのオリゴヌクレオチド・プライマーが、配列番号：1、配列番号：3、または配列番号：23 に由来する、少なくとも 23 個の連続したヌクレオチドを含む、請求項 31 記載の方法。

【請求項 33】

請求項 32 記載の方法において使用されるオリゴヌクレオチド・プライマー。

【請求項 34】

請求項 33 記載のオリゴヌクレオチド・プライマーを含む、組換え DNA ベクター。

【請求項 35】

請求項 33 記載のオリゴヌクレオチド・プライマー配列に機能的に連結したプロモーター配列を含む、組換え核酸分子。

【請求項 36】

核酸配列がプロモーター配列に対してアンチセンス方向にある、請求項 35 記載の組換え核酸分子。

【請求項 37】

請求項 35 記載の組換え核酸分子により形質転換した細胞。

【請求項 38】

請求項 36 記載の組換え核酸分子を含む、非ヒト・トランスジェニック動物。

【請求項 39】

M a t e r 分子が M A T E R コード配列である、請求項 26 記載の方法。

【請求項 40】

M a t e r : 因子複合体がヌクレオチド・ハイブリダイゼーションにより検出される、請求項 39 記載の方法。

【請求項 41】

因子が標識化ヌクレオチド・プローブである、請求項 39 記載の方法。

【請求項 42】

ヌクレオチド・プローブが、

(a) 配列番号：1；

(b) 配列番号：3；

(c) 配列番号：23；

(d) (a)、(b)、または (c) と少なくとも 82% の配列同一性を有する核酸配列；および

(e) 長さが少なくとも 23 ヌクレオチドである、(a)、(b)、または (c) の断片

からなる群より選択される配列を有する、請求項 41 記載の方法。

【請求項 43】

請求項 41 記載の方法において使用されるヌクレオチド・プローブ。

【請求項 44】

M a t e r 分子が M A T E R タンパク質である、請求項 26 記載の方法。

【請求項 45】

複合体がウエスタンブロット・アッセイ法により検出される、請求項 44 記載の方法。

【請求項 46】

ウエスタンブロット・アッセイ法において、M A T E R タンパク質の C 末端ペプチドに対して生成された抗体が使用される、請求項 45 記載の方法。

【請求項 47】

複合体が E L I S A により検出される、請求項 44 記載の方法。

【請求項 48】

M A T E R タンパク質が、

(a) 配列番号：2；

10

20

30

40

50

- (b) 配列番号：4；
(c) 配列番号：24；
(d) (a)、(b)、または(c)と少なくとも65%の配列同一性を有するアミノ酸配列；および
(e) (a)、(b)、または(c)の保存的変種
からなる群より選択される配列を含む、請求項44記載の方法。

【請求項49】

MATER特異的結合因子が、MATER特異的抗体またはその機能的断片である、請求項46記載の方法。

【請求項50】

因子が抗体である請求項49記載の因子。

【請求項51】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項50記載の抗体。

【請求項52】

配列番号：2、配列番号：4、またはそれらの抗原断片の配列を含むペプチドを認識する、請求項41記載の抗体。

【請求項53】

MATERタンパク質特異的結合因子を含む、請求項44記載の方法を用いて被検者におけるMATERタンパク質の過剰または欠乏を検出するキット。

【請求項54】

因子が、

- (a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列；
(b) 配列番号：4に記載のアミノ酸配列；
(c) 配列番号：24に記載のアミノ酸配列；
(d) (a)、(b)、または(c)に記載される配列と、一つまたは複数の保存的アミノ酸置換により異なるアミノ酸配列；
(e) (a)、(b)、または(c)に記載される配列と、少なくとも65%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または
(f) (a)、(b)、(c)、(d)または(e)の抗原断片、
の中のエピトープと特異的に結合することのできる、請求項53記載のキット。

【請求項55】

MATERタンパク質結合因子とMATERポリペプチドとの結合を検出する方法をさらに含む、請求項53記載のキット。

【請求項56】

被検者が哺乳動物である、請求項53記載のキット。

【請求項57】

哺乳動物がヒトまたはマウスである、請求項56記載のキット。

【請求項58】

前記過剰または欠乏が不妊症の変化を引き起こす、請求項53記載のキット。

【請求項59】

MATERタンパク質結合因子が抗体である、請求項43記載のキット。

【請求項60】

核酸試料中の遺伝子突然変異を検出するキットであって、

- (a) Mater核酸と特異的にハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドを含む第一の容器；および、
(b) 該オリゴヌクレオチドと完全相補的な、蛍光標識核酸プローブを含む第二の容器を含むキット。

【請求項61】

蛍光標識核酸プローブの長さが5ヌクレオチドから500ヌクレオチドである、請求項60記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 6 2】

被検者由来の組織試料および/または体液試料中のM A T E Rタンパク質の欠乏を検出することにより、被検者が異常なM a t e r発現と関連する生物学的状態を有するか否かを判定するキットであって、

M A T E Rタンパク質に特異的な抗体を含む容器；および

試料中のM A T E Rタンパク質の存在を検出する方法を実行する段階と、

該方法によって生成されるデータを解析する段階と

を示す、キットを使用する手引書

を含み、

該手引書により、試料中のM A T E Rタンパク質の欠乏が個体が生物学的状態を有するかまたはその素因を有することを示すことが示されるキット。 10

【請求項 6 3】

M A T E Rタンパク質特異的な抗体に結合する検出可能な抗体を含む容器をさらに含む、請求項 6 2 記載のキット。

【請求項 6 4】

被検者が異常M a t e r発現と関連した生物学的状態を有しているか否かを判定するインビトロアッセイキットであって、

M A T E Rタンパク質特異的な抗体を含む容器；

陰性対照試料を含む容器；および

被検者の組織試料および/または体液試料中のM A T E Rタンパク質の量を検出する試験アッセイ法を行う段階と、 20

陰性対照試料中のM A T E Rタンパク質の量を検出する、陰性対照アッセイ法を行う段階と、

試験アッセイ法および陰性対照アッセイ法によって生成されるデータを比較する段階と

を示す、キットを使用する手引書

を含み、

該手引書により、試験試料中のM A T E Rタンパク質の量が陰性対照試料中のM A T E Rタンパク質の量より少ないことが被検者が該生物学的状態を有することを示すことが示されるキット。 30

【請求項 6 5】

M A T E Rタンパク質に特異的な抗体に結合する検出可能な抗体を含む容器をさらに含む、請求項 6 4 記載のキット。 30

【請求項 6 6】

配列番号：1、配列番号：3、または配列番号：2 3 に記載の配列を含む核酸プローブと、5 5、0.2 x S S C、0.1 % S D S の洗浄条件下でハイブリダイズする、請求項 1 0 記載の単離核酸分子。

【請求項 6 7】

配列番号：1、配列番号：3、または配列番号：2 3 に記載の配列を含む核酸プローブと、5 0、2 x S S C、0.1 % S D S の洗浄条件下でハイブリダイズする、請求項 1 0 記載の単離核酸分子。 40

【請求項 6 8】

被検者中のM A T E Rタンパク質の発現レベルを核酸分子に機能的に連結したプロモーターを含む組換え遺伝子構築物により改変する方法であって、該核酸分子が、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：2 3 に記載の配列、または配列番号：1、配列番号：3、もしくは配列番号：2 3 に記載の配列と少なくとも6 5 %の同一性を有する配列において少なくとも2 3 個の連続したヌクレオチドを含み、該核酸分子の発現がM A T E Rタンパク質の発現を変化させる方法。

【請求項 6 9】

核酸分子がプロモーターに対してアンチセンス方向にあり、方法が避妊法である、請求項 6 8 記載の方法。 50

【請求項70】

M A T E Rを介する哺乳動物の不妊症に影響を与えるのに有用な化合物をスクリーニングする方法であって、試験化合物が請求項1記載のタンパク質もしくはその変種またはその断片に結合するかあるいは相互作用をするかどうかを判定し、そのように結合した化合物を選択することを含む方法。

【請求項71】

化合物の結合がM A T E Rタンパク質の生物活性を阻害する、請求項70記載の方法。

【請求項72】

試験化合物を被検細胞に適用する、請求項70記載の方法。

【請求項73】

請求項70記載の方法により選択された化合物。

【請求項74】

避妊薬として使用するための請求項73記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本開示は一般に生殖能力に関し、それを制御する機序、そのような機序の異常から生ずる疾患、および生殖能力に影響を与える（阻害または促進）方法を含む。

【0002】

背景

早発性卵巣機能不全（P O F）は、女性の特定の型の不妊症を表すのに使用される用語である。米国の全女性の1%程度がP O Fで悩むと考えられ、それは40歳未満の女性において不妊症を含む更年期型の症状として発現する。潜在的な染色体疾患（例えば、X染色体易損性）、化学療法、または放射線治療を含む多くの異なる疾患および条件によって、P O Fが引き起こされる可能性がある。自己免疫は確立された早発性卵巣機能不全の機序である（Y a n ら、J W o m e n s H e a l t h G e n d B a s e d M e d . 9 : 2 7 5 - 2 8 7、2 0 0 0 ; K a l a n t a r i d o u および N e l s o n、J A m M e d W o m e n s A s s o c . 5 3 : 1 8 - 2 0、1 9 9 8 参照）。自己免疫性不妊症では、女性の卵巣は彼女自身の免疫機構の細胞により攻撃され、自己免疫性卵巣炎（卵巣の炎症）として知られる状態を招く。自己免疫疾患は、単一の誘発抗原への応答により発症し、その後広がって同じ臓器の他の抗原分子を含むに至る可能性がある（K a u f m a n、N a t u r e 3 6 6 : 6 9 ~ 7 2、1 9 9 3）。従って、臓器特異性自己免疫疾患において、自己抗原の標的を同定することは、その病因論の理解に不可欠である。

【0003】

ヒトの自己免疫性卵巣炎の機序を洞察するために、実験動物（マウス）モデルが用いられてきた。新生期（約3日齢）のマウスの胸腺の除去（胸腺摘出）により、一部の系統のマウスに実験的自己免疫性卵巣炎が誘発される（T a g u c h i ら、C l i n E x p I m m u n o l . 4 2 : 3 2 4 - 3 3 1、1 9 8 0）。この実験的に誘発された状態は、卵胞の変性を伴う高レベルの抗卵質抗体産生および不妊に至る；この状態の進行はヒト自己免疫性卵巣炎と極めて類似すると思われる（K a l a n t a r i d o u および N e l s o n、J A m M e d W o m a n s A s s o c . 5 3 : 1 8 - 2 0、1 9 9 8）。

【0004】

母性産物は、胚のゲノム活性化が起こるまで発生プログラムを制御する。初期の胚発生に重要な母性効果遺伝子については、ショウジョウバエおよびアフリカツメガエルにおいて多く記載されてきたが（M o r i s a t o および A n d e r s o n、A n n u . R e v . G e n e t . 2 9 : 3 7 1 - 3 9 9、1 9 9 5 ; N e w p o r t および K i r s c h n e r、C e l l 3 0 : 6 8 7 - 6 9 6、1 9 8 2）、哺乳類においてはその存在が推測されてきたにすぎない（G a r d n e r、H u m . R e p r o d . U p d a t e 2 : 1 - 2 7、1 9 9 9）。マウスでは、胚転写は後期1細胞接合体期に最初に検出され、2細胞期を超えて発達するために必要である（S c h u l t z、B i o e s s a y s 1

10

20

30

40

50

5 : 531 - 538、1993 ; Fl a c h e r、E M B O J . 1 : 681 - 686、1982 ; L a n t h a m、M o l . R e p r o d . D e v . 35 : 140 - 150、1993)。母方から胚ゲノムへのこの遷移を支配する因子は知られていない。

【0005】

発生における重大な遷移は、卵に蓄えられたタンパク質への依存から胚ゲノムの活性化の結果生じるタンパク質への依存に転換するのに伴って生ずる。マウスの2細胞期に生ずるこの転換は母性因子に依存する。遺伝子の転写やタンパク質の翻訳はネズミ科の卵形成の間に活発であり、卵母細胞にRNAとタンパク質が蓄積する。しかしながら、生殖細胞は卵形成後期には転写が不活性になり、母性RNAの多くは成熟分裂及び卵が卵管へ排卵する間に分解する。従って、母性遺伝子産物で2細胞胚期を過ぎて存続するものは少なく、初期発生に影響することが直接証明されたものはない (S c h u l t z、B i o e s s a y s 15 : 531 - 538、1993 ; G a r d n e r、H u m . R e p r o d . U p d a t e 2、3 - 27、1996)。

10

【0006】

開示の概要

本明細書には、ヒトMATERタンパク質である、女性の生殖能力に必要な哺乳動物の卵母細胞で発現する約135kDa(予測推定分子量)の細胞質タンパク質が記載される。MATERヌル卵母細胞から発生する接合体は2細胞期を超えて進行しない。

【0007】

いくつかの態様は、推定分子量約125kDaから約135kDa、いくつかの態様では、特に約134.2kDaと予想される単離されたヒトMATERタンパク質である。例えばこの推定分子量は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、および、例えばマウスMATERのC末端ペプチド(例えば配列番号:6における1093残基から1111残基)に対して産生された抗体を利用したウエスタンブロッティングによって得ることができる。MATERタンパク質は配列番号:2、4もしくは24に記載のアミノ酸配列、または配列番号:2、4もしくは24と少なくとも65%の配列同一性を有する配列を含む。そのようなタンパク質の一部の具体的な例では、一つまたは複数の保存的変種をそのような配列中に含む可能性がある。提供されるヒトMATERタンパク質は、例えばMaterヌル表現型を相補することができるという意味において、MATERタンパク質の生物学的活性を有する。

20

30

【0008】

一部の態様では、ヒトMATERタンパク質は自己免疫性不妊症と関連性のある自己抗原である。そのタンパク質は卵母細胞の細胞質、例えば、ヒトのような哺乳動物の卵母細胞の細胞質で発現する可能性がある。

【0009】

従って、一つの具体的態様は、推定分子量約135kDaと予測される単離されたヒトMATERタンパク質であって、そのヒトMATERタンパク質は、配列番号:2、および/または配列番号:4、および/または配列番号:24に記載のアミノ酸配列を含み、自己免疫性不妊症と関連性のある卵母細胞の細胞質特異的な自己抗原であり、胚の2細胞期を超えた発達を可能にすることによりMaterヌル表現型を相補することができる。

40

【0010】

さらなる態様は、そのようなMATERタンパク質をコードする単離核酸分子である。そのような核酸分子の例は、配列番号:1、3もしくは23に記載の配列、または配列番号:1、3もしくは23と少なくとも82%の配列同一性を有する配列を含む。そのような核酸分子のある例では、一つまたは複数の保存的変種がその配列中に含まれる。特定の例では、55、0.2XSSC、および0.1%SDSの洗浄条件、または50、2XSSC、および0.1%SDSの洗浄条件下で、配列番号:1、配列番号:3、または配列番号:23に記載の配列を含む核酸プローブとハイブリダイズする。

【0011】

また、MATER核酸分子に機能的に連結したプロモーター配列を含む組換え核酸分子、

50

およびそのような組換え核酸分子で形質転換した細胞も提供される。

【0012】

被検者における異常なMater核酸、または異常なMATER発現、またはMATERに対する自己免疫応答と関連性のある生物学的状態を検出する方法も提供される。そのような生物学的状態の例には、不妊症（例えば自己免疫性不妊症）もしくは生殖能力低下、または不妊症もしくは生殖能力低下に対する感受性の増加が含まれる。そのような方法は、被検者における異常なMater核酸、または異常なMATER発現、またはMATERに対する自己免疫応答の検出を含みうる。そのような方法の具体的な例において、その異常なMater核酸または異常なMater発現は、Mater核酸またはMATERタンパク質の細胞レベルと正常レベルとの比較における変化を含む。異常なMater発現は、被検者におけるMaterの増加または減少した発現を含んでよい。

10

【0013】

提供される具体的な方法は、被検者がMATERタンパク質のエピトープを認識する循環自己抗体を持つかどうかを決定することを含み、そのような自己抗体の存在は被検者の不妊症もしくは生殖能力低下、または不妊症もしくは生殖能力低下に対する感受性の増加を示す。その他の具体的な方法は、被検者からの臨床試料に含まれる少なくとも一つのMater分子を、Mater特異的結合因子（例えばオリゴヌクレオチドまたはMATERタンパク質特異的結合因子（例えば抗体またはその機能的断片））を含む試薬と反応させて、Mater：因子複合体を形成することを含む。

【0014】

また、不妊症もしくは生殖能力低下についての素因を検出する方法、または個体を不妊症もしくは生殖能力低下について前症状的にスクリーニングする方法も提供される。

20

【0015】

本明細書で提供される、生物学的状態を検出する具体的な方法には、異常なMater核酸を検出する前にMater核酸をインビトロで増幅することが含まれる。増幅は、例えばMATERタンパク質をコードする配列に由来する少なくとも一つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行うことができる。そのようなオリゴヌクレオチドの例には、配列番号：1、3、または23から少なくとも15個、例えば少なくとも20個または少なくとも23個の連続したヌクレオチドが含まれうる。

【0016】

また、そのような方法に使用されるオリゴヌクレオチドプライマー、そのような核酸分子を含む組換えDNAベクター、およびそのような核酸分子に機能的に（センスまたはアンチセンス方向で）連結したプロモーター配列を含む組換え核酸分子も提供される。そのようなベクターおよび組換え核酸分子は、細胞または動物（例えばヒト以外の動物）を形質転換することができる；そのような形質転換細胞および動物もまた提供される。

30

【0017】

提供される方法のうち特定の例では、Mater分子はMATERをコードする配列である。そのような例のいくつかでは、Mater：因子複合体はヌクレオチド・ハイブリダイゼーションによって検出され、例えば、その因子は標識した核酸プローブである。そのようなプローブは、配列番号：1、3もしくは23に記載の配列、それらの配列断片（例えば23個またはそれ以上のヌクレオチド断片）を含むことができる。その他のプローブは、配列番号：1、3、または23に記載の配列と少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含むことができる。そのようなヌクレオチドプローブもまた提供される。

40

【0018】

提供される方法のその他の例では、Mater分子はMATERタンパク質であって、配列番号：2、4もしくは24に記載の配列、配列番号：2、4もしくは24と少なくとも65%の配列同一性を有する配列、またはその保存的変種を含むことができる。そのような例のいくつかでは、MATER：因子複合体はウエスタンブロットアッセイ法またはELISAによって検出される。提供される特定の方法では、そのMater特異的結合因子はMATER特異的抗体またはその機能的断片であり、例えばポリクローナル抗体また

50

はモノクローナル抗体である。特定の例においては、抗体は配列番号：2、4もしくは24に記載の配列を含むペプチド、またはそれらペプチドのうち一つの抗原断片を認識する。

【0019】

また本明細書で提供されるものにはキットもあり、それはMATERタンパク質またはMater核酸が（例えば、動物のような被検者からの試料において）過剰にあるかまたは欠乏することを検出するキットを含み、そのキットには（例えば抗体またはその機能的断片のような）MATERタンパク質特異的結合因子が含まれる。ある例では、その因子は、配列番号：2、4もしくは24に記載のアミノ酸配列、それらと一つもしくは複数の保存性アミノ酸置換により異なるアミノ酸配列、それらの配列と少なくとも65%の配列相同性を有するアミノ酸配列、またはそれらのいずれかの配列の抗原断片中のエピトープと特異的に結合することができる。そのようなキットの特定の例は、MATERポリペプチドへのMATERタンパク質結合因子の結合を検出する方法をさらに含む。それらのキットのある例では、検出されるMATERタンパク質またはMater核酸の過剰または欠乏は、不妊症の変化を引き起こす。

10

【0020】

提供される他のキットは、核酸試料中の遺伝子変異（例えば、Mater配列中の変異）を検出するためのものである。そのようなキットはMater核酸と特異的にハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチド（第一の容器に提供してもよい）、および（例えば約5～500ヌクレオチドの）本オリゴヌクレオチドと完全に相補的な蛍光標識核酸プローブ（第二の容器に提供してもよい）を含んでもよい。

20

【0021】

本明細書に提供される具体的なキットの態様は、被検者が異常なMater発現と関連性のある生物学的状態を有しているかどうかを、被検者からの組織および/または体液の試料中にMATERタンパク質が欠乏することを検出することにより判定するためのものである。そのようなキットはMATERタンパク質に特異的な抗体とそのキットを使用するための手引書を含む。そのような手引書は（例えば本明細書に記載の方法を用いて）試料中のMATERタンパク質の存在を検出する方法の実行のための段階と、その方法により生成されるデータ解析のための段階とを指示することができる。その場合、手引書は、MATERタンパク質が試料中に欠乏することが、個体が前記生物学的状態を有するかまたはその素因があることを意味するということを示す。そのようなキットの特定の例は、MATERタンパク質特異的抗体に結合する検出可能な抗体をさらに含む。

30

【0022】

その他の具体的なキットの態様は、MATERタンパク質特異的抗体（一つの容器に提供してもよい）、陰性対照試料（一つの容器に提供してもよい）、そのキットを使用するための手引書を含む。そのような手引書では、被検者の組織および/または、体液の試験試料中のMATERタンパク質の量を検出する試験アッセイ法（例えば本明細書に提供される試験アッセイ法のような）を実行する段階；陰性対照試料中のMATERタンパク質の量を検出する陰性対照アッセイ法を実行する段階；ならびにその試験アッセイ法および陰性対照アッセイ法によって生成させるデータの比較をする段階を指示することができる。そのようなキットの特定の例においては、その手引書が、試験試料中のMATERタンパク質の量が陰性対照試料中のMATERタンパク質の量より少ないことは、その被検者が前記生物学的状態を有することを意味するということを示す。そのようなキットのいくつかは、MATERタンパク質特異的抗体に結合する検出可能な抗体をさらに含む（別個の容器に提供してもよい）。

40

【0023】

また、例えば被検者の中で、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：23、または配列番号：1、配列番号：3、もしくは配列番号：23と少なくとも70%の同一性を有する配列を含む、少なくとも23個の連続したヌクレオチドを含む核酸分子と、（センスまたはアンチセンス方向に）機能的に連結したプロモーターとを含む組換え遺伝子構築物を発

50

現することによって、被検者の中でMATERタンパク質の発現レベルを改変する方法も提供される。特定の例では、核酸分子の発現はMATERタンパク質の発現を変化させる。

【0024】

さらなる態様は、哺乳動物においてMATERを介する不妊症に影響を与えるのに役立つ化合物をスクリーニングする方法を提供する。そのような方法は、試験化合物が、（例えばそれが被検細胞に用いられた場合に）例えばヒトMATERタンパク質のようなMATERタンパク質またはその変異体もしくは断片に結合するか、あるいは相互作用するかどうかを判定する段階、およびそのように結合する化合物をスクリーニングする段階を含む。そのような方法の特定の例では、その化合物の結合がMATERタンパク質の生物活性を阻害する。本明細書にさらに含まれるのは、それらの方法で選別された化合物であり、例えば避妊薬または受精率増強剤として使用するための化合物である。

10

【0025】

本発明の前述およびその他の特色および長所は、添付の図面を参照すると共に、続くいくつかの態様の詳細な記載からより明らかになると思われる。

【0026】

配列表

添付の配列表中の核酸およびアミノ酸配列は、37連邦規則集1.822において定められた定義のとおり、ヌクレオチド塩基においては標準的の文字省略形で、アミノ酸においては3文字コードで示される。それぞれのヌクレオチド配列のうち一鎖のみが示されるが、示される鎖へのいずれの言及によっても、相補鎖が含まれるものと理解される。添付の配列表中において、

20

配列番号：1は、ヒトMater cDNA断片1の核酸配列を示す；

配列番号：2は、断片1（配列番号：1）によってコードされるヒトMATERペプチドのアミノ酸配列を示す；

配列番号：3は、ヒトMater cDNA断片2の核酸配列を示す；

配列番号：4は、断片2（配列番号：3）によってコードされるヒトMATERペプチドのアミノ酸配列を示す；

配列番号：5は、マウスMater cDNA（GenBankアクセッション番号NM_011860.1およびAF074018；個々のエキソンはAF143559～AF143573にも記載されている）の核酸配列を示す；

30

配列番号：6は、マウスMATERタンパク質（GenBankアクセッション番号NP_035990）のアミノ酸配列を示す；

配列番号：7～22は、プローブおよび/またはプライマーとして有用な、いくつかの合成オリゴヌクレオチドを示す；

配列番号：23は、ヒトMater cDNAの核酸配列、およびコードされたアミノ酸配列を示す；

配列番号：24は、ヒトMATERタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0027】

開示の詳細な説明

40

I. 略語

ES：胚性幹（embryonic stem）

Mater：胚が必要とする母性抗原（Maternal Antigen That Embryos Require）

OP1：卵質特異的タンパク質1（Ooplasm-specific Protein 1）

POF：早発性卵巢機能不全（Premature Ovarian Failure）

TRC：転写関連複合体（Transcription Related Complex）

ZP3：透明帯糖タンパク質3（zona pellucida glycoprotein 3）

50

n 3)

【0028】

II.用語

別に記載がなければ、専門用語は従来の方法に従って用いられる。分子生物学の一般的な用語の定義は、ベンジャミン・レウイン (Benjamin Lewin)、「遺伝子 第5版 (Genes V)、Oxford University Press、1994 (国際標準図書番号 0-19-854287-9); ケンドリュー (Kendrew)ら編、「分子生物学百科事典 (The Encyclopedia of Molecular Biology)」、Blackwell Science Ltd.、1994 (国際標準図書番号 0-632-02182-9); およびロバートAメイヤーズ (Robert A. Meyers)編、「分子生物学と生命工学：総合的机上参考書 (Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference)」、VCH Publishers Inc.、1995 (国際標準図書番号 1-56081-569-8)に見いだすことができる。

10

【0029】

本発明の様々な態様の評価を容易にするために、特定の用語について以下に説明を提供する。

【0030】

異常：正常な特性からの逸脱。正常な特性は、対照、母集団における標準などに見出すことができる。例えば、異常な状態が自己免疫性不妊症のような自己免疫疾患状態である場合において、正常な特性の出所としては、自己免疫障害に罹患していない個体、この疾患に罹患していないと考えられる個体の母標準などを含んでもよい。

20

【0031】

いくつかの例では、異常とは、疾患と関連性のある状態を意味する。「と関連性のある」という用語は、疾患自体に加えて、疾患の発症に対する危険性の増大を含む。例えば、ある異常 (例えば Mater 核酸、または MATER タンパク質発現の異常) について、生殖能力の変化 (例えば減少) および自己免疫性不妊症を発症する体質に基づく生物学的状態と関連性がある、というように記載することができる。

【0032】

異常な Mater 核酸などの異常な核酸とは、正常な (野生型) 核酸とある状態において異なる核酸である。そのような異常には、それぞれ対照または標準との比較において、(1) 核酸の突然変異 (例えば点突然変異 (例えば一塩基多型) またはいくつかのヌクレオチドにおける短い欠失または重複); (2) 核酸の複製や発現を変化させるような核酸と関連性のある、対照配列中の突然変異 (例えばプロモーターの機能的な不活化); (3) 細胞またはその他の生物試料における核酸の量またはコピー数の減少 (例えば、選択的遺伝子欠失または染色体のより広範な部分の欠失による核酸の欠失、または mRNA の低発現); および (4) 細胞または試料における核酸の量またはコピー数の増加 (例えば、一部もしくは全ての核酸のゲノム増幅、または mRNA の過剰発現) が含まれるが、必ずしもそれらに限定されることはない。これらの種類の異常は、同一核酸または同一細胞もしくは試料に共存するものと理解される; 例えば、ゲノム増幅した核酸配列は、1つまたは複数の点突然変異も含む可能性がある。加えて、核酸の異常は、対応するタンパク質の発現の異常と関連し、実際にそれを生じさせる可能性があるものと理解される。

30

40

【0033】

異常な MATER タンパク質発現のような異常なタンパク質発現とは、正常な (野生型) 状態におけるタンパク質の発現とある状態において異なるタンパク質の発現を言う。これには、それぞれ対照または標準との比較において、(1) 1つまたは複数のアミノ酸残基が異なるような、タンパク質の突然変異; (2) タンパク質配列への、1つまたは数個のアミノ酸残基の短い欠失または挿入; (3) 例えばタンパク質のドメインやサブドメイン全体が除去または追加されるような、アミノ酸残基のより広範な欠失または挿入; (4) 対照または標準における量と比較して、増加した量のタンパク質発現; (5) 対照または

50

標準における量と比較して、減少した量のタンパク質発現；(6)タンパク質の細胞内の局在性または標的化の変化；(7)タンパク質の一過的に調節された発現の変化(例えば、タンパク質が通常は発現しないような時期に発現する、または通常は発現するような時期に発現しない)；および(8)タンパク質の局在化された(例えば、臓器または組織特異的な)発現の変化(例えば、タンパク質が通常は発現するような場所に発現しない、または通常は発現しないような場所に発現する)が含まれるが、必ずしもそれらに限定されることはない。

【0034】

異常性を決定するために試料と比較するのに適切な対照または標準には、たとえ恣意的な集合である可能性があるにしても、研究室の評価の上では正常と考えられるものが含まれ、そのような評価が研究室ごとに異なる可能性があることに留意する。研究室の標準および評価は、既知のまたは測定された集団値に基づいて設定されたものであってもよく、測定され実験的に決定された値の簡単な比較を可能にするような、グラフや表の様式で提供されたものであってもよい。

10

【0035】

アンチセンス、センス、およびアンチジーン(antigene)：二本鎖DNA(dsDNA)は、プラス鎖と呼ばれる5' 3'鎖、およびマイナス鎖と呼ばれる3' 5'鎖(逆相補)の二本の鎖を持つ。RNAポリメラーゼは核酸を5' 3'方向に追加するため、DNAのマイナス鎖は転写中にRNAの鋳型として作用する。従って、形成されたRNAは(TがUに置換されていることを除き)マイナス鎖と相補的で、プラス鎖と同一

20

【0036】

アンチセンス分子とは、RNAまたはDNAのプラス鎖のいずれかと特異的にハイブリダイズ可能な、または特異的に相補的な分子である。センス分子とは、DNAのマイナス鎖と特異的にハイブリダイズ可能な、または特異的に相補的な分子である。アンチジーン分子とは、dsDNAを標的とした、アンチセンスまたはセンスのいずれかの分子である。

【0037】

結合または安定した結合：十分量のオリゴヌクレオチドが塩基対を形成し、または標的の核酸にハイブリダイズして、その結合が検出可能になった場合、オリゴヌクレオチドは標的の核酸に結合または安定して結合する。結合は、標的：オリゴヌクレオチド複合体の物理的または機能的な性質により検出できる。標的とオリゴヌクレオチドの結合は、機能的および物理的な結合アッセイ法の両方を含む、当業者に知られた任意の方法により検出できる。結合が、遺伝子の発現、DNA複製、転写、翻訳等のような生合成過程に対して観察可能な効果を有するかどうかを決定することにより、結合を機能的に検出することができる。

30

【0038】

DNAまたはRNAの相補鎖の結合を物理的に検出する方法は、当技術分野において公知であり、例えばDNアーゼIまたは化学的フットプリント法、ゲルシフトおよびアフィニティー切断(affinity cleavage)アッセイ法、ノーザン・ブロッティング、ドット・ブロッティング、ならびに吸光度検出法などの方法が含まれる。例えば、容易かつ信頼性があるために広く用いられている方法として、温度を穏やかに上昇させながら、オリゴヌクレオチド(または類似体)および標的核酸を含む溶液において220nmから300nmでの吸光度の変化を観察することが含まれる。オリゴヌクレオチドまたは類似体はその標的に結合している場合に、オリゴヌクレオチド(または類似体)および標的が固有の温度において、互いに解離または融解するために、吸光度の急激な上昇がある。

40

【0039】

オリゴマーとその標的核酸の間の結合は、50%の標的配列が完全に一致するプローブまたは相補鎖とハイブリダイズした状態を維持する温度(T_m)によって、しばしば特徴づけられる。高い(T_m)は、低い(T_m)と比較して、より強いまたはより安定な複合体

50

を意味する。

【0040】

cDNA（相補的DNA）：内部に非コードセグメント（イントロン）および転写調節配列を欠失するDNA断片。cDNAはまた、対応するRNA分子の翻訳を制御する役割を持つ非翻訳領域（UTR）も含まれる。cDNAは通常、研究室において、細胞から抽出したメッセンジャーRNAからの逆転写により合成される。

【0041】

DNA（デオキシリボ核酸）：DNAは、ほとんどの生物の遺伝物質を構成する長いポリマー鎖である（いくつかのウイルスはリボ核酸（RNA）を含む遺伝子を有する）。DNAポリマーの反復単位は4つの異なるヌクレオチドであり、そのそれぞれは、リン酸基が付いたデオキシリボース糖に結合した、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、およびチミン（T）の4つの塩基のうちの一つを含む。ヌクレオチドのトリプレット（コドンと呼ぶ）は、ポリペプチド中のそれぞれのアミノ酸または終結シグナルをコードする。コドンという用語は、そのDNA配列から転写されたmRNAにおいて対応する（かつ相補的な）3つのヌクレオチド配列にも使用される。

10

【0042】

他に明記しない限り、DNA分子のいずれの言及も、そのDNA分子の逆相補鎖を含むことを意図する。本明細書の文面において一本鎖であることが要求される場面を除いて、DNA分子は、一本鎖のみを表すように記載されている場合であっても、二本鎖DNA分子の両方の鎖を包含する。従って、特定のタンパク質をコードする核酸分子またはその断片への言及は、センス鎖およびその逆相補鎖の双方を包含する。従って、例えば、開示された核酸分子の逆相補配列からプローブまたはプライマーを生成することも適当である。

20

【0043】

欠失：DNAの配列の除去であって、除去された配列のそれぞれの側にある領域が互いに結合されること。

【0044】

遺伝子増幅またはゲノム増幅：遺伝子、または遺伝子の断片もしくは領域、または関連した5'または3'領域のコピー数を、正常組織におけるコピー数と比較した場合のコピー数の増加。ゲノム増幅の例として、癌遺伝子のコピー数の増加がある。「遺伝子欠失」は、遺伝子配列に通常存在する一つまたは複数の核酸の欠失であり、極端な例では、遺伝子全体または染色体の一部の欠失さえ含むことがある。

30

【0045】

ハイブリダイゼーション：オリゴヌクレオチドおよびそれらの類似体は、相補的塩基間において、ワトソン・クリック型、フーグスティーン型、または逆フーグスティーン型水素結合を含む水素結合によりハイブリダイズする。一般に、核酸は含窒素塩基、すなわちピリミジン（シトシン（C）、ウラシル（U）、およびチミン（T））またはプリン（アデニン（A）およびグアニン（G））のいずれかで構成される。それらの含窒素塩基はピリミジンとプリン間で水素結合を形成し、ピリミジンとプリンとの結合は「塩基の対合」と呼ばれる。より具体的には、AはTまたはUと水素結合し、GはCと結合する。「相補的」とは、二つの別個の核酸配列、または同一核酸配列中の二つの別個の領域の間に生ずる塩基の対合を指す。

40

【0046】

「特異的にハイブリダイズする」および「特異的に相補的」は、オリゴヌクレオチド（またはその類似体）とDNAまたはRNAの標的の間で安定で特異的な結合をするのに十分な程度の相補性を表す用語である。オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体は、特異的にハイブリダイズするためにその標的配列と100%相補的である必要はない。オリゴヌクレオチドまたは類似体と標的DNAまたはRNA分子との結合が、標的DNAまたはRNAの正常な機能を妨げ、例えばインビボのアッセイ法または系の場合の物理的条件のような特異的な結合が要求される状況下で、オリゴヌクレオチドまたは類似体が非標的配列へ非特異的に結合するのを妨げるのに十分な程度の相補性がある場合に、オリ

50

ゴヌクレオチドまたは類似体が特異的にハイブリダイズすると言う。そのような結合を、特異的ハイブリダイゼーションと称する。

【0047】

特定の程度のストリンジェンシーを生ずるハイブリダイゼーション条件は、選択されるハイブリダイゼーション方法の特性、ならびにハイブリダイズする核酸配列の組成や長さによって異なると考えられる。一般に、ハイブリダイゼーションの温度およびハイブリダイゼーション緩衝液のイオン強度（特にNa⁺濃度）がハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定するが、作業時間もストリンジェンシーに影響する。特定の程度のストリンジェンシーを得るために必要なハイブリダイゼーション条件に関する計算は、サムブロック（Sambrook）ら編、「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」第2版1～3巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1989、第9章および11章に論じられており、これは、参照として本明細書に組み入れられる。

10

【0048】

本目的のために、「ストリンジェントな条件」には、ハイブリダイゼーション分子と標的配列との間のミスマッチが25%未満の場合にのみハイブリダイゼーションを生ずるような条件が含まれる。より厳密な定義においては、「ストリンジェントな条件」は、特定レベルのストリンジェンシーに分類され得る。従って、本明細書で使用される「緩やかなストリンジェント」な条件とは、25%より多くの配列のミスマッチがある分子はハイブリダイズしないような条件である；また、「中程度のストリンジェント」な条件とは、15%より多くの配列のミスマッチがある分子はハイブリダイズしないような条件であり、「高ストリンジェント」な条件とは、10%より多くのミスマッチがある配列はハイブリダイズしないような条件である。「極めて高ストリンジェント」な条件とは、6%より多くのミスマッチがある配列はハイブリダイズしないような条件である。

20

【0049】

インビトロ増幅：試料または標本中の核酸分子のコピー数を増加させる手法。増幅の例にはポリメラーゼ連鎖反応があり、被検者から回収した生物試料を、一对のオリゴヌクレオチド・プライマーと、そのプライマーが試料中の鋳型核酸とハイブリダイゼーションすることを可能にする条件の下で接触させる。プライマーを適当な条件で伸長させ、鋳型から解離させて、次いで再びアニーリングして、伸長させ、解離して、核酸のコピー数を増幅させる。インビトロ増幅の生成物は、標準的手法を用いて、電気泳動、制限エンドヌクレアーゼ分解パターン、オリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーションもしくはライゲーション、および/または核酸配列決定により特徴を調べることができる。他のインビトロ増幅手法の例には、鎖置換増幅（米国特許第5,744,311号参照）；転写フリー等温増幅（米国特許第6,033,881号参照）；修復連鎖反応増幅（国際公開公報第90/01069号参照）；リガーゼ連鎖反応増幅（欧州特許出願公開第320308号参照）；ギャップ補充性リガーゼ連鎖反応増幅（米国特許第5,427,930号参照）；共役リガーゼ検出およびPCR（米国特許第6,027,889号参照）；ならびにNASBA（商標）RNA転写フリー増幅（米国特許第6,025,134号参照）が含まれる。

30

40

【0050】

注入可能な組成物：少なくとも一つの活性成分を含む薬学的に許容される液体組成物。活性成分は、通常生理学的に許容される担体に溶解または懸濁されており、組成物は、1つまたは複数の少量の非毒性の補助物質、例えば乳化剤、防腐剤、pH緩衝剤等のを追加的に含んでよい。提供される核酸およびタンパク質と共に使用するのに有用であるそのような注入可能な組成物は慣例的に用いられており、その適切な製剤化は当技術分野で公知である。

【0051】

単離された：「単離された」生物成分（例えば核酸分子、タンパク質、または細胞小器官

50

など)は、その生物成分が自然に存在する有機体の細胞中の他の生物成分、すなわち他の染色体、ならびに染色体外のDNAおよびRNA、タンパク質、および細胞小器官から実質的に分離または精製されたものである。「単離された」核酸およびタンパク質は、標準の精製方法により精製した核酸およびタンパク質を含む。この用語はまた、宿主細胞における組換え発現された核酸およびタンパク質、ならびに化学的合成により得られた核酸を包む。

【0052】

MATERタンパク質：約125kDaから約135kDa(ゲル移動度に基づく推定分子量)の女性の生殖能力に不可欠である細胞質局在性タンパク質(配列番号：24)。頭文字は、胚が必要とする母性抗原(Maternal Antigen That Embryos Require)を意味する。Materは、ヒト第19染色体上に見出された単一コピー遺伝子である。Materヌル(Mater^{-/-})卵母細胞から生じた接合体は2細胞期を超えて発達しない。従って、Materは、哺乳動物の胚の生存および初期発生に必要な新規の母性効果遺伝子を意味する。

10

【0053】

タンパク質は、それらの活性およびその他の物理的性質を、ヒトまたはマウスMATERタンパク質のような原型的なMATERタンパク質と比較することにより、MATERタンパク質として同定することができる。MATERタンパク質の生物学的活性は、タンパク質がMaterヌル変異体を相補する(失われた機能を実質的に置き換える)能力の点から評価できる。タンパク質がMater変異体を相補する能力は、そのタンパク質をコードする遺伝子を、標準的な方法によってMater変異動物系(本明細書に記載したMaterヌルマウスなど)に導入することにより容易に判別できる。コードされたタンパク質がMATERタンパク質の生物活性を有している場合、トランスジェニック子孫動物の一部が、Mater変異体に関連した特性(例えば、Materヌル卵母細胞が2細胞期を超えて発達できないことに由来するMaterヌルの雌の不妊症)において、相対的に野生型の表現型を持つことから明らかにされる。

20

【0054】

仮定的なMATERタンパク質を評価する場合に検討することができるその他のMATERタンパク質の物理的特性としては、タンパク質の分子量(約125kDa~約135kDa、実施例1参照、但しこの値は種ごとにいくぶん変動する可能性がある)、タンパク質の細胞内局在性(ヒトMATERは卵母細胞内で発現し(実施例4)、マウスで起こっているように、細胞質に特異的に発現し核には含まれていないと予測される(実施例1参照)、ならびにmRNAの時間的および空間的な制御(Mater転写物は成熟中の卵母細胞で産生されている、実施例1および実施例3参照)が含まれる。一つのMATERタンパク質(例えばマウスMATER)を認識する抗体は、他種由来のMATERタンパク質(例えばヒトMATER)を認識する可能性がある(実施例4参照);従って、仮定的なMATERタンパク質は、他種由来のMATERタンパク質に対して産生された抗MATER抗体による認識に基づいて、さらに検討および同定をすることができる。従って、ヒトMATERタンパク質の同一性は、例えばマウスMATERタンパク質またはそのタンパク質のエピトープに対して産生された抗体を用いる免疫学的同定によって確認できる。

30

40

【0055】

ヌクレオチド：「ヌクレオチド」は、ピリミジン、プリンもしくはそれらの合成類似体のような糖と連結した塩基、またはペプチド核酸(PNA)のようなアミノ酸に連結した塩基を含むモノマーを含むが、それらに限定はされることはない。ヌクレオチドはポリヌクレオチド中の一つのモノマーである。ヌクレオチド配列とは、ポリヌクレオチドにおける塩基配列を指す。

【0056】

オリゴヌクレオチド：オリゴヌクレオチドは、固有のホスホジエステル結合により結合された複数個の連結したヌクレオチドであり、約6ヌクレオチドから約300ヌクレオチド

50

の長さを有する。オリゴヌクレオチド類似体とは、オリゴヌクレオチドと同様に機能するが、自然に存在しない部分を指す。例えば、オリゴヌクレオチド類似体は、ホスホロチオエート・オリゴデオキシヌクレオチドのように、改変した糖部分または糖間の結合のような、自然に存在しない部分を含むことができる。自然に存在するポリヌクレオチドの機能的類似体は、RNAまたはDNAに結合でき、ペプチド核酸(PNA)分子を含む。

【0057】

特定のオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド類似体は、約200ヌクレオチドの長さまでの直鎖配列を含んでよく、例えば、その配列(DNAまたはRNAなど)は、少なくとも6塩基、例えば少なくとも8塩基、10塩基、15塩基、20塩基、25塩基、30塩基、35塩基、40塩基、45塩基、50塩基、100塩基もしくはさらに200塩基の長さ、または約6塩基から約50塩基、例えば12塩基、15塩基、20塩基もしくは23塩基のような約10塩基~約25塩基の長さである。

10

【0058】

機能的に連結：第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的な関係に位置する場合に、第1の核酸配列は第2の核酸配列と機能的に連結されている。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、プロモーターはコード配列と機能的に連結している。一般に、機能的に連結したDNA配列は連続しており、2つのタンパク質コード領域を連結する必要がある場合に、同一のリーディングフレーム内にある。

【0059】

オープンリーディングフレーム：内部に終止コドンを持たない、アミノ酸をコードする一連のヌクレオチド・トリプレット(コドン)。これらの配列は、通常、ペプチドに翻訳可能である。

20

【0060】

オルソログ：2つの核酸またはアミノ酸配列が共通の祖先配列を共有し、且つその祖先配列を持つ種が2つの種に分かれるときにそれらが分岐したものである場合、それらは互いにオルソログである。オルソログな配列は相同な配列でもある。

【0061】

非経口：腸管外、例えば、消化管を介さない投与。一般に、非経口製剤とは、経口摂取以外の任意の可能な方法を介した投与によるものである。この用語は、特に、静脈内、髄腔内、筋肉内、腹腔内、または皮下などの注射による投与、ならびに例えば鼻腔内、皮内、および局所投与を含む様々な体表塗布を指す。

30

【0062】

ペプチド核酸(PNA)：ペプチド結合で連結したアミノ酸モノマーのような、アミド(ペプチド)結合により連結したモノマーを含む骨格を有するオリゴヌクレオチド類似体。

【0063】

薬学的に許容される担体：本明細書で提供される組成物と共に有用な薬学的に許容される担体は、従来のものである。マーチン(Martin)らの「レミントンの医薬科学(Remington's Pharmaceutical Science)」、マーク出版(Mark Publishing Co.)、Easton, PA、第19版、1995において、本明細書で開示したヌクレオチドおよびタンパク質の薬物送達に適した組成物および製剤化が記載されている。

40

【0064】

一般に、担体の種類は、使用される特定の投与法に依存する。例えば、非経口製剤は、通常、媒体として、水、生理食塩水、平衡化された塩溶液、ブドウ糖水、グリセリン等のような、薬学および生理学的に許容される液体を含む注射可能な液体を含む。固体組成物(例えば散剤、丸剤、錠剤、またはカプセル剤形)向けには、慣例的な非毒性の固体担体として、例えば医薬等級のマニトール、乳糖、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムが含まれ得る。生物学的に中性な担体に加えて、投与される薬学的組成物は、例えば酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートなどの保湿または乳化剤、防腐剤、およびpH緩衝剤などのような少量の非毒性の補助物質を含み得る。

50

【0065】

多形：遺伝子配列中の変種。多形は、個体間、異なる人種集団間、地理的場所の間で一般的に見いだされる変異のように、異なるヌクレオチド配列を有していながら、機能的に等価な遺伝子産物を産生するような変異（ヌクレオチド配列の差異）でありうる。多形という用語は、機能が変化した遺伝子産物を産生する変異、即ち、機能的に等価でない遺伝子産物をもたらす遺伝子配列中の変異をも包含する。この用語は、遺伝子産物を産生しない変異、不活性な遺伝子産物または増加した遺伝子産物を産生する変異をも包含する。多形という用語は、文脈が明らかに別であると指示される場合を除き、対立形質または突然変異と互換的に使用される可能性がある。

【0066】

多形は、例えば、変異が存在するヌクレオチド部位、ヌクレオチド変異によって生じたアミノ酸配列中の変化、または変異と関連した核酸分子のその他の特性の変化（例えばステム・ループのような二次構造の変化、または、ポリメラーゼ、RNアーゼ等のような関連分子に対する核酸の結合親和性の変化）を意味しうる。

10

【0067】

プローブおよびプライマー：核酸プローブおよびプライマーは、疾患または疾患の進行の指標として提供される核酸分子に基づいて容易に調製できる。核酸分子の断片または部分に基づいてプローブおよびプライマーを生成することが適当である。5'領域または3'領域に対するプローブおよびプライマーに加えて、逆相補鎖に特異的なプローブおよびプライマーも適当である。

20

【0068】

プローブは、検出可能な標識またはその他のレポーター分子を付加した単離核酸を含む。典型的な標識には、放射性同位体、酵素基質、補助因子、リガンド、化学発光または蛍光物質、ハプテン、および酵素が含まれる。標識の方法、および様々な目的に適した標識の選択についての手引きは、例えば、サンプロック (Sambrook) ら (「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、CSHL、New York、1989) およびオスベル (Ausubel) ら (「分子生物学の最新プロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」、ジョンウイリーアンドソンズ (John Wiley and Sons)、New York、1998) において考察されている。

30

【0069】

プライマーは、例えばヌクレオチドが10個またはそれ以上の長さのDNAオリゴヌクレオチドのような、短い核酸分子である。より長いDNAオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチドが約15個、20個、25個、30個、または50個またはそれ以上の長さであってもよい。プライマーは、核酸ハイブリダイゼーションによって、相補的な標的DNA鎖にアニリングさせ、プライマーと標的DNA鎖の間でハイブリッドを形成することができ、次にプライマーは、DNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA鎖に沿って伸長される。プライマー対は、例えばポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) または当技術分野で知られている他のインビトロ核酸増幅法を用いて、核酸配列の増幅に使用されうる。

40

【0070】

核酸プローブおよびプライマーを調製および使用する方法は、例えばサンプロック (Sambrook) ら (「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、CSHL、New York、1989)、オスベル (Ausubel) ら編 (「分子生物学の最新プロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」、ジョンウイリーアンドソンズ (John Wiley and Sons)、New York、1998)、およびイニス (Innis) ら (「PCRプロトコール、方法と応用へのガイド (PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications)」、アカデミック出版 (Academic Press In

50

c.)、San Diego、CA、1990)に記載されている。増幅プライマー対(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応増幅に使用するのための)は、本明細書に記載したMater配列のような既知の配列から、例えば、プライマー(Primer)(バージョン0.5、1991年著作権、ホワイトヘッド生物医学研究所(Whitehead Institute for Biomedical Research)、Cambridge、MA)のような、その目的向けのコンピューター・プログラムを使用して得ることができる。

【0071】

特定のプローブまたはプライマーの特異性が、その長さに従って増加することは、当業者に自明である。従って、例えばMATERタンパク質をコードするヌクレオチドのうちの30個の連続したヌクレオチドを含むプライマーは、15個のみのヌクレオチドの対応するプライマーと比較して、例えば指定されたMATERタンパク質の別の相同体のような標的配列に高い特異性でアニーリングする。従って、より大きい特異性を得るために、プローブおよびプライマーは、MATERタンパク質をコードするヌクレオチド配列のうちの少なくとも20個、23個、25個、30個、35個、40個、45、50個またはそれ以上の連続したヌクレオチドを含むように選択してもよい。

10

【0072】

また、開示されたMaterヌクレオチド配列のうちの特定の長さを含む単離核酸分子も提供される。そのような分子は、それらの配列またはそれより多くの配列のうちの少なくとも10個、15個、20個、23個、25個、30個、35個、40個、45個、50個またはそれ以上の連続したヌクレオチドを含んでもよく、また開示された配列のうちの任意の領域から得てもよい(例えば、Mater核酸は、配列の長さに基づき半分または4分の1に分割でき、単離核酸分子は半分にした分子の一つ目もしくは二つ目、または四半分にした分子の任意のものなどから得ることができる)。Mater cDNAまたはその他のコード配列は、同様な効果により、例えば約1/8、1/16、1/20、1/50などのより小領域に分けることもできる。

20

【0073】

他の分割の様式は、Mater遺伝子に関連した5'(上流)および/または3'(下流)領域を選択することである。

【0074】

核酸分子は、本明細書に記載したようなヒトMater核酸分子またはこの核酸分子の他の部分、および関連する隣接領域の中で任意のもののうち、少なくとも10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、50個、もしくは100個またはそれ以上の連続したヌクレオチドを含むように選択できる。従って、代表的な核酸分子は、配列番号:1および2に記載のヒトcDNA断片、または配列番号:24に記載の全ヒトMATER cDNA断片のうち、少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでもよい。

30

【0075】

タンパク質:遺伝子または組換えもしくは合成のコード配列によって発現された生体分子であってアミノ酸から構成される分子。

【0076】

精製された:「精製された」という用語は絶対的な純度を要求するものではない;むしろ、それは相対的な用語として意図される。従って、例えば、精製されたタンパク質調製物とは、細胞内または(適当な場合には)産生反応チャンバの中の天然の環境におけるタンパク質よりも純粋であるようなタンパク質調製物である。

40

【0077】

組換え体:組換え核酸は、自然には存在しない配列、または配列中の別個の異なる2つのセグメントの人工的な組合せによって作製された配列を有する核酸である。この人工的な組合せは、化学合成、またはより一般的には、単離された核酸セグメントの人工的な操作、例えば遺伝子工学技術によって得ることができる。

【0078】

50

配列同一性：2つの核酸配列間の類似性、または2つのアミノ酸配列間の類似性は、特に配列同一性と呼ばない限り、配列間の類似性として表現される。配列同一性は、しばしば同一性%（または類似性%または相同性%）という点で評価される；百分率が高いほど、2つの配列はより類似している。ヒトMATERタンパク質の相同体またはオルソログ、および対応するcDNAまたは遺伝子配列は、標準的な方法を用いてアライメントすると比較的高い程度の配列同一性を保有すると考えられる。この相同性は、オルソログなタンパク質または遺伝子またはcDNAが、より遠縁の種の場合（例えばヒト配列と*C. elegans*（*C. elegans*）の配列）と比較して、より近縁な種に由来する場合（例えばヒト配列とチンパンジーの配列）に顕著である。

【0079】

比較のための配列のアラインメントの方法は、当技術分野で既知である。様々なプログラムやアラインメント・アルゴリズムは、スミス（Smith）およびウォーターマン（Waterman）、*Adv. Appl. Math.* 2:482、1981；ニードルマン（Needleman）およびウンシュ（Wunsch）、*J. Mol. Biol.* 48:443、1970；ピアソン（Pearson）およびリップマン（Lipman）、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444、1988；ヒギンス（Higgins）およびシャープ（Sharp）、*Gene* 73:237-244、1988；ヒギンス（Higgins）およびシャープ（Sharp）、*CABIOS*、5:151-153、1989；コーペット（Corpet）ら、*Nuc. Acids Res.* 16:10881-90、1988；フアン（Huang）ら、*Computer Appls. in the Biosciences* 8:155-65、1992；ならびにピアソン（Pearson）ら、*Meth. Mol. Bio.* 24、307-31、1994、に記載されている。アルトシュール（Altschul）ら（*J. Mol. Biol.* 215:403-410、1990）は、配列アラインメントの手法および相同性の計算の詳細な検討を示している。

【0080】

NCBIベイシック・ローカル・アラインメント・サーチ・ツール（Basic Local Alignment Search Tool:BLAST）（アルトシュール（Altschul）ら、*J. Mol. Biol.* 215:403-410、1990）は、米国生命工学情報国立センター（National Center for Biotechnology Information:NCBI、Bethesda、MD）およびインターネットを含むいくつかの供給元より入手でき、配列解析プログラムのblastp、blastn、blastx、tblastn、およびtblastxと関連して用いられる。一例として、約30個より多いアミノ酸のアミノ酸配列比較のために、デフォルトBLOSUM62行列をデフォルト・パラメータに設定して用いるBlast2配列機能が使用される（ギャップ存在コストが11、および塩基毎ギャップコストが1）。短いペプチド（約30アミノ酸より少数）をアライメントする場合は、PAM30行列をデフォルト・パラメータに設定して用いるBlast2配列機能を使用したアラインメントを実行すべきである（開始ギャップ 9、伸長ギャップ 1ペナルティ）。

【0081】

2つの核酸分子が近縁関係にあることの別の指標は、2つの分子がストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。ストリンジェント条件は配列に依存し、且つ異なる環境パラメータ下で異なる。一般に、ストリンジェント条件は、定められたイオン強度およびpHにおける特定配列の融解温度（ T_m ）より、約5 から20 低くなるように選択される。 T_m は、標的配列の50%が、完全に一致するプローブまたは相補鎖とハイブリダイズを維持するような（定められたイオン強度およびpHにおける）温度である。核酸のハイブリダイゼーション条件およびストリンジェンシーの計算は、サンブローク（Sambrook）ら（「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、CSHL、New York、1989）およびティジッセン（Tijssen）（「生化学および分子生物

10

20

30

40

50

学の実験手法 - 核酸プローブを用いたハイブリダイゼーション 第一部 (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes Part I)」、第2章、Elsevier、New York、1993)に見出すことができる。ストリンジェント条件下でヒトMATERタンパク質コード配列とハイブリダイズする核酸分子は、通常、全ヒトMATERコード配列またはそのコード配列のいずれかのうちの選択された部分に基づいたプローブと、 $2 \times \text{SSC}$ 、50 の洗浄条件下でハイブリダイズする。

【0082】

高い程度の同一性を示さない核酸配列であっても、遺伝コードの縮重のために、なお類似したアミノ酸配列をコードする可能性がある。この縮重を利用し、全ての核酸分子が実質的に同一のタンパク質をコードするような多数の核酸分子を産生することによって、核酸配列を変化させることができると理解される。

10

【0083】

特異的結合因子：実質的に、定められた標的にのみ結合する因子。従ってタンパク質特異的結合因子は、実質的に特定のタンパク質にのみ結合する。一例として、本明細書で使用されるように、「MATERタンパク質特異的結合因子」という用語は、抗MATERタンパク質抗体（およびその機能的断片）ならびにその他の実質的にMATERタンパク質にのみ結合する因子（可溶性受容体など）を含む。

【0084】

抗MATERタンパク質抗体は、ハーロー (Harlow) およびレーン (Lane) (「抗体、実験室マニュアル (Antibodies, A Laboratory Manual)」、CSHL、New York、1988) を含む多くの教科書に記載される標準的な手段を用いて産生されうる。特定の因子が実質的に特定のタンパク質にのみ結合することの確認は、通常の手法を使用または応用することによって、容易に行うことができる。適切なインビトロアッセイ法として、ウエスタン・ブロッティング法を利用するものがある (ハーロー (Harlow) およびレーン (Lane) (「抗体、実験室マニュアル (Antibodies, A Laboratory Manual)」、CSHL、New York、1988) を含む多くの標準的教科書に記載されている)。ウエスタン・ブロッティングは、抗MATERタンパク質モノクローナル抗体のような所与のタンパク質結合因子が、実質的にMATERタンパク質にのみ結合することを確認するために用いることができる。

20

30

【0085】

抗体の短い断片も、特異的結合因子として作用する。例えば、特定のタンパク質に結合する Fab s、Fv s、および一本鎖 Fv s (SCFv s) は、特異的結合因子となり得る。これらの抗体断片は以下のように定義できる：(1) Fab、パパイン酵素による抗体全体の消化により、無傷の軽鎖および重鎖の一部が生じることで産生された抗体分子の一価の抗原結合性断片を含む断片；(2) Fab'、ペプシンによる抗体全体の処理およびその後の還元により、無傷の軽鎖および重鎖の一部が生じることで得られた抗体分子の断片；抗体分子あたり2つの Fab' 断片が得られる；(3) (Fab')₂、抗体全体をその後の還元なしにペプシン酵素で処理することにより得られた抗体分子の断片；(4) F(ab')₂、2つのジスルフィド結合により結合された2つの Fab' 断片の二量体；(5) Fv、二本鎖として発現させた、軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含む遺伝的に操作された断片；ならびに(6) 一本鎖抗体 (「SCA」)、遺伝子的に融合した一本鎖分子のように、適当なポリペプチド・リンカーにより連結した軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域を含む遺伝的に操作された分子。これらの断片を作製する方法は通常のものである。

40

【0086】

被検者：多細胞の脊椎生物であり、ヒトおよびヒト以外の哺乳動物の両方を含むカテゴリ。

50

【0087】

標的配列：「標的配列」は *ssDNA*、*dsDNA*、または *RNA* の一部であり、治療的に有効なオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体とのハイブリダイゼーションにより、発現の阻害を生ずるもの。例えば、治療的に有効なオリゴヌクレオチドと *Material* 標的配列とのハイブリダイゼーションにより、*MATER* 発現が阻害される。アンチセンス分子またはセンス分子のいずれかを *dsDNA* の一部を標的化するために用いることができるが、これは両方ともが *dsDNA* のその部分の発現を妨害するためである。アンチセンス分子はプラス鎖に結合でき、センス分子はマイナス鎖に結合できる。従って、*ssDNA*、*dsDNA*、および *RNA* が標的配列になり得る。

【0088】

形質転換：形質転換した細胞とは、分子生物学の手法によって核酸分子を導入した細胞である。本明細書で使用されるように、形質転換という用語は、核酸分子がそのような細胞に導入されるであろう手法の全てを包含し、ウイルス・ベクターによるトランスフェクション、プラスミド・ベクターによる形質転換、ならびに電気穿孔法、リポフェクション、およびパーティクルガン法による裸の *DNA* の導入を含む。

【0089】

ベクター：宿主細胞に導入されることによって、形質転換した宿主細胞を生成するような核酸分子。ベクターは、複製起点などの、それが宿主細胞内で複製できるようにする核酸配列を含んでもよい。ベクターはまた、一つまたは複数の選択マーカー遺伝子、および当技術分野に知られたその他の遺伝的要素を含んでもよい。

【0090】

特に定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術および科学用語は、この発明の属する分野における当業者に一般に理解されるものと同様な意味をもつ。単数用語「1つの(a)」 「1つの(an)」 および「その(the)」 は、文脈において明白に他の意味を示さない限り複数の対象を含む。本発明の実施または試験において、本明細書に記載したものと類似または同等な方法および材料を使用することも可能であるが、以下に適当な方法および材料を記載する。本明細書において言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照として本明細書に組み入れられる。矛盾がある場合は、用語の説明を含む本明細書が統制する。加えて、方法、材料および実施例は、説明的なものにすぎず、限定することを意図するものではない。

【0091】

III. ヒト *MATER* タンパク質および核酸配列

態様は、*cDNA* 配列を含む *MATER* タンパク質および *Material* 核酸分子を提供する。原型的な *Material* 配列はマウス配列およびヒト配列であり、増加または減少したレベルの *MATER* タンパク質を有するトランスジェニック動物を産生するためのそれらの配列の使用法、および *Material* 発現または *MATER* タンパク質産生の異常もしくは変化を検出する診断法を提供する。

【0092】

ヒト *Material* の全長 *cDNA* (配列番号：23) は3900塩基対長と決定され(これはマウス *Material cDNA* よりいくらか長い、*GenBank* アクセション番号 *NM_011860.1*、配列番号：5)、その *ORF* は1200アミノ酸のタンパク質をコードし、約135.2 *kDa* の推定分子量および約6.08の予測 *pI* を有する。ヒト *Material cDNA* は、配列番号：1および配列番号：3に記載の配列を含み、それらはそれぞれマウス *Material* 配列の第7エキソンおよび第11から第15エキソンとほぼ一致すると考えられる。ヒト *Material mRNA* は、インサイチュー・ハイブリダイゼーション実験(実施例3)により示されるように、卵母細胞で発現する。

【0093】

免疫蛍光検査法によって、ヒト *MATER* タンパク質(配列番号：24)が、ヒト卵母細胞に特異的に局在化されていた(実施例4)。*Material cDNA* の *ATG* 開始コドンは、脊椎動物の開始コドンと関連する *ANNA TG* モチーフ(コザック(*Kozak*))、

10

20

30

40

50

1991、J. Biol. Chem. 266:19867)の文脈中に位置する。ヒトMATERタンパク質は、本明細書に記載されるヒトMater cDNA配列(それぞれ配列番号:1および3)に対応する推定タンパク質配列(配列番号:2および4)を含む。それらのタンパク質断片はマウス由来のOP1/MATERタンパク質と、低いながらも有意な配列相同性を有する(GenBank番号NP_035990、配列番号:6)。特に、配列番号:2はマウスMATER(配列番号:6)の257~638残基と54%の同一性を有し、一方、配列番号:4はマウスMATERの854~1111残基と64%の同一性を有する。ヒトMATERタンパク質配列(配列番号:24)は全体としてマウスMATERタンパク質配列(配列番号:6)と約50%の配列類似性を有する; 関連する配列アラインメントは図9に示される。図示したヒトおよびマウスMATERタンパク質間の比較は、BLAST2配列プログラムを期待値10およびフィルターを閉じたパラメータ条件で使用して行った。

【0094】

ヒトMater cDNAの特定の領域は、ヒトHTGSの配列決定法により同定したが、それらの配列には以前に何の機能または同一性も割り当てられていなかった。例えば、GenBankアクセッション番号:AC024580(GI=770510、2000年5月4日公表); AC012107(GI=6088020、1999年10月20日公表、および更新されたGI=7329252、2000年3月28日公表); ならびにAC023887(GI=7631054、2000年4月21日公表)を参照のこと。これらの断片的で重複したヒト配列は、長さにおいて最大207ヌクレオチドであり、マウスMater cDNA配列の全体に渡り散在する。ヒトESTは、短い断続的な領域にわたり、個々に、マウスMater cDNAと最大89%の同一性を有する。開示されたオリゴヌクレオチドは、それらのESTを避けて選択することができる。全体としては、ヒトMaterの最初の75ヌクレオチド(1~75)および対応する推定アミノ酸(1~25)は、公表されたヒトゲノムDNA配列との比較によって決定し、残りのMater配列は、ヒト卵巣cDNAの直接的なクローニングおよび配列決定により決定された。

【0095】

Materは、単一コピーの母性効果遺伝子であり、そのタンパク質産物は初期胚の生存に必要である。MATERタンパク質を欠失する卵は受精可能であるが、早ければ2細胞期には形態学的な変性の徴候が観察され、変異胚はその時期を超えて発達できない。ヒトMATERタンパク質は1200アミノ酸を有し、マウスMATERタンパク質(1111アミノ酸)に見られるような分子ドメインと同様なものを持つと推定される。トン(Tong)ら(Mamm. Genome 11:281-287、2000)に記載されたように、マウスMATERタンパク質は、そのN末端付近における5回の親水性反復(26~27アミノ酸)、短いロイシン・ジッパー、およびそのカルボキシル末端付近における14回のロイシンリッチ反復(28~29アミノ酸)を含む(トン(Tong)ら、Mamm. Genome 11:281-287、2000に記載のように、マウスMATERタンパク質との比較に基づく)。親水性反復は、細胞骨格タンパク質(神経フィラメント)と低い相同性を有し、本領域がMATERを細胞質にとどまらせる相互作用を媒介する可能性を提起する。ロイシンリッチ領域および短いロイシン・ジッパーの存在は、いずれもタンパク質間相互作用を媒介することが知られているモチーフであり(カジャバ(Kajava)、J. Mol. Biol. 277、519-527、1998; ブハナン(Buchanan)およびガイ(Gay)、Prog. Biophys. Mol. Biol. 65、1-44、1996)、MATERが、そのうち一つまたは複数細胞質でMATERに直接結合するような介在因子を通して、胚の発達に影響を及ぼす可能性を示唆する。

【0096】

本発明者らは、マウスMATERペプチド(マウスMATER(配列番号:6)の1093から1111残基まで)に対する抗血清を用いて、ヒトMATERタンパク質がヒト卵

巢切片中の卵母細胞に存在することを証明した(実施例4)。同様に、マウス由来のセンスおよびアンチセンス・ヌクレオチド・プローブをインサイチュハイブリダイゼーション実験に使用して、ヒト卵母細胞がMater mRNAを発現することが証明された(実施例3)。

【0097】

本発明者らは、マウスMATERを、哺乳動物の胚形成における機能に関してさらに特徴づけた。このタンパク質は「母性」タンパク質であり、受精に先立ち卵母細胞で生成され、従って母性遺伝子によりコードされる。MATERは(タンパク質レベルで測定した場合)、胚発生における後期胚盤胞期まで存続するという点で特有である。機能的なMATERは雌の生殖能力に必要とされる; Materヌル卵母細胞から生じた接合体は2細胞期を超えて発達しない; どのようなMater遺伝子型の雄が精子を産生したかに拘らず、このことは当てはまる。本タンパク質は細胞質性であり、明確に核から除外されている。

10

【0098】

本発明は、以下の限定されない実施例によって例示される。

【0099】

実施例1

マウスMATERタンパク質の特徴づけ

本実施例は、哺乳動物の系におけるMATERタンパク質および核酸を調べるためのいくつかの方法を提供する; マウスの系が用いられた。

20

【0100】

方法:

卵母細胞、卵および胚の単離 全ての実験は、動物実験委員会(Animal Care and Use Committee)のガイドラインに準拠して、認可された動物研究プロトコルのもとで実施された。休止期、成長期、および成熟した卵母細胞は、1日齢、10日齢、および21日齢(d/o)マウス卵巢からそれぞれ解剖分離し、卵は、ゴナドトロピンで刺激した雌マウスから単離した(トン(Tong)ら、J. Biol. Chem. 270: 849-853、1995; ランキン(Rankin)ら、Development 125: 2415-2424、1998)。胚はゴナドトロピンで刺激した雌マウスを雄と交配することにより得られ、1細胞接合体、2細胞胚、桑実胚、および胚盤胞は、hCGを投与した次の朝を1日目とカウントし、1日目、2日目、3日目、および4日目に卵管より洗い流した。胚は、M16培地で培養し(37、5%CO₂)、1%パラホルムアルデヒドで固定してその後の共焦点顕微鏡検査に供するか、または-80で凍結し、RNAおよびタンパク質の解析に供した。卵巢を固定し(10%ホルマリン)、パラフィンに包埋した後、切片標本の作製し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した(アメリカンヒストラボ(American Histlabs)、Gaithersburg、Maryland)。

30

【0101】

転写物およびタンパク質の検出 Mater、ZP3、 α -アクチン、シクロフィリン、および28S-rRNAの転写物は、RPA I Iキット(アンピオン(Ambion)、Austin、TX)を用いて、既に記載されたように(トン(Tong)およびネルソン(Nelson)、Endocrinology 140、3720-3746、1999; トン(Tong)ら、J. Biol. Chem. 270、849-853、1995)、RNアーゼ保護アッセイ法によって検出した。

40

【0102】

ウサギはKLHを結合したMATERペプチド(アミノ酸1093~1111)によって免疫し、単一特異性抗血清を得た。免疫プロットをMATER抗血清とインキュベート(1:1000、2時間、20)した後、抗体の結合はHRP結合ヤギ抗ウサギ抗体を用いてECLで検出した(アマシャムファルマシアバイオテク(Amersham Pharmacia Biotech)、Piscataway、NJ)。固定した卵母細胞、

50

卵、または胚は、MATER抗血清とインキュベート(1:8000、4、16時間)し、Cy⁵結合ヤギ抗ウサギIgG(1:200)を用いて共焦点レーザー走査型顕微鏡(LSM5、ツァイス(Zeiss)、Thornwood、NY)で画像化した。

【0103】

タンパク質合成および免疫プロットイング 胚は、L-³⁵Sメチオニン(0.5Ci/ml、アマシャム(Amersham))を含む100μlのM16培地中で、37、4時間インキュベートした。放射性同位体による標識化の最後に、1細胞胚および2細胞胚を、hCG/交配後それぞれ26時間および48時間において回収した。1%BSAを含む10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mMEDTA、および140mM NaClで洗浄後、10個の胚を10μlの試料緩衝液に、(1)直接、または(2) 2% Triton X-100/0.3M KClで処理してTRCおよびp35を抽出した後に、直接溶解した(コノバー(Conover)ら、Dev. Biol. 144、392-404、1991)。既に報告されたようなSDS-PAGEおよびフルオログラフィー(トン(Tong)ら、J. Biol. Chem. 270:849-853、1995)の後、放射能の取り込みを、ホスホイメージャーおよびイメージクアント・ソフトウエア(ImageQuant software)(モレキュラーダイナミクス(Molecular Dynamics)、アマシャムファルマシアバイオテック(Amersham Pharmacia Biotech)、Piscataway、NJ)により判定した。

10

【0104】

Materヌル・マウスの産生 Materヌル・マウスを産生するのに用いる構築物を図2に示した。pPNT(Tybulewiczら、Cell 65、1153-1163、1991)において標的化ベクターを構築するため、マウスMaterの最初の2つのエキソンを含む1.5kbpのSacI-EcoRI DNA断片(トン(Tong)ら、Mamm. Genome 11、281-287、2000)をPGK-NeoとPGK-TKカセットの間に挿入し、エキソン3および4を含む2kbpのEcoRI-BamHI断片をPCK-Neoの上流に挿入した。直鎖状にして、胚性幹(ES)細胞への電気穿孔法(レッドモンド(Redmond)ら、Nat. Genet. 20、344-351、1998)の後、化学的に選別したクローンにおける変異対立遺伝子の存在を、5'および3'(またはNeo)プローブにより、それぞれ3.5kbpおよび4.0kbpのXbaI断片として検出した。その5'および3'プローブは、いずれも正常対立遺伝子を9.4kbのXbaI断片として検出する。別々に選別した5つのクローンに由来する8から12個のES細胞を、C57BL/6の胚盤胞に注入した。毛色キメラ動物を生じる2つの細胞系統をC57BL/6の雌と交配させ、生殖細胞系を通じてMater変異を伝達した。ホモ接合型ヌルの雌におけるMater転写物の欠如は、既に記載されるように、ノーザン・プロット解析によって確認した(トン(Tong)およびネルソン(Nelson)、Endocrinology 140、3720-3726、1999)。

20

30

【0105】

生殖の実行 6~10週齢の雌マウスにおける4回またはそれ以上の発情周期を調べるため、毎日膣スミアを得た(ルフ(Rugh)、「マウス:生殖と発生(The Mouse: Its Reproduction and Development)」210、Oxford University Press、Oxford、1991)。稔性の雄との交配の翌朝、交尾行動は膣栓の存在により評価した。

40

【0106】

接合体遺伝子転写アッセイ法 基本的に既に記載されたとおりに(ブーニオル(Bouniol)ら、Exp. Cell Res. 218、57-62、1995)、hCGおよび交配に続いて28時間(1細胞胚)および48時間(2細胞胚)で単離した胚の細胞質に、100mM BrUTP、140mM KCl、および2mM Pipes、pH7.4の5~10pIアリコートマイクロインジェクションした。M16培地中で、5%

50

CO₂ において37 1時間インキュベーションした後、インジェクションを行った胚を1%パラホルムアルデヒドで固定した。

【0107】

RNAへのBrUTP取り込みは、マウス抗BrdUモノクローナル抗体(シグマ(Sigma)、1:1000、16時間、4)でアッセイした。3%BSAを含むPBSで洗浄後、FITC結合ヤギ抗マウスIgG抗体を用いて、共焦点顕微鏡により胚を画像化した；蛍光は任意の単位で記録した。モノクローナル抗体が核小体にほとんど浸透しないため、リボゾームRNAへのBrUTP取り込み測定が不能であることから、本アッセイ法は主として新規のRNAポリメラーゼII活性を反映する(ワンシンク(Wansink)ら、J. Cell Biol 122、283-293、1993)。

10

【0108】

結果

Mater 転写物およびタンパク質発現

Mater mRNAは、卵母細胞が成長期に入る時(30~50 μm)に最初に検出された(図1A)。Mater 転写物は、完全に成長した卵母細胞(70~85 μm)において最も豊富であり、多くの卵母細胞転写物と同様に(バックバロバ(Bachvarova)、「発生生物学：卵形成(Developmental Biology: Oogenesis)」1、453-524、Plenum Press、New York、1985；エピファノ(Epifano)ら、Development 121、1947-1956、1995)、成熟分裂およびそれに続く排卵の間に分解した。Mater mRNAは初期胚では検出されなかった(図1A)が、初期胚由来のESTデータベースにこれが存在することは一部の転写物が分解を免れていた可能性を示唆する。

20

【0109】

卵形成の間におけるMATERタンパク質の最初の蓄積は、Mater 転写物において観察されたものと同様であった(図1Aと図1Bを比較のこと)。しかしながら、転写物の実際の消失とは異なり、MATERタンパク質は、着床前の発生の間、後期胚盤胞期まで持続した(図1B)。共焦点顕微鏡によると、MATERタンパク質は成長中の卵母細胞の細胞質に局在し、核からは著しく除外されていた。MATERは、卵母細胞および初期胚(1および2細胞期)の皮質領域内に濃縮されており、この周辺性パターンは着床前発生の後期まで持続し、内側の胚盤胞細胞塊に比して外側の栄養外胚葉細胞でMATERが高濃度であった(図1C)。

30

【0110】

Materヌル動物

MATERタンパク質の機能を明らかにするために、ホモ接合型の雌がMater 転写物またはタンパク質のいずれも発現しないようなMaterヌル・マウス系統を作出した。Materヌル・マウスは、期待されるメンデル比において、等しい性比率で産まれた。誕生から成獣期まで、表現型の異常は観察されなかった。

【0111】

Materヌル・マウスの卵巣および子宮は形態学的に正常であった(図6)。Materヌルの卵巣は、原始卵胞の正常必要量を有しており、卵胞発生の全ての期が正常に示された；自発排卵を経たことを示す黄体も存在した(図5)。

40

【0112】

Materを欠失した卵はインピボで正常に受精した(図1)。Materヌルの雌由来の接合体および2細胞胚の数および形態は、正常の雌由来のそれらと同様であった(図5)。しかしながら、交配から3日または4日後までに、Materヌルの雌由来の胚は、2細胞期にとどまるか、または変性し始めていた(図3Dおよび図3Gを、図3Eおよび図3Hと比較のこと)。従って、受精はMaterヌルの雌において正常であり、結果として生ずる接合体は最初の卵割を経て進行することができるが、それに続く発生は2細胞期において停止する。これは初期胚形成の停止が、Materヌルの雌における不妊の原因であることを示す。

50

【0113】

Materヌル変異を持つ2つのマウス系統(T54およびT85)を作出したが(図2Aおよび図2B)、ホモ接合型ヌルの雌において、Mater転写物(図2C)またはタンパク質(図2D)のいずれも検出されなかった。

【0114】

Materヌル動物の生殖表現型

ヘテロ接合体Materヌルの親の交配により平均数の同腹仔(8.5 ± 1.9)が生まれ、子孫のヌル対立形質は正常なメンデル比および等しい性比率であった。ホモ接合型ヌル動物は正常な様相を呈し、雄は正常の同腹仔と同程度に稔性であった。しかしながら、ホモ接合型ヌルの雌は交配後5月後でも仔を産出せず(表1)、このことはMaterが母性効果遺伝子であることを示唆した。

【0115】

【表1】Mater変異を持つマウスの生殖能力およびメンデル対立遺伝子比

交配対	n*	同腹仔数 平均±標準誤差	メンデル比		
			+/+	+/-	-/-
♂ x ♀					
<i>Mater</i> ^{+/+} x <i>Mater</i> ^{+/+}	11	7.5 ± 1.8	1.00	0	0
<i>Mater</i> ^{+/+} x <i>Mater</i> ^{+/-}	10	7.4 ± 1.9	n.d. [†]	n.d.	n.d.
<i>Mater</i> ^{+/+} x <i>Mater</i> ^{-/-}	9	0	n.a. [‡]	n.a.	n.a.
<i>Mater</i> ^{-/-} x <i>Mater</i> ^{+/+}	8	7.6 ± 2.4	0	1.00	0
<i>Mater</i> ^{-/-} x <i>Mater</i> ^{+/-}	18	8.4 ± 1.9	0	0.47	0.53
<i>Mater</i> ^{+/-} x <i>Mater</i> ^{+/-}	15	8.5 ± 1.9	0.21	0.57	0.22

* n、交配対の数、[†] n.d.、行っていない、[‡] n.a.、当てはまらない。

【0116】

性的に成熟したMaterヌルの雌は、規則的な 5.67 ± 0.22 日の発情周期を示し、正常の雌において観察された周期(5.40 ± 0.23 日)と同様であった。Materヌルの雌または正常の雌のいずれにおいても、稔性の雄への接触後に約70%で膣栓が出現したことから証明されるように、交配は正常に生じた。Materヌルの卵巣は、正常必要量の原始卵胞を有しており、自発排卵を経たことを示す黄体のみならず、卵胞発生の全ての段階が存在した(図5Aおよび図5B)。加えて、Materヌルの雌は、外因性のゴナドトロピンによる刺激の後、正常に排卵した。しかしながら、ホモ接合型ヌルの雌は、正常の雄との交配後5ヶ月目にも仔を産生せず、一方ホモ接合型ヌルの雄とヘテロ接合型ヌルの雌は、正常な生殖能力を有した。

【0117】

ヌルの雌から回収された排卵した卵の平均数(±標準誤差)(27.6 ± 4.5 、 $n=14$)と、正常の雌から得られた平均数(27.7 ± 4.3 、 $n=12$)とに統計的な差異はなかった($p > 0.05$)(図5D)。その2つの群の卵は形態学的に互いに区別がつかなかった(図5C)。

【0118】

Materヌル動物における受精と胚発生

インピボの受精および初期発生を評価するために、正常の雄と交配後1日目、2日目、3日目、および4日目に、正常およびMaterヌルの雌から胚を単離した。2つの前核の存在から証明されるように(矢印、図3Aおよび図3B)、MATERを欠失した卵において受精が生じた。Materヌルの雌からインピボで得られた1細胞接合体および2細胞胚の数および形態は、正常の雌から得られた数および形態と同様であったが、2細胞変異胚では、細胞質顆粒が表れ(図3A~図3F)、健康状態が悪いように思われた。交配から3日または4日後のMaterヌルの雌から得られた胚は、依然として2細胞期に止まっていた(または変性を始めていた)が、一方で、正常マウス由来の胚は、それぞれ桑実胚または胚盤胞期まで発達していた。Materヌルおよび正常の雌由来で同じ割合%

(~ 70%) の受精 1 細胞接合体が、インビトロで 2 細胞期まで発達した。しかしながら、培養 4 日後では、MATER を欠失した胚は 2 細胞期で停止したままであった (大部分は変性されていた) (図 3 K) ; 正常の雌からの胚は、同じ時期に胚盤胞期まで成長していた (図 3 J) 。従って、受精は正常と思われ、MATER を欠失した接合体は最初の卵割を経て発達することができても、それに続く胚発生は 2 細胞期において停止する。

【 0 1 1 9 】

Mater ヌル動物における転写の特徴づけ

Mater ヌル・マウスに見られる初期停止の表現型は、RNA ポリメラーゼ II に結合してジヌクレオチドを超える転写伸長を抑制 (バイシアス (Vaisius) およびウィーランド (Wieland) 、 Biochemistry 21, 3097 - 3101、1982) するキノコ毒である アマニチン (シュルツ (Schultz) 、 Bioessays 15 : 531 - 538、1993 ; フラッハ (Flach) ら、EMBO J . 1, 681 - 686、1982) にマウス胚を曝露した後に生ずる、2 細胞期における遮断を連想させる。正常な胚転写は 1 細胞接合体の後期において 2 細胞胚の転写の ~ 20% のレベルで最初に検出されるが (Aoki ら、Dev. Biol. 181, 296 - 307、1997) 、それらの初期転写物は、全てであるにしても、不十分にしかタンパク質に翻訳されない (ノシアス (Nothias) ら、EMBO J . 15, 5715 - 5725、1996) 。

10

【 0 1 2 0 】

初期 Mater ヌル胚の新規の RNA ポリメラーゼ II 活性を評価するため、プロモUTP (BrUTP) の取り込みを、本質的には既に記載されたように (ブニオル (Bouniol) ら、Exp. Cell. Res. 218, 57 - 62、1995) 、BrUTP 特異的なモノクローナル抗体により共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてアッセイした (ブニオル (Bouniol) ら、Exp. Cell. Res. 218, 57 - 62、1995) (図 4 A ~ 図 4 G) 。交配後 28 時間 (図 4 B) および 48 時間 (図 4 D) において正常の胚の核内に検出される BrGUP の量は、MATER を欠失した場合 (図 4 A および図 4 C) に比べ、形態学的に劇的な違いがあった。MATER を欠失した胚における BrUTP の取り込みは、非注入対照群 (図 4 E および図 4 F) より僅かに高く、新規の転写は、正常 2 細胞胚で観察された転写の 5% 未満であった (図 4 G) 。

20

【 0 1 2 1 】

Mater ヌル動物における TRC の特徴づけ

成熟分裂と排卵の間、正常マウスにおいては、母性 RNA の 50% より多くが失われる (バックバロバ (Bachvarova) 、 「 発生生物学 : 卵形成 (Developmental Biology : Oogenesis) 」 1, 453 - 524、Plenum Press、New York、1985) 。この分解過程は、MATER を欠失した雌においても、リボゾーム RNA (図 4 H) および少なくともいくつかの mRNA (アクチン、ZP3、シクロフィリン、および GAPDH) の損失が起こる。通常、それに続く 2 細胞期における胚ゲノムの活性化に先立ち、一部の遺伝子産物が一過性に転写および翻訳され、それらのうちいくつかは特徴的な転写関連複合体 (Transcription Related Complex : TRC) を形成する (ボルトン (Bolton) ら、J. Embryol. Exp. Morphol. 79 : 139 - 163、1984 ; ノシアス (Nothias) ら、EMBO J . 15 : 5715 - 5725、1996 ; コノバー (Conover) ら、Dev. Biol. 144 : 392 - 404、1991) 。この複合体は、初期 2 細胞胚において最初に観察されるが、アマニチンの存在下では形成されない。

30

40

【 0 1 2 2 】

TRC をアッセイするために、正常の雄と交配した Mater ヌルの雌に由来する 1 および 2 細胞胚を ³ ⁵ S メチオニンとインキュベートした。正常の 1 細胞接合体と MATER を欠失した 1 細胞接合体との比較では、³ ⁵ S メチオニン取り込み量、またはタンパク質特性において、全体的な違いは認められなかった (図 4 I、左パネル) 。MATER を欠

50

失した胚で2細胞期にTRC複合体が検出されるが(図4I、中央パネルおよび右パネル)、それらはいくぶん欠乏し(正常の~60%)、MATERを欠失した胚における異常なタンパク質合成を反映している可能性がある。このことは、MATERが、初期胚における全ての転写-翻訳装置の開始に絶対的に重要というわけではないことを示す。

【0123】

転写の著しい減少は、胚の全体的な病的状態を反映する可能性もあるが、全く健全に見える1細胞接合体において同様な減少があるほか、新規のタンパク質合成が同様な劇的減少を示さないこと(図4I)も、転写の減少がMATERの欠如に直接または間接的に起因することを示す。

【0124】

哺乳類MATERの提案される機能

哺乳類のMATERタンパク質のロイシンリッチ反復ドメインとブタのリボヌクレアーゼ阻害因子との相同性は、MATERが細胞質RNAアーゼの阻害因子として働く可能性を示す。このことが事実であれば、MATERを欠失した胚のRNAは、広範な分解を受ける可能性があり、おそらく初期胚における母系から接合体への遷移の間に生じるRNAの正常な代謝回転が強調されると思われる。転写に必要なタンパク質をコードするRNAを含むRNAの分解は、Materヌル胚で観察される表現型を説明するかもしれない。しかし、Materを欠失していても、変異胚は^{3 5}Sメチオニンをタンパク質に取り込み、正常胚と比べてタンパク質特性に主要な違いが観察されないため、この可能性はありそうにない。これらの結果は、タンパク質合成に補助するのに十分なmRNA、tRNA、およびリボゾームRNAが変異胚に存在することを示すが、初期胚の生存に必要な一群の標的RNAの分解は阻害されないことを示す。

【0125】

2細胞胚における転写依存性のタンパク質合成は、2つの期において生じる：TRCタンパク質の出現により特徴づけられる初期の主要ではない活性化(最初の有糸分裂から2時間~4時間後)、およびG₂において生ずる後期の主要な活性化(最初の有糸分裂から8時間~10時間後)。後者の活性化は、2細胞期を超えて発達するために必要な発生プログラムを開始する(シュルツ(Schultz)、Bioessays 15、531~538、1993)。MATERを欠失した胚で観察された胚転写の減少は、転写装置の変性、ゲノムDNAへのアクセスの低下、または核内のクロマチン鑄型における異常に起因する可能性がある。しかし、Materヌル動物におけるTRCタンパク質の存在は、MATERが2細胞胚における転写依存性タンパク質合成の初期局面を決定づけるものではないことを示唆する。それはさらに、転写装置および核DNAにアクセスする能力が、Materヌル胚においておおむね損なわれていないことを示唆する(転写が活発であるMaterヌル卵母細胞と同様)。

【0126】

初期の爆発的な転写の結果生じるTRCタンパク質は、核に関連する(シュルツ(Schultz)、Bioessays 15、531-538、1993)。これらのタンパク質は、MATERを含む機序を介して、2細胞期を超えて発達するのに必要な後期転写抑制を解除する可能性がある。加えて、マウスの卵母細胞および1細胞胚は、2細胞胚におけるエンハンサー依存性転写に必要なコアクチベータを欠失していることが報告されている(ローウィンガー(Lawinger)ら、J. Biol. Chem. 274、8002-8011、1999)。それらのコアクチベータの性質については知られていない；それらは、以前から存在する母性タンパク質の修飾か、または2細胞胚における初期転写依存性のタンパク質合成によって生ずるのかもしれない。そのような過程に細胞質のMATERが関与するかもしれない。または、MATERは、2細胞期を超えた細胞周期の進行に必要な一つまたは複数の相互作用に関与するかもしれない。MATERと相互作用するタンパク質の同定および特徴づけをすることによって、胚の生存および初期発生の促進における母性タンパク質の役割に関する洞察が得られると考えられる。

【0127】

10

20

30

40

50

Mater は、初期の哺乳類の発生において不可欠な役割を果たすことが証明された最初の母性効果遺伝子であり、観察された生殖不能の表現型は、同様な分子の欠如によってヒトの生殖不能が生じ得る可能性を提起する。

【0128】

実施例 2

ヒト Mater cDNA の同定

ヒト Mater cDNA は、マウス Mater cDNA 配列との相同性に基づき、NCBI および米国国立医学図書館 (National Library of Medicine) によって維持されるヒトハイスルーブットゲノム (HTG) 配列の収集情報を検索することにより同定した。本発明者らは、この検索によって単離された不連続なヌクレオチド断片を用いてオリゴヌクレオチドプライマー対を考案し (例えば、配列番号: 7 および 8、19 および 20、21 および 22)、それらを用いて、標準的な手法の利用により、精製したヒト卵巣 DNA または mRNA / cDNA から Mater 配列を増幅し、さらにヒト cDNA ライブラリーから部分的な cDNA クローンを単離した。

10

【0129】

ヒト Mater cDNA の二つの長さの断片配列を配列番号: 1 および 3 に示す。それらの二つの長い cDNA 断片を合わせると、完全ヒト Mater cDNA のうちの 2213 ヌクレオチドを構成する。

【0130】

cDNA 断片 1 (配列番号: 1) および断片 2 (配列番号: 3) がコードする推定ヒト MATER タンパク質部分は、それぞれ配列番号: 2 および 4 に示す。

20

【0131】

それらの配列を用いて、残りのヒト Mater cDNA を同定した; 全長 cDNA の配列を、配列番号: 23 に示す。全体として、ヒト Mater の最初の 75 ヌクレオチド (1 ~ 75) および対応する推定アミノ酸 (1 ~ 25) は、公表されたヒトゲノム DNA 配列との比較により決定し、残りの Mater 配列は、ヒト卵巣 cDNA の直接的なクロニングおよび配列決定により決定した。ヒト MATER タンパク質の完全配列を配列番号: 24 に示す。

【0132】

実施例 3:

ヒト Mater 転写物の局在性

本実施例は、ヒト Mater 転写物の発現を検出するための方法を提供する。

30

【0133】

インサイチュール・ハイブリダイゼーション・プローブを産生するために、ヒトゲノム DNA を以下のプライマーを用いて増幅した:

5'-プライマー: 5'-TTTCACATGAACATCCITCTCC-3' (配列番号: 7);

3'-プライマー: 5'-AGTGCTGGAGGCAGAAGGAAG-3' (配列番号: 8).

得られた増幅核酸分子産物の大きさは 496 bp であったが、マウス Mater エキソン - イントロン地図との比較に基づき、これはヒト Mater 遺伝子の第 7 エキソン中に含まれると予測される。この断片を DNA 鋳型として pBluscript ベクターにサブクローニングした。³ ⁵ S - UTP 標識したセンス配列およびアンチセンス配列は、いずれも T3 および T7 RNA ポリメラーゼを用いてインビトロ転写により合成した。

40

【0134】

インサイチュール・ハイブリダイゼーションは、本質的には既に記載したように行った (トング (Tong) およびネルソン (Nelson)、Endocrinology 140: 3720 - 3726、1999)。簡単に記すと、プローブはアルカリ加水分解により調製し、凍結ヒト卵巣切片と 60 で 24 時間ハイブリダイズした。スライドガラスは、Kodak NTB - 2 エマルジョンに浸した後、フィルムに 2 ~ 3 日間露出してオートラジオグラフを現像した。

50

【0135】

凍結ヒト卵巣切片は、放射標識したセンスプローブ（図7Aおよび図7C）およびアンチセンスプローブ（BおよびD）とハイブリダイズさせた。スライドガラスは、ヘマトキシリンおよびエオシンにより染色した。おのおののプローブにつき、明視野（AおよびB）および暗視野（CおよびD）の画像が示されている。Mater転写物は卵母細胞に局在化していた。

【0136】

実施例4：

ヒトMATERタンパク質の局在性

本実施例は、ヒトMATERタンパク質の局在性を検討するための方法を提供する。

10

【0137】

インサイチュー局在化は、基本的にマウス試料について記載されたように行った（トン（Tong）およびネルソン（Nelson）、Endocrinology 140:3720-3726、1999年）。簡単に記すと、マウスMATERのC末端ペプチドに対するウサギポリクローナル抗体（配列番号：6の1093残基から1111残基まで）を、実施例9Cに記載のように調製した。凍結ヒト卵巣切片をこの抗血清（1:200）とインキュベートし、2次抗体としてFITC結合ヤギ抗ウサギIgG抗血清を用いて、卵母細胞中のヒトMATERタンパク質を検出した（図8A）。図8Bは、図8Aに示す試料に対応する位相差顕微鏡像を示す。

【0138】

実施例5：

ヒトMater cDNAを作製する方法

Mater cDNAを同定し取得した最初の方法は、先に記載されている。MATERタンパク質の大部分の配列（配列番号：2および4）およびコードする核酸分子（配列番号：1および3）の供給において、現在ではヌクレオチドの増幅（ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）など）を、Mater cDNAを産生する簡単な手段として利用することができる。

【0139】

総RNAは、当業者に周知の様々な方法のうちいずれか一つによって、ヒト細胞から抽出される。サンプロック（Sambrook）ら（「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、CSHL、New York、1989）およびオスベル（Ausubel）ら（「分子生物学の最新プロトコール（Current Protocols in Molecular Biology）」、Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences、1992）により、RNA単離の方法が記載されている。MATERは卵母細胞で発現するため、卵母細胞または卵巣由来のヒト細胞株は、そのようなRNAの供給源として使用できる。抽出されたRNAは次にcDNAの逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）増幅を行うための鋳型として用いられる。RT-PCRの方法と条件はカワサキ（Kawasaki）ら（「PCRプロトコール、方法と応用へのガイド（PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications）」、Innis）ら編、21~27頁、Academic Press Inc.、San Diego、California、1990）により記載されている。

30

40

【0140】

増幅プライマーの選択は増幅をするcDNAの部分に基づいて作製されると考えられる。プライマーはcDNAのセグメント、またはcDNA分子全体を増幅するために選択することができる。異なる長さや組成のプライマーおよび単位複製配列に適應させるために、様々な増幅条件が必要とされる：そのような考察は当技術分野に周知であり、例えばインスら（「PCRプロトコール、方法と応用へのガイド（PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications）」、Academ

50

ic Press Inc.、San Diego、CA、1990)に記載されている。
一例として、ヒトMATER cDNA分子のコード領域の大部分(約2.8kb)を、
以下のプライマーの組合せにより増幅することができる:

5'プライマー(推定される第7エキソンの一部):

5'-CAGGAATTGGGAAATCGGCTCTCTAG-3'(配列番号:9);

3'プライマー(推定される第15エキソンの末端):

5'-CCAAATGCTTTGTGTTTATTTAATTCC-3'(配列番号:10).

当業者は、既知の技術を用いてcDNA全体を増幅するために用いることが可能なプライマーを考案するために、本明細書に提供される全長ヒトMater cDNA配列(配列番号:23)を使用することができる。 10

【0141】

以下の4つのプライマーセットは、ヒトMater cDNAの5'末端の~950bpを増幅するために用いることができる。

【0142】

5'プライマーは、以下のような5'-RACE-PCRのための共通アダプター・プライマー(ADP)である(OriGene Technologies, Inc.、Rockville, MD):

ADP1: 5'-CGGAATTCGTCAGCG-3'(配列番号:11)

ADP2: 5'-AGCGCGTGAATCAGATCG-3'(配列番号:12) 20

【0143】

3'プライマーは、以下のような第7エキソン内のヒトMATER cDNAの遺伝子特異的プライマー(GSP)である:

GSP1: 5'-ATTCCCTGGTAGAGTCCACCTTGC-3'(配列番号:13)

GSP2: 5'-ACAGCACGATCCTTCTGGCTAGAG-3'(配列番号:14).

【0144】

GSP1はヒト卵巣RNAの逆転写のためのプライマーとしてcDNAの合成に使用される。次に逆転写されたcDNAの5'末端にADP1プライマーを結合させ、ADP1およびGSP1プライマーを用いて1巡目のPCRの増幅を行う。1巡目のPCR産物を鋳型として、ADP2およびGSP2をプライマーとして用い、2巡目のPCR増幅を行う。 30

【0145】

ヒトMater cDNA(配列番号:1)の断片1は、以下のプライマーの組合せを用いて増幅してもよい:

5'プライマー: 5'-CAAGCTCCGGTGACGGAGATCAT-3'(配列番号:15);

3'プライマー: 5'-AGCTGGAGGCAGAAGGAAGATG-3'(配列番号:16).

【0146】 40

ヒトMater cDNA分子の3'末端領域(本明細書ではヒトMater cDNA断片2、配列番号:3とも呼ばれる)は、以下のプライマーの組合せを用いて増幅してもよい:

5'プライマー: 5'-TCTGGCCTCAGCCCTCGTCAGCTTGAC-3'(配列番号:17);

3'プライマー: 5'-CCAAATGCTTTGTGTTTATTTAATTCC-3'(配列番号:18).

【0147】

これらのプライマーは例示のためのものにすぎない;ヒトMater cDNAの配列を完全にするためのみならず、Mater cDNAの特定の指定領域を増幅するために、多くの異なるプライマーを、提供されたDNA配列から導き出すことが可能なことが当業 50

者に理解される。

【0148】

これらの増幅手段により得られたPCR産物は、再び配列決定することが推奨される；増幅した配列の確認が容易になり、この配列における異なる集団または種間での自然変異についての情報が得られるためである。提供されたMater配列に由来するオリゴヌクレオチドは、そのような配列決定に使用することができる。

【0149】

ヒトMaterのオルソログを同様の方法でクローニングすることができ、この場合はヒト以外の種から得た細胞を含む出発材料を用いる。オルソログは、通常、開示されたヒトMater cDNAと少なくとも80%の配列相同性を有する。ヒト以外の種がヒトとより近縁関係にある場合、一般に配列相同性はより高いと考えられる。近縁関係のオルソログ的なMater分子は、開示されたヒトMater cDNAと少なくとも82%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも93%、少なくとも95%、または少なくとも98%の配列相同性を有する可能性がある。

【0150】

ヒトMater cDNA配列（配列番号：23）に由来するオリゴヌクレオチド、またはその断片（例えば配列番号：1および3など）は、本開示の範囲内に含まれる。好ましくは、そのようなオリゴヌクレオチド・プライマーは、Mater核酸配列の少なくとも23個の連続したヌクレオチドの配列を含む。増幅の特異性を高めるために、それらの配列の少なくとも25個、30個、35個、40個、45個、または50個の連続したヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド・プライマーを用いることもできる。例えばそれらのプライマーは、開示された配列の任意の領域から得ることができる。一例として、ヒトMater cDNA、ORF、および遺伝子配列は、配列の長さに基づき半分または4分の1に分割でき、単離核酸分子（例えばオリゴヌクレオチド）はこの分子を半分にしたうちの一つ目もしくは二つ目、または四半分にしたうちの任意のものから得ることができる。このことを例示するために、配列番号：5に記載のマウスMater cDNAを用いることができる。ヒトMater cDNAは3447ヌクレオチド長であり、従って仮定上およそ半分（ヌクレオチド1～1723、および1724～3447）、あるいは約四半分（ヌクレオチド1～862、863～1723、1724～2586、および2587～3447）に分けることができる。ヒトcDNAは同様に分割することができ、または本明細書に提示した断片で表すことができる（例えば、断片1、マウスMaterのヌクレオチド約1700から約1950までに対応；およびヒトcDNAの断片2、マウスMater cDNAの3'末端領域、マウスMater cDNAのヌクレオチド約2500からポリA尾部までに対応）。

【0151】

核酸分子はヒトMater cDNAまたは他の部分のうち任意の、少なくとも15個、20個、23個、25個、30個、35個、40個、50個、または100個の連続したヌクレオチドを含むように選択できる。従って、代表的な核酸分子は、ヒトMater cDNA（配列番号：23）の少なくとも15個の連続したヌクレオチド、または開示されたヒトMaterコード配列の断片1もしくは断片2（それぞれ配列番号：1および3）を含む可能性がある。

【0152】

実施例6

Materゲノム配列（または遺伝子）のクローニング

上述のMater cDNA配列および断片は、Mater遺伝子のイントロン、上流の転写プロモーターもしくは調節領域、または下流の転写調節領域を含まない。胚発生の異常、不妊、または生殖能力低下につながるMater遺伝子の一部の変異は、cDNA内ではなく、Mater遺伝子の他の領域内に位置する可能性がある。MATERタンパク質をコードするオープン・リーディング・フレームの外部に位置する変異は、おそらくタンパク質の機能的活性に影響せず、むしろ細胞内のタンパク質レベルの変化をもたらすと

10

20

30

40

50

思われる。例えば、M a t e r 遺伝子のプロモーター領域内の変異は、遺伝子の転写を阻害し、その結果、細胞内のM A T E Rタンパク質の完全な欠如をもたらす可能性がある。

【0153】

加えて、ゲノム遺伝子のイントロン配列内の変異もまたM A T E Rタンパク質の発現を阻害する可能性がある。イントロンを含む遺伝子の転写に続き、イントロン配列は、R N A分子の翻訳に先立つスプライシングと呼ばれる過程でR N A分子から除かれ、その結果コードタンパク質が産生される。イントロンを除くためにR N A分子をスプライシングする場合に、スプライシング機能を行う細胞の酵素は、イントロンとエキソンの境界の周辺の配列を認識し、そのようにして適切なスプライシング部位を認識する。イントロンとエキソンの接合部に近いイントロン配列内に変異がある場合、酵素はその接合部を認識できない可能性があり、イントロンを除くことができない可能性がある。これが生じた場合に、コードタンパク質は異常を有する可能性があると考えられる。従って、M a t e r 遺伝子のイントロン配列内部の変異(「スプライシング部位変異」と呼ばれる)もまた胚発生の異常の原因となる可能性がある。しかし、それらの異常性の分子的基盤を明確化するために、M a t e r 遺伝子のエキソン構造およびイントロンのスプライシング部位の配列について知識が必要とされる。本明細書におけるM a t e r c D N A配列の提供により、M a t e r 遺伝子全体(プロモーターおよび他の調節領域ならびにイントロン配列を含む)のクローニングおよびそのヌクレオチド配列の決定を可能にする。この情報が得られた場合、D N A分析に基づく生殖能力の異常に対する遺伝的素因の診断は、M a t e r 遺伝子座における全ての可能性のある変異事象を包含すると考えられる。

10

20

【0154】

M a t e r 遺伝子は、M a t e r 配列を含む一つまたは複数のB A CまたはP A Cクローンの直接的配列決定を含む、一つまたは複数の従来法によって単離することができる。

【0155】

ヒトM a t e r c D N Aおよび遺伝子の配列が得られた場合、それらの配列に由来するプライマーを、患者のゲノムM a t e r 遺伝子の任意の部分における変異の存在を判定するための診断検査(以下に記載)に用いることが可能である。そのようなプライマーは、M a t e r 遺伝子配列の断片(イントロン配列、エキソン配列、またはイントロンとエキソンの境界にまたがる配列)を含むオリゴヌクレオチドであると考えられ、M a t e r c D N Aまたは遺伝子の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含みうる。より長いプライマーを使用することにより、より高い特異性が得られる可能性があることが理解されると思われる。従って、より一層の特異性を得るために、使用されるプライマーは、M a t e r c D N Aまたは遺伝子の15個、17個、20個、23個、25個、30個、40個、またはさらに50個の連続したヌクレオチドを含むことができる。さらに、M a t e r イントロン配列情報の提供により、ミスマッチ化学切断(コットン(C o t t o n)ら、P r o c . N a t l . A c d . S c i . U S A 85:4397-4401、1985;モンタンドン(M o n t a n d o n)ら、N u c l e i c . A c i d s R e s . 9:3347-3358、1989)および1本鎖D N A高次構造多型解析(オリタ(O r i t a)ら、G e n o m i c s 5:874-879、1989)のような方法を使用して、大きく、未だ行われていない患者材料の供給源についての変異解析が可能になると考えられる。

30

40

【0156】

M a t e r 遺伝子に隣接する調節要素の同定および特徴づけをするために追加の実験を行ってもよい。推定調節領域のヌクレオチドを除き、その欠失の効果を一過的または長期的な発現解析実験により検討する欠失分析を含む標準的手法を用いて、それらの調節要素を特徴づけることができる。ゲノムM a t e r 遺伝子に隣接した調節要素の同定および特徴づけは、一過的または長期的な発現解析による哺乳動物細胞の機能的実験(欠失分析など)によって実施することができる。

【0157】

ゲノムクローン、c D N A、またはそれらのクローンに由来する配列のいずれかが、M a

50

t e r 遺伝子発現の研究、M A T E R タンパク質機能の研究、M A T E R タンパク質に対する抗体の産生、胚発生の異常を防ぐかまたは治療するためのM A T E R が欠失または変異した患者の診断および治療を含むが、これらに限定されることはない応用分野に使用できることは当業者に明らかである。従って、M a t e r c D N A またはその断片の用途を記述した応用例の記載は、ゲノムM a t e r 遺伝子の使用を包含することを意図する。

【0158】

本遺伝子の相同体が、ラットまたはサルのような他種から、標準的なクローニング手法によってクローニングできることもまた、現在、当業者に明らかであると考えられる。そのような相同体は、自己免疫性不妊症の発症および進行、ならびに初期胚形成の動物モデルの産生に有用であると考えられる。一般的にそのようなオルソロガスなM a t e r 分子は、本明細書に開示されるヒトM a t e r 核酸と少なくとも70%の配列同一性を有する；より近縁関係のオルソロガスな配列は、この配列と、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%の配列同一性を有する。

10

【0159】

実施例7

M a t e r 核酸およびアミノ酸配列の変種

本明細書におけるヒトM A T E R タンパク質断片および対応する核酸配列の提供により、それらの配列の変種を作製することが現在可能である。

【0160】

アミノ酸配列において、変種M A T E R タンパク質は、開示されたヒトM A T E R 配列と異なるが、提供されるヒトM A T E R タンパク質と少なくとも65%のアミノ酸配列の相同性を有するタンパク質を含む。その他の変種は、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%のアミノ酸配列相同性を有すると考えられる。そのような変種を産生するために、例えば部位特異的突然変異誘発またはP C Rを含む標準的手法を使用した、M a t e r のヌクレオチド配列の操作を用いることができる。最も単純な改変としては、一つまたは複数のアミノ酸を同様な生化学的性質を有するアミノ酸と置換することが含まれる。これらのいわゆる保存的置換は、結果として得られるタンパク質の活性に最小限の影響を与えられと思われる。タンパク質の元のアミノ酸から置換してもよく、保存的置換とみなされるアミノ酸を

20

30

【0161】

【表2】

元のアミノ酸	保存的置換
Ala	ser
Arg	lys
Asn	gln; his
Asp	glu
Cys	ser
Gln	asn
Glu	asp
Gly	pro
His	asn; gln
Ile	leu; val
Leu	ile; val
Lys	arg; gln; glu
Met	leu; ile
Phe	met; leu; tyr
Ser	thr
Thr	ser
Trp	tyr
Tyr	trp; phe
Val	ile; leu

40

【0162】

酵素機能またはその他のタンパク質の特性のより実質的な変化は、表2に列挙したものよ

50

り保存性の低いアミノ酸置換を選択することにより得られる。そのような変化は、ポリペプチド骨格構造（例えばシート構造またはヘリックス構造）、その標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または特異的側鎖のかさを維持する効果において、より著しく異なる残基への変化を含む。下記の置換は、一般的に、タンパク質の性質に最も大きな変化をもたらすことが期待される：（a）親水性残基（例えば、セリルまたはトレオニル）への（からの）疎水性残基（例えば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バニル、またはアラニル）の置換；（b）システインまたはプロリンへの（からの）その他の任意の残基の置換；（c）正電荷の側鎖を有する残基（例えば、リシル、アルギニル、またはヒスチジル）への（からの）負電荷の側鎖を有する残基（例えば、グルタミンまたはアスパルチル）の置換；または（d）かさ高い側鎖を有する残基（例えば、フェニルアラニン）への（からの）側鎖を欠失した残基（例えば、グリシン）の置換。 10

【0163】

変種MATERをコードする配列は、例えばM13プライマー突然変異誘発などの、標準的なDNA突然変異誘発技法を用いて産生することができる。それらの技法の詳細は、サンプロク（Sambrook）ら（「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、CSHL、New York、1989）、第15章に記載されている。そのような技法を用いることにより、開示されたヒトMATER配列と僅かに異なる変種を作製することができる。本明細書に具体的に開示されるものの誘導體であり、且つヌクレオチドの欠失、付加、または置換により開示されたものと異なるが、開示されたヒトMATERコード配列（配列番号：1および3）と依然として少なくとも82%の配列同一性を有するタンパク質をコードするDNA分子およびヌクレオチド配列が本開示に包含される。また、開示されたMater配列と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%のヌクレオチド配列相同性を有するより近縁関係の核酸分子も包含される。最も単純な形態においては、そのような変種は、その分子が導入される特定の生物におけるコドン使用の偏りに適合するようにコード領域が改変されていることにより、開示された配列と異なってもよい。全長ヒトMater cDNA（配列番号：23）もまた、断片1（配列番号：1）および断片2（配列番号：3）の両方を含み、且つ記載される生理学的特徴および生物学的性質を有するヒトMATERタンパク質をコードする分子として本開示に包含される。 20 30

【0164】

または、遺伝コードの縮重を利用することにより、ヌクレオチド配列は実質的に変化するが、それにもかかわらず、開示されたヒトMATERタンパク質配列と実質的に同様のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするようにコード配列を改変することで、コード領域を改変してもよい。例えば、遺伝コードの縮重のため、4つのヌクレオチド・コドン・トリプレット（GCT、GCG、GCC、およびGCA）はアラニンをコードする。従って、ヒトMATERタンパク質におけるいかなる特定のアラニン残基のコード配列もコードタンパク質のアミノ酸組成または特性に影響を与えることなく、それらの代替的なコドンのうちの任意のコドンに変更され得る。上述のような標準的DNA突然変異誘発技法を用い、またはDNA配列の合成によって、本明細書に開示するcDNAおよび遺伝子配列から遺伝コードの縮重に基づき変種DNA分子を誘導することができる。従って本開示は、MATERタンパク質をコードするが、遺伝コードの縮重によって開示された核酸配列と異なる核酸配列も包含する。 40

【0165】

MATERタンパク質変種は、原型ヒトMATERタンパク質に対するそれらの配列同一性によって定義することもできる。上述のように、ヒトMATERタンパク質は、本明細書に開示するヒトMATERタンパク質（配列番号：24）または断片（配列番号：2および4など）と、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有する。そのようなタンパク質/断片をコードする核酸配列は、遺伝コードをM 50

A T E Rタンパク質または断片のアミノ酸配列に単純に適用することによって容易に決定することができ、そのような核酸分子は、配列の部分に対応するオリゴヌクレオチドを組み合わせるによって容易に産生することができる。

【0166】

開示されたヒトMater cDNA核酸配列に由来する核酸配列は、開示された原型Mater核酸分子またはその断片に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする分子を含む。ストリンジェントな条件は、6xSSC、5xデンハルト(Denhardt)溶液、0.5%SDS、および100µg/mlの剪断サケ精巢DNA中、65にてハイブリダイゼーションを行った後、2xSSC、0.5%SDS、続いて1xSSC、0.5%SDS、最後に0.2xSSC、0.5%SDS中、65にて15~30分間連続的に洗浄することである。

10

【0167】

(近縁関係のより低い相同体を検出するための)低ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、(ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件の両方を)50で行うことを除き、上述のように実施する；しかし、検出シグナルの強さにより、2xSSCの洗浄の後、洗浄段階を終了してもよい。

【0168】

ヒトMater核酸コード分子(配列番号：23に記載のcDNA、配列番号：1および3に記載の断片、ならびにそれらの配列を含む核酸を含む)、ならびにそれらの配列のオルソログおよび相同体を、形質転換用または発現用のベクターに導入してもよい。

20

【0169】

実施例8

MATERタンパク質の発現

ヒトMater cDNA配列断片、ならびに全長ヒトMater cDNAの決定およびクローニングの方法の提供により、現在、標準的な実験室の手法によるMATERタンパク質の発現および精製が可能になった。精製したヒトMATERタンパク質は、機能解析、抗体産生、診断、および患者の治療に用いることができる。さらに、Mater cDNAのDNA配列は、遺伝子の発現およびその産物の機能を理解する研究において操作することができる。ヒトMATERの変異型は、本明細書に含まれる情報に基づいて単離することができる。相対量による発現パターン、細胞内局在性、組織特異性、およびコードされた変異MATERタンパク質の機能的性質の変化を検出するために調べることができる。被検者タンパク質をコードする部分的および全長cDNA配列は、細菌発現ベクターの中にライゲーションすることができる。大腸菌(*Escherichia coli*)に導入したクローニング遺伝子からタンパク質を大量発現させる方法は、タンパク質の精製、局在化、および機能解析のために活用できる。例えば、大腸菌lacZまたはtrpE遺伝子の一部によりコードされるアミノ末端ペプチドをMATERタンパク質に連結したもものからなる融合タンパク質は、これらのタンパク質に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を調製するために用いることができる。その後これらの抗体を、免疫アフィニティ・クロマトグラフィーによるタンパク質の精製、タンパク質レベルを定量する診断用アッセイ法、ならびに免疫蛍光法による組織および個々の細胞中におけるタンパク質の局在化のために使用することができる。そのような抗体は、同定および/または精製の目的で発現構築物に加えることができるエピトープ・タグに特異的でありうる。

30

40

【0170】

機能的研究のため、無傷の天然タンパク質もまた大腸菌において大量に産生させることができる。細菌で融合タンパク質および無傷の天然タンパク質を産生するための方法およびプラスミド・ベクターは、サンブロック(Sambrook)ら(Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、第17章、CSHL、New York、1989)に記載されている。そのような融合タンパク質は大量に作製可能であり、精製が容易であり、抗体反応を誘発するのに用いることができる。クローニングした遺伝子の上流に、

50

強力な調節プロモーターおよび有効なリボゾーム結合部位を配置することによって、天然タンパク質を細菌で産生させることができる。低レベルのタンパク質が産生される場合は、タンパク質産生を増加させるための追加的処置をとることができる；高レベルのタンパク質が産生される場合は、精製は比較的容易である。適当な方法はサンプロック (Sambrook) ら (「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、C S H L、New York、1989) に記載されており、当業者に周知である。高レベルで発現したタンパク質は、しばしば、不溶性の封入体中に見出される。それらの凝集物からタンパク質を抽出する方法は、サンプロック (Sambrook) ら (「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、第17章、C S H L、New York、1989) に記載されている。LacZ 融合遺伝子の発現に適したベクター系には、pUR シリーズのベクター (ルーサー (Ruther) およびミュラーヒル (Muller-Hill)、EMBO. J 2: 1791、1983)、pEX1-3 (スタンレー (Stanley) およびルジオ (Luzio)、EMBO. J 3: 1429、1984)、および pMR100 (グレイ (Gray) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6598、1982) が含まれる。無傷の天然タンパク質の産生に適したベクターには、pKC30 (シマタケ (Shimatake) およびローゼンベルグ (Rosenberg)、Nature 292: 128、1981)、pKK177-3 (アマン (Amann) およびブロシウス (Brosius)、Gene 40: 183、1985)、および pET-3 (シュトゥディアー (Studiar) およびモファット (Moffatt)、J. Mol. Biol. 189: 113、1986) が含まれる。MATER 融合タンパク質をタンパク質ゲルから単離し、凍結乾燥し、粉末に磨りつぶし、抗原として用いることができる。DNA 配列は、既存の状況から、例えば他のプラスミド、バクテリオファージ、コスミド、動物ウイルス、および酵母人工染色体 (YAC) (ブルケ (Burke) ら、Science 236: 806-812、1987) のような、他のクローニング媒体に移すこともまた可能である。これらのベクターは、次に体細胞、ならびに細菌、真菌 (ティンバレイク (Timberlake) およびマーシャル (Marshall)、Science 244: 1313-1317、1989)、無脊椎動物、植物、および動物 (パーセル (Pursell) ら、Science 244: 1281-1288、1989) のような単純または複雑な生物を含む様々な宿主に導入してもよく、それらの細胞または生物は、異種 Mater cDNA の導入により、トランスジェニックとなる。

【0171】

哺乳動物細胞で発現させるために、cDNA 配列は、例えば pSV2 ベクター (マリガン (Mulligan) およびパーク (Berg)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072-2076、1981) におけるシミアンウイルス (SV) 40 プロモーターのような、異種のプロモーターにライゲーションし、例えばサル COS-1 細胞 (グルツマン (Gulzman)、Cell 23: 175-182、1981) のような細胞に導入して、一過的または長期的な発現を得ることができる。キメラ遺伝子構築物の安定した組み込みは、例えばネオマイシン (サザン (Southern) およびパーク (Berg)、J. Mol. Appl. Genet. 1: 327-341、1982) およびミコフェノール酸 (マリガン (Mulligan) およびパーク (Berg)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072-2076、1981) のような生化学的選択によって、哺乳動物細胞中に維持することができる。

【0172】

DNA 配列は、例えば制限酵素消化、DNA ポリメラーゼによる平滑末端化、エキソヌクレアーゼによる削除、ターミナル・デオキシヌクレオチド・トランスフェラーゼによる伸長、合成またはクローニングした DNA のライゲーション、一本鎖バクテリオファージ中間体を介した、または特異的ヌクレオチドを核酸増幅と組み合わせて使用することによる

特定部位の配列改変などの標準的手順により操作することができる。

【0173】

cDNA配列(もしくはそれに由来する部分)またはミニ遺伝子(イントロンおよび自らのプロモーターを持つcDNA)は、従来の方法を用いて真核生物の発現ベクターに導入することができる。これらのベクターは、cDNAの転写を開始し増加させ、その適切なスプライシングおよびポリアデニル化を確実にするような調節配列を含むことにより、真核細胞においてcDNAの転写を可能にするように設計されている。SV40のプロモーター領域およびエンハンサー領域またはラウス肉腫ウイルスの末端反復(LTR)、ならびにSV40由来のポリアデニル化シグナルおよびスプライシングシグナルを含むベクターを容易に入手することができる(マリガン(Mulligan)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1078-2076、1981;ゴルマン(Gorman)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6777-6781、1982)。この種のベクターは、異なる活性を有するプロモーターを使うことによるか(例えば、パキウウイルスpAC373はS.フルギペルダ(S. frugiperda)細胞においてcDNAを高レベルで発現可能であり(サマーズ(Summers)およびスミス(Smith)、「遺伝的改変ウイルスと環境(Genetically Altered Viruses and the Environment)」、フィールズ(Fields)ら編、22:319-328、CSHL Press、Cold Spring Harbor、New York、1985))、または、例えばマウス乳癌ウイルス由来の糖質コルチコイド応答性プロモーター(リー(Lee)ら、Nature 294:228、1982)のような、調節されたプロモーターを含むベクターを使用することにより、cDNAの発現レベルを操作することができる。cDNAの発現は、導入後24時間から72時間に(一過的発現)受容細胞で観察することができる。

10

20

【0174】

加えて、一部のベクターは、細菌遺伝子のgpt(マリガン(Mulligan)およびパーク(Berg)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072-2076、1981)またはneo(サザン(Southern)およびパーク(Berg)、J. Mol. Appl. Genet. 1:327-341、1982)のような選択マーカーを含む。それらの選択マーカーは、ベクター(従ってcDNA)の安定で長期的な発現を示すトランスフェクション細胞の選択を可能にする。ベクターは、パピロマウイルス(サーバー(Sarver)ら、Mol. Cell. Biol. 1:486-496、1981)またはエプスタイン・バーウイルス(スグデン(Sugden)ら、Mol. Cell. Biol. 5:410-413、1985)のような調節因子を用いることにより、エピソーム様の自由に複製する独立体として細胞中に維持することができる。または、ゲノムDNAにベクターが組み込まれた細胞株を作製することもまた可能である。これらの型の細胞株はいずれも継続的に遺伝子産物を産生する。また、高レベルの遺伝子産物を産生可能な細胞株を作製するために、ベクター(従ってcDNAも同様)のコピー数が増幅した細胞株を作製することもできる(アルト(Alt)ら、J. Biol. Chem. 253:1357-1370、1978)。

30

40

【0175】

真核生物、とりわけヒトまたは他の哺乳動物の細胞へのDNAの導入は、現在では従来技術である。組換え発現ベクターは、例えば、燐酸カルシウム(グラハム(Graham)およびファンダーエブ(vander Eb)、Virology 52:466、1973)もしくは燐酸ストロンチウム(ブラッシュ(Brash)ら、Mol. Cell. Biol. 7:2013、1987)との沈殿、電気穿孔法(ノイマン(Neumann)ら、EMBO J. 1:841、1982)、リポフェクション(フェルグナー(Felgner)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413、1987)、DEAEデキストラン(マッカーサン(McCutthan)ら、J. Natl. Cancer Inst. 41:351、1968)、マイクロインジェク

50

ション法 (ミュラー (Mueller) ら、Cell 15:579、1978)、プロトプラスト融合 (シャフナー (Schafner)、Proc. Natl. Acad. Sci USA 77:2163-2167、1980)、または空気銃 (クライン (Klein) ら、Nature 327:70、1987) により、純粋な DNA として受容細胞に導入 (トランスフェクション) することができる。または、ウイルス・ベクターによる感染によって、cDNA またはその断片を導入することができる。例えばレトロウイルス (バーンスタイン (Bernstein) ら、Gen. Engr'g 7:235、1985)、アデノウイルス (アーマッド (Ahmad) ら、J. Virol. 57:267、1986)、またはヘルペスウイルス (シュペーテ (Spaete) ら、Cell 30:295、1982) を使用する系が開発されている。長い転写物をパッケージングする有用な技術は、コーチャネク (Kochanek) ら (Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:5731-5739、1996)、パークス (Parks) ら (Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:13565-13570、1996)、ならびにパークス (Parks) およびグラハム (Graham) (J. Virol. 71:3293-3298、1997) に見出せる。MATER をコードする配列は、非感染系、例えばリポソームを介してインビトロで標的細胞に送達することができる。

【0176】

これらの真核生物発現系は、MATER コード核酸およびそれらの分子の変異型、MATER タンパク質およびそのタンパク質の変異型の研究に用いることができる。そのような用途には、例えば、本明細書に含まれる情報を利用してヒトゲノム DNA ライブラリーから単離することのできるゲノムクローン上にある、Mater 遺伝子の 5' 領域内に位置する調節要素の同定が含まれる。真核生物発現系は、正常な完全タンパク質の機能、タンパク質の特異的部位、または自然に生じたもしくは人工的に産生した変異タンパク質の研究にも使用することができる。

【0177】

必要な場合には、上記の技術を使用して、Mater 遺伝子配列もしくは cDNA を含む発現ベクター、またはそれらの断片もしくは変種または変異体を、ヒトの細胞、他種の哺乳動物細胞、または非哺乳動物細胞に導入することができる。細胞の選択は処理の目的によって判断される。例えば、高レベルの SV40 T 抗原を産生して SV40 の複製起点を含むベクターの複製を可能にするサル COS 細胞 (グルツマン (Gulzman)、Cell 23:175-182、1981) を使用してもよい。同様に、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)、マウス NIH3T3 線維芽細胞、またはヒト線維芽細胞もしくはリンパ芽球 (本明細書に記載のように) を使用してもよい。

【0178】

従って本明細書に記載の態様は、適当な宿主における発現のために、Mater 遺伝子または cDNA またはそれらの変種のような MATER コード配列の全てまたは一部を含む、組換えベクターを包含する。Mater cDNA は、MATER ポリペプチドが発現できるように、ベクターにおいて組換え DNA 分子の発現制御配列に機能的に連結されている。発現制御配列は、原核細胞または真核細胞、およびそれらのウイルスの遺伝子、ならびにそれらの組み合わせの発現を制御する配列からなる群より選択することができる。発現制御配列は、lac 系、trp 系、tac 系、trc 系、ファージ・ラムダの主要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制御領域、SV40 の初期および後期プロモーター、ポリオーマ、アデノウイルス、レトロウイルス、バキュロウイルス、およびシミアンウイルス由来のプロモーター、3-ホスホグリセリン酸キナーゼのプロモーター、酵母酸性ホスファターゼのプロモーター、酵母アルファ接合因子のプロモーター、ならびにそれらの組合せからなる群より特に選択することができる。

【0179】

ベクターでトランスフェクションされうる宿主細胞は、大腸菌、シュードモナス、枯草菌 (Bacillus subtilis)、バチルス・ステアロサーモフィラス (Bac

illus stea rothermophilus)、もしくはその他のバチルス属；その他の細菌；酵母；真菌；昆虫；マウスもしくはその他の動物；または植物の宿主；またはヒト組織細胞からなる群より選択することができる。

【0180】

変異体または変種 Mater・DNA配列については、同様な系が変異産物を発現し産生するために使用されることが理解される。

【0181】

実施例9

MATERタンパク質に対する抗体の産生

正常MATERタンパク質またはこのタンパク質の変異型のいずれかに対してモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を産生することができる。選択的には、MATERタンパク質に対して産生された抗体は、MATERタンパク質を特異的に検出すると考えられる。すなわちそのような抗体は、MATERタンパク質を認識して結合し、実質的にヒト細胞に見出されるその他のタンパク質を認識または結合しないと考えられる。ヒトMATERタンパク質の抗体は、マウスMATERのような他種のMATERを認識する可能性があり、その逆もまた同様である。

【0182】

抗体がMATERタンパク質を特異的に検出することは、多数の標準的な免疫アッセイ法のうち任意の方法、例えば、ウエスタン・ブロッティング法(サンブロック(Sambrook)ら、「分子クローニング：実験室マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、CSHL、New York、1989)によって判定される。所与の抗体調製品(例えばマウスで産生したもの)がウエスタン・ブロッティングで特異的にMATERタンパク質を検出することを確かめるために、全細胞タンパク質をヒト細胞(例えばリンパ球)から抽出し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド・ゲル上で電気泳動する。タンパク質は次にウエスタン・ブロッティングによって膜(例えば、ニトロセルロースまたはPVDF)に転写し、抗体調製品を膜とともにインキュベートする。膜を洗浄して非特異的に結合した抗体を除去した後、アルカリホスファターゼのような酵素を結合した抗マウス抗体(一例として)の利用により、特異的に結合した抗体の存在を検出する。アルカリホスファターゼ基質-5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート/ニトロブルーテトラゾリウムの使用の結果、濃青色の化合物が、免疫局在性アルカリホスファターゼによって生じる。MATERタンパク質を特異的に検出する抗体は、本方法により、MATERタンパク質のバンド(分子量によりゲル上の特定の位置に局在化され、マウスMATERについてはゲル移動度による推定に基づき約125kDaである)に結合することが示される。他のタンパク質と抗体との非特異的結合は、ウエスタン・プロット上で弱いシグナルとして生じ、検出される可能性がある。特異的な抗体とMATERタンパク質との結合から生ずる強い一次シグナルとの比較におけるウエスタン・プロット上で得られる弱いシグナルによって、この結合の非特異的な性質は当業者に認識されると思われる。

【0183】

免疫原として使用するのに適した実質的に純粋なMATERタンパク質は、上述のようにトランスフェクション細胞または形質転換細胞から単離される。最終調製品のタンパク質濃度は、例えば、アミコン(Amicon)(ミリポア(Millipore)、Bedford、Massachusetts)または同様のフィルター装置による濃縮によって、数マイクログラム毎ミリリットルのレベルに調節する。タンパク質に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体は、以下のように調製することができる。

【0184】

A. ハイブリドーマ融合によるモノクローナル抗体の産生

記載したように同定および単離したMATERタンパク質のエピトープに対するモノクローナル抗体は、マウスハイブリドーマから、コーラー(Kohler)およびミルシュタイン(Milstein)(Nature 256:495-497、1975)の古典

的な方法またはその派生法に従って調製することができる。簡単には、マウスに数マイクログラムの選択したタンパク質を数週間に渡り繰り返し接種する。次に、マウスを屠殺し、脾臓の抗体産生細胞を単離する。脾臓細胞はポリエチレン・グリコールを用いてマウス・ミエローマ細胞と融合させ、過剰の非融合細胞を、系をアミノプテリンを含む選択培地（HAT培地）中で培養することにより死滅させる。融合に成功した細胞を希釈し、希釈液のアリコートマイクロタイター・プレートのウェルに撒き、そこで培養物の成長を行う。抗体を産生するクローンは、例えばエングバル（Engvall）（Enzymol. 70（A）：419-439、1980）によって最初に記載されたELISAおよびその派生法のような免疫アッセイ法によって、ウェルの上清液体中で抗体を検出することにより同定される。選択された陽性クローンを増幅し、それらのモノクローナル抗体産物を回収して使用することができる。モノクローナル抗体産生の詳細な手順は、ハーロー（Harlow）およびレーン（Lane）（「抗体、実験室マニュアル（Antibodies, A Laboratory Manual）」、C S H L、New York、1988）に記載されている。

10

【0185】

B. 免疫化によるポリクローナル抗体の産生

単一のタンパク質における異種のエピトープに対する抗体を含むポリクローナル抗血清は、発現タンパク質（任意で、免疫原性を高めるために修飾されていてもよい）により適当な動物を免疫化することによって調製することができる（実施例8）。抗原および宿主種の両方に関係した多くの要因が、効率的なポリクローナル抗体の産生に影響する。例えば、低分子は他のものより免疫原性が低い傾向にあり、担体およびアジュバント（その例は既知である）の使用を必要とする可能性がある。また、宿主動物は、接種の部位および用量に対する反応性が様々であり、不十分または過剰な用量の抗原では、低い力価の抗血清が生じる。少ない用量（ナノグラムレベル）の抗原を複数の皮下部位に連続的に投与することが最も確実であると思われる。ウサギの効果的な免疫化プロトコールは、バイツカイティス（Vaitukaitis）ら（J. Clin. Endocrinol. Metab. 33：988-991、1971）に見出すことができる。

20

【0186】

ブースター注射は規則的な間隔で行うことができ（例えば、既知の濃度の抗体に対する寒天中での二倍免疫拡散法により）抗体力価が下がり始めて半量と測定されたときの抗血清を採取する。例としては、アウチターロニー（Ouchterlony）ら（「実験免疫学ハンドブック（Handbook of Experimental Immunology）」、ウィアー（Wier）D. 編、第19章、Blackwell、1973）を参照のこと。血清中の抗体のプラトーな濃度は通常約0.1mg/mlから0.2mg/mlの範囲にある（約12μM）。抗血清の抗原に対する親和性は、例えばにフィッシャー（Fisher）（「臨床免疫学マニュアル（Manual of Clinical Immunology）」、第42章、1980）により記載されているように、結合競合曲線を作製することによって判定することができる。

30

【0187】

C. 合成ペプチドに対して産生された抗体

MATERタンパク質に対する抗体産生の第三の方法は、MATERタンパク質の推定アミノ酸配列に基づき、市販のペプチド合成機で合成した合成ペプチドの利用である。

40

【0188】

一例にすぎないが、マウスMATER C末端ペプチド（配列番号：6の1093位から1111位の残基）をKLHと結合させて、2週毎に雌ウサギ（2匹）を免疫化した。3回目の免疫化より、免疫化ウサギから少量（～3ml）の血液の採取を開始し、抗ペプチド抗体の力価を、このペプチドを抗原としたELISA法を用いて調べた。抗体が最大力価に達成するまで免疫化を続け（これはおよそ十回の免疫化で生じた）、次いで血清を調製するためにウサギを屠殺し抜血した。得られた試料は、マウスMATER（実施例1）およびヒトMATER（実施例4）の両方を特徴づけるために使用した。

50

【0189】

D. MATERコード配列の注射により産生された抗体

マウスのような実験動物中でMATERタンパク質を発現する組換えDNAベクターを皮下注射することによって、MATERタンパク質に対する抗体を産生させることも可能である。組換えベクターの動物への送達は、タン(Tang)ら(Nature 356: 152-154、1992)により記載されているように、携帯型の遺伝子銃システム(サンフォード(Sanford)ら、Particulate Sci. Technol. 5: 27-37、1987)によって達成することができる。この目的に適した発現ベクターとしては、ヒトアクチン・プロモーターまたはサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターのいずれかの転写制御のもとにMATERコード配列を発現するものが含まれる。

10

【0190】

これらのプロトコルに従って調製した抗体調製物は、生物試料中の抗原性を有する物質の濃度を測定する定量的免疫アッセイ法に有用である；これらはまた、生物試料中の抗原の存在を半定量的または定量的に同定するために使用される。

【0191】

実施例10

DNAに基づく診断

本明細書に提示したMater配列情報は、欠失、重複、または突然変異などのMaterの異常が原因の自己免疫性不妊症のような、生殖能力低下または不妊症に対する病因素質を遺伝子検査する分野で使用することができる。イントロンとエキソンの境界を含むMater遺伝子の遺伝子配列も、そのような診断方法に有用である。Mater遺伝子(またはその一部)に変異を有する個体、あるいはMater遺伝子の重複またはヘテロ接合性もしくはホモ接合性の欠失を有する個体は、様々な技法を用いてDNAレベルで検出することができる。そのような診断方法を行うため、被検者の生物試料(このような生物試料は被検者由来のDNAまたはRNAのいずれかを含む)はMater遺伝子の変異、重複、または欠失についてアッセイされる。適当な生物試料としては、例えば末梢血、尿、唾液、組織生検、外科試料、羊水穿刺試料、および検死材料に存在するもののような、体細胞から得られたゲノムDNAまたはRNAを含む試料が含まれる。変異Mater遺伝子、変異Mater RNA、あるいは重複しているかまたはホモ接合性もしくはヘテロ接合性で欠失しているMater遺伝子のうちいずれかを生物試料において検出することは、多くの方法論によって行うことができ、その例を以下に記載する。

20

30

【0192】

未知の変異を同定するためのそのような検出技法の一つの態様は、被検者から単離されたRNAの逆転写増幅(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応)であり(RT-PCR)、その後、産物の直接的DNA配列決定を行う。得られた配列と原型Mater cDNA配列との間の1つまたは複数のヌクレオチドの相違、特にヌクレオチド配列のORF部分の相違の存在は、Mater遺伝子突然変異の可能性を示すものと理解される。

【0193】

または、生物試料から抽出されたDNAは直接増幅に用いることができる。ゲノムDNAからの直接的増幅は、オープン・リーディング・フレームの上流および下流に位置する調節配列またはイントロンとエキソンの境界を含むMater遺伝子の全体を解析するために適当である。直接的DNA診断についての総説は、カスキー(Caskey)(Science 236: 1223-1228、1989)およびランデグレン(Landegren)ら(Science 242: 229-237、1989)によって記載されている。

40

【0194】

DNAまたはcDNAにより単位複製配列中の未知のものを検出するために適当な、その他の突然変異スキニング技法も行うことができる。それらの技法には、直接配列決定法(配列決定を含まない)、ならびに1本鎖高次構造多型(SSCP)解析(例えば、ホン

50

ギヨ (Hongyo) ら、Nucleic Acids Res. 21:3637-3642、1993)、化学的切断法 (HOT切断を含む) (ベイトマン (Bateman) ら、Am. J. Med. Genet. 45:233-240、1993; エリス (Ellis) らの総説、Hum. Mutat. 11:345-353、1998)、変性勾配ゲル電気泳動 (DGGE)、ライゲーション増幅ミスマッチ保護 (LAMP)、および酵素的突然変異スキニング (テイラー (Taylor) およびディーブル (Deeble)、Genet. Anal. 14:181-186、1999) が含まれ、次いで、推定変異配列を有する単位複製配列の直接配列決定法が行われる。

【0195】

不妊症を呈する女性被検者、特に自己免疫性不妊症の被検者または彼女らの親族から単離された Mater 遺伝子のさらなる研究によって、その個体集団間で高頻度に生ずる特有の変異、ゲノム増幅、または欠失が明らかになる可能性がある。そのような場合、Mater 遺伝子全体の配列決定を行うことなく、最も一般的または最も密接に疾患と関連した MATER の異常を特異的に検出するような DNA 診断法を設計することができる。

【0196】

特異的 DNA 変異の検出は、例えば対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (ASO) を利用したハイブリダイゼーション法 (ワラス (Wallace) ら、CSHL Symp. Quant. Biol. 51:257-261、1986)、直接 DNA 配列決定法 (チャーチ (Church) およびギルバート (Gilbert)、Proc. Natl. Acad. Sci USA 81:1991-1995、1988)、制限酵素の使用 (フラベル (Flavell) ら、Cell 15:25-41、1978; ギーバー (Geever) ら、1981)、変性試薬を用いたゲル中での電気泳動移動度に基づく識別法 (マイヤーズ (Myers) およびマニアティス (Maniatis)、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:275-284、1986)、RNアーゼ保護法 (マイヤーズ (Myers) ら、Science 230:1242-1246、1985)、化学的切断法 (コットン (Cotton) ら、Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:4397-4401、1985)、およびリガーゼを介した検出手法 (ランデグレン (Landegren) ら、Science 241:1077-1080、1988) などの方法によって行うことができる。

【0197】

正常または変異配列に特異的なオリゴヌクレオチドは、市販の機械を使用して化学的に合成される。次にそれらのオリゴヌクレオチドは、同位体 (^{32}P など) を用いて放射性標識するか、またはピオチン (ワード (Ward) およびランガー (Langer)、Proc. Natl. Acad. Sci USA 78:6633-6657、1981) のようなタグを用いて非放射性標識して、ドットプロットまたは電気泳動後のゲルからの転写によって膜または他の固形の支持体に固定した個々の DNA 試料にハイブリダイズさせる。それらの特異的配列は、オートラジオグラフィまたは蛍光 (ランデグレン (Landegren) ら、Science 242:229-237、1989) または比色反応 (ゲバイフ (Gebeyehu) ら、Nucleic Acids Res. 15:4513-4534、1987) のような方法によって視覚化される。正常対立遺伝子に特異的な ASO を用いた場合、ハイブリダイゼーションの欠如は、遺伝子の特定領域における変異、または Mater 遺伝子の欠失を示すと考えられる。一方、変異対立遺伝子に特異的な ASO が臨床試料にハイブリダイズした場合、そのことは ASO によって規定された領域における変異の存在を示すと思われる。

【0198】

Mater 遺伝子の正常型と変異型の間配列の相違はまた、チャーチ (Church) およびギルバート (Gilbert) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991-1995、1988) の方法を用いた直接 DNA 配列決定によって明らかにすることができる。クローニングされた DNA セグメントは、特異的 DNA セ

10

20

30

40

50

グメントを検出するプローブとして用いることができる。この方法の感度は、核酸増幅、例えばPCR（リチニク（*Wrichnik*）ら、*Nucleic Acids Res.* 15:529-542、1987；ワン（*Wong*）ら、*Nature* 330:384-386、1987；ストフレット（*Stoflet*）ら、*Science* 239:491-494、1988）と組み合わせた場合に著しく高まる。この手法では、増幅された配列内に位置する配列決定用プライマーが、改良されたPCRによって産生した2本鎖PCR産物または1本鎖鋳型と共に用いられる。配列決定は、放射性標識した核酸を用いた従来の方法または蛍光タグを用いた自動配列決定法により行う。

【0199】

配列の変化は、偶然の制限酵素認識部位を生じるか、または存在する制限酵素認識部位を欠失させる可能性がある。制限酵素認識部位の変化は、適当な酵素消化およびそれに続く慣例的なゲル・プロット・ハイブリダイゼーションの使用により明らかになる（サザン（*Southern*）、*J. Mol. Biol.* 98:503-517、1975）。制限酵素切断部位を有するDNA断片（正常または変異体のいずれか）は、大きさの減少または対応する制限酵素断片数の増加により検出される。ゲノムDNA試料も、適当な制限酵素による処理に先立ち、PCRで増幅することができる；次いで、異なる大きさの断片は、ゲル電気泳動後、臭化エチジウムの存在中でUV光下で可視化される。

【0200】

DNA配列の違いに基づく遺伝子検査は、変性試薬を含むかまたは含まないゲル中で、DNA断片の電気泳動移動度の変化を検出することによって行うことができる。高分解能ゲル電気泳動によって、小さい配列の欠失および挿入が可視化できる。例えば、小さい欠失を有するPCR産物は、8%非変性ポリアクリルアミドゲル上で、正常配列と明らかに区別することができる（国際公開公報第91/10734号；*Nagamine*ら、*Am. J. Hum. Genet.* 45:337-339、1989）。異なる配列組成のDNA断片は、変性ホルムアミド勾配ゲル上で識別可能であり、そこでは、異なるDNA断片の移動度はそれらに特有な「部分融解」温度に従い、ゲル中の異なる位置で遅延する（マイヤーズ（*Myers*）ら、*Science* 230:1242-1246、1985）。または、単一塩基置換またはその他の小さい変化を含む変異を検出する方法が、PCRにおけるプライマーの長さの差に基づいてもよい。例えば、変異を有さないプライマーを、変異に対して特異的なプライマーに加えて用いてもよい。正常および変異遺伝子のPCR産物は、そのあとアクリルアミドゲルで区別して検出することができる。

【0201】

慣例的なゲル電気泳動法およびプロット・ハイブリダイゼーション法に加えて、個々のDNA試料が膜に固定されないような方法によってもDNA断片を可視化することができる。プローブおよび標的配列が共に溶液中にあってもよいし、プローブ配列が固定されていてもよい（サイキ（*Saiki*）ら、*Proc. Nat. Acad. Sci USA* 86:6230-6234、1989）。放射性同位体、放射性崩壊の直接検出（発光の有無における）を含むオートラジオグラフィ、熱産生反応を含む分光測光、および蛍光発生反応を含む蛍光光度法のような様々な検出方法を、特異的な個体遺伝子型を同定するために用いることができる。

【0202】

Material 遺伝子に多数の変異が頻繁に生じる場合、そのような多数の変異の検出可能な系が望ましい可能性があると考えられる。例えば、全ての可能な変異を同時に同定するために、多数の特異的オリゴヌクレオチド・プライマーおよびハイブリダイゼーション・プローブによる核酸増幅反応を使用してもよい（チャンパーライン（*Chamberlain*）ら、*Nucl. Acids Res.* 16:1141-1155、1988）。その方法は、固定された配列特異的オリゴヌクレオチド・プローブを含んでもよい（サイキ（*Saiki*）ら、*Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86:6230-6234、1989）。

【0203】

10

20

30

40

50

実施例 1 1

M A T E R タンパク質の定量

M a t e r 遺伝子の欠失、増幅、または変異を診断する代替法は、被検者の細胞中の M A T E R タンパク質レベルを定量することである。この診断ツールは、例えば全 M a t e r 遺伝子の欠失のみならず、M a t e r 遺伝子のプロモーター領域の変異、または切断されたポリペプチド、非機能性ポリペプチドもしくは不安定なポリペプチドを産生する遺伝子のコード領域の変異に原因する M A T E R タンパク質レベルの減少を検出するのに有用であると考えられる。または、M a t e r 遺伝子の重複は、本タンパク質の発現レベルの増加として検出される可能性がある。減少または増加した M A T E R タンパク質レベルの測定は、先に概説した方法による M a t e r 遺伝子の欠失、重複、または変異の状況の直接的な判定に代替的な手法、または補足的な手法となると思われる。

10

【0204】

M A T E R タンパク質に特異的な抗体の入手可能性は当業者に周知であり、ハーロー (H a r l o w) およびレーン (L a n e) (「抗体、実験室マニュアル (A n t i b o d i e s , A L a b o r a t o r y M a n u a l)」, C S H L , N e w Y o r k , 1 9 8 8) に記載されている多数の免疫アッセイ法の一つにより、細胞 M A T E R タンパク質の定量が可能になると考えられる。

【0205】

M A T E R タンパク質を定量する目的のために、細胞タンパク質を含む、被検者の生物試料が必要である。そのような生物試料は、末梢血、尿、唾液、組織生検、羊水穿刺試料、外科標本、および検死材料の中に存在するような体細胞から得ることができる。特に、女性の生殖細胞 (例えば卵) または胚は適切な試料である。M A T E R タンパク質の定量は、免疫アッセイ法により行われ、健常細胞 (例えば、生殖能力が低下していないことが分かっている女性の細胞) 中に見出されるタンパク質レベルと比較される。正常ヒト細胞における M A T E R タンパク質の量と比較して、被検者の細胞における M A T E R タンパク質の量が著しく減少 (例えば、10% またはそれ以上、例えば、20%、25%、30%、50% またはそれ以上が減少) していることは、著しく増加 (例えば、10% またはそれ以上、例えば、20%、25%、30%、50% またはそれ以上が増加) していることが重複または変異の増加が生じたことを示すと考えられるのに対し、被検者が M a t e r 遺伝子座に欠失または変異を持っている可能性を示すものとして解釈されると考えられる

20

30

【0206】

実施例 1 2

M A T E R タンパク質に対する血清抗体の検出

M A T E R ファミリーのタンパク質は、自己免疫性不妊症のある種の症例の病原性に関与する自己抗体として初めて同定された。本明細書におけるヒト M A T E R タンパク質配列およびコード核酸の提供により、現在、そのような生殖能力不全の検出および診断方法が可能になった。

【0207】

ヒト M A T E R タンパク質のエピトープを認識する自己抗体は、例えば血清またはその他の液体などの被験者に由来する試料中で、既知の免疫学的技法により検出することができる。そのような自己抗体 (例えば M A T E R エピトープに特異的な循環自己抗体) の存在は、被検者が M A T E R を介する不妊症または生殖能力低下に罹患しているか、またはそれらの状態のうちの一つに罹患する感受性が増加していることを示す。

40

【0208】

抗原の検出および定量のための多くの方法が当技術分野に周知である。最も一般的には、精製した抗原を基質と結合させ、試料中の抗体が F a b 部分を介してその抗原と結合し、基質を洗浄した後に標識二次抗体を加え、それがアッセイ法の対象である抗体の F c 部分と結合すると考えられる。標識二次抗体は種特異的、即ち、血清がヒト由来である場合に、標識二次抗体は抗ヒト I g G 抗体となると考えられる。標本を洗浄した後、結合した標

50

識二次抗体の量を標準的な方法により検出し定量する。

【0209】

浸漬片またはその他の固定されたアッセイ用の装置を使用した方法を含む、生物試料中の抗体を検出する方法の例は、例えば以下の特許において開示されている：米国特許第5,965,356号(単純ヘルペスウイルス・型特異的血清アッセイ法)；同第6,114,179号(抗原および/または抗体を検出するための方法および検査キット)；同第6,077,681号(抗体の検出による運動神経障害の診断)；第6,057,097号(自己免疫反応および/または炎症性疾患を含む病状のマーカー)；および同第5,552,285号(免疫アッセイ法、酸化DNA塩基に対する抗体の組成およびキット)。

【0210】

実施例12

MATER発現の抑制

トランスジェニック細胞中のMATERタンパク質発現の減少は、ヒトMater cDNAまたはその断片(例えば、配列番号：1および3に記載のcDNA断片)またはその遺伝子配列もしくはその隣接領域を含む、Materコード配列に基づくアンチセンス構築物を細胞に導入することにより達成されうる。アンチセンス抑制のために、MATERコード配列に由来するヌクレオチド配列、例えばMater cDNAまたは遺伝子の全てまたは一部を形質転換ベクターのプロモーター配列に関して逆方向に配置する。ベクターのその他の局面は先に記載したように選択することができる(実施例8)。

【0211】

導入された配列は完全長のヒトMater cDNA(配列番号：23)または遺伝子である必要はなく、形質転換された細胞型に見出される同等な配列と全く相同である必要もない。従って、マウスcDNA(配列番号：5)の一部または断片もまたヒトMater遺伝子の発現をノックアウトするために使用することができる。しかし、一般的に、導入された配列の長さが短い場合、効果的なアンチセンス抑制のために、天然のMater配列へのより高い相同性が必要とされることが考えられる。導入されたベクター中のアンチセンス配列の長さは少なくとも30ヌクレオチドがよく、アンチセンス配列の長さが増せば、一般にアンチセンス抑制に改善がみられると考えられる。ベクター中のアンチセンス配列の長さは、100ヌクレオチドより長いほうが有利であり、ヒトMater cDNAまたは遺伝子のおよそ全長まで増加させることができる。Mater遺伝子自体を抑制するために、アンチセンス構築物の転写は、細胞の内因性Mater遺伝子から転写されたmRNA分子に逆相補性であるRNA分子の産生をもたらす。

【0212】

アンチセンスRNA分子が遺伝子発現に干渉する正確な機序は明らかになっていないが、アンチセンスRNA分子が内因性mRNA分子に結合することによって、内因性mRNAの翻訳を阻害すると考えられている。

【0213】

内因性MATER発現の抑制は、リボザイムを使用することによっても行うことができる。リボザイムは、特異性の高いエンドリボヌクレアーゼ活性を有する合成RNA分子である。リボザイムの産生および使用については、チェク(Cech)の米国特許第4,987,071号およびヘイセルホフ(Haselhoff)の米国特許第5,543,508号に開示されている。アンチセンスRNAに結合する内因性mRNA分子が切断されるように、アンチセンスRNAにリボザイムの配列を含ませてアンチセンスRNAにRNA切断活性を与えることが可能であり、その結果、内因性遺伝子の発現のアンチセンス抑制が増強される。

【0214】

最後に、内因性MATER活性を阻害するために、MATERのドミナントネガティブ変異型を用いることができる。

【0215】

実施例14

10

20

30

40

50

M A T E R ノックアウトおよび過剰発現トランスジェニック動物

M A T E R タンパク質を低発現、または過剰発現する変異生物は、研究に有用である。そのような変異体は、健常および/または病的な生物における M A T E R の生理学的および/または病理学的な役割に知見を加えることを可能にする。それらの変異体は「遺伝子操作された」、即ち、ヌクレオチドの形の情報が、通常存在しないと思われる場所または組合せで変異体のゲノムに導入されている。このような方法で導入されたヌクレオチドは、「非天然」と呼ばれる。例えば、天然の M a t e r 遺伝子上流に挿入された非 M a t e r のプロモーターは、非天然であると呼ばれる。細胞に形質転換されたプラスミド上の M a t e r 遺伝子またはその他のコード配列の追加的コピーは、追加的コピーが同じ種由来の M a t e r であっても、または異なる種のものであっても、非天然であると考えられる。

【0216】

変異体は、例えば、M A T E R タンパク質を過剰発現もしくは低発現するか、または M A T E R を全く発現しない哺乳動物（マウスなど）から産生させることができる。過剰発現変異体は、生物中で M A T E R コード配列（遺伝子など）の数を増加させるか、またはマウス乳癌ウイルス（M M T V）プロモーター、または乳清酸性タンパク質（W A P）プロモーターもしくはメタロチオネインプロモーターのような、構成的もしくは誘導可能な、またはウイルスのプロモーターの制御下にある M A T E R コード配列を生物に導入することにより作製される。M A T E R を低発現する変異体は、誘導可能もしくは抑制可能なプロモーターを用いることにより、または M a t e r 遺伝子を欠失させることにより、または例えばトランスポゾン挿入による遺伝子の破壊により M a t e r 遺伝子の機能を破壊もしくは制限することにより、作製することができる。

【0217】

実施例 13 において先に記載したように、M A T E R の発現を減少または阻害するため、構成的または誘導可能なプロモーターの下に、アンチセンス遺伝子を生物中に導入することができる。

【0218】

遺伝子工学を用いて、遺伝子発現を無視し得るレベルにまで打ち消すか、または減少させた場合に、遺伝子は「機能的に欠失」される。本出願において、変異体が、改変または機能的に欠失された M a t e r 遺伝子を有すると言及された場合、これは M a t e r 遺伝子およびこの遺伝子の任意のオルソログを意味する。変異体が、「通常のコピー数より多く」の遺伝子を有すると言及された場合、これはその変異体が野生型の生物、例えば二倍体のマウスまたはヒトに見出される通常の数より多くの遺伝子を有することを意味する。

【0219】

M A T E R を過剰発現する変異体マウスは、マウス乳癌ウイルス（M M T V）プロモーターまたは乳清酸性タンパク質（W A P）プロモーターのようなプロモーターによって誘導される M a t e r 遺伝子を有するプラスミドを構築することによって作製することができる。プラスミドをマウス卵母細胞にマイクロインジェクションによって導入することができる。その卵母細胞は偽妊娠雌に移植し、同腹仔を導入遺伝子の挿入についてアッセイする。その後、導入遺伝子を含む多数の系統を研究のために利用することができる。

【0220】

W A P は、授乳期間の乳腺発現に極めて特異的であり、M M T V は乳腺、唾液腺、およびリンパ系組織を含む様々な組織に発現する。例えば、メタロチオネイン・プロモーターなどの他の多くのプロモーターを様々な発現パターンを得るために使用することができる。

【0221】

テトラサイクリンのようにマウスに与えることができる物質によって調節されるプロモーターにより、対象となる発現構築物が誘導されるような、誘導可能な系を作製することができる。そのような技術は当技術分野に周知である。

【0222】

M a t e r 遺伝子が欠失されるか、そうでなければ不能になった変異ノックアウト動物（

例えばマウス)は、Mater 遺伝子のコード領域を胚性幹細胞から除去することで作製することができる。標的化ベクターを用いて欠失変異を作製する方法が記載されている(例えば、トーマス(Thomas)およびキャベック(Capeccch)、Cell 51:503-512、1987を参照)。Materヌル・マウスを産生する一つの具体的な例は先の実施例1に記載されている。

【0223】

実施例15

遺伝子治療

被検者のMATERを介する生殖能力異常を治療するための遺伝子治療法、または被検者にMATERを介する不妊を生じさせるための遺伝子治療法が、現在可能となった。

10

【0224】

遺伝子治療における実験のために、高い効率での感染ならびに安定な組み込みおよび発現を伴うレトロウイルスが、好ましいベクターであると考えられている(オーキン(Orkin)ら、Prog. Med. Genet. 7:130-142、1988)。全長のMater遺伝子またはcDNAをレトロウイルスベクターにクローニングし、その内因性プロモーター、または例えばレトロウイルスのLTR(末端反復配列)から誘導させることができる。アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)(マクローリン(McLaughlin)ら、J. Virol 62:1963-1973、1988)、ワクシニアウイルス(モス(Moss)ら、Annu. Rev. Immunol. 5:305-324、1987)、ウシパピローマウイルス(ラスムッセン(Rasmussen)ら、Methods Enzymol. 139:642-654、1987)、またはエプスタインバーウイルス(マーゴルスキー(Margolskee)ら、Mol. Cell. Biol. 8:2837-2847、1988)のようなヘルペスウイルス群のメンバーを含むその他のウイルスのトランスフェクション系もこの種の方法に用いることができる。

20

【0225】

遺伝子治療技術の最近の発達には、コールストラウス(Cole-Strauss)ら(Science 273:1386-1389、1996)に記載のような、RNA-DNA混成オリゴヌクレオチドの使用が含まれる。この技術はクローニングされた配列の部位特異的な組込みを可能にし、それによって正確に標的化された遺伝子置換を可能にする。

30

【0226】

ウイルスベクターを用いたMaterの細胞への送達に加え、非感染法を送達に用いることが可能である。例えば、リピドおよびリポソームを介した遺伝子送達、最近、様々な遺伝子のトランスフェクションに成功して利用されている(総説として、テンプレトン(Templeton)およびラシック(Lasic)、Mol. Biotechnol. 11:175-180、1999;リー(Lee)およびフアン(Huang)、Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14:173-206;およびクーパー(Cooper)、Semin. Oncol. 23:172-187、1996を参照)。例えば、陽イオン性リポソームは単球性白血病細胞をトランスフェクトする能力につき解析されており、ウイルスベクターの使用に替わる実行可能な選択肢であることが示された(デリマ(de Lima)ら、Mol. Membr. Biol. 16:103-109、1999)。そのような陽イオン性リポソームは、例えばモノクローナル抗体またはその他の適当な標的リガンドを含めることによって、特異的な細胞を標的化させることも可能である(カオ(Kao)ら、Cancer Gene Ther. 3:250-256、1996)。

40

【0227】

実施例16

治療化合物の同定

本明細書に開示したヒトMATER分子は、MATERの活性を遮断(阻害)する(従っ

50

て、それによる生殖能力低下)か、またはMATER活性を増加させる(従って、それによる生殖能力増強)ことによって、哺乳動物におけるMATERを介した不妊症に影響を及ぼす有用な化合物を同定(選別)するのに用いることができる。

【0228】

そのような選別方法には、試験化合物がMATERタンパク質またはMATERタンパク質の変種または断片に直接結合するか、そうでなければ相互作用するかどうかを判別することを含みうる。そのような分子に結合するタンパク質は、さらなる特徴づけのために選択される。

【0229】

具体的態様において、活性を試験する化合物は、被検細胞(例えば、哺乳動物の発達中の卵母細胞または胚)のような細胞に適用される。次に、例えば卵母細胞または胚が2細胞期を超えて発達するかどうかを判別することにより、被検細胞におけるMATERタンパク質の活性が測定される。試験化合物の適用により2細胞期を超えて発達する胚の比率が変化した場合には、その化合物は可能性のある候補としてさらなる特徴づけのために選択される。特定の例において、例えばインビボで生殖能力が阻害されるかどうかを判定するために、物質を哺乳動物の雌の生殖系にインビボで曝露することによって、MATER活性を妨害または阻害する試験物質がさらなる研究のために選択される。そのように同定された化合物は避妊薬として有用な可能性がある。

10

【0230】

MATER活性を効率的に阻害し、それ故に避妊薬として有効である可能性を有する化合物の具体的な例には、MATERタンパク質のエピトープに特異的に向かう抗体が含まれる。免疫避妊薬の一般的な概念は記載されている(例えば透明帯のタンパク質に対する避妊用抗体が記載される米国特許第5,637,300号および同第6,027,727号を参照のこと;参照として本明細書に組み入れられる)。

20

【0231】

または、2細胞期を超えて発達する胚の比率を増加させる化合物(例えば、生殖能力に障害があるとして知られる動物系において)が、生殖能力を増加させる可能性のある物質としてさらなる研究のために選択される。例えばMaterヌル動物において、MATERタンパク質の活性を模倣する化合物を同定するために、同様な選別を用いることができる。

30

【0232】

加えて、MATERタンパク質は細胞質内で他の未知のタンパク質と相互作用することによってその機能を果たすことが示唆されている。そのような相互作用の物理的な妨害により、MATERの機能が阻害されることが期待される。そのような相互作用の候補は、酵母ツー・ハイブリッド系(フィールズ(Fields)およびソングス(Songs)、Nature 340:245、1989)における相互作用に基づいて同定される。タンパク質相互作用のための分子ドメインが分かれば、MATERタンパク質とそれら他のタンパク質との相相互作用を特異的に阻害するか、そうでなければ干渉することに基づいて分子を直接設計することができる。

【0233】

それらの方法を使用して選択した化合物は、本開示に包含される。

40

【0234】

実施例17

キット

書面による手引書に加えて、Mater遺伝子に特異的なプローブまたはプライマーのような、Mater遺伝子のコピー数を測定するために必要な試薬を含むキットが提供される。Mater mRNA(即ち、プローブを含む)またはMATERタンパク質(即ち、MATER特異的結合試薬)の異常な発現を判定するキットもまた提供される。診断キットにおいて提供される手引書には、決められた(例えば、実験的に測定された)値と比較するための検量線または図表を含めることができる。

50

【0235】

A. Mater ゲノム配列を検出するキット

本明細書において開示されるヌクレオチド配列およびその断片を、Mater ゲノム配列の検出および/または不妊症もしくは生殖能力低下の診断に用いるためのキットの形で供給することができる。そのようなキットでは、適当量の一つまたは複数のMater 特異的オリゴヌクレオチド・プライマーが、一つまたは複数の容器中に提供される。オリゴヌクレオチド・プライマーを、例えば水溶液に懸濁するか、またはフリーズドライもしくは凍結乾燥した粉末として供給することができる。オリゴヌクレオチドを供給する容器は、供給される形状を収容可能な任意の通常の容器、例えば微量遠心チューブ、アンプル、または瓶であってよい。一部の応用例では、別々の、典型的には使い捨てのチューブまたは同等の容器に、予め測定した一回分の使用量のプライマー対を供給することができる。そのような準備により、Mater ゲノム増幅の存在を試験すべき試料を個々のチューブに加え、直接インビトロ増幅を行うことができる。

【0236】

キットで供給される各々のオリゴヌクレオチド・プライマーの量は、例えばその製品が向けられた市場に依存した、任意の適当な量でよい。例えば、キットが研究または臨床使用に適合させたものである場合、提供される各々のオリゴヌクレオチド・プライマーの量は、数回のインビトロ増幅反応を開始するのに十分な量であると思われる。当業者には、一回の増幅反応の使用に適当なオリゴヌクレオチド・プライマーの量が既知である。一般的な指針は、例えば、インニス(Innis)ら、「PCRプロトコール、方法と応用へのガイド(PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications)」、Academic Press Inc.、San Diego、CA、1990)、サンブロック(Sambrook)ら、「分子クローニング: 実験室マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor、New York、1989)、およびオスベル(Ausubel)ら、「分子生物学の最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」、John Wiley & Sons、New York、1989)にあると思われる。

【0237】

キットは、Mater 配列、例えばMater 遺伝子、遺伝子の特異的エキソンもしくはその他の部分、またはその5'もしくは3'の隣接領域のPCRのインビトロ増幅を容易にするため、二つより多くのプライマーを含んでもよい。

【0238】

一部の態様においては、キットは、PCRのインビトロ増幅反応を行うのに必要な試薬(例えばDNA試料調製試薬、適当な緩衝液(例えばポリメラーゼ緩衝液)、塩(例えば塩化マグネシウム)、およびデオキシリボヌクレオチド(dNTP)を含む)を含んでもよい。書面による手引書も含んでもよい。

【0239】

キットはさらに、インビトロで増幅したMater 配列の検出に用いるため、標識または非標識のいずれかのオリゴヌクレオチド・プローブを含んでもよい。そのようなプローブとして適当な配列は、二つの提供されたオリゴヌクレオチド・プライマーのアニーリング部位間に位置する任意の配列となり、そのプローブに相補的な配列がインビトロ増幅反応中で増幅される。

【0240】

増幅反応で使用するために、一つまたは複数の対照配列もキットに提供されることは有用であると思われる。適当な陽性対照配列の設計は当業者に周知である。

【0241】

B. Mater mRNA発現を検出するキット

先に開示したものと同様なMater ゲノム配列を検出するためのキットを、Mater mRNA発現レベルを検出するために用いることができる。そのようなキットには、R

10

20

30

40

50

NAで使用するための技術的に明らかな改良が加えられ、上記で提供されるものと同様な、逆転写増幅反応に使用するための適当量の一つまたは複数のオリゴヌクレオチド・プライマーを含んでもよい。

【0242】

一部の態様では、Mater mRNA発現レベルを検出するキットには、例えばRNA試料調製試薬（例えばRNアーゼ阻害剤を含む）、適当な緩衝液（例えば、ポリメラーゼ緩衝液）、塩（例えば、塩化マグネシウム）、およびデオキシリボヌクレオチド（dNTP）などの、RT-PCRインビトロ増幅反応を行うために必要な試薬を含んでもよい。書面による手引書も含んでもよい。

【0243】

キットはさらに、インビトロで増幅した標的配列の検出に用いるため、標識または非標識のいずれかのオリゴヌクレオチド・プローブを含んでもよい。そのようなプローブとして適当な配列は、二つの提供されたオリゴヌクレオチド・プライマーのアニーリング部位間に位置する任意の配列となり、そのプローブに相補的な配列がPCR反応中で増幅される。

10

【0244】

RT-PCR反応で使用するために、一つまたは複数の対照配列もキットに提供されることは有用であると思われる。適当な陽性対照配列の設計は当業者に周知である。

【0245】

または、キットには、Mater mRNAの定量的または半定量的なノーザン解析を行うために必要な試薬も提供することができる。そのようなキットには、例えば、プローブとして用いるための少なくとも一つのMater特異的オリゴヌクレオチドが含まれる。このオリゴヌクレオチドは、放射性同位体、酵素基質、補助因子、リガンド、化学発光もしくは蛍光試薬、ハプテン、または酵素を含む、選択された任意の従来法により標識することができる。

20

【0246】

C. MATERタンパク質またはペプチド発現を検出するキット

MATERタンパク質の発現を検出するキットは、例えば、少なくとも一つの標的（例えばMATER）タンパク質特異的結合因子（例えばポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体または抗体断片）および少なくとも一つの対照を含んでもよい。MATERタンパク質特異的結合因子および対照は、別個の容器に収容することができる。キットは、MATER：因子複合体を検出する手段を含んでもよく、例えばその因子は検出可能に標識されていてよい。検出用の因子が標識されていない場合は、一部のキットにおいて一つまたは複数の別個の容器で提供される可能性のある例えば二次抗体またはプロテインAによって、それを検出することができる。そのような技術は周知である。

30

【0247】

一部のキットにおける補足的な構成要素には、アッセイ法を行うための手引書が含まれる。手引書は、MATERの発現レベルが例えば対照試料と比べて変化したかどうか判定することを試験者に可能にすると思われる。キットには、反応容器、および色素原、緩衝液、酵素等の補助的試薬も含むことができる。

40

【0248】

一例にすぎないが、非特異的抗卵巣抗体の検出について報告されているように（ウィートクロフト（Wheatcroft）ら、Clin. Exp. Immunol. 96：122-128、1994；ウィートクロフト（Wheatcroft）ら、Hum. Reprod. 12：2617-2622、1997）、酵素免疫吸着法のような効果的で簡便な免疫アッセイキットを、ヒト血清中の抗MATER抗体を試験するために構成することが可能である。細菌またはバキュロウイルスのいずれかにおいて組換えヒトMATERタンパク質を産生するために、発現ベクターをヒトMATER cDNAを用いて構築することができる（実施例8において記述のとおり）。アフィニティー精製によって、制限なく純粋組換えMATERタンパク質を産生することができる。

50

【0249】

アッセイキットは、酵素基質と共に、抗原として組換えタンパク質、および二次抗体として酵素結合ヤギ抗ヒトIgGを提供し得る。そのようなキットは、患者の血清がヒトMATERに対する抗体を含む場合の試験に使用することができる。

【0250】

本開示は、上述のヒトMater分子を含む、Mater核酸およびタンパク質を提供する。本開示はさらにそれらの分子を使用する方法を提供するものであって、女性の不妊症、生殖能力低下、または生殖不全を予測および/または診断する方法に加えて、そのような不妊症および生殖能力低下の治療法、ならびに避妊薬を含む。記載された分子および方法の正確な詳細には変化があること、または低発現もしくは過剰発現もまた考慮されていることが明らかになると思われる。そのようなキットは、記載された発明の精神を逸脱することなく改変されたものを含むと思われる。本発明者らは、特許請求の範囲の範囲および精神に含まれるそのような改変および変形の全ての権利を主張するものである。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】発生時におけるマウスMATERの発現を詳細に示す2枚のデジタル化ゲル、および一連のデジタル化顕微鏡写真を示す。

【図1A】Mater転写物およびZP3転写物のRNアーゼ保護を示すノーザン・プロットのデジタル画像である。RNアーゼ保護アッセイ法は、50個の卵母細胞、卵、または胚からの総RNAを用いて行った。³²P標識したアンチセンス・プローブならびに保護されたMaterおよびZP3断片の長さは、それぞれ180/139ntおよび257/205ntである。

20

【図1B】示されたマウス細胞型におけるMATERタンパク質(約125kD)の量を示す、ウエスタンプロットのデジタル画像である。MATERタンパク質は25個の卵母細胞、卵、または胚において、MATERに対する単一特異的な抗血清を用いた免疫ブロッキングによりアッセイした。

【図1C】MATERタンパク質の細胞局在を示す一連のデジタル化顕微鏡写真である。タンパク質の局在は、蛍光標識抗体を用い、共焦点レーザー走査型顕微鏡単独で(上図)、またはノマルスキー画像に重ね合わせてから(下図)、卵母細胞、卵、または胚を画像化することにより決定した。スケールバーは50μm。

【図2】標的化によるMater遺伝子座破壊の特徴付けを示す。

30

【図2A】正常マウスMater対立遺伝子(上)、標的化構築物(中央)、およびヌル対立遺伝子(下)の略図である。標的化を評価するのに用いた5'および3'プローブは、DNA相同性領域の外にある。

【図2B】Materヌル対立遺伝子が、XbaIで消化したES細胞DNAにおいて、5'プローブ(左)により3.5kb断片として、または3'プローブ(中央)およびneoプローブ(右)により4.0kb断片として検出されたことを示す一連のデジタル化ノーザンプロットである。

【図2C】Mater転写物は正常またはヘテロ接合体(正常の半分の量)においては検出されたが、ホモ接合体のヌル卵巣においては検出されなかったことを示す一対のデジタル化ノーザンプロットである(左パネル)。ZP3転写物(対照)は3つの遺伝子型の全てに存在していた(右パネル)。

40

【図3】Materヌルの雌マウスに由来する胚におけるインビボの発育異常を示す一連のデジタル化顕微鏡写真および対応する棒グラフである。

ゴナドトロピンにより誘導した排卵の後、雌マウスを正常の雄と交配し、正常(図3A、図3D、図3G、および図3J)またはMaterヌル(図3B、図3E、図3H、および図3K)の雌由来の卵管を、1日(図3Aおよび図3B)、2日(図3Dおよび図3E)、3日(図3Gおよび図3H)、ならびに4日(図3Jおよび図3K)後に洗浄した。固定しない胚の写真をノマルスキー光学により撮影した。矢印は1細胞接合体の前核を指す(図3Aおよび図3B)。スケールバーは50μm。

棒グラフは、交配後1日(図3C)、2日(図3F)、3日(図3I)、および4日(図

50

3 L) 目の M a t e r ヌル (黒四角) および正常 (白四角) の雌に由来する、平均胚数の発生の進行を示す。それぞれのバーは 4 ~ 5 回の実験の平均 ± 標準誤差を示す。

【図 4】M a t e r を欠失したマウス胚において新規の転写および翻訳が生ずることを示す。

【図 4 A ~ 4 F】マウス胚のデジタル化顕微鏡写真画像である。新規に合成された R N A は、M a t e r ヌル (図 4 A および図 4 C) および正常 (図 4 B および図 4 D) の雌に由来する 1 細胞 (図 4 A および図 4 B) および 2 細胞 (図 4 C および図 4 D) 胚の核への B r U T P 取り込みにより、共焦点レーザー走査顕微鏡および B r U T P に対するモノクローナル抗体を用いて測定した。

【図 4 G】M a t e r の存在下 (+) および非存在下 (-) における 2 細胞胚に取り込まれた B r U T P の量を、注入を行っていない対照群で得られる量で差し引いた後、任意の蛍光単位を用いて示した棒グラフである (図 4 E および図 4 F)。スケールバーは 50 μ m。 10

【図 4 H】M a t e r の存在下 (+) および非存在下 (-) における雌に由来する 50 個の発達中の卵母細胞、卵、および 2 細胞胚からの総 R N A を用いた、28 S リボゾーム R N A の R N アーゼ保護アッセイ法を示す一対のデジタル化ノーザンプロットである。^{3 2} P 標識したアンチセンスプローブと 28 S - r R N A における保護された断片の長さは、それぞれ 153 n t および 115 n t であった。

【図 4 I】M a t e r を含む (+) あるいは含まない (-) 1 細胞接合体 (左パネル) および 2 細胞胚 (中央パネルおよび右パネル) における新規のタンパク質合成を示す、一連のデジタル化フルオログラフィーである。それぞれの列は試料緩衝液に直接溶解した (左パネルおよび中間パネル)、または T R C (65 ~ 75 k D a) および p 35 を部分精製抽出後 (右パネル) の 10 個の胚由来のタンパク質を含む。 20

【図 5】M a t e r ヌルの雌由来の卵巢組織像、卵、および産生された卵の数を示す。排卵された卵の数、および成熟または変性を示すそれらの形態は、正常および M a t e r ヌルのマウスの間で顕著には異なっていない。

【図 5 A および 5 B】4 週齢 (図 5 A) および 8 週齢 (図 5 B) の M a t e r ヌルマウス由来の卵巢切片のデジタル化画像である。4 週齢の M a t e r ヌルの卵巢組織像 (図 5 A) では卵形成における異なる期の正常の卵巢が見られ、正常の卵巢と組織学的に区別できない。8 週齢の試料 (図 5 B) では、野生型マウス卵巢の卵胞黄体形成と同様に、正常な自発的排卵を示唆する多数の黄体がある。 30

【図 5 C】外因性の P M S G および h C G への応答によって M a t e r ヌルマウスより産生された、排卵された卵のデジタル化写真である。野生型マウス由来の排卵された卵と形態学的に同様であるように思われる。

【図 5 D】M a t e r ヌルマウスおよび野生型マウス由来の、排卵した卵の数 (平均 ± 標準誤差) を示す棒グラフである。

【図 6】正常マウスおよび M a t e r ヌルマウスで、子宮および卵巢の全体の形態学的外見を比較するデジタル化画像である。M a t e r ヌルの雌マウスの卵巢および子宮 (右) は野生型雌マウスの卵巢および子宮 (左) と区別できなかった。

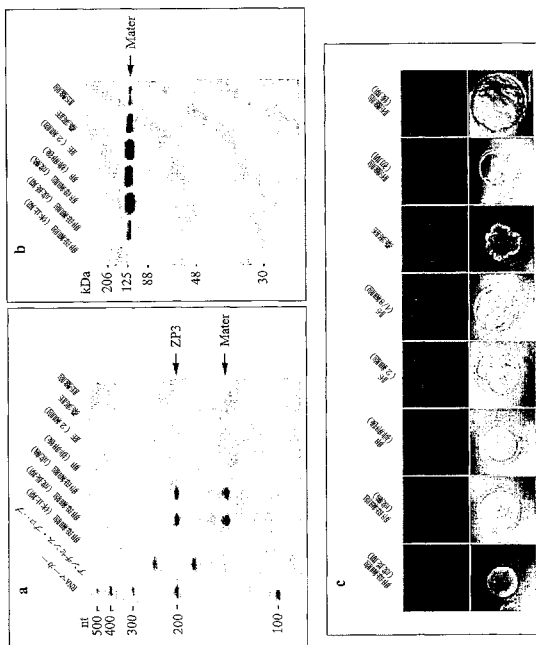
【図 7】M a t e r 転写物のヒトにおける卵母細胞特異的な発現を、インサイチュー・ハイブリダイゼーションによって示す一連のデジタル化顕微鏡写真である。[^{3 5}S] 標識したアンチセンスプローブおよびセンスプローブは、いずれもクローニングされたヒト M a t e r c D N A を鋳型として用い、インビトロ転写により合成した。ヒト卵巢凍結切片を放射標識したセンスプローブ (図 7 A および図 7 C) およびアンチセンスプローブ (図 7 B および図 7 D) とハイブリダイズした。スライドはヘマトキシリンおよびエオシンにより染色した。各々のプローブにつき、明視野画像 (図 7 A および図 7 B) および暗視野画像 (図 7 C および図 7 D) が示される。 40

【図 8】ヒト M A T E R タンパク質の卵母細胞特異的な発現を示す一対のデジタル化顕微鏡写真である。ヒト卵巢凍結切片を、マウス M A T E R タンパク質の C 末端ペプチドに対するウサギ抗血清 (200 分の 1) とインキュベートし、F I T C 結合ヤギ抗ウサギ I g 50

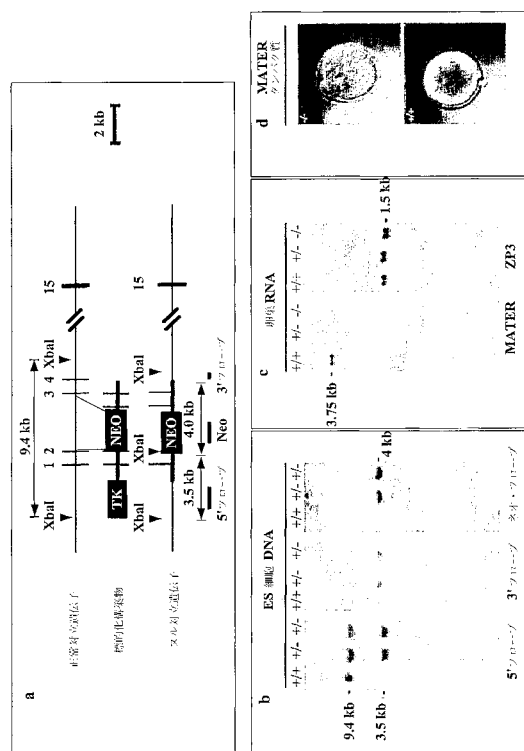
G 抗血清を二次抗体として用いて、卵母細胞のヒト M A T E R タンパク質を検出した (図 8 A)。対応する位相差画像を図 8 B に示す。

【 図 9 】 ヒト M A T E R タンパク質 (配列番号 : 2 4) およびマウス M A T E R タンパク質 (配列番号 : 6) のアミノ酸配列のアラインメントである。同一アミノ酸が同定され、類似アミノ酸はプラス (+) 記号で示される。

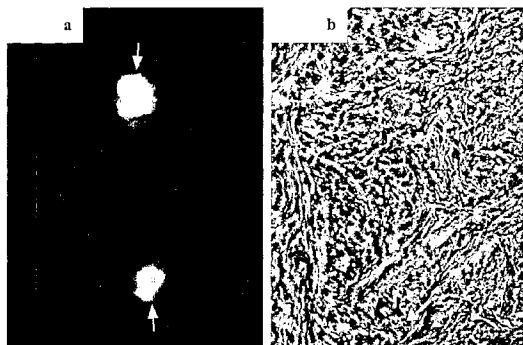
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 8 】



【 図 9 】

```

111: 1 MYVAGGLALGA 12
112: 13 ALLASAPRALVLTGTPFCILPKNFLPQNGDQFCIPKSGDKKLTSTSYGQVVEL 72
113: 73 DKKEFTVFKLLKKSSESTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTST 132
114: 1 MGPFFREKAT 11
115: 133 NMLPVLSPADQWNRSTL-DEANVYDCCDEK-----KVPFQD 173
116: 12 NMRKLEPQWSEKMTSFFSDKSTSDKQCTWQVSESTNGPFPKQSSALQAGLGR 71
117: 174 AVQDS-----ATANVTETIQMNSQHTATETETETETETETETETETETETET 223
118: 72 +AS A ** *DA E+ + E + + E + + E + + E + + E + + E + + E + + 130
119: 224 -----EQGSGGVWYKSNVWYKFAKESVPRSEKNTAAMPEMGTAGAFES 272
120: 131 LQSEEDPVTEAKMGDGLQVYKAVYAFVGLVY-----DPPHLLSAPRP 183
121: 273 DRMFPRPVLVAGKSGQKSAALAVLCAAGGLVGMFTVYVTVLVSRRKSESE 232
122: 184 + P+P T+LIG+ G-GKSLAR IYD WQD L+Q M S+V F VRE+ - +SS+ 242
123: 233 TETISREKQDQAPVTEKMSRELLAFIDCTDGLGSVL-NVDLCKQWAKQPPPTIT 391
124: 243 AGLIAREKFSQMDVTKMSQFELLVFDGLDMSVLSQDNLKSNKQDQPIYIM 302
125: 392 RLLRLLVLPESFIVTVVWVSKLSEVVSFVYLLRGLSGRTHLLRAGLGRK 451
126: 393 YLLRLLVLPESFIVTVVWVSKLSEVVSFVYLLRGLSGRTHLLRAGLGRK 362
127: 452 TCGAATINRGLAQCVFAGLILCVAQGLQVWVSVAFTWGLKGLKALNADIT 511
128: 363 G + + N + L DQDQ F+V SL+ C ALQ+ +G QDNLGA FROK 522
129: 512 PRDVRKLSLSEVFLKATKRAVQWNSVFDQDQWQDQWQDQWQDQWQDQWQDQW 571
130: 423 DKRQKALSQDQVTVLQVQWNSVFDQDQWQDQWQDQWQDQWQDQWQDQWQDQW 482
131: 573 PDSH-CDFVYTFALSTQVCAALVYVLSGLL-EPALCPVETKESRMLQAGHIM 629
132: 483 QVQNSQCVYFVLSGLLQVCAALVYVLSGLL-EPALCPVETKESRMLQAGHIM 539
133: 630 SLMNPLFELVSDQVRFVLELQDQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 689
134: 540 LQGRFRLSGLMKNKILKLELVFVIVTVVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 599
135: 690 CLFETQDQVFWALMSTFVWVLELQDQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 749
136: 600 CLFETQDQVFWALMSTFVWVLELQDQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 659
137: 750 ANAGVFWLQND-NTLSEKQVWVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 806
138: 660 LFLCPVTVVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 719
139: 809 TCKLQVFWLQND-NTLSEKQVWVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 868
140: 720 +C+D L F+H+ + G+H+H+ + H+H+ H+H+ H+H+ H+H+ H+H+ H+H+ H+H+ 828
141: 869 ESFLDQGLTHACLKLSLILTPKLSLCLAGNVTGCVVQVQVQVQVQVQVQVQV 928
142: 780 EFLD C DT Y IS H+ + K LSLA H+V + + L +AL S C IQL 939
143: 929 ITRDQVATQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 988
144: 840 IIRDQVATQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 899
145: 989 QCHLQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 1048
146: 900 CCHLQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 959
147: 1049 ITRDQVATQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 1108
148: 960 ITRDQVATQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 1019
149: 1109 DCRALSLALSCNHL-LSLWVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 1168
150: 1020 NCCALSLALSCNHL-LSLWVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 1079
151: 1169 KLELVQLLNRVIVDQSNHSEKQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 1268
152: 1080 KLELVQLLNRVIVDQSNHSEKQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 1311

```

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/32955 A1(51) International Patent Classification: C07K 14/47,
C12N 15/12, C12Q 1/68, G01N 33/53, C12N 15/11, 5/06,
A01K 67/027, C07K 16/18, G01N 33/50, A61K 38/17,
A61P 15/00, 15/18VA 22015-4295 (US), TONG, Zhi-Bin [CN/US]; 7826
Oracle Place, Potomac, MD 20854 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/10981

(74) Agent: HARDING, Tanya, M., Klarquist, Sparkman,
Campbell, Leigh & Whinston, L. LP, One World Trade
Center, Suite 1600, 121 SW Salmon Street, Portland, OR
97204 (US).

(22) International Filing Date: 4 April 2001 (04.04.2001)

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/241,510 18 October 2000 (18.10.2000) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Applicant (for all designated States except US): THE
GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF
AMERICA, as represented by THE SECRETARY
DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SER-
VICES, THE NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH
[US/US], Office of Technology Transfer, Suite 325, 601
Executive Boulevard, Rockville, MD 20852 (US).Published:
— with international search report

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): NELSON,
Lawrence, M. [US/US]; 9513 Millgate Place, Burke,For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/32955 A1

(54) Title: HUMAN GENE CRITICAL TO FERTILITY

(57) Abstract: Disclosed herein are novel nucleic acid and protein sequences that are essential to fertility. In particular, human *Mater* cDNA and protein sequences are provided. Functional MATER is required for female fertility; zygotes that arise from *Mater* null oocytes do not progress beyond the two-cell stage. Methods are described for using *Mater* molecules in diagnoses, prognosis, and treatment of fertility and reduced fertility. Also provided are methods for using MATER as a contraceptive agent. The disclosure also describes compounds involved in such methods, and the identification of such compounds.

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-1-

HUMAN GENE CRITICAL TO FERTILITY**FIELD**

The present disclosure is generally related to fertility, including the mechanisms controlling it, diseases that arise from defects in such mechanisms, and methods of influencing (either inhibiting or enhancing) fertility.

BACKGROUND

Premature ovarian failure (POF) is a term used to describe certain types of infertility in women. As many as 1% of all women in the United States are thought to be afflicted with POF, which manifests as menopausal-type symptoms, including infertility, in women under the age of 40. Many different diseases and conditions can cause POF, including underlying chromosomal defects (e.g., X-chromosome fragility), chemotherapy, or radiation treatment. Autoimmunity is a well-established mechanism of premature ovarian failure (see Yan *et al.*, *J Womens Health Genet Based Med.* 9:275-87, 2000; and Kalantaridou & Nelson, *J Am Med Womens Assoc.* 53:18-20, 1998). In autoimmune infertility, a woman's ovaries are attacked by cells of her own immune system, leading to a condition known as autoimmune oophoritis (inflammation of the ovary). Autoimmune disease can develop in response to a single inciting antigen and then spread to involve other antigenic molecules of the same organ (Kaufman, *Nature* 366:69-72, 1993). Therefore, identifying the autoantigen target in an organ-specific autoimmune disease is essential to understanding its pathogenesis.

An experimental animal (mouse) model has been used to gain insight into the mechanisms of human autoimmune oophoritis. Removal of the thymus (thymectomy) in neonatal mice (about three days old) induces experimental autoimmune oophoritis in certain strains of mice (Taguchi *et al.*, *Clin Exp Immunol.* 42:324-331, 1980). This experimentally induced condition leads to the production of high levels of anti-ooplasm antibodies and sterility, accompanied by follicular degeneration; the progression of the condition appears to closely parallel human autoimmune oophoritis (Kalantaridou & Nelson, *J Am Med Womens Assoc.* 53:18-20, 1998).

Maternal products control the developmental program until embryonic genome activation takes place. Maternal effect genes that are important in early embryonic development have been well documented in *Drosophila* and *Xenopus* (Morisato & Anderson, *Annu. Rev. Genet.* 29:371-399, 1995; Newport & Kirschner, *Cell* 30:687-696, 1982), but their presence has only been inferred in mammals (Gardner, *Hum. Reprod. Update* 2:1-27, 1999). In mice, embryonic transcription is first detected in the late 1-cell zygote stage and is required for development beyond the 2-cell stage (Schultz, *Bioessays* 15:531-538, 1993; Flach *et al.*, *EMBO J.* 1:681-686, 1982; Latham *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 35:140-150, 1993). The factors governing this transition from the maternal to the embryonic genome are unknown.

A critical transition in development occurs with the switch from dependence on proteins stored in the egg to those that result from activation of the embryonic genome. This shift which

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-2-

occurs at the two-cell stage in mice is dependent on maternal factors. Gene transcription and protein translation are active during murine oogenesis and RNAs and proteins accumulate within oocytes. However, germ cells becomes transcriptionally inactive late in oogenesis and much of the maternal RNA is degraded during meiotic maturation and ovulation of the egg into the oviduct. Thus, few maternal gene products persist past the two-cell embryo stage and none have been demonstrated directly to affect early development (Schultz, *Bioessays* 15, 531-538, 1993; Gardner, *Hum. Reprod. Update* 2, 3-27, 1996).

SUMMARY OF THE DISCLOSURE

10 Described herein is the human MATER protein, an approximately 135 kDa (predicted estimated molecular weight) cytoplasmic protein expressed in mammalian oocytes that is required for female fertility. Zygotes that arise from a MATER null oocyte do not progress beyond the two-cell stage.

15 Some embodiments are an isolated human MATER protein predicted to have an estimated molecular weight of about 125 kDa to about 135 kDa, in some embodiments more particularly about 134.2 kDa. For instance, this estimated molecular weight may be obtained by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting, for instance using an antibody raised against a C-terminal peptide of murine MATER (e.g., residues 1093 to 1111 of SEQ ID NO: 6). MATER proteins include an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NOs: 2 or 4 or 24, or a sequence having at least 65% sequence identity with SEQ ID NOs: 2 or 4 or 24. Certain specific examples of such proteins may contain one or more conservative variants within such sequences. The provided human MATER proteins have MATER protein biological activity, for instance in that they can complement a *Mater* null phenotype.

25 In certain embodiments, the human MATER protein is an autoantigen associated with autoimmune infertility. The protein may be expressed in oocyte cytoplasm, for instance the oocyte cytoplasm of a mammal such as a human.

30 One specific embodiment is thus an isolated human MATER protein predicted to have an estimated molecular weight of about 135 kDa, wherein the human MATER protein comprises amino acid sequences as set forth in SEQ ID NO: 2 and/or SEQ ID NO: 4 and/or SEQ ID NO: 24, the protein is an oocyte cytoplasm-specific autoantigen associated with autoimmune infertility, and it can complement a *Mater* null phenotype by permitting progression of an embryo beyond the two-cell stage.

35 Further embodiments are isolated nucleic acid molecules that encode such a MATER protein. Examples of such nucleic acid molecules include a sequence as set forth in SEQ ID NOs: 1 or 3 or 23, or a sequence having at least 82% sequence identity with SEQ ID NOs: 1 or 3 or 23. Certain examples of such nucleic acid molecules may contain one or more conservative variants within such sequences. Certain examples hybridizes with a nucleic acid probe that includes the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 23 under wash conditions of 55° C, 0.2 x SSC and 0.1% SDS, or under wash conditions of 50° C, 2 x SSC, 0.1 % SDS.

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-3-

Also provided are recombinant nucleic acid molecules that include a promoter sequence operably linked to a MATER nucleic acid molecule and cells transformed with such a recombinant nucleic acid molecule.

5 Methods of detecting a biological condition associated with an abnormal *Mater* nucleic acid or an abnormal MATER expression or an autoimmune response to MATER in a subject are also provided. Examples of such a biological condition include infertility (such as autoimmune infertility) or reduced fertility, or an increased susceptibility to infertility or reduced fertility. Such methods can involve detecting an abnormal *Mater* nucleic acid or an abnormal *Mater* expression or the autoimmune response to MATER in the subject. In specific examples of such methods, the abnormal
10 *Mater* nucleic acid or abnormal *Mater* expression includes an alteration in cellular level of *Mater* nucleic acid or MATER protein, in comparison to a normal level. The abnormal *Mater* expression may include an increased or decreased expression of *Mater* in a subject.

Specific provided methods involve determining whether the subject has circulating autoantibodies that recognize an epitope of a MATER protein, wherein presence of such
15 autoantibodies indicates the infertility or reduced fertility of the subject, or an increased susceptibility of the subject to infertility or reduced fertility. Other specific methods involve reacting at least one *Mater* molecule contained in a clinical sample from the subject with a reagent that includes a *Mater* specific binding agent (such as an oligonucleotide or a MATER protein specific binding agent (e.g., an antibody or functional fragment thereof), to form a *Mater*:agent complex.

20 Also provided are methods for detecting a predisposition to infertility or reduced fertility or for presymptomatic screening of an individual for infertility or reduced fertility.

Specific methods of detecting a biological condition provided herein involve *in vitro* amplifying a *Mater* nucleic acid prior to detecting the abnormal *Mater* nucleic acid. Amplification can be performed, for instance, using at least one oligonucleotide primer derived from a MATER
25 protein encoding sequence. Examples of such oligonucleotides may include at least 15, for instance at least 20 or at least 23, contiguous nucleotides from SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 23.

Also provided are oligonucleotide primers used in such methods, recombinant DNA vectors that contain such nucleic acid molecules, and recombinant nucleic acid molecules that include a
30 promoter sequence operably linked (in sense or antisense orientation) to such a nucleic acid molecule. Such vectors and recombinant nucleic acid molecules can be transformed into cells or animals (e.g., non-human animals); such transformed cells and animals are also provided.

In certain examples of the provided methods, the *Mater* molecule is a MATER encoding sequence. In some of such examples, a *Mater*:agent complex is detected by nucleotide hybridization,
35 for instance where the agent is a labeled nucleotide probe. Such probes may include a sequence as shown in SEQ ID NOs: 1 or 3 or 23, fragments of these sequences (for instance, fragments of 23 or more nucleotides). Other probes may contain a sequence that shares at least 70% sequence identity with a sequence as shown in SEQ ID NOs: 1 or 3 or 23. Such nucleotide probes are also provided.

In other examples of the provided methods, the *Mater* molecule is a MATER protein, which may contain the sequence of SEQ ID NOs: 2 or 4 or 24, a sequence sharing at least 65% sequence identity with SEQ ID NOs: 2 or 4 or 24, or conservative variants thereof. In some of such examples, Mater:agent complexes are detected by Western blot assay or by ELISA. In certain methods
5 provided, the *Mater*-specific binding agent is a MATER-specific antibody or a functional fragment thereof, for instance a polyclonal or monoclonal antibody. In specific examples, the antibody recognizes a peptide that includes the sequence of SEQ ID NOs: 2 or 4 or 24, or an antigenic fragment of one of these peptides.

Also provided herein are kits, including kits for detecting an over- or under-abundance of
10 MATER protein or *Mater* nucleic acid (for instance, in a sample from a subject, such as a mammal), which kits include a MATER protein specific binding agent (such as an antibody or a functional fragment thereof). In certain examples, the agent is capable of specifically binding to an epitope within the amino acid sequence shown in SEQ ID NOs: 2 or 4 or 24, an amino acid sequences that differ from these by one or more conservative amino acid substitutions, an amino acid sequences
15 having at least 65% sequence identity to these sequences, or an antigenic fragment of any of these sequences. Particular examples of such kits further include a means for detecting binding of the MATER protein binding agent to a MATER polypeptide. In certain examples of these kits, the overabundance or underabundance of MATER protein or *Mater* nucleic acid that is detected results in altered infertility.

Other provided kits are for detecting a genetic mutation (*e.g.*, a mutation in a *Mater* sequence) in a sample of nucleic acid. Such kits may include an oligonucleotide capable of specifically hybridizing with a *Mater* nucleic acid (which may be provided in a first container), and a fluorescent labeled nucleic acid probe (for instance, of about 5 to 500 nucleotides) that is fully
20 complementary to the oligonucleotide (which may be provided in a second container).

Specific kit embodiments provided herein are for determining whether or not a subject has a biological condition associated with an abnormal *Mater* expression by detecting an underabundance of MATER protein in a sample of tissue and/or body fluids from the subject. Such kits include an antibody specific for MATER protein and instructions for using the kit. Such instructions may indicate steps for performing a method to detect the presence of MATER protein in the sample (for
25 instance, using a method described herein); and analyzing data generated by the method, wherein the instructions indicate that underabundance of MATER protein in the sample indicates that the individual has or is predisposed to the biological condition. Specific examples of such kits further include a detectable antibody that binds to the MATER protein specific antibody.

Other specific kit embodiments include a MATER protein specific antibody (which may be
30 provided in a container), a negative control sample which may be provided in a container), instructions for using the kit. Such instructions may indicating steps for performing a test assay to detect a quantity of MATER protein in a test sample of tissue and/or bodily fluid from the subject (such as a test assay provided herein), performing a negative control assay to detect a quantity of MATER protein in the negative control sample; and comparing data generated by the test assay and

negative control assay. In specific examples of such kits, the instructions indicate that a quantity of MATER protein in the test sample that is less than the quantity of MATER protein in the negative control sample indicates that the subject has the biological condition. Some of such kits further include a detectable antibody that binds to the antibody specific for MATER protein (which may be provided in a separate container).

Also provided are methods of modifying the level of expression of a MATER protein in an subject, for instance by expressing in the subject a recombinant genetic construct that includes a promoter operably linked (in either sense or antisense orientation) to a nucleic acid molecule that includes at least 23 consecutive nucleotides of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 23 or a sequence at least 70% identical to SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 23. In particular examples, expression of the nucleic acid molecule changes expression of the MATER protein.

A further embodiment provides methods of screening for a compound useful in influencing MATER-mediated fertility in a mammal. Such methods involve determining if a test compound (for instance, when it is applied to a test cell) binds to or interacts with a MATER protein, such as a human MATER protein, or a variant or fragment thereof, and selecting a compound that so binds. In particular examples of such methods, binding of the compound inhibits a MATER protein biological activity. Also encompassed herein are compounds selected by these methods, for instance such compounds for use as contraceptives or fertility enhancers.

The foregoing and other features and advantages of the invention will become more apparent from the following detailed description of several embodiments, which proceeds with reference to the accompanying figures.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG. 1 shows two digitized gels, and a series of digitized micrographs, detailing the developmental expression of murine MATER.

FIG. 1A is a digitized image of a Northern blots showing RNase protection of *Mater* and ZP3 transcripts. RNase protection assays were performed using total RNA from 50 oocytes, eggs or embryos. ³²P-labeled antisense probes and protected fragment lengths for *Mater* and ZP3 were 180/139 nt and 257/205 nt, respectively.

FIG. 1B is a digitized image of a Western blot, showing MATER protein (approximately 125 kD) amounts in the indicated murine cell types. MATER protein was assayed in 25 oocytes, eggs or embryos by immunoblotting with monospecific antisera to MATER.

FIG. 1C is a series of digitized micrographs, showing the cellular localization of MATER protein. Protein localization was determined using fluorescent labeled antibody, by imaging oocytes, eggs and embryos with laser-scanning confocal microscopy alone (upper images) or after superimposition on a Nomarski image (lower images). Scale bar, 50 μ m.

FIG. 2 shows the characterization of targeted *Mater* locus disruptions.

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-6-

FIG. 2A is a schematic representation of the normal murine *Mater* allele (upper), the targeting construct (middle) and the null allele (bottom). The 5' and 3' probes used to assess targeting were outside the region of DNA homology.

FIG. 2B is a series of digitized Northern blots, showing that the *Mater* null allele was detected in XbaI digested ES cell DNA as a 3.5 kb fragment with the 5' (left) or as a 4.0 kb fragment with the 3' (middle) and neo (right) probes.

FIG. 2C is a pair of digitized Northern blots, showing that *Mater* transcripts were detected in normal and heterozygous (half the abundance of normal), but not in homozygous null ovaries (left panel). ZP3 transcripts (control) were present in all three genotypes (right panel).

FIG. 3 is a series of digitized micrographs and corresponding bar graphs, showing the *in vivo* development defects of embryos derived from *Mater* null female mice.

After gonadotrophin induced ovulation, female mice were mated with normal males and oviducts from normal (FIG. 3A, 3D, 3G, and 3J) or *Mater* null (FIG. 3B, 3E, 3H, and 3K) females were flushed one (FIG. 3A and 3B), two (FIG. 3D and 3E), three (FIG. 3G and 3H) and four (FIG. 3J and 3K) days later. The unfixed embryos were photographed using Nomarski optics. The arrows point to pronuclei in 1-cell zygotes (FIG. 3A and 3B). Scale bar, 50 μ m.

The bar graphs indicate developmental progress of the average number of embryos derived from *Mater* null (■) and normal (□) females at one (FIG. 3C), two (FIG. 3F), three (FIG. 3I), and four (FIG. 3L) days after mating. Each bar represents the average of 4-5 experiments \pm s.e.m.

FIG. 4 shows that *de novo* transcription and translation occurs in murine embryos lacking *Mater*.

FIG. 4A-4F show digitized micrograph images of murine embryos. Newly synthesized RNA was measured by BrUTP incorporation into the nucleus of one- (FIG. 4A and 4B) and 2-cell (FIG. 4C and 4D) embryos derived from *Mater* null (FIG. 4A and 4C) and normal (FIG. 4B and 4D) females using laser-scanning confocal microscopy and a monoclonal antibody to BrUTP.

FIG. 4G is a bar graph, showing the quantity of BrUTP incorporated in 2-cell embryos with (+) and without (-) *Mater* using arbitrary fluorescence units after subtraction of that obtained with uninjected controls (FIG. 4E and 4F). Scale bar, 50 μ m.

FIG. 4H is a pair of digitized northern blots, showing RNase protection assays of 28S ribosomal RNA using total RNA from 50 growing oocytes, eggs and 2-cell embryos isolated from females with (+) and without (-) *Mater*. 32 P-labeled antisense probes and protected fragment lengths for 28S-rRNA were 153 nt and 115 nt, respectively.

FIG. 4I is a series of digitized fluorographs, showing *de novo* protein synthesis in 1-cell zygotes (left panel) and 2-cell embryos (middle and right panels) that do (+) or do not (-) contain *Mater*. Each lane contained proteins from 10 embryos that were dissolved in sample buffer directly (left and middle panels) or after partial purification extraction of TRC (65-75 kDa) and p35 (right panels).

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-7-

FIG. 5 shows ovarian histology, eggs and the number of eggs produced from *Mater* null females. The number of ovulated eggs and their morphology indicating maturation or degeneration were not remarkably different between normal and *Mater* null mice.

FIG. 5A and 5B are digitized images of ovarian slices from a 4 week old (FIG. 5A) and 8 week old (FIG. 5B) *Mater* null mouse. The 4 week old *Mater* null ovarian histology (FIG. 5A) displays different stages of normal ovarian follicles with oogenesis, which are indistinguishable from normal ovarian histology. In the 8 week old sample (FIG. 5B), there are a number of corpora lutea indicating normal spontaneous ovulation, similar to follicular luteinization in the wild-type mouse ovary.

FIG. 5C is a digitized photograph of ovulated eggs from the *Mater* null mice, produced in response to exogenous PMSG and hCG. Morphology appears similar to that of ovulated eggs from wild-type mice.

FIG. 5D is a bar graphs showing the numbers (mean \pm s.e.m.) of the ovulated eggs from the *Mater* null and wild-type mice.

FIG. 6 is a digitized image comparing the gross morphological appearance of the uterus and ovaries of normal and *Mater* null mice. Ovaries and uteri of *Mater* null female mice (right) were indistinguishable from the ovaries and uteri from the wild-type female mice (left).

FIG. 7 is a series of digitized micrographs, showing oocyte-specific expression of *Mater* transcripts in human by *in situ* hybridization. Both [³⁵S]-labeled antisense and sense probes were synthesized by *in vitro* transcription using the cloned human *Mater* cDNA as a template. The frozen human ovarian sections were hybridized with the radiolabeled sense (FIG. 7A and 7C) and antisense (FIG. 7B and 7D) probes. The slides were stained with hematoxylin and eosin. For each probe, bright-field (FIG. 7A and 7B) and dark-field (FIG. 7C and 7D) images are shown.

FIG. 8 is a pair of digitized micrographs, showing oocyte-specific expression of human MATER protein. Frozen human ovarian sections were incubated with rabbit antisera (1:200) against a C-terminal peptide of mouse MATER protein, and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antisera were used as the second antibody to detect human MATER protein in the oocyte (FIG. 8A). The corresponding phase contrast image is shown in FIG. 8B.

FIG. 9 is an alignment of the amino acid sequence of human MATER (SEQ ID NO: 24) and murine MATER (SEQ ID NO: 6) proteins. Identical amino acids are identified; similar amino acids are indicated with a plus (+) symbol.

SEQUENCE LISTING

The nucleic and amino acid sequences listed in the accompanying sequence listing are shown using standard letter abbreviations for nucleotide bases, and three letter code for amino acids, as defined in 37 C.F.R. 1.822. Only one strand of each nucleic acid sequence is shown, but the complementary strand is understood as included by any reference to the displayed strand. In the accompanying sequence listing:

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-8-

- SEQ ID NO: 1 shows the nucleic acid sequence of human *Mater* cDNA fragment 1.
 SEQ ID NO: 2 shows the amino acid sequence of the human MATER peptide encoded by fragment 1 (SEQ ID NO: 1).
- 5 SEQ ID NO: 3 shows the nucleic acid sequence of human *Mater* cDNA fragment 2.
 SEQ ID NO: 4 shows the amino acid sequence of the human MATER peptide encoded by fragment 2 (SEQ ID No: 3).
- SEQ ID NO: 5 shows the nucleic acid sequence of murine *Mater* cDNA (GenBank Accession number NM_011860.1 and AF074018; individual exons are also listed in AF143559-AF143573).
- 10 SEQ ID NO: 6 shows the amino acid sequence of the murine MATER protein (GenBank Accession number NP_035990).
- SEQ ID NOs: 7-22 shows several synthetic oligonucleotides useful as probes and/or primers.
 SEQ ID NO: 23 shows the nucleic acid sequence of the human *Mater* cDNA, and the amino acid sequence so encoded.
- 15 SEQ ID NO: 24 shows the amino acid sequence of the human MATER protein.

DETAILED DESCRIPTION OF THE DISCLOSURE

- I. *Abbreviations*
- ES: embryonic stem
- 20 **Mater**: Maternal Antigen That Embryos Require
OPI: Ooplasm-specific Protein 1
POF: Premature Ovarian Failure
TRC: Transcription Related Complex
ZP3: zona pellucida glycoprotein 3
- 25
- II. *Terms*
- Unless otherwise noted, technical terms are used according to conventional usage. Definitions of common terms in molecular biology may be found in Benjamin Lewin, *Genes V*, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); and Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).
- In order to facilitate review of the various embodiments of the invention, the following explanations of specific terms are provided:
- 35 **Abnormal**: Deviation from normal characteristics. Normal characteristics can be found in a control, a standard for a population, etc. For instance, where the abnormal condition is an autoimmune disease condition, such as autoimmune infertility, sources of normal characteristics

might include an individual who is not suffering from the autoimmune disorder, a population standard of individuals believed not to be suffering from the disease, etc.

In some examples, abnormal may refer to a condition that is associated with a disease. The term "associated with" includes an increased risk of developing the disease as well as the disease itself. For instance, a certain abnormality (such as an abnormality in an *Mater* nucleic acid or *MATER* protein expression) can be described as being associated with the biological conditions of altered (e.g., reduced) fertility and tendency to develop autoimmune infertility.

An abnormal nucleic acid, such as an abnormal *Mater* nucleic acid, is one that is different in some manner to a normal (wildtype) nucleic acid. Such abnormality includes but is not necessarily limited to: (1) a mutation in the nucleic acid (such as a point mutation (e.g., a single nucleotide polymorphism) or short deletion or duplication of a few to several nucleotides); (2) a mutation in the control sequence(s) associated with that nucleic acid such that replication or expression of the nucleic acid is altered (such as the functional inactivation of a promoter); (3) a decrease in the amount or copy number of the nucleic acid in a cell or other biological sample (such as a deletion of the nucleic acid, either through selective gene loss or by the loss of a larger section of a chromosome or under expression of the mRNA); and (4) an increase in the amount or copy number of the nucleic acid in a cell or sample (such as a genomic amplification of part or all of the nucleic acid or the overexpression of an mRNA), each compared to a control or standard. It will be understood that these types of abnormalities can co-exist in the same nucleic acid or in the same cell or sample; for instance, a genomic-amplified nucleic acid sequence may also contain one or more point mutations. In addition, it is understood that an abnormality in a nucleic acid may be associated with, and in fact may cause, an abnormality in expression of the corresponding protein.

Abnormal protein expression, such as abnormal *MATER* protein expression, refers to expression of a protein that is in some manner different to expression of the protein in a normal (wildtype) situation. This includes but is not necessarily limited to: (1) a mutation in the protein such that one or more of the amino acid residues is different; (2) a short deletion or addition of one or a few amino acid residues to the sequence of the protein; (3) a longer deletion or addition of amino acid residues, such that an entire protein domain or sub-domain is removed or added; (4) expression of an increased amount of the protein, compared to a control or standard amount; (5) expression of an decreased amount of the protein, compared to a control or standard amount; (6) alteration of the subcellular localization or targeting of the protein; (7) alteration of the temporally regulated expression of the protein (such that the protein is expressed when it normally would not be, or alternatively is not expressed when it normally would be); and (8) alteration of the localized (e.g., organ or tissue specific) expression of the protein (such that the protein is not expressed where it would normally be expressed or is expressed where it normally would not be expressed), each compared to a control or standard.

Controls or standards appropriate for comparison to a sample, for the determination of abnormality, include samples believed to be normal as well as laboratory values, even though possibly arbitrarily set, keeping in mind that such values may vary from laboratory to laboratory.

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-10-

Laboratory standards and values may be set based on a known or determined population value and may be supplied in the format of a graph or table that permits easy comparison of measured, experimentally determined values.

Antisense, Sense, and Antigene: Double-stranded DNA (dsDNA) has two strands, a 5' -> 3' strand, referred to as the plus strand, and a 3' -> 5' strand (the reverse complement), referred to as the minus strand. Because RNA polymerase adds nucleic acids in a 5' -> 3' direction, the minus strand of the DNA serves as the template for the RNA during transcription. Thus, the RNA formed will have a sequence complementary to the minus strand and identical to the plus strand (except that U is substituted for T).

Antisense molecules are molecules that are specifically hybridizable or specifically complementary to either RNA or the plus strand of DNA. **Sense molecules** are molecules that are specifically hybridizable or specifically complementary to the minus strand of DNA. **Antigene molecules** are either antisense or sense molecules directed to a dsDNA target.

Binding or stable binding: An oligonucleotide binds or stably binds to a target nucleic acid if a sufficient amount of the oligonucleotide forms base pairs or is hybridized to its target nucleic acid, to permit detection of that binding. Binding can be detected by either physical or functional properties of the target:oligonucleotide complex. Binding between a target and an oligonucleotide can be detected by any procedure known to one skilled in the art, including both functional and physical binding assays. Binding may be detected functionally by determining whether binding has an observable effect upon a biosynthetic process such as expression of a gene, DNA replication, transcription, translation, and the like.

Physical methods of detecting the binding of complementary strands of DNA or RNA are well known in the art, and include such methods as DNase I or chemical footprinting, gel shift and affinity cleavage assays, Northern blotting, dot blotting and light absorption detection procedures. For example, one method that is widely used, because it is so simple and reliable, involves observing a change in light absorption of a solution containing an oligonucleotide (or an analog) and a target nucleic acid at 220 to 300 nm as the temperature is slowly increased. If the oligonucleotide or analog has bound to its target, there is a sudden increase in absorption at a characteristic temperature as the oligonucleotide (or analog) and target disassociate from each other, or melt.

The binding between an oligomer and its target nucleic acid is frequently characterized by the temperature (T_m) at which 50% of the target sequence remains hybridized to a perfectly matched probe or complementary strand. A higher (T_m) means a stronger or more stable complex relative to a complex with a lower (T_m).

cDNA (complementary DNA): A piece of DNA lacking internal, non-coding segments (introns) and transcriptional regulatory sequences. cDNA may also contain untranslated regions (UTRs) that are responsible for translational control in the corresponding RNA molecule. cDNA is usually synthesized in the laboratory by reverse transcription from messenger RNA extracted from cells.

DNA (deoxyribonucleic acid): DNA is a long chain polymer which comprises the genetic material of most living organisms (some viruses have genes comprising ribonucleic acid (RNA)). The repeating units in DNA polymers are four different nucleotides, each of which comprises one of the four bases, adenine (A), guanine (G), cytosine (C), and thymine (T) bound to a deoxyribose sugar to which a phosphate group is attached. Triplets of nucleotides (referred to as codons) code for each amino acid in a polypeptide, or for a stop signal. The term codon is also used for the corresponding (and complementary) sequences of three nucleotides in the mRNA into which the DNA sequence is transcribed.

Unless otherwise specified, any reference to a DNA molecule is intended to include the reverse complement of that DNA molecule. Except where single-strandedness is required by the text herein, DNA molecules, though written to depict only a single strand, encompass both strands of a double-stranded DNA molecule. Thus, a reference to the nucleic acid molecule that encodes a specific protein, or a fragment thereof, encompasses both the sense strand and its reverse complement. Thus, for instance, it is appropriate to generate probes or primers from the reverse complement sequence of the disclosed nucleic acid molecules.

Deletion: The removal of a sequence of DNA, the regions on either side of the removed sequence being joined together.

Gene amplification or genomic amplification: An increase in the copy number of a gene or a fragment or region of a gene or associated 5' or 3' region, as compared to the copy number in normal tissue. An example of a genomic amplification is an increase in the copy number of an oncogene. A "gene deletion" is a deletion of one or more nucleic acids normally present in a gene sequence and, in extreme examples, can include deletions of entire genes or even portions of chromosomes.

Hybridization: Oligonucleotides and their analogs hybridize by hydrogen bonding, which includes Watson-Crick, Hoogsteen or reversed Hoogsteen hydrogen bonding, between complementary bases. Generally, nucleic acid consists of nitrogenous bases that are either pyrimidines (cytosine (C), uracil (U), and thymine (T)) or purines (adenine (A) and guanine (G)). These nitrogenous bases form hydrogen bonds between a pyrimidine and a purine, and the bonding of the pyrimidine to the purine is referred to as "base pairing." More specifically, A will hydrogen bond to T or U, and G will bond to C. "Complementary" refers to the base pairing that occurs between two distinct nucleic acid sequences or two distinct regions of the same nucleic acid sequence.

"Specifically hybridizable" and "specifically complementary" are terms that indicate a sufficient degree of complementarity such that stable and specific binding occurs between the oligonucleotide (or its analog) and the DNA or RNA target. The oligonucleotide or oligonucleotide analog need not be 100% complementary to its target sequence to be specifically hybridizable. An oligonucleotide or analog is specifically hybridizable when binding of the oligonucleotide or analog to the target DNA or RNA molecule interferes with the normal function of the target DNA or RNA, and there is a sufficient degree of complementarity to avoid non-specific binding of the oligonucleotide or analog to non-target sequences under conditions where specific binding is desired.

for example under physiological conditions in the case of *in vivo* assays or systems. Such binding is referred to as specific hybridization.

Hybridization conditions resulting in particular degrees of stringency will vary depending upon the nature of the hybridization method of choice and the composition and length of the hybridizing nucleic acid sequences. Generally, the temperature of hybridization and the ionic strength (especially the Na⁺ concentration) of the hybridization buffer will determine the stringency of hybridization, though waste times also influence stringency. Calculations regarding hybridization conditions required for attaining particular degrees of stringency are discussed by Sambrook *et al.* (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapters 9 and 11, herein incorporated by reference.

For present purposes, "stringent conditions" encompass conditions under which hybridization will only occur if there is less than 25% mismatch between the hybridization molecule and the target sequence. "Stringent conditions" may be broken down into particular levels of stringency for more precise definition. Thus, as used herein, "moderate stringency" conditions are those under which molecules with more than 25% sequence mismatch will not hybridize; conditions of "medium stringency" are those under which molecules with more than 15% mismatch will not hybridize, and conditions of "high stringency" are those under which sequences with more than 10% mismatch will not hybridize. Conditions of "very high stringency" are those under which sequences with more than 6% mismatch will not hybridize.

***In vitro* amplification:** Techniques that increase the number of copies of a nucleic acid molecule in a sample or specimen. An example of amplification is the polymerase chain reaction, in which a biological sample collected from a subject is contacted with a pair of oligonucleotide primers, under conditions that allow for the hybridization of the primers to nucleic acid template in the sample. The primers are extended under suitable conditions, dissociated from the template, and then re-annealed, extended, and dissociated to amplify the number of copies of the nucleic acid. The product of *in vitro* amplification may be characterized by electrophoresis, restriction endonuclease cleavage patterns, oligonucleotide hybridization or ligation, and/or nucleic acid sequencing, using standard techniques. Other examples of *in vitro* amplification techniques include strand displacement amplification (see U.S. Patent No. 5,744,311); transcription-free isothermal amplification (see U.S. Patent No. 6,033,881); repair chain reaction amplification (see WO 90/01069); ligase chain reaction amplification (see EP-A-320 308); gap filling ligase chain reaction amplification (see U.S. Patent No. 5,427,930); coupled ligase detection and PCR (see U.S. Patent No. 6,027,889); and NASBA™ RNA transcription-free amplification (see U.S. Patent No. 6,025,134).

Injectable composition: A pharmaceutically acceptable fluid composition including at least one active ingredient. The active ingredient is usually dissolved or suspended in a physiologically acceptable carrier, and the composition can additionally include minor amounts of one or more non-toxic auxiliary substances, such as emulsifying agents, preservatives, and pH buffering agents and the like. Such injectable compositions that are useful for use with the provided nucleotides and proteins are conventional; appropriate formulations are well known in the art.

Isolated: An "isolated" biological component (such as a nucleic acid molecule, protein or organelle) has been substantially separated or purified away from other biological components in the cell of the organism in which the component naturally occurs, *i.e.*, other chromosomal and extra-chromosomal DNA and RNA, proteins and organelles. Nucleic acids and proteins that have been
5 "isolated" include nucleic acids and proteins purified by standard purification methods. The term also embraces nucleic acids and proteins prepared by recombinant expression in a host cell as well as chemically synthesized nucleic acids.

MATER protein: A cytosol-localized protein (SEQ ID NO: 24) of approximately 125 to approximately 135 kDa (estimated molecular weight based on gel mobility) that is essential for
10 female fertility. The acronym stands for Maternal Antigen That Embryos Require. *Mater* is a single-copy gene found on human Chromosome 19. Zygotes that arise from *Mater* null (*Mater*^{-/-}) oocytes do not progress beyond the two-cell stage. Thus, *Mater* represents a novel maternal effect gene that is required for embryonic survival and early development in mammals.

Proteins can be identified as MATER proteins by comparing their activity and other physical
15 characteristics to a prototypical MATER protein, such as the human or murine MATER protein. MATER protein biological activity can be described in terms of the ability of a protein to complement (substantially replace the lost function in) a *Mater* null mutant. The ability of a protein to complement a *Mater* mutant may be readily determined by introducing the gene encoding the protein into a *Mater* mutant animal system (such as the *Mater* null mice described herein) using standard
20 methods. If the encoded protein has MATER protein biological activity, this will be manifested as a proportion of the transgenic progeny animals having a relatively wild-type phenotype for those characteristics linked to the *Mater* mutant (*e.g.*, infertility of *Mater* null females due to failure of *Mater* null oocytes to progress beyond the two-cell stage).

Other MATER protein physical characteristics that can be examined when evaluating a
25 hypothetical MATER protein include the molecular weight of the protein (approximately 125-135 kDa, see Example 1, though this value may vary somewhat from species to species), the subcellular localization of the protein (human MATER is expressed in oocytes (Example 4)), and is predicted to be specifically expressed in the cytoplasm and excluded from the nucleus, as occurs in mice (see Example 1), and the temporal and spatial regulation of the mRNA (*Mater* transcript is produced in the
30 maturing oocyte, see Examples 1 and 3). Antibodies that recognize one MATER protein (*e.g.*, a murine MATER) may recognize a MATER protein from another species (*e.g.*, human MATER) (see Example 4); thus, hypothetical MATER proteins can be further examined and identified based on recognition by anti-MATER antibodies produced against MATER proteins from other species. The identity of the human MATER protein can therefore be confirmed for instance by immunological
35 identification using an antibody raised against the murine MATER protein, or an epitope of that protein.

Nucleotide: "Nucleotide" includes, but is not limited to, a monomer that includes a base linked to a sugar, such as a pyrimidine, purine or synthetic analogs thereof, or a base linked to an

amino acid, as in a peptide nucleic acid (PNA). A nucleotide is one monomer in a polynucleotide. A nucleotide sequence refers to the sequence of bases in a polynucleotide.

Oligonucleotide: An oligonucleotide is a plurality of joined nucleotides joined by native phosphodiester bonds, between about 6 and about 300 nucleotides in length. An oligonucleotide analog refers to moieties that function similarly to oligonucleotides but have non-naturally occurring portions. For example, oligonucleotide analogs can contain non-naturally occurring portions, such as altered sugar moieties or inter-sugar linkages, such as a phosphorothioate oligodeoxynucleotide. Functional analogs of naturally occurring polynucleotides can bind to RNA or DNA, and include peptide nucleic acid (PNA) molecules.

Particular oligonucleotides and oligonucleotide analogs can include linear sequences up to about 200 nucleotides in length, for example a sequence (such as DNA or RNA) that is at least 6 bases, for example at least 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100 or even 200 bases long, or from about 6 to about 50 bases, for example about 10-25 bases, such as 12, 15, 20, or 23 bases.

Operably linked: A first nucleic acid sequence is operably linked with a second nucleic acid sequence when the first nucleic acid sequence is placed in a functional relationship with the second nucleic acid sequence. For instance, a promoter is operably linked to a coding sequence if the promoter affects the transcription or expression of the coding sequence. Generally, operably linked DNA sequences are contiguous and, where necessary to join two protein-coding regions, in the same reading frame.

Open reading frame: A series of nucleotide triplets (codons) coding for amino acids without any internal termination codons. These sequences are usually translatable into a peptide.

Ortholog: Two nucleic acid or amino acid sequences are orthologs of each other if they share a common ancestral sequence and diverged when a species carrying that ancestral sequence split into two species. Orthologous sequences are also homologous sequences.

Parenteral: Administered outside of the intestine, e.g., not via the alimentary tract. Generally, parenteral formulations are those that will be administered through any possible mode except ingestion. This term especially refers to injections, whether administered intravenously, intrathecally, intramuscularly, intraperitoneally, or subcutaneously, and various surface applications including intranasal, intradermal, and topical application, for instance.

Peptide Nucleic Acid (PNA): An oligonucleotide analog with a backbone comprised of monomers coupled by amide (peptide) bonds, such as amino acid monomers joined by peptide bonds.

Pharmaceutically acceptable carriers: The pharmaceutically acceptable carriers useful with the compositions provided herein are conventional. Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, published by Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th Edition, 1995, describes compositions and formulations suitable for pharmaceutical delivery of the nucleotides and proteins herein disclosed.

In general, the nature of the carrier will depend on the particular mode of administration being employed. For instance, parenteral formulations usually comprise injectable fluids that include pharmaceutically and physiologically acceptable fluids such as water, physiological saline, balanced

salt solutions, aqueous dextrose, glycerol or the like as a vehicle. For solid compositions (*e.g.*, powder, pill, tablet, or capsule forms), conventional non-toxic solid carriers can include, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, or magnesium stearate. In addition to biologically-neutral carriers, pharmaceutical compositions to be administered can contain minor amounts of non-toxic auxiliary substances, such as wetting or emulsifying agents, preservatives, and pH buffering agents and the like, for example sodium acetate or sorbitan monolaurate.

Polymorphism: Variant in a sequence of a gene. Polymorphisms can be those variations (nucleotide sequence differences) that, while having a different nucleotide sequence, produce functionally equivalent gene products, such as those variations generally found between individuals, different ethnic groups, geographic locations. The term polymorphism also encompasses variations that produce gene products with altered function, *i.e.*, variants in the gene sequence that lead to gene products that are not functionally equivalent. This term also encompasses variations that produce no gene product, an inactive gene product, or increased gene product. The term polymorphism may be used interchangeably with allele or mutation, unless context clearly dictates otherwise.

Polymorphisms can be referred to, for instance, by the nucleotide position at which the variation exists, by the change in amino acid sequence caused by the nucleotide variation, or by a change in some other characteristic of the nucleic acid molecule that is linked to the variation (*e.g.*, an alteration of a secondary structure such as a stem-loop, or an alteration of the binding affinity of the nucleic acid for associated molecules, such as polymerases, RNases, and so forth).

Probes and primers: Nucleic acid probes and primers can be readily prepared based on the nucleic acid molecules provided as indicators of disease or disease progression. It is also appropriate to generate probes and primers based on fragments or portions of these nucleic acid molecules. Also appropriate are probes and primers specific for the reverse complement of these sequences, as well as probes and primers to 5' or 3' regions.

A probe comprises an isolated nucleic acid attached to a detectable label or other reporter molecule. Typical labels include radioactive isotopes, enzyme substrates, co-factors, ligands, chemiluminescent or fluorescent agents, haptens, and enzymes. Methods for labeling and guidance in the choice of labels appropriate for various purposes are discussed, *e.g.*, in Sambrook *et al.* (In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1989) and Ausubel *et al.* (In *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1998).

Primers are short nucleic acid molecules, for instance DNA oligonucleotides 10 nucleotides or more in length. Longer DNA oligonucleotides may be about 15, 20, 25, 30 or 50 nucleotides or more in length. Primers can be annealed to a complementary target DNA strand by nucleic acid hybridization to form a hybrid between the primer and the target DNA strand, and then the primer extended along the target DNA strand by a DNA polymerase enzyme. Primer pairs can be used for amplification of a nucleic acid sequence, *e.g.*, by the polymerase chain reaction (PCR) or other *in vitro* nucleic-acid amplification methods known in the art.

Methods for preparing and using nucleic acid probes and primers are described, for example, in Sambrook *et al.* (In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1989), Ausubel

et al. (ed.) (In *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1998), and Innis *et al.* (*PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990). Amplification primer pairs (for instance, for use with polymerase chain reaction amplification) can be derived from a known sequence such as the *Mater* sequences described herein, 5 for example, by using computer programs intended for that purpose such as Primer (Version 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

One of ordinary skill in the art will appreciate that the specificity of a particular probe or primer increases with its length. Thus, for example, a primer comprising 30 consecutive nucleotides of a *MATER* protein encoding nucleotide will anneal to a target sequence, such as another homolog 10 of the designated *MATER* protein, with a higher specificity than a corresponding primer of only 15 nucleotides. Thus, in order to obtain greater specificity, probes and primers can be selected that comprise at least 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 50 or more consecutive nucleotides of a *MATER* protein-encoding nucleotide sequences.

Also provided are isolated nucleic acid molecules that comprise specified lengths of the 15 disclosed *Mater* nucleotide sequences. Such molecules may comprise at least 10, 15, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45 or 50 or more consecutive nucleotides of these sequences or more, and may be obtained from any region of the disclosed sequences (*e.g.*, a *Mater* nucleic acid may be apportioned into halves or quarters based on sequence length, and isolated nucleic acid molecules may be derived from the first or second halves of the molecules, or any of the four quarters, etc.). A *Mater* cDNA or other 20 encoding sequence also can be divided into smaller regions, *e.g.* about eighths, sixteenths, twentieths, fiftieths and so forth, with similar effect.

Another mode of division is to select the 5' (upstream) and/or 3' (downstream) region associated with a *Mater* gene.

Nucleic acid molecules may be selected that comprise at least 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 25 or 100 or more consecutive nucleotides of any of these or other portions of a human *Mater* nucleic acid molecule, such as those disclosed herein, and associated flanking regions. Thus, representative nucleic acid molecules might comprise at least 10 consecutive nucleotides of the human cDNA fragments show in SEQ ID NOs: 1 and 2, or the full human *MATER* cDNA shown in SEQ ID NO: 24.

30 **Protein:** A biological molecule expressed by a gene or recombinant or synthetic coding sequence and comprised of amino acids.

Purified: The term "purified" does not require absolute purity; rather, it is intended as a relative term. Thus, for example, a purified protein preparation is one in which the protein referred to is more pure than the protein in its natural environment within a cell or within a production reaction 35 chamber (as appropriate).

Recombinant: A recombinant nucleic acid is one that has a sequence that is not naturally occurring or has a sequence that is made by an artificial combination of two otherwise separated segments of sequence. This artificial combination can be accomplished by chemical synthesis or,

more commonly, by the artificial manipulation of isolated segments of nucleic acids, e.g., by genetic engineering techniques.

Sequence identity: The similarity between two nucleic acid sequences, or two amino acid sequences, is expressed in terms of the similarity between the sequences, otherwise referred to as sequence identity. Sequence identity is frequently measured in terms of percentage identity (or similarity or homology); the higher the percentage, the more similar the two sequences are. Homologs or orthologs of human MATER protein, and the corresponding cDNA or gene sequence, will possess a relatively high degree of sequence identity when aligned using standard methods. This homology will be more significant when the orthologous proteins or genes or cDNAs are derived from species that are more closely related (e.g., human and chimpanzee sequences), compared to species more distantly related (e.g., human and *C. elegans* sequences).

Methods of alignment of sequences for comparison are well known in the art. Various programs and alignment algorithms are described in: Smith & Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981; Needleman & Wunsch *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970; Pearson & Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, 1988; Higgins & Sharp *Gene*, 73: 237-244, 1988; Higgins & Sharp *CABIOS* 5: 151-153, 1989; Corpet *et al. Nuc. Acids Res.* 16, 10881-90, 1988; Huang *et al. Computer Appls. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992; and Pearson *et al. Meth. Mol. Bio.* 24, 307-31, 1994. Altschul *et al. (J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990), presents a detailed consideration of sequence alignment methods and homology calculations.

The NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al. J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990) is available from several sources, including the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) and on the Internet, for use in connection with the sequence analysis programs blastp, blastn, blastx, tblastn and tblastx. By way of example, for comparisons of amino acid sequences of greater than about 30 amino acids, the Blast 2 sequences function is employed using the default BLOSUM62 matrix set to default parameters, (gap existence cost of 11, and a per residue gap cost of 1). When aligning short peptides (fewer than around 30 amino acids), the alignment should be performed using the Blast 2 sequences function, employing the PAM30 matrix set to default parameters (open gap 9, extension gap 1 penalties).

An alternative indication that two nucleic acid molecules are closely related is that the two molecules hybridize to each other under stringent conditions. Stringent conditions are sequence-dependent and are different under different environmental parameters. Generally, stringent conditions are selected to be about 5° C to 20° C lower than the thermal melting point (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. The T_m is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of the target sequence remains hybridized to a perfectly matched probe or complementary strand. Conditions for nucleic acid hybridization and calculation of stringencies can be found in Sambrook *et al. (In Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1989) and Tijssen (*Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes* Part I, Chapter 2, Elsevier, New York, 1993). Nucleic acid molecules that hybridize under stringent conditions to a human MATER protein-encoding sequence

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-18-

will typically hybridize to a probe based on either an entire human MATER protein-encoding sequence or selected portions of the encoding sequence under wash conditions of 2x SSC at 50° C.

Nucleic acid sequences that do not show a high degree of identity may nevertheless encode similar amino acid sequences, due to the degeneracy of the genetic code. It is understood that changes in nucleic acid sequence can be made using this degeneracy to produce multiple nucleic acid molecules that all encode substantially the same protein.

Specific binding agent: An agent that binds substantially only to a defined target. Thus a protein-specific binding agent binds substantially only to the specified protein. By way of example, as used herein, the term "MATER-protein specific binding agent" includes anti-MATER protein antibodies (and functional fragments thereof) and other agents (such as soluble receptors) that bind substantially only to the MATER protein.

Anti-MATER protein antibodies may be produced using standard procedures described in a number of texts, including Harlow and Lane (*Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1988). The determination that a particular agent binds substantially only to the specified protein may readily be made by using or adapting routine procedures. One suitable *in vitro* assay makes use of the Western blotting procedure (described in many standard texts, including Harlow and Lane (*Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1988)). Western blotting may be used to determine that a given protein binding agent, such as an anti-MATER protein monoclonal antibody, binds substantially only to the MATER protein.

Shorter fragments of antibodies can also serve as specific binding agents. For instance, Fabs, Fvs, and single-chain Fvs (SCFVs) that bind to a specified protein would be specific binding agents. These antibody fragments are defined as follows: (1) Fab, the fragment which contains a monovalent antigen-binding fragment of an antibody molecule produced by digestion of whole antibody with the enzyme papain to yield an intact light chain and a portion of one heavy chain; (2) Fab', the fragment of an antibody molecule obtained by treating whole antibody with pepsin, followed by reduction, to yield an intact light chain and a portion of the heavy chain; two Fab' fragments are obtained per antibody molecule; (3) (Fab')₂, the fragment of the antibody obtained by treating whole antibody with the enzyme pepsin without subsequent reduction; (4) F(ab')₂, a dimer of two Fab' fragments held together by two disulfide bonds; (5) Fv, a genetically engineered fragment containing the variable region of the light chain and the variable region of the heavy chain expressed as two chains; and (6) single chain antibody ("SCA"), a genetically engineered molecule containing the variable region of the light chain, the variable region of the heavy chain, linked by a suitable polypeptide linker as a genetically fused single chain molecule. Methods of making these fragments are routine.

Subject: Living multi-cellular vertebrate organisms, a category that includes both human and non-human mammals.

Target sequence: "Target sequence" is a portion of ssDNA, dsDNA or RNA that, upon hybridization to a therapeutically effective oligonucleotide or oligonucleotide analog, results in the inhibition of expression. For example, hybridization of therapeutically effectively oligonucleotide to

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-19-

a *Mater* target sequence results in inhibition of *MATER* expression. Either an antisense or a sense molecule can be used to target a portion of dsDNA, since both will interfere with the expression of that portion of the dsDNA. The antisense molecule can bind to the plus strand, and the sense molecule can bind to the minus strand. Thus, target sequences can be ssDNA, dsDNA, and RNA.

5 **Transformed:** A transformed cell is a cell into which has been introduced a nucleic acid molecule by molecular biology techniques. As used herein, the term transformation encompasses all techniques by which a nucleic acid molecule might be introduced into such a cell, including transfection with viral vectors, transformation with plasmid vectors, and introduction of naked DNA by electroporation, lipofection, and particle gun acceleration.

10 **Vector:** A nucleic acid molecule as introduced into a host cell, thereby producing a transformed host cell. A vector may include nucleic acid sequences that permit it to replicate in a host cell, such as an origin of replication. A vector may also include one or more selectable marker genes and other genetic elements known in the art.

15 Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. The singular terms "a," "an," and "the" include plural referents unless context clearly indicates otherwise. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, suitable methods and materials are described
20 below. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including explanations of terms, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

25 III. *Human MATER Protein and Nucleic Acid Sequences*

Embodiments provide *MATER* proteins and *Mater* nucleic acid molecules, including cDNA sequences. The prototypical *Mater* sequences are the murine and human sequences, and the use of these sequences to produce transgenic animals having increased or decreased levels of *MATER* protein is provided, as are diagnostic methods to detect defects or alterations in *Mater* expression or
30 *MATER* protein production.

The full-length cDNA for human *Mater* (SEQ ID NO: 23) is determined to be 3900 base pairs long (which is somewhat longer the mouse *Mater* cDNA, GenBank Accession # NM_011860.1, SEQ ID NO: 5) and its ORF encodes a protein of 1200 amino acids, having a predicted molecular weight of approximately 135.2 kDa and a predicted pI of about 6.08. The human *Mater* cDNA
35 comprises the sequences shown in SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 3, which are thought to be aligned approximately with the seventh and eleventh through fifteenth exons of the mouse *Mater* sequence, respectively. The human *Mater* mRNA is expressed in oocytes, as shown by *in situ* hybridization experiments (Example 3).

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-20-

Human MATER protein (SEQ ID NO: 24) has been specifically localized by immunofluorescence to human oocytes (Example 4). The ATG initiation codon of the *Mater* cDNA lies within the context of the ANNATG motif associated with vertebrate initiator codon (Kozak, 1991, *J. Biol. Chem.* 266:19867). The human MATER protein comprises the deduced protein sequences (SEQ ID NOs: 2 and 4) corresponding to the herein described human *Mater* cDNA sequences (SEQ ID NOs: 1 and 3, respectively). These protein fragments show low but significant sequence homology with the OPI/MATER protein from mouse (GenBank # NP_035990, SEQ ID NO: 6). In particular, SEQ ID NO: 2 is 54% identical to residues 257-638 of murine MATER (SEQ ID NO: 6), while SEQ ID NO: 4 is 64% identical to residues 854-1111 of murine MATER. The overall human MATER protein sequence (SEQ ID NO: 24) shares approximately 50% similarity with the murine MATER protein sequence (SEQ ID NO: 6); the relevant sequence alignment is shown in FIG. 9. The depicted comparison between the human and murine MATER proteins was conducted using the BLAST 2 Sequences Program with parameter conditions of Expect 10 and Filter closed (NIH-NCBI).

Certain regions of the human *Mater* cDNA have been identified through the sequencing of human HTGSs, though no function or identity had been previously assigned to those sequences. See, for instance, GenBank accession numbers: AC024580 (GI = 7705010, published May 4, 2000); AC012107 (GI = 6088020, published October 20, 1999, and updated as GI = 7329252, published March 28, 2000); and AC023887 (GI = 7631054, published April 21, 2000). These fragmentary and overlapping human sequences are up to 207 nucleotides in length and are scattered throughout the murine *Mater* cDNA sequence. The human ESTs individually share up to 89% identity with the murine *Mater* cDNA over short, discontinuous regions. Oligonucleotides according to the current disclosure may be chosen to avoid these ESTs. Overall, the first 75 nucleotides of human *Mater* (1-75) and the corresponding deduced amino acids (1-25) were determined by comparison to published human genomic DNA sequences, while the remainder of the *Mater* sequence was determined by direct cloning and sequencing of human ovarian cDNAs.

Mater is a single-copy maternal effect gene, the protein product of which is required for early embryonic survival. Although eggs lacking MATER protein can be fertilized, morphologic signs of deterioration are observed as early as the 2-cell stage beyond which the mutant embryos do not progress. The human MATER protein with 1200 amino acids is predicted to have similar molecular domains to those seen in the murine MATER protein (1111 amino acids). As described by Tong *et al.* (*Mamm. Genome* 11:281-287, 2000), the mouse MATER protein contains a five-fold hydrophilic repeat (26-27 amino acid) near its N-terminus, a short leucine-zipper and a fourteen-fold leucine-rich repeat (28-29 amino acid) near its carboxyl terminus (based on a comparison to the murine MATER protein, as described in Tong *et al.*, *Mamm. Genome* 11, 281-287, 2000). The hydrophilic repeat has low homology with a cytoskeletal protein (neurofilament), raising the possibility that this region mediates interactions that anchor MATER in the cytoplasm. The presence of the leucine-rich domain, as well as a short leucine zipper, both motifs known to mediate protein-protein interactions (Kajava, *J. Mol. Biol.* 277, 519-527, 1998; Buchanan & Gay, *Prog. Biophys. Mol.*

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-21-

Biol. 65, 1-44, 1996), suggests that MATER may affect embryonic progression through intermediate factor(s), one or more of which binds directly to MATER in the cytoplasm.

Using antisera against a mouse MATER peptide (residues 1093 through 1111 of murine MATER, SEQ ID NO: 6), the inventors have demonstrated that human MATER protein is present in oocytes in human ovary sections (Example 4). Likewise, using mouse-derived nucleotide sense and antisense probes for *in situ* hybridization experiments, it has been demonstrated that human oocytes express *Mater* mRNA (Example 3).

The inventors have further characterized murine MATER as to its function in mammalian embryogenesis. This protein is a "maternal" protein, generated in the oocyte prior to fertilization, and therefore encoded for by a maternal gene. MATER is unusual in that it persists (as measured by protein level) into the late blastocyst stage of embryonic development. Functional MATER is required for female fertility; zygotes that arise from *Mater* null oocytes do not progress beyond the two-cell stage; this is true regardless of what *Mater* genotype male produced the sperm. The protein is cytoplasmic, with definite exclusion from the nucleus.

The invention is illustrated by the following non-limiting Examples.

EXAMPLE 1

Characterization of the Murine MATER protein

This example provides several methods for examining MATER proteins and nucleic acids in a mammalian system; the murine system is used.

Methods:

Isolation of oocytes, eggs and embryos. All experiments were conducted in compliance with the guidelines of the Animal Care and Use Committee under an approved animal study protocol. Resting, growing and fully grown oocytes were dissected from 1, 10 and 21 day old (d/o) mouse ovaries, respectively, and eggs were isolated from gonadotrophin stimulated female mice (Tong *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270, 849-853, 1995; Rankin *et al.*, *Development* 125, 2415-2424, 1998). Embryos were obtained by mating gonadotrophin stimulated females with males and 1-cell zygotes, 2-cell embryos, morulae and blastocysts were flushed from the oviducts at 1, 2, 3 and 4 days, respectively, counting the morning after hCG administration as day 1. Embryos were either incubated in M16 media (37 °C, 5% CO₂), fixed in 1% paraformaldehyde for subsequent confocal microscopy, or frozen at -80 °C for RNA and protein analyses. Ovaries were fixed (10% formalin) and embedded in paraffin prior to sectioning and staining with hematoxylin and eosin (American Histolabs, Gaithersburg, Maryland).

Detection of transcripts and proteins. *Mater*, ZP3, β -actin, cyclophilin and 28S-rRNA transcripts were detected by RNase protection assays as previously described (Tong & Nelson, *Endocrinology* 140, 3720-3726, 1999; Tong *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270, 849-853, 1995) using an RPA II kit (Ambion, Austin, TX).

- Rabbits were immunized with a KLH conjugated MATER peptide (amino acids 1093-1111) to obtain a monospecific antisera. After incubating immunoblots with MATER antisera (1:1000, two hours, 20 °C), antibody binding was detected by ECL using a HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Fixed oocytes, eggs or embryos were incubated with MATER antisera (1:8000, 4 °C, 16 hours) and imaged by laser-scanning confocal microscopy (LSM 5; Zeiss, Thornwood, NY) using Cy⁵-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200).
- Protein synthesis and immunoblotting.* Embryos were incubated in 100 µl of M16 medium containing L-³⁵S-methionine (0.5 Ci/ml, Amersham) at 37 °C for 4 hours. At the end of radiolabeling, 1-cell and 2-cell embryos were harvested at 26 hours and 48 hours post-hCG/mating, respectively.
- After washing with 1% BSA in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA and 140 mM NaCl, ten embryos were dissolved directly in 10 µl of sample buffer (1) directly or (2) after treatment with 2% Triton X-100/0.3 M KCl to extract the TRC and p35 (Conover *et al.*, *Dev. Biol.* 144, 392-404, 1991). After SDS-PAGE and fluorography as previously reported (Tong *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270, 849-853, 1995), radioactive incorporation was determined by a phosphorimager and ImageQuant software (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).
- Production of Mater null mice.* Constructs used to produce Mater null mice are shown in FIG. 2. To construct a targeting vector in pPNT (Tybulewicz *et al.*, *Cell* 65, 1153-1163, 1991), a 1.5 kbp SacI-EcoRI DNA fragment containing the first two exons of murine Mater (Tong *et al.*, *Mamm. Genome* 11, 281-287, 2000) was inserted between the PGK-Neo and PGK-TK cassettes and a 2 kbp EcoRI-BamHI fragment containing exons 3 and 4 was inserted upstream of the PCK-Neo. After linearization and electroporation into embryonic stem (ES) cells (Redmond *et al.*, *Nat. Genet.* 20, 344-351, 1998), the presence of the mutant allele in chemically selected clones was detected as 3.5 kbp and 4.0 kbp XbaI fragments with 5' and 3' (or Neo) probes, respectively. Both the 5' and 3' probes detected the normal allele as a 9.4 kbp XbaI fragment. C57BL/6 blastocysts were injected with 8-12 ES cells derived from five independently selected clones. Two cell lines that gave rise to coat-color chimeric animals were mated with C57BL/6 females and transmitted the Mater mutation through the germ line. The absence of Mater transcripts in homozygous null females was confirmed by northern blot analysis as described previously (Tong & Nelson, *Endocrinology* 140, 3720-3726, 1999).
- Reproductive performance.* Vaginal smears were obtained daily to examine four or more estrus cycles of 6-10 week-old female mice (Rugh, *The Mouse: Its Reproduction and Development* 210 Oxford University Press, Oxford, 1991). Mating behavior was evaluated by the presence of a vaginal plug on the morning after mating with fertile males.
- Zygotic gene transcription assays.* A 5-10 µl aliquot of 100 mM BrUTP, 140 mM KCl and 2mM Pipes, pH 7.4 was microinjected into the cytoplasm of embryos isolated 28 hours (1-cell embryos) and 48 hours (2-cell embryos) following hCG and mating, essentially as previously described (Bouniol *et al.*, *Exp. Cell Res.* 218, 57-62, 1995). After incubation in M16 medium in 5% CO₂ for one hour at 37 °C, the injected embryos were fixed in 1% paraformaldehyde.

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-23-

BrUTP incorporation into RNA was assayed with a mouse anti-BrdU monoclonal antibody (Sigma, 1:1000, 16 hours, 4 °C). After washing in PBS containing 3% BSA, a FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody was used to image the embryos by confocal microscopy; fluorescence was recorded in arbitrary units. This assay primarily reflects *de novo* RNA polymerase II activity, because poor penetration of the monoclonal antibody into nucleoli prevents measurement of BrUTP incorporation into ribosomal RNA (Wansink, *et al.*, *J. Cell Biol.* 122, 283-293, 1993).

Results

Mater transcript and protein expression

Mater mRNA was first detected as oocytes entered into their growth phase (30-50 µm) (FIG. 1A). *Mater* transcripts were most abundant in fully-grown oocytes (75-85 µm) and, like many oocyte transcripts (Bachvarova, in *Developmental Biology: Oogenesis* 1, 453-524, Plenum Press, New York, 1985; Epifano *et al.*, *Development* 121, 1947-1956, 1995), were degraded during meiotic maturation and subsequent ovulation. *Mater* mRNA was not detected in the early embryo (FIG. 1A), although its presence in EST databases derived from early embryos suggest that some transcripts may have escaped destruction.

The initial accumulation of MATER protein during oogenesis was similar to that observed for *Mater* transcripts (compare FIG. 1A with FIG. 1B). However, unlike the virtual disappearance of the transcripts, the MATER protein persisted during preimplantation development until the late blastocyst stage (FIG. 1B). Using confocal microscopy, MATER protein was located in the cytoplasm of growing oocytes and noticeably excluded from the nucleus. MATER was more concentrated in the cortical region of oocytes and early embryos (one- and two-cell stages), and this peripheral pattern persisted later in preimplantation development with a higher concentration of MATER in the outer trophoctodermal cells compared to the inner cell mass of blastocysts (FIG. 1C).

Mater null animals

To determine the function of MATER protein, *Mater* null mouse lines were generated, in which homozygous females did not express either *Mater* transcripts or protein. *Mater* null mice were born in the expected Mendelian ratios with equal sex distribution. No phenotypic abnormalities were observed from birth through adulthood.

Ovaries and uteri from *Mater* null mice appeared morphologically normal (FIG. 6). *Mater* null ovaries had a normal complement of primordial follicles and all stages of follicular development were normally represented; *corpora lutea*, indicating past spontaneous ovulation, were also present (FIG. 5).

Ova lacking *Mater* were fertilized normally *in vivo* (FIG. 1). The number and morphology of zygotes and 2-cell embryos from the *Mater* null females were similar to those from normal females (FIG. 5). However, by 3 or 4 days after mating the embryos from *Mater* null females still remained at the 2-cell stage or had begun to degenerate (compare FIG. 3D and 3G with 3E and 3H). Thus, fertilization is normal in *Mater* null females and the resulting zygotes can progress through the first

cleavage, but subsequent development is arrested at the 2-cell stage. This indicates that an arrest of early embryogenesis accounts for the infertility in *Mater* null females.

Two mouse lines with a *Mater* null mutation (T54 and T85) were generated (FIG. 2A and 2B) and neither *Mater* transcript (FIG. 2C) nor protein (FIG. 2D) were detected in homozygous null females.

Reproductive phenotype of *Mater* null animals

Matings of heterozygous *Mater* null parents produced average sized litters (8.5 ± 1.9) with normal Mendelian and equal sex distribution of the null allele in progeny. Homozygous null animals appeared normal and males were as fertile as normal littermates. However, homozygous null females produced no litters, even after five months of mating (Table 1) which implicated *Mater* as a maternal effect gene.

Table 1: Fertility and Mendelian allele ratio of mice with *Mater* mutation

Mating pairs	n*	Litter sizes mean \pm s.e.m.	Mendelian ratios		
			+/+	+/-	-/-
$\text{♂} \times \text{♀}$					
<i>Mater</i> ^{+/+} \times <i>Mater</i> ^{+/+}	11	7.5 \pm 1.8	1.00	0	0
<i>Mater</i> ^{+/+} \times <i>Mater</i> ^{+/-}	10	7.4 \pm 1.9	n.d. [†]	n.d.	n.d.
<i>Mater</i> ^{+/+} \times <i>Mater</i> ^{-/-}	9	0	n.a. [‡]	n.a.	n.a.
<i>Mater</i> ^{+/-} \times <i>Mater</i> ^{+/+}	8	7.6 \pm 2.4	0	1.00	0
<i>Mater</i> ^{+/-} \times <i>Mater</i> ^{+/-}	18	8.4 \pm 1.9	0	0.47	0.53
<i>Mater</i> ^{+/-} \times <i>Mater</i> ^{-/-}	15	8.5 \pm 1.9	0.21	0.57	0.22

* n, the number of mating pairs, [†] n.d., not done, [‡] n.a., not applicable.

Sexually mature *Mater* null females exhibited regular 5.67 ± 0.22 days estrus cycles, similar to those observed in normal females (5.40 ± 0.23 days). Mating occurred normally, as demonstrated by the appearance of vaginal plugs in about 70% of either *Mater* null or normal females, after exposure to fertile males. The *Mater* null ovary had a normal complement of primordial follicles, with all stages of follicular development as well as *corpora lutea* indicating past spontaneous ovulations (FIG. 5A and 5B). In addition, the *Mater* null females ovulated normally after stimulation with exogenous gonadotropins. However, homozygous null females produced no litters even after five months of mating with normal males, while the homozygous null males and heterozygous females had normal fertility.

The mean number (\pm s.e.m.) of ovulated eggs recovered from null (27.6 ± 4.5 , n=14) was not statistically different ($p > 0.05$) from that obtained from normal (27.7 ± 4.3 , n=12) females (FIG. 5D). Morphologically, the two groups of eggs were indistinguishable from one another (FIG. 5C).

Fertilization and embryo development in *Mater* null animals

To evaluate *in vivo* fertilization and early development, embryos were isolated from normal and *Mater* null females at 1, 2, 3 and 4 days after mating with normal males. Fertilization occurred in eggs lacking MATER, as demonstrated by the presence of two pronuclei (arrows, FIG. 3A and 3B).

5 The number and morphology of 1-cell zygotes and 2-cell embryos obtained *in vivo* from the *Mater* null females were similar to those observed from normal females, although the 2-cell mutant embryos appeared less healthy, displaying cytoplasmic granulations (FIG. 3A-3F). Embryos obtained from the *Mater* null female mice 3 or 4 days after mating still remained at the 2-cell stage (or had begun to degenerate), while embryos from normal mice had progressed to the morula or blastocyst stages,
10 respectively

An equal percentage (~70%) of fertilized 1-cell zygotes derived from *Mater* null and normal females progressed *in vitro* to the 2-cell stage. However, after four days in culture, embryos lacking MATER remained arrested at the 2-cell stage (most were degenerating) (FIG. 3K); embryos from the normal females developed to the blastocyst stage in the same time (FIG. 3J). Thus, although
15 fertilization appears normal and zygotes without MATER can progress through the first cleavage, subsequent embryonic development is arrested at the 2-cell stage.

Characterization of transcription in *Mater* null animals

The early arrest phenotype seen in *Mater* null mice is reminiscent of the 2-cell block that occurs after exposure of mouse embryos to α -amanitin (Schultz, *Bioessays* 15:531-538, 1993; Flach *et al.*, *EMBO J.* 1, 681-686, 1982), a mushroom toxin that binds to RNA polymerase II and prevents elongation of transcription beyond dinucleotides (Vaisius & Wieland, *Biochemistry* 21, 3097-3101, 1982). Normal embryonic transcription is first detected late in the 1-cell zygote at a level that is ~20% that of the 2-cell embryo (Aoki *et al.*, *Dev. Biol.* 181, 296-307, 1997), but these nascent
25 transcripts are poorly, if at all, translated into protein (Nothias *et al.*, *EMBO J.* 15, 5715-5725, 1996).

To assess *de novo* RNA polymerase II activity of the early *Mater* null embryo, bromo-UTP (BrUTP) incorporation was assayed with a monoclonal antibody specific to BrUTP using laser-scanning confocal microscopy, essentially as described previously (Bouniol *et al.*, *Exp. Cell Res.* 218, 57-62, 1995) (FIG. 4A-4G). Morphologically there was a dramatic difference in the amount of
30 BrUTP detected in the nuclei of normal embryos 28 hours (FIG. 4B) and 48 hours (FIG. 4D) after mating compared to those lacking MATER (FIG. 4A and 4C). BrUTP incorporation in embryos without MATER was marginally greater than that of uninjected controls (FIG. 4E and 4F) and *de novo* transcription was less than 5% that observed in normal 2-cell embryos (FIG. 4G).

Characterization of TRC in *Mater* null animals

During meiotic maturation and ovulation, more than 50% of maternal RNA is lost in normal mice (Bachvarova, in *Developmental Biology: Oogenesis* 1, 453-524, Plenum Press, New York, 1985). This degradative process also occurs in females lacking MATER with loss of ribosomal RNA

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-26-

(FIG. 4H) and at least some mRNAs (β -actin, ZP3, cyclophilin, and GAPDH). Normally, the subsequent activation of the embryonic genome at the 2-cell stage is preceded by the transient transcription and translation of a subset of gene products, some of which form the distinctive Transcription Related Complex (TRC) (Bolton *et al.*, *J. Embryol. Exp. Morphol.* 79:139-163, 1984; Nothias *et al.*, *EMBO J.* 15:5715-5725, 1996; Conover *et al.*, *Dev. Biol.* 144:392-404, 1991). This complex, first observed in the early 2-cell embryo, is not formed in the presence of α -amanitin.

To assay for the TRC, 1- and 2-cell embryos derived from *Mater* null females mated with normal males were incubated with 35 S-methionine. No global differences in the amount of 35 S-methionine incorporation or in protein profiles were noted in comparing normal 1-cell zygotes and those lacking MATER (FIG. 4I, left panel). Although TRC complexes were detected in embryos without MATER at the 2-cell stage (FIG. 4I, middle and right panels), they appeared somewhat less abundant (~60% of normal), which could reflect abnormal protein synthesis in the embryos lacking MATER. This indicates that MATER is not absolutely critical for initiation of all transcription-translation machinery in early embryos.

Although this striking decrease in transcription could reflect generalized morbidity of the embryo, a similar decrease in 1-cell zygotes, which appear quite healthy, as well as absence of an equally dramatic decrease in *de novo* protein synthesis (FIG. 4J) suggest that the depressed levels of transcription are due either directly, or indirectly to the absence of MATER.

20 Proposed function(s) of mammalian MATER

The homology of the leucine-rich repeat domain of mammalian MATER protein with porcine ribonuclease inhibitor implies that MATER may act as an inhibitor of cytoplasmic RNase. If this is true, RNA in embryos lacking MATER might be subject to extensive degradation, perhaps an accentuation of the normal turnover of RNA that occurs during the maternal-to-zygotic transition in the early embryo. The degradation of RNAs, including those that encode proteins required for transcription, could account for the phenotype observed in *Mater* null embryos. This seems unlikely; however, because in the absence of *Mater* mutant embryos incorporate 35 S-methionine into proteins and no major difference in protein profiles are observed in comparison with normal embryos. These results indicate that sufficient mRNA, tRNA and ribosomal RNA are present in the mutant embryos to support protein biosynthesis, although it does not preclude the degradation of a targeted subset of RNA required for early embryonic survival.

Transcription-dependent protein synthesis occurs in two phases in the 2-cell embryo, an early minor activation (2-4 hours after the first mitotic division) that is characterized by appearance of the TRC proteins, and a later major activation that occurs in G_2 (8-10 hours after the first mitotic division). The later activation initiates developmental programs required for progression beyond the 2-cell stage (Schultz, *Bioessays* 15, 531-538, 1993). The observed decrease in embryonic transcription in embryos lacking MATER could result from deterioration of transcription machinery, decreased access to genomic DNA or abnormalities in the chromatin template within the nucleus.

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-27-

However, the presence of the TRC proteins in *Mater* null animals indicates that MATER is not critical for the early phase of transcription-dependent protein synthesis in 2-cell embryos. It further suggests that the transcription machinery, and its ability to access nuclear DNA, is largely intact in *Mater* null embryos (as it appears to be in *Mater* null oocytes, which are also transcriptionally active).

5 The TRC proteins resulting from the early burst of transcription are associated with the nucleus (Schultz, *Bioessays* 15, 531-538, 1993). These proteins could relieve the late transcriptional repression required for progression beyond the 2-cell stage via mechanisms involving MATER. Additionally, it has been reported that mouse oocytes and 1-cell embryos lack coactivator(s) required for enhancer-dependent transcription in 2-cell embryos (Lawinger *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274, 8002-8011, 1999). The nature of these coactivators is unknown; they may arise by modification of pre-
10 existing maternal proteins or from early transcription-dependent protein synthesis in the 2-cell embryo. Such process may involve cytoplasmic MATER. Alternatively, MATER might be involved in one or more interactions that are required for cell cycle progression beyond the 2-cell stage. Identification and characterization of proteins that interact with MATER will provide insights into the
15 role of this maternal protein in promoting embryonic survival and early development.

Mater is the first maternal effect gene demonstrated to play a critical role in early mammalian development and the observed sterile phenotype raises the possibility that the absence of a similar molecule could be a cause of human infertility.

20

EXAMPLE 2**Identification of the Human *Mater* cDNA**

The human *Mater* cDNA was identified based on its homology to the mouse *Mater* cDNA sequence by searching the collection of human High Throughput Genomic (HTG) Sequences, maintained by NCBI and the National Library of Medicine. Using the isolated and discontinuous
25 nucleotide fragments identified in this search, the inventors devised oligonucleotide primers pairs (for instance, SEQ ID NOs: 7 and 8, 19 and 20, and 21 and 22) that were used to amplify *Mater* sequence from purified human ovarian DNA or mRNA/cDNA, and to isolate a partial cDNA clone from a human cDNA library, using standard techniques.

The sequence of two long fragments of the human *Mater* cDNA is shown in SEQ ID NO: 1
30 and 3. Together, these two long cDNA fragments constitute 2213 nucleotides of the complete human *Mater* cDNA.

The deduced human MATER protein portions encoded cDNA fragment 1 (SEQ ID NO: 1) and fragment 2 (SEQ ID NO: 3) are shown in SEQ ID NOs: 2 and 4, respectively.

Using these sequences, the remainder of the human *Mater* cDNA has been identified; the
35 sequence of the full length cDNA is shown in SEQ ID NO: 23. Overall, the first 75 nucleotides of human *Mater* (1-75) and the corresponding deduced amino acids (1-25) were determined by comparison to published human genomic DNA sequences, while the remainder of the *Mater* sequence was determined by direct cloning and sequencing of human ovarian cDNAs. The complete sequence of the human MATER protein is shown in SEQ ID NO: 24.

EXAMPLE 3:**Localization of Human *Mater* transcript**

This example provides one method for detecting expression of the human *Mater* transcript.

5 To produce *in situ* hybridization probes, human genomic DNA was amplified using the following primers:

5'-primer: 5'-TTTCACATGAACATCCTTCTCC-3' (SEQ ID NO: 7);

10 3'-primer: 5'-AGTGCTGGAGGCAGAAGGAAG-3' (SEQ ID NO: 8).

The resultant amplified nucleic acid molecule product size was 496 bp, and is predicted to fall within exon 7 of the human *Mater* gene, based on comparison to the murine *Mater* exon-intron map. This fragment was subcloned into pBluscript vector as a DNA template. Both ³²S-UTP-labeled sense and antisense sequences were synthesized by *in vitro* transcription using T3 and T7 RNA polymerases.

15 *In situ* hybridization was carried out essentially as described previously (Tong & Nelson, *Endocrinology* 140:3720-3726, 1999). Briefly, the probes were prepared by alkaline hydrolysis and hybridized with frozen human ovarian sections at 60 °C for 24 hours. After dipping in Kodak NTB-2 emulsion, the slides were exposed to film for 2-3 days and the autoradiographs developed.

20 The frozen human ovarian sections were hybridized with the radio-labeled sense (FIG. 7A and 7C) and antisense (B and D) probes. The slides were stained with hematoxylin and eosin. For each probe, bright-field (A and B) and dark-field (C and D) images are displayed. *Mater* transcript was localized to oocytes.

EXAMPLE 4:**Localization of Human MATER Protein**

25 This example provides one method for examining the localization of human MATER protein.

In situ localization was carried out essentially as described for murine samples (see, Tong and Nelson, *Endocrinology* 140:3720-3726, 1999). Briefly, rabbit polyclonal antibody to a murine 30 MATER C-terminal peptide (residues 1093 through 1111 of SEQ ID NO: 6) was prepared as described in Example 9C. Frozen human ovarian sections were incubated with this antiserum (1:200), and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antiserum was used as the secondary antibody to detect human MATER protein in the oocyte (FIG. 8A). FIG. 8B shows the phase contrast images corresponding to the samples in FIG. 8A.

35

EXAMPLE 5:**Methods of Making Human *Mater* cDNA**

The original means by which the *Mater* cDNA was identified and obtained is described above. With the provision of the sequence of the large portions of the MATER protein (SEQ ID

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-29-

NOs: 2 and 4) and encoding nucleic acid molecules (SEQ ID NOs: 1 and 3), nucleotide amplification (such as polymerase chain reaction (PCR)) now may be utilized in a simple method for producing the *Mater* cDNA.

Total RNA is extracted from human cells by any one of a variety of methods well known to those of ordinary skill in the art. Sambrook *et al.* (In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1989) and Ausubel *et al.* (In *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences, 1992) provide descriptions of methods for RNA isolation. Because *MATER* is expressed in oocytes, human cell lines derived from oocytes or ovaries can be used as a source of such RNA. The extracted RNA is then used as a template for performing reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of cDNA. Methods and conditions for RT-PCR are described in Kawasaki *et al.*, (In *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Innis *et al.* (eds.), 21-27, Academic Press, Inc., San Diego, California, 1990).

The selection of amplification primers will be made according to the portion(s) of the cDNA that is to be amplified. Primers may be chosen to amplify a segment of a cDNA or the entire cDNA molecule. Variations in amplification conditions may be required to accommodate primers and amplicons of differing lengths and composition; such considerations are well known in the art and are discussed for instance in Innis *et al.* (*PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990). By way of example, the majority of the coding portion of the human *MATER* cDNA molecule (approximately 2.8 kb) may be amplified using the following combination of primers:

5'-primer (part of predicted exon 7):

5'-CAGGAATTGGGAAATCGGCTCTCTAG-3' (SEQ ID NO.: 9);

3'-primer (end of predicted exon 15):

5'-CCAAATGCTTTGTGTTTATTTAATCC-3' (SEQ ID NO.: 10).

One of ordinary skill can use the full length human *Mater* cDNA sequence provided herein (SEQ ID NO: 23) to devise primers that could be used to amplify the entire cDNA using known techniques.

The following set of four primers can be used to amplify ~950 bp at the 5'-end of human *Mater* cDNA:

The 5'-primers are the universal adapter primers (ADP) for 5'-RACE-PCR as follows (OriGene Technologies, Inc, Rockville, MD):

ADP1: 5'-CGGAATTCGTCACTCAGCG-3' (SEQ ID NO.: 11)

ADP2: 5'-AGCGCGTGAATCAGATCG-3' (SEQ ID NO.: 12)

The 3'-primers are gene-specific primers (GSP) for human *MATER* cDNA within exon 7, as follows:

GSP1: 5'-ATTCCCTGGTAGAGTCCACCTTGC-3' (SEQ ID NO.: 13)

GSP2: 5'-ACAGCACGATCCTTCTGGCTAGAG-3' (SEQ ID NO.: 14).

-30-

GSP1 is used as a primer for reverse transcription of human ovarian RNA to synthesize cDNA. The reverse transcribed cDNAs are then adapted at the 5'-end by ADP1 primer, then amplified for the first round of PCR using ADP1 and GSP1 primers. The second round of PCR amplification is followed using PCR products from the first round as template, and ADP2 and GSP2 as primers.

5

Fragment 1 of the human *Mater* cDNA (SEQ ID NO: 1) may be amplified using the following combination of primers:

5'-primer: 5'-CAAGCTCCGGTGACGGAGATCAT-3' (SEQ ID NO.: 15);

3'-primer: 5'-AGCTGGAGGCAGAAGGAAGATG-3' (SEQ ID NO.: 16).

10

The 3'-terminal region of the human *Mater* cDNA molecule (also referred to herein as human *Mater* cDNA fragment 2, SEQ ID NO: 3) may be amplified using the following combination of primers:

5'-primer: 5'-TCTGGCCTCAGCCCTCGTCAGCTTGAC-3' (SEQ ID NO.: 17);

15

3'-primer: 5'-CCAAATGCTTTGTGTTTATTAATCC-3' (SEQ ID NO.: 18).

These primers are illustrative only; one skilled in the art will appreciate that many different primers may be derived from the provided cDNA sequence in order to amplify particular the indicated regions *Mater* cDNA, as well as to complete the sequence of the human *Mater* cDNA.

20

Re-sequencing of PCR products obtained by these amplification procedures is recommended; this will facilitate confirmation of the amplified sequence and will also provide information on natural variation on this sequence in different populations or species. Oligonucleotides derived from the provided *Mater* sequences provided may be used in such sequencing methods.

25

Orthologs of human *Mater* can be cloned in a similar manner, where the starting material consists of cells taken from a non-human species. Orthologs will generally share at least 80% sequence homology with the disclosed human *Mater* cDNA. Where the non-human species is more closely related to humans, the sequence homology will in general be greater. Closely related orthologous *Mater* molecules may share at least 82%, at least 85%, at least 90%, at least 91%, at least 93%, at least 95%, or at least 98% sequence homology with the disclosed human sequences.

30

Oligonucleotides derived from the human *Mater* cDNA sequence (SEQ ID NO: 23), or fragments thereof (such as SEQ ID NOs: 1 and 3), are encompassed within the scope of the present disclosure. Preferably, such oligonucleotide primers will comprise a sequence of at least 23 consecutive nucleotides of the *Mater* nucleic acid sequence. To enhance amplification specificity, oligonucleotide primers comprising at least 25, 30, 35, 40, 45 or 50 consecutive nucleotides of these sequences may also be used. These primers for instance may be obtained from any region of the disclosed sequences. By way of example, the human *Mater* cDNA, ORF and gene sequences may be apportioned into about halves or quarters based on sequence length, and the isolated nucleic acid molecules (e.g., oligonucleotides) may be derived from the first or second halves of the molecules, or

35

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-31-

any of the four quarters. The murine *Mater* cDNA, shown in SEQ ID NO: 5, can be used to illustrate this. The human *Mater* cDNA is 3447 nucleotides in length and so may be hypothetically divided into about halves (nucleotides 1-1723 and 1724-3447) or about quarters (nucleotides 1-862, 863-1723, 1724-2586 and 2587-3447). The human cDNA can be likewise apportioned, or can be

5 described in terms of the fragments presented herein (e.g., fragment 1, corresponding to around about nucleotide 1700 through around about 1950 of murine *Mater*; and fragment 2 of the human *Mater* cDNA, corresponding to the 3'-terminal region of murine *Mater* cDNA, around about nucleotide 2500 through the polyA tail of the murine *Mater* cDNA).

Nucleic acid molecules may be selected that comprise at least 15, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 50

10 or 100 consecutive nucleotides of any of these or other portions of the human *Mater* cDNA. Thus, representative nucleic acid molecules might comprise at least 15 consecutive nucleotides of the human *Mater* cDNA (SEQ ID NO: 23), or fragment 1 or fragment 2 of the disclosed human *Mater* coding sequence (SEQ ID NOs: 1 and 3, respectively).

15

EXAMPLE 6**Cloning of the *Mater* Genomic Sequence (or Gene)**

The *Mater* cDNA sequence and fragments described above does not contain introns, upstream transcriptional promoter or regulatory regions or downstream transcriptional regulatory regions of the *Mater* gene. It is possible that some mutations in the *Mater* gene that may lead to

20 defects in embryo development, infertility, or reduced fertility are not included in the cDNA but rather are located in other regions of the *Mater* gene. Mutations located outside of the open reading frame that encodes the MATER protein are not likely to affect the functional activity of the protein, but rather are likely to result in altered levels of the protein in the cell. For example, mutations in the promoter region of the *Mater* gene may prevent transcription of the gene and therefore lead to the

25 complete absence of the MATER protein in the cell.

Additionally, mutations within intron sequences in the genomic gene may also prevent expression of the MATER protein. Following transcription of a gene containing introns, the intron sequences are removed from the RNA molecule in a process termed splicing prior to translation of the RNA molecule which results in production of the encoded protein. When the RNA molecule is

30 spliced to remove the introns, the cellular enzymes that perform the splicing function recognize sequences around the intron/exon border and in this manner recognize the appropriate splice sites. If there is a mutation within the sequence of the intron close to the junction of the intron with an exon, the enzymes may not recognize the junction and may fail to remove the intron. If this occurs, the encoded protein will likely be defective. Thus, mutations inside the intron sequences within the

35 *Mater* gene (termed "splice site mutations") may also lead to defects in embryo development. However, knowledge of the exon structure and intronic splice site sequences of the *Mater* gene is required to define the molecular basis of these abnormalities. The provision herein of the *Mater* cDNA sequence enables the cloning of the entire *Mater* gene (including the promoter and other regulatory regions and the intron sequences) and the determination of its nucleotide sequence. With

this information in hand, diagnosis of a genetic predisposition to fertility defects based on DNA analysis will comprehend all possible mutagenic events at the *Mater* locus.

The *Mater* gene may be isolated by one or more routine procedures, including direct sequencing of one or more BAC or PAC clones that contain the *Mater* sequence.

5 With the sequences of human *Mater* cDNA and gene in hand, primers derived from these sequences may be used in diagnostic tests (described below) to determine the presence of mutations in any part of the genomic *Mater* gene of a patient. Such primers will be oligonucleotides comprising a fragment of sequence from the *Mater* gene (intron sequence, exon sequence or a sequence spanning an intron-exon boundary) and may include at least 10 consecutive nucleotides of the *Mater* cDNA or
10 gene. It will be appreciated that greater specificity may be achieved by using primers of greater lengths. Thus, in order to obtain enhanced specificity, the primers used may comprise 15, 17, 20, 23, 25, 30, 40 or even 50 consecutive nucleotides of the *Mater* cDNA or gene. Furthermore, with the provision of the *Mater* intron sequence information the analysis of a large and as yet untapped source of patient material for mutations will now be possible using methods such as chemical cleavage of
15 mismatches (Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397-4401, 1985; Montandon *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 9:3347-3358, 1989) and single-strand conformational polymorphism analysis (Orita *et al.*, *Genomics* 5:874-879, 1989).

Additional experiments may be performed to identify and characterize regulatory elements flanking the *Mater* gene. These regulatory elements may be characterized by standard techniques
20 including deletion analyses wherein successive nucleotides of a putative regulatory region are removed and the effect of the deletions are studied by either transient or long-term expression analyses experiments. The identification and characterization of regulatory elements flanking the genomic *Mater* gene may be made by functional experimentation (deletion analyses, etc.) in mammalian cells by either transient or long-term expression analyses.

25 It will be apparent to one skilled in the art that either the genomic clone or the cDNA or sequences derived from these clones may be utilized in applications, including but not limited to, studies of the expression of the *Mater* gene, studies of the function of the MATER protein, the generation of antibodies to the MATER protein diagnosis and therapy of MATER deleted or mutated patients to prevent or treat the defects in embryo development. Descriptions of applications
30 describing the use of *Mater* cDNA, or fragments thereof, are therefore intended to comprehend the use of the genomic *Mater* gene.

It will also be apparent to one skilled in the art that homologs of this gene may now be cloned from other species, such as the rat or a monkey, by standard cloning methods. Such homologs
35 will be useful in the production of animal models of onset and development of autoimmune infertility, and early embryogenesis. In general, such orthologous *Mater* molecules will share at least 70% sequence identity with the human *Mater* nucleic acid disclosed herein; more closely related orthologous sequences will share at least 75%, at least 80%, at least 90%, at least 95%, or at least 98% sequence identity with this sequence.

EXAMPLE 7

Mater Nucleic Acid and Amino Acid Sequence Variants

With the provision of human *MATER* protein fragments and corresponding nucleic acid sequences herein, the creation of variants of these sequences is now enabled.

5 Variant *MATER* proteins include proteins that differ in amino acid sequence from the human *MATER* sequences disclosed but that share at least 65% amino acid sequence homology with the provided human *MATER* protein. Other variants will share at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 90%, at least 95%, or at least 98% amino acid sequence homology. Manipulation of the nucleotide sequence of *Mater* using standard procedures, including for instance site-directed mutagenesis or PCR, can be used to produce such variants. The simplest modifications involve the substitution of one or more amino acids for amino acids having similar biochemical properties. These so-called conservative substitutions are likely to have minimal impact on the activity of the resultant protein. Table 2 shows amino acids that may be substituted for an original amino acid in a protein, and which are regarded as conservative substitutions.

15

Table 2

Original Residue	Conservative Substitutions
Ala	ser
Arg	lys
Asn	gln; his
Asp	glu
Cys	ser
Gln	asn
Glu	asp
Gly	pro
His	asn; gln
Ile	leu; val
Leu	ile; val
Lys	arg; gln; glu
Met	leu; ile
Phe	met; leu; tyr
Ser	thr
Thr	ser
Trp	tyr
Tyr	trp; phe
Val	ile; leu

20

25

30

35

More substantial changes in enzymatic function or other protein features may be obtained by selecting amino acid substitutions that are less conservative than those listed in Table 2. Such changes include changing residues that differ more significantly in their effect on maintaining polypeptide backbone structure (e.g., sheet or helical conformation) near the substitution, charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or bulk of a specific side chain. The following substitutions are generally expected to produce the greatest changes in protein properties: (a) a hydrophilic residue (e.g., seryl or threonyl) is substituted for (or by) a hydrophobic residue (e.g., leucyl, isoleucyl, phenylalanyl, valyl or alanyl); (b) a cysteine or proline is substituted for (or by) any other residue; (c) a residue having an electropositive side chain (e.g., lysyl, arginyl, or histadyl) is

40

45

substituted for (or by) an electronegative residue (e.g., glutamyl or aspartyl); or (d) a residue having a bulky side chain (e.g., phenylalanine) is substituted for (or by) one lacking a side chain (e.g., glycine).

Variant MATER encoding sequences may be produced by standard DNA mutagenesis techniques, for example, M13 primer mutagenesis. Details of these techniques are provided in
5 Sambrook *et al.* (*In Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1989), Ch. 15. By the use of such techniques, variants may be created that differ in minor ways from the human MATER sequences disclosed. DNA molecules and nucleotide sequences that are derivatives of those
10 specifically disclosed herein, and which differ from those disclosed by the deletion, addition, or substitution of nucleotides while still encoding a protein that has at least 82% sequence identity with the human MATER encoding sequence disclosed (SEQ ID NOs: 1 and 3), are comprehended by this disclosure. Also comprehended are more closely related nucleic acid molecules that share at least
15 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, or at least 98% nucleotide sequence homology with the disclosed *Mater* sequences. In their most simple form, such variants may differ from the disclosed sequences by alteration of the coding region to fit the codon usage bias of the particular organism into which the molecule is to be introduced. The full length human *Mater* cDNA (SEQ ID NO: 23) is also encompassed in the disclosure, and as a molecule that comprises both fragment 1 (SEQ ID NO: 1) and fragment 2 (SEQ ID NO: 3), and encoding the human MATER protein with described physical characteristics and biological properties.

Alternatively, the coding region may be altered by taking advantage of the degeneracy of the
20 genetic code to alter the coding sequence such that, while the nucleotide sequence is substantially altered, it nevertheless encodes a protein having an amino acid sequence substantially similar to the disclosed human MATER protein sequences. For example, because of the degeneracy of the genetic code, four nucleotide codon triplets -- (GCT, GCG, GCC and GCA) - code for alanine. The coding
25 sequence of any specific alanine residue within the human *MATER* protein, therefore, could be changed to any of these alternative codons without affecting the amino acid composition or characteristics of the encoded protein. Based upon the degeneracy of the genetic code, variant DNA molecules may be derived from the cDNA and gene sequences disclosed herein using standard DNA mutagenesis techniques as described above, or by synthesis of DNA sequences. Thus, this disclosure
30 also encompasses nucleic acid sequences that encode a *MATER* protein, but which vary from the disclosed nucleic acid sequences by virtue of the degeneracy of the genetic code.

Variants of the *MATER* protein may also be defined in terms of their sequence identity with the prototype human *MATER* protein. As described above, human *MATER* proteins share at least
35 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 90%, at least 95%, or at least 98% amino acid sequence identity with the human *MATER* protein (SEQ ID NO: 24) or fragments disclosed herein (such as SEQ ID NOs: 2 and 4). Nucleic acid sequences that encode such proteins/fragments readily may be determined simply by applying the genetic code to the amino acid sequence of an *MATER* protein or fragment, and such nucleic acid molecules may readily be produced by assembling oligonucleotides corresponding to portions of the sequence.

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-35-

Nucleic acid molecules that are derived from the human *Mater* cDNA nucleic acid sequences disclosed include molecules that hybridize under stringent conditions to the disclosed prototypical *Mater* nucleic acid molecules, or fragments thereof. Stringent conditions are hybridization at 65° C in 6 x SSC, 5 x Denhardt's solution, 0.5% SDS and 100 µg/ml sheared salmon testes DNA, followed by 5 15-30 minute sequential washes in 2 x SSC, 0.5% SDS, followed by 1 x SSC, 0.5% SDS and finally 0.2 x SSC, 0.5% SDS, at 65° C.

Low stringency hybridization conditions (to detect less closely related homologs) are performed as described above but at 50°C (both hybridization and wash conditions); however, depending on the strength of the detected signal, the wash steps may be terminated after the first 2 x 10 SSC wash.

Human *Mater* nucleic acid encoding molecules (including the cDNA shown in SEQ ID NO: 23 and fragments shown in SEQ ID NOs: 1 and 3, and nucleic acids comprising these sequences), and orthologs and homologs of these sequences, may be incorporated into transformation or expression vectors.

15

EXAMPLE 8**Expression of MATER Protein**

With the provision of human *Mater* cDNA sequence fragments, and methods for determining and cloning the full length human *Mater* cDNA, the expression and purification of the 20 MATER protein by standard laboratory techniques is now enabled. Purified human MATER protein may be used for functional analyses, antibody production, diagnostics, and patient therapy. Furthermore, the DNA sequence of the *Mater* cDNA can be manipulated in studies to understand the expression of the gene and the function of its product. Mutant forms of the human MATER may be isolated based upon information contained herein, and may be studied in order to detect alteration in 25 expression patterns in terms of relative quantities, cellular localization, tissue specificity and functional properties of the encoded mutant MATER protein. Partial or full-length cDNA sequences, which encode for the subject protein, may be ligated into bacterial expression vectors. Methods for expressing large amounts of protein from a cloned gene introduced into *Escherichia coli* (*E. coli*) may be utilized for the purification, localization and functional analysis of proteins. For example, fusion 30 proteins consisting of amino terminal peptides encoded by a portion of the *E. coli lacZ* or *trpE* gene linked to MATER proteins may be used to prepare polyclonal and monoclonal antibodies against these proteins. Thereafter, these antibodies may be used to purify proteins by immunoaffinity chromatography, in diagnostic assays to quantitate the levels of protein and to localize proteins in tissues and individual cells by immunofluorescence. Such antibodies may be specific for epitope 35 tags, which can be added to the expression construct for identification an/or purification purposes.

Intact native protein may also be produced in *E. coli* in large amounts for functional studies. Methods and plasmid vectors for producing fusion proteins and intact native proteins in bacteria are described in Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ch. 17,

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-36-

CSHL, New York, 1989). Such fusion proteins may be made in large amounts, are easy to purify, and can be used to elicit antibody response. Native proteins can be produced in bacteria by placing a strong, regulated promoter and an efficient ribosome binding site upstream of the cloned gene. If low levels of protein are produced, additional steps may be taken to increase protein production; if high levels of protein are produced, purification is relatively easy. Suitable methods are presented in Sambrook *et al.* (In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1989) and are well known in the art. Often, proteins expressed at high levels are found in insoluble inclusion bodies. Methods for extracting proteins from these aggregates are described by Sambrook *et al.* (In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ch. 17, CSHL, New York, 1989). Vector systems suitable for the expression of *lacZ* fusion genes include the pUR series of vectors (Ruther and Muller-Hill, *EMBO J.* 2:1791, 1983), pEX1-3 (Stanley and Luzio, *EMBO J.* 3:1429, 1984) and pMR100 (Gray *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6598, 1982). Vectors suitable for the production of intact native proteins include pKC30 (Shimatake and Rosenberg, *Nature* 292:128, 1981), pKK177-3 (Amann and Brosius, *Gene* 40:183, 1985) and pET-3 (Studier and Moffatt, *J. Mol. Biol.* 189:113, 1986). MATer fusion proteins may be isolated from protein gels, lyophilized, ground into a powder and used as an antigen. The DNA sequence can also be transferred from its existing context to other cloning vehicles, such as other plasmids, bacteriophages, cosmids, animal viruses and yeast artificial chromosomes (YACs) (Burke *et al.*, *Science* 236:806-812, 1987). These vectors may then be introduced into a variety of hosts including somatic cells, and simple or complex organisms, such as bacteria, fungi (Timberlake and Marshall, *Science* 244:1313-1317, 1989), invertebrates, plants, and animals (Pursel *et al.*, *Science* 244:1281-1288, 1989), which cells or organisms are rendered transgenic by the introduction of the heterologous *Mater* cDNA.

For expression in mammalian cells, the cDNA sequence may be ligated to heterologous promoters, such as the simian virus (SV) 40 promoter in the pSV2 vector (Mulligan and Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072-2076, 1981), and introduced into cells, such as monkey COS-1 cells (Gluzman, *Cell* 23:175-182, 1981), to achieve transient or long-term expression. The stable integration of the chimeric gene construct may be maintained in mammalian cells by biochemical selection, such as neomycin (Southern and Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1:327-341, 1982) and mycophenolic acid (Mulligan and Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072-2076, 1981).

DNA sequences can be manipulated with standard procedures such as restriction enzyme digestion, fill-in with DNA polymerase, deletion by exonuclease, extension by terminal deoxynucleotide transferase, ligation of synthetic or cloned DNA sequences, site-directed sequence-alteration via single-stranded bacteriophage intermediate or with the use of specific oligonucleotides in combination with nucleic acid amplification.

The cDNA sequence (or portions derived from it) or a mini gene (a cDNA with an intron and its own promoter) may be introduced into eukaryotic expression vectors by conventional techniques. These vectors are designed to permit the transcription of the cDNA in eukaryotic cells by providing regulatory sequences that initiate and enhance the transcription of the cDNA and ensure its proper splicing and polyadenylation. Vectors containing the promoter and enhancer regions of the SV40 or

long terminal repeat (LTR) of the Rous Sarcoma virus and polyadenylation and splicing signal from SV40 are readily available (Mulligan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1078-2076, 1981; Gorman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6777-6781, 1982). The level of expression of the cDNA can be manipulated with this type of vector, either by using promoters that have different activities (for
5 example, the baculovirus pAC373 can express cDNAs at high levels in *S. frugiperda* cells (Summers and Smith, In *Genetically Altered Viruses and the Environment*, Fields *et al.* (Eds.) 22:319-328, CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York, 1985) or by using vectors that contain promoters amenable to modulation, for example, the glucocorticoid-responsive promoter from the mouse mammary tumor virus (Lee *et al.*, *Nature* 294:228, 1982). The expression of the cDNA can be
10 monitored in the recipient cells 24 to 72 hours after introduction (transient expression).

In addition, some vectors contain selectable markers such as the *gpt* (Mulligan and Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072-2076, 1981) or *neo* (Southern and Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1:327-341, 1982) bacterial genes. These selectable markers permit selection of transfected cells that exhibit stable, long-term expression of the vectors (and therefore the cDNA). The vectors can be
15 maintained in the cells as episomal, freely replicating entities by using regulatory elements of viruses, such as papilloma (Sarver *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 1:486-496, 1981) or Epstein-Barr (Sugden *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 5:410-413, 1985). Alternatively, one can also produce cell lines that have integrated the vector into genomic DNA. Both of these types of cell lines produce the gene product on a continuous
20 basis. One can also produce cell lines that have amplified the number of copies of the vector (and therefore of the cDNA as well) to create cell lines that can produce high levels of the gene product (Alt *et al.*, *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370, 1978).

The transfer of DNA into eukaryotic, in particular human or other mammalian cells, is now a conventional technique. Recombinant expression vectors can be introduced into the recipient cells as
25 pure DNA (transfection) by, for example, precipitation with calcium phosphate (Graham and vander Eb, *Virology* 52:466, 1973) or strontium phosphate (Brash *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 7:2013, 1987), electroporation (Neumann *et al.*, *EMBO J* 1:841, 1982), lipofection (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413, 1987), DEAE dextran (McCuthan *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 41:351, 1968), microinjection (Mueller *et al.*, *Cell* 15:579, 1978), protoplast fusion (Schafner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2163-2167, 1980), or pellet guns (Klein *et al.*, *Nature* 327:70, 1987). Alternatively, the
30 cDNA, or fragments thereof, can be introduced by infection with virus vectors. Systems are developed that use, for example, retroviruses (Bernstein *et al.*, *Gen. Engng* 7:235, 1985), adenoviruses (Ahmad *et al.*, *J. Virol.* 57:267, 1986), or Herpes virus (Spaete *et al.*, *Cell* 30:295, 1982). Techniques of use in packaging long transcripts can be found in Kochanek *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5731-5739, 1996) Parks *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13565-13570, 1996)
35 and Parks and Graham (*J. Virol.* 71:3293-3298, 1997). MATER encoding sequences can also be delivered to target cells *in vitro* via non-infectious systems, for instance liposomes.

These eukaryotic expression systems can be used for studies of MATER encoding nucleic acids and mutant forms of these molecules, the MATER protein and mutant forms of this protein. Such uses include, for example, the identification of regulatory elements located in the 5' region of the

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-38-

Mater gene on genomic clones that can be isolated from human genomic DNA libraries using the information contained herein. The eukaryotic expression systems also may be used to study the function of the normal complete protein, specific portions of the protein, or of naturally occurring or artificially produced mutant proteins.

5 Using the above techniques, expression vectors containing the *Mater* gene sequence or cDNA, or fragments or variants or mutants thereof, can be introduced into human cells, mammalian cells from other species or non-mammalian cells, as desired. The choice of cell is determined by the purpose of the treatment. For example, monkey COS cells (Gluzman, *Cell* 23:175-182, 1981) that produce high levels of the SV40 T antigen and permit the replication of vectors containing the SV40
10 origin of replication may be used. Similarly, Chinese hamster ovary (CHO), mouse NIH 3T3 fibroblasts or human fibroblasts or lymphoblasts (as described herein) may be used.

Embodiments described herein thus encompass recombinant vectors that comprise all or part of a *MATER* encoding sequence, such as the *Mater* gene or cDNA or variants thereof, for expression in a suitable host. The *Mater* DNA is operatively linked in the vector to an expression control
15 sequence in the recombinant DNA molecule so that the *MATER* polypeptide can be expressed. The expression control sequence may be selected from the group consisting of sequences that control the expression of genes of prokaryotic or eukaryotic cells and their viruses and combinations thereof. The expression control sequence may be specifically selected from the group consisting of the *lac* system, the *trp* system, the *tac* system, the *trc* system, major operator and promoter regions of phage
20 lambda, the control region of fd coat protein, the early and late promoters of SV40, promoters derived from polyoma, adenovirus, retrovirus, baculovirus and simian virus, the promoter for 3-phosphoglycerate kinase, the promoters of yeast acid phosphatase, the promoter of the yeast alpha-mating factors and combinations thereof.

The host cell, which may be transfected with a vector, may be selected from the group
25 consisting of *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* or other bacilli; other bacteria; yeast; fungi; insect; mouse or other animal; or plant hosts; or human tissue cells.

It is appreciated that for mutant or variant *Mater* DNA sequences, similar systems are employed to express and produce the mutant product.

30

EXAMPLE 9

Production of an Antibody to *MATER* Protein

Monoclonal or polyclonal antibodies may be produced to either the normal *MATER* protein or mutant forms of this protein. Optimally, antibodies raised against the *MATER* protein would specifically detect the *MATER* protein. That is, such antibodies would recognize and bind the
35 *MATER* protein and would not substantially recognize or bind to other proteins found in human cells. Antibodies to the human *MATER* protein may recognize *MATER* from other species, such as murine *MATER*, and vice versa.

The determination that an antibody specifically detects the *MATER* protein is made by any one of a number of standard immunoassay methods; for instance, the Western blotting technique

(Sambrook *et al.*, In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1989). To determine that a given antibody preparation (such as one produced in a mouse) specifically detects the MATER protein by Western blotting, total cellular protein is extracted from human cells (for example, lymphocytes) and electrophoresed on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. The proteins are then transferred to a membrane (for example, nitrocellulose or PVDF) by Western blotting, and the antibody preparation is incubated with the membrane. After washing the membrane to remove non-specifically bound antibodies, the presence of specifically bound antibodies is detected by the use of (by way of example) an anti-mouse antibody conjugated to an enzyme such as alkaline phosphatase. Application of an alkaline phosphatase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium results in the production of a dense blue compound by immunolocalized alkaline phosphatase. Antibodies that specifically detect the MATER protein will, by this technique, be shown to bind to the MATER protein band (which will be localized at a given position on the gel determined by its molecular weight, which is approximately 125 kDa based on gel-mobility estimation for murine MATER. Non-specific binding of the antibody to other proteins may occur and may be detectable as a weak signal on the Western blot. The non-specific nature of this binding will be recognized by one skilled in the art by the weak signal obtained on the Western blot relative to the strong primary signal arising from the specific antibody-MATER protein binding.

Substantially pure MATER protein suitable for use as an immunogen is isolated from the transfected or transformed cells as described above. The concentration of protein in the final preparation is adjusted, for example, by concentration on an Amicon (Millipore, Bedford, Massachusetts) or similar filter device, to the level of a few micrograms per milliliter. Monoclonal or polyclonal antibody to the protein can then be prepared as follows:

A. Monoclonal Antibody Production by Hybridoma Fusion

Monoclonal antibody to epitopes of the MATER protein identified and isolated as described can be prepared from murine hybridomas according to the classical method of Kohler and Milstein (*Nature* 256:495-497, 1975) or derivative methods thereof. Briefly, a mouse is repetitively inoculated with a few micrograms of the selected protein over a period of a few weeks. The mouse is then sacrificed, and the antibody-producing cells of the spleen isolated. The spleen cells are fused with mouse myeloma cells using polyethylene glycol, and the excess un-fused cells destroyed by growth of the system on selective media comprising aminopterin (HAT media). Successfully fused cells are diluted and aliquots of the dilution placed in wells of a microtiter plate, where growth of the culture is continued. Antibody-producing clones are identified by detection of antibody in the supernatant fluid of the wells by immunoassay procedures, such as ELISA, as originally described by Engvall (*Enzymol.* 70(A):419-439, 1980), and derivative methods thereof. Selected positive clones can be expanded and their monoclonal antibody product harvested for use. Detailed procedures for monoclonal antibody production are described in Harlow and Lane (*Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1988).

B. Polyclonal Antibody Production by Immunization

Polyclonal antiserum containing antibodies to heterogeneous epitopes of a single protein can be prepared by immunizing suitable animals with the expressed protein (Example 8), which optionally can be modified to enhance immunogenicity. Effective polyclonal antibody production is affected by many factors related both to the antigen and the host species. For example, small molecules tend to be less immunogenic than others and may require the use of carriers and adjuvant, examples of which are known. Also, host animals vary in response to site of inoculations and dose, with either inadequate or excessive doses of antigen resulting in low titer antisera. A series of small doses (ng level) of antigen administered at multiple intradermal sites appear to be most reliable. An effective immunization protocol for rabbits can be found in Vaitukaitis *et al.* (*J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33:988-991, 1971).

Booster injections can be given at regular intervals, and antiserum harvested when antibody titer thereof begins to fall, as determined semi-quantitatively (for example, by double immunodiffusion in agar against known concentrations of the antigen). See, for example, Ouchterlony *et al.* (In *Handbook of Experimental Immunology*, Wier, D. (ed.) chapter 19. Blackwell, 1973). Plateau concentration of antibody is usually in the range of about 0.1 to 0.2 mg/ml of serum (about 12 μ M). Affinity of the antisera for the antigen is determined by preparing competitive binding curves, as described, for example, by Fisher (*Manual of Clinical Immunology*, Ch. 42, 1980).

C. Antibodies Raised against Synthetic Peptides

A third approach to raising antibodies against the MATER protein is to use synthetic peptides synthesized on a commercially available peptide synthesizer based upon the predicted amino acid sequence of the MATER protein.

By way of example only, mouse MATER C-terminal peptide (residues 1093 through 1111 of SEQ ID NO: 6) was conjugated with KLH to immunize the female rabbits (two) every two-weeks. Starting from the third immunization, a small amount (~3 ml) of blood was collected from the immunized rabbits to examine the titer of the anti-peptide antibodies using the peptide as antigen and ELISA method. Immunizations continued until the antibodies reached maximal titers, which occurred in about ten immunizations, and then the rabbits were sacrificed to bleed in preparation for the sera. The resultant preparation was used both to characterize murine MATER (Example 1) and human MATER (Example 4).

D. Antibodies Raised by Injection of MATER Encoding Sequence

Antibodies may be raised against the MATER protein by subcutaneous injection of a recombinant DNA vector that expresses the MATER protein into laboratory animals, such as mice. Delivery of the recombinant vector into the animals may be achieved using a hand-held form of the Biolistic system (Sanford *et al.*, *Particulate Sci. Technol.* 5:27-37, 1987), as described by Tang *et al.* (*Nature* 356:152-154, 1992). Expression vectors suitable for this purpose may include those that

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-41-

express the *MATER* encoding sequence under the transcriptional control of either the human β -actin promoter or the cytomegalovirus (CMV) promoter.

5 Antibody preparations prepared according to these protocols are useful in quantitative immunoassays which determine concentrations of antigen-bearing substances in biological samples; they are also used semi-quantitatively or qualitatively to identify the presence of antigen in a biological sample.

EXAMPLE 10**DNA-Based Diagnosis**

10

The *Mater* sequence information presented herein can be used in the area of genetic testing for predisposition to reduced fertility or infertility, such as autoimmune infertility, owing to defects in *Mater*, such as deletion, duplication or mutation. The gene sequence of the *Mater* gene, including intron-exon boundaries is also useful in such diagnostic methods. Individuals carrying mutations in 15 the *Mater* gene (or a portion thereof), or having duplications or heterozygous or homozygous deletions of the *Mater* gene, may be detected at the DNA level with the use of a variety of techniques. For such a diagnostic procedure, a biological sample of the subject, which biological sample contains either DNA or RNA derived from the subject, is assayed for a mutated, duplicated or deleted *Mater* gene. Suitable biological samples include samples containing genomic DNA or RNA obtained from 20 body cells, such as those present in peripheral blood, urine, saliva, tissue biopsy, surgical specimen, amniocentesis samples and autopsy material. The detection in the biological sample of either a mutant *Mater* gene, a mutant *Mater* RNA, or a duplicated or homozygously or heterozygously deleted *Mater* gene, may be performed by a number of methodologies, examples of which are discussed below.

25 One embodiment of such detection techniques for the identification of unknown mutations is the amplification (e.g., polymerase chain reaction amplification) of reverse transcribed RNA (RT-PCR) isolated from a subject, followed by direct DNA sequence determination of the products. The presence of one or more nucleotide differences between the obtained sequence and the prototypical *Mater* cDNA sequence, and especially, differences in the ORF portion of the nucleotide sequence, are 30 taken as indicative of a potential *Mater* gene mutation.

Alternatively, DNA extracted from a biological sample may be used directly for amplification. Direct amplification from genomic DNA would be appropriate for analysis of the entire *Mater* gene including regulatory sequences located upstream and downstream from the open reading frame, or intron/exon borders. Reviews of direct DNA diagnosis have been presented by 35 Caskey (*Science* 236:1223-1228, 1989) and by Landegren *et al.* (*Science* 242:229-237, 1989).

Other mutation scanning techniques appropriate for detecting unknown within amplicons derived from DNA or cDNA could also be performed. These techniques include direct sequencing (without sequencing), single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP) (for instance, see Hongyo *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 21:3637-3642, 1993), chemical cleavage (including HOT cleavage)

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-42-

(Bateman *et al.*, *Am. J. Med. Genet.* 45:233-240, 1993; reviewed in Ellis *et al.*, *Hum. Mutat.* 11:345-353, 1998), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), ligation amplification mismatch protection (LAMP), and enzymatic mutation scanning (Taylor and Deeble, *Genet. Anal.* 14:181-186, 1999), followed by direct sequencing of amplicons with putative sequence variations.

5 Further studies of *Mater* genes isolated from female subjects displaying infertility, particularly autoimmune infertility subjects, or their relatives, may reveal particular mutations, genomic amplifications, or deletions, which occur at a high frequency within this population of individuals. In such case, rather than sequencing the entire *Mater* gene, DNA diagnostic methods can be designed to specifically detect the most common, or most closely disease-linked, *MATER* defects.

10 The detection of specific DNA mutations may be achieved by methods such as hybridization using allele specific oligonucleotides (ASOs) (Wallace *et al.*, *CSHL Symp. Quant. Biol.* 51:257-261, 1986), direct DNA sequencing (Church and Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995, 1988), the use of restriction enzymes (Flavell *et al.*, *Cell* 15:25-41, 1978; Geever *et al.*, 1981), discrimination on the basis of electrophoretic mobility in gels with denaturing reagent (Myers and Maniatis, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:275-284, 1986), RNase protection (Myers *et al.*, *Science* 230:1242-1246, 1985), chemical cleavage (Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397-4401, 1988), and the ligase-mediated detection procedure (Landegren *et al.*, *Science* 241:1077-1080, 1988).

15 Oligonucleotides specific to normal or mutant sequences are chemically synthesized using commercially available machines. These oligonucleotides are then labeled radioactively with isotopes (such as ³²P) or non-radioactively, with tags such as biotin (Ward and Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6633-6657, 1981), and hybridized to individual DNA samples immobilized on membranes or other solid supports by dot-blot or transfer from gels after electrophoresis. These specific sequences are visualized by methods such as autoradiography or fluorometric (Landegren *et al.*, *Science* 242:229-237, 1989) or colorimetric reactions (Gebeyehu *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 15:4513-4534, 1987). Using an ASO specific for a normal allele, the absence of hybridization would indicate a mutation in the particular region of the gene, or deleted *Mater* gene. In contrast, if an ASO specific for a mutant allele hybridizes to a clinical sample, this would indicate the presence of a mutation in the region defined by the ASO.

20 Sequence differences between normal and mutant forms of the *Mater* gene may also be revealed by the direct DNA sequencing method of Church and Gilbert (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995, 1988). Cloned DNA segments may be used as probes to detect specific DNA segments. The sensitivity of this method is greatly enhanced when combined with nucleic acid amplification, e.g., PCR (Wrichnik *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 15:529-542, 1987; Wong *et al.*, *Nature* 330:384-386, 1987; Stoffet *et al.*, *Science* 239:491-494, 1988). In this approach, a sequencing primer that lies within the amplified sequence is used with double-stranded PCR product or single-stranded template generated by a modified PCR. The sequence determination is performed by conventional procedures with radiolabeled nucleotides or by automatic sequencing procedures with fluorescent tags.

35

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-43-

Sequence alterations may occasionally generate fortuitous restriction enzyme recognition sites or may eliminate existing restriction sites. Changes in restriction sites are revealed by the use of appropriate enzyme digestion followed by conventional gel-blot hybridization (Southern, *J. Mol. Biol.* 98:503-517, 1975). DNA fragments carrying the restriction site (either normal or mutant) are detected by their reduction in size or increase in corresponding restriction fragment numbers. Genomic DNA samples may also be amplified by PCR prior to treatment with the appropriate restriction enzyme; fragments of different sizes are then visualized under UV light in the presence of ethidium bromide after gel electrophoresis.

Genetic testing based on DNA sequence differences may be achieved by detection of alteration in electrophoretic mobility of DNA fragments in gels, with or without denaturing reagent. Small sequence deletions and insertions can be visualized by high-resolution gel electrophoresis. For example, a PCR product with small deletions is clearly distinguishable from a normal sequence on an 8% non-denaturing polyacrylamide gel (WO 91/10734; Nagamine *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 45:337-339, 1989). DNA fragments of different sequence compositions may be distinguished on denaturing formamide gradient gels in which the mobilities of different DNA fragments are retarded in the gel at different positions according to their specific "partial-melting" temperatures (Myers *et al.*, *Science* 230:1242-1246, 1985). Alternatively, a method of detecting a mutation comprising a single base substitution or other small change could be based on differential primer length in a PCR. For example, an invariant primer could be used in addition to a primer specific for a mutation. The PCR products of the normal and mutant genes can then be differentially detected in acrylamide gels.

In addition to conventional gel-electrophoresis and blot-hybridization methods, DNA fragments may also be visualized by methods where the individual DNA samples are not immobilized on membranes. The probe and target sequences may be both in solution, or the probe sequence may be immobilized (Saiki *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:6230-6234, 1989). A variety of detection methods, such as autoradiography involving radioisotopes, direct detection of radioactive decay (in the presence or absence of scintillant), spectrophotometry involving calorigenic reactions and fluorometry involving fluorogenic reactions, may be used to identify specific individual genotypes.

If multiple mutations are encountered frequently in the *Mater* gene, a system capable of detecting such multiple mutations likely will be desirable. For example, a nucleic acid amplification reaction with multiple, specific oligonucleotide primers and hybridization probes may be used to identify all possible mutations at the same time (Chamberlain *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16:1141-1155, 1988). The procedure may involve immobilized sequence-specific oligonucleotide probes (Saiki *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:6230-6234, 1989).

35

EXAMPLE 11**Quantitation of MATER Protein**

An alternative method of diagnosing *Mater* gene deletion, amplification, or mutation is to quantitate the level of MATER protein in the cells of a subject. This diagnostic tool would be useful for detecting reduced levels of the MATER protein that result from, for example, mutations in the

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-44-

promoter regions of the *Mater* gene or mutations within the coding region of the gene that produce truncated, non-functional or unstable polypeptides, as well as from deletions of the entire *Mater* gene. Alternatively, duplications of the *Mater* gene may be detected as an increase in the expression level of this protein. The determination of reduced or increased MATER protein levels would be an
5 alternative or supplemental approach to the direct determination of *Mater* gene deletion, duplication or mutation status by the methods outlined above.

The availability of antibodies specific to the MATER protein will facilitate the quantitation of cellular MATER protein by one of a number of immunoassay methods, which are well known in the art and are presented in Harlow and Lane (*Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, New York,
10 1988).

For the purposes of quantitating the MATER protein, a biological sample of the subject, which sample includes cellular proteins, is required. Such a biological sample may be obtained from body cells, such as those present in peripheral blood, urine, saliva, tissue biopsy, amniocentesis samples, surgical specimens and autopsy material. In particular, female reproductive cells (*e.g.*, ova)
15 or embryos are appropriate samples. Quantitation of MATER protein is achieved by immunoassay and compared to levels of the protein found in healthy cells (*e.g.*, cells from a female known not to suffer from decreased fertility). A significant (*e.g.*, 10% or greater, for instance, 20%, 25%, 30%, 50% or more) reduction in the amount of MATER protein in the cells of a subject compared to the amount of MATER protein found in normal human cells would be taken as an indication that the
20 subject may have deletions or mutations in the *Mater* gene locus, whereas a significant (*e.g.*, 10% or greater, for instance, 20%, 25%, 30%, 50% or more) increase would indicate that a duplication or enhancing mutation had occurred.

EXAMPLE 12

25 Detection of Serum Antibody against MATER Protein

The MATER family of proteins was first identified as autoantibodies involved in the pathogenesis of certain cases of autoimmune infertility. With the provision herein of human MATER protein sequences and encoding nucleic acids, methods for the detection and diagnosis of such
fertility failure are now enabled.

30 Autoantibodies that recognize an epitope of the human MATER protein can be detected in samples from a subject, for instance serum or other fluid, using known immunological techniques. The presence of such autoantibodies (*e.g.*, circulating autoantibodies specific for a MATER epitope) indicates that the subject suffers from MATER-mediated infertility or reduced fertility, or has an increased susceptibility to suffer from one of these conditions.

35 Many techniques are commonly known in the art for the detection and quantification of antigen. Most commonly, the purified antigen will be bound to a substrate, the antibody of the sample will bind via its Fab portion to this antigen, the substrate will then be washed and a second, labeled antibody will then be added which will bind to the Fc portion of the antibody that is the subject of the assay. The second, labeled antibody will be species specific, *i.e.*, if the serum is from a

human, the second, labeled antibody will be anti-human-IgG antibody. The specimen will then be washed and the amount of the second, labeled antibody that has been bound will be detected and quantified by standard methods.

5 Examples of methods for the detection of antibodies in biological samples, including methods employing dip strips or other immobilized assay devices, are disclosed for instance in the following patents: U.S. Patents No. 5,965,356 (Herpes simplex virus type specific seroassay); 6,114,179 (Method and test kit for detection of antigens and/or antibodies); 6,077,681 (Diagnosis of motor neuropathy by detection of antibodies); 6,057,097 (Marker for pathologies comprising an auto-immune reaction and/or for inflammatory diseases); and 5,552,285 (Immunoassay methods, 10 compositions and kits for antibodies to oxidized DNA bases).

EXAMPLE 13

Suppression of MATER Expression.

A reduction of MATER protein expression in a transgenic cell may be obtained by introducing 15 into cells an antisense construct based on the *Mater* encoding sequence, including the human *Mater* cDNA or fragments thereof (for instance, the cDNA fragments shown in SEQ ID NO: 1 and 3) or gene sequence or flanking regions thereof. For antisense suppression, a nucleotide sequence from an MATER encoding sequence, e.g. all or a portion of the *Mater* cDNA or gene, is arranged in reverse orientation relative to the promoter sequence in the transformation vector. Other aspects of the vector 20 may be chosen as discussed above (Example 8).

The introduced sequence need not be the full length human *Mater* cDNA (SEQ ID NO: 23) or gene, and need not be exactly homologous to the equivalent sequence found in the cell type to be transformed. Thus, portions or fragments of the murine cDNA (SEQ ID NO: 5) could also be used to knock out expression of the human *Mater* gene. Generally, however, where the introduced sequence 25 is of shorter length, a higher degree of homology to the native *Mater* sequence will be needed for effective antisense suppression. The introduced antisense sequence in the vector may be at least 30 nucleotides in length, and improved antisense suppression typically will be observed as the length of the antisense sequence increases. The length of the antisense sequence in the vector advantageously may be greater than 100 nucleotides, and can be up to about the full length of the human *Mater* cDNA 30 or gene. For suppression of the *Mater* gene itself, transcription of an antisense construct results in the production of RNA molecules that are the reverse complement of mRNA molecules transcribed from the endogenous *Mater* gene in the cell.

Although the exact mechanism by which antisense RNA molecules interfere with gene 35 expression has not been elucidated, it is believed that antisense RNA molecules bind to the endogenous mRNA molecules and thereby inhibit translation of the endogenous mRNA.

Suppression of endogenous MATER expression can also be achieved using ribozymes. Ribozymes are synthetic RNA molecules that possess highly specific endoribonuclease activity. The production and use of ribozymes are disclosed in U.S. Patent No. 4,987,071 to Cech and U.S. Patent No. 5,543,508 to Haselhoff. The inclusion of ribozyme sequences within antisense RNAs may be

used to confer RNA cleaving activity on the antisense RNA, such that endogenous mRNA molecules that bind to the antisense RNA are cleaved, which in turn leads to an enhanced antisense inhibition of endogenous gene expression.

Finally, dominant negative mutant forms of MATER may be used to block endogenous
5 MATER activity.

EXAMPLE 14

MATER Knockout and Overexpression Transgenic Animals

Mutant organisms that under-express or over-express MATER protein are useful for research.
10 Such mutants allow insight into the physiological and/or pathological role of MATER in a healthy and/or pathological organism. These mutants are "genetically engineered," meaning that information in the form of nucleotides has been transferred into the mutant's genome at a location, or in a combination, in which it would not normally exist. Nucleotides transferred in this way are said to be "non-native." For example, a non-MATER promoter inserted upstream of a native *Mater* gene would be
15 non-native. An extra copy of a *Mater* gene or other encoding sequence on a plasmid, transformed into a cell, would be non-native, whether that extra copy was *Mater* derived from the same or a different species.

Mutants may be, for example, produced from mammals, such as mice, that either over-express or under-express MATER protein, or that do not express MATER at all. Over-expression mutants are
20 made by increasing the number of MATER-encoding sequences (such as genes) in the organism, or by introducing an MATER-encoding sequence into the organism under the control of a constitutive or inducible or viral promoter such as the mouse mammary tumor virus (MMTV) promoter or the whey acidic protein (WAP) promoter or the metallothionein promoter. Mutants that under-express MATER may be made by using an inducible or repressible promoter, or by deleting the *Mater* gene, or by
25 destroying or limiting the function of the *Mater* gene, for instance by disrupting the gene by transposon insertion.

Antisense genes may be engineered into the organism, under a constitutive or inducible promoter, to decrease or prevent MATER expression, as discussed above in Example 13.

A gene is "functionally deleted" when genetic engineering has been used to negate or reduce
30 gene expression to negligible levels. When a mutant is referred to in this application as having the *Mater* gene altered or functionally deleted, this refers to the *Mater* gene and to any ortholog of this gene. When a mutant is referred to as having "more than the normal copy number" of a gene, this means that it has more than the usual number of genes found in the wild-type organism, e.g., in the diploid mouse or human.

A mutant mouse over-expressing MATER may be made by constructing a plasmid having the
35 *Mater* gene driven by a promoter, such as the mouse mammary tumor virus (MMTV) promoter or the whey acidic protein (WAP) promoter. This plasmid may be introduced into mouse oocytes by microinjection. The oocytes are implanted into pseudopregnant females, and the litters are assayed for insertion of the transgene. Multiple strains containing the transgene are then available for study.

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-47-

WAP is quite specific for mammary gland expression during lactation, and MMTV is expressed in a variety of tissues including mammary gland, salivary gland and lymphoid tissues. Many other promoters might be used to achieve various patterns of expression, e.g., the metallothionein promoter.

5 An inducible system may be created in which the subject expression construct is driven by a promoter regulated by an agent that can be fed to the mouse, such as tetracycline. Such techniques are well known in the art.

A mutant knockout animal (e.g., mouse) from which the *Mater* gene is deleted or otherwise disabled can be made by removing coding regions of the *Mater* gene from embryonic stem cells. The methods of creating deletion mutations by using a targeting vector have been described (see, for 10 instance, Thomas and Capecch, *Cell* 51:503-512, 1987). One specific example of the production of a *Mater* null mouse is described above, in Example 1.

EXAMPLE 15

Gene Therapy

15

Gene therapy approaches for combating MATER-mediated fertility defects in subjects, or for causing MATER-mediated infertility in subjects, are now made possible.

Retroviruses have been considered the preferred vector for experiments in gene therapy, with a high efficiency of infection and stable integration and expression (Orkin *et al.*, *Prog. Med. Genet.* 7:130-142, 1988). The full-length *Mater* gene or cDNA can be cloned into a retroviral vector and 20 driven from either its endogenous promoter or, for instance, from the retroviral LTR (long terminal repeat). Other viral transfection systems may also be utilized for this type of approach, including adenovirus, adeno-associated virus (AAV) (McLaughlin *et al.*, *J. Virol.* 62:1963-1973, 1988), Vaccinia virus (Moss *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 5:305-324, 1987), Bovine Papilloma virus (Rasmussen *et al.*, *Methods Enzymol.* 139:642-654, 1987) or members of the herpesvirus group such as Epstein-Barr virus (Margolske *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 8:2837-2847, 1988).

Recent developments in gene therapy techniques include the use of RNA-DNA hybrid oligonucleotides, as described by Cole-Strauss, *et al.* (*Science* 273:1386-1389, 1996). This technique may allow for site-specific integration of cloned sequences, thereby permitting accurately targeted 30 gene replacement.

In addition to delivery of *Mater* to cells using viral vectors, it is possible to use non-infectious methods of delivery. For instance, lipidic and liposome-mediated gene delivery has recently been used successfully for transfection with various genes (for reviews, see Templeton and Lasic, *Mol. Biotechnol.* 11:175-180, 1999; Lee and Huang, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:173-206; and Cooper, *Semin. Oncol.* 23:172-187, 1996). For instance, cationic liposomes have 35 been analyzed for their ability to transfect monocytic leukemia cells, and shown to be a viable alternative to using viral vectors (de Lima *et al.*, *Mol. Membr. Biol.* 16:103-109, 1999). Such cationic liposomes can also be targeted to specific cells through the inclusion of, for instance,

monoclonal antibodies or other appropriate targeting ligands (Kao *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 3:250-256, 1996).

EXAMPLE 16

5

Identification of Therapeutic Compounds

The human MATER molecules disclosed herein can be used to identify (screen for) compounds that are useful in influencing MATER-mediated fertility in a mammal, either by blocking (inhibiting) the activity of MATER (and thereby reducing fertility) or enhancing MATER activity (and thereby increasing fertility).

10

Such screening methods can include determining if a test compound binds directly to or otherwise interacts with a MATER protein, or a variant or fragment of a MATER protein. Proteins that do bind to such a molecule are select for further characterization.

15

In specific embodiments, the compound being tested for activity is applied to a cell for instance a test cell (e.g., a developing oocyte or embryo of a mammal). The activity of the MATER protein in that test cell is then measured, for instance by determining whether the oocyte or embryo progresses beyond the two-cell stage. If application of the test compound alters proportion of embryos that progress beyond two cells, then that compound is selected as a likely candidate for further characterization. In particular examples, a test agent that opposes or inhibits a MATER activity is selected for further study, for example by exposing the agent to a mammalian female reproductive system *in vivo*, to determine if *in vivo* fertility is inhibited. Such identified compounds may be useful as contraceptive agents.

20

Specific examples of compounds likely to be effective at inhibiting MATER activity, and therefore effective as contraceptives, include antibodies specifically directed to epitopes of the MATER protein. The general concept of immunocontraceptives has been described (see, e.g., U.S. Patents No. 5,637,300 and 6,027,727, describing contraceptive antibodies directed to proteins of the *zona pellucida*, and incorporated herein by reference).

25

Alternatively, compounds that increase the proportion of embryos that progress beyond two cells (for instance, in an animal system known to be defective for fertility) are selected for further study as possible fertility enhancing agents. Similar screens can be used to identify compounds that mimic the activity of MATER protein, for instance in a *Mater* null animal.

30

In addition, it is suggested that MATER protein perform its function within the cytoplasm through interacting with other unknown protein. Physical blockage of such interaction is expected to arrest the MATER function. Candidates for such interactions are being identified based on interactions in a yeast two-hybrid system (Fields and Song, *Nature* 340:245, 1989). Once molecular domains for the protein interaction are known, molecules can be designed directly based to specifically inhibit or otherwise interfere with MATER protein interactions with these other proteins.

35

Compounds selected using these methods are comprehended by this disclosure.

EXAMPLE 17

Kits

Kits are provided which contain the necessary reagents for determining *Mater* gene copy number, such as probes or primers specific for the *Mater* gene, as well as written instructions. Kits are also provided to determine abnormal expression of *Mater* mRNA (i.e., containing probes) or MATER protein (i.e., containing a MATER-specific binding agent). Instructions provided in the diagnostic kits can include calibration curves or charts to compare with the determined (e.g., experimentally measured) values.

10 A. Kits for Detection of *Mater* Genomic Sequences

The nucleotide sequences disclosed herein, and fragments thereof, can be supplied in the form of a kit for use in detection of *Mater* genomic sequences and/or diagnosis of infertility or reduced fertility. In such a kit, an appropriate amount of one or more of the *Mater*-specific oligonucleotide primers is provided in one or more containers. The oligonucleotide primers may be provided suspended in an aqueous solution or as a freeze-dried or lyophilized powder, for instance. The container(s) in which the oligonucleotide(s) are supplied can be any conventional container that is capable of holding the supplied form, for instance, microfuge tubes, ampoules, or bottles. In some applications, pairs of primers may be provided in pre-measured single use amounts in individual, typically disposable, tubes or equivalent containers. With such an arrangement, the sample to be tested for the presence of *Mater* genomic amplification can be added to the individual tubes and *in vitro* amplification carried out directly.

The amount of each oligonucleotide primer supplied in the kit can be any appropriate amount, depending for instance on the market to which the product is directed. For instance, if the kit is adapted for research or clinical use, the amount of each oligonucleotide primer provided would likely be an amount sufficient to prime several *in vitro* amplification reactions. Those of ordinary skill in the art know the amount of oligonucleotide primer that is appropriate for use in a single amplification reaction. General guidelines may for instance be found in Innis *et al.* (*PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990), Sambrook *et al.* (In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 1989), and Ausubel *et al.* (In *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1998).

A kit may include more than two primers, in order to facilitate the PCR *in vitro* amplification of *Mater* sequences, for instance the *Mater* gene, specific exon(s) or other portions of the gene, or the 5' or 3' flanking region thereof.

In some embodiments, kits may also include the reagents necessary to carry out PCR *in vitro* amplification reactions, including, for instance, DNA sample preparation reagents, appropriate buffers (e.g., polymerase buffer), salts (e.g., magnesium chloride), and deoxyribonucleotides (dNTPs). Written instructions may also be included.

Kits may in addition include either labeled or unlabeled oligonucleotide probes for use in detection of the *in vitro* amplified *Mater* sequences. The appropriate sequences for such a probe will

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-50-

be any sequence that falls between the annealing sites of the two provided oligonucleotide primers, such that the sequence the probe is complementary to is amplified during the *in vitro* amplification reaction.

5 It may also be advantageous to provided in the kit one or more control sequences for use in the amplification reactions. The design of appropriate positive control sequences is well known to one of ordinary skill in the appropriate art.

B. Kits for Detection of *Mater* mRNA Expression

10 Kits similar to those disclosed above for the detection of *Mater* genomic sequences can be used to detect *Mater* mRNA expression levels. Such kits may include an appropriate amount of one or more of the oligonucleotide primers for use in reverse transcription amplification reactions, similarly to those provided above, with art-obvious modifications for use with RNA.

15 In some embodiments, kits for detection of *Mater* mRNA expression levels may also include the reagents necessary to carry out RT-PCR *in vitro* amplification reactions, including, for instance, RNA sample preparation reagents (including *e.g.*, an RNase inhibitor), appropriate buffers (*e.g.*, polymerase buffer), salts (*e.g.*, magnesium chloride), and deoxyribonucleotides (dNTPs). Written instructions may also be included.

20 Kits in addition may include either labeled or unlabeled oligonucleotide probes for use in detection of the *in vitro* amplified target sequences. The appropriate sequences for such a probe will be any sequence that falls between the annealing sites of the two provided oligonucleotide primers, such that the sequence the probe is complementary to is amplified during the PCR reaction.

It also may be advantageous to provided in the kit one or more control sequences for use in the RT-PCR reactions. The design of appropriate positive control sequences is well known to one of ordinary skill in the appropriate art.

25 Alternatively, kits may be provided with the necessary reagents to carry out quantitative or semi-quantitative Northern analysis of *Mater* mRNA. Such kits include, for instance, at least one *Mater*-specific oligonucleotide for use as a probe. This oligonucleotide may be labeled in any conventional way, including with a selected radioactive isotope, enzyme substrate, co-factor, ligand, chemiluminescent or fluorescent agent, hapten, or enzyme.

30

C. Kits For Detection of MATER Protein or Peptide Expression

35 Kits for the detection of MATER protein expression, for instance MATER at least one target (*e.g.*, MATER) protein specific binding agent (*e.g.*, a polyclonal or monoclonal antibody or antibody fragment) and may include at least one control. The MATER protein specific binding agent and control may be contained in separate containers. The kits may also include means for detecting MATER:agent complexes, for instance the agent may be detectably labeled. If the detectable agent is not labeled, it may be detected by second antibodies or protein A for example which may also be provided in some kits in one or more separate containers. Such techniques are well known.

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-51-

Additional components in some kits include instructions for carrying out the assay. Instructions will allow the tester to determine whether MATER expression levels are altered, for instance in comparison to a control sample. Reaction vessels and auxiliary reagents such as chromogens, buffers, enzymes, etc. may also be included in the kits.

5 By way of example only, an effective and convenient immunoassay kit such as an enzyme-linked immunosorbent assay can be constructed to test anti-MATER antibody in human serum, as reported for detection of non-specific anti-ovarian antibodies (Wheatcroft *et al*, *Clin. Exp. Immunol.* 96:122-128, 1994; Wheatcroft *et al*, *Hum. Reprod.* 12:2617--2622, 1997). Expression vectors can be constructed using the human MATER cDNA to produce the recombinant human MATER protein in
10 either bacteria or baculovirus (as described in Example 8). By affinity purification, unlimited amounts of pure recombinant MATER protein can be produced.

An assay kit could provide the recombinant protein as an antigen and enzyme-conjugated goat anti-human IgG as a second antibody as well as the enzymatic substrates. Such kits can be used
15 to test if the patient sera contain antibodies against human MATER.

This disclosure provides *Mater* nucleic acids and proteins, including the human *Mater* molecules described above. The disclosure further provides methods employing these molecules, including methods to predict and/or diagnose infertility, reduced fertility, or reproductive failure in females, as well as treatments for such infertility and reduced fertility, and contraceptives. It will be
20 apparent that the precise details of the molecules and methods described may be varied or under- or overexpression, are also contemplated. Such kits will include modified without departing from the spirit of the described invention. The inventors claim all such modifications and variations that fall within the scope and spirit of the claims below.

CLAIMS

1. An isolated human MATER protein comprising at least one amino acid sequence as set forth in
- 5 (a) SEQ ID NO: 2;
(b) SEQ ID NO: 4;
(c) SEQ ID NO: 24;
(d) sequences having 65% sequence identity to (a) or (b) or (c); or
(e) conservative variants of (a) or (b) or (c),
- 10 wherein the human MATER protein can complement a *Mater* null phenotype.
2. The protein of claim 1, wherein the protein is an autoantigen associated with autoimmune infertility.
3. The protein of claim 1, wherein the protein is expressed in oocyte cytoplasm.
4. The isolated human MATER protein of claim 1, comprising the amino acid
- 15 sequences as set forth in SEQ ID NOs: 2 and 4.
5. The isolated human MATER protein of claim 1, comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 24.
6. The isolated human MATER protein of claim 1, comprising an amino acid sequence having 75% sequence identity to SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO 24.
- 20 7. The isolated human MATER protein of claim 1, comprising an amino acid sequence having 85% sequence identity to SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO 24.
8. The isolated human MATER protein of claim 1, comprising an amino acid sequence having 95% sequence identity to SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO 24.
9. An isolated human MATER protein comprising the amino acid sequence as set
- 25 forth in SEQ ID NO: 24.
10. An isolated nucleic acid molecule encoding a protein according to claim 1.
11. The isolated nucleic acid molecule of claim 10, comprising a nucleotide sequence as set forth in:
- (a) SEQ ID NO: 1;
(b) SEQ ID NO: 3;
(c) SEQ ID NO: 23; or
(d) sequences having at least 82% sequence identity with (a) or (b) or (c).
- 30 12. The isolated nucleic acid molecule of claim 10, comprising nucleotide sequences as set forth in SEQ ID NOs: 1 and 3.
13. The isolated nucleic acid molecule of claim 10, comprising a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO: 23.
14. The isolated nucleic acid molecule of claim 10, comprising a nucleotide sequence having at least 90% sequence identity with SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 23.

15. The isolated nucleic acid molecule of claim 10, comprising a nucleotide sequence having at least 95% sequence identity with SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 23.
16. A recombinant nucleic acid molecule comprising a promoter sequence operably linked to nucleic acid molecule according to claim 11.
- 5 17. A cell transformed with a recombinant nucleic acid molecule according to claim 12.
18. A method of detecting a biological condition associated with an abnormal *Mater* nucleic acid or an abnormal MATER expression or an autoimmune response to MATER in a subject, comprising determining whether the subject has abnormal *Mater* nucleic acid or abnormal *Mater* expression or an autoimmune response to MATER.
- 10 19. The method of claim 18, which is a method of evaluating a cause of female infertility.
20. The method of claim 18, wherein the abnormal *Mater* nucleic acid or abnormal *Mater* expression comprises an alteration in a cellular level of *Mater* nucleic acid or MATER protein, in comparison to a normal level.
- 15 21. The method of claim 19, wherein the biological condition comprises infertility or reduced fertility, or an increased susceptibility to infertility or reduced fertility.
22. The method of claim 21, wherein the infertility comprises autoimmune infertility.
23. The method of claim 21, comprising:
determining whether the subject has circulating autoantibodies that recognize an
20 epitope of a MATER protein, wherein presence of such autoantibodies indicates the infertility or reduced fertility of the subject, or an increased susceptibility of the subject to infertility or reduced fertility.
24. The method of claim 18, wherein the abnormal *Mater* expression comprises an increased or decreased expression of *Mater* in a subject.
- 25 25. The method of claim 18, comprising:
reacting at least one *Mater* molecule contained in a clinical sample from the subject
with a reagent comprising a *Mater* specific binding agent to form a *Mater*:agent complex.
26. The method of claim 25, wherein the *Mater* molecule is a MATER encoding
nucleic acid or a MATER protein.
- 30 27. The method of claim 25, wherein the *Mater* specific binding agent is a *Mater* oligonucleotide or a MATER protein specific binding agent.
28. The method of claim 25, wherein the sample comprises a reproductive cell.
29. The method of claim 18, wherein the method is used for detecting a predisposition
to infertility or reduced fertility or for presymptomatic screening of an individual for infertility or
35 reduced fertility.
30. The method of claim 18, further comprising *in vitro* amplifying a *Mater* nucleic acid prior to detecting the abnormal *Mater* nucleic acid.
31. The method of claim 18, wherein the *Mater* nucleic acid is *in vitro* amplified using
at least one oligonucleotide primer derived from a MATER protein encoding sequence.

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-54-

32. The method of claim 31, wherein at least one oligonucleotide primer comprises at least 23 contiguous nucleotides from SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 23.
33. An oligonucleotide primer used in the method of claim 32.
34. A recombinant DNA vector comprising the oligonucleotide primer according to claim 33.
35. A recombinant nucleic acid molecule comprising a promoter sequence operably linked to the oligonucleotide primer sequence according to claim 33.
36. The recombinant nucleic acid molecule according to claim 35 wherein the nucleic acid sequence is in antisense orientation relative to the promoter sequence.
37. A cell transformed with the recombinant nucleic acid molecule according to claim 35.
38. A transgenic non-human animal, comprising the recombinant nucleic acid molecule according to claim 36.
39. The method of claim 26, wherein the *Mater* molecule is a MATER encoding sequence.
40. The method of claim 39, wherein the *Mater*:agent complex is detected by nucleotide hybridization.
41. The method of claim 39, wherein the agent is a labeled nucleotide probe.
42. The method of claim 41, wherein the nucleotide probe has a sequence selected from the group consisting of:
- (a) SEQ ID NO: 1;
 - (b) SEQ ID NO: 3;
 - (c) SEQ ID NO: 23;
 - (d) nucleic acid sequences having at least 82% sequence identity with (a) or (b) or (c); and
 - (e) fragments of (a) or (b) or (c) at least 23 nucleotides in length.
43. An nucleotide probe used in the method of claim 41.
44. The method of claim 26, wherein the *Mater* molecule is a MATER protein.
45. The method of claim 44, wherein the complexes are detected by Western blot assay.
46. The method of claim 44, wherein the Western blot assay uses an antibody generated against a C-terminal peptide of a MATER protein.
47. The method of claim 44, wherein the complexes are detected by ELISA.
48. The method of claim 44, wherein the MATER protein comprises a sequence selected from the group consisting of:
- (a) SEQ ID NO: 2;
 - (b) SEQ ID NO: 4;
 - (c) SEQ ID NO: 24;
 - (d) amino acid sequences having at least 65% sequence identity with (a) or (b) or (c); and

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-55-

- (e) conservative variants of (a) or (b) or (c).
49. The method of claim 46, wherein the *Mater*-specific binding agent is a *MATER*-specific antibody or a functional fragment thereof.
50. The agent of claim 49, wherein the agent is an antibody.
51. The antibody of claim 50, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
52. The antibody of claim 41, which recognizes a peptide comprising the sequence of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or an antigenic fragment thereof.
53. A kit for detecting an excess or deficiency of *MATER* protein in a subject using the method of claim 44, comprising a *MATER* protein specific binding agent.
54. The kit of claim 53, wherein the agent is capable of specifically binding to an epitope within:
- (a) the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
 - (b) the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4;
 - (c) the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 24;
 - (d) amino acid sequences that differ from those specified in (a) or (b) or (c) by one or more conservative amino acid substitutions;
 - (e) the amino acid sequences having at least 65% sequence identity to the sequences specified in (a) or (b) or (c); or
 - (f) antigenic fragments of (a), (b), (c), (d), or (e).
55. The kit of claim 53, further comprising a means for detecting binding of the *MATER* protein binding agent to a *MATER* polypeptide.
56. The kit of claim 53, wherein the subject is a mammal.
57. The kit of claim 56, wherein the mammal is a human or a mouse.
58. The kit of claim 53, wherein the overabundance or underabundance results in altered infertility.
59. The kit of claim 43, wherein the *MATER* protein binding agent is an antibody.
60. A kit for detection of a genetic mutation in a sample of nucleic acid, comprising:
- (a) a first container containing an oligonucleotide capable of specifically hybridizing with a *Mater* nucleic acid; and
 - (b) a second container containing a fluorescent labeled nucleic acid probe that is fully complementary to the oligonucleotide.
61. The kit of claim 60, wherein the fluorescent labeled nucleic acid probe has a length of between 5 and 500 nucleotides.
62. A kit for determining whether or not a subject has a biological condition associated with an abnormal *Mater* expression by detecting an underabundance of *MATER* protein in a sample of tissue and/or body fluids from the subject, comprising:
- a container comprising an antibody specific for *MATER* protein; and
 - instructions for using the kit, the instructions indicating steps for:

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-56-

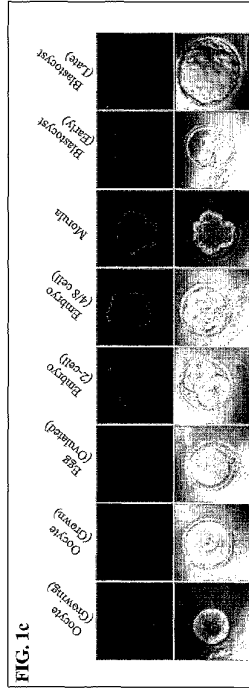
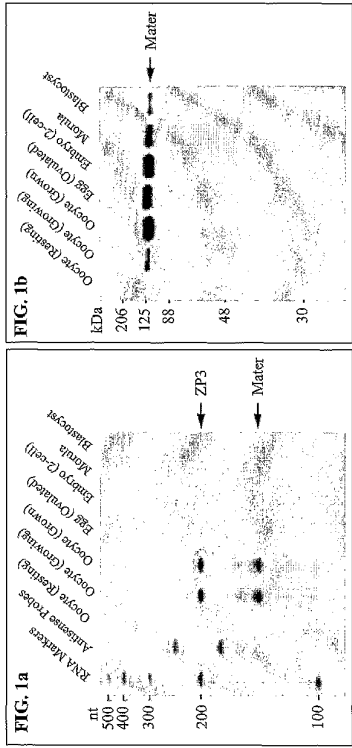
- performing a method to detect the presence of MATER protein in the sample; and
analyzing data generated by the method,
wherein the instructions indicate that underabundance of MATER protein in the sample indicates that the individual has or is predisposed to the biological condition.
- 5 63. The kit of claim 62 further comprising a container that comprises a detectable antibody that binds to the MATER protein specific antibody.
- 10 64. An *in vitro* assay kit for determining whether or not a subject has a biological condition associated with an abnormal *Mater* expression, the kit comprising:
a container comprising a MATER protein specific antibody;
a container comprising a negative control sample; and
instructions for using the kit, the instructions indicating steps for:
performing a test assay to detect a quantity of MATER protein in a test sample of tissue and/or bodily fluid from the subject,
15 performing a negative control assay to detect a quantity of MATER protein in the negative control sample; and
comparing data generated by the test assay and negative control assay,
wherein the instructions indicate that a quantity of MATER protein in the test sample less than the quantity of MATER protein in the negative control sample indicates that the subject has the biological condition.
- 20 65. The kit of claim 64 further comprising a container that comprises a detectable antibody that binds to the antibody specific for MATER protein.
- 25 66. An isolated nucleic acid molecule according to claim 10, wherein the molecule hybridizes with a nucleic acid probe comprising the sequence shown in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 23 under wash conditions of 55° C, 0.2 x SSC and 0.1% SDS.
67. An isolated nucleic acid molecule according to claim 10, wherein the molecule hybridizes with a nucleic acid probe comprising the sequence shown in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 23 under wash conditions of 30° C, 2 x SSC, 0.1 % SDS.
- 30 68. A method of modifying a level of expression of a MATER protein in an subject, comprising expressing in the subject a recombinant genetic construct comprising a promoter operably linked to a nucleic acid molecule, wherein the nucleic acid molecule comprises at least 23 consecutive nucleotides of the sequence shown in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 23, or a sequence at least 65% identical to SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 23, and expression of the nucleic acid molecule changes expression of the MATER protein.
- 35 69. The method of claim 68 wherein the nucleic acid molecule is in antisense orientation relative to the promoter, and the method is a method of contraception.
70. A method of screening for a compound useful in influencing MATER-mediated fertility in a mammal, comprising determining if a test compound binds to or interacts with the protein according to claim 1, or variants or fragments thereof, and selecting a compound that so binds.

WO 02/32955

PCT/US01/10981

-57-

71. The method of claim 70, wherein binding of the compound inhibits a MATERNAL protein biological activity.
72. The method of claim 70, wherein the test compound is applied to a test cell.
73. A compound selected by the method of claim 70.
- 5 74. The compound of claim 73, for use as a contraceptive.



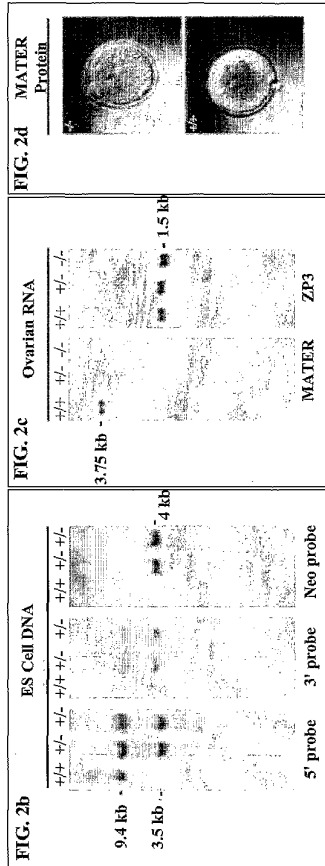
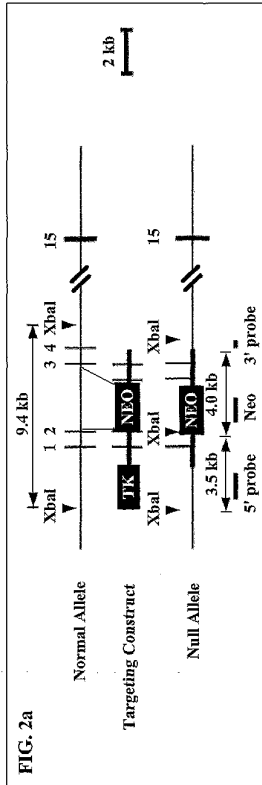
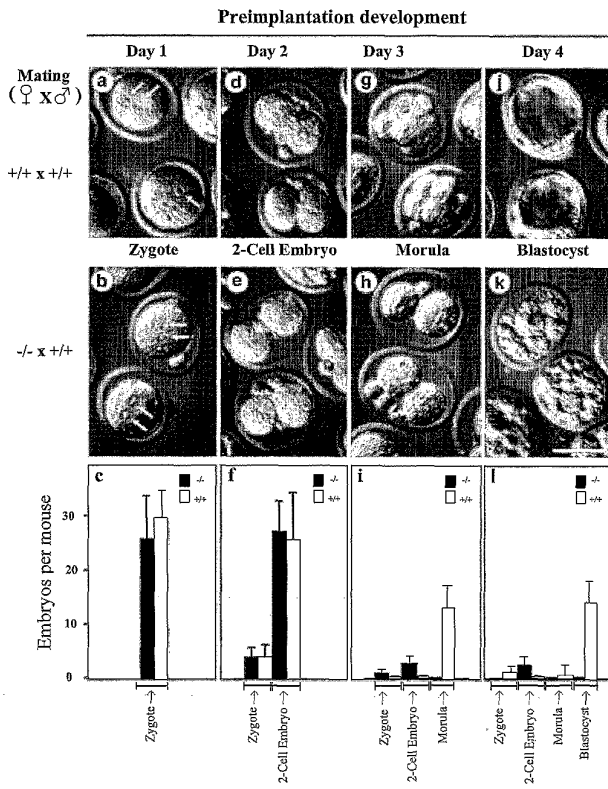
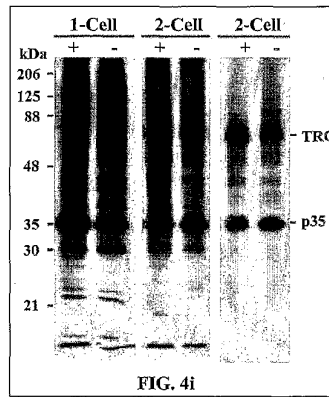
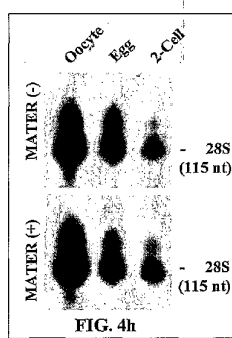
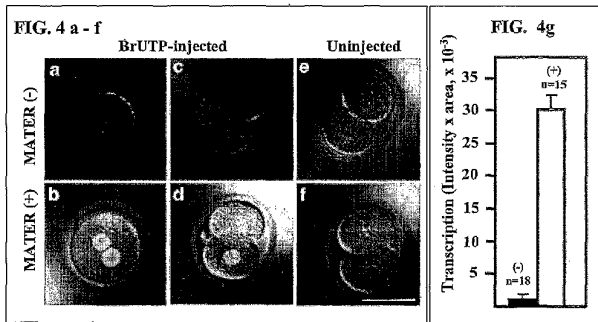


FIG. 3a - l





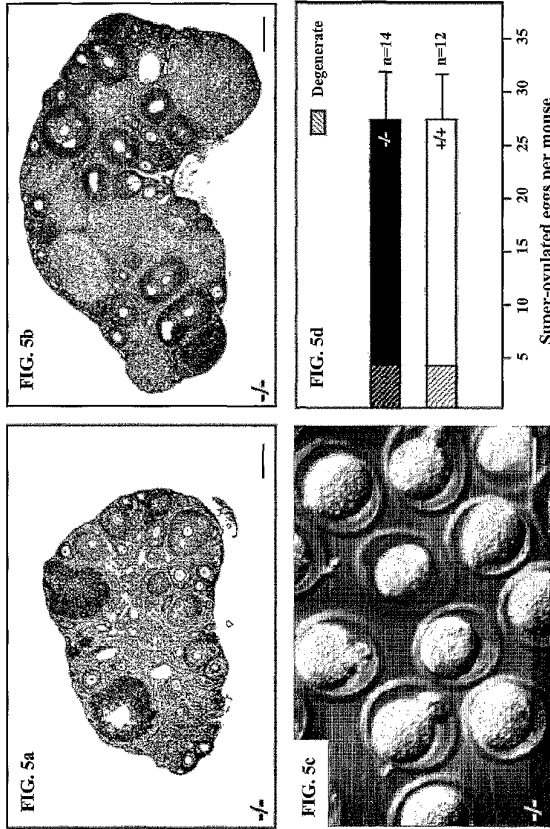
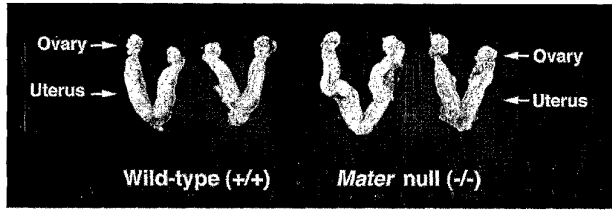
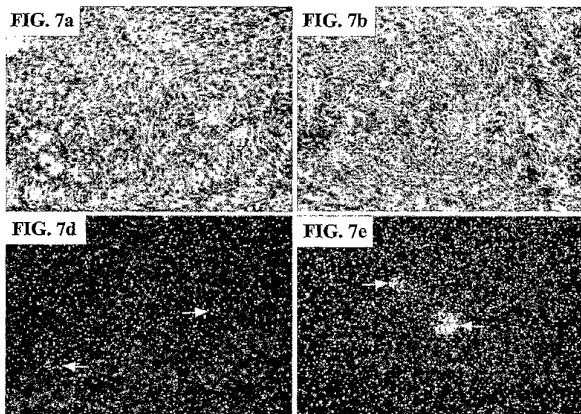
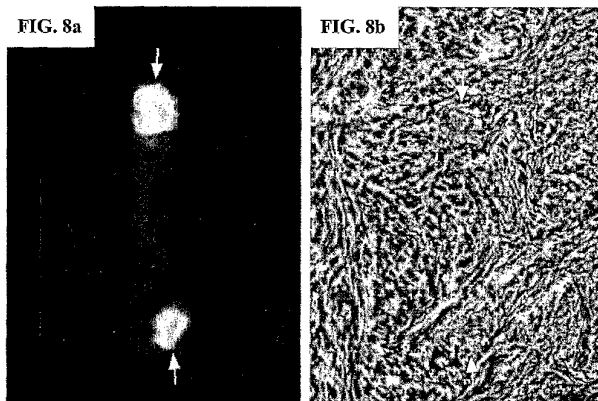


FIG. 6







WO 02/32955

PCT/US01/10981

SEQUENCE LISTING

<110> THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES, THE NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH

Nelson, Lawrence M.
Tong, Zhi-Bin

<120> HUMAN GENE CRITICAL TO FERTILITY

<130> 4239-55874

<150> 60/241,510

<151> 2000-10-18

<160> 24

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 1157

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 1
caagctccgg tgacggagat catgtcccga ccagaaaggc tgttgttcat cattgacggt 60
ttgatgacc tgggctctgt cctcaacaat gacacaagc tctgcaaaga ctggctgag 120
aagcagcctc cgttcaccct catacgcagt ctgctgagga aggtcctgct cctgagttcc 180
ttcctgatcc tcaccgtcag agacgtgggc acagagaagc tcaagtcaga ggtcgtgtct 240
ccccgttacc tgttagttag aggaatctcc ggggaacaaa gaatccactt gctccttgag 300
cgcgggattg gtgagcatca gaagacacaa ggggttcgtg cgatcatgaa caaccgtgag 360
ctgctcgacc agtgccaggt gccgcctgtg ggctctctca tctgcgtggc cctgcagctg 420
caggacgtgg tgggggagag cgtcgcccc ttcaacacaa cgtccacagg cctgcacgcc 480
gcttttgtgt ttcatcagct caccctcga ggcgtgtcc ggcgctgtct caatctggag 540
gaaagagttg tcctgaagcy cttctgcctg atggctgtgg agggagttgt gaataggaag 600
tcagtgtttg acggtgacga cctcatggtt caaggactcg gggagtttga gctcctgtct 660
ctgtttcaca tgaacatcct tctcccagac agccactgtg aggagtacta caccttcttc 720
cacctcagtc tccaggactt ctgtgcgcc ttgtactacg tgttagaggc cctgaaaatc 780
gagccagctc tctgccccct gtacgttgag aagacaaaga ggtccatgga gcttaaacag 840
gcaggcttcc atatccactc gotttggatg aagcgtttct tgtttggcct cgtgagcga 900
gacgtaagga ggocactgga ggtcctgctg gctgtccc ttcccctggg ggtgaagcag 960
aagcttctgc actgggtctc tctgttgggt cagcagccta atgccaccac cccaggagac 1020
accctggacg ccttccactg tcttttcgag actcaagaca aaggtttgt tcgcttgga 1080

WO 02/32955

PCT/US01/10981

ttaaacagct tccaagaagt gtgggtcccg attaaccaga acctggactt gatagcatct 1140
tcctttctgcc tccagct 1157

<210> 2
<211> 365
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 2

Gln Ala Pro Val Thr Glu Ile Met Ser Arg Pro Glu Arg Leu Leu Phe
1 5 10 15
Ile Ile Asp Gly Phe Asp Asp Leu Gly Ser Val Leu Asn Asn Asp Thr
20 25 30
Lys Leu Cys Lys Asp Trp Ala Glu Lys Gln Pro Pro Phe Thr Leu Ile
35 40 45
Arg Ser Leu Leu Arg Lys Val Leu Leu Pro Glu Ser Phe Leu Ile Val
50 55 60
Thr Val Arg Asp Val Gly Thr Glu Lys Leu Lys Ser Glu Val Val Ser
65 70 75 80
Pro Arg Tyr Leu Leu Val Arg Gly Ile Ser Gly Glu Gln Arg Ile His
85 90 95
Leu Leu Leu Glu Arg Gly Ile Gly Glu His Gln Lys Thr Gln Gly Leu
100 105 110
Arg Ala Ile Met Asn Asn Arg Glu Leu Leu Asp Gln Cys Gln Val Pro
115 120 125
Ala Val Gly Ser Leu Ile Cys Val Ala Leu Gln Leu Gln Asp Val Val
130 135 140
Gly Glu Ser Val Ala Pro Phe Asn Gln Thr Leu Thr Gly Leu His Ala
145 150 155 160
Ala Phe Val Phe His Gln Leu Thr Pro Arg Gly Val Val Arg Arg Cys
165 170 175
Leu Asn Leu Glu Glu Arg Val Val Leu Lys Arg Phe Cys Arg Met Ala
180 185 190
Val Glu Gly Val Trp Asn Arg Lys Ser Val Phe Asp Gly Asp Asp Leu
195 200 205
Met Val Gln Gly Leu Gly Glu Ser Glu Leu Arg Ala Leu Phe His Met
210 215 220
Asn Ile Leu Leu Pro Asp Ser His Cys Glu Glu Tyr Tyr Thr Phe Phe
225 230 235 240
His Leu Ser Leu Gln Asp Phe Cys Ala Ala Leu Tyr Tyr Val Leu Glu
245 250 255
Gly Leu Glu Ile Glu Pro Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Val Glu Lys Thr

WO 02/32955

PCT/US01/10981

	260		265		270	
Lys	Arg	Ser	Met	Glu	Leu	Lys
	275					Gln
						Ala
						Gly
						Phe
						His
						Ile
						His
						Ser
						Leu
Trp	Met	Lys	Arg	Phe	Leu	Phe
	290					Gly
						Leu
						Val
						Ser
						Glu
						Asp
						Val
						Arg
						Arg
Pro	Leu	Glu	Val	Leu	Leu	Gly
	305					Cys
						Pro
						Val
						Pro
						Leu
						Gly
						Val
						Lys
						Gln
Lys	Leu	Leu	His	Trp	Val	Ser
						Leu
						Leu
						Gly
						Gln
						Gln
						Pro
						Asn
						Ala
						Thr
Thr	Pro	Gly	Asp	Thr	Leu	Asp
						Ala
						Phe
						His
						Cys
						Leu
						Phe
						Glu
						Thr
						Gln
Asp	Lys	Glu	Phe	Val	Arg	Leu
						Ala
						Leu
						Asn
						Ser
						Phe
						Gln
						Glu
						Val
						Trp
Leu	Pro	Ile	Asn	Gln	Asn	Leu
						Asp
						Leu
						Ile
						Ala
						Ser
						Ser
						Phe
						Cys
						Leu

Gln
385

<210> 3
<211> 1075
<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 3
tctggcctca gccctcgtca gcaaccggag cttgacacac ctgtgcctat ccaacaacag 60
cctggggaac gaaggtgtaa atctactgtg togatccatg aggcttcccc actgtagtct 120
gcagaggctg atgctgaatc agtgccacct ggacacggct ggotgtggtt ctcttgcact 180
tgcgcttatg ggtaactcat ggctgacgca cctgagcctt agcatgaacc ctgtggaaga 240
caatggcgtg aagcttctgt gcgaggctat gagagaacca tcttgcctc tccaggacct 300
ggagttggta aaatgtcctc toaccgccgc gtgctgtgag agtctgtcct gtgtgatctc 360
gaggagcaga cacctgaaga gccctggatct cacggacaat gccctgggtg acggtggggt 420
tgctgcgctg tgcgagggac tgaagcaaaa gaacagtggt ctgacgagac tcgggttgaa 480
ggcatgtgga ctgaactctg attgctgtga ggcactctcc ttggcccttt cctgcaaccg 540
gcatctgacc agtctaacc ttggtcagaa taacttcagt cccaaaggaa tgatgaagct 600
gtgttcggcc ttgctctgct ccacgtctaa cttacagata attggctgt ggaatggca 660
gtaccctgtg caaataagga agctgtgga ggaagtgcag ctactcaagc cccgagtcgt 720
aattgacggt agttggcatt cttttgatga agatgaccgg tactggtgga aaaactgaag 780
atcggaaac ctgcccact cacaccatc tgatggagga acittaaacg ctgtttctc 840
agagcaagct atgcacctgg gacttcttc tcaagatgg agaagattt ctgattctca 900

WO 02/32955

PCT/US01/10981

caaaagccctc aatggtagtg attctctgtg gttcactcta cgttggttac tggatttgaa 960
 ggctagagac ctccaagtca taggactcag tatctgtgaa atgtccgtca tatctcagag 1020
 catatagagg gaattaaata aacacaaagc atttgaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1075

<210> 4
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 4

Leu Ala Ser Ala Leu Val Ser Asn Arg Ser Leu Thr His Leu Cys Leu
 1 5 10 15
 Ser Asn Asn Ser Leu Gly Asn Glu Gly Val Asn Leu Leu Cys Arg Ser
 20 25 30
 Met Arg Leu Pro His Cys Ser Leu Gln Arg Leu Met Leu Asn Gln Cys
 35 40 45
 His Leu Asp Thr Ala Gly Cys Gly Ser Leu Ala Leu Ala Leu Met Gly
 50 55 60
 Asn Ser Trp Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Met Asn Pro Val Glu Asp
 65 70 75 80
 Asn Gly Val Lys Leu Leu Cys Glu Val Met Arg Glu Pro Ser Cys His
 85 90 95
 Leu Gln Asp Leu Glu Leu Val Lys Cys His Leu Thr Ala Ala Cys Cys
 100 105 110
 Glu Ser Leu Ser Cys Val Ile Ser Arg Ser Arg His Leu Lys Ser Leu
 115 120 125
 Asp Leu Thr Asp Asn Ala Leu Gly Asp Gly Gly Val Ala Ala Leu Cys
 130 135 140
 Glu Gly Leu Lys Gln Lys Asn Ser Val Leu Thr Arg Leu Gly Leu Lys
 145 150 155 160
 Ala Cys Gly Leu Thr Ser Asp Cys Cys Glu Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 165 170 175
 Ser Cys Asn Arg His Leu Thr Ser Leu Asn Leu Val Gln Asn Asn Phe
 180 185 190
 Ser Pro Lys Gly Met Met Lys Leu Cys Ser Ala Phe Ala Cys Pro Thr
 195 200 205
 Ser Asn Leu Gln Ile Ile Gly Leu Trp Lys Trp Gln Tyr Pro Val Gln
 210 215 220
 Ile Arg Lys Leu Leu Glu Glu Val Gln Leu Leu Lys Pro Arg Val Val
 225 230 235 240
 Ile Asp Gly Ser Trp His Ser Phe Asp Glu Asp Asp Arg Tyr Trp Trp

WO 02/32955

PCT/US01/10981

245

250

255

Lys Asn

<210> 5
 <211> 3447
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 5
 aaagcacaat gggctcctoca gaaaaagaaa gtaaagcaat cttgaaagca cgtggattgg 60
 aagaggaaca gaagtcagaa agaaaaatga cttctccaga aaacgacagt aaatcaatcc 120
 agaaagacca aggaccagag caggagcaga catcagaaag cacaatgggt cctccagaaa 180
 aagacagtaa agcaatcttg aaagcacgtg gattggaaga ggaacagaag tcagaagaagc 240
 caatgtctcc ttcagaaaat gtcagttagag caatcctgaa agacagtgga tcagaagaag 300
 tggaacaggc gtcagaaga aaaaatgactt ctccagaaaa cgacagttaa tcaatccaga 360
 aagaccaagc accagagcag gacgagacat cagaacctt acaatctaag gaagaagatg 420
 aagtgcaga ggcagataaa gataatggag gtgacttaoa agaotacaag gccaatgtga 480
 ttgctaagtt cgacacaagt gtggatctac actatgacag cccagagatg aaattattgt 540
 ctgatgcttt taaaccatac cagaaaaacct tccagcctoa caccattatc ctacatggaa 600
 gaccaggagt tgggaagtca gctttggcca gaagtattgt tcttggctgg gcacagggta 660
 aactcttcca aaaaatgtcc tttgtcatct tctctctgt tagagaaata aagtggacag 720
 agaagagcag tttggcacag ctgattgcta aggagtgtcc agactcctgg gatctagtga 780
 caaagatcat gtcccaacca gaaagactct tgtttgtcat agatggcttg gatgatattg 840
 actctgtcct ccaacatgat gatatgacac tatccagaga ctggaaggat gaacagccoa 900
 tatacatcct gatgtacago ctctgagga aggctctctt acctcagtcc tttctcaoa 960
 ttaccacoag aaacacaggc ttagaaaaac tcaagtaaat ggttggctcc cccctctata 1020
 tactggttga aggactgtct goatacaagg gatctcagct ggtcctcag aacatctcoa 1080
 atgagtctga tagaatacaa gtcttccatt ctctgataga aaatcaccag ctgtttgacc 1140
 aatgccagcc cccctctgtg tgcctcctgg tctgtgagc tctacagcta cagaagaaac 1200
 tgggaaagag atgcacccta cccctccaga ctctcaccgg tttgtatgoc acgttggtyt 1260
 ttcaccagct caccctgaaa aggccttccc agagcctct cagtcaggaa gaacagatta 1320
 ctctagtggg tttgtgcatg atggcagctg aaggagtgtg gacctagag tcggtgtct 1380
 atgatgatga cctgaagaac tatagootaa aggagtctga gatottggcc ctctttcaca 1440
 tgaacatcct tctccaggtt ggcacaaca gtgagcagtg ttatgttttc tcccacctca 1500

WO 02/32955

PCT/US01/10981

gcctgcagga tttctttgct gccttatatt atgtttttaga agggctggag gaatggaatc 1560
 agcatttttg cttcattgaa aaccaaagga gcalcatgga ggtgaagaga actgacgaca 1620
 ctgcctcct cgggatgaag cgtttcttat ttggcctcat gaacaaggat atcttgaaga 1680
 ctctggaggt tctgtttgaa tatcccgta ttccaaactg tgagcagaag ctccaacact 1740
 gggctctct gatagctcag caggtcaatg gcaccagccc aatggacacc ctggatgctc 1800
 totattgtct atttgagctc caggatgaag agtttgttg cygggctctc aaacgcttc 1860
 aagaagtgtg gctgtgatt aaccagaaga tggactgaa ggtctcttc taotgtctca 1920
 agcaactgca gaactgaa gcaatccggg tggatatcag agacctctc toggtagata 1980
 atactctga gctgtgcct gttgttactg tccaggagac acaatgtaag cocctctca 2040
 tggagtggg gggaaacttc tgcctctgct ttggcagcct cgggaacttg aaggagctgg 2100
 acttgggca cagcaactct agtcaacggg ccatgaagat actgtcctc gagctgcgga 2160
 atcagctctg cagaatacag aagctgacgt ttaagagtgc agaggtagt tctggctga 2220
 aacatctctg gaagctcctt tttagcaatc aaaacttaaa gtaacctaat ctagggaaca 2280
 ctccatgaa ggatgatgac atgaagttag cctgcgaagc gctgaaacat ccaaagtgtc 2340
 ccgtggagac tctgaggtg gattcctgtg agttaacct cattggttat gagatgatct 2400
 ccaogcttct tattcaaco accaggctaa agtgtctcag cctggccaaa aatagagtgg 2460
 gagtaaaaag catgatatac ctggggaatg ccttgagttag ctcaatgtgt ctactgcaaa 2520
 agttgatact ggacaactgt ggctcacac ctgcccagctg ccacctctg gtctcagccc 2580
 ttttcagcaa ccagaacttg acacacctgt gctgtcaaa caacagcctg gggactgaag 2640
 gagtgaaca gctgtgtcag ttcttgagga atccagaatg tgcctccag cggctgatac 2700
 tgaatcactg caacattgta gatgatgctt atggcttctt ggcaatgaga cttgcaaaaca 2760
 acacaaagct gaccacctg agcctgacca tgaacccctg aggggatggt gcaatgaagc 2820
 tactgtgtga agctttaaag gaacctactt gttacctoa agaactgaa ctagtggact 2880
 gccaaactac acagaactgc tgcgaggacc tggcctgtat gatcacaaca accaagcaact 2940
 taaaagttt ggtcttgggt aacaacgccc tgggtgacaa aggagtcata acctgtgtg 3000
 agggactgaa gcaaagtagc agctccctga ggagacttg gttgggggca tgaagtga 3060
 cttccaattg ctgtgagga ttgtcattgg ccactctctg caacctcact ctgaacagcc 3120
 taaacctggt gaagaatgac ttoagtacat cggggatgtt gaagctgtgc tctgcgttc 3180
 aatgacctgt ctctaacctg gggataattg gctgtggaa gcaggaglac tatgcccag 3240
 tgagaagaca gctggaggaa gttgagttg tcaagcccca cgtggtgatt gatggtgatt 3300
 ggtatgotag tgatgaagat gaccgaaact ggtggaaaa ctgaagacat gagccocctc 3360

WO 02/32955

PCT/US01/10981

tccttcacgt cctagcactg cagtatctgt gaaatgtttg tctcacttg gaggatgtag 3420
 caagaatgaa ataaacacag catttag 3447

<210> 6
 <211> 1111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6

Met Gly Pro Pro Glu Lys Glu Ser Lys Ala Ile Leu Lys Ala Arg Gly
 1 5 10 15
 Leu Glu Glu Glu Gln Lys Ser Glu Arg Lys Met Thr Ser Pro Glu Asn
 20 25 30
 Asp Ser Lys Ser Ile Gln Lys Asp Gln Gly Pro Glu Gln Glu Gln Thr
 35 40 45
 Ser Glu Ser Thr Met Gly Pro Pro Glu Lys Asp Ser Lys Ala Ile Leu
 50 55 60
 Lys Ala Arg Gly Leu Glu Glu Gln Lys Ser Glu Ser Thr Met Ser
 65 70 75 80
 Pro Ser Glu Asn Val Ser Arg Ala Ile Leu Lys Asp Ser Gly Ser Glu
 85 90 95
 Glu Val Glu Gln Ala Ser Glu Arg Lys Met Thr Ser Pro Glu Asn Asp
 100 105 110
 Ser Lys Ser Ile Gln Lys Asp Gln Gly Pro Glu Gln Glu Gln Thr Ser
 115 120 125
 Glu Thr Leu Gln Ser Lys Glu Glu Asp Glu Val Thr Glu Ala Asp Lys
 130 135 140
 Asp Asn Gly Gly Asp Leu Gln Asp Tyr Lys Ala His Val Ile Ala Lys
 145 150 155 160
 Phe Asp Thr Ser Val Asp Leu His Tyr Asp Ser Pro Glu Met Lys Leu
 165 170 175
 Leu Ser Asp Ala Phe Lys Pro Tyr Gln Lys Thr Phe Gln Pro His Thr
 180 185 190
 Ile Ile Leu His Gly Arg Pro Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Ala Arg
 195 200 205
 Ser Ile Val Leu Gly Trp Ala Gln Gly Lys Leu Phe Gln Lys Met Ser
 210 215 220
 Phe Val Ile Phe Phe Ser Val Arg Glu Ile Lys Trp Thr Glu Lys Ser
 225 230 235 240
 Ser Leu Ala Gln Leu Ile Ala Lys Glu Cys Pro Asp Ser Trp Asp Leu
 245 250 255

WO 02/32955

PCT/US01/10981

Val Thr Lys Ile Met Ser Gln Pro Glu Arg Leu Leu Phe Val Ile Asp
 260 265 270
 Gly Leu Asp Asp Met Asp Ser Val Leu Gln His Asp Asp Met Thr Leu
 275 280 285
 Ser Arg Asp Trp Lys Asp Glu Gln Pro Ile Tyr Ile Leu Met Tyr Ser
 290 295 300
 Leu Leu Arg Lys Ala Leu Leu Pro Gln Ser Phe Leu Ile Ile Thr Thr
 305 310 315
 Arg Asn Thr Gly Leu Glu Lys Leu Lys Ser Met Val Val Ser Pro Leu
 325 330 335
 Tyr Ile Leu Val Glu Gly Leu Ser Ala Ser Arg Arg Ser Gln Leu Val
 340 345 350
 Leu Glu Asn Ile Ser Asn Glu Ser Asp Arg Ile Gln Val Phe His Ser
 355 360 365
 Leu Ile Glu Asn His Gln Leu Phe Asp Gln Cys Gln Ala Pro Ser Val
 370 375 380
 Cys Ser Leu Val Cys Glu Ala Leu Gln Leu Gln Lys Lys Leu Gly Lys
 385 390 395 400
 Arg Cys Thr Leu Pro Cys Gln Thr Leu Thr Gly Leu Tyr Ala Thr Leu
 405 410 415
 Val Phe His Gln Leu Thr Leu Lys Arg Pro Ser Gln Ser Ala Leu Ser
 420 425 430
 Gln Glu Glu Gln Ile Thr Leu Val Gly Leu Cys Met Met Ala Ala Glu
 435 440 445
 Gly Val Trp Thr Met Arg Ser Val Phe Tyr Asp Asp Asp Leu Lys Asn
 450 455 460
 Tyr Ser Leu Lys Glu Ser Glu Ile Leu Ala Leu Phe His Met Asn Ile
 465 470 475 480
 Leu Leu Gln Val Gly His Asn Ser Glu Gln Cys Tyr Val Phe Ser His
 485 490 495
 Leu Ser Leu Gln Asp Phe Phe Ala Ala Leu Tyr Tyr Val Leu Glu Gly
 500 505 510
 Leu Glu Glu Trp Asn Gln His Phe Cys Phe Ile Glu Asn Gln Arg Ser
 515 520 525
 Ile Met Glu Val Lys Arg Thr Asp Asp Thr Arg Leu Leu Gly Met Lys
 530 535 540
 Arg Phe Leu Phe Gly Leu Met Asn Lys Asp Ile Leu Lys Thr Leu Glu
 545 550 555 560
 Val Leu Phe Glu Tyr Pro Val Ile Pro Thr Val Glu Gln Lys Leu Gln
 565 570 575
 His Trp Val Ser Leu Ile Ala Gln Gln Val Asn Gly Thr Ser Pro Met

WO 02/32955 PCT/US01/10981

580 585 590

Asp Thr Leu Asp Ala Phe Tyr Cys Leu Phe Glu Ser Gln Asp Glu Glu
595 600 605

Phe Val Gly Gly Ala Leu Lys Arg Phe Gln Glu Val Trp Leu Leu Ile
610 615 620

Asn Gln Lys Met Asp Leu Lys Val Ser Ser Tyr Cys Leu Lys His Cys
625 630 635 640

Gln Asn Leu Lys Ala Ile Arg Val Asp Ile Arg Asp Leu Leu Ser Val
645 650 655

Asp Asn Thr Leu Glu Leu Cys Pro Val Val Thr Val Gln Glu Thr Gln
660 665 670

Cys Lys Pro Leu Leu Met Glu Trp Trp Gly Asn Phe Cys Ser Val Leu
675 680 685

Gly Ser Leu Arg Asn Leu Lys Glu Leu Asp Leu Gly Asp Ser Ile Leu
690 695 700

Ser Gln Arg Ala Met Lys Ile Leu Cys Leu Glu Leu Arg Asn Gln Ser
705 710 715 720

Cys Arg Ile Gln Lys Leu Thr Phe Lys Ser Ala Glu Val Val Ser Gly
725 730 735

Leu Lys His Leu Trp Lys Leu Leu Phe Ser Asn Gln Asn Leu Lys Tyr
740 745 750

Leu Asn Leu Gly Asn Thr Pro Met Lys Asp Asp Asp Met Lys Leu Ala
755 760 765

Cys Glu Ala Leu Lys His Pro Lys Cys Ser Val Glu Thr Leu Arg Leu
770 775 780

Asp Ser Cys Glu Leu Thr Ile Ile Gly Tyr Glu Met Ile Ser Thr Leu
785 790 795 800

Leu Ile Ser Thr Thr Arg Leu Lys Cys Leu Ser Leu Ala Lys Asn Arg
805 810 815

Val Gly Val Lys Ser Met Ile Ser Leu Gly Asn Ala Leu Ser Ser Ser
820 825 830

Met Cys Leu Leu Gln Lys Leu Ile Leu Asp Asn Cys Gly Leu Thr Pro
835 840 845

Ala Ser Cys His Leu Leu Val Ser Ala Leu Phe Ser Asn Gln Asn Leu
850 855 860

Thr His Leu Cys Leu Ser Asn Asn Ser Leu Gly Thr Glu Gly Val Gln
865 870 875 880

Gln Leu Cys Gln Phe Leu Arg Asn Pro Glu Cys Ala Leu Gln Arg Leu
885 890 895

Ile Leu Asn His Cys Asn Ile Val Asp Asp Ala Tyr Gly Phe Leu Ala
900 905 910

WO 02/32955

PCT/US01/10981

Met Arg Leu Ala Asn Asn Thr Lys Leu Thr His Leu Ser Leu Thr Met
 915 920 925

Asn Pro Val Gly Asp Gly Ala Met Lys Leu Leu Cys Glu Ala Leu Lys
 930 935 940

Glu Pro Thr Cys Tyr Leu Gln Glu Leu Glu Leu Val Asp Cys Gln Leu
 945 950 955

Thr Gln Asn Cys Cys Glu Asp Leu Ala Cys Met Ile Thr Thr Thr Lys
 965 970 975

His Leu Lys Ser Leu Asp Leu Gly Asn Asn Ala Leu Gly Asp Lys Gly
 980 985 990

Val Ile Thr Leu Cys Glu Gly Leu Lys Gln Ser Ser Ser Ser Leu Arg
 995 1000 1005

Arg Leu Gly Leu Gly Ala Cys Lys Leu Thr Ser Asn Cys Cys Glu
 1010 1015 1020

Ala Leu Ser Leu Ala Ile Ser Cys Asn Pro His Leu Asn Ser Leu
 1025 1030 1035

Asn Leu Val Lys Asn Asp Phe Ser Thr Ser Gly Met Leu Lys Leu
 1040 1045 1050

Cys Ser Ala Phe Gln Cys Pro Val Ser Asn Leu Gly Ile Ile Gly
 1055 1060 1065

Leu Trp Lys Gln Glu Tyr Tyr Ala Arg Val Arg Arg Gln Leu Glu
 1070 1075 1080

Glu Val Glu Phe Val Lys Pro His Val Val Ile Asp Gly Asp Trp
 1085 1090 1095

Tyr Ala Ser Asp Glu Asp Asp Arg Asn Trp Trp Lys Asn
 1100 1105 1110

<210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> synthetic oligonucleotide

<400> 7
 tttcacatga acatccttct cc 22

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> synthetic oligonucleotide

<400> 8
 agtgcggag gcagaaggaa g 21

<210> 9
 <211> 26
 <212> DNA

WO 02/32955	PCT/US01/10981
<213> synthetic oligonucleotide	
<400> 9	
caggaattgg gaaatcggt ctctag	26
<210> 10	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> synthetic oligonucleotide	
<400> 10	
ccaaatgctt tgggtttatt taattcc	27
<210> 11	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> synthetic oligonucleotide	
<400> 11	
cggaattcgt cactcagcg	19
<210> 12	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> synthetic oligonucleotide	
<400> 12	
agcgcgtgaa tcagatcg	18
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> synthetic oligonucleotide	
<400> 13	
attccctggt agagtcacc ttgc	24
<210> 14	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> synthetic oligonucleotide	
<400> 14	
acagcacgat cttctggct agag	24
<210> 15	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> synthetic oligonucleotide	
<400> 15	
caagtcocgg tgacgggat cat	23
<210> 16	

WO 02/32955	PCT/US01/10981
<211> 22	
<212> DNA	
<213> synthetic oligonucleotide	
<400> 16	
agctggaggc agaaggaga tg	22
<210> 17	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> synthetic oligonucleotide	
<400> 17	
tctggcctca gccctcgtea gcttgac	27
<210> 18	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> synthetic oligonucleotide	
<400> 18	
ccaaatgctt tgggtttatt taattcc	27
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> synthetic oligonucleotide	
<400> 19	
tctggcctca gccctcgtea g	21
<210> 20	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> synthetic oligonucleotide	
<400> 20	
actgaagtta ttctgacca g	21
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> synthetic oligonucleotide	
<400> 21	
tgacttctga ttgctgtgag	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> synthetic oligonucleotide	
<400> 22	
ttccaccagt accggtcacc	20

WO 02/32955

PCT/US01/10981

```

<210> 23
<211> 3900
<212> DNA
<213> homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(3600)

<400> 23
atg aag gtt gca gga gga ctt gaa ctt gga gct gct gct ctg ctc tca      48
Met Lys Val Ala Gly Gly Leu Glu Leu Gly Ala Ala Ala Leu Leu Ser
1                               5          10          15

gca tca cca cgt gct ctt gtc act ctt tcc aca ggt cct act tgc tct      96
Ala Ser Pro Arg Ala Leu Val Thr Leu Ser Thr Gly Pro Thr Cys Ser
20                               25          30

ata tta cca aag aat cca ctt ttc ccc caa aac ctg agc tct cag cct      144
Ile Leu Pro Lys Asn Pro Leu Phe Pro Gln Asn Leu Ser Ser Gln Pro
35                               40          45

tgt atc aag atg gaa gga gac aaa tcg ctc acc ttt tcc agc tac ggg      192
Cys Ile Lys Met Glu Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
50                               55          60

ctg caa tgg tgt ctc tat gag cta gac aag gaa gaa ttt cag aca ttc      240
Leu Gln Trp Cys Leu Tyr Glu Leu Asp Lys Glu Glu Phe Gln Thr Phe
65                               70          75          80

aag gaa tta cta aag aag aaa tct tca gaa tcg acc aca tgc tct att      288
Lys Glu Leu Leu Lys Lys Lys Ser Ser Glu Ser Thr Thr Cys Ser Ile
85                               90          95

cca cag ttt gaa atc gag aat gcc aac gty gaa tgt ctg gca ctc ctc      336
Pro Gln Phe Glu Ile Glu Asn Ala Asn Val Glu Cys Leu Ala Leu Leu
100                              105          110

ttg cat gag tat tat gga gca tcg ctg gcc tgg gct acg tcc att agc      384
Leu His Glu Tyr Tyr Gly Ala Ser Leu Ala Trp Ala Thr Ser Ile Ser
115                              120          125

atc ttt gaa aac atg aac ctg cga acc ctc tcg gag aag gca cgg gat      432
Ile Phe Glu Asn Met Asn Leu Arg Thr Leu Ser Glu Lys Ala Arg Asp
130                              135          140

gac atg aaa aga cat tca cca gaa gat cct gaa gca acg atg act gac      480
Asp Met Lys Arg His Ser Pro Glu Asp Pro Glu Ala Thr Met Thr Asp
145                              150          155

caa gga cca agc aag gaa aaa gtg cca gga att tca caa gct gtg caa      528
Gln Gly Pro Ser Lys Glu Lys Val Pro Gly Ile Ser Gln Ala Val Gln
165                              170          175

caa gat agt gcc aca gct gca gag aca aaa gaa cag gaa att tca caa      576
Gln Asp Ser Ala Thr Ala Ala Glu Thr Lys Glu Gln Glu Ile Ser Gln
180                              185          190

gct atg gaa caa gaa ggt gcc aca gca gca gag aca gaa gaa caa gaa      624
Ala Met Glu Gln Glu Gly Ala Thr Ala Ala Glu Thr Glu Glu Gln Glu

```

WO 02/32955		PCT/US01/10981	
195	200	205	
att tca caa gct atg gaa	caa gaa ggt gcc aca	gca gca gag aca gaa	672
Ile Ser Gln Ala Met Glu	Gln Gln Glu Gly Ala Thr	Ala Ala Glu Thr Glu	
210	215	220	
gaa caa gga cat gga ggt	gac aca tgg gac tac	aag agt cac gtg atg	720
Glu Gln Gly His Gly Gly	Asp Thr Trp Asp Tyr Lys	Ser His Val Met	
225	230	235	240
acc aaa ttc gct gag gag	gag gat gta cgt cgt	agt ttt gaa aac aet	768
Thr Lys Phe Ala Glu Glu	Glu Asp Val Arg Arg	Ser Phe Glu Asn Thr	
245	250	255	
gct gct gac tgg cgg gaa	atg caa acg ttg gct	ggt gct ttt gat tca	816
Ala Ala Asp Trp Pro Glu	Met Gln Thr Leu Ala Gly	Ala Phe Asp Ser	
260	265	270	
gac cgg tgg gcc ttc cgg	cct cgc acg gtg gtt	ctg cac gga aag tca	864
Asp Arg Trp Gly Phe Arg	Pro Arg Thr Val Val	Leu His Gly Lys Ser	
275	280	285	
gga att ggg aaa tcg gct	cta gcc aga agg atc	gtg ctg tgc tgg gcg	912
Gly Ile Gly Lys Ser Ala	Leu Ala Arg Arg Ile	Val Leu Cys Trp Ala	
290	295	300	
caa ggt gga ctc tac cag	gga atg ttc tcc tac	gtc ttc ttc ctc ccc	960
Gln Gly Gly Leu Tyr Gln	Gly Met Phe Ser Tyr	Val Phe Phe Leu Pro	
305	310	315	320
gtt aga gag atg cag cgg	aag aag gag agc agt	gtc aca gag ttc atc	1008
Val Arg Glu Met Gln	Arg Lys Lys Glu Ser	Ser Val Thr Glu Phe Ile	
325	330	335	
tcc agg gag tgg cca gac	tcc cag gct cgg gtg	acg gag atc atg tcc	1056
Ser Arg Glu Trp Pro Asp	Ser Gln Ala Pro Val	Thr Glu Ile Met Ser	
340	345	350	
oga cca gaa agg ctg ttg	ttc atc att gac ggt	ttc gat gac ctg gcc	1104
Arg Pro Glu Arg Leu Leu	Phe Ile Ile Asp Gly	Phe Asp Asp Leu Gly	
355	360	365	
tct gtc ctc aac aat gac	aca aag ctc tgc aaa	gac tgg got gag aag	1152
Ser Val Leu Asn Asn Asp	Thr Lys Leu Cys Lys	Asp Trp Ala Glu Lys	
370	375	380	
cag cct cgg ttc acc ctc	ata cgc agt ctg ctg	agg aag gtc ctg ctc	1200
Gln Pro Pro Phe Thr Leu	Ile Arg Ser Leu Leu	Arg Lys Val Leu Leu	
385	390	395	400
cct gag tcc ttc ctg atc	gtc acc gtc aga gac	gtg gcc aca gag aag	1248
Pro Glu Ser Phe Leu Ile	Val Thr Val Arg Asp	Val Gly Thr Glu Lys	
405	410	415	
ctc aag tca gag gtc gtg	tot ccc cgt tac ctg	tta gtt aga gga atc	1296
Leu Lys Ser Glu Val Val	Ser Pro Arg Tyr Leu	Leu Val Arg Gly Ile	
420	425	430	
tcc ggg gaa caa aga atc	cac ttg ctc ctt gag	cgc ggg att ggt gag	1344
Ser Gly Glu Gln Arg Ile	His Leu Leu Leu Glu	Arg Gly Ile Gly Glu	
435	440	445	

WO 02/32955	PCT/US01/10981
cat cag aag aca caa ggg ttg cgt gcg atc atc aac aac cgt gag ctg His Gln Lys Thr Gln Gly Leu Arg Ala Ile Ile Asn Asn Arg Glu Leu 450 455 460	1392
ctc gac caa tgc cag gtg ccc gcc gtg ggc tct ctc atc tgc gtg gcc Leu Asp Gln Cys Gln Val Pro Ala Val Gly Ser Leu Ile Cys Val Ala 465 470 475 480	1440
ctg cag ctg cag gac gtg gtg ggg gag agc gtc gcc ccc ttc aac caa Leu Gln Leu Gln Asp Val Val Gly Glu Ser Val Ala Pro Phe Asn Gln 485 490 495	1488
acg ctc aca gcc ctg cac gcc get ttt gcg ttt cat cag ctc acc cct Thr Leu Thr Gly Leu His Ala Ala Phe Ala Phe His Gln Leu Thr Pro 500 505 510	1536
cga gcc gtg tgc cgg cgc tgt ctc aat ctg gag gaa aga gtt gtc ctg Arg Gly Val Val Arg Arg Cys Leu Asn Leu Glu Glu Arg Val Val Leu 515 520 525	1584
aag cgc ttc tgc cgt atg gct gtg gag gga gtg tgg aat agg aag tca Lys Arg Phe Cys Arg Met Ala Val Glu Gly Val Trp Asn Arg Lys Ser 530 535 540	1632
gtg ttt gat ggt gac gac ctc atg gtt caa gga ctc ggg gag tct gag Val Phe Asp Gly Asp Asp Leu Met Val Gln Gly Leu Gly Glu Ser Glu 545 550 555 560	1680
ctc cgt gct ctg ttt cac atg aac atc ctt ctc cca gac agc cac tgt Leu Arg Ala Leu Phe His Met Asn Ile Leu Leu Pro Asp Ser His Cys 565 570 575	1728
gag gag tac tac acc ttc ttc cac ctc agt ctc cag gac ttc tgt gcc Glu Glu Tyr Tyr Thr Phe Phe His Leu Ser Leu Gln Asp Phe Cys Ala 580 585 590	1776
gcc ttg tac tac gtg tta gag gcc ctg gaa atc gag cca gct ctc tgc Ala Leu Tyr Tyr Val Leu Glu Gly Leu Glu Ile Glu Pro Ala Leu Cys 595 600 605	1824
cct ctg tac gtt gag aag aca aag agg tcc atg gag ctt aaa cag gca Pro Leu Tyr Val Glu Lys Thr Lys Arg Ser Met Glu Leu Lys Gln Ala 610 615 620	1872
ggc ttc est atc cac tgc ctt tgg atg aag cgt ttc ttg ttt gcc ctc Gly Phe His Ile His Ser Leu Trp Met Lys Arg Phe Leu Phe Gly Leu 625 630 635 640	1920
gtg agc gaa gac gta agg agg coa ctg gag gtc ctg ctg ggc tgt ccc Val Ser Glu Asp Val Arg Arg Pro Leu Glu Val Leu Leu Gly Cys Pro 645 650 655	1968
gtt ccc ctg ggg gtg aag cag aag ctt ctg cac tgg gtc tct ctg ttg Val Pro Leu Gly Val Lys Gln Lys Leu Leu His Trp Val Ser Leu Leu 660 665 670	2016
ggc cag cag cct aat gcc acc acc coa gga gac acc ctg gac gcc ttc Gly Gln Gln Pro Asn Ala Thr Thr Pro Gly Asp Thr Leu Asp Ala Phe 675 680 685	2064

WO 02/32955	PCT/US01/10981
cac tgt ctt ttc gag act caa gac aaa gag ttt gtt cgc ttg gca tta His Cys Leu Phe Glu Thr Gln Asp Lys Glu Phe Val Arg Leu Ala Leu 690 695 700	2112
aac agc ttc caa gaa gtg tgg ctt cag att aac cag aac ctg gac ttg Asn Ser Phe Gln Glu Val Trp Leu Pro Ile Asn Gln Asn Leu Asp Leu 705 710 715 720	2160
ata gca tct tcc ttc tgc ctc cag cac tgt cag tat ttg cgg aaa att Ile Ala Ser Ser Phe Cys Leu Gln His Cys Pro Tyr Leu Arg Lys Ile 725 730 735	2208
cgg gtg gat gtc aaa ggg atc ttc cca aga gat gag tcc gct gag gca Arg Val Asp Val Lys Gly Ile Phe Pro Arg Asp Glu Ser Ala Glu Ala 740 745 750	2256
tgt cct gtg gtc cct cta tgg atg cgg gat aag acc ctc att gag gag Cys Pro Val Val Pro Leu Trp Met Arg Asp Lys Thr Leu Ile Glu Glu 755 760 765	2304
cag tgg gaa gat ttc tgc tcc atg ctt ggc acc cac cca cac ctg cgg Gln Trp Glu Asp Phe Cys Ser Met Leu Gly Thr His Pro His Leu Arg 770 775 780	2352
cag ctg gac ctg ggc agc agc atc ctg aca gag cgg gcc atg aag acc Gln Leu Asp Leu Gly Ser Ser Ile Leu Thr Glu Arg Ala Met Lys Thr 785 790 795 800	2400
ctg tgt gcc aag ctg agy cat ccc acc tgc aag ata cag acc ctg atg Leu Cys Ala Lys Leu Arg His Pro Thr Cys Lys Ile Gln Thr Leu Met 805 810 815	2448
ttt aga aat gca cag att acc cct ggt gtg caa cac ctc tgg aga atc Phe Arg Asn Ala Gln Ile Thr Pro Gly Val Gln His Leu Trp Arg Ile 820 825 830	2496
gtc atg gcc aac cgt aac cta aga tcc ctc aac ttg gga ggc acc cac Val Met Ala Asn Arg Asn Leu Arg Ser Leu Asn Leu Gly Gly Thr His 835 840 845	2544
ctg aag gaa gag gat gta agy atg gcy tgt gaa gcc tta aaa cac cca Leu Lys Glu Glu Asp Val Arg Met Ala Cys Glu Ala Leu Lys His Pro 850 855 860	2592
aaa tgt ttg ttg gag tct ttg agy ctg gat tgc tgt gga ttg acc cat Lys Cys Leu Leu Glu Ser Leu Arg Leu Asp Cys Cys Gly Leu Thr His 865 870 875 880	2640
gcc tgt tac ctg aag atc tcc caa atc ctt acg acc tcc ccc agc ctg Ala Cys Tyr Leu Lys Ile Ser Gln Ile Leu Thr Thr Ser Pro Ser Leu 885 890 895	2688
aaa tct ctg agc ctg gca gga aac aag gtg aca gac cag gga gta acg Lys Ser Leu Ser Leu Ala Gly Asn Lys Val Thr Asp Gln Gly Val Thr 900 905 910	2736
cct ctc agt gat gcc ttg agg gtc tcc cag tgc gcc ctg cag aag ctg Pro Leu Ser Asp Ala Leu Arg Val Ser Gln Cys Ala Leu Gln Lys Leu 915 920 925	2784
ata ctg gag gac tgt ggc atc aca gcc acg ggt tgc cag agt ctg gcc	2832

WO 02/32955 PCT/US01/10981

1160 1165 1170

gtg cag cta ctc aag ccc cga gtc gta att gac ggt agt tgg cat 3564
 Val Gln Leu Leu Lys Pro Arg Val Val Ile Asp Gly Ser Trp His
 1175 1180 1185

tct ttt gat gaa gat gac cgg tac tgg tgg asa aac tgaagatagc 3610
 Ser Phe Asp Glu Asp Asp Arg Tyr Trp Trp Lys Asn
 1190 1195 1200

gaaacctgcc ccactcacac ccactctgatg gaggaacttt aaacgctgtt ttctcagagc 3670

aagctatgca cctgggagtt ccttctcaaa gatggagaat gattctgat tctcacaag 3730

ccctcaatgg tagtgattct tctgtgtca cctacggtg gttactggat ttgaaggcta 3790

gagaccttca agtcatagga ctcaagtatct gtgaaatgtc cgtcatatct cagagcatat 3850

agaggggaatt aaataaacac aaagcatttg gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3900

<210> 24
 <211> 1200
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 24

Met Lys Val Ala Gly Gly Leu Glu Leu Gly Ala Ala Ala Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Arg Ala Leu Val Thr Leu Ser Thr Gly Pro Thr Cys Ser
 20 25 30

Ile Leu Pro Lys Asn Pro Leu Phe Pro Gln Asn Leu Ser Ser Gln Pro
 35 40 45

Cys Ile Lys Met Glu Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 50 55 60

Leu Gln Trp Cys Leu Tyr Glu Leu Asp Lys Glu Glu Phe Gln Thr Phe
 65 70 75 80

Lys Glu Leu Leu Lys Lys Lys Ser Ser Glu Ser Thr Thr Cys Ser Ile
 85 90 95

Pro Gln Phe Glu Ile Glu Asn Ala Asn Val Glu Cys Leu Ala Leu Leu
 100 105 110

Leu His Glu Tyr Tyr Gly Ala Ser Leu Ala Trp Ala Thr Ser Ile Ser
 115 120 125

Ile Phe Glu Asn Met Asn Leu Arg Thr Leu Ser Glu Lys Ala Arg Asp

WO 02/32955 PCT/US01/10981

130 135 140

Asp Met Lys Arg His Ser Pro Glu Asp Pro Glu Ala Thr Met Thr Asp
 145 150 155 160

Gln Gly Pro Ser Lys Glu Lys Val Pro Gly Ile Ser Gln Ala Val Gln
 165 170 175

Gln Asp Ser Ala Thr Ala Ala Glu Thr Lys Glu Gln Glu Ile Ser Gln
 180 185 190

Ala Met Glu Gln Glu Gly Ala Thr Ala Ala Glu Thr Glu Glu Gln Glu
 195 200 205

Ile Ser Gln Ala Met Glu Gln Glu Gly Ala Thr Ala Ala Glu Thr Glu
 210 215 220

Glu Gln Gly His Gly Gly Asp Thr Trp Asp Tyr Lys Ser His Val Met
 225 230 235 240

Thr Lys Phe Ala Glu Glu Glu Asp Val Arg Arg Ser Phe Glu Asn Thr
 245 250 255

Ala Ala Asp Trp Pro Glu Met Gln Thr Leu Ala Gly Ala Phe Asp Ser
 260 265 270

Asp Arg Trp Gly Phe Arg Pro Arg Thr Val Val Leu His Gly Lys Ser
 275 280 285

Gly Ile Gly Lys Ser Ala Leu Ala Arg Arg Ile Val Leu Cys Trp Ala
 290 295 300

Gln Gly Gly Leu Tyr Gln Gly Met Phe Ser Tyr Val Phe Phe Leu Pro
 305 310 315 320

Val Arg Glu Met Gln Arg Lys Lys Glu Ser Ser Val Thr Glu Phe Ile
 325 330 335

Ser Arg Glu Trp Pro Asp Ser Gln Ala Pro Val Thr Glu Ile Met Ser
 340 345 350

Arg Pro Glu Arg Leu Leu Phe Ile Ile Asp Gly Phe Asp Asp Leu Gly
 355 360 365

Ser Val Leu Asn Asn Asp Thr Lys Leu Cys Lys Asp Trp Ala Glu Lys
 370 375 380

WO 02/32955

PCT/US01/10981

Gln Pro Pro Phe Thr Leu Ile Arg Ser Leu Leu Arg Lys Val Leu Leu
 385 390 395 400
 Pro Glu Ser Phe Leu Ile Val Thr Val Arg Asp Val Gly Thr Glu Lys
 405 410 415
 Leu Lys Ser Glu Val Val Ser Pro Arg Tyr Leu Leu Val Arg Gly Ile
 420 425 430
 Ser Gly Glu Gln Arg Ile His Leu Leu Leu Glu Arg Gly Ile Gly Glu
 435 440 445
 His Gln Lys Thr Gln Gly Leu Arg Ala Ile Ile Asn Asn Arg Glu Leu
 450 455 460
 Leu Asp Gln Cys Gln Val Pro Ala Val Gly Ser Leu Ile Cys Val Ala
 465 470 475 480
 Leu Gln Leu Gln Asp Val Val Gly Glu Ser Val Ala Pro Phe Asn Gln
 485 490 495
 Thr Leu Thr Gly Leu His Ala Ala Phe Ala Phe His Gln Leu Thr Pro
 500 505 510
 Arg Gly Val Val Arg Arg Cys Leu Asn Leu Glu Glu Arg Val Val Leu
 515 520 525
 Lys Arg Phe Cys Arg Met Ala Val Glu Gly Val Trp Asn Arg Lys Ser
 530 535 540
 Val Phe Asp Gly Asp Asp Leu Met Val Gln Gly Leu Gly Glu Ser Glu
 545 550 555 560
 Leu Arg Ala Leu Phe His Met Asn Ile Leu Leu Pro Asp Ser His Cys
 565 570 575
 Glu Glu Tyr Tyr Thr Phe Phe His Leu Ser Leu Gln Asp Phe Cys Ala
 580 585 590
 Ala Leu Tyr Tyr Val Leu Glu Gly Leu Glu Ile Glu Pro Ala Leu Cys
 595 600 605
 Pro Leu Tyr Val Glu Lys Thr Lys Arg Ser Met Glu Leu Lys Gln Ala
 610 615 620

WO 02/32955

PCT/US01/10981

Gly Phe His Ile His Ser Leu Trp Met Lys Arg Phe Leu Phe Gly Leu
 625 630 635 640
 Val Ser Glu Asp Val Arg Arg Pro Leu Glu Val Leu Leu Gly Cys Pro
 645 650 655
 Val Pro Leu Gly Val Lys Gln Lys Leu Leu His Trp Val Ser Leu Leu
 660 665 670
 Gly Gln Gln Pro Asn Ala Thr Thr Pro Gly Asp Thr Leu Asp Ala Phe
 675 680 685
 His Cys Leu Phe Glu Thr Gln Asp Lys Glu Phe Val Arg Leu Ala Leu
 690 695 700
 Asn Ser Phe Gln Glu Val Trp Leu Pro Ile Asn Gln Asn Leu Asp Leu
 705 710 715 720
 Ile Ala Ser Ser Phe Cys Leu Gln His Cys Pro Tyr Leu Arg Lys Ile
 725 730 735
 Arg Val Asp Val Lys Gly Ile Phe Pro Arg Asp Glu Ser Ala Glu Ala
 740 745 750
 Cys Pro Val Val Pro Leu Trp Met Arg Asp Lys Thr Leu Ile Glu Glu
 755 760 765
 Gln Trp Glu Asp Phe Cys Ser Met Leu Gly Thr His Pro His Leu Arg
 770 775 780
 Gln Leu Asp Leu Gly Ser Ser Ile Leu Thr Glu Arg Ala Met Lys Thr
 785 790 795 800
 Leu Cys Ala Lys Leu Arg His Pro Thr Cys Lys Ile Gln Thr Leu Met
 805 810 815
 Phe Arg Asn Ala Gln Ile Thr Pro Gly Val Gln His Leu Trp Arg Ile
 820 825 830
 Val Met Ala Asn Arg Asn Leu Arg Ser Leu Asn Leu Gly Gly Thr His
 835 840 845
 Leu Lys Glu Glu Asp Val Arg Met Ala Cys Glu Ala Leu Lys His Pro
 850 855 860

WO 02/32955

PCT/US01/10981

Lys Cys Leu Leu Glu Ser Leu Arg Leu Asp Cys Cys Gly Leu Thr His
 865 870 875 880

Ala Cys Tyr Leu Lys Ile Ser Gln Ile Leu Thr Thr Ser Pro Ser Leu
 885 890 895

Lys Ser Leu Ser Leu Ala Gly Asn Lys Val Thr Asp Gln Gly Val Thr
 900 905 910

Pro Leu Ser Asp Ala Leu Arg Val Ser Gln Cys Ala Leu Gln Lys Leu
 915 920 925

Ile Leu Glu Asp Cys Gly Ile Thr Ala Thr Gly Cys Gln Ser Leu Ala
 930 935 940

Ser Ala Leu Val Ser Asn Arg Ser Leu Thr His Leu Cys Leu Ser Asn
 945 950 955 960

Asn Ser Leu Gly Asn Glu Gly Val Asn Leu Leu Cys Arg Ser Met Arg
 965 970 975

Leu Pro His Cys Ser Leu Gln Arg Leu Met Leu Asn Gln Cys His Leu
 980 985 990

Asp Thr Ala Gly Cys Gly Ser Leu Ala Leu Ala Leu Met Gly Asn Ser
 995 1000 1005

Trp Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Met Asn Pro Val Glu Asp Asn
 1010 1015 1020

Gly Val Lys Leu Leu Cys Glu Val Met Arg Glu Pro Ser Cys His
 1025 1030 1035

Leu Gln Asp Leu Glu Leu Val Lys Cys His Leu Thr Ala Ala Cys
 1040 1045 1050

Cys Glu Ser Leu Ser Cys Val Ile Ser Arg Ser Arg His Leu Lys
 1055 1060 1065

Ser Leu Asp Leu Thr Asp Asn Ala Leu Gly Asp Gly Gly Val Ala
 1070 1075 1080

Ala Leu Cys Glu Gly Leu Lys Gln Lys Asn Ser Val Leu Thr Arg
 1085 1090 1095

Leu Gly Leu Lys Ala Cys Gly Leu Thr Ser Asp Cys Cys Glu Ala

WO 02/32955

PCT/US01/10981

1100		1105		1110	
Leu Ser	Leu Ala	Leu Ser	Cys	Asn Arg	His Leu Thr
1115			1120		1125
Leu Val	Gln Asn	Asn Phe	Ser	Pro Lys	Gly Met Met
1130			1135		1140
Ser Ala	Phe Ala	Cys Pro	Thr	Ser Asn	Leu Gln Ile
1145			1150		1155
Trp Lys	Trp Gln	Tyr Pro	Val	Gln Ile	Arg Lys Leu
1160			1165		1170
Val Gln	Leu Leu	Lys Pro	Arg	Val Val	Ile Asp Gly
1175			1180		1185
Ser Phe	Asp Glu	Asp Asp	Arg	Tyr Trp	Trp Lys Asn
1190			1195		1200

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/10981
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C12N15/12 C12O1/68 G01N33/53 C12N15/11 C12N5/06 A01K67/027 C07K16/18 G01N33/50 A61K38/17 A61P15/00 A61P15/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EMBL, WPI Data, EPO-Internal, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 8 October 1999 (1999-10-08) Database accession no. AC011470 XP002181745 Homo sapiens chromosome 19 clone CTC-490M10, complete sequence. HGT DOE Joint Genome Institute Stanford Human Genome Center. 99.913% identity in 1156 nt overlap (1156-1:40494-41649) abstract	1-15,18, 25,26, 30-33, 39-43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) *O* document referred to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *C* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
1 November 2001	19/11/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentstr. 2 NL - 2200 MV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Mateo Rosell, A.M.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/10981
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indicia, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! 21 October 1999 (1999-10-21) Database accession no. AC012107 XP002181746 cited in the application Homo sapiens clone RP11-45K21, WORKING DRAFT SEQUENCE, 25 unordered pieces. HTG; HTGS_DRAFT; HTGS_PHASE1. Birren B. et al., Unpublished. 98% identity in 186 nt overlap (1-185:47829-48014) abstract</p>	1-15,18, 25,26, 30-33, 39-43
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! 11 September 1997 (1997-09-11) Database accession no. Z86039 XP002181747 Bos taurus mRNA for hypothetical protein (oocyte transcript). Lauer B., and Einspanier R.; "Expression in the bovine oviduct"; Unpublished. abstract</p>	1-6,18, 25,26, 30-33, 39-43
Y	<p>TONG ZHI-BIN ET AL: "Mater encodes a maternal protein in mice with a leucine-rich repeat domain homologous to porcine ribonuclease inhibitor." MAMMALIAN GENOME, vol. 11, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 281-287, XP001035150 ISSN: 0938-8990 cited in the application the whole document</p>	1-5, 16-18, 20, 22-28, 30-37, 39-65, 68,71-73
Y	<p>KALANTARIDOU S N ET AL: "AUTOIMMUNE PREMATURE OVARIAN FAILURE: OF MICE AND WOMEN" JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL WOMEN'S ASSOCIATION, AMERICAN MEDICAL WOMEN'S ASSOCIATION, NEW YORK, US, vol. 53, no. 1, 21 December 1998 (1998-12-21), pages 18-20, XP001035151 ISSN: 0098-8421 cited in the application abstract</p>	1-5, 16-18, 20, 22-28, 30-37, 39-65, 68,71-73
A	<p>TONG ZHI-BIN ET AL: "A mouse gene encoding an oocyte antigen associated with autoimmune premature ovarian failure." ENDOCRINOLOGY, vol. 140, no. 8, August 1999 (1999-08), pages 3720-3726, XP002181743 ISSN: 0013-7227 cited in the application the whole document</p>	1-5, 16-18, 20, 22-28, 30-37, 39-65, 68,71-73

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In ternational Application No PCT/US 01/10981
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE EMBL 'Online! 5 November 1999 (1999-11-05) Database accession no. AV367637 XP002181748 Mus musculus 16 days embryo lung cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:8430436F06, 3' end partial sequence. EST. RIKEN Genomic Sciences Center abstract</p>	1-5, 18, 25, 26, 30-33, 39-43
A	<p>TAGUCHI O; NISHIZUKA Y: " AUTO IMMUNE OPHTHORITIS IN THYMECTOMIZED MICE T CELL REQUIREMENT IN ADOPTIVE CELL TRANSFER " CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 42, no. 2, 1980, page 324-331 XP001036530 cited in the application the whole document</p>	1
A	<p>MELNER MH AND FELTUS FA: "Editorial: autoimmune premature ovarian failure-endocrine aspects of a T cell disease" ENDOCRINOLOGY, vol. 140, no. 8, 1999, pages 3401-3403, XP002181744 the whole document</p>	1

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 5/24	A 6 1 P 5/24	4 C 0 8 6
A 6 1 P 15/18	A 6 1 P 15/18	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// G 0 1 N 33/564	C 1 2 N 5/00	A
	G 0 1 N 33/564	Z

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 トン ツィ - ビン

アメリカ合衆国 メリーランド州 ポトマック オラクル プレイス 7 8 2 6

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FA11
 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA31 CA01 CA09 DA02 GA11 HA12 HA20
 4B063 QA19 QQ02 QQ42 QQ79 QQ96 QR08 QR32 QR42 QR48 QR62
 QS33 QS34 QX01
 4B065 AA91X AA93Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA25 CA46
 4C084 AA13 AA17 NA14 ZA86 ZC11
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 NA14 ZA86 ZC11
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA86 EA26 EA50 FA74

专利名称(译)	人类基因对生育至关重要		
公开(公告)号	JP2004534504A	公开(公告)日	2004-11-18
申请号	JP2002536336	申请日	2001-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府		
申请(专利权)人(译)	美国		
[标]发明人	ネルソンローレンスエム トンツイビン		
发明人	ネルソン ローレンス エム. トン ツィ-ビン		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/711 A61K45/00 A61K48/00 A61P5/24 A61P15/00 A61P15/18 C07H21/04 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61P5/24 A61P15/00 A61P15/18 C07H21/04 C07K14/47 C07K16/18 C07K2319/00 G01N33/689 G01N2800/361 G01N2800/367 Y10S424/811 Y10S530/806 Y10S530/853		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/711 A61K45/00 A61K48/00 A61P5/24 A61P15/18 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A G01N33/564.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA20 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA86 4C084/ZC11 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA86 4C086/ZC11 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA26 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/241510 2000-10-18 US		
其他公开文献	JP4744062B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了对于生育必需的新型核酸和蛋白质序列。特别地，提供了人Mater cDNA和蛋白质。功能性物质是女性生育能力所必需的，由雌性卵母细胞产生的受精卵不能超过2细胞阶段。描述了使用Mater分子在不孕症和生育力的诊断，预后和治疗中的方法。还提供了使用MATER作为避孕药的方法。本公开还描述了与这些方法有关的化合物，以及这些化合物的鉴定。

交配対	n*	同腹仔数 平均±標準偏差	メンデル比		
			+/+	+/-	-/-
♂ x ♀	n*	平均±標準偏差	+/+	+/-	-/-
<i>Mater</i> ^{+/+} x <i>Mater</i> ^{+/+}	11	7.5 ± 1.8	1.00	0	0
<i>Mater</i> ^{+/+} x <i>Mater</i> ^{+/-}	10	7.4 ± 1.9	n.d. [†]	n.d.	n.d.
<i>Mater</i> ^{+/+} x <i>Mater</i> ^{-/-}	9	0	n.a. [†]	n.a.	n.a.
<i>Mater</i> ^{+/-} x <i>Mater</i> ^{+/+}	8	7.6 ± 2.4	0	1.00	0
<i>Mater</i> ^{+/-} x <i>Mater</i> ^{+/-}	18	8.4 ± 1.9	0	0.47	0.53
<i>Mater</i> ^{+/-} x <i>Mater</i> ^{-/-}	15	8.5 ± 1.9	0.21	0.57	0.22