

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公開特許公報 ( A )

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 252801

(P2003 - 252801A)

(43)公開日 平成15年9月10日 (2003.9.10)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* ( 参考 )
A 6 1 K 48/00		A 6 1 K 48/00	4 B 0 2 4
31/7088	ZNA	31/7088 ZNA	4 B 0 6 3
38/00		39/395	D 4 C 0 8 4
39/395		A 6 1 P 5/06	4 C 0 8 5
A 6 1 P 5/06		5/10	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L ( 全 26数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 51022(P2002 - 51022)

(22)出願日 平成14年2月27日(2002.2.27)

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72)発明者 巽 圭太

大阪府吹田市津雲台5 - 5 - 7

(72)発明者 田中 進

福井県勝山市芳野町2 - 1 - 5

(72)発明者 網野 信行

大阪府高槻市南平台5 - 60 - 38

(72)発明者 大久保 公策

大阪府箕面市瀬川2 - 11 - 26

(74)代理人 100087631

弁理士 滝田 清暉 ( 外 1 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 下垂体特異的遺伝子の使用法

(57)【要約】

【課題】 下垂体において特異的に発現する遺伝子及びアミノ酸に関する。

【解決手段】 発明者らは、ヒト下垂体に活性に発現する遺伝子を調べることにより、ヒト下垂体組織において豊富に発現する遺伝子を特定し、配列番号1～4の遺伝子が、ヒト下垂体において特異的に発現することを見出した。更に、このような発見に基づき、これら遺伝子及びタンパク質を有効に利用する方法を見出した。本発明は、配列番号1～4のいずれかの塩基配列又はその部分の、ヒト下垂体に関する検査又はヒト下垂体関連疾患の治療のための使用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1～4のいずれかの塩基配列又はその部分の、ヒト下垂体若しくはヒト関節に関する検査又はヒト下垂体関連疾患若しくはヒト関節関連疾患の治療のための使用。

【請求項2】 配列番号1～4のいずれかの塩基配列又はその部分をPCR増幅するためのプライマーから成る、ヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の遺伝子異常の診断キット。

【請求項3】 配列番号1～4のいずれかの塩基配列の部分配列をプローブとする、ヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の遺伝子発現の診断薬。

【請求項4】 配列番号1～4の塩基配列のいずれかを含む発現ベクターから成る、配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質の低発現が増悪因子となるヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の治療薬。

【請求項5】 配列番号1～4のいずれかの塩基配列に対するアンチセンス核酸から成る、配列番号5～8のいずれかのタンパク質の過剰発現が増悪因子となるヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の治療薬。

【請求項6】 配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質又は該タンパク質に対する抗体の、ヒト下垂体若しくはヒト関節に関する検査又はヒト下垂体関連疾患若しくはヒト関節関連疾患の治療のための使用。

【請求項7】 配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質を抗原として成るヒト下垂体又はヒト関節関連の自己免疫疾患の診断薬。

【請求項8】 前記抗原が標識されている請求項7に記載の診断薬。

【請求項9】 前記自己免疫疾患が、自己免疫性下垂体炎又は慢性関節リウマチである請求項7又は8に記載の診断薬。

【請求項10】 配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質に対する抗体から成るヒト下垂体又はヒト関節機能の診断薬。

【請求項11】 配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質から成る、配列番号5～8のいずれかの配列タンパク質の低発現が増悪因子となるヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の治療薬。

【請求項12】 配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質に対する抗体から成る、配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質の過剰発現が増悪因子となるヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の治療薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、下垂体において特異的に発現する遺伝子及びアミノ酸に関する。

## 【0002】

【従来の技術】下垂体は主に下垂体ホルモンを作る内分泌細胞から成っている。これらのホルモンは分泌顆粒に

蓄えられ、調節されたエキソサイトーシス（細胞外放出）により放出される。この分泌顆粒はまたプロセッシング酵素を含み、細胞膜に溶解しホルモンやその他の成分を放出する（Arvan P & Castle D Biochemical Journal 332 593-610(1998)）

この下垂体の特徴的な機能は、下垂体特有の下垂体ホルモンや転写因子などのタンパク質によって保たれている。これらの遺伝子の異常は、分離した下垂体前葉ホルモンの欠乏と、結合した下垂体ホルモンの欠乏の両方をもたらす（Phillips III JA et al. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 78 6372-6375(1981)；Tatsumi K et al. Nature Genetics 1 56-58(1992)；Cushman LJ & Camper, Mammalian Genome 12 485-494(2001)）。タンパク修飾酵素にはGalNAc-4-スルホトランスフェラーゼのように下垂体特異的に発現するものと（Okuda T et al. Journal of Biological Chemistry 275 40605-40613(2000)）、プロホルモンコンバーターゼ（PC）1/3、PC2、カルボキシペプチダーゼE（CPE）及び神経内分泌タンパク質7B2（Iguchi H et al. Neuroendocrinology 39 453-458(1984)）のようにすい臓や神経組織でも発現するものがある（Gorr SU et al. Molecular and Cellular Endocrinology 172 1-6(2001)）。CPEや7B2の異常では、ACTH（副腎皮質刺激ホルモン）の分泌が制御されなくなる（Gorr SU et al. Molecular and Cellular Endocrinology 172 1-6(2001)）。組織特有のタンパク質の異常が、自己免疫疾患の有用なマーカーであることは既に立証されている。リンパ球性下垂体炎に対する下垂体に特有の抗体は報告されているが、それに対応する抗原は特定されていない（Crock PA, Metabolism 83 609-618(1998)；Nishiki M et al. Clinical Endocrinology (Oxford) 54 327-333(2001)）。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】下垂体特有組織の主となる分子を明らかにして、下垂体疾患の機構を解明するために、下垂体特有の転写産物を単離することは重要である。ヒト下垂体で特異的に発現した分子を特定する試みにおいて、発明者らは遺伝子発現プロファイリング（gene expression profiling）という方法を用いた（Okubo K et al. Nature Genetics 2 173-179(1992)）。この方法は、mRNA種のオリジナル組成を忠実に表す3'-方向cDNAライブラリーを構成し、そのcDNAクローンをランダムに配列させ、GATC（MboI認識配列）に隣接するポリ（A）の丁度上流に位置する短ヌクレオチド配列から成る3'ESTを得る。これらの3'ESTは、個々の遺伝子に特有であることから、遺伝子のサイン（gene signature, GSs）と呼ばれる（Okubo K et al. Nature Genetics 2 173-179(1992)）。発現された遺伝子はそれらのGS種により特定され、各転写産物の相対的存在度は、ライブラリー中の対応する

G S種の頻度により見積もることができる。その結果生じた遺伝子発現のプロファイルは、ヒト下垂体での遺伝子の転写量を表す。64のヒト組織での同様の遺伝子発現のプロファイルにより、ボディマップデータベース (Body Map database) と称する分子解剖データベースを構成する (日本臨床52巻4号(4,1994); Hishiki T et al. Nucleic Acids Research 28 136-138(2000); Kawamoto S et al. Genome Research 10 1817-1827(2000))。ボディマップデータベースにおける種々の組織から得られた遺伝子発現のプロファイルを比較することにより、多くの組織に特有の遺伝子とその遺伝子の異状により生じる疾患が特定されてきた (Okubo K et al. Nature Genetics 2 173-179(1992); Kita H et al. DNA Research 3 1-7(1996); Nishida K et al. Investigative Ophthalmology & Visual Science 37 1800-1809(1996); Yokoyama M et al. DNA Research 3 311-320(1996); Maeda K et al. Gene 190 227-235(1997); Nishida K et al. American Journal of Human Genetics 61 1268-1275(1997); Shimizu-Matsumoto A et al. Blood 92 1432-1441(1998))。このように、この方法は、機能的クローニング、相位的クローニング、位置クローニングなどの他の方法の、新規な遺伝子を特定するための効果的な代替法である。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】発明者らは、ヒト下垂体に活性に発現する遺伝子を調べることにより、ヒト下垂体組織において豊富に発現する遺伝子を特定した。ヒト下垂体のこの遺伝子の発現プロファイルをボディマップデータベースと比較することにより、ヒト下垂体において特異的に発現する遺伝子を見出し、これらがヒト下垂体における疾患の検査や治療に利用できることを見出した。

【0005】本発明において、下記の4種の遺伝子が、ヒト下垂体において特異的に発現することを見出した。

1. PGSF1a (GS9544のプライス変種) : 配列番号1
2. PGSF1b (GS9544のプライス変種) : 配列番号2
3. PGSF2 (GS9589と同じ) : 配列番号3
4. Pi-a (GS9573、KIAA0512と同じ) : 配列番号4

従って、本発明は、これらがコードするアミノ酸配列 (配列番号5~8) が下垂体に由来するタンパク質であることを明らかにしている。なお、pi-aの塩基配列及びアミノ酸配列は既登録であり (AX127740、AX036667、AK026832、AB037745)、PGSF1a (AB058892)、PGSF1b (AB058893) 及びPGSF2 (AB058894) の塩基配列については発明者らが14-APR-2001に登録した。また、本発明は、配列番号1~3のいずれかの塩基配列であり、配列

番号5~7のいずれかのアミノ酸配列であるといえる。

【0006】本発明においては、このような発見に基づき、これら遺伝子及びタンパク質を有効に利用する方法を見出した。即ち、本発明は、配列番号1~4のいずれかの塩基配列又はその部分の、ヒト下垂体若しくはヒト関節に関する検査又はヒト下垂体関連疾患若しくはヒト関節関連疾患の治療のための使用である。即ち、本発明は、以下の発明を含む。

- 1) 配列番号1~4のいずれかの蛋白コード領域をPCR増幅するためのプライマーから成る、ヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の遺伝子異常の診断キット。更に、配列番号1~4のいずれかの蛋白コード領域をPCR増幅するためのプライマーを用いた、ヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の遺伝子異常の診断方法。
- 2) 配列番号1~4のいずれかの塩基配列の部分配列をプローブとする、ヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の遺伝子発現の診断薬。更に、配列番号1~4のいずれかの塩基配列の部分配列をプローブとして使用した、ヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の遺伝子発現の診断方法。

【0007】3) 配列番号1~4の塩基配列のいずれかを含む発現ベクターから成る、配列番号5~8のいずれかの配列のタンパク質の低発現が増悪因子となるヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の治療薬。更に、配列番号1~4の塩基配列のいずれかを含む発現ベクターを用いた、配列番号5~8のいずれかの配列のタンパク質の低発現が増悪因子となるヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の治療方法。

4) 配列番号1~4のいずれかの塩基配列に対するアンチセンス核酸から成る、配列番号5~8のいずれかのタンパク質の過剰発現が増悪因子となるヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の治療薬。更に、配列番号1~4のいずれかの塩基配列に対するアンチセンス核酸を用いた、配列番号5~8のいずれかのタンパク質の過剰発現が増悪因子となるヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の治療方法。

【0008】また、本発明は、配列番号5~8のいずれかの配列のタンパク質又は該タンパク質に対する抗体の、ヒト下垂体若しくはヒト関節に関する検査又はヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の治療のための使用である。即ち、本発明は、以下の発明を含む。

- 1) 配列番号5~8のいずれかの配列のタンパク質を抗原として成るヒト下垂体関連の自己免疫疾患の診断薬。更に、配列番号5~8のいずれかの配列のタンパク質を抗原として用いた、ヒト下垂体又はヒト関節関連の自己免疫疾患の診断方法。前記抗原が標識されていてもよく、前記自己免疫疾患が、自己免疫性下垂体炎又は慢性関節リウマチであってもよい。
- 2) 配列番号5~8のいずれかの配列のタンパク質に対する抗体から成るヒト下垂体機能の診断薬。更に、配列

番号5～8のいずれかの配列のタンパク質に対する抗体を用いた、ヒト下垂体又はヒト関節機能の診断方法。

【0009】3) 配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質から成る、配列番号5～8のいずれかの配列タンパク質の低発現が増悪因子となるヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の治療薬。更に、配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質を用いた、配列番号5～8のいずれかの配列タンパク質の低発現が増悪因子となるヒト下垂体関連疾患又はヒト関節関連疾患の治療方法。

4) 配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質に対する抗体から成る、配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質の過剰発現が増悪因子となるヒト下垂体関連疾患の治療薬。更に、配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質に対する抗体を用いた、配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質の過剰発現が増悪因子となるヒト下垂体関連疾患の治療方法。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明で見出したヒト下垂体において特異的に発現することを見出した遺伝子は下記のように用いることができる。

1. 先天性下垂体ホルモン欠損症の遺伝子異常の診断方法。本発明のタンパク質(配列番号5～8)をコードするcDNA配列(配列番号1～4)を既知のヒトゲノム配列と比較することにより、各遺伝子のエクソン構造を決定することができる。それをもとに、蛋白コード領域をPCR増幅するプライマーを作製し、患者の血液などより抽出したDNAをPCR増幅し、塩基配列を決定し、正常配列との異同を調べる。即ち、配列番号1～4のいずれかの蛋白コード領域をPCR増幅するプライマ

【0011】humPGSF1b.ex1-U 5'-TGGGCCACAACCTATGAGGTAATC-3' (配列番号9)

humPGSF1b.ex2+L 5'-TCAGACCACCTCTCTCGTCC-3' (配列番号10)

humPGSF1b.ex3-U 5'-GCCTCAGCCTCCCGAGTATC-3' (配列番号11)

humPGSF1b.ex4+L 5'-CGTCAGAGACATGGGATTTGGAGT-3' (配列番号12)

humPGSF1b.ex5-U 5'-CCAATTCTCTGCAACACCCTAATC-3' (配列番号13)

humPGSF1b.ex5+L 5'-CTTTGATGCCTTTATTGATTC AACAC-3' (配列番号14)

【0012】2. cDNAの部分配列を用いた下垂体の遺伝子発現診断。配列番号1～4のcDNAの部分配列を用いて、Northern法、PCR法、DNA tip等の定量法や定性法を用いて遺伝子発現を調べることにより、下垂体腫瘍を始めとする組織の遺伝子発現診断を行う。即

ち、配列番号1～4のcDNAの部分配列を、このような診断のための診断用プローブとして用いることができる。

3. 自己免疫性下垂体炎、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患の診断。配列番号5～8の配列のタンパク質から成る抗原を用いて、これに対する自己抗体を測定し、自己免疫性下垂体炎、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患ならびに、下垂体などの組織破壊の診断に用いる。一例として、実施例2に標識抗原(各々の新規タンパク質)に患者の血清を反応させ、標識抗原/自己抗体複合体を形成させたあと、この複合体を検出する方法(ラジオリガンドアッセイ)を示す。

【0013】4. 抗体を作製して、患者の血清、組織での蛋白を測定し、下垂体、内分泌、外分泌機能の診断を行う。下垂体、内分泌、外分泌疾患の診断の為、配列番号5～8の配列のタンパク質に対する抗体を作製して、イムノアッセイにより血清、組織での各々の新規タンパク質の蛋白量を測定する。

【0014】5. 配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質又はこれらタンパク質をコードするDNA(配列番号1～4)を投与することにより、これらのタンパク質の低発現が増悪因子となる疾患で、下垂体疾患を初めとする内外分泌異常のある疾患、慢性関節リウマチ等の疾患を治療する。

例1)慢性関節リウマチ患者にPGSF1aタンパク質を関節内注射し補充・治療する。

例2)新規タンパク質(pi-a, PGSF1a, PGSF1b, PGSF2)の低発現が増悪因子となる疾患で、新規タンパク質の経静脈投与あるいは経口投与することにより補充・治療する。

例3)新規タンパク質(pi-a, PGSF1a, PGSF1b, PGSF2)の下垂体での低発現が増悪因子となる疾患で、これらタンパク質をコードするDNA(配列番号1～4)を含んだ発現ベクターを下垂体に投与することにより補充・治療する。

【0015】6. 配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質が過剰発現するのが増悪因子となる疾患で、これらタンパク質に対する抗体やアンチセンス核酸を投与することにより、作用を中和して下垂体疾患を初めとする内外分泌異常のある疾患、慢性関節リウマチ等の疾患を治療する。

例1)慢性関節リウマチ患者に抗PGSF1a抗体を関節内注射して蛋白量を抑制し、治療する。

例2)新規タンパク質(pi-a, PGSF1a, PGSF1b, PGSF2)の過剰発現が増悪因子となる疾患で、新規タンパク質に対する抗体を経静脈投与することにより蛋白量を抑制し治療する。

例3)新規タンパク質(pi-a, PGSF1a, PGSF1b, PGSF2)の下垂体での過剰発現が増悪因子となる疾患で、これらタンパク質をコードするDNA(配列番号1～4)に対

するアンチセンス核酸を下垂体に投与することにより発現量を抑制し、治療する。

【0016】7. 配列番号5～8のいずれかの配列のタンパク質を作製して、その機能・構造の解析研究の為の材料にする。新規タンパク質に対する抗体を作製して、その機能・構造の解析研究をする。

例1) 新規タンパク質(pi-a, PGSF1a, PGSF1b, PGSF2)を動物細胞、昆虫細胞、酵母、大腸菌など各種の細胞で *in vitro*に合成、あるいは化学合成し、培養細胞や動物に投与して過剰発現実験による機能解析をする研究に用

いる。  
例2) 新規タンパク質に対する抗体を作製してタンパク質の一次構造や立体構造を認識する抗体や、活性を中和する中和抗体を得る。一次構造や立体構造を認識する抗体は、蛋白構造の構造の解析研究に有用である。中和抗体は培養細胞や動物に投与することにより蛋白活性を抑制し、機能解析研究に有用である。

例3) 生体内あるいは活性の得られた発現系で発現させたタンパク質を、抗体を用いるか、活性を指標に精製し、精製タンパク質を用いて糖鎖構造を解析したり、結

晶解析で立体構造を調べる。

【0017】  
【実施例】以下、実施例にて本発明を例証するが、本発明を限定することを意図するものではない。以下、本実施例の用いた試験方法を記す。

### 3'-方向cDNAライブラリーの構成と配列分析

16～70歳の21人から採取したヒト下垂体のポリ(A)RNAサンプルをCLONTEC (Palo Alto, CA, USA) から購入した。これらから3'-方向cDNAライブラリーを構成し、既報 (Okubo K et al. Nature Genetics 2 173-179(1992)) に従って大腸菌を形質転換した。その手順を簡単に記載すると、MboIで消化されたpUC19ベースのベクタープライマーを用いて上記サンプルからcDNAを合成し、それを環状化し、大腸菌に導入した。これをプレートに撒き、ランダムに選択した形質転換体のcDNAインサートをPCRで増幅し、配列鑄型を作った。蛍光サイクルシーケンシングキット (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) とABI PRISM373遺伝子分析器 (Perkin-Elmer) を用いて、この増幅産物 (cDNA) の3'末端塩基配列を決定した。その結果得られた3'末端塩基配列 (以下「GSs」という。) をBLAST法により互いに比べて、クラスター化した (Altschul SF et al. Nature Genetics 6 119-129(1994))。各クラスターから1つの代表的GSを選択し、既に生成したクラスターからの代表的配列と比較した。各独立クラスターに1つのGSナンバーを付与した。このGSクラスター群 (GS種) の代表的配列を、再びBLAST法を用いてDDBJ/GenBank/EMBLデータベースで検索した (Altschul SF et al. Nature Genetics 6 119-129(1994))。

### 【0018】電子計算機内(インシリコ)でのRNAの発現比較

各GSの頻度をボディマップデータベースのものと比較した。ヒト下垂体中の各GS種の特異的発現を下式の「下垂体TS比」で表す。

$$\text{下垂体TS比} = \frac{\frac{\text{下垂体におけるGS種の頻度}}{\text{下垂体におけるGSの総数}}}{\frac{\text{全ボディマップデータベースにおけるGS種の頻度}}{\text{全ボディマップデータベースにおけるGSの総数}}}$$

### 【0019】cDNAライブラリーのスクリーニング

Uni-ZAP XRベクターを用いてZap-cDNA合成キット (STRATAGENE, La Jolla, CA, USA) により構成されたヒト下垂体cDNAのライブラリーを定法によりスクリーニングした。GS配列用にアルカルホスフェートで標識されたプローブを、Alphosダイレクトシステム (Amersham Pharmacia, Arlington Height, IL, USA) により合成した。ファージブランクを通常のアルカリ転写法によりナイロン膜 (Hybond N+, Amersham Pharmacia) に転写した後、この膜を80℃で2時間加熱した。次に、この膜を各プローブにより55℃で一晩ハイブリダイズした。ハイブリダイズした後、この膜を、55℃で一次洗浄液 (2M 尿素、0.1%SDS、50mM リン酸ナトリウム溶液 pH7.0、150mM NaCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.2%遮断薬) で10分間2回洗浄し、続いて室温で二次洗浄液 (50mM トリス塩基、100mM NaCl、2mM MgCl<sub>2</sub>) で5分間2回洗浄した。これをCDP-Star検出薬 (Amersham Pharmacia) で陽性検体を発光させ、増感膜を用いて室温で1時間診断用フィルム (RX-U, Fuji Film, Tokyo, Japan) に曝して検出した。この陽性クローンの二重鎖プラスミドDNAを回収し、DNA配列をABI PRISM373 遺伝子分析器 (Perkin-Elmer) により決定した。

### 【0020】5'-cDNA末端(5'-RACE)の迅速増幅

Marathon cDNA増幅キット (CLONTECH) を用い、GS9544、GS9589及びGS9573の5'末端の配列を決定した。ReverTraAce (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いてランダムヘキサマーによりヒト下垂体のポリ(A)RNA 1μgを逆転写した。それを二重鎖DNAに合成し、アダプター (5'-CTAATACGAC TCACTATAGG GCTCGAGCGG CCGCCCGGC AGGT-3' (配列番号15)、3'-H<sub>2</sub>N-CCCGTCCA-PO<sub>4</sub>-5') を結合した。アダプタープライマー1及びGS9544に対する遺伝子特定プライマー (5'-CTCAGACCAC CCCTCCTCCC ACGCA-3' (配列番号16))、GS9589に対する遺伝子特定プライマー (5'-TGCTCTTC CAGTAGCAGC ACCGGTAAA-3' (配列番号17))、GS9573に対する遺伝子特定プライマー (5'-AGACAGACCC TCCAAAGATT CA-3' (配列番号18)) を用いてPCRを行った。このPCRの産物についてAP1又は遺伝子特有のプライマーを用いて配列を決定した。

## 【0021】ノーザンハイブリダイゼーション

ヒト下垂体及び肝臓からのポリ(A)RNAをホルムアルデヒド-アガロースゲルで分画し、通常のアルカリ転写法によりHybond N+膜に転写した。この膜又はヒト心臓、脳、肝臓、すい臓、骨格筋及び肺mRNAを含むノーザンLIGHT Human Multiple mRNA Blot I (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)を、cDNAライブラリーをスクリーニングして得た陽性クローンのcDNA<sup>\*</sup>GSセンスプライマー

\*Aの蛋白コード領域部分をECLダイレクトシステム(Amersham Pharmacia)でラベルしたcDNAプローブとハイブリダイズし、洗浄した。この膜を増感膜を用いて室温で1時間又はそれ以上RX-U診断用フィルムに曝した。これらのcDNAプローブは表1に示すプライマーを用いてPCRにより得た。

【表1】

アンチセンスプライマー

GS9544 (PGSF1)	GACAGGACGGCGAAGTTTGA (配列番号19)	TCCTTATTGCCTCACCATTTC (配列番号20)
GS9589 (PGSF2) 3'	AGGACTTATATGCCAGGCAC (配列番号21)	TGTTATTTTTATGTGTGGAA (配列番号22)
GS9589 (PGSF2) 5'	CGCTCTAGAAGTAGTGGATC (配列番号23)	TTTGTGCTTATCCTCAGCAGCAG (配列番号24)
GS9573 (KIAA0512)	TGCTGAGTTCAGGTTAGAGGCC (配列番号25)	GTTACTGCTTTTCCACTTGCTC (配列番号26)

【0022】以下、本実施例の試験結果を記す。

ヒト下垂体の遺伝子発現プロファイル

下垂体ホルモンの合成とその分泌を分子面から理解するために、発明者らは、上述のようにヒト下垂体の遺伝子発現プロファイルを構築した。このプロファイルは、そ

20 の組織の特異性を保持する際のその遺伝子の相対的活性を示す。ヒト下垂体の3'-方向cDNAライブラリーから、1015のGSが得られた(表2)。

【表2】

位置	12 GS種	GSs	頻度 (%)
<b>I. Known genes</b>	<b>263</b>	<b>658</b>	<b>64.8</b>
<b>i. Extracellular proteins</b>	<b>16</b>	<b>238</b>	<b>23.4</b>
Secretory proteins	12	234	23.1
<i>Pituitary hormones</i>	5	219	21.6
<i>Other secretory proteins</i>	7	14	1.4
Matrix proteins	4	5	0.5
<b>ii. Plasma membrane proteins</b>	<b>12</b>	<b>20</b>	<b>2.0</b>
<b>iii. Intracellular proteins</b>	<b>172</b>	<b>301</b>	<b>29.8</b>
Secretory granule proteins	(9-10) <sup>a</sup>	(25-34) <sup>a</sup>	(2.5-3.4) <sup>a</sup>
ER-Golgi proteins	18	21	2.1
Nuclear proteins	32	49	4.8
Mitochondrial proteins	17	23	2.3
Lysosomal proteins	15	17	1.7
Cytoplasmic proteins	80	158	15.6
<i>Ribosomal proteins</i>	50	100	9.9
<i>Signal transducers</i>	(15-16) <sup>a</sup>	(17-26) <sup>a</sup>	(1.7-2.6) <sup>a</sup>
<i>Cytoskeletal proteins</i>	8	17	1.7
<i>Others</i>	6	15	1.5
<b>iv. Uncharacterized</b>	<b>63</b>	<b>98</b>	<b>9.7</b>
<b>II. Novel genes</b>	<b>264</b>	<b>357</b>	<b>35.2</b>
<b>Total</b>	<b>527</b>	<b>1015</b>	<b>100.0</b>

表中、aはGNAS1遺伝子による変種である(表3のGS1007参照)。

【0023】それらの配列を比較して527の独立のGS種を選んだ。この527のGS主の中から、DDBJ/GenBank/EMBLデータベースに登録されている遺伝子から、658のGSを代表する263のGS種が導き出された。この263のGS種は新規な遺伝子から導き出された357のGSを代表する。表3及び表4(表3の続き)において、ヒト下垂体に頻繁に現れる遺伝子の頻度

を、ボディーマップデータベースのほかの63の組織のものと比較した。それらの下垂体に対する特異性を、「下垂体TS比」で示す。ヒト下垂体で活性な遺伝子の特徴を決定するために、表2に示すように、これらGS種をその細胞の局在性と下垂体における頻度により、分類した。

【0024】

【表3】

位置／定義	下垂体での 出現数	全て TS比	血液		上皮		#ACC		
			神経	結合組織	複合体				
Extracellular proteins									
Secretory proteins									
Pituitary hormones									
PRL	181	85.53	185	4	0	0	0	0	NM_000948
GH	20	87.42	20	0	0	0	0	0	NM_000515
LH beta	7	87.42	7	0	0	0	0	0	NM_000737
glycoprotein alpha	6	87.42	6	0	0	0	0	0	NM_000735
FSH beta	5	87.42	5	0	0	0	0	0	NM_000510
Other secretory proteins									
B2M	4	0.74	471	20	151	33	218	45	NM_004048
SEPP1	4	6.60	53	6	0	7	29	7	NM_005410
Plasma membrane proteins									
HLA-C	4	2.59	135	7	41	12	55	16	NM_002117
TNFRSF12	3	23.84	11	3	2	0	2	1	NM_003790
Intracellular proteins									
Secretory granule proteins									
CHGB	12	61.71	17	4	0	1	0	0	NM_001819
(NESP55)	(9)	(6.15)	(128)	(32)	(8)	(36)	(29)	(14)	(NM_016592)
CPE	3	5.96	44	30	0	8	0	3	NM_001873
7B2	3	26.23	10	7	0	0	0	0	NM_003020
Nuclear proteins									
RB1	5	33.62	13	1	3	3	1	0	NM_000321
CDC2L1	3	0.66	399	8	27	70	223	68	NM_001787
TB4X	3	0.81	322	72	106	40	64	37	NM_021109
DOC-1	3	4.86	54	21	3	4	13	10	NM_00464
Mitochondrial proteins									
ATP5	3	2.62	100	19	11	39	20	8	NM_001685
Cytoplasmic proteins									
Ribosomal proteins									
Component proteins									
RPS8	6	1.10	477	60	85	78	181	67	NM_001012

【0025】

【表4】

RPS24	5	2.01	218	45	36	39	73	20	NM_001026
RPS20	5	2.99	146	17	32	27	49	16	NM_001023
RPS27A	4	2.13	164	16	43	21	56	24	NM_002954
RPL34	3	1.33	197	39	22	39	73	21	NM_000995
Proteins related to peptide synthesis									
TPT1	6	0.91	577	72	79	113	232	75	NM_003295
NACA	6	2.19	239	58	44	43	63	25	NM_005594
EEF1A1	5	0.67	652	151	145	76	208	67	NM_001402
MAT2A	4	4.32	81	20	16	12	18	11	NM_005911
EIF4G2	3	3.80	69	3	22	14	27	3	NM_001418
Signal transducers									
(Gs-alpha)	(9)	(6.15)	(128)	(32)	(8)	(36)	(29)	(14)	(NM_000516)
(XL-alpha-s)	(9)	(6.15)	(128)	(32)	(8)	(36)	(29)	(14)	(AJ251790)
RALBP1	4	26.90	13	0	2	4	3	0	NM_006788
PBP	3	3.32	79	41	3	8	17	7	NM_002567
ANXA6	3	3.50	75	37	4	24	2	5	NM_001155
PRKACA	3	87.42	3	0	0	0	0	0	NM_002730
Cytoskeletal proteins									
PIN	6	6.81	77	29	4	8	29	1	NM_003746
ACTG1	3	2.02	130	32	12	30	30	23	NM_001614
Others									
ubiquitin C	4	1.75	200	28	37	49	58	24	M26880
PSMB4	3	5.96	44	10	5	9	13	4	NM_002796
PSMB5	3	9.71	27	5	2	7	5	5	NM_002797
Uncharacterized									
PUM1	3	9.37	28	3	1	5	10	6	NM_014676
MLN51	3	12.49	21	4	4	8	0	2	NM_007359
BM-002	3	14.57	18	5	2	4	2	2	NM_016617
galanin-related peptide	3	23.84	11	0	1	0	7	0	NM_015973
KIAA0343	3	29.14	9	6	0	0	0	0	AB002341
KIAA0512	3	65.57	4	1	0	0	0	0	NM_014782
ボディーマップデータベース における各プロファイル の出現数									
	1015	88732	22537	7112	19113	28917	10299		

表中、( )内のタンパク質と数はGNAS1遺伝子の変種を表す。GNAS1遺伝子は3つのプロモーターを有し、その一つは分泌顆粒タンパク質(NESP55)、他の2つはシグナルトランスデューサー(Gs-alpha、XL-alpha-s)である。

【0026】PRL遺伝子は最も活性に発現し、その次はGH遺伝子であった。表に挙げられた下垂体ホルモンの遺伝子の全ては、下垂体で特異的に発現し、ヒト下垂体で最も頻繁に発現した(23.4%、表2)。3番目に多い遺伝子はクロモグラニンB(chromogranin B, CHGB)であった。CHGBは、規制分泌経路に関連する分泌顆粒タンパク質である。他の2つの分泌顆粒タンパク質遺伝子(CPEと7B2)は、下垂体と神経組織で主に発現した。これらの分泌顆粒タンパク質遺伝子は4番目に多く発現するグループに属する(2.3-3.4%、表2)。下垂体と神経組織の両方に特異的な遺伝子に関し

て、既に詳細の分かっている遺伝子の全ては、cAMP依存性触媒的サブユニット(PRKACA)を例外として、下垂体ホルモン又は分泌顆粒タンパク質のいずれかである。従って、下垂体と神経組織で主に発現するその他の詳細のよく分かっていない遺伝子、例えば、KIAA0343やKIAA0512は、制御された分泌経路に関連している可能性がある。

【0027】4番目に多い遺伝子はGNAS1遺伝子である。この遺伝子は、3つの異なるプロモータにより転写された、3つのタンパク質、Gs-、超大Gタンパク質(XL- -s)及びNESP55、を製造する(Kozasa T et al. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 8520 81-2085(1988); Kehlenbach RH et al. Nature 372 804-809(1994); Ischia Ret al. Journal of Biological Chemistry 272 11657-11662(1997)。XL- -s及びN

E S P 5 5 発現は神経内分泌組織に限定されるが、G s - に対する活性は種々の組織で検知され、その活性と不活性の転換は内分泌の異常、例えば、Albright遺伝的骨形成異常(Albright hereditary osteodystrophy) (Patten JL et al. New England Journal of Medicine 322 1412-1419(1990); Weinstein LS, et al. Genomics 13 1319-1321(1992)) やMcCune-Albright症候群 (Schwindinger WF et al. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 89 515 2-5156(1992)) を引き起こす。G s - の活性と一致して、それらの発現は、全体として、ボディーマップデータベースにおいては下垂体と神経組織に限定されていなかった(表3及び4)。その他の頻りに現れる遺伝子のほとんどは、下垂体又は神経組織で特異的に発現せず、従って、これらはハウスキーピング遺伝子と考えられる。リボソーム蛋白遺伝子(9.9%)と核蛋白遺伝子(4.8%)は頻りに発現している。2つの良く用いられる標準である - アクチンやグリセリンアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼはボディーマップデータベースの組織の中では均一又は頻りに発現しないので、これら 20 の遺伝子のいくつかは組織内の発現レベルを比較する際の良い内部標準になる。

【0028】Huらは細菌ヒト下垂体の発現プロファイルを発表した(Hu RM et al. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 97 9543-9548 (2000))。このプロファイルはcDNA sからの70005'-ESTに基づくものであり、その1/3は第1ATGを含む。彼らはそれを視床下部と副腎の発現プロファイルと比較した。我々の観察と一致したことに、GH(成長ホルモン)とPRL(プロラクチン)は分析した全ESTの1%以上で発現した。この他の頻りに現れる公知の表3及び4の遺伝子も彼らのプロファイルで観察されたが、SEPP1、NACA、EIF4G2、TNFRSF12、PBP、ANXA6、PRKACAの遺伝子や、Pumilio homolog 1、MLN51、KIAA0343、KIAA0512などの特性が決定されていないいくつかの遺伝子は観察されなかった。下垂体ホルモンのなかでTSH やPOMCは我々のプロファイルでは現れず、PRLは我々のプロファイルでは10倍多く、FSHは彼らのプロファイルでは現れなかった。これらのプロファイルの質を評価するために、特性が良く決定されている下垂体ホルモンの比較をした。

【0029】TSH(甲状腺刺激ホルモン) cDNA にはMbo I認識配列が欠けているために(Tatsumi K et al. Gene 73 489-497 (1988))、それはGSとしては現れない。我々のプロファイルでPRLが極めて高度に発現することは、特定の内分泌条件によるものではない。その理由は以下の通りである。ここで用いるヒト下垂体ポリ(A)RNAは21人のヒトに由来するものであ

るので、この中の1~2の個人からの組織が、プロラクチノーマや内分泌条件のいずれかの結果、PRLを高度に発現するものであったとしても、この大量のPRLは10倍以上に希釈されるので、我々のプロファイルで用いたPRLを超高度に発現している例外的な個人は全mRNAの100%以上でPRLを発現するという、実際的にはありえない状況になる。POMCが無いことは下垂体前葉においてACTH(副腎皮質刺激ホルモン)の量が少ないことを反映している(Matsuyama H et al. Endocrinology 88 692-695(1971); Moldow R & Yalow RS Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 75 994-998(1978); Ishikawa J et al. Endocrinologia japonica 34 755-767(1977))。以前測定されたFSH とLH の発現レベルは我々のプロファイルと同様の結果を示した(Dalkin AC et al. Endocrinology 125 917-924(1989))。

【0030】我々の方法は他の遺伝子発現プロファイル法に比べて2つの優れた点がある。第1は、単一の組織又は複数の組織から得た遺伝子発現プロファイル法に比べると、63の異なるヒト組織のボディーマップデータベースを現在利用することが可能であり、ボディーマップデータベースにも用いる方法と同じ方法を用いて構成された下垂体発現プロファイルを比較するので組織に特有の転写物の候補を直ちに明らかにすることができる。第2に、ほとんどのGSの長さは1Kb以下で30bp以上であるので、容易に更に分析するためのプローブを用意することができる。実際、この方法は種々の他の組織の組織特有の遺伝子を単離するのに有効であった(Okubo K et al. Genomics 30 178-186(1995); Kita H et al. DNA Research 3 1-7(1996); Nishida K et al. Investigative Ophthalmology & Visual Science 37 1800-1809(1996)); Yokoyama M et al. DNA Research 3 311-320(1996); Shimizu-Matsumoto A et al. Investigative Ophthalmology & Visual Science 38 2576-2585(1997)); Itoh K et al. Blood 92 1432-1441(1998))。そこで我々は、他の方法や他の生物で得られる他の遺伝子発現プロファイルの更なる分析が必要ではあるが、我々の方法は信頼性のあるものであると結論した。

【0031】ヒト下垂体特有遺伝子発現プロファイル 下垂体で重要な役割を果たすかもしれない遺伝子を特定するために、我々は下垂体で頻りにかつ特異的に発現しているGS種を選択した(表5)。11のGS種の中で8は公知の遺伝子であった。この中の5つ(PRL, GH, LH, 糖蛋白アルファ, FSH)は下垂体前葉ホルモンであり、2つ(CHGB, PRKACA)は内分泌組織に特有であり、残りの1つ(KIAA0512)はその特性が決定されていないものであった。

【表5】

GS種	定義	下垂体における出現数	発現分析
9703	PRL	181	
9496	GHI	20	
7687	CHGB	12	
9512	glycoprotein alpha	7	
9535	LH beta	6	
9544	PGSF1a*	6	ps
	PGSF1b*		ps
9504	FSH beta	5	
9651		4	
9589	PGSF2*	3	ps
9606	PRKACA	3	
9573	KIAA0512	3	ppd

表中、psは下垂体特異的(pituitary-specific)、ppdは下垂体に顕著に特異的(pituitary-predominant)を表す。

【0032】ヒト下垂体cDNAライブラリーをGS配列でスクリーニングすることにより、GS9544、GS9589及びGS9651のcDNAクローンが得られた。GS9651はヒトゲノムドラフト配列中のユニークな配列であったが(International Human Genome Sequencing Consortium 2001, Venter et al 2001, Nature 409 860-921(2001))、cDNAクローンのスクリーニングは不成功であった。ノーザンハイブリダイゼーションによれば、GS9544とGS9589は下垂体特有であり、GS9573(KIAA0512)は下垂体で最も際立つものであった。

#### 【0033】新規な下垂体特有転写物のキャラクタリゼーション

GS9544について、ヒト下垂体cDNAライブラリーから0.7kbと0.9kbの2つの分離した異変株が単離された。それらは2つのタンパク質、即ち、128アミノ酸から成る下垂体特異的遺伝子1a(PGSF1a)と91アミノ酸から成る下垂体特異的遺伝子1b(PGSF1b)をコードしていると推定された(図1、図2)。ヒトゲノムドラフト配列のBLASTサーチにより、これらPGSF1が19染色体に存在するものであることがわかった(ACC#NT\_011255)(International Human Genome Sequencing Consortium 2001, Nature 409 860-921(2001))。ESTデータベースにおいて、ランゲルハンス島cDNAライブラリーからの単部分ヒトcDNAは、他のスプライス変種を表していた(ACC#AW583046)(図1)。この2つのPGSF1(PGSF1aとPGSF1b)のためのcDNAプローブは、多組織ノーザンハイブリダイゼーションにおいて約1kbの下垂体(Pituitary)転写物と

強くハイブリダイズし、約1.4kbのすい臓(Pancreas)転写物と弱くハイブリダイズした(図3)。これらは恐らく下垂体に特異的に発現する内分泌特有の転写物である。これらは、ヒト下垂体の遺伝子発現プロファイルの中の最も多いもののひとつである分泌顆粒に関連したタンパク質である可能性がある。これらPGSF1はダイズ(soybean)のnodulin 26B-カルボキシ末端ドメインと51アミノ酸以内で33%の相同性がある(Jacobs FA et al. Nucleic Acids Research 15 1271-1280(1987))(図4)。nodulinはダイズ根結節の細菌状膜に関連するタンパク質であり、このカルボキシ末端ドメインはその結節の細胞質部分に存在する。このドメインの機能は未だ特定されていないが(Panter S et al. Molecular Plant-Microbe Interactions 13 325-333(2000))、このドメインがヒトとダイズの間で保持されているという事実は、それが新規な機能を有するというを示す。

【0034】GS9589の全長cDNAは2kbの長さであり、242アミノ酸から成るPGSF2タンパク質をコードすると推定される。BLASTサーチにより、このcDNAの5'-0.8kbが、1(IGDC1)を含む免疫グロブリン(Ig)様ドメインのエクソン1-5と同一であって(Frattini A et al. Gene 214 1-6(1998))、それが最近特定されたラットインヒピン結合タンパク質の短いスプライス産物であるInhBP-Sに対するヒトの相同蛋白であることが明らかになった(Bernard DJ & Woodruff TK, Molecular Endocrinology 15 654-667(2001))(図5, 6)。このIGDC1タンパク質はN-末端単一ペプチド、12のIg様ドメイン及びC-末端膜貫通ドメインから成る。PGSF2はIGDC1のスプライス異型であり、恐らく分泌される。PGSF2用の3'-プロ

ープは、多組織ノーザンハイブリダイゼーションにより約2 kbの下垂体 (Pituitary) に特有の転写物とハイブリダイズする(図7)。この3'-プローブは下垂体に特有の転写物とハイブリダイズするが、5'-プローブはそれぞれPGSF2及びIGDC1をコードする2 kbバンド及びそれより長いバンドとハイブリダイズする(図7)。InhBPの長いスプライス産物であるInhBP-LはIGDC1の相同蛋白でインヒピンA特有のレセプターであると特定された (Bernard DJ & Woodruff TK, Molecular Endocrinology 15 654-667(2001))。InhBP-SとInhBP-L mRNAはラット下垂体及び精巣で特異的に検出され (Bernard DJ & Woodruff TK, Molecular Endocrinology 15 654-667(2001))、IGDC1 mRNAはヒト精巣及び前立腺で特異的に検出され (Frattini A et al. Gene 214 1-6(1998))、PGSF2/InhBP-SとIGDC1/InhBP-Lの双方ともヒト及びラットの分泌顆粒を有する組織で特異的に発現される。ヒトゲノムドラフト配列に対するBLASTサーチにより、PGSF2が染色体Xのq25-26.2領域に位置することがわかった。Xに結合した劣性下垂体機能不全矮小発育症の遺伝子はこの領域に存在する (Lagerstrom-Fermer M et al. American Journal of Human Genetics 60 910-916(1997))。もしPGSF2がこの病気に関連しているのであれば、それは下垂体の発育と機能に関係しているであろう。

【0035】GS9573の全長cDNAは、5'-非コード領域に44 bpの挿入部分を有している以外は、KIAA0512をコードするcDNAに一致している。KIAA0512は632アミノ酸から成るタンパク質をコードすると推定され、アルマジロノ -カテニン様繰り返しモチーフを有しており、下垂体タンパク質 (ACC#AF211175) と307アミノ酸以内で61%の相同性を有する。多組織ノーザンハイブリダイゼーションによれば、KIAA0512は、試験した全ての組織において、3.2 kbと4.5 kbの転写物として発現された。その発現レベルは異なるが、下垂体 (Pituitary) と心臓 (Heart) において最も強く発現した (図8)。この下垂体タンパク質 (ACC#AF21117 \*

\*5) は赤血球以外で発現する - スペクトリンにインビボで結合する。スペクトリンファミリーは膜又はゴルジ体に接続して存在する構造タンパク質であるので、KIAA0512タンパク質はスペクトリン又は他のスペクトリン結合タンパク質(例えば、アンキリン、アクチン又はバンド4.1)と複合体を形成している可能性があり、小包の輸送に関わる可能性がある。

【0036】以上の結果、ヒト下垂体の発現プロファイル及びその他の組織の発現プロファイルとの比較から、ヒト下垂体に特有に発現する遺伝子を単離することができた。GSの数を増やせば、少量の下垂体特異的遺伝子を特定することもできる。今回の実験で、ヒト下垂体に特異的に発現する2つのGSから、3つの特異的転写物を得た。最近開発されたオリゴヌクレオチドに基づくPCRを介した多組織定量的発現分析法 (Heid CA et al. Genome Research 6 986-994(1996); Kato K, Nucleic Acid s Research 25 4694-4696(1997); Hall LL et al. Biot echniques 24 652-658(1998); Kawamoto S et al. Geno me Research 9 1305-1312(1999)) を用いることにより、将来はより容易に下垂体に特異的な遺伝子を選択することができるであろう。これらの遺伝子は、先天的下垂体異常やリンパ球性下垂体炎の自己抗原のような下垂体の病気に有効な治療手段をもたらすであろう。

【0037】実施例2

本実施例では、ラジオリガンドアッセイ (RLA) により、慢性関節リウマチ患者血清中に存在する下垂体特異的蛋白PGSF1aに対する自己抗体価を検討した。慢性関節リウマチ患者における自己抗体の同定にはこれまで変性IgGに対する抗体を検出するリウマチ因子が主に用いられてきたが、リウマチ因子は慢性関節リウマチの早期では陽性率が低く、非特異的な疾患でも陽性になるという問題があった。最近になって、cDNA があれば立体構造を保持したまま抗原として用いることができ、立体構造認識抗体をも検出できる RLA が開発された。本実施例で用いた患者検体を表6に示す。

【表6】

疾患名	症例数	男性/女	年齢 (平均値 ± SD)
慢性関節リウマチ	41		
リウマチ因子 (RF) 陽性	37	1/36	53.9 ± 13.4
RF 陰性	4	0/4	48.8 ± 2.5
変形性関節症	10	1/9	69.0 ± 13.7
自己免疫性下垂体疾患と関連疾患	34	14/18	50.5 ± 11.9
ラジオリガンドアッセイ	14		
MCTD	8	0/8	45.4 ± 10.1

【0038】本実施例では下記の方法を用いた。  
 ラジオリガンドアッセイ  
 1. 転写翻訳システム (TNT coupled in vitro transcription / translation system, Promega) に PGSF1a を発 50  
 5.0  
 0.1

現用プラスミドと 35S-methionine を加えて 30 90 分反応させた。37.8 ± 5.0  
 2. 反応後、35S-GH の分画をカラムを使って分離した。 5.0  
 3. Reaction buffer (NaCl 150mmol/L, Tris 50mmol/L,

pH 7.4, Tween-20 1ml/L, bovine serum albumin 4g/L, and NaN3 1g/L) で 35S-PGSF1a を 2万cpm / 20μl に希釈した。

4. 血清 4μl を Reaction buffer (上記と同様) 26μl で希釈し 35S-GH 20μlと混ぜて 4 で一晩反応。96-well filter plate (Millipore) をBlockingbuffer (NaCl 150mmol/L, Tris 50mmol/L, pH 7.4, Tween-20 1ml/L, bovine serum albumin 30g/L, and NaN3 1g/L) にて室温で 3 時間半及び 4 で一晩ブロッキングした。

5. Protein G Sepharose (Amersham) を 4 で一時間 Blocking buffer (上記と同様) にてブロッキングした。

6. 4 の「血清 / 35S-PGSF1a」混合物をブロッキングが終わった 96-well filter plate に移し、5 の Protein G Sepharose を 10 μl 混ぜて室温で 45 分反応させた。

【0039】7. 96-well filtration system (Millipore)を用いて Wash buffer (NaCl 150mmol/L, Tris 50mmol/L, pH 7.4, Tween-20 10 ml/L) で 6 の反応物を 10 回洗浄した。

\*8. 液体シンチレーターを加え、counter (Micro Beta, Amersham)で 35S-PGSF1a / 抗体 / Protein G 複合体を測定した。

9. 得られたカウントをもとに次の指標で精度を検討した。

anti-PGSF1a Ab index (unit) = the count of unknown sample (cpm) / the count of NPS (cpm)

組換えPGSF1aは以下のようにして作製した。即ち、大腸菌での組換えタンパク質発現システム (pET expression system, Novagen) でHis tag付き PGSF1a を発現させ、TALON Metal Affinity Resins (CLONTECH)のアフィニティカラムで精製した。抑制試験は以下のように行った。陽性検体の希釈時に 1μg の recombinant PGSF1a または ovalbumin (negative control) を加えて反応させた。

【0040】結果を以下に示す。Assay 内変動誤差は、3.1 % (n = 6)、Assay 間変動誤差は、3.3 % (n = 4)であった。血清中の抗 PGSF1a 抗体陽性の頻度を表7に示す。

【表7】

疾患名	症例数	陽性数 (陽性率)
慢性関節リウマチ	41	
RF 陽性	37	31 (83.8%)
RF 陰性	4	3 (75.0%)
変形性関節症	10	2 (20.0%)
自己免疫性下垂体疾患と関連疾患	34	3 (8.8%)

【0041】これらの陽性検体の特異性を調べるため、大腸菌で発現させた recombinant human PGSF1a による競合試験を行った。陽性検体は recombinant human PGSF1aにより抑制され (図9)、ovalbuminでは抑制されず (図10)、PGSF1a特異的であった。今回の試験では、慢性関節リウマチ患者血清中に抗 PGSF1a 抗体が約 8割の頻度で認められた。健康人 36 例中には認めず、類

縁疾患の変形性関節症では20.0%、自己免疫疾患では0-12.5%と陽性率は有意に低く、特に、RF 陰性例の慢性関節リウマチ患者でも高頻度で陽性であったので、RFの測定と同等かそれ以上に慢性関節リウマチ患者の補助的診断に有効であると考えられる。

【30042】 0

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> 下垂体特異的遺伝子の使用方法

<130> PS02-1103

<160> 26

<210> 1

<211> 696

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

acctgcatct gccacaaga ctggaagcag gtga  
ggcaca cagaggggga ggcccgcagc 60  
tgcgtagggag gaggggtgt ctgagggacg tggg  
atgccg ggaatgaggc tggtttcag 120

gttggcgcac ggacattttc ccagaaaggg acag  
 agacgg cgaagtttga cggctctgaa 180  
 agcagagacc agcagggctg actgcttggg agca  
 ccaaat atccggacag cgcctctcgg 240  
 gaggtccgag aagagaaccg cgatctgttt cagc  
 accggg gctcaggaca gttcccagcg 300  
 ggctccgttt cgtctccaga accctggaca gctc  
 ctccag cttggaatgc actccctcca 360  
 cctccacca gagctcccca caactgacct tgcc  
 ttcttc tgcaagctcc atttcatcaa 420  
 gggaaacgat cttattgcc tcaccatttc ccac  
 gtgaag tctgtattga cattctcata 480  
 gacctgggat attgtgtctg cagcacatag tcca  
 attatt ttcatgttat ctaactgacag 540  
 gtctatttgt ctccctgtta cactgtgagc tccg  
 tgaggg cagaacaat gtagtatttt 600  
 tcaactgtgt gtcccagcg cctggtccgg ggcc  
 cggcac acagcaggca tataataagc 660  
 atgtgttgaa tcaataaagg catcaaagaa taaa  
 cc 696

<210> 2

<211> 865

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

acctgcatct gccacaaga ctggaagcag gtga  
 ggcaca cagaggggga ggcccagc 60  
 tgcgtgggag gaggggtgt ctgaggacg tggg  
 atgccg ggaatgaggc tggtttgac 120  
 gttggcgcac ggacattttc ccagaaaggg acag  
 agacgg cgaagtttga cggctctgaa 180  
 agcagagacc agcagggctg actgcttggg agca  
 ccaaat atccggacag cgcctctcgg 240  
 gaggtccgag aagagaaccg cgatctgttt cagc  
 accggg gctcaggaca gttcccagcg 300  
 ggctccgttt cgtctccaga accctggaca gctc  
 ctccag cctccaaag tgctaggatt 360  
 acaggcgtga gtcaactgac ctggccaag tccg  
 gaattt tcaacaggac atgggtgtta 420  
 ctgtgccat gtgacatttg ggaaccca ggcc  
 ctgaga aaggcagaaa aataaccac 480  
 gcagggactc tcagcccaca agtgaagctc ttgg  
 aatgca ctccctccac ctccaccag 540  
 agctcccccac aactgaccct gccttcttct gcaa  
 gctcca tttcatcaag gaaacgatc 600  
 cttattgcct caccatttcc cacgtgaagt ctgt  
 attgac atttcatag acctgggata 660  
 ttgtgtctgc agcacatag ccaattattt tcat  
 gttatc tactgacagg tctatttgc 720  
 tccctgttac actgtgagct ccgtgagggc agaa  
 acaatg ttagtatttt cactgctgtg 780  
 tcccagcgc ctggtccggg gcccgccaca cagc  
 aggcac ataataagca tigtgtgaat 840



gtgggtgga attctaggac caacactcct gtgg  
agacgt ggaagggtc caaaggcaaa 1740  
cagtcctata cctacatcat tgaggagaac acta  
ccacga gcttcacctg ggccttcag 1800  
aggaccactt ttcattgaggc aagcaggaag taca  
ccaatg acgttgccaa gatctactcc 1860  
atcaatgtca ccaatggtt gaatggcgtg gcct  
cctact gccgtccctg tgccttagaa 1920  
gcctctgatg tgggtcctc ctgcacctct tgtc  
ctgctg gttactatat tgaccgagat 1980  
tcaggaacct gccactcctg cccccctaac acaa  
ttctga aagcccacca gccttatggt 2040  
gtccaggcct gtgtgccctg tgggccagg acca  
agaaca acaagatcca ctctctgtgc 2100  
tacaatgatt gcaccttctc acgcaacact ccaa  
ccagga ctttcaacta caacttctcc 2160  
gctttggcaa acaccgtcac tcttgctgga gggc  
caagct tcaacttcaa agggttgaaa 2220  
tacttccatc actttaccct cagtctctgt ggaa  
accagg gtaggaaaat gtctgtgtgc 2280  
accgacaatg tcaactgacct ccggattcct gagg  
gtgagt cagggttctc caaatctatc 2340  
acagcctacg tctgccaggc agtcatcatc cccc  
cagagg tgacaggcta caaggccggg 2400  
gtttcctcac agcctgtcag ccttgctgat cgac  
ttattg gggtgacaac agatatgact 2460  
ctggatggaa tcacctcccc agctgaactt ttcc  
acctgg agtccttggg aataccggac 2520  
gtgatcttct tttataggtc caatgatgtg accc  
agtctt gcagttctgg gagatcaacc 2580  
acttctcgcg tcaggtgcag tccacagaaa actg  
ctctctgctc agtttctgct gctgccagga 2640  
acttctcgcg atgggacctg tgatggctgc aact  
ctctctcgcg aggttctgag gagcgcggct 2700  
gcttctcgcg tctgctcagt ggctgactac catg  
acttctcgcg aggttctgag gagcgcggct 2760 Arg Leu  
Atacttctcgcg aggttctgag gagcgcggct 2820 10  
acttctcgcg aggttctgag gagcgcggct 2880  
acttctcgcg aggttctgag gagcgcggct 30  
acttctcgcg aggttctgag gagcgcggct 3000 45  
acttctcgcg aggttctgag gagcgcggct 3060  
acttctcgcg aggttctgag gagcgcggct 60  
acttctcgcg aggttctgag gagcgcggct 75  
acttctcgcg aggttctgag gagcgcggct 80  
acttctcgcg aggttctgag gagcgcggct 3180 75  
acttctcgcg aggttctgag gagcgcggct 3240 80  
acttctcgcg aggttctgag gagcgcggct 3300

【 0 0 4 4 】

15

30

45

60

75

80

【0045】

	125	120	125	
<210> 6				
<211> 91				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 6				
Met Pro Gly Met Arg Leu Val Cys Arg Leu				
Ala His Gly His Phe Pro				
	5	10	15	
Arg Lys Gly Gln Arg Arg Arg Ser Leu Thr				
Val Trp Lys Ala Glu Thr				
	20	25	30	
Ser Arg Ala Asp Cys Leu Gly Ala Pro Asn				
Ile Arg Thr Ala Pro Leu				
	35	40	45	
Gly Arg Ser Glu Lys Arg Thr Ala Ile Cys				
Phe Ser Thr Gly Ala Gln				
	50	55	60	
Asp Ser Ser Gln Arg Ala Pro Phe Arg Leu				
Gln Asn Pro Gly Gln Leu				
	65	70	75	80
Leu Gln Pro Pro Lys Val Leu Gly Leu Gln				
Ala				
	85	90		
<210> 7				
<211> 242				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 7				
Met Thr Leu Asp Arg Pro Gly Glu Gly Ala				
Thr Met Leu Lys Thr Phe				
	5	10	15	
Thr Val Leu Leu Phe Cys Ile Arg Met Ser				
Leu Gly Met Thr Ser Ile				
	20	25	30	
Val Met Asp Pro Gln Pro Glu Leu Trp Ile				
Glu Ser Asn Tyr Pro Gln				
	35	40	45	
Ala Pro Trp Glu Asn Ile Thr Leu Trp Cys				
Arg Ser Pro Ser Arg Ile				
	50	55	60	
Ser Ser Lys Phe Leu Leu Leu Lys Asp Lys				
Thr Gln Met Thr Trp Ile				
	65	70	75	80
Arg Pro Ser His Lys Thr Phe Gln Val Ser				
Phe Leu Ile Gly Ala Leu				
	85	90	95	
Thr Glu Ser Asn Ala Gly Leu Tyr Arg Cys				
Cys Tyr Trp Lys Glu Thr				
	100	105	110	
Gly Trp Ser Lys Pro Ser Lys Val Leu Glu				
Leu Glu Ala Pro Gly Gln				

【 0 0 4 6 】

Leu Trp Ser Glu Pro Ser Asn Pro Leu Lys  
 Leu Val Val Ala Gly Gly  
 210 215 220  
 Cys Gly Tyr Gly Cys Trp His Leu Ala Ile  
 Val Val Phe Gly Ile Met  
 225 230 235 2  
 <210> 8  
 <211> Gly013  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8  
 Met Ala Glu Pro Gly His Ser His His Leu  
 Ser Ala Arg Val Arg Gly  
 5 10 15  
 Arg Thr Glu Arg Arg Ile Pro Arg Leu Trp  
 Arg Leu Leu Leu Trp Ala  
 20 25 30  
 Gly Thr Ala Phe Gln Val Thr Gln Gly Thr  
 Gly Pro Glu Leu His Ala  
 35 40 45  
 Cys Lys Glu Ser Glu Tyr His Tyr Glu Tyr  
 Thr Ala Cys Asp Ser Thr  
 50 55 60  
 Gly Ser Arg Trp Arg Val Ala Val Pro His  
 Thr Pro Gly Leu Cys Thr  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Pro Asp Pro Val Lys Gly Thr Glu  
 Cys Ser Phe Ser Cys Asn  
 85 90 95  
 Ala Gly Glu Phe Leu Asp Met Lys Asp Gln  
 Ser Cys Lys Pro Cys Ala  
 100 105 110  
 Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Gly Thr Gly Ile  
 Arg Phe Asp Glu Trp Asp  
 115 120 125  
 Glu Leu Pro His Gly Phe Ala Ser Leu Ser  
 Ala Asn Met Glu Leu Asp  
 130 135 140  
 Asp Ser Ala Ala Glu Ser Thr Gly Asn Cys  
 Thr Ser Ser Lys Trp Val  
 145 150 155 1  
 60  
 Pro Arg Gly Asp Tyr Ile Ala Ser Asn Thr  
 Asp Glu Cys Thr Ala Thr  
 165 170 175  
 Leu Met Tyr Ala Val Asn Leu Lys Gln Ser  
 Gly Thr Val Asn Phe Glu  
 180 185 190  
 Tyr Tyr Tyr Pro Asp Ser Ser Ile Ile Phe  
 Glu Phe Phe Val Gln Asn  
 195 200 205  
 Asp Gln Cys Gln Pro Asn Ala Asp Asp Ser  
 Arg Trp Met Lys Thr Thr

305                    310                    315                    3  
 20  
 Ser Ser Ser Cys Asn Val Arg Pro Ala Cys  
 Thr Asp Lys Asp Tyr Phe  
                          325                    330                    335  
 Tyr Thr His Thr Ala Cys Asp Ala Asn Gly  
 Glu Thr Gln Leu Met Tyr  
                          340                    345                    350  
 Lys Trp Ala Lys Pro Lys Ile Cys Ser Glu  
 Asp Leu Glu Gly Ala Val  
                          355                    360                    365  
 Lys Leu Pro Ala Ser Gly Val Lys Thr His  
 Cys Pro Pro Cys Asn Pro  
                          370                    375                    380  
 Gly Phe Phe Lys Thr Asn Asn Ser Thr Tyr  
 Gln Pro Cys Pro Tyr Gly  
 385                    390                    395                    4  
 00  
 Ser Tyr Ser Asn Gly Ser Asp Cys Thr Arg  
 Cys Pro Ala Gly Thr Glu  
                          405                    410                    415  
 Pro Ala Val Gly Phe Glu Tyr Lys Trp Trp  
 Asn Thr Leu Pro Thr Asn  
                          420                    425                    430  
 Met Glu Thr Thr Val Leu Ser Gly Ile Asn  
 Phe Glu Tyr Lys Gly Met  
                          435                    440                    445  
 Thr Gly Trp Glu Val Ala Gly Asp His Ile  
 Tyr Thr Ala Ala Gly Ala  
                          450                    455                    460  
 Ser Asp Asn Asp Phe Met Ile Leu Thr Leu  
 Val Val Pro Gly Phe Arg  
 465                    470                    475                    4  
 80  
 Pro Pro Gln Ser Val Met Ala Asp Thr Glu  
 Asn Lys Glu Val Ala Arg  
                          485                    490                    495  
 Ile Thr Phe Val Phe Glu Thr Leu Cys Ser  
 Val Asn Cys Glu Leu Tyr  
                          500                    505                    510  
 Phe Met Val Gly Val Asn Ser Arg Thr Asn  
 Thr Pro Val Glu Thr Trp  
                          515                    520                    525  
 Lys Gly Ser Lys Gly Lys Gln Ser Tyr Thr  
 Tyr Ile Ile Glu Glu Asn  
                          530                    535                    540  
 Thr Thr Thr Ser Phe Thr Trp Ala Phe Gln  
 Arg Thr Thr Phe His Glu  
 545                    550                    555                    5  
 60  
 Ala Ser Arg Lys Tyr Thr Asn Asp Val Ala  
 Lys Ile Tyr Ser Ile Asn  
                          565                    570                    575



<400> 10  
tcagaccacc ctctctcgtc c  
21

<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 11  
gcctcagcct cccgagtatc  
20

<210> 12  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 12  
cgtcagagac atgggatttg gagt  
24

<210> 13  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 13  
ccaattctct gcaacaccct aatc  
24

<210> 14  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 14  
ctttgatgcc tttattgatt caacac  
26

<210> 15  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 15  
ctaatacgac tcaactatagg gctcagcgg ccgc  
ccgggc aggt 44

<210> 16  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 16  
ctcagaccac ccctcctccc acgca  
25

<210> 17  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 17  
tgtctcttc cagtagcagc accggtaaa  
28

<210> 18



ド領域と非コード領域を表す。黒塗り四角はダイズnodulinファミリーに保存された領域を示す(図4参照)。AW583046は、エクソン2でのスプライスが異なり、下垂体ORFにフレームシフトをもたらす53bp挿入部分を有している。

【図2】PGSF1のアミノ酸配列アラインメントを示す図である。

【図3】PGSF1とアクチンの多組織ノーザンハイブリダイゼーションを示す図である。

【図4】PGSF1とダイズnodulinファミリーのアミノ酸配列アラインメントを示す図である。PGSF1に一致するアミノ酸を黒で示す。N02B\_SOYBNIはダイズnodulin26Bを表し、N023\_SOYBNIはダイズnodulin23を表し、N044\_SOYBNIはダイズnodulin44を表す。

【図5】PGSF2とIGDC1の構造を示す図である。背の高い四角と背の低い四角はそれぞれ蛋白コード領域と非コー\*

\*ド領域を表す。影付きのものは異なるヌクレオチド配列を示す。シグナルペプチド、Ig様領域、膜貫通領域(TMs)、及びノーザンハイブリダイゼーションで用いたプローブを示す。

【図6】PGSF21、GDC1及びInhBP-sのアミノ酸配列アラインメントを示す図である。一致するアミノ酸を黒で示す。

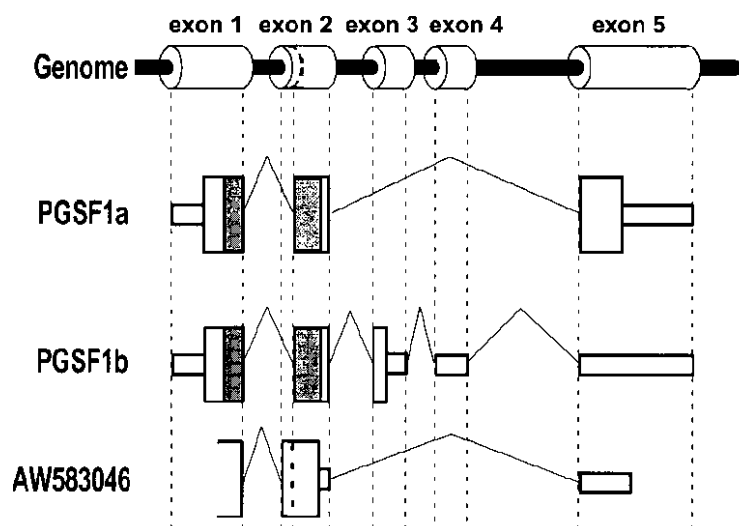
【図7】PGSF2の3'-プローブ及び5'-プローブを用いた多組織ノーザンハイブリダイゼーションを示す図である。

【図8】K1AA0512の多組織ノーザンハイブリダイゼーションを示す図である。

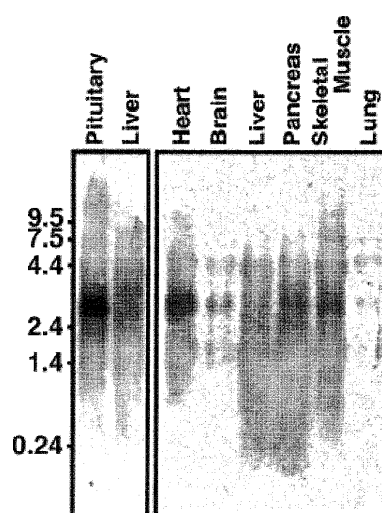
【図9】陽性検体における組換えヒトPGSF1aによる抑制効果を示す図である。

【図10】陽性及び陰性検体における組換えヒトPGSF1aによる抑制効果を示す図である。

【図1】



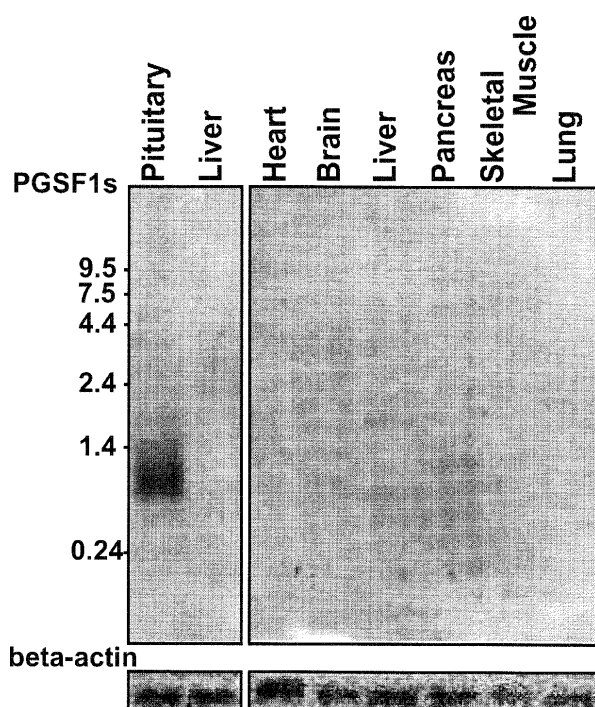
【図8】



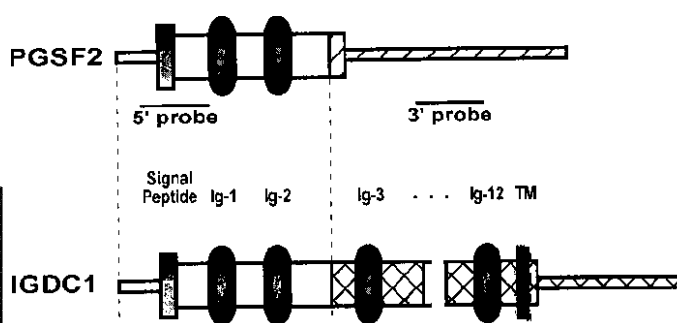
【図2】

PGSF1a	1	MPGMRLVCR <sup>●</sup> LAHG <sup>●</sup> HFP <sup>●</sup> RK <sup>●</sup> GQ <sup>●</sup> RR <sup>●</sup> SL <sup>●</sup> TV <sup>●</sup> WKA <sup>●</sup> ETS <sup>●</sup> RAD <sup>●</sup> CLG <sup>●</sup> AP <sup>●</sup> NI <sup>●</sup> RT <sup>●</sup> AP <sup>●</sup> LGR <sup>●</sup> SE <sup>●</sup> KRT <sup>●</sup> AIC <sup>●</sup> FST <sup>●</sup> G <sup>●</sup> AQ <sup>●</sup> D
PGSF1b	1	MPGMRLVCR <sup>●</sup> LAHG <sup>●</sup> HFP <sup>●</sup> RK <sup>●</sup> GQ <sup>●</sup> RR <sup>●</sup> SL <sup>●</sup> TV <sup>●</sup> WKA <sup>●</sup> ETS <sup>●</sup> RAD <sup>●</sup> CLG <sup>●</sup> AP <sup>●</sup> NI <sup>●</sup> RT <sup>●</sup> AP <sup>●</sup> LGR <sup>●</sup> SE <sup>●</sup> KRT <sup>●</sup> AIC <sup>●</sup> FST <sup>●</sup> G <sup>●</sup> AQ <sup>●</sup> D
PGSF1a	66	SSQRAPFRLQ <sup>●</sup> NP <sup>●</sup> GQL <sup>●</sup> LQ <sup>●</sup> LG <sup>●</sup> MBS <sup>●</sup> LH <sup>●</sup> LE <sup>●</sup> PE <sup>●</sup> LPT <sup>●</sup> DP <sup>●</sup> AF <sup>●</sup> CK <sup>●</sup> LH <sup>●</sup> FI <sup>●</sup> KGN <sup>●</sup> DPY <sup>●</sup> CL <sup>●</sup> TIS <sup>●</sup> HV <sup>●</sup> KSV <sup>●</sup> LT <sup>●</sup> FS
PGSF1b	66	SSQRAPFRLQ <sup>●</sup> NP <sup>●</sup> GQL <sup>●</sup> LQ <sup>●</sup> PP <sup>●</sup> KV <sup>●</sup> LGL <sup>●</sup> QA

【図3】



【図5】



【図4】

```

PGSF1a,b 20 QRRSITVWKAETSRADECLCAPNITAFVGRSEK--RTAICFSTGAQDSSQRAPF
NO2B_SOYBN 158 QFRIVLRTCLESART-CLNAPNVATSELGRLSHSIHESCVYPSGAESGTGSLPI
NO23_SOYBN 168 QLRTAIRTCTHTVART-CLTAPNVATSILEACLTPSMNQCIYPRGAEY--GSPPI
NO44_SOYBN 309 QLRTVIGICSHVTART-CLTAPNVATSILEACLTPSMNQCVYPPGAES--GSPPI
  
```

【図6】

```

PGSF2 1 MFLDRPGEATMLKTFVLLFCIRMSLGMTSIVMDP-QPELWIESNYFQAPWENITLWCR
human IGDC1 1 MFLDRPGEATMLKTFVLLFCIRMSLGMTSIVMDP-QPELWIESNYFQAPWENITLWCR
rat InhBP-s 1 MFLDRPGEATMLKTFVLLFCIRMSLGMTSIVMDP-QPELWIESNYFQAPWENITLWCR

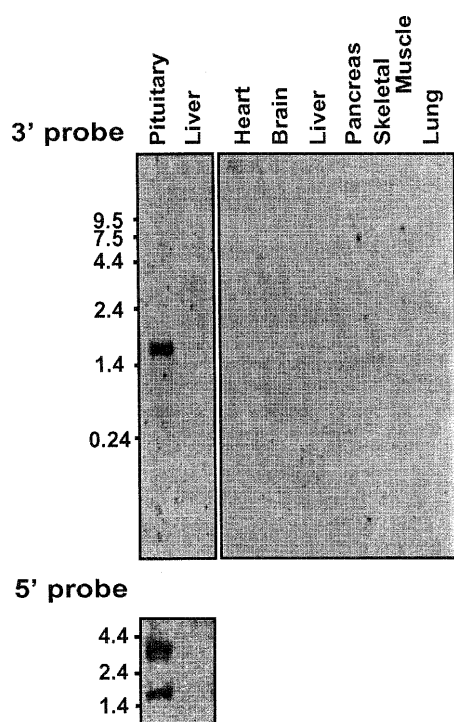
PGSF2 60 SPSRISSEKFLLLKDKTQMTWIRPSHKTFOVSFLIGALTESNAGLYRCCYWKETGWSKPSK
human IGDC1 60 SPSRISSEKFLLLKDKTQMTWIRPSHKTFOVSFLIGALTESNAGLYRCCYWKETGWSKPSK
rat InhBP-s 51 SPSRISSEKFLLLKDKTQMTWIRPSHKTFOVSFLIGALTESNAGLYRCCYWKETGWSKPSK

PGSF2 120 VLELEAPGQLPKPIFWIQAETPALPGCNVNILCHGWLQDLVFMFLFREGYAEFVDYQVPTG
human IGDC1 120 VLELEAPGQLPKPIFWIQAETPALPGCNVNILCHGWLQDLVFMFLFREGYAEFVDYQVPTG
rat InhBP-s 111 VLELEAPGQLPKPIFWIQAETPALPGCNVNILCHGWLQDLVFMFLFREGYAEFVDYQVPTG

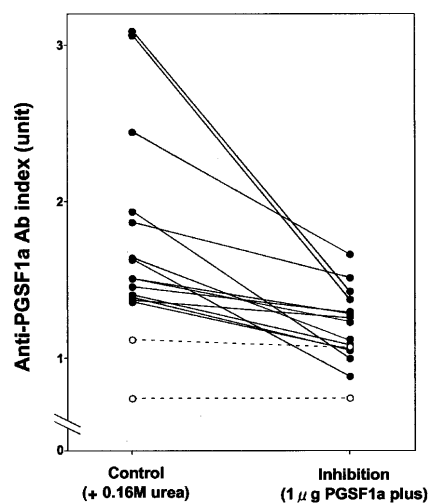
PGSF2 180 TMAIFSIDNLTPEDEGVYICRTHIQMLPTLWSEPSNPLKLVVAGGCGYGCWHLAIVPGI
human IGDC1 180 TMAIFSIDNLTPEDEGVYICRTHIQMLPTLWSEPSNPLKLVVAGGCGYGCWHLAIVPGI
rat InhBP-s 171 TMAIFSIDNLTPEDEGVYICRTHIQMLPTLWSEPSNPLKLVVAGGCGYGCWHLAIVPGI

PGSF2 240 MAG
human IGDC1 240 PGKSLNLRQGGPIYGMTFALMRVDELEKSFYHKKTIKNEANFFQSLKIQDTGHYLCFYY
rat InhBP-s 231 MAG
  
```

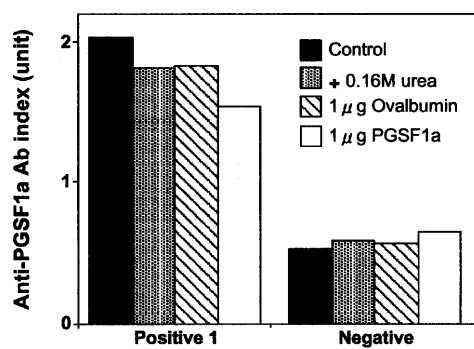
【図7】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

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

識別記号

F I

テ-マコード<sup>\*</sup> (参考)

A 6 1 P 5/10  
19/02  
C 1 2 N 15/09  
C 1 2 Q 1/68  
G 0 1 N 33/53

A 6 1 P 19/02  
C 1 2 Q 1/68  
G 0 1 N 33/53  
C 1 2 N 15/00  
A 6 1 K 37/02

A  
D  
A

(72)発明者 大久保 公策

大阪府箕面市瀬川2-11-26

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 HA14 HA17  
4B063 QA19 QQ03 QQ43 QR08 QR55  
QR62 QS25 QS34  
4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA20  
BA21 BA22 BA23 CA18 CA28  
DC50 NA14 ZA962 ZC012  
4C085 AA13 BB11 CC28  
4C086 AA01 AA02 EA16 NA14 ZA96  
ZC01

专利名称(译)	如何使用垂体特异性基因		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003252801A</a>	公开(公告)日	2003-09-10
申请号	JP2002051022	申请日	2002-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	科学技术振兴事业团		
[标]发明人	巽圭太 田中進 網野信行 大久保公策		
发明人	巽 圭太 田中 進 網野 信行 大久保 公策		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P5/06 A61P5/10 A61P19/02 A61P43/00 C07K14/47 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/68 G01N33/68		
CPC分类号	A61K31/7088 A61K48/00 A61P5/06 A61P5/10 A61P19/02 A61P43/00 C07K14/47 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/6893		
FI分类号	A61K48/00 A61K31/7088.ZNA A61K39/395.D A61P5/06 A61P5/10 A61P19/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D C12N15/00.A A61K37/02 A61K38/00 A61K38/16 A61K38/17 C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/CA28 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA962 4C084/ZC012 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/CC28 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA96 4C086/ZC01		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

在垂体中特异性表达的基因和氨基酸。 本发明人通过研究在人垂体中活跃表达的基因，鉴定了在人垂体组织中大量表达的基因，并且在人垂体中鉴定了SEQ ID NO：1-4的基因。发现被明确表达。此外，基于这样的发现，发现了有效利用这些基因和蛋白质的方法。本发明是SEQ ID NO：1至4的核苷酸序列中的任何一个或其一部分在对人垂体的测试或对人垂体相关疾病的治疗中的用途。

位置	(7) 12 GS種	GSs	特開 2 0 0 頻度 (%)
<b>I. Known genes</b>	<b>263</b>	<b>658</b>	<b>64.8</b>
<b>i. Extracellular proteins</b>	<b>16</b>	<b>238</b>	<b>23.4</b>
Secretory proteins	12	234	23.1
Pituitary hormones	5	219	21.6
Other secretory proteins	7	14	1.4
Matrix proteins	4	5	0.5
<b>ii. Plasma membrane proteins</b>	<b>12</b>	<b>20</b>	<b>2.0</b>
<b>iii. Intracellular proteins</b>	<b>172</b>	<b>301</b>	<b>29.8</b>
Secretory granule proteins	(9-10) <sup>3</sup>	(25-34) <sup>3</sup>	(2.5-3.4) <sup>3</sup>
ER-Golgi proteins	18	21	2.1
Nuclear proteins	32	49	4.8
Mitochondrial proteins	17	23	2.3
Lysosomal proteins	15	17	1.7
Cytoplasmic proteins	80	158	15.6
Ribosomal proteins	50	100	9.9
Signal transducers	(15-16) <sup>3</sup>	(17-26) <sup>3</sup>	(1.7-2.6) <sup>3</sup>
Cytoskeletal proteins	8	17	1.7
Others	6	15	1.5
iv. Uncharacterized	63	98	9.7
<b>II. Novel genes</b>	<b>264</b>	<b>357</b>	<b>35.2</b>
<b>Total</b>	<b>527</b>	<b>1015</b>	<b>100.0</b>