

(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2002 - 51782

(P2002 - 51782A)

(43)公開日 平成14年2月19日(2002.2.19)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/47	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/47		16/18	4 B 0 2 4
16/18		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02		1/66	4 B 0 6 4
1/66		1/68	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 26 O L (全 44数)			最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 241413(P2000 - 241413)

(22)出願日 平成12年8月9日(2000.8.9)

(71)出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(72)発明者 奥津 潤一

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(72)発明者 川井田 礼美

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(74)代理人 100081400

弁理士 大野 彰夫 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤の試験方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 骨粗鬆症、慢性関節リウマチにおける骨破壊、ガン細胞の骨転移と骨破壊等を含むさまざまな骨代謝疾患の治療又は予防剤を試験するための新規な方法及び該方法において用いられるDNAの提供。

【解決手段】 培養細胞を被検物質の存在下又は非存在下で培養し、次いで、該培養細胞における、マウス由来の特定のヌクレオチド配列又はヒト由来の特定のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現量を、被検物質非存在下で培養した細胞と、被検物質存在下で培養した細胞との間で比較することを特徴とする方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 物質の、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤としての効果を試験する方法であって、下記の工程：

1) 培養細胞を被検物質の存在下または非存在下で培養する；

2) 上記1)の培養細胞における、下記のa)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列(ただし、配列中のtはuに読み替える)を有するmRNAの発現量を検出する；

a) 配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232から720に示されるヌクレオチド配列；

b) 配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26から514に示されるヌクレオチド配列；

c) 形質転換大腸菌*E. coli* pUC18-A574(1.8K) SANK 70600(FERM BP-7238)が保持するプラスミドにおいてpUC18のマルチクローニングサイトに挿入されたDNAが有するヌクレオチド配列；

d) 形質転換大腸菌*E. coli* pUC18-hjd p-2 SANK 70700(FERM BP-7237)が保持するプラスミドにおいてpUC18のマルチクローニングサイトに挿入されたDNAが有するヌクレオチド配列；

e) 上記a)乃至d)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導する活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；および
3) 上記工程2)の結果、被検物質非存在下で培養した細胞と、被検物質存在下で培養した細胞との間で、検出されたmRNAの発現量を比較する；を含む方法。

【請求項2】 培養細胞が破骨細胞前駆細胞であることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項3】 培養細胞が霊長類または齧歯類動物由来であることを特徴とする、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 培養細胞がヒトまたはマウス由来であることを特徴とする、請求項3記載の方法。

【請求項5】 請求項1乃至4のいずれか一つに記載の方法において、mRNAの発現量を検出する方法がノーザンブロット、ドットブロットまたはスロットブロットであることを特徴とする方法。

【請求項6】 請求項1乃至4のいずれか一つに記載の方法において、mRNAの発現量を検出する方法がRT-PCRであることを特徴とする方法。

【請求項7】 請求項1乃至4のいずれか一つに記載の方法において、mRNAの発現量を検出する方法がリボヌクレアーゼ保護アッセイであることを特徴とする方法。

【請求項8】 請求項1乃至4のいずれか一つに記載の方法において、mRNAの発現量を検出する方法がランオン・アッセイであることを特徴とする方法。

【請求項9】 下記のa)またはb)記載のDNA：

a) 配列表の配列番号1の配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232から720に示されるヌクレオチド配列からなるDNA、または該ヌクレオチド配列の一方または両方の末端が1ヌクレオチドもしくは2ヌクレオチド以上欠失した、少なくとも15ヌクレオチドからなるDNA；

b) 配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26から514に示されるヌクレオチド配列からなるDNA、または該ヌクレオチド配列の一方または両方の末端が1ヌクレオチドもしくは2ヌクレオチド以上欠失した、少なくとも15ヌクレオチドからなるDNA。

【請求項10】 配列表の配列番号1の配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1から1642に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号1から1495に示されるヌクレオチド配列中の連続した15乃至30ヌクレオチドからなるヌクレオチド配列のアンチセンス配列からなるDNAまたはRNA。

【請求項11】 物質の、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤としての効果を試験する方法であって、下記の工程：

1) 培養細胞を被検物質の存在下または非存在下で培養する；

2) 上記1)の培養細胞上清における、下記のa)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドの産生量を、該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて検出する；

a) 配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232から720に示されるヌクレオチド配列；

b) 配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26から514に示されるヌクレオチド配列；

c) 形質転換大腸菌*E. coli* pUC18-A574(1.8K) SANK 70600(FERM BP-7238)が保持するプラスミドにおいてpUC18のマルチクローニングサイトに挿入されたDNAが有するヌクレオチド配列；

d) 形質転換大腸菌*E. coli* pUC18-hjd p-2 SANK 70700(FERM BP-7237)が保持するプラスミドにおいてpUC18のマルチクローニングサイトに挿入されたDNAが有するヌクレオチド配列；

e) 上記a)乃至d)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導する活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；および

3) 上記工程2)の結果、被検物質非存在下で培養した細胞と、被検物質存在下で培養した細胞との間で、検出されたポリペプチドの量を比較する；を含む方法。

【請求項12】 請求項11記載の方法において、a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドを特異的に認識する抗体が、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1-163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその一部、もしくは配列番号4のアミノ酸番号1から163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその一部を特異的に認識するものであることを特徴とする方法。

【請求項13】 請求項11または12記載の方法において、a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドを特異的に認識する抗体が、配列表の配列番号21に示されるアミノ酸配列を特異的に認識するものであることを特徴とする方法。

【請求項14】 請求項11乃至13のいずれか一つに記載の方法において、a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドの産生量を該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて検出する操作が、ウエスタンブロット、ドットブロットまたはスロットブロットであることを特徴とする方法。

【請求項15】 請求項11乃至14のいずれか一つに記載の方法において、a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドの産生量を該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて検出する操作が、固相酵素免疫定量法(ELISA法)または放射性同位元素免疫定量法(RIA法)であることを特徴とする方法。

【請求項16】 下記のa)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドを特異的に認識する抗体：

- a) 配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232から720に示されるヌクレオチド配列；
- b) 配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26から514に示されるヌクレオチド配列；
- c) 形質転換大腸菌*E. coli* pUC18-A574(1.8K) SANK 70600(FERM BP-7238)が保持するプラスミドにおいてpUC18のマルチクローニングサイトに挿入されたDNAが有するヌクレオチド配列；
- d) 形質転換大腸菌*E. coli* pUC18-hjd p-2 SANK 70700(FERM BP-7237)が保持するプラスミドにおいてpUC18のマルチクローニングサイトに挿入されたDNAが有するヌク

レオチド配列；

e) 上記a)乃至d)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドとストリンジントな条件でハイブリダイズし、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導する活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列。

【請求項17】 請求項16記載の抗体であって、配列表の配列番号21に示されるアミノ酸配列を特異的に認識することを特徴とする抗体。

【請求項18】 請求項16または17記載の抗体を含むことからなる、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤を試験するためのキット。

【請求項19】 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を特異的に阻害する物質をスクリーニングする方法であって、下記の(i)および(ii)の工程を含むことを特徴とする方法：

(i) 予めカテプシンKプロモーター遺伝子または酒石酸耐性酸ホスファターゼ(以下「TRAP」という)プロモーター遺伝子の支配下にあり、該プロモーター活性の検出を可能ならしめる遺伝子(以下「マーカー遺伝子」という)と、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1から163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号4のアミノ酸番号1から163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする遺伝子とで形質転換された培養細胞を、被検物質を添加してまたは添加しないで培養する；

(ii) 上記(i)記載の培養細胞におけるマーカー遺伝子の発現量を、被検物質を添加した細胞と添加しなかった細胞との間で比較する。

【請求項20】 マーカー遺伝子を発現誘導するためのプロモーターとして、配列表の配列番号27に示されるヌクレオチド配列からなるマウスカテプシンKプロモーター遺伝子を用いることを特徴とする、請求項19記載の方法。

【請求項21】 マーカー遺伝子を発現誘導するためのプロモーターとして、配列表の配列番号26に示されるヌクレオチド配列からなるマウスTRAPプロモーター遺伝子を用いることを特徴とする、請求項19記載の方法。

【請求項22】 マーカー遺伝子がクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、-ガラクトシダーゼ、分泌型アルカリホスファターゼおよび緑色蛍光タンパク質からなる群より選択される蛋白質をコードするものであることを特徴とする、請求項19乃至21のいずれか一つに記載の方法。

【請求項23】 マーカー遺伝子がホタルルシフェラーゼをコードする遺伝子であることを特徴とする、請求項19乃至21のいずれか一つに記載の方法。

【請求項24】 マーカー遺伝子および配列表の配列番号2のアミノ酸番号1-163に示されるアミノ酸配列

からなるポリペプチドまたは配列番号4のアミノ酸番号1-163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする遺伝子で形質転換される培養細胞が、RAW264.7細胞株であることを特徴とする、請求項19乃至23のいずれか一つに記載の方法。

【請求項25】 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を調節する物質をスクリーニングする方法であって、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1から163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号4のアミノ酸番号1から163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに被検物質を含む試料を接触させ、次いで、該ポリペプチドに結合した物質を分離することを特徴とする方法。

【請求項26】 配列表の配列番号2のアミノ酸番号46から163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】 本発明は、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤として有用な物質の新規試験方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 骨は、自らの形態変化や血中カルシウム濃度の維持のため、常に形成と吸収を繰り返し再構築を行う動的な器官として知られる。骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収とは平衡関係にあるため、通常は骨の量が一定に保たれているが、ひとたびこの平衡関係が崩れると、骨粗鬆症などの骨代謝異常に陥ることになる(Suda et al., *Endocr. Rev.* 13, 66-80 (1992), Suda et al., in *Principles of Bone Biology* (Bilezikian et al. Eds), pp87-102, Academic Press, New York (1996))。

【0003】 骨代謝を調節する因子は、全身性のホルモンや局所性のサイトカインが数多く報告されており、それら因子の共同作用により骨の形成と維持が営まれている(Suda et al., *Endocr. Rev.* 13, 66-80 (1992), Rodman, *Endocr. Rev.* 17, 308-332 (1996))。一方、加齢による骨組織の変化は、骨粗鬆症の発症を通して広く知られているが、その発症機構は性ホルモンの分泌低下やそのレセプター異常、老化遺伝子の発現、破骨細胞や骨芽細胞の分化あるいは機能不全など多岐にわたっており、加齢による生理現象として理解するのは困難である。骨粗鬆症はエストロゲンの分泌低下による閉経後骨粗鬆症と加齢による老人性骨粗鬆症に大別されているが、その発症機構の解明と治療薬開発の為には、骨吸収と骨形成の調節機構についての基礎的研究の進展が必須である。

【0004】 破骨細胞は、造血幹細胞に由来する多核の細胞で、その前駆細胞は骨表面の骨芽細胞/ストローマ細胞の細胞膜上に発現する破骨細胞分化因子(osteocla

st differentiation factor; 以下「ODF」という)を認識し、破骨細胞へ分化することが明らかとなってきた(Yasuda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3597-3602 (1998), Lacey et al., *Cell* 93, 165-176 (1998))。ODFの細胞内ドメインと膜貫通ドメインを欠いた組換え可溶性ODFを用いた実験の結果、ODFは骨芽細胞/ストローマ細胞が産生する膜結合因子であり、その発現は骨吸収因子により調節されること、および、ODFは破骨細胞前駆細胞から単核破骨細胞への分化を誘導することなどが明らかにされた(Yasuda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3597-3602 (1998), Jimi et al., *J. Bone Miner. Res.* 23, S222 (Abstract) (1998))。さらに、ODFをノックアウトしたマウスが、典型的な大理石病を発症することが見出され、ODFが生理的な破骨細胞分化誘導因子であることが証明された(Kong et al., *Nature (London)* 397, 315-323 (1999))。

【0005】 ODFは、破骨細胞前駆細胞膜に発現するODFレセプターであるRANK (Receptor activator of NF- κ B)を介してシグナルを伝達し、破骨細胞分化を促進することが知られている(Nakagawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 395-400 (1998))。RANKのトランスジェニックマウスやノックアウトマウスが作製されて、RANKが*in vivo*においても破骨細胞の分化を制御していることが証明された(Hsu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3540-3545 (1999), Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1566-1571 (2000))。

【0006】 一方、本発明において検出の対象となる、ODF刺激により発現誘導されるタンパク質は、そのアミノ酸配列がラット由来の公知タンパク質jun dimerization protein 2(jdp-2)と同一または高い相同性を有しているが、jdp-2が破骨細胞分化を含めた骨代謝に関する機能を有するか否かについては知られていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、骨粗鬆症、慢性関節リウマチにおける骨破壊、ガン細胞の骨転移と骨破壊等を含む種々の骨代謝疾患の治療または予防剤を試験するための新規な方法および該方法において用いられる核酸プローブ、プライマーおよび抗体を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明は、(1) 物質の、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤としての効果を試験する方法であって、下記の工程：
1) 培養細胞を被検物質の存在下または非存在下で培養する；
2) 上記1)の培養細胞における、下記のa)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列(ただし、配

列中の t は u に読み替える) を有する mRNA の発現量を検出する:

- a) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 232 から 720 に示されるヌクレオチド配列;
 - b) 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 26 から 514 に示されるヌクレオチド配列;
 - c) 形質転換大腸菌 *E. coli* pUC18-A574 (1.8K) SANK 70600 (FERM BP-7238) が保持するプラスミドにおいて pUC18 のマルチクローニングサイトに挿入された DNA が有するヌクレオチド配列;
 - d) 形質転換大腸菌 *E. coli* pUC18-hjdp-2 SANK 70700 (FERM BP-7237) が保持するプラスミドにおいて pUC18 のマルチクローニングサイトに挿入された DNA が有するヌクレオチド配列;
 - e) 上記 a) 乃至 d) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導する活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列; および 3) 上記工程 2) の結果、被検物質非存在下で培養した細胞と、被検物質存在下で培養した細胞との間で、検出された mRNA の発現量を比較する; を含む方法、
- (2) 培養細胞が破骨細胞前駆細胞であることを特徴とする、(1) 記載の方法、(3) 培養細胞が霊長類または齧歯類動物由来であることを特徴とする、(1) または (2) 記載の方法、(4) 培養細胞がヒトまたはマウス由来であることを特徴とする、(3) 記載の方法、(5) (1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載の方法において、mRNA の発現量を検出する方法がノーザンブロット、ドットブロットまたはスロットブロットであることを特徴とする方法、(6) (1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載の方法において、mRNA の発現量を検出する方法が RT-PCR であることを特徴とする方法、(7) (1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載の方法において、mRNA の発現量を検出する方法がリボヌクレアーゼ保護アッセイであることを特徴とする方法、(8) (1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載の方法において、mRNA の発現量を検出する方法がランオン・アッセイであることを特徴とする方法、(9) 下記の a) または b) 記載の DNA:
- a) 配列表の配列番号 1 の配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 232 から 720 に示されるヌクレオチド配列からなる DNA、または該ヌクレオチド配列の一方または両方の末端が 1 ヌクレオチドもしくは 2 ヌクレオチド以上欠失した、少なくとも 15 ヌクレオチドからなる DNA;
 - b) 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 26 から 514 に示されるヌクレオチド配列からなる DNA、また

は該ヌクレオチド配列の一方または両方の末端が 1 ヌクレオチドもしくは 2 ヌクレオチド以上欠失した、少なくとも 15 ヌクレオチドからなる DNA、(10) 配列表の配列番号 1 の配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 から 1642 に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 1 から 1495 に示されるヌクレオチド配列中の連続した 15 乃至 30 ヌクレオチドからなるヌクレオチド配列のアンチセンス配列からなる DNA または RNA、(11) 物質の、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤としての効果を試験する方法であって、下記の工程:

- 1) 培養細胞を被検物質の存在下または非存在下で培養する;
 - 2) 上記 1) の培養細胞上清における、下記の a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドの産生量を、該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて検出する:
- a) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 232 から 720 に示されるヌクレオチド配列;
 - b) 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 26 から 514 に示されるヌクレオチド配列;
 - c) 形質転換大腸菌 *E. coli* pUC18-A574 (1.8K) SANK 70600 (FERM BP-7238) が保持するプラスミドにおいて pUC18 のマルチクローニングサイトに挿入された DNA が有するヌクレオチド配列;
 - d) 形質転換大腸菌 *E. coli* pUC18-hjdp-2 SANK 70700 (FERM BP-7237) が保持するプラスミドにおいて pUC18 のマルチクローニングサイトに挿入された DNA が有するヌクレオチド配列;
 - e) 上記 a) 乃至 d) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導する活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列; および 3) 上記工程 2) の結果、被検物質非存在下で培養した細胞と、被検物質存在下で培養した細胞との間で、検出されたポリペプチドの量を比較する; を含む方法、(12) (11) 記載の方法において、a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドを特異的に認識する抗体が、配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 1-163 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその一部、もしくは配列番号 4 のアミノ酸番号 1 から 163 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその一部を特異的に認識するものであることを特徴とする方法、(13) (11) または (12) 記載の方法において、a) 乃至 e) のいずれか一つ

に記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドを特異的に認識する抗体が、配列表の配列番号 21 に示されるアミノ酸配列を特異的に認識するものであることを特徴とする方法、(14) (11)乃至(13)のいずれか一つに記載の方法において、a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドの産生量を該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて検出する操作が、ウエスタンブロット、ドットブロットまたはスロットブロットであることを特徴とする方法、(15) (11)乃至(14)のいずれか一つに記載の方法において、a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドの産生量を該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて検出する操作が、固相酵素免疫定量法(ELISA法)または放射性同位元素免疫定量法(RIA法)であることを特徴とする方法、(16) 下記のa)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドを特異的に認識する抗体:

a) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 232 から 720 に示されるヌクレオチド配列;

b) 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 26 から 514 に示されるヌクレオチド配列;

c) 形質転換大腸菌 *E. coli* pUC18-A574(1.8K) SANK 70600(FERM BP-7238) が保持するプラスミドにおいて pUC18 のマルチクローニングサイトに挿入された DNA が有するヌクレオチド配列;

d) 形質転換大腸菌 *E. coli* pUC18-hjd p-2 SANK 70700(FERM BP-7237) が保持するプラスミドにおいて pUC18 のマルチクローニングサイトに挿入された DNA が有するヌクレオチド配列;

e) 上記 a)乃至d)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導する活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、(17) (16) 記載の抗体であって、配列表の配列番号 21 に示されるアミノ酸配列を特異的に認識することを特徴とする抗体、(18) (16) または(17) 記載の抗体を含むことからなる、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤を試験するためのキット、(19) 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を特異的に阻害する物質をスクリーニングする方法であって、下記の(i)および(ii)の工程を含むことを特徴とする方法:

(i) 予めカテプシン K プロモーター遺伝子または酒石

酸耐性酸ホスファターゼ(以下「TRAP」という)プロモーター遺伝子の支配下にあり、該プロモーター活性の検出を可能ならしめる遺伝子(以下「マーカー遺伝子」という)と、配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 1 から 163 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 4 のアミノ酸番号 1 から 163 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする遺伝子とで形質転換された培養細胞を、被検物質を添加してまたは添加しないで培養する;

(ii) 上記(i)記載の培養細胞におけるマーカー遺伝子の発現量を、被検物質を添加した細胞と添加しなかった細胞との間で比較する、(20) マーカー遺伝子を発現誘導するためのプロモーターとして、配列表の配列番号 27 に示されるヌクレオチド配列からなるマウスカテプシン K プロモーター遺伝子を用いることを特徴とする、(19) 記載の方法、(21) マーカー遺伝子を発現誘導するためのプロモーターとして、配列表の配列番号 26 に示されるヌクレオチド配列からなるマウス TRAP プロモーター遺伝子を用いることを特徴とする、(19) 記載の方法、(22) マーカー遺伝子がクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、分泌型アルカリホスファターゼおよび緑色蛍光タンパク質からなる群より選択される蛋白質をコードするものであることを特徴とする、(19)乃至(21)のいずれか一つに記載の方法、(23) マーカー遺伝子がホタルルシフェラーゼをコードする遺伝子であることを特徴とする、(19)乃至(21)のいずれか一つに記載の方法、(24) マーカー遺伝子および配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 1-163 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 4 のアミノ酸番号 1-163 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする遺伝子で形質転換される培養細胞が、RAW264.7 細胞株であることを特徴とする、(19)乃至(23)のいずれか一つに記載の方法、(25) 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を調節する物質をスクリーニングする方法であって、配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 1 から 163 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 4 のアミノ酸番号 1 から 163 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに被検物質を含む試料を接触させ、次いで、該ポリペプチドに結合した物質を分離することを特徴とする方法、(26) 配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 46 から 163 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、に関する。

【0009】マウス単球由来細胞株 RAW264.7 を ODF で刺激すると、酒石酸耐性酸ホスファターゼ(以下「TRAP」という)やカテプシン K などの破骨細胞分化マーカーの遺伝子発現が強く誘導されることが知られている(Hsu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9

6, 3540-3545 (1999))。すなわち、RAW264.7株は、ODF刺激することにより破骨細胞へと分化誘導できると考えられる。そこで、本発明者らは、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤の標的遺伝子を探索する目的で、ODF刺激しないRAW264.7細胞に発現するmRNAとODF刺激したRAW264.7細胞に発現するmRNAとの間で遺伝子発現量を比較した結果、破骨細胞への分化誘導に關与する遺伝子(cDNA)を同定することに成功した。このマウスcDNAは、ホモロジー検索の結果、公知ラット遺伝子と高いヌクレオチド配列相同性を有しており、またそれらのコードするアミノ酸配列においては100%の一致が認められた。本発明者らは、このマウスcDNAおよびそれに対応するヒト遺伝子をRAW264.7細胞に強制発現させると、TRAPやカテプシンK遺伝子のプロモーター活性が促進されることを見出し、これら遺伝子が、従来知られていなかった破骨細胞分化に關する機能を有することを明らかにした。また、この遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部をプローブもしくはプライマーとして用いた遺伝子発現の検出系を利用する、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤の新規試験方法の構築に成功した。さらに、この遺伝子がコードするポリペプチドに特異的な抗体を調製し、該抗体を用いて該ポリペプチドの産生量を検出する実験系を利用する骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤の新規試験方法を構築した。そして、本発明者らは、この遺伝子がコードするポリペプチドの有する破骨細胞化促進活性を機能的に阻害する物質の新規試験方法を構築して、本発明を完成させた。

【0010】本発明において、「ストリンジентな条件下でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液ExpressHyb Hybridization Solution(クローンテック社製)中、68℃でハイブリダイズすること、またはそれと同等の条件下でハイブリダイズすることをいう。

【0011】また、本発明において、「破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導する活性」とは、破骨細胞前駆細胞(例えば、RAW264.7細胞)内において、破骨細胞分化マーカーであるカテプシンKやTRAPの発現を亢進させる活性をいう。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明の方法は、具体的には例えば、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232から720に示されるヌクレオチド配列、または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26から514に示されるヌクレオチド配列を有する遺伝子、またはそれらがコードするポリペプチドと同じ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を、当該核酸(mRNA)または当該ポリペプチドの特異的検出によって測定し、該遺伝子の発現量(すなわち、当該ポリペプチドの産生量)

を低下させるような被検物質を骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤の候補物質として選択するのである。以下、核酸の検出を行う態様とポリペプチドの検出を行う態様とに分けて説明する。

【0013】(A)核酸の検出

1)プローブ

核酸の検出を行う態様のうち、核酸ハイブリダイゼーションを利用する方法において用いられるプローブは、DNAまたはRNAであって、そのヌクレオチド配列は、下記a)乃至e)：

a)配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232から720に示されるヌクレオチド配列；

b)配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26から514に示されるヌクレオチド配列；

c)形質転換大腸菌*E. coli* pUC18-A574(1.8K) SANK 70600(FERM BP-7238)が保持するプラスミドにおいてpUC18のマルチクローニングサイトに挿入されたDNAが有するヌクレオチド配列；

d)形質転換大腸菌*E. coli* pUC18-hjd p-2 SANK 70700(FERM BP-7237)が保持するプラスミドにおいてpUC18のマルチクローニングサイトに挿入されたDNAが有するヌクレオチド配列；

e)上記a)乃至d)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズし、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導する活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；のいずれか一つ(ただし、配列中のtはuに読み替える)を有するポリリボヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であればよく、例えば、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチド、該アンチセンス配列中の連続した少なくとも15ヌクレオチドからなる部分配列を有するポリヌクレオチド、もしくは該アンチセンス配列の改変体等、およそ上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有するポリリボヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズすることにより該ポリリボヌクレオチドを特異的に検出することが可能なものは全て本発明の方法に用いられ得る。それらのうち、上記a)記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドは、例えばマウスRAW264.7細胞由来のcDNAライブラリーから、配列表の配列番号1に示すヌクレオチド配列情報に基づいて、周知の方法、例えばブランクハイブリダイゼーション法、コロニーハイブリダイゼーション法またはポリメラーゼ連鎖反応(以下「PCR」という)法等によりクローニングしたcDNAクローンを、周知の方法で直接標識するか、または該

cDNAクローンを鋳型としたポリメラーゼ反応による複製または転写反応において標識することにより、標識プローブとして得ることができる。

【0014】また、上記b)記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドは、例えばヒト脾臓由来のcDNAライブラリーから配列表の配列番号3に示すヌクレオチド配列情報に基づいて、同様の操作を行うことによりクローニングしたcDNAクローンから標識プローブを得ることができる。

【0015】一方、上記c)またはd)記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドは、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成12年7月19日付で国際寄託され、受託番号FERM BP-7238が付されている形質転換大腸菌株*E. coli* pUC18-A574(1.8k) SANK 70600株または同じく平成12年7月19日付で国際寄託され、受託番号FERM BP-7237が付されている*E. coli* pUC18-hjdp-2 SANK 70700株が保持する組換えプラスミドから得ることができる。

【0016】さらに、上記e)記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドは、例えば上記のようにして得られる上記a)乃至d)記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドをプローブとして、任意の哺乳動物(好ましくは脾臓)由来のcDNAライブラリーについてブランクハイブリダイゼーション法やコロニーハイブリダイゼーション法によるクローニングを行って単離したcDNAクローンから得ることができる。

【0017】さらにまた、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列中の連続した少なくとも15ヌクレオチドからなる部分配列を有するポリヌクレオチドは、数十ヌクレオチド程度のものであれば化学合成によって得ることが可能である。またあるいは、上記のようにして得られる上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有するcDNAクローン中の任意の部分配列を、例えばPCR等によってサブクローニングしてから、上記と同様の手法でアンチセンス配列を有するプローブとして調製することもできる。

【0018】例えば、配列表の配列番号1記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列中の連続した数十ヌクレオチドからなる部分配列において、数ヌクレオチドが付加、欠失および/または付加されたようなヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドであっても、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のポリリボヌクレオチドとストリンジентな条件でハイブリダイズする限り、本発明の方法に用いられ得る。そのようなポリヌクレオチドは、化学合成法や、PCR等の酵素反応を利用した本発明の属する技術分野における周知の変異導入法を用い

て作製することが可能である。

【0019】また、本発明の方法において用いられるプローブは単一のヌクレオチド配列からなるものに限定されない。すなわち本発明の方法においては、例えば上記の要件を満足する複数種類のヌクレオチド配列の混合物をプローブとして用いたり、もしくはそれら複数種類のヌクレオチド配列をそれぞれ個別に用いた多重検出を行ってもよい。

【0020】2) RT-PCR用プライマー

本発明における、核酸の検出を行うもう一つの態様は、まずmRNAを鋳型とする逆転写酵素反応を行ってから、PCRを実施して特異的にDNA断片を増幅する、いわゆるRT-PCRを行う方法である。この方法において、目的のヌクレオチド配列を特異的に増幅するためには、目的のmRNAの特定の部分配列に相補的なアンチセンスプライマーと、該アンチセンスプライマーから逆転写酵素により生成されるcDNAの配列中の特定の部分配列に相補的なセンスプライマーが用いられる。

【0021】逆転写酵素反応およびPCRの両方に用いられるアンチセンスプライマーは、実質的に上記a)乃至e)記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列中の、連続した少なくとも18ヌクレオチド、好ましくは少なくとも23ヌクレオチドのヌクレオチド配列からなる。

【0022】一方、PCRにおいて用いられるセンスプライマーの配列は、上記a)乃至e)記載のヌクレオチド配列において、上記アンチセンスプライマーの相補鎖にあたる配列中の最も5'末端側の位置よりもさらに5'末端側領域に存在する配列中の連続した少なくとも18ヌクレオチド、好ましくは少なくとも21ヌクレオチドの任意の部分配列からなる。ただし、センスプライマーとアンチセンスプライマーに互いに相補的な配列が存在すると、プライマー同士がアニーリングすることにより非特異的な配列が増幅され、特異的な遺伝子検出の妨げとなるおそれがあるので、そのような組み合わせを避けたプライマーの設計を行うことが好ましい。

【0023】これらアンチセンスプライマーおよびセンスプライマーには、いずれも上記で規定したそれらヌクレオチド配列の5'末端に、上記a)乃至e)記載のヌクレオチド配列とは無関係のヌクレオチド配列がリンカーとして付加されていてもよい。ただし、特異的な遺伝子検出の妨げとならないよう、該リンカーは反応中に反応液内の核酸と非特異的アニーリングを起こさないようなものであることが好ましい。

【0024】3) 遺伝子発現を検出する細胞または動物次に、本発明の方法において用いられる培養細胞は、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子を発現する哺乳動物細胞であればよい。好ましくは哺乳動物脾臓由来の培養細胞であるが、例えば上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレ

オチド配列を有する遺伝子をそのプロモーター領域とともに導入した細胞など、人為的に形質転換された細胞（例えば、RAW264.7細胞）も使用することが可能である。哺乳動物種としては、ヒト、マウスまたはハムスターが好ましく、ヒトまたはマウスがより好ましいが、これらに限定されない。また、何らかの事情により培養細胞を用いるよりも好適と判断される場合には、哺乳動物個体に被検物質を投与して、その後該動物個体から抽出されたその臓器または組織細胞における上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現を検出する方法も採用し得る。その際、遺伝子発現の検出対象となる臓器または組織は、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子を発現するものであればよいが、好ましくは脾臓や骨髄である。この実施態様における好ましい哺乳動物種はヒト、マウスまたはハムスターが好ましく、ヒトまたはマウスがより好ましい。

【0025】本発明の方法において用いられる培養細胞は、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子を発現可能な条件（ただし被検物質を添加しない場合）であれば、いかなる条件で培養してもよい。例えば、該培養細胞について確立された培養条件が知られており、該条件下において該細胞が上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子を発現する場合は、該条件で培養してよい。また、哺乳動物個体から抽出した臓器または組織における遺伝子発現を検出する場合における、該動物の飼育条件も、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子を発現可能な条件（ただし被検物質を添加しない場合）であればよい。

【0026】4) 被検物質の添加

上記細胞の培養中、被検物質を培養培地に添加し一定期間培養する。被検物質としては、化合物、微生物の代謝産物、植物や動物組織の抽出物、それらの誘導体またはそれらの混合物等が挙げられる。被検物質の投与量や濃度は適宜設定するか、または例えば希釈系列を作成するなどして複数種の投与量を設定してもよい。被検物質存在下で培養する期間も適宜設定してよいが、好ましくは30分乃至48時間である。哺乳動物個体に被検物質を投与する場合は、被検物質の物性等により経口投与、静脈注射、腹腔内注射、経皮投与、皮下注射等の投与形態を使い分ける。

【0027】5) 試料の調製

上記のようにして培養した細胞からRNAを抽出するに際しては、培養終了後直ちに細胞をRNA抽出用の溶媒（例えばフェノール等リボヌクレアーゼを不活性化する作用を有する成分を含むもの）で直接溶解するのが好ましい。または、細胞を破壊しないように、スクレーパーで慎重に掻きとるか、もしくはトリプシン等のタンパク質分解酵素を用いて穏やかに培養基材から分離させるな

どの方法により、細胞を回収した後、速やかにRNA抽出工程に移行する。

【0028】RNAの抽出方法としては、チオシアン酸グアニジン・塩化セシウム超遠心法、チオシアン酸グアニジン・ホットフェノール法、グアニジン塩酸法、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法（Chomczynski, P. and Sacchi, N., (1987) Anal. Biochem., 162, 156-159）などを採用しうるが、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法が好適である。

【0029】得られたRNAからさらにmRNAを精製する方法は以下に説明する通りである。すなわち、真核細胞の細胞質に存在するmRNAの多くは、その3'末端にポリ(A)配列を持つことが知られているので、この特徴を利用して例えばピオチン化したオリゴ(dT)プローブにmRNAを吸着させ、さらにストレプトアビジンを固定化した常磁性粒子に、ピオチン/ストレプトアビジン間の結合を利用してmRNAを捕捉し洗浄操作の後、mRNAを溶出することにより、mRNAを精製することができる。また、オリゴ(dT)セルロースカラムにmRNAを吸着させて、次にこれを溶出して精製する方法も採用し得る。さらにショ糖密度勾配遠心法などにより、mRNAをさらに分画することもできる。ただし、本発明の方法のためには、これらmRNAの精製工程は必須ではなく、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現の検出が可能である限りにおいて、全RNAをその後の工程に用いることもできる。

【0030】6) 試料の固相化

核酸ハイブリダイゼーションによる検出を行う場合、上記のようにして得られたRNA試料中の遺伝子を特異的に検出するため、該RNA試料をアガロース電気泳動を経てハイブリダイゼーション実験用メンブレン（以下単に「メンブレン」という）に転写する（ノーザンプロット法）か、または直接メンブレンに試料を染み込ませる、いわゆるドットプロット法やスロットプロット法により、メンブレンに固相化する。このメンブレンとしては、ニトロセルロースメンブレン（例えば、ハイボンド-Cピュア（アマシャム・ファルマシア社製）等）、ポジティブチャージ・ナイロンメンブレン（例えば、ハイボンド-N+アマシャム・ファルマシア社製）等）または親水性ナイロンメンブレン（例えば、ハイボンド-N/NX（アマシャム・ファルマシア社製）等）等が用いられる。

【0031】ノーザンプロット用のアガロース電気泳動方法としては、アガロースホルムアミドゲル電気泳動法、試料をグリオキサールとジメチルスルホキシドで処理し、変性させた後、リン酸緩衝液で作製したアガロースゲルで泳動させる方法およびアガロースゲルメチル水銀電気泳動法（以上Maniatis, T. et al. (1982) in "M

olecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.)等を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0032】電気泳動後のゲルからメンブレンにRNAを移す、いわゆるプロットング方法としては、キャピラリートランスファー法 (Maniatis, T. et al. (1982) in "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.)、パキウム法、電気泳動法 (Maniatis, T. et al. (1989) in "Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd ed" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.)等を挙げることができる。ドットプロット法やスロットプロット法のための器材も市販されている(例えば、バイオドット(バイオラッド社製)等)。

【0033】プロットング終了後、メンブレンに移し取られたRNAをメンブレンに固定する操作を行う(この操作はメンブレンの材質によって異なり、製品によっては固定操作不要の場合もある)。

【0034】7)プローブの標識

核酸ハイブリダイゼーションによる検出を行うにあたり、上記のようにして固相化させたRNA試料中の特定のmRNAを検出するためのプローブの標識方法と検出方法について以下に述べる：

i)放射性同位元素標識

DNA断片またはそれを保持するベクター等を材料乃至鋳型として、ニックトランスレーション法(例えば、ニックトランスレーションキット(アマシャム・ファルマシア社製)等を使用)、ランダムプライム法(例えば、マルチプライムDNAラベリングシステム(アマシャム・ファルマシア社製)等を使用)、末端標識法(例えば、メガラベル(宝酒造(株)社製)、3'-末端ラベリングキット(アマシャム・ファルマシア社製)等を使用)で標識DNAプローブを調製するか、あるいは鋳型となるDNAをサブクローニングしたベクター中のSP6プロモーターやT7プロモーターを利用したイン・ビトロ転写法により標識RNAプローブを調製する。これらプローブの検出はX線フィルムまたはイメージングプレートを用いたオートラジオグラフィにより行うことができ、さらにX線フィルムの場合はデンシトメトリー(例えば、GS-700イメージングデンシトメーター(バイオラッド社製)を使用)を、イメージングプレートの場合はBAS2000II(富士フィルム製)システムをそれぞれ用いた定量も可能である。

【0035】ii)酵素標識

DNAあるいはRNA断片を直接酵素標識する。標識に用いられる酵素は例えば、アルカリフォスファターゼ(AlkPhos Direct system for chemiluminescence(アマシャム・ファルマシア社製)等を使用)、西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish Peroxidase)(ECLダイレクト・ヌクレック・アシッド・ラベリング・ア

ンド・ディテクション・システム(アマシャム・ファルマシア社製)等を使用)を挙げることができる。プローブの検出は、標識した酵素の触媒反応が検出可能になるような基質、例えば該触媒反応により発色物質を生成したり、発光するような基質を含む酵素反応緩衝液にメンブレンを浸すことにより行う。発色基質を用いた場合は目視により検出することができ、発光基質を用いた場合は放射性同位元素標識の場合と同様にX線フィルムまたはイメージングプレートを用いたオートラジオグラフィやインスタントカメラを用いた写真撮影により検出することができる。さらに、発光基質を用いた場合は、デンシトメトリーやモレキュラー・イメージャーF_x(バイオラッド社製)システムを利用した定量も可能である。

【0036】iii)その他分子による標識

フルオレセイン標識：DNA断片にニックトランスレーション法、ランダムプライム法、または3'末端標識法(アマシャム・ファルマシア社より市販されているECL 3'-オリゴラベリングシステムなど)で標識する。あるいはSP6、T7プロモーターによるイン・ビトロ転写によりRNAに標識する；

ビオチン標識：DNAの5'末端を標識(アマシャム・ファルマシア社より市販されているオリゴヌクレオチド・ビオチン・ラベリングキットなど使用)したり、DNA断片にニックトランスレーション法、ランダムプライム法などで標識する；

ジゴキシゲニン修飾dUTP標識：DNA断片にニックトランスレーション法、ランダムプライム法などで標識する。

【0037】これら標識分子の検出は、いずれの場合も、標識された分子に特異的に結合する分子を放射性同位元素や酵素で標識したものをプローブに結合させる操作を含む。特異的に結合する分子とは、例えばフルオレセインやジゴキシゲニンの場合は抗フルオレセイン抗体や抗ジゴキシゲニン抗体であり、ビオチンの場合はアビジンまたはストレプトアビジンである。これらをプローブに結合させた以降は、その標識された放射性同位元素や酵素により上記i)またはii)記載と同様の方法にしたがって検出を行うことができる。

【0038】8)ハイブリダイゼーションと検出

ハイブリダイゼーションは、本発明が属する技術分野において周知の方法で行われ得る。本発明におけるハイブリダイゼーション溶液または洗浄液の組成と、ハイブリダイゼーション温度または洗浄温度の関係については、例えば文献(バイオ実験イラストレイテッド4、p148、秀潤社刊)の記載に従うことができるが、好ましい条件は以下の通りである：

ハイブリダイゼーション溶液：ExpressHyb Hybridization Solution(クローンテック社製)；

プローブの終濃度(放射標識プローブの場合)：1乃

至 2×10^6 cpm/ml (好ましくは、 2×10^6 cpm/ml) ;

ハイブリダイゼーション温度および時間: 68、1乃至24時間。

【0039】メンブレンの洗浄条件:

i) 0.1乃至 $5 \times \text{SSC}$ (最も好ましくは $2 \times \text{SSC}$)、0.05乃至0.1% SDS (最も好ましくは0.05%) ドデシル硫酸ナトリウム (以下「SDS」という) 中、室温乃至42 (最も好ましくは室温) で20乃至60分間 (最も好ましくは20分間) 振盪する操作を、洗浄液を交換して2乃至6回 (最も好適には3回) 行う;

ii) 上記i)の後、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS中、50乃至65 で、20乃至60分間振盪する操作を、洗浄液を交換して2乃至6回行う。または、 0.2 乃至 $0.5 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS中、62乃至65 で、20乃至60分間振盪する操作を、洗浄液を交換して2乃至6回行う。最も好適には、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS中、50 で、20分間振盪する操作を、洗浄液を交換して3回行う。

【0040】洗浄終了後、上記7)に記載したように、プローブの標識法に合わせた検出・定量を行う。また、
- アクチン遺伝子の細胞あたりの発現量は安定していることが知られているので、各試料間のRNA量の差等に起因するばらつきを補正する目的で、各試料における
- アクチン遺伝子の発現量を同時に測定しておき、この
- アクチン発現量を基準とした、検出対象遺伝子発現量の相対値を、被検物質を投与した細胞群と投与しなかった細胞群との間で比較することにより、より精密な評価を行うことができる。

【0041】その結果、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現量を低下させる被検物質は、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤となり得る。

【0042】9) RT-PCR反応

RT-PCRによって核酸の検出を行う態様における、各反応の条件は以下に記載する通りである。なお、RT-PCRによる検出のための試料は、通常ポリ(A)⁺RNAにまで精製されている必要はない。

【0043】i) 逆転写酵素反応

反応液組成の例 (全量 $20 \mu\text{l}$) :

全RNA 適宜;

塩化マグネシウム 2.5乃至5mM (好ましくは5mM) ;

$1 \times \text{RNA PCR}$ 緩衝液 (10mM トリス - 塩酸 (25 におけるpH 8.3乃至9.0 (好ましくは8.3))、50mM 塩化カリウム) ;

dNTPs 0.5乃至1mM (好ましくは1mM) ;

アンチセンスプライマー $1 \mu\text{M}$ (アンチセンスプライマーの代用として、市販のランダムプライマーやオリ

ゴ(dT)プライマー (12-20ヌクレオチド) を $2.5 \mu\text{M}$ 添加することもできる) ;

逆転写酵素 0.25乃至1単位/ μl (好ましくは0.25単位/ μl) ;

滅菌水で $20 \mu\text{l}$ に調整する。

【0044】反応温度条件: 30 で10分間保温 (ランダムプライマー使用時のみ) した後、42乃至60 (好ましくは42) で15乃至30分間 (好ましくは30分間) 保温し、さらに99 で5分間加熱して酵素を失活させてから、4乃至5 (好ましくは5) で5分間冷却する。

【0045】ii) PCR

反応液組成の例:

塩化マグネシウム 2乃至2.5mM (好ましくは2.5mM) ;

$1 \times \text{PCR}$ 緩衝液 (10mM トリス - 塩酸 (25 におけるpH 8.3乃至9.0 (好ましくは8.3))、50mM 塩化カリウム ;

dNTPs 0.2乃至0.25mM (好ましくは0.25mM) ;

アンチセンスプライマーおよびセンスプライマー 0.2乃至 $0.5 \mu\text{M}$ (好ましくは $0.2 \mu\text{M}$) ;

Taqポリメラーゼ 1乃至2.5単位 (好ましくは2.5単位) ;

滅菌水を加えて全量を $80 \mu\text{l}$ に調整し、その全量を、逆転写反応を終了した反応液全量に加えてからPCRを開始する。

【0046】反応温度条件: まず94 で2分間加熱した後、90乃至95 (好ましくは94) で30秒間、40乃至60 (好ましくは、プライマーの特性から算出される解離温度 (T_m) からそれより20度低い温度までの範囲内で30秒間、70乃至75 (好ましくは72) で1.5分間の温度サイクルを28乃至50サイクル (好ましくは28サイクル) 繰り返してから、4 に冷却する。

【0047】PCR終了後、反応液を電気泳動し、目的の大きさのバンドが増幅されているか否かを検出する。定量的検出を行うためには、予め段階希釈したcDNAクローンを標準の鋳型DNAとして同条件でPCRを実施し、定量的検出が可能な温度サイクル数を定めておくか、または、例えば5サイクル毎に一部反応液をサンプリングしてそれぞれ電気泳動を行う。また例えばPCR反応時に放射標識dCTPを用いることにより、バンド中に取り込まれた放射能の量を指標に定量を行うこともできる。遺伝子定量の信頼性を高めた方法として、上記RT-PCR法を改良した競合RT-PCR法 (Souaze et al., BioTechniques 21, 280-285 (1996)) や、TaqMan PCR法 (Heid et al., Genom. Res. 6, 986-994 (1996)) なども利用可能である。

【0048】被検物質存在下で培養した細胞由来の試料

と、被検物質非存在下で培養した細胞由来の試料との間で検出結果を比較し、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現量を低下させた被検物質は骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤となり得る。

【0049】10)その他の方法

上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現量を測定する他の方法としては、以下に記載するものを挙げることができる。

【0050】i)リボヌクレアーゼ保護アッセイ(RNase protection assay): RNA試料中の、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有するmRNA(ただし配列中のtはuに読み替える)のみに標識プローブをハイブリダイズさせ、二本鎖ポリヌクレオチドを形成させておいてから、試料にリボヌクレアーゼを添加してインキュベーションすると、プローブがハイブリダイズしたmRNAは二本鎖を形成していることによりリボヌクレアーゼによる消化を免れ、それ以外のRNAは消化されるので、該二本鎖ポリヌクレオチドのみが残る(検出されるmRNAよりプローブが短ければ、プローブの鎖長に相当する二本鎖ポリヌクレオチドが残る)。この二本鎖ポリヌクレオチドを定量することにより、目的の遺伝子の発現量を測定する。具体的には、例えば以下に記載する方法に従う。

【0051】二本鎖を形成せずに余った標識プローブを二本鎖ポリヌクレオチドと確実に分離して定量を容易にするために、余った標識プローブはリボヌクレアーゼに消化されることが好ましいが、リボヌクレアーゼとして一本鎖DNAも消化できるようなものを使用すれば、標識プローブはDNAでもRNAでもよい。標識プローブの調製方法は上記1)および7)の記載に準ずるが、この方法において用いられるプローブの長さは50乃至500ヌクレオチド程度が好ましい。また、二本鎖DNAを直接標識して熱変性したのみのプローブ等、相補鎖が混在するようなプローブは本法には好適ではない。

【0052】RNAプローブは、例えば下記の方法に従って調製される。まず鋳型DNAをバクテリオファージのプロモーター(T7、SP6、T3プロモーター等)を有するプラスミドベクター(例えばpGEM-T(プロメガ社製)など)に挿入する。次にこの組換えプラスミドベクターを、制限酵素で、挿入断片のすぐ下流で一ヶ所だけ切断されるように消化する。得られた直鎖DNAを鋳型として、放射能標識されたリボヌクレオチド存在下で、インビトロ転写反応を行う。この反応には、ベクター中のプロモーターに合わせてT7、SP6またはT3ポリメラーゼ等の酵素を用いる。以上の操作は例えばリボプローブシステム-T7、同-SP6または同-T3(いずれもプロメガ社製)を用いて行うことができる。

【0053】RNA試料を調製するまでの工程は上記

3)乃至5)記載の通りである。調製された全RNA試料10乃至20 μ g相当分と、 5×10^5 cpm相当の過剰量の標識プローブとを用いてリボヌクレアーゼ保護アッセイを行う。この操作は市販のキット(HybSpeed RPA Kit、アンピオン社製)を用いて行うことができる。得られたリボヌクレアーゼ消化後の試料を、8M尿素を含む4乃至12%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、ゲルを乾燥させ、X線フィルムでオートラジオグラフィーを行う。以上の操作により、リボヌクレアーゼ消化を免れた二本鎖ポリヌクレオチドのバンドを検出することができ、またその定量は上記7)のi)記載の方法に従って実施することができる。さらに、ノーザンプロット解析の場合と同様、各試料間のRNA量の差等に起因するばらつきを補正する目的で、 β -アクトン遺伝子の発現量を同時に測定しておけば、より精密な評価を行うことができる。

【0054】このようにして、被検物質存在下で培養した細胞由来の試料と、被検物質非存在下で培養した細胞由来の試料との間で検出結果を比較し、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現量を低下させた被検物質は骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤となり得る。

【0055】ii)ランオン・アッセイ(Run-on assay、Greenberg, M. E. and Ziff, E.B.B. (1984) Nature 311, 433-438,およびGroudine, M. et al. (1981) Mol. Cell Biol. 1, 281-288参照): 本方法は、細胞から核を単離して目的の遺伝子の転写活性を測定する方法であり、これまでに述べたような細胞内のmRNAを検出する方法ではないが、本発明においては「遺伝子の発現量を検出する方法」に包含される。単離された細胞核を用いて、試験管内で転写反応を行わせると、核を単離する前に既に転写が開始されmRNA鎖が生成されている途中のものが伸長していく反応のみが進行する。この反応時に放射標識したリボヌクレオチドを添加して、伸長していくmRNAを標識しておき、その中に含まれる、非標識プローブにハイブリダイズするmRNAを検出することにより、核を単離した時点における目的の遺伝子の転写活性を測定することができる。被検物質の影響が最も顕著に現れる時間のデータを判定に用いるため、培養細胞に被検物質を添加してから核を単離するまでの時間について、例えば添加30分後、1時間後、2時間後、4時間後、8時間後および24時間後の細胞から核を単離してそれぞれアッセイを行うなどの方法をとることができる。なお具体的操作方法は、プローブを上記1)の記載に準じて標識しないものを調製する他は、上記参照文献の記載に準ずる。このようにして、被検物質存在下で培養した細胞由来の試料と、被検物質非存在下で培養した細胞由来の試料との間で検出結果を比較し、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の転写活性を低下させた被検物

質は骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤となり得る。

【0056】(B) ポリペプチドの検出

次に、本発明の方法の別の実施態様としては、上記の遺伝子発現を検出する実施態様において検出対象となった遺伝子がコードするポリペプチドを検出する方法がある。この実施態様においては、試料中のポリペプチドを96穴プレートのウエル内底面やメンブレン等に固相化しておいてから、標的のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いた検出が行われる。このうち、96穴プレートを用いるのは一般に固相酵素免疫定量法(ELISA法)や放射性同位元素免疫定量法(RIA法)と呼ばれる方法である。一方、メンブレンに固相化する方法としては、試料のポリアクリルアミド電気泳動を経てメンブレンにポリペプチドを転写する方法(ウエスタンブロット法)か、または直接メンブレンに試料またはその希釈液を染み込ませる、いわゆるドットブロット法やスロットブロット法が挙げられる。

【0057】1) 試料の調製

このようなポリペプチドを検出する実施態様において用いられる培養細胞の種類に関する条件は、上記した遺伝子発現を検出する実施態様の場合と同様である。また、何らかの事情により培養細胞を用いるよりも好適と判断される場合には、哺乳動物個体に被検物質を投与して、その後該動物個体から採取された臓器または組織等を試料として用いる方法も採用し得る。この場合の好ましい哺乳動物種はヒト、マウスまたはハムスターが好ましく、ヒトまたはマウスがより好ましい。培養細胞の培養条件、動物の飼育条件、被検物質の投与方法についても、遺伝子発現を検出する実施態様の場合と同様である。被検物質としては、化合物、微生物の代謝産物、植物や動物組織の抽出物、それらの誘導体またはそれらの混合物等が挙げられる。

【0058】本実施態様のための試料を調製するための材料としては、被検物質存在下または非存在下で培養した細胞培養の全細胞抽出液または核抽出画分が用いられ得るが、全細胞抽出液が好適である。全細胞抽出液は、必要により高速遠心することにより不溶性の物質を除去した後、ELISA/RIA用試料やウエスタンブロット用試料の調製工程に供される。

【0059】ELISA/RIA用試料としては、例えば回収した全細胞抽出液をそのまま使用するか、緩衝液で適宜希釈したものをを用いる。

【0060】ウエスタンブロット用(電気泳動用)試料は、例えば全細胞抽出液をそのまま使用するか、緩衝液で適宜希釈して、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動用の2-メルカトルエタノールを含むサンプル緩衝液(シグマ社製等)と混合する。

【0061】ドット/スロットブロットの場合は、例えば回収した全細胞抽出液そのもの、または緩衝液で適宜

希釈したものを、プロットング装置を使用するなどして、直接メンブレンへ吸着させる。

【0062】2) 試料の固相化

上記のようにして得られた試料中のポリペプチドを特異的に検出するため、該試料を固相化する。ウエスタンブロット法、ドットブロット法またはスロットブロット法に用いられるメンブレンとしては、ニトロセルロースメンブレン(例えば、バイオラッド社製等)、ナイロンメンブレン(例えば、ハイボンド-ECL(アマシャム・ファルマシア社製)等)、コットンメンブレン(例えば、ブロットアブソーベントフィルター(バイオラッド社製)等)またはポリビニリデン・ジフルオリド(PVDF)メンブレン(例えば、バイオラッド社製)等が挙げられる。

【0063】電気泳動後のゲルからメンブレンにポリペプチドを移す、いわゆるプロットング方法としては、ウエット式プロットング法(CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY volume 2 ed by J. E. Coligan, A. M. Kruijsbeek, D. H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober)、セミドライ式プロットング法(上記CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY volume 2 参照)等を挙げることができる。ドットブロット法やスロットブロット法のための器材も市販されている(例えば、バイオ・ドット(バイオラッド)等)。

【0064】一方、ELISA法/RIA法で検出・定量を行うためには、専用の96穴プレート(例えば、イムノプレート・マキシソープ(ヌンク社製)等)に試料またはその希釈液(例えば0.05% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水(以下「PBS」という)で希釈したものを)を入れて4乃至室温で一晩、または37で1乃至3時間静置することにより、ウエル内底面にポリペプチドを吸着させて固相化する。

【0065】3) 抗体

本実施態様に用いられる抗体は、上記(A)のa)からe)記載のヌクレオチド配列を含む遺伝子が動物細胞で発現することにより産生されるポリペプチド、好ましくは、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1-163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその一部、もしくは配列番号4のアミノ酸番号1-163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその一部を特異的に認識するものである。このような抗体として好適なものは例えば、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1-163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドおよび配列番号4のアミノ酸番号1-163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれにも結合するが、他のいかなるマウスまたはヒト由来のタンパク質とも結合しないような抗体を挙げることができる。

【0066】本実施態様のための抗体は、常法を用いて(例えば、新生化学実験講座1、タンパク質1、p.389-

397、1992)、抗原となるタンパク質、あるいはそのアミノ酸配列から選択される任意のポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。また、公知の方法(例えば、Kohler and Milstein, Nature 256, 495-497, 1975; Kennet, R. ed., Monoclonal Antibody p.365-367, 1980, Penum Press, N.Y.)に従って、本発明のタンパク質に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエロマ細胞とを融合させることによりハイブリドマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

【0067】本実施態様に用いられる抗体を作製するための抗原としては、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1-163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその少なくとも6個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペプチド、もしくは配列番号4のアミノ酸番号1-163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその少なくとも6個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいはそれらポリペプチドに任意のアミノ酸配列や担体が付加された形の誘導体を挙げることができるが、好ましくは配列表の配列番号21のアミノ酸番号1-16に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端に、キーホールリンペットヘモシアニンを担体として結合させたものである。

【0068】配列表の配列番号2のアミノ酸番号1-163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号4のアミノ酸番号1-163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、例えば、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232-720に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26-514に示されるヌクレオチド配列にコードされるポリペプチドを遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、上記ヌクレオチド配列を有するDNAを適当なベクターDNAに組み込むことにより、他の原核生物、または真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらにこれらのベクターに適当なプロモーター、および形質発現に関わる配列を導入することにより、それぞれの宿主において遺伝子を発現させることが可能である。

【0069】原核細胞の宿主としては、例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)や枯草菌(*Bacillus subtilis*)などが挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質転換させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコンすなわち複製起点と、調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させる。また、ベクターとしては、形質転換細胞に表現形質(表現型)の選択性を付与することができる配列を有するものが好ましい。

【0070】例えば、大腸菌としてはK12株などがよく用いられ、ベクターとしては、一般にpBR322やpUC系のプラスミドが用いられるが、これらに限定さ

れず、公知の各種菌株、およびベクターがいずれも使用できる。

【0071】プロモーターとしては、大腸菌においては、トリプトファン(*trp*)プロモーター、ラクトース(*lac*)プロモーター、トリプトファン・ラクトース(*tac*)プロモーター、リポプロテイン(*lpp*)プロモーター、ポリペプチド鎖伸張因子Tu(*tufB*)プロモーター等が挙げられ、どのプロモーターも目的のポリペプチドの産生に使用することができる。

10 【0072】枯草菌としては、例えば207-25株が好ましく、ベクターとしてはpTUB228(Ohmura, K. et al. (1984) J. Biochem. 95, 87-93)などが用いられるが、これに限定されるものではない。枯草菌の-アミラーゼのシグナルペプチド配列をコードするDNA配列を連結することにより、菌体外での分泌発現も可能となる。

【0073】真核細胞の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母などの細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるCOS細胞(Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182, ATCC CRL-1650)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO細胞、ATCC CCL-61)のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株(Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4126-4220)等がよく用いられているが、これらに限定されない。

【0074】脊椎動物細胞の発現プロモーターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終結配列等を有するものを使用でき、さらにこれは必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、サイトメガロウイルス初期プロモーターを有するpCR3.1(Invitrogen社製)、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr(Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol. 1, 854-864)等が挙げられるが、これに限定されない。

【0075】宿主細胞として、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自立増殖が可能であり、さらに、転写プロモーター、転写終結シグナル、およびRNAスプライス部位を備えたものを用いることができる。該発現ベクターは、ジエチルアミノエチル(DEAE)-デキストラン法(Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res, 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法(Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) Virology 52, 456-457)、および電気パルス穿孔法(Neumann, E. et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845)などによりCOS細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、抗生物質G418耐性

マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo (Sambrook, J. et al. (1989) : "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) やpSV2neo (Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341)などをコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより、目的のポリペプチドを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

【0076】昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、鱗翅類ヤガ科のSpodoptera frugiperdaの卵巣細胞由来株化細胞(Sf-9またはSf-21)やTrichoplusia niの卵細胞由来High Five細胞(Wickham, T. J. et al, (1992) Biotechnol. Prog. 1: 391-396)などが宿主細胞としてよく用いられ、バキュロウイルストランスファーベクターとしてはオートグラフィア核多角体ウイルス(AcNPV)のポリヘドリンタンパク質のプロモーターを利用したpVL1392/1393がよく用いられる(Kidd, I. M. and V.C. Emery (1993) The use of baculoviruses as expression vectors. Applied Biochemistry and Biotechnology 42, 137-159)。この他にも、バキュロウイルスのP10や同塩基性タンパク質のプロモーターを利用したベクターも使用できる。さらに、AcNPVのエンベロープ表面タンパク質GP67の分泌シグナル配列を目的タンパク質のN末端側に繋げることにより、組換えタンパク質を分泌タンパク質として発現させることも可能である(Zhe-mei Wang, et al. (1998) Biol. Chem., 379, 167-174)。

【0077】真核微生物を宿主細胞とした発現系としては、酵母が一般によく知られており、その中でもサッカロミセス属酵母、例えばパン酵母Saccharomyces cerevisiaeや石油酵母Pichia pastorisが好ましい。該酵母などの真核微生物の発現ベクターとしては、例えば、アルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター(Bennetzen, J. L. and Hall, B. D. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3018-3025)や酸性フォスファターゼ遺伝子のプロモーター(Miyanohara, A. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1-5)などを好ましく利用できる。また、分泌型タンパク質として発現させる場合には、分泌シグナル配列と宿主細胞の持つ内在性プロテアーゼあるいは既知のプロテアーゼの切断部位をN末端側に持つ組換え体として発現することも可能である。例えば、トリプシン型セリンプロテアーゼのヒトマスト細胞トリプターゼを石油酵母で発現させた系では、N末端側に酵母のファクターの分泌シグナル配列と石油酵母の持つKEX2プロテアーゼの切断部位をつなぎ発現させることにより、活性型トリプターゼが培地中に分泌されることが知られている(Andrew, L. Niles, et al. (1998) Biotechnol. Appl. Biochem. 28, 125-131)。

【0078】上記のようにして得られる形質転換体は、

常法に従い培養することができ、該培養により細胞内、または細胞外に目的のポリペプチドが産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば、上記COS細胞であれば、RPMI1640培地やダルベッコ変法イーグル培地(以下「DMEM」という)などの培地に、必要に応じウシ胎児血清などの血清成分を添加したものを使用できる。

【0079】上記培養により、形質転換体の細胞内または細胞外に産生される組換えタンパク質は、該タンパク質の物理的性質や化学的性質などを利用した各種の公知の分離操作法により分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば、通常のタンパク沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せなどを例示できる。また、発現させる組換えタンパク質に6残基からなるヒスチジンを繋げることにより、ニッケルアフィニティークラムで効率的に精製することができる。上記方法を組み合わせることにより容易に高収率、高純度で本発明のポリペプチドを大量に製造できる。

【0080】上記のようにして得られる抗体は、RIA法、ELISA法、蛍光抗体法、受身血球凝集反応法などの各種免疫学的測定法や免疫組織染色などに用いることができる。

【0081】4) 検出

上記3)記載の方法で得られる抗体は、それを直接標識するか、または該抗体を一次抗体とし、該抗体を特異的に認識する(抗体を作製した動物由来の抗体を認識する)標識二次抗体と協同で検出に用いられる。

【0082】標識の種類として好ましいものは酵素(アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ)またはビオチン(ただし二次抗体のビオチンにさらに酵素標識ストレプトアビジンを結合させる操作が加わる)であるが、これらに限定されない。標識二次抗体(または標識ストレプトアビジン)を使用する方法のための、予め標識された抗体(またはストレプトアビジン)は種々のものが市販されている。RIAの場合はI¹²⁵等の放射性同位元素で標識された抗体を用い、測定は液体シンチレーションカウンター等を用いて行う。

【0083】これら標識された酵素の活性を検出することにより、抗原であるポリペプチドの量が測定される。アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼの場合、それら酵素の触媒により発色する基質や発光する基質が市販されている。

【0084】発色する基質を用いた場合、ウエスタンブロット法やドット/スロットブロット法においては目視で検出できる。ELISA法においては、好ましくは市

販のマイクロプレートリーダーを用いて各ウエルの吸光度（測定波長は基質により異なる）を測定することにより定量する。また好ましくは上記3）において抗体作製のために使用した抗原の希釈系列を調製し、これを標準抗原試料として他の試料と同時に検出操作を行って、標準抗原濃度と測定値をプロットした標準曲線を作成することにより、他の試料中の抗原濃度を定量することが可能である。

【0085】一方、発光する基質を使用した場合は、ウエスタンプロット法やドット/スロットプロット法においてはX線フィルムまたはイメージングプレートを用いたオートラジオグラフィーや、インスタントカメラを用いた写真撮影により検出することができ、デンシトメトリーやモレキュラー・イメージャーF×システム（パイオラッド社製）等を利用した定量も可能である。また、ELISA法で発光基質を用いる場合は、発光マイクロプレートリーダー（例えば、パイオラッド社製等）を用いて酵素活性を測定する。

【0086】5)測定操作

i)ウエスタンプロット、ドットプロットまたはスロットプロットの場合

まず、抗体の非特異的吸着を阻止するため、予めメンブレンをそのような非特異的吸着を阻害する物質（スキムミルク、カゼイン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン等）を含む緩衝液中に一定時間浸しておく操作（ブロッキング）を行う。ブロッキング溶液の組成は、例えば5% スキムミルク、0.05乃至0.1% ツイーン20を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）またはトリス緩衝生理食塩水（TBS）が用いられる。スキムミルクの代わりに、ブロックエース（大日本製薬）、1乃至10%のウシ血清アルブミン、0.5乃至3%のゼラチンまたは1%のポリビニルピロリドン等を用いてもよい。ブロッキングの時間は、4で16乃至24時間、または室温で1乃至3時間である。

【0087】次に、メンブレンを0.05乃至0.1% ツイーン20を含むPBSまたはTBS（以下「洗浄液」という）で洗浄して余分なブロッキング溶液を除去した後、上記3）記載の方法で作製された抗体をブロッキング溶液で適宜希釈した溶液中に一定時間浸して、抗体をメンブレン上の抗原に結合させる。このときの抗体の希釈倍率は、例えば上記3）記載の組換え抗原を段階希釈したものを試料とした予備のウエスタンプロット実験を行って決定することができる。この抗体反応操作は、好ましくは室温で2時間行う。抗体反応操作終了後、メンブレンを洗浄液で洗浄する。ここで、用いた抗体が標識されたものである場合は、ただちに検出操作を行うことができる。未標識の抗体を用いた場合には、引き続き二次抗体反応を行う。標識二次抗体は、例えば市販のものを使用する場合はブロッキング溶液で20

00乃至20000倍に希釈して用いる（添付の指示書に好適な希釈倍率が記載されている場合は、その記載に従う）。一次抗体を洗浄除去した後のメンブレンを二次抗体溶液に室温で45分乃至1時間浸し、洗浄液で洗浄してから、標識方法に合わせた検出操作を行う。洗浄操作は、例えばまずメンブレンを洗浄液中で15分間振盪してから、洗浄液を新しいものに交換して5分間振盪した後、再度洗浄液を交換して5分間振盪することにより行う。必要に応じてさらに洗浄液を交換して洗浄してもよい。

【0088】ii)ELISA/RIA

まず、上記2）の方法で試料を固相化させたプレートのウェル内底面への抗体の非特異的吸着を阻止するため、ウエスタンプロットの場合と同様、予めブロッキングを行っておく。ブロッキングの条件については、ウエスタンプロットの項に記載した通りである。

【0089】次に、ウェル内を0.05乃至0.1% ツイーン20を含むPBSまたはTBS（以下「洗浄液」という）で洗浄して余分なブロッキング溶液を除去した後、上記3）記載の方法で作製された抗体を洗浄液で適宜希釈した溶液を分注して一定時間インキュベーションし、抗体を抗原に結合させる。このときの抗体の希釈倍率は、例えば上記3）記載の組換え抗原を段階希釈したものを試料とした予備のELISA実験を行って決定することができる。この抗体反応操作は、好ましくは室温で1時間程度行う。抗体反応操作終了後、ウェル内を洗浄液で洗浄する。ここで、用いた抗体が標識されたものである場合は、ただちに検出操作を行うことができる。未標識の抗体を用いた場合には、引き続き二次抗体反応を行う。標識二次抗体は、例えば市販のものを使用する場合は洗浄液で2000乃至20000倍に希釈して用いる（添付の指示書に好適な希釈倍率が記載されている場合は、その記載に従う）。一次抗体を洗浄除去した後のウェルに二次抗体溶液を分注して室温で1乃至3時間インキュベーションし、洗浄液で洗浄してから、標識方法に合わせた検出操作を行う。洗浄操作は、例えばまずウェル内に洗浄液を分注して5分間振盪してから、洗浄液を新しいものに交換して5分間振盪した後、再度洗浄液を交換して5分間振盪することにより行う。必要に応じてさらに洗浄液を交換して洗浄してもよい。

【0090】また本発明において、いわゆるサンドイッチ法のELISAは例えば以下に記載する方法により実施することができる。まず、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1-163に示されるアミノ酸配列および配列番号4のアミノ酸番号1-163に示されるアミノ酸配列のいずれか一つにおいて、親水性に富む領域を2箇所選んで、それぞれの領域中のアミノ酸6残基以上からなる部分ペプチドを合成し、該部分ペプチドを抗原とした2種類の抗体を取得する。このうち一方の抗体を上記4）記載のように標識しておく。標識しなかった方の抗

体は、上記2)記載の方法に準じて96穴ELISA用プレートのウェル内底面に固相化する。ブロッキングの後、試料液をウェル内に入れて常温で1時間インキュベーションする。ウェル内を洗浄後、標識した方の抗体希釈液を各ウェルに分注してインキュベーションする。再びウェル内を洗浄後、標識方法に合わせた検出操作を行う。

【0091】6) 評価

以上に記載した方法で、被検物質存在下で培養した細胞由来の試料と、被検物質非存在下で培養した細胞由来の試料との間で検出結果を比較し、その結果上記3)記載の方法で作製された抗体が特異的に結合するポリペプチドの産生量を低下させた被検物質は、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤となり得る。また、上記3)記載の方法で作製された抗体、およびその他上記の一連の方法に用いられる試薬をまとめることにより、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤を試験するためのキットが提供される。

【0092】配列表の配列番号2および3のアミノ酸番号1-163に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、上記の抗体作製の抗原を得る方法の記載に従って得られる他、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232-720に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26-514に示されるヌクレオチド配列を有するDNAを組み込んだレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターを利用して動物細胞に産生させることもできる。そのような組換えレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターを構築する方法として、市販のキット(例えば、Retro-X System(クロンテック社製)、アデノウイルス・エクスプレッション・ベクター・キット(宝酒造(株)社製))を用いる方法を例示できる。

【0093】本発明はまた、多数の被検物質をスクリーニングして、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤としての可能性を有する物質を機能的に同定するための試験方法を提供する。すなわち、ODF刺激依存的に発現の促進されるような遺伝子のプロモーターDNAの支配下にあり、該プロモーター活性の検出を可能ならしめる遺伝子(以下「マーカー遺伝子」という)の発現プラスミドとともに、(i)配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232-720に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26-514に示されるヌクレオチド配列を有する遺伝子を哺乳類細胞で発現可能にした組換えベクターを同時トランスフェクションした群;および(ii)上記組換えベクターから配列表の配列番号1または2のDNA部分を除いたベクターのみを同時トランスフェクションした群を設定し、それぞれの群における該マーカー遺伝子の発現量を比較する実験系において、上記培養時に被検試料を添加することにより上記各群の該マーカー遺伝子の

発現量に差異が現れるか否かを調べることにより実施することができる。用いられる動物細胞は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232-720に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26-514に示されるヌクレオチド配列を有する遺伝子を哺乳類細胞で発現可能にした組換えベクターをトランスフェクションした場合に、該マーカー遺伝子の発現量が亢進するものでなければならず、(i)群における該マーカー遺伝子の発現量と(ii)群における発現量の差が大きいものほど好ましい。このような系において、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232-720に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26-514に示されるヌクレオチド配列にコードされるポリペプチドの産生が促進されるような条件下での該マーカー遺伝子の発現を強く抑制するような試料は、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療や予防剤として有用な物質であると考えられる。

【0094】本発明の方法において、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232-720に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26-514に示されるヌクレオチド配列を有する遺伝子を哺乳類細胞で発現させるためのベクターの例としては、pCR3.1(インビトロジェン社製)、pCMV-Script(ストラタジーン社製)等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0095】本発明の方法において用いられる動物細胞は、該細胞への配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232-720に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26-514に示されるヌクレオチド配列を有する遺伝子を哺乳類細胞で発現可能にした組換えベクターをトランスフェクションした場合に、該マーカー遺伝子の発現量が亢進するものであればよい。そのような細胞として、RAW264.7細胞を挙げることができるが、これに限定されない。

【0096】マーカー遺伝子の転写を開始させるためのプロモーターは、破骨細胞の分化誘導に伴って特異的に発現の上昇する遺伝子由来のものであればよく、好適には、TRAPやカテプシンKのプロモーターDNA中のODFに応答して転写を促進するのに必要な領域(ODF応答領域)を含むものであればよい。好ましい態様においては、後に本明細書中で詳しく説明するように、マウスTRAP 5'末端側上流領域約1.9kb(-1855~+2位を含有する)やマウスカテプシンK 5'末端側上流領域約1.7kb(-1670~+5位を含有する)であるが、これらに限定されない。

【0097】上記プロモーター下流に連結されるマーカー遺伝子にコードされるマーカータンパク質は、宿主である上記細胞が本発明の方法の一連の過程において産生し得る他のいかなるタンパク質とも特異的に区別可能な

もの（好ましくは、形質転換前の上記細胞が該マーカータンパク質と同一または類似のタンパク質をコードする遺伝子を持たないようなもの）であればよい。例えば、マーカータンパク質が該細胞に対して毒性を有するようなものや、該細胞が感受性を有する抗生物質の耐性を付与するものであるような場合でも、マーカー遺伝子の発現の有無は細胞の生存率で判定することが可能である。しかしながら、本発明で用いられるマーカー遺伝子としてより好ましいものは、発現量を特異的かつ定量的に検出することができる（例えば該マーカー遺伝子にコードされるタンパク質に対する特異的抗体が取得されているような）構造遺伝子である。さらに好ましくは、いわゆるレポーター遺伝子、すなわち外来の基質と特異的に反応することにより定量的測定が容易な代謝産物を生じるような酵素等をコードする遺伝子である。そのようなものとして、以下に挙げるようなタンパク質をコードする遺伝子を例示することができるが、本発明はそれらに限定されない：

クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ：クロラムフェニコールにアセチル基を付加する。いわゆるCATアッセイ等で検出可能。プロモーターを組み込むだけでレポーターアッセイ用のベクターを調製できるベクターとしてpCAT3-Basicベクター（プロメガ社製）が市販されている；

ホタルルシフェラーゼ：ルシフェリンを代謝した際に生じる生物発光を測定することにより定量する。同じくレポーターアッセイ用のベクターとしてpGL3-Basicベクター（プロメガ社製）が市販されている；

- ガラクトシダーゼ：呈色反応、蛍光または化学発光でそれぞれ測定可能な基質がある。レポーターアッセイ用のベクターとしてpGal-Basic（プロメガ社製）が市販されている；

分泌型アルカリホスファターゼ：呈色反応、生物発光または化学発光でそれぞれ測定可能な基質がある。レポーターアッセイ用のベクターとしてpSEAP2-Basic（クロンテック社製）が市販されている；

緑色蛍光タンパク質（green-fluorescent protein）：酵素ではないが、自らが蛍光を発するので直接定量できる。同じくレポーターアッセイ用のベクターとしてpEGFP-1（クロンテック社製）が市販されている。

【0098】培養細胞株に発現プラスミドを導入する方法としては、DEAE-デキストラン法（Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1295-1308）、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法（Graham, F. L. and van der Eb, A.J. (1973) Virology 52, 456-457）、電気パルス穿孔法（Neumann, E. et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845）、リポフェクション法（Lopata et al. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717, Sussman and Milman (1984) Mol. Cell. Biol. 4, 1641-1643）等を挙げるができるが、これらに限定され

ず、本発明の属する技術分野において汎用される他の方法も採用することができる。ただし、培養細胞株がいわゆる浮遊細胞である場合は、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法以外の方法を用いることが好ましい。いずれの方法においても、用いる細胞に応じて、至適化されたトランスフェクション条件を用いる。

【0099】このようにして配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232-720に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26-514に示されるヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現ベクターと、レポーター発現ベクターを同時トランスフェクションした細胞を培養すると、マーカー遺伝子の転写が促進される。マーカー遺伝子の発現が可能な条件下で培養するにあたって、培地中に任意の被検物質を添加した条件および添加しない条件を設定して培養後、マーカー遺伝子の発現量を測定し、被検物質の添加によりマーカー遺伝子の発現量に変化が生じるか否かを検定する。「マーカー遺伝子の発現が可能な条件」は、細胞が生存して、タンパク質の生産が可能な条件であればよいが、好ましくは、使用される細胞株に適合した培地（ウシ胎児血清等の血清成分を添加してもよい）を使用し、4乃至6%（最も好適には5%）の炭酸ガスを含む空気存在下、36乃至38（最も好適には37）で2乃至3日間（最も好適には2日間）培養する。

【0100】このような系において、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232-720に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26-514に示されるヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現ベクターを導入した際のレポーター遺伝子の発現誘導を抑制するような被検物質は、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤として有用な候補物質として選択される。

【0101】以上のような、一過的な遺伝子導入法を利用した試験方法とは別に、マーカー遺伝子、および配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232-720に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26-514に示されるヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現ベクターで宿主細胞を二重に形質転換した細胞を利用した試験方法も採択可能である。この場合には、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232-720に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26-514に示されるヌクレオチド配列を有する遺伝子を誘導性に哺乳類細胞で発現できるように、pIND（インビトロジェン社製）やpTet-On（クロンテック社製）等の発現ベクターを利用して、該遺伝子の発現を誘導する条件下で該マーカー遺伝子の発現が促進されるような細胞株を樹立することが必要となる。この形質転換細胞の作出においては、導入される遺伝子は、宿主細胞の染色体に組み込まれるなどして、宿主細胞の継代を重ねても安定的

に保持されることが望ましいので、そのように形質転換された細胞を選択する目的で、導入遺伝子に抗生物質耐性等の選択マーカー（例えば、ネオマイシン（またはG418）耐性遺伝子neo等）が連結されたものをトランスフェクションに用いるか、もしくは別個に調製した該選択マーカーと導入遺伝子とを同時トランスフェクションすることが好ましい。その後は該選択マーカーの特性を利用することにより、安定的に形質転換された細胞を選択する。

【0102】このようにして得られた細胞株に対して、10 配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232-720に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26-514に示されるヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現を誘導する条件におくと、マーカー遺伝子の転写が促進される。マーカー遺伝子の発現が可能な条件下で培養するにあたって、培地中に任意の被検物質を添加した条件および添加しない条件を設定して培養後、マーカー遺伝子の発現量を測定し、被検物質の添加によりマーカー遺伝子の発現量に変化が生じるか否かを検定する。配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232-720に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26-514に示されるヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現が促進されるような誘導条件下で、該マーカー遺伝子の発現を強く抑制するような試料は、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤として有用な物質であると考えられる。

【0103】また、他の一つの態様は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号232-720に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号26-514に示されるヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわち配列表の配列番号2または配列番号4に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド（以下「jdp-2ホモログ」という）の機能を抑制するような物質を得ることを目的とした、該ポリペプチドの立体構造をベースとしたドラッグデザインの手法を含む。このような手法は、ラショナルドラッグデザイン法として知られており、酵素活性などの機能や、リガンド、コファクター、またはDNAへの結合などを効率よく阻害もしくは活性化させるような化合物の探索に利用されている。この例として、すでに上市されている抗HIV剤であるプロテアーゼの阻害剤がよく知られている。jdp-2ホモログは、その推定アミノ酸配列上、塩基性領域とそれに続くロイシンジッパー構造を有しているが、これと類似した構造を持つc-fosやc-junでは、すでに三次元構造解析がなされている（Grover and Harrison (1995) Nature 373, 257-261）。したがって、jdp-2ホモログの三次元構造解析においても、X線結晶解析や核磁気共鳴法といった一般的によく知られている手法が利用できると思

えられる。さらに、jdp-2ホモログの機能を抑制する物質の探索には、コンピュータドラッグデザイン（CADD）を活用した設計も可能である。この例としては、慢性関節リウマチ治療の新たなゲノム新薬として期待されているAP-1の働きを阻害する低分子化合物（国際特許出願公開WO99/58515号）などが知られている。このような方法により、jdp-2ホモログに直接結合したり、あるいはjdp-2ホモログと他の因子やDNAなどとの結合を阻害することにより、jdp-2ホモログの機能を抑制するような物質を得ることができる。

【0104】前述したように、jdp-2ホモログはTRAPやカテプシンKプロモーターの活性化作用を有しており、このことから、jdp-2ホモログは破骨細胞化に関与する転写因子として機能している可能性が考えられる。したがって、このような手法により得られた試料は、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤として有用な物質であると考えられる。

【0105】さらに、他の一つの態様は、jdp-2ホモログが会合するポリペプチド、すなわちjdp-2ホモログのパートナータンパク質に関する。jdp-2ホモログが有するロイシンジッパーモチーフは、すでにいくつかの転写因子、例えばJunファミリーに属する転写因子（例：c-Jun；JunD；JunB；およびv-Jun）、Fosファミリーに属する転写因子（例：c-Fos；FosB；Fra1；Fra2；およびv-Fos）、ATF1、B-ATF、CREBおよびUSF中に同定されている（Gou, B., et al., Biochemistry 36 (1997) 14447-14455; Dorsey, M.J., et al., Oncogene 11 (1995) 2255-2265; Lu, T., and Sawadogo, M., J. Biol.Chem. 269 (1994) 30694-30700）。これら転写因子は互いのロイシンジッパー構造を介して、ホモまたはヘテロ二量体を形成し、特異的遺伝子の転写を制御することが多数報告されている（Hai, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88: 3720-3724, 1991）。本発明において、jdp-2ホモログには、TRAPやカテプシンKプロモーターの活性化作用を有することが明らかにされた。したがって、jdp-2ホモログは、タンパク質相互作用を介して、ホモまたはヘテロ二量体を形成し、核のアダプタータンパク質、転写因子、または転写因子の補助活性因子として機能する可能性が示唆される。すなわち、本発明は、jdp-2ホモログの活性を調節するパートナータンパク質のスクリーニング方法に関する。jdp-2ホモログの有するTRAPやカテプシンKプロモーター活性化作用を調節するタンパク質としては、直接jdp-2ホモログに結合して活性を促進あるいは阻害するタンパク質の他に、細胞膜受容体や細胞内タンパク質に作用して、間接的にjdp-2ホモログの機能を促進あるいは阻害するタンパク質が含まれる。

【0106】このスクリーニング方法の一つの態様は、j d p - 2 ホモログに被検タンパク質試料を接触させ、j d p - 2 ホモログに結合するタンパク質を選択する工程を含む。このような方法としては、例えば、精製した j d p - 2 ホモログを用いて、これに結合するタンパク質のアフィニティー精製を行う方法が挙げられる。具体的な方法の一例を示せば、j d p - 2 ホモログにヒスチジン6個よりなる配列をアフィニティータグとして融合したものを作製して、これを細胞の抽出液（予めニックル - アガロースカラムにチャージして、このカラムを素通りした画分）と4 で12時間インキュベートし、次いで、この混合物に別途ニックル - アガロース担体を加えて4 で1時間インキュベートする。ニックル - アガロース担体を洗浄バッファーで十分洗浄した後、100 mMイミダゾールを加えることにより、j d p - 2 ホモログと特異的に結合する細胞抽出液中のタンパク質を溶出させて精製し、この構造を決定する。このようにして、j d p - 2 ホモログと直接結合するタンパク質、およびj d p - 2 ホモログとの結合活性は持たないが、サブユニットとしてj d p - 2 ホモログに直接結合するタンパク質と複合体を形成することにより間接的にj d p - 2 ホモログに結合するタンパク質が精製できる（実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ5「転写因子研究法」pp215 - 219（羊土社刊））。

【0107】別の方法としては、ファウエスタンプロット法（実験医学別冊、「新遺伝子工学ハンドブック」pp76 - 81（羊土社刊））や、酵母や哺乳類動物細胞を用いたツーハイブリッドシステム法（実験医学別冊、「新遺伝子工学ハンドブック」pp66 - 75（羊土社刊）、「チェックメイト・マンリアン・ツーハイブリッドシステム」（プロメガ社製））によるクローニングも可能であるが、これらの方法に限定されない。

【0108】他の一つの態様は、j d p - 2 ホモログの産生亢進に伴って、破骨細胞化マーカー遺伝子の発現が促進されるような細胞に、被検DNAを導入し、マーカー遺伝子の発現を調節する活性を有する発現産物をコードするDNAを選択する工程を含む。このような方法には、例えば、j d p - 2 ホモログの発現ベクター導入によるTRAPやカテプシンKなどのマーカー遺伝子の発現誘導が、遺伝子発現ライブラリーとの同時トランスフェクションにより、促進あるいは阻害されるようなクローンを選択し、j d p - 2 ホモログに結合するタンパク質をコードする遺伝子を選択する。この方法により、j d p - 2 ホモログに直接あるいは間接的に結合して、j d p - 2 ホモログの機能を調節しうる遺伝子を得ることができる。なお、j d p - 2 ホモログの発現ベクター導入によるTRAPやカテプシンKなどのマーカー遺伝子の発現誘導時に、被検DNAを導入する代わりに、遺伝子ライブラリーを導入した細胞の培養上清とをインキュベートして、TRAPやカテプシンKなどのマーカー遺

伝子の発現誘導を促進あるいは阻害するタンパク質あるいはこれをコードする遺伝子を単離することも可能である。この方法により、細胞膜受容体などを介して間接的にj d p - 2 ホモログによるマーカー遺伝子の発現誘導活性を調節するタンパク質をコードする遺伝子を得ることができる。

【0109】このようにして、j d p - 2 ホモログと直接もしくは間接的に相互作用するパートナータンパク質のcDNAが得られれば、i) j d p - 2 ホモログと該パートナータンパク質との相互作用を阻害する物質や、ii) j d p - 2 ホモログと該パートナータンパク質との相互作用によって誘導される破骨細胞化マーカー遺伝子の発現誘導を阻害する物質の機能的スクリーニングに利用することができる。具体的には、まず、i) の場合には、例えば、j d p - 2 ホモログとグルタチオンS - トランスフェラーゼとの融合タンパク質を調製して、抗グルタチオンS - トランスフェラーゼ抗体で覆ったマイクロプレートに結合させた後、ビオチン化した該パートナータンパク質をこの融合タンパク質と接触させ、該融合タンパク質との結合をストレプトアビジン化アルカリフォスファターゼで検出する。ビオチン化した該パートナータンパク質添加の際、被検物質も添加し、融合タンパク質と該パートナータンパク質との結合を促進あるいは阻害する物質を選択する。この方法では、融合タンパク質に直接作用する物質または該パートナータンパク質に直接作用する物質が得られる。

【0110】融合タンパク質と該パートナータンパク質との結合が間接的であり、何らかの別の因子を介しているような場合には、例えば該因子を含むような細胞抽出液存在下で、同様に上記アッセイを行う。この場合には、該因子に対して作用するような物質も選択される可能性がある。また例えば、j d p - 2 ホモログに結合するパートナータンパク質が生体内でj d p - 2 ホモログによる破骨細胞化マーカー遺伝子の発現を促進するような活性を持つようなものである場合には、このタンパク質とj d p - 2 ホモログとの結合を阻害するような物質は、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤として有用であると考えられる。

【0111】また、得られたパートナータンパク質が、単独もしくはj d p - 2 ホモログと共同してTRAPやカテプシンKなどのマーカー遺伝子の発現誘導を引き起こす活性を有している場合には、既に記載したj d p - 2 ホモログの発現ベクターを利用した試験方法に従って、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤として有用な候補物質のスクリーニングを行うことができる。また、得られたパートナータンパク質が、j d p - 2 ホモログの有するTRAPやカテプシンKなどのマーカー遺伝子の発現誘導活性を抑制する活性を有している場合には、このような阻害因子をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、骨粗鬆症もしくは

は関節リウマチの遺伝子治療に用いることができる。

【0112】そのようなポリヌクレオチドは、例えば同定された阻害因子のアミノ酸配列を解析し、該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプローブを合成してcDNAライブラリーやゲノムライブラリーのスクリーニングを行うことにより取得できる。また、マーカー遺伝子の発現誘導の阻害活性を有するペプチドが、ランダムに合成された人工ペプチドライブラリー由来である場合は、該ペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなるDNAを

10 化学合成する。
【0113】遺伝子治療においては、そのようにして得られた阻害因子をコードするポリヌクレオチドを、例えばウイルスベクターに組み込んで、該組換えウイルスベクターを有するウイルス（無毒化されたもの）を患者に感染させる。患者体内では阻害因子が産生され、jdp-2ホモログの機能を阻害するので、破骨細胞への分化が抑制されて、骨吸収活性を抑制することができる。

【0114】遺伝子治療剤を細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターを利用した遺伝子導入方法、あ

20 るいは非ウイルス性の遺伝子導入方法（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、実験医学増刊、12(15)(1994)、実験医学別冊「遺伝子治療の基礎技術」、羊土社（1996））のいずれの方法も適用することができる。
【0115】ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンピスウイルス等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに、TR4あるいは変異TR4をコードするDNAを組み込んで

30 導入する方法が挙げられる。このうち、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスを用いた方法が、特に好ましい。非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。
【0116】また遺伝子治療剤を実際に医薬として作用

40 させるには、DNAを直接体内に導入するインビボ（in vivo）法およびヒトからある種の細胞を取り出し体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻すエクスピボ（ex vivo）法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48（1994）、実験医学増刊、12（15）（1994））。
【0117】例えば、該遺伝子治療剤がインビボ法により投与される場合は、疾患、症状等に応じ、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等、適当な投与経路により投与される。またインビボ法により投与する場合は、該遺伝

子治療剤は一般的には注射剤等とされるが、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス-リポソーム等）の形態にした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤とすることができる。

【0118】jdp-2ホモログをコードするDNA配列に相補的なヌクレオチド配列は、いわゆるアンチセンス治療に用いることができる。アンチセンス分子は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1-1642（より好適には、ヌクレオチド番号232-720）に示されるヌクレオチド配列の一部または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号1-1495（より好適には、ヌクレオチド番号26-514）に示されるヌクレオチド配列の一部に相補的な、通常15乃至30merからなるDNA、もしくはそのホスホロチオエート、メチルホスホネートまたはモルフォリノ誘導体などの安定なDNA誘導体、2'-O-アルキルRNAなどの安定なRNA誘導体として用いられ得る。そのようなjdp-2アンチセンス分子を、微量注入、リポソームカプセル化により、あるいはアンチセンス配列を有するベクターを利用して発現させるなど、本発明の技術分野において周知の方法で、細胞に導入することができる。このようなアンチセンス療法は、jdp-2活性を減少させることが有用な病気、特に、骨粗鬆症や関節リウマチの治療に有用である。

【0119】jdp-2アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬として有用な組成物は、医薬として許容できる担体の混合などの公知の方法によって製造され得る。このような担体と製造方法の例は、レミントンのPharmaceutical Sciencesに記載されている。そして、jdp-2の発現や活性に異常の認められる骨粗鬆症や関節リウマチ疾患の治療に十分な量を各人に投与される。その有効量は、各人の状態、体重、性別、及び年齢などの種々の因子や、皮下、局所、経口、及び筋肉内といった投与方法の違いによって変化し得る。例えば、静脈注射する場合には、0.02乃至0.2mg/kg/時間で2時間、また、皮下投与の場合には、1乃至200mg/m²/日のように変化し得る。

【0120】

【実施例】 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0121】実施例1．グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）とマウス破骨細胞分化因子（ODF）細胞外領域の融合タンパク質（GST-mODF）の調製

GenBankデータベースに登録されているマウスODF遺伝子配列（登録番号：019048）のうち、細胞外領域に相当する部分のcDNAを取得し、さらに制限酵素SmaIで認識される配列を付加するため、下記のヌク

レオチド配列: 5'-gtgcccgggc agcgttctc agg -3'
(S1: 配列表の配列番号5); および5'-catccccggg
cagtctatgt cctgaact -3' (AS1: 配列表の配列番
号6)を有する2種類のオリゴヌクレオチドプライマー
を、DNA合成機(オリゴ1000(ベックマン社製))を用
いて合成した。

【0122】マウス骨髄初代培養細胞より、RNA抽出
試薬(ISOGEN(ニッポンジーン(株)社製))を
添付のプロトコールに従って用いることにより、総RN
Aを取得し、RT-PCRをキット(RNA PCRキ
ット AMV ver 2.1(宝酒造(株)社製))を用
いて実施した。すなわち、まずこの総RNAについて
42で30分間逆転写反応を行ない一本鎖DNAを合
成した(反応液量20 μ l)。逆転写反応のプライマー
としては、キット添付のランダムプライマーを使用し
た。

【0123】次いで、この一本鎖DNAを鋳型として、
上記オリゴヌクレオチドS1およびAS1をプライマー
として用いて、PCRを行なった(反応液量100 μ
l。温度条件: 94で1分、55で30秒、72
20で30秒の温度サイクルを35回繰り返した)。このP
CR後の反応液を一部とり、TAKAクロニングキット
(インビトロジェン社製)を添付のプロトコールに従
って用いて、増幅されたDNA断片をプラスミド(pCR
II)にクロニングすることにより、プラスミドpC
RII-mODFを得た。挿入されたDNA断片は、ジ
デオキシヌクレオチド鎖終結法により、ヌクレオチド
配列を確認した。

【0124】得られたプラスミドpCRII-mODF
を、制限酵素SmaIで消化し、1.0%アガロースゲ
ル電気泳動により分離後、mODF DNA断片を精製
した。一方で、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ
(以下「GST」という)発現用プラスミドpGEX-
3X(アマシャム・ファルマシア社製)も制限酵素Sm
aIで同様に消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動
により精製した。そして、これらの断片を、DNAライ
ゲーションキット(バージョン2、宝酒造(株)社製)
を用いて連結し、GST-mODF発現プラスミドpG
EX-3X-mODFを得た。

【0125】b) GST-mODFタンパク質の大腸菌
40における発現と精製
先に得たpGEX-3X-mODFのプラスミドは、p
GEX-3X由来のlacプロモーター支配下のGST
遺伝子にリーディングフレームが合うようにmODF遺
伝子が連結されているので、このプラスミドを宿主に導
入することによりGST-mODF融合タンパクの発現
が可能である。なお、配列表の配列番号7にpGEX-
3X-mODFで発現される融合タンパク質のアミノ酸
配列を示した。

【0126】上記のプラスミドpGEX-3X-mOD 50

Fで、大腸菌TOP10株を常法により形質転換した。
pGEX-3X-mODFを保有するTOP10株を、
アンピシリン100 μ g/mlを含むL-broth培
地(10g トリプトン(ディフコ社製)、5g イー
ストエクストラクト(ディフコ社製)、5g 塩化ナト
リウムをそれぞれ1リットルの水溶液に含む)にて、3
7で4時間振とう培養を行なった後、アンピシリン1
00 μ g/mlを含むL-broth培地3リットルに
5.0%(v/v)植菌し、37にて3時間振とう培
養を行なった。その後、イソプロピル-D-チオガ
ラクトピラノシドを終濃度0.1mMになるように添加
し、25で20時間振とう培養を行なった。培養終
了後、培養液を遠心分離(8000 \times g、10分)して
沈澱した菌体を回収し、150mlのダルベッコリン酸
バッファー(以下「PBS」という)に懸濁した。その
後、超音波処理にて菌体を破碎し、トライトンX-10
0を終濃度1%(v/v)となるように加え、室温で3
0分間静かに振とうした。高速遠心分離(11000 \times
g、15分)により未破碎菌体を除去した後、その上清
にグルタチオンセファロース4Bゲルを1.5ml添加
し、30分間静かに振とうした。パッチ法により、10
mM還元型グルタチオン溶液(PBSに溶解したもの)
7.5mlを用いて溶出した。溶出液は、10mM ト
リス-塩酸(pH7.0)で平衡化したDEAEトヨパ
ール650Mカラムに添加し、陰イオン交換クロマトグ
ラフィーを、塩化ナトリウムの直線濃度勾配(0-1
M)をかけることにより行った。溶出液の一部をとっ
て、SDSポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度12.5
%)電気泳動を行ない、予想される融合タンパク質の分
子量(46000)に相当する位置にバンドが見られる
フラクションを集めた。回収された粗精製物をさらに、
PBSで平衡化したセファクリルS-100を用いたゲ
ルろ過法により精製した。溶出液の一部をとって、SD
Sポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度12.5%)電気
泳動を行ない(分子量マーカーとしてアプロ社製プレ
ステインドマーカーSP-0120を用いた)、予想され
る融合タンパク質の分子量(46000)に相当する位
置にバンドが見られるフラクションを集めた。このよ
うにして得られた融合タンパク質を以下の実施例に使用し
た。

【0127】実施例2. 分子インデックス法による発
現変動遺伝子の取得

マウス細胞株RAW264.7をGST-mODFで刺
激することによって発現が変動する遺伝子を取得するた
め、分子インデックス法(Kato K., (1995) Nucleic Ac
ids Res., 23, 3685-3690)を用いた解析を実施した。

【0128】まず、RAW264.7細胞(大日本製薬
(株)社より購入)を10%ウシ胎児血清(ギブコ・ピ
ーアールエル社製)を含むDME M培地(ギブコ・ピ
ーアールエル社製)で、 2×10^7 細胞/mlに調製して

大角フラスコ(培養面積225cm²。住友ベークライト(株)社製)に蒔き、GST-mODFを未添加、もしくは終濃度で100ng/mlとなるように加えて、37、5%炭酸ガス下で48時間培養した。

【0129】次いで、全RNA抽出用試薬(TRIZOL試薬:ギブコ・ビーアールエル社製)を添付のプロトコールに従って用いることにより、RAW264.7細胞からの全RNAの抽出を行った。得られた全RNAを用いて、分子インデックス法による解析を行った。なお、原法(Kato K., (1995) Nucleic Acids Res., 23, 3685-3690)ではクラスII制限酵素を複数種類用いているが、本実施例では制限酵素としてFokIのみを用い、それ以外は原法に従って実施した。

【0130】分子インデックス法操作で得られたPCR産物は、ポリアクリルアミドゲル(50%尿素、10%スーパーリーディングDNAシーケンス溶液(東洋紡(株)社製)、1×TBE(0.089Mトリス-ホウ酸、0.089Mホウ酸、0.001Mエチレンジアミン四酢酸(以下「EDTA」という)、pH8.0)で電気泳動した(45W、1時間)。次いで、泳動後のゲルを、モレキュラー・イメジャーF×(バイオラッド社製)を用いてスキャンして、ゲル上で分離された蛍光標識されたDNAフラグメントを検出した。GST-mODF添加の有無により変化が見られるバンドについては、剃刀刃でバンド部分のゲルを切り出し、100μlの再蒸留水を添加してから、-20で凍結保存した。使用時に、凍結融解を2から3回繰り返すことによりゲルからDNAを溶出させ、軽く遠心(1000回転、1分間)して、ゲルを沈殿させ、その上清をDNAフラグメント溶液として増幅のための鋳型に用いた。

【0131】フラグメントの増幅にあたっては、PCR用プライマーとして下記のヌクレオチド配列:

5'-gtacatattgtcgttagaacgc-3'(CIS:配列表の配列番号8);および5'-ggatccttttttttttttttta-3'(DAPA1:配列表の配列番号9)

を有するオリゴヌクレオチドを合成した。次いで、サーマルサイクラー(ジーンアンプPCRシステム9600、(株)パーキンエルマー・アプライドバイオシステムズ事業部製)を使用して以下の条件でPCRを行った。プライマーC1SおよびDAPA1(終濃度各0.8μM)、10μlジーンアンプ10×PCRバッファー(PEバイオシステムズジャパン社製)、12μl25mM塩化マグネシウム、10μl2mM dNTPs、10μl上記DNAフラグメント溶液を加え、再蒸留水で100μlとした。さらに10U/μlTaqStoffelフラグメント(PEバイオシステムズジャパン社製)を1μl添加した。この反応液を、まず94で2分間加熱した後、94で30秒、55で1分、72で1分の温度サイクルを

20回繰り返してから、7210分加熱し、4で保温した。このPCR反応液中に含まれる増幅されたDNAを、精製キット(QIAquick PCR Purification Kit:キアジェン社製)を添付のプロトコールに従って用いることにより精製した。

【0132】精製したフラグメントを1.5ng/mlに調製し、TAKAクローニングキット(宿主大腸菌付属:インビトロジェン社製)を添付のプロトコールに従って用いることにより、プラスミドベクター(pCR2.1)に連結した。この組換えプラスミドDNAでキット添付の宿主大腸菌INV F'を形質転換し、アンピシリン耐性のコロニーを得た。これらのコロニーを選択してプラスミドを抽出し、75bpのDNAインサートを有するプラスミドpCR2.1-A574を回収した。

【0133】得られたプラスミドpCR2.1-A574に挿入されているcDNAの全ヌクレオチド配列を(株)パーキンエルマー・アプライドバイオシステムズ事業部製ABIプリズム3700DNAシーケンサーを用いて解析した結果、配列表の配列番号10に示される配列であることが判明した。

【0134】実施例3.cDNAのクローニング RAW264.7細胞を材料として、下記の方法に従って配列表の配列番号10に示されるヌクレオチド配列を含むcDNAを取得した。

【0135】a) RAW264.7細胞からのmRNA抽出およびcDNAライブラリーの作製 RAW264.7細胞を10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で、 2×10^7 細胞/mlに調製して大角フラスコに蒔き、GST-mODFを未添加もしくは終濃度で100ng/mlとなるように加えて、37、5%炭酸ガス下で48時間培養した。次いで、全RNA抽出用試薬(TRIZOL試薬:ギブコ・ビーアールエル社製)を添付のプロトコールに従って用いることにより、RAW264.7細胞より全RNAを抽出した。さらに、得られた全RNAから、mRNA精製用試薬(オリゴテックス-MAG:宝酒造(株)社製)を添付のプロトコールに従って用いることにより、mRNAを精製した。このようにして得られた5μgのmRNAを鋳型とし、cDNAライブラリー作成キット(ZAPエクスプレス・cDNA:ストラタジーン社製)をその添付プロトコールに従って用いることにより、プラスミドcDNAライブラリーを作製した。なお、クローニングベクターとしては、pCR3.1(インビトロジェン社)を用いた。

【0136】b)cDNAライブラリーのスクリーニング 上記a)記載の方法で得られたプラスミドcDNAライブラリーから配列表の配列番号10に示されるヌクレオチド配列を含む全長cDNAを取得することを目的として、ジーントラッパー法によるcDNA選択キット(ジ

ートラッパー cDNA ポジティブセレクションシステム：ギブコ・ビーアールエル社製）をその添付プロトコールに従って用いた。なお、取得にあたっては、下記のヌクレオチド配列：

5'- tccaccaccagtttaaggccatt -3' (GT-1：配列表の配列番号11)

を有するオリゴヌクレオチドを合成し、プローブとして用いた。また、コロニーPCR逆方向PCRプライマーとして、下記のヌクレオチド配列：

5'- taggaaggggttacaaggatgga -3' (ZNF-3'：10 配列表の配列番号12)

を有するオリゴヌクレオチドを合成した。

【0137】ジーントラッパー法により得られた大腸菌コロニーをいくつか選択して鋳型とし、上記GT-1およびZNF-3'をプライマーとし、キットのプロトコール記載の方法でコロニーPCRを実施して、DNA断片の特異的増幅が見られたコロニーを選択、培養した。その結果、1.8kbのcDNAインサートを有するプラスミドpCR3.1-A574(1.8k)を保持する形質転換大腸菌を単離した。

【0138】得られたプラスミドに挿入されているcDNAの全ヌクレオチド配列を(株)パーキンエルマージャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製ABIプリズム3700DNAシーケンサーを用いて解析した結果、配列表の配列番号1に示される配列であることが判明した。この配列は、GenBankデータベースにラットjun-dimerization protein 2(以下「jdp-2」という)として登録されている配列(登録番号：U53449)と高い相同性を有していた。また、予想されるアミノ酸配列は、ラットjdp-2のアミノ酸配列と100%一致していた。この結果、得られた遺伝子は、マウスjdp-2をコードするものであることが判明した。

【0139】プラスミドpCR3.1-A574を制限酵素NheIとXhoIで二重消化し、切り出されたインサートDNAを、同様にXbaIとSalIで消化したpUC18ベクターに連結して、プラスミドpUC-A574(1.8k)を得た。このプラスミドを保持する形質転換大腸菌E.coli pUC18-A574(1.8k)SANK 70600は、2000(平成12)年7月19日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託され、受託番号FERM BP-7238が付された。

【0140】実施例4. マウスjdp-2のN末端欠失変異体発現ベクターの構築

上記実施例3で得られたcDNAから予想されるタンパク質のN末端欠失変異体を動物細胞で発現させて機能解析を行うためのベクター構築を行った。

【0141】まず、PCR用に以下に示す3種類の順方向プライマー：

5'- atgctagcggcctgccactcctcctgctatgatgcctg -3' (5'-1F：配列表の配列番号13)；

5'- atgctagcggctcggccccctcaccggacttcccagct -3' (5'-46F：配列表の配列番号14)；および

5'- atgctagcttctgcagaggaggagtcagagcggctggagc -3' (5'-110F：配列表の配列番号15)；

ならびに、C末端にHAタグ(インフルエンザウイルスヘマグルチニン由来9アミノ酸のエピトープタグ)を付加するように設計した逆方向PCRプライマー：

5'- tactcgagtcagcatagctctggaacgtcgttaaggatacttctgtccagctgctc -3' (3'-HA-R)：配列表の配列番号16)

を合成した。

【0142】そして、実施例3で得られたマウスjdp-2遺伝子を含むプラスミドpCR3.1-A574(1.8k)を鋳型とし、サーマルサイクラー(ジーンアンプPCRシステム9600、(株)パーキンエルマージャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製)を使用して以下の条件でPCRを行った。

20 【0143】順方向及び逆方向プライマー(終濃度各0.2μM)、PCR試薬(ワンショットLA PCRミックス：宝酒造(株)社製) 25μl、プラスミドpCR3.1-A574(1.8k) 0.16μgを加え、再蒸留水で50μlとして反応液を調製した。この反応液を、まず94で2分間加熱した後、94で30秒、55で30秒、72で1分の温度サイクルを25回繰り返してから、72で6分加熱し、4で保温した。

30 【0144】この反応物を0.8%アガロースゲル(ギブコ・ビーアールエル社製)で電気泳動した。電気泳動後のゲルを臭化エチジウムで染色した後、紫外線照射下で約540bp、約480bp、約230bpに相当するバンド部分を剃刀刃を用いて各々分離した。このゲル中に含まれるDNAを精製キット(QIAquick Gel Extraction Kit：キアジェン社製)を用いて添付のプロトコールにしたがって精製した。

【0145】精製したフラグメントの一部を制限酵素NheIとXhoIで消化し、精製キット(QIAquick PCR Purification Kit：キアジェン社製)を添付のプロトコールにしたがって用いることにより精製した。一方、pCR3.1ベクター(インビトロジェン社製)を同様にNheIとXhoIで消化し、末端をウシ小腸アルカリホスファターゼ(東洋紡(株)社製)を用いて脱リン酸化した後、精製キット(QIAquick PCR Purification Kit)を添付のプロトコールにしたがって用いることにより精製し、上記DNA断片とDNAライゲーションキット(バージョン2：宝酒造(株)社製)を用いて連結した。このDNAで大腸菌DH5のコンピテント細胞(東洋紡(株)社製)を形質転換し、アンピシリン耐性のコロニーを得た。いくつかのコロニーの培養菌体から

プラスミドを抽出して制限酵素Nhe IとXho Iで二重切断処理し、jdp-2断片(約540bp、約480bp、または約230bp)と約5kbpのpCR3.1ベクター断片が生じることを指標として、jdp-2 cDNAが挿入されたプラスミドDNAを取得した。得られたプラスミドDNAに挿入されているヌクレオチド配列を解析し、目的のヌクレオチド配列と一致することを確認した。得られたプラスミドをpCR3.1-mjdp-2(1-163)HA、pCR3.1-mjdp-2(46-163)HA、pCR3.1-mjdp-2(110-163)HAと命名した。これらのプラスミドを保有する形質転換大腸菌を50μg/mlのアンピシリンを含む100mlの液体LB培地中で、37℃で一晩培養し、この培養液から、プラスミド大量精製キット(EndoFree Plasmid Maxi Kit:キアジェン社製)を用いてプラスミドを回収し、精製した。

【0146】実施例5. ノーザンプロット解析

a) RAW264.7細胞からの全RNAの抽出

実施例3で得られたcDNAのRAW264.7細胞における発現変動を調べる目的で、ノーザンプロット解析を実施した。まず、RAW264.7細胞を10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で 2×10^7 細胞/55mlに調製したものを大角フラスコに蒔き、GST-mODFを終濃度100ng/mlとなるように加えて、5、24、48、72、96時間、もしくは未添加の状態での、24、96時間培養した。

【0147】次いで、全RNA抽出用試薬(TRIZOL試薬:ギブコ・ビーアールエル社製)を添付のプロトコールに従って用いることにより、それぞれの条件で培養したRAW264.7細胞より全RNAを抽出した。なお、回収した全RNAは-80℃に保存した。

【0148】b)全RNAの電気泳動およびプロッティング

回収した全RNAをRNA試料緩衝液(1×MOPS緩衝液(1×MOPS緩衝液は20mM MOPS、5mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTAを含む)、50%ホルムアミド、18μg/mlプロモフェノールブルー、6.6%ホルムアルデヒド、5%グリセロール)で1μg/mlに調製し、65℃10分間保温した後、氷上で5分間放置し、0.2mg/mlエチジウムブロミドを1μl加えた。この試料液15μlを、ホルムアルデヒドを含む電気泳動用1%アガロースゲル(1×MOPS緩衝液、1%アガロース(ギブコ・ビーアールエル社製)、6%ホルムアルデヒド)のひとつのウェルへ注入し、電気泳動した。電気泳動は、1×MOPS緩衝液の入ったサブマリン電気泳動層中、50Vで約2時間通電することにより行った。

【0149】電気泳動終了後、アガロースゲル中のRNAをキャピラリートランスファー法(Maniatis, T. et al. (1982) in "Molecular Cloning A Laboratory Manu

al" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に従ってナイロンメンブレン(ハイボンドN+、アマシヤム・ファルマシア社製)に一晩かけて転写した(転写用溶液は $20 \times SSC$ を用いた)。このメンブレンを $2 \times SSC$ で5分間洗浄し、風乾させ、クロスリンク用紫外線照射装置(スペクトロリンカーXL-1000、トミー精工(株)社製)で紫外線を照射($1200 J/cm^2$)してRNAを固定した。

【0150】c)プローブの調製

実施例2で合成したプライマーC1S、DAPA1を用い、サーマルサイクラー(ジーンアンプPCRシステム9600、(株)パーキンエルマー・ジャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製)を使用して以下の条件でPCRを行った。まずプライマーC1S、DAPA1(終濃度各0.4μM)、10μl 10×リアクションバッファー(100mM トリス、500mM 塩化カリウム、15mM 塩化マグネシウム、1% Triton-X100)、10μl 2mM dNTPs、1μl プラスミドpCR2.1-A574を加え、再蒸留水で100μlとした。さらに1μlのリコンビナントTaqポリメラーゼ(東洋紡(株)社製)を添加し、反応液を調製した。この反応液を、まず94℃で2分間加熱した後、94℃で1分、55℃で1分、72℃で2分の温度サイクルを30回繰り返してから、72℃10分加熱し、4℃で保温した。

【0151】このPCR反応液中に含まれる増幅されたDNAを、精製キット(QIAquick PCR Purification Kit)を添付のプロトコールに従って用いることにより精製した。得られたDNA溶液2μlについて、ランダムプライマーDNAラベリングキット(宝酒造(株)社製)を添付のプロトコールに従って用いることにより、 ^{32}P で標識されたプローブを調製した。

【0152】d)ハイブリダイゼーション

上記b)で作成したメンブレンを6mlのハイブリダイゼーション溶液(ExpressHyb Hybridization Solution:クローンテック社製)の中に入れて68℃で1時間インキュベーション(プレハイブリダイゼーション)した後、 ^{32}P 標識プローブを含む6mlのハイブリダイゼーション溶液中で68℃、2時間インキュベートした。その後、メンブレンを $2 \times SSC$ 、0.05% SDSを含む溶液中、室温で20分間、3回洗浄し、さらに $0.1 \times SSC$ 、0.1% SDSを含む溶液中、50℃で20分間、3回洗浄してから、イメージングプレート(富士フィルム(株)社製)に曝露し、BAS2000(富士フィルム(株)社製)によるイメージングを行った。

【0153】その結果、検出した遺伝子の発現は、GST-mODF未添加のRAW264.7細胞においてもわずかに認められ、GST-mODFを添加することにより、その発現量が著明に上昇することが明らかとな

った(図1)。

【0154】実施例6. ヒトjdp-2ホモログをコードするcDNAのクローニング

a) ヒトjdp-2遺伝子配列の推定およびプライマー合成

実施例3で得られた、配列番号1に示されるヌクレオチド配列は、GenBankデータベースにラットjdp-2として登録されている配列(登録番号:U53449)と高い相同性を有していた。そこで、ヒトjdp-2ホモログの遺伝子配列をGenBankデータベースより検索したところ、部分配列を得ることができた(登録番号:AF111167)。また、この遺伝子と高い相同性を有するヒトのESTを検索すると、登録番号NM_003442で登録されている配列が得られた。そこで、これら2つの配列を連結することにより、ヒトjdp-2ホモログのアミノ酸をコードする遺伝子配列を推定した(配列番号17)。このcDNAをPCRにより取得するためのプライマーとして、下記のヌクレオチド配列:

5'-cagctcggccctgactgtggag-3' (GT-1F:配列表の配列番号18);および

5'-gcggtgtcggttcagcatcag-3' (GT-2R:配列表の配列番号19)

を有するオリゴヌクレオチドを合成した。

【0155】b) cDNAライブラリーのスクリーニング

ヒトjdp-2ホモログ全長をコードするcDNAを取得することを目的として、ジントラッパー cDNAポジティブセレクションシステム(ギブコ・ビーアールエル社製)をその添付プロトコールに従って用いた。なお、取得にあたっては、スーパースクリプトヒト脾臓cDNAライブラリー(ギブコ・ビーアールエル社製)、および上記a)で合成したGT-1F(プローブとして使用)を用いた。単離した大腸菌コロニーを鋳型とし、GT-1FおよびGT-2Rをプライマーとして、プロトコール記載の方法でPCRを実施した結果、DNA断片の特異的増幅が見られたコロニーを選択、培養し、約1.6kbpのcDNAインサートを有するプラスミドpCMV・SPORT-hjdp-2を保持する形質転換大腸菌E.coli pCMV・SPORT-hjdp-2/DH12Sを単離した。

【0156】得られたプラスミドに挿入されているcDNAの全ヌクレオチド配列を解析した結果、配列表の配列番号3に示される配列であることが判明した。この配列も、ラットjdp-2との間に高い相同性を有していた。

【0157】実施例7. ヒトjdp-2遺伝子発現ベクターの構築

上記実施例6で得られたヒトjdp-2ホモログをコードする遺伝子(以下「ヒトjdp-2遺伝子」という) 50

を動物細胞で発現させ機能解析を行うためのベクター構築を行った。まず、PCR用逆方向プライマーとして、下記のヌクレオチド配列:

5'-cccgaattcactcacaagcccattgtca-3' (jdp2RS:配列表の配列番号20)

を有するオリゴヌクレオチドを合成した。そして、実施例6で得られたヒトjdp-2遺伝子を含むプラスミドpCMV・SPORT-hjdp-2を鋳型とし、実施例4で使用した順方向プライマー5'-1F(配列表の配列番号13)および逆方向プライマーjdp2RSを用いて、サーマルサイクラー(ジーンアンプPCRシステム9600、(株)パーキンエルマー・アプライドバイオシステムズ事業部製)を使用して以下の条件でPCRを行い、ヒトjdp-2タンパク質をコードするDNA配列を増幅した。上記各プライマー(終濃度各0.4μM)、10μl 10×LA PCRバッファ-1I(Mg²⁺フリー)(宝酒造(株)社製)、10μl 2.5mM dNTPs、25mM 塩化マグネシウム、1μl プラスミドDNA(pCMV・SPORT-hjdp-2)を加え、再蒸留水で200μlとした。さらに2μl Taqポリメラーゼ(TaKaRa LA Taq:宝酒造(株)社製)を添加し、反応液を調製した。この反応液を、まず94で2分間加熱した後、94で1分、55で1分、72で2分の温度サイクルを30回繰り返してから、72で7分加熱し、4で保温した。

【0158】得られたPCR反応液は、エタノール沈殿させた後に、1×ローディングバッファ(0.1% SDS、0.5% グリセロール、0.005% ブロモフェノールブルー)25μlに溶解した。この試料液全量を、電気泳動用1%アガロースゲル(1×TBE緩衝液、1% アガロース(宝酒造(株)社製)、)ひとつのウェルへ注入し、電気泳動した。

【0159】電気泳動は、1×TBE緩衝液の入ったサブマリン電気泳動層中、100Vで約30分通電することにより行った。電気泳動終了後、アガロースゲルを1μg/mlのエチジウムブロミド溶液で10分間染色し、観察された約500bpのバンドを含むゲル片を、剃刀刃で切り出した。このゲル片から、精製キット(QIAquick PCR Purification Kit:キアジェン社製)を添付のプロトコールに従って用いることによりDNA断片を精製した。50μlの再蒸留水で溶出したDNA断片は、添付のバッファを含む反応液中でNheIおよびEcoRI制限酵素で消化し、NheIおよびEcoRI消化したプラスミドベクターpCR3.1に挿入することにより、ヒトjdp-2遺伝子発現ベクターpCR3.1-hjdp-2を得た。

【0160】プラスミドpCR3.1-hjdp-2を制限酵素NheIとEcoRIで二重消化し、切り出されたインサートDNAを、同様にXbaIとEcoRI

消化したpUC18ベクターに連結して、プラスミドpUC-hjdp-2を得た。このプラスミドを保持する形質転換大腸菌E.coli pUC18-hjdp-2 SANK 70700は、2000(平成12)年7月19日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託され、受託番号FERM BP-7237が付された。

【0161】実施例8. ポリクローナル抗体の作製とウエスタンブロット解析

a) ポリクローナル抗体の作製

配列表の配列番号1および同配列番号3に示されるヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列、すなわち配列表の配列番号2および同配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをいずれも認識する抗体を作製する目的で、抗原として、それらマウスおよびヒトのjdp-2ホモログポリペプチドの間で保存されている領域から選ばれたアミノ酸配列:

Cys-Val-Lys-Leu-Gly-Lys-Arg-Pro-Gln-Pro-Val-Lys-Ser-Glu-Leu-Asp (配列表の配列番号21)

を有するペプチドを化学合成法で合成した(使用機器: 20 パーキンエルマー・ジャパン社製モデル433)。ただし、このアミノ酸配列は、後に担体としてキーホールリンペットヘモシアニン(以下「KLH」という)を結合させるため、本来のアミノ酸配列のN末端にシステイン残基が付加されたものである。

【0162】次に、この合成ペプチド 10.5mgおよびKLH 23.0mgを、N-(6-マレイミドカプロイロキシ)スクシニミド(EMCS、同仁化学研究所(株)社製)試薬を用いて縮合させた(縮合反応溶媒として8M尿素および0.9%塩化ナトリウムを含む0.02Mリン酸緩衝液(pH7.5)を用い、室温で15時間保温した)。この反応液を8M尿素溶液中に入れた後、流水に対して透析し、さらに純水に対して透析を行ってから凍結乾燥し、KLHが結合したペプチド抗原を得た。これらのペプチド抗原10mgに1mlの生理食塩水を加え、超音波発振機(ソニケーター)、ボルテックスミキサー、ガラス棒等を用いて細かい懸濁液にした。その後、生理的食塩水で全量を10mlとし、さらに1mlずつバイアルに小分けして凍結保存した。

【0163】免疫の際には、上記バイアル1本分の抗原溶液を融解し、同量のアジュバンドと混合してウサギ2羽の背中に皮下、または皮内に注射した。アジュバンドはフロイント完全アジュバンドを用いて行い、2回目以降の免疫ではフロイントの不完全アジュバンドを用いた。免疫は2週間おきに合計で4回行い、2回めの免疫以降、試験採血を行い血清中の抗体価を固層法による酵素免疫測定法(ELISA)で調べた。96穴のELISA用プレート(住友ベークライト(株)社製、96穴Hタイプ)に各々の抗原ペプチドをコーティングし、西

洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体を二次抗体として使用した。4回目の免疫から12日後に全採血を行った。このときに得られた抗血清を以下の操作で抗体として使用した。

【0164】b) COS-1細胞での発現およびウエスタンブロット解析

実施例4で得られた、全長のマウスjdp-2のC-末端にHAを付加したタンパク質を発現するように構築されたプラスミドpCR3.1-mjdp-2(1-163)HAでCOS-1細胞をトランスフェクションした。COS-1細胞へのトランスフェクションは、市販のトランスフェクション試薬(FuGENE 6トランスフェクション試薬(ロシュ・ダイアグノスティックス(株)社製))を用いて、添付のプロトコールに従って行った。すなわち、まず10%ウシ胎児血清(ギブコ・ビーアールエル社製)を含むDMEM培地(ギブコ・ビーアールエル社製)中でCOS-1細胞をセミコンフルエントになるまで増殖させ、細胞培養用シャーレ(60mm、コーニング社製)に、 $2.8 \times 10^5 / 5\text{ml}$ で蒔き、37、5%炭酸ガス下で一晩培養した。

【0165】翌日、FuGENE 6試薬(15μl)と血清を含まないDMEM培地(250μl)を混合し、室温で5分間静置した溶液全量をpCR3.1-mjdp-2(1-163)HAプラスミド、またはjdp-2 cDNAを含まないネガティブコントロールプラスミドpCR3.1 5μgに、混ぜながら滴下した。この混合物を室温で15分間静置した後、全量を上記細胞培養用シャーレ中のCOS-1細胞に滴下して静かに混合し、37で2日間培養した。

【0166】培養後の細胞を氷冷した2mlのPBS(-)で2回洗浄後、250μlのRIPAバッファー(PBS(-)に、1%ノニデットP-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDSおよびプロテアーゼ阻害剤としてコンプリート・ミニ(ロシュ・ダイアグノスティックス(株)社製)を1錠/10mlの割合で含む)を加えて、4で5分間静置した後、セルスクレーパ(ヌンク社製)で細胞を掻き取り、その細胞懸濁液を1.5mlのエピペンドルフチューブへ移して、氷上で20分間静置した。15,000rpm、4で20分間遠心後の上清を全細胞抽出液として回収し、-20で保存した。全細胞抽出液中のタンパク質濃度は、タンパク質濃度測定用試薬(BCAプロテインアッセイ試薬:ピアース社製)を用いて測定した。

【0167】このようにして得られた全細胞抽出液10μg分に対して、6xSDSローディングバッファー(0.35Mトリス-塩酸(pH6.8)、10.28%SDS、36%グリセロール、5%β-メルカプトエタノール、0.012%プロモフェノール・ブルー)を1/6容量加えて、沸騰水浴にて3分間加熱し、10-20%ポリアクリルアミド密度勾配ゲル

(パジェルNPG-1020L型、アトー(株)社製)を用いて、還元条件下でSDS-PAGEを行った。

【0168】電気泳動後、ポリアクリルアミドゲルからタンパク質を転写緩衝液(25mMトリス、192mMグリシン、20%メタノール)中でゲルメンブレン転写装置(マリソル社製、KS-8452)を用いて0、180分、200mAの条件でPVDF膜(バイオラッド社製)に転写した。

【0169】転写後のPVDF膜を1×TBS(20mMトリス-塩酸(pH7.6)、137mM塩化ナトリウム)中、室温で5分間振とうして洗浄した後、ブロッキング試薬(ブロックエース:大日本製薬(株)社製)30mlに浸して、4で一晩放置した。翌日、PVDF膜を0.1%のツイーン20を含む1×TBS(以下「1×TBS-T」という)で一回洗浄した後、上記a)で得られた抗体(以下「jdp-2-N抗体」という)を10%ブロッキング試薬を含む1×TBS-Tで1000倍希釈した溶液10mlに浸して、室温で2時間穏やかに振とうした。次いで、PVDF膜を取り出し、1×TBS-Tで軽く2回洗浄した後、15分間×1回、次いで5分間×2回洗浄した。その後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体(アマシャム・ファルマシア社製)を10%ブロックエースを含む1×TBS-Tで2000倍に希釈した溶液10mlにPVDF膜を浸して、室温で1時間振とうした。PVDF膜を取り出し、1×TBS-Tで軽く2回洗浄した後、15分間×1回、次いで5分間×3回洗浄した。洗浄後、PVDF膜をラップフィルム上に置き、化学発光による検出用試薬(ECLプラス ウェスタンブロッティング検出溶液:アマシャム・ファルマシア社製)を用いて、jdp-2-N抗体が結合するバンドの検出を行った。具体的には、PVDF膜をラップフィルム上に置き、検出用試薬に5分間浸した後、X線フィルム(ハイパーフィルムECL:アマシャム・ファルマシア社製)を4分間感光させた後、X線フィルムを現像した。

【0170】その結果、jdp-2-N抗体により、pCR3.1-mjdp-2(1-163)HAプラスミドDNAを導入して得られたCOS-1細胞全抽出液中に特異的なバンドが検出された(図2)。

【0171】なお、上記実験系において、例えば被検物質存在下または非存在下で培養し、破骨細胞への分化誘導刺激したRAW264.7細胞から試料を調製し、以下同様の操作を行うことにより、被検物質の骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤としての効果を調べることができる。この実験において検出される抗原量を低下させるような被検物質は、骨粗鬆症もしくは関節リウマチの治療または予防剤となり得る。多検体処理を行う場合には、電気泳動を省略してドットプロットやスロットプロットを行うこともできる。

【0172】c)RAW264.7細胞での発現およびウエスタンブロット解析

実施例4で得られた、全長のマウスjdp-2のC-末端にHAを付加したタンパク質を発現するように構築されたプラスミドpCR3.1-mjdp-2(1-163)HAでRAW264.7細胞を以下に記載する方法によりトランスフェクションした。まず、セミコンフルエントになるまで増殖させた大角フラスコに、PBS(-)(ダルベッコPBS(-))「ニッスイ」:日水製薬(株)社製)を加えて、セルスクレーパー(住友ベークライト社製)を用いて細胞を掻きとって回収した。その細胞を1×TBS(++)(25mMトリス-塩酸(pH7.5)、137mM塩化ナトリウム、5mM塩化カリウム、0.5mMリン酸二ナトリウム、0.49mM塩化マグネシウム、0.68mM塩化カルシウム)に懸濁して細胞数をカウントし、 3.5×10^6 個分ずつ15ml遠心チューブに移し、遠心して細胞を回収した。一方で、pCR3.1-mjdp-2(1-163)HAプラスミド、またはjdp-2 cDNAを含まないネガティブコントロールプラスミドpCR3.1 4μg、0.5mg/mlのDEAE-デキストラン(プロメガ社製)を含む1×TBS(++)(0.4ml)を調製した。このDNA/DEAE-デキストラン溶液で先の 3.5×10^6 個分の細胞を再懸濁させ、10分おきに軽く攪拌しながら、30分間室温でインキュベーションした。次いでこの細胞を5mlの1×TBS(++)(0.4ml)添加により希釈し、遠心することにより回収し、7.5mlの10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地に懸濁して、そのうちの3mlを細胞培養用シャーレ(60mm、コーニング社製)に蒔き、37、5%炭酸ガス下で2日間培養した。

【0173】培養後の細胞を氷冷した2mlのPBS(-)で2回洗浄後、1.5mlのPBS(-)を加えて、セルスクレーパー(ヌンク社製)で細胞を掻き取り、その細胞懸濁液を15mlの遠心チューブへ移し、氷上で保存した。掻き取った後のシャーレに1.5mlのPBS(-)を加えて軽くリンスし、その液を先程の細胞懸濁液と合わせて、1,000rpm、4で5分間遠心して細胞を回収した。集めた細胞を150μlのバッファA(10mM HEPES(pH7.9)、10mM塩化カリウム、1mMEDTA、0.5mMEGTAおよびプロテアーゼ阻害剤としてコンブリート・ミニ(ロシュ・ダイアグノスティクス(株)社製)を1錠/10mlの割合で含む)に懸濁し、1.5mlのエッペンドルフチューブに移して、15分間氷上に静置した。10%ノニドットP-40を9.6μl加えて、ボルテックスミキサーで3秒間混合後、氷上に1分間静置してから、5000rpm、4で5分間遠心した。遠心後の上清を細胞質画分として回収し、沈殿には50μlのバッファB(20mM H

EPES (pH 7.9) に 420 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA、1 mM EGTA、20% グリセロールおよびプロテアーゼ阻害剤としてコンプリート・ミニ (ロシュ・ダイアグノスティクス (株) 社製) を 1 錠 / 10 ml の割合で含む) を加えて、マイクロプレートミキサーを使って、4 で 30 分間激しく混合した。その混合物を 14000 rpm、4 で 20 分間遠心した上清を核画分として回収した。

【0174】このようにして得られた両画分から、各々 1/8.3 容量ずつとり、6 × SDS ローディングバッファー (0.35 M トリス - 塩酸 (pH 6.8)、10.28% SDS、36% グリセロール、5% -メルカプトエタノール、0.012% プロモフェノール・ブルー) を 1/6 容量加えて、沸騰水浴中で 3 分間加熱し、10 - 20% ポリアクリルアミド密度勾配ゲル (パジェル NPG - 1020 L 型、アトー (株) 社製) を用いて、還元条件下で SDS - PAGE を行った。

【0175】電気泳動後、ポリアクリルアミドゲルからタンパク質を転写緩衝液 (25 mM トリス、192 mM グリシン、20% メタノール) 中でゲルメンブレン転写装置 (マリソル社製、KS - 8452) を用いて 0、180 分、200 mA の条件で PVDF 膜に転写した。

【0176】転写後の PVDF 膜を 1 × TBS 中、室温で 5 分間振とうして洗浄した後、ブロッキング試薬 30 ml に浸して、4 で一晩放置した。翌日、PVDF 膜を 1 × TBS - T で一回洗浄した後、10% ブロッキング試薬を含む 1 × TBS - T で 0.2 μg/ml に希釈した抗 HA (高親和性) 抗体 (ロシュ・ダイアグノスティクス (株) 社製) 溶液 10 ml に浸して、室温で 2 時間穏やかに振とうした。PVDF 膜を取り出し、1 × TBS - T で軽く 2 回洗浄した後、15 分間 × 1 回、次いで 5 分間 × 2 回洗浄した。その後、10% ブロッキング試薬を含む 1 × TBS - T で 2000 倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG 抗体 (サンタクルーズ社製) 溶液 10 ml に浸して、室温で 1 時間振とうした。PVDF 膜を取り出し、1 × TBS - T で軽く 2 回洗浄した後、15 分間 × 1 回、次いで 5 分間 × 3 回洗浄した。洗浄後、PVDF 膜をラップフィルム上に置き、上記 b) と同様の操作を行って抗 HA 抗体が結合するバンドの検出を行った (ただし、感光は 2 分間)。

【0177】その結果、マウス jdp - 2 (1 - 163) HA タンパク質と思われる特異的バンドは、マウス jdp - 2 (1 - 163) HA プラスミド DNA を導入した RAW264.7 細胞においてのみ認められ、また、細胞質画分に比べて、核画分で強く検出された (図 3)。この結果、jdp - 2 タンパク質は、主に核に存在することが示唆された。

【0178】実施例 9. マーカープラスミドの構築
マウスカテプシン K プロモーターおよびマウス酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) プロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミドを下記の方法にしたがって構築した。

【0179】a) プラスミド pGL3 - mCTSK - 1.7 の構築

マウス染色体 DNA は、約 2×10^7 個の RAW264.7 細胞を出発材料として、DNA 抽出精製キット (Blood & Cell Culture DNA Midi Kit (キアジェン社製)) を添付のプロトコールにしたがって用いることにより調製した。

【0180】一方、PCR プライマーとして、下記のヌクレオチド配列:

5' - atggctacctc gactcgtatct gggctctctc tactca -3'

(プライマー 1: 配列表の配列番号 22) および

5' - taagatctgt gagcgaaga ctaagggtgc tagat -3'

(プライマー 2: 配列表の配列番号 23)

を有するオリゴヌクレオチドを化学合成した。

【0181】上記プライマー (終濃度各 0.2 μM) と、25 μl の PCR 用試薬混液 (ワンショット LA PCR ミックス (宝酒造 (株) 社製))、上記マウス染色体 DNA 1 μg および滅菌水を加えて全量 50 μl とし、PCR を行った (温度条件: 94 で 2 分間加熱してから、次に 98 で 20 秒、68 で 2 分 30 秒の温度サイクルを 30 回繰り返し、さらに 72 10 分加熱した後、4 に冷却、保存した)。

【0182】この反応物を 0.8% アガロースゲル (ギブコ・ビーアールエル社製) で電気泳動した。電気泳動後のゲルを臭化エチジウムで染色した後、紫外線照射下で約 1.7 kb に相当するバンド部分を剃刀刃を用いて分離した。このゲル中に含まれる DNA を、抽出精製キット (QIAquick Gel Extraction Kit (キアジェン社製)) を添付のプロトコールに従って用いることにより精製した。

【0183】次に、精製された DNA 断片の一部を制限酵素 Kpn I と Bgl II で消化し、70 で 15 分間保温して酵素を失活させた。一方、ルシフェラーゼ発現ベクター pGL3 - Basic (プロメガ社製) を同様に Kpn I と Bgl II で消化し、末端をウシ小腸アルカリホスファターゼ (東洋紡 (株) 社製) を用いて脱リン酸化した後、上記 DNA 断片と DNA ライゲーションキット (バージョン 2、宝酒造 (株) 社製) を用いて連結した。この DNA で大腸菌 DH5 のコンピテント細胞 (東洋紡 (株) 社製) を形質転換し、アンピシリン耐性のコロニーを得た。

【0184】いくつかのコロニーの培養菌体からプラスミドを抽出して、制限酵素 Kpn I と Bgl II で二重切断処理し、約 1.7 kb p と約 4.8 kb p の断片が生じることを指標として、マウスカテプシン K 遺伝子の

5'末端側上流域DNA(配列表の配列番号27)が挿入されたプラスミドDNAを取得した。このプラスミドをpGL3-mCTS K-1.7と命名した。このプラスミドを保有する形質転換大腸菌を50 μ g/mlのアンピシリンを含む100mlの液体LB培地中で、37

で一晩培養し、この培養液から、プラスミド抽出精製キット(エンドフリー・プラスミド・マキシ・キット(キアジェン社製))を用いてpGL3-mCTS K-1.7 DNAを回収し、精製した。

【0185】b) プラスミドpGL3-mTRAP-1.9の構築
GenBankデータベースにマウスTRAP遺伝子5'末端として登録されているゲノム配列(登録番号:M85212)を参考にして、PCRプライマーとして、下記のヌクレオチド配列:

5'-atggtagccgggtctcccttaactcctgggactctg-3'(配列表の配列番号24); および

5'-gtctctagatctgtgaggaagagaggaggttcaga-3'(配列表の配列番号25)

を有するオリゴヌクレオチドを合成した。

【0186】上記各プライマー(終濃度各0.2 μ M)と、25 μ lのワンショットLAPCRミックス(宝酒造(株)社製)、実施例8のa)で得られたマウス染色体DNA 1 μ gに滅菌水を加えて全量50 μ lとし、以下の条件でPCRを行った。94で2分間加熱した後、98で20秒、68で2分30秒の温度サイクルを30回繰り返してから、72で10分加熱し、4で保存した。この反応物を0.8%アガロースゲル(ギブコ・ビーアールエル社製)で電気泳動した。電気泳動後のゲルを臭化エチジウムで染色した後、紫外線照射下で約1.9kbpに相当するバンド部分を剃刀刃を用いて分離した。このゲル中に含まれるDNAを抽出精製キット(QIAquick Gel Extraction Kit)を添付のプロトコールに従って用いることにより精製した。

【0187】次に、精製されたDNA断片の一部を制限酵素KpnIとBglIIで消化し、70で15分間保温して酵素を失活させた。一方、ルシフェラーゼ発現ベクターpGL3-Basic(プロメガ社製)を同様にKpnIとBglIIで消化し、末端をウシ小腸アルカリホスファターゼ(東洋紡(株)社製)を用いて脱リン酸化したものを、精製キット(QIAquick PCR Purification Kit)を添付のプロトコールにしたがって用いることにより精製した。このpGL3-BasicのKpnI-BglII消化物と上記DNA断片とをDNAライゲーションキット(バージョン2、宝酒造(株)社製)を用いて連結した。このDNAで大腸菌DH5のコンピテント細胞(東洋紡(株)社製)を形質転換し、アンピシリン耐性のコロニーを得た。いくつかのコロニーの培養菌体からプラスミドを抽出して制限酵素KpnIとBglIIで二重切断処理し、約1.9kbpと約

4.8kbpの断片が生じることを指標として、マウスTRAP遺伝子5'末端側上流域DNA(配列表の配列番号26、GenBankデータベースの登録番号M85212に示される配列上で、atg開始コドンのヌクレオチドaを+1とした時の-1846~+2に相当するが、完全に同一ではなく挿入配列が存在する)が挿入されたプラスミドDNAを取得し、このプラスミドをpGL3-mTRAP-1.9と命名した。このプラスミドを保有する形質転換大腸菌を50 μ g/mlのアンピシリンを含む100mlの液体LB培地中で、37

で一晩培養し、この培養液から、エンドフリー・プラスミド・マキシ・キット(キアジェン社製)を用いてpGL3-mTRAP-1.9 DNAを回収し、精製した。

【0188】実施例10. トランスフェクション法およびレポーターアッセイ

RAW264.7細胞を、中角フラスコ(培養面積75cm²;住友ベークライト(株)社製)で、10%ウシ胎児血清およびペニシリン(100単位/ml)およびストレプトマイシン(100 μ g/ml)を含むDME M培地中、37で5%炭酸ガス下で培養した。セミコンフルエントになるまで増殖させたRAW264.7細胞に、PBS(-)を加えて、セルスクレーパー(住友ベークライト社製)で細胞を掻きとって回収した。その細胞を1 \times TBS(++)(実施例8のc)参照)に懸濁して細胞数をカウントし、3 \times 10⁶個ずつ15ml遠心チューブに移し、遠心して細胞を回収した。一方で、cDNA発現プラスミド 3 μ g、ホタルルシフェラーゼ発現プラスミド 1 μ g、トランスフェクション効率を補正するための内部標準としてウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド(pRL-SV40:プロメガ社製) 0.05 μ g、0.5mg/mlのDEAE-デキストラン(プロメガ社製)を含む1 \times TBS(++)溶液 0.4mlを調製した。このDNA/DEAE-デキストラン溶液で先の3 \times 10⁶個分の細胞を再懸濁させ、10分おきに軽く攪拌しながら、30分間室温でインキュベーションした。次いでこの細胞を5mlの1 \times TBS(++)添加により希釈し、遠心することにより回収し、5mlの10%ウシ胎児血清を含むDME M培地に懸濁して、96穴プレート(コーニング社製)に、0.1ml/ウェルとなるように蒔いた。37で一晩培養してから、培地のみ、または培地で希釈したGST-mODF(終濃度100ng/ml)を10 μ lずつ加えて、37でさらに24時間培養し、細胞を100 μ lのPBS(-)で2回洗浄後、50 μ lの細胞溶解剤(Passive Lysis Buffer:プロメガ社製)に溶解して、細胞抽出液を調製した。そして、そのうちの10 μ lを用いて、ルシフェラーゼ活性検出用試薬キット(デュアル・ルシフェラーゼ・レポーター・アッセイ・システム:プロメガ社製)を、キット添付のプロトコールに従って用いることにより発光量測定用試料を調製

し、各試料におけるホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性による化学発光を、ルミノスキャン(ラボシステムズ社製)にて測定した。細胞抽出液中のタンパク質濃度は、タンパク質濃度測定用試薬(バイオ・ラッド・プロテイン・アッセイ:バイオ・ラッド社製)を用いて測定した。なお、測定したホタルルシフェラーゼ活性は、トランスフェクションしてから一晩培養した細胞の一部を用いて測定したウミシイタケルシフェラーゼ活性によりトランスフェクション効率の補正を行い、さらに各細胞抽出液中のタンパク質濃度で標準化した。

【0189】実施例11. マウスおよびヒトjdp-2のカテプシンKおよびTRAPプロモーター促進活性の測定

a) jdp-2のカテプシンKおよびTRAPプロモーター促進作用

RAW264.7細胞に、実施例10記載の方法にしたがって、マウスjdp-2発現プラスミド(実施例3で得られたpCR3.1-A574(1.8k))、ホタルルシフェラーゼ発現プラスミド(実施例8のpGL3-mCTS K-1.7またはpGL3-mTRAP-1.9)およびトランスフェクション効率を補正するための内部標準として利用するウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド(pRL-SV40)をコトランスフェクションした。次いで、無刺激の細胞もしくはGST-mODFにより刺激された細胞におけるホタルルシフェラーゼ活性を測定した。なお、pCR3.1-A574(1.8k)の対照としては、マウスjdp-2 cDNAを挿入していないpCR3.1ベクターを用いた。

【0190】その結果、マウスjdp-2 cDNAを挿入していないpCR3.1ベクターを導入した細胞をGST-mODF刺激すると、カテプシンKおよびTRAPプロモーターの活性化が認められた(図4)。すなわち、このようなレポーターアッセイにより、RAW264.7細胞におけるGST-mODF刺激による破骨細胞化の応答を見ることができた。このような実験条件下、マウスjdp-2発現ベクターを導入した場合には、GST-mODF刺激なしにカテプシンKおよびTRAPプロモーターの強い活性化が認められた(図4)。そして、GST-mODF刺激を加えた場合には、さらに著明な両プロモーター活性の促進が認められた(図4)。

【0191】一方、ヒトjdp-2発現プラスミド(実施例7のpCR3.1-hjdp-2)を用いて同様の実験を行った結果、マウスjdp-2と類似のカテプシンKおよびTRAPプロモーター活性化作用が見出された(図5)。

【0192】以上の結果より、マウスおよびヒトjdp-2は、RAW264.7細胞において、カテプシンKおよびTRAPプロモーターの活性化作用を有すること*50

*が明らかとなった。

【0193】b) マウスjdp-2のN末端欠失変異体のカテプシンKおよびTRAPプロモーター促進作用
マウスjdp-2のN末端欠失変異体の有するカテプシンKおよびTRAPプロモーター促進活性について検討した。C末端にHAタグを付加した全長のマウスjdp-2発現プラスミド(実施例4のpCR3.1-mjdp-2(1-163)HA)には、HAタグ無しの場合と同様の活性があることが判明したので、jdp-2としてのN末端を欠失した変異体の活性を評価した。

【0194】その結果、マウスjdp-2の、N末端から45番目までのアミノ酸配列を欠く、46-163番目までのアミノ酸を発現するように構築されたpCR3.1-mjdp-2(46-163)HAを導入した場合には、全長のものを導入した場合と同程度のカテプシンKおよびTRAPプロモーター活性化作用が認められたのに対し、同じく110-163番目までのアミノ酸配列を発現するように構築されたpCR3.1-mjdp-2(110-163)HAを導入した場合には、そのような効果がほぼ消失した(図6)。

【0195】以上の結果より、N末端の45アミノ酸を欠くマウスjdp-2は、野生型と同程度のカテプシンKおよびTRAPプロモーター活性化作用を有していること、そして、その活性に必要な領域がN末端から46から109番目までのアミノ酸の間に存在することが明らかとなった。

【0196】

【発明の効果】 以上のように、本発明により骨粗鬆症、慢性関節リウマチにおける骨破壊、ガン細胞の骨転移と骨破壊等を含む種々の骨代謝疾患の治療または予防剤を試験するための新規な方法および該方法において用いられる核酸プローブ、プライマーおよび抗体が提供された。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ノーザンブロット解析の結果を表す図。「None」はGST-mODF未添加の細胞を、「sODF」はGST-mODFを添加した細胞をそれぞれ表す。

【図2】 マウスjdp-2を発現させたCOS-1細胞抽出液のウエスタンブロット解析の結果を表す図。

「Empty」はjdp-2 cDNAを含まないネガティブコントロールプラスミドpCR3.1ベクターのみをトランスフェクションした細胞抽出液のレーンを、「mouse jdp-2(1-163)HA」はpCR3.1-mjdp-2(1-163)HAプラスミドをトランスフェクションした細胞抽出液のレーンをそれぞれ表す。

【図3】 マウスjdp-2を発現させたRAW264.7細胞抽出液のウエスタンブロット解析の結果を表す図。「C」のレーンは細胞質画分を、「N」のレーンは核画分をそれぞれ表す。

【図4】 マウスjdp-2のカテプシンK(CTS

K) およびTRAPプロモーター促進作用を調べるためのレポーターアッセイの結果を表す図。縦軸は、ルシフェラーゼ活性の相対値を表す。

【図5】 ヒトjdp-2のカテプシンK(CTSK)およびTRAPプロモーター促進作用を調べるためのレポーターアッセイの結果を表す図。

【図6】 マウスjdp-2のN末端欠失変異体(1-163、46-163および131-163)の、カテプシンK(CTSK)およびTRAPプロモーター促進作用を調べるためのレポーターアッセイの結果を表す図。

【配列表フリーテキスト】

配列番号5: マウス破骨細胞分化因子をコードするcDNAを増幅するためのPCRプライマー

配列番号6: マウス破骨細胞分化因子をコードするcDNAを増幅するためのPCRプライマー

配列番号7: グルタチオン-S-トランスフェラーゼおよびマウス破骨細胞分化因子からなる融合タンパク質

配列番号8: 分子インデックス法のためのPCRプライマー

配列番号9: 分子インデックス法のためのPCRプライマー

配列番号11: ジーントラッパー法のためのオリゴヌクレオチドプローブ

配列番号12: ジーントラッパー法におけるコロニーPCRのためのプライマー

*配列番号13: 全長マウスjdp-2をコードするDNA断片を増幅するためのPCRプライマー

配列番号14: 欠失型マウスjdp-2をコードするDNA断片を増幅するためのPCRプライマー

配列番号15: 欠失型マウスjdp-2をコードするDNA断片を増幅するためのPCRプライマー

配列番号16: HAタグを有する全長または欠失型マウスjdp-2をコードするDNA断片を増幅するためのPCRプライマー

10 配列番号18: ジーントラッパー法のためのオリゴヌクレオチドプローブ

配列番号19: ジーントラッパー法におけるコロニーPCRのためのプライマー

配列番号20: ヒトjdp-2をコードするDNA断片を増幅するためのPCRプライマー

配列番号21: 抗jdp-2抗体を取得するためのオリゴペプチド抗原

配列番号22: マウスカテプシンKプロモーターDNA断片を増幅するためのPCRプライマー

20 配列番号23: マウスカテプシンKプロモーターDNA断片を増幅するためのPCRプライマー

配列番号24: マウスTRAPプロモーターDNA断片を増幅するためのPCRプライマー

配列番号25: マウスTRAPプロモーターDNA断片を増幅するためのPCRプライマー

* 【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Sankyo Company, Limited
<120> Novel Method for Development of Anti-osteoporotic Drugs
<130> 2000130SS
<140>
<141>
<160> 27
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 1664
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220>
<221> CDS
<222> (232)..(720)
<400> 1
gcgggagggga cactcggcgg ccgacgagg gggc
gctggc ggcagcggac gctgcagcgg 60
cggcggcggg gctggcggcc cggcggctcc cggg
ccggga cgggcctggg cagcgggcgg 120

cagcagcgcg gagtgggcac cgcgcctgca gcag
ggttct gggcccgggg ccgccgctc 180
cgccagcggc ttctgcacgc ccctccaggc cggc
ctgccca ctctcctgc t atg atg 237

```

Pro Gly Gln Ile Pro Asp Pro Ser Val Thr
 Ala Gly Ser Leu Pro Gly
 5 10 15
 ctc ggc ccc ctc acc gga ctt ccc agc tct
 gct ctg acc aca gag gag 333
 Leu Gly Pro Leu Thr Gly Leu Pro Ser Ser
 Ala Leu Thr Thr Glu Glu
 20 25 30
 ctg aaa tac gct gac atc cgc aac att ggg
 gcg atg att gcg ccc ttg 381
 Leu Lys Tyr Ala Asp Ile Arg Asn Ile Gly
 Ala Met Ile Ala Pro Leu
 35 40 45 50

 cac ttc ctg gag gtg aaa ctg ggc aag agg
 ccc caa ccc gtg aag agt 429
 His Phe Leu Glu Val Lys Leu Gly Lys Arg
 Pro Gln Pro Val Lys Ser
 55 60 65
 gag cta gac gag gaa gaa gag cga agg aaa
 agg cgc cgg gaa aag aac 477
 Glu Leu Asp Glu Glu Glu Glu Arg Arg Lys
 Arg Arg Arg Glu Lys Asn
 70 75 80
 aaa gtc gct gca gcc aga tgc cgg aac aag
 aag aag gaa cgc aca gag 525
 Lys Val Ala Ala Ala Arg Cys Arg Asn Lys
 Lys Lys Glu Arg Thr Glu
 85 90 95
 ttt ctg cag agg gag tca gag cgg ctg gag
 ctc atg aac gca gag ctg 573
 Phe Leu Gln Arg Glu Ser Glu Arg Leu Glu
 Leu Met Asn Ala Glu Leu
 100 105 110
 aag acg cag ata gag gag ctg aag ctg gag
 cgg caa cag ctt atc ctg 621
 Lys Thr Gln Ile Glu Glu Leu Lys Leu Glu
 Arg Gln Gln Leu Ile Leu
 115 120 125 1
 30
 atg ctc aac cgc cac cgc ccc acc tgc atc
 gtg cgc aca gat agc gtc 669
 Met Leu Asn Arg His Arg Pro Thr Cys Ile
 Val Arg Thr Asp Ser Val
 135 140 145
 agg acg ccc gag tcc gaa ggc aac cca ctg
 ctg gag cag ctg gac aag 717
 Arg Thr Pro Glu Ser Glu Gly Asn Pro Leu
 Leu Glu Gln Leu Asp Lys
 150 155 160
 aag tgactgaagg cctggaggag gcatcagagg
 aagaggagga aggggaggag 770
 Lys

<213> Mus musculus
 <400> 2
 Met Met Pro Gly Gln Ile Pro Asp Pro Ser
 Val Thr Ala Gly Ser Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Leu Gly Pro Leu Thr Gly Leu Pro
 Ser Ser Ala Leu Thr Thr
 20 25 30
 Glu Glu Leu Lys Tyr Ala Asp Ile Arg Asn
 Ile Gly Ala Met Ile Ala
 35 40 45
 Pro Leu His Phe Leu Glu Val Lys Leu Gly
 Lys Arg Pro Gln Pro Val
 50 55 60
 Lys Ser Glu Leu Asp Glu Glu Glu Glu Arg
 Arg Lys Arg Arg Arg Glu
 65 70 75 80

 Lys Asn Lys Val Ala Ala Ala Arg Cys Arg
 Asn Lys Lys Lys Glu Arg
 85 90 95
 Thr Glu Phe Leu Gln Arg Glu Ser Glu Arg
 Leu Glu Leu Met Asn Ala
 100 105 110
 Glu Leu Lys Thr Gln Ile Glu Glu Leu Lys
 Leu Glu Arg Gln Gln Leu
 115 120 125
 Ile Leu Met Leu Asn Arg His Arg Pro Thr
 Cys Ile Val Arg Thr Asp
 130 135 140
 Ser Val Arg Thr Pro Glu Ser Glu Gly Asn
 Pro Leu Leu Glu Gln Leu
 145 150 155 1
 60

Asp Lys Lys
 <210> 3
 <211> 1555
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (26)..(514)
 <400> 3
 aggctggcct gccactcctc ctgct atg atg cc
 t gga cag atc ccg gac cct 52
 Met Met Pro Gly Gln Ile
 Pro Asp Pro
 1 5
 tcg gtg acc aca ggc tcc ctg cca ggg ctt
 ggc ccc ctg acc ggg ctc 100
 Ser Val Thr Thr Gly Ser Leu Pro Gly Leu
 Gly Pro Leu Thr Gly Leu

cgg aac aag aag aag gag cgc acg gag ttt
 ctg cag cgg gaa tcc gag 340
 Arg Asn Lys Lys Lys Glu Arg Thr Glu Phe
 Leu Gln Arg Glu Ser Glu
 90 95 100 10
 5
 cgg ctg gaa ctc atg aac gca gag ctg aag
 acc cag att gag gag ctg 388
 Arg Leu Glu Leu Met Asn Ala Glu Leu Lys
 Thr Gln Ile Glu Glu Leu
 110 115 120
 aag cag gag cgg cag cag ctc atc ctg atg
 ctg aac cga cac cgc ccc 436
 Lys Gln Glu Arg Gln Gln Leu Ile Leu Met
 Leu Asn Arg His Arg Pro
 125 130 135
 acc tgc atc gtc cgg acc gac agt gtc aag
 acc ccc gag tca gaa ggc 484
 Thr Cys Ile Val Arg Thr Asp Ser Val Lys
 Thr Pro Glu Ser Glu Gly
 140 145 150
 aac cca ctg ctc gag cag ctc gag aag aag
 tgaccatggg ctgggaggag 534
 Asn Pro Leu Leu Glu Gln Leu Glu Lys Lys
 155 160

gtggaggagg aggaagagga gaaggaaaag tgac
 gaagag agaggaggag gggggcccca 594
 gatggccctt cctttggtgc atgaaaaact gtac
 aatgag gttcagcaca gccagcatca 654
 gccgagcttt tttgtgaaac tcagatcagc cacc
 caggag gaagagcggg ctgaggaaac 714
 ccagagggac caagcgtga gaccaaagt gacc
 ctggg tagggttgc ctgcctggg 774
 cccactttg aaggaggcag gacagaggca ccga
 ggccag ggagacgccc aacgaggcag 834
 ccctgggctc ttctctggcc tcctcaccag ggca
 cccatc caaggaacct ccgaacagcc 894
 aggaaaagcc atgagttgca accaaaacgc ggct
 gaggat ggaactcaga atgaaactgc 954
 aaccacctg ccccagccc tgcccctgc cctg
 atgca agctggagag gggcgtgctg 1014
 cggggcccctg atgccccac ccacctcggg ccag
 cgcggc cctgccagg aggcggcagc 1074
 cgggcgcacc ctgccagcc ctgctggagt ttgc
 tgtggg cactgaggcg cgggcgccct 1134
 tccaaagcac atactaccg aatgtttaca gact
 ggctgt cctggcaggg ctttcaactg 1194
 cacatgttt ttatactttc ctttttttt tttt
 ttttaa tattttttac aaaaaaaag 1254
 attttataca agcaatata ataggttt ctat
 aatcac tcgatgtgat acagtataa 1314

Lys Asn Lys Val Ala Ala Ala Arg Cys Arg
 Asn Lys Lys Lys Glu Arg
 85 90 95
 Thr Glu Phe Leu Gln Arg Glu Ser Glu Arg
 Leu Glu Leu Met Asn Ala
 100 105 110
 Glu Leu Lys Thr Gln Ile Glu Glu Leu Lys
 Gln Glu Arg Gln Gln Leu
 115 120 125
 Ile Leu Met Leu Asn Arg His Arg Pro Thr
 Cys Ile Val Arg Thr Asp
 130 135 140
 Ser Val Lys Thr Pro Glu Ser Glu Gly Asn
 Pro Leu Leu Glu Gln Leu
 145 150 155 1
 60
 Glu Lys Lys
 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR primer to
 amplify a cDNA encoding mouse osteo
 clast
 differentiation factor

 <400> 5
 gtgccgggc agcgcttctc agg
 23
 <210> 6
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR primer to
 amplify a cDNA encoding mouse osteo
 clast
 differentiation factor
 <400> 6
 catcccggt cagtctatgt cctgaact
 28
 <210> 7
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: a fusion
 protein consisting of a glutathion

50	55	60		
Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr				
Ile Ala Asp Lys His Asn				
65	70	75	80	
Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala				
Glu Ile Ser Met Leu Glu				
	85	90	95	
Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val				
Ser Arg Ile Ala Tyr Ser				
	100	105	110	
Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe				
Leu Ser Lys Leu Pro Glu				
	115	120	125	
Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys				
His Lys Thr Tyr Leu Asn				
	130	135	140	
Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met				
Leu Tyr Asp Ala Leu Asp				
145	150	155	1	
60				
Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu				
Asp Ala Phe Pro Lys Leu				
	165	170	175	
Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile				
Pro Gln Ile Asp Lys Tyr				
	180	185	190	
Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro				
Leu Gln Gly Trp Gln Ala				
	195	200	205	
Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys				
Ser Asp Leu Ile Glu Gly				
	210	215	220	
Arg Gly Ile Pro Gly Gln Arg Phe Ser Gly				
Ala Pro Ala Met Met Glu				
225	230	235	2	
40				
Gly Ser Trp Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly				
Lys Pro Glu Ala Gln Pro				
	245	250	255	
Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser				
Ile Pro Ser Gly Ser His				
	260	265	270	
Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp				
Arg Gly Trp Ala Lys Ile				
	275	280	285	
Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu				
Arg Val Asn Gln Asp Gly				
290	295	300		
Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe				
Arg His His Glu Thr Ser				
305	310	315	3	

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR primer for
 molecular indexing
 <400> 8
 gtacatattg tcgtagaac gc
 22
 <210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR primer for
 molecular indexing
 <400> 9
 ggatcctttt ttttttttt tta
 23
 <210> 10
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 10
 aattaagagc aatgtttact gaacgataca ggac
 tgggta ctaggaagg gttacaagga 60
 tggaaatga cctca
 75
 <210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:
 Oligonucleotide probe for the "Gen
 eTrapper" method
 <400> 11
 tccaccacc agttaaggcc att
 23
 <210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer for the
 colony PCR in the "GeneTrapper" me
 thod
 <400> 12
 taggaagggg ttacaaggat gga
 23
 <210> 13
 <211> 38

<211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR primer to
 amplify a DNA fragment encoding a t
 runcated mouse
 jdp-2
 <400> 14
 atgctagcgg ctcggcccc tcaccgact tccc
 agct 38
 <210> 15
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR primer to
 amplify a DNA fragment encoding a t
 runcated mouse
 jdp-2
 <400> 15
 atgctagctt ctgcagaggg agtcagagcg gctg
 gacg 38
 <210> 16
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR primer to
 amplify DNA fragments encoding ful
 l-length or
 truncated mouse jdp-2 with HA tag
 <400> 16
 tactcgagtc atgcatagtc tgaacgctg taag
 gataact tctgtccag ctgctc 56
 <210> 17
 <211> 489
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 atgatgcctg gacagatccc ggacccttcg gtga
 ccacag gctccctgcc agggcttggc 60
 cccctgaccg ggctccccag ctcggccctg actg
 tggagg agctgaaata cgctgacatc 120
 cgcaacctcg gggccatgat tgcacccttg cact
 tcctgg aggtgaaact gggcaagagg 180
 cccagccccg tgaagagtga gctagatgag gaag
 aggagc gaaggaaaag gcgccgggag 240
 aagaacaaag tcgcagcagc ccgatgccgg aaca
 agaaga aggagcgcac ggagtttctg 300

<400> 18
 cagctcggcc ctgactgtgg ag
 63 22

<210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer for
 the coloney PCR in the "GeneTrapper
 " method

<400> 19
 gcggtgtcgg ttcagcatca g
 21

<210> 20
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR primer to
 amplify a DNA fragment encoding hum
 an jdp-2

<400> 20
 cccgaattca ctcacaagcc catggtca
 28

<210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Oligopeptide
 antigen to obtain anti-jdp-2 antib
 ody

<400> 21
 Cys Val Lys Leu Gly Lys Arg Pro Gln Pro
 Val Lys Ser Glu Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR primer to
 amplify a mouse cathepsin K promote
 r DNA fragment

<400> 22
 atggtacctc gactcgatct ggcctctctc tact

taagatctgt gagcggaaga ctaagggtgc taga
 t 35
 <210> 24
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR primer to
 amplify a mouse TRAP promoter DNA f
 ragment
 <400> 24
 atggtaccgc ggtctccctt aactcctggg actc
 tg 36
 <210> 25
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR primer to
 amplify a mouse TRAP promoter DNA f
 ragment
 <400> 25
 gtctctagat ctgtgaggaa gagaggaggt tcag
 a 35
 <210> 26
 <211> 1857
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 26
 cccgggtctc ccttaactcc tgggactctg aacc
 ttggag gcgaggcgca ggtaatggct 60
 gaggcaggat tggggcgggg aaaccgaggc accc
 gccctc tgcaactctg gactctgtag 120
 ggcaggcagg gagccgtggg cgaaggctgg cccg
 cgccgc ctcttccaa ctggtgcagc 180
 ccggagcgcac ccgccgcgaa tccgcagctc agtt
 gggtag cacagcttgt cctggacca 240
 ccgccaaggt gagactcgcc cgccaggccc ttgc
 tctgcc tcccacgggg gaggggtct 300
 ctgtctgttg gggccacccc acttcttcc tggt
 cgctc tactgagagg tgcgagtggg 360
 gaatgcaagg caaactcttc gctgggtgac ctgg
 ggtgag tcgctgacct tctctgagcc 420

 tttatgcaaa gcacggaacg agagattcca gaat
 ccgagc ttgcaggac cggaggggtt 480
 ggtggtgagt gttcaaggaa ggagtctgga aaga
 ttgggc ggcttgtgaa gtttaaggagg 540
 gaggggagga ggtgggaagc tggccacacc cacc
 acagcg ctgggctctg cggtcgaaac 600
 agcctgcagc tgactgctgt aggtgccaag gtca

gaccacctgt gcttcctcca ggtaagtgt caga
ggagcg aggtggaaga ggcctgtggg 1500
ggccaccttc ccagctcctc agctccttgc aggc
ccaatt gctactggtg tgtctgtgga 1560
actgacggct gtagatggct aggggtgtgtg tgtg
tgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtc 1620
ttaagaccgg tcttatgtct ttatctcaga cttt
ctgttt ccatTTTTca aacttcccaa 1680
ttagctgag gctggccttg aacttctggt ccag
ttgctc cacctccatg gtagtgcctg 1740
agtttatagg catgcaccgt gagaccaggc tcag
cgggct agtctttctt tgcttggacc 1800
agggtctcgc tctctgtcct caccagagac tctg
aactcc ctctcttctt cacagat 1857

<210> 27

<211> 1675

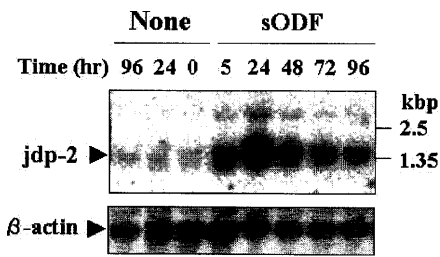
<212> DNA

<213> Mus musculus

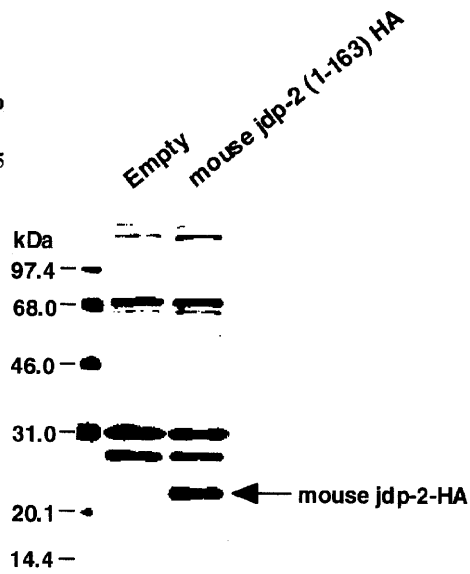
<400> 27

tcgactcgat ctgggctctc tctactcagg tggg
acattg agatcctggg gtctagaaat 60
cctggggctct gtgccaggaa tccagctagg aact
gaatct atattgtgg taatatcctt 120
tgtgcttcac agtccctcat ttctaatic ctca
catgtg tttatggaag taaatggagt 180
ttaggggtgtg gttggccaag tcagactctt atga
tctgtc acatgcctgg attttgggga 240
agcgcttga gactcttga actggaccta gttt
gggatt ttaatgattg agatgcagta 300
ctcatcagac attctaccac ccgagagtct agca
gtagag tcccacgtgt atccattaat 360
gtagattcaa gtgttgtaa taattagggt ctac
attggg tcagttgtct ttccttactg 420
tcatgttggg tgttgatcct tgggcctcat aatg
ttagga aagcccacca ccgctgagtc 480
atgttcctca accctctttt agctttttgt aaat
tacttt tatcctccat ttaagcaact 540
agaatctttt tgtaaagttt atgtatatga gtac
actatc tctgtcttca gacacaccag 600
aagagggtat cagatcccat tacagatggt ttg
agccac cactgtggtg ctgggaattg 660
aacttaggac ctctggaaga ataggcagtg cttt
taactg ctgagccatc tccctggccc 720
ttagggcat ttcttagtgg ttgatgggag agag
cccagc tcaactgtga tgggtccatt 780
cctgggctgg tgccccagcc gttgttattt ttag
acagga tctcactaaa ttgcctagag 840
taggttgacc ttgaaagtaa gttcttactt agag
acgtct cactgtatgg ctctggctga 900
ctttggactc actctgtaga ctgttgggc attg
acctca cagagaacca tccaccctg 960
ccatccagtg tgtatgttga ggggacagag gtgt
gcccac agccagtgat ggctttgctt 1020

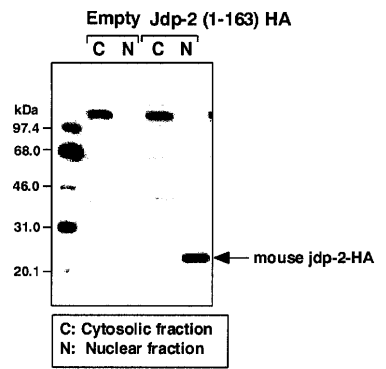
【図1】



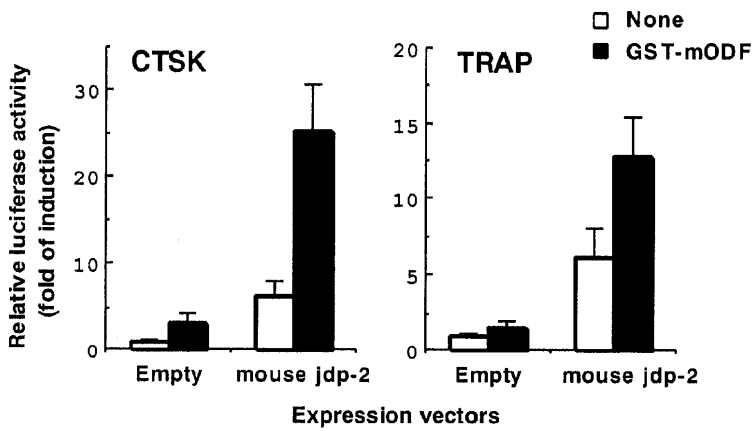
【図2】



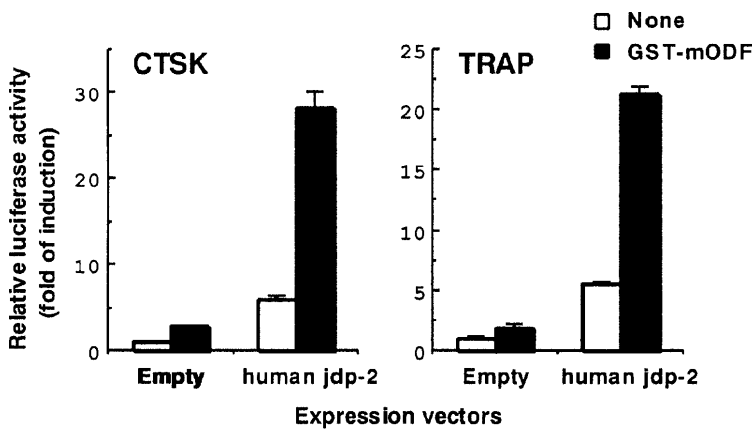
【図3】



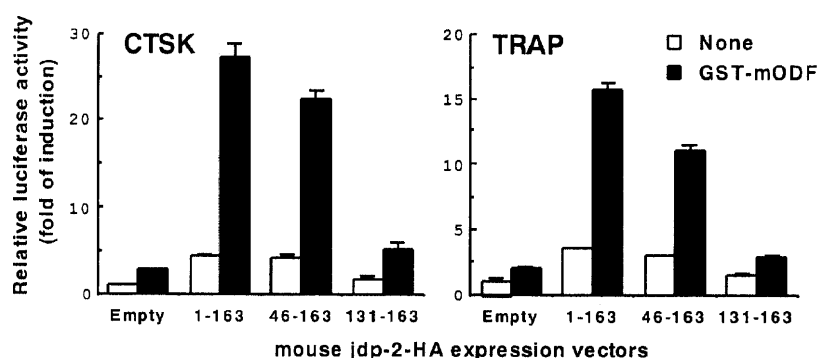
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード ⁸ (参考)	
C 1 2 Q	1/68	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15		33/50	Z
	33/50			X
	33/53		33/53	D
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 P	21/08	
		C 1 2 N	15/00	Z N A A

(72)発明者 大塚 敏明
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(72)発明者 高橋 亘
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB10 BB14 BB20
BB29 BB41 BB46 BB50 BB51
CB01 DA13 DA14 DA36 FB02
FB03 FB05 FB07
4B024 AA11 CA04 CA07 CA09 CA12
CA20 DA02 DA06 EA04 FA02
GA11 GA18 HA12
4B063 QA01 QA05 QQ08 QQ13 QQ22
QQ53 QQ79 QR32 QR33 QR35
QR48 QR56 QR60 QR62 QR80
QS25 QS33 QS34 QX02
4B064 AG26 AG27 AG31 CA10 CA20
CC24 DA13
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40
DA75 DA76 DA86 EA50 FA71
FA72 FA73 FA74 HA05

专利名称(译)	用于测试骨质疏松症或类风湿性关节炎的治疗剂或预防剂的方法		
公开(公告)号	JP2002051782A	公开(公告)日	2002-02-19
申请号	JP2000241413	申请日	2000-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三共		
申请(专利权)人(译)	三共株式会社		
[标]发明人	奥津潤一 川井田礼美 大塚敏明 高橋亘		
发明人	奥津 潤一 川井田 礼美 大塚 敏明 高橋 亘		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/66 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53		
FI分类号	C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/66 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/50.X G01N33/53.D C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.202.D C12N5/074		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB29 2G045/BB41 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ22 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR33 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR60 4B063/QR62 4B063/QR80 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74 4H045/HA05 4B065/AA90		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 要解决的问题: 提供一种用于测试各种骨代谢疾病(包括骨质疏松症, 类风湿性关节炎中的骨破坏, 癌细胞骨转移和骨破坏)的治疗剂或预防剂的新方法, 以及用于该方法的DNA。。 解决方案: 在有或没有测试物质的情况下培养培养的细胞, 然后在培养的细胞中测量具有源自小鼠的特定核苷酸序列或源自人的特定核苷酸序列的基因的表达水平。一种方法, 包括将在不存在测试物质的情况下培养的细胞与存在测试物质的情况下培养的细胞进行比较。

【图5】

