

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-531291

(P2005-531291A)

(43) 公表日 平成17年10月20日(2005.10.20)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7105	A 6 1 K 31/7105	4 B 0 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-571420 (P2003-571420)
 (86) (22) 出願日 平成15年2月21日 (2003. 2. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年8月20日 (2004. 8. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/005501
 (87) 国際公開番号 W02003/072732
 (87) 国際公開日 平成15年9月4日 (2003. 9. 4)
 (31) 優先権主張番号 60/358, 578
 (32) 優先日 平成14年2月21日 (2002. 2. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

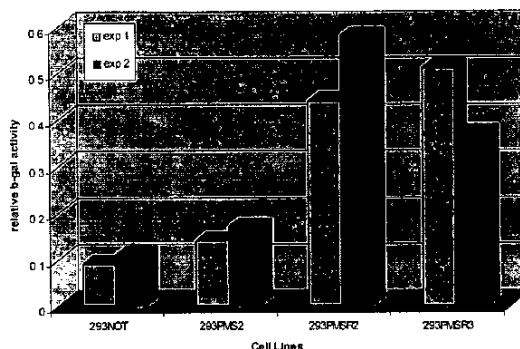
(71) 出願人 503166643
 モーフオテク・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州1934
 1 エクストン・ウエルシュプールロード2
 10
 (74) 代理人 100060782
 弁理士 小田島 平吉
 (72) 発明者 グラツソ, ルイジ
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州1900
 4 バラシンウイド・コンシヨホツケンステ
 イトロード707
 (72) 発明者 ニコレイダス, ニコラス・シー
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州1906
 1 ブースウイン・シダーミルコート4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PMS R 相同体を使用する超変異性細胞の作成方法

(57) 【要約】

共通の配列モチーフを有する PMS 2 相同体を使用する細胞を超変異性にする方法が開示される。本発明の PMS 2 相同体は ATP アーゼ様モチーフを有し、そして PMS 2 - 1 3 4 に最低約 9 0 % 同一である。変異体ライブラリーの生成方法ならびに癌についての診断および治療の応用での PMS 2 相同体の使用方法もまた開示される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 23 のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる PMS2 相同体を細胞に導入してそれにより超変異性細胞を作成すること（ここで前記 PMS2 相同体は PMSR2 および PMSR3 以外である）を含んでなる、前記細胞を超変異性にする方法。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが配列番号 24 のアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが配列番号 22 のアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 4】

前記 PMS2 相同体が ATPアーゼドメインを有するタンパク質をコードする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞が真核生物細胞である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞が原核生物細胞である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 7 記載の方法。

20

【請求項 9】

前記細胞を変異原と接触させることをさらに含んでなる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

目的遺伝子中の 1 突然変異について前記細胞をスクリーニングすることをさらに含んでなる、請求項 1 もしくは 9 記載の方法。

【請求項 11】

前記スクリーニングが前記超変異性細胞の核酸に対して実施される、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

前記スクリーニングが前記超変異性細胞のタンパク質に対して実施される、請求項 10 記載の方法。

30

【請求項 13】

前記スクリーニングが、前記超変異性細胞の表現型を検査することにより実施される、請求項 10 記載の方法。

【請求項 14】

前記超変異性細胞の遺伝的安定性を復帰させることをさらに含んでなる、請求項 10 記載の方法。

【請求項 15】

配列番号 23 のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる PMS2 相同体を、目的の 1 遺伝子を含有する細胞中に導入してそれにより前記細胞を超変異性にする、および目的の前記遺伝子中に 1 突然変異を含んでなる変異体細胞を選択することを含んでなる、目的遺伝子中における突然変異の作成方法。

40

【請求項 16】

前記ポリペプチドが配列番号 24 のアミノ酸配列を含んでなる、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

前記ポリペプチドが配列番号 22 のアミノ酸配列を含んでなる、請求項 15 記載の方法。

【請求項 18】

50

前記 P M S 2 相同体が A T P アーゼドメインを有するタンパク質をコードする、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 9】

前記細胞が真核生物細胞である、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 2 0】

前記細胞が原核生物細胞である、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 2 1】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 2】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 2 1 記載の方法。

10

【請求項 2 3】

前記細胞を変異原と接触させることをさらに含んでなる、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 2 4】

前記変異体細胞の遺伝的安定性を復帰させることをさらに含んでなる、請求項 1 5 もしくは 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】

配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる P M S 2 相同体を 1 細胞型に導入してそれにより超変異性細胞を作成すること（ここで前記 P M S 2 相同体は P M S R 2 および P M S R 3 以外である）、前記超変異性細胞型をインキュベートして突然変異を蓄積させること、前記超変異性細胞から核酸を抽出すること、ならびに核酸ライブラリーを創製することを含んでなる、前記細胞型における変異体遺伝子のライブラリーの生成方法。

20

【請求項 2 6】

前記ポリペプチドが配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含んでなる、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 7】

前記ライブラリーが c D N A ライブラリーである、請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 2 8】

前記ライブラリーがゲノムライブラリーである、請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 2 9】

配列番号 2 3 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と試料とを接触させて、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含んでなる P M S 2 相同体をコードするポリヌクレオチドの発現を検出すること（ここで前記 P M S 2 相同体の発現は新形成と関連する）を含んでなる、新形成を検出するための細胞のアッセイ方法。

30

【請求項 3 0】

検出することがノーザンブロット分析を含んでなる、請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 1】

検出することが P C R を含んでなる、請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 2】

検出することが R T - P C R 分析を含んでなる、請求項 2 9 記載の方法。

40

【請求項 3 3】

P M S 2 相同体もしくはそのペプチドフラグメントに対し作られた抗体と試料とを接触させること；および P M S 2 相同体もしくはそのペプチドフラグメントとともに形成される抗体複合体の存在を検出してそれにより前記試料中の前記 P M S 2 相同体の存在を検出すること（ここで前記 P M S 2 相同体の存在は新形成と関連する）ことを含んでなる、新形成を検出するための細胞のアッセイ方法。

【請求項 3 4】

検出することが、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロットアッセイ、免疫蛍光アッセイ、酵素免疫測定法および化学発光アッセイよりなる群から選択されるイムノアッセイを含んでなる、請求項 3 3 記載の方法。

50

【請求項 35】

PMS2 相同体関連の新形成を伴う患者を同定すること、前記 PMS2 相同体の発現の阻害剤を前記患者に投与すること（ここで前記阻害剤は前記 PMS2 相同体関連の新生物における前記 PMS2 相同体の発現を抑制する）を含んでなる、癌を伴う患者の治療方法。

【請求項 36】

前記 PMS2 相同体関連の新生物がリンパ腫である、請求項 35 記載の方法。

【請求項 37】

前記 PMS2 相同体の前記阻害剤が前記 PMS2 相同体をコードするポリヌクレオチドに対し向けられたアンチセンス核酸である、請求項 35 記載の方法。

10

【請求項 38】

前記 PMS2 相同体の前記阻害剤がリボザイムである、請求項 35 記載の方法

【請求項 39】

前記阻害剤が、前記 PMS2 相同体に特異的に結合する ATP アーゼ類似物である、請求項 35 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は 2002 年 2 月 21 日出願の米国仮出願第 60/358,578 号明細書（その開示はそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる）の利益を主張する。

20

本発明はミスマッチ修復遺伝子の領域に関する。具体的には、それは、ドミナントネガティブのミスマッチ修復遺伝子を使用する超変異性（hypermutable）細胞の生成の分野に関し、ここで、該ミスマッチ修復遺伝子によりコードされるタンパク質は ATP アーゼのコンセンサス配列を含んでなる。

【背景技術】

【0002】

過去 4 年以内に、遺伝性非ポリープ性結腸直腸癌症候群（HNPCC）（リンチ症候群 I I 型としてもまた知られる）の遺伝的原因が、該疾患に冒された家系の大多数について確かめられた（非特許文献 1）。HNPCC の分子的基礎は不完全なミスマッチ修復（MMR）由来の遺伝的不安定性を伴う。今日まで、mutS 相同体（homolog）GTBP、hMSH2、hMSH3 ならびに mutL 相同体 hMLH1、hPMSI および hPMS2 を包含する MMR の過程のタンパク質をコードしかつそれに参画すると思われる 6 遺伝子がヒトで同定されている（非特許文献 2；非特許文献 3；非特許文献 4；非特許文献 5；非特許文献 6；非特許文献 7；非特許文献 8）。これらの遺伝子の機能に影響を及ぼす突然変異すなわち後成的変化が、上に列挙された相同体の全部について、マイクロサテライトの不安定性（MI）（MMR 欠損による一、二もしくは三ヌクレオチド反復中の「翻訳スリップ突然変異」から生じるある型のゲノムの不安定性）を表す腫瘍組織中で報告されている（非特許文献 9；非特許文献 10；非特許文献 11）。これらの遺伝子の全部中の生殖系列突然変異が HNPCC の家系で同定されている（非特許文献 2；非特許文献 4；非特許文献 1；非特許文献 5；非特許文献 8）一方、MI を表す腫瘍型が既知の MMR 遺伝子のいずれか中の突然変異を欠く多くの例が存在し、MMR 過程に關与する付加的遺伝子の存在を示唆している（個人的観察結果；非特許文献 12；非特許文献 13；非特許文献 14）。HNPCC 患者で生じる事実上全部の腫瘍におけるその発生に加え、MI は、多くの異なる組織型から発する独特の分子および表現型の特性をもつ散発性腫瘍の 1 サブセットにおいてもまた見出され、他の癌の型における不完全な MMR の拡大された関与のためのある役割を示唆している（非特許文献 12；非特許文献 13；非特許文献 14；非特許文献 15；非特許文献 16）。

30

40

【0003】

MMR 欠損から生じる変異誘発体（mutator）欠損はいずれかの DNA 配列に影

50

響を及ぼし得るとはいえ、マイクロサテライト配列はMMR異常に対しとりわけ感受性である(非特許文献17)。マイクロサテライトの不安定性(MI)は従って不完全なMMRの有用な指標である。HNPCC患者で生じる事実上全部の腫瘍におけるその発生に加え、MIは独特の分子および表現型の特性をもつ散発性腫瘍の小さな部分で見出される(非特許文献10)。

【0004】

HMPCCは常染色体ドミナントの様式で遺伝され、その結果、冒された家族メンバーの正常細胞は、関連するMMR遺伝子の1変異体アレル(冒された親から遺伝される)および1野性型アレル(冒されていない親から遺伝される)を含有する。しかしながら、腫瘍発生の初期段階の間に、野性型アレルは体細胞突然変異により不活性化されて機能的なMMR遺伝子をもたない細胞を残し、そしてMMR活性の大きな欠陥をもたらす。体細胞突然変異は、生殖系列突然変異に加えて腫瘍細胞中で不完全なMMRを生成させるのに必要とされるため、この機構は一般に、他の遺伝性癌を開始させる腫瘍抑制遺伝子の二対立遺伝子の不活性化に類似の2ヒットを伴うものと称されている(非特許文献4;非特許文献1;非特許文献18)。この2ヒット機構と一致して、HMPCC患者の非腫瘍性細胞は一般に、野性型アレルの存在により正常レベル近くのMMR活性を保持する。

10

【0005】

遺伝的研究は、PMS2を包含するミスマッチ修復(MMR)遺伝子の不活性化がヒトおよびげっ歯類組織中での遺伝的不安定性および腫瘍形成性をもたらすことを明確に示した。大多数の症例において、MMRスペルチェック系(腫瘍抑制アレルの不活性化の「2ヒット」仮説に類似である過程)の1成分を完全にノックアウトするために特定の1MMR遺伝子の双方のアレルの不活性化が必要とされる。正常および腫瘍性組織中の突然変異されたMMR遺伝子のスクリーニングに焦点をあてた独立した研究が、MMR遺伝子の単一の突然変異されたアレルのみが腫瘍に関連して見出された2症例を除き、2ヒット仮説を確認した。このアレルはコドン134にナンセンス突然変異を含有するPMS2遺伝子であり、これは細胞のMMR活性に対するドミナントネガティブな影響を導き出すことが可能な133アミノ酸のタンパク質をコードする短縮型ポリペプチドをもたらす。この仮説は、それ以外はMMRに熟達した哺乳動物細胞のMMR活性に対するドミナントネガティブな影響を引き起こすPMS134タンパク質の能力を示すその後の研究により確認された。

20

30

【0006】

PMS134の短縮型ドメインはPMSR2およびPMSR3タンパク質のコーディング領域に高度に相同性であり、タンパク質レベルで90%以上の同一性を共有する。しかしながら、PMSR2およびPMSR3は正常組織中で発現されるとは思われず、また、HMPCCと関連することが示されていない。

【0007】

野性型タンパク質もしくはそのフラグメントの過剰発現または該タンパク質の特定のタンパク質ドメインへの突然変異の導入(いわゆるドミナントネガティブの阻害性変異体)のいずれかによる遺伝子産物機能の操作によりシグナル伝達経路を変える能力は、Herskowitz(非特許文献19)により酵母の系、ビール酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)で10年にわたって記述された。野性型遺伝子産物の過剰発現が、最もありそうには低レベルで存在しかつ活性に必要であるタンパク質のようなある因子の「飽和(saturating-out)」により類似のドミナントネガティブの阻害性表現型をもたらし得;高レベルのその同族のパートナーへの結合によるタンパク質の除去が同一の正味の影響をもたらし、タンパク質および関連するシグナル伝達経路の不活性化に至る。最近、Nicolaidesら(非特許文献20;特許文献1)によりなされた研究は、包括的DNA超変異性を賦与するための哺乳動物細胞中へのドミナントネガティブの阻害性ミスマッチ修復変異体の導入の利用性を示した。MMR過程を操作しかつ従ってこの例では哺乳動物細胞中の標的の宿主ゲノムの変異性を随意に増大させる能力は、元の野性型細胞の革新的な細胞サブタイプもしくはバリエーションの生成を可能に

40

50

する。これらのバリエーションは指定される所望の選択過程下に置くことができ、その結果は変えられた生物学的分子（1種もしくは複数）を発現しかつ新たな特質を有する新規生物体である。細菌細胞中のMMRアレルを包含する1遺伝子のドミナントネガティブのアレルの創製かつ導入という概念は、遺伝的に変えられた原核生物のミスマッチ修復遺伝子をもたらすことが報告されている（非特許文献21；非特許文献22；非特許文献23）。

【0008】

さらに、変えられたMMR活性は、酵母、哺乳動物細胞および植物を包含する多様な種からのMMR遺伝子が過剰発現される場合に示されている（非特許文献3；非特許文献24；非特許文献25；非特許文献26）。

【0009】

最近、Guarneら（非特許文献27）はMLH1およびPMS2のヘテロ二量体MutLのATPアーゼ機能を記述した。GuarneらはPMS2の三次元構造を研究し、そしてATP結合および加水分解に参画する分子の部分を決定した。Guarneらは、二量体化およびATPアーゼ活性がおそらくMMR機能に必要とされると仮定した。しかしながら、Guarneらは彼らの知見がミスマッチ修復のドミナントネガティブの表現型にどのように関係するかを教示もしくは示唆していない。

【0010】

それらの作動の特徴および能力を増大させるための細胞の遺伝的操作方法に対する当該技術分野における継続的必要性が存在する。この目的のため、超変異性細胞の生成における使用のためにドミナントネガティブな影響を賦与するMMR遺伝子を理解、開発および設計することの当該技術分野における必要性が存在する。

【特許文献1】Nicolaidesらへの米国特許第6,146,894号明細書

【非特許文献1】Liu, B.ら（1996）Nat. Med. 2: 169 - 174

【非特許文献2】Bronner, C. E.ら（1994）Nature 368: 258 - 261

【非特許文献3】Fishel, R.ら（1993）Cell 7: 1027 - 1038

【非特許文献4】Leach, F. S.ら（1993）Cell 75: 1215 - 1225

【非特許文献5】Nicolaides, N. C.ら（1994）Nature 371: 75 - 80

【非特許文献6】Nicolaides, N. C.ら（1996）Genomics 31: 395 - 397

【非特許文献7】Palombo, F.ら（1995）Science 268: 1912 - 1914

【非特許文献8】Papadopoulos, N.ら（1994）Science 263: 1625 - 1629

【非特許文献9】Jiricny, J.とM. Nystrom-Lahhti（2000）Curr. Opin. Genet. Dev. 10: 157 - 161

【非特許文献10】Perucho, M.（1996）Biol. Chem. 377: 675 - 684

【非特許文献11】Strand, M.ら（1993）Nature 365: 274 - 276

【非特許文献12】Nagy, M.ら（2000）Leukemia 14: 2142 - 2148

【非特許文献13】Peltomaki P.（2001）Hum. Mol. Genet. 10: 735 - 740

【非特許文献14】Wang Y.ら（2001）Int. J. Cancer 93: 353 - 360

【非特許文献15】Starostik P.ら（2000）Am. J. Pathol. 157: 1129 - 1136

10

20

30

40

50

【非特許文献16】Chen Y. ほか (2001) Cancer Res. 61: 4112 - 4121

【非特許文献17】Modrich, P. (1994) Science 266: 1959 - 1960

【非特許文献18】Parsons, R. ほか (1993) Cell 75: 1227 - 1236

【非特許文献19】Herskowitz (1987) Nature 329 (6136): 219 - 222

【非特許文献20】Nicolaidis N. C. ほか (1998) Mol. Cell. Biol. 18: 1635 - 1641

10

【非特許文献21】Aronsham A. と M. G. Marinus (1996) Nucl. Acids Res. 24: 2498 - 2504

【非特許文献22】Wu T. H. と M. G. Marinus (1994) J. Bacteriol. 176: 5393 - 400

【非特許文献23】Brosh R. M. Jr. と S. W. Matson (1995) J. Bacteriol. 177: 5612 - 5621

【非特許文献24】Studamire B. ほか (1998) Mol. Cell. Biol. 18: 75907601

【非特許文献25】Alani E. ほか (1997) Mol. Cell. Biol. 17: 2436 - 2447

20

【非特許文献26】Lipkin S. M. ほか (2000) Nat. Genet. 24: 27 - 35

【非特許文献27】Guarne ほか (2001) EMBO J. 20 (19): 5521 - 5531

【発明の開示】

【0011】

[発明の要約]

本発明は、配列番号23のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるPMS2相同体を細胞に導入してそれにより細胞を超変異性にすることを含んでなる、細胞を超変異性にする方法を提供し、ここで該PMS2相同体はPMSR2およびPMSR3以外である。

30

【0012】

本発明はまた、ポリペプチド(ここで該ポリペプチドは配列番号23のアミノ酸配列を含んでなる)をコードするヌクレオチド配列を含んでなるPMS2相同体を、目的の1遺伝子を含む細胞中に導入してそれにより前記細胞を超変異性にする(ここで該PMS2相同体はPMSR2およびPMSR3以外である)、ならびに目的の前記遺伝子中の1突然変異を含んでなる変異体細胞を選択することを含んでなる、目的の1遺伝子中の突然変異の作成方法も提供する。

【0013】

本発明はまた、超変異性細胞を創製するための細胞中への導入のためのドミナントネガティブのMMR遺伝子の作成方法も提供する。該ドミナントネガティブのMMR遺伝子は、配列番号23のアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードしかつPMS2-134(配列番号13)と最低約90%の同一性を共有する。

40

【0014】

本発明はまた、突然変異された遺伝子のライブラリーの生成方法も提供する。本発明の該方法の態様において、PMS2相同体のドミナントネガティブなアレルが細胞中に導入されてそれにより該細胞は超変異性となる。該細胞は遺伝子中に突然変異を蓄積し、そして細胞の一集団は従って安定なゲノムをもつ野性型細胞に比較して突然変異された遺伝子のライブラリーを含みうる。

【0015】

50

本発明の該方法のいくつかの態様において、該ポリペプチドは配列番号24のアミノ酸配列を含んでなる。いくつかの態様において、該ポリペプチドは保存されたATPアーゼドメインを有する。本発明の該方法のいくつかの態様において、PMS2相同体はPMSR6である。本発明の該方法のある態様において、PMSR6ポリペプチドは配列番号22のアミノ酸配列を含んでなりかつ配列番号21のポリヌクレオチド配列によりコードされる。

【0016】

本発明の該方法のいくつかの態様において、PMS2相同体はさらに、MLH1と二量体化することの不能をもたらす短縮を含んでなる。これは、例えばGuarneら(2001)EMBO J. 20(19):5521-5531により記述されかつ図2に示されるところの、E'-ヘリックスからC末端、E-ヘリックスからC末端、F-ヘリックスからC末端、G-ヘリックスからC末端、H'-ヘリックスからC末端、H-ヘリックスからC末端、もしくはI-ヘリックスからC末端からの短縮でありうる。

10

【0017】

本発明の方法は真核生物細胞、とりわけ原生動物、酵母、昆虫、脊椎動物、および哺乳動物、とりわけヒトからの細胞に使用してよい。本発明の方法は細菌細胞のような原核生物細胞にもまた使用してよく、そして植物細胞に使用してよい。

【0018】

本発明の方法はまた、ミスマッチ修復単独を混乱させることにより観察されるものを上回って突然変異の率を増大させるように化学物質変異原もしくは放射線で細胞を処理することを含んでもよい。

20

【0019】

本発明の超変異性細胞は、所望の表現型を賦与する目的の遺伝子中の突然変異を検出するためにスクリーニングしてよい。該細胞は、該細胞の核酸、タンパク質もしくは表現型を検査することによりスクリーニングしてよい。

【0020】

本発明の該方法のいくつかの態様において、遺伝的安定性が超変異性細胞に復帰されるかもしれない、それによりさらに誠実に増殖しうる、目的の遺伝子中に突然変異を含んでなる細胞を維持することができる。

30

【0021】

本発明はまた、配列番号23のアミノ酸配列を含んでなるPMS2相同体をコードするポリヌクレオチドの発現を検出するために配列番号23のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と前記サンプルを接触させることを含んでなる、新形成を検出するための細胞のアッセイ方法も提供し、ここで前記PMS2相同体の発現は新形成と関連する。PMS2相同体の検出は、限定されるものでないがノーザンブロット分析およびRT-PCRを挙げることができる当該技術分野で既知のいかなる手段によって達成してもよい。

【0022】

本発明はまた、PMS2相同体もしくはそのペプチドフラグメントに反応する抗体と前記サンプルを接触させること；およびPMS2相同体もしくはそのペプチドフラグメントとともに形成された抗体複合体の存在を検出してそれにより前記サンプル中の前記PMS2相同体の存在を検出することを含んでなる、新形成を検出するための細胞のアッセイ方法も提供し、ここで前記PMS2相同体の存在は新形成と関連する。PMS2相同体の検出方法は、限定されるものでないがラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロット、免疫蛍光アッセイ、酵素免疫測定法(ELISA)および化学発光アッセイを挙げることができる当該技術分野で既知のいずれの手段によってもよい。

40

【0023】

本発明はまた、PMS2相同体関連の新形成を伴う患者を同定すること、前記PMS2相同体の発現の阻害剤を前記患者に投与することを含んでなる、癌を伴う患者の治療方法も提供し、ここで前記阻害剤は前記PMS2相同体関連の新生物における前記PMS2相

50

同体の発現を抑制する。こうした新形成は例えばリンパ腫を包含する。PMS2 相同体発現の阻害剤は、PMS2 相同体を特異的に結合するアンチセンスヌクレオチド、リボザイム、抗体フラグメントおよび ATPアーゼ類似物を包含する。

[発明の詳細な説明]

本発明は ATPアーゼのコンセンサス配列をもつミスマッチ修復遺伝子の誘導体を使用して細胞を超変異性にする方法を提供する。このコンセンサス配列は、宿主細胞にトランスフェクトされる場合にミスマッチ修復のドミナントネガティブな表現型を賦与する多数の PMS2 相同体中に存在する。

【 0 0 2 4 】

PMSR2 および PMSR3 のような PMS2 相同体はタンパク質の mutL ミスマッチ修復ファミリーの相同体をコードする。PMSR2 および PMSR3 双方のタンパク質は、例えばヒト PMS2 遺伝子およびそのコードされるポリペプチドの N 末端に高度に相同性である。機能研究は、PMSR2 もしくは PMSR3 cDNA が MMR に熟練した哺乳動物細胞中で発現される場合にこれらの相同体のいずれもドミナントネガティブな様式で MMR を不活性化することが可能であり遺伝的不安定性に至ることを示している (図 5 を参照されたい) 。

【 0 0 2 5 】

予備的遺伝子発現研究は、PMSR2 もしくは PMSR3 遺伝子が非腫瘍性組織中で発現されず、また、マイクロサテライトの不安定性 (MMR 欠損の特質) を表すバーキットリンパ腫起源のヒトリンパ腫細胞株の 1 サブセット中でのみ検出されることを見出している (図 3 および 4 を参照されたい) 。

【 0 0 2 6 】

本発明は、ドミナントネガティブな様式で MMR 活性を低下させるよう機能する PMS2 相同体をコードするポリヌクレオチド配列を細胞中に導入することによる、超変異性細胞の生成における使用のための、PMS134、PMSR2 および PMSR3 の保存されたドメインを含んでなりかつ ATPアーゼドメインの保存された部分を共有する PMS2 相同体の使用に向けられる。

【 0 0 2 7 】

コンセンサス配列、および ATPアーゼドメインの構造的特徴を包含する PMS2 の N 末端ドメインに対する相同性を含んでなるタンパク質がドミナントネガティブのミスマッチ修復阻害剤として機能することが発見された。特定の一態様において、PMSR6 発現は細胞中の MMR 欠損のドミナントネガティブの表現型を賦与する。

【 0 0 2 8 】

配列番号 23 もしくは配列番号 24 のコンセンサス配列を含んでなりかつ PMS2 - 134 と最低約 90% の相同性を有する一部分を含んでなるタンパク質が、細胞中に導入される場合にドミナントネガティブの表現型および MMR 活性の低下を賦与し得ることがさらに発見された。いくつかの態様において、PMS2 相同体は ATPアーゼドメインを含んでなる。PMS2 相同体はさらに、PMS2 - 134 に相同であるドメインおよび異種である部分を含んでなるキメラもしくは融合タンパク質のような MMR タンパク質以外であるドメインを含んでもよい。

【 0 0 2 9 】

本明細書で使用されるところの「PMS2 相同体」という用語は AVKE LVENS LDAGA TN (配列番号 23) のコンセンサス配列を有するポリペプチド配列を指す。いくつかの態様において、PMS2 相同体は LRPNAVKE LVENS LDAGA TNVDLKLKDY GVDLIEVSGN GCGVEEENFE (配列番号 24) のポリペプチド配列を含んでなる。PMS2 相同体はこの構造的特徴を含んでなり、また、作動のいずれか特定の理論により拘束されることを願わない一方、この構造的特徴は既知の ATPアーゼとの高い相同性により ATPアーゼ活性と相関すると考えられている。この構造的特徴および相互に関連づけられる機能の知識、ならびに本明細書に提供される代表的な数の例は、本発明の方法でどのタンパク質を使用してよいかを当業者に容易に

10

20

30

40

50

同定させることができる。

【0030】

本明細書で使用されるところの「PMS2相同体をコードする核酸配列」は、ATPアーゼコンセンサ配列モチーフを有しかつ細胞中で発現される場合に該細胞中でのミスマッチ修復の活性を低下させるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を指す。PMS2相同体をコードする核酸配列は、細胞中に導入しかつ発現される場合に、内因性のミスマッチ修復媒介性のDNA修復活性の有効性を低下させることにより自発的突然変異の率を増大させ、それにより該細胞を遺伝的变化に対し高度に感受性にする（すなわち細胞を超変異性とする）。超変異性細胞は、その後、野性型細胞中で見出されない発現特質（output trait）（1種もしくは複数）を表すバリエーション同胞中での1遺伝子もしくは一組の遺伝子中の突然変異についてスクリーニングするのに利用し得る。PMS2相同体は変えられたミスマッチ修復遺伝子であってよいか、もしくは、細胞中で過剰発現される場合は損なわれたミスマッチ修復活性をもたらすミスマッチ修復遺伝子であってよい。

10

【0031】

PMS2相同体をコードする核酸配列を細胞中に導入しかつ発現させる。該細胞のミスマッチ修復活性が低下され、そして該細胞は超変異性となる。いくつかの態様において、細胞をさらに化学物質変異原とともにインキュベートして突然変異の率をさらに高めてもよい。

【0032】

MMR欠損が宿主の内在性のDNA突然変異率の約1000倍の増大に至る可能性があることが報告されている一方、MMR欠損単独で、新たな活性（1種もしくは複数）をもつ変えられた生化学物質（biochemicals）を創製するように宿主細菌のDNA内のすべての遺伝子を変えるのに十分であることができるという保証は存在しない。従って、臭化エチジウム、EMS、MNNG、MNU、タモキシフェン、8-ヒドロキシグアニンのような化学物質変異原およびそれらのそれぞれの類似物、ならびに：Khrumov-Borisov, N. N. ら（1999）Mutat. Res. 430: 55-74；Ohe, T. ら（1999）Mutat. Res. 429: 189-199；Hour, T. C. ら（1999）Food Chem. Toxicol. 37: 569-579；Hrelia, P. ら（1999）Chem. Biol. Interact. 118: 99-111；Garganta, F. ら（1999）Environ. Mol. Mutagen. 33: 75-85；Ukawa-Ishikawa S. ら（1998）Mutat. Res. 412: 99-107；www.ehs.utah.edu/ohh/mutagensなどに教示されるもののような他者の使用は、突然変異の範囲をさらに拡大しかつ所望の新たな発現特質（1種もしくは複数）をもつ宿主細胞を順に生成させ得る1種もしくはそれ以上の遺伝子中の変化を得る見込みを増大させるために使用し得る。ミスマッチ修復欠損は、DNA損傷活性をもつ化学物質による毒性に対する増大された抵抗性をもつ宿主に至る。この特徴は、ミスマッチ欠損細胞がこうした作用物質に曝露される場合に、こうした化学物質変異原の毒性の影響によりそうでなければ不可能であるとみられる付加的な遺伝的に多彩な宿主の創製を可能にする [Colella, G. ら（1999）Br. J. Cancer 80: 338-343；Moreland, N. J. ら（1999）Cancer Res. 59: 2102-2106；Humbert, O. ら（1999）Carcinogenesis 20: 205-214；Glaab, W. E. ら（1998）Mutat. Res. 398: 197-207]。

20

30

40

【0033】

PMS2相同体でトランスフェクトしてよい細胞はいかなる原核生物もしくは真核生物細胞も包含する。原核生物細胞は多様な属の細菌細胞であってよい。

【0034】

他の態様において、細胞は限定されるものでないが昆虫細胞、原生動物、酵母、真菌、

50

脊椎動物細胞（例えば魚類、鳥類、は虫類および両生類細胞のような）、哺乳動物細胞（例えばヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類、ヤギ、ウマ、ウシおよびヒツジ細胞を包含する）を挙げることができる真核生物細胞である。

【0035】

他の態様において、植物細胞をPMS2相同体でトランスフェクトして該植物細胞を超変異性にしてもよい。

【0036】

細胞が一旦超変異性にされれば、細胞のゲノムは目的の遺伝子中の突然変異を包含する突然変異を蓄積し始めることができる。目的の遺伝子中の突然変異は、選択し得る望ましい新たな表現型をこれらの遺伝子に賦与するかもしれない。制限しない一例として、タンパク質をコードする遺伝子中の突然変異は該タンパク質をより高レベルで発現されるようにするかもしれない。別の制限しない例として、抗体および酵素のようなタンパク質は、それぞれそれらの抗原もしくは基質に対するより高い親和性のような変えられた結合の特徴を有するかもしれない。こうした変えられた表現型はスクリーニングすることができ、そして、該遺伝子を含むしかつ変えられた表現型を表す細胞をさらなる培養のため選択してよい。

【0037】

新たな表現型を伴う目的の遺伝子を含む細胞のゲノムは、トランスフェクトされたPMS2相同体の影響を相殺することにより遺伝的に安定にされるかもしれない。当業者は、PMS2相同体を含むプラスミドの細胞を「キュアリング」、つまりPMS2相同体がもはや発現されないように細胞内のPMS2相同体を破壊しうる。薬物圧下でのみ細胞中で維持されるプラスミドを使用して、PMS2相同体をもつ細胞を培養してよい。薬物圧を除去する場合に、該細胞は該プラスミドを喪失する傾向がある。他の態様において、誘導可能な発現ベクターを使用してPMS2相同体を発現させてもよい。その後、誘導物質分子を取り上げてゲノムを安定化させることができる。

【0038】

本明細書で使用されるところの、「ミスマッチプルーフリーディング」ともまた呼ばれる「ミスマッチ修復」という用語は、細菌のような原核生物細胞からより複雑な哺乳動物細胞までほど異質な細胞で報告されているタンパク質複合体により実施される進化上高度に保存された過程を指す（Modrich, P. (1994) Science 266: 1959 - 1960; Parsons, R.ら (1995) Science 268: 738 - 740; Perucho, M. (1996) Biol Chem. 377: 675 - 684）。ミスマッチ修復遺伝子はこうしたミスマッチ修復複合体のタンパク質の1種をコードする遺伝子である。いずれかの特定の作用機序理論により拘束されることを欲しないとは言え、ミスマッチ修復複合体はヌクレオチド塩基の非相補的対形成から生じるDNAらせんの歪みを検出すると考えられている。より新しいDNA鎖上の非相補的塩基が取り出され、そして該取り出された塩基がより古いDNA鎖に相補的である適切な塩基で置換される。こうして、細胞は、DNA複製中の誤りの結果として起こる多くの突然変異を排除して、親細胞由来の同胞細胞の遺伝的安定性をもたらす。

【0039】

数種の野性型アレル、ならびにドミナントネガティブのアレルは、同一細胞中の野性型アレルの存在下であってもミスマッチ修復欠損表現型を生じさせる。ミスマッチ修復遺伝子のドミナントネガティブのアレルの一例は、コドン134に短縮突然変異を持つヒト遺伝子hPMS2-134である（Parsons, R.ら (1995) Science 268: 738 - 740; Nicolaides N. C.ら (1998) Mol. Cell. Biol. 18: 1635 - 1641）。突然変異はこの遺伝子の産物を134番目のアミノ酸の位置で異常に終止させ、N末端の133アミノ酸を含む短縮されたポリペプチドをもたらす。こうした突然変異は、DNA複製後に細胞中に蓄積する突然変異の率の増大を引き起こす。ミスマッチ修復遺伝子のドミナントネガティブのアレルの発現は、野性型アレルの存在下であってもミスマッチ修復活性の減損をもたらす。こうした影

10

20

30

40

50

響を生じさせるいかなる PMS 2 相同体も、それが野性型であろうと変えられていようと、それが哺乳動物、酵母、真菌、両生類、昆虫、植物、細菌由来であろうとキメラもしくは融合タンパク質として設計されていようと、本発明で使用し得る。

【0040】

例えば宿主 MMR の供給源となりうる酵母は突然変異されていてももしくはされていなくてもよい。本出願で使用される「酵母」という用語は、限定されるものでないがサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) 種、ピキア属 (*Pichia*) 種、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*) 種、クワイベロミセス属 (*Kluyveromyces*) 種および他の真菌を挙げることができる真核生物界からのいかなる株も含んでなる (Gellissen, G. と Hollenberg, C. P. (1997) *Gene* 190(1): 87-97)。これらの生物体は例えば化学物質変異原もしくは放射に曝露し得、そして不完全なミスマッチ修復についてスクリーニングし得る。ミスマッチ修復タンパク質をコードするいかなる細胞からのゲノム DNA、cDNA、mRNA もしくはタンパク質も野性型配列からの変異について分析し得る。PMS 2 相同体のドミナントネガティブのアレルもまた、例えば、タンパク質の一部分が配列番号 23 もしくは配列番号 24 のコンセンサス配列を含んでなり、PMS 2 - 134 と約 90% のアミノ酸相同性を有する、および異種アミノ酸配列である別の部分の融合タンパク質もしくはキメラタンパク質を創製することにより人工的に創製し得る。

10

【0041】

部位特異的突然変異誘発の多様な技術を使用し得る。超変異性酵母の生成における使用のためのこうしたアレル (天然であれ人工的であれ) の適合性は、(Nicolaides N. C. ら (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18: 1635-1641 に記述される方法を使用して) 1 種もしくはそれ以上の野性型アレルの存在下での該アレルにより引き起こされるミスマッチ修復活性を試験してそれがドミナントネガティブのアレルであるかどうかを決定することにより評価し得る。

20

【0042】

ミスマッチ修復遺伝子の野性型ミスマッチ修復アレルもしくはドミナントネガティブのアレルを過剰発現する細胞は超変異性になることができる。これは、こうした細胞の自発的突然変異率がこうしたアレルを伴わない細胞と比較して上昇されることを意味している。自発的突然変異率の上昇の程度は、1 時間あたりの細胞倍加の関数として測定されるところの正常細胞のもの最低 2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍もしくは 1000 倍であり得る。

30

【0043】

本発明の一面によれば、PMS 2 相同体をコードするポリヌクレオチドを例えば哺乳動物細胞、脊椎動物細胞、植物細胞もしくは酵母のような細胞中に導入する。該遺伝子は PMS 2 相同体でありかつドミナントネガティブである。PMS 2 相同体は天然に存在し得るか、もしくは実験室で作成し得る。ポリヌクレオチドはゲノム DNA、cDNA、RNA、または化学的に合成されたポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの形態であり得る。該分子は、形質転換、電気穿孔法、交接、粒子砲撃法、もしくは文献中に記述される他の方法により細胞中に導入し得る。

40

【0044】

形質転換は、本明細書で、それによりポリヌクレオチドもしくはポリペプチドが細胞中に導入されるいずれかの方法として使用される。形質転換の方法は細胞の懸濁液を使用して酵母培養物中で実施し得る。

【0045】

一般に、形質転換は細胞の懸濁液を使用して実施することができるが、しかし、他の方法もまた、処理された細胞の十分な部分がトランスフェクトされた細胞を増殖かつ利用させるように該ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドを取り込む限りは使用可能である。ポリヌクレオチドのタンパク質産物は細胞中で一過性もしくは安定に発現されてよい。形質転換の技術は当業者に公知である。細胞中にポリヌクレオチドもしくはポリペプチド

50

を導入するのに利用可能な技術は、限定されるものでないが電気穿孔法、ウイルス形質導入、細胞融合、スフェロプラストもしくは化学的にコンピテントな細胞（例えば塩化カルシウム）の使用、および目的の細胞との融合のための脂質と一緒にポリヌクレオチドのパッケージングを挙げることができる。細胞がミスマッチ修復遺伝子もしくはタンパク質で一旦形質転換されれば、該細胞を液体培養物中もしくはペトリ皿のような固形アガーマトリックス上のいずれかで増殖させかつ操作し得る。トランスフェクトした細胞が安定である場合、遺伝子は多くの細胞世代について一貫したレベルで発現されることができ、そして安定な超変異性酵母株が生じる。

【0046】

単離された酵母細胞は、発現ベクターの抗生物質選択を使用して株を化学的に選択することにより酵母培養物から得ることができる。酵母細胞が単一細胞由来である場合はそれをクローンと定義する。酵母のような微生物の単一細胞クローニング技術は当該技術分野で公知である。

10

【0047】

PMS2 相同体をコードするポリヌクレオチドは、酵母のゲノム中に導入し得るか、もしくは2- μ プラスミドのような染色体外プラスミド上で増殖させ得る。ミスマッチ修復遺伝子発現ベクターをもつクローンの選択は、適切なアミノ酸もしくは記述されるものの(Schneider, J. C. と L. Guarante (1991) *Methods in Enzymology* 194: 373)他の必須栄養素を欠く合成完全培地上で細胞をプレーティングすることにより達成し得る。酵母は、限定されるものでないがサ

20

【0048】

当該技術分野で既知のトランスジェニック酵母のいかなる作成方法も使用し得る。トランスジェニック微生物の1製造方法によれば、当業者に公知の方法の一によりポリヌクレオチドを酵母中に導入する。次に、ミスマッチ修復遺伝子をコードするポリヌクレオチドが安定な実体として宿主ゲノム中に取り込まれるかもしくは自己複製する染色体外プラス

30

【0049】

PMS2 相同体を発現するように安定なトランスジェニック細胞を一旦工作すれば、該細胞を培養して同一細胞内に保持される目的の1種もしくはそれ以上の遺伝子中で新規突然変異を創製し得る。目的の遺伝子は細胞により天然に有されるいかなる遺伝子、もしくは標準的組換えDNA技術により細胞宿主中に導入されたものであり得る。標的遺伝子(1種もしくは複数)は選択前に知られていてももしくは未知であってもよい。酵母内の常在性のもしくは染色体外遺伝子中で突然変異を誘発するためにトランスジェニック酵母細胞を使用する一利点は、標的遺伝子(1種もしくは複数)中に一連のランダムな遺伝子変化を生じさせるために細胞を変異原性傷害(それが化学物質であるにせよ放射であるにせよ)に曝露することが不必要であることである。これは、変えられたミスマッチ修復過程の結果として生じる天然に生じる突然変異の高度に効率的な性質および範囲による。しかしながら、MMR欠損細胞と一緒に化学物質および/もしくは放射のいずれかの同時の使用により突然変異の範囲および頻度を増大させることが可能である。組合せ処置の正味の影響は、新たな発現特質を生じさせるのに有用である遺伝的に変えられた酵母における突然変異率の増大である。組合せ処置の率は、MMR欠損細胞のみもしくは野性型MMR細

40

50

胞とともに変異原のみを使用する率より高い。同一の戦略が脊椎動物および哺乳動物細胞を包含する他の型の細胞に有用である。

【0050】

本発明のMMR欠損細胞は、商業的に望ましい応用とともに新たな発現特質を表すパリアントサブクローンの直接選択のための遺伝子スクリーニングで使用し得る。これは遺伝子の同定、単離および特徴付けの退屈かつ時間のかかる段階を迂回することを可能にする。

【0051】

突然変異は、その遺伝子型および/もしくは表現型の変化について突然変異誘発した細胞を内的にかつ/もしくは外的に分析することにより検出し得る。MMR欠損微生物細胞中で変えられた表現型を生じさせる遺伝子は、当業者に公知の多様な分子技術のいずれかにより識別し得る。例えば、細胞のゲノムを単離し得、そして、酵母ゲノムの制限フラグメントのライブラリーをプラスミドベクター中にクローン化し得る。該ライブラリーを「正常」細胞に導入し得、そして新規表現型を表す細胞をスクリーニングし得る。新規表現型を表す正常細胞からプラスミドを単離し得、そして遺伝子(1種もしくは複数)をDNA配列分析により特徴付けし得る。

10

【0052】

あるいは、ドライバーおよびテスターRNA(それぞれ野性型および新規変異体由来)を利用し、次いで、当業者に公知の標準的分子生物学の方法により示差的転写物をクローニングしかつそれらの特徴付けする示差的メッセンジャーRNAスクリーニングを使用し得る。さらに、探究された変異体が染色体外プラスミドによりコードされる場合には、ドミナントネガティブのMMR遺伝子および目的の遺伝子の共発現後、ならびに表現型選択後に、プラスミドを変異体クローンから単離し得、そして当業者に公知の方法を使用するDNA配列分析により分析し得る。

20

【0053】

MMR欠損変異体における発現特質についての表現型スクリーニングは、変えられた遺伝子産物の生化学的活性および/もしくは容易に観察可能な表現型によることができる。変異体の表現型はまた、変異体遺伝子によりコードされるタンパク質の電気泳動の移動度、転写因子の場合はDNA結合、IR、CD、X線結晶学もしくは高電界型NMR分析のような分光学的特性または他の物理的もしくは構造的特徴の変化を同定することによっても検出可能である。in situで、単離された形態でもしくはモデル系でタンパク質の変えられた新規機能についてスクリーニングすることもまた可能である。遺伝子が選択前に既知であろうと未知であろうと、目的の遺伝子の機能に関連した酵母のいかなる特性の変化についてもスクリーニングし得る。

30

【0054】

論考されるスクリーニングおよび選択方法は商業的に価値のある発現特質をもつ新規変異体を得る潜在的手段を具体的に説明することを意味しているが、しかし、それらはスクリーニングおよび選択が当業者により実施され得る多くの可能な方法を制限することを意味していない。

【0055】

PMS2相同体挿入物をもつプラスミド発現ベクターを多数の商業的に入手可能な制御配列とともに使用して、ドミナントネガティブのMMRタンパク質の一時的および定量的双方の生化学的発現レベルを制御し得る。制御配列はプロモーター、エンハンサーもしくはプロモーター/エンハンサーの組合せより構成され得、そして、MMR遺伝子の上流もしくは下流のいずれかに挿入して発現レベルを制御し得る。制御配列は、染色体外発現ベクターについて当業者に公知のもののものであることもできるか、もしくは相同的組換えを介してゲノム中に組込まれる構築物上にあり得る。これらの型の制御系は学術的刊行物中に開示されており、そして当業者に馴染みがある。

40

【0056】

目的の新規の所望の発現特質をもつ細胞が一旦創製されれば、異常なMMR活性の活性

50

は、望ましくは、当該技術分野で既知のいずれかの手段により減弱もしくは排除される。これらは、限定されるものでないが、培地からプロモーター活性化の原因である誘導物質を除去すること、形質転換された酵母細胞からプラスミドをキュアリングすること、および目的の遺伝子を「ループアウトさせる」5-フルオロオロト酸のような化学物質の添加を挙げることができる。

【0057】

誘導可能に制御されるドミナントネガティブのPMS2相同体の場合には、PMS2相同体の発現のスイッチを入れて（誘導して）新たな発現特質をもつ超変異性細胞の一集団を生成させることができる。ドミナントネガティブのMMRアレルの発現のスイッチを迅速に切って、商業的目的の新たな発現特質を表す遺伝的に安定な株を再構成することができる。生じる細胞は今や、それにかげられる選択方法に依存して多様な商業的応用に適用し得る安定な細胞株として有用である。

10

【0058】

遺伝的に欠損のミスマッチ修復細胞を使用して新たな発現特質を得る場合には、遺伝的欠損を補いそして従って特質選択後に宿主のミスマッチ修復活性を復帰させるのに十分な野性型ミスマッチ修復遺伝子を発現するトランスジェニック構築物を使用し得る [Grzesiuk, E.ら(1998) *Mutagenesis* 13:127-132); Bridges, B. A.ら(1997) *EMBO J.* 16:3349-3356); LeClerc, J. E. (1996) *Science* 15:1208-1211); Jaworski, A.ら(1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11019-11023]。生じる細胞は遺伝的に安定でありかつ多様な商業的応用に使用し得る。

20

【0059】

ヒトおよびMSH2、MLH1、MLH3などのような酵母からの外来（外因性、トランスジェニック）ミスマッチ修復遺伝子の過剰発現の使用は、酵母宿主においてドミナントネガティブの変異誘発体表現型を生じさせることが以前に示されている (Shcherbakova, P. V.ら(2001) *Mol. Cell. Biol.* 21(3):940-951; Studamire, B.ら(1998) *Mol. Cell. Biol.* 18:7590-7601; Alani E.ら(1997) *Mol. Cell. Biol.* 17:2436-2447; Lipkin, S. M.ら(2000) *Nat. Genet.* 24:27-35)。加えて、原核生物のドミナントネガティブのMMR遺伝子を発現する酵母株ならびに内在性MMRタンパク質中にゲノム欠損を有する宿主の使用もまた、ドミナントネガティブの変異誘発体表現型をもたらすことが以前に示されている (Evans, E.ら(2000) *Mol. Cell.* 5(5):7897-7899; Aroonsham, A.とM. G. Marinus (1996) *Nucl. Acids Res.* 24:2498-2504; Wu, T. H.とM. G. Marinus (1994) *J. Bacteriol.* 176:5393-5400; Brosh R. M. Jr.とS. W. Matson (1995) *J. Bacteriol.* 177:5612-5621)。しかしながら、ここに開示される知見は、超変異性酵母を創製するための、ヒトPMSR2遺伝子 (Nicolaides, N. C.ら(1995) *Genomics* 30:195-206)、関連するPMS2-134短縮型MMR遺伝子 (Nicolaides N. C.ら(1995) *Genomics* 29:329-334)、植物のミスマッチ修復遺伝子 (米国特許出願第09/749,601号明細書) およびPMS2遺伝子の134個のN末端アミノ酸に相同である遺伝子を包含するPMS2相同体の使用を教示する。

30

40

【0060】

PMS2相同体を使用して超変異性生物体を創製する能力は、限定されるものでないが製造業を挙げることができる多様な応用、新たな生化学物質の生成、有毒化学物質（製造工程の副生成物もしくは触媒として使用されるもののいずれか）の解毒、ならびに、限定されるものでないがポリクロロベンゼン (PCB)、重金属および他の環境の危険を挙げ

50

ることができる環境中に存在するトキシンの是正を助けるのに有用な新たな出力の特徴を表す革新的酵母株を生成させるのに使用し得る。新規細胞株は、生体内変換によってタンパク質もしくは非タンパク質治療的分子の増大された量もしくは質のいずれかを生じさせる高められた活性について選択し得る。生体内変換は、微生物もしくは微生物由来の抽出物による、経路もしくはスキーム中の一化学物質中間体の次の中間体もしくは生成物への酵素的転化である。ペニシリンG、エリスロマイシンおよびクラブラン酸を包含する重要な生物学および化学的生成物の商業的製造のための使用における生体内変換の多数の例が存在する。「原」材料の次段階の(advanced)中間体および/もしくは最終生成物への転化で効率的である生物体もまた生体内変換を実施し得る(Berry, A. (1996) Trends Biotechnol. 14(7): 250-256)。PMS2相同体を使用する宿主細胞中でのDNAの超変異性を制御する能力は、限定されるものでないがトキシン耐性であり、トキシンをin situで分解する能力もしくはある分子を中間体から次段階の中間体もしくは最終生成物のいずれかに転化する能力を有する生物体を挙げるることができる商業的目的の新たな表現型について選択し得るバリエーションタイプの生成を可能にする。

10

【0061】

新たな発現特質について宿主細胞の遺伝的变化を生じさせるPMS2相同体を使用する他の応用は、限定されるものでないがより多量の組換えポリペプチドを生じさせる組換え生産株、ならびに化学物質を転換もしくは製造下流の工程を触媒し得る変えられた内因性遺伝子の使用を挙げるることができる。調節可能なPMS2相同体を使用して商業的に有益な発現特質をもつ細胞を生じさせ得る。この方法を使用して、PMS2相同体を発現する細胞を目的の表現型について直接選択し得る。指定された発現特質をもつ選択された細胞が一旦単離されれば、当業者に公知のいくつかの方法により超変異性活性のスイッチを切ることができる。例えば、PMS2相同体が誘導可能なプロモーター系により発現される場合、誘導物質が除去もしくは枯渇され得る。こうした系は、限定されるものでないが：ラクトースの誘導可能なGALI-GAL10プロモーター(Johnston, M.とR. W. Davis (1984) Mol. Cell Biol. 4: 1440);リン酸の誘導可能なPH05プロモーター(Miyano-hara, A.ら(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1-5);アルコール脱水素酵素I (ADH)および3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(PKG)プロモーターのようなプロモーター、限定されるものでないが乳酸(Ammerer, G. (1991) Methods in Enzymology 194: 192; Mellor, J.ら(1982) Gene 24: 563); Hahn S.とL. Guarente (1988) Science 240: 317);ピキアパストリス(Pichia pastoris)中のアルコール酸化酵素(AOX)(Tschopp, J. F.ら(1987) Nucl. Acids Res. 15(9): 3859-76;および分裂酵母(Schizosaccharomyces pombe)中のチアミンで抑制可能な発現プロモーターnmt1(Moreno, M. B.ら(2000) Yeast 16(9): 861-872)を挙げるることができる、構成的であると考えられるがしかし酵母細胞を醗酵可能でない炭素源中で増殖させる場合に抑制/脱抑制され得るものを挙げるることができる。酵母細胞は、LiClでの化学的形質転換(Mount, R. C.ら(1996) Methods Mol. Biol. 53: 139-145)および電気穿孔法(Thompson, J. R.ら(1998) Yeast 14(6): 565-571)を包含する当業者に既知のいずれかの手段により形質転換し得る。DNAで形質転換されている酵母細胞は、限定されるものでないが選択可能なマーカー(URA3; Rose, M.ら(1984) Gene 29: 113; LEU2; Andreadis, A.ら(1984) J. Biol. Chem. 259: 8059; ARG4; Tschumper G.とJ. Carbon (1980) Gene 10: 157;およびHIS3; Struhl, K.ら(1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1035)ならびに酵母細胞の増殖を阻害する薬物(ツニカマイシン、TUN; Hahn S.ら(19

20

30

40

50

88) *Mol. Cell Biol.* 8: 655) を挙げることができる多様な方法により増殖について選択し得る。組換えDNAは上述されたとおり酵母に導入し得、また、酵母ベクターは染色体外でもしくは特定の遺伝子座中に組込まれてのいずれかで酵母細胞内で持たれ得る。染色体外に基づく酵母発現ベクターは高コピーに基づく(2-pmベクター-Yep13のような; Rose, A. B. と J. R. Broach (1991) *Methods in Enzymology* 185: 234)、YRp7のような自律複製配列(ARS)を含有する低コピーセントロメアベクター(Fitzgerald-Hayes, M. ら (1982) *Cell* 29: 235)ならびに目的の遺伝子を宿主ゲノム内の指定された遺伝子座に導入させかつ安定な様式で増殖させる組込みベクター(Rothstein, R. J. (1991) *Methods in Enzymology* 101: 202)のいずれかであり得る。酵母におけるMMR遺伝子の異所性発現は、限定されるものでないが特定の化学的誘導物質の培地からの除去(例えば、ビール酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)中のGAL10プロモーターの発現を駆動するガラクトース、もしくはピキアパストリス(*Pichia pastoris*)中のAOX1プロモーターの発現を駆動するメタノールを枯渇させる)を挙げることができる多様な方法により随意に減弱もしくは完全に排除し得、染色体外で複製するプラスミドは非選択的条件下での細胞の増殖により発現プラスミドから「キュアリング」され得(例えば、YEp13を持つ細胞はロイシンの存在下で増殖し得る)、また、ゲノム中に挿入された遺伝子を有する細胞は挿入された遺伝子座を「ループアウト」させる化学物質とともに増殖させ得る(例えば、URA3を有する組込み体は5-フルオロオロト酸での組込み体の増殖により挿入された遺伝子の喪失について選択し得る(Boeke, J. D. ら (1984) *Mol. Gen. Genet.* 197: 345-346)。誘導物質の除去によるしる化学物質での酵母細胞の処理にしる、MMR発現の除去は遺伝的に安定な酵母細胞株の再樹立をもたらす。その後、変異体MMRの欠如は、宿主細胞中での内因性の野性型MMR活性が正常に機能してDNAを修復することを可能にする。新規の選択された発現特質を表す新たに生成された変異体酵母株は、広範な商業的工工程もしくは特定の発現特質の生成に關与する新たな生体分子を同定するための遺伝子/タンパク質の発見に適する。もちろん、酵母は使用しうる細胞型の一例にすぎず、そして、既知のプロモーターおよび誘導物質を使用する類似の戦略を、例えば脊椎動物、昆虫および哺乳動物細胞を包含する他の型の細胞での使用に使用してよい。

【0062】

さらに、ミスマッチ修復は化学的に誘導されるDNA付加物の修復を司り、従って、この過程を遮断することは、理論上、酵母の数、型、突然変異率およびゲノムの変化を増大させ得る[Rasmussen, L. J. ら (1996) *Carcinogenesis* 17: 2085-2088); Sledziewska Gojska, E. ら (1997) *Mutat. Res.* 383: 31-37); および Janion, C. ら (1989) *Mutat. Res.* 210: 15-22)]。上に列挙した化学物質に加え、酵母中でDNA突然変異誘発を引き起こすことが知られているイオン化放射およびUV照射を包含する他の型のDNA変異原もまたこの過程を潜在的に高めるのに使用し得る(Leec, C. C. ら (1994) *Mutagenesis* 9: 401-405; Vidal A. ら (1995) *Carcinogenesis* 16: 817-821)。宿主細胞に対し極めて毒性でありかつ従って変えられた酵母細胞の実際のプールのサイズの減少をもたらすこれらの作用物質はMMR欠損宿主中でより耐えられ、そして順に高められた範囲および程度のゲノム突然変異誘発を可能にする。

【0063】

本発明の一般的方法は、従って、PMS2相同体の導入から超変異性にされた細胞が突然変異を蓄積する、突然変異された遺伝子のライブラリーの生成方法もまた提供し、そして、その後、突然変異された遺伝子(野性型親宿主細胞に比較して)を含んでなるcDNAおよびゲノムライブラリーを生じさせるのに使用してよい。cDNAおよびゲノムライブラリーの製造方法は当該技術分野で公知であり、そして、技術は例えばSambroo

から MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第3版、2001に見出されるかもしれない。

【0064】

本発明はまた、配列番号23のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と前記サンプルを接触させて配列番号23のアミノ酸配列を含んでなるPMS2相同体をコードするポリヌクレオチドの発現を検出することを含んでなる、新形成を検出するための細胞のアッセイ方法も提供し、ここで前記PMS2相同体の発現は新形成と関連する。

【0065】

PMS2相同体は配列番号23もしくは配列番号24のコンセンサス配列を有するとして同定され、そして、配列番号23もしくは配列番号24をコードする配列を含んでなる核酸により検出されうる。当業者は、腫瘍性であると疑われる細胞中のPMS2相同体の発現を検出するように逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応アッセイ(RT-PCRアッセイ)を設計しうる。ノーザンプロットもまた、例えばSambrookら MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第3版、2001に見出されるもののような標準的プロトコルを使用してPMS2相同体発現を検出するのに使用してよい。

【0066】

本発明はまた、PMS2相同体もしくはそのペプチドフラグメントに対し向けられた抗体と前記サンプルを接触させること；およびPMS2相同体もしくはそのペプチドフラグメントとともに形成された抗体複合体の存在を検出してそれにより前記サンプル中の前記PMS2相同体の存在を検出することを含んでなる、新形成を検出するための細胞のアッセイ方法も提供し、ここで前記PMS2相同体の存在は新形成と関連する。PMS2相同体の検出方法は、限定されるものでないがラジオイムノアッセイ、ウェスタンプロット、免疫蛍光アッセイ、酵素免疫測定法(ELISA)および化学発光アッセイを挙げることができる当該技術分野で既知のいかなる手段によってもよい。これらのアッセイの多様なプロトコルが当該技術分野で公知である。

【0067】

本発明はまた、PMS2相同体関連の新形成を伴う患者を同定すること、前記患者に前記PMS2相同体の発現の阻害剤を投与することを含んでなる、癌を伴う患者の治療方法も提供し、ここで前記阻害剤は前記PMS2相同体関連の新形成における前記PMS2相同体の発現を抑制する。こうした新形成は例えばリンパ腫を包含する。PMS2相同体発現の阻害剤は、PMS2相同体を特異的に結合するアンチセンスヌクレオチド、リボザイム、抗体フラグメントおよびATPアーゼ類似物を包含する。

【0068】

アンチセンス分子は、PMS2相同体をコードするRNAの一部に相補的でありかつ該RNAに特異的に結合するポリヌクレオチドである。アンチセンス分子はPMS2相同体RNAの翻訳を阻害し、そしてそれによりPMS2発現の影響を阻害する。アンチセンス分子は、リボソーム結合もしくは翻訳の開始に関与するRNAの部分ならびにコーディング配列の部分に向けられてよい。一般に、アンチセンス分子は長さが最低15ヌクレオチドであるが、しかし、長さが20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチドもしくはそれ以上であってよい。

【0069】

リボザイムは、基質ヌクレオチドを切断する特定の触媒的種類のアンチセンス分子である。PMS2相同体のためのリボザイムの設計は、例えばLyngstadaas SP.(2001) "Synthetic hammerhead ribozymes as tools in gene expression" Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 12(6): 469-78; Samarsky D, Ferbeyre G, Bertrand E. (2000) "Expressing active ribozymes in cells" Curr. Issues Mol. Biol. 2(3): 87-93に記述されるところの当該技術分野で公知の方法を使用して実施

10

20

30

40

50

してよい。リボザイムもしくはリボザイムをコードするベクターを、PMS2相同体を発現する細胞に導入し、そしてPMS2相同体をコードするポリヌクレオチドにリボザイムが結合しかつ切断するように活性化し、それによりPMS2相同体の発現を予防する。

【0070】

上の開示は本発明を一般的に記述する。より完全な理解は、具体的説明のみの目的上本明細書に提供されることができかつ本発明の範囲を制限することを意図していない以下の特定の実施例への言及により得ることができる。

【実施例】

【0071】

実施例1：リンパ組織の腫瘍中のPMSR2およびPMSR3 RNA発現の関連の評価
ならびにマイクロサテライトの不安定性プロファイルとの比較 10

一団のリンパ腫組織および細胞系を、PCR媒介性の遺伝子型分析によりマイクロサテライトの不安定性(MI)について、ならびに以前に使用されかつNicolaides博士による刊行物中(Liu, B.ら(1996) Nature Med. 2: 169-174; Nicolaides, N. C.ら(1996) Genomics 31: 395-397)で記述された方法に従ったRT-PCRを介してPMSR2およびPMSR3発現について分析する。RNA発現研究のため、製造元(ギブコ/BRL(Gibco/BRL))により記述されたところのライゾール法を使用して一団の83種のリンパ腫細胞株(ATCCおよび個人的接触から得た)からRNAを抽出する。100ngの全RNAを、製造元(ギブコ/BRL(Gibco/BRL))により推奨されるとおり20μlの反応中でスーパースクリプト(Superscript)II逆転写酵素(RT)およびプライマーとしてのランダムヘキサマーを使用して逆転写する。各サンプルをRTを含む(RT+)もしくは含まない(RT-)反応緩衝液中でインキュベートし、ここでRT-サンプルは陰性対照としてはたらく。反応を37°Cで1時間インキュベートし、そして100マイクロリットルの最終容量まで希釈する。慣例で、5μlの各サンプルを、6.7mMトリス、pH 8.8、16.6mM (NH₄)₂SO₄、6.7mM MgCl₂、10mM 2-メルカプトエタノール、4% DMSO、1.25mMの4種のdNTPのそれぞれ、175ngの各cDNA特異的プライマー、および1UのTaqポリメラーゼを含有する25μlの反応中でのPCR反応に使用する。増幅は94°C 30秒間、58°C 90秒間、72°C 90秒間で30周期実施する。反応の半分を1×トリス酢酸EDTA泳動用緩衝液中1%アガロースゲル上に負荷し、そして臭化エチジウム染色により検出する。下は、遺伝子特異的プライマーおよび期待される分子量のPCRフラグメントを含む表(表1)である。サンプルは、RT+反応が期待された分子量のDNAフラグメントを含有する一方でRT-もしくは水対照中でシグナルが観察されない場合に陽性と評価する。 20 30

【0072】

【表 1】

表1：細胞および組織からのPMSR cDNAの特異的増幅のためのプライマー

遺伝子	フォワードプライマー	リバースプライマー	大きさ(bp)
hPMS2	5'-ggacgagaagtataactcgag-3' (配列番号:27)	5'-catctcgcttggttaagagc-3' (配列番号:28)	372
hPMSR2	5'-ggcgcaccaagcaagag-3' (配列番号:29)	5'-actgcgtrtttccgaacg-3' (配列番号:30)	221
hPMSR3	5'-atgttgagaactacagcc-3' (配列番号:31)	5'-cactccatagtccttaagc-3' (配列番号:32)	278
β -actin	5'-gggaatgggtcagaagac-3' (配列番号:33)	5'-ttcacgggtgccttaggg-3' (配列番号:34)	209

10

【0073】

PMSR2およびPMSR3を発現することが既に決定された細胞株を陽性対照として使用する一方、PMSRヌルと以前に同定された株を陰性対照として使用する。サンプルを二重で分析して発現の再現性を確認する。

【0074】

リンパ腫サンプルのマイクロサテライトの不安定性を評価するために、上述されたところの一団のリンパ腫からDNAを単離する。DNAは記述されるところの(Liuら(1996) Nature Med. 2:169-174)プロテイナーゼK消化およびフェノール抽出手順を使用して単離することができる。リンパ腫細胞およびHCT116(MMR欠損のヒト結腸上皮細胞株)からの多様な量の試験DNAを使用してわれわれのマイクロサテライト試験の感受性を決定する。D2S123、BAT26およびBAT40アレルはHCT116細胞中で不均一であることが知られており、そして従ってMIの検出のための陽性対照として使用する。MIについて測定するために、DNAを制限希釈により力価測定して各マーカーの組について感受性のレベルを決定する。DNAは、BAT26F:5'-tgactacttttgacttcagcc-3'(配列番号35)およびBAT26R:5'-aaccaattcaacatttttaaccc-3'(配列番号36);BAT40F:5'-attaacttcctacaccacaac-3'(配列番号37)およびBAT40R:5'-gtagagcaagaccaccttg-3'(配列番号38);ならびにD2S123F:5'-acattgctggaggttcctggc-3'(配列番号39)およびD2S123R:5'-cctttctgaccttgatacca-3'(配列番号40)プライマーを記述された(Nicolaides, N.C.ら(1995) Genomics 30:195-206)ところの緩衝液中で使用してPCR増幅する。簡潔には、1pgないし100ngのDNAを以下の条件すなわち94 30秒間、50~55 30秒間、72 30秒間を30周期を使用して増幅する。その後PCR反応を8%変性ポリアクリルアミドゲル上で分離しかつオートラジオグラフィーにより可視化する。これらの試薬およびパラフィン包埋組織から抽出したDNAを使用する予備試験は、0.1ngのゲノムDNAがわれわれの条件を使用する検出の限界であることを慣例に見出している。

20

30

40

【0075】

マイクロサテライトの安定性は、同一の臨床サンプルもしくは細胞からの0.01ngのDNAの20回の独立した反応を使用してPCRにより細胞中で測定しうる。この濃度は、典型的に、サンプルあたり同等な1ゲノムの測定を可能にし、また、特定の1細胞株もしくは組織の増殖の間に起こっていたクローン性バリエーション中のマイクロサテライトの変化の検出を可能にする。サンプルは、特定の1マーカーの最低2サンプルが所定のサンプルの優位を占めるアレルの大きさと異なるPCRフラグメントを有することが見出され

50

る場合にMI+と評価する。統計学的解析は、PMSR2もしくはPMSR3を発現するMI+細胞の数をいずれのPMSR遺伝子も発現しないものと比較することにより実施する。

実施例2：免疫染色およびタンパク質レベルでの概念の証明のためのPMSR2およびPMSR3に特異的なポリクローナル抗血清の生成

PMSR2もしくはPMSR3を特異的に認識し得る抗体を産生する能力は、診断的マーカーとして、これらのタンパク質を発現する組織の*in situ*分析方法を確立するために非常に有用である。図4に示されるとおり、PMSR特異的ペプチドの生成を、特定の1PMSRポリペプチドの特異的発現を測定するための組織分析に使用する。図4に示されるイムノプロットは、他のPMSR相同体に対する交差反応性をもたないPMSRタンパク質の特異的検出を可能にする新たな抗血清に対する必要性を示す。PMSR特異的抗血清を生成させるために、われわれは20アミノ酸のペプチドを合成しかつウサギでの抗血清産生のためにKLH免疫原にそれらを結合することができる。hPMSR2およびhPMSR3タンパク質のアミノおよびカルボキシ末端に向けられるペプチドを既知の方法により生成しうる。合成されるべきペプチドのアミノ酸配列を表2に提供する。全ペプチドは、過去にわれわれのグループについて溶解性の問題を呈した複数のシステインおよびトリプトファン残基を回避するようにアミノ酸5ないし26を含有するN末端hPMSR3ペプチドを除き、コードされるポリペプチド(Nicolaides, N.C.ら(1998) Mol. Cell. Biol. 18: 1635-1641)の最初のもしくは最後の20アミノ酸残基に向けられる。

【0076】

【表2】

表2: PMSR2およびPMSR3特異的抗血清のためのペプチド

タンパク質	N-末端ペプチド	C-末端ペプチド
hPMSR2	MAQPKQERVARARHQRSETA (配列番号:41)	LEDNVITVFSSVKNKNGPGSSR (配列番号:42)
hPMSR3	RPRLGRRCMVSPRARAPREQ (配列番号:43)	GVEEENFEGLISFSSETSHM (配列番号:44)

【0077】

製造したペプチドを精製し、そして質量分析およびHPLC分析により分析する。3mgの免疫純粋なペプチドを、配列中のシステイン残基に対する必要性を排除する水溶性カルボジイミドを使用してキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)担体に複合体化する。残存するペプチド物質はELISAおよびウェスタンブロットによる抗血清分析に使用する。複合体化後にKLHに連結したペプチドをフロイントのアジュバントに再懸濁し、そして免疫感作の準備が完了である。

【0078】

以下のプロトコルを使用してウサギを各ペプチドに対し免疫する。第0日に前採血を各宿主ウサギから採取することができる。20mlの血清サンプルを収集しかつ分析する第49、63および77日の3回の予定した採血を伴う毎週の予定でのアジュバントを含有する溶液の注入により、抗原をウサギに投与する。採血は酵素免疫測定法(ELISA)およびウェスタンブロットにより、PMSR2およびPMSR3についての免疫化ペプチドに対し向けられた抗血清について分析することができる。

【0079】

ELISAアッセイを実施して、上述された天然のペプチドに対する抗体の反応性について測定するための未精製採血中で抗体力価を試験する。簡潔には、各ペプチドを含有する1μg/ml溶液50μlで96ウェルプレートに4で4時間被覆する。各ペプチドを含有するウェルを各抗血清によりプロービングしてバックグラウンドおよび抗体特異性について測定する。プレートをカルシウムおよびマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理

10

20

30

40

50

的食塩水 (PBS) で3回洗浄し、そして5%粉乳を含む100 μ lのPBS溶液中室温で1時間ブロッキングする。ブロッキング後にウェルをすすぎ、そして各ウサギからの免疫前血清もしくはそれぞれの採血の5倍希釈物を含む100 μ lのPBS溶液とともに2時間インキュベートする。その後プレートをPBSで3回洗浄し、そしてヒツジ抗ウサギワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合二次抗体の3000倍希釈物を含む50 μ lのPBS溶液とともに室温で1時間インキュベートする。その後、プレートをPBSで3回洗浄し、そして50 μ lのTMB-HRP基質 (バイオラッド (BioRad)) とともに室温で15分間インキュベートして抗体力価を検出する。50 μ lの500 mM重炭酸ナトリウムを添加することにより反応を停止し、そしてバイオラッド (BioRad) のプレートリーダーを使用して415 nmのODにより分析する。サンプルは、バックグラウンド (免疫前血清および/もしくは陰性対照ペプチド) を上回る高められたシグナルが観察される場合に陽性であると決定する。

10

【0080】

全細胞抽出物中の期待される分子量のタンパク質を認識する抗血清の能力を立証するため、プローブとして上で生成された抗血清を使用してウェスタンブロットもまた実施する。最初に、複合体化されていないペプチドを抗体反応性について試験する。表2に列挙したペプチドを20 μ lの2xSDS溶解緩衝液 (60 mMトリス、pH 6.8 / 2% SDS / 0.1 M 2-メルカプトエタノール / 0.1% プロモフェノールブルー) に添加し、かつ2分間沸騰させる。その後、18% トリス-グリシンSDS / PAGEゲル中で各サンプル20マイクロリットルを10分間電気泳動し、そして転写緩衝液 (48 mMトリス / 40 mMグリシン / 0.0375% SDS / 20% メタノール) 中でイモビロン (Immobilon) - P (ミリポア (Millipore)) メンブレンに20分間電気ブロッティングしてペプチド結合を最大にする。フィルターをブロッキング緩衝液 (TBS、0.05% トウイン (Tween) - 20 / 5% 粉乳) 中で一夜ブロッキングする。フィルターは、各ウサギからの多様な前採血および抗血清、次いで二次ワサビペルオキシダーゼ結合抗ウサギ (ピアース (Pierce)) でプロービングし、そして化学発光のため調製する。サンプルは、適切な抗血清が対応するペプチド抗原と反応する一方で陰性もしくはペプチド対照レーンで反応が観察されない場合に陽性とみなす。サンプルはまた、免疫前血清を使用して反応が観察されない場合にも陽性とみなす。

20

【0081】

上述されたところの陽性の抗血清の反応性は、RNAおよび/もしくはPMSR2の場合はタンパク質レベルで (抗PMS2抗血清により認識される、図4を参照されたい) PMSR2およびPMSR3を発現することが以前に同定された細胞からの抽出物を使用するウェスタンブロットで全細胞ライセートを使用して分析する。50,000個の細胞を遠心分離し、そして25 μ lの2xサンプル緩衝液中で直接溶解し、かつ5分間沸騰させる。サンプルを4~20% トリス-グリシンゲルに負荷し、そして電気泳動および転写時間が1時間であることを除き上述されたとおり電気ブロットする。フィルターを多様な抗血清および採血ロットでプロービングし、かつ上のおり検出する。抗血清は、PMSR陽性株で免疫反応が観察されるがしかしPMSR陰性細胞株で非存在である場合に陽性とみなす。陽性反応は、図4にみられるところの内因性PMS2の交差反応性に関するモニタリングならびに結合についてモニターするための多様なペプチドを使用する競合により、特異性についてさらに確認することができる。バックグラウンドがいずれかの抗血清で観察される場合は、ブロッキング緩衝液、洗浄のストリンジェンシーおよび抗血清の希釈 (成功裏の抗体プロービングのためわれわれのグループにより慣例に改変されたパラメータ) を変えることにより反応条件を変える。

30

40

【0082】

PMSR特異的抗血清は、例えば>95%純度まで全免疫グロブリンを精製することが可能であるピアース (Pierce) のIg精製キットを使用して精製してよい。抗体全体を分光測光法により定量し、保存剤としてアジ化ナトリウムを含むPBS中1 mg / mlの濃度で再懸濁する。抗血清を、10、100および1000倍希釈物を使用する

50

ウェスタンブロットにて活性について再試験して純粋な物質の至適濃度を決定する。その後、精製した抗血清を下述されることの組織ブロックの免疫組織学的分析に使用してよい。

【0083】

PMSRで生じられた抗血清が全細胞抽出物中の標的タンパク質を検出することが不可能である場合には、製造元のプロトコル(ピアース(Pierce))に従って臭化シアンで活性化したアガロースビーズに対応するペプチドを結合することにより抗体をアフィニティー精製することができる。全抗血清を、5周期の間、回転装置の回転板上で2時間アフィニティー樹脂とともにインキュベートし、PBS緩衝液中で洗浄し、次いで遠心分離することができる。酸性グリシン緩衝液中でのインキュベーションにより抗体を樹脂から遊離させる。遊離抗体を1Mトリス pH 8.0中の中和緩衝液に添加する。その後抗体を上記されたとおり再試験する。

10

実施例3：PMSR2およびPMSR3発現についての他の腫瘍源の分析

一次組織からのRNAを使用して、ならびに結腸直腸腫瘍組織および細胞株のサブセットで、PMSR2およびPMSR3発現の予備分析を実施した。以前に同定されたMMR遺伝子中での検出可能な突然変異を欠くMI腫瘍の広範な分布(Xu, L.ら(2001) Int. J. Cancer 91:200-204)を鑑み、PMSR2およびPMSR3発現についての他の組織型のより広範囲の調査を実施してもよい。サンプルは、協同ヒト組織ネットワーク(Cooperative Human Tissue Network)により支援されるNCIの組織アレイ研究プログラム(Tissue Array Research Program)(TARP)のような供給元から購入した組織団を使用して試験してもよい。マイクロアレイをhPMSR2およびhPMSR3抗血清を用いてスクリーニングして、腫瘍性試料中での発現についてモニターする。

20

【0084】

スライドガラスの免疫組織化学を、記述された(Grasso, L.ら(1998) J. Biol. Chem. 273:24016-24024)ところの標準的プロトコルを使用して実施する。簡潔には、パラフィン包埋切片をキシレン中で各10分間インキュベートし、次いで100%エタノール中で2分間インキュベートする。次に、サンプルを95%、70%、50%、30%エタノール中に各2分間入れることによりそれらを水和させる。その後、水和させたサンプルをメタノール中0.3%過酸化水素中で30分間インキュベートして内因性のペルオキシダーゼ活性を封鎖する。スライドガラスを流水のチャンバー中で20分間洗浄しそして0.25Mトリス-HCl pH 7.5緩衝液に入れる。免疫染色のために、加湿したチャンバー中室温でPBS中10%ヤギ血清を用いてスライドガラスを20分間ブロッキングし、次いでPBS緩衝液中で最終洗浄する。0.25Mトリス-HCl pH 7.5; 0.5%BSAおよび2%ウシ胎児血清を含有する反応緩衝液で抗体を20倍希釈し、そして、組織領域を浸水するのに十分な容量でスライドガラス表面に添加する。スライドガラスを室温で4時間インキュベートし、そしてPBS中で5分間洗浄し、反応緩衝液中で5分間ブロッキングし、そして加湿したチャンバー中、反応緩衝液で200倍希釈した二次抗ウサギHRP結合抗体で30分間プロービングする。二次染色後にスライドガラスを前のおり緩衝液中で5分間洗浄する。製造元の説明書に従ってベクタスタチンキット(アマシャム(Amersham))を使用するペルオキシダーゼ染色により切片を可視化する。均一な褐色が切片上で目に見えるようになった後に、水中ですすぐことにより反応を停止する。特異的結合についてモニターするための競合体としての免疫化ペプチドとともにもしくは伴わずに抗体を使用して反応を実施する。顕微鏡を介してスライドガラスを検査し、そして、適切な抗体を単独でもしくはナンセンスペプチド競合体の存在下でインキュベートした場合に内的染色が観察されるが、抗体をブロッキングペプチドとともにインキュベートした場合には陰性サンプルを陽性と評価する。サンプルを反復して再現性を確認することができる。

30

40

実施例4：誘導可能なMMRドミナントネガティブアレルベクターおよび該発現ベクターをもつ酵母細胞の生成

50

酵母発現構築物を調製して、ヒトPMS2関連遺伝子(hPMSR2)(Nicolaides, N. C.ら(1995) Genomics 30(2):195-206)およびヒトPMS134遺伝子(Nicolaides N. C.ら(1998) Mol. Cell. Biol. 18:1635-1641)が酵母のMMR活性を不活性化することが可能でありそしてそれによりゲノムの超変異性(その結果は宿主選択後の新規発現特質を伴うバリエーション同胞細胞の生成である)の全体的頻度を増大させるかどうかを決定した。これらの研究のため、hPMS134 cDNAをコードするプラスミドをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により変えた。5'オリゴヌクレオチドは、NdeI制限部位CAT ATGを包含する以下の構造すなわち5'-ACG CAT ATG GAG C GA GCT GAG AGC TCG AGT-3'(配列番号45)を有する。3'-オリゴヌクレオチドは、EcoRI部位GAA TTCおよびV5抗体の14アミノ酸のエピトープを包含する以下の構造すなわち5'-GAA TTC TTA TCA C GT AGA ATC GAG ACC GAG GAG AGG GTT AGG G AT AGG CTT ACC AGT TTC AAC CTT CGC CGA T GC-3'(配列番号46)を有する。該オリゴヌクレオチドは25周期のPCR(95 1分間、55 1分間、72 1.5分間を25周期、次いで72 で3分)を包含した標準的条件下でのPCRに使用した。

【0085】

PCRフラグメントをゲル電気泳動により精製し、そして標準的クローン化方法(Sambrookら MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第3版、2001)によりpTA2.1(インビトロジェン(Invitrogen))にクローン化してプラスミドpTA2.1-hPMS134を創製した。pTA2.1-hPMS 143を制限酵素EcoRIで消化して挿入物を遊離させ、それをpPIC3.5K(インビトロジェン(Invitrogen))のEcoRI制限部位にクローン化した。ヒトPMS134をクローン化するための上述されたものに類似の以下の戦略を使用してヒト関連遺伝子PMSR2の発現ベクターを構築した。最初に、hPMSR2フラグメントを、2個の制限部位すなわちフラグメントの5'端のNdeI制限部位および3'端のEcoRI部位を導入するためのPCRにより増幅した。PCRに使用した5'-オリゴヌクレオチドは、NdeI制限部位CAT ATGを包含する以下の構造すなわち5'-ACG CAT ATG TGT CCT TGG CGG CC T AGA-3'(配列番号47)を有する。PCRに使用した3'-オリゴヌクレオチドは、EcoRI部位GAA TTCおよび抗体検出を可能にするV5エピトープを包含する以下の構造すなわち5'-GAA TTC TTA TTA CGT AGA AT C GAG ACC GAG GAG AGG GTT AGG GAT AGG CT T ACC CAT GTG TGA TGT TTC AGA GCT-3'(配列番号48)を有する。pBluescript SK中にヒトPMSR3を含有したプラスミド(Nicolaides N. C.ら(1995) Genomics 30(2):195-206)を、上のhPMS2特異的オリゴヌクレオチドとともにPCR標的として使用した。25周期のPCR(95 1分間、55 1分間、72 1.5分を25周期、次いで72 で3分)後、PCRフラグメントをゲル電気泳動により精製し、そして標準的クローン化方法(Sambrookら MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第3版、2001)によりpTA2.1(インビトロジェン(Invitrogen))にクローン化してプラスミドpTA2.1-hR2を創製した。pTA2.1-hR2を次に制限酵素EcoRIで消化して挿入物(挿入物に隣接するpTA2.1のマルチクローニング部位に2個のEcoRI制限部位が存在する)を遊離させ、そして酵母発現ベクターpPIC3.5K(インビトロジェン(Invitrogen))に挿入した。

【0086】

ピキア パストリス(Pichia pastoris)酵母細胞を、後に続くとおりpPIC3.5Kベクター、pPIC3.5K-PMS134およびpPIC3.5K-

h R 2 で形質転換した。最初に、5 m l の Y P D (1 % 酵母抽出物、2 % バクトペプトン、1 % D - ブドウ糖) 培地に Y P D プレート (Y P D 液体と同一だがしかしプレート化するため 2 % D i f c o アガーを添加する) からの単一コロニーを接種し、そして振とうを伴い 3 0 で一夜インキュベートした。一夜培養物を使用して 5 0 0 m l の Y P D 培地に接種し (2 0 0 μ l の一夜培養物)、そして 6 0 0 n m での光学密度が 1 . 3 ないし 1 . 5 に達するまで培養物を 3 0 でインキュベートした。その後細胞を回転して落とし (4 , 0 0 0 × g、1 0 分間)、そしてその後滅菌水で 2 回洗浄し (各回 1 容量)、その後細胞を 2 0 m l の 1 M ソルビトールに懸濁した。ソルビトール / 細胞懸濁液を回転して落とし (4 , 0 0 0 × g、1 0 分間) そして 1 m l の 1 M ソルビトールに懸濁した。8 0 μ l の細胞懸濁液を 5 ないし 1 0 μ g の直鎖状にしたプラスミド DNA と混合し、そして 0 . 2 c m キュベットに入れ、7 , 5 0 0 V / c m の電場強度で長さ 5 ないし 1 0 ミリ秒でパルス投与した (p u l s e d)。次に、細胞を 1 m l の 1 M ソルビトールで希釈しかつ 1 5 m l チューブに移し、そして振とうを伴わずに 3 0 で 1 ないし 2 時間インキュベートする。次に細胞を回転して落とし (4 , 0 0 0 × G、1 0 分間) かつ 1 0 0 μ l の滅菌水に懸濁し、そして 5 0 μ l / プレートを適切な選択培地プレート上に広げる。プレートを 3 0 で 2 ないし 3 日間インキュベートし、そしてコロニーをさらなる試験のため Y P D プレート上に斑点状にする。

10

実施例 5 : ミスマッチ修復遺伝子の誘導可能なドミナントネガティブのアレルをもつ超変異性酵母の生成

ヒト P M S 2 相同体 2 P M S - R 2 もしくは空のベクターを発現する酵母クローンを B M G (1 0 0 m M リン酸カリウム、p H 6 . 0、1 . 3 4 % Y N B (酵母窒素ベース)、4 × 1 0 - 5 % ビオチン、1 % グリセロール) 液体培養物中で 3 0 で 2 4 時間増殖させた。次の日に培養物を M M 培地 (1 . 3 4 % Y N B、4 × 1 0 - 5 % ビオチン、0 . 5 % メタノール) で 1 0 0 倍希釈し、そして振とうを伴い 3 0 でインキュベートした。細胞を変異体選択のため、下述されるとおりメタノールインキュベーション後 2 4 および 4 8 時間に取り出した (実施例 6 を参照されたい)。

20

実施例 6 : ドミナントネガティブの M M R 遺伝子は酵母中で新たな遺伝的バリエーションおよび商業的に実現可能な発現特質を生じさせ得る。

【 0 0 8 7 】

実施例 5 に提示されたところの酵母中で M M R 遺伝子が発現する能力は、ドミナントネガティブの M M R 遺伝子が発現する酵母中で遺伝的变化および新たな表現型を生成する能力を示す。本実施例において、われわれは、商業的に有意義な発現特質をもつ真核生物株を創製するための本方法の利用性を教示する。

30

ウラシル依存性酵母株の生成

利用性の一例は、アミノ酸もしくはヌクレオチドのような特定の代謝産物についての変異体である酵母株の生成である。こうした酵母株の工作は、組換え製造の測定可能な工程のための遺伝子の導入のための酵母株の組換え操作を可能にすることができる。M M R を酵母中で操作して特定の分子構成要素を産生する能力を欠く変異体を生成させ得ることを示すために、以下の実験を実施した。メタノールで誘導可能なヒト P M S 2 相同体 h P M S 2 - R 2 (上の実施例 4 に記述されるところの) を発現する酵母細胞を B M Y 培地中で一夜増殖させ、その後 1 0 0 倍希釈しかつ M M 培地に移し、これは A O X プロモーターの活性化および酵母細胞内に常在性である h P S M 2 - R 2 M M R 遺伝子の産生をもたらす。対照細胞を同一の様式で処理し (これらの細胞は酵母中に p P I C 3 . 5 ベクターを含有するが挿入物を欠く)、細胞を 2 4 および 4 8 時間誘導し、そしてその後、後にとおりウラシル要求突然変異について選択した。細胞を 5 - F O A 培地 (B o e k e , J . D . ら (1 9 8 4) M o l . G e n . G e n e t . 1 9 7 : 3 4 5 - 3 4 6) にプレティングした。プレートは後にとおり作成する。すなわち、(2 × 濃縮物 (フィルター滅菌) : 酵母窒素ベース 7 グラム ; 5 - フルオロオロト酸 1 グラム ; ウラシル 5 0 ミリグラム ; ブドウ糖 2 0 グラム ; 水で 5 0 0 m l まで ; 5 0 0 m l の 4 % アガー (オートクレーブ済み) に添加しかつプレートに注ぐ。細胞を 5 - F O A プレート上にプレティン

40

50

グシ(0、24および48時間の時間点)、そして30で3と5日との間インキュベートする。典型的な実験からのデータを表3に示す。ウラシル要求クローンは「空の」ベクターをもつ酵母細胞中の誘導していないもしくは誘導した培養物では観察されなかった一方、MMR遺伝子hPMS2-R2をもつ細胞は選択培地上での増殖が可能であるクローンを有する。hPMS2-R2の誘導されない培養物は5-FOAに対し抵抗性であるいかなるコロニーも有さず、新規表現型が生成されるためには該遺伝子が誘導されなければならないことを示すことに注目されたい。

【0088】

(エチルメチルスルホン酸のような変異原が少数のura変異体をもたらすこと、およびこの分類の変異体を生成させるための自発的突然変異率が低いことが示されている(Boeke, J. D.ら(1984) Mol. Gen. Genet. 197: 345-346)。

表3: ウラシル要求変異体ピキアパストリス(Pichia pastoris)酵母細胞の生成。

#は24時間メタノール誘導を、および@は48時間誘導を表す。比較のため処理/未処理の野性型酵母細胞を示す(Galli, A.とR. H. Schiestl, (1999) Mutat. Res. 429(1): 13-26)。

【0089】

【表3】

株	播種	ura-	URA+	頻度 (ura-細胞)
Wt	100,000	0	~100,000	0
空	100,000	0	~100,000	0
pMOR ^{yc-1#}	100,000	14	~100,000	1/7,142
pMOR ^{yc2@}	100,000	123	~100,000	1/813
Wt	100,000	1-0.1	100,000	1/10 ^{5-6*}
変異原	100,000	10	100,000	1/10,000

【0090】

熱抵抗性産生株の生成

商業的利用性の一例は熱抵抗性組換えタンパク質産生株の生成である。組換え体製造のスケラブルな工程において、原核生物および真核生物双方の大スケール醗酵は培養物内での過度の熱の生成をもたらす。この熱は、培養物が活発に増殖しかつ生成物を産生している際にそれを取り囲む冷却ジャケットを使用することのような物理的手段により散逸させなければならない。高温の出現に効果的に耐え得る酵母株の製造は、大スケールの組換え体製造工程に有利であるとみられる。この目的のため、実施例5に記述されたところの酵母株をメタノールの存在下で増殖させてドミナントネガティブのMMR遺伝子を誘導し得、そして該細胞を多様な時間の間(例えば12、24、36および48時間)増殖させ得、その後プレート上に置きかつ上昇された温度でインキュベートして高温の出現(例えば37もしくは42)に耐える変異体について選択し得る。これらの株は醗酵の開発および工程のスケラアップに有用であるとみられ、また、より少なくしばしば醗酵を冷却する必要性による製造費用の減少をもたらすはずである。

高組換えタンパク質生産株およびより低い内因性プロテアーゼ活性をもつ株の生成

酵母は増殖させるのが安価でありかつスケラで(at scale)の醗酵に容易に役立つ単細胞生物体であるために、それは価値のある組換え製造生物体である。さらに、

大腸菌 (*Escherichia coli*) の系で発現される場合に効果的にフォールディングすることが不可能である多くの真核生物タンパク質は、酵母中で適正なコンホメーションを伴いフォールディングし、そしてそれらの哺乳動物の対蹠物に構造上同一である。組換えタンパク質の過剰および/もしくは不適切なグリコシル化、内因性の酵母の酵素によるタンパク質分解、ならびに酵母細胞の内側から培地への組換えタンパク質の不十分な分泌(精製を助長する)を包含する、酵母中で発現される多くのタンパク質のいくつかの固有の限界が存在する。タンパク質を過剰分泌するこの能力、またはより低い内因性プロテアーゼ活性および/もしくはより低い高グリコシル化活性を伴う酵母細胞を生成させるために、実施例4に記述されたところの酵母細胞を12、24、36および48時間メタノールとともに増殖させ得、そして、酵母細胞を、目的のタンパク質を過剰分泌しそれを過小グリコシル化する能力について、もしくは減弱されたプロテアーゼ活性を伴うもしくはプロテアーゼ活性をもたない細胞を選択し得る。こうした株は組換え製造もしくは他の商業的目的上有用であることができ、そして上に概説された熱抵抗性株と組合せ得る。

10

【0091】

例えば、高温の出現に対し抵抗性でありかつ大量のタンパク質を培地中に分泌し得る変異体酵母細胞が生じるとみられる。

【0092】

同様の結果が、PMSR2、PMSR3およびヒトMLH1タンパク質のような他のドミナントネガティブ変異体で観察された。

実施例7：不完全なMMRにより酵母の宿主ゲノム中で生成される突然変異は遺伝的に安定である

20

実施例6に記述されたとおり、酵母中のMMR経路の操作は宿主ゲノム内の変化、および新規発現特質について選択する能力、例えば特定の栄養素を要求する酵母細胞の能力をもたらす。MMR経路により導入される突然変異は遺伝的に安定であり、そして野性型MMR経路が一旦再確立されれば娘細胞に再現可能に渡されることが重要である。酵母ゲノム中に導入された突然変異の遺伝的安定性を決定するために以下の実験を実施した。ura-であるpPIC3.5KhPMS2-R2からの5個の独立したコロニー、5個の野性型対照細胞(URA+)および5個のpPIC3.5K形質転換細胞(「空のベクター」)を5mlのYPD(1%酵母抽出物、2%バクトペプトンおよび1%D-ブドウ糖)中で単離されたコロニーから30で振とうを伴い一夜増殖させた。YPD培地は、ウラシルを包含する、酵母が増殖するのに必要な全栄養素を含有する。次に、 > 3.0 の600nmで測定されるところの光学密度(OD)であった一夜培養物1pLをYPDで0.01のOD600に希釈し、そして培養物を振とうを伴い30で追加の24時間インキュベートした。この過程をもう3回、合計5回の一夜インキュベーションの間反復した。これは100世代以上の倍加(プレート上の最初のコロニーから最後の一晩インキュベーションの終わりまでの同等物である。その後、細胞(uraである5個の独立したコロニーおよび野性型であった5個を300ないし1,000細胞/プレートの細胞密度でYPDプレート上でプレーティングし、そして30で2日間インキュベートした。これらのプレートからの細胞を、以下のプレート；合成完全(SC)SC-ura(1.34%酵母窒素ベースおよび硫酸アンモニウム； 4×10^{-5} %ビオチン；全アミノ酸を補充、ウラシル補充なし；2%D-ブドウ糖および2%アガー)；SC+URA(SC-uraと同一だがしかし50mgのウラシル/培地1リットルを含む補充プレート)、ならびにYPDプレートにレプリカプレーティングし、そして30での3日インキュベーション後の増殖について評価した。それらは以下の順序-SC-ura、SC完全、YPDでレプリカプレーティングした。変異体MMR(本実施例においてはPMS2のヒト相同体hPMS2-R2)の発現により生成された酵母ゲノム内に常在性である新規発現特質が不安定である場合は、ウラシル依存性細胞はウラシル非依存性の表現型を「復帰」させるはずである。該表現型が安定である場合、非選択的条件下での変異体細胞の増殖は、ウラシルの外因性補給に依存するそれらの生存可能性を維持する酵母細胞をもたらすはずである。表4に提示されるデータで見ることができるとおり、ウラシル依存性の表現型は、酵母細

30

40

50

胞が非選択的条件下で増殖される場合に安定であり、ウラシル生合成経路遺伝子の1つ中の突然変異に由来するMMRで生成される表現型が遺伝的に安定であることを示す。

【0093】

【表4】

表4

株	播種	-ura	+URA	YPD
Wt	650	650	650	650
空	560	560	560	560
pMOR ^{yc-1#}	730	0	730	730

10

【0094】

これらのデータは、遺伝的に変えられた株を生成させるために真核生物系で誘導可能な発現系およびドミナントネガティブのMMR遺伝子を使用することの利用率を示す。本実施例で開発された株（今や増殖のためにウラシルの添加を必要とする酵母株）は組換え製造のための株として潜在的に有用であり；組込みプラスミドもしくは染色体外ベクターのいずれか上で野性型URA3遺伝子をもつ発現ベクターを構築することにより、目的のタンパク質を発現する新規細胞を形質転換かつ創製することが今や可能である。酵母細胞中の他の常在性遺伝子を改変しかつ新規生体内変換を実施する能力のような他の有用な表現型を与える遺伝子中の突然変異について選択することもまた可能である。さらに、上述されたところの変えられたMMR活性を有する酵母株中で染色体外で遺伝子を発現させかつ該染色体外遺伝子中の突然変異について選択することが可能である。従って、上述されたものに類似の様式で変異体の酵母細胞を特定の選択圧下に置きかつ商業的に重要な生化学的屬性をもつ新規タンパク質を選択することが可能である。

20

【0095】

これらの例は具体的説明としてのみ意味しており、そして本発明の範囲を制限することを意味していない。

【0096】

最後に、上述されたとおり、突然変異が一旦目的の遺伝子中に導入されれば、MMR活性が減弱されるかもしくは完全に廃止される。該結果は目的の標的遺伝子（1種もしくは複数）中に安定な変異体をもつ酵母細胞である。

30

実施例8：新たな発現特質の生成のためのMMR欠損酵母および化学物質変異原の高められた生成

MMR欠損が、増大された突然変異頻度、ならびに限定されるものでないが：臭化エチジウム、EMS、MNNG、MNU、タモキシフェン、8-ヒドロキシグアニンのようなもの、ならびに限定されるものでないが：Khromov-Borisov, N. N. ら (1999) *Mutat. Res.* 430: 55-74; Ohe, T. ら (1999) *Mutat. Res.* 429: 189-199; Hour, T. C. ら (1999) *Food Chem. Toxicol.* 37: 569-579; Hrelia, P. ら (1999) *Chem. Biol. Interact.* 118: 99-111; Garganta, F. ら (1999) *Environ. Mol. Mutagen.* 33: 75-85; Ukwawa-Ishikawa S. ら (1998) *Mutat. Res.* 412: 99-107; www.ehs.utah.edu/ohh/mutagens; Marcelino, L. A. ら (1998) *Cancer Res.* 58(13): 2857-2862; Koi, M. ら (1994) *Cancer Res.* 54: 4308-4312 による刊行物中に列挙される他者を挙げる事ができる化学物質変異原(CM)およびそれらのそれぞれの類似物の毒性の影響に対する増大された抵抗性を生じさせることが以前に報告されている。ミスマッチ修復はメチル化剤もしくは6チオグアニン（しかしエチル化

40

50

剤でない)で処理したハムスター細胞中の染色体異常を惹起する。MMR欠損酵母細胞中の突然変異頻度を増大させるCMの能力を示すために、われわれは、メタノール(PMS2に対する常在性のヒト相同体hPMS2-R2の発現を誘導する)の存在もしくは非存在下でのCMへの酵母細胞の曝露が酵母細胞内での突然変異の増大をもたらすであろうことを予測することができる。

【0097】

hPMS2-R2(誘導されたもしくは誘導されない)を発現する酵母細胞および空のベクター対照細胞を実施例5および6)に記述されるとおりかつ24時間増殖させ、そして上述されたとおりMM培地で希釈する。次に、MM中の細胞を0から1、10、50、100および200pMの増大する量のエチルメタンスルホン酸(EMS)とともにもしくは伴わずにのいずれかでインキュベートする。培養物の10個の活発な(zip)アリコート(300μlのMMで希釈)かつ30分、60分および120分間インキュベートし、次いで上で実施例3に記述されたところの5-FOAプレート上に細胞をプレティングする。変異体を上のとおり選択かつ評価する。われわれは、メタノールで誘導されるPMS2-R2培養物において、誘導されない親もしくは野性型株に比較してura変異体の頻度の増大が存在するであろうことを予測することができる。本実施例のさらなる一拡張において、ヒトPMS2-R2をもつ細胞を24および48時間誘導することができる。その後EMSで突然変異誘発することができる。これはMMR遺伝子が完全に活性にされかつ高レベルで発現されることを可能にすることができ、それにより、得られるura変異体の数の増大をもたらす。われわれは、誘導されない親対照もしくは野性型の「空のベクター」細胞中で得られるura変異体の数の変化が存在しないであろうことを予測することができる。本実施例は、新たな発現特質について選択し得る高められた数の遺伝的に変えられた酵母株を生じさせるための、調節されたドミナントネガティブのMMRの系に加えて化学物質変異原を使用することの使用を示す。本方法は、限定されるものでないが組換え製造、生体内変換、および高められた活性をもつ変えられた生化学物質を挙げる
ことができる商業的応用のためのこうした生物体の生成に有用である。それはまた、上の実施例4に記述されるものに類似の染色体外発現ベクター上に持たれる異所性に発現されるタンパク質からのタンパク質活性の変化を得るのにも有用である。

MMR遺伝子およびコードされるポリペプチドの例

酵母MLH1 cDNA(受託番号U07187)(配列番号1);酵母MLH1タンパク質(受託番号U07187)(配列番号2);マウスPMS2タンパク質(配列番号3);マウスPMS2 cDNA(配列番号4);ヒトPMS2タンパク質(配列番号5);ヒトPMS2 cDNA(配列番号6);ヒトPMS1タンパク質(配列番号7);ヒトPMS1 cDNA(配列番号8);ヒトMSH2タンパク質(配列番号9);ヒトMSH2 cDNA(配列番号10);ヒトMLH1タンパク質(配列番号11);ヒトMLH1 cDNA(配列番号12);hPMS2-134タンパク質(配列番号13);hPMS2-134 cDNA(配列番号14);hMSH6(ヒトタンパク質)(受託番号U028946(配列番号15);hMSH6(ヒトcDNA)(受託番号U28946)(配列番号16);hPMSR2(ヒトcDNA)(受託番号U38964)(配列番号17);hPMSR2(ヒトタンパク質)(受託番号U38964)(配列番号18);HPMSR3(ヒトcDNA)(受託番号MM_005395.1)(配列番号19);hPMSR3(ヒトタンパク質)(受託番号U38979.1)(配列番号20);hPMSR6(ヒトcDNA)(受託番号U38980.1)(配列番号21);hPMSR6(ヒトタンパク質)(受託番号U38980.1)(配列番号22)。

【図面の簡単な説明】

【0098】

【図1】下線付けでコンセンサス配列領域を示すPMSR2、PMSR3およびPMSR6のポリペプチド配列を示す。

【図1B】PMS2のコンセンサス配列領域のDNAジャイレース様ATPアーゼモチーフとのアライメントを示す。

10

20

30

40

50

【図2A - B】PMS2のN末端フラグメントの構造（直交図）を示す。

【図2C】図2Aおよび2Bに対応するhPMS2、hMLH1およびMutLのN末端フラグメントの配列のアライメントならびに構造的特徴を示す（Guarneら（2001）EMBO J. 20（19）：5521 - 5531、図2A - Cから）。

【図3】リンパ腫細胞株中のPMSR遺伝子のRT-PCR分析を示す。マイクロサテライトの不安定性（MI）を伴う（レーン3～5）もしくは伴わない（レーン2）リンパ腫細胞株で30周期のRT-PCR増幅を実施した。上で示されたとおり、MIを伴う各株はPMSR2もしくはPMSR3いずれかの遺伝子を発現した一方、MIを欠く細胞株（レーン2）では発現が観察されなかった。hPMS2および - アクチンのメッセージを内部対照として使用してRNA負荷について測定した。レーン1は潜在的アーチファクトもしくは汚染について測定するための疑似反応であった。45周期の増幅を使用して追加のPCR増幅を実施し、これは、30周期で観察されたところの陽性レーン中でのより確固たる産物をもたらした一方、レーン1および2に提示されるもののような陰性サンプル中ではPMSRシグナルが検出されなかった。

【図4】マイクロサテライトの不安定性（MI）を伴う（LMM - 1）（レーン2）もしくは伴わない（LNM - a）（レーン1）ヒトリンパ腫細胞株のウェスタンブロット分析を示す。矢印はhPMS2およびhPMSR2ポリペプチドの期待される分子量をもつタンパク質を示す。MIを表すリンパ腫細胞株でPMSR発現の相関が観察される。

【図5】PMS2およびPMSR相同体に加えてMMR感受性のpCAR - OFレポーターを発現する293細胞中での - ガラクトシダーゼ活性を示す。MMR活性が低下されている細胞は - ガラクトシダーゼ遺伝子内の挿入 - 欠失突然変異につながるMIをもたらし、その1サブセットは読み取り枠（ORF）を復帰させかつ機能的酵素を産生することができる。細胞を17日間増殖させ、そしてその後タンパク質ライセートのため収集して各細胞株により生成された - ガラクトシダーゼ活性を測定する。高率の突然変異誘発が発生していた細胞は - ガラクトシダーゼ活性を生じさせることができる一方、MMR活性が機能的である細胞はバックグラウンドレベルの酵素活性を保持することができる。各細胞株を2回の独立した実験（実験1および実験2）で試験した。抽出物を比色性ガラクトース基質とともに1時間インキュベートした。基質転化の関数としての酵素活性を、記述されたとおり（Nicolaides, N. C. ら（1998）Mol. Cell. Biol. 18：1635 - 1641）576nmでの光学密度により測定した。上に示されたとおり、PMSR2およびPMSR3を発現する細胞は - ガラクトシダーゼ活性の増大につながる高程度のMIを有した。MIを遺伝子レベルでモニターして、遺伝子変化が - ガラクトシダーゼのORFを混乱させるポリヌクレオチド反復内で発生したことを確認した。

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

<110> Morphotek Inc.
Grasso, Luigi
Nicolaides, Nicholas C.
Sass, Philip M.

<120> Methods of Making Hypermutable Cells Using FMSR Homologs

<130> FT0005 PCT (MOR-0145)

<150> 60/358,578
<151> 2002-02-21

<160> 48

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 3218
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1
aaataggaat gtgatacctt ctattgcatg caaagatagt gtaggaggcg ctgctattgc 60
caaagacttt tgagaccgct tgctgtttca ttatagtga ggagttctcg aagacgagaa 120
attagcagtt ttogggtgttt agtaatcgcg ctagcatgct aggacaattt aactgcaaaa 180
ttttgatcag atagtgatag taaatggaag gtaaaaaata catagaccta tcaataagca 240
atgtctctca gaataaaagc acttgatgca tcagtggta acaaaattgc tgcaggtgag 300
atcataatat cccccgtaaa tgctctcaaa gaaatgatgg agaattccat cgatgcgaat 360
gctacaatga ttgatattct agtcaaggaa ggaggaatta aggtacttca aataacagat 420
aacggatctg gaattaataa agcagacctg ccaatcttat gtgagcgatt cacgacgtcc 480
aaattacaaa aattcgaaga tttagtgcag attcaaacgt atggattccg aggagaagct 540
ttagccagta tctcacatgt ggcaagagtc acagtaacga caaaagttaa agaagacaga 600
tgtgcatgga gagtttcata tgcagaaggt aagatgttgg aaagcccaa acctgttgct 660
ggaaaagacg gtaccacgat cctagttaga gaccttttt tcaatattcc ttctagatta 720
agggccttga ggtcccataa tgatgaatac tctaaaaat tagatgttgt cgggcgatac 780
gccattcatt ccaaggacat tggcttttct tgtaaaaagt tcggagactc taattattct 840
ttatcagtta aaccttcata tacagtccag gataggatta ggactgtgtt caataaatct 900
gtggcttoga atttaattac ttttcatatc agcaaagtag aagatttaaa cctggaaagc 960
gttgatgaa aggtgtgtaa tttgaatttc atatccaaaa agtccatttc attaatTTTT 1020
ttcattaata atagactagt gacatgtgat cttctaagaa gagctttgaa cagcgtttac 1080
tccaattatc tgccaaaggg cttcagacct tttatttatt tgggaattgt tatagatccg 1140
gcggtgttg atgttaacgt tcacccgaca aagagagagg ttcgtttctc gagccaagat 1200
gagatcatag agaaaatcgc caatcaattg cacgccgaat tatctgccat tgatacttca 1260
cgtactttca agccttcttc aatttcaaca aacaagccag agtcattgat accatttaat 1320
gacaccatag aaagtgatag gaataggaag agtctccgac aagcccaagt ggtagagaat 1380
tcataacga cagccaatag tcaactaagg aaagcgaaaa gacaagagaa taaactagtc 1440

10

20

30

agaatagatg cttcacaagc taaaattacg tcatttttat cctcaagtca acagttcaac 1500
 tttgaaggat cgtctacaaa gcgacaactg agtgaaccca aggtaacaaa tgtaagccac 1560
 tcccaagagg cagaaaagct gacactaaat gaaagcgaac aaccgcgtga tgccaataca 1620
 atcaatgata atgacttgaa ggatcaacct aagaagaaac aaaagtggg ggattataaa 1680
 gttccaagca ttgccgatga cgaagaagaat gcactcccga tttcaaaaga cgggtatatt 1740
 agagtaccta aggagcaggt taatgttaat ottacgagta tcaagaaatt gcgtgaaaaa 1800
 gtagatgatt cgatacatcg agaactaaca gacatttttg caaatttgaa ttacgttggg 1860
 gttgtagatg aggaagaag attagccgct attcagcatg acttaagct ttttttaata 1920
 gattacggat ctgtgtgcta tgagctatc tatcagattg gtttgacaga cttcgcaaac 1980
 tttggtaaga taaacctaca gagtacaaat gtgtcagatg atatagtttt gtataatctc 2040
 ctatcagaat ttgacgagtt aatgacgat gcttccaaag aaaaaataat tagtaaaata 2100
 tgggacatga gcagtatgct aatgagtagc tattccatag aattggtgaa tgatggtcta 2160
 gataatgact taaagtctgt gaagctaaaa tctctaccac tacttttaaa aggctacatt 2220
 ccatctctgg tcaagttacc attttttata tatcgctgg gtaaagaagt tgattgggag 2280
 gatgaacaag agtgtctaga tggatattta agagagattg cattactcta tatacctgat 2340
 atggttccga aagtcgatac actcagatga tcgttgtcag aagacgaaaa agcccagttt 2400
 ataaatagaa aggaacacat atcctcatta ctagaacacg ttctcttccc ttgtatcaaa 2460
 cgaaggttcc tggcccctag acacattctc aaggatgtcg tggaaatagc caacctcca 2520
 gatctataca aagtttttga gaggtgttaa ctttaaaacg ttttggctgt aataccaaag 2580
 tttttgttta tttcotgagt gtgattgtgt ttcatttgaa agtgtatgcc ctttccctta 2640
 acgattcatc cgcgagattt caaaggatat gaaataggt tgcagttagg aaagtatgtc 2700
 agaaatgat attcggattg aaactctct aatagttctg aagtcacttg gtccgtatt 2760
 gtttctgtcc tcttccctca gcaacgatc ttgtctaagc ttattcaacg gtaccaaaga 2820
 cccgagtcct tttatgagag aaaacatttc atcatttttc aactcaatta tcttaatatc 2880
 atttttagt attttgaaaa caggatggtg aaacgaatca cctgaatcta gaagctgtac 2940
 cttgtcccat aaaagtttta atttactgag ctttccggtc aagtaaaacta gtttatctag 3000
 ttttgaaccg aatattgtgg gcagatttgc agtaagttca gttagatcta ctaaaagttg 3060
 tttgacagca gccgattcca caaaaatttg gtaaaaggag atgaaagaga cctcgcgcgt 3120
 aatggttgc atcaccatcg gatgtctgtt gaaaaactca ctttttgcac ggaagttatt 3180
 aacaataaga ctaatgatta cottagaata atgtataa 3218

10

20

30

<210> 2
 <211> 769
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

Met Ser Leu Arg Ile Lys Ala Leu Asp Ala Ser Val Val Asn Lys Ile

1

5

10

15

Ala Ala Gly Glu Ile Ile Ile Ser Pro Val Asn Ala Leu Lys Glu Met
 20 25 30

Met Glu Asn Ser Ile Asp Ala Asn Ala Thr Met Ile Asp Ile Leu Val
 35 40 45

Lys Glu Gly Gly Ile Lys Val Leu Gln Ile Thr Asp Asn Gly Ser Gly
 50 55 60

Ile Asn Lys Ala Asp Leu Pro Ile Leu Cys Glu Arg Phe Thr Thr Ser
 65 70 75 80

Lys Leu Gln Lys Phe Glu Asp Leu Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Gly Phe
 85 90 95

Arg Gly Glu Ala Leu Ala Ser Ile Ser His Val Ala Arg Val Thr Val
 100 105 110

Thr Thr Lys Val Lys Glu Asp Arg Cys Ala Trp Arg Val Ser Tyr Ala
 115 120 125

Glu Gly Lys Met Leu Glu Ser Pro Lys Pro Val Ala Gly Lys Asp Gly
 130 135 140

Thr Thr Ile Leu Val Glu Asp Leu Phe Phe Asn Ile Pro Ser Arg Leu
 145 150 155 160

Arg Ala Leu Arg Ser His Asn Asp Glu Tyr Ser Lys Ile Leu Asp Val
 165 170 175

Val Gly Arg Tyr Ala Ile His Ser Lys Asp Ile Gly Phe Ser Cys Lys
 180 185 190

Lys Phe Gly Asp Ser Asn Tyr Ser Leu Ser Val Lys Pro Ser Tyr Thr
 195 200 205

Val Gln Asp Arg Ile Arg Thr Val Phe Asn Lys Ser Val Ala Ser Asn
 210 215 220

Leu Ile Thr Phe His Ile Ser Lys Val Glu Asp Leu Asn Leu Glu Ser
 225 230 235 240

Val Asp Gly Lys Val Cys Asn Leu Asn Phe Ile Ser Lys Lys Ser Ile
 245 250 255

Ser Leu Ile Phe Phe Ile Asn Asn Arg Leu Val Thr Cys Asp Leu Leu
 260 265 270

Arg Arg Ala Leu Asn Ser Val Tyr Ser Asn Tyr Leu Pro Lys Gly Phe
 275 280 285

Arg Pro Phe Ile Tyr Leu Gly Ile Val Ile Asp Pro Ala Ala Val Asp

10

20

30

290 295 300
 Val Asn Val His Pro Thr Lys Arg Glu Val Arg Phe Leu Ser Gln Asp
 305 310 315 320
 Glu Ile Ile Glu Lys Ile Ala Asn Gln Leu His Ala Glu Leu Ser Ala
 325 330 335
 Ile Asp Thr Ser Arg Thr Phe Lys Ala Ser Ser Ile Ser Thr Asn Lys
 340 345 350
 Pro Glu Ser Leu Ile Pro Phe Asn Asp Thr Ile Glu Ser Asp Arg Asn
 355 360 365
 Arg Lys Ser Leu Arg Gln Ala Gln Val Val Glu Asn Ser Tyr Thr Thr
 370 375 380
 Ala Asn Ser Gln Leu Arg Lys Ala Lys Arg Gln Glu Asn Lys Leu Val
 385 390 395 400
 Arg Ile Asp Ala Ser Gln Ala Lys Ile Thr Ser Phe Leu Ser Ser Ser
 405 410 415
 Gln Gln Phe Asn Phe Glu Gly Ser Ser Thr Lys Arg Gln Leu Ser Glu
 420 425 430
 Pro Lys Val Thr Asn Val Ser His Ser Gln Glu Ala Glu Lys Leu Thr
 435 440 445
 Leu Asn Glu Ser Glu Gln Pro Arg Asp Ala Asn Thr Ile Asn Asp Asn
 450 455 460
 Asp Leu Lys Asp Gln Pro Lys Lys Lys Gln Lys Leu Gly Asp Tyr Lys
 465 470 475 480
 Val Pro Ser Ile Ala Asp Asp Glu Lys Asn Ala Leu Pro Ile Ser Lys
 485 490 495
 Asp Gly Tyr Ile Arg Val Pro Lys Glu Arg Val Asn Val Asn Leu Thr
 500 505 510
 Ser Ile Lys Lys Leu Arg Glu Lys Val Asp Asp Ser Ile His Arg Glu
 515 520 525
 Leu Thr Asp Ile Phe Ala Asn Leu Asn Tyr Val Gly Val Val Asp Glu
 530 535 540
 Glu Arg Arg Leu Ala Ala Ile Gln His Asp Leu Lys Leu Phe Leu Ile
 545 550 555
 Asp Tyr Gly Ser Val Cys Tyr Glu Leu Phe Tyr Gln Ile Gly Leu Thr
 565 570 575

10

20

30

Asp Phe Ala Asn Phe Gly Lys Ile Asn Leu Gln Ser Thr Asn Val Ser
580 585 590

Asp Asp Ile Val Leu Tyr Asn Leu Leu Ser Glu Phe Asp Glu Leu Asn
595 600 605

Asp Asp Ala Ser Lys Glu Lys Ile Ile Ser Lys Ile Trp Asp Met Ser
610 615 620

Ser Met Leu Asn Glu Tyr Tyr Ser Ile Glu Leu Val Asn Asp Gly Leu
625 630 635 640

Asp Asn Asp Leu Lys Ser Val Lys Leu Lys Ser Leu Pro Leu Leu Leu
645 650 655

Lys Gly Tyr Ile Pro Ser Leu Val Lys Leu Pro Phe Phe Ile Tyr Arg
660 665 670

Leu Gly Lys Glu Val Asp Trp Glu Asp Glu Gln Glu Cys Leu Asp Gly
675 680 685

Ile Leu Arg Glu Ile Ala Leu Leu Tyr Ile Pro Asp Met Val Pro Lys
690 695 700

Val Asp Thr Leu Asp Ala Ser Leu Ser Glu Asp Glu Lys Ala Gln Phe
705 710 715 720

Ile Asn Arg Lys Glu His Ile Ser Ser Leu Leu Glu His Val Leu Phe
725 730 735

Pro Cys Ile Lys Arg Arg Phe Leu Ala Pro Arg His Ile Leu Lys Asp
740 745 750

Val Val Glu Ile Ala Asn Leu Pro Asp Leu Tyr Lys Val Phe Glu Arg
755 760 765

Cys

<210> 3
<211> 859
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3

Met Glu Gln Thr Glu Gly Val Ser Thr Glu Cys Ala Lys Ala Ile Lys
1 5 10 15

Pro Ile Asp Gly Lys Ser Val His Gln Ile Cys Ser Gly Gln Val Ile
20 25 30

Leu Ser Leu Ser Thr Ala Val Lys Glu Leu Ile Glu Asn Ser Val Asp
35 40 45

10

20

30

Ala Gly Ala Thr Thr Ile Asp Leu Arg Leu Lys Asp Tyr Gly Val Asp
50 55 60

Leu Ile Glu Val Ser Asp Asn Gly Cys Gly Val Glu Glu Glu Asn Phe
65 70 75 80

Glu Gly Leu Ala Leu Lys His His Thr Ser Lys Ile Gln Glu Phe Ala
85 90 95

Asp Leu Thr Gln Val Glu Thr Phe Gly Phe Arg Gly Glu Ala Leu Ser
100 105 110

Ser Leu Cys Ala Leu Ser Asp Val Thr Ile Ser Thr Cys His Gly Ser
115 120 125

Ala Ser Val Gly Thr Arg Leu Val Phe Asp His Asn Gly Lys Ile Thr
130 135 140

Gln Lys Thr Pro Tyr Pro Arg Pro Lys Gly Thr Thr Val Ser Val Gln
145 150 155 160

His Leu Phe Tyr Thr Leu Pro Val Arg Tyr Lys Glu Phe Gln Arg Asn
165 170 175

Ile Lys Lys Glu Tyr Ser Lys Met Val Gln Val Leu Gln Ala Tyr Cys
180 185 190

Ile Ile Ser Ala Gly Val Arg Val Ser Cys Thr Asn Gln Leu Gly Gln
195 200 205

Gly Lys Arg His Ala Val Val Cys Thr Ser Gly Thr Ser Gly Met Lys
210 215 220

Glu Asn Ile Gly Ser Val Phe Gly Gln Lys Gln Leu Gln Ser Leu Ile
225 230 235 240

Pro Phe Val Gln Leu Pro Pro Ser Asp Ala Val Cys Glu Glu Tyr Gly
245 250 255

Leu Ser Thr Ser Gly Arg His Lys Thr Phe Ser Thr Phe Arg Ala Ser
260 265 270

Phe His Ser Ala Arg Thr Ala Pro Gly Gly Val Gln Gln Thr Gly Ser
275 280 285

Phe Ser Ser Ser Ile Arg Gly Pro Val Thr Gln Gln Arg Ser Leu Ser
290 295 300

Leu Ser Met Arg Phe Tyr His Met Tyr Asn Arg His Gln Tyr Pro Phe
305 310 315 320

Val Val Leu Asn Val Ser Val Asp Ser Glu Cys Val Asp Ile Asn Val
325 330 335

10

20

30

Thr Pro Asp Lys Arg Gln Ile Leu Leu Gln Glu Glu Lys Leu Leu Leu
 340 345 350
 Ala Val Leu Lys Thr Ser Leu Ile Gly Met Phe Asp Ser Asp Ala Asn
 355 360 365
 Lys Leu Asn Val Asn Gln Gln Pro Leu Leu Asp Val Glu Gly Asn Leu
 370 375 380
 Val Lys Leu His Thr Ala Glu Leu Glu Lys Pro Val Pro Gly Lys Gln
 385 390 395 400
 Asp Asn Ser Pro Ser Leu Lys Ser Thr Ala Asp Glu Lys Arg Val Ala
 405 410 415
 Ser Ile Ser Arg Leu Arg Glu Ala Phe Ser Leu His Pro Thr Lys Glu
 420 425 430
 Ile Lys Ser Arg Gly Pro Glu Thr Ala Glu Leu Thr Arg Ser Phe Pro
 435 440 445
 Ser Glu Lys Arg Gly Val Leu Ser Ser Tyr Pro Ser Asp Val Ile Ser
 450 455 460
 Tyr Arg Gly Leu Arg Gly Ser Gln Asp Lys Leu Val Ser Pro Thr Asp
 465 470 475 480
 Ser Pro Gly Asp Cys Met Asp Arg Glu Lys Ile Glu Lys Asp Ser Gly
 485 490 495
 Leu Ser Ser Thr Ser Ala Gly Ser Glu Glu Glu Phe Ser Thr Pro Glu
 500 505 510
 Val Ala Ser Ser Phe Ser Ser Asp Tyr Asn Val Ser Ser Leu Glu Asp
 515 520 525
 Arg Pro Ser Gln Glu Thr Ile Asn Cys Gly Asp Leu Asp Cys Arg Pro
 530 535 540
 Pro Gly Thr Gly Gln Ser Leu Lys Pro Glu Asp His Gly Tyr Gln Cys
 545 550 555 560
 Lys Ala Leu Pro Leu Ala Arg Leu Ser Pro Thr Asn Ala Lys Arg Phe
 565 570 575
 Lys Thr Glu Glu Arg Pro Ser Asn Val Asn Ile Ser Gln Arg Leu Pro
 580 585 590
 Gly Pro Gln Ser Thr Ser Ala Ala Glu Val Asp Val Ala Ile Lys Met
 595 600 605
 Asn Lys Arg Ile Val Leu Leu Glu Phe Ser Leu Ser Ser Leu Ala Lys
 610 615 620

10

20

30

Arg Met Lys Gln Leu Gln His Leu Lys Ala Gln Asn Lys His Glu Leu
625 630 635 640

Ser Tyr Arg Lys Phe Arg Ala Lys Ile Cys Pro Gly Glu Asn Gln Ala
645 650 655

Ala Glu Asp Glu Leu Arg Lys Glu Ile Ser Lys Ser Met Phe Ala Glu
660 665 670

Met Glu Ile Leu Gly Gln Phe Asn Leu Gly Phe Ile Val Thr Lys Leu
675 680 685

Lys Glu Asp Leu Phe Leu Val Asp Gln His Ala Ala Asp Glu Lys Tyr
690 695 700

Asn Phe Glu Met Leu Gln Gln His Thr Val Leu Gln Ala Gln Arg Leu
705 710 715 720

Ile Thr Pro Gln Thr Leu Asn Leu Thr Ala Val Asn Glu Ala Val Leu
725 730 735

Ile Glu Asn Leu Glu Ile Phe Arg Lys Asn Gly Phe Asp Phe Val Ile
740 745 750

Asp Glu Asp Ala Pro Val Thr Glu Arg Ala Lys Leu Ile Ser Leu Pro
755 760 765

Thr Ser Lys Asn Trp Thr Phe Gly Pro Gln Asp Ile Asp Glu Leu Ile
770 775 780

Phe Met Leu Ser Asp Ser Pro Gly Val Met Cys Arg Pro Ser Arg Val
785 790 795 800

Arg Gln Met Phe Ala Ser Arg Ala Cys Arg Lys Ser Val Met Ile Gly
805 810 815

Thr Ala Leu Asn Ala Ser Glu Met Lys Lys Leu Ile Thr His Met Gly
820 825 830

Glu Met Asp His Pro Trp Asn Cys Pro His Gly Arg Pro Thr Met Arg
835 840 845

His Val Ala Asn Leu Asp Val Ile Ser Gln Asn
850 855

<210> 4
<211> 3056
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 4
gaattccggt gaaggtcctg aagaatttcc agattcctga gtatcattgg aggagacaga 60
taacctgtcg tcaggtaacg atggtgtata tgcaacagaa atgggtgttc ctggagacgc 120

10

20

30

gtcttttccc gagagcggca ccgcaactct cccgcggtga ctgtgactgg aggagtcttg 180
 catccatgga gcaaaccgaa ggcgtgagta cagaatgtgc taagccatc aagcctattg 240
 atgggaagtc agtccatcaa atttgttctg ggcaggtgat actcagttta agcaccgctg 300
 tgaaggagtt gatagaaaat agtgtagatg ctggtgctac tactattgat ctaaggctta 360
 aagactatgg ggtggacctc attgaagttt cagacaatgg atgtggggtg gaagaagaaa 420
 actttgaagg tctagctctg aacatcaca catctaagat tcaagagttt gccgacctca 480
 cgcaggttga aactttcggc ttctgggggg aagctctgag ctctctgtgt gcactaagtg 540
 atgtcactat atctacctgc cacgggtctg caagcgttgg gactcgactg gtgtttgacc 600
 ataatgggaa aatcacccag aaaactccct acccccgacc taaaggaacc acagtcaagt 660
 tgcagcactt atttataca ctaccctgct gttacaaaga gtttcagagg aacattaaaa 720
 aggagtattc caaaatggtg caggtcttac aggcgtactg tatcatctca gcaggcgtcc 780
 gtgtaagctg cactaatcag ctccggacag ggaagcggca cgctgtggtg tgcacaagcg 840
 gcacgtctgg catgaaggaa aatctcgggt ctgtgtttgg ccagaagcag ttgcaaagcc 900
 tcaatccctt tgttcagctg ccccctagt acgctgtgtg tgaagagtac ggcctgagca 960
 ctccaggacg ccacaaaacc tttctctact ttccggcttc atttcacagt gcacgcacgg 1020
 cgccgggagg agtgcaacag acaggcagtt tttcttcac aatcagaggc cctgtgacct 1080
 agcaaaggtc tctaagcttg tcaatgaggt tttatcacat gtataaccgg catcagtacc 1140
 catttgcctg ccttaacggt tccgttgact cagaatgtgt ggatattaat gtaactccag 1200
 ataaaaggca aattctacta caagaagaga agctattgct ggccgtttta aagacctcct 1260
 tgataggaat gtttgacagt gatgcaaca agcttaatgt caaccagcag ccaactgctag 1320
 atgttgaagg taacttagta aagctgcata ctgcagaact agaaaagcct gtgccaggaa 1380
 agcaagataa ctctccttca ctgaagagca cagcagacga gaaaagggtg gcatccatct 1440
 ccaggctgag agaggccttt tctcttcac ctactaaaga gatcaagtct aggggtccag 1500
 agactgctga actgacacgg agttttccaa gtgagaaaag gggcgtgtta tctctttatc 1560
 ctccagacgt catctcttac agaggcctcc gtggctcgca ggacaaattg gtgagtccca 1620
 cggacagccc tgggtgactg atggacagag agaaaataga aaaagactca gggctcagca 1680
 gcacctcagc tggctctgag gaagagtcca gcaccccaga agtggccagt agctttagca 1740
 gtgactataa cgtgagctcc ctagaagaca gaccttctca ggaaaccata aactgtggtg 1800
 acctggactg ccgtctctca ggtacaggac agtccttga gccagaagac catggatatac 1860
 aatgcaaaagc tctacctcta gctcgtctgt caccacaaa tgccaagcgc ttcaagacag 1920
 aggaaagacc ctcaaatgct aacatttctc aaagattgct tggctctcag agcacctcag 1980
 cagctgaggt cgatgtagcc ataaaaatga ataagagaat cgtgctcctc gaggttctctc 2040
 tgagttctct agctaagcga atgaagcagt tacagcaoct aaaggcgcag aacaaacatg 2100
 aactgagtta cagaaaatct agggccaaga tttgccctgg agaaaaccaa gcagcagaag 2160
 atgaactcag aaaagagatt agtaaatcga tgtttgcaga gatggagatc ttgggtcagt 2220

10

20

30

ttAACCTGGG atttatagta accaaactga aagaggacct cttcctgggtg gaccagcatg 2280
 ctgCGGatga gaagtacaac tttgagatgc tgcagcagca cacgggtgctc caggcgcaga 2340
 ggctcatcac accccagact ctgaacttaa ctgctgtcaa tgaagctgta ctgatagaaa 2400
 atctggaaat attcagaaag aatggctttg actttgtcat tgatgaggat gctccagtca 2460
 ctgaaagggc taaattgatt tccttaccaa ctagtaaaaa ctggaccttt ggacccaag 2520
 atatagatga actgatcttt atgttaagt acagccctgg ggtcatgtgc cggccctcac 2580
 gagtcagaca gatgtttgct tccagagcct gtcggaagtc agtgatgatt ggaacggcgc 2640
 tcaatgagag cgagatgaag aagctcatca cccacatggg tgagatggac caccctgga 2700
 actgccccca cggcaggcca accatgaggc acgttgccaa tctggatgct atctctcaga 2760
 actgacacac cccttgtagc atagagtta ttacagattg ttcggtttgc aaagagaag 2820
 ttttaagtaa tctgattatc gttgtacaaa aattagcatg ctgctttaat gtactggatc 2880
 catttaaaag cagtgttaag gcaggcatga tggagtgttc ctctagctca gctacttggg 2940
 tgatcgggtg ggagctcatg tgagcccagg actttgagac cactccgagc cacattcatg 3000
 agactcaatt caaggacaaa aaaaaaaga tatttttgaa gccttttaaa aaaaaa 3056

<210> 5
 <211> 932
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Met Lys Gln Leu Pro Ala Ala Thr Val Arg Leu Leu Ser Ser Ser Gln
1 5 10 15

Ile Ile Thr Ser Val Val Ser Val Val Lys Glu Leu Ile Glu Asn Ser
20 25 30

Leu Asp Ala Gly Ala Thr Ser Val Asp Val Lys Leu Glu Asn Tyr Gly
35 40 45

Phe Asp Lys Ile Glu Val Arg Asp Asn Gly Glu Gly Ile Lys Ala Val
50 55 60

Asp Ala Pro Val Met Ala Met Lys Tyr Tyr Thr Ser Lys Ile Asn Ser
65 70 75 80

His Glu Asp Leu Glu Asn Leu Thr Thr Tyr Gly Phe Arg Gly Glu Ala
85 90 95

Leu Gly Ser Ile Cys Cys Ile Ala Glu Val Leu Ile Thr Thr Arg Thr
100 105 110

Ala Ala Asp Asn Phe Ser Thr Gln Tyr Val Leu Asp Gly Ser Gly His
115 120 125

Ile Leu Ser Gln Lys Pro Ser His Leu Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
130 135 140

10

20

30

Ala Leu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Pro Val Arg Lys Gln Phe Tyr Ser
 145 150 155 160

Thr Ala Lys Lys Cys Lys Asp Glu Ile Lys Lys Ile Gln Asp Leu Leu
 165 170 175

Met Ser Phe Gly Ile Leu Lys Pro Asp Leu Arg Ile Val Phe Val His
 180 185 190

Asn Lys Ala Val Ile Trp Gln Lys Ser Arg Val Ser Asp His Lys Met
 195 200 205

Ala Leu Met Ser Val Leu Gly Thr Ala Val Met Asn Asn Met Glu Ser
 210 215 220

Phe Gln Tyr His Ser Glu Glu Ser Gln Ile Tyr Leu Ser Gly Phe Leu
 225 230 235 240

Pro Lys Cys Asp Ala Asp His Ser Phe Thr Ser Leu Ser Thr Pro Glu
 245 250 255

Arg Ser Phe Ile Phe Ile Asn Ser Arg Pro Val His Gln Lys Asp Ile
 260 265 270

Leu Lys Leu Ile Arg His His Tyr Asn Leu Lys Cys Leu Lys Glu Ser
 275 280 285

Thr Arg Leu Tyr Pro Val Phe Phe Leu Lys Ile Asp Val Pro Thr Ala
 290 295 300

Asp Val Asp Val Asn Leu Thr Pro Asp Lys Ser Gln Val Leu Leu Gln
 305 310 315 320

Asn Lys Glu Ser Val Leu Ile Ala Leu Glu Asn Leu Met Thr Thr Cys
 325 330 335

Tyr Gly Pro Leu Pro Ser Thr Asn Ser Tyr Glu Asn Asn Lys Thr Asp
 340 345 350

Val Ser Ala Ala Asp Ile Val Leu Ser Lys Thr Ala Glu Thr Asp Val
 355 360 365

Leu Phe Asn Lys Val Glu Ser Ser Gly Lys Asn Tyr Ser Asn Val Asp
 370 375 380

Thr Ser Val Ile Pro Phe Gln Asn Asp Met His Asn Asp Glu Ser Gly
 385 390 395 400

Lys Asn Thr Asp Asp Cys Leu Asn His Gln Ile Ser Ile Gly Asp Phe
 405 410 415

Gly Tyr Gly His Cys Ser Ser Glu Ile Ser Asn Ile Asp Lys Asn Thr
 420 425 430

10

20

30

Lys Asn Ala Phe Gln Asp Ile Ser Met Ser Asn Val Ser Trp Glu Asn
 435 440 445
 Ser Gln Thr Glu Tyr Ser Lys Thr Cys Phe Ile Ser Ser Val Lys His
 450 455 460
 Thr Gln Ser Glu Asn Gly Asn Lys Asp His Ile Asp Glu Ser Gly Glu
 465 470 475 480
 Asn Glu Glu Glu Ala Gly Leu Glu Asn Ser Ser Glu Ile Ser Ala Asp
 485 490 495
 Glu Trp Ser Arg Gly Asn Ile Leu Lys Asn Ser Val Gly Glu Asn Ile
 500 505 510
 Glu Pro Val Lys Ile Leu Val Pro Glu Lys Ser Leu Pro Cys Lys Val
 515 520 525
 Ser Asn Asn Asn Tyr Pro Ile Pro Glu Gln Met Asn Leu Asn Glu Asp
 530 535 540
 Ser Cys Asn Lys Lys Ser Asn Val Ile Asp Asn Lys Ser Gly Lys Val
 545 550 555 560
 Thr Ala Tyr Asp Leu Leu Ser Asn Arg Val Ile Lys Lys Pro Met Ser
 565 570 575
 Ala Ser Ala Leu Phe Val Gln Asp His Arg Pro Gln Phe Leu Ile Glu
 580 585 590
 Asn Pro Lys Thr Ser Leu Glu Asp Ala Thr Leu Gln Ile Glu Glu Leu
 595 600 605
 Trp Lys Thr Leu Ser Glu Glu Glu Lys Leu Lys Tyr Glu Glu Lys Ala
 610 615 620
 Thr Lys Asp Leu Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Met Lys Arg Ala Ile Glu
 625 630 635 640
 Gln Glu Ser Gln Met Ser Leu Lys Asp Gly Arg Lys Lys Ile Lys Pro
 645 650 655
 Thr Ser Ala Trp Asn Leu Ala Gln Lys His Lys Leu Lys Thr Ser Leu
 660 665 670
 Ser Asn Gln Pro Lys Leu Asp Glu Leu Leu Gln Ser Gln Ile Glu Lys
 675 680 685
 Arg Arg Ser Gln Asn Ile Lys Met Val Gln Ile Pro Phe Ser Met Lys
 690 695 700
 Asn Leu Lys Ile Asn Phe Lys Lys Gln Asn Lys Val Asp Leu Glu Glu

10

20

30

aatattgatc taaagcttaa ggactatgga gtggatctta ttgaagtffc agacaatgga 240
tgtggggtag aagaagaaaa ctfcgaaggc ttaactctga aacatcacac atctaagatt 300
caagagtttg ccgacctaac tcagggtgaa acttttggct ttccggggga agctctgagc 360
tcactttgtg cactgagcga tgtcaccatt tctacctgcc accgatcggc gaaggttggga 420
actcgactga tgtttgatca caatgggaaa attatccaga aaacccccta ccccgcgcc 480
agagggacca cagtcagcgt gcagcagtta tttccacac tacctgtgcy ccataaggaa 540
tttcaaagga atattaagaa ggagtatgcc aaaatgggcc aggtcttaca tgcatactgt 600
atcatttcag caggcacccg tgtaagtgc accaatcagc ttggacaagg aaaacgacag 660
cctgtggtat gcacaggtgg aagccccagc ataaaggaaa atatcggtc tgtgtttggg 720
cagaagcagt tgcaaagcct cttccctttt gttcagctgc cccctagtga ctccgtgtgt 780
gaagagtacg gtttgagctg ttccgatgct ctgcataatc ttttttacct ctccaggttc 840
atttcacaat gcacgcagtg agttggaagg agttcaacag acagacagtt tttctttatc 900
aaccggcggc cttgtgaccc agcaaaggtc tgcagactcg tgaatgaggt ctaccacatg 960
tataatcgac accagtatcc atttgttgtt cttaacattt ctgttgattc agaatgcggt 1020
gatataaatg ttactccaga taaaaggcaa attttgctac aagaggaaaa gcttttgttg 1080
gcagtttaa agacctctt gataggaatg tttgatagtg atgtcaaca gctaaatgtc 1140
agtcagcagc cactgctgga tgttgaaggc aacttaataa aaatgcagc agcggatttg 1200
gaaaagccca tggtagaaaa gcaggatcaa tcccctcat taaggactgg agaagaaaa 1260
aaagacgtgt ccatttccag actgcgagag gcctttctc ttctgcacac aacagagaac 1320
aagcctcaca gcccaagac tccagaacca agaaggagcc ctctaggaca gaaaaggggt 1380
atgctgtctt ctgacactc aggtgccatc tctgacaaa gcgtctgag acctcagaaa 1440
gaggcagtg gttccagtc cggacccagt gaccctacgg acagagcggg ggtggagaag 1500
gactcggggc acggcagcac ttccgtggat tctgaggggt tcagcatccc agacacgggc 1560
agtcactgca gcagcgagta tgcggccagc tcccagggg acaggggctc gcaggaacat 1620
gtggactctc aggagaaaag gcctgaaact gacgactctt tttcagatgt ggactgcat 1680
tcaaaccagg aagataccgg atgtaaat ttagtcttgc ctacgccaac taatctcgca 1740
accccaaca caaagcgtt taaaaagaa gaaattctt ccagttctga catttgcaca 1800
aagttagtaa atactcagga catgtcagc tctcaggtg atgtagctgt gaaaattaat 1860
aagaaaagtg tgcccctgga cttttctatg agttctttag ctaaacgaat aaagcagtta 1920
catcatgaag cacagcaag tgaaggggaa cagaattaca ggaagtttag ggcaagatt 1980
tgtcctggag aaaatcaagc agccgaagat gaactaagaa aagagataag taaaacgatg 2040
tttgagaaa tggaaatcat tggtcagttt aacctgggat ttataataac caaactgaat 2100
gaggatattc tcatagtgga ccagcatgcc acggacgaga agtataactt cgagatgctg 2160
cagcagcaca ccgtgctcca gggcagagc ctcatagcac ctacagactc caacttaact 2220
gctgttaatg aagctgttct gatagaaaat ctggaaatat ttgaaaagaa tggctttgat 2280
tttgttatcg atgaaaatgc tccagtcact gaaagggcta aactgattc cttgccact 2340

10

20

30

agtaaaaact ggaccttcgg accccaggac gtcgatgaac tgatcttcat gctgagcgcac 2400
 agccctgggg tcattgtccg gccttcccga gcaagcaga tgtttgcctc cagagcctgc 2460
 cggaagtcgg tgatgattgg gactgtctctt aacacaagcg agatgaagaa actgatcacc 2520
 cacatggggg agatggacca cccctggaac tgtcccatg gaaggccaac catgagacac 2580
 atcgccaacc tgggtgtcat ttctcagaac tgaccgtagt cactgtatgg aataattggt 2640
 tttatcgag atttttatgt ttgaaagac agagtcttca ctaacctttt ttgttttaa 2700
 atgaaacctg ctacttaaaa aaaatacaca tcacaccat ttaaaagtga tcttgagaac 2760
 cttttcaaac c 2771

<210> 7
 <211> 932
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

Met Lys Gln Leu Pro Ala Ala Thr Val Arg Leu Leu Ser Ser Ser Gln
1 5 10 15

Ile Ile Thr Ser Val Val Ser Val Val Lys Glu Leu Ile Glu Asn Ser
20 25 30

Leu Asp Ala Gly Ala Thr Ser Val Asp Val Lys Leu Glu Asn Tyr Gly
35 40 45

Phe Asp Lys Ile Glu Val Arg Asp Asn Gly Glu Gly Ile Lys Ala Val
50 55 60

Asp Ala Pro Val Met Ala Met Lys Tyr Tyr Thr Ser Lys Ile Asn Ser
65 70 75 80

His Glu Asp Leu Glu Asn Leu Thr Thr Tyr Gly Phe Arg Gly Glu Ala
85 90 95

Leu Gly Ser Ile Cys Cys Ile Ala Glu Val Leu Ile Thr Thr Arg Thr
100 105 110

Ala Ala Asp Asn Phe Ser Thr Gln Tyr Val Leu Asp Gly Ser Gly His
115 120 125

Ile Leu Ser Gln Lys Pro Ser His Leu Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
130 135 140

Ala Leu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Pro Val Arg Lys Gln Phe Tyr Ser
145 150 155 160

Thr Ala Lys Lys Cys Lys Asp Glu Ile Lys Lys Ile Gln Asp Leu Leu
165 170 175

Met Ser Phe Gly Ile Leu Lys Pro Asp Leu Arg Ile Val Phe Val His
180 185 190

10

20

30

Asn Lys Ala Val Ile Trp Gln Lys Ser Arg Val Ser Asp His Lys Met
195 200 205

Ala Leu Met Ser Val Leu Gly Thr Ala Val Met Asn Asn Met Glu Ser
210 215 220

Phe Gln Tyr His Ser Glu Glu Ser Gln Ile Tyr Leu Ser Gly Phe Leu
225 230 235 240

Pro Lys Cys Asp Ala Asp His Ser Phe Thr Ser Leu Ser Thr Pro Glu
245 250 255

Arg Ser Phe Ile Phe Ile Asn Ser Arg Pro Val His Gln Lys Asp Ile
260 265 270

Leu Lys Leu Ile Arg His His Tyr Asn Leu Lys Cys Leu Lys Glu Ser
275 280 285

Thr Arg Leu Tyr Pro Val Phe Phe Leu Lys Ile Asp Val Pro Thr Ala
290 295 300

Asp Val Asp Val Asn Leu Thr Pro Asp Lys Ser Gln Val Leu Leu Gln
305 310 315 320

Asn Lys Glu Ser Val Leu Ile Ala Leu Glu Asn Leu Met Thr Thr Cys
325 330 335

Tyr Gly Pro Leu Pro Ser Thr Asn Ser Tyr Glu Asn Asn Lys Thr Asp
340 345 350

Val Ser Ala Ala Asp Ile Val Leu Ser Lys Thr Ala Glu Thr Asp Val
355 360 365

Leu Phe Asn Lys Val Glu Ser Ser Gly Lys Asn Tyr Ser Asn Val Asp
370 375 380

Thr Ser Val Ile Pro Phe Gln Asn Asp Met His Asn Asp Glu Ser Gly
385 390 395 400

Lys Asn Thr Asp Asp Cys Leu Asn His Gln Ile Ser Ile Gly Asp Phe
405 410 415

Gly Tyr Gly His Cys Ser Ser Glu Ile Ser Asn Ile Asp Lys Asn Thr
420 425 430

Lys Asn Ala Phe Gln Asp Ile Ser Met Ser Asn Val Ser Trp Glu Asn
435 440 445

Ser Gln Thr Glu Tyr Ser Lys Thr Cys Phe Ile Ser Ser Val Lys His
450 455 460

Thr Gln Ser Glu Asn Gly Asn Lys Asp His Ile Asp Glu Ser Gly Glu

10

20

30

Glu Glu Ala Leu Leu Phe Lys Arg Leu Leu Glu Asn His Lys Leu Pro
755 760 765

Ala Glu Pro Leu Glu Lys Pro Ile Met Leu Thr Glu Ser Leu Phe Asn
770 775 780

Gly Ser His Tyr Leu Asp Val Leu Tyr Lys Met Thr Ala Asp Asp Gln
785 790 795 800

Arg Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ser Asp Pro Arg Leu Thr Ala Asn
805 810 815

Gly Phe Lys Ile Lys Leu Ile Pro Gly Val Ser Ile Thr Glu Asn Tyr
820 825 830

Leu Glu Ile Glu Gly Met Ala Asn Cys Leu Pro Phe Tyr Gly Val Ala
835 840 845

Asp Leu Lys Glu Ile Leu Asn Ala Ile Leu Asn Arg Asn Ala Lys Glu
850 855 860

Val Tyr Glu Cys Arg Pro Arg Lys Val Ile Ser Tyr Leu Glu Gly Glu
865 870 875 880

Ala Val Arg Leu Ser Arg Gln Leu Pro Met Tyr Leu Ser Lys Glu Asp
885 890 895

Ile Gln Asp Ile Ile Tyr Arg Met Lys His Gln Phe Gly Asn Glu Ile
900 905 910

Lys Glu Cys Val His Gly Arg Pro Phe Phe His His Leu Thr Tyr Leu
915 920 925

Pro Glu Thr Thr
930

<210> 8
<211> 3063
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
ggcaccgagtg gctgcttgcg gctagtggat ggtaattgcc tgcctcgcgc tagcagcaag 60
ctgctctggt aaaagcgaaa atgaaacaat tgcctgcggc aacagttcga ctcccttcaa 120
gttctcagat catcacttcg gtggtcagtg ttgtaaaaga gcttattgaa aactccttgg 180
atgctggtgc cacaagcgta gatgttaaac tggagaacta tggatttgat aaaattgagg 240
tgcgagataa cggggagggt atcaaggctg ttgatgcacc tgtaatggca atgaagtact 300
acacctcaaa aataaatagt catgaagatc ttgaaaattt gacaacttac ggttttctgtg 360
gagaagcctt ggggtcaatt tgttgtatag ctgaggtttt aattacaaca agaacggctg 420
ctgataattt tagcaccag tatgttttag atggcagtgg ccacatactt tctcagaaac 480
cttcacatct tgggtcaaggt acaactgtaa ctgctttaag attatttaag aatctacctg 540

10

20

30

taagaaagca gttttactca actgcaaaaa aatgtaaaga tgaaataaaa aagatccaag 600
 atctcctcat gagctttggt atccttaaac ctgacttaag gattgtcttt gtacataaca 660
 aggagttat ttggcagaaa agcagagtat cagatcacia gatggctctc atgtcagttc 720
 tggggactgc tgttatgaac aatatggaat cctttcagta ccactctgaa gaatctcaga 780
 tttatctcag tggatttctt ccaaagtgtg atgcagacca ctctttcact agtctttcaa 840
 caccagaaag aagtttcac ttcataaaca gtcgaccagt acatcaaaaa gatattctaa 900
 agttaatccg acatcattac aatctgaaat gcctaaagga atctactcgt ttgtatcctg 960
 ttttctttct gaaaatcgat gttcctacag ctgatgttga tgtaaattta acaccagata 1020
 aaagccaagt attattacaa aataaggaat ctgttttaat tgctcttgaa aatctgatga 1080
 cgacttgta tggaccatta cctagtacaa attcttatga aaataataaa acagatgttt 1140
 ccgagctga catcgttctt agtaaacag cagaaacaga tgtgcttttt aataaagtgg 1200
 aatcatctgg aaagaattat tcaaatgttg atacttcagt cattccattc caaaatgata 1260
 tgcataatga tgaatctgga aaaaacactg atgattgttt aaatcaccag ataagtattg 1320
 gtgactttgg ttatggctcat tgtagtgtg aaatttctaa cattgataaa aacactaaga 1380
 atgcatttca ggacatttca atgagtaatg tatcatggga gaactctcag acggaatata 1440
 gtaaaacttg tttataagt tccgttaagc acaccagtc agaaaatggc aataaagacc 1500
 atatagatga gagtggggaa aatgaggaag aagcaggtct tgaaaactct tcggaaattt 1560
 ctgcagatga gtggagcagg ggaaatatac ttaaaaatc agtgggagag aatattgaac 1620
 ctgtgaaaat tttagtgcct gaaaaaagt taccatgtaa agtaagtaat aataattatc 1680
 caatccctga acaaatgaat cttaatgaag attcatgtaa caaaaaatca aatgtaatag 1740
 ataataaatc tggaaaagt acagcttatg atttacttag caatcgagta atcaagaaac 1800
 ccatgtcagc aagtgtctct tttgttcaag atcatctgcc tcagtttctc atagaaaatc 1860
 ctaagactag tttagaggat gcaacactac aaattgaaga actgtggaag acattgagtg 1920
 aagaggaaaa actgaaatat gaagagaagg ctactaaaga cttggaacga tacaatagtc 1980
 aatgaagag agccattgaa caggagtcac aaatgtcact aaaagatggc agaaaaaga 2040
 taaaaccac cagcgcattg aatttgccc agaagcacia gttaaaaacc tcattatcta 2100
 atcaaccaa acttgatgaa ctctctcagt cccaaattga aaaaagaagg agtcaaaata 2160
 ttaaaatggt acagatcccc tttctatga aaaacttaa aataaatttt aagaaacaaa 2220
 acaaagtga cttagaagag aaggatgaac ctgcttgat ccacaatctc aggtttctctg 2280
 atgcatggct aatgacatcc aaaacagagg taatgttatt aaatccatat agagtagaag 2340
 aagccctgct atttaaaaga cttcttgaga atcataaact tcctgcagag ccaactgaaa 2400
 agccaattat gttaacagag agtcttttta atggatctca ttatttagac gttttatata 2460
 aatgacagc agatgaccaa agatcacagt gatcaactta cctgtctgat cctcgtctta 2520
 cagcgaatgg tttcaagata aaattgatac caggagtctt aattactgaa aattacttgg 2580
 aatagaag aatggcta atgtctccat tctatggagt agcagattta aaagaaattc 2640

10

20

30

```

ttaatgctat attaaacaga aatgcaaagg aagtttatga atgtagacct cgcaaagtga 2700
taagttatnt agaggagaa gcagtgcgtc tatccagaca attacccatg tactttatcaa 2760
aagaggacat ccaagacatt atctacagaa tgaagcacca gtttggaat gaaattaaag 2820
agtgtgttca tggtcgccc ttttttcac atttaaccta tcttccagaa actacatgat 2880
taaatagttt taagaagatt agttaccatt gaaattgggt ctgtcataaa acagcatgag 2940
tctgttttta aattatcttt gtattatgtg tcacatgggt attttttaa tgaggattca 3000
ctgacttggt tttatattga aaaaagtcc acgtattgta gaaaacgtaa ataaactaat 3060
aac 3063

```

```

<210> 9
<211> 934
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```
<400> 9
```

```
Met Ala Val Gln Pro Lys Glu Thr Leu Gln Leu Glu Ser Ala Ala Glu
1 5 10 15
```

```
Val Gly Phe Val Arg Phe Phe Gln Gly Met Pro Glu Lys Pro Thr Thr
20 25 30
```

```
Thr Val Arg Leu Phe Asp Arg Gly Asp Phe Tyr Thr Ala His Gly Glu
35 40 45
```

```
Asp Ala Leu Leu Ala Ala Arg Glu Val Phe Lys Thr Gln Gly Val Ile
50 55 60
```

```
Lys Tyr Met Gly Pro Ala Gly Ala Lys Asn Leu Gln Ser Val Val Leu
65 70 75 80
```

```
Ser Lys Met Asn Phe Glu Ser Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu Val Arg
85 90 95
```

```
Gln Tyr Arg Val Glu Val Tyr Lys Asn Arg Ala Gly Asn Lys Ala Ser
100 105 110
```

```
Lys Glu Asn Asp Trp Tyr Leu Ala Tyr Lys Ala Ser Pro Gly Asn Leu
115 120 125
```

```
Ser Gln Phe Glu Asp Ile Leu Phe Gly Asn Asn Asp Met Ser Ala Ser
130 135 140
```

```
Ile Gly Val Val Gly Val Lys Met Ser Ala Val Asp Gly Gln Arg Gln
145 150 155 160
```

```
Val Gly Val Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln Arg Lys Leu Gly Leu Cys
165 170 175
```

```
Glu Phe Pro Asp Asn Asp Gln Phe Ser Asn Leu Glu Ala Leu Leu Ile
180 185 190
```

10

20

30

Gln Ile Gly Pro Lys Glu Cys Val Leu Pro Gly Gly Glu Thr Ala Gly
 195 200 205
 Asp Met Gly Lys Leu Arg Gln Ile Ile Gln Arg Gly Gly Ile Leu Ile
 210 215 220
 Thr Glu Arg Lys Lys Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ile Tyr Gln Asp
 225 230 235 240
 Leu Asn Arg Leu Leu Lys Gly Lys Lys Gly Glu Gln Met Asn Ser Ala
 245 250 255
 Val Leu Pro Glu Met Glu Asn Gln Val Ala Val Ser Ser Leu Ser Ala
 260 265 270
 Val Ile Lys Phe Leu Glu Leu Leu Ser Asp Asp Ser Asn Phe Gly Gln
 275 280 285
 Phe Glu Leu Thr Thr Phe Asp Phe Ser Gln Tyr Met Lys Leu Asp Ile
 290 295 300
 Ala Ala Val Arg Ala Leu Asn Leu Phe Gln Gly Ser Val Glu Asp Thr
 305 310 315 320
 Thr Gly Ser Gln Ser Leu Ala Ala Leu Leu Asn Lys Cys Lys Thr Pro
 325 330 335
 Gln Gly Gln Arg Leu Val Asn Gln Trp Ile Lys Gln Pro Leu Met Asp
 340 345 350
 Lys Asn Arg Ile Glu Glu Arg Leu Asn Leu Val Glu Ala Phe Val Glu
 355 360 365
 Asp Ala Glu Leu Arg Gln Thr Leu Gln Glu Asp Leu Leu Arg Arg Phe
 370 375 380
 Pro Asp Leu Asn Arg Leu Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln Ala Ala Asn
 385 390 395 400
 Leu Gln Asp Cys Tyr Arg Leu Tyr Gln Gly Ile Asn Gln Leu Pro Asn
 405 410 415
 Val Ile Gln Ala Leu Glu Lys His Glu Gly Lys His Gln Lys Leu Leu
 420 425 430
 Leu Ala Val Phe Val Thr Pro Leu Thr Asp Leu Arg Ser Asp Phe Ser
 435 440 445
 Lys Phe Gln Glu Met Ile Glu Thr Thr Leu Asp Met Asp Gln Val Glu
 450 455 460
 Asn His Glu Phe Leu Val Lys Pro Ser Phe Asp Pro Asn Leu Ser Glu
 465 470 475 480

10

20

30

Leu Arg Glu Ile Met Asn Asp Leu Glu Lys Lys Met Gln Ser Thr Leu
 485 490 495
 Ile Ser Ala Ala Arg Asp Leu Gly Leu Asp Pro Gly Lys Gln Ile Lys
 500 505 510
 Leu Asp Ser Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Tyr Phe Arg Val Thr Cys Lys
 515 520 525
 Glu Glu Lys Val Leu Arg Asn Asn Lys Asn Phe Ser Thr Val Asp Ile
 530 535 540
 Gln Lys Asn Gly Val Lys Phe Thr Asn Ser Lys Leu Thr Ser Leu Asn
 545 550 555 560
 Glu Glu Tyr Thr Lys Asn Lys Thr Glu Tyr Glu Glu Ala Gln Asp Ala
 565 570 575
 Ile Val Lys Glu Ile Val Asn Ile Ser Ser Gly Tyr Val Glu Pro Met
 580 585 590
 Gln Thr Leu Asn Asp Val Leu Ala Gln Leu Asp Ala Val Val Ser Phe
 595 600 605
 Ala His Val Ser Asn Gly Ala Pro Val Pro Tyr Val Arg Pro Ala Ile
 610 615 620
 Leu Glu Lys Gly Gln Gly Arg Ile Ile Leu Lys Ala Ser Arg His Ala
 625 630 635 640
 Cys Val Glu Val Gln Asp Glu Ile Ala Phe Ile Pro Asn Asp Val Tyr
 645 650 655
 Phe Glu Lys Asp Lys Gln Met Phe His Ile Ile Thr Gly Pro Asn Met
 660 665 670
 Gly Gly Lys Ser Thr Tyr Ile Arg Gln Thr Gly Val Ile Val Leu Met
 675 680 685
 Ala Gln Ile Gly Cys Phe Val Pro Cys Glu Ser Ala Glu Val Ser Ile
 690 695 700
 Val Asp Cys Ile Leu Ala Arg Val Gly Ala Gly Asp Ser Gln Leu Lys
 705 710 715 720
 Gly Val Ser Thr Phe Met Ala Glu Met Leu Glu Thr Ala Ser Ile Leu
 725 730 735
 Arg Ser Ala Thr Lys Asp Ser Leu Ile Ile Ile Asp Glu Leu Gly Arg
 740 745 750
 Gly Thr Ser Thr Tyr Asp Gly Phe Gly Leu Ala Trp Ala Ile Ser Glu

10

20

30

agagacaggt tggagttggg tatgtggatt ccatacagag gaaactagga ctgtgtgaat 600
 tccctgataa tgatcagttc tccaatcttg aggctctcct catccagatt ggaccaaagg 660
 aatgtgtttt acccggagga gagactgctg gagacatggg gaaactgaga cagataattc 720
 aaagaggagg aattctgata acagaaagaa aaaaagctga cttttccaca aaagacattt 780
 atcaggacct caaccggttg ttgaaaggca aaaagggaga gcagatgaat agtgctgtat 840
 tgccagaaat ggagaatcag gttgcagttt catcactgtc tgcggtaac aagtttttag 900
 aactcttatac agatgattcc aactttggac agtttgaact gactactttt gacttcagcc 960
 agtatatgaa attggatatt gcagcagtc gagcccttaa cctttttcag ggttctgttg 1020
 aagataccac tggctctcag tctctggctg ccttgctgaa taagtgtaaa acccctcaag 1080
 gacaaagact tgtaaccag tggattaagc agcctctcat ggataagaac agaatagagg 1140
 agagattgaa tttagtggaa gctttttag aagatgcaga attgaggcag actttacaag 1200
 aagatttact tcgtcgattc ccagatctta accgacttgc caagaagttt caaagacaag 1260
 cagcaaaactt acaagattgt taccgactct atcagggtat aaatcaacta cctaattgta 1320
 tacaggctct ggaaaaacat gaaggaaaac accagaaatt attgttgga gtttttgtga 1380
 ctctcttac tgatcttctg tctgacttct ccaagtttca ggaaatgata gaaacaactt 1440
 tagatatgga tcagggtgaa aaccatgaat tccttgtaaa accttcattt gatcctaatac 1500
 tcagtgaatt aagagaaata atgaatgact tggaaaagaa gatgcagtc acattaataa 1560
 gtgcagccag agatcttggc ttggaccctg gcaaacagat taaactggat tccagtgcac 1620
 agtttgata ttactttctg gtaacctgta aggaagaaaa agtcctctctg aacaataaaa 1680
 acttttagtac tgtagatata cagaagaatg gtgttaaatt taccaacagc aaattgactt 1740
 ctttaaatga agagtatacc aaaaataaaa cagaatatga agaagcccag gatgccattg 1800
 ttaaagaaat tgtcaatatt tcttcaggct atgtagaacc aatgcagaca ctcaatgatg 1860
 tgttagctca gctagatgct gttgtcagct ttgctcacgt gcaaatgga gcacctgttc 1920
 catatgtacg accagccatt ttggagaaa gacaaggaag aattatatta aaagcatcca 1980
 ggcattgctt tgttgaagtt caagatgaaa ttgcatttat tctaatgac gtatactttg 2040
 aaaaagataa acagatgttc cacatcatta ctggcccaa tatgggaggt aaatcaacat 2100
 atattcgaca aactgggttg atagtactca tggcccaaat tgggtgtttt gtgcatgtg 2160
 agtcagcaga agtgtccatt gtggactgca tcttagccc agtaggggct ggtgacagtc 2220
 aattgaaagg agtctccag ttcattggctg aaatgttga aactgcttct atcctcaggt 2280
 ctgcaaccaa agattcatta ataatcatag atgaattggg aagaggaact tctacctacg 2340
 atggatttgg gttagcatgg gctatatcag aatacattgc aacaagatt ggtgcttttt 2400
 gcatgtttgc aaccatttt catgaactta ctgccttggc caatcagata ccaactgtta 2460
 ataacttaca tgtcacagca ctaccactg aagagacctt aactatgctt tatcaggtga 2520
 agaaagggtt ctgtgatcaa agttttggga ttcattgttc agagcttgct aatttccta 2580
 agcatgtaat agagtgtct aaacagaaag ccctggaact tgaggagttt cagtatattg 2640
 gagaatcgca aggatatgat atcatggaac cagcagcaaa gaagtgtat ctggaaagag 2700

10

20

30

agcaagtgga aaaaattatt caggagttcc tgtccaaggt gaaacaaatg ccctttactg 2760
 aaatgtcaga agaaaacatc acaataaagt taaaacagct aaaagctgaa gtaatagcaa 2820
 agaataatag ctttgtaaat gaaatcattt cacgaataaa agttactacg tgaaaaatcc 2880
 cagtaatgga atgaaggtaa tattgataag ctattgtctg taatagtttt atattgtttt 2940
 atattaaccc tttttccata gtgttaactg tcagtgccca tgggctatca acttaataag 3000
 atatttagta atattttact ttgaggacat tttcaaagat ttttattttg aaaaatgaga 3060
 gctgtaactg aggactgttt gcaattgaca taggcaataa taagtgatgt gctgaarrrt 3120
 ataaataaaa tcatgtagtt tgtgg 3145

<210> 11
 <211> 756
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ser Phe Val Ala Gly Val Ile Arg Arg Leu Asp Glu Thr Val Val
1 5 10 15

Asn Arg Ile Ala Ala Gly Glu Val Ile Gln Arg Pro Ala Asn Ala Ile
20 25 30

Lys Glu Met Ile Glu Asn Cys Leu Asp Ala Lys Ser Thr Ser Ile Gln
35 40 45

Val Ile Val Lys Glu Gly Gly Leu Lys Leu Ile Gln Ile Gln Asp Asn
50 55 60

Gly Thr Gly Ile Arg Lys Glu Asp Leu Asp Ile Val Cys Glu Arg Phe
65 70 75 80

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

Tyr Gly Phe Arg Gly Glu Ala Leu Ala Ser Ile Ser His Val Ala His
100 105 110

Val Thr Ile Thr Thr Lys Thr Ala Asp Gly Lys Cys Ala Tyr Arg Ala
115 120 125

Ser Tyr Ser Asp Gly Lys Leu Lys Ala Pro Pro Lys Pro Cys Ala Gly
130 135 140

Asn Gln Gly Thr Gln Ile Thr Val Glu Asp Leu Phe Tyr Asn Ile Ala
145 150 155 160

Thr Arg Arg Lys Ala Leu Lys Asn Pro Ser Glu Glu Tyr Gly Lys Ile
165 170 175

Leu Glu Val Val Gly Arg Tyr Ser Val His Asn Ala Gly Ile Ser Phe
180 185 190

10

20

30

Ser Val Lys Lys Gln Gly Glu Thr Val Ala Asp Val Arg Thr Leu Pro
 195 200 205
 Asn Ala Ser Thr Val Asp Asn Ile Arg Ser Ile Phe Gly Asn Ala Val
 210 215 220
 Ser Arg Glu Leu Ile Glu Ile Gly Cys Glu Asp Lys Thr Leu Ala Phe
 225 230 235 240
 Lys Met Asn Gly Tyr Ile Ser Asn Ala Asn Tyr Ser Val Lys Lys Cys
 245 250 255
 Ile Phe Leu Leu Phe Ile Asn His Arg Leu Val Glu Ser Thr Ser Leu
 260 265 270
 Arg Lys Ala Ile Glu Thr Val Tyr Ala Ala Tyr Leu Pro Lys Asn Thr
 275 280 285
 His Pro Phe Leu Tyr Leu Ser Leu Glu Ile Ser Pro Gln Asn Val Asp
 290 295 300
 Val Asn Val His Pro Thr Lys His Glu Val His Phe Leu His Glu Glu
 305 310 315 320
 Ser Ile Leu Glu Arg Val Gln Gln His Ile Glu Ser Lys Leu Leu Gly
 325 330 335
 Ser Asn Ser Ser Arg Met Tyr Phe Thr Gln Thr Leu Leu Pro Gly Leu
 340 345 350
 Ala Gly Pro Ser Gly Glu Met Val Lys Ser Thr Thr Ser Leu Thr Ser
 355 360 365
 Ser Ser Thr Ser Gly Ser Ser Asp Lys Val Tyr Ala His Gln Met Val
 370 375 380
 Arg Thr Asp Ser Arg Glu Gln Lys Leu Asp Ala Phe Leu Gln Pro Leu
 385 390 395 400
 Ser Lys Pro Leu Ser Ser Gln Pro Gln Ala Ile Val Thr Glu Asp Lys
 405 410 415
 Thr Asp Ile Ser Ser Gly Arg Ala Arg Gln Gln Asp Glu Glu Met Leu
 420 425 430
 Glu Leu Pro Ala Pro Ala Glu Val Ala Ala Lys Asn Gln Ser Leu Glu
 435 440 445
 Gly Asp Thr Thr Lys Gly Thr Ser Glu Met Ser Glu Lys Arg Gly Pro
 450 455 460
 Thr Ser Ser Asn Pro Arg Lys Arg His Arg Glu Asp Ser Asp Val Glu

10

20

30

Phe Glu Arg Cys
755

<210> 12
<211> 2484
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
cttggctcctt ctggcgccaa aatgtcgttc gtggcagggg ttattcggcg gctggacgag 60
acagtgttga accgcatcgc ggcgggggaa gttatccagc ggccagctaa tgctatcaaa 120
gagatgattg agaactgttt agatgcaaaa tccacaagta ttcaagtgat tgttaaagag 180
ggaggcctga agttgattca gatccaagac aatggcaccg ggatcaggaa agaagatctg 240
gatattgtat gtgaaagggt cactactagt aaactgcagt cctttgagga tttagccagt 300
atctctacct atggctttcg aggtgaggct ttggccagca taagccatgt ggctcatggt 360
actattacaa cgaaaacagc tgatggaaag tgtgcataca gagcaagtta ctccagatgga 420
aaactgaaa cccctcctaa accatgtgct ggcaatcaag ggaccagat cacggtggag 480
gacotTTTTT acaacatagc cagcaggaga aaagctttaa aaaatccaag tgaagaatat 540
gggaaaattt tggaaagtgt tggcaggtat tcagtacaca atgcaggcat tagttttctca 600
gttaaaaaac aaggagagac agtagctgat gttaggacac taccoaatgc ctcaaccgtg 660
gacaatatcc gctccatcct tggaaatgct gttagtcgag aactgataga aattggatgt 720
gaggataaaa ccctagcctt caaaatgaat ggttacatat ccaatgcaaa ctactcagtg 780
aagaagtgca tcttcttact cttcatcaac catcgtctgg tagaatcaac ttccttgaga 840
aaagccatag aaacagtgtg tgcagcctat ttgcccaaaa acacacaccc attcctgtac 900
ctcagtttag aaatcagtc cagaatgtg gatgtaaatg tgcaccccaac aaagcatgaa 960
gttcaacttc tgcacgagga gagcatcctg gagcgggtgc agcagcacat cgagagcaag 1020
ctcctgggct ccaattcctc caggatgtac ttcaccacaga ctttgctacc aggacttgct 1080
ggcccctctg gggagatggt taaatccaca acaagtctga cctcgtcttc tacttctgga 1140
agtagtgata aggtctatgc ccaccagatg gttcgtacag attcccggga acagaagctt 1200
gatgcatttc tgcagcctc gagcaaaccc ctgtccagtc agccccaggc cattgtcaca 1260
gaggataaga cagatatttc tagtggcagg gctaggcagc aagatgagga gatgcttgaa 1320
ctcccagccc ctgctgaagt ggctgccaaa aatcagagct tggaggggga tacaacaaag 1380
gggacttcag aaatgtcaga gaagagagga cctacttcca gcaaccccag aaagagacat 1440
cgggaagatt ctgatgtgga aatggtgga gatgattccc gaaaggaaat gactgcagct 1500
tgtaccccc ggagaaggat cattaacctc actagtgttt tgagtctcca ggaagaaatt 1560
aatgagcagg gacatgagg tctccgggag atgttgcata accactcctt cgtgggctgt 1620
gtgaatcctc agtgggcctt ggcacagcat caaaccaagt tataccttct caacaccacc 1680
aagcttagtg aagaactgtt ctaccagata ctcatattatg attttgccaa ttttggtgtt 1740
ctcaggttat cggagccagc accgctcttt gacottgcca tgcttgctt agatagtcca 1800
gagagtggct ggacagagga agatggctcc aaagaaggac ttgctgaata cattgttgag 1860

10

20

30

tttctgaaga agaaggctga gatgcttgca gactatttct ctttggaat tgatgaggaa 1920
 ggaacctga ttggattacc cttctgatt gacaactatg tgcccccttt ggagggactg 1980
 cctatcttca ttcttcgact agccactgag gtgaattggg acgaagaaaa ggaatgtttt 2040
 gaaagcctca gtaaagaatg cgcctatgttc tattccatcc ggaagcagta catatctgag 2100
 gagtcgaccc tctcaggcca gcagagtga gtgcctggct ccattccaaa ctcttggaag 2160
 tggactgtgg aacacattgt ctataaagcc ttgcgctcac acattctgcc tctaaacat 2220
 ttcacagaag atggaatat cctgcagctt gctaacctgc ctgatctata caaagtcttt 2280
 gagaggtggt aaatatggtt atttatgcac tgtgggatgt gttcttcttt ctctgtatc 2340
 cgatacaaa gtgtgtatca aagtgtgata tacaaagtgt accaacataa gtgttgtag 2400
 cacttaagac ttatacttgc cttctgatag tattccttta tacacagtgg attgattata 2460
 aataaataga tgtgtcttaa cata 2484

<210> 13
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Met Lys Gln Leu Pro Ala Ala Thr Val Arg Leu Leu Ser Ser Ser Gln
1 5 10 15

Ile Ile Thr Ser Val Val Ser Val Val Lys Glu Leu Ile Glu Asn Ser
20 25 30

Leu Asp Ala Gly Ala Thr Ser Val Asp Val Lys Leu Glu Asn Tyr Gly
35 40 45

Phe Asp Lys Ile Glu Val Arg Asp Asn Gly Glu Gly Ile Lys Ala Val
50 55 60

Asp Ala Pro Val Met Ala Met Lys Tyr Tyr Thr Ser Lys Ile Asn Ser
65 70 75 80

His Glu Asp Leu Glu Asn Leu Thr Thr Tyr Gly Phe Arg Gly Glu Ala
85 90 95

Leu Gly Ser Ile Cys Cys Ile Ala Glu Val Leu Ile Thr Thr Arg Thr
100 105 110

Ala Ala Asp Asn Phe Ser Thr Gln Tyr Val Leu Asp Gly Ser Gly His
115 120 125

Ile Leu Ser Gln Lys
130

<210> 14
 <211> 426
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10

20

30

<400> 14
 cgagggcggat cgggtggttc atccatggag cgagctgaga gctcaggtac agaacctgct 60
 aaggccatca aacctattga tcggaagtca gtccatcaga tttgctctgg gcaggtggta 120
 ctgagctctaa gcaactgctg aaaggagtta gtagaaaaca gtctggatgc tgggtgccact 180
 aatattgatc taaagcttaa ggactatgga gtggatctta ttgaagtttc agacaatgga 240
 tgtgggtag aagaagaaaa ctccgaaggc ttaactctga aacatcacac atctaagatt 300
 caagagtttg ccgacctaac tcaggtttaa acttttggct ttcgggggga agctctgagc 360
 tcactttgtg cactgagcga tgtcaccatt tctacctgcc acgcatcggc gaaggttga 420
 acttga 426

10

<210> 15
 <211> 1360
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Met Ser Arg Gln Ser Thr Leu Tyr Ser Phe Phe Pro Lys Ser Pro Ala
 1 5 10 15
 Leu Ser Asp Ala Asn Lys Ala Ser Ala Arg Ala Ser Arg Glu Gly Gly
 20 25 30
 Arg Ala Ala Ala Ala Pro Gly Ala Ser Pro Ser Pro Gly Gly Asp Ala
 35 40 45
 Ala Trp Ser Glu Ala Gly Pro Gly Pro Arg Pro Leu Ala Arg Ser Ala
 50 55 60
 Ser Pro Pro Lys Ala Lys Asn Leu Asn Gly Gly Leu Arg Arg Ser Val
 65 70 75 80
 Ala Pro Ala Ala Pro Thr Ser Cys Asp Phe Ser Pro Gly Asp Leu Val
 85 90 95
 Trp Ala Lys Met Glu Gly Tyr Pro Trp Trp Pro Cys Leu Val Tyr Asn
 100 105 110
 His Pro Phe Asp Gly Thr Phe Ile Arg Glu Lys Gly Lys Ser Val Arg
 115 120 125
 Val His Val Gln Phe Phe Asp Asp Ser Pro Thr Arg Gly Trp Val Ser
 130 135 140
 Lys Arg Leu Leu Lys Pro Tyr Thr Gly Ser Lys Ser Lys Glu Ala Gln
 145 150 155 160
 Lys Gly Gly His Phe Tyr Ser Ala Lys Pro Glu Ile Leu Arg Ala Met
 165 170 175
 Gln Arg Ala Asp Glu Ala Leu Asn Lys Asp Lys Ile Lys Arg Leu Glu

20

30

Ala Phe Gly Arg Tyr Ser Asp Ser Leu Val Gln Lys Gly Tyr Lys Val
465 470 475 480

Ala Arg Val Glu Gln Thr Glu Thr Pro Glu Met Met Glu Ala Arg Cys
485 490 495

Arg Lys Met Ala His Ile Ser Lys Tyr Asp Arg Val Val Arg Arg Glu
500 505 510

Ile Cys Arg Ile Ile Thr Lys Gly Thr Gln Thr Tyr Ser Val Leu Glu
515 520 525

Gly Asp Pro Ser Glu Asn Tyr Ser Lys Tyr Leu Leu Ser Leu Lys Glu
530 535 540

Lys Glu Glu Asp Ser Ser Gly His Thr Arg Ala Tyr Gly Val Cys Phe
545 550 555 560

Val Asp Thr Ser Leu Gly Lys Phe Phe Ile Gly Gln Phe Ser Asp Asp
565 570 575

Arg His Cys Ser Arg Phe Arg Thr Leu Val Ala His Tyr Pro Pro Val
580 585 590

Gln Val Leu Phe Glu Lys Gly Asn Leu Ser Lys Glu Thr Lys Thr Ile
595 600 605

Leu Lys Ser Ser Leu Ser Cys Ser Leu Gln Glu Gly Leu Ile Pro Gly
610 615 620

Ser Gln Phe Trp Asp Ala Ser Lys Thr Leu Arg Thr Leu Leu Glu Glu
625 630 635 640

Glu Tyr Phe Arg Glu Lys Leu Ser Asp Gly Ile Gly Val Met Leu Pro
645 650 655

Gln Val Leu Lys Gly Met Thr Ser Glu Ser Asp Ser Ile Gly Leu Thr
660 665 670

Pro Gly Glu Lys Ser Glu Leu Ala Leu Ser Ala Leu Gly Gly Cys Val
675 680 685

Phe Tyr Leu Lys Lys Cys Leu Ile Asp Gln Glu Leu Leu Ser Met Ala
690 695 700

Asn Phe Glu Glu Tyr Ile Pro Leu Asp Ser Asp Thr Val Ser Thr Thr
705 710 715 720

Arg Ser Gly Ala Ile Phe Thr Lys Ala Tyr Gln Arg Met Val Leu Asp
725 730 735

Ala Val Thr Leu Asn Asn Leu Glu Ile Phe Leu Asn Gly Thr Asn Gly
740 745 750

10

20

30

Ser Thr Glu Gly Thr Leu Leu Glu Arg Val Asp Thr Cys His Thr Pro
755 760 765

Phe Gly Lys Arg Leu Leu Lys Gln Trp Leu Cys Ala Pro Leu Cys Asn
770 775 780

His Tyr Ala Ile Asn Asp Arg Leu Asp Ala Ile Glu Asp Leu Met Val
785 790 795 800

Val Pro Asp Lys Ile Ser Glu Val Val Glu Leu Leu Lys Lys Leu Pro
805 810 815

Asp Leu Glu Arg Leu Leu Ser Lys Ile His Asn Val Gly Ser Pro Leu
820 825 830

Lys Ser Gln Asn His Pro Asp Ser Arg Ala Ile Met Tyr Glu Glu Thr
835 840 845

Thr Tyr Ser Lys Lys Lys Ile Ile Asp Phe Leu Ser Ala Leu Glu Gly
850 855 860

Phe Lys Val Met Cys Lys Ile Ile Gly Ile Met Glu Glu Val Ala Asp
865 870 875 880

Gly Phe Lys Ser Lys Ile Leu Lys Gln Val Ile Ser Leu Gln Thr Lys
885 890 895

Asn Pro Glu Gly Arg Phe Pro Asp Leu Thr Val Glu Leu Asn Arg Trp
900 905 910

Asp Thr Ala Phe Asp His Glu Lys Ala Arg Lys Thr Gly Leu Ile Thr
915 920 925

Pro Lys Ala Gly Phe Asp Ser Asp Tyr Asp Gln Ala Leu Ala Asp Ile
930 935 940

Arg Glu Asn Glu Gln Ser Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Lys Gln Arg Asn
945 950 955 960

Arg Ile Gly Cys Arg Thr Ile Val Tyr Trp Gly Ile Gly Arg Asn Arg
965 970 975

Tyr Gln Leu Glu Ile Pro Glu Asn Phe Thr Thr Arg Asn Leu Pro Glu
980 985 990

Glu Tyr Glu Leu Lys Ser Thr Lys Lys Gly Cys Lys Arg Tyr Trp Thr
995 1000 1005

Lys Thr Ile Glu Lys Lys Leu Ala Asn Leu Ile Asn Ala Glu Glu
1010 1015 1020

Arg Arg Asp Val Ser Leu Lys Asp Cys Met Arg Arg Leu Phe Tyr
1025 1030 1035

10

20

30

Asn Phe Asp Lys Asn Tyr Lys Asp Trp Gln Ser Ala Val Glu Cys
 1040 1045 1050
 Ile Ala Val Leu Asp Val Leu Leu Cys Leu Ala Asn Tyr Ser Arg
 1055 1060 1065
 Gly Gly Asp Gly Pro Met Cys Arg Pro Val Ile Leu Leu Pro Glu
 1070 1075 1080
 Asp Thr Pro Pro Phe Leu Glu Leu Lys Gly Ser Arg His Pro Cys
 1085 1090 1095
 Ile Thr Lys Thr Phe Phe Gly Asp Asp Phe Ile Pro Asn Asp Ile
 1100 1105 1110
 Leu Ile Gly Cys Glu Glu Glu Glu Gln Glu Asn Gly Lys Ala Tyr
 1115 1120 1125
 Cys Val Leu Val Thr Gly Pro Asn Met Gly Gly Lys Ser Thr Leu
 1130 1135 1140
 Met Arg Gln Ala Gly Leu Leu Ala Val Met Ala Gln Met Gly Cys
 1145 1150 1155
 Tyr Val Pro Ala Glu Val Cys Arg Leu Thr Pro Ile Asp Arg Val
 1160 1165 1170
 Phe Thr Arg Leu Gly Ala Ser Asp Arg Ile Met Ser Gly Glu Ser
 1175 1180 1185
 Thr Phe Phe Val Glu Leu Ser Glu Thr Ala Ser Ile Leu Met His
 1190 1195 1200
 Ala Thr Ala His Ser Leu Val Leu Val Asp Glu Leu Gly Arg Gly
 1205 1210 1215
 Thr Ala Thr Phe Asp Gly Thr Ala Ile Ala Asn Ala Val Val Lys
 1220 1225 1230
 Glu Leu Ala Glu Thr Ile Lys Cys Arg Thr Leu Phe Ser Thr His
 1235 1240 1245
 Tyr His Ser Leu Val Glu Asp Tyr Ser Gln Asn Val Ala Val Arg
 1250 1255 1260
 Leu Gly His Met Ala Cys Met Val Glu Asn Glu Cys Glu Asp Pro
 1265 1270 1275
 Ser Gln Glu Thr Ile Thr Phe Leu Tyr Lys Phe Ile Lys Gly Ala
 1280 1285 1290
 Cys Pro Lys Ser Tyr Gly Phe Asn Ala Ala Arg Leu Ala Asn Leu

10

20

30

ttttatgagc tgtaccacat ggatgctctt attggagtca gtgaactggg gctggtattc 1440
 atgaaaggca actggggcca ttctggcttt cctgaaattg ctttggccg ttattcagat 1500
 tccctggtgc agaagggcta taaagtagca cgagtggaac agactgagac tccagaaatg 1560
 atggaggcac gatgtagaaa gatggcacat atatccaagt atgatagagt ggtgaggagg 1620
 gagatctgta ggatcattac caaggtaca cagacttaca gtgtgctgga aggtgatccc 1680
 tctgagaact acagtaagta tcttcttagc ctcaaagaaa aagaggaaga ttcttctggc 1740
 catactcgtg catatggtgt gtgctttgtt gatacttcac tgggaaagt tttcataggt 1800
 cagttttcag atgatcgcca ttgttcgaga tttaggactc tagtggcaca ctatcccca 1860
 gtacaagttt tatttgaaaa aggaaatctc tcaaagaaa ctaaacaat tctaaagagt 1920
 tcattgtcct gttctctca ggaaggtctg ataccoggct cccagttttg ggatgcatcc 1980
 aaaaacttga gaactctcct tgaggaagaa ttttttaggg aaaagctaag tgatggcatt 2040
 ggggtgatgt taccocagggt gcttaaaggt atgacttcag agtctgattc cattgggttg 2100
 acaccaggag agaaaagtga attgcccctc tctgctctag gtggtttgtt cttctacctc 2160
 aaaaaatgcc ttattgatca ggagctttta tcaatggcta attttgaaga atatattccc 2220
 ttggattctg acacagtcag cactacaaga tctggtgcta tcttcaccaa agcctatcaa 2280
 cgaatggtgc tagatgcagt gacattaaac aacttggaga ttttctgaa tggaaacaaat 2340
 ggttctactg aaggaacctt actagagagg gttgatactt gccatactcc ttttggttaag 2400
 cggctcctaa agcaatggct ttgtgcccga ctctgtaacc attatgctat taatgatcgt 2460
 ctagatgcca tagaagacct catggtttg cctgacaaaa tctcogaagt tgtagagctt 2520
 ctaaagaagc ttccagatct tgagaggcta ctcagtaaaa ttcataatgt tgggtctccc 2580
 ctgaagagtc agaaccacct agacagcagc gctataatgt atgaagaaac tacatacagc 2640
 aagaagaaga ttattgattt tcttctgct ctggaaggat tcaaagtaat gtgtaaaatt 2700
 ataggatca tgaagaagt tgctgatggt ttaagtcta aaatccttaa gcaggtcatc 2760
 tctctgcaga caaaaaatcc tgaaggctgt tttctgatt tgactgtaga attgaaccga 2820
 tgggatacag cctttgacca tgaaaaggct cgaagactg gacttattac tcccaaagca 2880
 ggctttgact ctgattatga ccaagctctt gctgacataa gagaaaatga acagagcctc 2940
 ctggaatacc tagagaaaca gcgcaacaga attggctgta ggaccatagt ctattggggg 3000
 attggtagga accgttacca gctggaatt cctgagaatt tcaccactcg caatttgcca 3060
 gaagaatacg agttgaaatc taccaagaag gctgtaaac gatactggac caaaactatt 3120
 gaaaagaagt tggctaactc cataaatgct gaagaacgga gggatgtatc attgaaggac 3180
 tgcattcggc gactgttcta taactttgat aaaaattaca aggactggca gtctgctgta 3240
 gagtgtatcg cagtgttggg tgttttactg tgccctggcta actatagtcg agggggtgat 3300
 ggtcctatgt gtcgccagc aattctgtt cgggaagata cccccctt cttagagctt 3360
 aaaggatcac gccatccttg cattacgaag actttttttg gagatgattt tattcctaatt 3420
 gacattctaa tagctgtga ggaagaggag caggaaaatg gcaaagccta ttgtgtgctt 3480
 gttactggac caaatatggg gggcaagtct acgcttatga gacaggctgg cttattagct 3540

10

20

30

gtaatggccc agatggggtg ttacgtccct gctgaagtgt gcaggctcac accaattgat 3600
 agagtgttta ctgactttgg tgcctcagac agaataatgt caggtgaaag tacatttttt 3660
 gttgaattaa gtgaaactgc cagcactctc atgcatgcaa cagcacattc tctggtgctt 3720
 gtggatgaat taggaagagg tactgcaaca tttgatggga cggcaatagc aaatgcagtt 3780
 gttaaagaac ttgctgagac tataaaatgt cgtacattat tttcaactca ctaccattca 3840
 ttagtagaag attattctca aaatgttgct gtgogcctag gacatatggc atgcatggta 3900
 gaaaatgaat gtgaagacct cagccaggag actattacgt tcctctataa attcattaag 3960
 ggagcttgct ctaaaagcta tggctttaat gcagcaaggc ttgctaactc cccagaggaa 4020
 gttattcaaa agggacatag aaaagcaaga gaatttgaga agatgaatca gtcactacga 4080
 ttatttcggg aagtttgctt ggctagtga aggtcaactg tagatgctga agctgtccat 4140
 aaattgctga ctttgattaa ggaattatag actgactaca ttggaagctt tgagttgact 4200
 tctgacaaa ggtggtaaat tcagacaaca ttatgatcta ataaacttta ttttttaaaa 4260
 atga 4264

<210> 17
 <211> 1408
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 ggcgctccta cctgcaagtg gctagtcca agtgctgggc cgccgctcct gccgtgcatg 60
 ttggggagcc agtacatgca ggtgggctcc acacggagag gggcgagac ccggtgacag 120
 ggctttacct ggtacatcgg catggcgcaa ccaaagcaag agaggggtggc gcgtgccaga 180
 caccaacggt cggaaaccgc cagacaccaa cggtcggaaa ccgccaagac accaacgctc 240
 ggaaaccgcc agacaccaac gctcggaaac cgccagacac caaggctcgg aatccacgcc 300
 aggccaacgc ggaggcgac tacctccctt ctgaccctgc tgctggcgtt cggaaaaaac 360
 gcagtcgggt gtgctctgat tggccaggc tctttgacgt cacggactcg acctttgaca 420
 gagccactag gcgaaaagga gagacgggaa gtattttttc cgccccgccc ggaaaggggtg 480
 gagcacaacg tcgaaagcag ccggtgggag cccaggaggc ggggcgctg tgggagccgt 540
 ggagggaaact ttcccagtc ccgaggggga tccggtgttg catccttggg gcgagctgag 600
 aactcgagta cagaacctgc taaggccatc aaacctattg atcggaaagtc agtccatcag 660
 atttgcctct ggccgggtgt accgagtcta aggcgcaatg cggatgaagga gttagtagaa 720
 aacagtctgg atgctggtgc cactaatggt gatctaaagc ttaaggacta tggagtggat 780
 ctcatgaaag tttcagcga tggatgtggg gtagaagaag aaaacttcga aggctttact 840
 ctgaaacatc acacatgtaa gattcaagag tttgccgacc taactcaggt ggaaactttt 900
 ggctttcggg ggaagctct gagctcactt tgtgactga gtgatgtoac cttttctacc 960
 tgccgtgtat cagcgaaggt tgggactcga ctgggtgttg atcactatgg gaaaatcctc 1020
 cagaaaaccc cctacccccg ccccagaggg atgacagtca gcgtgaagca gttattttct 1080
 acgctacctg tgcaccataa agaatttcaa aggaatatta agaagaaacg tgctgtcttc 1140

10

20

30

```

cccttcgcct tctgccgtga ttgtcagttt cctgaggcct ccccagccat gcttcctgta 1200
cagcctgtag aactgactcc tagaagtacc ccaccccacc cctgtctcctt ggaggacaac 1260
gtgatcactg tattcagctc tgcaagaat ggtccaggtt cttctagatg atctgcacaa 1320
atggttcctc tcctccttcc tgatgtctgc cattagcatt ggaataaagt tcctgctgaa 1380
aatccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1408

```

```

<210> 18
<211> 389
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

<400> 18

```

Met Ala Gln Pro Lys Gln Glu Arg Val Ala Arg Ala Arg His Gln Arg
1 5 10 15

```

```

Ser Glu Thr Ala Arg His Gln Arg Ser Glu Thr Ala Lys Thr Pro Thr
20 25 30

```

```

Leu Gly Asn Arg Gln Thr Pro Thr Leu Gly Asn Arg Gln Thr Pro Arg
35 40 45

```

```

Leu Gly Ile His Ala Arg Pro Arg Arg Arg Ala Thr Thr Ser Leu Leu
50 55 60

```

```

Thr Leu Leu Leu Ala Phe Gly Lys Asn Ala Val Arg Cys Ala Leu Ile
65 70 75 80

```

```

Gly Pro Gly Ser Leu Thr Ser Arg Thr Arg Pro Leu Thr Glu Pro Leu
85 90 95

```

```

Gly Glu Lys Glu Arg Arg Glu Val Phe Phe Pro Pro Arg Pro Glu Arg
100 105 110

```

```

Val Glu His Asn Val Glu Ser Ser Arg Trp Glu Pro Arg Arg Arg Gly
115 120 125

```

```

Ala Cys Gly Ser Arg Gly Gly Asn Phe Pro Ser Pro Arg Gly Gly Ser
130 135 140

```

```

Gly Val Ala Ser Leu Glu Arg Ala Glu Asn Ser Ser Thr Glu Pro Ala
145 150 155 160

```

```

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

```

```

Gly Pro Val Val Pro Ser Leu Arg Pro Asn Ala Val Lys Glu Leu Val
180 185 190

```

```

Glu Asn Ser Leu Asp Ala Gly Ala Thr Asn Val Asp Leu Lys Leu Lys
195 200 205

```

10

20

30

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

10

20

<210> 19
 <211> 795
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 atgtgtcctt ggcggcctag actaggccgt cgctgtatgg tgagccccag ggagggcggat 60
 ctgggcccc agaaggacac ccgcctggat ttgccccgta gcccgcccc ggcccctcgg 120
 gagcagaaca gccttgggta ggtggacagg aggggacctc gcgagcagac gcgcgcgcca 180
 gcgacagcag ccccgcccc gcctctcggg agccgggggg cagaggctgc ggagccccag 240
 gagggctcat cagccacagt ctctgcatgt ttccaagagc aacaggaaat gaacacattg 300
 cagggggccag tgtcattcaa agatgtggct gtggatttca cccaggagga gtggcggcaa 360
 ctggaccctg atgagaagat agcatacggg gatgtgatgt tggagaacta cagccatcta 420
 gtttctgtgg ggtatgatta tcaccaagcc aaacatcatc atggagtgga ggtgaaggaa 480
 gtggagcagg gagaggagcc gtggataatg gaaggtgaat ttccatgtca acatagtcca 540

30

gaacctgcta aggccatcaa acctattgat cggaagtcag tccatcagat ttgctctggg 600
 ccagtggtac tgagtctaag cactgcagtg aaggagttag tagaaaacag tctggatgct 660
 ggtgccacta atattgatct aaagcttaag gactatggag tggatctcat tgaagttca 720
 gacaatggat gtggggtaga agaagaaaac tttgaaggct taatctcttt cagctctgaa 780
 acatcacaca tgtaa 795

<210> 20
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Met Cys Pro Trp Arg Pro Arg Leu Gly Arg Arg Cys Met Val Ser Pro
 1 5 10 15

Arg Glu Ala Asp Leu Gly Pro Gln Lys Asp Thr Arg Leu Asp Leu Pro
 20 25 30

Arg Ser Pro Ala Arg Ala Pro Arg Glu Gln Asn Ser Leu Gly Glu Val
 35 40 45

Asp Arg Arg Gly Pro Arg Glu Gln Thr Arg Ala Pro Ala Thr Ala Ala
 50 55 60

Pro Pro Arg Pro Leu Gly Ser Arg Gly Ala Glu Ala Ala Glu Pro Gln
 65 70 75 80

Glu Gly Leu Ser Ala Thr Val Ser Ala Cys Phe Gln Glu Gln Gln Glu
 85 90 95

Met Asn Thr Leu Gln Gly Pro Val Ser Phe Lys Asp Val Ala Val Asp
 100 105 110

Phe Thr Gln Glu Glu Trp Arg Gln Leu Asp Pro Asp Glu Lys Ile Ala
 115 120 125

Tyr Gly Asp Val Met Leu Glu Asn Tyr Ser His Leu Val Ser Val Gly
 130 135 140

Tyr Asp Tyr His Gln Ala Lys His His His Gly Val Glu Val Lys Glu
 145 150 155 160

Val Glu Gln Gly Glu Glu Pro Trp Ile Met Glu Gly Glu Phe Pro Cys
 165 170 175

Gln His Ser Pro Glu Pro Ala Lys Ala Ile Lys Pro Ile Asp Arg Lys
 180 185 190

Ser Val His Gln Ile Cys Ser Gly Pro Val Val Leu Ser Leu Ser Thr
 195 200 205

10

20

30

Ala Val Lys Glu Leu Val Glu Asn Ser Leu Asp Ala Gly Ala Thr Asn
 210 215 220

Ile Asp Leu Lys Leu Lys Asp Tyr Gly Val Asp Leu Ile Glu Val Ser
 225 230 235 240

Asp Asn Gly Cys Gly Val Glu Glu Glu Asn Phe Glu Gly Leu Ile Ser
 245 250 255

Phe Ser Ser Glu Thr Ser His Met
 260

<210> 21
 <211> 1445
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 tttttttttt tgatgtttct cagtgcctca gtggcagcag aactggccct gtatcaggcc 60
 gctaccgcca ctccatgacc aacctcctg catacccccc ccccagcac ccctcccaca 120
 ggaccgcttc tgtgtttggg acccaccagg cctttgcacc atacaacaaa ccctcactct 180
 ccggggcccg gctcgcgcc aggctgaaca ccacgaacgc ctgggacgca gctcctcctt 240
 ccctggggag ccagcccctc taccgtcca gcctctcca cctgggaccg cagcacctgc 300
 ccccaggatc ctccacctcc ggtgcagtca gtgcctcctt ccccagcggc ccctcaagca 360
 gccacggcga gcgtccctgc cactgtgccc atgcagatgc caagccagca gagtcagcag 420
 gcgctcgctg gagcgaccgc aagccagagc agagcagagc aggtcataaa actacacgga 480
 agagctgaaa gtgccccag atgaggactg catcatctgc atggagaagc tgtccgcagc 540
 gtctggatac agcgatgtga ctgacagcaa ggcaatgggg cccctggctg tgggetgcct 600
 caccaagtgc agccacgct tccacctgct gtgcctcctg gccatgtaet gcaacggcaa 660
 taagggccct gagcaccca atcccggaaa gccgttact gccagagggt ttcccgccag 720
 tgctaccttc cagacaacgc cagggcccga agcctccagg ggcttcaga acccgagac 780
 actggtgac attccggcct ccccacagct gctgaccgat ggccactaca tgacgtgccc 840
 cgtgtctccg gaccagctgc cctgtgacga ccccatggcg ggcagcggag gcgccccgt 900
 gctgogggtg ggccatgacc acggctgcca ccagcagcca cgtatctgca acgcgccct 960
 ccctggccct ggaccctatc gtacagaacc tgctaaggcc atcaaaccta ttgatcggaa 1020
 gtcagtccat cagatttgct ctgggccagt ggtactgagt ctaagcactg cagtgaággga 1080
 gttagtagaa aacagtctgg atgctggtgc cactaatatt gatctaaagc ttaaggacta 1140
 tggaatgat ctcattgaag tttcaggcaa tggatgtggg gtagaagaag aaaacttcga 1200
 aggcctaatg atgtcaccat ttctacctgc cacgtctcgg cgaaggttgg gactcgactg 1260
 gtgtttgatc acgatgggaa aatcatccag aagacccctt acccccacc cagagggacc 1320
 acagtcagcg tgaagcagtt attttctacg ctacctgtgc gccataagga atttcaaagg 1380
 aatattaaga agaaacatgc tgcttccctt tcgccttctg ccgtgattgt cagttttaac 1440
 cggaa 1445

10

20

30

<210> 22
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Met Glu Lys Leu Ser Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Asp Val Thr Asp Ser
 1 5 10 15

Lys Ala Met Gly Pro Leu Ala Val Gly Cys Leu Thr Lys Cys Ser His
 20 25 30

Ala Phe His Leu Leu Cys Leu Leu Ala Met Tyr Cys Asn Gly Asn Lys
 35 40 45

10

Gly Pro Glu His Pro Asn Pro Gly Lys Pro Phe Thr Ala Arg Gly Phe
 50 55 60

Pro Ala Ser Ala Thr Phe Gln Thr Thr Pro Gly Pro Gln Ala Ser Arg
 65 70 75 80

Gly Phe Gln Asn Pro Glu Thr Leu Ala Asp Ile Pro Ala Ser Pro Gln
 85 90 95

Leu Leu Thr Asp Gly His Tyr Met Thr Leu Pro Val Ser Pro Asp Gln
 100 105 110

20

Leu Pro Cys Asp Asp Pro Met Ala Gly Ser Gly Gly Ala Pro Val Leu
 115 120 125

Arg Val Gly His Asp His Gly Cys His Gln Gln Pro Arg Ile Cys Asn
 130 135 140

Ala Pro Leu Pro Gly Pro Gly Pro Tyr Arg Thr Glu Pro Ala Lys Ala
 145 150 155 160

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

Val Val Leu Ser Leu Ser Thr Ala Val Lys Glu Leu Val Glu Asn Ser
 180 185 190

30

Leu Asp Ala Gly Ala Thr Asn Ile Asp Leu Lys Leu Lys Asp Tyr Gly
 195 200 205

Met Asp Leu Ile Glu Val Ser Gly Asn Gly Cys Gly Val Glu Glu Glu
 210 215 220

Asn Phe Glu Gly Leu Met Met Ser Pro Phe Leu Pro Ala Thr Ser Arg
 225 230 235 240

Arg Arg Leu Gly Leu Asp Trp Cys Leu Ile Thr Met Gly Lys Ser Ser
 245 250 255

Arg Arg Pro Pro Thr Pro Thr Pro Glu Gly Pro Gln Ser Ala
260 265 270

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 23

Ala Val Lys Glu Leu Val Glu Asn Ser Leu Asp Ala Gly Ala Thr Asn
1 5 10 15

<210> 24
<211> 48
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 24

10

Leu Arg Pro Asn Ala Val Lys Glu Leu Val Glu Asn Ser Leu Asp Ala
1 5 10 15

Gly Ala Thr Asn Val Asp Leu Lys Leu Lys Asp Tyr Gly Val Asp Leu
20 25 30

Ile Glu Val Ser Gly Asn Gly Cys Gly Val Glu Glu Glu Asn Phe Glu
35 40 45

<210> 25
<211> 47
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 25

20

Leu Ser Thr Ala Val Lys Glu Leu Val Glu Asn Ser Leu Asp Ala Gly
1 5 10 15

Ala Thr Asn Ile Asp Leu Lys Leu Lys Asp Tyr Gly Val Asp Leu Ile
20 25 30

Glu Val Ser Asp Asn Gly Cys Gly Val Glu Glu Glu Asn Phe Glu
35 40 45

<210> 26
<211> 50
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 26

30

Leu Arg Gln Val Leu Ser Asn Leu Leu Asp Asn Ala Ile Lys Tyr Thr
1 5 10 15

Pro Glu Gly Gly Glu Ile Thr Val Ser Leu Glu Arg Asp Gly Asp His
20 25 30

Leu Glu Ile Thr Val Glu Asp Asn Gly Pro Gly Ile Pro Glu Glu Asp

35	40	45		
Leu Glu				
50				
<210> 27				
<211> 22				
<212> DNA				
<213> artificial				
<220>				
<223> Oligonucleotide primer				
<400> 27				
ggacgagaag tataacttcg ag			22	10
<210> 28				
<211> 21				
<212> DNA				
<213> Artificial				
<220>				
<223> Oligonucleotide primer				
<400> 28				
catctcgctt gtgtaagag c			21	
<210> 29				
<211> 19				
<212> DNA				
<213> Artificial				20
<220>				
<223> Oligonucleotide primer				
<400> 29				
ggcgcaacca aagcaagag			19	
<210> 30				
<211> 19				
<212> DNA				
<213> Artificial				
<220>				
<223> Oligonucleotide primer				
<400> 30				
actgcgtttt ttcgaacg			19	30
<210> 31				
<211> 19				
<212> DNA				
<213> Artificial				
<220>				
<223> Oligonucleotide primer				
<400> 31				
atggttgaga actacagcc			19	
<210> 32				
<211> 19				
<212> DNA				
<213> Artificial				40

<220>
 <223> Oligonucleotide primer
 <400> 32
 cactccatag tccttaagc 19

<210> 33
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotide primer
 <400> 33
 gggaatgggt cagaaggac 19 10

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotide primer
 <400> 34
 tttcacggtt ggccttaggg 20

<210> 35
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial 20

<220>
 <223> Oligonucleotide primer
 <400> 35
 tgactacttt tgacttcagc c 21

<210> 36
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotide primer
 <400> 36
 aaccattcaa catttttaac cc 22 30

<210> 37
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotide primer
 <400> 37
 attaacttcc tacaccacaa c 21

<210> 38
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer
 <400> 38
 gtagagcaag accaccttg 19

<210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer
 <400> 39 10
 acattgctgg aagttctggc 20

<210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer
 <400> 40
 cctttctgac ttggatacca 20

<210> 41
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens 20
 <400> 41
 Met Ala Gln Pro Lys Gln Glu Arg Val Ala Arg Ala Arg His Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Glu Thr Ala
 20

<210> 42
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 42 30
 Leu Glu Asp Asn Val Ile Thr Val Phe Ser Ser Val Lys Asn Gly Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Ser Arg
 20

<210> 43
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 Arg Pro Arg Leu Gly Arg Arg Cys Met Val Ser Pro Arg Ala Arg Ala 40

1 5 10 15

Pro Arg Glu Gln
20

<210> 44
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Gly Val Glu Glu Glu Asn Phe Glu Gly Leu Ile Ser Phe Ser Ser Glu
1 5 10 15

Thr Ser His Met
20

<210> 45
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide primer

<400> 45
acgcatatgg agcgagctga gagctcgagt 30

<210> 46
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide primer

<400> 46
gaattcttat cacgtagaat cgagaccgag gagaggggta gggataggct taccagttcc 60
aaccttcgcc gatgc 75

<210> 47
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide primer

<400> 47
acgcatatgt gtccttgccg gcctaga 27

<210> 48
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide primer

<400> 48
gaattcttat tacgtagaat cgagaccgag gagaggggta gggataggct taccatgtg 60

10

20

30

40

tgatgtttca gagct

75

10

20

30

40

【 図 3 】

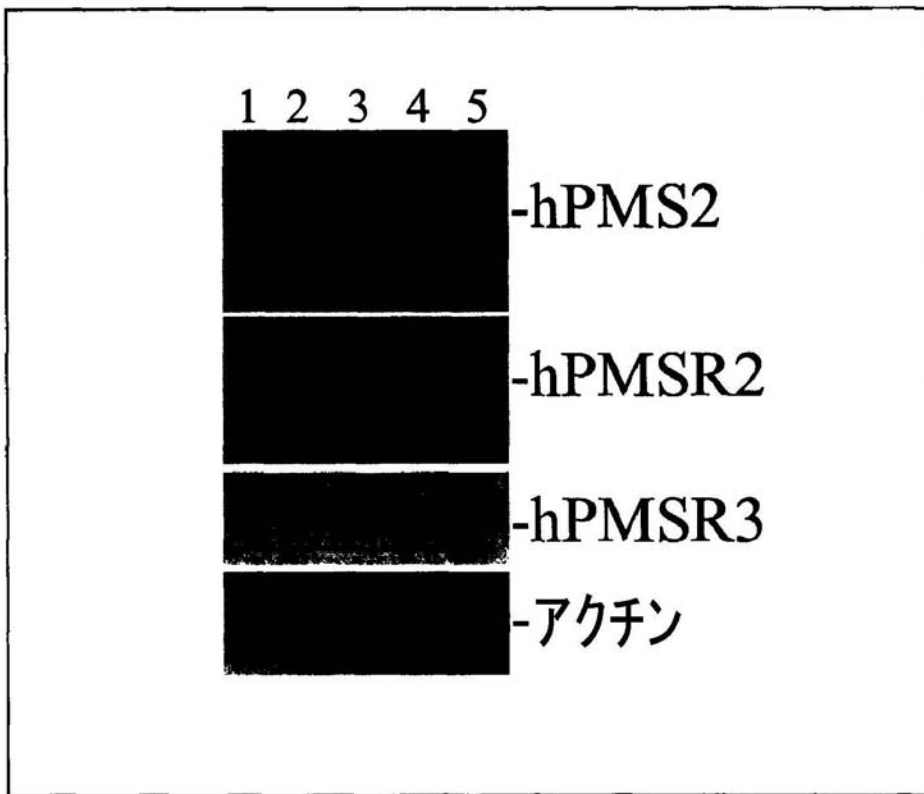


Figure 3

【 図 5 】

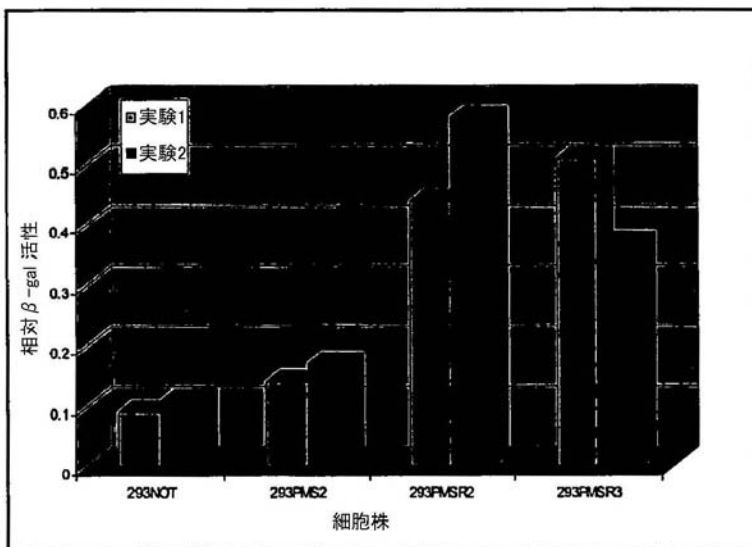


Figure 5

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	B

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, M X, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 サス, フィリップ・エム

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 4 0 3 オーデュボン・ブラツクホークサークル 1 9 0 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA11 CA04 CA09 DA02 DA05 GA11 GA25 HA12
 HA15
 4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ42 QR13 QR56 QR62 QR77 QR80 QR82
 QS24 QS25 QS34 QX02 QX07
 4B065 AA01X AA93X AA93Y AB01 AC14 AC20 BA16 CA31 CA44 CA46
 4C084 AA13 BA35 CA18 CA25 NA14 ZB26
 4C086 AA01 EA16 NA14 ZB26

专利名称(译)	使用PMSR同源物制备高度可变细胞的方法		
公开(公告)号	JP2005531291A	公开(公告)日	2005-10-20
申请号	JP2003571420	申请日	2003-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	莫佛泰克公司		
申请(专利权)人(译)	每次Mofuoteku酒店股份有限公司的Rete		
[标]发明人	グラツソルイジ ニコレイデスニコラスシー サスフィリップエム		
发明人	グラツソ,ルイジ ニコレイデス,ニコラス・シー サス,フィリップ・エム		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7105 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/47 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/10 C12Q1/02 C12Q1/68		
CPC分类号	C12N15/1024 A61K48/00 C07K14/47 C12N15/102		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7105 A61K48/00 A61P35/00 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.Y C12N5/00.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/GA11 4B024/GA25 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QR13 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX07 4B065/AA01X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA16 4B065/CA31 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/BA35 4C084/CA18 4C084/CA25 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZB26		
优先权	60/358578 2002-02-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了使用具有共同序列基序的PMS 2同源物使细胞超突变的方法。本发明的PMS2同源物具有ATP酶样基序，并且与PMS2-134至少约90%相同。还公开了产生变体文库的方法和在癌症的诊断和治疗应用中使用PMS2同源物的方法。

