

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4704666号
(P4704666)

(45) 発行日 平成23年6月15日(2011.6.15)

(24) 登録日 平成23年3月18日(2011.3.18)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N	33/48 M
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N	33/53 D
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G O 1 N	33/53 M

請求項の数 11 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-558380 (P2002-558380)
 (86) (22) 出願日 平成14年1月18日(2002.1.18)
 (65) 公表番号 特表2004-529617 (P2004-529617A)
 (43) 公表日 平成16年9月30日(2004.9.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2002/000215
 (87) 国際公開番号 W02002/057307
 (87) 国際公開日 平成14年7月25日(2002.7.25)
 審査請求日 平成16年12月17日(2004.12.17)
 (31) 優先権主張番号 0101300.2
 (32) 優先日 平成13年1月18日(2001.1.18)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

前置審査

(73) 特許権者 503372842
 ケンブリッジ エンタープライズ リミテ
 イド
 イギリス国, シービー2 1ティーエヌ,
 ケンブリッジ, トリニティー レーン, ジ
 オールド スクールズ
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程：

- a) 配列番号1の核酸配列と、少なくとも90%の同一性を有する核酸の、細胞中における発現を検出する工程；ならびに/あるいは
 - b) 配列番号2の配列と、少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドの、細胞中における存在を検出する工程；ならびに/あるいは
 - c) 配列番号2の配列と、少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドの、細胞の表面における存在を検出する工程
- のうち、少なくとも1つを含む、多能性細胞を同定する方法。

【請求項2】

核酸の発現をin situハイブリダイゼーションによって検出する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

配列番号1の核酸配列に特異的な5'および3'プライマーを使用して、前記細胞から取得される核酸を増幅することにより、核酸の発現を検出する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

ポリペプチドの細胞中または細胞表面における存在を免疫染色によって検出する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

多能性細胞を同定する際の使用に適している抗体であって、配列番号2からなるfragilisポリペプチドの1番目から62番目または128番目から137番目のアミノ酸残基からなる細胞外ドメインに特異的に結合する、抗体。

【請求項6】

Fv ; ScFv ; Fab' および F(ab')₂ より選択される抗体断片である、請求項5に記載の抗体。

【請求項7】

モノクローナル抗体またはその抗体断片である、請求項5または6に記載の抗体。

【請求項8】

標識をさらに含む、請求項5から7のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項9】

細胞集団内において多能性細胞を検出するための、請求項5から8のいずれか一項に記載の抗体の使用。

【請求項10】

前記細胞集団が、非ヒト胚組織 ; 成体組織 ; 培養物内で培養される組織、および前述のいずれかに由来する細胞調製物より取得される、請求項9に記載の抗体の使用。

【請求項11】

前記多能性細胞が、幹細胞 ; 始原生殖細胞 ; 胚性生殖(EG)細胞 ; および胚性幹(ES)細胞より選択され、細胞がヒト胚に由来する胚性幹細胞ではない、請求項9または10に記載の抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、発生学、分子生物学、および遺伝学の分野に関する。より詳細には、本発明は、始原生殖細胞(PGC)の初期集団内でのみで発現される遺伝子、ならびにこのような遺伝子およびその産物の、PGC、多能性胚性幹細胞(ES)、多能性胚性生殖細胞(EG)など細胞集団内の多能性細胞(pluripotent cell)および多分化能性細胞(multipotent cell)同定における使用に関する。これらはまた、細胞状態が多能性でない状態から多能性である状態になる、変化のマーカー、およびこの状態を多能性でない細胞に与えることができるマーカーである。

【背景技術】

【0002】

受精後、初期の哺乳動物胚は4回の卵割を経て16細胞の桑実胚を形成する。これらの細胞は、さらなる分裂の後、細胞を2つの異なる領域、すなわち、胚を形成する内部細胞塊と胎盤など胚外組織を形成する栄養外胚葉とに分けることができる胚盤胞に発達する。

【0003】

胚盤胞の形成までは、胚の一部を形成する細胞は全能性(totipotent)である。すなわち、各細胞が、完全な個別の胚およびその発達に必要なすべての外胚組織を生じさせる能力を有している。胚盤胞の形成後は、内部細胞塊の細胞はもはや全能性ではなく多能性となり、この場合これらは様々な異なる組織を生じさせることができる。このような細胞の既知のマーカーは、酵素アルカリホスファターゼおよびOct4の発現である。

【0004】

始原生殖細胞(PGC)は、3つの一次胚葉すべてに分化する能力を有する多能性細胞である。哺乳動物では、PGCが尿膜基部から後腸上皮および背側腸間膜を通して遊走し、生殖腺原基のコロニーを形成する。PGC由来の細胞は、通常は顕著な核小体を有する、特徴的に低い細胞質/核比を有している。胚の生殖隆腺を取り除き、PGCを生殖腺原基から解離し、PGCを回収することによって、PGCを胚から単離することができる。初期PGC集団は、受精後7.25日で新生尿膜基部に見つかる約45(四十五)個のアルカリホスファターゼ陽性細胞のクラスターからなると報告されている(Ginsburg他、1990、Development、110:521-528)。

【0005】

PGCには、最新のバイオテクノロジーおよび分子生物学において多くの用途がある。こ

10

20

30

40

50

れらは、遺伝子導入動物の生成に有用であり、この場合PGC由来の胚性生殖(EG)細胞を胚性幹(ES)細胞とほぼ同様に使用することができる(Labosky他、1994、Development、120:3197-3204)。これらはさらに、胎児発生の研究、ならびに変性疾患治療での組織再生および外傷後の破傷組織の再増殖における、多能性幹細胞の供給に有用である。中でも、PGCは、いくらかの分化した特質を有しているが、体細胞の運命を獲得するPGCの創始集団を取り囲む近隣細胞からは失われている、潜在的な多能性を保持している。PGCおよび周囲の体細胞は共通の祖先を共有する。しかし、創始PGCは数が少なく、胚組織および周囲の体細胞から単離するのが困難であるので、これらの研究およびそれを利用する技術の開発が難しくなる。

【0006】

10

PGCの創始集団内での遺伝子の発現、およびPGCに特異的な遺伝子発現とこれら細胞の多能性の保持との関連性については、当分野で少ししか知られていない。特定のPGCマーカーが知られており、たとえば、組織に非特異的なアルカリホスファターゼ(TNAP)の発現が初期PGCのマーカーとして使用されている(Ginsburg他、1990、Development、110:521-528)。Oct4は、PGC内では発現されるが体細胞内では発現されないことで知られている(Yoem他、1996、Development、122:881-894)。BMP4など他のマーカーは、主に体組織で発現されることで知られている(Lawson他、1999、Genes & Dev.、13:424-436)。しかし、これらの遺伝子は、他の種類の組織内でも発現されるので、どれもPGCに特異的でない。

【非特許文献1】Ginsburg他、1990、Development、110:521-528

【非特許文献2】Labosky他、1994、Development、120:3197-3204

20

【非特許文献3】Yoem他、1996、Development、122:881-894

【非特許文献4】Lawson他、1999、Genes & Dev.、13:424-436

【非特許文献5】Saitou他、1998、J Cell Biol、141、397-408

【非特許文献6】Deblandre、1995

【非特許文献7】J.Sambrook、E.F.Fritsch、およびT.Maniatis、1989、「Molecular Cloning:A Laboratory Manual」、第2版、第1-3巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press

【非特許文献8】Ausubel、F.M.他、(1995および定期的補遺;「Current Protocols in Molecular Biology」第9、13、16章、John Wiley & Sons、ニューヨーク州ニューヨーク)

【非特許文献9】B.Roe、J.Crabtree、およびA.Kahn、1996、「DNA Isolation and Sequencing:Essential Techniques」、John Wiley & Sons

30

【非特許文献10】J.M.PolakおよびJames O'D.McGee、1990、「In Situ Hybridization:Principles and Practice」、Oxford University Press

【非特許文献11】M.J.Gait(編集者)、1984、「Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach」、Irl Press

【非特許文献12】D.M.J.LilleyおよびJ.E.Dahlberg、1992、「Methods of Enzymology:DNA Structure Part A:Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology」Academic Press

【非特許文献13】Devereux他、1984、Nucleic Acids Research、12:387

【非特許文献14】BergerおよびKimmel、1987、「Guide to Molecular Cloning Techniques,Methods in Enzymology」、第152巻、Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ

40

【特許文献1】Winter、ヨーロッパ特許出願第0239400号

【非特許文献15】KohlerおよびMilstein、1975、Nature、256:495-497

【特許文献2】米国特許第4,376,110号

【非特許文献16】HarlowおよびLane、「Antibodies:a Laboratory Manual」、1988、Cold Spring Harbor

【特許文献3】ヨーロッパ特許第0623679号

【特許文献4】ヨーロッパ特許第0368684号

【特許文献5】ヨーロッパ特許第0436597号

【特許文献6】国際公開公報W097/28261号

50

- 【非特許文献 1 7】Rabbany他、1994、Crit Rev Biomed Eng、22:307-346
- 【非特許文献 1 8】Morgan他、1996、Clin Chem、42:193-209
- 【非特許文献 1 9】Robinson、1991、Bioelectrochim Acta、6:183-191
- 【非特許文献 2 0】Ghindilis他、1998、Biosens Bioelectron、1:113-131
- 【非特許文献 2 1】Attridge他、1991、Biosens Bioelectron、6:201-214
- 【非特許文献 2 2】BradyおよびIscove、1993
- 【非特許文献 2 3】Dulac,CおよびAxel、1995
- 【非特許文献 2 4】Ginsburg,M.、Snow,M.H.L.、およびMcLaren,A.、1990
- 【非特許文献 2 5】Lawson,K.A.、Dunn,N.R.、Roelen,B.A.J.、Zeinstra,L.M.、Davis,A.M.、Wright,C.V.E.、Korving,J.P.W.F.M.、およびHogan,B.L.M.、1999 10
- 【非特許文献 2 6】Yoem,Y.H.、Fuhrmann,G.、Ovitt,C.E.、Brehm,A.、Ohbo,K.、Gross,M.、Hubner,K.、およびScholer,H.R.、1996
- 【非特許文献 2 7】Lawson他、1999
- 【非特許文献 2 8】Nichols、199、Pesce、1998
- 【非特許文献 2 9】Yeom、1996
- 【発明の開示】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0007】
- したがって、PGCのマーカーとして使用でき、生殖細胞発生生物学および多能性状態の性質の見識を提供することができる遺伝子の同定が、当分野で必要とされている。 20
- 【課題を解決するための手段】
- 【0008】
- 本発明者らは、PGCおよび他の多能性細胞内で特異的に発現される2つの遺伝子の配列を開示する。マウス由来のこの遺伝子の配列を、配列番号1(GCR1すなわちFragilis)および配列番号3(GCR2すなわちStella)に示す。マウスのGCR1およびGCR2に対応するアミノ酸配列を、それぞれ配列番号2および配列番号4に示す。ラットGCR2相同体の核酸配列を、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9に示す。
- 【0009】
- 本発明の第1の態様によると、本発明者らは、GCR1ポリペプチドまたはその断片、相同体、変異体、誘導体を提供する。好ましくは、このポリペプチドは、配列番号2に示す配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%または95%の相同性を有する。 30
- 【0010】
- 本発明の第2の態様によると、GCR2ポリペプチドまたはその断片、相同体、変異体、誘導体を提供する。好ましくは、このポリペプチドは、配列番号4に示す配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%または95%の相同性を有する。
- 【0011】
- 本発明の第3の態様によると、本発明者らは、前記請求項のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする核酸を提供する。
- 【0012】
- 本発明の第4の態様として、配列番号1に示す配列と少なくとも90%の相同性を有する核酸、またはその断片、変異体、誘導体を提供する。 40
- 【0013】
- 本発明の第5の態様によると、本発明者らは、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9に示す配列と少なくとも75%の相同性を有する核酸、またはその断片、変異体、誘導体を提供する。
- 【0014】
- 第6の態様では、本発明は、本発明の第3、第4、または第5の態様に記載の、25個の連続したヌクレオチドの核酸配列を含む核酸を提供する。
- 【0015】
- 本発明の第7の態様では、本発明の第3、第4、第5または第6の態様に記載の、15個の連 50

続したヌクレオチドの核酸配列を含む核酸を提供する。

【0016】

本発明第8の態様によると、本発明者らは、本発明の第3から第7の態様のいずれかに記載の核酸配列の相補体(complement)を提供する。

【0017】

好ましくは、このような核酸は、遺伝暗号の縮重のためヌクレオチドの置換で前記核酸のコード特異性が改変されない、1つまたは複数のヌクレオチドの置換を含む。

【0018】

本発明の第9の態様によると、本発明者らは、本発明の前記態様のいずれかに記載の核酸にコードされるポリペプチドを提供する。

【0019】

好ましくは、このポリペプチドは配列番号2または配列番号4に示す配列を含む。

【0020】

本発明の第10の態様によると、本発明の第1、第2、第9または第10の態様に記載のポリペプチドの存在を検出すること、あるいは本発明の第3から第8の態様のいずれかに記載の核酸またはその相同体の発現を検出することを含む、多能性細胞を同定する方法を提供する。

【0021】

好ましくは、この方法は、GCR1(Fragilis)および/またはGCR2(Stella)に特異的な5'および3'プライマーを用いて推定上の多能性細胞由来の核酸を増幅するステップと、増幅して生成した核酸を検出するステップとを含む。好ましくは、核酸配列の発現はin situハイブリダイゼーションによって検出される。

【0022】

核酸配列の発現は、それにコードされるタンパク質産物を検出することで判定することができる。代わりに、またはそれにくわえて、免疫染色によってタンパク質産物を検出することができる。

【0023】

本発明の第11の態様として、本発明者らは、本発明の第1、第2、第9、または第10の態様に記載のポリペプチドに特異的な抗体を提供する。好ましくは、この抗体はGCR1の細胞外ドメインに特異的に結合することができる。

【0024】

本発明の第12の態様によると、本発明者らは、多能性細胞を同定および/または単離するためのこのような抗体の使用を提供する。

【0025】

本発明の第13の態様によると、本発明者らはさらに、前述の方法によって同定した多能性細胞を提供する。

【0026】

本発明の第14の態様によると、(a)多能性細胞を含む細胞集団を提供するステップと、(b)そこから1つまたは複数の多能性細胞を単離して単一細胞の多能性細胞単離体を提供するステップと、(c)単一の多能性細胞内に存在する転写された核酸を増幅するステップと、(d)多能性細胞内に存在するが体細胞内には存在しない転写物を同定するためにサブトラクティブハイブリダイゼーションスクリーンを実施するステップと、(e)ステップ(d)で同定した1つまたは複数の転写物を用いて核酸ライブラリをプローブし、多能性細胞内で特異的に発現される1つまたは複数の遺伝子をクローニングするステップとを含む、多能性細胞内で特異的に発現される遺伝子を単離する方法を提供する。

【0027】

非常に好ましい実施形態では、多能性細胞は、始原生殖細胞(PGC)、胚性幹細胞(ES)、胚性生殖細胞(EG)からなる群から選択される。好ましくは、多能性細胞は始原生殖細胞を含む。

【発明を実施するための最良の形態】

10

20

30

40

50

【0028】

GCR1(FRAGILIS)およびGCR2(STELLA)

この開示は、一般的に、GCR1(Fragilis)およびGCR2(Stella)の核酸、ポリペプチドのみならず、その断片、相同体、変異体、誘導体を提供する。

【0029】

「GCR1」と「Fragilis」という名称は互いに同義であり、「GCR2」と「Stella」も同様に同義と見なされるべきである。GCR1/Fragilisの核酸配列およびアミノ酸配列を配列番号1および2に示す一方で、GCR2/Stellaの核酸配列を配列番号3、5、6、7、8および9に示し、GCR2/Stellaのアミノ酸配列を配列番号4に示す。

【0030】

しかし、好ましい実施形態では、GCR1/Fragilisは文脈に応じて配列番号1に示す核酸配列または配列番号2に示すアミノ酸配列を参照するとされるべきである。さらに、好ましい実施形態では、GCR2/Stellaは文脈に応じて配列番号3に示す核酸配列または配列番号4に示すアミノ酸配列を参照するとされるべきである。

【0031】

GCR1およびGCR2はPGCに特異的な転写物である。GCR1はPGCの細胞系譜の決定プロセス中に上方制御され、GCR2はGCR1の後に上方制御されてPGCの運命に決定される。第1の遺伝子GCR1(生殖細胞制限-1、Fragilis)は、予測分子量15.0kDの137アミノ酸のタンパク質をコードする。EMBLプログラムPredictProteinで一番合うモデルでは、N末端とC末端のいずれもが外に位置する2つの膜貫通型ドメインが予測される。BLASTP検索により、Fragilisがインターフェロン誘導可能タンパク質ファミリーの新規なメンバーであることが分かった。典型的なメンバーの1つであるヒト9-27(Leu-13抗原と同一)は、白血球および内皮細胞内でインターフェロンによって誘導可能であり、抗増殖性およびホモタイプ付着シグナルの伝達に参与する多量体の複合体の構成成分として細胞表面に位置する(Deblandre, 1995)。BLASTN検索により、胚と成体のいずれもからの様々な組織由来のEST内でFragilis配列が見つかることが分かり、これは、様々な発生学および細胞生物学の状況においてFragilisが共通の役割を果たすことを示唆する。データベースの検索により、未知機能のラットインターフェロン誘導可能タンパク質(sp:INIB RAT、pir:JC1241)との配列一致が明らかになった。本発明者らのスクリーン上にGCR1配列が6回現れ、これはPGC内の高発現レベルを示唆する。

【0032】

第2の遺伝子GCR2(Stella)は、18kDの150アミノ酸のタンパク質をコードする。これは、既知のどのタンパク質とも配列相同性を有さず、いくつかの核移行共通配列を含み、強度に塩基性のpI(pI=9.67、塩基性残基の含有率=23.3%)であり、潜在的なDNA親和性が示唆される。さらに、潜在的な核外シグナルが同定され、Stellaが核と細胞質の間を往復する可能性が示唆された。BLASTN分析により、Stella配列は移植前の胚および生殖系(新生卵巣、メス12.5中腎や生殖腺など)ESTのみで見つかり、全能性細胞および多能性細胞内で主に発現されることが示唆される。興味深いことに、StellaはそのN末端内に、SAPモチーフとある程度の配列類似性を有する変調ドメインを含む。このモチーフは、染色体の組織化に参与する推定DNA結合ドメインである。さらに、SMARTプログラムにより、スプライシング因子のモチーフ様構造がC末端内に存在することがわかった。これらの発見は、Stellaが染色体の組織化およびRNAプロセッシングに参与している可能性を示唆する。

【0033】

GCR1および/またはGCR2ポリペプチドに対して抗体を産生させることができる。具体的には、膜貫通型ポリペプチドであるGCR1の細胞外ドメインに対する抗体を産生させることができる。

【0034】

本明細書に開示する抗体および核酸は、細胞集団内でPGCを同定するのに有用である。したがって、本明細書に記載する方法および組成物は、たとえば生殖組織の発生の研究および遺伝子導入動物の作成に有用なPGCを単離する手段、および本明細書に記載の方法に

10

20

30

40

50

よって単離したPGCを提供する。

【0035】

また、GCR1およびGCR2の相同体を使用して、PGCおよびESやEG細胞など他の多能性細胞を同定することができる。

【0036】

別段に指示しない限りは、本発明の実施には、当分野の技術者の技量範囲内にある化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA学および免疫学の従来技術を利用する。このような技術は文献に記載されている。たとえば、J.Sambrook、E.F.Fritsch、およびT.Manias、1989、「Molecular Cloning:A Laboratory Manual」、第2版、第1-3巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press;Ausubel,F.M.他、(1995および定期的補遺;「Current Protocols in Molecular Biology」第9、13、16章、John Wiley & Sons、ニューヨーク州ニューヨーク);B.Roe、J.Crabtree、およびA.Kahn、1996、「DNA Isolation and Sequencing:Essential Techniques」、John Wiley & Sons;J.M.PolakおよびJames O'D.McGee、1990、「In Situ Hybridization:Principles and Practice」、Oxford University Press;M.J.Gait(編集者)、1984、「Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach」、Irl Press;D.M.J.LilleyおよびJ.E.Dahlberg、1992、「Methods of Enzymology:DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology」Academic Press参照。これら一般教科書のそれぞれを、参照により本明細書に組み込む。

10

【0037】

ポリペプチド

本明細書に開示するポリペプチド配列は、配列番号2および配列番号4に示す具体的な配列またはその断片、あるいはGCR1やGCR2タンパク質から得た配列だけには限定されず、任意の源たとえば関連する細胞性相同体、他の種由来の相同体、それらの変異体または誘導体から得た相同配列も含むことも理解されよう。

20

【0038】

したがって、本開示は、配列番号2および配列番号4に示したアミノ酸配列の変異体、相同体、誘導体のみならず、本明細書に開示するヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列の変異体、相同体、誘導体も包含する。

【0039】

相同体

開示するポリペプチドには、任意の源、たとえば関連するウイルス/細菌のタンパク質、細胞の相同体、合成ペプチドから得た相同配列のみならず、その変異体や誘導体が含まれる。したがって、ポリペプチドには、哺乳動物(たとえばマウス、ラット、ウサギ)、特に霊長類、とりわけヒトなどの動物を含む他の種由来のGCR1および/またはGCR2の相同体をコードするものも含まれる。より詳細には、相同体にはヒトの相同体が含まれる。

30

【0040】

本文書の文脈では、相同配列または相同体とは、少なくとも30個、好ましくは50、70、90、または100個のアミノ酸にわたるアミノ酸レベルで、GCR1またはGCR2と少なくとも60、70、80、または90%同一、好ましくは少なくとも95または98%同一であるアミノ酸配列、たとえば本明細書中の配列表に示すものを含めることとする。本文書の文脈では、相同配列は、好ましくは少なくとも50または100個、好ましくは200、300、400または500個のアミノ酸にわたるアミノ酸レベルで、GCR1またはGCR2の配列と少なくとも15、20、25、30、40、50、60、70、80または90%同一、好ましくは少なくとも95または98%同一であるアミノ酸配列、たとえばGCR1(配列番号2)およびGCR2(配列番号4)を含めることとする。相同性は類似度の点から考慮することもできるが(すなわち類似の化学特性/機能を有するアミノ酸残基)、本文書の文脈では、配列の同一性の点から相同性を表すことが好ましい。

40

【0041】

相同性の比較は視認で行うことができ、またはより一般的には容易に入手可能な配列比較プログラムを用いて行うことができる。これら市販のコンピュータプログラムで、2つ以上の配列間の%相同性を計算することができる。

50

【0042】

%相同性は、連続した配列にわたって計算することができる。すなわち一方の配列が他方の配列とアラインしており、一方の配列内の個々のアミノ酸を他方の配列の対応するアミノ酸と、1残基ずつ直接比較する。これは、「ギャップのない(ungapped)」アラインメントと呼ばれる。通常、このようなギャップのないアラインメントは比較的少数の残基でのみ実施される(たとえば50個未満の連続したアミノ酸)。

【0043】

この方法は非常に単純で一貫した方法であるが、たとえば、普通なら同一である配列の対で、1つの挿入または欠失がその後のアミノ酸残基にアラインメントのずれを生じさせ、その結果、全体のアラインメントを行った場合に%相同性が大きく減少する可能性があることを考慮に入れていない。したがって、ほとんどの配列比較方法は、全体の相同性スコアに過度のペナルティを与えることなしに挿入または欠失の可能性を考慮に入れる最適なアラインメントを生成するように設計されている。これは、配列アラインメントに「ギャップ」を挿入して局部相同性を最大にしようとすることによってなされる。

【0044】

しかし、より複雑なこれらの方法では、同数の同一アミノ酸では、できるだけ少ないギャップの配列アラインメント(これは比較している2つの配列間の関連性がより高いことを反映する)がギャップの多いものより高いスコアを得るように、アラインメント内で起こる各ギャップに「ギャップペナルティ」を課す。「擬似ギャップコスト」は通常、ギャップの存在に比較的高いコストを課し、ギャップ内に続く各残基により小さなペナルティを課すように用いられる。これは、最も一般的に使用されているギャップスコア決定システムである。もちろん、高いギャップペナルティは、より少ないギャップの最適化されたアラインメントを生成する。ほとんどのアラインメントプログラムは、ギャップペナルティを変更することができる。しかし、このようなソフトウェアを配列比較に使用する場合は、デフォルト値を使用することが好ましい。たとえば、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ(下記参照)を使用する場合は、アミノ酸配列のデフォルトギャップペナルティは、ギャップは-12、各伸長は-4である。

【0045】

したがって、最大%相同性の計算には、まず、ギャップペナルティを考慮した最適アラインメントの生成が必要とされる。このようなアラインメントを実施するのに適切なコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ(米国ウィスコンシン大学;Devreux他、1984、Nucleic Acids Research、12:387)である。配列比較を実施することができる他のソフトウェアの例には、それだけには限定されないが、BLASTパッケージ(Ausubel他、1999、ibid、第18章参照)、FASTA(Atschul他、1990、J.Mol.Biol.、403-410)およびGENEWORKSの比較ツール一式が含まれる。BLASTとFASTAのいずれもで、オフラインおよびオンライン検索が利用可能である(Ausubel他、1999、ibid、ページ7-58、7-60)。しかし、GCG Bestfitプログラムを使用することが好ましい。

【0046】

最終%相同性を同一性の点から測定することができるが、アラインメントプロセス自体は通常、絶対的な対比較に基づいていない。代わりに、各対の比較に化学的類似度または進化的距離に基づいたスコアを割り当てるスケールド(scaled)類似性スコア行列が一般的に使用される。一般的に使用されるこのような行列の例は、BLASTプログラム一式のデフォルト行列であるBLOSUM62行列である。GCG Wisconsinプログラムは概して、一般的なデフォルト値、または供給されていればカスタムシンボル比較表のいずれかを使用する(詳細な説明には取扱説明書参照)。GCGパッケージには一般的なデフォルト値、他のソフトウェアの場合にはBLOSUM62などデフォルト行列を使用することが好ましい。

【0047】

ソフトウェアが最適アラインメントを生成した後は、%相同性、好ましくは%配列同一性を計算することができる。このソフトウェアは通常これを配列比較の一環として行って、数値の結果を作成する。

10

20

30

40

50

【0048】

変異体および誘導体

本明細書に記載する、アミノ酸配列に関連する用語「変異体」または「誘導体」には、置換したもの、変異させたもの、改変したもの、交換したもの、1個(または複数の)アミノ酸を配列から欠失させたまたは配列に追加したもののすべてが含まれる。好ましくは、生じたアミノ酸配列は、改変していない配列と実質的に同じ活性を保持し、好ましくは少なくとも、配列表に示すGCR1および/またはGCR2ポリペプチドと同じ活性を有する。したがって、好ましくは、この配列の重要な特徴、すなわちこれらがPGCおよびES細胞またはEG細胞など他の多能性細胞に特異的であり、細胞集団内でこれらの細胞のマーカーとして働くことは、保持されている。

10

【0049】

本明細書に記載の方法および組成物で使用するために、実施例中に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドあるいはその断片または相同体を改変することができる。通常、配列の生理活性を維持する改変が行われる。改変した配列が改変していない配列の生理活性を維持するという条件として、アミノ酸の置換、たとえば1、2または3個から10、20または30個の置換を行うことができる。アミノ酸置換には、たとえば治療で投与したポリペプチドの血漿半減期を増加させるための、自然に存在しない類似体の使用が含まれる。

【0050】

GCR1およびGCR2の自然変異体には、おそらく保存的なアミノ酸置換体が含まれる。保存的置換は、たとえば下記の表に従って定義することができる。第2段で同一ブロック内にあり、好ましくは第3段で同一行内にあるアミノ酸は、互いに置換することができる。

20

【0051】

【表1】

脂肪族	非極性	GAP
		ILV
	極性-非荷電	CSTM
		NQ
	極性-荷電	DE
KR		
芳香族		HFYW

30

【0052】

断片

本明細書に開示し、マーカーとして有用であるポリペプチドには、配列番号2および配列番号4に示した配列の断片を含めた上述の完全長ポリペプチドおよびその変異体の断片が含まれる。

【0053】

ポリペプチドには、任意のGCR1および/またはGCR2ポリペプチドの完全長配列の断片も含まれる。好ましくは、断片は少なくとも1つのエピトープを含む。エピトープを同定する方法は当分野で周知である。断片は通常少なくとも6個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも10、20、30、50、または100個のアミノ酸を含む。

40

【0054】

GCR1および/またはGCR2のアミノ酸配列からの5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95

50

、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145または150個以上の残基を含む、好ましくはそれからなる断片が含まれる。

【0055】

GCRタンパク質のポリペプチド断片ならびにその対立形質および種変異体(species variant)は、保存的置換を含めて1つまたは複数(たとえば5、10、15、または20個)の置換、欠失、挿入を含む可能性がある。置換、欠失、および/または挿入が起こる場合、たとえば異なる種の場合は、好ましくは配列表に示すアミノ酸残基の50%、40%、または20%未満のアミノ酸残基が改変される。

【0056】

GCR1および/GCR2、ならびにその断片、相同体、変異体、誘導体を、組換え手段によって作成することができる。また一方、これらを固相合成など当業者に周知の技術を用いた合成手段によって作成することもできる。このタンパク質を、たとえば抽出および精製を補助するために、融合タンパク質として生成することもできる。融合タンパク質のパートナーの例には、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、6×His、GAL4(DNA結合および/または転写活性化ドメイン)、 λ -ガラクトシダーゼが含まれる。また、融合タンパク質配列の除去を可能にするために、融合タンパク質のパートナーと目的のタンパク質配列との間にタンパク質分解性の切断部位を含めると便利な場合がある。好ましくは、この融合タンパク質は目的のタンパク質配列の機能を妨げない。動物細胞の細胞抽出物を精製してタンパク質を得ることもできる。

【0057】

本明細書に開示するGCR1および/またはGCR2ポリペプチド、変異体、相同体、断片、および誘導体は、実質的に単離された形にできる。このようなポリペプチドを、タンパク質の意図する目的を妨げないキャリアまたは希釈剤と混合しても、実質的に単離されているとみなされることを理解されたい。GCR1/GCR2の変異体、相同体、断片、誘導体も実質的に精製した形であることができ、この場合、一般的に調製物内にこのタンパク質を含み、調製物内のタンパク質の90%超、たとえば95%、98%、または99%がタンパク質である。

【0058】

本明細書に開示するGCR1/GCR2ポリペプチド、変異体、相同体、断片、および誘導体を明示標識(revealing label)で標識することができる。明示標識は、ポリペプチドなどの検出を可能にする任意の適切な標識にすることができる。適切な標識には、放射性同位元素、たとえば ^{125}I 、酵素、抗体、ポリヌクレオチド、およびビオチンなどリンカーが含まれる。試料内のポリペプチドの量を決定するために、標識したポリペプチドを免疫アッセイなど診断上の手順で使用することができる。標準のプロトコルを使用して動物およびヒト内の前記ポリペプチドの免疫反応性を検出するために、ポリペプチドまたは標識したポリペプチドを血清免疫アッセイまたは細胞免疫アッセイで使用することができる。

【0059】

本明細書に開示する、任意選択で標識したGCR1/GCR2ポリペプチド、変異体、相同体、断片、および誘導体を固相、たとえば免疫アッセイウェルの表面またはディップスティックに固定化することもできる。このような標識したおよび/または固定化したポリペプチドを、適切な試薬、対照、指示書などと共に、適切な容器のキットにパッケージすることができる。ポリペプチドまたはその対立形質や種変異体に対する抗体の、免疫アッセイによる検出方法に、このようなポリペプチドおよびキットを使用することができる。

【0060】

免疫アッセイ方法は当分野で周知であり、一般的に(a)前記タンパク質に対する抗体によって結合可能なエピトープを含むポリペプチドを提供すること、(b)生物試料を前記ポリペプチドと共に、抗体-抗原複合体の形成を可能にする条件下でインキュベートすること、および(c)前記ポリペプチドを含む抗体-抗原複合体が形成されているかどうかを決定することを含む。

【0061】

本明細書に開示するGCR1/GCR2ポリペプチド、変異体、相同体、断片、および誘導体は

10

20

30

40

50

、それに対応する遺伝子およびその相同体の、疾病における機能を含めた細胞機能における役割を研究するために、in vitroまたはin vivo細胞培養システムで使用することができる。たとえば、切断したまたは改変したポリペプチドを細胞に導入して、細胞内で起こる通常の機能を乱すことができる。組換え発現ベクターからのポリペプチドのin situ発現によって(下記参照)ポリペプチドを細胞に導入することができる。発現ベクターは、任意選択でポリペプチドの発現を調節する誘導性プロモーターを有する。

【 0 0 6 2 】

昆虫細胞や哺乳動物細胞など適切な宿主細胞の使用により、組換え発現産物に最適な生理活性を与えるのに必要な可能性がある翻訳後修飾(たとえば、ミリストル化、グリコシル化、切断、ラビデーション、およびチロシン、セリン、スレオニンリン酸化)が行われることが期待される。本明細書に開示するGCR1/GCR2ポリペプチド、変異体、相同体、断片、および誘導体が発現されるこのような細胞培養システムを、細胞内のポリペプチドの機能を妨害するまたは促進する候補物質を同定するアッセイシステムで使用することができる。

10

【 0 0 6 3 】

GCR1/GCR2核酸

本明細書に記載する方法および組成物は、概して、いくつかのGCR1およびGCR2核酸と共に、その断片、相同体、変異体、誘導体を提供する。これらの核酸配列は好ましくは本明細書中、特に配列表中に開示のポリペプチド配列をコードする。好ましくは、ポリヌクレオチドは、配列番号1、3、5、6、7、8、9またはその断片、相同体、変異体、誘導体からなる群から選択されるStellaおよび/またはFragilis核酸を含む。

20

【 0 0 6 4 】

具体的には、本発明者らは、本明細書に開示する任意のGCR1および/またはGCR2ポリペプチドをコードする核酸を提供する。したがって、用語「GCR核酸」、「GCR1核酸」、および「GCR2核酸」はそれに沿って解釈されるべきである。しかし、好ましくは、このような核酸は、配列番号1、3、5、6、7、8または9に示す任意の配列、あるいは配列番号2および4のポリペプチドの任意のものをコードする配列、ならびにこのような核酸の断片、相同体、変異体、または誘導体を含む。したがって、好ましくは、上記の用語はこれらの配列を指すと解釈すべきである。

【 0 0 6 5 】

本文書で使用する用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」および核酸は、互いに同義であることを意図する。「ポリヌクレオチド」は一般的に、改変していないRNAまたはDNA、あるいは改変したRNAまたはDNAであってよい任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドをいう。「ポリヌクレオチド」には、それだけに限定されることはないが、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖と二本鎖領域の混合DNA、一本鎖および二本鎖RNA、一本鎖と二本鎖領域の混合RNA、一本鎖またはより典型的には二本鎖あるいは一本鎖と二本鎖領域の混合であるDNAとRNAを含むハイブリッド分子が含まれる。さらに、「ポリヌクレオチド」とは、RNA、DNA、またはRNAとDNAをいずれも含む三本鎖領域をいう。用語ポリヌクレオチドはまた、1つまたは複数の改変した塩基を含むDNAまたはRNA、および安定性または他の理由で主鎖を改変したDNAまたはRNAを含む。「改変した」塩基には、たとえばトリチル化した塩基、イノシンなど珍しい塩基が含まれる。DNAおよびRNAに様々な改変が行われ、したがって、「ポリヌクレオチド」は自然に存在する化学的、酵素的、代謝的に改変した形のポリヌクレオチドのみならず、ウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態も包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、しばしばオリゴヌクレオチドと呼ばれる比較的短いポリヌクレオチドも包含する。

30

40

【 0 0 6 6 】

遺伝コードの縮重の結果、多数の様々なポリヌクレオチドおよび核酸が同じポリペプチドをコードすることができることは、当業者には理解されよう。さらに、当業者は日常的な技術を使用して、ポリペプチドを発現させる任意の特定の宿主生物のコードンを反映させるために、本明細書に記載のポリヌクレオチドにコードされるポリペプチド配列に影

50

響しないヌクレオチド置換を行うことができることも、理解されよう。

【0067】

変異体、誘導体、および相同体

本明細書に記載のポリヌクレオチドは、DNAまたはRNAを含むことができる。これらは、一本鎖または二本鎖であり得る。これらはまた、内部に合成または改変したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであり得る。いくつかの異なるタイプのオリゴヌクレオチドの改変が当分野で知られている。これらには、メチルホスホネートおよびホスホロチオエート主鎖、分子の3'末端および/または5'末端へのアクリジンまたはポリリジン鎖の付加が含まれる。本文書の目的のために、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、当分野で利用可能な任意の方法で改変できることを理解されたい。このような改変を、ポリヌクレオチドの *in vivo* 活性または寿命を増強させるために実施することができる。

10

【0068】

ポリヌクレオチドが二本鎖の場合は、二重鎖の両鎖が、個別でも組み合わせてでも、本明細書に記載の方法および組成物に包含されている。ポリヌクレオチドが一本鎖の場合は、そのポリヌクレオチドの相補配列も含まれることを理解されたい。

【0069】

ヌクレオチド配列に関連して、用語「変異体」、「相同体」、または「誘導体」には、生じるヌクレオチド配列が多能性細胞に特異的、好ましくはPGC、ES細胞、またはEG細胞に特異的であることを条件として、置換したもの、変異させたもの、改変したもの、交換したもの、1個(または複数の)ヌクレオチドを配列から欠失させたまたは配列に追加したもののすべてが含まれる。最も好ましくは、生じるヌクレオチド配列はPGCに特異的である。

20

【0070】

上に示したように、配列同一性に関して、「相同体」とは配列表に示す関連する配列と、好ましくは、少なくとも5%の同一性、少なくとも10%の同一性、少なくとも15%の同一性、少なくとも20%の同一性、少なくとも25%の同一性、少なくとも30%の同一性、少なくとも35%の同一性、少なくとも40%の同一性、少なくとも45%の同一性、少なくとも50%の同一性、少なくとも55%の同一性、少なくとも60%の同一性、少なくとも65%の同一性、少なくとも70%の同一性、少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、または少なくとも95%の同一性を有する。

30

【0071】

より好ましくは少なくとも95%の同一性、より好ましくは少なくとも96%の同一性、より好ましくは少なくとも97%の同一性、より好ましくは少なくとも98%の同一性、より好ましくは少なくとも99%の同一性を有する。ヌクレオチド相同性比較を上記のように行うことができる。好ましい配列比較プログラムは、上記のGCG Wisconsin Bestfitプログラムである。デフォルトスコア決定(scoring)行列は、同一ヌクレオチドそれぞれに対して10、それぞれの不一致に対して-9の一致値(match value)を有する。デフォルトギャップ作成ペナルティは-50であり、デフォルトギャップ伸長ペナルティは各ヌクレオチドに対して-3である。

【0072】

ハイブリダイゼーション

本発明者らはさらに、本明細書に提示する任意の配列、またはその任意の変異体、断片、誘導体、あるいは上記のいずれかの相補体を選択的にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列を記載する。ヌクレオチド配列は、好ましくは少なくとも15ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも20、30、40または50ヌクレオチド長である。

40

【0073】

本明細書中で使用する用語「ハイブリダイゼーション」には、「核酸の鎖が塩基対形成で相補鎖と結合する方法」のみならず、ポリメラーゼ連鎖反応法技術で行われるような増幅方法が含まれるものとする。

【0074】

50

本明細書に提示するヌクレオチド配列またはその相補体に選択的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは一般的に、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25または30個、たとえば少なくとも40、60または100個以上の連続したヌクレオチド領域にわたって、本明細書に提示する対応するヌクレオチド配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましくは少なくとも95%または98%相同である。

【0075】

用語「選択的にハイブリダイズ可能」とは、標的ポリヌクレオチドがバックグラウンドより有意に高いレベルでプローブとハイブリダイズすることが分かっている条件下で、プローブとして用いるポリヌクレオチドを使用することをいう。バックグラウンドハイブリダイゼーションは、たとえばcDNAまたはスクリーニングするゲノムDNAライブラリ内に存在する他のポリヌクレオチドが原因で起こる可能性がある。この場合、バックグラウンドは、プローブとライブラリ内の非特異的DNAメンバーとの間の相互作用によって生じたシグナルレベルを示し、標的DNAで観察される特異的相互作用の1/10未満、好ましくは1/100未満の強度である。相互作用の強度は、たとえばプローブを³²Pなどで放射標識することで測定することができる。

10

【0076】

ハイブリダイゼーション条件は、BergerおよびKimmel(1987、「Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology」、第152巻、Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ)に教示されるように核酸結合複合体の融解温度(T_m)に基づいており、「ストリンジェンシー」の定義は以下で説明するように与える。

20

【0077】

最高ストリンジェンシーは通常、約T_m-5 (プローブのT_mの5 下)で起こり、T_mの約5から10 下で高ストリンジェンシー、T_mの約10 から20 下で中程度ストリンジェンシー、T_mの約20 から25 下で低ストリンジェンシーである。当業者には理解されるように、最高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションを使用して同一ポリヌクレオチド配列を同定または検出することができ、中程度(または低)ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションを使用して類似のまたは関連するポリヌクレオチド配列を同定または検出することができる。

【0078】

好ましい態様では、本発明者らは、ストリンジェントな条件下(たとえば、65 および0.1 × SSC {1 × SSC=0.15M NaCl、0.015M クエン酸Na₃ pH7.0})で、GCR1/GCR2核酸、またはその断片、相同体、変異体、誘導体にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列を開示する。

30

【0079】

ポリヌクレオチドが二本鎖の場合は、二重鎖の両鎖が、個別でも組み合わせでも、本発明の開示に包含されている。ポリヌクレオチドが一本鎖の場合は、そのポリヌクレオチドの相補配列も開示され包含されていることを理解されたい。

【0080】

本明細書に開示する配列と100%相同ではないが開示の範囲内であるポリヌクレオチドは、いくつかの方法で得ることができる。本明細書に記載の配列の他の変異体は、たとえば、様々な個体、たとえば異なる集団からの個体から作成したDNAライブラリをプローブすることによって得ることができる。さらに、他のウイルス性/細菌性、または細胞性の相同体、特に哺乳動物細胞にある細胞性相同体(たとえば、ラット、マウス、ウシおよび霊長類の細胞、ヒト細胞を含む)を得ることができ、このような相同体およびその断片は一般的に、本明細書中の配列表に示す配列に選択的にハイブリダイズすることができる。このような配列は、他の動物種から作成したcDNAライブラリまたは他の動物種からのゲノムDNAライブラリをプローブし、配列番号1または3のすべてまたは一部を含むプローブで、中程度から高いストリンジェンシーの条件下でこのようなライブラリをプローブすることによって得ることができる。GCR1およびGCR2の種相同体ならびに対立形質変異体得るために、同様の考慮事項が当てはまる。

40

50

【 0 0 8 1 】

本明細書に記載のポリヌクレオチドを使用して、プライマー、たとえばPCRプライマーや代替増幅反応用のプライマー、プローブ、たとえば放射性または非放射性標識を使用して従来方法によって明示標識で標識したプローブを生成するか、あるいはポリヌクレオチドをベクター内にクローニングすることができる。このようなプライマー、プローブ、および他の断片は、少なくとも15、好ましくは少なくとも20、たとえば少なくとも25、30、または40ヌクレオチド長であり、また本明細書中で使用される用語ポリヌクレオチドに含まれる。好ましい断片は、500、200、100、50、20ヌクレオチド長より短い。

【 0 0 8 2 】

DNAポリヌクレオチドなどのポリヌクレオチドおよびプローブは、組換え、合成、または当業者に利用可能な任意の方法によって生成することができる。また、これらを標準の技術でクローニングすることもできる。

10

【 0 0 8 3 】

一般的に、プライマーは、1ヌクレオチドずつ所望の核酸配列を段階的に製造することを要する合成方法によって生成する。自動化技術を使用してこれを行う技術は、当分野で容易に利用可能である。

【 0 0 8 4 】

より長いポリヌクレオチドは一般的に組換え方法を使用して、たとえばPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)クローニング技術を使用して生成する。これには、クローニングを所望する配列領域に隣接する1対のプライマー(たとえば約15から30ヌクレオチド)を作成すること、プライマーを動物またはヒトの細胞から得たmRNAまたはcDNAと接触させること、所望の領域の増幅をもたらす条件下でポリメラーゼ連鎖反応を実施すること、増幅した断片を(たとえば反応混合物をアガロースゲル上で精製することによって)単離すること、および増幅したDNAを回収することを要する。プライマーは、増幅したDNAを適切なクローニングベクター内にクローニングできるように、適切な制限酵素認識部位を含むように設計することができる。

20

【 0 0 8 5 】

ヌクレオチドベクター

ポリヌクレオチドを、組換え複製可能なベクターに組み入れることができる。このベクターは、適合宿主内の核酸を複製するのに使用することができる。したがって、さらなる実施形態では、本発明者らは、ポリヌクレオチドを複製可能なベクターに導入すること、このベクターを適合宿主細胞に導入すること、およびベクターの複製をもたらす条件下で宿主細胞を増殖させることによって、ポリヌクレオチドを作成する方法を提供する。適切な宿主細胞には、E.coliなどの細菌、酵母菌、哺乳動物細胞系、および他の真核生物細胞系、たとえば昆虫Sf9細胞が含まれる。

30

【 0 0 8 6 】

好ましくは、ベクター内のポリヌクレオチドは、宿主細胞でコード配列の発現をもたらすことができる調節配列に作動可能に連結している。すなわち、このベクターは発現ベクターである。用語「作動可能に連結」とは、記載した構成成分が、その意図された様式で機能できる関係にあることを意味する。コード配列に「作動可能に連結」している制御配列は、調節配列に適合した条件下でコード配列の発現が成されるようにライゲーションされている。

40

【 0 0 8 7 】

たとえば調節配列に指示される転写レベルの転写モジュレーターに対する応答性をより高めさせる、さらなる転写制御要素を付加することによって、調節配列を改変することができる。

【 0 0 8 8 】

タンパク質の発現をもたらすために、ベクターを適切な宿主に、下記のように形質転換または形質移入させることができる。この方法に、ベクターにタンパク質をコードするコード配列の発現をもたらす条件下で、上記の発現ベクターを用いて形質転換させた宿主細

50

胞を培養すること、および任意選択で発現させたタンパク質を回収することを含めることができる。

【0089】

ベクターは、たとえば複製起点、任意選択で前記ポリヌクレオチドの発現用のプロモーター、および任意選択でプロモーターのレギュレーターを与えられたプラスミドまたはウイルスベクターにすることができる。このベクターに、1つまたは複数の選択可能マーカ―遺伝子、たとえば細菌プラスミドの場合はアンピシリン耐性遺伝子または哺乳動物ベクターの場合はネオマイシン耐性遺伝子を含めることができる。たとえば宿主細胞を形質移入またはそれを形質転換させるのにベクターを使用することができる。

【0090】

タンパク質をコードする配列に作動可能に連結している調節配列には、プロモーター/エンハンサーおよび他の発現制御シグナルが含まれる。これらの調節配列を、発現ベクターを使用する予定の宿主細胞に適合するように選択することができる。用語「プロモーター」は当分野で周知であり、大きさおよび複雑さが最小プロモーターから上流要素およびエンハンサーを含むプロモーターの範囲である核酸領域を包含する。

【0091】

プロモーターは通常、哺乳動物細胞内で機能的なプロモーターから選択されるが、原核細胞のプロモーターおよび他の真核細胞で機能的なプロモーターを使用することもできる。このプロモーターは通常、ウイルスまたは真核細胞遺伝子のプロモーター配列に由来する。たとえば、発現を引き起こさせる細胞のゲノム由来のプロモーターにすることができる。真核生物のプロモーターに関しては、偏在的に機能するプロモーター(アクチン、アクチン、チューブリンのプロモーターなど)、あるいは組織特異的に機能するプロモーター(ピルビン酸キナーゼの遺伝子のプロモーターなど)にし得る。また、特定の刺激に応答するプロモーター、たとえばステロイドホルモン受容体を結合するプロモーターにすることもできる。ウイルスプロモーター、たとえばモロニー Maus 白血病ウイルス末端反復配列(MMLV LTR)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)LTRプロモーター、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)IEプロモーターを使用することもできる。

【0092】

異種性遺伝子の発現レベルを細胞の生存期間中制御できるように、プロモーターを誘導性にするのが有利な場合がある。誘導性とは、プロモーターを用いて得た発現レベルが制御可能であることを意味する。

【0093】

さらに、さらなる制御配列、たとえばエンハンサー配列を付加することによって、これらのプロモーターすべてを改変することができる。上に説明したプロモーターの2つ以上の異なるものからの配列要素を含むキメラプロモーターを使用することができる。

【0094】

宿主細胞

本明細書に開示するベクターおよびポリヌクレオチドを、ベクター/ポリヌクレオチドを複製するおよび/またはタンパク質を発現させるために、宿主細胞内に導入することができる。原核細胞を宿主細胞としてタンパク質を生成することもできるが、真核細胞、たとえば酵母菌、昆虫、または哺乳動物の細胞、特に哺乳動物細胞を使用することが好ましい。

【0095】

形質移入、形質転換、電気穿孔など当分野で周知の様々な技術を使用してベクター/ポリヌクレオチドを適切な宿主細胞に導入することができる。本明細書に開示するベクター/ポリヌクレオチドを動物に投与する場合は、当分野で既知のいくつかの技術、たとえばレトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルスなどの組換えウイルスベクターを用いた感染、核酸の直接注入、微粒子銃による形質転換が知られている。

【0096】

タンパク質の発現および精製

10

20

30

40

50

本明細書に開示するポリヌクレオチドを含む宿主細胞を使用してタンパク質を発現させることができる。タンパク質の発現を可能にする適切な条件下で宿主細胞を培養することができる。本明細書に記載するタンパク質の発現は、これらが連続的に生成される構造的なものでも、または発現の開始に刺激を必要とする誘導的なものでもよい。誘導的発現の場合、タンパク質の生産を、たとえば培養基に誘導物質、たとえばデキサメタゾンやIPTGを添加することによって、必要なときに開始させることができる。

【 0 0 9 7 】

酵素溶解、化学溶解、および/または浸透性溶解および物理的破壊を含む、当分野で周知の様々な技術によって宿主細胞からタンパク質を抽出することができる。

【 0 0 9 8 】

組換えStellaおよびFragilisタンパク質

StellaおよびFragilisのヌクレオチド配列をTRIシステムベクター(Qiagen)内にクローニングする。適切な制限酵素部位を用いて、製造者の指示に従って、前方の第2コドン(すなわち、第1のコドンATGなしのStellaのN末端断片)を含むStella配列をpQEベクター内にクローニングする。QIAexpress pQEベクターは、6×Hisタグタンパク質のE.coli内での高レベル発現を可能にする。

【 0 0 9 9 】

Stella遺伝子のN末端部分にHisタグを配置する。Ni-NTAカラム上のアフィニティークロマトグラフィーによって、製造者の指示に従って組換えタンパク質を精製する。適切な制限酵素を使用してHisタグを切断する。

【 0 1 0 0 】

組換えで発現したStellaおよびFragilisタンパク質は、生物学的に活性であることが分かった。

【 0 1 0 1 】

抗体

本明細書中で使用する抗体とは、選択した標的を結合することができる完全な抗体または抗体断片をいい、Fv、ScFv、Fab'およびF(ab')₂、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、キメラ、CDR移植およびヒト化抗体を含む操作した抗体、ならびにファージディスプレイや代替技術を用いて生成した人工的に選択した抗体が含まれる。FvやScFvなど小さな断片は、その小さなサイズとその結果の優れた組織内分布のために、診断用途および治療用途に有利な特性を有する。

【 0 1 0 2 】

本明細書の記載に従った抗体は特に、PGCおよびES細胞やEG細胞など他の多能性細胞の検出用に示す。したがって、これらは、標識など効果タンパク質を含む改変した抗体にすることができる。抗体のin vivoまたはin vitro分布のイメージングを可能にする標識が特に好ましい。このような標識は、胚または細胞の塊内で容易に可視化できる放射性標識または金属粒子など放射線不透過性標識であってよい。さらに、これらは蛍光標識または組織試料上で可視化できる他の標識であってよい。

【 0 1 0 3 】

組換えDNA技術を使用して、本明細書に記載のように抗体を改良することができる。このように、診断用途または治療用途で、抗体の免疫原性を低下させるためにキメラ抗体を構築することができる。さらに、CDR移植(ヨーロッパ特許出願第0239400号(Winter)参照)および任意選択でフレームワーク改変(ヨーロッパ特許出願第0239400)で抗体をヒト化することによって、免疫原性を最小限にすることができる。

【 0 1 0 4 】

抗体は、動物血清から得るか、あるいは、モノクローナル抗体またはその断片の場合は細胞培養物内で産生させることができる。組換えDNA技術を使用して、細菌または好ましくは哺乳動物細胞培養物内で、確立した手順に従って抗体を産生させることができる。選択した細胞培養システムは、好ましくは抗体産物を分泌する。

【 0 1 0 5 】

10

20

30

40

50

したがって、本発明者らは、前記抗体タンパク質をコードする第2 DNA配列に正しい読み枠で連結されたシグナルペプチドをコードする第1 DNA配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現カセットを含むハイブリッドベクターを用いて形質転換させた宿主、たとえばE.coliや哺乳動物細胞を培養すること、および前記タンパク質を単離することを含む、抗体を産生させる方法を開示する。

【0106】

ハイブリドーマ細胞または哺乳動物宿主細胞のin vitro増殖は、たとえば、ウシ胎児血清など哺乳動物血清、または微量元素や、正常マウス腹腔浸出細胞など支持細胞、脾臓細胞、骨髓マクロファージ、2-アミノエタノール、インスリン、トランスフェリン、低密度リポタンパク質、オレイン酸など増殖維持サプリメントを任意選択で補充した、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)やRPMI 1640培地など通常の標準培養基である適切な培養基中で実施する。細菌細胞や酵母菌細胞である宿主細胞の増殖も同様に、当分野で周知の適切な培養基、たとえば、細菌は培地LB、NZCYM、NZYM、NZM、Terrific Broth、SOB、SOC、2×YT、M9最少培地、酵母菌は培地YPD、YEPD、最少培地、完全最少ドロップアウト培地で行う。

10

【0107】

In vitroの産生は、比較的高純度な抗体調製物を与え、スケールアップにより大量の所望の抗体を与える。細菌細胞、酵母菌細胞、哺乳動物細胞の培養の技術は当分野で周知であり、均一懸濁培養、たとえばエアリフト反応器中または連続攪拌反応器中で、あるいは固定化または包括細胞培養、たとえば中空繊維中、マイクロカプセル中、アガロースマイクロビーズ上、またはセラミックカートリッジ中を含める。

20

【0108】

大量の所望の抗体を、哺乳動物細胞をin vivoで増殖することで得ることもできる。このために、所望の抗体を産生しているハイブリドーマ細胞を組織適合性哺乳動物に注入して、抗体産生腫瘍の成長を引き起こさせる。任意選択で、注入前に動物を炭化水素、特にプリスタン(テトラメチル-ペンタデカン)など鉱物油で準備刺激する。1から3週間後、これら哺乳動物の体液から抗体を単離する。たとえば、適切なミエローマ細胞とBalb/cマウス由来の抗体産生脾臓細胞との融合によって得られるハイブリドーマ細胞、または所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞系Sp2/0由来の形質移入細胞を、任意選択でプリスタンで前処理したBalb/cマウスに腹腔内注入し、1から2週間後、動物から腹水液を採取する。

30

【0109】

前述のおよび他の技術は、たとえばKohlerおよびMilstein、1975、Nature、256:495-497;米国特許第4,376,110号;HarlowおよびLane、「Antibodies:a Laboratory Manual」、1988、Cold Spring Harborに記載されており、本明細書に参照により組み込む。組換え抗体分子の調製技術も上記の参照文献に記載されており、また、たとえばヨーロッパ特許第0623679号、ヨーロッパ特許第0368684号、およびヨーロッパ特許第0436597号にも記載されており、これらを参照により本明細書に組み込む。

【0110】

細胞培養上清から所望の抗体を、優先的にはPGCまたはES細胞やEG細胞など他の多能性細胞の免疫蛍光染色によって、免疫プロットによって、サンドイッチアッセイやドットプロットアッセイなど酵素免疫アッセイによって、または放射性免疫アッセイによってスクリーニングする。

40

【0111】

抗体の単離には、培養物上清または腹水液中の免疫グロブリンを、たとえば硫酸アンモニウムを用いた沈殿、ポリエチレングリコールなど吸湿性物質に対する透析、選択的膜での濾過などによって、濃縮することができる。必要かつ/または所望する場合は、抗体を従来のクロマトグラフィー方法、たとえばゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAE-セルロースおよび/または(免疫)アフィニティークロマトグラフィー、たとえばGCR1やGCR2またはその断片あるいはタンパク質-Aを用いたアフィニティークロマトグラフィーに

50

よって精製することができる。

【0112】

モノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマ細胞も提供する。好ましいハイブリドーマ細胞は遺伝的に安定であり、所望の特異性のモノクローナル抗体を分泌し、超低凍結培養物から解凍および再クロニングすることによって活性化させることができる。

【0113】

適切な哺乳動物たとえばBalb/cマウスを、1つまたは複数のGCR1またはGCR2ポリペプチドあるいはその抗原性断片で免疫化することを特徴とする、GCR1および/またはGCR2に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマ細胞系の調製方法が、さらに含まれている。免疫化した哺乳動物の抗体産生細胞を適切なミエローマ細胞系の細胞と融合させ、融合で得られたハイブリッド細胞をクロニングし、所望の抗体を分泌している細胞クローンを選択する。たとえば、GCR1および/またはGCR2を用いて免疫化したBalb/cマウスの脾臓細胞をミエローマ細胞系PAIまたはミエローマ細胞系Sp2/0-Ag14の細胞と融合させ、ハイブリッド細胞から所望の抗体の分泌をスクリーニングし、陽性ハイブリドーマ細胞をクロニングする。

【0114】

GCR1および/またはGCR2を発現している 10^6 個および 10^7 個と 10^8 個の間の細胞と適切なアジュバントとを数回、たとえば4から6回、数カ月、たとえば2から4カ月の間に皮下注入または腹腔内注入することによってBalb/cマウスを免疫化すること、および、最終注入から2から4日後に免疫化したマウスから脾臓細胞を採取して、融合促進剤、好ましくはポリエチレングリコールの存在下でミエローマ細胞系PAIと融合させることを特徴とする、ハイブリドーマ細胞系の調製方法が好ましい。好ましくは、ミエローマ細胞を、3から20倍過剰の免疫化したマウス由来の脾臓細胞と、約30%から約50%の分子量約4000のポリエチレングリコールを含む溶液中で融合させる。融合後、本明細書に既に記載した適切な培養基中で細胞を増殖させ、正常なミエローマ細胞が所望のハイブリドーマ細胞を過増殖するのを防ぐために選択培地、たとえばHAT培地を定期的な間隔で補充する。

【0115】

本明細書に既に記載したGCR1および/またはGCR2に対する抗体の重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインをコードする挿入物を含む組換えDNAも、開示している。定義により、このようなDNAには、一本鎖コードDNA(coding DNA)、前記コードDNAおよびそれに相補的なDNAからなる二本鎖DNA、またはこれらの相補的な(一本鎖)DNA自体が含まれる。

【0116】

さらに、GCR1および/またはGCR2に対する抗体の重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインをコードするDNAは、重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメイン、あるいはその変異体をコードする標準DNA配列を有する、酵素的または化学的に合成したDNAであってよい。標準DNAの変異体とは、上で言及した抗体の重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインであって、アミノ酸の1つまたは複数欠失している、あるいは1つまたは複数の他のアミノ酸と交換されているドメインをコードするDNAである。好ましくは、前記改変は、抗体の重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインのCDRの外側にある。このような変異体DNAはまた、1つまたは複数のヌクレオチドが他のヌクレオチドで置換されているが新しいコドンも同じアミノ酸をコードしている、沈黙変異体であることを意図している。このような変異配列は、縮重配列でもある。縮重配列は、無制限数のヌクレオチドが他のヌクレオチドで置換されても元来コードされていたアミノ酸配列に変化がもたらされないように、遺伝コードの意味の範囲内で縮重している。このような縮重配列は、重鎖マウス可変ドメインおよび/または軽鎖マウス可変ドメインの最適な発現を得るために特定の宿主、特にE.coliが好む、異なった制限部位および/または特定のコドンの頻度のために、有用な可能性がある。

【0117】

変異体という用語は、当分野で周知の方法に従って標準DNAをin vitroで突然変異させ

10

20

30

40

50

ること得るDNA変異体を含むことを意図する。

【0118】

完全な四量体免疫グロブリン分子の構築およびキメラ抗体の発現のために、重鎖および軽鎖可変ドメインをコードする組換えDNA挿入物を、重鎖および軽鎖定常ドメインをコードする対応したDNAと融合させ、その後、たとえばハイブリッドベクターに組み込ませた後、適切な宿主細胞内に移す。

【0119】

ヒト定常ドメインg、たとえば 1、 2、 3、 4、好ましくは 1または 4と融合された、GCR1および/またはGCR2に対する抗体の重鎖マウス可変ドメインをコードする挿入物を含む組換えDNAも開示している。同様に、本発明は、ヒト定常ドメイン または 、好ましくは と融合された、GCR1および/またはGCR2に対する抗体の軽鎖マウス可変ドメインをコードする挿入物を含む組換えDNAに関する。

10

【0120】

別の実施形態では、本発明者らは、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインがスペーサー基によって結合されており、任意選択で、宿主細胞内での抗体のプロセッシングを促進するシグナル配列、および/または抗体の精製を容易にするペプチドをコードするDNA、および/または切断部位、および/またはペプチドスペーサー、および/または効果分子を含む組換えポリペプチドをコードする組換えDNAを開示する。

【0121】

効果分子をコードするDNAは、診断用途または治療用途に有用な効果分子をコードするDNAであることが意図される。したがって、毒素または酵素、特にプロドラッグの活性化を触媒することができる酵素であるエフェクタ分子が、特に示される。このようなエフェクタ分子をコードするDNAは、酵素あるいは毒素またはその変異体をコードする自然に存在する配列を有し、当分野で周知の方法によって調製することができる。

20

【0122】

抗ペプチドStellaおよびFragilis抗体

StellaおよびFragilisペプチド配列に対する抗ペプチド抗体を産生させる。選択した配列は以下のとおりである。

GCR1(Fragilis):ASGGQPPNYERIKEEYEおよびRDRKMVGDTVGAQAYA

GCR2(Stella):MEEPSEKVDPMKDPETおよびCHYQRWDPSENAKIGKN

30

【0123】

抗体は、たとえばHarlowおよびLane(上記)に記載のように、ウサギに注入すること、および他の従来方法によって産生させることができる。

【0124】

抗体は、Elisaアッセイおよびウエスタンブロットによって確認し、実施例に記載のように免疫染色で使用する。

【0125】

細胞集団内の多能性細胞の検出

本明細書に記載のポリヌクレオチドプローブまたは抗体を、細胞集団内の始原生殖細胞(PGC)など多能性細胞、胚性幹(ES)細胞や胚性生殖(EG)細胞など幹細胞の検出に使用することができる。本明細書で使用する「細胞集団」とは、1つまたは複数のPGC、ES細胞、またはEG細胞を含む、細胞の任意の集まりである。好ましくは、細胞の集まりはPGCのみで構成されず、少なくとも1種の別のタイプの細胞を含む。

40

【0126】

細胞集団は胚および胚組織を含むが、前述の任意のもの由来の成体細胞ならびに培養物および細胞調製物内で増殖させた組織も含む。

【0127】

本明細書に記載のポリヌクレオチドを、核酸ハイブリダイゼーション技術によって、PGCまたはES細胞やEG細胞など他の多能性細胞内のGCR1およびGCR2の転写物を検出するのに使用することができる。このような技術には、GCR1および/またはGCR2転写物にハイブリ

50

サイズさせて転写物を増幅するのにプライマーを使用し、検出可能なシグナルをもたらすPCR、ならびに、GCR1および/またはGCR2転写物内の独特な配列に特異的であるプローブを標的細胞内の転写物を検出するのに使用する標識プローブのハイブリダイゼーションが含まれる。

【 0 1 2 8 】

本明細書に既に言及したように、プローブを放射性、放射能不透過性、蛍光、または他の標識で、当分野で周知のように標識することができる。

【 0 1 2 9 】

抗体を、GCR1および/またはGCR2を検出するのに使用することもできる。特にGCR1は、抗GCR1抗体を標的にして細胞表面で検出することができる細胞外ドメインを有する。あるいは、細胞内のGCR1および/またはGCR2を検出するために細胞内scFvを使用することができる。

10

【 0 1 3 0 】

免疫染色およびFACS技術を特に示す。適切なフルオロフォアは当分野で周知であり、化学的フルオロフォアおよびGFPやその変異体(国際公開公報97/28261号参照)など蛍光ポリペプチドが含まれる。化学的フルオロフォアは、免疫グロブリン分子の合成中に、これに対する結合部位を免疫グロブリン分子内に組み入れることによって、付着させることができる。

【 0 1 3 1 】

好ましくは、フルオロフォアは、有利にGFPまたはその変異体である蛍光タンパク質である。GFPおよびその変異体は、当分野で周知の方法に従って、免疫グロブリンまたは標的分子と共に、融合ポリペプチドとして一緒に発現させることによって合成することができる。たとえば、所望のGFPと免疫グロブリンまたは標的との枠内融合として転写ユニットを構築し、PCRクローニングおよびライゲーション技術を使用して上記のようにベクター内に挿入することができる

20

【 0 1 3 2 】

シグナルを生成することができる任意の標識で抗体を標識することができる。シグナルは、検出可能な遺伝子産物の発現誘導など任意の検出可能なシグナルにし得る。検出可能な遺伝子産物の例には、ルシフェラーゼやGFPなど生物発光ポリペプチド、 β -ガラクトシダーゼやCATなど特定のアッセイで検出可能なポリペプチド、HIS3など代謝に必要な酵素やG418など抗生物質耐性遺伝子などの宿主細胞の増殖の特徴を変調させるポリペプチドが含まれる。好ましい態様では、このシグナルは細胞表面で検出可能である。たとえば、このシグナルは、細胞外から検出可能であり、FACSまたは他の光学選別技術による細胞の選別を可能にする、発光または蛍光シグナルにし得る。

30

【 0 1 3 3 】

蛍光標識した抗体の光学検出に基づいた光学免疫センサー技術の使用が好ましい。免疫センサーとは、相補種の結合を検出するシグナルトランスデューサーに結合された抗原または抗体種を含む生化学的検出器である(Rabbany他、1994、Crit Rev Biomed Eng、22:307-346;Morgan他、1996、Clin Chem、42:193-209)。このような相補種には、抗原Zif268および抗Zif268抗体が含まれる。免疫センサーは、血清や全血液など複合試料中に存在する抗体、抗原、またはハプテンの量の定量測定を行う(Robinson、1991、Biosens Bioelectron、6:183-191)。免疫センサーの感度は、スピードと正確さが要される状況に理想的である(Rabbany他、1994、Crit Rev Biomed Eng、22:307-346)。

40

【 0 1 3 4 】

免疫センサーで利用する検出技術には、免疫相互作用の電気化学的、圧電氣的、光学的な検出が含まれる(Ghindilis他、1998、Biosens Bioelectron、1:113-131)。間接的な免疫センサーでは、結合の後にたとえば蛍光または発光によって検出する、個別の標識した種を使用する(Morgan他、1996、Clin Chem、42:193-209)。直接的な免疫センサーは、電位差、電流、抵抗、質量、熱、または光学特性の変化によって結合を検出する(Morgan他、1996、Clin Chem、42:193-209)。間接的な免疫センサーは、非特異的結合のために直面

50

する問題がより少ない(Attridge他、1991、Biosens Bioelecton、6:201-214;Morgan他、1996、Clin Chem、42:193-209)。

【 0 1 3 5 】

発明のさらなる態様

本発明者らは、配列番号1と少なくとも90%相同な核酸分子および配列番号3と少なくとも75%相同な核酸分子を提供する。

【 0 1 3 6 】

本発明者らは、配列番号1または配列番号3、配列番号5から9のいずれか、あるいはそれと少なくとも90%相同である配列からのヌクレオチドの連続ストレッチを含むポリヌクレオチドを開示する。有利には、この連続ヌクレオチドのストレッチは50ヌクレオチド長、好ましくは40、35、30、25、20、15または10ヌクレオチド長である。

10

【 0 1 3 7 】

遺伝子GCR1およびGCR2は新規なポリペプチドをコードしており、その配列を配列番号2および配列番号4に示す。したがって、本発明者らは、ここに記載の核酸にコードされるポリペプチドを開示する。好ましくは、ポリペプチドは配列番号2または配列番号4に示す配列を有する。

【 0 1 3 8 】

さらに、本発明者らは、(a)PGCまたはES細胞やEG細胞など他の多能性細胞を含む細胞集団を提供するステップと、(b)そこから1つまたは複数のPGCまたはES細胞やEG細胞など他の多能性細胞を単離して単一細胞の単離体を提供するステップと、(c)単一細胞内に存在する転写された核酸を増幅するステップと、(d)PGCまたはES細胞やEG細胞など他の多能性細胞内に存在するが体細胞内には存在しない転写物を同定するためにサブトラクティブハイブリダイゼーションスクリーンを実施するステップと、(e)ステップ(d)で同定した1つまたは複数の転写物を用いて核酸ライブラリをプローブし、特異的に発現される1つまたは複数の遺伝子をクローニングするステップとを含む、PGCまたはES細胞やEG細胞など他の多能性細胞内で特異的に発現される遺伝子を単離することができる方法を提供する。

20

【 0 1 3 9 】

ここで、本発明のさらなる態様を、番号付けした段落で示す。本発明が以下の態様を包含することを理解されたい。

【 0 1 4 0 】

段落1。配列番号1に示した配列と少なくとも90%の相同性を有する核酸。

30

【 0 1 4 1 】

段落2。配列番号3に示した配列と少なくとも75%の相同性を有する核酸。

【 0 1 4 2 】

段落3。段落1または段落2の核酸の25個の連続ヌクレオチド配列を含む核酸。

【 0 1 4 3 】

段落4。段落1または段落2の核酸の15個の連続ヌクレオチド配列を含む核酸。

【 0 1 4 4 】

段落5。前記段落のいずれかに記載の核酸配列の相補体。

【 0 1 4 5 】

段落6。1つまたは複数のヌクレオチドの置換を含むが、遺伝コードの縮重のためにこのような置換によって前記核酸のコード特異性が改変されない、段落1から5のいずれかに記載の核酸。

40

【 0 1 4 6 】

段落7。前記段落のいずれかに記載の核酸にコードされるポリペプチド。

【 0 1 4 7 】

段落8。段落1または段落2に記載の核酸配列またはその相同体の発現を検出することを、細胞集団内の始原生殖細胞を同定する方法。

【 0 1 4 8 】

段落9。GCR1および/またはGCR2に特異的な5'および3'プライマーを使用して推定上のPG

50

Cから核酸を増幅するステップと、その結果生成された増幅した核酸を検出するステップとを含む、段落8に記載の方法。

【0149】

段落10。核酸配列の発現がin situハイブリダイゼーションによって検出される、段落8に記載の方法。

【0150】

段落11。核酸配列の発現が、それにコードされるタンパク質産物の検出によって決定される、段落8に記載の方法。

【0151】

段落12。タンパク質産物を免疫染色によって検出する段落11に記載の方法。

10

【0152】

段落13。段落7に記載のポリペプチドに特異的な抗体。

【0153】

段落14。GCR1の細胞外ドメインに特異的な、段落13に記載の抗体。

【0154】

段落15。細胞集団内のPGCを同定するための、段落13または段落14に記載の抗体の使用。

【0155】

段落16。段落8から12のいずれかに記載の方法によって同定したPGC。

【0156】

20

段落17。(a)PGCを含む細胞集団を提供するステップと、(b)そこから1つまたは複数のPGCを単離して単一細胞のPGC単離体を提供するステップと、(c)単一のPGC内に存在する転写された核酸を増幅するステップと、(d)PGC内に存在するが体細胞内には存在しない転写物を同定するためにサブトラクティブハイブリダイゼーションスクリーンを実施するステップと、(e)ステップ(d)で同定した1つまたは複数の転写物を用いて核酸ライブラリをプローブし、PGC内で特異的に発現される1つまたは複数の遺伝子をクローニングするステップとを含む、PGC内で特異的に発現される遺伝子を単離する方法。

【0157】

実施例

実施例 1

30

単一細胞cDNAディファレンシャルスクリーニングによる、始原生殖細胞(PGC)の初期集団に特異的な遺伝子の同定

生殖細胞系の特異化に關与する遺伝子を同定する単一細胞の分析方法が開発されており、これは、始原生殖細胞(PGC)の創始集団の確立をもたらす。PGCの系譜特異化は、体細胞内では発現されない独特な遺伝子の組の発現に伴う。

【0158】

遺伝子を同定する方法は主に、PGCを含む7.25日齢のマウス胚性断片由来の単一細胞からのライブラリのディファレンシャルスクリーニングに基づいている。単一細胞cDNAのディファレンシャルスクリーンはBradyおよびIscove、1993によって最初に記載されており、その後Cathaline DulacおよびRichard Axelによって改変され、ラット由来のフェロモン受容体遺伝子の同定に成功した(Dulac, CおよびAxel, 1995)。記載した軽微な改変を用いて、Axelのグループの方法を利用する。

40

【0159】

PGCの最も初期集団を保有する胚性断片由来の単一細胞cDNAの構築

マウス内で、PGCの最も初期集団は、妊娠7.25日目に新生尿膜基部に、約40個の細胞のアルカリホスファターゼ陽性クラスターからなると報告されている(Ginsburg, M., Snow, M. H. L., およびMcLaren, A., 1990)。同系交配した129SvおよびC57BL/6系内のPGCクラスターの正確な位置は、全載アルカリホスファターゼ染色およびメチレンブルーのどちらでも染色した準薄切片を使用した顕微鏡観察によって決定する。PGCクラスターを検出できる最も初期段階は後期ストリーク(Streak)段階であり(Downs, K. M. およびDavies, T., 1993)

50

、このとき尿膜芽(Bud)が現れる蓋上皮(epithelial lining)のすぐ下にはっきりと染色された細胞集団が見つかる。この領域は、胚外組織と胚性組織の境界、始原ストリークに最も近位な部分のすぐ後方で上方にある。このクラスターは、少なくとも初期/中期芽段階までこの場所に持続される。同系交配した129Sv系では、PGCクラスターが含む細胞数は僅かに多く、C57BL/6系に比べてより密接に詰まっていることが分かった。得られる初期PGCの回収率がより高いので、129Sv系をその後の実験に使用する。

【0160】

E7.5に129Sv胚を、DMEMおよび25mMのHEPESで緩衝した10%のFCS中、室温で単離し、各胚の発生段階を解剖顕微鏡の下で決定した。正確な発生段階は、同一腹内の胚でも相当異なる可能性がある。芽なしの段階または初期芽(尿膜)段階にある胚を選択してさらに解体し、これは、解剖顕微鏡の下で見られるPGCを含む領域を同定することの容易さによってある程度規定される。PGCクラスターを含むと予想される断片を、固体ガラス針によって非常に正確に切り出す。37[°]で10分間、0.25%トリプシン-1mM EGTA/PBSでこの領域を処理し、続いてマウスピペットで穏やかにピペット操作することで、この領域を単一細胞に解離する。解体した断片は通常250から300個の細胞を含んでいた。この穏やかな手順を用いた細胞分散手順により、内臓中胚葉層が無傷の細胞シートのまま残された。

【0161】

本発明者らは、マウスピペットで単一細胞を細胞懸濁液から無作為に選び、個々の単一細胞を(空気泡を生じさせるのを避けて)4 μ lの氷冷細胞溶解緩衝液(50mMのトリス-HCl pH 8.3、75mMのKCl、3mMのMgCl₂、0.5%のNP-40、80ng/mlのpd(T)₂₄、5 μ g/mlのprime RNase阻害剤、324U/mlのRNA guard、それぞれ10mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTPを含む)を含む薄壁PCRチューブに入れた。単一細胞が保有する培地の体積は0.5 μ l未満である。チューブを手短に遠心分離して、細胞が確かに溶解緩衝液中にあることを確認する。それぞれの個別の実験で、本発明者らは合計19個の単一細胞を選び、1つのチューブをPCR増幅手順の陰性対照として細胞なしのままにした。チューブに収集した細胞すべてを、その後の手順を開始する前に氷上に置く。

【0162】

チューブを65[°]で1分間インキュベートすることによって細胞を溶解し、オリゴdTをRNAにアニーリングさせるために室温で1から2分間置いた。第1鎖cDNAの合成は、50Uのモロニー Maus 白血病ウイルス(MMLV)および0.5Uのトリ骨髄芽球症ウイルス(AMV)逆転写酵素を加えることによって開始させ、次いで37[°]で15分間インキュベートした。65[°]、10分間で逆転写酵素を不活性化させる。この逆転写反応は15分間に限定されており、これにより、C末端から500塩基~1000塩基長の比較的均一な大きさのcDNAの合成が可能になる。これは、その後のPCR増幅がかなり表現的(representative)になることを可能にする。

【0163】

次に、合成した第1鎖cDNAの5'(5 prime)末端にポリAテールを付加するために、4.5 μ lの2 \times テリング緩衝液(200mMのカコジル酸カリウムpH7.2、4mMのCoCl₂、0.4mMのDTT、200mMのdATP、10Uの末端転移酵素を含む)を反応物に加え、次いで37[°]で15分間インキュベートする。試料を65[°]で10分間、熱で不活性化させる。この時点で、反応物には、C末端にポリTテールを有しN末端にポリAストレッチを有する合成したcDNAが含まれ、特異的プライマーを使用したPCRによる増幅の準備ができた。

【0164】

10mMのトリス-HCl pH8.3、50mMのKCl、2.5mMのMgCl₂、100 μ g/mlのウシ血清アルブミン、0.05%のTriton-X100、1mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP、10UのTaqポリメラーゼ、5 μ gのAL1プライマーからなる溶液を用いて、各チューブの内容量を100 μ lにする。AL1の配列は、ATT GGA TCC AGG CCG CTC TGG ACA AAA TAT GAA TCC (T)₂₄である。PCR増幅は以下のスケジュールに従って実施する。すなわち、94[°]で1分間、42[°]で2分間、72[°]で6分間で各サイクル10秒間ずつ延長して、25サイクル行う。5ユニットの追加のTaqポリメラーゼを加えて、さらに25サイクル、延長時間なしで同じプログラムを実施する。この時点で、各チューブが単一細胞由来の増幅したcDNA産物を含む。溶液のタンパク質含量をフェノール/

クロロホルム処理によって抽出し、増幅したcDNAをエタノールで沈殿させ、最終的に100 μ lのTE pH8.0に懸濁させる。5 μ lのcDNA溶液を1.5%アガロースゲル上に流して増幅が成功したかどうかを確認する。ほとんどの試料で、主に500bpから1200bpの範囲の非常に強い「スミア」バンドが現れ、単一細胞cDNAは効率的に増幅されたことが示された。増幅が成功した試料のみを、その後の「細胞種類分け」分析に使用する。

【0165】

実施例2

マーカー遺伝子の発現の検査によるPGCの同定

理論的に切除される胚の破片には、尿膜中胚葉、PGC、PGCを囲む胚外中胚葉の、3つの主な成分が含まれる。これらの試料からPGC起源の単一細胞cDNAを同定するため、様々な細胞種内のこの領域で発現または抑制されることで知られている4つのマーカー遺伝子(BMP4、TNAP、Hoxb1、Oct4)の発現を検査することによって、構築したcDNAの陽性および陰性選択を実施する。

【0166】

芽なし/初期芽段階では、BMP4は新生尿膜中および新生羊膜、漿膜、内臓卵黄囊の中胚葉成分中で発現されると報告されている(Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A.J., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V.E., Korving, J.P.W.F.M., およびHogan, B.L.M., 1999)。BMP4発現の境界は非常にはっきりしており、羊膜中胚葉につながっている蓋上皮の下の推定PGCが決定される中胚葉領域で、発現は完全に排除されている。したがって、BMP4は選択の陰性マーカーとして使用する。BMP4のC末端部分を増幅するためにプライマーの対を設計する(5':GCC ATA CCT TGA CCC GCA GAA G, 3':AAA TGG CAC TCA GTT CAG TGG G)。PCR増幅は、0.5 μ lのcDNA溶液を鋳型として使用し、以下のスケジュールに従って実施する。すなわち、95 で1分間、55 で1分間、72 で1分間を20サイクルで行う。試験した83個の試料のうち、57個の試料が予想した大きさのバンドを示し、これら単一細胞内でのBMP4の発現が示された。これらの試料は尿膜中胚葉起源のものと考えられ、したがって、PGC起源の細胞を表現する候補から除外する。

【0167】

続いて、長い間PGCの初期マーカーとして使用されてきた組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNAP)の発現(Ginsburg, M., Snow, M.H.L., およびMcLaren, A., 1990)を検査する。プライマーの対を設計し(5':CCC AAA GCA CCT TAT TTT TCT ACC, 3':TTG GCG AGT CTC TGC AAT TGG)、上と同じPCR反応を実施する。26個の試料のうち、22個の試料がTNAPに陽性であると判断した。切片にした胚のアルカリホスファターゼ染色から、PGCを囲む体細胞もある程度の量のTNAPを発現するが、その発現レベルはPGCより少し低い。したがって、これら22個の陽性試料のうちには、PGCになる運命の細胞のみならず、依然として体細胞になる運命の細胞もあるはずである。

【0168】

全能性PGCで発現されるが体細胞では発現されないことで知られている遺伝子の1つはOct4である(Yoem, Y.II., Fuhrmann, G., Ovitt, C.E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hubner, K., およびScholer, H.R., 1996)。この段階でPGCを体細胞から区別するためのマーカーとしてOct4が使用できる可能性を調査するために、Oct4発現を22個の試料でPCRによって確認した(5':CAC TCT ACT CAG TCC CTT TTC, 3':TGT GTC CCA GTC TTT ATT TAA G)。22個の試料すべてが比較可能なレベルでOct4を発現し、この段階では体細胞も依然として活発にOct4のRNAを転写していることが示された。

【0169】

TNAPの発現量を、22個の試料でサザンプロット分析によって定量した(逆ノーザンプロット分析)。単一ES細胞cDNAを増幅することで確認される、単一細胞法のかなり表現的な増幅が与えられれば、サザンプロットにより最初の単一細胞で発現される遺伝子の量の半定量的測定が可能になるが、細胞のアイデンティティの完全な指標としては役立たない。しかし、このTNAP分析の結果、22個の試料中10個が、同じレベルの比較的強いバンドを示したが、残りの12個の試料はより弱いシグナルを示した。これらの結果は、これら22個の

10

20

30

40

50

試料を少なくとも2つのグループ、すなわちより強いTNAP発現(したがって推定上のPGC由来)のグループと、より弱いTNAPのグループに分けることができることを示す。

【0170】

PGCを囲む体細胞がHoxb1を発現し始め、PGCが発現しない可能性(Kirstie Lawson博士からの個人的な情報)も調査した。プライマーの対を設計し(5':AAC TCA TCA GAG GTC GAA G GA、3':CGG TGC TAT TGT AAG GTC TGC)、上と同じPCR反応を実施した。試験した22個の試料のうち、12個が陽性であり、より重要なことに、これら12個の試料は、サザンプロット分析でより弱いTNAPシグナルを示すものと完全に一致した。

【0171】

これらの結果すべてを考慮して、83個の試料のうち、Oct4(+)、TNAP(++)、BMP4(-)、およびHoxb1(-)である10個の試料がPGC起源であると結論付けられた。PGCの創始集団の数が40個であり、破片中の細胞の数が250から300個であったことを考慮すると、この比(10/83)は妥当である。

【0172】

実施例3

単一細胞cDNAライブラリのディファレンシャルスクリーニング

cDNAの増幅効率はチューブ毎に異なるので、ライブラリの構築のためには最も効率的に増幅されたcDNAの試料を選択することが非常に重要である。10個のPGC候補試料で、6つの異なる遺伝子(リボソームタンパク質S12、中間径フィラメントタンパク質ビメンチン、チュープリン-5、アクチン、Oct4、E-カドヘリン)の増幅をサザンプロット分析によって調査した。これら6つの遺伝子すべての全体的な増幅プロファイルから判断して、3つのcDNA調整物をライブラリの構築のために選択する。

【0173】

最大量の二本鎖cDNAを得るために、上に記載のPCR緩衝液100 μ l(1 μ lのAmplitaqを含む)中、5 μ lの細胞cDNAを用いて以下のスケジュールに従って伸長ステップを実施する。すなわち、94 で5分間、42 で5分間、72 で30分間で行う。この溶液をフェノール/クロロホルム処理によって抽出し、増幅したcDNAをエタノールで沈殿させ、TEに懸濁させ、EcoRIを用いて完全に消化した。PCRプライマーおよび過剰量のdNTPをQIAGEN PCR Purification Kitによって取り除き、精製した全cDNAを2%の低融点アガロースゲル上に流した。500 bpより大きなcDNAを切り出し、QIAGEN Gel Purification Kitで精製した。精製したcDNAsをエタノールで沈殿させ、TEに懸濁させ、ZAP IIベクターのアーム内にライゲーションさせた。ライゲーションさせたベクターをパッケージし、力価を測定し(titered)、20個の溶菌斑からのT3およびT7プライマーで挿入物を増幅することによってライゲーションが成功したクローンの比をモニターした。95%を超えるファージが挿入物を含んでいることが分かった。

【0174】

5000個の溶菌斑をスクリーニングすることで3つの遺伝子、リボソームタンパク質S12、チュープリン-5、Oct4の表現を定量し、3つ(S12 0.62%、チュープリン0.4%、Oct4 0.5%)のうち最高品質のものライブラリをディファレンシャルスクリーニングに使用した。PGCプローブの比較パートナーとして、最も効率的に増幅される周囲体細胞cDNAの1つ(Oct4(+)、TNAP(+/-)、BMP(-)、Hoxb1(+))を同様のサザンプロット分析によって選ぶ。

【0175】

このライブラリを、15cmの皿に1000個の溶菌斑の密度で植えて大きな溶菌斑(直径2mm)を得、AmershamのHybond N+フィルターを用いて2つの複製写し(duplicate lift)を取った。1%ウシ血清アルブミンおよび4%SDSを含む0.5Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)中、65でフィルターをプレハイブリダイズした。本発明者らは、冷dCTPを存在させずに100 μ Ciの新しく入手した³²PdCTPを用いて、1 μ lの最初の細胞cDNAをAL1プライマーと共に50 μ lの全反応物に入れて10サイクル再増幅することによって細胞cDNAプローブを調製し、その後Amersham Nick(商標)Spin Columnを使用して精製した。フィルターを少なくとも16時間 1.0×10^7 cpm/mlでハイブリダイズさせた(第1のフィルターを体細胞プローブとハイブリダ

10

20

30

40

50

イズさせ、第2のフィルターをPGCプローブとハイブリダイズさせた)。ハイブリダイゼーション後、フィルターを65、0.5×SSC、0.5%SDSで3回洗浄し、適切なシグナルが得られるまでX線フィルムに暴露させた(通常1から2日間)。

【0176】

2つの複製フィルターの陽性溶菌斑を非常に注意深く比較する。スクリーニングした5000個の溶菌斑のうち、示差的に発現された遺伝子を表現する候補として280個を選ぶ。280個の溶菌斑すべての挿入物を、T3およびT7プライマーで増幅して1.5%アガロースゲル上に流し、ダブルサンドイッチサザンブロットを行う。スクリーニングと同じ条件を使用して、各膜をそれぞれPGCプローブと体細胞プローブとハイブリダイズさせる。280個のうち38個のクローンが遺伝子の示差的発現として選択される。次に、これらのクローンを第2のPGCプローブおよび体細胞cDNAプローブとハイブリダイズさせ、その結果、38個のうち20個のクローンがいずれのPGC cDNAでも共通であったが、いずれの体細胞cDNAでも含まれないまたはより少量であった。20個のクローンすべての配列を決定した。

【0177】

PGCの初期集団に高度に特異的な遺伝子

20個のクローンは11個の異なる遺伝子を表現する(2つのクローンが2回現れ、1つのクローンが3回現れ、1つのクローンが6回現れる)。さらにストリンジェントに発現の特異性を確認するために、これら11個のクローンのためにプライマーの対を設計し、PCRによってその発現を10個の異なる単一PGC候補cDNAおよび10個の異なる単一体細胞cDNA中で確認する。このうち2個がPGC cDNAに高度に特異的な発現を示す。

【0178】

第1の遺伝子GCR1(生殖細胞制限-1、Fragilis)は、予測分子量15.0kDの137アミノ酸のタンパク質をコードする。マウスFragilisのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図1に示す。

【0179】

EMBLプログラムPredictProteinで一番合うモデルでは、N末端とC末端のいずれもが外に位置する2つの膜貫通型ドメインが予測される。BLASP検索により、Fragilisがインターフェロン誘導可能タンパク質ファミリーの新規なメンバーであることが分かった。典型的なメンバーの1つであるヒト9-27(Leu-13抗原と同一)は、白血球および内皮細胞内でインターフェロンによって誘導可能であり、抗増殖性およびホモタイプ付着シグナルに關与する多量体の複合体の構成成分として細胞表面に位置する(Deblandre, 1995)。BLASTN検索により、胚と成体のいずれもからの様々な組織由来のEST内でFragilis配列が見つかることが分かり、これは、様々な発生学および細胞生物学の状況においてFragilisが共通の役割を果たすことを示唆する。データベースの検索により、未知機能のラットインターフェロン誘導可能タンパク質(sp: INIB RAT、pir: JC1241)との配列一致が明らかになった。本発明者らのスクリーン上にGCR1配列が6回現れ、これはPGC内の高発現レベルを示唆する。

【0180】

第2の遺伝子GCR2(Stella)は、18kDの150アミノ酸のタンパク質をコードする。マウスFragilisのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図2に示す。

【0181】

これは、既知のどのタンパク質とも配列相同性を有さず、いくつかの核移行共通配列を含み、強度に塩基性のpI(pI=9.67、塩基性残基の含有率=23.3%)であり、潜在的なDNA親和性が示唆される。さらに、潜在的な核外シグナルが同定され、Stellaが核と細胞質の間を往復する可能性が示唆された。BLASTN分析により、Stella配列は移植前の胚および生殖系(新生卵巣、メス12.5中腎や生殖腺など)ESTのみで見つかり、全能性細胞および多能性細胞内で主に発現されることが示唆される。興味深いことに、StellaはそのN末端内に、SAPモチーフとある程度の配列類似性を有する変調ドメインを含む。このモチーフは、染色体の組織化に關与する推定DNA結合ドメインである。さらに、SMARTプログラムにより、スプライシング因子のモチーフ様構造がC末端内に存在することがわかった。これらの発見は、Stellaが染色体の組織化およびRNAプロセッシングに關与している可能性を示唆する。

【 0 1 8 2 】

実施例 4

GCR1およびGCR2の発現をスクリーニングすることによるPGCの同定

BMP4、TNAP、Hoxb1、Oct4の分析によって実施例2でPGCを同定したが、いずれも、これらの遺伝子単一ではPGC状態のマーカーとして捉えることができなかった。しかし、GCR1およびGCR2はどちらも、このように使用することができる。

【 0 1 8 3 】

GCR1の発現を検査した。プライマーの対を設計し(5':CTACTCCGTGAAGTCTAGG、3':AATGAGTGTTACACCTGCGTG)、上と同じPCR反応を行った。GCR1の発現を生殖細胞の、反応能を有する細胞(competent cell)内で検出した。GCR1の発現を示しているこの細胞集団から、最終的なPGCを収集した。

10

【 0 1 8 4 】

GCR2の発現の境界は特によく定義されており、この発現は実質的にPGCに限定されている。したがって、GCR2はPGCの選択のための陽性マーカーとして使用される。GCR2のC末端部分を増幅するためにプライマーの対を設計する(5':GCCATTCAGATGTCTCTGCAC、3':CTCACA GCTTGAGGCTTCTAA)。実施例1のPGCから得たcDNA溶液0.5 μlを鋳型として用いて、以下のスケジュールに従ってPCR増幅を行った。すなわち、95 で1分間、55 で1分間、72 で1分間を20サイクルで行った。試験した83個の試料のうち、PGCから取ったものだけがGCR2の発現を示した。したがって、GCR2はPGC運命の陽性マーカーである。

【 0 1 8 5 】

多能性細胞を検出するために、GCR1およびGCR2に対する抗体を同様に使用することができる。好ましくは、GCR1に対する抗体は生殖細胞の、反応能を有する細胞を検出するのに使用し、GCR2に対する抗体はPGCを検出するのに使用する。

20

【 0 1 8 6 】

したがって、GCR1およびGCR2のいずれもが、PGCを肯定的に同定するのに使用できるPGC運命の陽性マーカーである。

【 0 1 8 7 】

ISHによるPGCの同定

2つの遺伝子のin vivo発現をin situハイブリダイゼーションで検査する。GCR1の発現は、E6.0からE6.5(プレストリーク段階)に原外胚葉全体で非常に弱く開始され、原外胚葉近位縁の数細胞層で強くなる。胚外の外胚葉で発現されるBMP4は、生殖細胞反応能の誘導およびGCR1の発現に重要なシグナル分子の1つである。インターフェロンなど他のシグナルがGCR1の誘導に関与している可能性が高い。初期/中期ストリーク段階で、発達中の原始ストリークの近位-後部末端で発現がより強くなり、後期ストリーク段階以降、この位置で非常に強くなる。発現は初期頭褶段階まで持続し、最終的には徐々に消える。E8.5の遊走PGCで発現は検出されない。

30

【 0 1 8 8 】

GCR2の発現は、中期/後期ストリーク段階で、発達中の原始ストリークの近位-後部末端で開始され、それ以降の段階、同じ位置で徐々に強くなる。この発現は特異的であり、ドットプロット様式で染色した個々の単一細胞は、PGCが細胞のクラスターとして分化し始めると考えられる領域で見られる。後期芽/初期頭褶段階では、最初のクラスターから遊走していると考えられる一部の細胞も、クラスター内の細胞と同様によく染まる。E8.5およびE9.5では、遊走PGCと考えられる細胞群が非常に特異的に染まる。

40

【 0 1 8 9 】

これらの結果から、GCR2がGCR1の後に開始されてPGC運命を固定するときに、GCR1は細胞系譜特異化および生殖細胞反応能のプロセス中、およびその後のPGCのプロセス中に上方制御される遺伝子であることが結論付けられる。

【 0 1 9 0 】

したがって、GCR1の発現は、細胞系譜特異化および/または生殖細胞反応能など多能性を検出する方法で検出することができる。同様に、GCR2の発現は、細胞運命の決定、たと

50

えば始原生殖細胞としての運命の決定を検出するために検出することができる。

【0191】

実施例5

生殖系の発達中におけるFragilisおよびStellaの発現

StellaおよびFragilisに対する抗体を使用して、初期胚中のこれら遺伝子の発現を検出する。これらの遺伝子それぞれが始原生殖細胞中で発現されることが分かった。具体的には、本発明者らは、生殖細胞の割当の時点でPGCの、反応能を有する細胞を標識する最初の遺伝子がFragilisであることを見出した。Stellaは系譜限定創始PGC内でのみ発現され、その後は生殖細胞系内で発現される。

【0192】

図3は、胚性幹(ES)細胞中のFragilisの発現を示す。

【0193】

Fragilisは、多能性ES細胞およびEG細胞内で発現される。PGCからEG細胞が誘導される間に、EG細胞でFragilisの発現が再出現することが分かった。これら細胞の特異化が完了したあとは、後期PGCはFragilis陰性である。

【0194】

図5は、E7.2マウス胚の全載in situハイブリダイゼーションによって検出されるFragilisの発現を示す。

【0195】

創始PGC集団がE7.25の胚内で分化する初発性尿膜の基部で、強いFragilis発現がある。Fragilisの発現はE7.5まで持続したが、E8.5の遊走PGC中では検出されなかった。Fragilisはまず、生殖細胞の、反応能を有する近位原外胚葉中で検出される。Fragilisの発現は、BMP4源である組織外胚の外胚葉組織と混合した場合に原外胚葉細胞中で誘導される。BM P4変異マウスではFragilisの発現はなく、これは、これらの胚中でPGCが存在しないことと矛盾していない(Lawson他、1999)。

【0196】

図4は、PGC中のStellaの発現を示す。

【0197】

PGC内の強いStellaの発現は、EG細胞内で下方制御される。ES細胞内でもStellaの発現レベルが低い。StellaおよびFragilisは、ES細胞およびEG細胞内でノーザンブロット分析によって検出することができる。Stellaはまず、E7.0の細胞系譜限定PGC特有クラスター内の単一細胞内で検出され、その後は遊走PGC内、次いでこれらが生殖腺に入るときに検出される。図7は、E9.0胚の、生殖腺への遊走プロセス中のPGCでのStella発現を示す。Stellaは、PGCの創始集団の決定的なマーカーとして現在知られている唯一の遺伝子である。

【0198】

図6は、E7.2マウス胚の全載in situハイブリダイゼーションによって検出したStellaの発現を示す。

【0199】

図8。単一細胞cDNAのPCR分析によって検出した、単一細胞のFragilisおよびStellaの発現を示す。Stellaの発現を示している単一細胞に比べて、Fragilisの発現を示している単一細胞の方が多くことに注目せよ。Fragilis発現が最も高いレベルである細胞のみがStellaを発現し、生殖細胞の運命を獲得することが分かった。Stellaを発現する細胞は、Hoxb1の発現を示さないことが分かった。より低いレベルのFragilisを発現してStellaを発現しない細胞は、体細胞となってHoxb1の発現を示す。PGCの創始集団も高レベルのTnapを示す。創始PGCおよび体細胞のどちらもがOct4、T(短尾)、およびFgf8の発現を示す。

【0200】

実施例6

個別細胞中のFragilisおよびStellaの発現

StellaおよびFragilisの細胞内局在化も決定した。Fragilisは、ゴルジ体の単一細胞質

10

20

30

40

50

スポット内のみならず原形質膜内にも局在化する。Stellaは推定核移行シグナルおよび核外移行シグナルを含み、細胞質と核のどちらにも局在化している。

【0201】

Fragilisは、ゴルジ体のみならずPGCの原形質膜内で観察される。Fragilisの細胞表面局在化は、インターフェロン誘導性遺伝子ファミリーのメンバーとして予測されている(Deblandre, 1995)。原外胚葉近位縁でのFragilisの発現は、生殖細胞反応能の開始を示す。Fragilisは、そのエキソン1の上流にIFN応答要素を有しているため、近位の原外胚葉細胞のBMP4による開始初回刺激の後にIFNによって誘導される可能性が高い。これらのIFN誘導性タンパク質は、抗増殖性シグナルの伝達が可能なTAPA1など他のタンパクと共に多量体の複合体を形成することができる。これは、体細胞は急速に分割し続けるのに対して、創始PGCの細胞サイクル時間が6から16時間増加する理由である可能性がある。

10

【0202】

推定核移行シグナルおよび核外移行シグナルを有するStellaは、細胞質および核のどちらでも観察された。Stellaの開始に続き、E8.5ではFragilisの発現が損失される。したがって、Fragilisの発現は生殖細胞反応能の開始を示し、Stellaの発現は特異化プロセスの終了を示す。創始PGC中のStellaの発現は、体細胞運命の回避を示し、その多能性状態と矛盾しない。これらの研究は、特定の遺伝子セットが、普通なら体細胞になる可能性がある細胞に生殖系運命を課さなければならないことを示す。多くの生物が、生殖細胞が体細胞になるのを防ぐ精巧な転写機構を有するので、Stellaは、その核と細胞質間を往復する潜在性により、転写および翻訳の制御の一役を担っている可能性がある。卵母細胞および移植前の胚中でのStellaの発現は、これが全能性および多分化能性においてより幅広い役割を担っていることを示す。

20

【0203】

実施例7

FragilisとStellaの関連性

Fragilisを発現する細胞の一部のみが最後にStellaの発現を示した。Fragilisの発現レベルが最も高い細胞のみがPGCとなり、Stellaを発現し始めた。さらに、Stella陽性PGCは決してHoxb1の発現を示さない。より重要なことに、Fragilisの発現レベルがより低い体細胞のみがHoxb1発現を示す。さらに、体細胞のみがホメオボックスを含む2つの他の遺伝子Lim1およびEvx-1の発現を示す。したがって、Hoxb1、Evx-1およびLim1の発現を損失することが、生殖細胞運命の特異化に重要と考えられる。

30

【0204】

図8aおよび8bは、PCR分析による、単一細胞PGCおよび体細胞中の様々な遺伝子の発現を示す。

【0205】

本実験はまた、Oct4はPGCの決定的なマーカーではないことを示す。これまでに、全能性細胞および多能性細胞でOct4の発現が実証されている(Nichols, 199; Pesce, 1998; Yeom, 1996)。しかし、本発明者らは、Oct4はすべてのPGCおよび体細胞で同程度発現されていることを見出した。しかし、本発明者らは、PGC中にT(短尾)およびFgf8の発現を見出し、これは、PGCが最初中胚葉細胞になる運命であった胚性細胞の中から収集されることを示す。

40

【0206】

実施例8

PGCの特異化

創始PGCおよびその近隣の体細胞は、近位原外胚葉細胞由来の共通起源を共有する。創始PGCおよびその近隣の体細胞を分析することにより、生殖細胞運命の特異化に重大な遺伝子の系統的なスクリーンが確立された。Fragilisは、推定生殖細胞をその近隣の体細胞から区別するために生殖細胞反応能および同型の会合を促進することができるインターフェロン(IFN)誘導性遺伝子であり、このような例は発生中の他の状況に適用される場合もある。Stellaの発現は、Fragilisの発現が高い細胞で起こる。ひとたび生殖細胞の特異化

50

が完了するとFragilisはもはや必要ないが、生殖細胞系でStellaの発現は続く。Stellaは卵母細胞内および初期の移植前の発生胚内でも発現されるので、これは全能性/多能性細胞全体で重要である可能性もある。

【 0 2 0 7 】

実施例 9

生殖細胞系および多能性幹細胞

多能性胚性(EG)細胞を誘導するのにPGCを使用することができる。しかし、EG細胞と異なって、未分化胚芽細胞に導入された場合は、PGCは発生に関与しない。これらは、シグナル分子に応答できないか、あるいは転写的に抑制される。ひとたび特異化されると、PGCはその細胞表面にFragilisを発現しない。しかし、EG細胞はその細胞表面上にはっきりとFragilisの発現を示し、ES細胞もそうである。EG細胞とES細胞のどちらかがノーザン分析で判断するとStellaを発現するが、StellaはPGCに比べてより低いレベルで、ES細胞やEG細胞で発現される。したがって、FragilisおよびStellaは多能性幹細胞中で、ある役割を担っている。したがって、これらの遺伝子はこれら多能性幹細胞のマーカーであり、これら幹細胞に多能性を与えるのに役割を担っている可能性もある。

10

【 0 2 0 8 】

[参考文献]

Brady, G. and Iscove, N.N. (1993). Construction of cDNA libraries from single cells. *Methods Enzymol.* 225, 611-623.

20

Dulac, C. and Axel, R. (1995). A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83, 195-206.

Ginsburg, M., Snow, M.H.L., and McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110, 521-528.

30

Downs, K.M., and Davies, T. (1993). Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* 118, 1255-1266.

Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A.J., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V.E., Korving, J.P.W.F.M., and Hogan, B.L.M. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes&Dev.* 13, 424-436.

Yoem, Y.II., Fuhrmann, G., Ovitt, C.E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hubner, K., and Scholer, H.R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 1996, 881-894.

10

1. Weismann, A. Das Keimplasma. Eine theorie der Vereburg. *Jenna. Gustav Fischer* (1892).

2. Eddy, E. M. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int Rev Cytol* 43, 229-80 (1975).

3. Seydoux, G. & Strome, S. Launching the germline in *Caenorhabditis elegans*: regulation of gene expression in early germ cells. *Development* 126, 3275-83. (1999).

20

4. Wylie, C. Germ cells. *Cell* 96, 165-74. (1999).

5. Lawson, K. A. et al. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13, 424-36. (1999).

30

6. Lawson, K. A. & Hage, W. J. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp* 182, 68-84 (1994).

7. Tam, P. P. & Zhou, S. X. The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Dev Biol* 178, 124-32. (1996).

40

8. Yoshimizu, T., Obinata, M. & Matsui, Y. Stage-specific tissue and cell interactions play key roles in mouse germ cell specification. *Development* **128**, 481-90. (2001).
9. McLaren, A. Signaling for germ cells. *Genes Dev* **13**, 373-6. (1999).
10. Ying, Y., Liu, X. M., Marble, A., Lawson, K. A. & Zhao, G. Q. Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* **14**, 1053-63. (2000). 10
11. Ying, Y., Qi, X. & Zhao, G. Q. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7858-7862. (2001).
12. Ying, Y. & Zhao, G. Q. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol* **232**, 484-92. (2001). 20
13. Chiquoine, A. D. The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* **118**, 135-146 (1954).
14. Ginsburg, M., Snow, M. H. & McLaren, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* **110**, 521-8. (1990). 30
15. MacGregor, G. R., Zambrowicz, B. P. & Soriano, P. Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development* **121**, 1487-96. (1995).
16. Nichols, J. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379-91. (1998). 40

17. Pesce, M., Gross, M. K. & Scholer, H. R. In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *Bioessays* **20**, 722-32. (1998).
18. Yeom, Y. I. et al. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* **122**, 881-94. (1996).
19. Downs, K. M. & Davies, T. Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* **118**, 1255-66. (1993). 10
20. Brady, G. & Iscove, N. N. Construction of cDNA libraries from single cells. *Methods Enzymol* **225**, 611-23 (1993).
21. Dulac, C. & Axel, R. A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* **83**, 195-206. (1995). 20
22. Frohman, M. A., Boyle, M. & Martin, G. R. Isolation of the mouse Hox-2.9 gene; analysis of embryonic expression suggests that positional information along the anterior-posterior axis is specified by mesoderm. *Development* **110**, 589-607. (1990).
23. Deblandre, G. A. et al. Expression cloning of an interferon-inducible 17-kDa membrane protein implicated in the control of cell growth. *J Biol Chem* **270**, 23860-6. (1995). 30
24. Friedman, R. L., Manly, S. P., McMahon, M., Kerr, I. M. & Stark, G. R. Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell* **38**, 745-55. (1984).
25. Evans, S. S., Collea, R. P., Leasure, J. A. & Lee, D. B. IFN-alpha induces homotypic adhesion and Leu-13 expression in human B lymphoid cells. *J Immunol* **150**, 736-47. (1993). 40

26. Evans, S. S., Lee, D. B., Han, T., Tomasi, T. B. & Evans, R. L. Monoclonal antibody to the interferon-inducible protein Leu-13 triggers aggregation and inhibits proliferation of leukemic B cells. *Blood* **76**, 2583-93. (1990).
27. Aravind, L. & Koonin, E. V. SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci* **25**, 112-4. (2000). 10
28. Gurdon, J. B., Lemaire, P. & Kato, K. Community effects and related phenomena in development. *Cell* **75**, 831-4. (1993).
29. Reid, L. E. et al. A single DNA response element can confer inducibility by both alpha- and gamma-interferons. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 840-4. (1989).
30. Kita, M. et al. [Expression of cytokines and interferon-related genes in the mouse embryo]. *C R Seances Soc Biol Fil* **188**, 593-600 (1994). 20
31. Gomperts, M., Garcia-Castro, M., Wylie, C. & Heasman, J. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development* **120**, 135-41. (1994).
32. Herrmann, B. G., Labeit, S., Poustka, A., King, T. R. & Lehrach, H. Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* **343**, 617-22. (1990). 30
33. Herrmann, B. G. Expression pattern of the Brachyury gene in whole-mount TWis/TWis mutant embryos. *Development* **113**, 913-17
34. Crossley, P. H. & Martin, G. R. The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* **121**, 439-51. (1995). 40

35. Barnes, J. D., Crosby, J. L., Jones, C. M., Wright, C. V. & Hogan, B. L. Embryonic expression of Lim-1, the mouse homolog of *Xenopus* Xlim-1, suggests a role in lateral mesoderm differentiation and neurogenesis. *Dev Biol* **161**, 168-78. (1994).
36. Fujii, T. et al. Expression patterns of the murine LIM class homeobox gene *lim1* in the developing brain and excretory system. *Dev Dyn* **199**, 73-83. (1994). 10
37. Bastian, H. & Gruss, P. A murine even-skipped homologue, *Evx 1*, is expressed during early embryogenesis and neurogenesis in a biphasic manner. *Embo J* **9**, 1839-52. (1990).
38. Rogers, M. B., Hosler, B. A. & Gudas, L. J. Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, *Rex- 1*, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. *Development* **113**, 815-24. (1991). 20
39. Sutton, J. et al. Genesis, a winged helix transcriptional repressor with expression restricted to embryonic stem cells. *J Biol Chem* **271**, 23126-33. (1996).
40. Cox, D. N. et al. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by *piwi* are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev* **12**, 3715-27. (1998).
41. Fujiwara, Y. et al. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila* vasa and its specific expression in germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 12258-62. (1994). 30
42. Dixon, K. E. Evolutionary aspects of primordial germ cell formation. *Ciba Found Symp* **182**, 92-110 (1994).
43. Mahowald, A. P. Assembly of the *Drosophila* germ plasm. *Int Rev Cytol* **203**, 187-213 (2001). 40

44. Nieuwkoop, P. D. & Satasurya, L. A. Primordial germ cells in the chordates. *Cambridge University Press, Cambridge, UK* (1979).
45. Johnson, A. D., Bachvarova, R. F., Drum, M. & Masi, T. Expression of axolotl *dazl* rna, a marker of germ plasm: widespread maternal rna and onset of expression in germ cells approaching the gonad. *Dev Biol* **234**, 402-15. (2001). 10
46. Johnson, A. D., Bachvarova, R. F., Masi, T. & Drum, M. Expression of *Vasa* and *Daz-like* genes demonstrate that Axolotl primordial germ cells (PGCs) are not predetermined. *Germ cells Cold Spring harbor laboratory*, 61 (2000).
47. Toyooka, Y. et al. Expression and intracellular localization of mouse *Vasa*-homologue protein during germ cell development. *Mech Dev* **93**, 139-49. (2000).
48. Saitou, M. et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* **141**, 397-408. (1998). 20
49. Henrique, D. et al. Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* **375**, 787-90. (1995).
50. Wilkinson, D. G. & Nieto, M. A. Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol* **225**, 361-73 (1993). 30
51. Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A. & Hogan, B. L. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* **9**, 2105-16. (1995).

【 0 2 0 9 】

本文書中で言及する各出願や特許、各出願や特許の実施中を含めて上記の各出願や特許中で引用または参照された各文書(「出願に引用された文書」、各出願や特許および出願に引用された文書すべてで引用または言及された製造者の指示書やカタログすべてが、本明細書に参照により組み込まれる。さらに、本文中で引用したすべての文書、本文中で引用した文書中で引用または参照された文書すべて、本文中で引用または言及した製品すべての製造者の指示書やカタログすべてが、本明細書に参照により組み込まれる。 40

【 0 2 1 0 】

本発明の範囲および精神から逸脱することなしに、本発明に記載した方法およびシステムの様々な改変や変化が当業者には明らかであろう。本発明を具体的な好ましい実施形態と関連させて記載したが、請求する本発明はこのような具体的な実施形態だけには過度に限定さるべきでないことを理解されたい。実際、本発明を実施するために記載した様式の、分子生物学または関連分野の当業者に明らかな改変は、特許請求の範囲内であることを意図する。 50

【図面の簡単な説明】

【0211】

【図1】Fragilisのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図である。2つの膜貫通型ドメイン(TM IおよびTM II)の予測位置に下線を引き、太字で表示した。ポリ(A)シグナルに下線を引いた。

【図2】Stellaのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図である。3つの核移行シグナルに下線を引いた。潜在的な核外移行シグナルに二重下線を引き、疎水性残基を太字で示した。SAPドメインに類似性のあるモチーフ内のらせん構造(アミノ酸28からアミノ酸63)に赤の下線を引き、保存された残基を青の下線で示した。スプライシング因子様のモチーフに下線を引き、保存された残基を緑で示した。ポリ(A)シグナルにも下線を引いた。

10

【図3】胚性幹(ES)細胞内でのFragilisの発現を示す図である。ES細胞は、PBS中4%のパラホルムアルデヒドで10分間、室温で固定し、Saitou他、1998、J Cell Biol、141、397-408(1998)に記載のように免疫組織化学用に処理した。生殖細胞の、反応能を有する細胞であるE6.5の近位胚盤葉上層細胞内、および新しく特異化された生殖細胞内で、Fragilisの発現を同様に検出した。この発現は、生殖細胞運命の特異化が完了した後のE8.5で減少する。

【図4】PGC内のStellaの発現を示す図である。E12.5の生殖腺をPBS中4%のパラホルムアルデヒドで10分間、室温で固定し、Saitou他、1998、J Cell Biol、141、397-408(1998)に記載のように免疫組織化学用に処理した。StellaはE7.25からE13.5のPGC、多能性ES細胞およびEG細胞内で検出された。Stellaはまた、全能性卵母細胞、接合子、ならびに、移植前発生および発生中の配偶子内の発生中の全能性および多能性割球でも検出される。EG細胞がPGC由来の場合(Labosky他、1994、Development、120:3197-3204)、Fragilisの発現はここでもまた、ES細胞と同様に多能性EG細胞中で検出される。したがって、FragilisおよびStellaは多能性幹細胞のマーカーでもある。

20

【図5】E7.2マウス胚の全載in situハイブリダイゼーションによるFragilisの発現を示す図である。

【図6】E7.2マウス胚の全載in situハイブリダイゼーションによるStellaの発現を示す図である。

【図7】E9.0胚における、生殖腺内に遊走中のPGC中のStellaの発現を示す図である。

30

【図8A】単一細胞cDNAのPCR分析によって検出された単一細胞中のFragilisおよびStellaの発現を示す図である。図8B中に記号*で示した数値はPGCである。Stellaの発現を示す単一細胞よりFragilisの発現を示している単一細胞の方が多くことに注目されたい。最も高いレベルでFragilisを発現する細胞のみがStellaを発現して生殖細胞の運命を獲得することが分かった。Stellaを発現する細胞はHoxb1の発現を示さないことが分かった。より低いレベルでFragilisを発現しStellaを発現しない細胞は体細胞となり、Hoxb1の発現を示した。PGCの創始集団も高レベルのTnapを示す。創始PGCと体細胞のいずれもがOct4、T(短尾)、およびFgf8の発現を示す。

【図8B】単一細胞cDNAのPCR分析によって検出された単一細胞中のFragilisおよびStellaの発現を示す図である。図8B中に記号*で示した数値はPGCである。Stellaの発現を示す単一細胞よりFragilisの発現を示している単一細胞の方が多くことに注目されたい。最も高いレベルでFragilisを発現する細胞のみがStellaを発現して生殖細胞の運命を獲得することが分かった。Stellaを発現する細胞はHoxb1の発現を示さないことが分かった。より低いレベルでFragilisを発現しStellaを発現しない細胞は体細胞となり、Hoxb1の発現を示した。PGCの創始集団も高レベルのTnapを示す。創始PGCと体細胞のいずれもがOct4、T(短尾)、およびFgf8の発現を示す。

40

【 図 1 】

```

CGCCGACGAGAGGGGACGACCCGACGCGGCTCCATCCCTTTGCGCCGACAGTGCCTGGCTTTGGC  60
TCGGCACCAATGACACACACTTCTCAGGCTTCCATCCACGCTCCATCCAGGAGGAGGACGACGCCCC  120
      M N H T S Q A F I T A A S G G Q P P
CAAACTACGAAAGCATCAGGAGAGATATGAGGTGGCTGAGATGGGGGACCGGACCGGAT  180
N Y E R I K E E Y E V A E M G A P H G S
CGGCTTCGTGACAGACTACTGTGATCAACATGCCCGAGAGGGTGTGGTGGCTGACCATG  240
A S V R T T V I N M P R E V S V P D H V
TTGTCGTGGTCCCGTTCATAGACTCTTCATGACACTTCCCTGCGCTGGGCTTCATAGGCT  300
V W S L F N T L F M N F C C L G F I A Y
      T M I
ATGCCATCCCGTGAAGTCTGAGGATCCGAGATGGTGGGTGATGTGACTGGGACCCAGG  360
A Y S V K S R D R K M V G D V T G A Q A
CCTAGGCTCCACTGCTGAGTGCCTGAGACTCAGCACCTTGGTCTCCAGCATCCCTGATGG  420
Y A S T A K C L N I S T L V L S I L M V
      T M II
TTGTTATCACCAATGTTTGTGATCATCATGTTCTTTAAGCTCRAAACTTCACACTT  480
V I T I V S V I I I V L N A Q N L H T *
AATAGAGGATTCGGACTCCGGTCCCTGAGTGCCTTCACCCCTCCGAGCTGGTCCCTCCT  540
TGCCCTCCCTACACCGCAGGTTGACACTCATTTATCTATCCACAGTGGATTCGATGAG  600
TGCACTTGTAAACACC

```

FIGURE 1

【 図 2 】

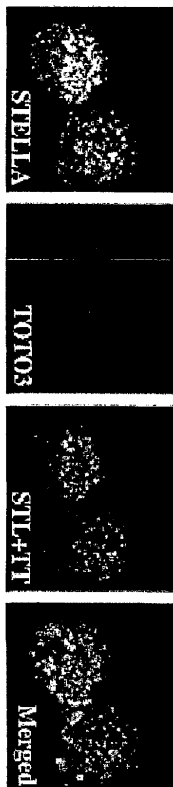
```

GGTTCAGGCTGCTGTAATGGGCTGTGTTTGGGCTTTTAAAGCATGACAT  60
CTGATCCGACGACGACCTTTGAGGCTTCCTCCGACCCGACGACGACGAC  120
      W S D S E
ACAAATCCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC  180
E V D P M K D P E T P Q K K D E S D A L
TCGAGATCCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC  240
D D T D V L Q P E T L V K V M K L L T
      Helix I
TAACTCCGCTGACGAGGCTGACGAGGCTGACGAGGCTGACGAGGCTGACGAG  300
N E S V R R R A R R R S L R R L L A A Y
      Helix II
TACCTGAGGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC  360
E Y S N A S E K I R R E V Q S A F D K E
GAGGCTCCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC  420
K V R T L L S V L K D P I A R N R L V
TTCGATTCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC  480
E I T Q R S R E L E Q S E P E D E T F
GTTTACGATTCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC  540
E R C L C T P C H Y Q R W D P S E N A X
AAATGGGAGATGAGGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC  600
I G K N *
ACAGCTTCAAGCTTTTGTGTTTAAAGTAACTTTCTCCGCTGGGAACTTT  650
MCTGTGATCTTAAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT  700
AGAACTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAG  750
TAGCTTAAATTCGAAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT  800

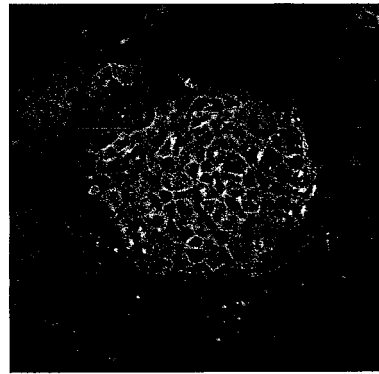
```

FIGURE 2

【 図 4 】



【 図 3 】



【 図 5 】

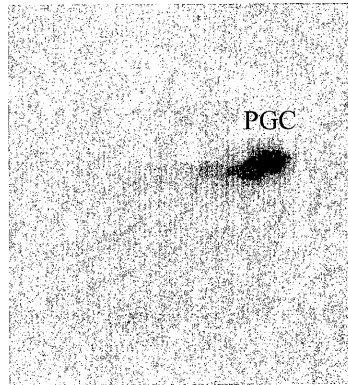


Figure 5

【 図 6 】

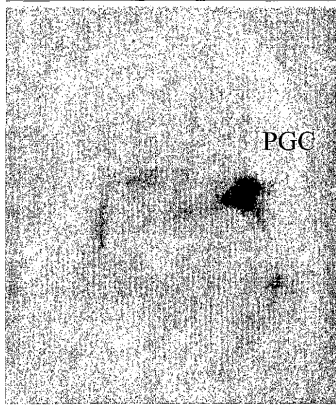


Figure 6

【 図 7 】



FIGURE 7

【 図 8 A 】

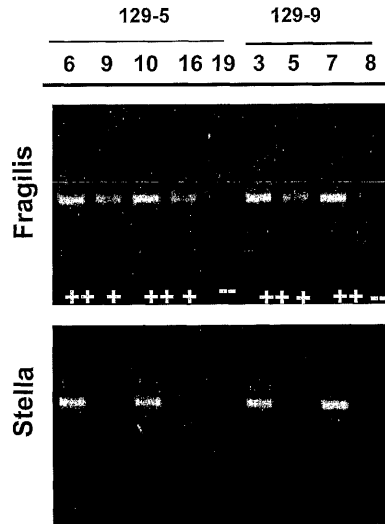


Figure 8A

【 図 8 B 】

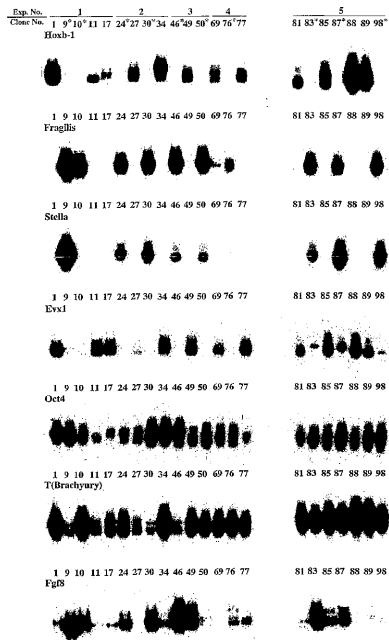


Figure 8B

【配列表】

0004704666000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N 5/073 (2010.01)		C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/074 (2010.01)		C 1 2 N 5/00 2 0 2 B
		C 1 2 N 5/00 2 0 2 D

(72)発明者 斎藤 通紀
イギリス・ケンブリッジ・シービー２・１キューアール・テニス・コート・ロード・(番地なし)
・ユニバーシティ・オブ・ケンブリッジ・ウエルカム・シーアールシー・インスティテュート

(72)発明者 アジム・スラニ
イギリス・ケンブリッジ・シービー２・１キューアール・テニス・コート・ロード・(番地なし)
・ユニバーシティ・オブ・ケンブリッジ・ウエルカム・シーアールシー・インスティテュート

審査官 佐藤 巖

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 3 8 9 7 3 (W O , A 1)
HAYZER, D.J. , "R. rattus interferon induced mRNA" , GenBank , 1 9 9 2 年 5 月 2 6 日 , Ac
cession Number X61381 , [online] , Retrieved on 2008-08-18 , Retrieved from the Internet:
<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=57604>>
LEWIN, A.R. et al. , "Molecular analysis of a human interferon-inducible gene family" ,
Eur. J. Biochem. , 1 9 9 1 年 , Vol.799 , pp.417-423
ADACHI, J. et al. , "Mus musculus 18 day embryo cDNA, RIKEN full-length enriched librar
y, clone:1110004C05, full insert sequence" , GenBank , 2 0 0 1 年 2 月 8 日 , Accession
Number AK003407 , [online] , [retrieved on 2008-08-18] , Retrieved from the Internet: <U
RL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?12834059:0LD06:19573>>
GINSBURG, M. et al. , Development , 1 9 9 0 年 , Vol.110 , pp.521-528

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C07K 16/18
C12N 15/00-15/90
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)
UniProt/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

专利名称(译)	基因		
公开(公告)号	JP4704666B2	公开(公告)日	2011-06-15
申请号	JP2002558380	申请日	2002-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	剑桥大学技术服务有限公司		
申请(专利权)人(译)	剑桥大学技术服务Rimitido		
当前申请(专利权)人(译)	剑桥企业Rimitido		
[标]发明人	斎藤通紀 アジムスラニ		
发明人	斎藤 通紀 アジム・スラニ		
IPC分类号	C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/48 G01N33/53 C12N15/09 C12N5/073 C12N5/074 C07K14/47 C07K14/705 C12N5/06 C12N5/08 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/705 C07K14/47		
FI分类号	C07K16/18 C12Q1/68.A G01N33/48.M G01N33/53.D G01N33/53.M C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.202.B C12N5/00.202.D		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
审查员(译)	佐藤岩		
优先权	2001001300 2001-01-18 GB		
其他公开文献	JP2004529617A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是在生殖细胞中特异性表达的原始生殖细胞的标记，以及两个基因GCR1 (Fragilis) 和GCR2 (可用于在细胞群内鉴定这些细胞)。提供斯特拉)。本发明涉及GCR1多肽，或其片段，同源物，变体或衍生物，特别是SEQ ID NO: 2中所示序列的至少50%，60%，70%，80%，90%或95%。根据权利要求1的多肽具有同源性。还有GCR2多肽或其片段，同源物，变体或衍生物，特别是与SEQ ID NO: 4中所示序列具有至少50%，60%，70%，80%，90%或95%的同源性根据权利要求3的多肽，具有还提供了编码这些多肽的核酸。

脂肪族	非極性	GAP
		ILV
	極性-非荷電	CSTM
		NQ
	極性-荷電	DE
		KR
芳香族		HFVY