

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002 - 541850

(P2002 - 541850A)

(43)公表日 平成14年12月10日(2002.12.10)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/47	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47		16/18	4 B 0 6 3
16/18		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5
1/19		1/21	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 60数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 612461(P2000 - 612461)

(86) (22)出願日 平成12年4月14日(2000.4.14)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月15日(2001.10.15)

(86)国際出願番号 PCT/US00/09904

(87)国際公開番号 W000/63382

(87)国際公開日 平成12年10月26日(2000.10.26)

(31)優先権主張番号 60/129,463

(32)優先日 平成11年4月15日(1999.4.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 オシリス セラピューティクス, インコーポレイテッド
アメリカ合衆国, 21231 - 2001 メリーランド, ボルチモア, アリスアンナ ストリート 2001

(72)発明者 リュー, シャーン
アメリカ合衆国, 20904 メリーランド, シルバー スプリング, モンドリアン テラス 1020

(72)発明者 チェン, リンツァオ
アメリカ合衆国, 21044 メリーランド, コロンビア, ウッドロット ロード 5346

(74)代理人 弁理士 丹羽 宏之

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 造血細胞からの遺伝子と発現産物

(57)【要約】

ヒト造血幹細胞/前駆細胞 (h H S P C) ポリペプチド (C 1 7 ポリペプチドと呼ばれるもの)、並びにこのようなポリペプチドをコード化する DNA (および RNA) が開示される。同じく開示されるのは、疾病プロセスでの遺伝変異で果される染色体地図作製、DNAフィンガープリンティングおよび可能な役割および前記ポリペプチドに特異的なポリクローナル血清またはモノクローナル抗体の生成等のためのマーカーを含むここで開示されるポリヌクレオチドとポリペプチドを利用する方法である。更に開示されるのは、本発明のポリペプチドを利用する h M S C s の増殖率を増加するために方法である。

。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一つ分離核酸であって、図2のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドに少なくとも90%同一であるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする分離核酸。

【請求項2】 一つ分離核酸であって、図2のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドに少なくとも95%同一であるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする分離核酸。

【請求項3】 一つ分離核酸であって、図2のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドに少なくとも98%同一であるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする分離核酸。

【請求項4】 一つ分離核酸であって、請求項1, 2または3記載のDNA配列または断片のいずれかに相補性であるRNAを含むことを特徴とする分離核酸。

【請求項5】 一つ分離核酸であって、図1のDNA配列に同一であるDNA配列を含むことを特徴とする分離核酸。

【請求項6】 一つ分離核酸であって、請求項5記載のDNA配列に相補性であるRNAを含むことを特徴とする分離核酸。

【請求項7】 一つ分離核酸であって、少なくともヒト遺伝子のポリペプチドコーディング領域を含み、ここで前記ヒト遺伝子が請求項1に基づくDNA配列を含むことを特徴とする分離核酸。

【請求項8】 一つ分離核酸であって、請求項5記載のDNA配列を含有するヒト遺伝子の少なくともポリペプチドコーディング領域を含むことを特徴とする分離核酸。

【請求項9】 適切な発現システムにある時にヒトタンパク質を発現することを特徴とする請求項8記載の分離核酸。

【請求項10】 請求項3記載のDNA配列を含むことを特徴とする一つ発現伝達体。

【請求項11】 請求項5記載のDNA配列を含むことを特徴とする一つ発現伝達体。

【請求項12】 請求項7記載のDNA配列を含むことを特徴とする一つの発現伝達体。

【請求項13】 請求項9記載のDNA配列を含むことを特徴とする一つの発現伝達体。

【請求項14】 請求項7記載のDNA配列およびその活性断片、誘導体並びに機能性類似体によりコードされることを特徴とする一つのポリペプチド。

【請求項15】 請求項8記載のDNA配列およびその活性断片、誘導体並びに機能性類似体によりコードされることを特徴とする一つのポリペプチド。

【請求項16】 図2記載のアミノ酸配列（配列識別番号3）を含むことを特徴とする一つのポリペプチド。

【請求項17】 請求項7記載のDNAのゲノムに挿入されていることを特徴とする一つの遺伝子操作細胞。

【請求項18】 請求項17記載〔原文は「請求項27」〕の遺伝子操作細胞を用いてポリペプチドを発現するための細胞を産生することを特徴とする一つのプロセス。

【請求項19】 図1のDNA（配列識別番号1）の断片を含む一つの分離DNA配列であって、ここで前記断片が前記配列の少なくとも15個の連続塩基を含むことを特徴とする分離DNA配列。

【請求項20】 図1のDNA（配列識別番号1）の断片を含む一つの分離DNA配列であって、ここで前記断片が前記配列の少なくとも30個の連続塩基を含むことを特徴とする分離DNA配列。

【請求項21】 図1のDNA（配列識別番号1）の断片を含む一つの分離DNA配列であって、ここで前記断片が前記配列の少なくとも50個の連続塩基を含むことを特徴とする分離DNA配列。

【請求項22】 図1のDNA（配列識別番号1）の断片を含む一つの分離DNA配列であって、ここで前記断片が前記配列の少なくとも80個の連続塩基を含むことを特徴とする分離DNA配列。

【請求項23】 請求項14または15に基づくポリペプチドで哺乳類を免疫化することで調製されることを特徴とする一つの抗血清。

【請求項24】 請求項14に基づくポリペプチドに対抗する一つのモノクローナル抗体。

【請求項25】 請求項15に基づくポリペプチドに対抗する一つのモノクローナル抗体。

【請求項26】 試験管内でヒト間葉幹細胞の繁殖率を増加する一つの方法であって、請求項16のポリペプチドの有効量をこのような細胞が懸濁される細胞外増殖培地に加えることを含むことを特徴とする方法。

【請求項27】 請求項26記載の方法であって、ここでポリペプチドが少なくとも1 pg/mlの濃度で、前記増殖培地に存在することを特徴とする方法。

【請求項28】 図2記載のC17ポリペプチドのドメインに類似する構造を持つことを特徴とする一つの化学化合物。

【請求項29】 細胞表面での増殖刺激受容体の存在を決定する一つの方法であって、図2記載の化学的に標識されたC17ポリペプチドまたはその類似体を使用して適切な培地でそのような類似体を細胞と共に保温培養し、そのような類似体の存在で増殖の刺激が存在するかどうかを決定し、細胞表面に結合する類似体を検出し、そのような類似体に結合する受容体を分離することによりそのような細胞の表面でのそのような受容体の存在を検出することを含むことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本出願は、1999年4月15日付け合衆国暫定特許出願番号60/129,643号の優先権を主張し、その開示はこの出願にその全体が組み込まれている。

【0002】

本発明はヒト遺伝子の転写産物に対応する新規に同定されたポリヌクレオチド配列に関し、またそれと関連する完全遺伝子配列およびその遺伝子発現産物に関し、更に前記のものの用途、とりわけそれらが造血および骨髄微環境を伴う場合のそれらの用途に関する。より詳細には、ここで開示される本発明はCD34⁺造血幹細胞およびまたは造血前駆細胞(HSPCs)で発現されるが、CD34⁻造血細胞では発現されない新規な遺伝子に関する。

【0003】

循環する血液細胞が数多くの決定された前駆細胞の末端分化の産物であることは十分に確定されている。胎児生命の間は、造血は細網内皮系全体に発生し、一方成人では前駆細胞(例えば白血球、赤血球および血小板)は骨髄、とりわけ軸骨格の骨髄に発生する。骨髄写真と生検標本は生体、とりわけヒトでの造血過程での状態について多くの情報に寄与している。

【0004】**【従来の技術】**

研究者は血液細胞のいずれかおよびすべてを生み出すことのできる多分化能幹細胞を定義した。とりわけ骨髄で発見されるこの多分化能幹細胞は2個の十分に定義された経路の一つに沿って分化する。かくしてこの幹細胞は骨髄幹細胞に分化し、最終的にBおよびTリンパ球を除くすべての最終分化血球を生み出すか、またはTリンパ球(T細胞)に分化するかのいずれかである。血液病の性質並びに分化血液細胞の形成への現在の研究はこれら前駆細胞に焦点を集める傾向があり、これにより造血の前駆的基礎と呼ばれてきたものを生じせしめた。

【0005】

もしそれが特殊な型の細胞または特殊なグループの細胞型に特異的なタンパク質である各種細胞の表面抗原のそのような細胞の表面での存在の発見のためでなかったとしたら、骨髓画分内の各種の型の血球細胞の成長を追うことは非常に困難であったことであろう。細胞が分化するにつれてその表面での細胞表面抗原のパターンは、細胞内の各種遺伝子がそれぞれの連続世代で停止しあるいは再始動して変化する。

【0006】

大抵のこのようなマーカーはとりわけ造血細胞を記載するときに使用される定評のある「CD」命名法を使用して分類される。「CD」という用語は「集落名称」または「分化集落」のいずれかを記載したものとして理解されており、細胞の分化の段階を同定し従って造血プロセスの異なる段階で作動する細胞を含む一クラスの造血細胞をもう一つのものから区別するのに有用なモノクローマ抗体の「集落」により認識される分子を引用する。

【0007】

これらCDタンパク質は各種の型の細胞を同定し、前駆幹細胞から最終分化子孫までの造血の推移を追うために日常的に使用される。例えばCD34はサイズが約105乃至120キロダルトンのタンパク質であり、造血幹細胞に存在する。

【0008】

ヒト造血幹/前駆細胞(HSPC)はCD34表面抗原(CD34⁺)を運ぶ骨髓(BM)単核細胞(MNC)の希少集団で富化される。BMに加えて、CD34⁺HSPCは同じく新生児臍帯血(CB)で見出され、サイトカインと化学療法で動員の後末梢血で富化される(クラウス他、血液、87、1(1996))。CD34⁺細胞はBM内のMNCの~1-4%を占めまたCBと、動員された末梢血(mPB)では~0.5%を占める。精製CD34⁺細胞は骨髓に移植でき移植後患者に長年にわたり血液/リンパ系細胞を生成する。加えて、個々のCD34⁺細胞は培養で造血細胞のコロニーを形成できる。これとは逆に、CD34⁻発現を欠く単核細胞(CD34⁻)は各種の分化系統の大きく成熟した造血細胞であり、培養でコロニーを形成する能力を喪失している。(クラウス他、19

96)。

【0009】

本発明はここで新規な分泌タンパク質とそのコード化遺伝子の診断と治療用途を開示し、後者の遺伝子はCD34⁺造血幹/前駆細胞で特異的に発現される。

【0010】

【発明の概要】

ヒト造血幹/前駆細胞(hHSPCs)は骨髓と臍帯からの血液に存在し(CD34⁺で表示されるような細胞の)CD34細胞表面抗原を発現する単核細胞の相対的に稀有集団の部分である。しかしCD34遺伝子はHSPCsで独占的に発現されない(例えば内皮細胞も高水準のCD34を発現する)。

【0011】

本発明に従って、臍帯から得られた血液細胞はもしその細胞がCD34表面抗原を持っていたなら新規なタンパク質を発現することが発見され、またCD34が細胞に検出されなかったならそれは発現されなかった。

【0012】

新規な遺伝子のcDNAクローン、および核酸、分離配列、その断片を含む発現産物を調製するためにこれらの細胞を使用し、またこれらの核酸およびその断片を含む配列の発現産物にそれを使用することが本発明の目的である。

【0013】

更に造血幹/前駆細胞で発現される本発明に基づいて同定されるmRNAsなどのcDNAsのタンパク質発現産物、同じく他の核酸、とりわけ分離核酸、そのような核酸のヌクレオチド配列、その断片を提供することが本発明のもう一つの目的である。

【0014】

ここで開示されたヌクレオチド配列のポリペプチド発現産物を提供し、そのポリペプチドは間葉幹細胞の成長因子として作用し、その細胞が殆どの型の結合組織細胞に分化することができ、そのような幹細胞は例えば代償療法その他で有用であるポリペプチド発現産物を提供することが本発明のもう一つの目的である。

【0015】

更にこのように産生されたcDNAs、およびその断片、同じくゲノム内でのそのいずれかの対立遺伝子を含むこのような遺伝子の位置を決定する染色体マーカーとしてのその発現産物を使用することが本発明の目的である。

【0016】

更にそれにより、異なった個体がここで開示されるものに完全にまたは部分的に同一であると同定された遺伝子の配列に基づき識別できるヒト「フィンガープリンティング」で使用するDNA配列を提供することが本発明のもう一つの目的である。

【0017】

更にまたそれにより、このような配列が哺乳類、とりわけヒトでの類似した染色体位置で発見されるものと比較でき、ここでそのような哺乳類が疾病で苦しみ、それにより前記遺伝子の変異の存在を検出し、前記変異が多分そのような疾病に導くここで開示されるポリペプチドをコーディングする遺伝子に一致するポリヌクレオチド配列を提供することが本発明のもう一つの目的である。

【0018】

更にまた、その急速クローニングのために本発明に従ってペプチド、またはポリペプチド、あるいはタンパク質を発現できる本発明に基づく1個またはそれ以上の核酸、またはDNAs、あるいは遺伝子、もしくはヌクレオチド配列の複製を含む遺伝子操作細胞およびベクターを提供することが本発明の目的である。

【0019】

【発明の開示】

本発明の一つの見地は、図1で同定されたDNA配列(配列識別番号1)に配列相同性を示し、またはそれにハイブリッド形成できる核酸、および分離DNA配列、更に分子、およびその断片(更に一致する分離RNA配列、およびその断片)に向けられる。本発明は更に少なくとも15塩基、望ましくは少なくとも30塩基、より望ましくは少なくとも50塩基およびもっとも望ましくは少なくとも80塩基を含むこのような配列の断片または部分に向けられ、およびそれに対して少なくとも60%望ましくは少なくとも80%、またもっとも望ましくは少なくとも95%同一であるこれらの配列に向けられ、更にその断片と部分を含み

更に天然源から誘導されるときにはその対立遺伝子を含む図1の配列と同じポリペプチドをコード化するDNA（またはRNA）配列に向けられる。

【0020】

本発明に従って、配列を引用するときに「パーセント同一性」または「パーセント同一である」という用語は、比較されるべき配列（「比較配列」）と説明または請求される配列（「引用配列」）とのアラインメントの後に配列が説明または請求される配列と比較されることを意味する。パーセント同一性は下記の式に基づき決定される。

【0021】

$$\text{パーセント同一性} = 100 \{ 1 - C / R \}$$

ここでCは引用配列と比較配列の間のアラインメントの長さ全体にわたり引用配列と比較配列の間の差の数であり、ここで(i)比較配列に対応するアラインされた塩基またはアミノ酸を持たない引用配列内の各塩基またはアミノ酸、および(ii)引用配列内の各ギャップ部、および(iii)比較配列内のアラインされた塩基またはアミノ酸と異なる引用配列内の各アラインされた塩基またはアミノ酸が差異を構成する。またRは引用配列内に創られ同じく塩基またはアミノ酸として計数されるいずれかのギャップ部と共に比較配列とのアラインメントの長さのわりに引用配列での塩基とアミノ酸の数である。

【0022】

もしも前に計算されたように、特定の最小パーセント同一性とほぼ同じかもしくはそれより大きいアラインメントが比較配列と引用配列の間に存在するとすれば、ここで計算されたパーセント同一性が特定のパーセント同一性以下であるアラインメントが存在するとしても、比較配列は引用配列に対して特定の最小パーセントを持つことになる。

【0023】

本発明の更なる見地は図1に含まれるものと同じであるDNA配列（配列識別番号1）であるまたはそのDNA配列を含むDNA配列（同じく対応するRNA配列）に向けられる。本発明に基づくDNA配列は図1で同定され配列表（配列識別番号1）で設定されたDNA配列に緊縮条件の下でハイブリッド合成可能で

ある。ここで使用されるように、「緊縮条件」という用語は配列の間で少なくとも97%同一性がある場合にのみハイブリッド形成が生じることを意味する。

【0024】

本発明の更にもう一つの見地は、ヒト遺伝子（またはコーディング領域などのような同じポリペプチドをコード化するDNA配列）、とりわけ発現されたヒト遺伝子の少なくともコーディング領域を含む分離DNA（またはRNA）配列あるいは分子に向けられ、そのヒト遺伝子は図1で示された配列（配列識別番号1）、または少なくとも90%、望ましくは少なくとも95%、およびもっとも望ましくは少なくとも98%それに同一性であるもの、同じく前記コーディング領域によりコード化されるポリペプチドに対して類似の機能を持つポリペプチドをコード化するコーディング領域の断片または部分に相同であるかそれに寄与するDNA配列を含む。かくして分離DNA（またはRNA）配列は発現遺伝子（または前に記載の断片またはその部分）のコーディング領域のみを含むことができるし、あるいは発現ヒト遺伝子の非コーディングDNA（またはRNA）のすべてまたは部分を更に含むことができる。

【0025】

一般に、図1で示される配列（配列識別番号1）、またはそれに少なくとも90%、望ましくは95%、およびもっとも望ましくは少なくとも98%同一であるか相同であるものに相同であり、それに寄与する配列はヒト遺伝子のコーディング領域からのものである。

【0026】

本発明は更にこのようなDNA（またはRNA）配列を含むベクターまたはプラスミドに関し、同じくDNA（またはRNA）配列の使用に関する。

【0027】

図1で示される配列（配列識別番号1）は異なるヒト組織から誘導される実際のDNAおよびRNA配列にハイブリッド形成可能である。各種ヒト組織でのこの配列の分布は他のヒト配列のデータベース付合から決定された。

【0028】

本発明のポリヌクレオチドはRNAの形態またはDNAの形態にあり、このD

NAはcDNA、ゲノムDNAおよび合成DNAを含む。DNAは二本鎖または一本鎖であり、一本鎖の場合ではコーディング鎖または非コーディング鎖（アンチセンス鎖）である。成熟ポリペプチドをコード化するコーディング配列は図1で示されるコーディング配列に同一であり、または異なるコーディング配列であり、このコーディング配列は冗長または縮重の結果として図1のDNA（配列識別番号1）と同じ成熟ポリペプチドをコード化する。

【0029】

図2のポリペプチド（配列識別番号3）をコード化するポリヌクレオチドは必ずしもそれに限定されないが、成熟ポリペプチドだけのコーディング配列；成熟ポリペプチド、およびリーダーまたは分泌配列、プロタンパク質配列および膜アンカーなどの追加コーディング配列；成熟ポリペプチドのコーディング配列（および選択的に追加コーディング配列）ならびにイントロンまたは成熟ポリペプチドのコーディング配列の非コーディング配列5 およびまたは3 などの非コーディング配列を含む。

【0030】

かくして本発明で使用される「ポリヌクレオチド」という用語はポリペプチドのコーディング配列のみを含むポリヌクレオチド同じく追加のコーディングおよびまたは非コーディング配列を含むポリヌクレオチドを網羅する。

【0031】

本発明は更に図2のアミノ酸配列（配列識別番号3）を持つポリペプチドの断片、類似体および誘導体をコード化する前に記載のポリヌクレオチドの変異体に関する。ポリヌクレオチドの変異体はポリヌクレオチドの自然発生対立遺伝子変異体またはポリヌクレオチドの非自然発生変異体である。

【0032】

かくして、本発明に基づく核酸、またはポリヌクレオチドは図1で示されるコーディング配列の自然発生対立遺伝子変異体であるコーディング配列を持つ。従来の技術で公知のように、対立遺伝子変異体は1個またはそれ以上のヌクレオチドの置換、欠失または追加を有し、またコード化ポリペプチドの機能を事実上変えないポリヌクレオチド配列の代替形態である。

【0033】

本発明は更にポリヌクレオチドを含みここで成熟ポリペプチドのコーディング配列は、例えば細胞からポリペプチドの輸送を制御する分泌配列として機能するリーダー配列、および細胞膜へのポリペプチドの付着を容易にする膜貫通アンカーなどの宿主細胞からのポリペプチドの発現と分泌を助けるポリヌクレオチド配列に同じリーディングフレーム内で融合する。リーダー配列を持つポリペプチドはプレタンパク質であり、成熟ポリペプチドを形成するためにリーダー配列を宿主細胞により切断させる。ポリヌクレオチドは更に成熟タンパク質プラス追加5アミノ酸残基であるプロタンパク質をコード化する。プロ配列を持つ成熟タンパク質はプロタンパク質でありしばしばタンパク質の不活性形態である。一度プロ配列が切断されると、活性成熟タンパク質が残る。

【0034】

かくして例えば、本発明に基づくポリヌクレオチドは成熟タンパク質を、プロ配列を持つタンパク質を、膜貫通アンカーを持つタンパク質を、またはプロ配列、プロ配列（リーダー配列）と膜貫通アンカーを持つポリペプチドをコード化する。

【0035】

本発明のポリヌクレオチドは本発明のポリペプチドの精製を可能にするマーカ配列にコーディング配列をフレーム内で融合させる。マーカ配列は細胞宿主の場合にマーカに融合される成熟ポリペプチドの精製を提供するpQE-9ベクターで供給されるヘキサヒスチジンであり、または例えばマーカ配列は哺乳類宿主、例えばCOS-7細胞が使用されるときには赤血球凝集素（HA）標識である。HA標識はインフルエンザ赤血球凝集素タンパク質から誘導されるエピトープに一致する（I. ウィルソン、他、細胞. 37:767(1984)）。

【0036】

本発明の全長ポリヌクレオチドの断片は、全長cDNAを分離した遺伝子に対し高い配列類似性または類似の生物活性を持つ他のcDNAを分離するためにcDNAライブラリーのハイブリッド形成プローブとして使用される。この型のプローブは望ましくは少なくとも15塩基を持ち、少なくとも30塩基および5

0もしくはそれ以上の塩基を持つことさえある。プローブは更に全長転写物に対応するcDNAクローン、およびゲノムクローンまたは調節およびプロモーター領域、エキソン、およびイントロンを含むゲノムクローンまたはクローンを同定するために使用される。スクリーンの例はオリゴヌクレオチドプローブを合成するために既知のDNA配列を用いることで遺伝子のコーディング領域を分離することを含む。本発明の遺伝子の配列に相補である配列を持つ標識オリゴヌクレオチドはライブラリーのどの部材にプローブがハイブリッド形成するかを決定するためにヒトcDNA、ゲノムDNAまたはmRNAのライブラリーをスクリーンするために使用される。

【0037】

本発明に基づくポリヌクレオチドは、少なくとも15塩基、望ましくは少なくとも30塩基、また望ましくは少なくとも50塩基を持ち、それは本発明のポリヌクレオチドにハイブリッド形成し、またここで記載したようにそのポリペプチドに同一性を有し、更に活性を保持しあるいは保持しないこともある。このようなポリヌクレオチドは例えばポリヌクレオチドの回収のための図1のポリヌクレオチドのプローブとして、あるいは診断用プローブとしてもしくはPCRプライマーとして使用される。

【0038】

本発明に基づくポリヌクレオチドは、更にそのいずれかおよびすべての断片を含む図1の配列（配列識別番号1）にある程度までハイブリッド形成可能なポリヌクレオチドの混合物の形態で発生し、またそのポリヌクレオチド混合物は、少なくとも10個、多分少なくとも30個のそのような配列またはその断片を持つ混合物を含むいずれかの数のそのようなポリヌクレオチドまたはその断片より成る。

【0039】

コーディング領域はヒトゲノムのほんの小さい部分を含むために、転写領域と染色体のコーディング領域の同定と地図化は重要な関心となる。染色体のコーディング領域と転写領域を同定し標識するための対応する試薬の必要性が存在する。更にこのようなヒト配列は、染色体の地図化、ヒトの同定、組織の型と起源の

同定、法廷での同定、疾病関連遺伝子（すなわち変異、欠失、または誤った遺伝子発現に拘らず遺伝によるヒト疾病に関連する遺伝子）の染色体での位置付けなどにとって価値がある。

【0040】

本発明の各種の見地は、部分および完全 cDNA s、ゲノムDNA、mRNA、アンチセンス鎖、PCRプライマー、コーディング領域、および構築物に対応するそれぞれの個別配列を含む。発現ベクターとポリペプチド発現産物はそのような発現産物に対する抗体、とりわけモノクローナル抗体と共に本発明の範囲内にある。

【0041】

ここで使用されまた特に記載される場合を除き、すべての用語は以下の定義による。

【0042】

本発明に従って、「遺伝子」または「シストロン」という用語は、ポリペプチド類を産生することに係るDNAのセグメント（すなわちDNAセグメント）を意味する。それはコーディング領域に前後する領域（5' および 3' 未翻訳領域すなわちUTRs、または同じくリーダーおよびトレーラー配列、領域またはセグメントと呼ばれる未翻訳領域）並びに個別のコーディングセグメント（エキソン）の間の介在配列（イントロン）を含み、このイントロン領域は最終翻訳可能 mRNA 産物を形成するために転写後RNAの処理の間に典型的には除去される。もちろんその性質から cDNA はイントロン配列を含まない。

【0043】

本発明に従って、「DNAセグメント」という用語は、異なった断片の形態でまたはより大きなDNA構築物の成分としてDNAポリマーを意味し、それは少なくとも一度事実上純粋な形態で、すなわち不純にする内因性物質無しで、標準生化学方法、例えばクローニングベクターを用いる方法によりセグメントとその成分ヌクレオチド配列の同定、操作および回収を可能にする量または濃度で分離された。このようなセグメントは典型的には真核遺伝子に存在する内部未翻訳配列、すなわちイントロンにより邪魔されることのないオープンリーディングフレ

ームの形態で提供される。未翻訳DNAの配列はオープンリーディングフレームからの下流に存在し、ここでは同じものはコーディング領域の操作または発現に干渉することはない。

【0044】

本発明に基づき開示される核酸とポリペプチド発現産物、並びにこのような核酸を含む発現ベクターは「富化形態」にある。ここで使用されるように、「富化」という用語は、その物質の濃度（例えば）その天然の濃度の少なくとも約2倍、5倍、10倍、100倍、または1,000倍であり、重量で少なくとも望ましくは0.01%であり、望ましくは少なくとも重量で約0.1%であることを意味する。重量で約0.5%、1%、10%および20%の富化調製物も同じく検討される。本発明を含む配列、構築物、ベクター、クローン、およびその他の物質は有利に富化されまたは分離された形態にすることができる。例えばここに記載された差動ディスプレイ技術を経由して、リボソームRNA遺伝子と「ハウスキッピング」遺伝子に対応するクローンおよびヒトcDNA挿入片のないクローンの除去は望ましいクローン内で「富化」されるライブラリーを生じる。

【0045】

本発明に基づき開示されるDNAとRNA配列およびポリペプチドは、一般に分離形態にある。「分離された」という用語は、物質がその元の環境（例えばそれがもし自然発生のものであれば自然環境）から除去されることを意味する。例えば生体動物に存在する自然発生ポリヌクレオチドまたはDNAは分離されないが、自然システムで共存する物質のいくらかまたはすべてから分離される同じポリヌクレオチドまたはDNAは分離される。このようなDNAはベクターの一部であることができ、およびまたはこのようなポリヌクレオチドは組成物の一部であることができ、しかもそのようなベクターまたはポリヌクレオチドがその自然環境の部分でないように分離することができる。

【0046】

本発明に基づき開示されるDNAとRNA配列あるいはポリペプチドは「精製された」形態でも存在する。「精製された」という用語は完全な純度を必要としない。むしろそれは相対的な定義として意図され、これらの用語が当業者に理解

されるように高度の精製された調製物または部分的にのみ精製された調製物を含むことができる。cDNAライブラリーから分離された個体クローンは電気泳動同質性に対し従来の方法で精製された。cDNAクローンは部分的に精製された自然発生物質(メッセンジャーRNA)の操作を経由して得られる。mRNAのcDNAライブラリーへの転換により、精製個体cDNAクローンをクローン選択により合成ライブラリーから分離することができる。かくしてRNAからcDNAライブラリーを創り、続いてこのライブラリーから個体クローンを分離することにより、生のメッセージの約 10^6 倍の精製を生じる。出発物質または天然物質の少なくとも1桁の大きさ、望ましくは2桁または3桁、およびより望ましくは4桁または5桁の大きさの精製が特に考慮される。更に望ましくは、重量で0.001%、または少なくとも0.01%あるいは0.1%、更により望ましくは重量で1%またはそれ以上の純度を持つ請求されたポリヌクレオチドが特に考慮される。

【0047】

「コーディング領域」という用語はその天然ゲノム環境でその遺伝子の発現産物を自然にまたは正常にコード化するヒト遺伝子の部分、すなわち遺伝子の自然発現産物を生体内でコーディングする領域を意味する。コーディング領域は正常、変異、または変更された遺伝子からのものであることができ、あるいはDNA合成の当業者に公知である方法を用いて完全に合成されるDNA配列または遺伝子から得ることも可能である。

【0048】

この発明に従って、「ヌクレオチド配列」という用語は、デオキシリボヌクレオチドのヘテロポリマーを引用する。一般に本発明により提供されるタンパク質をコード化するDNAセグメントは、微生物またはウイルスオペロンから誘導される調節要素を含む組換え転写ユニットで発現され得る合成遺伝子を提供するために、cDNA断片と短いオリゴヌクレオチド断片を短いオリゴヌクレオチドリンカーから、または一連のオリゴヌクレオチドから組立てられる。

【0049】

「発現産物」という用語は、遺伝子の天然転写産物であり、遺伝子コード縮重

から生じた同一アミノ酸をコーディングするいずれかの核酸配列コーディング等価物であるポリペプチドまたはタンパク質を意味する。

【0050】

コーディング配列を引用するときの「断片」という用語は、その発現産物が完全コーディング領域の発現産物と同じ生物学的機能または活性を基本的に保持する完全ヒトコーディング領域以下のものを含むDNAの部分を意味する。

【0051】

「プライマー」という用語は、DNAの一本鎖で対にされ、その点でDNAポリメラーゼがデオキシリボヌクレオチド鎖の合成を開始する遊離3' OH末端を提供する短い核酸配列を意味する。

【0052】

「プロモーター」という用語は、転写を開始するためのRNAポリメラーゼの結合に係るDNAの領域を意味する。

【0053】

「オープンリーディングフレーム(ORF)」という用語は、何らの停止コドン無しでアミノ酸の一連の三文字暗号を意味し、また(潜在的に)タンパク質に翻訳可能な配列である。

【0054】

「エクソン」という用語は、成熟RNA産物で代表される非連続性遺伝子のいずれかのセグメントを意味する。

【0055】

ここで使用されるように、DNA配列への引用は一本鎖DNAと二本鎖DNAの両方を含む。かくして前後関係が他のものを指示するものでない限り、この特異的配列はこのような配列の一本鎖DNA、その補体を持つこのような配列の二重構造(二本鎖DNA)およびこのような配列の補体を引用する。

【0056】

本発明に従って、hMSCsの間葉分化プロセスに関連するcDNAsの同定に対する全体的なアプローチは、培養で成長する細胞の骨形成分化の間の遺伝子発現の測定を含んでいた。細胞は収穫され、その全RNA内容物は回収された。

次いで各種のプライマーの組合せを用いて、逆転写酵素とポリメラーゼ連鎖反応手順が対応する cDNA s を産生し増幅するために使用され、それは次いで精製されクローンされる調節された DNA を発見するためにスクリーンされた。これらのクローンは次いで配列化されコンセンサス配列を決定するために使用された（コンセンサス配列は、寄与配列が残基位置によりアラインされた後に配列内の各ヌクレオチド位置にあるもっとも普通に発生する塩基に基づく配列である）。生成する配列は次いで例えばブラストプログラム及びジェンバンクデータベースを用いて新規性と既知の配列との相同性のためにコンピュータデータベース検索を受けた。

【0057】

前記のものに従って、cDNA ライブラリーが生成され、それは図1の配列（配列識別番号1）を同定するために使用された。これらのcDNA s に基づくプローブは、従来公知のノーザンブロット分析法を用いて関連転写物を同定するために使用された。

【0058】

本発明に従って開示されるヌクレオチド配列は、図1（配列識別番号1および2）に含まれるように、臍帯血並びに骨髓のCD34運搬細胞で発現することが発見され、（ノーザンブロットハイブリッド形成分析で決定されるように）完全転写物は約1.1キロベースであった。配列は136アミノ酸のポリペプチドをコーディングするオープン/リーディングフレームを含有した（後者のアミノ酸はジェンバンクにある既知のタンパク質のいずれとも著しい相同性を何も示さず従って新規であると考えられた）。推定されるペプチド配列（図2、配列識別番号3で示されるもの）のハイドロパシー（アミノ酸配列に対する疎水性のグラフ）分析はタンパク質のN末端で19アミノ酸のシグナルペプチドを示し、これはCD34⁺細胞により分泌されていることを示唆している。この分泌特性はcDNA をヒスチジン-6標識（後者はニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより容易に精製可能にする）で標識することで、また発見されたタンパク質のC末端に対応する位置でヒトmycガン遺伝子のエピトープで確認された。組換えタンパク質がヒト293細胞で発現されたとき、それは培地に分泌されたこと

が発見された。

【0059】

ここで同定されたDNA配列それぞれ（および対応する完全遺伝子配列）はポリヌクレオチド試薬として数多くの方法で使用することができる。配列は特定の細胞型同じく遺伝子連鎖分析（多型性）で特異的mRNAの存在下での診断プローブとして使用することができる。さらに配列は遺伝疾病と関連する遺伝子領域を位置決めするプローブとして使用することができる。

【0060】

本発明のヌクレオチドと遺伝子配列はさらに染色体同定のために価値がある。各配列は個体ヒト染色体上の特定の位置を特異的に標識化し、またその位置でハイブリッド形成することができる。さらに配列は染色体上の特定の部位を同定する必要性が現在ある。本発明に基づく特異的染色体に対するポリヌクレオチドの地図化はこれらの配列を疾病、例えば骨形成または骨格異常に影響する疾病などに関連する遺伝子に相関させるための重要な第1ステップとなる。

【0061】

要約すると、ここで開示される配列からPCRプライマー（望ましくは15 - 30塩基対）を準備することにより地図化することができる。これら配列のコンピュータ分析は、さもなければ増幅プロセスを複雑にしかねない対応するゲノムDNAで1個以上のエクソンに広げないようにプライマーを急速に選択するのに使用される。これらのプライマーは、次いで個体ヒト染色体を含有する体細胞雑種のPCRスクリーニングに使用される。ここで開示される配列または部分配列に対応するヒト遺伝子を含む雑種細胞のみが増幅された断片を産生するであろう。

【0062】

体細胞雑種のPCR地図化は特定配列を特定染色体に割当てするための加速手順である。従来技術で公知のように、単一のサーマルサイクラーを用いて1日当り3個以上のクローンを割当てることができる。同じオリゴヌクレオチドプライマーで本発明を使用して、類似の方法で大きなゲノムクローンの特定の染色体またはプールからの断片のパネルで部分局在化を達成することができる。その染色体

に対して配列または配列の部分を地図化するために同様に使用できる他の地図化戦略は、*in situ* ハイブリッド形成、標識フロー分類染色体でのプレスクリーニングおよび染色体特異的DNAライブラリーを構築するためのハイブリッド形成による予備選別を含む。

【0063】

中期染色体スプレッドへのcDNAクローンの蛍光*in situ* (原位置) ハイブリッド形成法 (FISH法) は1ステップで正確な染色体位置を提供するのに使用することができる。この方法は500または600塩基ほどの短いcDNAで使用できる。しかし2000塩基対以上の大きいクローンは単純な検出に対し十分なシグナル強度でユニークな染色体位置に結合するより高い尤度を持つ。FISH法は配列がそれから誘導されたクローンの使用を必要とし、それが長ければ長いほどいい。例えば2000塩基対は良く、4000塩基対はより良く、しかし4000以上はたぶん時間の妥当な割合でいい結果を得るためには必要ではない。この技法の報告については、ヴァーマ他、ヒト染色体：基本技術のマニュアル、ペルガモン・プレス、ニューヨーク (1988) を参照されたい。

【0064】

染色体地図化のための試薬は (単一染色体またはその染色体上の単一部位を標識するために) 個別に、または (多数の部位およびまたは多数の染色体を標識するために) 試薬のパネルとして使用することができる。遺伝子の非コーディング領域に対応する試薬は事実上地図化目的のためには望ましい。コーディング配列は遺伝子ファミリー内に確実により多く保持され、かくして染色体地図化の間に交差ハイブリッド形成の機会を増加させる。

【0065】

一度配列が正確な染色体位置に地図化されると、染色体上の配列の物理的位置遺伝子地図データで相関させることができる。(このようなデータは、例えばV. マッキューシク、ヒトにおけるメンデルの遺伝的性質、で見出される (ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティ、ウエルチ・メディカル・ライブラリーを通じてオンラインで利用可能))。同じ染色体領域に地図作製される遺伝子と疾病の間の関係は次いで連鎖分析 (物理的に密接な遺伝子の同時遺伝) を通じて同定

される。

【0066】

次いで影響を受けおよび影響を受けない個体間のcDNAまたはゲノム配列に差が存在するかどうかを決定する必要がある。もしも突然変異が影響を受けた個体のいくらかまたはすべてで観察されるがその正常な個体では観察されないならば、突然変異は疾病の原因となる病原体となるであろう。

【0067】

物理的地図化と遺伝子地図化の手法での現在の解決法により、疾病と関連する染色体領域に正確に局在化するcDNAは50種乃至500種の潜在的病原性病遺伝子のどれか一つと見ることができる(これは1メガベース地図化解決と、20キロベースあたり1個の遺伝子を仮定する)。

【0068】

影響を受けおよび受けなかった個体の比較は、染色体スプレッドから可視でありあるいはcDNA配列に基づくPCRを用いて検出可能な欠失またはトランスロケーションなどの染色体内の構造的変質を一般に最初に見ることを伴う。最終的には、いくつかの個体からの遺伝子の完全な配列化が突然変異の存在を確認し、また突然変異を多形性から区別することが必要とされる。

【0069】

前記に加えて、広範囲に記載された本発明の配列は、そのいずれの方法もポリヌクレオチド配列のDNAまたはRNAへの結合に基づく三重鎖形成またはアンチセンスDNAもしくはRNAを通じて遺伝子発現を制御するために使用することができる。これらの方法での使用に適したポリヌクレオチドは通常20個乃至40個の塩基の長さであり、転写に伴う遺伝子の領域に相補であるように設計されている(三重鎖 - リー他、核酸研究、6: 3073 (1979); クーニー他、サイエンス、241: 456 (1998); またダーバン他、サイエンス、251: 1360 (1991)を参照のこと)し、あるいはまたmRNAそれ自体に相補であるように設計されている(アンチセンス - 岡野J. 神経化学、56: 560 (1991); 遺伝子発現のアンチセンス阻害薬としてのオリゴデオキシヌクレオチド、CRCプレス、ボカレイトン、フロリダ、(1998))。三重

鎖形式は最適にはDNAからのRNA転写の停止に帰着し、一方アンチセンスRNAハイブリッド形成はmRNA分子のポリペプチドへの翻訳を遮断する。いずれの方法もモデルシステムで有効であることが示された。本発明の配列に含まれる情報はアンチセンスまたは三重鎖オリゴヌクレオチドの設計に必要である。

【0070】

本発明はまた遺伝子治療に有用な用具であり、遺伝子欠損を修正するために正常な遺伝子を生体に挿入する前提条件として問題となる疾病関連遺伝子の分離を必要とする。本発明に基づくcDNAプローブの高い特異性が非常に正確なやり方でこのような遺伝子の位置を標的にすることを保証する。

【0071】

広範囲に定義されその部分配列と断片を含む本発明の配列は、更に微小生物サンプルからの個体の同定に有用である。例えば合衆国陸軍は、その兵員の同定のために制限断片長多型(RFLP)の使用を検討している。この手法では、個体ゲノムDNAは1個またはそれ以上の制限酵素で消化され、兵員を同定するためのユニーク帯を産出するためにサザンブロット上でプローブされる。この方法は失ったり、切り換えたり、あるいは盗まれたりして確信ある同定を難しくしがちな「認識票」での現在の制約に悩むことはない。本発明の配列はRFLPの追加のDNA標識として有用である。

【0072】

しかしRFLPはパターンベースの技術であり、それは配列化されるべき個体のDNA配列を必要とはしない。本発明の配列の部分は個体ゲノムの選択部分の事実上塩基単位でのDNA配列を決定する代替的手法を提供するために使用することができる。更にこれらの配列はこのような選択されたDNAを増幅し分離するPCRプライマーを調製するために使用することができる。例えば本発明の配列の一部を取り出し配列の5' および3' 末端または配列の断片から2個のPCRプライマーを調製することができる。これらは配列に対応する個体DNAを増幅するために使用される。増幅DNAは配列される。

【0073】

このようにして作られた個体からの対応するDNA配列のパネルは、各個体が

対立遺伝子の差の故でこのようなDNA配列のユニークセットを持つので、ユニークな個別的同定を提供することができる。本発明の配列は個体からまた組織からのこのような同定配列を得るための特定の利益に使用することができる。対立遺伝子変質はこれら配列のコーディング領域である程度起こり、また非コーディング領域ではより大きな割合で生じる。個体ヒトの間での対立遺伝子変質は各500塩基毎に約1回の頻度で生じる。本発明の部分を含む断片または完全コーディング配列のそれぞれは、ある程度まで個体からのDNAが同定目的と比較できることに対する標準として使用することができる。より大きな数の多型性が非コーディング領域で生じるために、より少ない数の配列が分化した個体にとって必要である。

【0074】

もし本発明に基づく配列からの試薬のパネルが個体に対するユニークIDデータベースを生成するために使用される場合には、これらの同じ試薬は後でその個体からの組織を同定するのに使用できる。生きていても死んでいてもその個体の明白な同定を極めて小さな認識サンプルから行うことができる。

【0075】

DNAベースの同定技術のも一つの使用法は法生物学においてである。PCR技術は非常に小さな生物サンプルから取られたDNA配列を増幅するのに使用できる。一つの先行技術において、遺伝子配列は大きな数の対立遺伝子変質、例えばDQ クラスII HLA遺伝子を含むものとして知られる特異的遺伝子座で増幅される(H.エルリッヒ、PCR技術、フリーマン・アンド・カンパニー(1992))。ゲノムのこの特異的領域が一度増幅されると、DQ クラスII HLA遺伝子に対応するDNAでプローブされたサザンブロット上の同定セットの帯を産生するために、それは1個またはそれ以上の制限酵素で消化される。

【0076】

本発明の配列はヒトゲノムにある追加の遺伝子座を特異的に標的とするポリヌクレオチド試薬を提供するために使用することができ、またDNAベースの法的同定の信頼度を高めることができる。非コーディング領域を標的とするこれらの配列はとりわけ適切である。前に記載の通り、実際の塩基配列情報は制限酵素生

成断片により形成されるパターンに対して正確な選択肢として同定のために使用できる。このような配列情報を得るための試薬は本発明の範囲内にある。このような試薬は完全配列、遺伝子の部分または対応するコーディング領域、もしくは少なくとも15塩基対、望ましくは少なくとも18塩基対の断片を含むことができる。

【0077】

特別な組織の源を同定できる試薬の必要性も存在する。例えばこのような必要性は、起源の不明な組織を提出された時の法廷で生じる。適切な試薬は例えば本発明の配列から調製された特別な組織に特異的なDNAプローブまたはプライマーを含むことができる。このような試薬のパネルは種によりおよびまたは器官の型により組織を同定することができる。同じようなやり方で、これらの試薬は不純物のために組織培養をスクリーンするために使用できる。

【0078】

いくつか異なる遺伝子と完全に符合する配列は染色体にハイブリッド形成することで検出できる。もし多くの染色体遺伝子座が観察されるならば、配列（または閉鎖変異体）は、1個以上の遺伝子内にある。この問題は染色体位置または全長cDNAあるいは遺伝子のプローブとしてcDNAのみの3'末翻訳部分を使用することにより回避される。3'末翻訳領域は遺伝子ファミリー内でより確実にユニークであるように見えるが、それはmRNAの領域のコーディング機能を保存するために進化の圧力が存在しないためである。

【0079】

本発明に基づき開示されるcDNAライブラリーは理想的に方向性クローニングを用いているため、cDNAの5'末端（多分コーディング配列を含むもの）または3'末端（多分非コーディング配列であるように見えるもの）のいずれかを選択的に獲得できるからである。

【0080】

ここで提供される配列情報を用いることにより、本発明のポリヌクレオチドは既知の方法を用いて天然源から誘導されまたは合成することができる。本発明の範囲内に位置する配列は前記の特異的配列に限定されないが、更にそのヒト対立

遺伝子および種の変質並びにその部分を含む。加えて、本発明は配列表に記載した塩基の特異的なポリヌクレオチド配列と関連する全コーディング配列、並びに全コーディング配列の部分を含む。対立遺伝子変質は一つの配列を同じ種のも一つの個体の配列と比較することにより日常的に決まった形で決定することができる。更にまたコドンの変動性に適応するために、本発明はここで開示された特異的配列がするのと同じアミノ酸配列をコーディングする配列を含む。換言すれば、コーディング領域で一つのコドンが同じアミノ酸をコード化するも一つのものに置換されることが特に熟慮される（コーディング領域は日常的な配列分析を通じて決定することができる）。

【0081】

cDNAライブラリーでは、提示されるmRNAの多くの種が存在する。各cDNAクローンはそれ自身の正当な理由において興味深いものであるが、更なる試験が行われる前にライブラリーから分離されねばならない。いずれかの特異的なcDNAを配列するために、それはあらゆる他の配列から除去され分離され（すなわち単離され精製され）ねばならない。これは当業者にとって公知である多くの方法により達成することができる。これらの手順は通常対象となるcDNAを含む細菌コロニーの同定とその細菌の更なる増幅を伴う。一度cDNAが混合コロニーライブラリーから分離されると、それはヌクレオチド配列化などのような更なる手順の鋳型として使用することができる。

【0082】

本発明はまた前に広範囲に記載されたように1個またはそれ以上の配列を含む組換え構築物を含む。この構築物はプラスミドまたはウイルスベクターなどのようなベクターを含み、その中に本発明の配列が前進または逆配向で挿入された。本実施例の望ましい見地において、構築物は更に調節配列より成り、それは例えば操作可能に配列に連鎖されるプロモーターを含む。多数の適切なベクターとプロモーターは当業者にとっては公知であり、また商業的に利用可能である。下記のベクターは例として提供される。細菌性：pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a（ストラタジーン）；pTrc9

9A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (ファルマシア)。原核系: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (ストラータジーン); pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (ファルマシア)。

【0083】

かくして本発明はこのような構築物または配列のみに限定されることなく、プラスミド、ウイルス、またはいずれかの発現ベクターを含む発現伝達体を含み、細胞トリポソームを含み、本発明に基づき開示されるように核酸、ヌクレオチド配列、DNA s、RNA s、またはその断片のいずれかを含む。更にそのような配列がコーディング配列または非コーディング配列であるかおよびそのようなコーディング配列がここで開示される発現産物のすべてまたは部分をコードするかどうかにかかわらず、そのような発現産物またはその断片がここで開示される発明と同調しある効用を示す限りにおいてこれは真実である。かくして本発明は、適切な発現システム、例えば無細胞システムまたは試験管内発現システムにある時にヒトタンパク質を発現する分離されたDNA配列、または核酸を含む一方、このようなシステムは適切な発現伝達体またはベクターに、あるいはその部分に含まれ、それらは細胞、プラスミド、ウイルスまたはその他の操作可能な発現ベクターである。

【0084】

これらの発現システム、とりわけ発現伝達体の部分である発現システムは、一般に本発明に基づき開示された遺伝子発現産物およびタンパク質をコードする遺伝子と生体内で通常関連するものとは異なるプロモーターを含む何らかのプロモーター領域を必要とする。プロモーター領域は選択標識と共にCAT (クロラムフェニコール転移酵素) ベクターまたは他のベクターを用いていずれか望ましい遺伝子から選択することができる。2個の適切なベクターはpKK232-8とpCM7である。特に指名された細菌プロモーターはlacI, lacZ, T3, T7, gpt, ラムダP_Rおよびtrcである。真核プロモーターはCMV極初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルスからのLTRs、およびマウスメタロチオネイン-1の各プロモーターを含む。適切

なベクターとプロモーターの選択は十分当業者の水準内にある。

【0085】

更なる実施例において、本発明は前記構築物を含む宿主細胞に関する。宿主細胞は例えば哺乳類細胞などの高次の真核細胞、または酵母細胞などの低次の真核細胞であり得るし、あるいは宿主細胞は細菌細胞などのような原核細胞であることもできる。構築物の宿主細胞への導入はリン酸カルシウム形質移入、DEAE、デキストラン仲介形質移入、または電気穿孔法で実行することができる(L. デービス、M. ジブナー、I. バッティ、分子生物学における基本方法(1986))。

【0086】

宿主細胞における構築物は組換え配列によりコードされる遺伝子産物を産生するために従来の方式で 사용할 ことができる。選択肢として、一度配列がcDNAから公知であり、または純粋産物の単離で公知であるコード化ポリペプチドは手動または自動のいずれかの従来のペプチド合成法により合成で産生することができる。

【0087】

かくして本発明に基づいて、一度コーディング配列が公知となり、または遺伝子がポリペプチドをコード化してクローンにされると、分子生物学での従来の技術はポリペプチドを獲得するために使用できる。より一般的には、本発明は前記ポリペプチドの断片、同じくその誘導體と機能的類似体を含むここで開示されたいずれかおよび個々のDNAまたはRNA配列によりコードされるすべてのポリペプチドを含む。

【0088】

もっとも単純な水準では、アミノ酸配列は商業的に利用できるペプチド合成装置を用いて合成できる。これは小さなペプチドおよびより大型のポリペプチドの断片を産生するのにとりわけ有用である。(断片は例えば天然ポリペプチドに対する抗体を生成するのに有用である)。

【0089】

選択肢として、望ましいポリペプチドをコード化するDNAは宿主生体に挿入

し発現することができる。生体は細菌、酵母、細胞系、または多細胞植物もしくは動物である。文献は適切な宿主生体と発現技術が数多くあることを示している。例えばポリヌクレオチド(DNAまたはmRNA)がそれを発現する哺乳類の筋組織に直接注射することを可能にする。この方法は動物にポリペプチドを送達するためにまたは外部ポリペプチドに対する免疫応答を生成するために使用できる。ヴォルフ他、サイエンス、247: 1465(1990); フェルグナー、他、ネイチャー、349: 351(1991)。選択肢として、コーディング配列は適切な調節領域(すなわち構築物)と共にベクターに挿入することができ、それは次いで細胞を形質移入するために使用される。(細胞がより大きな生体の部分であるまたは部分でない)細胞は次いでポリペプチドを発現する。

【0090】

本発明は更に図2のアミノ酸配列(配列識別番号3)並びにこのようなポリペプチドの断片、類似体および誘導体をもつポリペプチドに関する。

【0091】

図2のポリペプチド(配列識別番号3)を引用する際の「断片」、「誘導体」および「類似体」という用語は、前記ポリペプチドと同じ生物機能または活性を基本的に保持するポリペプチドを意味する。かくして類似体は、活性成熟ポリペプチドを産生するためのタンパク質部分の切断により活性化できるプロタンパク質を含む。このような断片、誘導体および類似体は天然ポリペプチドの活性が保持されるよう図2のポリペプチド(配列識別番号3)に十分に類似するような性質をもつものでなければならない。

【0092】

本発明のポリペプチドは組換えポリペプチド、天然ポリペプチドまたは合成ポリペプチドであり、望ましくは組換えポリペプチドである。

【0093】

ここで使用される「組換え」は、組換え(例えば細菌または哺乳類)発現システムからタンパク質が誘導されることを意味する。「微生物性」は細菌または真菌(例えば酵母)発現システムで作られる組換えタンパク質を引用する。産物として、「組換え微生物性」は天然内因性物質を基本的に欠いており関連天然グリ

コシル化を伴わないタンパク質を意味する。大抵の細菌培養、例えば大腸菌で発現されるタンパク質はグリコシル化修飾を欠いており、酵母で発現されるタンパク質は哺乳類細胞で発現されるものとは異なるグリコシル化パターンを持つであろう。

【0094】

図2のポリペプチド(配列識別番号3)の断片、誘導体または類似体は、(i)1個またはそれ以上のアミノ酸残基が保存または非保存アミノ酸残基(望ましくは保存アミノ酸残基)で置換され、そのような置換アミノ酸残基が遺伝暗号(コード)でコード化されまたはコード化されないもの、または(ii)1個またはそれ以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの、あるいは(iii)成熟ポリペプチドがポリペプチドの半減期を増加する化合物などの一つの化合物(例えばポリエチレングリコール)に融合されるもの、もしくは(iv)追加アミノ酸がリーダー配列または分泌配列、もしくは成熟ポリペプチドまたはプロタンパク質配列の精製に使用される配列、などのような成熟ポリペプチドに融合されるものである。このような断片、誘導体および類似体はここでの教訓を考慮して当業者の能力内にあるものと見做される。

【0095】

本発明のポリペプチドは望ましくは分離形態で提供され、また望ましくは等質性に精製される。ポリペプチドに適応される時には、「分離された」という用語はすでに述べられた意味を有する。

【0096】

本発明のポリペプチドは図2のポリペプチド(とりわけ成熟ポリペプチド)、同じく図2のポリペプチド(配列識別番号3)に対し少なくとも90%の同一性、または図2のポリペプチド(配列識別番号3)に対し少なくとも95%の同一性、更により望ましくは図2のポリペプチド(配列識別番号3)に対し少なくとも98%の同一性を持ち、更に一般に少なくとも30個のアミノ酸またより望ましくは少なくとも50個のアミノ酸を持つポリペプチドを含む。

【0097】

本発明のポリペプチドの断片または部分はペプチド合成により対応する全長ポ

リペプチドを産生するために使用される。従ってこの断片は全長ポリペプチドを産生するための中間体として使用される。本発明のポリヌクレオチドの断片または部分は本発明の全長ポリヌクレオチドを合成するために使用される。

【0098】

本発明に従って、図2に開示されるポリペプチドは、ヒト間葉乾細胞を含む試験管内増殖培地に存在するときに増殖刺激活性を持つ。かくしてこのような幹細胞は、ここで開示されるポリペプチドの存在下で（図3で示されるように）より速い速度で複製するように誘導される。かくして293細胞で発現された組換えC17タンパク質はアフィニティ精製されヒトMSC（hMSC）培養に加えられた。無血清条件で維持されたhMSCsは、典型的に基礎増殖活性を殆んど示さない。ここで胎児ウシ血清（FBS）のdos滴定が正の対照として使用された。組換えC17タンパク質は血清培地を比較して10%の胎児ウシ血清と同等の水準で約10倍hMSC増殖を刺激した。C17ポリペプチドは培地のml当たり少なくとも1ピコグラム（pg）の濃度で培地に存在する。

【0099】

本発明は更に本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクターで遺伝子操作される宿主細胞および組換え技術による本発明のポリペプチドの産生を含むベクターに関する。

【0100】

宿主細胞は、本発明のベクターで遺伝子操作（形質導入または形質転換もしくは形質移入）され、そのベクターは例えば、クローニングベクターまたは発現ベクターであり、そのいずれかはプラスミド、ウイルス粒子、ファージなどの形態にある。操作宿主細胞は本発明のプロモーターを活性化し、形質転換細胞を選択し、または遺伝子を増幅するために適切に修飾された従来の栄養培地で培養することができる。温度、pHその他の培養条件は発現のために選択された宿主細胞でこれまでに使用されたものであり当業者にとっては周知である。

【0101】

本発明のポリヌクレオチドは組換え技術によるポリペプチドの産生に使用される。かくして例えば、ポリヌクレオチドはポリペプチドを発現する各種の発現ベ

クターのいずれか一つに含まれる。このようなベクターは染色体、非染色体および合成DNA配列を含み、例えばSV40の誘導體；細菌プラスミド、ファージDNA；バキュロウイルス・酵母プラスミド；プラスミドとファージDNA、腫瘍疹、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病などのウイルスDNAの組合せから誘導されるベクターを含む。しかし他のベクターでもそれが宿主で複製可能また生存可能である限り使用することができる。

【0102】

本発明に従って、適切なDNA配列、またはセグメントが各種の手順でベクターに挿入される。一般にDNAは公知の手順で適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。このような手順その他は当業者に周知であると見做される。

【0103】

発現ベクターでのDNA配列はmRNA合成に指向するように適切な発現制御配列（例えばプロモーター配列）に操作可能に連鎖される。このようなプロモーターの代表的な例として以下のものがあげられる：LTRまたはSV40プロモーター、大腸菌lacまたはtrp、原核または真核細胞もしくはそのウイルスで遺伝子発現を制御することで知られるファージラムダP_Lプロモーターとその他のプロモーター。発現ベクターは更に翻訳開始および転写終結因子のためのリボソーム結合部位を含む。ベクターはまた増幅発現のための適切な配列を含む。

【0104】

加えて、発現ベクターは望ましくは形質転換宿主細胞の選択のために表現型形質を提供する1個またはそれ以上の選択標識遺伝子を含み、それは真核細胞培養に対するジヒドロ葉酸レダクダーゼまたはネオマイシン耐性など、あるいは大腸菌でのキトラサイクリンまたはアンピシリン耐性などの標識遺伝子である。

【0105】

前に記載の適切なDNA配列を含むベクター、同じく適切なプロモーターもしくは制御配列は宿主にタンパク質の発現を可能にするため適切な宿主を形質転換するために使用される。

【0106】

適切な宿主の代表的な例としては、下記のものがあげられる：例えば大腸菌、

ストレプトミセス属、ネズミチフス菌などの細菌細胞；酵母などの真菌細胞；シヨウジョウバエS2およびスポドプテラSf9などの昆虫細胞；CHO、COSまたはBOWESメラノーマなどの動物細胞；アデノウイルス；植物細胞、等。適切な宿主の選択はここでの教示から当業者の範囲内にあるものと見做される。

【0107】

「組換え発現伝達体またはベクター」はDNA(RNA)配列からポリペプチドを発現するプラスミドまたはファージあるいはウイルスまたはベクターを引用する。発現伝達体は(1)遺伝子発現で調節役割を持つ遺伝要素、例えばプロモーターまたはエンハンサー、(2)mRNAに転写されタンパク質内に翻訳される構造またはコーディング配列、(3)適切な転写開始と終結配列、のアセンブリより成る転写ユニットを含むことができる。酵母または真核発現システムでの使用を意図された構造ユニットは、望ましくは宿主細胞により翻訳タンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。選択肢として、組換えタンパク質がリーダー配列または輸送配列なしで発現される場合には、それはN-末端メチオニン残基を含むであろう。この残基は最終産物を提供するために発現された組換えタンパク質から続いて切断されることもされないこともある。

【0108】

「組換え発現システム」は組換え、転写ユニットを染色体DNAに安定して組込んだ宿主細胞、または組換え転写ユニットを染色体外に輸送する宿主細胞を意味する。細胞は原核性でも真核性でもある。ここで定義される組換え発現システムは発現されるDNAセグメントまたは合成遺伝子に連鎖される調節エレメントの導入に際し異種タンパク質を発現するであろう。

【0109】

成熟タンパク質は適切なプロモーターの制御下で哺乳類細胞、酵母、細菌、または他の細胞で発現できる。無細胞翻訳システムも本発明のDNA構築物から誘導されるRNAsを用いてこのようなタンパク質を産生するために使用できる。原核および真核宿主と共に使用される適切なクローニングおよび発現ベクターはサムブルック、他、分子クローニング：研究所マニュアル、第2版(コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989)に記載されており、その開示

はここで引用例として組み込まれている。

【0110】

高次真核細胞による本発明に基づくポリペプチドをコード化するDNAの転写は、エンハンサー配列をベクターに挿入することで増加することができる。このようなエンハンサーはある時期に周知となっており、転写を増加するためのプロモーターに作用する通常どこでも10乃至300塩基対のDNAのシス作用エレメントである。普通の例はSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスで見られるエンハンサーである。

【0111】

一般に組換え発現ベクターは宿主細胞、例えば大腸菌のアンピシリン耐性遺伝子とビール酵母菌 TRP1 遺伝子の形質転換を可能にする複製起点および選択標識、および下流構造配列の直接転写に向けて高度発現遺伝子から誘導されるプロモーターを含む。このようなプロモーターはいろいろのものの中でも例えば3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、因子、酸性ホスファターゼ、または熱ショックタンパク質など解糖酵素をコードするオペロンから誘導することができる。異種構造配列は翻訳開始と終結配列、および望ましくは細胞周辺腔または細胞外培地に翻訳タンパク質の分泌を向ける能力のあるリーダー配列で適当な相で組立てられる。選択肢として、異種配列は例えば発現された組換え産物の安定化または単純な精製などの望ましい特性を与えるN-末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコード化することができる。

【0112】

細菌用に有用な発現ベクターは、望ましいタンパク質をコード化する構造DNA配列を適切な翻訳開始および終結シグナルと共に機能性プロモーターを持つ操作可能リーディング相に挿入することにより構築される。ベクターはベクターの維持を確実にし、もし望ましければ宿主内で増幅を提供するために1個またはそれ以上の表現型選択標識と複製起点を含むであろう。形質転換に適した原核宿主は、他のものも選択の問題として採用され得るけれども、大腸菌、枯草菌、ネズミチフス菌、およびシュードモナス属、ストレプトミセス属、ブドウ球菌属の属

にある各種の種を含む。

【0113】

代表的ではあるけれどもそれに限定されない例として、細菌用の有用な発現ベクターは周知のクローニングベクター pBR322 (ATCC 37017) の遺伝子エレメントを含む商業利用可能なプラスミドから誘導される選択標識と細菌複製起点を含むことができる。このような商業的ベクターは、例えば pKK223-3 (ファルマシア・ファイン・ケミカルズ、ウプサラ、スエーデン) と GEM 1 (プロメガ・バイオテック、マジソン、ウイスコンシン、アメリカ合衆国) を含む。これら pBR322 「バックボーン」部分は適当なプロモーターと発現される構造配列と組み合わせられる。

【0114】

適当な宿主菌株の形質転換と適当な細胞密度への宿主菌株の増殖に続き、選択されたプロモーターは適切な手段 (例えば温度移行または化学的誘導) により活性化され、細胞は追加の期間培養される。細胞は典型的には遠心分離で収穫され、物理的または化学的手段で破壊され、精製する粗抽出物は更なる精製のために保持される。

【0115】

各種の哺乳類細胞培養システムは、同じく組換えタンパク質を発現するために使用することができる。哺乳類発現システムの例は、グラズマン、細胞、23:175 (1981) に記載されたサル腎臓線維芽細胞の COS7 系、および適合ベクターを発現できる他の細胞系、例えば C127、3T3、CHO、HeLa および BHK 細胞系を含む。哺乳類発現ベクターは複製起点、適切なプロモーターとエンハンサー、また何らかの必要リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与体と受容体部位、転写終結配列、および 5' フランキング非転写配列を含むであろう。SV40 ウイルスゲノムから誘導される DNA 配列、例えば SV40 起点、初期プロモーター、エンハンサー、スプライス、およびポリアデニル化部位は必要とされる非転写遺伝子エレメントを提供するために使用される。

【0116】

細菌培養で産生される組換えタンパク質は細胞ペレットから最初の抽出で便利に分離され、続いて塩析、水性イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィーの一つまたはそれ以上のステップが行われる。必要に応じて成熟タンパク質の立体配置を完成するために、タンパク質リフォールディングステップを使用することができる。最後に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が最終精製ステップで使用できる。タンパク質の発現に使用される微生物細胞は凍結融解反復、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含むいずれかの便利な方法で破壊することができる。

【0117】

タンパク質、その断片または他の誘導体あるいはその類似体もしくはそれらを発現する細胞は、それらへの抗体を産生する免疫原として使用できる。これらの抗体は、例えばポリクローナル、モノクローナル、キメラ、一本鎖、Fabフラグメント、またはFab発現ライブラリーの産物であることができる。従来公知の各種の手順はポリクローナル抗体の産生に使用される。

【0118】

本発明の配列に一致するポリペプチドに対して精製された抗体は、ポリペプチドを動物に直接注射することで、またはポリペプチドを動物、望ましくは非ヒトに投与することで得ることができる。このようにして得られた抗体は次いでポリペプチド自身に結合する。このようにして、ポリペプチドの断片のみをコード化する配列においてもなお全天然ポリペプチドに結合する抗体を精製するために使用することができる。このような抗体は次いでポリペプチドを発現する組織からポリペプチドを分離するために使用できる。更に大きな数のポリペプチドに特異的なこのような抗体のパネルはこのような組織を同定し分化するために使用できる。

【0119】

モノクローナル抗体の調製のために、連続細胞系培養で産生される抗体を提供するいずれかの方法を使用することができる。その例はハイブリドーマ法（ケーラーおよびミルシュタイン、1975、ネイチャー、256:495-497）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（コスボー他、1983、今日の

免疫学、4:72)、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ法(コール、他、1985、モノクローナル抗体と癌治療、アラン・R・リス、インコーポレイテッド77-96ページ所収)を含む。

【0120】

一本鎖抗体の産生を記載した方法(合衆国特許第4,946,778号)は本発明の免疫ポリペプチド産物に対する一本鎖抗体を産生するために適用できる。

【0121】

この抗体は本発明のタンパク質配列の局在化と活性に関する方法として、例えばこれらのタンパク質をイメージし、適当な生理学的サンプルおよび類似のものの中でその水準を測定する方法に利用できる。

【0122】

もち論、図2のC17タンパク質の配列を知ることは、当業者に容易に間葉幹細胞、同じく他の細胞型の表面に適切な受容体を位置せしめ、それによりこのような細胞の増殖を調節する能力を付与するであろう。

【0123】

加えて、本発明は更に開示されたヌクレオチドとポリペプチドの配列に相同の配列を包含するために、構造状でそれ自身をタンパク質状にすることなくC17タンパク質の機能を擬態することのできる小分子を含む類似の機能領域を含む構造的に類似の構造類似体を誘導することがもち論可能になるであろう。かくして小さな有機分子はた易くここで開示されたC17タンパク質の領域を擬態するために、コンピュータプログラムとアルゴリズムを用いる分子モデリングにより、または組合せ法により開発されるであろう。このような擬態構造は更に本発明の開示により包含されるものと見做される。このような化合物は容易に合成できまた細胞増殖培地に加えることができ、これにより関連する受容体を刺激し細胞増殖率を増強する。このような細胞増殖を増強する方法はここで開示される発明の範囲内にあるものと見做される。

【0124】

このような増殖作用は細胞増殖刺激受容体を細胞の表面に位置付けるために使用できる。ここで細胞は適当な培地で増殖することができ、培地には適切な量の

標識C17タンパク質、またはその相同体、あるいはその小さな化学的類似体が加えられ、次いで前記相同体または類似体が細胞の増殖を刺激できるかどうかを決定する。もし刺激できるならば、その類似体は更に適切な標識形態；典型的には化学者に周知の通常的手段で標識された形態に導入することができ、このような標識は放射能標識法と非放射能標識法の両方を含み、また次いで表面受容体などに位置するように細胞表面に表面受容体を結合させるように各種の時間帯で培地に留まるようにする。これに続いてそれらが表面受容体か他のものかに拘らず、受容体の分離、同定および特徴づけを可能にする通常の方法が使用できる。このようにして各種細胞型の増殖刺激受容体が決定できる。

【0125】

本発明の手順を実行するに際して、特殊な緩衝液、培地、試薬、細胞、培養条件その他は限定するものではなくて、議論が提示される特殊な前後関係の中で当業者が関心または価値があると認識するすべての関連する物質を含むように読み取られるべきであることはもち論理解されるべきである。例えば、一つの緩衝システムまたは培養培地をも一つのものに置換してそれでもなお同一ではないにしても類似の結果を達成することがしばしば可能である。当業者はこのようなシステムと方法についての十分な知識を持ち、そのため過度の実験をすることなくここで開示される方法と手順を使用して当業者の目的に最適に役立つようにこの置換を行うことができるであろう。

【0126】

本発明の特異的实施例はこれから更に下記の非制限的实施例により詳細に記載され、本発明の教示の追加および異なる実施例が間違いなくそれ自身を当業者に提案し、また他の実施例がここで開示されるものから十分に推論されるということが評価されるであろう。

【0127】

方法と材料

臍帯血細胞とCD34⁺細胞の分離

臨月の新生児からの凍結臍帯血細胞がユニバーシティ・オブ・アリゾナの臍帯血バンクから購入された。CB（臍帯血）の3 - 4単位からの単核細胞（MNC

)はプールされ、CD34前駆細胞分離キット(カリフォルニア、オーバーン、ミルテニィ・バイオテック)で配設された抗CD34抗体(クローンQBEND/10)で標識された。200万個までのMNCでVariomACSシステム(ミルテニィ・バイオテック)で組立てられたLS⁺カラムを通過させた。磁気ビードで標識されカラムに保持されたCD34⁺細胞は磁石から移動後にカラムから溶離細胞により分離された。流動(FT)画分内のCD34⁺細胞を確実に除去するために、これらのFT細胞は前に第2カラムを通過された。この2回の枯湯後のFT画分はCD34⁺細胞集団として使用された。第1および第2カラムから分離されたCD34⁺細胞はプールされた。各集団のCD34⁺細胞の内容物は蛍光標示式細胞分取器(FACS)染色を用いてモニターされた(下記参照)。大部分の細胞は直ちにTRIzol試薬(メリーランド、ゲイザーズバーグ、Gibco/BRL)で溶離された。

【0128】

他のヒト細胞

健康な供与体の骨髄からのCD34⁺細胞は連邦と州規則に従ってピュアセル・カンパニー(カリフォルニア、サンマテオ)により同様に分離された。我々はまた健康なボランティアからのmPBからのヒトCD34⁺細胞を使用した。連続G-CSF処置の5日後、白血球交換細胞が得られた。CD34⁺とCD34⁻細胞はアイソレックス300システム(カリフォルニア、アービン、ネクセル/バクスター)を用いて同じように分離された。骨髄誘導間葉幹細胞(MSC)は分離され、文献(ピッテンジャー、サイエンス、284:143(1999))に記載の通り培養で拡張された。

【0129】

CD34⁺細胞のFACS分析

細胞分離前および後のCB細胞はR-フィコエリトリン(R-PE)複合CD34抗体(カリフォルニア、サンホセ、ベクトン・ディキンソン・免疫システム[BDIS]、クローンHPCA-2)で標識された。HPCA-2はQBEND/10で認識されたものとは異なるCD34エピトープを認識し、それは細胞を精製するために使用される。抗体標識細胞はBDIS FACSカリバーまた

は488nmに同調されたイオンアルゴンレーザーを備えたヴァンテージ装置で分析された。固体MNCの特異的CD34染色は(R-PEに対し)FL2チャンネルに記録された。非特異的染色(バックグラウンド)は0.1%であった。細胞分離前のCD34⁺細胞の内容物は0.4+/-0.1%(n=3)であり、従来の公開情報と一致した(カイロおよびワグナー、血液、90:4665-4678(1997))。典型的には、CD34⁺調製物内でのCD34⁺細胞の割合は85.0%であり、またCD34⁻画分ではそれは約0.1%であった(バックグラウンド水準)。処理された30個のCBサンプルの間で、2,3個の細胞はこの基準に合致せず、処分された。

【0130】

相補DNA(cDNA)合成

全RNAはTRIzol試薬(Gibco/BRL)を用いて分離された。200マイクログラムの全RNAはいくつかの調製物からプールされた4,000万個のCD34⁺細胞から分離された。約2マイクログラムのポリA⁺RNAがmRNA分離ミディキット(カリフォルニア、バレンシア、キアーゲン)を用いて精製された。二本鎖cDNAはスーパースクリプトII逆転写酵素とランダムヘキサマー(Gibco/BRL)を含むcDNA合成システムを用いて調製された。CD34⁺とCD34⁻細胞から誘導されるRNAサンプルは絶えず平行して処理された。

【0131】

RDA遺伝子断片の生成と分析

代表的差分分析(RDA)アンプリコン調製および差引きハイブリッド形成法が文献記載の通り行われた(リシチン他、サイエンス259:946-951(1993));ヒューバンクおよびシャッツ、核酸研究、22:5640-5648(1994)が、より短いPCRサイクル(95、30秒、72、2分)がアンプリコン(差引き前)および差引き産物(差引き後)の調製のために作用された点のみ異なっていた。3回の差引きの後、別の帯がアガロースゲルで明らかとなった。第3(および最終)差引き産物(DP3)は(アダプターを除去しGATCオーバーハングを生成する)DpnIIで消化され、次いでBamHI

消化pUC18ベクターにクローンされた。500個以上のクローンが大腸菌のDH5の菌株を連続DNAの小さなアリコートで形質転換した後に得られた。最初に55個の個体クローンが無作為に摘み取られた。個体クローンの挿入片はPCR増幅され配列化された。配列はまずBLASTNおよびBLASTXアルゴリズムを用いてジェンバンク非冗長(NR)データベースに対して検索された(アルトシュル他、核酸研究、25:3389-3402(1997); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。著しい付合を持たないものは新規であると考えられた。新規な配列は次いでBLASTNアルゴリズムを用いてジェンバンクESTデータベース(dbEST)に対して検索された。

【0132】

RT-PCRのためのオリゴヌクレオチド

CD34 cDNA増幅のためのプライマー(298塩基対)は以下の通りである。

【0133】

CD34-5 : CTGTGTCTCAACATGGCA-3 (配列識別番号4)

CD34-3 : GCCTTGATGTCACCTTAGG-5 (配列識別番号5)

C17 cDNA増幅のためのプライマー(286塩基対)は以下のものである。

【0134】

C17-5 : GATCACCCGCGACTTCAACC (配列識別番号6)

C17-3 : TGGCAGGACCGTAGTCACTG (配列識別番号7)

ベータ-2-ミクログロブリン(対照としての2M)cDNA増幅のためのプライマー(270塩基対)は以下のものである。

【0135】

2M-5 : TCTGGCCTTGAGGCTATCCAGCGT (配列識別番号8)

2M-3 : GTGGTTCACACGGCAGGCATACTC (配列識別番号9)

C17 cDNAを含有するプラスミド

C17 cDNA断片(290塩基対)を含有する我々のRDAクローンに加えて我々はジ・インターナショナル・モレキュラー・アナリシス・オブ・ジーン・

エクспRESSION (IMAGE) コンソーシアム (遺伝子発現 国際分子分析 借款団) のESTクローンの販売業者であるリサーチ・ジェネティクス, インコーポレイテッド (アラバマ、ハンツビル) からヒトESTsを含む5個のプラスミドを購入した (表1)。IMAGEクローン786066は最長の挿入片 (~1キロベース) を持ち、続く分析のためのC17コーディング配列の源として使用された。

【0136】

ヒト細胞での組換え遺伝子発現

IMAGEクローン786066からのC17の完全コーディング領域はPCRで増幅され、またEcoRIおよびBamHI部位で哺乳類発現ベクターpCDNA3.1/myc-HisB (カリフォルニア、カールスバッド、インヴァイトロジェン) に骨組のできた状態でクローンされた。生成するプラスミドはpCMV.C17/myc/hisと名付けられる。この構築物から発現される組換えC17タンパク質はC末端でのヒトC-mycエピトープと6個のヒスチジン残基 (His6) (下記の配列でイタリック体のもの) で標識された。

【0137】

この結果、31個のアミノ酸

(VDPSSVPSFLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH) (配列識別番号10)

【0138】

がC17のC末端に加えられた。

【0139】

ヒト293誘導BOSC23細胞はリン酸カルシウム沈殿により形質移入された (チェン他、ネイチャー・バイオテクノロジー、14:606 (1996) ; チェン他、遺伝子療法、4:1013 (1997))。形質移入の48時間後、細胞と馴化培地は収集された。細胞はタンパク質阻害薬カクテル (コンプリート™)、ロシュ・バイオケミカルズ) の存在下で培養皿からかき落とされた。細胞は塩化ナトリウム150mM、トリス塩酸20mM (pH7.4)、グリセロール10%、NP40、1%、EDTA10mM、NaVO₃、2mM、フッ化

ナトリウム100mM、およびコンブリート™を含む緩衝液に溶離された。溶離液は14,000rpm、30分、4℃での遠心分離で清澄化された。細胞抽出物および馴化培養培地は還元条件の下でサンプル緩衝液で変性され、SDS-トリス/グリシン緩衝液で4-20%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動された。rC17の産生はc-mycまたはHis6エピトープ(インヴァイトロジェン)に対する抗体でウェスタンブロットによりモニターされた。

【0140】

染色体マッピング

スタンフォードG3ヒト・ハムスター放射線雑種細胞(RH)パネルがリサーチ・ジェネティクスから購入された。2個の対のPCRプライマーはC17cDNAの5'未翻訳領域に基づいて設計された。

【0141】

TTTGATTTTCATCACCTTTC (配列識別番号11)

および CTGGTTTAATGGAGTAATGG (配列識別番号12)

GTTAGATACACAGCATGTTGA (配列識別番号13)

および GACAGTGAAGAAAGTCTGTG (配列識別番号14)

各対はハムスターからではなくヒトからのゲノムDNA鋳型で~200塩基対断片を特異的に増幅した。PCR反応は下記の条件、つまり94℃、20秒; 55℃、20秒; 72℃、30秒の30サイクルの下でDNA鋳型の25ng(ナノグラム)を用いて行われた。プライマーの両方のセットは同一の結果を示した。PCR反応の結果は(1を正とし0を負として)表にされ、スタンフォード・ヒューマン・ゲノム・センター・RHサーバーに提出された(<http://www.shgc.stanford.edu/>)。6以上のLODスコアは重要であると考えられる。

【0142】

【表1】

C17 RDA断片に関するヒトESTエントリー

EST Id	誘導された組織	スコア (ビット)	E値	IMAGE クローン#	配列化挿入片 (塩基対)	推定挿入片 (塩基対)
AA448744	9週全胚	573	e-132	786066	431	ND
T81361	胎児肝臓/脾臓	297	5e-79	110792	397	830
T82005	胎児肝臓/脾臓	295	2e-78	110293	436	520
AA460463	9週全胚	143	2e-32	796569	464	ND
AA461037	9週全胚	143	2e-32	796773	549	ND

【0143】

C17 遺伝子断片 (290 塩基対) は BLASTN アルゴリズムを使用して dbEST に対して検索された。使用された cDNA ライブラリー、スコアおよび E 値のより詳細については <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> を参照のこと。

ND: 5 または 3 末端のいずれかからの挿入片を部分的に配列化した寄託者によって決定されないもの。検索の時点 (1998 年 7 月) で、全体で 2,072,964 EST (ヒトおよび非ヒト) エントリーが寄託された。

【0144】

【実施例】

実施例 1

CD34⁺造血細胞での C17 の望ましい遺伝子発現は下記の通り立証された。RT-PCR (逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応) が CD34⁺ または CD34⁻ 細胞からの全 RNA および 2 個の C17 特異的プライマー (290 塩基対 C17 RDA 断片の配列に基づくもの) を用いて行われた。C17 遺伝子発現は CB CD34⁺ 細胞で容易に検出されたが CD34⁻ 細胞集団では検出できなかった。類似の RT-PCR 結果が mPB からの細胞で、同じく骨髄からの細胞で得られた。従って、C17 遺伝子発現は、HSPC を含むものとして知られる 3 個の源、CB、BM および mPB から分離される CD34⁻ 細胞集団に制約される。

【0145】

未処理で培養された CD34⁺ 細胞の C17 遺伝子発現がノーザンプロットで

分析された。BM CD34⁺細胞は異なるサイトカインで2個の培養条件の下で培養された。第1条件の下では、BM CD34⁺細胞はTPO, SCFおよび、幹細胞の維持と前駆細胞の拡張を支持するものとして知られる組み合わせのFlt3/Flk2リガンド(FL)で処理された(ルーエンス他、血液、91:1206-1215(1998);カウシャンスキー、血液、92:1-3(1998))。第2条件の下では、細胞は5個の造血コロニー刺激因子(IL-3、IL-6、G-CSF、GM-CSFおよびEPO)で処理された。これらは方向づけられた前記細胞を拡張し細胞分化を刺激し、HSPCのミエロイド/エリスロイド系列への分化とCD34⁺細胞減少を来たすものとして知られている(ルーエンス他、1998)。培養され未処理のCD34⁺細胞でのC17遺伝子発現はC17 RDA断片(290塩基対)をプローブとして使用するノーザンブロットで分析された。単一の~1.0キロベースの顕著な帯が未処理BM CD34⁺細胞並びに培養細胞で観察され、それはC17遺伝子を各種の水準で発現した。7日乃至15日の培養後、C17 mRNA水準は条件#1では上昇し、一方それは条件#2の下では僅かに減少した。

【0146】

正常な組織では、精製ポリA+RNAを含むクロンテック多重組織ブロットを使用して、C17発現はヒト骨髄および非常に弱いもののリンパ節で検出されたが、脾臓、胸腺、胎児肝臓およびPBLではノーザンハイブリッド形成で検出できなかった。同じハイブリッド形成で、C17はいくつかのヒト癌細胞系: HeLa S3(頸部癌腫)、A549(肺癌腫)、G-361(黒色腫)、SW480(結腸直腸腺癌)、HL-60(前骨髄球白血病)、K-562(慢性骨髄性白血病)、Molt-4(リンパ芽球性白血病)およびRaji(バーキットリンパ腫)、これらの癌細胞系からのポリA+RNAを含む一つのブロットでは検出できなかった。加えて、ノーザンブロットとRT-PCR分析は、C17遺伝子転写物が間葉幹細胞には存在しなかったことを示し、これらは骨髄のHSPCに非常に近接して存在すると考えられている(ビッテンジャー他、1999)。かくして、C17発現は造血サイトカインにより調節される。

【0147】

実施例 2

C17 cDNAの全長DNA配列がC17関連EST配列を含む5個のプラスミドクローンを購入することで得られた(表1)。これらのプラスミドの挿入片は部分的にIMAGEコンソーシアムメンバーによる5'または3'末端のいずれかからの配列であった。これらプラスミドでの挿入片のサイズは両末端のいずれかから決定され配列化された。IMAGEクローン786066での挿入片は最長(~1キロベース)であり、また他の4個のプラスミドとC17 RDA断片からの配列すべてを含む。IMAGEクローン786066の挿入片配列は続く分析で使用された。推定上のmRNAポリアデニル化シグナルであるAATAAAはC17 cDNAの3'末端近くで見出される(例えば残基979-984での配列識別番号を参照のこと)。ノーザンブロットおよび多重ESTからの配列で示される転写物のサイズ(~1キロベース)に基づき、IMAGEクローン786066はC17遺伝子のほぼ全長cDNAを含有する。C17 cDNAは136アミノ酸(配列識別番号3)のタンパク質をコード化する408ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含有する。第1ATGの周りのすぐ傍にあるコザック配列の存在は、それが望ましい翻訳開始であることを示唆する(コザック、細胞生物学ジャーナル、115:887-903(1991))。推定ペプチド配列の疎水性分析は、N末端での推定上のシグナルペプチドを示している。更にまた、詳細に説明されたシグナルペプチドは、分泌ペプチド切断部位がその第19および第20アミノ酸の間にあることを明らかにした(ニールセン他、タンパク質エンジニアリング、10;1-6(1997))。配列の残りに他の疎水性膜貫通ドメインまたはGPI固定シグナルドメインはなく、これはC17が分泌タンパク質であることを示している。二次構造分析は、C17ペプチドが造血サイトカインとインターロイキンの特性である4ヘリックスを含有することを予言する(バザン、今日の免疫学、11(10):350-354(1999);ウエルおよびデ・ボス、生化学マニュアルレビュー、65;609-634(1996))。C17のジエンバンク、アクセス番号はAF193766である。

【0148】

実施例3

C17タンパク質はpCMV.C17/myc/hisを作るためにC17 cDNAコーディング領域を哺乳類発現ベクターにクローニングすることで特徴付けられた。組換えC17タンパク質はC末端で9E10 c-mycエピトープと6個のヒスチジン残基(His6)の両方で標識され、これによりrC17の検出と精製を容易にした。ヒト293T細胞は標識C17遺伝子の発現を可能にするためにベクターで形質移入された。形質移入の48時間後、形質移入からの細胞検出物と馴化培地(上澄み)の両方は2個の標識のいずれかに対する抗体を使用してウェスタンブロットで分析された。抗myc抗体はC17形質移入細胞にユニークな細胞抽出物と上澄み内の特異的なタンパク質を認識した。細胞抽出物では、主要19キロダルトンタンパク質帯は特異的に認識され、これは未処理の標識C17タンパク質(シグナルペプチドを含めて全体で167アミノ酸)の予想された19キロダルトンと一致した。C17形質移入細胞から収集された上澄みでは単一タンパク質帯が検出され、これはC17タンパク質が実際に分泌したことを示している。目に見える分子量(約26キロダルトン)は予想された17.2キロダルトンのサイズ(19アミノ酸シグナルペプチド無しの処理されたC17タンパク質)よりも大きく、これは分泌タンパク質が分泌の間または分泌後に修飾されたことを示している。アミノ酸配列に基づいて、C17またはエピトープ標識内では潜在的なN-グリコシル化部位は存在しない。グリコシダーゼのパネルでの消化もまたSDS-PAGEでのタンパク質移動のシフトを果せなかった。

【0149】

実施例4

rC17は原核発現ベクターであるpBAD/gIII(インヴァイトロンのもの)へのC17のクローニングにより大量に産生された。この発現ベクターでは、推定上のC17シグナル配列は除去され、コーディング配列の残部は、細菌リーダー配列の枠組みに連結された。これは組換えタンパク質が周皮細胞周辺腔に分泌することを可能にする。このベクターで発現されるC17タンパク質はまたc-mycとHis6エピトープで標識される。アラビノースによる導入に際し

(全長 r C 1 7 で予熱されたように) 19 キロダルトンのタンパク質は 0 . 0 0 2 % またはそれ以上のアラビノース濃度での高い水準で発現するように誘導された。

【 0 1 5 0 】

(実施例 5)

放射線維種細胞 (R H) 技術がヒトゲノムでの C 1 7 遺伝子の位置の地図作製に使用された。G 3 ヒト - ハムスター雑種染色体 DNA サンプルがヒト C 1 7 に特異的なプライマーでの P C R 増幅の鋳型として使用された。もしヒトゲノム (ハムスターゲノムでないもの) が鋳型として存在するならば、プライマーは 2 0 0 塩基対断片を増幅できるだけである。ある種の G 3 R H DNA 鋳型での P C R 反応は予想された DNA 断片を生成したが、一方他のものは生成できなかった。生成データはスタンフォード・ヒトゲノムセンター・データベースとアルゴリズムに基づき、その染色体局在化を決定するために使用された。(<http://www.shgc.stanford.edu/>)。ユニークなパターンは C 1 7 遺伝子を、D 4 S 4 1 2 と D 4 S 1 6 0 1 の間のヒト染色体 4 P にある単一遺伝子座に地図化した(<http://www.hcbi.nlm.nih.gov/genemap98/map.cgi?MAP=G3&BIN=130&MARK=SHGC.33462>)。この結果は他の人で行われた関連 E S T s (ユニゾン・データベースでの H s . 1 3 8 7 2) の地図化により確認される。この領域はヒト染色体 4 p 1 5 - 1 6 を細胞遺伝子地図作製で共同局在化する。造血と関連するいくつかの他の遺伝子は同じようにこの領域で配置される。これらは (C 1 7 / H s . 1 3 8 7 2 として D 4 S 4 1 2 と 7 4 S 1 6 0 1 の間の) C D 3 8 および (D 4 S 1 6 0 1 乃至 D 4 S 1 6 0 8 の周りに配置される) A C 1 3 3 を含む。後者は最近発見された細胞表面タンパク質であり、C D 3 4 · H S P C で優先的に発現される (伊他、血液、9 0 : 5 0 0 2 - 5 0 1 2 (1 9 9 7) ; ミラーリア他、血液、9 0 : 5 0 1 3 - 5 0 2 1 (1 9 9 7))。

【 配列表 】

SEQUENCE LISTING

<110> Liu, Xuan
Cheng, Linzhou

<120> Novel Genes and Expression Products from Hematopoietic Cells

<130> 640100-364

<140>
<141>

<150> U.S. 60/129,463
<151> 1999-04-15

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 999
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Consensus
sequence for C17 protein

<400> 1
 gggcgaggct gcaccagcgc ctggcaccat gaggacgcct gggcctctgc ccgtgctgct 60
 gctgctcctg gcgggagccc ccgccgcgcg gcccaactccc ccgacctgct actcccgcct 120
 gggggccctg agccaggaga tcaccgcga cttcaacctc ctgcaggctt cggagccctc 180
 ggagccatgt gtgagatacc tgcccaggct gtacctggac atacacaatt actgtgtgct 240
 ggacaagctg cgggactttg tggcctcgcc ccctgtttgg aaagtggccc aggtagattc 300
 cttgaaggac aaagcacgga agctgtacac catcatgaac tcgttctgca ggagagattt 360
 ggtattcctg ttggatgact gcaatgcctt ggaataccca atcccagtga ctacggctct 420
 gccagatcgt cagcgctaag ggaactgaga ccagagaaag aaccaagag aactaaagtt 480
 atgtcagcta ccagactta atgggccaga gccatgacct tcacaggctt tgtgttagtt 540
 gtatctgaaa ctgttatgta tctctctacc ttctggaaaa cagggtctgtt attcctacct 600
 agaacctcc tttgagcata gagttagcaa ccatgcttct cattcccttg actcatgtct 660
 tgccaggatg gttagatata cagcatgttg atttggtcac taaaaagaag aaaaggacta 720
 acaagcttca cttttatgaa caactathtt gagaacatgc acaatagtat gttttatta 780
 ctggtttaat ggagtaatgg taottttatt ctttcttgat agaaacctgc ttacatttaa 840
 ccaagcttct attatgcctt tttctaacac agactttctt cactgtcttt catttaaaaa 900
 gaaattaatg ctcttaagat atatatttta cgtagtgtct acaggaccca ctctttcatt 960
 gaaagtgat gaaatcaaa taaagaatct cttcacatg 999

<210> 2
 <211> 411
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:cDNA sequence
 for C17 protein

<400> 2
 atgaggacgc ctgggcctct gcccgctgctg ctgctgctcc tggcgggagc ccccgccgcg 60
 eggcccactc ccccgacctg ctactcccgc atgcggggccc tgagccagga gatcaccgcg 120
 gacttcaacc tcctgcaggt ctgggagccc tcggagccat gtgtgagata cctgcccagg 180
 ctgtacctgg acatacacia ttactgtgtg ctggacaagc tgcgggactt tgtggcctcg 240
 ccccctgttt ggaaagtggc ccaggtagat tccttgaagg acaaagcagc gaagctgtac 300
 accatcatga actcgttctg caggagagat ttggtattcc tgttggatga ctgcaatgcc 360
 ttggaatacc caatcccagt gactacggtc ctgccagatc gtcagcgcta a 411

<210> 3
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Amino acid
 sequence derived from cDNA

<400> 3
 Met Arg Thr Pro Gly Pro Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Ala Pro Ala Ala Arg Pro Thr Pro Pro Thr Cys Tyr Ser Arg Met Arg
 20 25 30
 Ala Leu Ser Gln Glu Ile Thr Arg Asp Phe Asn Leu Leu Gln Val Ser
 35 40 45
 Glu Pro Ser Glu Pro Cys Val Arg Tyr Leu Pro Arg Leu Tyr Leu Asp
 50 55 60
 Ile His Asn Tyr Cys Val Leu Asp Lys Leu Arg Asp Phe Val Ala Ser
 65 70 75 80
 Pro Pro Cys Trp Lys Val Ala Gln Val Asp Ser Leu Lys Asp Lys Ala
 85 90 95

Arg Lys Leu Tyr Thr Ile Met Asn Ser Phe Cys Arg Arg Asp Leu Val
 100 105 110

Phe Leu Leu Asp Asp Cys Asn Ala Leu Glu Tyr Pro Ile Pro Val Thr
 115 120 125

Thr Val Leu Pro Asp Arg Gln Arg
 130 135

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR forward
 primer for CD34 cDNA

<400> 4

ctgtgtctca acatggca

18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR reverse
 primer for CD34 cDNA

<400> 5

gccttgatgt cacttagg

18

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR forward
 primer for C17 cDNA

<400> 6

gacacccgc gacttcaacc

20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:PCR reverse
 primer for C17 cDNA

 <400> 7
 tggcaggacc gtagtcactg 20

 <210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:PCR forward
 primer for beta-2-microglobulin cDNA

 <400> 8
 tctggccttg aggotatcca gcgt 24

 <210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:PCR reverse
 primer for beta-2-microglobulin cDNA

 <400> 9
 gtggttcaca cggcaggcat actc 24

 <210> 10
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Human c-myc
 epitope used to tag recombinant C17 protein

<400> 10
 Val Asp Pro Ser Ser Val Pro Ser Phe Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 20 25 30

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
 based on 5'-untranslated region of C17 cDNA

<400> 11
 tttgattttc atcacctttc 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
 based on 5'-untranslated region of C17 cDNA

<400> 12
 ctggtttaat ggagtaatgg 20

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
 based on 5'-untranslated region of C17 cDNA

<400> 13
 gttagataca cagcatgttg a 21

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
 based on 5'-untranslated region of C17 cDNA

<400> 14
 gacagtgaag aaagtctgtg 20

【図面の簡単な説明】

【図1A】 本発明に従って開示される新規な遺伝子のヌクレオチド配列（

配列識別番号1)を示す図、であり、これは遺伝子をクローニングした利用される断片を提供する図2の推定上のタンパク質と2個の関連d p n II制限部位に一致するオープンリーディングフレーム(配列識別番号2)を含む。

【図1B】 図1Aの継続を示す図。

【図2】 図1で開示される配列のオープンリーディングフレームのための、推定アミノ酸配列(配列識別番号3)を示す図

【図3】 無血清培養での間葉幹細胞の増殖に対するC17タンパク質の作用を示す図。C17タンパク質は血清含有培地で支持されるものと等しい増殖率を可能にする。

【図1A】

```

GGGCGAGGCTGCACCAGCGCCTGGCACCATGAGGACGCCTGGGCCTCTGCCCGTGCTGCT
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CCCCTCCGACGTGGTCGCGGACCGTGGTACTCCTGCGGACCCGGAGACGGGCACGACGA

                                M R T P G P L P V L L -

GCTGCTCCTGGCGGGAGCCCCGCGCGCGGCCACTCCCCGACCTGCTACTCCCGCAT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CGACGAGGACCGCCCTCGGGGGCGGCGCGCCGGGTGAGGGGGCTGGACGATGAGGGCGTA

    L L L A G A P A A R P T P P T C Y S R M -

                DpnII
                |
GCGGGCCCTGAGCCAGGAGATCACCCGCGACTTCAACCTCCTGCAGGTCTCGGAGCCCTC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CGCCCGGACTCGGTCTCTAGTGGGCGCTGAAGTTGGAGGACGTCCAGAGCCTCGGGAG

    R A L S Q E I T R D F N L L Q V S E P S -

GGAGCCATGTGTGAGATACCTGCCCAGGCTGTACCTGGACATACACAATTACTGTGTGCT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CCTCGGTACACACTCTATGGACGGGTCCGACATGGACCTGTATGTGTTAATGACACACGA

    E P C V R Y L P R L Y L D I H N Y C V L -

GGACAAGCTGCGGGACTTTGTGGCCTCGCCCCGTGTTGAAAAGTGGCCAGGTAGATTC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCTGTTGACGCCCCTGAAACACCGGAGCGGGGCACAACCTTTCACCGGTCCATCTAAG

    D K L R D F V A S P P C W K V A Q V D S -

CTTGAAGGACAAAGCACGGAAGCTGTACACCATCATGAACTCGTTCTGCAGGAGAGATTT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GAACTTCCTGTTTCGTGCCTTCGACATGTGGTAGTACTTGAGCAAGACGTCCTCTCTAAA

    L K D K A R K L Y T I M N S F C R R D L -

GGTATTCCTGTTGGATGACTGCAATGCCTTGAATACCCAATCCCAGTGACTACGGTCCT
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CCATAAGGACAACCTACTGACGTTACGGAACCTTATGGGTTAGGGTCACTGATGCCAGGA

    V F L L D D C N A L E Y P I P V T T V L -

                DpnII
                |
GCCAGATCGTCAGCGCTAAGGGAAGTGGAGACCAGAGAAAGAACCCAAGAGAACTAAAGTT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CGGTCTAGCAGTCGCGATTCCCTTGACTCTGGTCTCTTTCTGGGTTCTCTTGATTTCAA

```

【図1B】

P D R Q R *
 481 ATGTCAGCTACCCAGACTTAATGGGCCAGAGCCATGACCCTCACAGGTCTTGTGTTAGTT 540
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TACAGTCGATGGGTCTGAATTACCCGGTCTCGGTACTGGGAGTGTCCAGAACAATCAA

 541 GTATCTGAAACTGTTATGTATCTCTCTACCTTCTGGAAAACAGGGCTGGTATTCTACCC 600
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CATAGACTTTGACAATACATAGAGAGATGGAAGACCTTTTGTCCCGACCATAAGGATGGG

 601 AGGAACCTCCTTTGAGCATAGAGTTAGCAACCATGCTTCTCATTCCCTTGACTCATGTCT 660
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCCTTGGAGGAACTCGTATCTCAATCGTTGGTACGAAGAGTAAGGGAAGTACTGAGTACAGA

 661 TGCCAGGATGGTTAGATACACAGCATGTTGATTTGGTCACTAAAAAGAAGAAAAGGACTA 720
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACGGTCTACCAATCTATGTGTCGTACAATAAACCAGTGATTTTTCTCTTTTCTGAT

 721 ACAAGCTTCACTTTTATGAACAATAATTTGAGAATGCACAATAGTATGTTTTATTA 780
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGTTCGAAGTGAAAATACTTGTGATAAACTCTTGTACGTGTTATCATACAAAAATAAT

 781 CTGGTTTAAATGGAGTAATGGTACTTTTATTCTTTCTTGATAGAAACCTGCTTACATTTAA 840
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GACCAAATTACCTCATTACCATGAAAATAAGAAAGAACTATCTTGGACGAATGTAAATT

 841 CCAAGCTTCTATTATGCCTTTTTCTAACACAGACTTTCTTCACTGTCTTTCATTTAAAAA 900
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGTTCGAAGATAATACGGAAAAAGATTGTGTCTGAAAGAAGTGACAGAAAGTAAATTTT

 901 GAAATTAATGCTCTTAAGATATATATTTTACGTAGTGCTGACAGGACCCACTCTTTCATT 960
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTTAATTACGAGAATCTATATATAAAATGCATCACGACTGTCCTGGGTGAGAAAGTAA

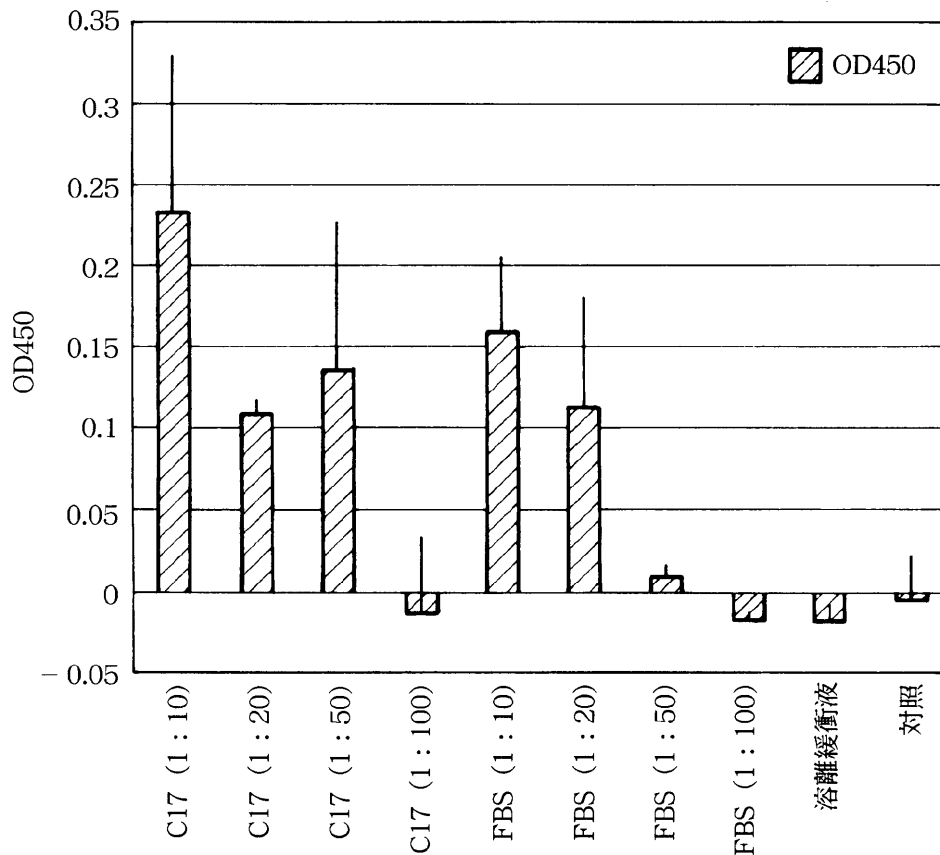
 961 GAAAGGTGATGAAAATCAAATAAAGAATCTCTTCACATG 999
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTTCCACTACTTTTAGTTTATTCTTAGAGAAGTGTAC

【図2】

Met Arg Thr Pro Gly Pro Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Ala Gly
 Ala Pro Ala Ala Arg Pro Thr Pro Pro Thr Cys Tyr Ser Arg Met Arg
 Ala Leu Ser Gln Glu Ile Thr Arg Asp Phe Asn Leu Leu Gln Val Ser
 Glu Pro Ser Glu Pro Cys Val Arg Tyr Leu Pro Arg Leu Tyr Leu Asp
 Ile His Asn Tyr Cys Val Leu Asp Lys Leu Arg Asp Phe Val Ala Ser
 Pro Pro Cys Trp Lys Val Ala Gln Val Asp Ser Leu Lys Asp Lys Ala
 Arg Lys Leu Tyr Thr Ile Met Asn Ser Phe Cys Arg Arg Asp Leu Val
 Phe Leu Leu Asp Asp Cys Asn Ala Leu Gly Tyr Pro Ile Pro Val Thr
 Thr Val Leu Pro Asp Arg Glu Arg

【図3】

SFMでのMSC増殖についてのWST-1分析法



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 00/09904
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/52 G01N33/50 C07K16/24		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal; STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 54963 A (FERRIE ANN M; HUMAN GENOME SCIENCES INC ; GREENE JOHN M (US); YOUNG) 10 December 1998 (1998-12-10) SEQ ID NOs 72,295 page 328 -page 329 page 516 -page 517 ---	1-5, 7-22,28
X	HILLIER L ET AL: "Homo sapiens cDNA clone" EMEST DATABASE ENTRY HS1248747, ACCESSION NUMBER AA448744, 10 June 1997 (1997-06-10), XP002143937 sequence --- -/-	19-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (no specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 31 July 2000		Date of mailing of the international search report 03.08.00
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Espen, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 93/09904

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HILLIER L ET AL: "Homo sapiens cDNA clone" EMEST DATABASE ENTRY HS1151114, ACCESSION NUMBER AA233071, 6 March 1997 (1997-03-06), XP002143938 sequence -----	19-22

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Publication No
PCT/US 00/09904

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9854963 A	10-12-1998	AU 7812098 A	21-12-1998
		AU 7811998 A	21-12-1998
		AU 6552198 A	29-09-1998
		EP 0973892 A	26-01-2000
		WO 9840483 A	17-09-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
C 1 2 N	1/21	C 1 2 Q	1/02
	5/06	G 0 1 N	33/53
	5/10		33/566
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 P	21/08
G 0 1 N	33/53	C 1 2 N	15/00
	33/566		5/00
// C 1 2 P	21/08		Z N A A
			A
			E
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
Fターム(参考)	4B024 AA01 AA11 BA41 BA80 CA04 CA11 EA04 GA11		
	4B063 QA01 QQ79 QQ91 QR48 QR69 QS03 QS12 QS24		
	4B064 AG27 CC24 DA13		
	4B065 AA26X AA46X AA50X AA72X AA88X AA90X AA93X AA93Y AA95X AC14 AC20 BB19 BC10 CA24 CA44 CA46		
	4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50 FA72 FA73 FA74		

专利名称(译)	来自造血细胞和表达产物的基因		
公开(公告)号	JP2002541850A	公开(公告)日	2002-12-10
申请号	JP2000612461	申请日	2000-04-14
申请(专利权)人(译)	奥西里斯Therapeutics公司		
[标]发明人	リユーシャー チェンリンツアオ		
发明人	リユー,シャー チェン,リンツアオ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C07K14/52 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/52		
FI分类号	C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 G01N33/53.M G01N33/566 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5/00.E		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR48 4B063/QR69 4B063/QS03 4B063/QS12 4B063/QS24 4B064/AG27 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA46X 4B065/AA50X 4B065/AA72X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AA95X 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BB19 4B065/BC10 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74		
代理人(译)	丹羽浩之		
优先权	60/129463 1999-04-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了人类造血干/祖细胞 (hHSPC) 多肽 (称为C17多肽), 以及编码此类多肽的DNA (和RNA)。还公开了用于染色体作图, DNA指纹图谱以及疾病过程中遗传突变所起的可能作用以及产生所述多肽特异性的多克隆血清或单克隆抗体等的标记物。利用本文公开的多核苷酸和多肽的方法。进一步公开了一种利用本发明的多肽增加hMSC的生长速率的方法。

EST Id	誘導された組織	スコア (ピット)	E値	IMAGE クローン#	配列化挿入片 (塩基対)	推定挿入片 (塩基対)
AA448744	9週全胚	573	e-132	786066	431	ND
T81361	胎児肝臓/脾臓	297	5e-79	110792	397	830
T82005	胎児肝臓/脾臓	295	2e-78	110293	436	520
AA460463	9週全胚	143	2e-32	796509	464	ND
AA461037	9週全胚	143	2e-32	796773	549	ND