

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02002/024738

発行日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(43) 国際公開日 平成14年3月28日(2002.3.28)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/00
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 38/00
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 45/00

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 39/395 E
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 K 45/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 84 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2002-529146 (P2002-529146)	(71) 出願人	000001029
(21) 国際出願番号	PCT/JP2001/008140		協和醗酵工業株式会社
(22) 国際出願日	平成13年9月19日(2001.9.19)		東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(31) 優先権主張番号	特願2000-287876 (P2000-287876)	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成12年9月22日(2000.9.22)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100108774
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW	(72) 発明者	秋山 徹
		(72) 発明者	足達 俊吾
			東京都多摩市貝取1493-1-604
			東京都台東区谷中3-15-16

(54) 【発明の名称】 β-カテニン核局在化蛋白質

(57) 【要約】

本発明は、新規な - カテニン核局在化蛋白質および該蛋白質をコードするDNAを提供し、さらに - カテニン核局在化蛋白質および該蛋白質をコードするDNAを利用することにより、癌などの - カテニン核局在化と関連する疾患の診断薬および治療薬を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 292 ~ 439 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

【請求項 2】

蛋白質が、配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載の蛋白質。

【請求項 3】

配列番号 10 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

【請求項 4】

配列番号 10 および配列番号 12 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の有するアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が付加、欠失あるいは置換したアミノ酸配列からなり、かつ - カテニンと結合し、 - カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の有するアミノ酸配列と、60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ - カテニンと結合し、 - カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質。

【請求項 7】

蛋白質が、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ - カテニンと結合し、 - カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質である請求項 3 または 4 に記載の蛋白質。

【請求項 8】

配列番号 12 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の有するアミノ酸配列中の連続した 5 ~ 60 アミノ酸残基を有するポリペプチド。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の蛋白質またはポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 11】

配列番号 1 で表される塩基配列の塩基番号 874 ~ 1317 で表される塩基配列を含む DNA。

【請求項 12】

DNA が、配列番号 1 または配列番号 3 で表される塩基配列を有する請求項 11 に記載の DNA。

【請求項 13】

以下の [1] または [2] に記載の塩基配列を含み、かつ - カテニンと結合し、 - カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質をコードする DNA。

[1] 配列番号 9 で表される塩基配列

[2] 配列番号 9 および 11 で表される塩基配列

【請求項 14】

請求項 10 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ - カテニンと結合し、 - カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質をコードする DNA。

【請求項 15】

DNA が、配列番号 9 および 11 で表される塩基配列を含む DNA であり、かつ配列番号 2 で表される塩基配列と 60% 以上の同一性を有する塩基配列からなる DNA であり、かつ - カテニンと結合し、 - カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質をコードする DNA。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

配列番号 11 で表される塩基配列を有する DNA。

【請求項 17】

請求項 10 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の組換え体 DNA を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の形質転換体を培養液中で培養し、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の蛋白質またはポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該蛋白質またはポリペプチドを採取することを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の蛋白質またはポリペプチドの製造法。

10

【請求項 20】

請求項 10 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の DNA の塩基配列中の連続した 10 ~ 60 塩基の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドまたはそれらオリゴヌクレオチドの誘導体。

【請求項 21】

請求項 10 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の DNA あるいは請求項 20 に記載のオリゴヌクレオチドまたはそれらオリゴヌクレオチドの誘導体を用いて、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の発現量を mRNA レベルで検出または定量する方法。

20

【請求項 22】

請求項 10 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の DNA あるいは請求項 20 に記載のオリゴヌクレオチドまたはそれらオリゴヌクレオチドの誘導体を用いて、健常人と被験者が有する請求項 3 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の発現量を mRNA レベルで測定・比較し、健常人に比べ該蛋白質の発現量が増加または減少している疾患を判定する方法。

【請求項 23】

請求項 10 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の DNA あるいは請求項 20 に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体を含む、請求項 3 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の発現量を mRNA レベルで測定・比較し、健常人に比べ該蛋白質の発現量が増加または減少している疾患の診断薬。

30

【請求項 24】

請求項 10 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の DNA あるいは請求項 20 に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体を用いて、請求項 3 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の遺伝子の変異を検出する方法。

【請求項 25】

請求項 10 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の DNA あるいは請求項 20 に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体を用いて、請求項 3 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の遺伝子に変異を有する疾患を判定する方法。

【請求項 26】

請求項 10 ~ 16 のいずれかの 1 項に記載の DNA あるいは請求項 20 に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体を含む、請求項 3 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の遺伝子に変異を有する疾患の診断薬。

40

【請求項 27】

請求項 10 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の DNA あるいは請求項 20 に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体を用いて、請求項 3 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の発現を転写段階で抑制する方法。

【請求項 28】

請求項 10 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の DNA、請求項 20 に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体、bc19 蛋白質をコードする DNA、bc19 蛋白質をコードする DNA の塩基配列中の連続した 10 ~ 60 塩基の塩基配列を有するオリ

50

ゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドまたはそれらオリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチドまたはDNAを用いて、 β -カテニンの核局在化を阻害する方法。

【請求項29】

請求項10～16のいずれか1項に記載のDNA、請求項20に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体、bc19蛋白質をコードするDNA、またはbc19蛋白質をコードするDNAの塩基配列の連続した10～60塩基の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、またはそれらオリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチドまたはDNAを含有する癌の治療薬。

10

【請求項30】

請求項10～16のいずれか1項に記載したDNAを含有する遺伝子治療用ベクター。

【請求項31】

請求項10～16のいずれか1項に記載のDNAを導入することにより作製した非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項32】

請求項31に記載の非ヒトトランスジェニック動物またはbc19蛋白質をコードするDNAを導入することにより作製した非ヒトトランスジェニック動物を発癌モデル動物として用いる方法。

【請求項33】

請求項31に記載のトランスジェニック動物またはbc19蛋白質をコードするDNAを導入することにより作製したトランスジェニック動物を用いて癌の治療薬を評価する方法。

20

【請求項34】

請求項10～16のいずれか1項に記載のDNAの全部または一部が欠損し、 β -カテニンと結合し、 β -カテニンを核内へ局在させる活性を有する蛋白質の機能が喪失または低下した遺伝子欠損非ヒト動物。

【請求項35】

[1]被験試料非存在下でのbc19蛋白質と β -カテニンとの結合と、[2]被験試料存在下でのbc19蛋白質と β -カテニンとの結合を比較し、被験試料より、bc19蛋白質と β -カテニンの結合を阻害する物質を選択することを特徴とする、bc19蛋白質と β -カテニンとの結合を阻害する物質のスクリーニング方法。

30

【請求項36】

[1]被験試料非存在下での請求項1～7のいずれか1項に記載の蛋白質と β -カテニンとの結合と、[2]被験試料存在下での請求項1～7のいずれか1項に記載の蛋白質と β -カテニンとの結合を比較し、被験試料より、請求項1～7のいずれか1項に記載の蛋白質と β -カテニンとの結合を阻害する物質を選択することを特徴とする、請求項1～7のいずれか1項に記載の蛋白質と β -カテニンの結合を阻害する物質のスクリーニング方法。

【請求項37】

請求項35または36に記載のスクリーニング方法によって得られる化合物、またはその薬理的に許容される塩。

40

【請求項38】

請求項37に記載した化合物、またはその薬理的に許容される塩を含有する癌の治療薬。

【請求項39】

請求項1～9のいずれか1項に記載の蛋白質またはポリペプチドを認識する抗体。

【請求項40】

請求項39に記載の抗体を用いた、請求項1～7のいずれか1項に記載の蛋白質を免疫学的に検出または定量する方法。

50

【請求項 4 1】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質と結合し、該蛋白質の有する - カテニンと結合し - カテニンを核内に局在させる作用を阻害する中和抗体。

【請求項 4 2】

b c l 9 蛋白質と結合し、b c l 9 蛋白質の有する - カテニンと結合し - カテニンを核内に局在させる作用を阻害する中和抗体。

【請求項 4 3】

請求項 3 9 に記載の抗体を用いて、健常人と被験者が有する請求項 3 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の発現量を定量・比較し、健常人に比べ該蛋白質量が増加または減少している疾患を判別する方法。

【請求項 4 4】

請求項 3 9 に記載の抗体を含有する、請求項 3 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の発現量が、健常人と比較して増加または減少している疾患の診断薬。

【請求項 4 5】

請求項 4 1 に記載の抗体を用いて、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の機能を阻害することにより、 - カテニンと L e f / T c f ファミリーに属する転写因子との複合体による転写の活性化を阻害する方法。

【請求項 4 6】

請求項 4 2 に記載の抗体を用いて、b c l 9 蛋白質の機能を阻害することにより、 - カテニンと L e f / T c f ファミリーに属する転写因子との複合体による転写の活性化を阻害する方法。

【請求項 4 7】

請求項 4 1 または 4 2 に記載の抗体を含有する癌の治療薬。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は - カテニンと結合し、 - カテニンを核に局在させる作用を有する新規蛋白質、該蛋白質をコードする DNA、該蛋白質を認識する抗体、該蛋白質、該 DNA または該抗体を含有する治療薬、および該抗体を含有する診断薬に関する。

背景技術

大腸腺腫症 (A P C) 遺伝子は、家族性大腸腺腫症 (F A P) の原因遺伝子として単離された遺伝子である [K i n z l e r K . W . & V o g e l s t e i n B . , C e l l , 8 7 , 1 5 9 (1 9 9 6)] が、F A P だけでなく散発性大腸癌の 7 0 ~ 8 0 % の症例に A P C 遺伝子の異常を起こしていることが報告されている。大腸癌は A P C だけでなく、K - r a s、p 5 3、D C C などの多数の遺伝子に段階的に変異が起きることにより発症すると考えられているが、A P C 遺伝子はこれらの遺伝子の中で最も早期から変異が見られることから、大腸癌の発症にはまず A P C 遺伝子の異常が起こる必要があると考えられている。

A P C 遺伝子の異常から癌の発症に結びつく機構を解明するには、遺伝子産物である A P C の機能を解明する必要がある。A P C は約 3 0 0 k D a の蛋白質であり、細胞内で - カテニン (- c a t e n i n)、グリコーゲン・シンターゼ・キナーゼ - 3 (G S K - 3)、D L G と結合していることが報告されている [R u b i n f e l d B . ら , S c i e n c e , 2 6 2 , 1 7 3 1 (1 9 9 3)、S u L . K . ら , S c i e n c e , 2 6 2 , 1 7 3 4 (1 9 9 3)、R u b i n f e l d B . ら , S c i e n c e , 2 7 2 , 1 0 2 3 (1 9 9 6)、M a t s u m i n e A . ら , S c i e n c e , 2 7 2 , 1 0 2 0 (1 9 9 6)]。A P C の機能については、A P C 遺伝子に変異をもつ大腸癌細胞株 S W 4 8 0 に正常な A P C を発現させると、細胞内の - カテニンの量が急激に低下することが報告されている [M u n e m i t s u S . ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 2 , 3 0 4 6 (1 9 9 5)]。この A P C が機能するには A P C 内の中央部にある 7 回繰り返し構造の領域が必要であるが、この領域は、多くの大腸癌で変異が見出されている領域と一致しており、また、これらの大腸癌細胞では、細胞内の - カ

10

20

30

40

50

テニンの量が増大していることも報告されている [Munemitsu S.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 3046 (1995)、Rubinfeld B.ら, Cancer Res., 57, 4624 (1997)]。

-カテニンは細胞接着分子カドヘリンの裏打ち蛋白質としても知られる蛋白質であるが、以下に示すWnt蛋白質の情報伝達系に関わっていることが報告されている [Cadigan K.M. & Nusse R., Genes Dev., 11, 3286 (1997)]。Wnt遺伝子は動物の初期発生や形態形成過程で多様な機能を持って関与している大きな遺伝子ファミリーであり、マウスで約20種類のファミリーを形成する他、アフリカツメガエルやショウジョウバエ、線虫等広い動物種で保存されている遺伝子である。

WntがリセプターであるFrizzledと結合すると、細胞内情報伝達分子Dishevelled (Dsh)を介してグリコーゲン・シンターゼ・キナーゼ-3 (GSK-3)の活性が抑制される。GSK-3は -カテニンをリン酸化することにより、

-カテニンの分解を引き起こしているため、GSK-3の活性が抑制されることにより

-カテニンは細胞内に蓄積する。 -カテニンはLef/Tcfファミリーに属する転

写因子(以下TCFと略す)と結合して複合体を形成して、TCFを転写因子として活性化

する性質を持っているため、 -カテニンの蓄積により、 -カテニン/TCF複合体

が形成され、核内に移行してターゲット遺伝子の転写が促進される。Tcfの中で、Tcf

-4は大腸上皮に特異的に発現していることから、大腸癌では、主に -カテニンはT

cf-4と複合体を形成していると考えられている [Korinek V.ら, Science, 275, 1784 (1997)]。また、APC遺伝子は正常であるが、GSK

-3による制御を受けないような -カテニン遺伝子の変異をもつ、大腸癌やメラノ

ーマの細胞も報告されている [Morin P.J.ら, Science, 275, 1787 (1997)、Rubinfeld B.ら, Science, 275, 1790 (1

997)]。これらの細胞では -カテニンは常に細胞内に蓄積し -カテニン/TCF

複合体による転写の活性化がおきていると考えられる。

以上のことから -カテニンは大腸癌の発症に大きく関与していると考えられるので、

-カテニンと結合しその機能を抑制する物質は、大腸癌の発症に関与し、その治療や診断

等に有用と考えられる。 -カテニンと結合する分子としては、Wnt蛋白質の情報伝達

系を負に制御する蛋白質Axin [Zeng L.ら, Cell, 90, 181 (1997)]が報告されている。AxinはGSK-3

と結合して -カテニンのリン酸化を

促進する [Ikeda S.ら, EMBO J., 17, 1371 (1998)]だけでなく、さらにAPCおよび

-カテニンとも結合しており、 -カテニンの分解を促進す

ることにより細胞内の -カテニンの量を低下させる作用を持つことが報告されている [

Kishida S.ら, J. Biol. Chem., 273, 10823 (1998)

、Rubinfeld B.ら, Curr. Biol., 8, 573 (1998)、Na

kamura T.ら, Genes Cells, 3, 395 (1998)]。しかしながら、 -カテニンと結合し、

-カテニンを核に局在させる機能を有する蛋白質は知ら

れていない。

bcl9蛋白質 [Willis T.G. et al., Blood, 91, 1871 (1998)]は、B細胞前駆体の急性リンパ芽球性白血病患者から樹立された細胞株CE

MO-1の第1染色体の染色体転座部位からクローニングされた遺伝子であり、CEMO

-1で異常に高い発現がみられる遺伝子であるが、 -カテニンとの結合など -カテニ

ンとの関連性は知られていない。

-カテニンと結合し、その機能を制御する蛋白質およびその遺伝子を解析することによ

り、大腸癌をはじめとする -カテニンが関与する癌の発症機構を解明し、癌の治療や診

断に有用な蛋白質および該蛋白質をコードするDNAを単離し構造を明らかにすることが

求められていた。

発明の開示

本発明は、癌の治療や診断に有用な、 -カテニンと結合し -カテニンを核内へ局在さ

せる作用をもつ蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質を認識する抗体、該蛋白

質

質

質

質

質

質

質

質

質

質

10

20

30

40

50

質または該DNAを含有する治療薬、該抗体を含有する診断薬を提供することを目的とする。

本発明は、以下の(1)~(47)に関する。

(1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号292~439で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

(2) 蛋白質が、配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を有する上記(1)の蛋白質。

(3) 配列番号10で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

(4) 配列番号10および配列番号12で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

(5) 上記(1)~(4)のいずれか1つの蛋白質が有するアミノ酸配列において、10以上のアミノ酸が付加、欠失あるいは置換したアミノ酸配列からなり、かつβ-カテニンと結合し、β-カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質。

(6) 上記(1)~(4)のいずれか1つの蛋白質の有するアミノ酸配列と、60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつβ-カテニンと結合し、β-カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質。

(7) 蛋白質が、配列番号2で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつβ-カテニンと結合し、β-カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質である上記(3)または(4)の蛋白質。

(8) 配列番号12で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質。

(9) 上記(1)~(8)のいずれか1つの蛋白質が有するアミノ酸配列中の連続した205~60アミノ酸残基を有するポリペプチド。

(10) 上記(1)~(9)のいずれか1つの蛋白質またはポリペプチドをコードするDNA。

(11) 配列番号1で表される塩基配列の塩基番号874~1317で表される塩基配列を含むDNA。

(12) DNAが、配列番号1または配列番号3で表される塩基配列を有する上記(11)のDNA。

(13) 以下の[1]または[2]の塩基配列を含み、かつβ-カテニンと結合し、β-カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質をコードするDNA。

[1] 配列番号9で表される塩基配列

[2] 配列番号9および11で表される塩基配列

(14) 上記(10)~(13)のいずれか1つのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつβ-カテニンと結合し、β-カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質をコードするDNA。

(15) DNAが、配列番号9および11で表される塩基配列を含むDNAであり、かつ配列番号1で表される塩基配列と60%以上の相同性を有する塩基配列からなるDNAであり、かつβ-カテニンと結合し、β-カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質をコードするDNA。

(16) 配列番号11で表される塩基配列を有するDNA。

(17) 上記(10)~(16)のいずれか1つのDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(18) 上記(17)の組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(19) 上記(18)の形質転換体を培養液中で培養し、上記(1)~(9)のいずれか1つの蛋白質またはポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該蛋白質またはポリペプチドを採取することを特徴とする該蛋白質またはポリペプチドの製造法。

(20) 上記(10)~(16)のいずれか1つのDNAの塩基配列中の連続した100~60塩基の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドまたはそれらオリゴヌクレオチドの誘導體。

(21) 上記(10)~(16)のいずれか1つのDNAあるいは上記(20)のオリ

ゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体を用いて、上記(1)～(7)のいずれか1つの蛋白質の発現量をmRNAレベルで検出または定量する方法。

(22) 上記(10)～(16)のいずれか1つのDNAあるいは上記(20)のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体を用いて、健常人と被験者が有する上記(3)～(7)のいずれか1つの蛋白質の発現量をmRNAレベルで測定・比較し、健常人に比べ該蛋白質の発現量が増加または減少している疾患を判別する方法。

(23) 上記(10)～(16)のいずれか1つのDNAあるいは上記(20)のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体を含む、上記(3)～(7)のいずれか1つの蛋白質の発現量をmRNAレベルで測定・比較し、健常人に比べ該蛋白質の発現量が増加または減少している疾患の診断薬。

(24) 上記(10)～(16)のいずれか1つのDNAあるいは上記(20)のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体を用いて、上記(3)～(7)のいずれか1つの蛋白質の遺伝子の変異を検出する方法。

(25) 上記(10)～(16)のいずれか1つのDNAあるいは上記(20)のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体を用いて、上記(3)～(7)のいずれか1つの蛋白質の遺伝子に変異を有する疾患を判別する方法。

(26) 上記(10)～(16)のいずれか1つのDNAあるいは上記(20)のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体を含む、上記(3)～(7)から選ばれる蛋白質の遺伝子に変異を有する疾患の診断薬。

(27) 上記(10)～(16)のいずれか1つのDNAあるいは上記(20)のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体を用いて、上記(3)～(7)のいずれか1つの蛋白質の発現を転写段階で抑制する方法。

(28) 上記(10)～(16)のいずれか1つのDNA、上記(20)のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチドの誘導体、bc19蛋白質をコードするDNA、bc19蛋白質をコードするDNAの塩基配列中の連続した10～60塩基の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチドまたはDNAを用いて、 β -カテニンの核局在化を阻害する方法。

(29) 上記(10)～(16)のいずれか1つのDNA、(20)に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの誘導体、bc19蛋白質をコードするDNA、bc19蛋白質をコードするDNAの塩基配列中の連続した10～60塩基の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドまたはそれらオリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチドまたはDNAを含む癌の治療薬。

(30) 上記(10)～(16)のいずれか1つのDNAを含む遺伝子治療用ベクター。

(31) 上記(10)～(16)のいずれか1つのDNAを導入することにより作製した非ヒトトランスジェニック動物。

(32) 上記(31)の非ヒトトランスジェニック動物またはbc19蛋白質をコードするDNAを導入することにより作製した非ヒトトランスジェニック動物を発癌モデル動物として用いる方法。

(33) 上記(31)のトランスジェニック動物またはbc19蛋白質をコードするDNAを導入することにより作製したトランスジェニック動物を用いて癌の治療薬を評価する方法。

(34) 上記(10)～(16)のいずれか1つのDNAの全部または一部が欠損し、 β -カテニンと結合し、 β -カテニンを核内へ局在させる活性を有する蛋白質の機能が喪失または低下した遺伝子欠損非ヒト動物。

(35) [1]被験試料非存在下でのbc19蛋白質と β -カテニンとの結合と、[2]被験試料存在下でのbc19蛋白質と β -カテニンとの結合を比較し、被験試料より、bc19蛋白質と β -カテニンの結合を阻害する物質を選択することを特徴とする、bc

10

20

30

40

50

19蛋白質と - カテニンの結合を阻害する物質のスクリーニング方法。

(36) [1] 上記(1)~(7)のいずれか1つの蛋白質と - カテニンを接触させた場合と、[2] 上記(1)~(7)のいずれか1つの蛋白質、 - カテニンおよび被検試料を接触させた場合を比較し、被検試料より、上記(1)~(7)のいずれか1つの蛋白質と - カテニンの結合を阻害する物質を選択することを特徴とする、上記(1)~(7)のいずれか1つの蛋白質と - カテニンの結合を阻害する物質のスクリーニング方法。

(37) 上記(35)または(36)のスクリーニング方法によって得られる化合物、またはその薬理的に許容される塩。

(38) 上記(37)の化合物、またはその薬理的に許容される塩を含有する癌の治療薬。 10

(39) 上記(1)~(9)のいずれか1つの蛋白質またはポリペプチドを認識する抗体。

(40) 上記(39)の抗体を用いた、上記(1)~(7)のいずれか1つの蛋白質を免疫学的に検出または定量する方法。

(41) 上記(1)~(7)のいずれか1つの蛋白質と結合し、該蛋白質の有する - カテニンと結合し - カテニンを核内に局在させる作用を阻害する中和抗体。

(42) bcl-2蛋白質と結合し、bcl-2蛋白質の有する - カテニンと結合し - カテニンを核内に局在させる作用を阻害する中和抗体。

(43) 上記(39)の抗体を用いて、健常人と被験者が有する上記(3)~(7)のいずれか1つの蛋白質の発現量を定量・比較し、健常人に比べ該蛋白質量が増加または減少している疾患を判別する方法。 20

(44) 上記(39)の抗体を含有する、上記(3)~(7)のいずれか1つの蛋白質の発現量が、健常人と比較して増加または減少している疾患の診断薬。

(45) 上記(41)の抗体を用いて、上記(1)~(7)のいずれか1つの蛋白質の機能を阻害することにより、 - カテニンとLef/Tcfファミリーに属する転写因子との複合体による転写の活性化を阻害する方法。

(46) 上記(42)の抗体を用いて、bcl-2蛋白質の機能を阻害することにより、 - カテニンとLef/Tcfファミリーに属する転写因子との複合体による転写の活性化を阻害する方法。 30

(47) (41)または(42)の抗体を含有する癌の治療薬。

本発明の蛋白質またはポリペプチドとしては、

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号292~439で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質、

(b) 蛋白質が、配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を有する上記(a)の蛋白質、

(c) 配列番号10で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質、

(d) 配列番号10および配列番号12で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質、

(e) 上記(a)~(d)のいずれか1つの蛋白質の有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が付加、欠失あるいは置換したアミノ酸配列からなり、かつ - カテニンと結合し、 - カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質、 40

(f) 上記(a)~(d)のいずれか1つの蛋白質の有するアミノ酸配列と、60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ - カテニンと結合し、 - カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質、

(g) 蛋白質が、配列番号2で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ - カテニンと結合し、 - カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質である上記(c)または(d)に記載の蛋白質、

(h) 配列番号12で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(i) 上記(a)~(h)のいずれか1つの蛋白質の有するアミノ酸配列中の連続した5~60アミノ酸残基を有するポリペプチド、をあげることができる。 上記のアミノ酸 50

の付加、欠失、あるいは置換は、Zoller M. J. & Smith M., *Nucleic Acids Res.*, 10, 6487 (1982)、Dalbadié-McFarland G.ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6409 (1982)、Wells J. A.ら、*Gene*, 34, 315 (1985)、Carter P.ら、*Nucleic Acids Res.*, 13, 4431 (1985)、Kunkel T. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、配列番号2記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより行うことができる。

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、1個から数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。

目的の変異(欠失、置換、付加)を導入した配列をそれぞれの5'端に持つ1組のPCRプライマーを用いたPCR[Ho S. N.ら、*Gene*, 77, 51 (1989)]によっても、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAに変異を導入することができる。すなわち、まず該DNAの5'端に対応するセンスプライマーと、5'端に変異の配列と相補的な配列を有する、変異導入部位の直前(5'側)の配列に対応するアンチセンスプライマーで該DNAを鋳型にしてPCRを行い、該DNAの5'端から変異導入部位までの断片A(3'端に変異が導入されている)を増幅する。次いで、5'端に変異の配列を有する、変異導入部位の直後(3'側)の配列に対応するセンスプライマーと、該DNAの3'端に対応するアンチセンスプライマーで該DNAを鋳型にしてPCRを行い、5'端に変異が導入された該DNAの変異導入部位から3'端までの断片Bを増幅する。これらの増幅断片同士精製後、混合して鋳型やプライマーを加えずにPCRを行うと、増幅断片Aのセンス鎖と増幅断片Bのアンチセンス鎖は変異導入部位が共通しているのでハイブリダイズし、プライマー兼鋳型としてPCRの反応が進行し、変異が導入された該DNAが増幅する。

また欠失変異体の一種である - カテニン核局在化蛋白質の部分断片をコードするDNAは、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAの任意のDNA断片の両端の塩基配列に対応したプライマーを用い、該DNAを鋳型にしたPCRを行うことにより取得することができる。

また、本発明の蛋白質が - カテニンを核に局在化させる機能を有するためには、配列番号2で表されるアミノ酸配列と、少なくとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。

アミノ酸配列や塩基配列の相同性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5873 (1993)]やFASTA[*Methods Enzymol.*, 183, 63 (1990)]を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXとよばれるプログラムが開発されている[J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメータは例えばScore = 100、word length = 12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメータは例えばscore = 50、word length = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメータを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

配列番号2で表されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が付加、欠失あるいは置換したアミノ酸配列からなり、かつ - カテニンと結合し、 - カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質として、配列番号2で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号245~564番目に相当する部分断片である配列番号4のアミノ酸配列からなる蛋白質をあ

げることができる。

本発明のDNAとしては、

- (j) 上記本発明の蛋白質またはポリペプチドをコードするDNA、
- (k) 配列番号1で表される塩基配列の塩基番号874~1317で表される塩基配列を含むDNA、
- (l) DNAが、配列番号1または3で表される塩基配列を有する上記(k)のDNA

(m) 以下の[1]または[2]に記載の塩基配列を含み、かつ -カテニンと結合し、 -カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質をコードするDNA、

[1] 配列番号9で表される塩基配列

[2] 配列番号9および11で表される塩基配列

(n) 上記(j)~(m)のいずれか1つのDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ -カテニンと結合し、 -カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質をコードするDNA、

(o) DNAが、配列番号9および11で表される塩基配列を含むDNAであり、かつ配列番号2で表される塩基配列と60%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAであり、かつ -カテニンと結合し、 -カテニンを核内へ局在させる作用を有する蛋白質をコードするDNA、または

(p) 配列番号11で表される塩基配列を有するDNA、をあげることができる。

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、例えば配列番号1で表される塩基配列を有するDNAなどの本発明のDNAまたはその一部のDNA断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0mol/Lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/L塩化ナトリウム、15mmol/Lクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)(以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons(1987-1997)(以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University(1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1で表される塩基配列と少なくとも60%以上の同一性を有するDNA、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有するDNAをあげることができる。

本発明のオリゴヌクレオチドとしては、本発明のDNAの塩基配列中の10~60塩基の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをあげることができる。ただし、公知の塩基配列、すなわちESTやゲノムドラフトシーケンスとしてその配列が公開されている塩基配列からなるオリゴヌクレオチドは、本発明のオリゴヌクレオチドから除く。

以下、本発明を詳細に説明する。なお、以下の説明において、 -カテニンと結合し、 -カテニンを核内へ局在させる作用をもつ蛋白質を「 -カテニン核局在化蛋白質」と総称し、本発明の新規なアミノ酸配列を有する -カテニン核局在化蛋白質を、アミノ酸配列がbc19と同一性をもつことからbc19類似蛋白質(bc19 like protein、以下、B9L蛋白質と略す)と称する。

10

20

30

40

50

1. - カテニン核局在化蛋白質をコードするDNAおよび該DNAの部分配列からなるオリゴヌクレオチド

1) B9L蛋白質をコードするDNAの取得

本発明のB9L蛋白質をコードするDNA(以下、B9L DNAと略記する)として、B9L全長cDNA、B9L全長cDNAに対応するゲノムDNA、B9L全長cDNAのB9L蛋白質をコードしている領域(配列番号1で表される塩基配列からなるDNA)、配列番号2で表されるアミノ酸配列をコードするDNAをあげることができる。

B9L cDNAは、酵母ツーハイブリッド法[Fields S.ら, Nature, 340, 245(1989)]により取得することができる。

酵母ツーハイブリッド法とは、GAL4のようなDNA結合ドメイン(BD)と転写活性化ドメイン(AD)が別々に存在するような酵母の転写因子Zを利用して、目的蛋白質[この方法では、一般にベイト(bait)と呼ばれる]Xと被検蛋白質Yの結合を検出する方法である。まず、宿主酵母内でXを転写因子ZのDNA結合ドメインとの融合蛋白(以下、BD-Xと称する)として発現できるプラスミド(ベイト・プラスミド)を作製する。一方、宿主酵母内でYと転写因子Zの転写活性化ドメインとの融合蛋白(以下、AD-Yと称する)として発現できるプラスミドを作製する。両プラスミドを宿主の酵母に導入し、BD-XとAD-Yを同時に発現させる。この宿主酵母には、転写因子Zが結合して転写を活性化するプロモーターの制御下で、リポーター遺伝子を発現できるような遺伝子型のものを用いる。蛋白質YがXと結合する性質を持っている場合は、BD-XとAD-Yが結合して複合体を形成するため、DNA結合ドメイン(BD)を介してプロモーターに結合した複合体が転写活性化ドメイン(AD)を介して転写を活性化しリポーター遺伝子が発現する。したがって、リポーター遺伝子の発現を指標として、蛋白質YがXと結合することを確認することができる。ここで、被検蛋白質Yとして、cDNAライブラリー由来の蛋白質を用いて、リポーター遺伝子の発現を指標にして形質転換体をスクリーニングすることにより、Xと結合する蛋白質YをコードするcDNAを含む形質転換体を単離することができる。該形質転換体からプラスミドを単離することにより目的とするcDNAをクローン化することができる。

以下、上記方法によるB9L cDNAのクローニングを、ベイトとしてマウス - カテニンのアルマジロ・ドメイン(以下、 - カテニンarmと略記する)を、転写因子Zとしては酵母GAL4をそれぞれ用いた場合を例にして具体的に説明する。

(1) ベイト・プラスミドの作製

本発明においては、ベイトとしてm - カテニンarm(マウス - カテニンのアミノ酸配列のアミノ酸番号128~683番目に相当する)を用いた。ベイト・プラスミドの作製のためには、ベイトとなるm - カテニンarmをコードするDNA(以下、m - カテニンarm DNAと略記する)が必要である。マウス - カテニンのcDNAの全塩基配列は公知[GenBankアクセス番号:M90364、Butz S.ら, Science, 257, 1142(1992)]であるので、m - カテニンarm DNAに相当する塩基配列は容易に見出すことができる。したがって、以下に示すRT-PCR[McPherson M. J.ら, PCR: A practical approach, Oxford University Press(1991)]によりm - カテ

ニンarm DNAを増幅し、単離することができる。具体的には、 - カテニンを発現しているマウスの組織あるいは細胞からRNAを単離し、該RNAを材料にしてcDNAを合成し、該cDNAを鋳型にしてm - カテニンarm DNAの5'端部分の塩基配列を含むセンスプライマーと3'端部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含むアンチセンスプライマーを用いてPCRを行なう。増幅用プライマーのそれぞれの5'端に、後述するベイト・プラスミド用ベクターのクローニング用制限酵素サイトの認識配列を存在させることにより、後述するベイト・プラスミド作製のベクターに増幅断片を組み込む際に制限酵素サイトを利用して効率よく組み込むことが可能となる。なおクローニング用制限酵素サイトの認識配列をプライマーに存在させる場合は、ベクターに組み込んだときに、転写因子の転写活性化ドメインとm - カテニンarm

のコードンのフレームが合うようにデザインする。

上記の方法で調製した m - カテニン arm DNA を組み込むベクターとしては、酵母 Saccharomyces cerevisiae で複製可能であり、適当な形質転換マーカー遺伝子、例えば TRP1、LEU2 等のアミノ酸合成系遺伝子等をもち、酵母で発現するプロモーター、例えばアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) プロモーターの制御下で、GAL4 の DNA 結合ドメイン (以下、GAL4 BD と略記する) を発現できるようなベクターが好ましい。この場合 m - カテニン arm DNA 挿入のため、GAL4 BD の C 末側に相当する部分に適当な制限酵素サイトがあり、また、ベクター DNA の精製等の取扱い上の容易さから、大腸菌でも複製でき、アンピシリン耐性遺伝子等の大腸菌で検出可能な形質転換マーカーをもつものが望ましい。このようなベクターとして

10

は pGBT9 [クローンテック (Clontech) 社]、pAS1 [Durfée T. ら, *Genes Dev.*, 7, 555 (1993)]、pAS2-1 (クローンテック社製) 等が挙げられる。

上記で調製した m - カテニン arm DNA を単離し、ベクター中の GAL4 BD の C 末側の制限酵素サイトにコードンのフレームが合うように挿入する。

(2) ツーハイブリッド法用 cDNA ライブラリーの作製

GAL4 の転写活性化ドメインとの融合蛋白質を発現する cDNA ライブラリーを作製するためのベクターとしては、酵母 Saccharomyces cerevisiae で複製可能であり、適当な形質転換マーカー遺伝子、例えば TRIP1、LEU2 等の酵母のアミノ酸合成系遺伝子等をもち、酵母で発現するプロモーター、例えば ADH プロモーターの制御下で、GAL4 の転写活性化ドメイン (以下、GAL4 AD と略記する) を発現できるようなベクターが好ましい。この場合、GAL4 AD の C 末側に相当する部分に適当な制限酵素サイトがあり、また、ベクター DNA の精製等の取扱い上の容易さから、大腸菌でも複製でき、アンピシリン耐性遺伝子等の大腸菌で検出可能な形質転換マーカーをもつものが好ましい。このようなベクターとしては pGAD [Chien C. T. ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9578 (1991)]、pGAD424 (クローンテック社製) や pACT [Durfée T. ら, *Genes Dev.*, 7, 555 (1993)]、pACT2-1 (クローンテック社製) 等が挙げられる。

20

細胞内で - カテニンと相互作用する蛋白質は、- カテニンと同じ細胞や組織で発現していると考えられる。- カテニンは成体や胎児の組織で広く発現していることが報告されているが、- カテニンが発現していると考えられるマウスの組織や細胞から cDNA を調製し、前述の融合蛋白質発現用ベクターの GAL4 AD の C 末側の制限酵素サイトに挿入することにより、cDNA ライブラリーを作製することができる。この場合、cDNA と GAL4 AD の方向およびフレームがあていれば、GAL4 AD と該 cDNA がコードする蛋白質との融合蛋白質が発現する。あるいは酵母ツーハイブリッド法に使用できる市販のライブラリー、例えば マッチメーカー (MATCHMAKER) cDNA ライブラリー (クローンテック社製) を用いることもできる。

30

(3) 酵母ツーハイブリッド法による cDNA のスクリーニング

(1) で作製したベイト・プラスミドと (2) で作製した cDNA ライブラリーを導入する酵母としては、Saccharomyces cerevisiae に属する酵母であって、上述のベイト・プラスミドと cDNA ライブラリーを導入でき、さらに (a) 導入するプラスミドの形質転換マーカーの遺伝子、およびツーハイブリッド法に用いた転写因子 GAL4 の遺伝子が欠失や変異により発現できないこと、(b) 適当なりポーター遺伝子のプロモーター部位に、GAL4 BD が結合する塩基配列が挿入してあることが必要である。この場合のリポーター遺伝子としては、ベイトとの結合により転写が開始された場合に検出が容易なもの、例えば HIS3 等のアミノ酸合成系遺伝子 (この場合、ベイト・プラスミドの形質転換マーカーとは異なるものを用いる)、酵母でも検出可能である大腸菌の ガラクトシダーゼ遺伝子 lacZ 等が好ましく用いられる。例えば Saccharomyces cerevisiae CG1945 株 (クローンテック社製)、HF7C

40

50

株(クローンテック社製)、Y153株 [Durfee T.ら, Genes Dev., 7, 555 (1993)]、CGY1:171株 [Gill G. & Ptashne M., Cell, 51, 121 (1987)]等があげられる。

この宿主酵母に(1)で作製したベイト・プラスミドと(2)で作製したcDNAライブラリーとを導入し、リポーター遺伝子の発現を指標にしてm⁻-カテニンarmと結合する蛋白質をコードするcDNAを含む形質転換体を選択する。例えば、ヒスチジン生合成系遺伝子HIS3遺伝子をリポーター遺伝子とした場合は、ヒスチジンを含まない最小培地で培養したときに生育するコロニーを、大腸菌lacZ遺伝子をリポーター遺伝子とした場合はX-galを作用させ青く発色するコロニーを選択する。

選択した形質転換体コロニーにはベイト・プラスミドとcDNAライブラリーのプラスミドの2種類のプラスミドが含まれているので、cDNAライブラリーのプラスミドだけを、文献[Glover D. M. & Hames B. D., DNA Cloning 2: Expression Systems (Practical Approach Series 149) Second Edition, Oxford University Press (1995)、Chien C. T.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9578 (1991)]記載の方法により単離する。すなわち、コロニーからプラスミドを含むDNA全体を単離し、大腸菌を形質転換する。この際の宿主大腸菌は、cDNAライブラリーのマーカー遺伝子に対応する遺伝子を発現せず、該マーカー遺伝子が導入された形質転換体が該マーカー遺伝子を発現した際に検出可能な株を用いる。該形質転換体より、cDNAライブラリー由来のマーカー遺伝子を発現している形質転換体を選択し、選択した形質転換体からプラスミドDNAを単離し、cDNAクローンとする。

(4) cDNAクローンの塩基配列の解析

(3)で得られたcDNAクローンの塩基配列は、得られたcDNAクローンをそのまま、あるいはcDNA部分を適当な制限酵素によって切り出してpUC118等の適当なクローニングベクターにサブクローニングした後、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばSangerらのジデオキシ法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)]あるいはパーキン・エルマー(Perkin Elmer)社等のDNAシーケンサーを用いることにより決定することができる。

得られたcDNAの塩基配列が新規な配列かどうかは、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJ等の塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の既存の遺伝子の塩基配列と一致すると考えられるような明らかな相同性を示す塩基配列がないことにより確認できる。

新規な塩基配列である場合、(3)で得られたcDNAクローンは(2)で述べたように、GAL4 ADのC末にB9L蛋白質が同一フレームでつながっている融合蛋白質をコードしているはずである。したがって、ここで解明されたcDNAの塩基配列をGAL4 ADの翻訳フレームと同じフレームでアミノ酸に変換することにより、このcDNAがコードしている蛋白質のアミノ酸配列を得ることができる。

また、このアミノ酸配列をBLAST、FASTA、FrameSearch等の相同性検索プログラムを用いて、Genpept、PIR、Swiss-Prot等のアミノ酸配列データベースを検索することにより、cDNAがコードする蛋白質と相同性をもつ既存の遺伝子を検索することができる。

以上のようにして得られる新規な塩基配列を有するcDNAとして配列番号3で表される塩基配列を有するcDNAをあげることができる。該cDNAは配列番号4で表される新規なアミノ酸配列を有する蛋白質をコードしている。

ただしこのようにして得られたcDNAは、目的とする蛋白質全体をコードしていない不完全長のcDNAであることが多い。この場合は、下記(5)に示す方法で全長のcDNAを得た後、上記で取得したcDNAをアミノ酸へ翻訳したときと同一のフレームでアミノ酸配列に翻訳することにより、目的とする蛋白質全体のアミノ酸配列を明らかにすることができる。なお、B9L蛋白質全体のアミノ酸配列をコードしていれば、B9L蛋白質を

コードしている領域の各コドンの塩基配列はcDNAで用いられているコドンに限られるものではなく、同じアミノ酸をコードするあらゆるコドンの塩基配列を用いることができる。

(5) B9L全長cDNAのクローン化

(4)の塩基配列の解析や後述するノーザンブロットハイブリダイゼーションで得られたmRNAの長さの情報から、(3)で得られたB9L cDNAが全長ではないと予測される場合は、以下に示す方法でB9L全長cDNAを調製することができる。

(5-1) cDNAライブラリーのスクリーニング

(2)で調製した融合蛋白発現cDNAライブラリー、あるいはβ-カテニンが発現しているためB9L蛋白質も同時に発現していると考えられる組織または細胞、または、後述するノーザンブロットでβ-カテニンのmRNAが検出された細胞等から調製したcDNAライブラリーに対して、(3)で得られたcDNAの全体あるいは一部をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーションを行い、ポジティブクローンの中から全長と考えられる長さのcDNAクローンを選択する。cDNAライブラリーの作製やハイブリダイゼーションはモレキュラー・クローニング 第2版に記載の方法で行なうことができる。また、クローンテック社等から市販されているcDNAライブラリーを利用することもできる。得られたcDNAクローンについて(4)と同様にして塩基配列を決定することにより、マウスB9L全長cDNAの塩基配列および、マウスB9L蛋白質全体のアミノ酸配列を明らかにすることができる。

(5-2) RACE法

B9L蛋白質が発現していると考えられる組織あるいは細胞からcDNAを調製し、そのcDNAの両端にアダプターオリゴヌクレオチドを付加し、このアダプターの塩基配列と(3)で得られたcDNAクローンの塩基配列に基づいたプライマーでPCRを行う5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法および3'-RACE法 [Frohman M. A.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)] により、(3)で得られたcDNAよりも5'側および3'側のcDNA断片を得ることができる。得られたcDNAの塩基配列を(4)と同様にして決定することによりB9L全長cDNAの塩基配列を明らかにすることができる。

(5-3) ESTの塩基配列の利用

(4)で決定したB9L cDNAの塩基配列を公知の塩基配列データベースと相同性解析を行なった際に、既知の遺伝子の塩基配列とは一致が見られないが、ランダムなcDNAクローンの部分塩基配列であるESTと一致が見られる場合がある。この場合はこれらのESTおよび該ESTの塩基配列と一致する塩基配列をもつEST、該ESTと同一クローン由来のESTを同一遺伝子由来のESTとして集める。これらのB9L cDNA由来と考えられるESTの塩基配列をつなぎ合わせると、(4)で得られたcDNAよりも、5'側あるいは3'側に延長した部分の塩基配列が見出されることがある。この場合、これらのESTをつなぎ合わせて得られた塩基配列の最も5'端の塩基配列を有するセンスプライマーあるいは3'端の塩基配列に相補的な塩基配列を有するアンチセンスプライマーを用いて、B9L蛋白質が発現していると考えられるマウス組織あるいは細胞由来のcDNAまたは、cDNAライブラリーを鋳型にしてRT-PCRを行なうことにより、(4)で得られたcDNAの塩基配列よりも5'側あるいは3'側の配列を含むcDNA断片を得ることができる。これらのcDNA断片の塩基配列を決定し、これらがB9L全長cDNAの5'端あるいは3'端に相当していると考えられる場合は、(4)で得られたcDNAの塩基配列とつなぎあわせることによりマウスB9L全長cDNAの塩基配列を明らかにすることができる。マウスB9L cDNA由来と考えられるESTが公知の塩基配列データベースより多数得られた場合は、RT-PCRを行なわなくても、集めたESTの塩基配列をつなぎ合わせることによりマウスB9L全長cDNAの塩基配列を明らかにすることもできる場合もある。

(5-4) B9L全長cDNAの調製

明らかになった B9L 全長 cDNA の 5' 末端および 3' 末端の塩基配列に基づいたプライマーを用いて、B9L 蛋白質を発現していると考えられるマウス組織あるいは細胞から (3) と同様にして調製した cDNA あるいは cDNA ライブラリーを鋳型として PCR を行うことにより B9L 全長 cDNA を増幅し、調製することができる。

また (5-1) で得られた B9L 全長 cDNA クローン、あるいは (5-2) や (5-3) で得られた 5' 側や 3' 側の部分 cDNA と最初に得られた B9L cDNA を cDNA 内の制限酵素サイトを利用してつなぎあわせることにより作製した B9L 全長 cDNA クローン、または上記の PCR で調製した B9L 全長 cDNA を、適当なクローニングベクターにクローン化した B9L 全長 cDNA クローンで、大腸菌を形質転換して培養し、そこからプラスミド DNA を調製することにより、B9L 全長 cDNA を調製することができる。

このようにして得られた配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA を含有するプラスミド DNA である pEGFP-C2B9L を含有する形質転換体 Escherichia coli MM294/pEGFP-C2B9L は、平成 12 年 9 月 6 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許性物寄託センター、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 1 中央 6 (郵便番号 305-8566) (旧称 工業技術院生命工学工業技術研究所、旧住所 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に FERM BP-7291 として寄託されている。

また B9L 全長 cDNA をその塩基配列に基づいて、DNA 合成機で化学合成することもできる。DNA 合成機としては、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製の DNA 合成機 model 392 等をあげることができる。

(6) ヒト B9L 蛋白質をコードする DNA の取得

ヒトの大腸癌の発症機構の解析やその治療や診断のためには、マウスよりもヒトの B9L 蛋白質あるいは該蛋白質をコードする DNA を取得することが重要である。一般に同じ機能を持つ蛋白質は、生物種が異なった場合、同一ではないが相同性を示すアミノ酸配列を有する場合が多い。したがってその蛋白質をコードする DNA も同様に相同性を示すと考えられる。また、生物の進化に伴い遺伝子の変異も進むため、その生物種が系統的に近いほど、その相同性は高いと考えられる。従って、(3) で得られたマウス B9L cDNA あるいはその塩基配列情報を用いることにより、以下に示す方法で、他の哺乳類、例えばヒトの B9L cDNA を取得することができる。この cDNA が完全長 cDNA でない場合は、(5) と同様の方法を用いることによりヒト B9L DNA を得ることができる。

なお、マウス B9L DNA を取得せずに、ヒト - カテニン [Hulsken J.ら, J. Cell Biol., 127, 2601 (1994)、GenBank アクセス番号 X87838] のアルマジロドメインをベイトとしたベイト・プラスミドとヒト cDNA ライブラリーを用いた酵母ツーハイブリッド法で (1) ~ (5) と同様の操作を行なうことにより、直接ヒト B9L cDNA を取得することも可能である。

(6-1) cDNA ライブラリーのスクリーニング

ヒト B9L 蛋白質の cDNA クローンは、マウス B9L 蛋白質が発現しているマウス組織と同じヒト組織あるいはそのような組織由来のヒト細胞から (5-1) と同様にして cDNA ライブラリーを作製するか、そのようなヒト組織や細胞由来の市販のヒト cDNA ライブラリーを購入し、当該 cDNA ライブラリーから、マウス B9L DNA を放射性同位体やジギキシゲニン等で標識したものをプローブにして、ややストリンジентな条件でコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーションを行なうことにより、取得することができる。

ここでいう、ややストリンジентな条件とは、ヒト B9L cDNA とマウス B9L cDNA の相同性の程度によって異なるが、制限酵素切断したヒト染色体 DNA に対してマウス B9L cDNA をプローブにして、ストリンジентな度合いが異なるいくつかのハイブリダイズ条件でサザンプロットハイブリダイゼーションを行い、明確なバンドが見える条件のうち最もストリンジентな条件を用いる。例えばホルムアミドを含まない

10

20

30

40

50

ハイブリダイズ液の場合、ハイブリダイズ液の組成は塩濃度を 1 m o l / l に固定し、ハイブリダイズ温度を 6 8 ~ 4 2 で段階的に変えたいくつかの条件下でハイブリダイズを行い、ハイブリダイズと同じ温度で 0 . 5 % S D S を含む 2 x S S C で洗浄を行って決めて決める。あるいはホルムアミドを含むハイブリダイズ液の場合、温度 (4 2) と塩濃度 (6 x S S C) を固定し、ホルムアミド濃度を 5 0 ~ 0 % で段階的に変えたいくつかの条件下でハイブリダイズを行い、5 0 で 0 . 5 % S D S を含む 6 x S S C で洗浄を行って決めて決める。

(6 - 2) E S T およびヒトゲノム塩基配列を利用したヒト B 9 L 蛋白質をコードする D N A の取得

(4) で得られたマウス B 9 L c D N A の塩基配列、特に蛋白質をコードしている領域と高い (具体的には 8 0 % 以上の) 相同性をもつヒト D N A の塩基配列を G e n B a n k 等の塩基配列データベースから B L A S T 等の相同性プログラムを用いて検索することにより、ヒト B 9 L c D N A 由来と推定される E S T あるいはヒト B 9 L ゲノム遺伝子のエキソン部分を含むヒトゲノム D N A の塩基配列を見出すことができる。このような塩基配列として、G e n B a n k アクセス番号 U 4 6 3 6 5 や R 2 4 7 6 2 のヒト E S T、あるいは G e n B a n k アクセス番号 A P 0 0 0 8 7 7、A P 0 0 2 3 5 7、A P 0 0 0 9 0 9 のヒトゲノム D N A のワーキング・ドラフト・シーケンスをあげることができる。このようなヒトゲノム D N A の配列とマウス B 9 L c D N A およびヒト E S T の塩基配列を比較することにより、ヒト B 9 L 蛋白質をコードするエキソン部分すなわちヒト B 9 L c D N A の配列を得ることができる。このようなヒト B 9 L ゲノム D N A のエキソンの塩基配列として配列番号 5 ~ 8 で表される塩基配列をあげることができる。該 E S T クローンは、例えば I n t e g r a t e d M o l e c u l a r A n a l y s i s o f G e n o m e E x p r e s s i o n C o n s o r t i u m (I . M . A . G . E . C o n s o r t i u m) の E S T クローンを A T C C から入手するか、または相同性をもつヒト E S T あるいはヒトゲノム D N A のエキソンの配列に基づいたプライマーを作製し、B 9 L 蛋白質が発現していると考えられるヒトの組織あるいは細胞から調製した m R N A を鋳型にして (3) と同様の R T - P C R を行い D N A 断片を増幅することにより、ヒト B 9 L c D N A を得ることができる。

(7) B 9 L ゲノム D N A の取得

モレキュラー・クローニング第 2 版に記載の方法により、マウスあるいはヒトの細胞や組織から単離した染色体 D N A を用いて作製したゲノム D N A ライブラリーに対して、(3) あるいは (6) で得られたマウスあるいはヒト B 9 L c D N A をプローブにして、ブランクハイブリダイゼーション等の方法でスクリーニングすることにより、B 9 L 遺伝子のマウスあるいはヒトのゲノム D N A を得ることができる。B 9 L のゲノム D N A の塩基配列と c D N A の塩基配列を比較することにより B 9 L 遺伝子のエキソン/イントロン構造を明らかにすることができる。また、特に c D N A の 5 ' 側の部分をプローブにすることにより、B 9 L 遺伝子のプロモーターなど転写を制御する領域のゲノム遺伝子の塩基配列を明らかにすることができる。この配列は B 9 L 遺伝子の転写の制御機構を解析するのに役立つ。また、相同性組換えの手法 [K u e h n M . R . ら , N a t u r e , 3 2 6 , 2 9 5 (1 9 8 7) , T h o m a s K . R . & C a p e c c h i M . R . , C e l l , 5 1 , 5 0 3 (1 9 8 7)] により、染色体上の B 9 L 遺伝子を不活化または任意の配列と置換したクローンを作製することができる。

(8) B 9 L オリゴヌクレオチドの調製

上記 (5) の D N A 合成機により、本発明の B 9 L D N A の一部の配列を有するオリゴヌクレオチドあるいはこれと相補的な塩基配列をもつオリゴヌクレオチド (以下、B 9 L オリゴヌクレオチドと略記する) を調製することができる。

B 9 L オリゴヌクレオチドとしては、具体的には、配列番号 1 で表される塩基配列中の連続した 1 0 ~ 6 0 塩基と同じ配列を有する D N A または該 D N A と相補的な配列を有する D N A をあげることができる。これらの D N A をセンスプライマーまたはアンチセンスプライマーとして用いる場合には、融解温度および塩基数が極端に変わることはないオリゴ

ヌクレオチドが好ましい。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-o-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔横山和尚，細胞工学，16，1463（1997）〕。

2) bcl9蛋白質をコードするDNAおよび該DNAの部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの取得

bcl9蛋白質は上記の方法で得られるマウスB9L蛋白質とアミノ酸配列レベルで全体に渡って約37%の相同性を有する蛋白質であるが、本発明により、 β -カテニンと結合することが見出されたことから、 β -カテニン核局在化蛋白質であると考えられる蛋白質である。ヒトbcl9蛋白質をコードする全長cDNAの塩基配列および該cDNAがコードするアミノ酸配列は公知である〔Willis T. G. et al., Blood, 91, 1871（1998）〕。bcl9蛋白質をコードするDNAやオリゴヌクレオチドは、ヒトcDNAやゲノムDNAから上記（5-4）、（7）、（8）の方法で得ることができる。また、上記（6）の方法と同様にしてヒト以外の動物、たとえばマウスのbcl9 DNAを得ることができる。

2. β -カテニン核局在化蛋白質または該蛋白質の部分ポリペプチドの製造法およびその活性の測定法

本発明の β -カテニン核局在化蛋白質であるB9L蛋白質やbcl9蛋白質および該蛋白質の部分ポリペプチドは、モレキュラー・クローニング 第2版、D. M. Glover and B. D. Hames; DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press（1995）等に記載された方法を用いて、1. で調製した β -カテニン核局在化蛋白質をコードするDNAまたは該蛋白質の部分ポリペプチドをコードするDNAを宿主細胞中で発現させることにより製造することができる。以下にB9L蛋白質を例にして記載するが、bcl9蛋白質または該蛋白質の部分ポリペプチドも同様にして製造することができる。

すなわち、B9L DNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、B9L蛋白質を発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のB9L蛋白質を製造することができる。

発現ベクターとしては、宿主細胞において自律複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、宿主細胞中でB9L DNAからmRNAを転写できるプロモーターを含有しているものが用いられる。

宿主細胞としては、原核生物、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。また、動物個体や植物個体を用いることができる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、発現ベクターは宿主原核生物中で自律

10

20

30

40

50

複製可能であり、リボソーム結合配列を有するプロモーターの下流にB9L DNAが配置されたものを用いる。リボソーム結合配列と開始コドンとの間は適当な距離（例えば、大腸菌宿主のベクターの場合6～18塩基）に調節されていることが好ましい。必ずしも必要ではないが、B9L DNAの直下に転写終結配列を配置する方が好ましい。また、形質転換体の選択のため、薬剤耐性遺伝子等のマーカーとなる遺伝子を発現する配列を含むようにする。

プロモーターとしては、宿主細胞中で機能するものであればいかなるものでもよい。例えば大腸菌を宿主とした場合は、trpプロモーター（P_{trp}）、lacプロモーター（P_{lac}）、P_Lプロモーター、T7プロモーター、P_Rプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター等をあげることができる。またP_{trp}を2つ直列させたプロモーター、tacプロモーター、T7lacプロモーター、letIプロモーターのように人為的に設計変更されたプロモーター等も用いることができる。枯草菌を宿主とした場合は、枯草菌のファージであるSPO1やSPO2のプロモーター、PenPプロモーター等をあげることができる。

発現ベクターとしては、例えば、pSE280（インビトロジェン社製）、pGEMEX-1（プロメガ社製）、pQE-8（キアゲン社製）、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript IISK (-)（ストラタジーン社製）、pKK223-3（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）、pGEX-5X-3（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）、pET14（ノバジェン社製）等を例示することができる。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュドモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniophilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Dower W. J. ら, Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]、カルシウムイオンを用いる方法 [Cohen S. N. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)、Reid J. D. ら, Gene, 17, 107 (1982)]、プロトプラスト法 [特開昭63-248394、Chan S. & Cohen S. N., Mol. Gen. Genet., 168, 111 (1979)]等をあげることができる。

10

20

30

40

50

酵母を宿主細胞として用いる場合の発現ベクターとしては、宿主酵母で転写を行なうプロモーター、B9L DNA、転写の終止配列および酵母での形質転換マーカーとなる遺伝子を発現できる配列を含有しているものが用いられる。また、発現ベクターの作製や維持を容易にするため、大腸菌内でも自律複製と遺伝子導入マーカーとなる薬剤耐性遺伝子を発現できるものが好ましい。

プロモーターとしては、酵母中で機能するものであればいずれのものを用いてもよく、例えば Saccharomyces cerevisiae のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 ADH1、ガラクトース代謝系遺伝子 GAL1 や GAL10 等のプロモーター、酸性フォスファターゼ遺伝子 PHO5 プロモーター、フォスフォグリセレートキナーゼ遺伝子 PGK プロモーター、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 GAP プロモーター、ヒートショック蛋白質遺伝子プロモーター、接合因子遺伝子 MF1 プロモーター、銅メタロチオネイン遺伝子 CUP1 プロモーター、Pichia pastoris のアルコールオキシダーゼ遺伝子 AOX1 のプロモーター等が用いられる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、ピヒア属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Pichia pastoris 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Becker D. M. & Guarente L., Methods. Enzymol., 194, 182 (1991)]、スフェロプラスト法 [Shortle D. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [Ito H. R., J. Bacteriol., 153, 163 (1983)] 等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、宿主動物細胞で転写を行なうプロモーター、B9L DNA、転写の終止と転写物のポリアデニル化のシグナルの配列を含有しているものが用いられる。またベクターの作製や維持を容易にするため、大腸菌内でも自律複製と遺伝子導入マーカーとなる薬剤耐性遺伝子を発現できるものが望ましい。プロモーターとしては、動物細胞中で機能するものであればいずれも用いることができるが、SV40 の初期プロモーター、ヒトサイトメガロウイルスの IE (immediate early) 遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー、ラウス肉腫ウイルス、ヒト T 細胞白血病ウイルス I、モロニーマウス白血病ウイルス等のレトロウイルスの LTR 等のウイルス由来の配列、あるいはメタロチオネイン遺伝子や - アクチン遺伝子、伸長因子 - 1 などの動物細胞由来の遺伝子のプロモーター等をあげることができる。また SV40 の初期プロモーターとヒト T 細胞白血病ウイルス I の LTR を組み合わせた SR プロモーター等これらのプロモーターを人為的に組み合わせたプロモーターも用いられる。宿主染色体 DNA に B9L DNA が組み込まれた恒常的な B9L 蛋白質発現細胞は、G418、ハイグロマイシン等の薬剤に対する耐性遺伝子を発現できる配列を含む B9L 発現ベクターを宿主細胞に導入し、薬剤の存在下で培養することにより選択することができる。また、宿主細胞中での B9L 蛋白質の生産量を上昇させるために、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (dhfr) 遺伝子を発現できるような配列を含む B9L 蛋白質の恒常的発現ベクターを宿主細胞に導入し、dhfr 阻害剤であるメトトレキセート (methotrexate) の濃度を段階的に上げながら培養することにより、dhfr 遺伝子とともに B9L DNA のコピー数を増幅させることもできる。この dhfr 遺伝子を用いた遺伝子増幅を行なう場合の宿主細胞としては、dhfr 遺伝子が機能していない細胞、例えば CHO/dhfr⁻ (ATCC: CRL-9096) などを用いる。

上記の B9L 蛋白質発現ベクターの作製に用いられる具体的なベクターとして、例えば、pEGFP-C2 (クローンテック社製)、PAGE107 [特開平3-22979、Miyaji H. R., Cytotechnol., 3, 133, (1990)]、PAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 [Seed B., Nature, 32

10

20

30

40

50

9, 840, (1987)]、p cDNA 3.1 (+) (インビトロジェン社製)、p REP 4 (インビトロジェン社製)、p BK-RSV (ストラタジーン社製)、p SVK 3 (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)、p cDNA 1.1 / Amp (インビトロジェン社製)、p AMO [Sasaki K.ら, J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)]等があげられる。

B9L蛋白質の動物細胞発現ベクターとしては、ベクター pEGFP-C2のEcoRI/SalIサイト間にマウスB9L全長cDNAを挿入したpEGFP-C2B9Lをあげることができる。pEGFP-C2B9Lを含む形質転換体 Escherichia coli MM294/pEGFP-C2B9Lは、平成12年9月6日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 1 中央第6 (郵便番号305-8566) (旧称 工業技術院生命工学工業技術研究所、旧住所 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号) にFERM BP-7291として寄託されている。

宿主細胞としては、ヒト細胞であるHeLa、ナマルバ(Namalwa)、293、アフリカミドリザル腎臓細胞であるCOS-1やCOS-7、ハムスターの細胞であるCHOやBHK、マウス胎児細胞であるNH13T3、マウス・ミエローマ細胞であるSP2/0やNSO、ラット・ミエローマ細胞であるYB2/0等の細胞株をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Miyaji H.ら, Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Felgner P.L.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合は、バキュロウイルス発現系 [O'Reilly D.R.ら, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York (1992)、Luckow V.A. & Summers M.D., Bio/Technology, 6, 47 (1988)]が用いられる。即ち、トランスファーベクターと呼ばれるベクターにB9L DNAを挿入した後、該ベクターとバキュロウイルスを昆虫細胞に同時に導入し、強力なプロモーターであるポリヘドリン遺伝子プロモーター下にB9L DNAが挿入された組換えバキュロウイルスを相同組換えによって作製した後、この組換えバキュロウイルスを再度昆虫細胞に感染させることにより、B9L蛋白質を発現することができる。

バキュロウイルスとしては Autographa californica 核多角体病ウイルス、カイコ核多角体病ウイルス等が用いられる。昆虫細胞としては Spodoptera frugiperda の細胞である Sf9 および Sf21 [O'Reilly D.R.ら, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York (1992)]、Trichoplusia ni の細胞である Hig5 (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。また、カイコ幼虫体をそのまま用いることもできる。トランスファーベクターには、ポリヘドリンプロモーターおよび相同組換えを起こさせるためのバキュロウイルス由来の配列、ベクターの維持・増殖や外来遺伝子の組み込み等の遺伝子操作を大腸菌内で行なうための配列 (大腸菌での自律複製可能な配列および薬剤耐性遺伝子) が含まれており、具体的には pVL1392、pVL1393、pBluebac4 (ともにインビトロジェン社製) 等があげられる。

動物個体を用いてB9L蛋白質を生産することもできる。例えば、公知の方法 [Colman A., Am. J. Clin. Nutr., 63, 639S (1996)、Rose J.M.ら, Am. J. Clin. Nutr., 63, 627S (1996)、Wright G.ら, Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて、B9L DNAを導入した動物中にB9L蛋白質を生産することができる。

プロモーターとしては、動物で機能するものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである カゼインプロモーター、カゼインプロモーター、ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物細胞または植物個体を宿主として用いる場合には、公知の方法 [井沢毅, 組織培養, 20, 6 (1994)、橋本隆, 組織培養, 21, 14 (1995)、Miele L., Trends Biotechnol., 15, 45 (1997)] に準じて B9L 蛋白質を生産することができる。

B9L DNA の発現に用いるプロモーターとしては、植物細胞中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター、イネアクチン 1 プロモーター等をあげることができる。また、プロモーターと発現させる B9L DNA との間に、トウモロコシのアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン 1 等を挿入することにより、B9L DNA の発現効率をあげることもできる。

宿主細胞としては、ポテト、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、大豆、トマト、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*)、エレクトロポレーション法 [Miyaji H.ら, Cytotechnol., 3, 133 (1990)]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法等をあげることができる。

B9L DNA を導入した植物の細胞や器官は、ジャーファーマンターを用いて大量培養することができる。また、遺伝子導入した植物細胞を再分化させることにより、B9L DNA が導入された植物個体 (トランスジェニック植物) を造成することもできる。

本発明の B9L DNA を組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、B9L 蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より B9L 蛋白質を採取することにより、B9L 蛋白質を製造することができる。

動物細胞を宿主とした形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI 1640 培地 [J. Am. Med. Assoc., 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [Eagle H., Science, 122, 501 (1952)]、Dalbecco 改変 Eagle 培地 [Dalbecco R. & Freeman G., Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。必要に応じてペニシリンやストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。培養は、通常 pH 6 ~ 8、30 ~ 40、5% CO₂ 存在下等の条件下で 1 ~ 7 日間行う。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 [ファージン (Pharming) 社製]、Sf-900 I I SFM 培地 (ライフ・テクノロジー社製)、ExCell 1400、ExCell 1405 [いずれも JRH バイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製]、Grace's Insect Medium [Grace T. D. C., Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。培養条件は、pH 6 ~ 7、培養温度 25 ~ 30 がよく、培養時間は、通常 1 ~ 5 日間である。また、培養中に必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、B9L 蛋白質を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より B9L 蛋白質を採取することにより、B9L 蛋白質を製造することができる。

すなわち、動物個体の場合、例えば、B9L DNA を保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該組換え体 DNA のコードする B9L 蛋白質を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より B9L 蛋白質を採取することにより、B9L 蛋白質を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげること

10

20

30

40

50

ができる。

植物個体の場合、例えば、B 9 L DNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、B 9 L蛋白質を該植物中に生成蓄積させ、該植物中よりB 9 L蛋白質を採取することにより、B 9 L蛋白質を製造することができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含みする糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。 10

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15 ~ 40 がよく、培養期間は、通常16 ~ 96時間である。培養中pHは3.0 ~ 9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。必要に応じて、培養期間中にアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。 20

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、l a cプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはIPTG等を、t r pプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

上記形質転換体の培養物中に蓄積したB 9 L蛋白質を単離精製するには、以下のような通常の蛋白質の単離精製法を用いればよい。 30

B 9 L蛋白質が細胞外に分泌される場合には、培地中にB 9 L蛋白質が蓄積する。従って培養終了後、遠心分離等の手法により細胞を含まない培地のみを回収する。該培地から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、D E A Eセファロース、D I A I O N H P A - 7 5 (三菱化成社製)、M o n o - Q (アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製)等のレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S Pセファロース(アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製)等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。 40

B 9 L蛋白質が、形質転換体の細胞内に蓄積する場合には、培養終了後の培養物から、形質転換体の細胞を遠心分離等の手法により回収し、緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。

B 9 L蛋白質が細胞内で溶解状態で存在する場合には、該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、上記の培地からの精製単離と同様にして精製標品を得ることができる。また、B 9 L蛋白質が細胞内に不溶体を形成して存在する場合は、該無細胞抽出液を遠心分離後、沈殿画分としてB 9 L蛋白質の不溶体を回収する。このB 9 L蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化した後、該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるい 50

は蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈あるいは透析し、B9L蛋白質を正常な立体構造に復元させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

また、公知の方法 [K i g a w a T . ら , J . B i o m o l . N M R , 6 , 1 2 9 (1 9 9 8) 、 S p i r i n A . S . ら , S c i e n c e , 2 4 2 , 1 1 6 2 (1 9 8 8) 、 K i g a w a T . & Y o k o y a m a S . , J . B i o c h e m . , 1 1 0 , 1 6 6 (1 9 9 1)] に準じて、in vitro転写・翻訳系を用いてB9L蛋白質を生産することができる。すなわち、B9L DNAをSP6、T7、T3等のプロモーターの下流につなげ、それぞれのプロモーター特異的なRNAポリメラーゼを反応させることにより大量のB9L RNAをインビトロで合成した後、無細胞系の翻訳系例えばウサギ網状赤血球ライセートやコムギ胚芽抽出液を用いた翻訳系を利用して、B9L蛋白質を生産することができる。

精製したB9L蛋白質の構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば「遺伝子クローニングのための蛋白質構造解析」(平野久著、東京化学同人発行、1993年)に記載の方法により実施可能である。

B9L蛋白質あるいはbc19蛋白質、およびこれらの蛋白質のアミノ酸配列中のアミノ酸の置換、欠失あるいは付加がなされた誘導体や部分断片、あるいはこれらの蛋白質とアミノ酸配列で相同性を有する蛋白質(以下これらを「B9L/bc19類似体」と総称する)が、 β -カテニンと結合するかどうかは、1.に示した酵母ツーハイブリッド法において、転写活性化ドメインとこれらの蛋白質をコードするDNAの融合蛋白質発現ベクターと β -カテニンのベイト・プラスミドを用いて、リポーター遺伝子の転写が検出されるかどうかで調べられる。

また、インビトロで直接B9L/bc19類似体と β -カテニンを混合し結合反応をさせた後、あるいは細胞内でB9L/bc19類似体を発現させることにより細胞内で結合させた後、反応液あるいは細胞抽出液に対して β -カテニンに対する抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降物中に該B9L/bc19類似体が存在するかどうかをウェスタンブロット等により検出することで、調べられる。また抗体を用いずに、B9L/bc19類似体をGST等の精製が容易な蛋白質あるいはペプチドとの融合蛋白質を作製した後、³⁵S等で標識した β -カテニンと結合反応を行い、B9L/bc19類似体の融合蛋白質を精製した後、精製物中に標識された β -カテニンが存在するかどうかをオートラジオグラフ等

により検出することによっても調べることができる。

また、B9L/bc19類似体が、 β -カテニンを核へ局在させる作用を有するかどうかは、 β -カテニンおよびB9L/bc19類似体の両者を強制発現させた細胞と β -カテニンのみを強制発現させた細胞で、細胞を固定化しそれぞれ抗 β -カテニン抗体を用いた免疫染色によって β -カテニンを検出することにより調べることができる。この場合、通常の β -カテニンでは細胞内でGSK-3による分解制御を受けるので、分解を受けずに蓄積するリン酸化部位の変異体例えば、33位セリンをチロシンに置換した β -カテニン変異体を用いることにより、細胞内に存在する β -カテニンの量が多くなり、細胞内での β -カテニンの検出が容易になる。 β -カテニンには細胞内局在性はなく、 β -カテニンのみを強制発現させた細胞では細胞全体に一樣に分布するが、B9L/bc19類似体に β -カテニンを核へ局在させる作用がある場合は、細胞質に比較して核により多くの β -カテニンが検出される。このような β -カテニンを核に局在化させる活性を有するB9L/bc19類似体として、B9L蛋白質、本発明でツーハイブリッド法により得られたcDNAクローンがコードするB9L蛋白質部分断片(マウスB9L蛋白質のアミノ酸配列の245~564番目の部分に相当する。配列番号4にアミノ酸配列を示した。)をあげることができる。

B9L蛋白質あるいはbc19蛋白質は、核内に移行する β -カテニンを増加させることから、 β -カテニン/TCFによる転写活性化を促進すると考えられる。

B9L蛋白質およびbc19蛋白質自体も含めB9L/bc19類似体が、Wntのシグナル伝達の結果おこる β -カテニン/TCFによる転写活性化にどのような影響を及ぼす

10

20

30

40

50

かは、TCFと結合する配列をもち、 β -カテニン/TCFに属する蛋白質との複合体により転写の活性化を受けるようなプロモーターの下流にルシフェラーゼやクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ等のレポーター遺伝子を接続させたプラスミド、例えばpTOPFLASH、pTOPCAT [両者ともKorinek V.ら, *Science*, 275, 1784 (1997)]を利用して調べることができる。上記のレポーター遺伝子発現プラスミドと、恒常的にTCF/Lefファミリーに属する蛋白質と結合して転写活性化を行えるような変異型 β -カテニン、例えば33番目めのセリン残基をチロシンに置換した β -カテニンの発現プラスミドを動物細胞に導入し、そこにB9L/bcl9類似体の発現プラスミドをさらに導入した場合としない場合で、レポーター遺伝子の発現量を測定し比較することにより、該B9L/bcl9類似体が β -カテニン/TCFによる転写活性化をさらに促進できるかどうかを調べることができる。

10

3. β -カテニン核局在化蛋白質を認識する抗体の調製

(1) ポリクローナル抗体の調製

上記2.に記載の方法により取得した β -カテニン核局在化蛋白質の全長または部分断片蛋白質、あるいはペプチド合成機による化学合成法等により製造した β -カテニン核局在化蛋白質の部分ペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。該抗原の投与量は動物1匹当たり50~100 μ gが好ましい。

20

部分ペプチドを抗原として用いる場合は、該部分ペプチドをKLHや牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。

該抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法 [石川栄治, 酵素免疫測定法医学書院 (1978)、Harlow E. & Lane D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、該血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿 [Harlow E. & Lane D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィ等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

30

(2) モノクローナル抗体の調製

(2-1) 抗体産生細胞の調製

上記(1)において、免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3~7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM中で細断し、ピンセットでほぐし、1200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

40

得られた沈殿画分の脾細胞をTris-塩化アンモニウム緩衝液 (pH 7.65) で1~2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(2-2) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [Yelton D.E.ら, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 81, 1 (1978)、Kohler G. & Milste

50

in C., Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)], SP2/0-Ag14 (SP-2) [Shulman M.ら, Nature, 276, 269 (1978)], P3-X63-8653 (653) [Seeger R. C.ら, J. Immunol., 123, 1548 (1979)], P3-X63-Ag (X63) [Kohler G. & Milstein C., Nature, 256, 495 (1975)]等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI 1640培地に1.5 mmol/lグルタミン、 5×10^{-5} mmol/l 2-メルカプトエタノール、10 μ g/ml ジェンタマイシンおよび10%ウシ胎児血清 (CSL社製)を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに15 μ g/ml 8-アザグアニンを加えた培地] で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。 10

(2-3) ハイブリドーマの作製

(2-1) で取得した抗体産生細胞と (2-2) で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム1.83 g、リン酸一カリウム0.21 g、塩化ナトリウム7.65 g、蒸留水1リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞 : 骨髓腫細胞 = 5~10 : 1になるよう混合し、1200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 10^8 抗体産生細胞あたり、PEG-1000 2 g、MEM 2 ml およびDMSO 0.7 mlを混合した溶液を0.2~1 ml添加し、更に1~2分間毎にMEM 1~2 mlを数回添加する。 20

添加後、MEMを加えて全量が50 mlになるように調製する。

該調製液を900 rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈澱画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地 [正常培地に 10^{-4} mmol/lヒポキサンチン、 1.5×10^{-5} mmol/lチミジンおよび 4×10^{-7} mmol/lアミノプテリンを加えた培地] 100 ml中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養用プレートに100 μ l/穴ずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で7~14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりHarlow E. & Lane D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) Chapter 14等に述べられている酵素免疫測定法により、上記抗体産生細胞を取得するために、免疫に用いた抗原に特異的に反応するハイブリドーマを選択する。 30

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明の蛋白質の全長または部分断片精製標品を適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(2-4)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明の蛋白質に特異的に反応するものを本発明の蛋白質に対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。 40

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返す [1回目は、HT培地 (HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものを本発明の蛋白質に対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

(2-4) モノクローナル抗体の調製

プリスタン (Pristan; 2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) 0.5 mlを腹腔内投与し、2週間飼育した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(2-3)で取得した本発明の蛋白質に対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマ 50

は腹水癌化する。

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの設定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

4. - カテニン核局在化蛋白質をコードするmRNAの検出・定量法および該蛋白質の発現量がmRNAレベルで変動している疾患の診断方法

- カテニン核局在化蛋白質のDNA、例えば配列番号1で表される塩基配列を有するB9L DNAやbc19 DNA、該DNAの部分断片例えば配列番号1で表される塩基配列の連続する200bp以上の連続した塩基配列を有する断片や - カテニン核局在化蛋白質のオリゴヌクレオチドを用いて、 - カテニン核局在化蛋白質のmRNAを検出することができる。

- カテニン核局在化蛋白質のmRNAを検出する方法としては、例えばノーザンブロット法、i n s i t uハイブリダイゼーション法、定量的PCR法、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、DNAチップ法、RNase保護アッセイ法などの方法等があげられる。これらの方法により組織や細胞におけるB9L蛋白質のmRNAレベルでの発現量を調べることができる。

これらの方法によって、 - カテニン核局在化蛋白質がどのような組織や細胞で発現しているかという情報や、細胞がどのような刺激を受けたときにその発現量が変化するかという情報を得ることができる。

これらの方法に用いる試料としてはヒトや動物から採取した臓器や生体組織、血液等の生体試料、あるいはこれらの生体試料から樹立した初代培養細胞、細胞株が用いられる。

ノーザンブロット法は、試料から抽出した全RNAあるいはmRNA（以下「試料由来RNA」という）をゲル電気泳動で分離後、ナイロンフィルター等の膜に転写し、 - カテニン核局在化蛋白質をコードするDNAあるいはその部分配列を有するDNA、 - カテニン核局在化蛋白質をコードするDNAの部分配列を有するオリゴヌクレオチドを放射性同位体やジゴキシゲニン、ピオチン等で標識して調製したプローブを用いて、ハイブリダイゼーションならびに洗浄を行い、 - カテニン核局在化蛋白質をコードするmRNAを、標識プローブが特異的に結合したバンドとして検出する方法のことでありモレキュラー・クロニング第2版に記載の方法および条件に基づいて行うことができる。バンドの強度すなわち結合した標識プローブの量は - カテニン核局在化蛋白質のmRNAの量を反映しているので、組織や病態により発現量がほとんど変化せず、常に構成的に発現しているアクチンやG3PDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)等のmRNAのバンドを同一のフィルター上で検出し、その強度によって標準化を行うことにより - カテニン核局在化蛋白質を、mRNAレベルでの発現量を定量することができる。また、試料由来RNAを電気泳動する際に標識したRNA分子量マーカーを同時に電気泳動し、バンドの泳動位置を分子量マーカーの位置と比較することにより、 - カテニン核局在化蛋白質のmRNAの長さを測定することができる。

i n s i t uハイブリダイゼーション法は、試料である臓器や生体組織からパラフィン包埋切片あるいはクリオスタット切片を作製し、該切片に対して - カテニン核局在化蛋白質をコードするDNA、該DNAの部分配列を有するDNA、あるいは - カテニン核局在化蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列からなるオリゴヌクレオチドより調製した標識プローブとハイブリダイゼーションならびに洗浄の工程を行い、組織内の - カテニン核局在化蛋白質発現細胞や発現部位を詳細に検出する方法で、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法および条件により行うことができる。

10

20

30

40

50

定量的PCR法 [Delidow B. C.ら, Gene Anal. Tech., 6, 120 (1989)]は、試料由来RNAからオリゴdTプライマーと逆転写酵素を用いて合成したcDNA (以下「試料由来cDNA」という)を鋳型として - カテニン核局在化蛋白質をコードするcDNAの塩基配列に基づき設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCRを行い、 - カテニン核局在化蛋白質をコードするmRNA由来のDNA断片を特異的に増幅する方法である。該増幅DNA断片の量は試料中の - カテニン核局在化蛋白質をコードするmRNAの量を反映することから、組織や病態で発現量の変化しないアクチンやG3PDH等のcDNAに対するPCRをコントロールとすることで - カテニン核局在化蛋白質をコードするmRNAを定量することが可能である。オリゴヌクレオチドプライマーは、プライマー間あるいはプライマー内でのハイブリダイゼーションを起こさないアニーリング温度で - カテニン核局在化蛋白質をコードするcDNAと特異的に結合して、変性温度ではずれるように設計する。該増幅DNA断片の定量は増幅産物が指数関数的に増加しているPCR回数の中に行うことが必要である。このようなPCR回数は、一つの試料に関して増幅回数を変えてPCRを行い、各回数ごとに増加する該増幅DNA断片の量をゲル電気泳動で分析することで知ることができる。

ディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法 [Lennon G. G. & Lehrach H., Trends Genet., 7, 314 (1991)]やDNAチップ法 [Shalon D.ら, Genome Res., 6, 639 (1996)]は、 - カテニン核局在化蛋白質をコードするDNA、該DNAの部分塩基配列を有するDNA、あるいは - カテニン核局在化蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを固定化させたフィルターあるいはスライドガラスやシリコンなどの基盤に対して、試料由来RNAからオリゴdTプライマーと、標識dNTPおよび逆転写酵素を用いて合成した標識cDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションならびに洗浄を行うことで、測定の対照となる検体の - カテニン核局在化蛋白質のmRNAレベルでの発現量の変動を検出する方法である。いずれの方法もフィルターあるいは基盤上にアクチンやG3PDHのDNAを固定化し内部コントロールとすることにより、測定検体と対照検体との - カテニン核局在化蛋白質のmRNAレベルでの発現の差を検出することができる。また測定検体と対照検体から標識cDNAプローブを作製する際、両者で異なる標識dNTPを用いて作製し、1枚のフィルターあるいは1枚の基盤に二つの標識cDNAプローブを同時にハイブリダイズさせることで正確な定量を行うことができる。

リボヌクレアーゼ保護アッセイ [Pape M. E.ら, Genet. Anal. Tech. Appl., 8, 206 (1991)]では、まず - カテニン核局在化蛋白質をコードするDNAの3'端にT7プロモーター、SP6プロモーターなどのプロモーター配列を結合し、標識NTPおよびプロモーター特異的なRNAポリメラーゼを用いたインビトロの転写系により標識した - カテニン核局在化蛋白質のアンチセンスRNAを合成する。該標識アンチセンスRNAを検体から調製した全RNAまたはmRNAとハイブリダイゼーションさせ、検体中の - カテニン核局在化蛋白質のmRNAとRNA-RNAハイブリッドを形成させた後、リボヌクレアーゼで消化し、ハイブリッドの形成によりリボヌクレアーゼによる消化から保護されたバンドをゲル電気泳動で検出する。保護されたバンドを定量することで、 - カテニン核局在化蛋白質のmRNAレベルでの発現を定量することができる。

以上のような方法により、被検者およびコントロールとなる健常者から生検等により採取した臓器や生体組織、血液等の生体試料、あるいはこれから培養した初代培養細胞を検体として用い、両者の - カテニン核局在化蛋白質のmRNAレベルでの発現の定量を行い比較することにより、 - カテニン核局在化蛋白質のmRNAレベルでの発現量が健常者と比べて増加あるいは減少している疾患を診断することができる。

該疾患としては、例えば大腸癌等の癌があげられる。大腸癌等の癌では、 - カテニン核局在化蛋白質の発現量が増加し、 - カテニンの核内への移行および - カテニン/TCFによる転写活性化が促進されることが、細胞の癌化の原因の一つとなりうる。したがって大腸癌等の癌細胞の中には、通常の細胞に比べて - カテニン核局在化蛋白質の発現量

が増加しているものがあると考えられ、上記方法により、 β -カテニン核局在化蛋白質の発現量が増加していると診断された場合、癌を患っている可能性が考えられる。

5. β -カテニン核局在化蛋白質の遺伝子の変異検出法および該遺伝子に変異を有する疾患の診断方法

β -カテニン核局在化蛋白質をコードするDNA、該DNAの部分塩基配列を有するDNAあるいは β -カテニン核局在化蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて、10~100人からなる大腸癌等の疾患を有する患者集団と健常人等の対照集団における β -カテニン核局在化蛋白質のゲノムDNAの塩基配列を比較し、該疾患と β -カテニン核局在化蛋白質遺伝子等の変異の有無の関係を評価することができる。

検体としてはヒトから採取した臓器や生体組織、血液等の生体試料あるいはこれらから樹立した初代培養細胞から抽出したゲノムDNAあるいはこれらから抽出した全RNAまたはmRNAから調製したcDNAを用いることができる(以下これらを「検体DNA」と称す)。

また、検体DNAを鋳型に、B9L DNAの塩基配列に基づき設計したプライマーで増幅したDNA断片の塩基配列を決定し、正常なB9L DNAの塩基配列と比較することにより、変異の有無を見出すこともできる。

B9L遺伝子のDNAに疾患と関連する変異があるかどうかを選別する方法として、一本鎖コンフォメーション多型(single strand conformation polymorphism; SSCP)解析[Sheffield V.C.ら, Genomics, 16, 325(1993)]、ミスマッチ切断、変性ゲル電気泳動等の方法があげられる。

SSCP解析はB9L DNAの200bpよりも小さい断片を増幅できるようなプライマーを、B9L蛋白質をコードするDNAの塩基配列に基づいて設計し、該プライマーを用いて検体由来DNAを鋳型にPCRを行い、増幅したDNA断片を変性後、未変性のポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行う方法である。PCRを行う際にプライマーを放射性同位体や蛍光色素で標識するか、または増幅したDNA断片を銀染色することにより、増幅したDNA断片をバンドとして検出できる。未変性ゲル中では、塩基配列の違いにより移動度が変化するので、正常な塩基配列を有するB9L DNA断片との移動度を比較することにより変異を検出できる。

ミスマッチ切断法は、検体DNAを鋳型に、B9L DNAの塩基配列に基づき設計したプライマーでPCRを行い、増幅したDNA断片を放射性同位体や蛍光色素で標識した正常な塩基配列を有するB9L DNAとハイブリダイズさせ、四酸化オスミウムあるいはT4ファージエンドヌクレアーゼVII[Dean M., Nat. Genet., 9, 103(1995)]で処理することにより、ミスマッチ部位でDNAを切断する方法である。最も感度の高い検出法の1つであり、キロベースの長さの検体にも適応できる。

変性ゲル電気泳動(denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE)法[Fischer S.G. & Lerman L.S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1579(1983)、Cariello N.F. & Skopek T.R., Mutat. Res., 288, 103(1993)]は、検体DNAを鋳型に、B9L DNAの塩基配列に基づき設計したプライマーで増幅したDNA断片を化学的変性剤の濃度勾配や温度勾配を有するゲルを用いて電気泳動する方法である。塩基配列の変異によりDNA断片の変性がおこる温度あるいは変性剤濃度が変化するため、移動度が変化することから、変異の存在を検出することができる。プライマーにポリ(G:C)末端を付けることにより検出感度を上げることができる[Sheffield V.C.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 232(1989)]。

以上のような方法で見い出された突然変異は、Handbook of Human Genetics Linkage, The John Hopkins University Press(1994)に記載された方法に従い統計処理を行うことで、疾患と

10

20

30

40

50

の連鎖がある一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms; SNPs) として同定することができる。

癌等の疾患と連鎖のある突然変異が見出された場合は、この変異部位とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブにより染色体DNAをサザンハイブリダイゼーション解析することや、3'端が一致しないとPCRによる増幅がおこらないことを利用した、疾患では変異がおきている部位に対応する正常配列を3'端にもつようなB9L蛋白質のオリゴヌクレオチドプライマーによるPCR、B9Lのオリゴヌクレオチドシーケンスプライマーによる変異部位の塩基配列解析等により疾患の診断を行なうことができる。

また、B9L蛋白質をコードするDNAあるいは該DNAの部分塩基配列を有するDNAをプローブにして、適当な制限酵素で切断した染色体DNAに対してサザンハイブリダイゼーションすることにより、B9L遺伝子の欠失、コピー数の変化、染色体転座等の異常を検出することができる。

DNAに変異があるかどうかを選別する別の方法として、蛋白質短縮試験 (protein truncation test: PTT) 法 [van der Luijt R.ら, Genomics, 20, 1 (1994)] がある。この方法は変異の結果、翻訳フレームの途中でストップコドンが生じ蛋白質の欠失を生み出すようなフレームシフト突然変異、スプライス部位突然変異、ナンセンス突然変異等を特異的に検出できる方法である。PTT法では、B9L蛋白質をコードするDNAの塩基配列の5'末端にT7プロモーター配列と真核生物翻訳開始配列をつないだ特殊なプライマーを設計し、該プライマーを用いて検体由来RNAよりRT-PCRによりcDNA断片を増幅させる。該cDNAについてT7RNAポリメラーゼを含むインビトロ転写系を用いてmRNAの転写を行わせ、このmRNAについてインビトロ翻訳系を用いて蛋白質を生産させる。該蛋白質のSDS-PAGEを行い、正常なB9L蛋白質のmRNAから翻訳されたB9L蛋白質と分子量を比較することにより、蛋白質の欠損を生み出す変異を検出できる。

6. -カテニン核局在化蛋白質遺伝子の染色体位置の決定

-カテニン核局在化蛋白質のDNAを用いて、ラジエーション・ハイブリッド法 [Science, 250, 245 (1990)] や *in situ* ハイブリダイゼーション法 [Annals of Human Genetics, 45, 135 (1981)、Cell, 52, 51 (1988)] により、-カテニン核局在化蛋白質の遺伝子の染色体上の位置を決定することができる。

ラジエーション・ハイブリッド法とは、Gene-Bridge 4などのヒト染色体断片をもつ多数のパネル(どの部分の染色体断片が含まれているかが染色体マーカーにより解析されているもの) DNAに対し、-カテニン核局在化蛋白質の遺伝子の特異的に増幅させるPCRを行い、増幅結果を解析することにより詳細な染色体の位置を特定する方法である。

in situ ハイブリダイゼーション法では、まず、ヒト染色体の標本に対し、ヒトB9L蛋白質をコードするDNAをプローブとしてハイブリダイズしたシグナルを検出し、標本上のシグナルの位置を特定する。これにより、-カテニン核局在化蛋白質の遺伝子の存在する染色体の番号だけでなく、その染色体上での物理的な位置を特定することができる。プローブは、放射性同位体³Hやビオチンにより標識し、³H標識ではオートラジオグラフにより、ビオチン標識では蛍光色素FITCで標識したアビジンを用いてシグナルを検出することができる。

また、上記のように直接 -カテニン核局在化蛋白質の遺伝子の染色体位置を検出する方法ではないが、STS (sequence-tagged site: 種々のESTの塩基配列に由来するプライマーとそのプライマーによって増幅される染色体DNA断片およびその断片の染色体上の位置についての情報を有する) のデータベースに対してB9L蛋白質をコードするDNAの塩基配列と相同性を検索することにより、-カテニン核局在化蛋白質のDNAの一部と同一の塩基配列を持つSTSが見出された場合は、そのSTSは染色体上の -カテニン核局在化蛋白質の遺伝子と対応するものと考えられるので、そのSTSの染色体上の位置が -カテニン核局在化蛋白質の遺伝子の染色体上の位置であ

10

20

30

40

50

ると推定できる。

また、データベース上のヒトゲノムDNAの配列には通常、その配列の染色体の位置についての情報が記載されている。例えば、上記1.(6-2)で得られたヒトB9Lゲノム遺伝子のエキソンを含むヒトゲノムDNAの配列である、GenBankアクセス番号AP000877、AP000909についてはヒト染色体11q23に位置することがデータベース上に記載されている。したがってヒトB9L遺伝子はヒト染色体11q23に位置するということができる。

なお、bc19遺伝子についてはヒト染色体1q21に位置することが既に報告されている。

このようにして得られた - カテニン核局在化蛋白質の遺伝子の染色体上の位置の情報は、疾患と - カテニン核局在化蛋白質の遺伝子の関連を研究するのに役立つ。例えば、癌では癌抑制遺伝子の存在する可能性の高い染色体上の領域として、多くの癌について高頻度にLOH(Loss of heterozygosity: 2対の内の一方の遺伝子に見られる染色体欠失)が検出される領域の特定が進んでいるが(LOHのおきている領域にある癌抑制遺伝子のもう一方で変異が起こることにより癌抑制遺伝子の不活化が起こり、癌が発症すると考えられているため)、このような領域と - カテニン核局在化蛋白質の遺伝子が存在する染色体の位置が一致すれば、 - カテニン核局在化蛋白質がこの領域にLOHを持つ癌の発症に関与する可能性があることになる。この場合、このような癌における - カテニン核局在化蛋白質の遺伝子の変異や - カテニン核局在化蛋白質の発現量を解析することにより、 - カテニン核局在化蛋白質の関連が明らかになれば、この 10 20

7. - カテニン核局在化蛋白質の活性を阻害することによる癌の治療

APC遺伝子や - カテニン遺伝子に変異を持つような大腸癌等の癌細胞では、 - カテニンの分解制御ができなくなり - カテニンが蓄積することにより - カテニン/TCFによる転写の活性化の抑制ができなくなっていることが、癌としての発症に関与していると考えられる。 - カテニン核局在化蛋白質の - カテニンを核内に局在させるという作用を阻害したり、 - カテニン核局在化蛋白質の発現を抑制することにより、蓄積した - カテニンの核内への移行が妨げられ、 - カテニン/TCFによる転写の活性化を抑制 30

(1) - カテニン核局在化蛋白質の阻害剤およびそのスクリーニング方法

- カテニン核局在化蛋白質の阻害剤とは、 - カテニン核局在化蛋白質と - カテニンの結合を阻害することにより、 - カテニンの核への移行を阻害する物質である。

- カテニンと - カテニン核局在化蛋白質を接触させ、試験化合物を添加した場合としない場合での - カテニンと - カテニン核局在化蛋白質の結合量を比較することにより - カテニン核局在化蛋白質と - カテニンの結合を阻害する物質をスクリーニングすることができる。

例えば - カテニン核局在化蛋白質を³⁵S等で標識した - カテニンを試験化合物の存在下/非存在下で混合して結合させた後、抗体等により - カテニン核局在化蛋白質を単離して、標識物質の量を測定することにより、 - カテニン核局在化蛋白質と結合した - カテニンの量を評価することができる。試験化合物が存在しない場合と比べて存在した場合に、結合した - カテニンの量が減少している場合、 - カテニン核局在化蛋白質と - カテニンの結合を阻害する物質と考えられる。 40

このようにして得られた - カテニン核局在化蛋白質と - カテニンの結合を阻害する物質が、 - カテニンの核への移行を阻害するかどうかは、 - カテニンおよび - カテニン核局在化蛋白質の両者を強制発現させた細胞に試験化合物を添加/非添加の場合の細胞をそれぞれ固定化し、それぞれ抗 - カテニン抗体を用いた免疫染色によって - カテニンを検出することにより調べることができる。この場合、通常の - カテニンでは細胞内でGSK-3による分解制御を受けるので、分解を受けずに蓄積するリン酸化部位の変 50

異体例えば、33位セリンをチロシンに置換した - カテニン変異体を用いることにより、細胞内に存在する - カテニンの量が多くなり、細胞内での - カテニンの検出が容易になる。 - カテニンには細胞内局在性はなく、 - カテニンのみを強制発現させた細胞では細胞全体に一様に分布するが、B9L/bcl9類似体に - カテニンを核へ局在させる作用がある場合は、細胞質に比較して核により多くの - カテニンが検出される。上記スクリーニング法に用いる - カテニンおよび - カテニン核局在化蛋白質は、該蛋白質を発現している組織、細胞などから精製した蛋白質を用いてもよいが、該蛋白質をコードするDNAを用いて形質転換された形質転換体を培養し、常法に従って精製することにより、大量の該蛋白質を得ることができる。また該蛋白質を生産する培養細胞や培養細胞処理物を用いても、本スクリーニングを行うことは可能であるが、細胞をそのまま用いる場合は、該蛋白質を分泌生産する細胞を用いるのが好ましい。ここでいう培養細胞処理物とは、濃縮物、培養細胞の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる細胞、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩砕処理物、該細胞の溶媒処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の蛋白質分画物、該細胞の固定化物あるいは該細胞より抽出して得られる酵素標品等があげられる。

10

(2) - カテニン核局在化蛋白質の発現を抑制する方法

- カテニン核局在化蛋白質の発現を抑制する方法としては、 - カテニン核局在化蛋白質遺伝子に対するアンチセンスDNAやアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与あるいはアンチセンスRNA発現ベクターの投与による、mRNAから - カテニン核局在化蛋白質蛋白質への翻訳の抑制、 - カテニン核局在化蛋白質遺伝子プロモーターと結合するトリプルヘリックス形成オリゴヌクレオチド投与による転写の阻害、リボザイムの投与による - カテニン核局在化蛋白質mRNAの分解、 - カテニン核局在化蛋白質遺伝子の転写を特異的に阻害する化合物の投与による転写の阻害をあげることができる。

20

8. 遺伝子治療用ベクター

- カテニン核局在化蛋白質の発現量が少ないことが原因の疾患に対しては、 - カテニン核局在化蛋白質あるいは - カテニン核局在化蛋白質をヒト生体内で産生する遺伝子治療用ベクターを投与することにより治療を行うことができる。

- カテニン核局在化蛋白質をヒト生体内で産生する遺伝子治療用ベクターとして - カテニン核局在化蛋白質を産生する組み換えウイルスベクターをあげることができる。該組み換えウイルスベクターは、1.に記載の方法で取得したヒト - カテニン核局在化蛋白質完全長cDNA、あるいは必要に応じて - カテニン核局在化蛋白質をコードする領域を含む適当な長さのDNA断片を調製し、ウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、造成することができる。該組換えウイルスベクターは、ウイルスのパッケージングに必要な蛋白質例えばマウスモロニー白血病ウイルス等のレトロウイルスの場合はgag、pol、env等、HIV等のレンチウイルスの場合はgag、pol、env、vpr、vpu、vif、tat、rev、nef等、アデノウイルスの場合はE1A、E1B等、アデノ随伴ウイルスの場合はRep(p5, p19, p40)、Vp(Cap)等の遺伝子が欠損している。

30

該組換えウイルスベクターを、該組換えウイルスベクターに適合したパッケージング細胞に導入する。パッケージング細胞としては、該組換えウイルスベクターで欠損しているウイルスのパッケージングに必要な蛋白質を補給できる細胞は全て用いることができ、例えばヒト腎臓由来のHEK293細胞、マウス繊維芽細胞NIH3T3等を用いることができる。

40

ウイルスベクターとしては上記パッケージング細胞において組換えウイルスが生産でき、標的細胞でB9L遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。プラスミドベクターとしてはMFG[Riviere I.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733(1995)], pBabepuro[Morgnster J.P. & Land H., Nucleic Acids Res., 18, 3587(1990)], LL-CG, CL-CG, CS-CG, CLG[Miyoshi H.ら, J. Virol., 72, 8150(1998)], pAd

50

ex 1 [Kanegae Y.ら, *Nucleic Acids Res.*, 23, 3816 (1995)]、プロモーターとしては、ヒト組織中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えばサイトメガロウイルスのIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのLTR、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター等をあげることができる。また、サイトメガロウイルスのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

上記パッケージング細胞への上記組換えウイルスベクターの導入法としては、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法 [Felgner P. L.ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。 10

また、ウイルスベクターを用いない遺伝子治療方法としては、所望の組織にDNAを直接輸送する手段として、裸のプラスミドDNAの形態で直接注入される治療用遺伝子トランスフェクション法がある [US 5589466]。すなわち、 β -カテニン核局在蛋白質をコードするDNAを有する発現ベクターを、治療が必要な組織、例えば大腸癌組織に注射器等を用いて注入することにより、該蛋白質を該癌組織内で発現させることができる。

9. 抗体を用いた β -カテニン核局在化蛋白質の検出および定量方法

β -カテニン核局在化蛋白質を認識する抗体を用いて β -カテニン核局在化蛋白質を免疫学的に検出する方法としては、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法、フローサイトメトリー、ウェスタンブロットティング法、サンドイッチELISA等の酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay; EIA) や放射性免疫測定法 (Radioimmunoassay; RIA) などがあり、文献 [富山朔二・安東民衛編 単クローン抗体実験マニュアル (講談社サイエンティフィック 1987年)、続生化学実験講座5 免疫生化学研究法 (東京化学同人 1986年)、Goding J. W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Third edition* (Academic Press 1996)、Harlow E. & Lane D., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory 1988)] に基づいて行うことができる。 20 30

免疫組織化学染色法は、生体組織や細胞を固定化し、 β -カテニン核局在化蛋白質を認識する抗体を反応させ、さらに蛍光物質、酵素、ビオチン、金コロイド、放射性物質等で標識した抗イムノグロブリン抗体あるいは抗体断片を反応させた後、必要ならば標識抗体の可視化処理を行い、顕微鏡を用いて観察することにより組織や細胞中の β -カテニン核局在化蛋白質を検出する方法である。蛍光物質標識には、フルオレセイン・イソチオシアネート (FITC)、テトラメチルローダミン・イソチオシアネート等が用いられ、蛍光顕微鏡によって観察することにより検出する。酵素標識の場合はペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等が用いられ、酵素により発色する基質を添加して発色反応させた後、光学顕微鏡で観察することにより検出できる。ビオチン標識の場合は、ペルオキシダーゼ等の酵素で標識したアビジンを反応させた後、酵素標識抗体と同様の操作を行う。金コロイド標識の場合は、電子顕微鏡で観察することにより検出する。放射性物質標識には¹²⁵I等が用いられ、感光乳剤をコートして放射線により析出した銀粒子を光学顕微鏡で観察することにより検出できる。 40

フローサイトメトリーは、被験者から採取した細胞に、 β -カテニン核局在化蛋白質を認識する抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネートあるいはフィコエリスリンなどの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体あるいは抗体断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定することにより、細胞での β -カテニン核局在化蛋白質の発現を検出する方法である。

ウェスタンブロットティング法は、被験者から採取した生体組織または細胞あるいはそれらの破砕液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画した後、該ゲルをPVDF膜 50

あるいはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に α -カテニン核局在化蛋白質を認識する抗体またはその抗体断片を反応させ、さらにペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼなどの酵素や¹²⁵I等の放射性物質で標識した抗イムノグロブリン抗体あるいは抗体断片を反応させた後、 α -カテニン核局在化蛋白質のバンドを検出する方法である。検出は、酵素標識の場合は、酵素により発色する基質を添加して反応させ α -カテニン核局在化蛋白質のバンドを可視化したり、酵素により発光する基質を添加してX線フィルムのオートラジオグラフィにより検出し、放射性物質の場合はX線フィルムのオートラジオグラフィにより検出する。

酵素免疫測定法の一つであるサンドイッチELISAでは、抗原認識部位の異なる2種類の α -カテニン核局在化蛋白質を認識するモノクローナル抗体を用意し、あらかじめ一方のモノクローナル抗体または抗体断片はプレートに吸着させ、もう一方のモノクローナル抗体または抗体断片はペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼなどの酵素で標識しておく。被検者から採取した生体組織あるいは細胞から細胞破砕液を調製し、試験サンプルとする。抗体吸着プレートに試験サンプルを反応させ、さらに酵素標識した α -カテニン核局在化蛋白質モノクローナル抗体またはその抗体断片を反応させ、酵素により発色する基質を添加して発色反応させた後、分光光度計により発色強度を測定することにより、サンプル中の α -カテニン核局在化蛋白質の検出または定量を行う。

放射性免疫測定法は、酵素でなく¹²⁵I等の放射性物質で標識した抗体を用いて、酵素免疫測定法と同様の操作を行い、シンチレーションカウンターで放射線を測定することによりサンプル中の α -カテニン核局在化蛋白質の検出または定量を行う方法である。

また酵素免疫測定法や放射性免疫測定法には、上記のようなサンドイッチ法の他に、抗体でなく α -カテニン核局在化蛋白質標品を標識し、一定量の標識 α -カテニン核局在化蛋白質標品と試験サンプルとをプレートに固相化した α -カテニン核局在化蛋白質を認識する抗体と反応させ、プレート上の酵素活性や放射線を測定することにより、サンプル中の α -カテニン核局在化蛋白質の検出または定量を行う競合法もある。

10. 医薬組成物

上記 α -カテニン核局在化蛋白質を含有する治療薬は、薬剤として該物質または該中和抗体単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与または、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適切な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該蛋白質そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該蛋白質を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該蛋白質および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経

10

20

30

40

50

口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり10 μg/kg ~ 100 mg/kgである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例を用いて詳細に説明する。

実施例1 B9L cDNAのクローン化

酵母ツーハイブリッドシステムを利用して、マウスm - カテニンarmと結合する蛋白質をコードする遺伝子をクローン化した。

(1) m - カテニンarmのベイトプラスミドの作製

マウス - カテニンのcDNAの塩基配列およびそのcDNAがコードするマウス - カテニンのアミノ酸配列は公知である[GenBankアクセス番号M90364、Science, 257, 1142(1992)]。マウス - カテニンはそのアミノ酸配列の128 ~ 683番目にアルマジロドメイン(m - カテニンarm)と呼ばれる繰り返し配列を有する。このm - カテニンarm部分をコードするマウス - カテニンのDNA断片を、マウス細胞cDNAを鋳型にしてPCRを行なうことにより増幅し単離した。PCRプライマーは上記のm - カテニンarmをコードするcDNAの部分の塩基配列をもとにデザインした。増幅したDNA断片の塩基配列を決定し、m - カテニンarmをコードしているものであることを確認後、ベクターpGBT9(クローンテック社製)のBamHI/SalIサイト間に挿入することによりGAL4 BDと融合させた蛋白質を発現させるプラスミドGAL4 - - cateninを作製した。

(2) ツーハイブリッド法によるスクリーニング

クローンテック社製のツーハイブリッド法に用いるライブラリーであるマッチメーカー・マウス胎児(Swiss Webster/NIHマウスの17日胚)cDNAライブラリーに対してスクリーニングを行った。このcDNAライブラリーはベクターpGAD10(クローンテック社製)にcDNAが挿入されているものであり、選択マーカとして酵母ロイシン合成系遺伝子LEU2をもち、ADH1プロモーターを使用して、GAL4 ADとcDNAのコードする蛋白とが融合蛋白の形で発現する。スクリーニングの具体的方法はライブラリーに添付されたクローンテック社のマニュアルに従って、以下のようにして行った。

すなわち、ツーハイブリッド法用のマウス胎児cDNAライブラリーと上記(1)で作製したプラスミドGAL4 - - cateninを酵母Saccharomyces cerevisiae HF7C株(クローンテック社製)に導入した。HF7C株は、トリプトファン、ロイシン、ヒスチジン要求性であり、その染色体中には、レポーター遺伝子としてGAL4 BDが結合するプロモーターであるGAL1プロモーターの下流につなげたヒスチジン合成系遺伝子HIS3および、GAL4 BDが結合するような塩基配列の下流につなげた大腸菌由来 - ガラクトシダーゼ遺伝子lacZを持っている菌株である[Gene, 212, 197(1998)]。プラスミドGAL4 - - cateninおよびm - カテニンarmと結合する蛋白質のcDNAクローンの両者を保持しそれぞれの融合蛋白質を発現する形質転換体は、m - カテニンarmと該結合蛋白質の結合によりGAL4 BDとGAL4 ADが近接し、GAL4 BDが結合する塩基配列の下流のHIS3遺伝子およびlacZ遺伝子の転写が活性化されるため、ヒスチジン非要求性、 - ガラクトシダーゼ活性陽性となる。1.2 × 10⁶個の形質転換体から、ロイシン、ヒスチジン、トリプトファンを含まない培地上で増殖し、 - ガラクトシダーゼ活性陽性のコロニーを選択した。

このクローンからプラスミドDNAを回収し、挿入されているcDNA断片の塩基配列を決定し、配列番号3に示した。この塩基配列を塩基配列データベースに対して相同性検索したところ、いくつかのマウスのESTに塩基配列が一致するものがあったが、既存の遺伝子の塩基配列で一致するものは見出されなかった。したがってツーハイブリッド法で単離された上記cDNA断片は、マウス - カテニンと結合する蛋白質をコードする、新規な塩基配列を有するcDNA断片であることが明らかとなった。このcDNA断片がコー

ドする蛋白質のアミノ酸配列を配列番号4に示した。配列番号3で表される塩基配列を有するcDNA断片は、終止コドンがみられずに全体が蛋白質をコードしていることから、全長cDNAの部分断片であると考えられた。全長cDNAは配列番号3で表される塩基配列の5'および3'側にさらに塩基配列が延長すると考えられた。そこで、5'-RACE法および3'-RACE法により、得られたcDNA断片よりもさらに5'側の塩基配列を含むcDNA断片および3'側の塩基配列を含むcDNA断片を増幅し、その塩基配列を決定した。ツーハイブリッド法によって得られたクローンのcDNAの塩基配列と5'-RACE法および3'-RACE法により得られたcDNAの塩基配列をつなぎ合わせるにより配列番号1で表される塩基配列を得た。この塩基配列は配列番号2で表される1494アミノ酸よりなる蛋白質をコードしていた。なおツーハイブリッド法で得られたcDNA断片の塩基配列は配列番号1で表される塩基配列の塩基番号733~1692番目に相当し、このcDNA断片がコードしていたアミノ酸配列は配列番号2で表されるアミノ酸配列の245~564番目に相当していた。このアミノ酸配列についてNCBI(National Center for Biotechnology Information)のアミノ酸配列データベースと相同性解析プログラムBLAST2を用いて相同性を調べたところ、第1図に示すようにbc19蛋白質[アクセス番号CAA73942; Willis T. G. et al., Blood, 91, 1871(1998)]と全体に渡って37%の相同性がみられたため、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる - カテニン結合蛋白質をB9L蛋白質(bc19 like protein)と名づけた。なお、上記のbc19蛋白質はヒトのものであり、マウスbc19蛋白質のアミノ酸配列は明らかになっていないが、マウスbc19蛋白質をコードするcDNAの塩基配列と考えられるESTが塩基配列データベースGenBankに存在し(アクセス番号AI550007、AI426858)、それらの塩基配列はヒトbc19蛋白質に対して90%以上と非常に高い相同性を有している(B9L蛋白質の塩基配列の相当部分の塩基配列の相同性は40%以下)、得られたB9L蛋白質(マウス)はマウスのbc19蛋白質にあたるものではないと考えられる。B9L蛋白質はbc19蛋白質と同様にプロリンを非常に高い割合で含む蛋白質であり、核内移行シグナルと類似の配列を有する。

なお、このcDNAをプローブとしてマウス胎児(13.5日胚)mRNAに対してノーザンブロットハイブリダイゼーションを行ったところ、長さ7.5kbのmRNAのバンドが検出された。

(3) ヒトB9L遺伝子および染色体上の位置

(2)で得られたマウスB9L cDNAの塩基配列と相同性をもつヒトDNAの塩基配列をGenBank等の塩基配列データベースからBLAST等の相同性プログラムを用いて検索した。その結果、ヒトB9L cDNA由来と推定されるGenBankアクセス番号U46365やR24762のヒトESTおよび、ヒトB9Lゲノム遺伝子のエキソン部分を含むGenBankアクセス番号AP000877、AP002357、AP000909のヒトゲノムDNAのワーキング・ドラフト・シークエンスを見出した。これらのワーキング・ドラフト・シークエンスと、マウスB9L cDNAおよびヒトESTの塩基配列を比較することにより、ヒトB9Lをコードするエキソン部分の配列として配列番号5~8の塩基配列が得られた。配列番号5はマウスB9L cDNAの塩基配列(配列番号1)の27~412番目に、配列番号6は413~532番目に、配列番号7は1183~3115番目に、配列番号8は3116~3397番目にそれぞれ対応するエキソンである。配列番号9に配列番号5および6から導かれるヒトB9L cDNAの部分塩基配列(配列番号1のマウスB9L cDNAの塩基配列の27~532番目に対応する)、配列番号10に配列番号9の塩基配列がコードするヒトB9L蛋白質の部分アミノ酸配列(配列番号2のマウスB9L蛋白質のアミノ酸配列の10~177番目に対応する)、配列番号11に配列番号7および8から導かれるヒトB9L cDNAの部分塩基配列(配列番号1のマウスB9L cDNAの塩基配列の1183~3397番目に対応する)、配列番号12に配列番号11の塩基配列がコードするヒトB9L蛋白質の部分

アミノ酸配列（配列番号2のマウスB9L蛋白質のアミノ酸配列の395～1132番目に対応する）を示した。

また、AP000877、AP000909についてはヒト染色体11q23に位置することがデータベース上に記載されており、ヒトB9L遺伝子はヒト染色体11q23に位置すると考えられた。

実施例2 B9L蛋白質と -カテニンのインビトロでの結合

B9L蛋白質が -カテニンと直接結合することを、以下のようにして確認した。なお、実施例2～5でB9L蛋白質として用いているのは、実施例1に記載のツーハイブリッド法により得られたB9L cDNA断片がコードする配列番号4のアミノ酸配列からなる蛋白質である。

実施例1でツーハイブリッド法により得られたB9L cDNA断片から、³⁵S標識メチオニンとTNT-網状赤血球溶解液システム（プロメガ社製）を用いたインビトロ転写・翻訳により³⁵S標識B9L蛋白質を合成した。マウス -カテニンDNAを大腸菌用グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）発現プラスミドベクターpGEX5X-1（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）のクローニングサイトに挿入したGST - -カテニン融合蛋白質（以下、GST - -カテニンと略す）発現プラスミド[Nakamura et al., Genes to Cells, 3, 395 (1998)]および対照用としてpGEX5X-1でそれぞれ形質転換した大腸菌を培養し、それぞれの菌体破砕液を調製した。これらの菌体破砕液にグルタチオン-セファロース4B（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）を添加して、GST - -カテニンまたはGSTを吸着させて単離した。GST - -カテニンまたはGSTをそれぞれ吸着させたグルタチオン-セファロース4Bと上記の³⁵S標識B9L蛋白質とを0.1%トリトンX-100を含む緩衝液A [10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.0)、140 mmol/l NaCl、1 mmol/l EGTA、10 μg/ml ロイペプチン、10 μg/ml アプロチニン] 中で4 で2時間反応させた。グルタチオン-セファロース4Bを緩衝液Aでよく洗浄した後、SDS-PAGE用サンプルバッファーを添加することにより、結合していた蛋白質をサンプルバッファー中に溶出させた。この溶出液および³⁵S標識B9L蛋白質をサンプルとしてSDS-PAGEを行なった後、ゲルのオートラジオグラフィーを行なった。その結果、GST - -カテニン発現大腸菌では³⁵S標識B9L蛋白質のバンドが検出されたのに対して、GST発現大腸菌ではバンドは検出されなかった。したがって、GST - -カテニンにB9L蛋白質がインビトロで直接結合すること、およびB9L蛋白質が結合する部分は、GST - -カテニン中の -カテニン部分であることが確認された。

実施例3 B9L蛋白質と -カテニンの動物細胞内での結合

実施例1で得られたB9L cDNA断片をグリーン蛍光蛋白質（GFP）発現ベクターpEGFP-C2（クローンテック社製）に挿入し、GFP-B9L融合蛋白質（以下GFP-B9Lと略す。）発現用プラスミドを作製した。また、動物細胞発現用プラスミドベクターpMKITneo [Nakamura et al., Genes to Cells, 3, 395 (1998)]に、GSK-3 によりリン酸化を受ける33位のセリン残基をチロシンに置換した変異型マウス -カテニンS33Y cDNAをサブクローニングし、S33Y -カテニン発現用プラスミドを作製した。これらのプラスミドDNAをリポフェクトアミン（LipofectAMINE; ライフ・テクノロジーズ社製）を用いてサル腎臓細胞株COS-7（ATCC: CRL-1651）に導入し、強制発現させた。24時間後に細胞を回収して、1%トリトンX-100を含む緩衝液Aを添加して細胞溶解液を調製し、この細胞溶解液と抗GFP抗体あるいは抗 -カテニン抗体と4 で1時間反応させて、GFP-B9LあるいはS33Y -カテニンと抗体の免疫複合体を形成させた後、反応液にIgGと結合する性質をもつプロテインG-セファロース4B（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）を添加し、免疫複合体を吸着させた。プロテインG-セファロース4Bを溶解用緩衝液Aでよく洗浄した後、SDS-PAGE用サンプルバッファーを添加して免疫複合体を溶出させた。この溶出液をサンプルとし

10

20

30

40

50

て SDS-PAGE を行った後、PVDF 膜イモビロン P (Immobilon P; ミリポア社製) に転写し、一次抗体として抗-カテニン抗体 [トランスダクション・ラボラトリー (Transduction Laboratory) 社製; 免疫動物はマウス]、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより S33Y-カテニンの検出を行なった。その結果を第 2 図に示したが、GFP-B9L を沈降させるための抗 GFP 抗体による免疫沈降物中に、抗-カテニン抗体によりバンドが検出されたことから、細胞内においても GFP-B9L は-カテニンと結合していることが確認された。

実施例 4 B9L 蛋白質の-カテニンの細胞内局在に対する作用

実施例 3 で作製した GFP-B9L 発現用プラスミドおよび S33Y-カテニン発現用プラスミドについて、それぞれ単独あるいは両者をマウス NIH3T3 細胞にエフェクチン (Effectene; キアゲン社製) を用いて導入し、強制発現させた。またコントロールとして GFP 発現ベクター pEGFP-C2 も同様にしてマウス NIH3T3 細胞に強制発現させた。24 時間後の細胞をホルムアルデヒドで固定化後、抗-カテニン抗体で細胞を染色後、FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体を反応させ、蛍光顕微鏡で観察することにより、細胞内の S33Y-カテニンを検出した。また、GFP-B9L は、GFP の直接蛍光顕微鏡 (FITC 用フィルター使用) 観察によって検出した。

その結果、S33Y-カテニンのみを発現させた細胞では、S33Y-カテニンが細胞質および核内に一様に分布しているのに対し、S33Y-カテニンと GFP-B9L の両者を発現させた細胞では、S33Y-カテニン、GFP-B9L とともに核内に局在していた。したがって、B9L 蛋白質は-カテニンと結合し、-カテニンを核内に局在させる性質をもつことがわかった。なお、GFP-B9L のみを発現させた場合も、GFP-B9L は核内に局在したが、GFP だけを発現させた場合は細胞質および核内に一様に分布していることから、核内への局在は付加した GFP とは無関係で B9L 蛋白質によることが確認された。

また、実施例 1 で得られた B9L 全長 cDNA を pEGFP-C2 の EcoRI / SalI サイト間に挿入した動物細胞発現用プラスミド pEGFP-C2-B9L を作製し、上記と同様にマウス 3T3 細胞に S33Y-カテニン発現用プラスミドとともに強制発現させ、細胞内の S33Y-カテニンを検出したところ、ツーハイブリッド法で得られた B9L 蛋白質断片と同様に、S33Y-カテニン、GFP-B9L (全長) とともに核内に局在していた。したがって、B9L 全長も-カテニンと結合し、-カテニンを核内に局在させる性質をもつことが確認された。

実施例 5 B9L 蛋白質と-カテニンの結合様式

(1) -カテニン中の結合領域

実施例 1 に記載のように B9L 蛋白質は-カテニンのアルマジロ・ドメイン部分 (-カテニン arm) に結合する蛋白質として得られたものだが、-カテニン arm のどの部分が B9L 蛋白質と結合するかを、以下のようにして-カテニン arm の部分断片を発現させ、B9L 蛋白質とそれぞれの-カテニン部分断片の結合を調べた。-カテニン arm ほぼ全体 (マウス-カテニンのアミノ酸配列の 141 ~ 664 番目に相当)、-カテニン arm 前半 (マウス-カテニンのアミノ酸配列の 141 ~ 390 番目、アルマジロ・リピート 1 ~ 6 に相当)、-カテニン arm 後半 (マウス-カテニンのアミノ酸配列の 391 ~ 664 番目、アルマジロ・リピート 7 ~ 12 に相当) をコードする DNA を、実施例 1 で作製した-カテニン arm のベイト・プラスミドを鋳型にして、それぞれ配列番号 13 で表される塩基配列を有するセンスプライマーおよび配列番号 16 で表される塩基配列を有するアンチセンスプライマー、配列番号 13 で表される塩基配列を有するセンスプライマーおよび配列番号 14 で表される塩基配列を有するアンチセンスプライマー、配列番号 15 で表される塩基配列を有するセンスプライマーおよび配列番号 16 で表される塩基配列を有するアンチセンスプライマーを用いて PCR により増幅し、ベクター pGBT9 に挿入してそれぞれのベイト・プラスミドを作製した。

それぞれのベイト・プラスミドと実施例 1 でツーハイブリッド法により得られた B9L

cDNA断片発現クローンと酵母HF7C株に導入し、形質転換体の β -ガラクトシダーゼ活性の有無により、B9L蛋白質とそれぞれの β -カテニン部分断片の結合を調べた。その結果、 β -カテニンarmほぼ全体および β -カテニンarm前半(アルマジロ・リピート1~6)とB9L蛋白質は結合がみられたが、 β -カテニンarm後半(アルマジロ・リピート7~12)とは結合がみられなかった。したがって、B9L蛋白質は β -カテニンarm前半(アルマジロ・リピート1~6)の領域と結合すると考えられた。

(2) B9L蛋白質中の結合領域

実施例1に記載のように、B9L蛋白質のアミノ酸配列を表す配列番号2のアミノ酸番号245~564番目のアミノ酸配列をもつ蛋白質が β -カテニンarmに結合する蛋白質として得られたことから、B9L蛋白質は、 β -カテニンarmとアミノ酸配列の245~564番目の領域で結合すると推定される。そこで、さらにこの中のどの領域が β -カテニンarmと結合するかを、以下のようにしてツーハイブリッド法により調べた。B9L蛋白質のアミノ酸配列を表す配列番号2のアミノ酸番号245~291番目、292~439番目、440~564番目、245~439番目、292~564番目をコードするDNA断片をPCRにより増幅しベクターpGAD424(クローンテック社製)に挿入することにより各B9L蛋白質部分断片をGAL4ADとの融合タンパク質として発現するツーハイブリッド法用の発現プラスミドを作製した。それぞれのプラスミドを実施例1で作製した β -カテニンarmベイト・プラスミドと酵母HF7C株に導入し、形質転換体の β -ガラクトシダーゼ活性の有無により、それぞれのB9L蛋白質部分断片と β -カテニンarmの結合を調べた。その結果、配列番号2で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号292~439番目、245~439番目および292~564番目のB9L蛋白質部分断片は β -カテニンarmと結合がみられたが、292~439番目の配列を含まない、アミノ酸配列の245~291番目および440~564番目のB9L蛋白質部分断片は β -カテニンarmとの結合がみられなかった。したがって、B9L蛋白質は配列番号2で表されるアミノ酸配列中のアミノ酸番号292~439番目の領域で β -カテニンarmと結合すると考えられた。

実施例6 bcl9蛋白質と β -カテニンの結合性

実施例5で β -カテニンとの結合領域であると特定されたB9L蛋白質のアミノ酸配列を表す配列番号2のアミノ酸番号292~439番目の領域は、相同性をもつ蛋白質であるbcl9蛋白質のアミノ酸配列の244~410番目のアミノ酸に相当する。そこで、bcl9蛋白質のこの領域が β -カテニン結合能をもつかどうかを実施例5と同様にして調べた。

すなわち、ヒトbcl9蛋白質のアミノ酸配列の244~410番目をコードするDNA断片をPCRにより増幅しベクターpGAD424(クローンテック社製)に挿入しbcl9蛋白質(244-410)部分断片をGAL4ADとの融合タンパク質として発現するツーハイブリッド法用の発現プラスミドを作製し、このプラスミドを実施例1で作製した β -カテニンarmベイト・プラスミドと酵母HF7C株に導入した。その結果、形質転換体で β -ガラクトシダーゼ活性が確認されたことから、bcl9蛋白質は β -カテニンとアミノ酸配列の244~410番目の領域で結合することがわかった。bcl9蛋白質には、核移行シグナル類似の配列があることから、bcl9蛋白質も、 β -カテニンと結合し核に局在させる作用を有する蛋白質である推定された。したがってbcl9蛋白質、bcl9蛋白質をコードするDNA、bcl9蛋白質を認識する抗体、bcl9蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列からなるオリゴヌクレオチドもB9L蛋白質、B9L蛋白質をコードするDNA、B9L蛋白質を認識する抗体、B9L蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと同様の目的に用いることができると考えられる。bcl9蛋白質は、B細胞前駆体の急性リンパ芽球性白血病患者から樹立された細胞株CEMO-1における異常に高い発現が報告されており[Willis T. G. et al., Blood, 91, 1871(1998)]、bcl9蛋白質がB9L蛋白質と同様に β -カテニンの核への局在を起し、 β -カテニン/TCFによる転写活性化を亢進することにより、癌の発症に関与しているという仮説を裏付けるものである

。

産業上の利用可能性

本発明により、新規な - カテニン核局在化蛋白質および該蛋白質をコードするDNAが提供され、 - カテニン核局在化蛋白質および該蛋白質をコードするDNAを利用して、癌などの - カテニン核局在化に関連する疾患の診断薬および治療薬を開発することができる。

「配列表フリーテキスト」

配列番号13 - 人工配列の説明：5'末端に MunI 認識配列を有するマウス - カテニンのアルマジロリピート1 (141番目の Asn 残基の下流) に対するセンスプライマー

配列番号14 - 人工配列の説明：5'末端に SalI 認識配列を有するマウス - カテニンのアルマジロリピート6 (390番目の Asp 残基の上流) に対するアンチセンスプライマー

配列番号15 - 人工配列の説明：5'末端に MunI 認識配列を有するマウス - カテニンのアルマジロリピート7 (391番目の Ala 残基の下流) に対するセンスプライマー

配列番号16 - 人工配列の説明：5'末端に SalI 認識配列を有するマウス - カテニンのアルマジロリピート12 (664番目の Glu 残基の上流) に対するアンチセンスプライマー

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> beta-catenin nuclear localization proteins

<130>

<140>

<141>

<150> JP 00/287876

<151> 2000-09-22

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4482

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(4482)

<400> 1

atg agg atc ctg gct aac aag aca agg tta ccc cac ccc agg agg aga 48

Met Arg Ile Leu Ala Asn Lys Thr Arg Leu Pro His Pro Arg Arg Arg

1

5

10

15

gag gct cca ggg agt cca ccg ctg tcc cct egg ggc cac tgc ccc cct 96

Glu Ala Pro Gly Ser Pro Pro Leu Ser Pro Arg Gly His Cys Pro Pro

20

25

30

gcc cca gcc aag cca atg cac cca gaa aat aaa ctg acc aat cat ggc 144

Ala Pro Ala Lys Pro Met His Pro Glu Asn Lys Leu Thr Asn His Gly

10

20

30

40

35	40	45	
aag aca ggg aat gga ggg gcc caa tcc cag cac cag aat gtg aac caa			192
Lys Thr Gly Asn Gly Gly Ala Gln Ser Gln His Gln Asn Val Asn Gln			
50	55	60	
gga ccc acc tgc aac ctg ggc tcc aag ggc gtg ggg gcg ggg agc cat			240
Gly Pro Thr Cys Asn Leu Gly Ser Lys Gly Val Gly Ala Gly Ser His			
65	70	75	10
ggg gcc aag gcc aac cag atc tca cct agc aac tca agt ctg aag aac			288
Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ile Ser Pro Ser Asn Ser Ser Leu Lys Asn			
85	90	95	
ccc cag gca gga gtg tct cct ttc agc tca ctc aag ggc aag gtg aag			336
Pro Gln Ala Gly Val Ser Pro Phe Ser Ser Leu Lys Gly Lys Val Lys			
100	105	110	20
cgc gag agg agt gtg tct gtg gac tct gga gag cag cgg gaa gct ggg			384
Arg Glu Arg Ser Val Ser Val Asp Ser Gly Glu Gln Arg Glu Ala Gly			
115	120	125	
act cca tcc ctc gat tca gag gcc aaa gag gtg gca ccc cgg agt aaa			432
Thr Pro Ser Leu Asp Ser Glu Ala Lys Glu Val Ala Pro Arg Ser Lys			
130	135	140	30
cgg agg tgt gtg ctg gag cgg aag cag ccg tac agt ggg gac gaa tgg			480
Arg Arg Cys Val Leu Glu Arg Lys Gln Pro Tyr Ser Gly Asp Glu Trp			
145	150	155	160
tgc tct ggg cca gac agc gag gag gac gac aag ccc att gcg gcc gcc			528
Cys Ser Gly Pro Asp Ser Glu Glu Asp Asp Lys Pro Ile Ala Ala Ala			
165	170	175	40
cac aat tgt aat gta gca gac cca gcc atg gtg acc cca cag ttg ggt			576
His Asn Cys Asn Val Ala Asp Pro Ala Met Val Thr Pro Gln Leu Gly			
180	185	190	
cct ggc caa act gcc caa ctg ccc ctc agt gag agc agt gca cca ggc			624

Pro Gly Gln Thr Ala Gln Leu Pro Leu Ser Glu Ser Ser Ala Pro Gly		
195	200	205
ccc caa cat ggc ccc cag cca ggc ctt cgg cca gac gtt cct ggg ggt	672	
Pro Gln His Gly Pro Gln Pro Gly Leu Arg Pro Asp Val Pro Gly Gly		
210	215	220
ggg ggt ggg ggc gtc cca gga aag cct ccg tca cag ttc gtc tat gtc	720	
Gly Gly Gly Gly Val Pro Gly Lys Pro Pro Ser Gln Phe Val Tyr Val		10
225	230	235 240
ttc acc acc cat ctg gcc aac aca gcg gca gag gca gtg ctg cag ggc	768	
Phe Thr Thr His Leu Ala Asn Thr Ala Ala Glu Ala Val Leu Gln Gly		
245	250	255
cgg gca gag tcc atc ctt gcc tac cac cag cag aat gtg cct cgg gcc	816	
Arg Ala Glu Ser Ile Leu Ala Tyr His Gln Gln Asn Val Pro Arg Ala		20
260	265	270
aag ctg gat cag gcc cct aaa gtg cca ccc acc cca gaa cca cta ccc	864	
Lys Leu Asp Gln Ala Pro Lys Val Pro Pro Thr Pro Glu Pro Leu Pro		
275	280	285
ctg aat acg cca tca gca ggt aca cca cag tcc cag cca cct cct ttg	912	
Leu Asn Thr Pro Ser Ala Gly Thr Pro Gln Ser Gln Pro Pro Pro Leu		30
290	295	300
cca cgg cca ccc cca gcc cct ggc agt gcc cct cct get ctg ccc ccg	960	
Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Gly Ser Ala Pro Pro Ala Leu Pro Pro		
305	310	315 320
gag ggg cct cct gaa gac acc agt cag gac ctg gcc ccc aac tca gtg	1008	
Glu Gly Pro Pro Glu Asp Thr Ser Gln Asp Leu Ala Pro Asn Ser Val		40
325	330	335
gga gct gcc agt aca ggt ggt ggg act ggg ggt acc cac cct aac acc	1056	
Gly Ala Ala Ser Thr Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr His Pro Asn Thr		
340	345	350

cca acg gct gcc acc gct aac aac cct ctg cct cct gga gga gac cct	1104	
Pro Thr Ala Ala Thr Ala Asn Asn Pro Leu Pro Pro Gly Gly Asp Pro		
355	360	365
ggc agt gcc cct ggc tcc gcc cta ttg ggg gag gcc acg ccc acc gga	1152	
Gly Ser Ala Pro Gly Ser Ala Leu Leu Gly Glu Ala Thr Pro Thr Gly		
370	375	380
aat ggg cag agg aac ctg gtg ggc tct gag ggc ctg tcc aaa gag cag	1200	10
Asn Gly Gln Arg Asn Leu Val Gly Ser Glu Gly Leu Ser Lys Glu Gln		
385	390	400
ctg gag cac cgg gag cgc tcc ctc cag aca ctg cgg gac atc gag agg	1248	
Leu Glu His Arg Glu Arg Ser Leu Gln Thr Leu Arg Asp Ile Glu Arg		
405	410	415
ctg ctg ctc cgc agt ggg gag act gag ccc ttc ctc aag ggg ccc ccg	1296	20
Leu Leu Leu Arg Ser Gly Glu Thr Glu Pro Phe Leu Lys Gly Pro Pro		
420	425	430
gga gga gct ggt gag gga ggc cca ccg gca caa gcg ccc tct gct gct	1344	
Gly Gly Ala Gly Glu Gly Gly Pro Pro Ala Gln Ala Pro Ser Ala Ala		
435	440	445
caa ccg cct ccc tcc gcc cct cct ggg ggg ctg aag aag tat gag gag	1392	30
Gln Pro Pro Pro Ser Ala Pro Pro Gly Gly Leu Lys Lys Tyr Glu Glu		
450	455	460
cct ctg cag tca atg atc tca cag aca cag agc cta gga ggt ccc cct	1440	
Pro Leu Gln Ser Met Ile Ser Gln Thr Gln Ser Leu Gly Gly Pro Pro		
465	470	475
ctg gag cat gaa gtg ccg ggg cac cct cag ggt gga gac atg gga cag	1488	40
Leu Glu His Glu Val Pro Gly His Pro Gln Gly Gly Asp Met Gly Gln		
485	490	495
caa atg aac atg atg atg cag agg ctg ggc cag gac agt ctg acg ccc	1536	
Gln Met Asn Met Met Met Gln Arg Leu Gly Gln Asp Ser Leu Thr Pro		
500	505	510

gag cag gtg gcc tgg cgc aaa ctg cag gaa gag tac tac gag gag aag	1584	
Glu Gln Val Ala Trp Arg Lys Leu Gln Glu Glu Tyr Tyr Glu Glu Lys		
515	520	525
cgg cgg aaa gag gag cag att gga ttg cac gga ggc cgc cct ctg cag	1632	
Arg Arg Lys Glu Glu Gln Ile Gly Leu His Gly Gly Arg Pro Leu Gln		
530	535	540
gac atg gtg gga atg ggg ggt atg atg ggg agg ggg ccc cca cct cct	1680	10
Asp Met Val Gly Met Gly Gly Met Met Gly Arg Gly Pro Pro Pro Pro		
545	550	555 560
tac cac agc aaa cct ggg gat cag tgt gca cct gga atg ggt gca caa	1728	
Tyr His Ser Lys Pro Gly Asp Gln Cys Ala Pro Gly Met Gly Ala Gln		
565	570	575
ctc cga ggg cct atg gat gtc caa gat ccc atg cag ctc cga cct gga	1776	20
Leu Arg Gly Pro Met Asp Val Gln Asp Pro Met Gln Leu Arg Pro Gly		
580	585	590
cct ccc ttc cct ggc ccc cgt ttc cca ggc aac cag atg caa agg gtg	1824	
Pro Pro Phe Pro Gly Pro Arg Phe Pro Gly Asn Gln Met Gln Arg Val		
595	600	605
ccc gga ttt gga ggt atg cag agt atg ccc atg gaa gta ccc atg aat	1872	30
Pro Gly Phe Gly Gly Met Gln Ser Met Pro Met Glu Val Pro Met Asn		
610	615	620
gcc atg cag aga cct gta agg cca ggc atg gcc tgg aat gaa gac ttg	1920	
Ala Met Gln Arg Pro Val Arg Pro Gly Met Ala Trp Asn Glu Asp Leu		
625	630	635 640
ccc cct att ggg gga ccc agc aac ttt gcc cag aat gcc gtg ccc tac	1968	40
Pro Pro Ile Gly Gly Pro Ser Asn Phe Ala Gln Asn Ala Val Pro Tyr		
645	650	655
cca ggt ggg cag ggg gag gca gag cga ttc atg acc cct cgt gtc cgg	2016	
Pro Gly Gly Gln Gly Glu Ala Glu Arg Phe Met Thr Pro Arg Val Arg		

660	665	670		
gag gag ctg ctg agg cac cag ttg ctg gag aag cgg tcc atg ggc atg			2064	
Glu Glu Leu Leu Arg His Gln Leu Leu Glu Lys Arg Ser Met Gly Met				
675	680	685		
cag cgt ccc ctg ggc atg gca ggt agc ggc atg gga cag agc atg gaa			2112	
Gln Arg Pro Leu Gly Met Ala Gly Ser Gly Met Gly Gln Ser Met Glu				10
690	695	700		
atg gaa cgg atg ata cag gct cat cga cag atg gac cct gcc atg ttc			2160	
Met Glu Arg Met Ile Gln Ala His Arg Gln Met Asp Pro Ala Met Phe				
705	710	715	720	
ccg gga cag atg act gga gga gat ggt ctc gcc ggc aca ccc atg ggc			2208	
Pro Gly Gln Met Thr Gly Gly Asp Gly Leu Ala Gly Thr Pro Met Gly				20
725	730	735		
ata gag ttt ggt gga ggt cgg ggc ctc ctg agc cct cca atg gga cag			2256	
Ile Glu Phe Gly Gly Gly Arg Gly Leu Leu Ser Pro Pro Met Gly Gln				
740	745	750		
tct ggg ctg cgg gag gta gac cgg cct atg ggg cca ggc aac ctc aac			2304	
Ser Gly Leu Arg Glu Val Asp Pro Pro Met Gly Pro Gly Asn Leu Asn				30
755	760	765		
atg aac atg aat gtg aac atg aac atg aac atg aac ctg aat gtg cag			2352	
Met Asn Met Asn Val Asn Met Asn Met Asn Met Asn Leu Asn Val Gln				
770	775	780		
atg acg ccc cag cag cag atg ctg atg tca cag aag atg cgg ggc cct			2400	
Met Thr Pro Gln Gln Gln Met Leu Met Ser Gln Lys Met Arg Gly Pro				40
785	790	795	800	
gga gac atg atg ggt cct cag ggc ctc agt ccc gaa gag atg gct cgg			2448	
Gly Asp Met Met Gly Pro Gln Gly Leu Ser Pro Glu Glu Met Ala Arg				
805	810	815		
gtt cgg gcc cag aac agt agt ggc atg atg ggg ggt cgg cag aag atg			2496	

agc tct tcc ctc ggt gtg cgt tca ccc act ggc tca ccc agc agg ctc 2976
 Ser Ser Ser Leu Gly Val Arg Ser Pro Thr Gly Ser Pro Ser Arg Leu
 980 985 990

aag tct ccc tcc atg gcg gtg cct tct cca ggc tgg gtc gcc tct ccc 3024
 Lys Ser Pro Ser Met Ala Val Pro Ser Pro Gly Trp Val Ala Ser Pro
 995 1000 1005

aag aca gcc atg cct agt cct ggg gtc tcc cag aac aag cag cca cct 3072
 Lys Thr Ala Met Pro Ser Pro Gly Val Ser Gln Asn Lys Gln Pro Pro
 1010 1015 1020

10

ctc agc ata aac tct tcc tcc acc ctg ggc aac gtg gaa cag ggt gct 3120
 Leu Ser Ile Asn Ser Ser Ser Thr Leu Gly Asn Val Glu Gln Gly Ala
 1025 1030 1035 1040

ctt cca cct agc gca ccc cgg aac agc tcc tcc gct cct ccc gcc aac 3168
 Leu Pro Pro Ser Ala Pro Arg Asn Ser Ser Ser Ala Pro Pro Ala Asn
 1045 1050 1055

20

cct tcc agt ggc ctc atg aac ccc agc cta ccg ttc aca tcc tcc cca 3216
 Pro Ser Ser Gly Leu Met Asn Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Ser Pro
 1060 1065 1070

gac ccc acc cct tcc cag aac cct ctg tca ctg atg atg tct cag atg 3264
 Asp Pro Thr Pro Ser Gln Asn Pro Leu Ser Leu Met Met Ser Gln Met
 1075 1080 1085

30

tcc aag tac gcc atg ccc agc tcg acc ccg cta tac cac aac gcc atc 3312
 Ser Lys Tyr Ala Met Pro Ser Ser Thr Pro Leu Tyr His Asn Ala Ile
 1090 1095 1100

aag acc atc gcc acc tca gat gac gag ctg ctg cct gac cgg ccc ctg 3360
 Lys Thr Ile Ala Thr Ser Asp Asp Glu Leu Leu Pro Asp Arg Pro Leu
 1105 1110 1115 1120

40

cta ccc cca ccc cca cca cgg cag ggc tct ggg cca ggt atc agc aat 3408
 Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gly Ser Gly Pro Gly Ile Ser Asn
 1125 1130 1135

aac cag ccc aac cag atg cac atg aac cct gct gct gcc cag agc ccc	3456	
Asn Gln Pro Asn Gln Met His Met Asn Pro Ala Ala Ala Gln Ser Pro		
1140 1145 1150		
atg ggc atg aac ttg cca ggc cag cag ccc ctg tcc cat gag cct ccc	3504	
Met Gly Met Asn Leu Pro Gly Gln Gln Pro Leu Ser His Glu Pro Pro		
1155 1160 1165		
cct act atg ttg ccc tcc ccc acc cct ctg ggg tcc aac att cca ctg	3552	10
Pro Thr Met Leu Pro Ser Pro Thr Pro Leu Gly Ser Asn Ile Pro Leu		
1170 1175 1180		
cat ccc aat gca cag ggg act ggg ggc tct tct caa aac tca atg atg	3600	
His Pro Asn Ala Gln Gly Thr Gly Gly Ser Ser Gln Asn Ser Met Met		
1185 1190 1195 1200		
atg gcc cca gga ggc cca gac tcc cta aat gcc cct tgt ggc cct gtg	3648	20
Met Ala Pro Gly Gly Pro Asp Ser Leu Asn Ala Pro Cys Gly Pro Val		
1205 1210 1215		
ccc agc tcc tcc cag atg atg tcc ttc cct cct cgg ctg cag caa cct	3696	
Pro Ser Ser Ser Gln Met Met Ser Phe Pro Pro Arg Leu Gln Gln Pro		
1220 1225 1230		
cac ggt gcc atg gcc ccc acc ggg gcc ggg ggc cca ggc ctg cag cag	3744	30
His Gly Ala Met Ala Pro Thr Gly Ala Gly Gly Pro Gly Leu Gln Gln		
1235 1240 1245		
cac tac cct tca ggc atg gcc ctg ccc ccc gag gac ctg ccc acc cag	3792	
His Tyr Pro Ser Gly Met Ala Leu Pro Pro Glu Asp Leu Pro Thr Gln		
1250 1255 1260		
cca ccg ggt ccc ata ccc ccc cag cag cac cta atg ggc aaa ggc atg	3840	40
Pro Pro Gly Pro Ile Pro Pro Gln Gln His Leu Met Gly Lys Gly Met		
1265 1270 1275 1280		
act ggc cgc atg ggc gac gca tac cca ccc ggg gtg etc cct ggg gtg	3888	
Thr Gly Arg Met Gly Asp Ala Tyr Pro Pro Gly Val Leu Pro Gly Val		

1285	1290	1295	
gca tgc gta ctg aat gac cca gag ctg agt gag gtg atc cgg ccc acc			3936
Ala Ser Val Leu Asn Asp Pro Glu Leu Ser Glu Val Ile Arg Pro Thr			
1300	1305	1310	
cct acc ggc att cct gag ttc gac tta tcc agg atc atc ccc tct gag			3984
Pro Thr Gly Ile Pro Glu Phe Asp Leu Ser Arg Ile Ile Pro Ser Glu			
1315	1320	1325	10
aaa cca agc agc acc ctc cag tac ttc ccc aag agc gag aac cag ccc			4032
Lys Pro Ser Ser Thr Leu Gln Tyr Phe Pro Lys Ser Glu Asn Gln Pro			
1330	1335	1340	
ccc aag gcc cag ccc ccc aat ctg cat ctc atg aac ctg cag aac atg			4080
Pro Lys Ala Gln Pro Pro Asn Leu His Leu Met Asn Leu Gln Asn Met			
1345	1350	1355	20
atg gca gag cag acc ccg tct cga ccc ccc aac ctc ccg ggc caa cag			4128
Met Ala Glu Gln Thr Pro Ser Arg Pro Pro Asn Leu Pro Gly Gln Gln			
1365	1370	1375	
ggg gtc cag cgg ggg ctc agc atg tcc atg tgc cac cct gga cag atg			4176
Gly Val Gln Arg Gly Leu Ser Met Ser Met Cys His Pro Gly Gln Met			
1380	1385	1390	30
tcc ttg ctg ggc agg aca ggt gtg ccc cca caa cag ggc atg gtg ccc			4224
Ser Leu Leu Gly Arg Thr Gly Val Pro Pro Gln Gln Gly Met Val Pro			
1395	1400	1405	
cat ggc ctg cac cag ggg gtc atg tcc cct cca caa ggc ctc atg acc			4272
His Gly Leu His Gln Gly Val Met Ser Pro Pro Gln Gly Leu Met Thr			
1410	1415	1420	40
cag cag aat ttt atg ctg atg aag cag agg ggt gtg ggg ggc gag gtc			4320
Gln Gln Asn Phe Met Leu Met Lys Gln Arg Gly Val Gly Gly Glu Val			
1425	1430	1435	1440
tac acc cag cct ccc cac atg ctc tcc cca cag ggc tcc ctc atg ggc			4368

Tyr Thr Gln Pro Pro His Met Leu Ser Pro Gln Gly Ser Leu Met Gly
 1445 1450 1455

ccc cea ccc cag cag aac etc atg gtg tcc cac cct ctg cgt cag cgc 4416
 Pro Pro Pro Gln Gln Asn Leu Met Val Ser His Pro Leu Arg Gln Arg
 1460 1465 1470

agt gtg tet ctg gac agc cag atg ggc tac ctg cea acg ccg ggc agc 4464
 Ser Val Ser Leu Asp Ser Gln Met Gly Tyr Leu Pro Thr Pro Gly Ser
 1475 1480 1485

10

atg gcc aat cta ccc ttc 4482
 Met Ala Asn Leu Pro Phe
 1490

<210> 2

20

<211> 1494

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Arg Ile Leu Ala Asn Lys Thr Arg Leu Pro His Pro Arg Arg Arg
 1 5 10 15

30

Glu Ala Pro Gly Ser Pro Pro Leu Ser Pro Arg Gly His Cys Pro Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Lys Pro Met His Pro Glu Asn Lys Leu Thr Asn His Gly
 35 40 45

Lys Thr Gly Asn Gly Gly Ala Gln Ser Gln His Gln Asn Val Asn Gln
 50 55 60

40

Gly Pro Thr Cys Asn Leu Gly Ser Lys Gly Val Gly Ala Gly Ser His
 65 70 75 80

Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ile Ser Pro Ser Asn Ser Ser Leu Lys Asn
 85 90 95

Pro Gln Ala Gly Val Ser Pro Phe Ser Ser Leu Lys Gly Lys Val Lys
 100 105 110

Arg Glu Arg Ser Val Ser Val Asp Ser Gly Glu Gln Arg Glu Ala Gly
 115 120 125

Thr Pro Ser Leu Asp Ser Glu Ala Lys Glu Val Ala Pro Arg Ser Lys
 130 135 140

10

Arg Arg Cys Val Leu Glu Arg Lys Gln Pro Tyr Ser Gly Asp Glu Trp
 145 150 155 160

Cys Ser Gly Pro Asp Ser Glu Glu Asp Asp Lys Pro Ile Ala Ala Ala
 165 170 175

His Asn Cys Asn Val Ala Asp Pro Ala Met Val Thr Pro Gln Leu Gly
 180 185 190

20

Pro Gly Gln Thr Ala Gln Leu Pro Leu Ser Glu Ser Ser Ala Pro Gly
 195 200 205

Pro Gln His Gly Pro Gln Pro Gly Leu Arg Pro Asp Val Pro Gly Gly
 210 215 220

Gly Gly Gly Gly Val Pro Gly Lys Pro Pro Ser Gln Phe Val Tyr Val
 225 230 235 240

30

Phe Thr Thr His Leu Ala Asn Thr Ala Ala Glu Ala Val Leu Gln Gly
 245 250 255

Arg Ala Glu Ser Ile Leu Ala Tyr His Gln Gln Asn Val Pro Arg Ala
 260 265 270

40

Lys Leu Asp Gln Ala Pro Lys Val Pro Pro Thr Pro Glu Pro Leu Pro
 275 280 285

Leu Asn Thr Pro Ser Ala Gly Thr Pro Gln Ser Gln Pro Pro Pro Leu
 290 295 300

Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Gly Ser Ala Pro Pro Ala Leu Pro Pro
305 310 315 320

Glu Gly Pro Pro Glu Asp Thr Ser Gln Asp Leu Ala Pro Asn Ser Val
325 330 335

Gly Ala Ala Ser Thr Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr His Pro Asn Thr
340 345 350

10

Pro Thr Ala Ala Thr Ala Asn Asn Pro Leu Pro Pro Gly Gly Asp Pro
355 360 365

Gly Ser Ala Pro Gly Ser Ala Leu Leu Gly Glu Ala Thr Pro Thr Gly
370 375 380

Asn Gly Gln Arg Asn Leu Val Gly Ser Glu Gly Leu Ser Lys Glu Gln
385 390 395 400

20

Leu Glu His Arg Glu Arg Ser Leu Gln Thr Leu Arg Asp Ile Glu Arg
405 410 415

Leu Leu Leu Arg Ser Gly Glu Thr Glu Pro Phe Leu Lys Gly Pro Pro
420 425 430

Gly Gly Ala Gly Glu Gly Gly Pro Pro Ala Gln Ala Pro Ser Ala Ala
435 440 445

30

Gln Pro Pro Pro Ser Ala Pro Pro Gly Gly Leu Lys Lys Tyr Glu Glu
450 455 460

Pro Leu Gln Ser Met Ile Ser Gln Thr Gln Ser Leu Gly Gly Pro Pro
465 470 475 480

40

Leu Glu His Glu Val Pro Gly His Pro Gln Gly Gly Asp Met Gly Gln
485 490 495

Gln Met Asn Met Met Met Gln Arg Leu Gly Gln Asp Ser Leu Thr Pro
500 505 510

Glu Gln Val Ala Trp Arg Lys Leu Gln Glu Glu Tyr Tyr Glu Glu Lys
 515 520 525

Arg Arg Lys Glu Glu Gln Ile Gly Leu His Gly Gly Arg Pro Leu Gln
 530 535 540

Asp Met Val Gly Met Gly Gly Met Met Gly Arg Gly Pro Pro Pro Pro
 545 550 555 560

10

Tyr His Ser Lys Pro Gly Asp Gln Cys Ala Pro Gly Met Gly Ala Gln
 565 570 575

Leu Arg Gly Pro Met Asp Val Gln Asp Pro Met Gln Leu Arg Pro Gly
 580 585 590

Pro Pro Phe Pro Gly Pro Arg Phe Pro Gly Asn Gln Met Gln Arg Val
 595 600 605

20

Pro Gly Phe Gly Gly Met Gln Ser Met Pro Met Glu Val Pro Met Asn
 610 615 620

Ala Met Gln Arg Pro Val Arg Pro Gly Met Ala Trp Asn Glu Asp Leu
 625 630 635 640

Pro Pro Ile Gly Gly Pro Ser Asn Phe Ala Gln Asn Ala Val Pro Tyr
 645 650 655

30

Pro Gly Gly Gln Gly Glu Ala Glu Arg Phe Met Thr Pro Arg Val Arg
 660 665 670

Glu Glu Leu Leu Arg His Gln Leu Leu Glu Lys Arg Ser Met Gly Met
 675 680 685

40

Gln Arg Pro Leu Gly Met Ala Gly Ser Gly Met Gly Gln Ser Met Glu
 690 695 700

Met Glu Arg Met Ile Gln Ala His Arg Gln Met Asp Pro Ala Met Phe
 705 710 715 720

Pro Gly Gln Met Thr Gly Gly Asp Gly Leu Ala Gly Thr Pro Met Gly
725 730 735

Ile Glu Phe Gly Gly Gly Arg Gly Leu Leu Ser Pro Pro Met Gly Gln
740 745 750

Ser Gly Leu Arg Glu Val Asp Pro Pro Met Gly Pro Gly Asn Leu Asn
755 760 765

10

Met Asn Met Asn Val Asn Met Asn Met Asn Met Asn Leu Asn Val Gln
770 775 780

Met Thr Pro Gln Gln Gln Met Leu Met Ser Gln Lys Met Arg Gly Pro
785 790 795 800

Gly Asp Met Met Gly Pro Gln Gly Leu Ser Pro Glu Glu Met Ala Arg
805 810 815

20

Val Arg Ala Gln Asn Ser Ser Gly Met Met Gly Gly Pro Gln Lys Met
820 825 830

Leu Met Pro Ser Gln Phe Pro Asn Gln Gly Gln Gln Gly Phe Ser Gly
835 840 845

Gly Gln Gly Pro Tyr Gln Ala Met Pro Gln Asp Met Gly Asn Thr Pro
850 855 860

30

Asp Met Phe Ser Pro Asp Gln Ser Ser Val Pro Met Gly Thr Val Gly
865 870 875 880

Thr Ala Arg Leu Ser His Met Pro Leu Pro Pro Ala Ser Asn Pro Pro
885 890 895

40

Gly Ser Val His Leu Ala Ser Asn Arg Gly Leu Gly Arg Arg Pro Ser
900 905 910

Asp Leu Thr Ile Ser Ile Asn Gln Met Gly Ser Pro Gly Met Gly His
915 920 925

Leu Lys Ser Pro Thr Leu Ser Gln Val His Ser Pro Leu Val Thr Ser
 930 935 940

Pro Ser Ala Asn Leu Lys Ser Pro Gln Thr Pro Ser Gln Met Val Pro
 945 950 955 960

Leu Pro Ser Ala Asn Pro Pro Gly Pro Leu Lys Ser Pro Gln Val Leu
 965 970 975

10

Ser Ser Ser Leu Gly Val Arg Ser Pro Thr Gly Ser Pro Ser Arg Leu
 980 985 990

Lys Ser Pro Ser Met Ala Val Pro Ser Pro Gly Trp Val Ala Ser Pro
 995 1000 1005

Lys Thr Ala Met Pro Ser Pro Gly Val Ser Gln Asn Lys Gln Pro Pro
 1010 1015 1020

20

Leu Ser Ile Asn Ser Ser Ser Thr Leu Gly Asn Val Glu Gln Gly Ala
 1025 1030 1035 1040

Leu Pro Pro Ser Ala Pro Arg Asn Ser Ser Ser Ala Pro Pro Ala Asn
 1045 1050 1055

Pro Ser Ser Gly Leu Met Asn Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Ser Pro
 1060 1065 1070

30

Asp Pro Thr Pro Ser Gln Asn Pro Leu Ser Leu Met Met Ser Gln Met
 1075 1080 1085

Ser Lys Tyr Ala Met Pro Ser Ser Thr Pro Leu Tyr His Asn Ala Ile
 1090 1095 1100

40

Lys Thr Ile Ala Thr Ser Asp Asp Glu Leu Leu Pro Asp Arg Pro Leu
 1105 1110 1115 1120

Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gly Ser Gly Pro Gly Ile Ser Asn
 1125 1130 1135

Asn Gln Pro Asn Gln Met His Met Asn Pro Ala Ala Ala Gln Ser Pro
 1140 1145 1150

Met Gly Met Asn Leu Pro Gly Gln Gln Pro Leu Ser His Glu Pro Pro
 1155 1160 1165

Pro Thr Met Leu Pro Ser Pro Thr Pro Leu Gly Ser Asn Ile Pro Leu
 1170 1175 1180

10

His Pro Asn Ala Gln Gly Thr Gly Gly Ser Ser Gln Asn Ser Met Met
 1185 1190 1195 1200

Met Ala Pro Gly Gly Pro Asp Ser Leu Asn Ala Pro Cys Gly Pro Val
 1205 1210 1215

Pro Ser Ser Ser Gln Met Met Ser Phe Pro Pro Arg Leu Gln Gln Pro
 1220 1225 1230

20

His Gly Ala Met Ala Pro Thr Gly Ala Gly Gly Pro Gly Leu Gln Gln
 1235 1240 1245

His Tyr Pro Ser Gly Met Ala Leu Pro Pro Glu Asp Leu Pro Thr Gln
 1250 1255 1260

Pro Pro Gly Pro Ile Pro Pro Gln Gln His Leu Met Gly Lys Gly Met
 1265 1270 1275 1280

30

Thr Gly Arg Met Gly Asp Ala Tyr Pro Pro Gly Val Leu Pro Gly Val
 1285 1290 1295

Ala Ser Val Leu Asn Asp Pro Glu Leu Ser Glu Val Ile Arg Pro Thr
 1300 1305 1310

40

Pro Thr Gly Ile Pro Glu Phe Asp Leu Ser Arg Ile Ile Pro Ser Glu
 1315 1320 1325

Lys Pro Ser Ser Thr Leu Gln Tyr Phe Pro Lys Ser Glu Asn Gln Pro
 1330 1335 1340

Pro Lys Ala Gln Pro Pro Asn Leu His Leu Met Asn Leu Gln Asn Met
 1345 1350 1355 1360

Met Ala Glu Gln Thr Pro Ser Arg Pro Pro Asn Leu Pro Gly Gln Gln
 1365 1370 1375

Gly Val Gln Arg Gly Leu Ser Met Ser Met Cys His Pro Gly Gln Met
 1380 1385 1390

10

Ser Leu Leu Gly Arg Thr Gly Val Pro Pro Gln Gln Gly Met Val Pro
 1395 1400 1405

His Gly Leu His Gln Gly Val Met Ser Pro Pro Gln Gly Leu Met Thr
 1410 1415 1420

Gln Gln Asn Phe Met Leu Met Lys Gln Arg Gly Val Gly Gly Glu Val
 1425 1430 1435 1440

20

Tyr Thr Gln Pro Pro His Met Leu Ser Pro Gln Gly Ser Leu Met Gly
 1445 1450 1455

Pro Pro Pro Gln Gln Asn Leu Met Val Ser His Pro Leu Arg Gln Arg
 1460 1465 1470

Ser Val Ser Leu Asp Ser Gln Met Gly Tyr Leu Pro Thr Pro Gly Ser
 1475 1480 1485

30

Met Ala Asn Leu Pro Phe
 1490

<210> 3

<211> 960

40

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(960)

<400> 3

ctg gcc aac aca gcg gca gag gca gtg ctg cag ggc cgg gca gag tcc 48
 Leu Ala Asn Thr Ala Ala Glu Ala Val Leu Gln Gly Arg Ala Glu Ser
 1 5 10 15

atc ett gcc tac cac cag cag aat gtg cct cgg gcc aag ctg gat cag 96
 Ile Leu Ala Tyr His Gln Gln Asn Val Pro Arg Ala Lys Leu Asp Gln
 20 25 30

10

gcc cct aaa gtg cca ccc acc cca gaa cca cta ccc ctg aat acg cca 144
 Ala Pro Lys Val Pro Pro Thr Pro Glu Pro Leu Pro Leu Asn Thr Pro
 35 40 45

tca gca ggt aca cca cag tcc cag cca cct cct ttg cca ccg cca ccc 192
 Ser Ala Gly Thr Pro Gln Ser Gln Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro
 50 55 60

20

cca gcc cct ggc agt gcc cct cct gct ctg ccc ccg gag ggg cct cct 240
 Pro Ala Pro Gly Ser Ala Pro Pro Ala Leu Pro Pro Glu Gly Pro Pro
 65 70 75 80

gaa gac acc agt cag gac ctg gcc ccc aac tca gtg gga gct gcc agt 288
 Glu Asp Thr Ser Gln Asp Leu Ala Pro Asn Ser Val Gly Ala Ala Ser
 85 90 95

30

aca ggt ggt ggg act ggg ggt acc cac cct aac acc cca acg gct gcc 336
 Thr Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr His Pro Asn Thr Pro Thr Ala Ala
 100 105 110

acc gct aac aac cct ctg cct cct gga gga gac cct ggc agt gcc cct 384
 Thr Ala Asn Asn Pro Leu Pro Pro Gly Gly Asp Pro Gly Ser Ala Pro
 115 120 125

40

ggc tcc gcc cta ttg ggg gag gcc acg ccc acc gga aat ggg cag agg 432
 Gly Ser Ala Leu Leu Gly Glu Ala Thr Pro Thr Gly Asn Gly Gln Arg
 130 135 140

aac ctg gtg ggc tct gag ggc ctg tcc aaa gag cag ctg gag cac cgg 480
 Asn Leu Val Gly Ser Glu Gly Leu Ser Lys Glu Gln Leu Glu His Arg
 145 150 155 160

gag cgc tcc ctc cag aca ctg cgg gac atc gag agg ctg ctg ctc cgc 528
 Glu Arg Ser Leu Gln Thr Leu Arg Asp Ile Glu Arg Leu Leu Leu Arg
 165 170 175

agt ggg gag act gag ccc ttc ctc aag ggg ccc ccg gga gga gct ggt 576
 Ser Gly Glu Thr Glu Pro Phe Leu Lys Gly Pro Pro Gly Gly Ala Gly
 180 185 190

10

gag gga ggc cca ccg gca caa gcg ccc tct gct gct caa ccg cct ccc 624
 Glu Gly Gly Pro Pro Ala Gln Ala Pro Ser Ala Ala Gln Pro Pro Pro
 195 200 205

tcc gcc cct cct ggg ggg ctg aag aag tat gag gag cct ctg cag tca 672
 Ser Ala Pro Pro Gly Gly Leu Lys Lys Tyr Glu Glu Pro Leu Gln Ser
 210 215 220

20

atg atc tca cag aca cag agc cta gga ggt ccc cct ctg gag cat gaa 720
 Met Ile Ser Gln Thr Gln Ser Leu Gly Gly Pro Pro Leu Glu His Glu
 225 230 235 240

gtg ccg ggg cac cct cag ggt gga gac atg gga cag caa atg aac atg 768
 Val Pro Gly His Pro Gln Gly Gly Asp Met Gly Gln Gln Met Asn Met
 245 250 255

30

atg atg cag agg ctg ggc cag gac agt ctg acg ccc gag cag gtg gcc 816
 Met Met Gln Arg Leu Gly Gln Asp Ser Leu Thr Pro Glu Gln Val Ala
 260 265 270

tgg cgc aaa ctg cag gaa gag tac tac gag gag aag cgg cgg aaa gag 864
 Trp Arg Lys Leu Gln Glu Glu Tyr Tyr Glu Glu Lys Arg Arg Lys Glu
 275 280 285

40

gag cag att gga ttg cac gga ggc cgc cct ctg cag gac atg gtg gga 912
 Glu Gln Ile Gly Leu His Gly Gly Arg Pro Leu Gln Asp Met Val Gly
 290 295 300

atg ggg ggt atg atg ggg agg ggg ccc cca cct cct tac cac agc aaa 960
 Met Gly Gly Met Met Gly Arg Gly Pro Pro Pro Pro Tyr His Ser Lys
 305 310 315 320

<210> 4

<211> 320

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 4

Leu Ala Asn Thr Ala Ala Glu Ala Val Leu Gln Gly Arg Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Ile Leu Ala Tyr His Gln Gln Asn Val Pro Arg Ala Lys Leu Asp Gln
 20 25 30

20

Ala Pro Lys Val Pro Pro Thr Pro Glu Pro Leu Pro Leu Asn Thr Pro
 35 40 45

Ser Ala Gly Thr Pro Gln Ser Gln Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro
 50 55 60

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

30

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

Thr Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr His Pro Asn Thr Pro Thr Ala Ala
 100 105 110

Thr Ala Asn Asn Pro Leu Pro Pro Gly Gly Asp Pro Gly Ser Ala Pro
 115 120 125

40

Gly Ser Ala Leu Leu Gly Glu Ala Thr Pro Thr Gly Asn Gly Gln Arg
 130 135 140

Asn Leu Val Gly Ser Glu Gly Leu Ser Lys Glu Gln Leu Glu His Arg
 145 150 155 160

Glu Arg Ser Leu Gln Thr Leu Arg Asp Ile Glu Arg Leu Leu Leu Arg
 165 170 175

Ser Gly Glu Thr Glu Pro Phe Leu Lys Gly Pro Pro Gly Gly Ala Gly
 180 185 190

10

Glu Gly Gly Pro Pro Ala Gln Ala Pro Ser Ala Ala Gln Pro Pro Pro
 195 200 205

Ser Ala Pro Pro Gly Gly Leu Lys Lys Tyr Glu Glu Pro Leu Gln Ser
 210 215 220

Met Ile Ser Gln Thr Gln Ser Leu Gly Gly Pro Pro Leu Glu His Glu
 225 230 235 240

20

Val Pro Gly His Pro Gln Gly Gly Asp Met Gly Gln Gln Met Asn Met
 245 250 255

Met Met Gln Arg Leu Gly Gln Asp Ser Leu Thr Pro Glu Gln Val Ala
 260 265 270

Trp Arg Lys Leu Gln Glu Glu Tyr Tyr Glu Glu Lys Arg Arg Lys Glu
 275 280 285

30

Glu Gln Ile Gly Leu His Gly Gly Arg Pro Leu Gln Asp Met Val Gly
 290 295 300

Met Gly Gly Met Met Gly Arg Gly Pro Pro Pro Pro Tyr His Ser Lys
 305 310 315 320

40

<210> 5

<211> 386

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gttaccccac cccaggagga gagaagctcc agggagcccg ccgctgtccc cccgcggtca 60
 ttgccccct gccccagcca agccaatgca cccagaaaat aaattgacca atcatggcaa 120
 gacagggaat ggccggggccc aatctcagca ccagaatgtg aaccaaggac ccacctgcaa 180
 cgtgggctcg aagggcgtgg gggcggggaa ccatgggggc aaggccaacc agatctcgcc 240
 tagcaactca agtctgaaga acccccaggc aggggtgccc ctttccagct cgtcaaggg 300
 caaggtgaag agggaccgga gtgtgtctgt ggactctgga gagcagcgag aggctgggac 360
 cccatccctg gattcagagg ccaaag 386

10

<210> 6

<211> 120

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

aggtggcgcc gcggagtaag cggcgtgtg tgctggagcg gaagcagccg tacagtgggg 60
 acgaatggtg ctctggaccg gacagtgagg aggacgacaa gccattggg gccaccacaa 120

20

<210> 7

<211> 1933

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ggcttgteca aagagcagct ggagcatcgg gaacggctccc tccagacgct gcgagacatt 60
 gagegactgc tgctccgcag cggagagact gagctcttcc tcaaggggccc cccaggagga 120
 ggggtgagg gagggccacc agcacaagcc cccctccac cccagcagca acctatggcc 180
 ccteccagtg ggctgaaaaa atatgaggac cttttgcagt ccatgatttc acagacacag 240
 agcctagggg gccccccgct ggagcatgaa gtgcctgggc acccccggg tggggacatg 300
 gggcagcaga tgaacatgat gatacagagg ctgggccagg acagcctcac gcctgagcag 360
 gtggcctggc gcaagetgca ggaggagtac tacgaagaga aacggcggaa agaggaacag 420
 attgggctgc atgggagccg tcctctgcag gacatgatgg gcatgggggg catgatggtg 480
 agggggcccc cgcctcetta ccacagcaag cctggggatc agtggccacc tggaatgggt 540
 gcgcagctgc gggggcccac ggatgttcaa gateccatgc agctccgggg cggacctccc 600
 ttctctgggc cccgtttccc aggcaaccag atacaacggg tacctgggtt tggggcatg 660
 cagagtatgc ccatggaggt gcccatgaat gccatgcaga ggcccgtgag accaggcatg 720
 ggctggaccg aagacttgcc ccctatgggg ggaccagca attttgcaca gaacaccatg 780

40

ccctaccag gtgggcaggg tgaggcggag cgattcatga ctccccgggt ccgtgaggag 840
 ctgctgcggc accagctgct ggagaagcgg tegatgggca tgcagegccc cctgggcatg 900
 gcaggcagtg gcatgggaca gagcatggag atggagcggg tgatgcagge gcaccgacag 960
 atggatcctg ccatgtttcc egggcagatg gctgggtggt agggcctggc gggcactccc 1020
 atgggcatgg agtttggtgg aggcgggggc ctctgagcc ctcccatggg gcagtctggg 1080
 ctgagggagg tggacceacc catggggcca ggcaacctca acatgaacat gaatgtcaac 1140
 atgaacatga acatgaacct gaacgtgcag atgacccccc agcagcagat gctgatgtcg 1200
 cagaagatgc ggggcctgg ggaactgatg gggccccagg gcctcagtcc tgaggagatg 1260
 gcccggttc gggcccagaa cagcagtggc gtgatgggcg gcccgcagaa gatgetgatg 1320
 cttcacagt tcccacaaca gggccagcag ggattctctg gaggccagg accctaccaa 1380
 gccatgtecc aggacatggg caatacccaa gacatgttca gccctgatca gagctcaatg 1440
 cccatgagca acgtgggcac cacccggctc agccacatgc ctctgcccc tgcgtccaat 1500
 cctcctggga ccgtgcattc agccccaaac cgggggctag gcaggcggcc ttgggaacct 1560
 accatcagta ttaacagat gggctcaccg ggcatggggc acttgaagtc gccaccctt 1620
 agccaggtgc actacecct ggtcacctg cctctgcca acctcaagtc accccagact 1680
 ccctcacaga tgggtgeect geettctgcc aaccgcccag gacctctca gtcgcccag 1740
 gtcctegget cctcctcag gtctcgttca cccactgget cgcccagcag getcaagtct 1800
 cttccatgg cgggtgectt tccagctgg gttgctcacc ctaagacggc catgcccage 1860
 ccgggggtct cccagaacaa gcagccgct ctaaacatga actcttccac caccctgagc 1920
 aacatggaac agg 1933

10

20

<210> 8

<211> 282

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30

<400> 8

gtacctccc gcctagcggc ccccggagca gctcctcagc acctcccgc aacctccca 60
 gggcctcat gaaccccage ctaccattea ctctctccc agaccccaca cttcccaga 120
 acccctgtc actgatgatg acccagatgt ccaagtacgc catgcccage tccaccccgc 180
 tctaccacaa tgccatcaag accatgcca cctcagacga cgagctgetg cccgaccgce 240
 cctgetgccc cccccacca ccaccgagg gctccgggccc ag 282

40

<210> 9

<211> 506

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(505)

<400> 9

g tta ccc cac ccc agg agg aga gaa gct cca ggg agc ccg ccg ctg tcc 49

Leu Pro His Pro Arg Arg Arg Glu Ala Pro Gly Ser Pro Pro Leu Ser

1

5

10

15

10

ccc cgc ggt cat tgc ccc cct gcc cca gcc aag cca atg cac cca gaa 97

Pro Arg Gly His Cys Pro Pro Ala Pro Ala Lys Pro Met His Pro Glu

20

25

30

aat aaa ttg acc aat cat ggc aag aca ggg aat ggc ggg gcc caa tct 145

Asn Lys Leu Thr Asn His Gly Lys Thr Gly Asn Gly Gly Ala Gln Ser

35

40

45

20

cag cac cag aat gtg aac caa gga ccc acc tgc aac gtg ggc tgc aag 193

Gln His Gln Asn Val Asn Gln Gly Pro Thr Cys Asn Val Gly Ser Lys

50

55

60

ggc gtg ggg gcg ggg aac cat ggg ggc aag gcc aac cag atc tgc cct 241

Gly Val Gly Ala Gly Asn His Gly Gly Lys Ala Asn Gln Ile Ser Pro

65

70

75

80

30

agc aac tca agt ctg aag aac ccc cag gca ggg gtg ccc cct ttc agc 289

Ser Asn Ser Ser Leu Lys Asn Pro Gln Ala Gly Val Pro Pro Phe Ser

85

90

95

tcg etc aag ggc aag gtg aag agg gac cgg agt gtg tct gtg gac tct 337

Ser Leu Lys Gly Lys Val Lys Arg Asp Arg Ser Val Ser Val Asp Ser

100

105

110

40

gga gag cag cga gag gct ggg acc cca tcc ctg gat tca gag gcc aaa 385

Gly Glu Gln Arg Glu Ala Gly Thr Pro Ser Leu Asp Ser Glu Ala Lys

115

120

125

gag gtg gcg ccg cgg agt aag cgg cgc tgt gtg ctg gag cgg aag cag 433

Glu Val Ala Pro Arg Ser Lys Arg Arg Cys Val Leu Glu Arg Lys Gln
 130 135 140

ccg tac agt ggg gac gaa tgg tgc tct gga ccg gac agt gag gag gac 481
 Pro Tyr Ser Gly Asp Glu Trp Cys Ser Gly Pro Asp Ser Glu Glu Asp
 145 150 155 160

gac aag ccc att ggg gcc acc cac a 506
 Asp Lys Pro Ile Gly Ala Thr His
 165

10

<210> 10

<211> 168

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 10

Leu Pro His Pro Arg Arg Arg Glu Ala Pro Gly Ser Pro Pro Leu Ser
 1 5 10 15

Pro Arg Gly His Cys Pro Pro Ala Pro Ala Lys Pro Met His Pro Glu
 20 25 30

Asn Lys Leu Thr Asn His Gly Lys Thr Gly Asn Gly Gly Ala Gln Ser
 35 40 45

30

Gln His Gln Asn Val Asn Gln Gly Pro Thr Cys Asn Val Gly Ser Lys
 50 55 60

Gly Val Gly Ala Gly Asn His Gly Gly Lys Ala Asn Gln Ile Ser Pro
 65 70 75 80

40

Ser Asn Ser Ser Leu Lys Asn Pro Gln Ala Gly Val Pro Pro Phe Ser
 85 90 95

Ser Leu Lys Gly Lys Val Lys Arg Asp Arg Ser Val Ser Val Asp Ser
 100 105 110

Gly Glu Gln Arg Glu Ala Gly Thr Pro Ser Leu Asp Ser Glu Ala Lys
 115 120 125

Glu Val Ala Pro Arg Ser Lys Arg Arg Cys Val Leu Glu Arg Lys Gln
 130 135 140

Pro Tyr Ser Gly Asp Glu Trp Cys Ser Gly Pro Asp Ser Glu Glu Asp
 145 150 155 160

10

Asp Lys Pro Ile Gly Ala Thr His
 165

<210> 11

<211> 2215

<212> DNA

20

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2214)

<400> 11

ggc ttg tcc aaa gag cag ctg gag cat cgg gaa cgg tcc etc cag acg 48
 Gly Leu Ser Lys Glu Gln Leu Glu His Arg Glu Arg Ser Leu Gln Thr
 1 5 10 15

30

ctg cga gac att gag cga ctg ctg etc cgc agc gga gag act gag etc 96
 Leu Arg Asp Ile Glu Arg Leu Leu Leu Arg Ser Gly Glu Thr Glu Leu
 20 25 30

ttc etc aag ggg ccc cca gga gga gcg ggt gag gga ggg cca cca gca 144
 Phe Leu Lys Gly Pro Pro Gly Gly Ala Gly Glu Gly Gly Pro Pro Ala
 35 40 45

40

caa gcc ccc cct cca ccc cag cag caa ccc atg gcc cct ccc agt ggg 192
 Gln Ala Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln Pro Met Ala Pro Pro Ser Gly
 50 55 60

ctg aaa aaa tat gag gac cct ttg cag tcc atg att tca cag aca cag 240
 Leu Lys Lys Tyr Glu Asp Pro Leu Gln Ser Met Ile Ser Gln Thr Gln
 65 70 75 80

agc cta ggg ggc ccc ccg ctg gag cat gaa gtg cct ggg cac ccc ccg 288
 Ser Leu Gly Gly Pro Pro Leu Glu His Glu Val Pro Gly His Pro Pro
 85 90 95

ggt ggg gac atg ggg cag cag atg aac atg atg ata cag agg ctg ggc 336
 Gly Gly Asp Met Gly Gln Gln Met Asn Met Met Ile Gln Arg Leu Gly
 100 105 110

10

cag gac agc ctc acg cct gag cag gtg gcc tgg cgc aag ctg cag gag 384
 Gln Asp Ser Leu Thr Pro Glu Gln Val Ala Trp Arg Lys Leu Gln Glu
 115 120 125

gag tac tac gaa gag aaa cgg cgg aaa gag gaa cag att ggg ctg cat 432
 Glu Tyr Tyr Glu Glu Lys Arg Arg Lys Glu Glu Gln Ile Gly Leu His
 130 135 140

20

ggg agc cgt cct ctg cag gac atg atg ggc atg ggg ggc atg atg gtg 480
 Gly Ser Arg Pro Leu Gln Asp Met Met Gly Met Gly Gly Met Met Val
 145 150 155 160

agg ggg ccc ccg cct cct tac cac agc aag cct ggg gat cag tgg cca 528
 Arg Gly Pro Pro Pro Tyr His Ser Lys Pro Gly Asp Gln Trp Pro
 165 170 175

30

cct gga atg ggt gcg cag ctg cgg ggg ccc atg gat gtt caa gat ccc 576
 Pro Gly Met Gly Ala Gln Leu Arg Gly Pro Met Asp Val Gln Asp Pro
 180 185 190

atg cag ctc cgg ggc gga cct ccc ttt cct ggg ccc cgt ttc cca ggc 624
 Met Gln Leu Arg Gly Gly Pro Pro Phe Pro Gly Pro Arg Phe Pro Gly
 195 200 205

40

aac cag ata caa cgg gta cct ggg ttt ggg ggc atg cag agt atg ccc 672
 Asn Gln Ile Gln Arg Val Pro Gly Phe Gly Gly Met Gln Ser Met Pro

210	215	220		
atg gag gtg ccc atg aat gcc atg cag agg ccc gtg aga cca ggc atg			720	
Met Glu Val Pro Met Asn Ala Met Gln Arg Pro Val Arg Pro Gly Met				
225	230	235	240	
ggc tgg acc gaa gac ttg ccc cct atg ggg gga ccc agc aat ttt gcc			768	
Gly Trp Thr Glu Asp Leu Pro Pro Met Gly Gly Pro Ser Asn Phe Ala				10
	245	250	255	
cag aac acc atg ccc tac cca ggt ggg cag ggt gag gcg gag cga ttc			816	
Gln Asn Thr Met Pro Tyr Pro Gly Gly Gln Gly Glu Ala Glu Arg Phe				
	260	265	270	
atg act ccc cgg gtc cgt gag gag ctg ctg cgg cac cag ctg ctg gag			864	
Met Thr Pro Arg Val Arg Glu Glu Leu Leu Arg His Gln Leu Leu Glu				20
	275	280	285	
aag cgg tcg atg ggc atg cag cgc ccc ctg ggc atg gca ggc agt ggc			912	
Lys Arg Ser Met Gly Met Gln Arg Pro Leu Gly Met Ala Gly Ser Gly				
	290	295	300	
atg gga cag agc atg gag atg gag cgg atg atg cag gcg cac cga cag			960	
Met Gly Gln Ser Met Glu Met Glu Arg Met Met Gln Ala His Arg Gln				30
305	310	315	320	
atg gat cct gcc atg ttt ccc ggg cag atg gct ggt ggt gag ggc ctg			1008	
Met Asp Pro Ala Met Phe Pro Gly Gln Met Ala Gly Gly Glu Gly Leu				
	325	330	335	
gcg ggc act ccc atg ggc atg gag ttt ggt gga ggc cgg ggc ctc ctg			1056	
Ala Gly Thr Pro Met Gly Met Glu Phe Gly Gly Gly Arg Gly Leu Leu				40
	340	345	350	
agc cct ccc atg ggg cag tct ggg ctg agg gag gtg gac cca ccc atg			1104	
Ser Pro Pro Met Gly Gln Ser Gly Leu Arg Glu Val Asp Pro Pro Met				
	355	360	365	
ggg cca ggc aac ctc aac atg aac atg aat gtc aac atg aac atg aac			1152	

Gly	Pro	Gly	Asn	Leu	Asn	Met	Asn	Met	Asn	Val	Asn	Met	Asn	Met	Asn			
370						375					380							
atg	aac	ctg	aac	gtg	cag	atg	acc	ccg	cag	cag	cag	atg	ctg	atg	tcg			1200
Met	Asn	Leu	Asn	Val	Gln	Met	Thr	Pro	Gln	Gln	Gln	Met	Leu	Met	Ser			
385					390					395					400			
cag	aag	atg	cgg	ggc	cct	ggg	gac	ttg	atg	ggg	ccc	cag	ggc	ctc	agt			1248
Gln	Lys	Met	Arg	Gly	Pro	Gly	Asp	Leu	Met	Gly	Pro	Gln	Gly	Leu	Ser			10
				405						410					415			
cct	gag	gag	atg	gcc	cgg	ggt	cgg	gcc	cag	aac	agc	agt	ggc	gtg	atg			1296
Pro	Glu	Glu	Met	Ala	Arg	Val	Arg	Ala	Gln	Asn	Ser	Ser	Gly	Val	Met			
				420					425						430			
ggc	ggc	ccg	cag	aag	atg	ctg	atg	cct	tca	cag	ttt	ccc	aac	cag	ggc			1344
Gly	Gly	Pro	Gln	Lys	Met	Leu	Met	Pro	Ser	Gln	Phe	Pro	Asn	Gln	Gly			20
				435					440					445				
cag	cag	gga	ttc	tct	gga	ggc	cag	gga	ccc	tac	caa	gcc	atg	tcc	cag			1392
Gln	Gln	Gly	Phe	Ser	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gln	Ala	Met	Ser	Gln			
				450				455						460				
gac	atg	ggc	aat	acc	caa	gac	atg	ttc	agc	cct	gat	cag	agc	tca	atg			1440
Asp	Met	Gly	Asn	Thr	Gln	Asp	Met	Phe	Ser	Pro	Asp	Gln	Ser	Ser	Met			30
465					470					475					480			
ccc	atg	agc	aac	gtg	ggc	acc	acc	cgg	ctc	agc	cac	atg	cct	ctg	ccc			1488
Pro	Met	Ser	Asn	Val	Gly	Thr	Thr	Arg	Leu	Ser	His	Met	Pro	Leu	Pro			
				485					490						495			
cct	gcg	tcc	aat	cct	cct	ggg	acc	gtg	cat	tca	gcc	cca	aac	cgg	ggg			1536
Pro	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Gly	Thr	Val	His	Ser	Ala	Pro	Asn	Arg	Gly			40
				500					505						510			
cta	ggc	agg	cgg	cct	tcg	gac	ctc	acc	atc	agt	att	aat	cag	atg	ggc			1584
Leu	Gly	Arg	Arg	Pro	Ser	Asp	Leu	Thr	Ile	Ser	Ile	Asn	Gln	Met	Gly			
				515					520						525			

tca ccg ggc atg ggg cac ttg aag teg ccc acc ctt agc cag gtg cac	1632	
Ser Pro Gly Met Gly His Leu Lys Ser Pro Thr Leu Ser Gln Val His		
530 535 540		
tca ccc ctg gtc acc teg ccc tet gcc aac etc aag tca ccc cag act	1680	
Ser Pro Leu Val Thr Ser Pro Ser Ala Asn Leu Lys Ser Pro Gln Thr		
545 550 555 560		
ccc tca cag atg gtg ccc ttg cct tet gcc aac ccg cca gga cct etc	1728	10
Pro Ser Gln Met Val Pro Leu Pro Ser Ala Asn Pro Pro Gly Pro Leu		
565 570 575		
aag teg ccc cag gtc ctc ggc tcc tcc etc agt gtc cgt tca ccc act	1776	
Lys Ser Pro Gln Val Leu Gly Ser Ser Leu Ser Val Arg Ser Pro Thr		
580 585 590		
ggc teg ccc agc agg ctc aag tct cct tcc atg gcg gtg cct tct cca	1824	20
Gly Ser Pro Ser Arg Leu Lys Ser Pro Ser Met Ala Val Pro Ser Pro		
595 600 605		
ggc tgg gtt gcc tca cct aag acg gcc atg ccc agc ccg ggg gtc tcc	1872	
Gly Trp Val Ala Ser Pro Lys Thr Ala Met Pro Ser Pro Gly Val Ser		
610 615 620		
cag aac aag cag ccg cct ctc aac atg aac tct tcc acc acc ctg agc	1920	30
Gln Asn Lys Gln Pro Pro Leu Asn Met Asn Ser Ser Thr Thr Leu Ser		
625 630 635 640		
aac atg gaa cag ggt acc ctc ccg cct agc ggc ccc cgg agc agc tcc	1968	
Asn Met Glu Gln Gly Thr Leu Pro Pro Ser Gly Pro Arg Ser Ser Ser		
645 650 655		
tca gea cct ccc gcc aac cct ccc agc ggc ctc atg aac ccc agc eta	2016	40
Ser Ala Pro Pro Ala Asn Pro Pro Ser Gly Leu Met Asn Pro Ser Leu		
660 665 670		
cca ttc act tcc tcc cca gac ccc aca cct tcc cag aac ccc ctg tca	2064	
Pro Phe Thr Ser Ser Pro Asp Pro Thr Pro Ser Gln Asn Pro Leu Ser		
675 680 685		

ctg atg atg acc cag atg tcc aag tac gcc atg ccc agc tcc acc ccg 2112
 Leu Met Met Thr Gln Met Ser Lys Tyr Ala Met Pro Ser Ser Thr Pro
 690 695 700

ctc tac cac aat gcc atc aag acc atc gcc acc tca gac gac gag ctg 2160
 Leu Tyr His Asn Ala Ile Lys Thr Ile Ala Thr Ser Asp Asp Glu Leu
 705 710 715 720

ctg ccc gac cgg ccc ctg ctg ccc ccc cca cca cca ccg cag ggc tcc 2208
 Leu Pro Asp Arg Pro Leu Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gly Ser
 725 730 735

ggg cca g 2215
 Gly Pro

<210> 12

<211> 738

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gly Leu Ser Lys Glu Gln Leu Glu His Arg Glu Arg Ser Leu Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Arg Asp Ile Glu Arg Leu Leu Leu Arg Ser Gly Glu Thr Glu Leu
 20 25 30

Phe Leu Lys Gly Pro Pro Gly Gly Ala Gly Glu Gly Gly Pro Pro Ala
 35 40 45

Gln Ala Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln Pro Met Ala Pro Pro Ser Gly
 50 55 60

Leu Lys Lys Tyr Glu Asp Pro Leu Gln Ser Met Ile Ser Gln Thr Gln
 65 70 75 80

Ser Leu Gly Gly Pro Pro Leu Glu His Glu Val Pro Gly His Pro Pro

10

20

30

40

85	90	95	
Gly Gly Asp Met Gly Gln Gln Met Asn Met Met Ile Gln Arg Leu Gly			
100	105	110	
Gln Asp Ser Leu Thr Pro Glu Gln Val Ala Trp Arg Lys Leu Gln Glu			
115	120	125	
Glu Tyr Tyr Glu Glu Lys Arg Arg Lys Glu Glu Gln Ile Gly Leu His			10
130	135	140	
Gly Ser Arg Pro Leu Gln Asp Met Met Gly Met Gly Gly Met Met Val			
145	150	155	160
Arg Gly Pro Pro Pro Pro Tyr His Ser Lys Pro Gly Asp Gln Trp Pro			
	165	170	175
			20
Pro Gly Met Gly Ala Gln Leu Arg Gly Pro Met Asp Val Gln Asp Pro			
180	185	190	
Met Gln Leu Arg Gly Gly Pro Pro Phe Pro Gly Pro Arg Phe Pro Gly			
195	200	205	
Asn Gln Ile Gln Arg Val Pro Gly Phe Gly Gly Met Gln Ser Met Pro			
210	215	220	30
Met Glu Val Pro Met Asn Ala Met Gln Arg Pro Val Arg Pro Gly Met			
225	230	235	240
Gly Trp Thr Glu Asp Leu Pro Pro Met Gly Gly Pro Ser Asn Phe Ala			
	245	250	255
Gln Asn Thr Met Pro Tyr Pro Gly Gly Gln Gly Glu Ala Glu Arg Phe			40
260	265	270	
Met Thr Pro Arg Val Arg Glu Glu Leu Leu Arg His Gln Leu Leu Glu			
275	280	285	
Lys Arg Ser Met Gly Met Gln Arg Pro Leu Gly Met Ala Gly Ser Gly			

290		295		300	
Met Gly Gln Ser Met Glu Met Glu Arg Met Met Gln Ala His Arg Gln					
305		310		315	320
Met Asp Pro Ala Met Phe Pro Gly Gln Met Ala Gly Gly Glu Gly Leu					
		325		330	335
Ala Gly Thr Pro Met Gly Met Glu Phe Gly Gly Gly Arg Gly Leu Leu					10
		340		345	350
Ser Pro Pro Met Gly Gln Ser Gly Leu Arg Glu Val Asp Pro Pro Met					
		355		360	365
Gly Pro Gly Asn Leu Asn Met Asn Met Asn Val Asn Met Asn Met Asn					
		370		375	380
Met Asn Leu Asn Val Gln Met Thr Pro Gln Gln Gln Met Leu Met Ser					
385		390		395	400
Gln Lys Met Arg Gly Pro Gly Asp Leu Met Gly Pro Gln Gly Leu Ser					
		405		410	415
Pro Glu Glu Met Ala Arg Val Arg Ala Gln Asn Ser Ser Gly Val Met					
		420		425	430
Gly Gly Pro Gln Lys Met Leu Met Pro Ser Gln Phe Pro Asn Gln Gly					
		435		440	445
Gln Gln Gly Phe Ser Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Gln Ala Met Ser Gln					
		450		455	460
Asp Met Gly Asn Thr Gln Asp Met Phe Ser Pro Asp Gln Ser Ser Met					
465		470		475	480
Pro Met Ser Asn Val Gly Thr Thr Arg Leu Ser His Met Pro Leu Pro					
		485		490	495
Pro Ala Ser Asn Pro Pro Gly Thr Val His Ser Ala Pro Asn Arg Gly					

	500		505		510	
Leu Gly Arg Arg Pro Ser Asp Leu Thr Ile Ser Ile Asn Gln Met Gly	515		520		525	
Ser Pro Gly Met Gly His Leu Lys Ser Pro Thr Leu Ser Gln Val His	530		535		540	
Ser Pro Leu Val Thr Ser Pro Ser Ala Asn Leu Lys Ser Pro Gln Thr	545		550		555	10
Pro Ser Gln Met Val Pro Leu Pro Ser Ala Asn Pro Pro Gly Pro Leu	565		570		575	
Lys Ser Pro Gln Val Leu Gly Ser Ser Leu Ser Val Arg Ser Pro Thr	580		585		590	20
Gly Ser Pro Ser Arg Leu Lys Ser Pro Ser Met Ala Val Pro Ser Pro	595		600		605	
Gly Trp Val Ala Ser Pro Lys Thr Ala Met Pro Ser Pro Gly Val Ser	610		615		620	
Gln Asn Lys Gln Pro Pro Leu Asn Met Asn Ser Ser Thr Thr Leu Ser	625		630		635	30
Asn Met Glu Gln Gly Thr Leu Pro Pro Ser Gly Pro Arg Ser Ser Ser	645		650		655	
Ser Ala Pro Pro Ala Asn Pro Pro Ser Gly Leu Met Asn Pro Ser Leu	660		665		670	
Pro Phe Thr Ser Ser Pro Asp Pro Thr Pro Ser Gln Asn Pro Leu Ser	675		680		685	40
Leu Met Met Thr Gln Met Ser Lys Tyr Ala Met Pro Ser Ser Thr Pro	690		695		700	
Leu Tyr His Asn Ala Ile Lys Thr Ile Ala Thr Ser Asp Asp Glu Leu						

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense primer for mouse beta-catenin armadillo repeat 7
(downstream from amino acid residue 391 Ala) with MunI
site at its 5' end

<400> 15

ggccaattga actatcagga tgacgcgg

28

10

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense primer for mouse beta-catenin armadillo repeat 12
(upstream from amino acid residue 664 Glu) with Sall site
at its 5' end.

20

<400> 16

ggcgtcgacc tcagacattc ggaataggac

30

【図面の簡単な説明】

第1図はマウスB9Lとヒトbc19のアミノ酸配列を比較した図ある。

30

上段がマウスB9L、下段がヒトbc19のアミノ酸配列を1文字表記で表したものである。ただし、*はヒトbc19で上段のマウスB9Lと同じアミノ酸を示し、-は対応するアミノ酸がないことを示す。下線は -カテニンとの結合部位を表し、二重下線は核移行シグナルと類似の配列を示す。

第2図は細胞内での -カテニンとB9Lの結合を示す図である。

レーンの下の+は発現させる遺伝子を示したもので、中央と右は、S33Y -カテニンとGFP-B9Lを発現させたCOS-7、左は対照用のS33Y -カテニンとGFPを発現させたCOS-7の細胞溶解液の免疫沈降物を抗 -カテニン抗体を1次抗体として用いたウェスタンブロッティングの結果である。レーンの上は免疫沈降を行った抗体を示したもので、左と中央は抗GFP抗体で、右は抗 -カテニン抗体でそれぞれ免疫沈降を行ったものである。

40

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP01/08140
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. ⁷ C07K14/435, C12N15/12, C12N5/18, C12Q1/68, A61K39/395, C07K16/18, G01N33/53		
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) Int. Cl. ⁷ C07K14/435, C12N15/12, C12N5/18, C12Q1/68, A61K39/395, C07K16/18, G01N33/53		
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 practicable, search terms used) Genbank/EMBL/DBBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), JICST (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 00/58473 A (Curagen Corporation), 05 October, 2000 (05.10.00), & AU 200037745 A	1-21, 23, 24, 26-36, 39-42, 44-47
X A	Prieve, M. G., et al., "Nuclear localization and formation of beta-catenin-lymphoid enhancer factor 1 complexes are not sufficient for activation of gene expression", Mol. Cell. Biol., (1999), Vol.19, No.6, pages 4503 to 4515	5 1-4, 6-21, 23, 24, 26-36, 39-42, 44-47
X A	Ertl, H., et al., "The extracellular matrix of <i>Volvox carteri</i> : molecular structure of the cellular compartment", J. Cell Biol., (1989), Vol.109, No.6, Pt.2, pages 3493 to 3501	9, 10 1-8, 11-21, 23, 24, 26-36, 39-42, 44-47
X A	Godl, K., et al., "Differential targeting of closely related ECM-glycoproteins: The pterophorin family from <i>Volvox</i> ", Embo J., (1997), Vol.16, pages 25 to 34	9, 10 1-8, 11-21, 23, 24, 26-36, 39-42, 44-47
A	Fago K., et al., "Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein", Genes Dev., July, 2000, Vol.14, No.14, pages 1741 to 1749	1-21, 23, 24, 26-36, 39-42, 44-47
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family 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 (as 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 "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 13 December, 2001 (13.12.01)		Date of mailing of the international search report 25 December, 2001 (25.12.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP01/08140
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: 22,25,43 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>Claims 22, 25 and 43 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a) of the PCT and Rule 39(iv) of the Regulations under the PCT, to search.</p>
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: 37,38 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>Concerning the "compound obtained by the screening method" as set forth in claims 37 and 38, it is completely unknown what particular compounds are involved in the scope thereof and what are not. Thus, the claims are described in an extremely unclear manner. Such being the case, no meaningful opinion can be made on the novelty and industrial applicability of the inventions as set forth in the above claims.</p>
3.	<input type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO1/08140
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C07K14/435, C12N15/12, C12N5/18, C12Q1/68, A61K39/395, C07K16/18, G01N33/53		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C07K14/435, C12N15/12, C12N5/18, C12Q1/68, A61K39/395, C07K16/18, G01N33/53		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STM), JICST (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	WO 00/58473 A (CURAGEN CORPORATION) 5.10月.2000 (05.10.00) & AU 200037745 A	1-21, 23, 24, 26-36, 39-42, 44-47
X A	Prieve MG, e t.al., Nuclear localization and formation of beta-catenin-lymphoid enhancer factor 1 complexes are not sufficient for activation of gene expression., Mol. Cell. Biol. (1999), Vol. 19, No. 6, p. 4503-4515	5 1-4, 6-21, 23, 24, 26-36, 39-42, 44-47
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	13.12.01	国際調査報告の発送日 25.12.01
国際調査機関の名称及び先 日本特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区蔵が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一	4N 9839 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP01/08140
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Ertl H, et. al., The extracellular matrix of <i>Volvox carteri</i> : molecular structure of the cellular compartment., J. Cell Biol. (1989), Vol. 109, No. 6 Pt 2, p. 3493-3501	9, 10 1-8, 11-21, 23, 24, 26-36, 39-42, 44-47
X A	Godl, K., et. al., Differential targetting of closely related ECM-glycoproteins: The perophorin family from <i>Volvox</i> ., EMBO J. (1997), Vol. 16, p. 25-34	9, 10 1-8, 11-21, 23, 24, 26-36, 39-42, 44-47
A	Tago K, et. al., Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein., Genes Dev. (2000 Jul), Vol. 14, No. 14, p. 1741-1749	1-21, 23, 24, 26-36, 39-42, 44-47

国際調査報告	国際出願番号 PCT/J P 01/08140
<p>第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き) 法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p>	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 22, 25, 43 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、 請求の範囲 22, 25, 43 は、人体の診断方法に該当するものであるから、PCT 17 条 (2) (a) 及び PCT 規則 39 (iv) の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。</p>	
<p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 37, 38 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、 請求の範囲 37, 38 に記載の「スクリーニング方法により得られる化合物」については、化合物として具体的にどの化合物が含まれ、どのような化合物が含まれないかが全く不明であって、請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求項に記載された発明に係る新規性、産業上の利用可能性についての有意義な見解を示すことができない。</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p>第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き) 次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認められた。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p>	
<p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p>	
<p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意 <input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。 <input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	β-catenin核定位蛋白		
公开(公告)号	JPWO2002024738A1	公开(公告)日	2004-01-29
申请号	JP2002529146	申请日	2001-09-19
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社		
[标]发明人	秋山 徹 足達 俊吾		
发明人	秋山 徹 足達 俊吾		
IPC分类号	C12N15/09 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/18 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A01K2217/05 A01K2217/075 A61K38/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/4705 G01N33/57484 G01N33/57496		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K35/76 A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.A A61K37/02		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2000287876 2000-09-22 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了新颖的β-连环蛋白核定位蛋白和编码该蛋白的DNA。此外，β-连环蛋白核定位蛋白和编码该蛋白的DNA的使用为与β-连环蛋白的核定位有关的疾病例如癌症提供了诊断剂和治疗剂。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP01/09140		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. C07K14/435, C12N15/12, C12N5/18, C12Q1/68, A61K39/395, C07K16/18, G01N33/53				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Int. Cl. C07K14/435, C12N15/12, C12N5/18, C12Q1/68, A61K39/395, C07K16/18, G01N33/53				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)				
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 file base and, where practicable, search terms used) Genbank/EMBL/DBJ/Genbank, SwissProt/PIR/Genbank, MEDLINE (PUB), JICRP (JOL)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	WO 00/28173 A (Ciba-Geigy Corporation), 05 October, 2000 (05.10.00), 6-11, 2000:745-9	1-23, 23, 24, 26-36, 39-42, 44-47		
X	Bieve, M. G., et al., "Nuclear localization and formation of beta-catenin-lymphoid enhancer factor 1 complexes are not sufficient for activation of gene expression", Mol. Cell. Biol., (1999), Vol. 19, No. 6, pages 4503 to 4515	5, 1-4, 5, 21, 23, 24, 26, 36, 39-42, 44-47		
X	Bell, H., et al., "The molecular structure of Volvox carterii: molecular structure of the cellular compartment", J. Cell Biol., (1988), Vol. 109, No. 2, Pt. 2, pages 3493 to 3501	9, 10, 1-8, 11-21, 23, 24, 26-36, 39-42, 44-47		
X	Gedl, R., et al., "Differential targeting of closely related Rho GTPases: The phosphoinositide family from Volvox", Embo J., (1997), Vol. 16, pages 25 to 34	9, 10, 1-8, 11-21, 23, 24, 26-36, 39-42, 44-47		
A	Tago K., et al., "Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein", Gene Dev., July, 2000, Vol. 14, No. 14, pages 1741 to 1749	1-23, 23, 24, 26-36, 39-42, 44-47		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family name.				
<input type="checkbox"/> Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <input type="checkbox"/> Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance <input type="checkbox"/> Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance but which is cited to substantiate the priority or date of invention <input type="checkbox"/> 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 (as specified in the annex to the international search report) <input type="checkbox"/> Document referred to in an oral disclosure, use, exhibition or other means <input type="checkbox"/> Document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <input type="checkbox"/> Literature published after the international filing date or priority date and in conflict with the application but cited to substantiate the priority or date of invention <input type="checkbox"/> Document of particular relevance, the citation of which is considered to involve an inventive step when the document is taken alone <input type="checkbox"/> Document of particular relevance, the citation of which is considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other cited documents, each document referred to in an oral disclosure, use, exhibition or other means <input type="checkbox"/> Document number of the same patent family </td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/> Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance <input type="checkbox"/> Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance but which is cited to substantiate the priority or date of invention <input type="checkbox"/> 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 (as specified in the annex to the international search report) <input type="checkbox"/> Document referred to in an oral disclosure, use, exhibition or other means <input type="checkbox"/> Document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	<input type="checkbox"/> Literature published after the international filing date or priority date and in conflict with the application but cited to substantiate the priority or date of invention <input type="checkbox"/> Document of particular relevance, the citation of which is considered to involve an inventive step when the document is taken alone <input type="checkbox"/> Document of particular relevance, the citation of which is considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other cited documents, each document referred to in an oral disclosure, use, exhibition or other means <input type="checkbox"/> Document number of the same patent family
<input type="checkbox"/> Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance <input type="checkbox"/> Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance but which is cited to substantiate the priority or date of invention <input type="checkbox"/> 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 (as specified in the annex to the international search report) <input type="checkbox"/> Document referred to in an oral disclosure, use, exhibition or other means <input type="checkbox"/> Document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	<input type="checkbox"/> Literature published after the international filing date or priority date and in conflict with the application but cited to substantiate the priority or date of invention <input type="checkbox"/> Document of particular relevance, the citation of which is considered to involve an inventive step when the document is taken alone <input type="checkbox"/> Document of particular relevance, the citation of which is considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other cited documents, each document referred to in an oral disclosure, use, exhibition or other means <input type="checkbox"/> Document number of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 13 December, 2003 (13.12.03)		Date of mailing of the international search report 25 December, 2003 (25.12.03)		
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Patent No.		Authorized officer Telephone No.		