

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報(A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 535997

(P2002 - 535997A)

(43)公表日 平成14年10月29日(2002.10.29)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード(参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7105	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7105		31/711	4 B 0 2 4
31/711		35/76	4 B 0 6 3
35/76		45/00	4 B 0 6 4
38/00		48/00	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求(全112数)			最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 597450(P2000 - 597450)

(86)(22)出願日 平成12年2月2日(2000.2.2)

(85)翻訳文提出日 平成13年8月1日(2001.8.1)

(86)国際出願番号 PCT/US00/02920

(87)国際公開番号 W000/46391

(87)国際公開日 平成12年8月10日(2000.8.10)

(31)優先権主張番号 09/243,277

(32)優先日 平成11年2月2日(1999.2.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザ・トラスティーズ・オブ・コロンビア・ユニバーシティー・イン・ザ・シティー・オブ・ニューヨーク

THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 10027、ニューヨーク、ウエスト・ワンハンドレッドシックスティーンズ・ストリート・アンド・ブロードウェイ(番地無し)

(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞の老化および細胞の最終分化の際に向上した発現を示す遺伝子、およびその使用

(57)【要約】

本発明は、OLD - 35タンパク質、OLD - 64タンパク質、OLD - 137タンパク質、OLD - 139タンパク質、OLD - 142タンパク質、またはOLD - 175タンパク質をコードする単離された核酸分子を提供する。本発明は更に、精製されたOLD - 35タンパク質、OLD - 64タンパク質、OLD - 137タンパク質、OLD - 139タンパク質、OLD - 142タンパク質、およびOLD - 175タンパク質を提供する。最後に、本発明はこれら核酸およびタンパク質の様々な使用を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 OLD - 35またはOLD - 64タンパク質をコードする単離された核酸分子。

【請求項2】 請求項1に記載の単離された核酸分子であって、配列番号39または19に記載の配列と実質的に同じ配列を有する核酸分子。

【請求項3】 OLD - 137、OLD - 139、OLD - 142、またはOLD - 175タンパク質をコードする単離された核酸分子。

【請求項4】 請求項3に記載の単離された核酸分子であって、配列番号31、32、34または38に記載の配列と実質的に同じ配列を有する核酸分子。

【請求項5】 請求項1または3に記載の単離された核酸分子であって、DNA、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA、またはRNAである核酸分子。

【請求項6】 請求項1または3の核酸分子の配列内に含まれる或る配列と特異的にハイブリダイズできる少なくとも15ヌクレオチドの核酸分子を含む核酸分子。

【請求項7】 請求項6に記載の核酸分子であって、前記核酸はDNA、cDNA、合成dDNAまたはRNAである核酸分子。

【請求項8】 請求項1または3の核酸に対して相補的な配列を含むアンチセンス核酸分子。

【請求項9】 請求項8に記載のアンチセンス核酸分子であって、前記ハイブリダイズした遺伝子の発現を阻害できるアンチセンス核酸分子。

【請求項10】 RNA転写のプロモータに対して動作可能に連結された、請求項1、3または8の単離された核酸分子。

【請求項11】 請求項1、3または8の単離された核酸分子を含むベクター。

【請求項12】 OLD - 35またはOLD - 64タンパク質の生物学的活性を有するタンパク質を製造するための宿主ベクター系であって、適切な宿主の中に請求項11のベクターを具備する宿主ベクター系。

【請求項13】 OLD - 137、OLD - 139、OLD - 142、またはOLD - 175タンパク質の生物学的活性を有するタンパク質を製造するため

の宿主ベクター系であって、適切な宿主の中に請求項11のベクターを含む宿主ベクター系。

【請求項14】 OLD-35、OLD-64、OLD-137、OLD-139、OLD-142、またはOLD-175タンパク質の生物学的活性を有するタンパク質を製造する方法であって、前記タンパク質を産生させる条件下で請求項12または13の宿主ベクター系を増殖させることと、こうして産生されたタンパク質を回収することを含む方法。

【請求項15】 精製されたOLD-35タンパク質。

【請求項16】 精製されたOLD-64タンパク質。

【請求項17】 精製されたOLD-137タンパク質。

【請求項18】 精製されたOLD-139タンパク質。

【請求項19】 精製されたOLD-142タンパク質。

【請求項20】 精製されたOLD-175タンパク質。

【請求項21】 請求項1または3の単離された核酸分子によりコードされるタンパク質。

【請求項22】 OLD-35、OLD-64、OLD-137、OLD-139、OLD-142、またはOLD-175タンパク質に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項23】 請求項22に記載のモノクローナル抗体。

【請求項24】 癌細胞の増殖を阻害する方法であって、前記癌細胞を、癌細胞の増殖を阻害するのに有効な或る量の精製されたOLD-35、またはOLD-64タンパク質またはその一部と接触させることを含む方法。

【請求項25】 癌細胞の癌性フェノタイプを反転させる方法であって、Old-35またはOld-64遺伝子またはその一部を含む核酸を、前記遺伝子を発現させる条件下で前記細胞の中に導入し、これにより前記細胞の癌性フェノタイプを反転させることを具備する方法。

【請求項26】 患者における癌細胞の癌性フェノタイプを反転させる方法であって、Old-35またはOld-64遺伝子またはその一部を含む核酸を、前記患者の細胞内で前記遺伝子を発現させる条件下において前記患者の細胞の

中に導入し、これにより前記細胞の癌性フェノタイプを反転させることを具備する方法。

【請求項27】 請求項25または26に記載の方法であって、前記核酸分子はベクターを含む方法。

【請求項28】 請求項25または26に記載の方法であって、前記O1d-35またはO1d-64遺伝子は調節要素に連結されており、その発現が前記調節要素の制御下にある方法。

【請求項29】 請求項26に記載の方法であって、前記調節要素は組織特異的な調節要素である方法。

【請求項30】 請求項25または26に記載の方法であって、前記核酸分子は、裸DNA技術、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、エプスタイン-バーウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、弱毒化HIVベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、リポソーム、抗体被覆リポソーム、機械的手段または電気的手段によって前記細胞の中に導入される方法。

【請求項31】 癌細胞の癌性フェノタイプを反転させる方法であって、OLD-35またはOLD-64タンパク質を前記癌性細胞の中に導入し、それによって前記細胞の癌性フェノタイプを反転させることを具備する方法。

【請求項32】 患者における癌細胞の癌性フェノタイプを反転させる方法であって、OLD-35またはOLD-64タンパク質を前記患者の癌性細胞の中に導入し、それによって前記細胞の癌性フェノタイプを反転させることを具備する方法。

【請求項33】 請求項25、26、31または32に記載の方法であって、前記癌細胞は、乳房細胞、子宮頸部細胞、結腸細胞、膵臓細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、脳細胞、前立腺細胞、鼻咽頭細胞、肺細胞、グリア芽細胞腫多形、リンパ腫細胞、白血病細胞、結合組織細胞、神経系細胞または基底細胞である方法。

【請求項34】 癌細胞の癌性フェノタイプを反転させるのに有効な或る量O1d-35、O1d-64遺伝子またはその一部を含む核酸分子と、薬学的に

許容可能なキャリアとを含有する薬学的組成物。

【請求項35】 前記核酸分子はベクターを含む請求項34に記載の薬学的組成物。

【請求項36】 請求項35に記載の薬学的組成物であって、前記ベクターはアデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、エプスタイン-バーウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、弱毒化HIVベクター、レトロウイルスベクターまたはワクシニアウイルスベクターである薬学的組成物。

【請求項37】 癌細胞の癌性フェノタイプを反転させるのに有効な或る量のOLD-35、OLD-64タンパク質と、薬学的に許容可能なキャリアとを含有する薬学的組成物。

【請求項38】 請求項34または36に記載の薬学的組成物であって、前記癌細胞は、乳房細胞、子宮頸部細胞、結腸細胞、膵臓細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、脳細胞、前立腺細胞、鼻咽頭細胞、肺細胞、グリア芽細胞腫多形、リンパ腫細胞、白血病細胞、結合組織細胞、神経系細胞または基底細胞である薬学的組成物。

【請求項39】 細胞が老化しているかどうかを決定する方法であって、Old-35遺伝子の発現を測定することを含み、該Old-35遺伝子の発現によって前記細胞が老化していることが示される方法。

【請求項40】 請求項39に記載の方法であって、前記Old-35遺伝子の発現は、Old-35特異的なRNAの発現によって測定される方法。

【請求項41】 請求項39に記載の方法であって、前記Old-35遺伝子の発現は、OLD-35タンパク質の発現によって測定される方法。

【請求項42】 細胞が最終分化しているかどうかを決定する方法であって、Old-35遺伝子の発現を測定することを含み、前記Old-35遺伝子の発現によって前記細胞が最終分化していることが示される方法。

【請求項43】 請求項42に記載の方法であって、前記Old-35遺伝子の発現は、Old-35特異的なRNAの発現によって測定される方法。

【請求項44】 請求項42に記載の方法であって、前記Old-35遺伝子の発現は、OLD-35タンパク質の発現によって測定される方法。

【請求項45】 細胞が成長停止状態にあるかどうかを決定する方法であって、O1d-35遺伝子の発現を測定することを含み、前記O1d-35遺伝子の発現によって前記細胞が成長停止状態にあることが示される方法。

【請求項46】 請求項45に記載の方法であって、前記O1d-35遺伝子の発現は、O1d-35特異的なRNAの発現によって測定される方法。

【請求項47】 請求項45に記載の方法であって、前記O1d-35遺伝子の発現は、OLD-35タンパク質の発現によって測定される方法。

【請求項48】 癌細胞の増殖を阻害する方法であって、前記癌細胞を、癌細胞の増殖を阻害するのに有効な或る量の精製されたOLD-64タンパク質と接触させることを具備した方法。

【請求項49】 癌細胞の増殖を阻害する方法であって、前記癌細胞を、癌細胞の増殖を阻害するのに有効な或る量の精製されたOLD-64タンパク質と接触させることを具備した方法。

【請求項50】 細胞が老化しているかどうかを決定する方法であって、O1d-64遺伝子の発現を測定することを含み、前記O1d-64遺伝子の発現によって前記細胞が老化していることが示される方法。

【請求項51】 請求項50に記載の方法であって、前記O1d-64遺伝子の発現は、O1d-64特異的なRNAの発現によって測定される方法。

【請求項52】 請求項50に記載の方法であって、前記O1d-64遺伝子の発現は、OLD-64タンパク質の発現によって測定される方法。

【請求項53】 細胞が最終分化しているかどうかを決定する方法であって、O1d-64遺伝子の発現を測定することを含み、前記O1d-64遺伝子の発現によって、前記細胞が最終分化していることが示される方法。

【請求項54】 請求項53に記載の方法であって、前記O1d-64遺伝子の発現は、O1d-64特異的なRNAの発現によって測定される方法。

【請求項55】 請求項53に記載の方法であって、前記O1d-64遺伝子の発現は、OLD-64タンパク質の発現によって測定される方法。

【請求項56】 細胞の増殖が停止しているかどうかを決定する方法であって、O1d-64遺伝子の発現を測定することを含み、前記O1d-64遺伝子

の発現によって、前記細胞の増殖が停止していることが示される方法。

【請求項57】 請求項56に記載の方法であって、前記O1d-64遺伝子の発現は、O1d-64特異的なRNAの発現によって測定される方法。

【請求項58】 請求項56に記載の方法であって、前記O1d-64遺伝子の発現は、OLD-64タンパク質の発現によって測定される方法。

【請求項59】 組織を再生する方法であって、前記組織に対して、前記組織を再生するのに有効な濃度の、OLD-35またはOLD-64タンパク質のインヒビターまたはその一部に接触させることを含む方法。

【請求項60】 細胞における老化を防止する方法であって、前記細胞に対して、前記細胞における老化プロセスを反転させるのに有効な濃度の、O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現を阻害する薬剤と接触させることを含む方法。

【請求項61】 細胞増殖を刺激するための薬学的組成物であって、薬学的に許容可能なキャリアと、細胞増殖を刺激するのに有効な濃度の精製されたO1d-35またはO1d-64抑制剤とを含有する組成物。

【請求項62】 サンプルにおけるインターフェロン または の存在をスクリーニングするための方法であって：

(a) 前記サンプルを、インターフェロン または の存在下に、O1d-35またはO1d-64遺伝子を発現させる条件下で前記細胞に接触させる工程と；

(b) O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現を決定する工程とを具備し、発現の増大によってインターフェロン または の存在が示される方法。

【請求項63】 インターフェロン または の分泌を検出する方法であって：

(a) 患者から適切なサンプルを取得する工程と；

(b) O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現を決定する工程とを具備し、O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現の増大によってインターフェロン または の分泌が示される方法。

【請求項64】 患者の化学療法をモニターする方法であって：

(a) 前記患者から適切なサンプルを取得する工程と；

(b) O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現を決定する工程とを具備し、O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現によって前記化学療法が有効であることが示される方法。

【請求項65】 患者由来の腫瘍の増殖段階を診断する方法であって：

(a) 患者から適切なサンプルを取得する工程と；

(b) O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現を検出する工程とを具備し、O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現によって前記腫瘍が増殖段階にないことが示される方法。

【請求項66】 腫瘍の増殖段階を診断するためのキットであって、O1d-35またはO1d-64遺伝子の核酸分子に特異的にハイブリダイズできる核酸分子を含むキット。

【請求項67】 腫瘍の増殖段階を診断するためのキットであって、OLD-35またはOLD-64タンパク質を特異的に認識できる抗体を含むキット。

【請求項68】 O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現を調節する薬剤を同定するための方法であって：

(a) 候補薬剤と、レポーター遺伝子を形質転換またはトランスフェクトされた細胞とを、O1d-35またはO1d-64プロモータまたはその調節要素の制御下において、前記候補薬剤が直接または間接に前記プロモータまたはその調節要素の発現を変化させることを可能にする条件下で、これを可能にするのに十分な時間だけ接触させる工程と；

(b) 前記細胞によって産生されるレポータタンパク質のレベルに対する前記候補薬剤の効果を測定することにより、O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現を調節する薬剤を同定する工程とを具備した方法

【請求項69】 増殖または癌性フェノタイプを誘導する化合物を同定する方法であって、O1d-35またはO1d-64のプロモータを含む細胞を前記化合物に露出させることと、O1d-35または64プロモータを抑制する化合物を同定することとを含む方法。

【請求項70】 老化または最終分化を誘導する化合物を同定する方法であ

って、O1d - 35またはO1d - 64のプロモータを含む細胞を前記化合物に露出させることと、O1d - 35または64プロモータを活性化させる化合物を同定することを含む方法。

【請求項71】 老化および最終分化の経路に共通した遺伝子を同定する方法であって：

(a) 最終分化において発現する遺伝子が富化された差し引きライブラリーを取得する工程と；

(b) 老化プローブを用いて前記ライブラリーをスクリーニングして、老化および最終分化の際に発現される新規遺伝子を同定する工程と；

(c) 前記同定された遺伝子の生物学的活性を試験して、それが老化および最終分化の際に発現されるかどうかを決定する工程とを具備する方法。

【請求項72】 老化および最終分化の経路に共通した遺伝子を同定する方法であって：

(a) 老化において発現する遺伝子が富化された差し引きライブラリーを取得する工程と；

(b) 最終分化プローブを用いて前記ライブラリーをスクリーニングして、老化および最終分化の際に発現される新規遺伝子を同定する工程と；

(c) 前記同定された遺伝子の生物学的活性を試験して、それが老化および最終分化の際に発現されるかどうかを決定する工程とを具備する方法。

【請求項73】 請求項71または72の方法によって同定された遺伝子。

【請求項74】 細胞における特異的なRNAを分解する方法であって、O1d - 35遺伝子の発現を誘導することを含む方法。

【請求項75】 細胞における特異的なRNAを分解する方法であって、O1d - 35遺伝子を含むベクターを前記細胞の中に導入することを含む方法。

【請求項76】 O1d - 35の発現は、細胞の老化、最終分化および/または増殖抑制の診断指標として使用することができる。

(a) 細胞が増殖能力を喪失して老化したかどうかを決定するために使用することができる。

【請求項77】 O1d - 35の発現は、老化を誘導して、例えば癌細胞の

増殖または異常な増殖状態（例えば乾癬、血管芽細胞腫など）を阻害する薬物または低分子化合物を同定するためのマーカーとして使用することができる。

【請求項78】 Old-35の発現は、老化を阻害する薬物または低分子を同定するために使用することができ、可能な使用には組織の再増殖、修復および再生を刺激することが含まれる。

【請求項79】 Old-35の発現は、細胞の最終分化を誘導して、例えば癌細胞の増殖または異常な増殖状態（例えば乾癬、血管芽細胞腫など）を阻害する薬物または低分子を同定するためのマーカーとして使用することができる。

【請求項80】 Old-35の発現は、細胞の最終分化を阻害する薬物または低分子を同定するために使用することができ、可能な用途には、組織の再増殖、修復および再生の刺激が含まれる。

【請求項81】 Old-35の発現は、生物学的サンプル中のサイトカイン類、特にI型インターフェロンを検出するためのマーカーとして使用することができる。白血球および繊維芽細胞インターフェロンを含むI型インターフェロンは、十分に特徴づけられたJakおよびStatキナーゼ経路を介して遺伝子発現を活性化させるので、この遺伝子は、これらの重要な経路を活性化させる薬物および低分子をモニターするために使用することができる。

【請求項82】 Old-35と他の相互作用タンパク質との組合せは、特定の標的細胞の分化をターゲティングするために使用できる。これは、末端細胞へと最終分化する多能性幹細胞の再プログラミングを生じる。

【請求項83】 Old-35は、AUリッチな3'UTRs（未翻訳領域）を含む可能性のある特定のmRNAを選択的に安定化させるために使用することができる。この効果は、細胞増殖を増強または阻害する遺伝子の持続的な発現を生じる。また、それは増大した生物学的および免疫学的活性を生じるサイトカイン遺伝子の安定化を生じる。

【請求項84】 Old-35は、ランダムなNTPsを核酸に重合させる方法論の一部として使用することができる。

【請求項85】 Old-35は、特定のmRNAの分解を誘導するために使用することができる。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

この出願は、1999年2月2日に出願された米国出願番号09/243,277号の一部継続出願であり、優先権を主張する。この親出願の内容は、本明細書の一部をなす参照として本願に援用される。

【0002】

この出願の全体を通して、種々の刊行物が括弧内のアラビア数字で引用される。これら刊行物の完全な書誌的引用は、明細書の実施例の直前に提示されている。これら刊行物の開示は、本発明が属する技術の状態をより完全に記述するために、その全体が本明細書の一部をなす参照として本願に援用される。

【0003】**【発明の背景】**

インビトロで培養された正常な細胞は、細胞老化として説明されるプロセスにおいて、最終的な数が倍化した後にそれらの増殖能力を喪失する (Hayflick and Moorehead, 1976)。この現象は、Hayflick and Moorehead (1976) の研究に基づいて、ヒト二倍体繊維芽細胞において十分に確立されているだけでなく、多くの追加の細胞タイプを用いた研究によっても確認されている (Goldstein et al., 1990; Murano et al., 1991)。これらの研究は、複製の老化とドナー年齢との間の逆相関、および複製老化とドナー種の寿命との間の直接的な関係を報告している (Hayflick and Moorehead, 1976; Goldstein et al., 1990; Murano et al., 1991)。この合同研究に一致して、ヴェルナー症候群および早老症のような未熟加齢症候群を伴う患者由来の細胞は、正常なヒト繊維芽細胞よりも遥かに迅速に休止状態に達する。この点において、たとえ遅延した速度であっても、正常な繊維芽細胞において同様の老化関連変化が生じれば、これらの細胞系はインビトロで老化を研究し、老化プロセスに関連した遺伝子を同定するための優れたモデルを提示する。老化は、細胞の形態における変化、マイトジェン刺激に対する反応性の欠如、および不可逆的な増殖停止によって特徴付けられる。しかし、細胞は細胞サイクルから撤退して、老化の際だけでなく、DNA損傷、アポトーシスまたは最終分化のプロセスの際にも、非分裂性になることができる。老化は時

間依存的プロセスであるが (Campisi et al., 1995)、最終分化は、適切な処理によって種々の細胞タイプで誘導することができる (Roberts et al., 1999)。例えば、最終分化は、メラノサイトにおいて cAMP 処理により誘導することができる (Medrano et al., 1994)。最終分化したメラノサイト v. 老化メラノサイトにおける遺伝子発現解析は、類似性および相違の両方を示している (Medrano et al., 1994)。両方の経路とも、p21 の向上および ERK2 のリン酸化分解不能をもたらすが、分化した細胞のみが、p27 の向上したレベルおよびメラノサイト特異的転写因子 (MITF) を表示する。

【0004】

ヒトメラノーマは、不可逆性の増殖停止および最終分化を研究するための優れたモデルを提示する。何故なら、これらの生理学的変化は、IFN- γ + メゼレイン (MEZ) によって化学的に誘導できるからである (Fisher et al., 1985; Jiang et al., 1994a)。HO-1 ヒトメラノーマ細胞における最終分化の誘導は、c-jun、jun-B、 α_5 インテグリン、 α_1 インテグリン、フィブロネクチン、HLA クラス I、ISG-54、ISG-15 および gro/MSGA のアップレギュレーション、並びに c-mym のダウンレギュレーションと相関している (Jiang et al., 1993a)。ヒトメラノーマ細胞における不可逆性増殖停止および最終分化の誘導の際に異なって発現される遺伝子のレパートリーを決定するために、我々は、迅速かつ効率的な分化誘導サブトラクションハイブリダイゼーション (DISH) (Jiang and Fisher, 1993) アプローチを使用した。このアプローチを単独で、および高スループットのスクリーニングストラテジー、マイクロチップ DNA アレイと組合せて使用することにより、増殖制御および最終分化に関連性をもつ可能性のある極めて多くの新規遺伝子が同定され、クローン化された (Jiang et al., 1995a, 1995b; Lin et al., 1996, 1998; Huang et al., 1999)。

【0005】

上記の考察に基づけば、特異的な動的に発現される遺伝子が、細胞老化の際に変化した発現を示す最終分化した cDNA 内に存在する可能性がある。これらのオーバーラップする遺伝子の同定を開始するために、時間的に離間した減算分化

インデューサで処理したH O - 1ヒトメラノーマライブラリーを、老化ヒト繊維芽細胞から単離したRNAでスクリーニングした。このようなスクリーニングプロトコールによって、28の既知のcDNAおよび10の新規なcDNAが生じた。その後のノーザンおよび逆ノーザンブロットング分析によって、特異的なcDNAの異なる発現が明らかになった。3つのcDNAのうちの一つ、即ちO1d-35の発現は、最終分化および老化に限定されていた。この点において、この遺伝子は増殖停止に導く経路に寄与しており、老化および最終分化の決定的成分である可能性がある。

【0006】

インターフェロン類 (I F N s) は、抗ウイルス活性、抗増殖活性、抗腫瘍活性および免疫調節活性を含む広範な活性を伴った、関連のサイトカイン類のファミリーを構成する (Stark et al., 1998; *Roberts et al., 1999)。 I F N の研究は、二つの主要な領域に焦点を当ててきた。一つは、治療目的のための I F N の臨床的使用を含んでおり、他方は、 I F N に刺激された遺伝子 (I S G) 活性化に導く哺乳類 J A K / S T A T 信号伝達カスケード (Darnell et al., 1994) を研究するためのパラダイムとして I F N 系を用いる。現在まで最も広範に研究されている I S G には、 RNA に活性化されたタンパク質キナーゼ (P K R)、 2 ' - 5 ' オリゴアデニレートシンターゼ、および M X タンパク質が含まれる (Stark et al., 1998, *Der et al., 1998)。

【0007】

mRNAレベルの転写後調節は、遺伝子発現における枢要な制御点である。初期応答遺伝子、例えばサイトカイン遺伝子、リンホカイン遺伝子および前癌遺伝子は、mRNAの3'非翻訳領域 (U T R) に見られるシス作用性アデニレート/ウリジレートに富む要素 (A R E) によって調節される (Caput et al., 1986 ; Shaw and Kamen, 1988; Chen and Shyu, 1995; Myer et al., 1997)。現在のところ、三つのクラスの不安定化要素が同定されている。即ち、AUUUA欠失要素、並びに散在したAUUUAモチーフを伴うもの (例えば前癌遺伝子) および重なったAUUUAモチーフを含むもの (例えば成長因子) に分類されるAUUUA含有要素である (Chen et al., 1995; Myer et al., 1997)。安定なメッセージ (例えば グ

ロプリン)の3'UTRへのAREを含む3'UTRの転位は、迅速な分解のために、この非常に安定なmRNAを標的とする(Shaw and Kamen, 1988)。対照的に、AREを除去すると、そうでなければ不安定なメッセージが安定化される(*Miller et al., 1984; *Lee et al., 1988)。

【0008】

今回の研究は、最終分化したヒトメラノーマcDNAライブラリーから得た新規な遺伝子であるO1d-35のクローニング、および最初の特徴付けを記述する。mRNAの安定性研究は、ARE要素を含むO1d-35・mRNAが、IFN- γ およびIFN- γ +MEZでの処理によってHO-1細胞中で安定化され得ることの証拠を与える。HO-1細胞に対するIFN- γ の増殖抑制効果、並びに集密化および老化の際のO1d-35の増大した安定性に基けば、この遺伝子が、該サイトカインによって誘導された増殖抑制において顕著な役割を果たす可能性がある。IFN信号伝達、最終分化および細胞老化におけるO1d-35の正確な役割を決定するためには、更なる実験が必要である。完全長クローニングおよびその後のタンパク質分析は、老化および分化のプロセスにおける、この潜在的に重要な遺伝子の機能に関する洞察を提供するはずである。

【0009】

最終分化および老化のプロセスは驚くほど類似した特徴を示すので、関連し且つ重なった遺伝子および遺伝子発現の変化は、これら両方の現象と関連し且つ両者を媒介することが可能である。O1d-35は、老化したヒト繊維芽細胞由来のRNAを用いて、増殖停止および最終分化に関連した遺伝子が富化された、差し引きヒトメラノーマcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって単離された。このcDNAは、集密化、老化および最終分化を含んだ異なるタイプの増殖停止の際に発現する、IFN- γ 誘導性遺伝子をコードしている。O1d-35RNAは、IFN- γ およびIFN- γ +MEZで処理されたHO-1ヒトメラノーマ細胞中において、増大した安定性を示す。また、O1d-35の定常状態mRNAは、心臓および脳、活性な再生特性をもたないヒト組織において高度に発現される。O1d-35発現のパターンから判断すると、この遺伝子は増殖停止の際に重要な役割を果たし、この点で老化および最終分化の重要なプロ

セスに寄与し得る可能性がある。

【0010】

【発明の概要】

本発明は、O1d35タンパク質、64タンパク質、137タンパク質、139タンパク質、142タンパク質、または175タンパク質をコードする単離された核酸分子を提供する。この単離された核酸分子は、DNA、ゲノムDNA、cDNA合成DNA、またはRNAであることができる。この単離された核酸は、配列番号39, 19, 31, 32, 34および38（これらは、夫々O1d35、o1d64, o1d137、o1d139、o1d142およびo1d175である）と実質的に同じ配列を有する。

【0011】

本発明はまた、o1d35タンパク質、64タンパク質、137タンパク質、139タンパク質、142タンパク質、および175タンパク質をコードする核酸分子の配列内に含まれる配列と特異的にハイブリダイズできる少なくとも15ヌクレオチドの核酸分子を提供する。この核酸プローブはDNA、ゲノムDNA、cDNA合成DNA、またはRNAであることができる。

【0012】

本発明は、更に、o1d35, 64, 137, 139, 142、および175タンパク質の生物学的活性を有するタンパク質を製造するための宿主ベクター系を提供する。単離されたo1d35, 64, 137, 139, 142、および175核酸分子は、RNA転写のプロモータに連結され、次いでプラスミドに連結される。適切な宿主は、使用するプロモータおよびプラスミドの種類に応じて、バクテリア細胞、昆虫細胞、または動物細胞である。本発明はまた、o1d35、64、137、139、142、および175タンパク質の生物学的活性を有するタンパク質を製造する方法であって、前記タンパク質を産生させる条件下で前記宿主ベクター系を増殖させることと、こうして産生されたタンパク質を回収することとを含む方法を提供する。

【0013】

本発明は更に、o1d35、64、137、139、142、および175の

精製されたタンパク質を提供する。このような精製された o l d 3 5、6 4、1 3 7、1 3 9、1 4 2、および 1 7 5 は、癌細胞の増殖を阻害するために有用であろう。本発明は、癌細胞を、癌細胞の増殖を阻害するのに有効な濃度の o l d 3 5、6 4、1 3 7、1 3 9、1 4 2、および 1 7 5 のある量と接触させる方法を提供する。本発明は更に、(a) 細胞中の核酸を単離することと、(b) この単離された核酸を、ハイブリッド形成を可能にする条件下で o l d 3 5 または 6 4 とハイブリダイズさせることと、(c) 前記細胞における o l d 3 5 または o l d 6 4 の発現を検出することとによって、細胞が老化しているかどうかを決定する方法を提供する。本発明は更に、(a) 細胞中の核酸を単離することと、(b) この単離された核酸を、ハイブリッド形成を可能にする条件下で o l d 3 5 または 6 4 とハイブリダイズさせることと、(c) 前記細胞における o l d 3 5 または o l d 6 4 の発現を検出することとによって、細胞が成長停止状態にあるかどうかを決定する方法を提供する。本発明は更に、(a) 細胞中の核酸を単離することと、(b) この単離された核酸を、ハイブリッド形成を可能にする条件下で o l d 3 5 または 6 4 とハイブリダイズさせることと、(c) 前記細胞における o l d 3 5 または o l d 6 4 の発現を検出することとによって、細胞が最終分化しているかどうかを決定する方法を提供する。更に、本発明は使用される検出体が DNA、RNA またはタンパク質であることを提供する。本発明はまた、前記組織を再生するのに有効な濃度の o l d 3 5 タンパク質のインヒビターを用いて、組織を再生する方法を提供する。本発明は、細胞における老化を防止する方法であって、前記細胞に対して、前記細胞における老化プロセスを反転させるのに有効な濃度の、o l d - 3 5 または o l d - 6 4 遺伝子の発現を阻害する薬剤と接触させることを含む方法を提供する。最後に、本発明は、細胞増殖を刺激するための薬学的組成物であって、薬学的に許容可能なキャリアと、細胞増殖を刺激するのに有効な濃度の精製された o l d 3 5 または o l d 6 4 とを含有する組成物を提供する。

【 0 0 1 4 】

【発明の詳細な記述】

後述の実験詳細のセクションの理解を容易にするために、頻繁に出てくる一定

の方法および/または用語は、Sambrook, et al. (1989)に記載されている。

【0015】

この出願の全体を通して、特定のヌクレオチドを示すために、下記の標準的な略語が明細書の全体を通して使用される。

【0016】

C = シトシン	A = アデノシン
T = チミジン	G = グアノシン

本発明は、OLD - 35またはOLD - 64タンパク質をコードする単離された核酸分子を提供する。一実施例において、上記の核酸分子は、配列番号39または19に記載の配列と実質的に同じ配列を含む。

【0017】

本発明はまた、OLD - 137、OLD - 139、OLD - 142、またはOLD - 175タンパク質をコードする単離された核酸分子を提供する。一実施例において、この核酸分子は、配列番号31、32、34または38に記載の配列と実質的に同じ配列を有する核酸分子を含む。上記の核酸分子は、DNA、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA、またはRNAであることができる。

【0018】

本発明はまた、OLD - 35、OLD - 64、OLD - 137、OLD - 139、OLD - 142、またはOLD - 175とは異なるアミノ酸配列をコードするが、フェノタイプの変化を生じない核酸をも包含する。或いは、本発明は、本発明のDNAおよびcDNAにハイブリダイズするDNAsおよびcDNAsをも包含する。ハイブリダイゼーション方は当業者に周知である。

【0019】

本発明のDNA分子はまた、一以上のアミノ酸残基の同一性または位置において天然に存在する形態とは異なり、且つ天然に存在する形態の幾つかまたは全ての性質を共有する、抗原性タンパク質のタンパク質類縁体、断片または誘導体（当該タンパク質に特異的な残基の全部よりも少ない残基を含む欠失類縁体、特定された一以上の残基が他の残基で置換された置換類縁体、および当該タンパク質の末端または中間部分に一以上のアミノ酸残基が付加された付加類縁体）をコー

ドするDNA分子をも含むものである。これらの配列は、選択された非哺乳類宿主による発現のために「好ましい」コドンの組込み；制限エンドヌクレアーゼ酵素による開裂のための部位の提供；および容易に発現されるベクターの構築を容易にする追加の開始、終始または中間DNA配列の提供を含むものである。

【0020】

ここに特許請求の範囲に記載した核酸分子は、それらが提供するタンパク質のアミノ酸配列に関する情報について、また種々の組換え技術によるタンパク質の大規模合成のための産物として有用である。この分子は、新規なクローニングベクターおよび発現ベクター、形質転換またはトランスフェクトされた原核および真核宿主細胞、および当該タンパク質および関連産物を発現できるこのような宿主細胞の培養増殖のための新規かつ有用な方法を創作するために有用である。

【0021】

本発明はまた、前記遺伝子産物の生物学的活性が維持されるO1d遺伝子またはタンパク質の断片または一部を提供する。このような断片または部分は、多機能分子を作製するために、他のアミノ酸配列に結合されてもよい。トリミング実験を行って、前記断片または部分を定義してもよい。

【0022】

O1d-35、O1d-64、O1d-137、O1d-139、O1d-142、またはO1d-175は、種々の脊椎動物から単離すればよい。一実施例においては、ヒトO1d-35、O1d-64、O1d-137、O1d-139、O1d-142、またはO1d-175が単離される。

【0023】

O1d-35、O1d-64、O1d-137、O1d-139、O1d-142、またはO1d-175の単離された核酸分子は、それぞれ配列番号39、19、31、32、34および38によって表される。

【0024】

本発明は、O1d-35、O1d-64、O1d-137、O1d-139、O1d-142、またはO1d-175をコードする核酸分子の配列内に含まれる配列と特異的にハイブリダイズできる少なくとも15ヌクレオチドの核酸分子

を提供する。

【0025】

ここで使用する「特異的にハイブリダイズする」の語句は、相補的塩基対の間の水素結合を介して、核酸分子がそれ自身に対して相補的な核酸配列を認識し、二重螺旋切片を形成する能力を意味する。核酸分子は、前記O1d遺伝子に対して特異的、即ち、適切な条件下において、前記分子は前記o1d遺伝子とのみハイブリダイズし、他の遺伝子とはハイブリダイズしないであろう。前記分子は、前記O1d遺伝子の独特の配列を含むことができる。

【0026】

核酸プローブ技術は当業者に周知であり、このようなプローブはその長さが大きく変化する可能性があり、また放射性同位元素または蛍光色素のような検出ラベルで標識され得ることを、当業者は容易に理解するであろう。

【0027】

プローブ分子は、当該技術において周知の方法を用いて、O1d-35、O1d-64、O1d-137、O1d-139、O1d-142、またはO1d-175タンパク質をコードする核酸分子またはその断片をプラスミドまたはバクテリオファージのような適切なベクターの中に挿入し、続いて適切なバクテリア宿主細胞に形質転換し、DNAプローブを回収することによって製造すればよい。或いは、プローブはDNA合成機で化学的に作製してもよい。

【0028】

このプローブは、該遺伝子を発現する組織を突き止めるための「インサイチュール」ハイブリダイゼーション、または種々の生物学的組織において当該遺伝子またはそのmRNAの存在を調べるための他のハイブリダイゼーションアッセイに有用である。

【0029】

本発明はまた、OLD-35、OLD-64、OLD-137、OLD-139、OLD-142、またはOLD-175タンパク質またはその断片をコードする核酸に対して相補的な配列を含むアンチセンス核酸を提供する。一つの実施例において、該アンチセンス核酸分子は、ハイブリダイズされた遺伝子の発現を

阻害することができる。

【0030】

本発明はまた、RNA転写のプロモータに動作可能に連結された、上記の単離された核酸分子を提供する。本発明は更に、上記の単離された核酸分子を含むベクターを提供する。

【0031】

上記の単離された核酸分子を含むベクターもまた提供される。適切なベクターにはプラスミドまたはウイルスが含まれるが、これらに限定されない。これらのベクターを適切な宿主細胞に形質転換して、OLD-35、OLD-64、OLD-137、OLD-139、OLD-142、またはOLD-175タンパク質の生物学的活性を有するタンパク質、またはその断片を製造するための宿主細胞ベクター系を形成することができる。

【0032】

本発明は更に、上記で述べた単離されたDNA、ゲノムDNA、cDNA、合成DNAまたはRNA分子を提供し、ここで前記宿主細胞はバクテリア細胞（例えばE. coli）、酵母細胞、真菌細胞、昆虫細胞および動物細胞からなる群から選ばれる。適切な動物細胞には、Verob細胞、HeLa細胞、Cos細胞、CV1細胞および種々の霊長類哺乳動物細胞が含まれるが、これらに限定されない。

【0033】

本発明は、精製されたOLD-35タンパク質、精製されたOLD-64タンパク質、精製されたOLD-137タンパク質、精製されたOLD-139タンパク質、精製されたOLD-142タンパク質、またはOLD-175タンパク質を提供する。

【0034】

本発明は、上記の単離された核酸分子によってコードされるタンパク質を提供する。

【0035】

本発明はまた、OLD-35、OLD-64、OLD-137、OLD-13

9、OLD-142、またはOLD-175タンパク質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片を提供する。一実施例において、前記抗体はモノクローナル抗体である。

【0036】

これらのタンパク質に対するポリクローナル抗体は、デコードされたアミノ酸配列から決定される選択されたペプチドを使用して、動物を免疫感作することにより製造することができる。モノクローナル抗体は、免疫感作された動物由来の抗体産生B細胞をミエローマ細胞と融合し、得られた所望の項体を産生するハイブリドーマ細胞株を選択することにより、ハイブリドーマ技術を使用して製造される。或いは、モノクローナル抗体は、当業者に知られたインビトロ技術によって製造してもよい。これらの抗体は、生きた動物、ヒト、または動物もしくはヒトから単離された生物学的組織もしくは体液において、OLDタンパク質の発現を検出するのに有用である。

【0037】

本発明は、癌細胞の増殖を阻害する方法であって、前記癌細胞を、癌細胞の増殖を阻害するのに有効な或る量の精製されたOLD-35、OLD-64タンパク質またはその一部と接触させることを含む方法を提供する。

【0038】

本発明はまた、癌細胞の癌性フェノタイプを反転させる方法であって、Old-35またはOld-64遺伝子またはその一部を含む核酸を、前記遺伝子を発現させる条件下で前記細胞の中に導入し、これにより前記細胞の癌性フェノタイプを反転させることを具備する方法を提供する。

【0039】

本発明は、患者における癌細胞の癌性フェノタイプを反転させる方法であって、Old-35またはOld-64遺伝子またはその一部を含む核酸を、前記患者の細胞内で前記遺伝子を発現させる条件下において前記患者の細胞の中に導入し、これにより前記細胞の癌性フェノタイプを反転させることを具備する方法を提供する。

【0040】

当該方法の一実施例において、核酸分子はベクターを含む。更なる実施例において、O1d-35またはO1d-64遺伝子は、その発現が調節要素の制御化にあるように、調節要素に連結される。更なる実施例において、調節要素は組織特異的調節要素である。更なる実施例において、調節要素は誘導性または構成的である。誘導性プロモータのような誘導性調節要素は、当該技術において公知である。構成的発現を指令できるプロモータのような調節要素もまた、当該技術において公知である。

【0041】

別の実施例において、前記調節要素は組織特異的な調節要素である。従って、挿入された遺伝子の発現は組織特異的である。

【0042】

核酸分子を細胞内に導入する方法は、当該技術において周知である。直接の形質転換により、裸の核酸分子を細胞内に導入してもよい。或いは、核酸分子をリポソーム通に包接してもよい。従って、本発明は、裸のDNA技術、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、エプスタインバーウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、弱毒化されたHIVウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、リポソーム、抗体被覆したりポソーム、機械的または電気的手段によって、核酸が細胞内に導入される上記方法を提供する。上記の方法は、核酸を細胞内に導入する容易な方法を例示しているに過ぎない。公知の他の方法を本発明に使用してもよい。

【0043】

本発明は、癌細胞の癌性フェノタイプを反転させる方法であって、O1d-35またはO1d-64遺伝子またはその一部を含む核酸を前記癌細胞の中に導入し、これにより前記細胞の癌性フェノタイプを反転させることを具備する方法を提供する。

【0044】

本発明は、患者における癌細胞の癌性フェノタイプを反転させる方法であって、O1d-35またはO1d-64遺伝子またはその一部を含む核酸を、前記患者の癌細胞内に導入し、これにより前記細胞の癌性フェノタイプを反転させるこ

とを具備する方法を提供する。一実施例において、前記癌細胞は、乳房細胞、子宮頸部細胞、結腸細胞、膵臓細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、脳細胞、前立腺細胞、鼻咽頭細胞、肺細胞、グリア芽細胞腫多形、リンパ腫細胞、白血病細胞、結合組織細胞、神経系細胞または基底細胞である。

【0045】

本発明は更に、癌細胞の癌性フェノタイプを反転させるのに有効な或る量のO1d-35、O1d-64遺伝子またはその一部を含む核酸分子と、薬学的に許容可能なキャリアとを含有する薬学的組成物を提供する。一実施例において、当該核酸分子はベクターを含む。更なる実施例において、該ベクターはアデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、エプスタインバーウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、弱毒化されたHIVウイルス、レトロウイルスベクター、またはワクシニアウイルスベクターである。

【0046】

本発明はまた、癌細胞の癌性フェノタイプを反転させるのに有効な或る量のOLD-35、OLD-64タンパク質と、薬学的に許容可能なキャリアとを含有する薬学的組成物を提供する。一実施例において、前記癌細胞は、乳房細胞、子宮頸部細胞、結腸細胞、膵臓細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、脳細胞、前立腺細胞、鼻咽頭細胞、肺細胞、グリア芽細胞腫多形、リンパ腫細胞、白血病細胞、結合組織細胞、神経系細胞または基底細胞である。

【0047】

上記方法の一実施例において、前記核酸はベクターを含む。該ベクターにはアデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、エプスタイン-バーウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、弱毒化HIVベクター、レトロウイルスベクターまたはワクシニアウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。

【0048】

ここで使用する「薬学的に許容可能なキャリア」の用語は、標準的な薬学的キャリアの何れをも包含するものである。この薬学的組成物は、選択された等位モードに適した如何なる形態に構成されてもよい。経口投与に適した組成物は、

丸薬、カプセル、顆粒、錠剤および粉末のような固体形態、並びに溶液、シロップ、エリキシル、および懸濁液のような液体形態が含まれる。非経腸的投与のために有用な形態には、滅菌溶液、エマルジョンおよび懸濁液が含まれる。

【0049】

前記方方位の実施において、投与は毎日、毎週、毎月、毎時間、または「山および谷(peak and trough)」であることができる。正確な頻度は、患者の年齢および症状、投与される量、患者における薬剤の半減期、投与が望まれる患者の表面積などのような種々の変数に従う。

【0050】

本発明の方法との関連において、治療的有効量は、患者の身長および体重、患者の年齢、症状の重篤度、薬剤の薬効、薬剤のデリバリー方法を考慮した投与量を含む。当業者は、正確な投与量および正確な投与回数を、このような因子に基づいて容易に決定できるであろう。

【0051】

本発明は、細胞が老化しているかどうかを決定する方法であって、O1d-35遺伝子の発現を測定することを含み、該O1d-35遺伝子の発現によって前記細胞が老化していることが示される方法を提供する。一実施例において、前記O1d-35遺伝子の発現は、O1d-35特異的なRNAの発現によって測定される。もう一つの実施例において、前記O1d-35遺伝子の発現は、OLD-35タンパク質の発現によって測定される。

【0052】

本発明はまた、細胞が最終分化しているかどうかを決定する方法であって、O1d-35遺伝子の発現を測定することを含み、前記O1d-35遺伝子の発現によって前記細胞が最終分化していることが示される方法を提供する。一実施例において、前記O1d-35遺伝子の発現は、O1d-35特異的なRNAの発現によって測定される。もう一つの実施例において、前記O1d-35遺伝子の発現は、OLD-35タンパク質の発現によって測定される。

【0053】

本発明は、細胞が成長停止状態にあるかどうかを決定する方法であって、O1

d - 35 遺伝子の発現を測定することを含み、前記 O 1 d - 35 遺伝子の発現によって前記細胞が成長停止状態にあることが示される方法を提供する。一実施例において、前記 O 1 d - 35 遺伝子の発現は、O 1 d - 35 特異的な RNA の発現によって測定される。もう一つの実施例において、前記 O 1 d - 35 遺伝子の発現は、O L D - 35 タンパク質の発現によって測定される。

【0054】

本発明は、癌細胞の増殖を阻害する方法であって、前記癌細胞を、癌細胞の増殖を阻害するのに有効な或る量の精製された O L D - 64 タンパク質と接触させることを具備した方法を提供する。

【0055】

本発明はまた、癌細胞の増殖を阻害する方法であって、前記癌細胞を、癌細胞の増殖を阻害するのに有効な精製された O L D - 64 タンパク質のある量と接触させることを具備した方法を提供する。

【0056】

本発明は、細胞が老化しているかどうかを決定する方法であって、O 1 d - 64 遺伝子の発現を測定することを含み、前記 O 1 d - 64 遺伝子の発現によって前記細胞が老化していることが示される方法を提供する。一実施例において、前記 O 1 d - 64 遺伝子の発現は、O 1 d - 64 特異的な RNA の発現によって測定される。もう一つの実施例において、前記 O 1 d - 64 遺伝子の発現は、O L D - 64 タンパク質の発現によって測定される。

【0057】

特異的な O L D ・ R N A の発現は、下記の方法によって測定される：(a) サンプルから核酸を単離し；(b) 該単離された核酸を、ハイブリッド形成を可能にする条件下で適切な O 1 d 遺伝子とハイブリダイズさせ；(c) 形成されたハイブリッドを検出する。

【0058】

本発明は、細胞増殖を阻害する薬学的組成物であって、薬学的に許容可能なキャリアと、細胞増殖を阻害するのに有効な濃度の精製された o 1 d 35 または o 1 d 64 とを含有する組成物を提供する。

【0059】

本発明は、細胞が最終分化しているかどうかを決定する方法であって、O1d-64遺伝子の発現を測定することを含み、前記O1d-64遺伝子の発現によって、前記細胞が最終分化していることが示される方法を提供する。一実施例において、前記O1d-64遺伝子の発現は、O1d-64特異的なRNAの発現によって測定される。もう一つの実施例において、前記O1d-64遺伝子の発現は、OLD-64タンパク質の発現によって測定される。

【0060】

本発明は、細胞の増殖が停止しているかどうかを決定する方法であって、O1d-64遺伝子の発現を測定することを含み、前記O1d-64遺伝子の発現によって、前記細胞の増殖が停止していることが示される方法を提供する。一実施例において、前記O1d-64遺伝子の発現は、O1d-64特異的なRNAの発現によって測定される。もう一つの実施例において、前記O1d-64遺伝子の発現は、OLD-64タンパク質の発現によって測定される。

【0061】

本発明は、組織を再生する方法であって、前記組織に対して、前記組織を再生するのに有効な濃度の、OLD-35またはOLD-64タンパク質のインヒビターに接触させることを含む方法を提供する。

【0062】

このような濃度を決定する方法は、当該技術において周知である。前記OLD-35またはOLD-64タンパク質のインヒビターの有効濃度は、異なった濃度の前記インヒビターを用い、生じた効果を試験することによって決定すればよい。

【0063】

本発明は、細胞における老化を防止する方法であって、前記細胞に対して、前記細胞における老化プロセスを反転させるのに有効な濃度の、O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現を阻害する薬剤と接触させることを含む方法を提供する。

【0064】

本発明は、細胞増殖を刺激するための薬学的組成物であって、薬学的に許容可能なキャリアと、細胞増殖を刺激するのに有効な濃度の精製されたO1d-35またはO1d-64抑制剤とを含有する組成物を提供する。精製された抑制剤は、O1d-35またはO1d-64の活性を抑制できる化合物である。例えば、該抑制剤は遺伝子レベルで作用して、O1d-35またはO1d-64がスイッチオンしないようにすることができる。或いは、抑制剤は、O1d-35またはO1d-64タンパク質の活性部位に結合して、該タンパク質が機能しないように、または該タンパク質の活性が減少するようにする低分子化合物であってもよい。O1d-35またはO1d-64に結合できる特異的な抗体またはその結合性断片葉、抑制剤であり得る。

【0065】

本発明は、サンプルにおけるインターフェロン または の存在をスクリーニングするための方法であって：(a)前記サンプルを、インターフェロン または の存在下に、O1d-35またはO1d-64遺伝子を発現させる条件下で前記細胞に接触させる工程と；(b)O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現を決定する工程とを具備し、発現の増大によってインターフェロン または の存在が示される方法を提供する。

【0066】

本発明は、患者由来の腫瘍の増殖段階を診断する方法であって：(a)患者から適切なサンプルを取得する工程と；(b)O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現を検出する工程とを具備し、O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現によって前記腫瘍が増殖段階にないことが示される方法を提供する。

【0067】

本発明はまた、腫瘍の増殖段階を診断するためのキットであって、O1d-35またはO1d-64遺伝子の核酸分子に特異的にハイブリダイズできる核酸分子を含むキットを提供する。

【0068】

本発明はまた、腫瘍の増殖段階を診断するためのキットであって、OLD-35またはOLD-64タンパク質を特異的に認識できる抗体を含むキットを提供

する。

【0069】

本発明はまた、O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現を調節する薬剤を同定するための方法であって：(a)候補薬剤と、レポーター遺伝子を形質転換またはトランスフェクトされた細胞とを、O1d-35またはO1d-64プロモータまたはその調節要素の制御下において、前記候補薬剤が直接または間節に前記プロモータまたはその調節要素の発現を変化させることを可能にする条件下で、これを可能にするのに十分な時間だけ接触させる工程と；(b)前記細胞によって産生されるレポータタンパク質のレベルに対する前記候補薬剤の効果を測定することにより、O1d-35またはO1d-64遺伝子の発現を調節する薬剤を同定する工程とを具備した方法を提供する。

【0070】

本発明は、増殖または癌性フェノタイプを誘導する化合物を同定する方法であって、O1d-35またはO1d-64のプロモータを含む細胞を前記化合物に露出させることと、O1d-35または64プロモータを抑制する化合物を同定することとを含む方法を提供する。

【0071】

本発明は、老化または最終分化を誘導する化合物を同定する方法であって、O1d-35またはO1d-64のプロモータを含む細胞を前記化合物に露出させることと、O1d-35または64プロモータを活性化させる化合物を同定することとを含む方法を提供する。

【0072】

本発明は、老化および最終分化の経路に共通した遺伝子を同定する方法であって：(a)最終分化において発現する遺伝子が富化された差し引きライブラリーを取得する工程と；(b)老化プローブを用いて前記ライブラリーをスクリーニングして、老化および最終分化の際に発現される新規遺伝子を同定する工程と；(c)前記同定された遺伝子の生物学的活性を試験して、それが老化および最終分化の際に発現されるかどうかを決定する工程とを具備する方法を提供する。

【0073】

本発明は、老化および最終分化の経路に共通した遺伝子を同定する方法であつて：(a)老化において発現する遺伝子が富化された差し引きライブラリーを取得する工程と；(b)最終分化プローブを用いて前記ライブラリーをスクリーニングして、老化および最終分化の際に発現される新規遺伝子を同定する工程と；(c)前記同定された遺伝子の生物学的活性を試験して、それが老化および最終分化の際に発現されるかどうかを決定する工程とを具備する方法を提供する。

【0074】

本発明はまた、上記方法によって同定された遺伝子を提供する。

【0075】

本発明は、細胞における特異的なRNAを分解する方法であつて、O1d-35遺伝子の発現を誘導することを含む方法を提供する。本発明は更に、細胞における特異的なRNAを分解する方法であつて、O1d-35遺伝子を含むベクターを前記細胞の中に導入することを含む方法を提供する。

【0076】

本発明の一実施例において、O1d-35の発現は、細胞の老化、最終分化および/または増殖抑制の診断指標として使用することができる。即ち、O1d-35は、細胞が増殖能力を喪失して老化したかどうかを決定するために使用することができる。

【0077】

加えて、O1d-35の発現は、老化を誘導して、例えば癌細胞の増殖または異常な増殖状態(例えば乾癬、血管芽細胞腫など)を阻害する薬物または低分子化合物を同定するためのマーカーとして使用することができる。

【0078】

更に、O1d-35の発現は、老化を阻害して、組織の再増殖、修復および/または再生を刺激する薬物または低分子化合物を同定するために使用することができる。

【0079】

更にまた、O1d-35の発現は、細胞の最終分化を誘導して、例えば癌細胞の増殖または異常な増殖状態(例えば乾癬、血管芽細胞腫など)を阻害する薬物

または低分子化合物を同定するためのマーカーとして使用することができる。

【0080】

O1d-35の発現は、細胞の最終分化を阻害して組織の再増殖、修復および/または再生を刺激する薬物または低分子を同定するためにも使用することができる。

【0081】

更に、O1d-35の発現は、生物学的サンプル中のサイトカイン類、特にI型インターフェロンを検出するためのマーカーとして使用することができる。白血球および繊維芽細胞インターフェロンを含むI型インターフェロンは、十分に特徴づけられたJakおよびStatキナーゼ経路を介して遺伝子発現を活性化させるので、この遺伝子(O1d35)は、これらの重要な経路を活性化させる薬物および低分子化合物を検出またはモニターするために使用することができる。

【0082】

O1d-35と他の相互作用タンパク質との組合せは、特定の標的細胞の分化をターゲティングして、末端細胞へと最終分化するように多能性幹細胞の再プログラミングを生じさせるために使用できる。

【0083】

加えて、O1d-35は、AUリッチな3'UTRs(未翻訳領域)を含む可能性のある特定のmRNAを選択的に安定化させるために使用することができる。この効果は、細胞増殖を増強または阻害する遺伝子の持続的な発現を生じることができる。また、それは増大した生物学的および免疫学的活性を生じるサイトカイン遺伝子の安定化をもたらすことができるであろう。

【0084】

O1d-35は、ランダムなNTPsを核酸に重合させ、および/または特定のmRNAの分解を誘導する方法論の一部として使用することができる。

【0085】

本発明は、以下の実験の詳細から更によく理解されるであろう。しかし、当業者は、ここで述べられている特定の方方位および結果は、特許請求の範囲により

完全に記述された発明の単なる例示に過ぎないことを容易に承認するであろう。

【0086】

【実験の詳細】

ライブラリーのスクリーニング：

最終分化の際に修飾された遺伝子に富む、ヒトメラノーマ細胞のサブトラクト cDNAライブラリー (Jiang and Fisher, 1993) を、200Pfu/プレートでプレートに撒いた。コロニーをナイロンフィルターに転写して、2分間変性させ(1.5M NaCl, 0.5M NaOH)、5分間中和し(1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl, pH8.0)、30秒間洗浄した(0.2M Tris-HCl, pH7.5, 2×SSC)。フィルターをStrate linker(Stratagene)により30秒間架橋して、65 °Cにおいて2時間、ExpressHyb(CloneTech)でプレハイブリダイズした。プローブを95 °Cで5分間変性し、0 °Cで5分間冷却し、その後 3×10^6 cpm/mlでフィルターに接触させた。前記フィルターを、65 °Cで一晩ハイブリダイズさせた。次の日、前記フィルターを(2×SSC、0.1%SDS)3回洗浄し、オートラジオグラフィーに暴露した。

【0087】

早老症cDNAプローブの調製：

10 μ lのAG0989B細胞(Progeria)(p22)(Corriell Repository, Camden)由来の全RNAを、10mM dCTPの代わりに900 μ Ciの[γ - 32 P]-dCTP(3000 Ci/mmol)(Amersham)および0.4mMの非放射活性dCTPを使用した以外は、Superscript II(製造者のプロトコール, GibcoBRL)を使用して逆転写した。Quick Spin Columns(Boehringer Mannheim)を使用して、前記プローブを精製した。

【0088】

ファージの単離：

オートラジオグラフィーにおいて暴露したフィルムを、ファージを含むプレートと並べて、およびハイブリダイズしているクローンを単離してSMバッファー(1ml)に再び懸濁した。

【0089】

PCR：

製造者のプロトコール(GibcoBRL)を使用して、それぞれのファージストック

につき3 μ lのSMストックを用いてPCRを行った。インサートの両端にはT3およびT7プライマーがあるので、ファージ(Staratagene)からインサートを選択的に増幅するためにこれらのプライマーを使用した。PCRの条件は、94 $^{\circ}$ で1分、55 $^{\circ}$ で1分、72 $^{\circ}$ で2分を30サイクル行い、かつ72 $^{\circ}$ で10分間によって完全に伸長させた。前記PCR産物を1%アガロースゲルで分離して、産物のサイズを測定した。全てのクローンをシーケンスして、ノーザンブロットング解析により新規cDNAを選択した。

【0090】

ノーザンブロットング:

Chomczynski and Sacchi(1987)に記載されたようにして、グアニジンイソチオシアネート法を使用した後、フェノール/クロロホルム/イソアミル抽出、およびイソプロパノール沈殿を行い、全RNAを抽出した。前記プローブは、ランダムプライミング(Amersham)によって、[γ -³²P]dCTPでラベルした。10 μ lの全RNAを、1%アガロース/2.2Mホルムアルデヒドゲルで電気泳動して、Hybond-NXフィルター(Amersham)に転写した。ハイブリダイゼーションは、ExpressHyb溶液(製造者のプロトコール、CloneTech)で行った。簡単には、フィルターを67 $^{\circ}$ で0.5時間プレハイブリダイズして、変性したプローブと1.5時間ハイブリダイズさせ、24 $^{\circ}$ 、5分間 \times 1、および55 $^{\circ}$ 、20分間 \times 2で洗浄(.2 \times SSC、.1%SDS)した。

【0091】

細胞および培養条件:

H0-1ヒトメラノーマ細胞は、5%ウシ胎児血清を補ったダルベッコ修正イーグル培地(DMEM)中で、5%CO₂/95%空気の加湿インキュベータ内において37 $^{\circ}$ で培養した。老化研究に使用した細胞株は、Corriell Respository(Camden, NJ)から得た。繊維芽細胞株および正常胎児繊維芽細胞(GM01379A)は、15%ウシ胎児血清(Gibco BRL)並びに2 \times 必須および非必須アミノ酸(Sigma)を補ったDMEMで培養した。IDH4細胞(Wright et al., 1989)は、10%ウシ胎児血清または活性炭処理された10%ウシ胎児血清を補充したDMEMで培養した。H0-1細胞をIFN-(2000U/ml)およびMEZ(10ng/ml)で処理して、最終分化を誘導した(Fisher et al., 1985)。RNAおよびタンパク質合成を阻害するためには、以前に報告さ

れたように (Jiang et al., 1993b)、HO-1細胞をアクチノマイシンD (5 µg/ml) およびサイクロヘキシミド (50 µg/ml) でそれぞれ処理した。

【0092】

老化関連B-GAL活性の染色：

細胞をPBSで2×洗浄し、3%ホルムアルデヒドで固定し、次いで以前に記載したようにして染色した(Dimri et al., 1995)。簡単に言えば、固定した後、細胞を反応バッファー (X-gal (1mg/ml)、40mM クエン酸/リン酸ナトリウム (pH6.0)、フェロシアン化/フェリシアン化カリウム (5mM)、NaCl (150mM)、および2mM MgCl₂を含む) 中において、37 °C でインキュベートした。デキサメタゾン (10⁻⁶ M) 存在下で培養したIDH4細胞をネガティブコントロールとして使用した。

【0093】

<実験結果>

cDNAライブラリーの予備スクリーニングにより、10の新規cDNAおよび20の既知cDNAが同定される結果となり、OId cDNAと呼ぶこととした(表1)。この予備スクリーニングは、一定期間の間隔をあけてサブトラクトされて、分化インデューサ処理されたHO-1 cDNA (DISH) のライブラリー(このライブラリーは、メラノーマ細胞の最終分化の際に調節される遺伝子に富んでいる)を、老化した繊維芽細胞由来のRNAに対してスクリーニングするものである。ノーザンおよび逆ノーザンプロットングを使用して、OId cDNAの発現パターンを測定した。我々のスクリーニングの目的は、老化および最終分化に共通して発現される遺伝子を同定し、かつクローン化することであった。この目的を達成するために、HO-1(未処理、またはIFN-γ、2000U/ml、またはIFN-γ (2000U/ml)+MEZ (10ng/ml))、培養若年繊維芽細胞(GM01379)および2種の培養老化細胞(AG01976, AG0989B)由来のRNAを単離して、特異的に発現するOId遺伝子を決定した(図1)。スクリーニングを行ったサブトラクトライブラリーは、IFN-γ およびIFN-γ +MEZによって調節されるHO-1遺伝子に富んでいるはずなので、活発に分化している未処理HO-1細胞では、多くのOId cDNAの発現レベルは減少しているか、または発現していないことが予想された。しかし、このライブラリーは、サブトラクトしてない老化プローブ(老化特異的な、ハウスキーピングおよびその他の遺伝子を含む

)でスクリーニングを行ったので、老化していない繊維芽細胞においても、そのcDNAのいくつかが発現されるはずである。

【0094】

六種の新規cDNAのうち、四種のO1d - 137、O1d - 139、O1d - 142、およびO1d - 175は、増殖中および老化繊維芽細胞のどちらにも発現していた。新規O1d遺伝子であるO1d - 35およびO1d - 69の二種の発現は、老化繊維芽細胞およびIFN- γ およびIFN- γ +MEZ処理したH0-1細胞に限定されていた。暴露時間を変化させると、老化繊維芽細胞におけるO1d - 35の発現レベルは、IFN- γ およびIFN- γ +MEZ処理したH0-1細胞よりも高くなることが示された(図1)。インターフェロンに対するO1d - 35の応答を調べるために、経時変化および濃度応答実験をH0-1細胞で行い、IFN- γ によって誘導されるO1d - 35の時間的動態、およびO1d - 35の発現を誘導することができるIFN- γ の濃度をそれぞれ測定した。さらに、IFN- γ 、IFN- β 、およびTNF- α が、H0-1細胞におけるO1d - 35の発現に及ぼす効果を調べた。O1d - 35は、IFN- γ (2000U/ml) およびIFN- γ +MEZ (2000U/ml+10ng/ml) により、処置から3時間以内にアップレギュレートされた(図2AおよびD)。IFN- γ は、200U/mlでH0-1細胞の増殖抑制を誘導するので、O1d - 35のアップレギュレーションが増殖を抑制せずに起こるかどうかを決定することが重要であると考えた。H0-1細胞において、O1d - 35は、1U/mlのIFN- γ (これは、増殖を阻害しないIFN濃度である)と同じくらい少量で発現を誘導したことから、IFNは増殖を抑制せずにこの遺伝子の発現に直接効果を及ぼしていることを示差される(図2B)。H0-1細胞をIFN- γ で処置すると、H0-1細胞のO1d - 35を有意にアップレギュレートする結果となるのに対して、この発現はIFN- γ によってもわずかに刺激され、またTNF- α では検出可能または持続的な誘導が観測されなかった(図2C)。これらの実験は、O1d - 35の発現が異なったサイトカインによって差動的に調節されることを示しており、タイプIインターフェロン(IFN- α /IFN- β)は、H0-1細胞においてO1d - 35の発現誘導をテストしたサイトカインのうち最も活性が強かった。様々なヒト組織におけるO1d - 35の発現、およびマウス発生時の組織特異的なO1d - 35の発現パターンを測定するために、我々は、この遺伝子の発現をHuman Multiple Tissue Northern(MTN)BLots(Clontech)を使用して調査し

た(図3A)。O1d - 35は、テストした全ての組織において発現していた。テストした組織には、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、および膵臓が含まれる。心臓および脳において、最も高レベルでO1d - 35の発現が検出された。脳と心臓は、非再生部の多くの部分である最終分化した細胞を含むので、これらの標的器官において最終段階の分化を維持するためには、O1d - 35が重要である可能性がある。特定組織の細胞タイプにおける最終分化は、正常な胚発生時に生じるので、マウス発生時におけるO1d - 35の発現パターンを測定した。発生の初期段階(8日)において、O1d - 35の発現が最も高いレベルであることが明らかとなり、それは時間とともに着実に減少した(10-16日)(図3B)。この希釈効果は、全身に対する発現領域の割合が(発生)経時的に減少するためであり、mRNAの発現が、(胚発生時の)特定の器官に局在している場合によく観察される。ヒトcDNAを用いてマウス発生時のノーザンブロットを調査したところ、生じたシグナルが非常に強かったので、ヒトとマウスO1d - 35転写物の類似性は非常に高いに違いない。ESTデータベース検索によって、マウスとヒトcDNA間が非常に類似していることが示された~90%(図4)。IDH4細胞において成長抑止および老化の際にO1d - 35を発現させるために、IMR - 90(正常ヒト繊維芽細胞)にデキサメタゾン(DEX)で誘導可能なマウス乳腺癌ウイルス由来シミアンウイルス40 T抗原を導入することによってIDH-4細胞を作製した(Wright et al., 1989)。このモデル系において、増殖の延長、および老化マーカーが存在しないことは、DEXが連続して存在すること(従ってSV40T抗原)に依存している。DEXフリーの培地では、DNA合成は最初の3日以内に~80%が減退し、7日で最小レベルに達する。この減退は、テロメラーゼ活性の減少およびT抗原の発現に対応している(Holt et al., 1996)。T抗原は半減期が長く(~3日)、かつDEXを除去した後、約5~7日間は細胞内に残ったままであるので、7日間でのO1d - 35のアップレギュレーションをT抗原の除去を対応させることが可能である(図5)。IDH - 4細胞において、T抗原の発現とO1d - 35の発現の関係を明確にするために、さらなる実験が進行中である。O1d - 35およびp21は静止細胞において協調的に発現しており、最終分化および老化に関する多くの遺伝子は、主に細胞周期のG1期において活性があるので、我々は、O1d - 35が細胞周期のこの時期に発現しているかどうか測定した。

この目的を達成するために、ヒト二倍体繊維芽細胞をコンフルエントに増殖させた（これらの細胞を抑止して、同調させるための通常の方法である）（Tseng et al., 1983）。細胞をコンフルエントな状態から解放すると、少し遅れた後、細胞は再びG1期に入り、次に細胞はS、G2、Mに移行して、G1期に戻る。これらの細胞において、コンフルエントな期間およびG1期にO1d - 35の発現が高かった（図6）。さらに、G1に入った細胞が多いほど、O1d - 35の発現が増加した。15時間後、O1d - 35の発現は有意に減少したが、細胞がコンフルエントになったとき（20時間）に再び発現が増加した。p21（G1特異的なサイクリン依存性キナーゼインヒビター）の発現は、O1d - 35の発現と同時に起こった（図6）。

【0095】

IFN - 処理した細胞におけるO1d - 35の安定性：

特定のリンホカイン、サイトカインおよび源癌遺伝子の3' UTRは、AREエレメントを含む。これはmRNAの安定性に関与している（図7）。O1d - 35の3' UTRにこのようなAREエレメントが4種存在することは、様々な処理および増殖条件下において、この遺伝子が差動的に発現することがmRNAの安定性に貢献しているであろうことを示差する。最近、AREエレメントを含むmRNAの不安定化に関与するタンパク質であるHuRが精製され、Elav-line遺伝子ファミリーの一因として同定された（maer et al., 1997）。H0-1細胞において、HuRがO1d - 35の安定性を調節することができるならば、サイクロヘキシミドで細胞を処理すると、HuRタンパク質が減少するか、またはなくなることによって、O1d - 35 mRNAの安定化が生じるはずである。H0-1細胞にサイクロヘキシミドを処理すると、O1d - 35 mRNAレベルが増加することから、その分解に応答可能な因子が阻害されているかもしれないことを示している。サイクロヘキシミドの研究からも、O1d - 35の発現を誘導することによって、新規タンパク質を合成せずに生じることができることを示す（図8A、レーン3、4、および5）。しかし、H0-1細胞におけるO1d - 35 RNAの産生は、処置後3時間以内に生じ、かつサイクロヘキシミドは処置の期間中そのまま存在しているため、O1d - 35の転写に変化がおこる前に、存在しているタンパク質に修飾が起こる可能性がある。細胞内のmRNAレベルの制御は、主に転写、およびmRNAの安定性の二点で調節されている。H0-1細胞において、IFN - +MEZまたはIFN

- がO1d - 35 mRNAの安定性に影響を及ぼすかどうかを測定するために、O1d - 35 mRNAの半減期を以前に記載されたように測定した (Jiang et al., 1993b) (図8b)。未処理、IFN - γ +MEZ、またはIFN - γ 処理したHO-1細胞を、RNAポリメラーゼIIインヒビターであるアクチノマイシンD (ActD) とインキュベートして、すでに存在しているmRNAの安定性をノーザンブロットングによって測定した。IFN - γ +MEZ、またはIFN - γ 処理したHO-1細胞におけるO1d - 35 mRNAの半減期は、~6-8時間であることが明らかとされたことから、このmRNAの安定化は、処理された細胞におけるO1d - 35レベルの増加に貢献しているであろう (図8bおよびデータ未提示) ことが示差される。しかし、未処理のHO-1細胞におけるO1d - 35の発現レベルは低かったため、これらの細胞におけるこのメッセージの半減期を正確に測定することは不可能であった。実際に増殖中の未処理HO-1細胞において観測された低レベルのO1d - 35 mRNAは、転写活性の欠損またはmRNA安定性の結果に生じたものかどうかは、未だ決定されていないままである。RNA転写速度を測定するための核ラン - オンアッセイは、プロモーターがIFN - γ 処理していないHO-1細胞において活性を持つどうか、およびIFN - γ +MEZまたはIFN - γ 処理した後にO1d - 35 mRNAを上昇させる転写活性化に寄与する可能性があるかを明らかにするはずである。

【0096】

O1d - 35のクローニングおよび配列解析：

ライブラリースクリーニングプロトコールに記載したように、分化誘導剤を処理したHO-1のサブトラクト (DISH) cDNAライブラリーから、O1d - 35の最初の600 bpを同定してクローニングした。サブトラクションハイブリダイゼーションした結果として得られたこのcDNAを、pBlueScriptベクターに逆向きの3' -5' (EcoRI-XhoI) にクローン化した。サブトラクション処理の際に、EcoRIおよびXhoIで二重消化することによってベクターからcDNAを切除した。多くのcDNAの内部にもEcoRI - XhoI部位が含まれているので、多くのcDNAは内部で切断され、およびサブトラクション処理の後、それらは不正確な向きで再びライゲーションされるであろう。従って、O1d - 35の600bp断片は、O1d - 35 cDNAの内部領域、および3' と5' のフランキング配列に欠失を含んでいた。O1d - 35の5' 領域は、最近開発

されたcDNA伸長方法である完全オープンリーディングフレームクローニング (C-ORF) を使用して、IFN- γ 処理したHO-1細胞からクローン化した。この方法により、一回の反応において、~2kBの断片が得られる (Kang and Fisher, 未公開)。O1d-35の3'領域は、3' RACE法を使用してクローン化した。この方法は、3' 遺伝子特異的ネスティッドプライマーおよびdTを使用し、~400bpの産物が得られる。O1d-35の最終的な配列を図9に示す。5'部分は未だに欠失しているかもしれないが、C-ORFおよび3' RACEを使用して得られたO1d-35 cDNAは、ノーザンブロットングのデータから判断して、ほぼ全長のクローンを示している (図1)。O1d-35は、~2.4-2.7kBのRNA種とハイブリダイズする。配列解析により、O1d-35 cDNA (から2.6kB) は、滅多に見られないポリアデニル化部位 (AUUAAA) を含むことが示された (cDNAの~10%のみで検出される) (Manley et al., 1988)。推定タンパク質配列は、大腸菌PNPase (ポリリボヌクレオチドホスホリラーゼ) 遺伝子の30%の配列と類似して、かつ50%が配列類似性を示すことを除き、いずれの既知遺伝子とも類似性を示していない (図10)。

【0097】

<実験の考察>

多細胞生物において恒常性が維持されるためには、細胞増殖が制御されることが主要となる。この機能的過程の調節には、細胞の損失と細胞の再生のバランスを維持することが特に重要であり、発生、分化、および老化において重要な因子である。さらに、細胞分裂の異常は多くの疾患症状の特徴である。この症状には、発生、および先天性異常、早老症および癌などの異常増殖症状が含まれる。いくつかの遺伝子 (腫瘍抑制因子p53およびサイクリン依存性キナーゼ (cdk) インヒビターp21を含む) は細胞増殖コントロールに関与し、以下のような成長抑制性条件下で発現の上昇を示す: たとえば静止状態 (Niculescu et al., 1998, Lacombe et al., 1996, Linke et al., 1996)、老化 (Irving et al., 1992; Gire and Wynford-Thomas, 1998)、および末端細胞分化 (Jiang et al., 1994b, 1995b; Steinman et al., 1994) である。最終分化および老化は、増殖停止によって特徴づけられるので、類似および重複遺伝子、並びに遺伝子発現の変化が、これらの過程を媒介している可能性がある。この仮説をテストするために、我々は

、分化誘導剤を処理したヒトH0-1メラノーマのライブラリー（老化ヒト繊維芽細胞由来のmRNAでサブトラクトされている）をスクリーニングした。この方法は、既知および新規両方の配列からなる多くのcDNA（表1）を単離する結果となり、老化ヒト繊維芽細胞において発現の上昇を示した。不可逆的な増殖抑止および最終分化を誘導するIFN- γ +MEZ（Huang et al., 1999）を処理したH0-1細胞から単離したmRNAでスクリーニングした後、同じcDNAのうちのいくつかは、同じサブトラクトH0-1ライブラリーから独立して同定された。この観測は我々の仮説を確証させ、かつこの新規方法が協調的発現を示す（最終分化および細胞の老化の際に増殖抑止の誘導に機能する）遺伝子の同定およびクローニングに有効なことが証明されることを示差する。このようなcDNAの一つが新規遺伝子O1d-35である。

【0098】

IFN- γ +MEZによってヒトメラノーマ細胞に最終分化を頻繁に誘導すると、IFN- γ にさらした後に発現の上昇を示す遺伝子も増加され、かつアップレギュレーションされる。これらは、タイプIメラノーマ分化関連（mda）遺伝子（Jiang and Fidher, 1993）といわれる。IFN- γ およびIFN- γ +MEZ処理したH0-1細胞でその発現が上昇するので、O1d-35はこのような遺伝子の代表である。また、ヒト繊維芽細胞では、増殖抑止および老化の際にもO1d-35がアップレギュレートされることから、その発現は分化のプログラム、またはヒトメラノーマ細胞のみに限定されてはいないことを示す。IFN- γ は、正常および癌細胞の両方に対して、抗増殖特性を持つことが十分に証明されているので（Fisher and Grant, 1985）、O1d-35がIFNシグナル経路（結果として増殖を抑止する）の下流の遺伝子として機能している可能性がある。O1d-35の発現は、細胞老化および増殖静止に関与していることが多くの実験により示されている。ヒトの若年および老化繊維芽細胞のノーザンプロット解析により、O1d-35の発現は老化細胞に限定されることが示されている。DEXで誘導可能なSV40 T抗原によって条件付きで不死化されたIDH4細胞は、老化研究において優れたインビトロモデルを提供する（Wright et al., 1989）。増殖培地中にDEXが存在すると、IDH細胞を活発に増殖することが可能となり、一方それが存在しないと老化を引き起こす。これらの細胞にお

いて、OId - 35の発現は、DEXのない培地中で7日間増殖した後にのみ検出された。この発現は、SA- (IDH4細胞の - GAL染色 (十分に証明された老化マーカである)) (Dimri et al., 1995))とも一致した。コンフルエントに増殖して、かつ維持されることによって繊維芽細胞がG₀期に停止されたときにも、OId - 35の発現が増加する。これらの関連して、OId - 35は、細胞老化、最終分化、および増殖抑制の診断用マーカーとして有用であることが証明できる。OId - 35の高レベルな発現が脳および心臓においても見られる。この組織は、活性な修復特性を持っていない唯一のヒト組織である。発生の際、OId - 35の発現の局在から判断して、この遺伝子は、心臓および脳の発達に (これらの器官の細胞の最終分化の維持を援助することによって) 貢献しているであろう。細菌のポリリボヌクレオチドホスホリラーゼ (PNPase) とOId - 35の高い配列類似性により、OId - 35タンパク質はPNPase酵素活性を示す可能性がある。PNPaseは、大腸菌RNA デグレードソーム (degradesome) の重要な成分の一つである (Blum et al., 1997)。これは、PNPaseおよびエンドリボヌクレアーゼRNase Eの両者からなる。この複合体の機能は、mRNA分解の速度を調節することである。PNPaseは二種の酵素活性を持つ。3' -5' プロセッシブエキソリボヌクレアーゼ活性、および5' -3' RNAポリメラーゼ活性である (Blun et al., 1997)。最近、PNPaseが、配列特異的な方法により特定の二本鎖DNA配列と結合する活性を有することも示された (Zhang et al., 1998)。OId - 35は増殖抑制を受けた細胞において差動的に発現しているので、この遺伝子が増殖抑制された細胞のRNA分解において、役割を果たしている可能性がある。さらに、AUUAエレメントを含む遺伝子は、遺伝子発現の調節に広く関与していることが示されているので、配列特異的なターゲットが結合することによって、OId - 35が増殖関連遺伝子の発現を制御している可能性がある。これに関連して、OId - 35は腫瘍抑制特性を示すかもしれないし、かつ癌の遺伝子治療に有用かもしれない。

【0099】

【表1 - 1】

表1

クローン名	クローンアイデンティティ
Old-1	ビメチン
Old-2	ヒト リボソームタンパク質 S3a, v-fos
Old-5	mRNA M期リンタンパク質
Old-7	RIG-G, Cig 49
Old-11	MHC クラス I リンパ球抗原
Old-14	ヒト 非-筋肉ミオシンアルカリ性ライト鎖
Old-18	ヒト ADP-リポシル化因子4
Old-19	ヒト ミトコンドリアシトクロム酸化
Old-24	56kDA IFN 誘導可能
Old-30	リボソームタンパク質 L5
Old-32*	新規*
Old-34	IFN-誘導可能タンパク質
Old-35*	新規*
Old-38	H.s.スモール酸性タンパク質
Old-39	ヒト 酸性リボソームホスファターゼ
Old-42	神経繊維腫症タイプ1
Old-59	ヒト 核内受容体 hTAK1
Old-60	ミトコンドリアDNA
Old-61	転写因子 I (99%)
Old-64 *	新規*
Old-65	CDC16HS 細胞 81, 261-68
Old-74	ヒト ISG 54K 遺伝子(IFN-gamma)-cig42
Old-79	ヒト T複合体ポリペプチド I 遺伝子

【0100】

【表1-2】

表1(つづき)

Old-80	ビタミンD誘導
Old-83*	新規*
Old-87*	新規*, Old-83 との類似の可能性あり
Old-107*	新規* -ウシG-タンパク質のヒトホモログ
Old-113	DNA結合タンパク質
Old-115	U1スモール核内RNP
Old-119	ヒト HS1タンパク質
Old-121*	新規*
Old-137*	新規*
Old-139*	新規*
Old-140	ヒト 推定上トランス CA150
Old-142*	新規*
Old-144	MLN70 カルシウム-結合
Old-165	T細胞サイクロフィリン
Old-170	ラット亜鉛トランスポーターのヒト類似体
Old-175(5-3)*	新規*

【0101】

【参照文献】

Blum E., Py B., Carpousis A.J., and Higgins C.F. (1997). Polyphosphate kinase is a component of the Escherichia coli RNA degradosome. Mol. Microbiol., 26: 387-398.

Campisi, J., (1996). Replicative Senescence An Old Lives Tale Cell. Cell 84(4):497-500.

Caput D., Beutler B., Hartog K., Thayer R., Brown-Shimer S., and Cerami A. (1986). Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. Proc Natl Acad Sci U S A, 83: 1670-1674.

Chen C.Y., and Shyu A.B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. Trends Biochem Sci., 20: 465-470. Chomczynski P., and Sacchi N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. Anal. Biochem., 162: 156-159.

Darnell J.E. Jr., Kerr I.M., and Stark G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science, 264: 1415-1421.

Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., and Campisi, J. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 9363-9367.

Fisher P.B., and Grant S. (1985). Effects of interferon on differentiation in normal and tumor cells. Pharmacology and Therapeutics, 27: 143-166. Fisher P.B., Prignoli D.R., Herms H. Jr., Weinstein I.B., and Pestka S. (1985). Effects of

combined treatment with interferon and mezerein on melanogenesis and growth in human melanoma cells. J. Interferon Res., 5: 11-22.

Gire V., and Wynford-Thomas D. (1998). Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. Mol. Cell. Biol., 18: 1611-1621.

Goeddel D.V., Leung D.W., Dull T.J., Gross M., Lawn R.M., McCandliss R., Seeburg P.H.,

Goldstein, S., (1990) Replicative Senescence The Human Fibroblast Comes Of Age. Science 249:1129-1133.

Gutterman J.U. (1994). Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 1198-1205.

Hayflick L., and Moorehead P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res., 25: 585-621.

Holt S.E., Wright W.E., and Shay J.W. (1996). Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. Mol. Cell. Biol., 16: 2932-2939.

Huang F., Adelman J., Jiang H., Goldstein N.I., and Fisher P.B. (1999). Identification and temporal expression pattern of genes modulated during irreversible growth arrest and terminal differentiation in human melanoma cells. Oncogene, in press.

Irving J., Feng J., Wistrom C., Pikaart M., and Villeponteau B. (1992). An altered repertoire of fos/jun (AP-1) at the onset of replicative senescence. Exp Cell Res., 202: 161-166.

- Jiang H., and Fisher P.B. (1993). Use of a sensitive and efficient subtraction hybridization protocol for the identification of genes differentially regulated during the induction of differentiation in human melanoma cells. Mol. Cell. Different., 1: 285-299.
- Jiang H., Lin J., and Fisher, P. B. (1994a). A molecular definition of terminal cell differentiation in human melanoma cells. Mol. Cell. Different., 2: 221-239.
- Jiang H., Lin J., Su Z.-z., Collart F.R., Huberman E., and Fisher P.B. (1994b). Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. Oncogene, 9: 3397-3406.
- Jiang H., Lin J.J., Su Z.-z., Goldstein N.I., and Fisher P.B. (1995a). Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. Oncogene, 11: 2477-2486.
- Jiang H., Lin J., Su Z.-z., Kerbel R.S., Herlyn M., Weissman R.B., Welch D., and Fisher P.B. (1995b). The melanoma differentiation associated gene mda-6, which encodes the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, is differentially expressed during growth, differentiation and progression in human melanoma cells. Oncogene, 10: 1855-1864.
- Jiang H., Su Z.-z., Boyd J., and Fisher P.B. (1993a). Gene expression changes associated with reversible growth suppression and the induction of terminal differentiation in human melanoma cells. Mol. Cell. Different., 1: 41-66.
- Jiang H., Waxman S., and Fisher P.B. (1993b). Regulation of c-fos, c-jun and jun-B gene expression in human melanoma cells induced to terminally differentiate. Mol. Cell. Different., 1: 197-214.

Kashima N., Nishi-Takaoka C., Fujita T., Taki S., Yamada G., Hamuro J., and Taniguchi T. (1985). Unique structure of murine interleukin-2 as deduced from cloned cDNAs. Nature, 313: 402-404.

Lacombe L., Orlov I., Silver D., Gerald W.L., Fair W.R., Reuter V.E., and Cordon-Cardo C. (1996). Analysis of p21WAF1/CIP1 in primary bladder tumors. Oncol. Res., 8: 409-414.

Lee, W.M. (1988) Linc, Currant Activation Of The Transforming Potential Of The Human Fos Proto-Oncogene Requires Message Stabilization And Results In Increased Amounts Of Partially Modified Fos Protein. Mol. Cell. Biol. 8(12)5521-5527.

Lin J.J., Jiang H., and Fisher P.B. (1996). Characterization of a novel melanoma differentiation associated gene, mda-9, that is down-regulated during terminal cell differentiation. Mol. Cell. Different., 4 (4): 317-333.

Lin J.J., Jiang H. and Fisher P.B. (1998). Melanoma differentiation associated gene-9 is a human gamma interferon responsive gene. Gene, 207: 105-110.

Linke S.P., Clarkin K.C., Di Leonardo A., Tsou A., and Wahl G.M. (1996). A reversible, p53-dependent G₀/G₁ cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. Genes & Devel., 10(8): 934-947.

Murano S., Thweatt R., et al., (1991) Diverse Gene Sequences Are Overexpres. In Werner Syndrome Fibroblasts Undergoing Premature Replicative Senescence Mol. Cell. Biol. 11(8):39005-39014.

Myer V.E., Fan X.C., and Steitz J.A. (1997). Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay.

EMBO J., 16: 2130-2139.

Medrano E.E., Yang F., Boissy R., Farooqui J., Shah V., Matsumoto K., Nordlund J.J., and Park H.Y. (1994). Terminal differentiation and senescence in the human melanocyte: repression of tyrosine-phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase 2 selectively defines the two phenotypes. Mol. Biol. Cell., 5: 497-509.

Nedwin G.E., Naylor S.L., Sakaguchi A.Y., Smith D., Jarrett-Nedwin J., Pennica D., Goeddel D.V., and Gray P.W. (1985). Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. Nucleic Acids Res., 13:6361-6373.

Niculescu A.B., Chen X., Smeets M., Hengst L., Prives C., and Reed S.I. (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G₁/S and the G₂/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. Mol. Cell. Biol., 18: 629-643.

Sambrook, J., et al. (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

Shaw G., and Kamen R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. Cell, 46: 659-667.

Smith J.R., and Pereira-Smith O.M. (1996) Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. Science, 273: 63-67.

Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R.G., Silverman R.H., and Schreiber, R.D. (1998). How cells respond to interferons. Annu. Rev. Biochem., 67: 227-264

Steinman R.A., Hoffman B., Iro A., Guillouf C., Liebermann D.A., and el-Housein ME. (1994). Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. Oncogene, 9: 3389-3396.

Ullrich A., Yelverton E., and Gray P.W. (1981). The structure of eight distinct cloned human leukocyte interferon cDNAs. Nature, 290: 20-26.

Van Straaten F., Muller R., Curran T., Van Beveren C., and Verma I.M. (1983). Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. Proc Natl Acad Sci. USA, 80: 3183-3187.

Wong G.G., Witek J.S., Temple P.A., Wilkens K.M., Leary A.C., Luxenberg D.P., Jones S.S., Brown E.L., Kay R.M., Orr E.C., Shemaker C., Golde D.W., Kaufman R.J., Hewick R.M., Wang E.A., and Clark S.C. (1985). Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. Science, 228: 810-815.

Wright W.E., Pereira-Smith O.M., and Shay, J.W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. Mol. Cell. Biol., 9: 3088-3092.

Zhang P., Vigne J.L., and Mellon S.H. (1998). Polyribonucleotide phosphorylase is a double-stranded DNA-binding protein. DNA Cell Biol., 17: 169-175.

例1

背景および重要性：

最終分化および老化の際に、多くの遺伝子が差動的に発現される。全mRNAのレベルを制御する二つの過程には、転写およびmRNAの安定性がある。増殖および分化の両者は、連続した調節を必要とする動的な過程である (Blau, H.M., 1992 Blau et al., 1992, Blau et al, 1985)。遺伝子発現を調節する分子機構の完全な知識は、我々が、発生、分化および悪性度を理解するために十分に貢献するであろう。遺伝子発現は、二つの機構によって調節される：mRNA産生の速度を決定する転写機構、および(同等に重要であるが研究中である)産生されるタンパク質の全体量を決定する転写後機構である。Xenopus laevis, Drosophila melano

gaster, *Caenorhabditis elegans*による実験データでは、胚における早期パターン化において転写後機構が重要であることを示している。これは、正確な分布、安定性、および遺伝した母系性転写物の転写を指令する (Seydoux, G. 1996)。さらに、植物において、プロトプラスト前駆体からクロロプラストへの分化を指令するのは、転写後調節であり、転写調節ではないがことが示された (Deng and Gruissem, 1987)。ほ乳類において、細胞が環境ストレス、増殖および分化に応答するためには転写後調節が重要であることが明らかである (June et al., 1990, Sierra et al., 1994)。転写後調節に応答可能な配列は、転写物の3'の非翻訳領域 (3' UTR) に見られる。オルソロガスな遺伝子を比較した場合、ほ乳類、鳥類、両生類または魚類 (Spicher et al., 1998) に由来する多くの領域の70%以上が、300-500年以上の進化の間、保存されていること示すことがわかった。mRNAの転写後調節は、遺伝子発現の中心的な制御点である。早期応答遺伝子であるサイトカイン、リンホカイン、および原癌遺伝子などは、シス作動性のアデニル酸 - ウリジル酸に富んだエレメント (ARE) によって調節される。このAREは、mRNAの3'非翻訳領域 (UTR) に見られる (Caput et al., 1986; Shaw and Kamen, 1988; Chen and Shyu, 1995; Myer et al., 1997)。現在、三つの不安定化エレメントの分類が同定されている: AUUA欠損エレメント、および点在するAUUAモチーフを持ったグループのAUUA含有エレメント (原癌遺伝子など)、および重複したAUUAモチーフを持つもの (たとえば成長因子) である (Chen et al., 1995; Myer et al., 1997)。グロブリンまたはルシフェラーゼなどの安定なメッセージの3' UTRの代わりにAREを含む3' UTRの置換は、この非常に安定なmRNAを急速な分解の標的とする (Shaw and Kamen, 1988, Maddireddi et al., 2000)。逆に、AREを除去すると、別の不安定なメッセージを安定化させる (Miller et al., 1984; Lee et al., 1988)。

【0102】

mRNAの安定化に関する遺伝子のプールは、非常に少ないままである。しかし、この領域の遺伝子ファミリーにおいて最も研究されたものの一つは、Elavである。Elavは、当初、黄色ショウジョウバエで同定された。これは、胚性致死で異常な視覚を示す。elav遺伝子の欠損変異体は、ニューロンの分化が欠失するため、

胚性致死となる (Robinow and White, 1991)。ほ乳類およびアフリカツメガエルでは、elav遺伝子ファミリーは、発生時に調節され、かつ組織特異的な三種類のメンバー、およびHuRと呼ばれる普遍的に発現した一つのメンバーからなる (Szaabo et al., 1991, Good, 1995, Ma et al., 1996, Antic and Keene, 1997)。Elav遺伝子がニューロンの分化を促進する機構は、完全には理解されていないが、Elavは選択された遺伝子の3' UTRにあるAUリッチなエレメントに結合することができる。ニューロンの最終分化が調節される際に、選択された遺伝子を選択的に安定化することによって、遺伝子発現の全体量に変化が見られる。3' UTRの安定化についてさらなる洞察を得るために、植物および細菌の3' 末端の成熟についての詳細を研究した。これら二種の完全に異なった生物において、この過程に関与するタンパク質複合体が非常に保存されていることに注目する価値はある。それらは、エンドヌクラーゼ、エキソヌクラーゼ、ヘリカーゼ、およびエノラーゼで構成される。エネルギーが高い環境に生息している大腸菌は、3' UTRのプロセッシングに関する二種のエキソヌクラーゼを持つ。：加水分解活性を持つRNase IIおよびリン酸分解活性を持つPNPase (ポリヌクレオチドホスホリラーゼ) である (Donocan and Kushner, 1986)。一方、エネルギーの乏しい環境の土壌に生息する*B. Subtilis*は、もっぱらPNPaseを使用し、RNase IIを欠損している。大腸菌に二種のエキソヌクラーゼが存在することについて、いくつかの異なる説明ができるであろう。第一に、二種のエキソヌクラーゼは異なる特性を有するであろう。これは、pnp変異体では、S20 mRNA特異的な分解物が蓄積するが、rnb (RNase II) 変異体では、それが蓄積しないという事実によっても支持される (Mackie, 1989)。PNPaseは、加リン酸分解するが、RNase IIは加水分解することから、もう一つの説明ができる。加リン酸分解はヌクレオチドの二リン酸を放出する (Gedefro-Colburn and Grunberg-Manago, 1966) ので、リン酸結合のエネルギーは保存される。これら二種の酵素の異なる使用法は、エネルギー状態の変化に対する適応性に反映されるであろう (Deutscher and Reuven, 1991)。枯草菌はもっぱらPNPaseを使用し、一方大腸菌はRNase IIを主に使用するという事実によって、このモデルは支持される。注目する価値がある他の興味のある点は、PNPaseが枯草菌のコンピテンス発生の際にも機能することである。

コンピテンスは、分化が獲得されるときの状態であるので、コンピテンスが分化の簡単なモデルとして使用されてきた。遺伝的コンピテンスは、培養細菌が高分子量の外因性DNAを結合して、かつ取り込むことを可能にする生理的状态（形質転換）として定義されている。コンピテンス遺伝子の研究は、それらを二つの広い概念に分類することを可能にした。後期コンピテント遺伝子は、コンピテンス制御下で発現し、かつ形質転換DNAの結合、取り込み、および切断に必要な産物を特定する。調節遺伝子は、後期遺伝子の発現に必要な産物を特定する（Dubnau, 1991）。PNPaseは、後期コンピテンス遺伝子の発現に必要である。pnp変異体の形質転換能は、野生型株において見られるものの1-5%である（Luttinger A, et al., 1996）。

【0103】

植物では、プラスチド3' UTRのプロセッシングに關与するクロロプラスチ分化の際に、PNPaseが機能する（例：petD）。プラスチド遺伝子が、その3' UTR内のAUリッチ領域をプロセスすることに注目するのも興味を持たれる。細菌と同様に、植物PNPaseは、3' -5' 切断のエキソヌクレアーゼ活性（ポリ（A）およびポリ（U）に対する増加された特異性を示す）を有する（Hayes et al., 1996）。ヒト奇形癌腫細胞（NT2）は、レチノイン酸処理によりニューロンへ分化させることができ、従ってニューロン分化を研究するための優れたモデルを提供する。最近、Elavファミリーの一因であるHe1-N1をNT2細胞に形質導入したときに、分化の初期サインである神経突起を形成することが示された。しかし、最終分化は引き起こさなかった（Antic et al., 1999）。O1d-35は、mRNA配列の分解に關与する3' -5' エキソヌクレアーゼPNPaseをコードするので、O1d-35は、NT2細胞においてHe1-N1の効果を増加させて、それらに分化を誘導することができる可能性がある。

【0104】

HO-1細胞におけるO1d-35 mRNAの半減期の測定：

O1d-35はAUリッチな3' UTRを有するので（図4）、我々は、その発現が転写後機構によって調節されているのではないかと推測した。転写後修飾の過程を研究するための一つの方法は、mRNAの半減期を調べることである。ほ乳類の培養細胞

系において、細胞にアクチノマイシンD (AD) を処理することによって、これを行うことができる。ADはRNAポリメラーゼII活性を阻害するので、mRNA合成が停止して、AD処理前に合成されたmRNAを減衰させることが可能である。全RNAを異なる時点で回収して、ノーザン解析を使用して定量した。このプロトコールを使用して、我々は、H0-1、コンフルエントH0-1、IFN- γ 処理およびIFN- γ +MEZ処理したH0-1におけるOid-35 mRNAの半減期を調査した。処理細胞の全てにおいて、oid-35の半減期は変化せず、かつ(図11)6時間まで評価した。H0-1とIFN- γ 処理したH0-1の間で半減期に違いはなかったため、転写後機構は、IFN- γ 処理したH0-1におけるOid-35 mRNAレベルのアップレギュレーションの原因にはならないと想定される。

【0105】

IDH4およびAR5細胞の成長抑止および老化の際のOid-35の発現：

IDH4細胞は、ヒト正常繊維芽細胞であるIMR-90にデキサメタゾン (DEX) で誘導可能なマウス乳腺癌ウイルスに由来するシミアンウイルス40 T抗原を形質導入することによって (Wright et al., 1989) 作製した。このモデル系において、増殖の延長、および老化マーカーが存在しないことは、DEX (従ってSV40T抗原) の連続的な存在に依存する。DEXフリーの培地では、DNA合成は最初の3日以内に~80%が減退し、7日で最小レベルに達する。この減退は、テロメラーゼ活性の減少およびT抗原の発現に対応している。T抗原は半減期が長く(から3日)、かつDEXを除去した後、約5~7日間は細胞内に残ったままであるので、7日間での、Oid-35のアップレギュレーションとT抗原の除去を対応させることが可能である。(図12)。しかしIDH4細胞を使用することに関して欠点がある。T抗原の発現はDEXに依存しているため、IDH4細胞の老化への移行は、細胞が増殖している培地および血清からDEXを完全に除去することに依存している。これは通常、血清を活性炭除去することによって行われる。しかし、胎児血清は大量のステロイドを含むので、完全にそのようにするのは挑戦となる。従って、DEXの完全な除去の再現性が問題となる。この問題を解決するために、我々は他の細胞株であるAR5を使用した。AR5は、T抗原がDEX誘導性ではなく、むしろ温度感受性であることを除き、IDH4と非常に似ている。AR5細胞は、35ではT抗原を発現している

ので、急速に増殖することができる。39 に移動した場合、T抗原が分解されて、細胞は老化する。35 で増殖させたAR5細胞から、および39 に移行させたAR5細胞から、全RNAを回収した。01d - 35は、移行後一日で発現され、かつもっと遅い時期でも同様（の発現）であった（図12）。35 に移行したときに、細胞が老化してしまうことを確認するために、我々は、ノーザンプロットで、老化マーカーとしてよく特徴づけられているp21（CDKインヒビター）とハイブリダイした（図12）。39 に移動したAR5細胞においてp21の発現が増加して、かつ01d - 35と同様のパターンを示した。

【0106】

T抗原はAR5細胞内（温度感受性）ではIDH4細胞内（半減期2-3日）よりも速く分解されるので、AR5細胞は、DEX除去したIDH4細胞よりも速い速度で老化状態に到達する。

【0107】

二次バリエーション（3.8kb）のクローニング：

一旦、ほとんどの配列がわかったら、前記cDNAをBLAST・ESTデータベースに対してスクリーニングした。この検索において、我々は他のバージョンの01d - 35（3.8kb）を同定した。これはおそらく、ノーザンプロットにおいて上段のバンドとして観測されたものである。前記3.8kbのESTをシーケンスした。シーケンス解析によって、2.6kbおよび3.8kbの断片の3' UTRが異なっていることが明らかになった。これは、異なったポリアデニル化パターンにより生じるのであろう。01d - 35のノーザンプロットにおける上段のバンドが、3.8kb断片を示していることを確認するために、我々は、ATCCクローンの3' UTRをプローブとして使用するつもりである（図13）。

【0108】

01d - 35 - GFPの局在：

01d - 35に対する抗体は、現在利用可能なものがないので、我々は、01d - 35のN末端融合GFP（Clontech）を作製して01d - 35の局在をテストすることに決めた。最初のATGのない01d - 35を、GFPに対しインフレームでクローン化して、次にSuperFect試薬（Clontech）を使用して、HeLaおよびH0-1細胞に形質導入した。前

記タンパク質は、24時間後に発現可能であった。分解酵素において予想されたように、O1d - 35は、HeLa (図14) およびH0-1 (データは示さず) の細胞質に局在していた。

【0109】

マウス発生時におけるO1d - 35の発現：

ヒト多重組織ノーザンブロット (Clontech) を使用して、我々は、テストした全ての組織の中で、心臓および脳においてO1d - 35が最も高レベルで発現されていることを測定した。特定組織の細胞タイプの最終分化は、正常な胚発生の際に生じるので、マウス発生時におけるO1d - 35の発現パターンを測定した。発生初期段階 (8日) に、O1d - 35が最も高レベルに発現していることが明らかとなり、時間とともに着実に減衰した (10-16日)。O1d - 35の空間的な発現を測定するために、インサイチュウハイブリダイゼーション実験を行った。マウスO1d - 35は、脊髄管および動脈に発現していた。しかし、発現パターンを正確に決定するためにはさらなる実験を行わなければならない (図15)。

【0110】

O1d - 35の発現に対する異なったIFN - サブタイプの効果：

全てのサブタイプがO1d - 35の発現を刺激した。IFN - Hおよび Iが、最も低い濃度でO1d - 35を刺激した (図16)。上記実験は、異なったサイトカインがO1d - 35の発現を差動的に調節することを示し、テストしたサイトカインのうち、H0-1細胞におけるO1d - 35の発現を誘導する活性が最も強いのは、タイプIインターフェロン (IFN - / IFN -) である。さらに、IFNシグナルカスケードは、JakおよびStatの活性化を含んでいるので、それらが、O1d - 35の誘導および発現の中間体として重要であることが証明されるであろう。

【0111】

O1d - 35のゲノム構造：

上記のように、我々は、O1d - 35 cDNAの特定領域と100%相同な二種のBACsを同定した。第一のBAC(RPCI-11、Plate=702、Col=8、Row=C) (Research Genetics) は、O1d - 35 cDNAの2207-2365領域と100%のホモロジーを示した。O1d - 35配列の両端に位置するシーケンスした領域は外来性であり、従って、それらはイン

トロンである可能性が高い。第二のBAC (CITBI-E1、クローン2505G20) (Research Genetics) は、OId - 35 cDNAの235-313領域と100%のホモロジーを示した。BACsをシーケンスした後、OId - 35遺伝子は、28エキソン内に分布していることが明らかとなった(表2)。イントロンカラム内の空間はイントロンサイズについてデータがないことを意味する。前記イントロンサイズは測定中である。

【0112】

興味深いことに、ヒトゲノム中にはOId - 35の偽遺伝子が、少なくとも3種存在する。最初の一つはOId - 35 cDNAと92%が相同であり、cDNAの一部(48bp-1387bp)を含む。このBACでは、前記cDNAの5'および3'末端を発見できなかった。第二の偽遺伝子は、第3染色体に存在することが、BLAST検索によって測定された。その遺伝子は、第49ヌクレオチドからcDNAの末端までのcDNA断片を含むんでいる。

【0113】

第三の偽遺伝子も、49bpから2517bpまでのcDNA断片を含んでいる。第二と第三のBACsは、90%の相同性を有する。全ての場合において、全てのBACsは、高頻度で変異を持ち、かつOId - 35 cDNAのイントロンのない部分である。

【0114】

【表2】

表2

OLD-35のエキソン-イントロン構造

エキソン	エキソンのサイズ	イントロン	イントロンのサイズ	エキソン	エキソンのサイズ	イントロン	イントロンのサイズ
1	174	1	6000	15	36	15	15
2	60	2	1100	16	66	16	16
3	74	3	1300	17	89	17	17
4	105	4	1100	18	53	18	18
5	49	5		19	105	19	19
6	63	6		20	72	20	20
7	47	7		21	63	21	21
8	113	8	6600	22	83	22	22
9	186	9	800	23	83	23	23
10	51	10	600	24	106	24	24
11	57	11	3500	25	55	25	25
12	96	12	800	26	77	26	26
13	102	13		27	45	27	27
14	70	14		28	406		

【0115】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Fisher, Paul B.

<120> Genes Displaying Enhanced Expression During
Cellular Senescence and Terminal Cell
Differentiation and Uses Thereof

<130> 0575/56765

<140> WIPO ST. 10/C

<141> 1999-02-03

<160> 50

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 674

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 1

```

aattcggcac gagcacgtct tgacctgaa cgcaaagtgg aatctttgca agaagagatt 60
gccttttga agaaactcca cgaagaggaa atccaggagc tgcaggctca gattcaggaa 120
cagcatgtcc aaatcgatgt ggatgtttcc aagcctgacc tcacggctgc cctgctgtac 180
gtacgtcagc aatatgaaag tgtggctgcc aagaacctgc aggaggcaga agaatggtac 240
aaatccaagt ttgctgacct ctctgaggct gccaacccga acaatgacgc cctgctgaccag 300
gcaaagcagg agtccactga gtaccggaga caggtgcagt cctccacctg tgaagtggat 360
gcccttaaag gaaccaatga gtccctggaa cgccagatgc gtgaaatgga agagaacttt 420
gccgttgaag ctgctaacta ccaagacact attggccccg ctgcaggatg agattcagaa 480
tatgaaggag gaaatggctc gtcaccttcg tgaatccaa gacctgctca atgntaagat 540
ggcccttgac attgagattg ccacctacag gaagctgctg ggaaggcgan gagagcagga 600
ttctctgct cttccaaact tttcctcctt gaccttgagg gaaactaatc tggattcact 660
cctcttggg tgaa 674

```

<210> 2

<211> 678

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 2

```

aattcggcac gagcaggacc caaggaacca aaattgcate tgatggcttc aagggtcgtg 60
tgtttgaagt gagtcttctt gatttgcaga atgatgaagt tgcattagaa aattcaagct 120
gattactgaa gatgttcagg gtaaaaactg cctgactaac ttccatggca tggatcttac 180
ccgtgacaaa atgtgttcca tggtcaaaaa atggcagaca atgattgaag ctcacgttga 240
tgtaagact accgatgggt acttgcttcg tctgttctgt gttggtttta ctaaaaaaac 300
caacaatcag atacggaaga cctcttatgc tcagcaccaa caggtccgac aaatccggaa 360

```

gaagatgatg gaaatcatga cccgagaggt gcagacaaat gacttgaag aagtggtaa 420
 taaattgatt ccagacagca ttggaaaaga catagaaaag gcttgccaat ctatttatcc 480
 tctccatgat gtcttcgta gaaaagttaa aatgctgaag aagcccaagt ttgaattggg 540
 aaagctcatg gagcttcatg gtgaanngca gtatctctgg aaaaagccac ttggggacga 600
 aacaggtgct aaaagtttga acgactgatg gatattgaac cccagtcaca gaatctgggt 660
 aaaggtcaca cttcaaat 678

<210> 3

<211> 670

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 3

aattcggcac gaggatgatg accttcaaga aaatgaagac aataaacaac ataaagaaag 60
 cttgaaaaga gtgaccttbg ctttaccaga tgatgaggaa actgaagata cagggtgtttt 120
 aaatgtaaag aaaaattctg atgaagttaa atcctccttt gaaaaaagac aggaaaagat 180
 gaatgaaaaa attgcatctt tagaaaaaga gttgttagaa aaaaagccgt ggcaacttca 240
 gggggaagtg acagcacaga agaggccaga gaacagcctc ctggaggaga ccctacactt 300
 tgaccatgct gtccggatgg caoctgtgat tacagaggaa accacccttc aactggaaga 360
 tatcattaaa cagaggataa gagatcaggc ttgggatgat gtatgacgta aagaaaaacc 420
 taagaggat gcatatgaat ataaaaagcg tttaacctta gaccatgaga agagtaaat 480
 gagccttgct gaattttatg aacaggagta catcaaacctc aaccagcaa aaacagcaga 540
 agaagaaaat ccagaacatg tagaattca gaagatgatg gatccctct tcttaattg 600
 gatgcctctc aaacttccct ttatccctta accgcctgtc cagagattaa agttgngggc 660
 aaatctgcca 670

<210> 4

<211> 675

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 4

aattcggcac gagatctgct gcaagcagcc aaatgttatg agaaggaact gggccgcctg 60
 ctaagggatg ccccttcagg cataggcagt attttcctgt cagcatctga gcttgaggat 120
 ggtagttagg aaatgggcca gggcgcagtc agctccagtc ccagagagct cctctctaac 180
 tcagagcaac tgaactgaga cagaggagga aaacagagca tcagaagcct gcagtgggtg 240
 ttgtgacggg taggaggata ggaagacagc gggccccaac ctgggattgc tgagcaggga 300
 agctttgcat gttgctctaa ggtacatttt taaagagttg ttttttggcc gggcgcagtg 360
 gctcatgcct gtaatcccag caocttggga ggccgaggtg gggggatcac gagtctgga 420
 gtttgagacc atcctggcta acacagtga atcccgtctc tactaaaaat acaaaaaatt 480
 agccaggcgt ggtggctggc acctgtagtc ccagctactt gggagctgan gcangagaat 540
 ggcgtgaacc tggaaaggaag aagttgcagg tgagcccaag attgcgccc cttgcactcc 600
 agctgggcaa cagagcaaga cttcatctca aaaaaaaaaa aaaaaaactn ncgnggggg 660
 gccccggggc cccca 675

<210> 5

<211> 460

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 5

```

aattcggcac gaggacacct gtgtctaccac tgacccccctt cctcacactg acctgtgttc 60
cttcacctgtt ctcttttcta ttaaaaaataa gaacctgggc agagtgcggc agctcatgcc 120
tgtaaatccca gcacttaggg aggccgagga gggcagatca cgaggtcagg agatcgaaac 180
catcctggct aacacgggta aacccccgtct ctactaaaaa atacaaaaaa ttagctgggc 240
gcagaggcac gggcctgtag tcccagctac tcaggaggcg gaggcaggag aatggcgtca 300
acccgggagg cggagggtgc agtgagccag gattgtgcga ctgcactcca gcctgggtga 360
cagggtgaaa cgccatctca aaaaaataaaa attaaaaaaa aaaaaaaaaa nntcnnnggg 420
ggccccggtn ccnatctcnc cntatnggga gncntnncaa 460

```

<210> 6

<211> 445

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 6

```

aattcggcac gatttctgcc catgctgcag acagtggcca agaacaagga ccagggcacc 60
tatgaggatt atgtcgaagg acttcgggtg tttgacaagg aaggaaatgg caccgtcatg 120
ggtgctgaaa tccggcatgt tcttgtcaca ctgggtgaga agatgacaga ggaagaagta 180
gagatgctgg tggcagggca tgaggacagc aatggttcta tcaactatga agagctcgtc 240
cgcatagtgc tgaatggctg aggaaccttc cagtcctccc agagtccttg ccttccctg 300
tgtgaatttt gtatctagcc taaagtttcc ctaggcttcc ttgtctcagc aactttccca 360
tcttgtctct ctggatgat gtttgcctgc agcatccacc aaataaactt gctctctggg 420
cctcggaaa aaaaaaaaaa aaaaa 445

```

<210> 7

<211> 656

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 7

```

aattcggcac gaggcaatgt gcttggtttt aaagaaatc tccttgggaa aaaagtatcc 60
tcttttaatt ttacttccca taagcgtaaa tgccctggaca tagctcttgt gcaaccttta 120
aataaattgt tttgagtgtt ttttgagccc cagacaaata atgttttaa gttatcccct 180
tgctacttta ctgatacctt tatcattcct gagacagttt gctaatttaa aaatgtagca 240
ttccatctgt atttatctct ctcccttgcc aaaaagattt tctaatactg cttgtaccag 300
ccagagaaaag atccaaaaca ctactcagct ctcttgcact gaggaaatct tccccctac 360
attgactcct ggccacatc agccaaactt aaccttgggt gggtttggat ttgatagcca 420
attagttctg tgctgggtgc aaagaattga tatttagatg gtttttaata ctcagcagat 480
tgncttctt tatattgngt cttttttatg ttgcatgttg cttttgntat cagcctgatt 540
ttttgctcag tatatgatag ttctgctgat ggtttggtta ttgggcagac atatcttcat 600
taagagtttt tggaaaactc atcaaatteg atgaatacat tttcttcata acccattgga 660
aatatc 666

```

<210> 8

<211> 409

<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 8
aattcggcac gagcgactac ggoggactaa tcttcaactc ctacatactt cccccattat 60
tcctagaacc aggcgacctg cgactccttg acgttgacaa tcgagtagta ctcccgattg 120
aagcccccat tcgtataata attacatcac aagacgtctt gcactcatga gctgtcccca 180
cattaggctt aaaaacagat gcaattcccg gacgtctaaa ccaaaccact ttcaccgcta 240
cacgaccggg ggtabactac ggtcaatgct ctgaaatctg tggagcaaac cacagtttca 300
tgcccacgtt cctagaatta attcccctaa aaatccttga aataggggcc gtattttacc 360
tatagcacc cctctacccc ctctagagca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 409

<210> 9
<211> 667
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 9
aattcggcac gagacaaggc acaaatgatc caaatcaagg aggcacaaa agggcagcct 60
agagggcaga acagagaaaa gctagacaaa atgataagat cagccatatt tcattttgaa 120
tctgcagtgg aaaaaagcc cacatttgag gtggctcacc tagacctggc aagaatgtat 180
atagaagcag gcaatcacag aaaagctgaa gagaattttc aaaaattggt atgcatgaaa 240
ccagtgttag aagaacaat gcaagacata catttccact atggctgggt tcaggaattt 300
caaaagaaat ctgacgtcaa tgcaattatc cattatttaa aagctataaa aatagaacag 360
gcatcattaa caaggyataa aagtatcaat tctttgaaga aattggtttt aaggaactt 420
eggagaaagg cattanactg gaaagcttga gctccttgg gtctgtctac aaattggaag 480
gaaatatgaa tgaagccttg gagtactatg agcgggcccct gagactggct gctgactttg 540
agactctgtg agacaaggtc cttagcccca gatatcagcc ctttccattt catttcat 600
tatgctaaca tttactaatc atctttcttg cttactgggt tcagaacctt ataattccct 660
ggnatga 667

<210> 10
<211> 672
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 10
aattcttctt gtacgattgg ggatataacy ggcttcaacta accttcccta ggcattgaaa 60
cttcccccaa atctgatgga cctagaagtc tgcttttgta cctgctgggc cccaaagttg 120
ggcatttttc tctctgttcc ctctcttttg aaaatgtaaa ataaaaccaa aaatagacaa 180
ctttttcttc agccattcca gcatagagaa caaaccttat ggaacagga atgtcaattg 240
tgtaatcatt gttctaatta ggtaaataga agtccttatg tatgtgttac aagaatttcc 300
cccacaacat cctttatgac tgaagttcaa tgacagtttg tgtttggtgg taaaggattt 360
tctccatggc ctgaattaag accattagaa agcaccaggc cgtgggagca gtgaccatct 420
gctgactggt cttgtggatc ttgtgtccag ggacatgggg tgacatgcct cgtatgtggt 480
agaggggtgga atggatgtgt ttggcctgac atgggatctg gtgcccctct tctcctggat 540
tcacatcccc acccagggcc cggtttctact aagtgtctgc octanattgg gtcaaaaggag 600
gtcatccaac tgactttatc aagtggaatt gggatataat tgatatactt ctggctaaca 660

acatgggaaa ag

672

<210> 11

<211> 672

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 11

```

aatttttctt gtaagattgg ggatataacg ggcttcaact accttcccta ggcattgaaa 60
cttcccccaa atctgatgga cctagaagtc tgcttttgta cctgctgggc cccaaagtty 120
ggcatttttc tctctgttcc ctctcttttg aaaatgtaaa ataaaaacaa aaatagacaa 180
ctttttcttc agccattcca gcatagagaa caaaccttat ggaaacagga atgtcaattg 240
tghtaatcatt gttctaatta ggtaaataga agtccttatg tatgtgttac aagaatttcc 300
cccacaacat cctttatgac tgaagttcaa tgacagtttg tgtttggtyg taaaggattt 360
tctccatggc ctgaattaag accattagaa agcaccaggc cgtgggagca gtgaccatct 420
gctgactggt cttgtggatc ttgtgtccag ggacatggg tgacatgcct cgtatgtggt 480
agagggtyga atggatgtgt ttggcgtgc atgggatctg gtgccccct tctcctggat 540
tcacatcccc acccagggcc cggttttact aagtgtctgc cctanattgg gtcaaaggag 600
gtcatccaac tgactttatc aagtggatg gggatatatt tgatatactt ctggctaaca 660
acatgggaaa ag 672

```

<210> 12

<211> 669

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 12

```

aattcctaga caccaatac agtgtgggaa tacacaacct actagcctat gtgaaacacc 60
tgaaaggcca gaatgaggaa gccctgaaga gcttaaaaga agctgaaaac ttaatgcagg 120
aagaacatga caaccaagca aatgtgagga gtctggtgac ctggggcaac ttgacctgga 180
tgtattacca catgggcaga ctggcagaag ccagactta cctggacaag gtggagaaca 240
tttgcaagaa gctttcaaat cccttccgct atagaatgga gtgtccagaa atagactgtg 300
aggaaggatg ggccttgctg aagtgtggag gaaagaatta tgaacgggcc aaggcctgct 360
ttgaaaaggt gcttgaagtg gacctgaaa accctgaatc cagcgtggg tatgcgatct 420
ctgcctatcg cctggatggc tttaaattag ccacaaaaaa tcacaagcca tttctcttgc 480
ttcccctaag gcaggctgtc cgcttaaatc cagataatgg atatattaag ggtctccttg 540
ccctgaagct tcaggatgaa ggacaggaaa cttgaaggag aaaagtnat tgaanaactn 600
taccaccat gtcctccaga cctatgcttt gattgcagcc aagttttacc gaaaaaaagn 660
tntgggata 669

```

<210> 13

<211> 702

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 13

```

aattcggcac gagtgttata ggagatcaca aatcaacatc tcacttccga accggggaag 60
aagacaagaa aattaatgaa gaactggagt ctcaatatca gcaaagtatg gacagttaat 120

```

```

tattcaggaag atatcggcga cattgtggac ttggcttcag tgaggtagaa gaccatgatg 180
gagaagggtga tgtggctgga gatgatgatg atgacgatga tgattcacct gatcctgaaa 240
gtccagatga ttctgaaagc gattcagagt cagagaaaga agaattctgt gaagaactcc 300
aagctgctga gcaccctgat gaagtggagg atccccaaaa caaaaaagat gcaaaaagca 360
attataaaat gatgtttgtt aaatccagtg gttcataact cccaaaagct tagtctttgt 420
attaaaaagta agccttattg ttacaatgca cagtggagga ctgcttatag agcacagacc 480
tttgtattat aatttttaaa aaggcccttt taaataatta caaagagtgn ttgctttcaa 540
atgccatggg ttacactttt atgggcatga ctataccatt ttgnaaaga gtagagtgn 600
ataaaataag aaatanctcc agtaactcact tccttctatt agcatctcac cctntaatc 660
ccttatgggg aaatgcttct tttggttggg atagcttttt an 702

```

<210> 14

<211> 312

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 14

```

aattcggcac gaggtaaatg ttgagccttt ttggcctggc ttgtttgcaa aggccttggc 60
caacgtcaac attgggagcc tcctctgcaa tgtaggggcc ggtggacctg ctccagcagc 120
tggtgctgca ccagcaggag gtcctgcccc ctccactgct gctgctccag ctgaggagaa 180
gaaagtggaa gcaaagaaag aagaatccga ggagtctgat gatgacatgg gcttttggct 240
ttttgactaa acctctttta taacatgttc aataaaaaagc tgaactttaa aaaaaaaaaa 300
aaaaaaaaaa ac 312

```

<210> 15

<211> 391

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 15

```

aattctgagg aggaactgat gatggcatgg aagaactttt cagtcactct aaggaggttc 60
cgctggtttt cctcaaggct ctctgatggt tctaacctgg taggatccac ttcaaagcta 120
acatggtgcc aatcagagga tgtgatcaca attcgttaata aaggatccag gagtttttgt 180
agataggttag caccatatac cttgaaacag aatgtcatta ttttactggc caagctgttg 240
cctcgggaaga gagtctgcat ggagtctgcc aattctactt ctttagaaaa catgttccag 300
agcagttggt agagtaaatg ccgagaatca aacagagtaa ccagaactcg agggggggcc 360
cggtaaccxaa ttccgccctat agtgagtctg t 391

```

<210> 16

<211> 720

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 16

```

aattcnnatc gagnttcttt gtatgtgaac ggtcctggaa ggattctggt gctccttggc 60
aggtgtgtgg ttgcgctat agactggctc cggatgatctg gccattatac tctgctgtct 120
ccatcttgag gatgtagggg attatgctgt ctatcgaaac attgccaatg agaccagtaa 180
aaaaaagttc ttctgttatg ttggagctca tcagcctgag tgccggcagg cgaacgagga 240

```

```

tccgggccc aa tctataaaaagg ggagtggtcat tagaaaagga gactgtttga tgccttcaa 300
ccacagctca gcaaaggctc ctgggggtccc gtctgtattg caccagaatc aaaccaacng 360
gatccacctt ccaccacact ttnttttctg atttcaacag ttctcttat agaaattat 420
catgagaaaa aaccaaatga gtccaaaang tatgtncana tgggttccct tcnctctggg 480
aatccaactt tctaaccctc nccnccaaaa aaaancnngg aattcttnac onggngngca 540
ccttaaggng gaagccttca tnggaannac ttgctanana ctcaattaaa aaaccgatta 600
ntnccaacc tgnntttct gncconggaa aanacntccc ntgacatatg gctcaaataa 660
aaggttttaa aggggaantt ttnaaaaaaa anaaaaaaa aaaccctnng gggggggccc 720

```

<210> 17

<211> 205

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 17

```

aattcgaaca gcataccccc gattccgcta cgaccaactc atacacctcc tatgaaaaaa 60
cttctacca ctcaccctag cattaacttat atgatatgtc tccataccca ttacaatctc 120
cagcattccc cctcaaacct aaaaaaaaaa aaaaaaannt ngnggggggg cccggncccc 180
anttcnccnt ntngggngnn gnntt 205

```

<210> 18

<211> 691

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 18

```

aattcttaca tgttttcttt gctttaagtg taactggcag ttttccattg gtttacctgt 60
gaaatagttc aaagccaagt ttatatacaa ttatatcagt cctctttcaa aggtagccat 120
catggatctg gtagggggaa aatgtgtatt ttattacatc tttcacattg gctatttaaa 180
gacaaagaca aattctgttt cttgagaaga gaatattagc tttactgttt gttatggctt 240
aatgacacta gctaatatca atagaaggat gtacatttcc aaattcaca gttgtgtttg 300
atatccaaag ctgaatacat tctgctttca tcttggtcac atacaattat ttttacagtt 360
ctcccagggg agttaggcta ttcacaacca ctcaattcaa agttgaaatt aaccatagat 420
gtagataaac tcagaaatth aattcatggt tcttaaatgg gctactttgt cctttttgnt 480
attaggggtg tatttagtct atttagccaca aaattgggaa aggagtagaa aaagcagtaa 540
ctgacaactt gaataataca ccagagataa tatgagaatc agatcatttc aaaactcatt 600
tcttatgtaa ctgcattgag aactgcatat gtttcgctga tatatggggg tttccatttg 660
cgaatgggtc cattctctct cggactttt t 691

```

<210> 19

<211> 483

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 19

```

tctagaacta gtggatcccc cgggtcgcag gaattcggca cgaggtttta agtactctga 60
aattgatctg tgatcaataa tactaatatg ttatctttta ccgtattctg cctctcacta 120
ttgatcttaa ttagtttaga gtatttgagc tgttatttct tgagcttaat attttttag 180

```

```

agttaactct ttaaggagat aatcatggct gtagacaagg ccagggctgg ctgacgtgcc 240
ttagaaagtt tgaatgcaat aaagcgggtg ttggcgttct cctgcattgt agtgccgggt 300
acaaatgcta attgttccgt caactgggtg cagcagatga gccgcccaact acagacggct 360
actgcccagg gacctgcccc ggcccccccc aagggctccc aagggttgag atttctgcag 420
acctatagcc agcacactta gtctctgcct atatagagtt cctcttcggg aagcttttga 480
taa

```

<210> 20
<211> 589
<212> DNA
<213> Homo sapien

```

<400> 20
gcacgagtcg aaatgtacat tgggtattct gaagcttata tcggagcaga cattaagac 60
aaattaaaaa gttatgaact tgatgtgcat acaatgaaga cactaaaaaa cattatttca 120
cctccgtggg atttcagggg atttgaagta gaaaaacaga ctgcagaaga aacggggctt 180
acgccattgg aaacctcaag gaaaactcca gattccagac ctctcttggg agaaaccttt 240
gaaattgaaa tgaatgaaag tgacatgatg ttagegacat ctatgtcaga ccacagcacg 300
tgactccagt cagtggtcct ggtcccactg tcccagtgta ggttagtatt ccttcacatc 360
cctccatggg cttaaagaatg tcccacttcc taacgtgact ccaaaactga tctctacatt 420
taggaacaga gacccgcctt aagagactgg atcgcacacc tttgcaacag atgtgttctg 480
attctctgaa cctacaaaaat agttatacat agtggataaa agaaggtaaa ccatcaaaaa 540
aaaaaaaaaa aaaccncngg gggggcccg gccaatttg ccttangg

```

<210> 21
<211> 713
<212> DNA
<213> Homo sapien

```

<400> 21
aattcaagtg cctgattaat tgaggtggca acatagtttg agacgagggc agagaacagg 60
aagatacata gctagaagcg acgggtacaa aaagcaatgt gtacaagaag actttcagca 120
agtatacaga gatttcacct ctactctgcc ctccctcatag tcataatgta gcaagtaaa 180
aatgagaatg gattctgtac aatcacactag aaaccaacat aatgtatttc tttaaaaacc 240
gtgtgaaaaa ataatgttc caccagtagg gataggggaa aagtaaccaa aagagagaaa 300
gagaaaggaa tgctggttta tctttgtaga ttgtaatcga atggagaaat ttgcagtatt 360
ttagccacta ttaggaattt ttttttttng taaaangaan actgaactnt gttcaaangc 420
tttcatganc ctggtttgaa acggtaggaa agcaccaaaa cgnnggancc tggggactaa 480
gggcctggtg caaggacttg ggaaatggca ttgataatan atgggggggt tttccccct 540
ttaaaaatgt tggatnttaa gggatataac ccttntttta ctccgaaaat nttntgagaa 600
atcccaaat tcnnggtatg cttggaacca ttganathtt ntagggaaan gccttgaata 660
gcctanacct caaagtggg gngaaccaaa attggagccn ttgncccacc tcc

```

<210> 22
<211> 480
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 22

cggcacgaga agaagtggta caggaggaat ttgtgatgat gagctgatct taatcaaaaa 60
 tactaaggct cgtacgtctg catcgattat cttacgtggg gcaaatgatt tcatgtgtga 120
 tgagatggag cgctctttac atgatgcact ttgtgtagtg aagagagttt tggagtcaaa 180
 atctgtgggt cccgggtggg gtgctgtaga agcagccctt tccatatacc ttgaaaacta 240
 tgcaaccagc atggggtctc gggaacagct tgcgattgca gagtttgcaa gatcacttct 300
 tgttattccc aatacactag cagttaatgc tgcccaggac tccacagatc tgggtgcaaa 360
 attaagagct tttcataatg agggccaggt taaccagaa cgtaaaaatc taaaatgatt 420
 ggtcttgatt tgagcaatgg taaacctcga gggggggccc ggtaccocat tcgccctata 480

<210> 23

<211> 198

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 23

cctgttaaaa gotgttcttg ngtgttacat gtaacagaca tggtaaatat ttgtttacag 60
 tctttgttta acaaaccatg catttaagtt taagtgaagt caacaaaaag gaaatagggt 120
 tatggatgat tgattttgag attaaagtta gtcttaaaat gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 198

<210> 24

<211> 414

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 24

aattcggcac gagaaaagca gtataactgc ctgacacagc gggattgaac gagagaagaa 60
 attgttcggt attgctcaga aaattcaaac acgcaaagat cttatggata aaactcagaa 120
 agtgaagggt aagaaaagaaa cgggtgaactc cccagctatt tataaatttc agagtcgtcg 180
 aaaacgttga cgtggttatag ataagccttg tcattctgta tcaaaaatct gttgtcgttt 240
 tctagtaact tcaaattcca ttactccaaa tggcatgggt ttccgggttg taaccataac 300
 taaattgtca gtctgacatt taatgtcttt ctatgggaca cattaaatct cctcccttc 360
 tgtagaanan anannnaaa aancncncng gggggggccg ggtccccatt cccc 414

<210> 25

<211> 367

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 25

aattcggcac gagaaaagca gtataactgc ctgacacagc gggattgaac gagagaagaa 60
 attgttcggt attgctcaga aaattcaaac acgcaaagat cttatggata aaactcagaa 120
 agtgaagggt aagaaaagaaa cgggtgaactc cccagctatt tataaatttc agagtcgtcg 180
 aaaacgttga cgtggttatag ataagccttg tcattctgta tcaaaaatct gttgtcgttt 240
 tctagtaact tcaaattcca ttactccaaa tggcatgggt ttccgggttg taaccataac 300
 taaattgtca gtctgacatt taatgtcttt ctatgggaca acattaaatc tccctccctt 360
 ctgtaaa 367

<210> 26
 <211> 432
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

<400> 26
 aattcggcac gaggcagact tgaaacagtt ctgtctgcag aatgctcaac atgaccctct 60
 gctgactgga gtatcttcaa gtacaaatcc cttcagaccc cagaaagtct gtcccttttt 120
 gtagtaaaat gaatctttca aagggttccc aaaccactcc ttatgatcca gtgaatattc 180
 aagagagcta catttgaagc ctgtacaaa gcttatccct gtaacacatg tgccataata 240
 taaaaacttc tactttcgtc agtccttaac atctacctct ctgaattttc atgaattttc 300
 atttcacaag ggtaattgtt ttatatacac tggcagcagc atacaataaa acttagtatg 360
 aaactttaaa aaaaaaaaaa aaaacntcnn ggggggnccc ggancccant tcnccntata 420
 gggngnccgn tt 432

<210> 27
 <211> 398
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

<400> 27
 aattcggcac gagtacaaaa ccagttggty gtgacaagaa cggcggtaac cgggtggtta 60
 aacttcgcaa aatgcttaga tattatccta ctgaagatgt gctcgaag ctggttagcc 120
 acggcaaaaa acccttcagt cagcactgta gaaaactcgg agccagcatt acccccggga 180
 ccattctgat catctcact ggaagccaca ggggcaagag ggtggttttc ctgaagcagc 240
 tggctagtgy cttattactt gtgactggac ctctggctct caatcgantt cctctacnaa 300
 gaacacacca gaaatttgtc attgccactt caacaaaaat cgatntcngc antgtannaa 360
 atcccaanac atcttactga tgcttacttc aagatgaa 398

<210> 28
 <211> 232
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

<400> 28
 aattcggcac gagattgtat cggttttata ttacctgttc tgcttcacca ggagatcatg 60
 ctgctgtgat actgagtttt ctaaacagca taaggaagac ttgctccctt gtcttatgaa 120
 agagaatagt tttggagggg agaagtggga caaaaaagat gcagttttcc tttgtattgg 180
 gaaatgtgaa aataaaattg tcaactcttt caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 232

<210> 29
 <211> 539
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

<400> 29
 aattcggcac gagcacaacc agaaagtaag gtgttctact tgaaaatgaa aggagattat 60

```

tttaggtatc tttctgaagt ggcactctgga gacaacaaac aaaccactgt gtcgaactcc 120
cagcaggctt accaggaagc atttgaaatt agtaagaaag aaatgcagcc tacacaccca 180
attcgtcttg gtctggcact aaatttctca gtcttttact atgagattct aaactctcct 240
gaaaaggcct gtagcctggc aaaaacggca tttgatgaag caattgctga attggatagc 300
ctgaatgaag agtcttataa agacagcact ctgatcatgc agttacttag ggacaattca 360
ctctgtggac atcggaaaac cagggagacg aaggagacgc tggggaggga gagaactaat 420
gttctctgtg ctttctgata tgttcagtgt cactctgtac cctcaacata tatcccttgt 480
gcgataaaaa aaaaanaaaa aaaaaccttc nggggggggc ccggancccn attccccct 539

```

```

<210> 30
<211> 568
<212> DNA
<213> Homo sapien

```

```

<400> 30
attccaaacc aagtagtgtc tgtcagccct cttaactctg tgcacgccct atttcagtct 60
tttacatttg ttctcttagg gaatgtatgc atctctatat atattttccc tctcaaaacc 120
agaacatcaa cagtgtctgt tctgacactt cagacatccc acgcaaaagc acattgaatt 180
tttgccaaat gaaaaacaca tccacaatca agttctaaga ggggtgtcaag tggggaatat 240
taatattggt tattattcaa aaatttagtt tatnaaangg aancaaaacc nttgaacctt 300
ttttcccnaa aanaaggaa aatntnntgt ngaccaaggg nccaacctga atccnccttg 360
aaaaattggt ntctcagaaa ggaaggcgc cctccagttc ttttaccoca agaatttana 420
aaaatttggg ccaagatttt atatgttcag ttgtttatgt ntaaaaaata ctttctggat 480
tttgtggggg aggaccgga aaggaaggga gtttattcct atgttatata ntanaaactt 540
cccnataaaa atgccatnga tgggttga 568

```

```

<210> 31
<211> 315
<212> DNA
<213> Homo sapien

```

```

<220>
<223> Human sapien

```

```

<400> 31
aattcggcac gagcaggag ccgctagtga aaatctggca tgaataaagg actaatggcc 60
ccaaaaaagg aggtggctct aagtaaaact gggattggac agtagtggty catctggctc 120
ttgcgcctg agagccccag gagacatcgg cttagatgac catggctatg ctcccgtctg 180
gaagatgccA gcactctggc tcccactggt ttcagctgtg tccccagtc cgtgtctttt 240
tagaatgtga atgatgataa agttgtgaaa taagggtttc tatctagttt gtaaaaaaaa 300
aaaaaaaaa aaaaa 315

```

```

<210> 32
<211> 458
<212> DNA
<213> Homo sapien

```

```

<400> 32

```

```

aattcaagga accttacatt gtaagagaaa acaaaacact gcaaaagaag tgtgcecgact 60
atcaaatata ttgtgaaatc atctgcaaat gtggccaggg ttggggaaca atgatgggtc 120
acaaggctt agatgtgcct tgtotcaaaa taaggaattt tgtagtgggt ttcaaaaaa 180
attcaacaaa gaaacaatac aaaaagtggg tagaattacc tatcacattt cccaatcttg 240
actattcaga atgctgttta tttagtgatg aggattagca cttgattgaa gattctttta 300
aaatactatc agttaaacat ttaatatgat tatgattaat gnattcatta tgctncagac 360
tgacntanga atcantaaaa ngatngtttt actctgcaaa aaaaaaaaa aacncggggg 420
ggggcccgcc cccaatttcc ccttntgggg gggggttt 458

```

<210> 33

<211> 470

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 33

```

aattcttata ttccagaggc tacaattatt ataatggaca atacttttac ctttgtctct 60
aaagatcaga ttagttttat ttgttcactt acgtgctttg attatccctc ctgaattata 120
gaccgagtct tgttgttttag cctaagagaa gatttatgta gtaatttctt ctcaggtagt 180
gaaccacggc cataactaac atgttggcca gaatagaacc actggttaaa catattttat 240
tcaccattaa gtgatcttta tcaatattct ggattagaca acaattacc tttctgggtg 300
ttctctgtaa actatactcc tgtttgaatg ttaaactttg ttgctaaagt ttaattttaa 360
gatgtttgaa tgttcagttt atgtatttga actacaataa accaacctt tttatataaa 420
aaaaaaaaaa aacntcgagg gggggccggg cccaattttn ccctataggg 470

```

<210> 34

<211> 261

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 34

```

aattcgaact gtgtgtatgt cagtggaaac aaatcaaaag ccactaacat ggetgtctgt 60
ttcactggac tgtcccattt gctggtaaa aggattgggg cccaaatcct ctggcctagc 120
atctctcagt gtttgcattt cagactgtct aaatacagca tgtgacaagc tgaagaagcc 180
aaacttagca gtcatttctg atttcattat attctcccc tctctctgct aaaagacaaa 240
aaaacaaaaa aaaaaaaaaa a 261

```

<210> 35

<211> 309

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 35

```

aattcggcac gagctggaca ccaacagtga tggtcagcta gatttctcag aatttcttaa 60
tctgatgggt ggcctagcta tggcctgcca tgactccttc ctcaaggctg tccttccca 120
gaagcggacc tgaggacccc ttggccctgg ccttcaaac caccoccttt ccttccagcc 180
ttctgtctat catctccaca gccacccat cccctgagca cactaaccac ctcatgcagg 240
cccacctgc caatagtaat aaagcaatgt cactttttta aaacatgaaa aaaaaaaaa 300
aaaaaaaaa 309

```

<210> 36
 <211> 243
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

<400> 36
 aattcggntc gagctcgaat aagtttgact tgtgttttat cttaccacc agatcattcc 60
 ttctgtagct caggagagca cccctccacc ccatttgctc gcagtatcct agaattctttg 120
 tgctctcgct gcagttccct ttgggttcca tgttttcctt gttccctccc atgcctagct 180
 ggattgcaga gtttaagttta tgattatgaa ataaaaacta aataacaaaa aaaaaaaaaa 240
 aaa 243

<210> 37
 <211> 650
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

<400> 37
 aattcggcac gagtaccatt cagcctgaat ttgctagtgt aggcctctaaa tcaagtgtag 60
 ttccgtgtga acttgcctgc agaaccaggt gtgctttgaa gcaatgttgt gggacactac 120
 cacaagcccc ttctggaaaag gatgcagaaa agaccccagc agtttagcatt tcttgttttag 180
 aacttagtaa caatctagag aagaagcccc ggaggactaa agctgaaaae atccctgctg 240
 ttgtgataga gattaaaaac atgccaacaa aacaacctga atcatctttg tgagtcttga 300
 aaaagatgtg atatttgact ttgcttttaa actgcaagag gaaaaagact ccaactgaaat 360
 tctaagtttg ccaagttagt taattgaagt ccttgtctgg tcacacagtt taattctatt 420
 tttgtaagaa cataatggga ctgcataaca gaggttctata ttacaatttt gtgattatta 480
 gtacagagta cagctatgct gtgactgttt tggaaagcca gttttaacac tatgttacat 540
 ttttgnntaa agnaagttaa accttatata acntaatgac atttgatttc tggattttcc 600
 catgataaaa aattaggggg gataaataaa aatgggttact ggaatttcaa 650

<210> 38
 <211> 687
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

<400> 38
 gaattcggca cgagattttt ttatttttca ttttcccctt aggcataattt agtatttttc 60
 cctcaggcag atcattctga gtgtgagagt gtgtgtgac atgttacaaa ggcaactacc 120
 atgttaataa aatattcaat ttgaaatcct tttcgggtatt tgaattgctt ttgaataatg 180
 ttttttatct gvatgtaaca ttgttgcat agctttttta ctttcccag taattgaata 240
 cattttatta cttggacttt tataaactct ttccctacc actataaatg agcattcac 300
 agcgttcaag tttgtattaa aggaaggat tagtttgacc ccttcttttg atggttaatg 360
 catacatgca gttaaatccc tttatgcaaa tgtgacacty ctttactagg tcttttagtt 420
 atttatttat ttttttttt ttgnocantt nattttttan nntaatttct naaacncatt 480
 attttttttn aaaataaaaa aacacnactn tttnttttta anantaaac cttantaaat 540
 ttttcccccn aaaaaaatc ccntaanntt ttnaatttnt tgaattnaan annaantaaa 600
 cttttttnaa aaccnggcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

687

<210> 39

<211> 2549

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 39

gatggctcctt tccttctgcc acggggggat cggggactca cccagttgca agtgcgagca 60
 ctatggagta ggcgagggtc tgcgactgtg gccctggact taggcaacag gaaattagaa 120
 atatcctctg gaaagctggc cagatttgca gatggctctg ctgtagtaca gtcagggtgc 180
 actgcagtaa tggtcacagc ggtcagtaaa acaaaacctt ccccttccca gtttatgcct 240
 ttgggtgggtg actacagaca aaaagctgct gcagcaggta gaattcccac aaactatctg 300
 agaagagagg ttggtaactc tgataaagaa attctaacaa gtcgaataat agatcgttca 360
 attagaccgc tctttccagc tggctacttc tatgatcac aggttctgtg taatctgta 420
 gcagtagatg gtgtaaatga gcctgatgtc cttagcaatta atggcgcttc cgtagccctc 480
 tcattatcag atattccttg gaatggacct gttggggcag tacgaatagg aataattgat 540
 ggagaatag ttgttaacct aacaagaaaa gaaatgtctt ctagtacttt aaatttagtg 600
 gttgctggag cacctaaaag tcagattgtc atggttgaag cctctgcaga gaacatttta 660
 cagcaggact tttgccatgc tatcaaagtg ggagtgaaat ataccaca aataattcag 720
 ggcattcagc agttggtaaa agaaactggg gttaccaaga ggacacctca gaagttat 780
 accccttcgc cagagattgt gaaatatact cataaacttg ctatggagag actctatgca 840
 gtttttacag attacgagca tgacaaagt tccagagatg aagctgttaa casaataaga 900
 ttatagaccg aggaacaact aaaagaaaaa ttccagaag ccgatccata tgaataata 960
 gaatccttca atgttgttgc aaaggaagtt tttagaagta ttgtttgaa tgaatacaaa 1020
 aggtgcgatg gtcgggattt gacttcactt aggaatgtaa gttgtgaggt agatattgtt 1080
 aaaaccttc atggatcagc attatttcaa agaggacaaa cacagggtct ttgtaccggt 1140
 acatattgatt cattagaatc tggtatbaag tcagatcaag ttataacagc tataaatggg 1200
 ataaaagata aaaatctcat gctgcactac gagtttctct cttatgcaac taatgaaat 1260
 ggcaaagtca ctgggtttaa tagaagagaa cttgggcatg gtgctcttgc tgagaaagct 1320
 ttgtatcctg ttattcccag agattttctt ttoaccataa gagttacatc tgaagtccta 1380
 gagtcaaatg ggtcatcttc tatggcatct gcctgtggcg gaagtttagc attaatggat 1440
 tcagggggtc caatttcatc tgctgttgca ggcgtagcaa taggattggg caccaaaacc 1500
 gatcctgaga aggtgaaat agaagattat cytttgtgga cagatatttt gggaaattgaa 1560
 gattacaatg gtgacatgga cttcaaaata gctggcacta ataaaggaat aactgcatta 1620
 caggctgata ttaaattacc tggataacca ataaaaattg tgatggaggg tattcaacaa 1680
 gcttcagtgg caaaaaagga gatattaCag atcatgaaca aaactatttc aaaacctcga 1740
 gcactctagaa aagaaaatgg acctgttgta gaaactgttc aggttccatt atcaaaacga 1800
 gcaaaatttg ttggacctgg tggctataac ttaaaaaaac ttcaggctga aacagggtgta 1860
 actatttagtc aggtggatga agaaacgttt tctgtatttg caccaacacc cagtgttatg 1920
 catgaggcaa gagacttcat tactgaaatc tgcaaggatg atcaggagca gcaattagaa 1980
 tttggagcag tatataccgc cacaataact gaaatcagag atactgggtg aatggtaaaa 2040
 ttatattccaa atatgactgc ggtactgctt cataacacac aacttgataa cgaagatta 2100
 aacatcctac tgccttagga ttagaagttg gccaaagaaat tcagggtgaaa tactttggac 2160
 gtagccacgc cgtatggaaga atgaggettt ctcgaaaagt gcttcagtcg ccagctacaa 2220
 ccgtggctcag aactttgaat gacagaagta gtattgtaat gggagaacct atttcacagt 2280
 catcatctaa ttctcagtga tttttttttt ttaaagagaa ttctagaatt ctattttgtc 2340
 taggggtgatg tgctgtagag caacatttta gtagatcttc cattgtgtag atttctatat 2400

```

aatataaata cattttaatt atttgtacta aaatgctcat ttacatgtgc cattttttta 2460
attcgagtaa cccatatttg ttaattgta tttacattat aaatcaagaa atattttatta 2520
ttaaagtaa gtcatttata catctttaga 2549

```

```

<210> 40
<211> 649
<212> DNA
<213> Homo sapien

```

```

<400> 40
ttgaagatta caatgggtgac atggacttca aaatagctgg cactaataaa ggaataactg 60
cattacaggc cgatattaaa ttacctggaa taccaataaa aattgtgatg gaggctattc 120
aacaagcttc agtggcaaaa aaggagatat tacagatcat gaacaaaact atttcaaac 180
ctcgagcabc tagaaaagaa aatggacctg ttgtagaaac tgttcagggt ccattatcaa 240
aacgagcaaa atttgttgga cctgggtgct ataacttaaa aaaacttcag gctgaaacag 300
gtgtaactat tagtcagggt gatgaagaaa cgttttgtat ttgcaccaac acccagtggt 360
atgcatgagg caagaagact tcattactga atctgcaagg atgacagga gcagcaatta 420
gaatttggag cagtatatac cgcacaata actgaaatca gagatactgg tgaatggta 480
aaattatata caaatatgac tgcggtactg ctccataaca cacaacttga taacgaaga 540
ttaaaccatc tactgcccta ggattagaag ttggccaaga aattcagggt aaatactttg 600
gactgtgacc cagccgatgg aagaatgagg cttctctgaa aagtgcctc 649

```

```

<210> 41
<211> 638
<212> DNA
<213> mouse

```

```

<400> 41
aatggtgaca tggatttcaa aatagccggt acaataaag gaataactgc attacaggct 60
gatattaagt tacctggagt accaattaaa attataatgg aagccatcca acaagcgtca 120
gtggcaaaga aggagatact gcagataatg aacaaacgat ttcaaaacct cgagcatcaa 180
gaaaagaaa tggaccagtt gtagaaacag taaagggtcc attatcaaaa cgagcaaat 240
tcgttggggc tgggtggatat cacttaaaaa aactccaggc tgagacaggt gtaacaatta 300
gtcaggttga tgaagaaacc ttctccatat ttgcaccaac acctactgca atgcatgaag 360
caagagattt cattacagaa atttgcagag atgatcaaga gcaacaatta gaatttggag 420
cagtttatac cgcgacaata actgaaatca gagacactgg agtgatggta aaactgtatc 480
caaacatgac tgcagtgctg ctccataatt cacaacttga ccaacgaaag attaaacatc 540
ccactgccct aggactagag gtggccaaga aattcaggtc aaatactttg gccgtgatcc 600
agctgatgga agaattgaggc tttctctgaa agtacttc 638

```

```

<210> 42
<211> 705
<212> PRT
<213> Homo sapien

```

```

<400> 42
Asp Gly Pro Phe Leu Leu Pro Arg Arg Asp Arg Ala Leu Thr Gln Leu
1 5 10 15

```

Gln Val Arg Ala Leu Trp Ser Ser Ala Gly Ser Arg Ala Val Ala Val
 20 25 30
 Asp Leu Gly Asn Arg Lys Leu Glu Ile Ser Ser Gly Lys Leu Ala Arg
 35 40 45
 Phe Ala Asp Gly Ser Ala Val Val Gln Ser Gly Asp Thr Ala Val Met
 50 55 60
 Val Thr Ala Val Ser Lys Thr Lys Pro Ser Pro Ser Gln Phe Met Pro
 65 70 75 80
 Leu Val Val Asp Tyr Arg Gln Lys Ala Ala Ala Gly Arg Ile Pro
 85 90 95
 Thr Asn Tyr Leu Arg Arg Glu Val Gly Thr Ser Asp Lys Glu Ile Leu
 100 105 110
 Thr Ser Arg Ile Ile Asp Arg Ser Ile Arg Pro Leu Phe Pro Ala Gly
 115 120 125
 Tyr Phe Tyr Asp Thr Gln Val Leu Cys Asn Leu Leu Ala Val Asp Gly
 130 135 140
 Val Asn Glu Pro Asp Val Leu Ala Ile Asn Gly Ala Ser Val Ala Leu
 145 150 155 160
 Ser Leu Ser Asp Ile Pro Trp Asn Gly Pro Val Gly Ala Val Arg Ile
 165 170 175
 Gly Ile Ile Asp Gly Glu Tyr Val Val Asn Pro Thr Arg Lys Glu Met
 180 185 190
 Ser Ser Ser Thr Leu Asn Leu Val Val Ala Gly Ala Pro Lys Ser Gln
 195 200 205
 Ile Val Met Leu Glu Ala Ser Ala Glu Asn Ile Leu Gln Gln Asp Phe
 210 215 220
 Cys His Ala Ile Lys Val Gly Val Lys Tyr Thr Gln Gln Ile Ile Gln
 225 230 235 240
 Gly Ile Gln Gln Leu Val Lys Glu Thr Gly Val Thr Lys Arg Thr Pro
 245 250 255
 Gln Lys Leu Phe Thr Pro Ser Pro Glu Ile Val Lys Tyr Thr His Lys
 260 265 270

Leu Ala Met Glu Arg Leu Tyr Ala Val Phe Thr Asp Tyr Glu His Asp
 275 280 285

Lys Val Ser Arg Asp Glu Ala Val Asn Lys Ile Arg Leu Asp Thr Glu
 290 295 300

Glu Gln Leu Lys Glu Lys Phe Pro Glu Ala Asp Pro Tyr Glu Ile Ile
 305 310 315 320

Glu Ser Phe Asn Val Val Ala Lys Glu Val Phe Arg Ser Ile Val Leu
 325 330 335

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

Val Ser Cys Glu Val Asp Met Phe Lys Thr Leu His Gly Ser Ala Leu
 355 360 365

Phe Gln Arg Gly Gln Thr Gln Val Leu Cys Thr Val Thr Phe Asp Ser
 370 375 380

Leu Glu Ser Gly Ile Lys Ser Asp Gln Val Ile Thr Ala Ile Asn Gly
 385 390 395 400

Ile Lys Asp Lys Asn Phe Met Leu His Tyr Glu Phe Pro Pro Tyr Ala
 405 410 415

Thr Asn Glu Ile Gly Lys Val Thr Gly Leu Asn Arg Arg Glu Leu Gly
 420 425 430

His Gly Ala Leu Ala Glu Lys Ala Leu Tyr Pro Val Ile Pro Arg Asp
 435 440 445

Phe Pro Phe Thr Ile Arg Val Thr Ser Glu Val Leu Glu Ser Asn Gly
 450 455 460

Ser Ser Ser Met Ala Ser Ala Cys Gly Gly Ser Leu Ala Leu Met Asp
 465 470 475 480

Ser Gly Val Pro Ile Ser Ser Ala Val Ala Gly Val Ala Ile Gly Leu
 485 490 495

Val Thr Lys Thr Asp Pro Glu Lys Gly Glu Ile Glu Asp Tyr Arg Leu
 500 505 510

Leu Thr Asp Ile Leu Gly Ile Glu Asp Tyr Asn Gly Asp Met Asp Phe
 515 520 525

Lys Ile Ala Gly Thr Asn Lys Gly Ile Thr Ala Leu Gln Ala Asp Ile
530 535 540

Lys Leu Pro Gly Ile Pro Ile Lys Ile Val Met Glu Ala Ile Gln Gln
545 550 555 560

Ala Ser Val Ala Lys Lys Glu Ile Leu Gln Ile Met Asn Lys Thr Ile
565 570 575

Ser Lys Pro Arg Ala Ser Arg Lys Glu Asn Gly Pro Val Val Glu Thr
580 585 590

Val Glu Val Pro Leu Ser Lys Arg Ala Lys Phe Val Gly Pro Gly Gly
595 600 605

Tyr Asn Leu Lys Lys Leu Gln Ala Glu Thr Gly Val Thr Ile Ser Gln
610 615 620

Val Asp Glu Glu Thr Phe Ser Val Phe Ala Pro Thr Pro Ser Val Met
625 630 635 640

His Glu Ala Arg Asp Phe Ile Thr Glu Ile Cys Lys Asp Asp Gln Glu
645 650 655

Gln Gln Leu Glu Phe Gly Ala Val Tyr Thr Ala Thr Ile Thr Glu Ile
660 665 670

Arg Asp Thr Gly Val Met Val Lys Leu Tyr Pro Asn Met Thr Ala Val
675 680 685

Leu Leu His Asn Thr Gln Leu Asp Asn Glu Arg Leu Asn Ile Leu Leu
690 695 700

Pro
705

<210> 43
<211> 665
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 43
Met Gly Gln Glu Lys His Val Phe Thr Ile Asp Trp Ala Gly Arg Thr
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Val Asn Tyr Glu Glu Arg Leu Tyr Ala Val Gly Lys

20			25			30									
Ile	Pro	Gly	Gly	Phe	Ile	Lys	Arg	Glu	Gly	Arg	Pro	Ser	Glu	Lys	Ala
		35					40					45			
Val	Leu	Ala	Ser	Arg	Leu	Ile	Asp	Arg	Pro	Ile	Arg	Pro	Leu	Phe	Ala
		50				55						60			
Asp	Gly	Phe	Arg	Asn	Glu	Val	Gln	Val	Ile	Ser	Ile	Val	Met	Ser	Val
		65			70					75					80
Asp	Gln	Asn	Cys	Ser	Ser	Glu	Met	Ala	Ala	Met	Phe	Gly	Ser	Ser	Leu
				85						90				95	
Ala	Leu	Ser	Val	Ser	Asp	Ile	Pro	Phe	Glu	Gly	Pro	Ile	Ala	Gly	Val
			100					105					110		
Thr	Val	Gly	Arg	Ile	Asp	Asp	Gln	Phe	Ile	Ile	Asn	Pro	Thr	Val	Asp
		115					120					125			
Gln	Leu	Glu	Lys	Ser	Asp	Ile	Asn	Leu	Val	Val	Ala	Gly	Thr	Lys	Asp
		130					135				140				
Ala	Ile	Asn	Met	Val	Glu	Ala	Gly	Ala	Asp	Glu	Val	Pro	Glu	Glu	Ile
		145			150					155					160
Met	Leu	Glu	Ala	Ile	Met	Phe	Gly	His	Glu	Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Ile
				165						170				175	
Ala	Phe	Gln	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Ala	Val	Gly	Lys	Glu	Lys	Ser	Glu
			180					185					190		
Ile	Lys	Leu	Phe	Glu	Ile	Asp	Glu	Glu	Leu	Asn	Glu	Lys	Val	Lys	Ala
		195					200					205			
Leu	Ala	Glu	Glu	Asp	Leu	Leu	Lys	Ala	Ile	Gln	Val	His	Glu	Lys	His
		210					215				220				
Ala	Arg	Glu	Asp	Ala	Ile	Asn	Glu	Val	Lys	Asn	Ala	Val	Val	Ala	Lys
		225			230					235					240
Phe	Glu	Asp	Glu	Glu	His	Asp	Glu	Asp	Thr	Ile	Lys	Gln	Val	Lys	Gln
			245						250					255	
Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Val	Lys	Asn	Glu	Val	Arg	Arg	Leu	Ile	Thr	Glu
			260					265					270		
Glu	Lys	Val	Arg	Pro	Asp	Gly	Arg	Gly	Val	Asp	Gln	Ile	Arg	Pro	Leu

275	280	285
Ser Ser Glu Val Gly Leu Leu Pro Arg Thr His Gly Ser Gly Leu Phe 290	295	300
Thr Arg Gly Gln Thr Gln Ala Leu Ser Val Cys Thr Leu Gly Ala Leu 305	310	315
Gly Asp Val Gln Ile Leu Asp Gly Leu Gly Val Glu Glu Ser Lys Arg 325	330	335
Phe Met His His Tyr Asn Phe Pro Gln Phe Ser Val Gly Glu Thr Gly 340	345	350
Pro Met Arg Gly Pro Gly Arg Arg Glu Ile Gly His Gly Ala Leu Gly 355	360	365
Glu Arg Ala Leu Glu Pro Val Ile Pro Ser Glu Lys Asp Phe Pro Tyr 370	375	380
Thr Val Arg Leu Val Ser Glu Val Leu Glu Ser Asn Gly Ser Thr Ser 385	390	395
Gln Ala Ser Ile Cys Ala Ser Thr Leu Ala Met Met Asp Ala Gly Val 405	410	415
Pro Ile Lys Ala Pro Val Ala Gly Ile Ala Met Gly Leu Val Lys Ser 420	425	430
Gly Glu His Tyr Thr Val Leu Thr Asp Ile Gln Gly Met Glu Asp Ala 435	440	445
Leu Gly Asp Met Asp Phe Lys Val Ala Gly Thr Glu Lys Gly Val Thr 450	455	460
Ala Leu Gln Met Asp Ile Lys Ile Glu Gly Leu Ser Arg Glu Ile Leu 465	470	475
Glu Glu Ala Leu Gln Gln Ala Lys Lys Gly Arg Met Glu Ile Leu Asn 485	490	495
Ser Met Leu Ala Thr Leu Ser Glu Ser Arg Lys Glu Leu Ser Arg Tyr 500	505	510
Ala Pro Lys Ile Leu Thr Met Thr Ile Asn Pro Asp Lys Ile Arg Asp 515	520	525
val Ile Gly Pro Ser Gly Lys Gln Ile Asn Lys Ile Ile Glu Glu Thr		

530	535	540
Gly Val Lys Ile Asp Ile Glu Gln Asp Gly Thr Ile Phe Ile Ser Ser		
545	550	555 560
Thr Asp Glu Ser Gly Asn Gln Lys Ala Lys Lys Ile Ile Glu Asp Leu		
	565	570 575
Val Arg Glu Val Glu Val Gly Gln Leu Tyr Leu Gly Lys Val Lys Arg		
	580	585 590
Ile Glu Lys Phe Gly Ala Phe Val Glu Ile Phe Ser Gly Lys Asp Gly		
	595	600 605
Leu Val His Ile Ser Glu Leu Ala Leu Glu Arg Val Gly Lys Val Glu		
	610	615 620
Asp Val Val Lys Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val Lys Val Thr Glu Ile		
	625	630 635 640
Asp Lys Gln Gly Arg Val Asn Leu Ser Arg Lys Ala Val Leu Arg Glu		
	645	650 655
Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Gln Ser		
	660	665
<210> 44		
<211> 704		
<212> PRT		
<213> Homo sapien		
<400> 44		
Asp Gly Pro Phe Leu Leu Pro Arg Arg Asp Arg Ala Leu Thr Gln Leu		
1	5	10 15
Gln Val Arg Ala Leu Trp Ser Ser Ala Gly Ser Arg Ala Val Ala Val		
	20	25 30
Asp Leu Gly Asn Arg Lys Leu Glu Ile Ser Ser Gly Lys Leu Ala Arg		
	35	40 45
Phe Ala Asp Gly Ser Ala Val Val Gln Ser Gly Asp Thr Ala Val Met		
	50	55 60
Val Thr Ala Val Ser Lys Thr Lys Pro Ser Pro Ser Gln Phe Met Pro		
	65	70 75 80

Leu Val Val Asp Tyr Arg Gln Lys Ala Ala Ala Ala Gly Arg Ile Pro
 85 90 95

Thr Asn Tyr Leu Arg Arg Glu Val Gly Thr Ser Asp Lys Glu Ile Leu
 100 105 110

Thr Ser Arg Ile Ile Asp Arg Ser Ile Arg Pro Leu Phe Pro Ala Gly
 115 120 125

Tyr Phe Tyr Asp Thr Gln Val Leu Cys Asn Leu Leu Ala Val Asp Gly
 130 135 140

Val Asn Glu Pro Asp Val Leu Ala Ile Asn Gly Ala Ser Val Ala Leu
 145 150 155 160

Ser Leu Ser Asp Ile Pro Trp Asn Gly Pro Val Gly Val Arg Ile Gly
 165 170 175

Ile Ile Asp Gly Glu Tyr Val Val Asn Pro Thr Arg Lys Glu Met Ser
 180 185 190

Ser Ser Thr Leu Asn Leu Val Val Ala Gly Ala Pro Lys Ser Gln Ile
 195 200 205

Val Met Leu Glu Ala Ser Ala Glu Asn Ile Leu Gln Gln Asp Phe Cys
 210 215 220

His Ala Ile Lys Val Gly Val Lys Tyr Thr Gln Gln Ile Ile Gln Gly
 225 230 235 240

Ile Gln Gln Leu Val Lys Glu Thr Gly Val Thr Lys Arg Thr Pro Gln
 245 250 255

Lys Leu Phe Thr Pro Ser Pro Glu Ile Val Lys Tyr Thr His Lys Leu
 260 265 270

Ala Met Glu Arg Leu Tyr Ala Val Phe Thr Asp Tyr Glu His Asp Lys
 275 280 285

Val Ser Arg Asp Glu Ala Val Asn Lys Ile Arg Leu Asp Thr Glu Glu
 290 295 300

Gln Leu Lys Glu Lys Phe Pro Glu Ala Asp Pro Tyr Glu Ile Ile Glu
 305 310 315 320

Ser Phe Asn Val Val Ala Lys Glu Val Phe Arg Ser Ile Val Leu Asn
 325 330 335

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

Gln Val Pro Leu Ser Lys Arg Ala Lys Phe Val Gly Pro Gly Gly Tyr
595 600 605

Asn Leu Lys Lys Leu Gln Ala Glu Thr Gly Val Thr Ile Ser Gln Val
610 615 620

Asp Glu Glu Thr Phe Ser Val Phe Ala Pro Thr Pro Ser Val Met His
625 630 635 640

Glu Ala Arg Asp Phe Ile Thr Glu Ile Cys Lys Asp Asp Gln Glu Gln
645 650 655

Gln Leu Glu Phe Gly Ala Val Tyr Thr Ala Thr Ile Thr Glu Ile Arg
660 665 670

Asp Thr Gly Val Met Val Lys Leu Tyr Pro Asn Met Thr Ala Val Leu
675 680 685

Leu His Asn Thr Gln Leu Asp Asn Glu Arg Leu Asn Ile Leu Leu Pro
690 695 700

<210> 45
<211> 245
<212> PRT
<213> B subtilis

<400> 45
Asp Arg Leu Gly Leu Ala Ala Gly Gly Asp Thr Ala Val Thr Ala Pro
1 5 10 15

Pro Phe Pro Leu Val Tyr Ala Gly Ile Pro Arg Glu Ser Lys Leu Ser
20 25 30

Arg Ile Asp Arg Ile Arg Pro Leu Phe Gly Gln Val Val Asp Ala Gly
35 40 45

Ser Ala Leu Ser Ser Asp Ile Gly Pro Val Gly Ile Asp Asn Pro Thr
50 55 60

Ser Asn Leu Val Val Ala Gly Lys Ile Met Glu Ala Ala Ala Ile Gly
65 70 75 80

Ile Val Gly Lys Lys Leu Phe Glu Leu Ala Glu Leu Glu Lys Glu Val
85 90 95

Glu Val Arg Ile Glu Arg Asp Gly Arg Arg Ser Glu Val His Gly Ser
 100 105 110
 Leu Phe Arg Gly Gln Thr Gln Leu Thr Leu Asp Lys Phe Met His Tyr
 115 120 125
 Phe Pro Glu Gly Gly Arg Arg Glu Gly His Gly Ala Leu Glu Ala Leu
 130 135 140
 Pro Val Ile Pro Asp Phe Pro Thr Arg Ser Glu Val Leu Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Ala Ser Cys Leu Ala Met Asp Gly Val Pro Ile Val Ala
 165 170 175
 Gly Ala Gly Leu Val Glu Tyr Leu Thr Asp Ile Gly Glu Asp Gly Asp
 180 185 190
 Met Asp Phe Lys Ala Gly Thr Lys Gly Thr Ala Leu Gln Asp Ile Lys
 195 200 205
 Gly Ile Glu Ala Gln Gln Ala Glu Ile Leu Met Thr Ser Arg Pro Thr
 210 215 220
 Lys Gly Pro Gly Lys Glu Thr Gly Val Ile Thr Ser Ala Ile Gln Leu
 225 230 235 240
 Gly Val Lys Leu Glu
 245

<210> 46

<211> 47

<212> RNA

<213> Homo sapien

<400> 46

uauuuuuuuuu auuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu
 47

<210> 47

<211> 11

<212> RNA

<213> Homo sapien

<400> 47

uuuuuuuuuuu a
 11

```

<210> 48
<211> 33
<212> RNA
<213> Homo sapien

<400> 48
uuuuuuuuuu aaauuuuuuu uuuuuuuuuu aau                               33

<210> 49
<211> 62
<212> RNA
<213> Homo sapien

<400> 49
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu gauggauucu cagauuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uu                                                                                   62

<210> 50
<211> 111
<212> RNA
<213> Homo sapien

<400> 50
uuuuuacaugu gccauuuuuu uauuucgagu aaccuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu 111
uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu

```

【図面の簡単な説明】

【図 1】

IFN- γ または IFN- γ +MEZ 処理したヒトメラノーマ細胞 HO-1、若年ヒト繊維芽細胞、および二種の異なるタイプの老化ヒト早老症繊維芽細胞における OId-35 の発現を示す電気泳動写真。ノーザンブロットは、未処理 HO-1 のコントロール（レーン 1）、IFN- γ 処理（2000U/ml）HO-1（レーン 2）、IFN- γ +MEZ 処理（2000U/ml+10ng/ml）HO-1（レーン 3）、若年繊維芽細胞（GM01379）（レーン 4）、および二種の老化早老症細胞株（AG01976）（レーン 5）（AG0989B）（レーン 6）由来の全 RNA を 10 μ g の含む。オートラジオグラフィーに 1、4、または 24 時間さらしてブロットした。ロードしたゲルを定量と、および RNA の質を測定するために、EtBr 染色した。

【図 2】

IFN- γ 、IFN- β 、IFN- α 、TNF- α 、および IFN- γ +MEZ が HO-1 細胞における OId-35 の発現に及ぼす効果を示した電気泳動写真。全てのノーザンブロットには、全 RNA が 10mg 含まれる。

(A) HO-1 細胞における、IFN- γ による OId-35 誘導の経時変化。細胞は ~60% コンフルエントにまいて、IFN- γ （2000units/ml）処理して、示した時間に R

NAを単離した。U = コントロールの未処理細胞由来のRNA。

(B) IFN- γ (2000units/ml) 処理されたH0-1細胞におけるOId - 35の発現の濃度応答性。

(C) IFN- α (1), IFN- β (1), IFN- γ (1)、およびTNF- α (T) がH0-1細胞におけるOId - 35の発現に及ぼす影響。RNAは、100units/mlの様々な試薬で処理してから15時間後に単離した。U = コントロールの未処理細胞由来のRNA。

(D) H0-1細胞における、IFN- γ +MEZによるOId - 35誘導の経時変化。RNAは、2000units/mlのIFN- γ +10ng/mlのMEZで処理した細胞から単離した。

【図3】

様々なヒト組織およびマウス発生時におけるOId - 35の発現を示した電気泳動写真。

(A) ノーザンプロットには、8種の異なったヒト組織由来のポリA⁺RNAを一レーンあたり2 μ g含む。レーン1-8は、順に、ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、および膵臓由来のRNAを含む(Clontech)。

(B) ノーザンプロットには、マウス胚由来の全RNAを10 μ g含む。日数は、妊娠後の日数を示す。

【図4A】

ヒトOId - 35とマウス相同体の配列を比較した図。上段の配列はヒトOId - 35 (h - OId - 35) ; 中段 : マウスOId - 35の配列 (m - OId - 35) ; および下段 : ヒトとマウスOId - 35で共有された一致配列。

【図4B】

ヒトOId - 35とマウス相同体の配列を比較した図。上段の配列はヒトOId - 35 (h - OId - 35) ; 中段 : マウスOId - 35の配列 (m - OId - 35) ; および下段 : ヒトとマウスOId - 35で共有された一致配列。

【図5】

Dex存在下または非存在下におけるIDH4細胞内のOId - 35の発現を示す電気泳動写真。ノーザンプロットには、IDH4細胞由来の全RNAを一レーンあたり10 μ g含む。+Dex = 10⁻⁶M Dexの存在下で持続的に培養した細胞 ; -Dex = Dexの非存在下で示

した日数培養した細胞。後者の実験では、Dexの存在下で細胞を培養した後、活性炭で除去した培地に移して、3、5、7および14日間Dexなしで培養した。

【図6】

細胞周期が進行する際のヒト皮膚繊維芽細胞におけるO1d - 35およびp21の発現を示した電気泳動写真。ノーザンブロットには、ヒト正常繊維芽細胞由来の全RNAを一レーンあたり10 μ g含む。コンフルエントの正常繊維芽細胞(C)をトリブシン処理して、(1:2)で再びまき直した。まき直した後5、15、および20時間後に全RNAを回収した。サブカルチャーして20時間後、前記細胞は90%コンフルエントであった。

【図7】

いくつかのリンホカインおよび原癌遺伝子mRNAの3'非翻訳領域で見出されたAUリッチ配列の図。略語：Hu-human, GM-CSF = 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子；IFN - = インターフェロン；IL-2 = インターロイキン2；TNF = 腫瘍壊死因子；c-fos = fos原癌遺伝子。下線/上線はAUUAモチーフは、示された全てのmRNAに共通な最大の配列である。参照文献：HuGM-CSF (Wong et al., 1985)、HuIFN - (Goeddel et al., 1983)、Hu IL2 (Kashima et al., 1985)、HuTNF (Nedwin et al., 1985)、Huc-fos (von Straaten et al., 1983)。

【図8】

サイクロヘキシミド処理したH0-1細胞におけるO1d - 35の発現に及ぼす効果、およびIFN - +MEZ処理したH0-1細胞におけるO1d - 35 RNAの半減期を示す電気泳動写真。

ノーザンブロットの各レーンには、10 μ gの前RNAを含む。

(A) H0-1細胞は50mg/mlのサイクロヘキシミドで30分間前処理し、その後IFN - で2、3、または4時間(それぞれレーン2、3、および4)処理した。H0-1細胞をIFN - で5時間処理して(レーン5)、その後サイクロヘキシミドで15時間処理した(レーン6)。U = コントロールの未処理H0-1細胞由来のRNA。

(B) IFN - +MEZ (IM) (2000units/ml+10ng/ml) 処理したH0-1細胞のO1d - 35 mRNAの半減期。細胞をIMと15時間インキュベートした後、ActD (50mg/ml) に2、6、8、10、および12時間さらした。U = コントロールの未処理H0-1細胞由来のR

NA。AD = ActD (5 µg/ml) 処理したコントロールのHO-1細胞由来のRNA。

【図9A】

01d - 35のDNA配列およびコードされる予想タンパク質を示す図。

(A) 01d - 35のcDNA配列。オルターナティブなポリアデニル化部位に下線を引いた。この部位は、全てのcDNAの10%に存在する (Manley et al., 1988)。

【図9B】

01d - 35のDNA配列およびコードされる予想タンパク質を示す図。

(B) 01d - 35 cDNAによってコードされる予想タンパク質。

【図10A】

細菌タンパク質PNPaseと01d - 35の予想タンパク質配列間の配列相同性を示す図。上段：Bacillus subtilis PNPase配列。中段：ヒト01d - 35の予想タンパク質配列。下段：細菌タンパク質PNPaseと01d - 35の予想タンパク質配列間で一致する配列。黒い箱の領域は、細菌タンパク質PNPaseと01d - 35の予想タンパク質配列間のアミノ酸の一致を示し、灰色の箱の領域は、アミノ酸の類似を示す。

【図10B】

細菌タンパク質PNPaseと01d - 35の予想タンパク質配列間の配列相同性を示す図。上段：Bacillus subtilis PNPase配列。中段：ヒト01d - 35の予想タンパク質配列。下段：細菌タンパク質PNPaseと01d - 35の予想タンパク質配列間で一致する配列。黒い箱の領域は、細菌タンパク質PNPaseと01d - 35の予想タンパク質配列間のアミノ酸の一致を示し、灰色の箱の領域は、アミノ酸の類似を示す。

【図11】

HO-1、コンフルエントHO-1, IFN - 処理、IFN - +MEZ処理されたHO-1をアクチノマイシンD (50mg/ml) 処理したノーザンブロットを示す電気泳動写真。全RNAはAD処理して2、4、6、8、10、12時間後に回収した。01d - 35 cDNAをプローブとして使用した。臭化エチジウムをローディングコントロールとして示した。

【図12】

IDH4およびAR5細胞のノーザンブロットを示す電気泳動写真。IDH4細胞は、デキサメタゾン (DEX) で誘導可能なマウス母系性腫瘍ウイルス由来シミアンウイルス40 T抗原を含む。全RNAはDex処理した細胞 (+として示した) から、および

Dexなしで3、5、7、および14日培養した細胞から抽出した。AR5細胞は、温度感受性のシミアンウイルス40 T抗原を含む。全RNAは、35 並びに39 に移動して、1、3、7、14日間後の細胞から回収した。O1d - 35およびp21をプローブとして使用した。

【図13】

O1d - 35遺伝子の構造を示す図。RNasePH、KH、S1は、O1d - 35 cDNAに見出された領域を示す。上の図は、3' UTR領域の長さが異なる二種の異なったバージョンのO1d - 35を示す。下の図は、C-ORF技術を使用したO1d - 35 cDNAのクローニングを示す。

【図14】

HeLa細胞におけるGFP - O1d - 35およびGFP単独の局在を示す図。

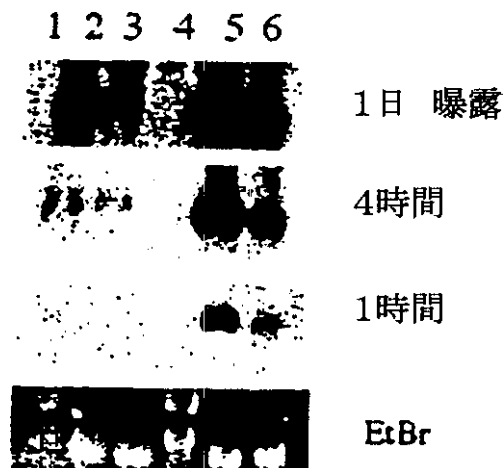
【図15】

マウスO1d - 35を使用したマウス胚(9.5日)のインサイチュウハイブリダイゼーションを示す図。矢印は、脊柱における発現を示す。

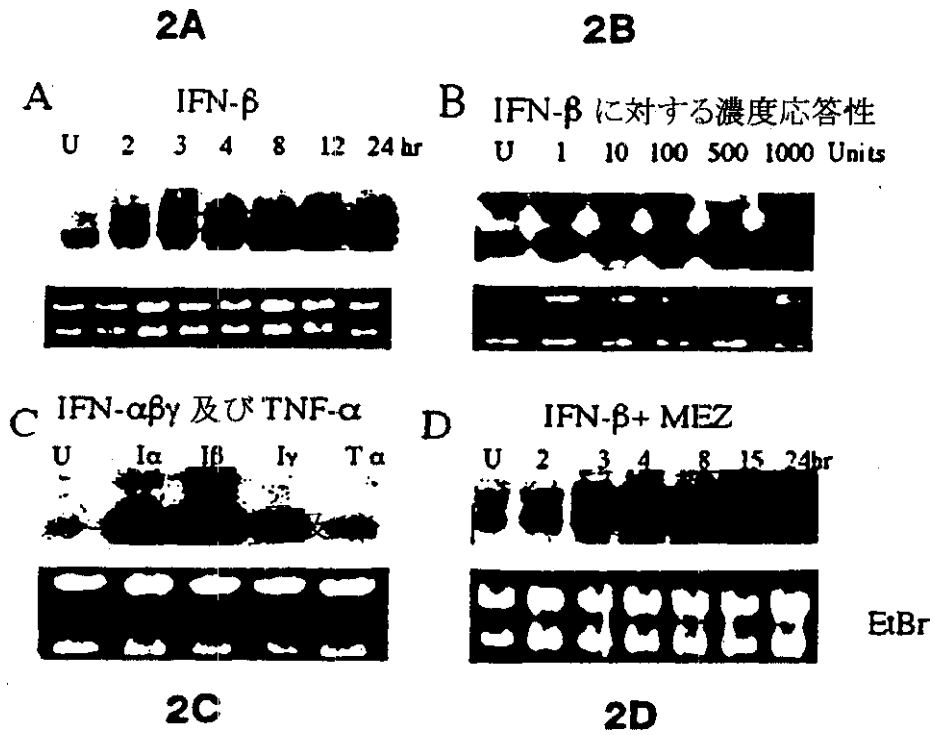
【図16】

様々なサブタイプのIFN - 処理したH0-1細胞のノーザンプロットの電気泳動写真。O1d - 35をプローブとして使用した。IFN - をコントロールとして使用した。

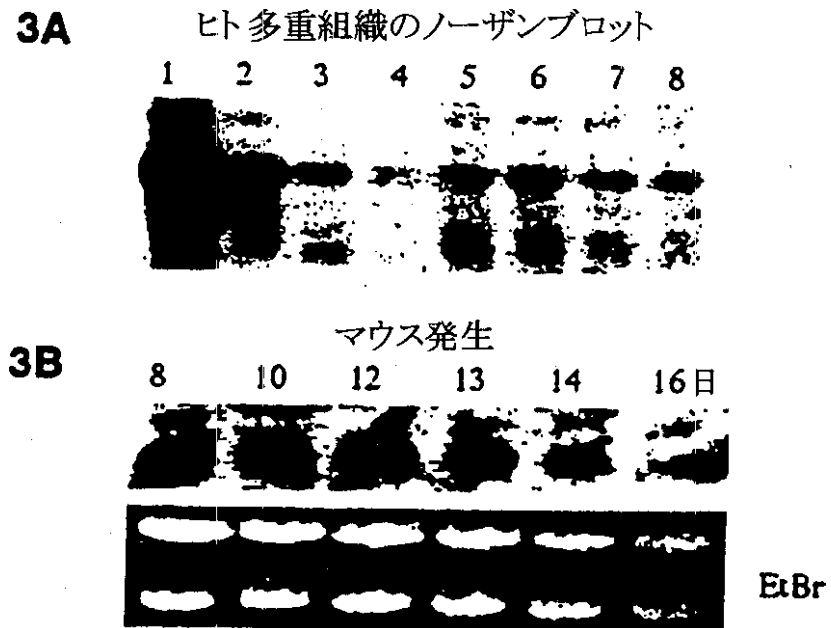
【図1】



【図2】



【図3】



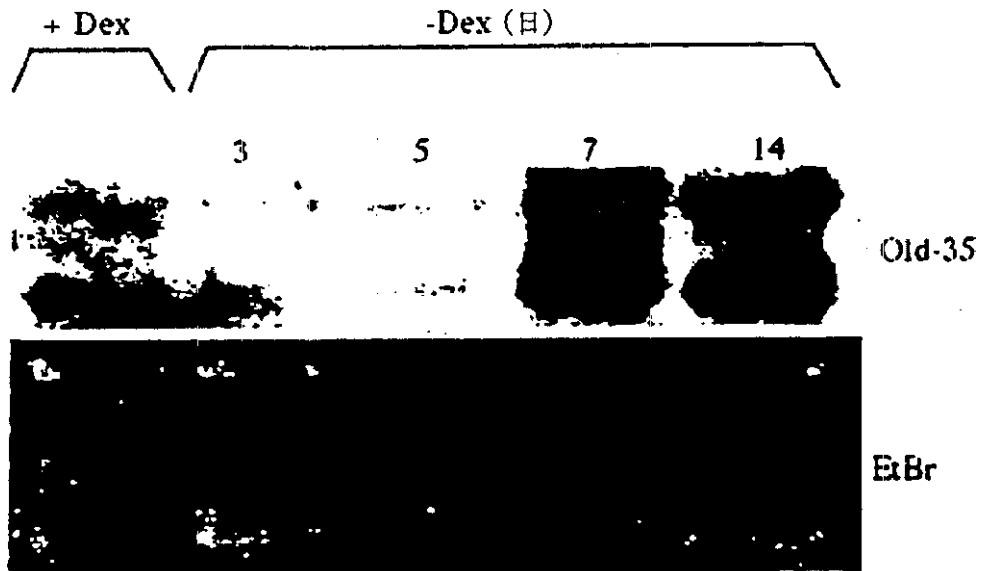
【図4A】

ヒト	TTGAAGATTACAATGGTGACATGGACTTCAAATAGCTGG	40
マウスAATGGTGACATGGATTCAAATAGCCGG	29
一致	aatggtgacatgga ttcaaatagc gg	
ヒト	CACAAATAAAGGAATAACTGCATTACAGGCTGATATTA	80
マウス	TACAAATAAAGCAATAACTGCATTACAGGCTGATATTA	69
一致	ac aataaaggaataactgcattacaggctgatattaa	
ヒト	TTACCTGGAAATACCAATAAAAATTGTGATGGAGGCTATTC	120
マウス	TTACCTGGAGTACCAATTAATAATGGAAGCCATCC	109
一致	ttacctgga taccaat aaaatt t atgga gc at c	
ヒト	AACAAGCCTCAGTGGCAAAAAGGAGATAATACAGATCAT	160
マウス	AACAAGCCTCAGTGGCAAAAGAGGAGATACTGCAGATAAT	149
一致	aacaagc tcagtggcaaa aaggagata t cagat at	
ヒト	GAACAAAACATTTCAAACCTCGAGCATCAGAAAAGAA	200
マウス	GAACAAAACGATTTCAAACCTCGAGCATCAGAAAAGAA	189
一致	gaacaaaac atttcaaacctcgagcatc agaaaagaa	
ヒト	AATGGACCCTGTTGTAGAAACGTTCAGGTCCATTATCAA	240
マウス	AATGGACCACTTGTAGAAACACTAAAGGTCCATTATCAA	229
一致	aatggacc gttgtagaac gt aggttccattatcaa	
ヒト	AACGAGCAAATTTGTTGCACTGGTGGCTATAACTTAAA	280
マウス	AACGAGCAAATTTCTTGGCCCTGGTGGATATCACTTAAA	269
一致	aacgagcaaaatt gttgg cctggtgg tat acttaa	
ヒト	AAAACCTCAGGCTGAAACAGGTGTAACATTAGTCAGGTG	320
マウス	AAAACCTCAGGCTGAGACAGGTGTAACAATTAGTCAGGTT	309
一致	aaaact caggetga acaggtgtaac attagtcaggt	
ヒト	GATGAAGAAACGTTTCTCTGATTTGCACCAACACCCACTG	360
マウス	GATGAAGAAACCTTCTCCATATTTGCACCAACACCTACTG	349
一致	gatgaagaaac tt ct tatttgcaccaacacc a tg	
ヒト	TTATGCATGAGGCAAGAGACTTCATTACTGAAATCTGCAA	400
マウス	CAATGCATGAGCAAGAGATTTTCATTACAGAAATTTGCCAG	389
一致	atgcatga gcaagaga ttcattac gaaat tgca	
ヒト	GGATGATCAGGAGCAACAATTAGAATTTGGAGCAGTATAT	440
マウス	AGATGATCAAGAGCAACAATTAGAATTTGGAGCAGTATAT	429
一致	gatgatca gagca caattagaat ttggagcagt tat	
ヒト	ACCGCGACAATAACTGAAATCAGAGATACTGGTGTAAATGG	480
マウス	ACCGCGACAATAACTGAAATCAGAGACACTGGAGTGATGG	469
一致	accgc acaataactgaaatcagaga actgg gt atgg	

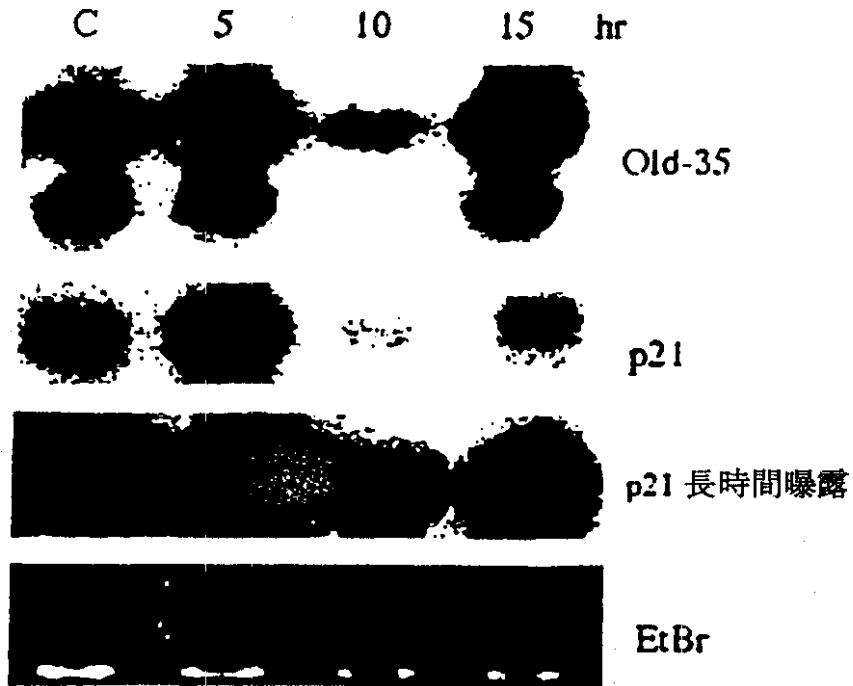
【図4B】

ヒト	TAAAAATATATCCAAATATGACTGGCGTACTGCTTCATAA	520
マウス	TAAAACTGTATCCAAACATGACTGCAGTGCTGCTTCATAA	509
一致	taaaa t tatccaaa atgactgc gt ctgcttcataa	
ヒト	CACACAACCTTGAT.AACGAAAGATTAAACATCCACTGCC	559
マウス	TTCACAACCTTGACC AACGAAAGATTAAACATCCACTGCC	549
一致	cacaacttga aacgaaagattaaacatcc actgcc	
ヒト	CTAGGATTAGAAGTTGGCCAAGAAATTCAGGTCAAATACT	599
マウス	CTAGGACTAGAGGTTGGCCAAGAAATTCAGGTCAAATACT	589
一致	ctagga taga gttggccaagaaattcaggt aaatact	
ヒト	TTGGACGTGACCCAGCCGATGGAAGAATGAGGCCTTTCTCG	639
マウス	TTGGCCGTGATCCAGCTGATGGAAGAATGAGGCCTTTCTCG	629
一致	ttgg cgtga ccagc gatggaagaatgaggcctttctcg	
ヒト	AAAAGTCTTC	650
マウス	TAAAGTACTTC	640
一致	aaagt cttc	

【図5】



【図6】



【図7】

Hu GM-CSF UAAUAUUUAUAUAUUUAUAUUUUAAAAUAUUUAUUUAUUUAUUUAA

Hu IFN- α UAUUUAUUUAA

Hu IL2 UAUUUAUUUAAAAUAUUUAAAUUUUUAAUUUAAU

Hu TNF AAUUAUUUAUUAUUUAUUUAUUAUUUAUUUAAU

C-fos GUUUUAAUUUAUUUAUUAAGAUGGAUUCUCAGAUAUUUAUAUUUUUU

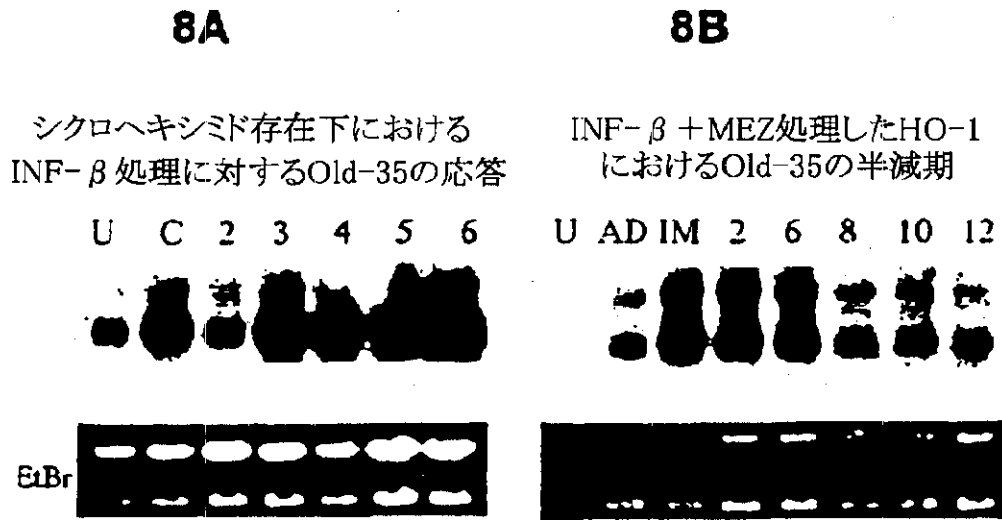
 AUUUUAUUUUUUUU

Old-35 AUUUACAUGUGCCAUUUUUUAAUUCGAGUAACCCAUAUUUGUUUAAUU

 GUAUUUACAUUUAUUUUCAAGAAAUAUUUAUUUUUUAAAAGUAAGUC

AUUUAUACAUCUAGA

【図8】



【図 9 A】

GATGGTCCTT TCCTTCTGCC ACGGCGGGAT CGGGCACTCA CCCAGTTGCA
 AGTGCAGCA CTATGGAGTA GCGCAGGGTC TCGAGCTGTG GCCGTGGACT
 TAGGCAACAG GAAATTAGAA ATATCTTCTG GAAAGCTGGC CAGATTTGCA
 GATGGCTCTG CTGTAGTACA GTCAGGTGAC ACTGCAGTAA TGGTCACAGC
 GGTCAAGTAA ACAAACCTT CCCCTTCCCA GTTTATGCCT TTGGTGGTTG
 ACTACAGACA AAAAGCTGCT GCAGCAGGTA GAATCCCAC AAACATCTG
 AGAAGAGAGG TTGGTACTTC TGATAAAGAA ATTCTAACAA GTCGAATAAT
 AGATCGTTCA ATTAGACCGC TCTTCCAGC TGGCTACTTC TATGATACAC
 AGGTTCTGTG TAATCTGTTA GCAGTAGATG GTGTAAATGA GCCTGATGTC
 CTAGCAATTA ATGGCGCTTC CGTAGCCCTC TCATTATCAG ATATTCCTTG
 GAATGAACCT GTTGGGGCAG TACGAATAGG AATAATTGAT GGAGAATAG
 TTGTTAACCC AACAAGAAA GAAATGTCTT CTAGTACTTT AAATTTATG
 GTTGTGGAG CACCTAAAAG TCAGATTGTC ATGTTGGAAG CCTCTGCAGA
 GAACATTTTA CAGCAGGACT TTTGCCATGC TATCAAAGTG GGAGTGAAAT
 ATACCCAACA AATAATTCAG GGCATTCAGC AGTTGGTAAA AGAACTGGT
 GTTACCAAGA GGACACCTCA GAAGTTATTT ACCCCTTCGC CAGAGATTGT
 GAAATATACT CATAAACTTG CTATGGAGAG ACTCTATGCA GTTTTTACAG
 ATTACGAGCA TGACAAAGTT TCCAGAGATG AAGCTGTAA CAAAATAAGA
 TTAGATACGG AGGAACAAC AAAAGAAAA TTTCCAGAAG CCGATCCATA
 TGAATAATA GAATCCTTCA ATGTTGTTGC AAAGGAAGTT TTAGAAGTA
 TTGTTTTGAA TGAATACAAA AGGTGCGATG GTCGGGATTT GACTTCACCT
 AGGAATGTAA GTTGTGAGGT AGATATGTTT AAAACCCTTC ATGGATCAGC
 ATTATTTCAA AGAGGACAAA CACAGGTGCT TTGTACCCTT ACATTTGATT
 CATTAGAATC TGGTATTAAG TCAGATCAAG TTATAACAGC TATAAATGGG
 ATAAAAGATA AAAATTTTTCAT GCTGCACTAC GAGTTTCCTC CTTATGCAAC
 TAATGAAATT GGCAAAGTCA CTGGTTTAAA TAGAAGAGAA CTTGGGCATG
 GTGCTCTTGC TGAGAAAGCT TTGTATCCTG TTATTTCCAG AGATTTTCTC
 TTCACCATA GAGTTACATC TGAAGTCTTA GAGTCAAATG GGTCACTCTC
 TATGGCATCT GCATGTGGCG GAAGTTTAGC ATTAATGGAT TCAGGCGTTC
 CAATTTTCTC TGCTGTTGCA GCGGTAGCAA TAGGATTGGT CACCAAACC
 GATCTGAGA AGGGTGAAT AGAAGATTAT CGTTTGCTGA CAGATATTTT
 GGGAAATGAA GATTACAATG GTGACATGGA CTTCAAATA GCTGGCCTA
 ATAAAGGAAT AACTGCATTA CAGGCTGATA TTAATTACC TGGGAATACCA
 ATAAAAATG TGATGGAGGC TATTCAACAA GCTTCAGTGG CAAAAAGGA
 GATATTACAG ATCATGAACA AAATATTTT AAAACCTCGA GCATCTAGAA
 AAGAAAATG ACCTGTTGTA GAACTGTTC AGGTTCCATT ATCAAACGA
 GCAAAATTTG TTGGACCTGG TGGCTATAAC TTAATAAAC TTCAGGCTGA
 AACAGGTGTA ACTATTAGTC AGGTGGATGA AGAAACGTTT TCTGTATTTG
 CACCAACACC CAGTGTATG CATGAGGCAA GAGACTTCAT TACTGAAATC
 TGCAAGGATG ATCAGGAGCA GCAATTAGAA TTTGGAGCAG TATATACCGC
 CACAATAACT GAAATCAGAG ATACTGGTGT AATGGTAAA TTATATCCAA
 ATATGACTGC GGTACTGCTT CATAACACAC AACTTGATAA CGAAAGATTA
 AACATCCTAC TGCCCTAGGA TTAGAAGTTG GCCAAGAAAT TCAGGTGAAA
 TACTTTGGAC GTGACCCAGC CGATGGAAGA ATGAGGCTTT CTCGAAAAGT
 GCTTCAGTCG CCAGCTACAA CCGTGGTCAG AACTTTGAAT GACAGAAGTA
 GTATTGTAAT GGGAGAACCT ATTTACACAGT CATCATCTAA TTCTCAGTGA
 TTTTTTTTTT TTAAGAGAA TTCTAGAATT CTATTTTGTG TAGGGTGTAG
 TGCTGTAGAG CAACATTTTA GTAGATCTTC CATTGTGTAG ATTTCTATAT
 AATATAAATA CATTTTAATT ATTTGTAATA AAATGCTCAT TTACATGTGC
 CATTTTTTTA ATTCGAGTAA CCCATATTTG TTTAATTGTA TTTACATTAT
 AAATCAAGAA ATATTTATTA TTAAGGTA GTCATTTATA CATCTTAGA

【図9B】

DGPFLLPRRD RALTQLQVRA LWSSAGSRAV AVDLGNRKLE ISSGKLARFA
DGSVVQSGD TAVMVTAVSK TKPSPSQFMP LVVDYRQKAA AAGRIPTNYL
RREVGTSKKE ILTSRIIDRS IRPLFPAGYF YDTQVLCNLL AVDGVNEPDV
LAINGASVAL SLSDIPWNGP VGAVRIGIID GEYVVNPTRK EMSSSTLNLV
VAGAPKSQIV MLEASAENIL QQDFCHAIKV GVKYTQQIIQ GIQQLVKETG
VTKRTPQKLF TPSPEIVKYT HKLAMERLYA VFTDYEHDKV SRDEAVNKIR
LDTEEQLKEK FPEADPYEII ESFNVVAVEV FRSIVLNEYK RCDGRDLTSL
RNVSCVDMF KTLHGSALFO RGQTQVLCTV TFDLSLESGIK SDQVITAING
IKDKNFMLHY EPPPYATNEI GKVTGLNRRE LGHGALAEKA LYPVIPRDFP
FTIRVTSEVL ESNSSSSMAS ACGGSLALMD SGVPISSAVA GVAIGLVTKT
DPEKGEIEDY RLLTDILGIE DYNGDMDFKI AGTNKGITAL QADIKLPGIP
IKIVMEAIQQ ASVAKKEILQ IMNKTISKPR ASRKENGPPV ETVQVPLSKR
AKFVGGGGYN LKKLQAEATGV TISQVDEETF SVFAPTPSVM HEARDFITEI
CKDDQEQQLE FGAVYTATIT EIRDTGVMVK LYPNMTAVLL HNTQLDNERL
NILLP·

【図10A】

B subtilisMGQEKHVFTI	DWAGRTLT	18	
ヒト	DGPFLLP	RRDRALTQLQVRLWSSAGSRAVAV	DLGNRKLE	40
一致			d r l	
B subtilis	VETGOLAKOANGAVMI RYGD	TAVLS	TATASKEPKPLDFFP	58
ヒト	ISSKLRARFADGSAVVO	SDTAVMVTAVSKTKPS	SCFMP	80
一致	g l a a g	g d t a v t a	p p f p	
B subtilis	LTVMYERLYAVGKIPGGFIKREG	RFSERAVLASRLIDRP	98	
ヒト	LVDYRQKAAAGRIPTNYLRRE	VGTSDEILTSRIIDRS	120	
一致	l v y	a g i p	r e s k l s r i d r	
B subtilis	IRPLFADCFRNEVQVI SIVMSVD	QNCSSEMAAMFCS	SLAL	138
ヒト	IRPLFPA	CFYFDTOVLCNLLAVDGVNEPDVLA	INGASVAL	160
一致	irplf	g q v	v d a g s a l	
B subtilis	SVSDIPFEGFLAGVTVSRIDDOFI	IINPTVDOLEKSDINLV	178	
ヒト	SLSDIPWNGPVGAVRI	SIIDGEYVVPTRKEMSSSTINLV	200	
一致	s s d i p	g p v g i d	n p t s n l v	
B subtilis	VAGT.KDAINNV	VEAGADEVPEEIMLEAIMF	GHEEIKRLIA	217
ヒト	VAGAP	SOIVLEASAENILOODFCHAIKV	VKYTOOIQ	240
一致	v a g	k i m e a a	a i g i	
B subtilis	FOEIVAAVGRK	.SEIKLSEIDEELNEKVKALAEEDILK	256	
ヒト	GIQQLVKET	GVTKRTPOKLT	TPSPDIVKYTHKLAEMRIYA	280
一致	v	g k k l f	e l a e l	
B subtilis	AIQVE	SKHAREDAINEVNAVVAKFED	EHDEDTIKQVKQ	296
ヒト	VFTDY	EHDKVSRDEAVNKIRLDTEEOLK	KFPEADPYEII	320
一致	e	k	e	
B subtilis	ILSKLVKNEVRRL	TE.EKVRFDGRGVDQIRPLSSEVGLL	335	
ヒト	ESFNVAKEVFR	SIVLNEYKRODGRDLTSLRNV	CEVDMF	360
一致	v	e v r i e r d g r	r s e v	
B subtilis	PRTGSGLETRGOTCAL	SVCILGALGDVQIL	DGLGVEES.	374
ヒト	KTLHGSA	LFORGOTOVLC	TVLFDSESGIKSDOVITAING	400
一致	h g s	l f r g q t q l	t l d	
B subtilis	...RRFM	EHYNGFPQFSVGET	CPMRSPGRREIGHGALGERA	411
ヒト	IKD	KNFMILHYEFPYATNEI	SKVTGLNRRELGHGALAEKA	440
一致	k f m	h y f p	e g g r r e g h g a l e a	
B subtilis	LEPVI	PSERDFPYTVRLVSEVLESNGSTSCASIS	CASTLAM	451
ヒト	LYPVI	PR..DFPFTIRVTSEVLESNGSSSMASAC	GGSLAL	478
一致	l p v i p	d f p t r	s e v l e s n g s s a s c l a	

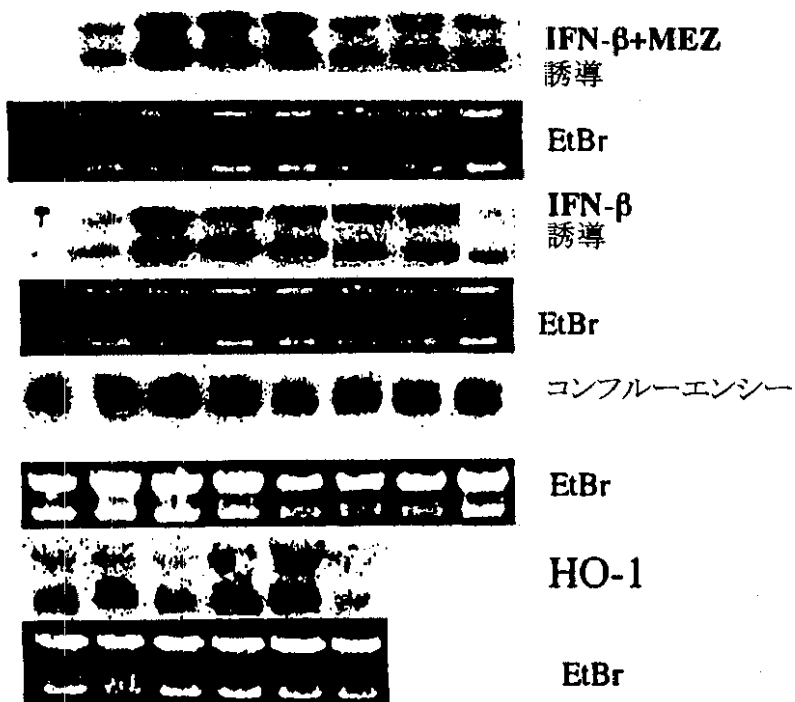
【図10B】

B subtilis	MDAGVPIKAPVAGIEMGLVRSKSG.....EHTVLTDTIQG	484
ヒト	MDSGVPISSAVAGVAIGLVTKTDPEKGEIEDVRLITDILS	518
一致	md gvpi vag a glv e y ltdi g	
B subtilis	MEDALGDNDPFRVAGTEKGVITALQMDIKIEELSRREILLEAL	524
ヒト	IEDYNGDNDPKIAGTNKGITALQADIKLPPIPIKIVMDAI	558
一致	ed gmdfk agt kg talq dik g i ea	
B subtilis	COAKKGRMEIINSEILATLSESRKELSRYPKILMTINPD	564
ヒト	COASVAKREILQIINKTIISKPRASRKENGIVVEIVQVPLS	598
一致	qqa eil m t s r p t	
B subtilis	KIRDVIGPSSKQINRIIEETGWKIDIEQDGIIFISSDDES	604
ヒト	KRAKPVGPGSYNLKRLQAEIGVTSQVDEEIVSVPAPTPS	638
一致	k gp g k etgv i t s	
B subtilis	GNOKAKKIIEDLVREVEVGOIYLSKVKRIEKFGAFVEIFS	644
ヒト	VMHEARDFIITEICKDDOECOLEFEAMVTATI TEIRD TGVM	678
一致	a i ql g v	
B subtilis	GFDGLVHISEVALERVGKVEDVVKIGDEIILVKVTEIDKQG	684
ヒト	VFLYPNMTAVLENTOLDNERLNILLP.....	705
一致	k l e	
B subtilis	RVNLSRKAVLREEKEKEEQOS	705
ヒト	705
一致		

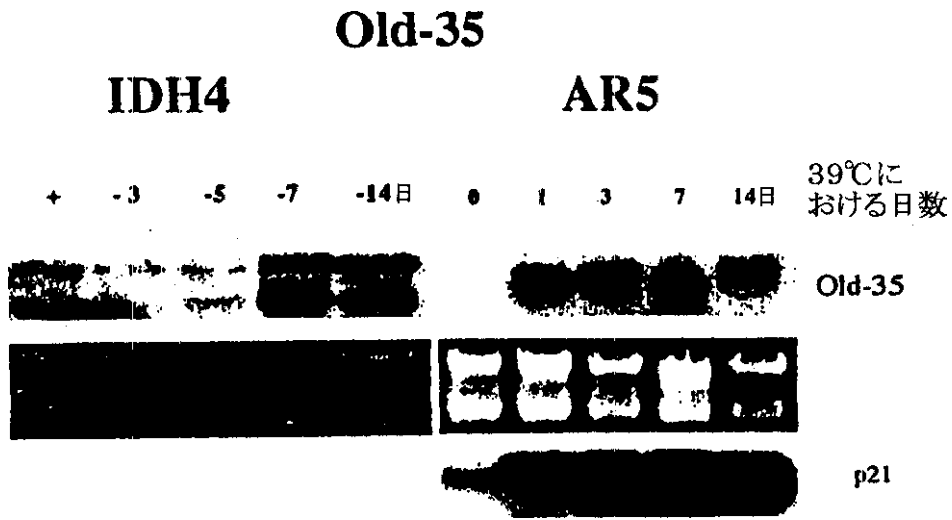
【図11】

Old-35mRNAの半減期

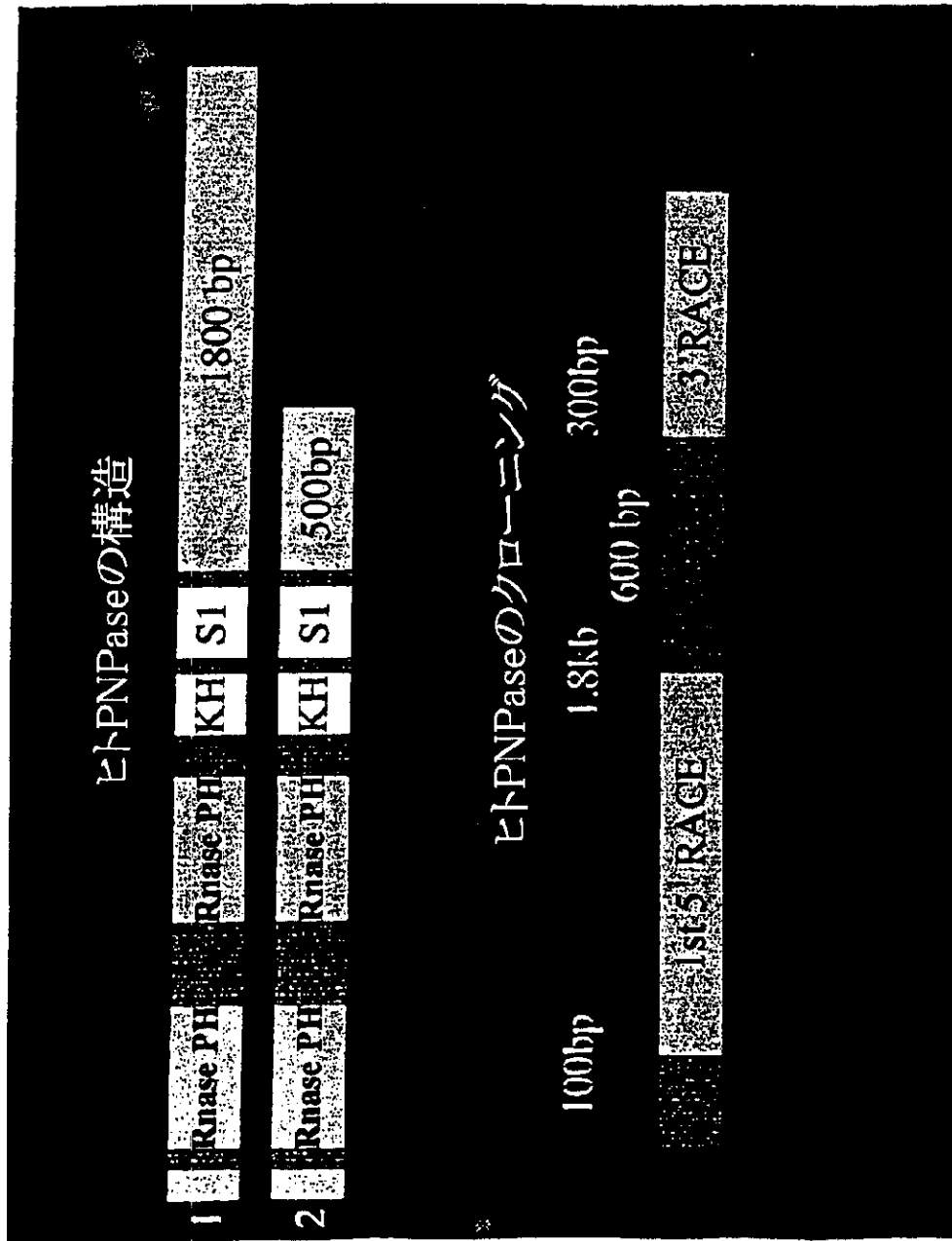
U ADT 2 6 8 10 12 hr



【図12】



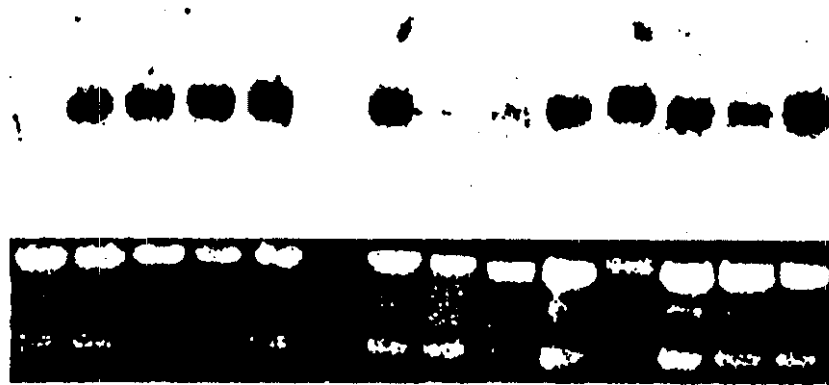
【図13】



【図14】

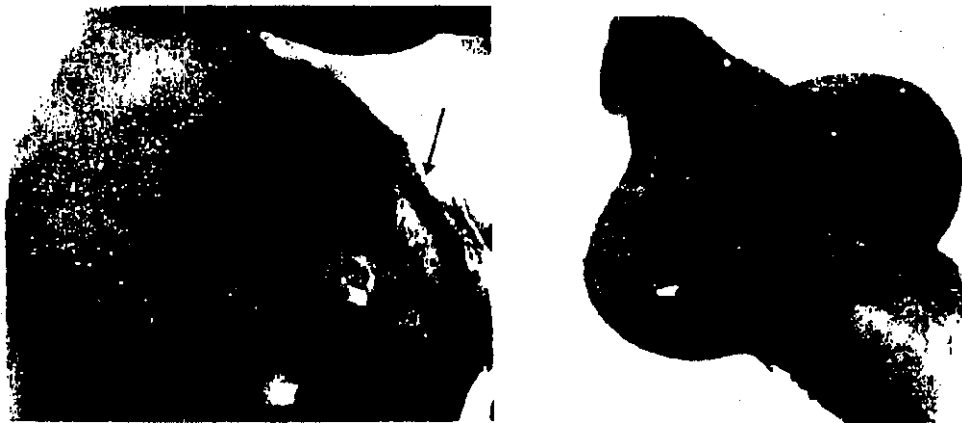
Old-35 発現に対する INF- α サブタイプ の及ぼす効果

U α A α B2 α C α D α F α G α H α I α J α A/D PBL001 TAU β



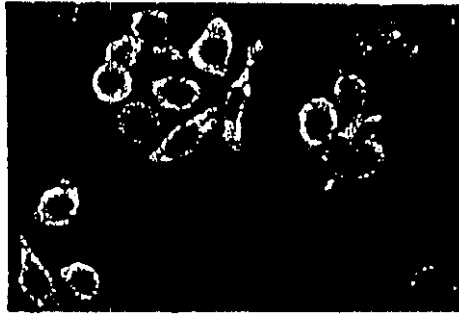
【図15】

Old-35 は脊椎及び性器部位に発現している



【図16】

HeLa 細胞における Old-35 の局在



GFP-hPNPase
40X



GFP
100X

【手続補正書】

【提出日】平成14年2月21日(2002.2.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0099

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0099】

【表1-1】

表1

クローン名	クローンアイデンティティ
Old-1(配列番号1)	ビメチン
Old-2(配列番号2)	ヒト リボソームタンパク質 S3a, v-fos
Old-5(配列番号3)	mRNA M期リンタンパク質
Old-7(配列番号4)	RIG-G, Cig 49
Old-11(配列番号5)	MHC クラス I リンパ球抗原
Old-14(配列番号6)	ヒト 非-筋肉ミオシナルカリ性ライト鎖
Old-18(配列番号7)	ヒト ADP-リポシル化因子4
Old-19(配列番号8)	ヒト ミトコンドリアシトクロム酸化
Old-24(配列番号9)	56kDA IFN 誘導可能
Old-30(配列番号10)	リボソームタンパク質 L5
Old-32*(配列番号11)	新規*
Old-34(配列番号12)	IFN-誘導可能タンパク質
Old-35*(配列番号40)	新規*
Old-38(配列番号13)	H.s.スモール酸性タンパク質
Old-39(配列番号14)	ヒト 酸性リボソームホスファターゼ
Old-42(配列番号15)	神経繊維腫症タイプ1
Old-59(配列番号16)	ヒト 核内受容体 hTAK1
Old-60(配列番号17)	ミトコンドリアDNA
Old-61(配列番号18)	転写因子 I (99%)
Old-64 *(配列番号19)	新規*
Old-65(配列番号20)	CDCI6HS 細胞 81, 261-68
Old-74(配列番号21)	ヒト ISG 54K 遺伝子(IFN-gamma)-cig42
Old-79(配列番号22)	ヒト T複合体ポリペプチド I 遺伝子

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0100

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0100】

【表1-2】

表1(つづき)

Old-80(配列番号23)	ビタミンD誘導
Old-83*(配列番号24)	新規*
Old-87*(配列番号25)	新規*, Old-83との類似の可能性あり
Old-107*(配列番号26)	新規* -ウシG-タンパク質のヒトホモログ
Old-113(配列番号27)	DNA結合タンパク質
Old-115(配列番号28)	U1スモール核内RNP
Old-119(配列番号29)	ヒト HS1タンパク質
Old-121*(配列番号30)	新規*
Old-137*(配列番号31)	新規*
Old-139*(配列番号32)	新規*
Old-140(配列番号33)	ヒト 推定上トランス CA150
Old-142*(配列番号34)	新規*
Old-144(配列番号35)	MLN70 カルシウム-結合
Old-165(配列番号36)	T細胞サイクロフィリン
Old-170(配列番号37)	ラット亜鉛トランスポーターのヒト類似体
Old-175(5-3)*(配列番号38)	新規*

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】

IFN- γ またはIFN- γ +MEZ処理したヒトメラノーマ細胞H0-1、若年ヒト繊維芽細胞、および二種の異なったタイプの老化ヒト早老症繊維芽細胞におけるOld-35の発現を示す電気泳動写真。ノーザンブロットは、未処理H0-1のコントロール(レーン1)、IFN- γ 処理(2000U/ml)H0-1(レーン2)、IFN- γ +MEZ処理(20

00U/ml+10ng/ml) H0-1 (レーン3)、若年繊維芽細胞 (GM01379) (レーン4)、および二種の老化早老症細胞株 (AG01976) (レーン5) (AG0989B) (レーン6) 由来の全RNAを10 μ gの含む。オートラジオグラフィーに1、4、または24時間さらしてプロットした。ロードしたゲルを定量と、およびRNAの質を測定するために、EtBr染色した。

【図2】

IFN- γ 、IFN- β 、IFN- α 、TNF- α 、およびIFN- γ +MEZがH0-1細胞におけるOid-35の発現に及ぼす効果を示した電気泳動写真。全てのノーザンプロットには、全RNAが10mg含まれる。

(A) H0-1細胞における、IFN- γ によるOid-35誘導の経時変化。細胞は~60%コンフルエントにまいて、IFN- γ (2000units/ml) 処理して、示した時間にRNAを単離した。U=コントロールの未処理細胞由来のRNA。

(B) IFN- γ (2000units/ml) 処理されたH0-1細胞におけるOid-35の発現の濃度応答性。

(C) IFN- γ (I)、IFN- β (I)、IFN- α (I)、およびTNF- α (T) がH0-1細胞におけるOid-35の発現に及ぼす影響。RNAは、100units/mlの様々な試薬で処理してから15時間後に単離した。U=コントロールの未処理細胞由来のRNA。

(D) H0-1細胞における、IFN- γ +MEZによるOid-35誘導の経時変化。RNAは、2000units/mlのIFN- γ +10ng/mlのMEZで処理した細胞から単離した。

【図3】

様々なヒト組織およびマウス発生時におけるOid-35の発現を示した電気泳動写真。

(A) ノーザンプロットには、8種の異なったヒト組織由来のポリA⁺RNAを一レーンあたり2 μ g含む。レーン1-8は、順に、ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、および膵臓由来のRNAを含む (Clontech)。

(B) ノーザンプロットには、マウス胚由来の全RNAを10 μ g含む。日数は、妊娠後の日数を示す。

【図4A】

ヒトO1d - 35とマウス相同体の配列を比較した図。上段の配列はヒトO1d - 35 (h - O1d - 35 ; 配列番号40) ; 中段 : マウスO1d - 35の配列 (m - O1d - 35 ; 配列番号41) ; および下段 : ヒトとマウスO1d - 35で共有された一致配列。

【図4B】

ヒトO1d - 35とマウス相同体の配列を比較した図。上段の配列はヒトO1d - 35 (h - O1d - 35 ; 配列番号40) ; 中段 : マウスO1d - 35の配列 (m - O1d - 35 ; 配列番号41) ; および下段 : ヒトとマウスO1d - 35で共有された一致配列。

【図5】

Dex存在下または非存在下におけるIDH4細胞内のO1d - 35の発現を示す電気泳動写真。ノーザンブロットには、IDH4細胞由来の全RNAを一レーンあたり10 μ g含む。+Dex = 10⁻⁶M Dexの存在下で持続的に培養した細胞 ; -Dex = Dexの非存在下で示した日数培養した細胞。後者の実験では、Dexの存在下で細胞を培養した後、活性炭で除去した培地に移して、3、5、7および14日間Dexなしで培養した。

【図6】

細胞周期が進行する際のヒト皮膚繊維芽細胞におけるO1d - 35およびp21の発現を示した電気泳動写真。ノーザンブロットには、ヒト正常繊維芽細胞由来の全RNAを一レーンあたり10 μ g含む。コンフルエントの正常繊維芽細胞(C)をトリプシン処理して、(1:2)で再びまき直した。まき直した後5、15、および20時間後に全RNAを回収した。サブカルチャーして20時間後、前記細胞は90%コンフルエントであった。

【図7】

いくつかのリンホカインおよび原癌遺伝子mRNAの3'非翻訳領域で見出されたAUリッチ配列の図。略語 : Hu = human, GM-CSF = 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 ; IFN - γ = インターフェロン γ ; IL-2 = インターロイキン2 ; TNF = 腫瘍壊死因子 ; c-fos = fos原癌遺伝子。全てのmRNAに共通な最大の配列の下線 / 上線を付したAUUAモチーフが示されている。参照文献 : HuGM-CSF (配列番号46 ; Wong et al., 1985)、HuIFN - γ (配列番号47 ; Goeddel et al., 1983)、Hu IL2 (配列番号48 ; Kashima et al., 1985)、HuTNF (配列番号51 ; Nedwin et al., 1985)、Huc-fos (配列番号49 ; von Straaten et al., 1983)、O1d35 (配列

番号50)。

【図8】

サイクロヘキシミド処理したH0-1細胞におけるO1d - 35の発現に及ぼす効果、およびIFN - γ +MEZ処理したH0-1細胞におけるO1d - 35 RNAの半減期を示す電気泳動写真。

ノーザンブロットの各レーンには、10 μ gの前RNAを含む。

(A) H0-1細胞は50mg/mlのサイクロヘキシミドで30分間前処理し、その後IFN - γ で2、3、または4時間(それぞれレーン2、3、および4)処理した。H0-1細胞をIFN - γ で5時間処理して(レーン5)、その後サイクロヘキシミドで15時間処理した(レーン6)。U = コントロールの未処理H0-1細胞由来のRNA。

(B) IFN - γ +MEZ (IM) (2000units/ml+10ng/ml) 処理したH0-1細胞のO1d - 35 mRNAの半減期。細胞をIMと15時間インキュベートした後、ActD (50mg/ml) に2、6、8、10、および12時間さらした。U = コントロールの未処理H0-1細胞由来のRNA。AD = ActD (5 μ g/ml) 処理したコントロールのH0-1細胞由来のRNA。

【図9A】

O1d - 35のDNA配列およびコードされる予想タンパク質を示す図。

(A) O1d - 35 (配列番号39)のcDNA配列。オルターナティブなポリアデニル化部位に下線を引いた。この部位は、全てのcDNAの10%に存在する(Manley et al., 1988)。

【図9B】

O1d - 35のDNA配列およびコードされる予想タンパク質を示す図。

(B) O1d - 35 cDNA (配列番号42)によってコードされる予想タンパク質。

【図10A】

細菌タンパク質PNPaseとO1d - 35の予想タンパク質配列間の配列相同性を示す図。上段: Bacillus subtilis PNPase配列。中段: ヒトO1d - 35の予想タンパク質配列。下段: 細菌タンパク質PNPaseとO1d - 35の予想タンパク質配列間で一致する配列。黒い箱の領域は、細菌タンパク質PNPaseとO1d - 35の予想タンパク質配列間のアミノ酸の一致を示し、灰色の箱の領域は、アミノ酸の類似を示す。

【図10B】

細菌タンパク質PNPaseとO1d - 35の予想タンパク質配列間の配列相同性を示す図。上段：Bacillus subtilis PNPase配列（配列番号43）。中段：ヒトO1d - 35の予想タンパク質配列（配列番号44）。下段：細菌タンパク質PNPaseとO1d - 35の予想タンパク質配列（配列番号45）間で一致する配列。黒い箱の領域は、細菌タンパク質PNPaseとO1d - 35の予想タンパク質配列間のアミノ酸の一致を示し、灰色の箱の領域は、アミノ酸の類似を示す。

【図11】

H0-1、コンフルエントH0-1、IFN- γ 処理、IFN- γ +MEZ処理されたH0-1をアクチノマイシンD（50mg/ml）処理したノーザンブロットを示す電気泳動写真。全RNAはAD処理して2、4、6、8、10、12時間後に回収した。O1d - 35 cDNAをプローブとして使用した。臭化エチジウムをローディングコントロールとして示した。

【図12】

IDH4およびAR5細胞のノーザンブロットを示す電気泳動写真。IDH4細胞は、デキサメタゾン（DEX）で誘導可能なマウス母系性腫瘍ウイルス由来シミアンウイルス40 T抗原を含む。全RNAはDex処理した細胞（+として示した）から、およびDexなしで3、5、7、および14日培養した細胞から抽出した。AR5細胞は、温度感受性のシミアンウイルス40 T抗原を含む。全RNAは、35 並びに39 に移動して、1、3、7、14日間後の細胞から回収した。O1d - 35およびp21をプローブとして使用した。

【図13】

O1d - 35遺伝子の構造を示す図。RNasePH、KH、S1は、O1d - 35 cDNAに見出された領域を示す。上の図は、3' UTR領域の長さが異なる二種の異なったバージョンのO1d - 35を示す。下の図は、C-ORF技術を使用したO1d - 35 cDNAのクローニングを示す。

【図14】

HeLa細胞におけるGFP - O1d - 35およびGFP単独の局在を示す図。

【図15】


マウスO1d - 35を使用したマウス胚（9.5日）のインサイチュウハイブリダイゼーションを示す図。矢印は、脊柱における発現を示す。

【図16】

様々なサブタイプのIFN- γ で処理したHO-1細胞のノーザンブロットの電気泳動写真。Oid-35をプローブと使用した。IFN- γ をコントロールとして使用した

。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/02920
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) :Please See Extra Sheet. US CL :Please See Extra Sheet. 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) U.S. : 435/4, 6, 69.1, 70.1, 455, 456, 458, 461, 325, 375, 377; 514/2; 530/350, 387.1, 388.1; 536/23.1, 23.5, 25.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched None Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,710,137 A (FISHER) 20 January 1998, col. 5, line 19 through col. 6, line 7.	1, 3, 5-14
A	SORGE et al. High Level Transcription of the Glucocerebrosidase Pseudogene in Normal Subjects and Patients with Gaucher Disease. <i>J. Clin. Invest.</i> October 1990, Vol. 86, pages 1137-1141, see the entire document.	15-74
A	CAWTHON et al. cDNA Sequence and Genomic Structure of <i>EV12B</i> , a Gene Lying within an Intron of the Neurofibromatosis Type 1 Gene. <i>Genomics.</i> 1991, Vol. 9, pages 446-460, see entire document.	15-74
<input checked="" 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 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 14 JUNE 2000		Date of mailing of the international search report 14 AUG 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JANET M. KERR  Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US00/02920

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AHN et al. The Structural and Functional Diversity of Dystrophin. Nature Genetics. 1993, Vol. 3, pages 283-291, see entire document.	15-74
A	GURA, T. Systems for Identifying New Drugs are Often Faulty. Science. 07 November 1997, Vol. 278, pages 1041-1042, see entire document.	24-38, 48, 49
A	VERMA et al. Gene Therapy- Promises, Problems and Prospects. Nature. 18 September 1997, Vol. 389, pages 239-242, see especially pages 239-241.	24-38, 48, 49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US00/02920

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

C07K 1/00, 14/00, 16/18; C07H 21/04; C12N 5/00, 5/06, 5/10, 15/09, 15/63, 15/85, 15/86, 15/87, 15/88; C12Q 1/00;
C12P 21/00, 21/08

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

435/4, 6, 69.1, 70.1, 455, 456, 458, 461, 325, 375, 377; 514/2; 530/350, 387.1, 388.1; 536/23.1, 23.5, 25.1

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, INPADOC, CAPLUS, GENBANK, USPT, JPAB, EPAB, DWPI
search terms: Old-35, old-36, old-137, old-139, old-142, old-175 and proteins or nucleic or polynucleotides or cDNA or
nucleotide, fisher p, leszcynska m.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 9/14	4 C 0 8 4
48/00		17/06	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/14		35/00	4 C 0 8 7
17/06		35/02	4 H 0 4 5
35/00		37/00	
35/02		43/00	1 0 7
37/00			1 1 1
43/00	1 0 7	C 0 7 K 14/47	
	1 1 1	16/18	
C 0 7 K 14/47		C 1 2 N 1/15	
16/18		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 P 21/02	C
1/21		21/08	
5/10		C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02		1/68	A
21/08		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02		33/50	Z
1/68		33/53	D
G 0 1 N 33/15			M
33/50		33/566	
33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		5/00	A
33/566		A 6 1 K 37/02	

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

(72)発明者 フィッシャー、ポール・ビー
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州 10583
 スカースデイル、ゴードン・プレイス

(72)発明者 レツシニエッカ、マグダレナ
アメリカ合衆国、ニュージャージー州
07011 クリフトン、ウエストエンド・ア
ベニュー 453

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 DA13 DA36 FB02
FB03
4B024 AA01 AA11 BA21 BA80 CA04
CA09 CA11 DA02 EA04 GA11
HA01 HA17
4B063 QA01 QQ08 QQ42 QQ52 QR32
QR55 QS25 QS33 QS34
4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CC24
DA01 DA13
4B065 AA90X AA99Y AB01 AC20
BA01 CA44 CA46
4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA08
BA22 BA23 BA44 CA18 DA01
NA14 ZA891 ZB012 ZB211
ZB212 ZB221 ZB261 ZB271
ZC521
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04
NA14 ZA89 ZB01 ZB21 ZB22
ZB26 ZB27 ZC52
4C087 AA01 AA03 BC83 CA12 NA14
ZA89 ZB01 ZB21 ZB22 ZB26
ZB27 ZC52
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA75 DA86 EA22 EA50
FA74

专利名称(译)	基因在细胞衰老和细胞终末分化后表现出改善的表达，及其用途		
公开(公告)号	JP2002535997A	公开(公告)日	2002-10-29
申请号	JP2000597450	申请日	2000-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	纽约市哥伦比亚大学理事会		
申请(专利权)人(译)	受托人Koranbia-大学在纽约市		
[标]发明人	フィッシャーポールビー レツシニエッカマグダレナ		
发明人	フィッシャー、ポール・ビー レツシニエッカ、マグダレナ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7105 A61K31/711 A61K35/76 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P9/14 A61P17/06 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/315 C07K14/47 C07K16/18 C12N1 /15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/74 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1 /68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P9/14 A61P17/06 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/315 C07K14/47 C07K14 /82 C12N15/746		
FI分类号	A61K31/7105 A61K31/711 A61K35/76 A61K45/00 A61K48/00 A61P9/14 A61P17/06 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P43/00.107 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024 /AA11 4B024/BA21 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063 /QR32 4B063/QR55 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065 /AC20 4B065/BA01 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/DA01 4C084/NA14 4C084 /ZA891 4C084/ZB012 4C084/ZB211 4C084/ZB212 4C084/ZB221 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084 /ZC521 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA89 4C086/ZB01 4C086/ZB21 4C086/ZB22 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZC52 4C087/AA01 4C087 /AA03 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA89 4C087/ZB01 4C087/ZB21 4C087/ZB22 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZC52 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	09/243277 1999-02-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了分离的核酸分子，其编码OLD-35蛋白，OLD-64蛋白，OLD-137蛋白，OLD-139蛋白，OLD-142蛋白或OLD-175蛋白。本发明进一步提供了纯化的OLD-35蛋白，OLD-64蛋白，OLD-137蛋白，OLD-139蛋白，OLD-142蛋白和OLD-175蛋白。最后，本发明提供了各种这些核酸和蛋白质的用途。

クローン名	クローンアイデンティティ
Old-1	ビメチン
Old-2	ヒト リボソームタンパク質 S3a, v-fos
Old-5	mRNA M期リンタンパク質
Old-7	RIG-G, Cig 49
Old-11	MHC クラス I リンパ球抗原
Old-14	ヒト 非-筋肉ミオシンアルカリ性ライト鎖
Old-18	ヒト ADP-リボシル化因子 4
Old-19	ヒト ミトコンドリアシトクロム酸化
Old-24	56kDA IFN 誘導可能
Old-30	リボソームタンパク質 L5
Old-32*	新規*
Old-34	IFN-誘導可能タンパク質
Old-35*	新規*
Old-38	H.s. スモール酸性タンパク質
Old-39	ヒト 酸性リボソームホスファターゼ
Old-42	神経繊維腫症タイプ 1
Old-59	ヒト 核内受容体 hTAK1
Old-60	ミトコンドリアDNA
Old-61	転写因子 I (99%)
Old-64 *	新規*
Old-65	CDC16HS 細胞 81, 261-68
Old-74	ヒト ISG 54K 遺伝子(IFN-gamma)-cig42
Old-79	ヒト T複合体ポリペプチド I 遺伝子