

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2003/100064

発行日 平成17年9月22日(2005.9.22)

(43) 国際公開日 平成15年12月4日(2003.12.4)

(51) Int. Cl. ⁷	F I		
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027		
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088		
A 6 1 K 31/7105	A 6 1 K 31/7105		
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	D	
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 118 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2004-508302 (P2004-508302)	(71) 出願人	000001029
(21) 国際出願番号	PCT/JP2003/006749		協和醗酵工業株式会社
(22) 国際出願日	平成15年5月29日(2003.5.29)		東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(31) 優先権主張番号	特願2002-156257 (P2002-156257)	(72) 発明者	中山 敬一
(32) 優先日	平成14年5月29日(2002.5.29)		福岡県福岡市東区箱崎5-11-5-80
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		2
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, B A, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, M X, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW	(72) 発明者	嘉村 巧
			福岡県福岡市西区小戸5-7-6-53

(54) 【発明の名称】 新規ユビキチンリガーゼ

(57) 【要約】

本発明により、 $p27^{kip1}$ をユビキチン化する活性を有する新規な蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質の製造方法、該蛋白質を用いた、 $p27^{kip1}$ のユビキチン化を阻害する物質のスクリーニング方法、該蛋白質と特異的に結合する抗体、および該DNAに由来するポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドまたは該抗体を含む、癌等の細胞周期が異常を原因とする疾患の診断薬および治療薬を提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

p 2 7^{K i p 1}をユビキチン化する活性を有する複合体の構成成分であり、分子量が 1 4 0 k D aである、p 2 7^{K i p 1}をユビキチン化する活性を有する蛋白質。

【請求項 2】

配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

【請求項 3】

配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列において 1 つ以上のアミノ酸が付加、欠失あるいは置換したアミノ酸配列からなり、かつ p 2 7^{K i p 1}をユビキチン化する活性を有する蛋白質。

【請求項 4】

配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列と 6 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ p 2 7^{K i p 1}をユビキチン化する活性を有する蛋白質。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質および以下の (a) ~ (c) のいずれかに記載の蛋白質を構成成分として含む、p 2 7^{K i p 1}をユビキチン化する活性を有する複合体。

(a) 配列番号 6 または 8 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質

(b) 配列番号 6 または 8 で表されるアミノ酸配列において 1 つ以上のアミノ酸が付加、欠失あるいは置換したアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質

(c) 配列番号 6 または 8 で表されるアミノ酸配列と 6 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質

【請求項 6】

請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする D N A。

【請求項 7】

配列番号 1 または 3 で表される塩基配列を含む D N A。

【請求項 8】

配列番号 1 または 3 で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなる D N A とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ p 2 7^{K i p 1}をユビキチン化する活性を有する蛋白質をコードする D N A。

【請求項 9】

請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の D N A をベクターに組み込んで得られる組換え体 D N A。

【請求項 1 0】

請求項 9 に記載の組換え体 D N A を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 に記載の形質転換体を培養液中で培養し、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質を該培養物中に生成、蓄積させ、該培養物中より該蛋白質を採取することを特徴とする請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の製造法。

【請求項 1 2】

請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の D N A および以下の (a) ~ (e) のいずれかに記載の D N A をベクターに組み込んで得られる組換え体 D N A。

(a) 配列番号 6 または 8 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質をコードする D N A

(b) 配列番号 6 または 8 で表されるアミノ酸配列において 1 つ以上のアミノ酸が付加、欠失あるいは置換したアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質をコードする D N A

(c) 配列番号 6 または 8 で表されるアミノ酸配列と 6 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合す

10

20

30

40

50

る蛋白質をコードするDNA

(d) 配列番号5または7で表される塩基配列を含むDNA

(e) 配列番号5または7で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質をコードするDNA

【請求項13】

請求項12に記載の組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項14】

請求項9に記載の組換え体DNAおよび以下の(a)~(e)のいずれかに記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(a) 配列番号6または8で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質をコードするDNA

(b) 配列番号6または8で表されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が付加、欠失あるいは置換したアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質をコードするDNA

(c) 配列番号6または8で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質をコードするDNA

(d) 配列番号5または7で表される塩基配列を含むDNA

(e) 配列番号5または7で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質をコードするDNA

【請求項15】

請求項13または14に記載の形質転換体を培養液中で培養し、請求項5に記載の複合体を該培養物中に生成、蓄積させ、該培養物中より該複合体を採取することを特徴とする請求項5に記載の複合体の製造法。

【請求項16】

請求項6~8のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項17】

以下の(a)または(b)を用いて、請求項2~4のいずれか1項に記載の蛋白質をコードするmRNAの検出または定量を行う方法。

(a) 請求項6~8のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列の連続する20塩基以上の配列を含むポリヌクレオチド

(b) 請求項6~8のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列中の連続する20~100塩基の配列を含むDNAおよび請求項6~8のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列中の連続する20~100塩基の配列を含むDNA

【請求項18】

以下の(a)または(b)を用いて、請求項2~4のいずれか1項に記載の蛋白質の発現量が健常人と比較してmRNAレベルで増加または減少している疾患の判定または診断を行う方法。

(a) 請求項6~8のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列中の連続する20塩基以上の配列を含むポリヌクレオチド

(b) 請求項6~8のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列中の連続する20~100塩基の配列を含むDNAおよび請求項6~8のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列中の連続する20~100塩基の配列を含むDNA

【請求項19】

以下の(a)または(b)を含む、請求項2~4のいずれか1項に記載の蛋白質の発現量が健常人と比較してmRNAレベルで増加または減少している疾患の診断薬。

(a) 請求項6~8のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列中

10

20

30

40

50

の連続する20塩基以上の配列を含むポリヌクレオチド

(b) 請求項6～8のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列中の連続する20～100塩基の配列を含むDNAおよび請求項6～8のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列中の連続する20～100塩基の配列を含むDNA

【請求項20】

請求項6～8のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列中の連続する20～100塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドおよび請求項6～8のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列中の連続する20～100塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドのうち少なくとも1つを用いて、請求項2～4のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の変異を検出する方法。

10

【請求項21】

請求項6～8のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列中の連続する20～100塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドおよび請求項6～8のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列中の連続する20～100塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドのうち少なくとも1つを用いて、請求項2～4のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする遺伝子が変異を有している疾患を判定または診断する方法。

【請求項22】

請求項6～8のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列中の連続する20～100塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドおよび請求項6～8のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列中の連続する20～100塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドのうち少なくとも1つを含む、請求項2～4のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の変異を有している疾患の診断薬。

20

【請求項23】

以下の(a)～(c)からなる群から選ばれるRNA。

(a) 配列番号36で表される配列および該配列と相補的な配列の3'端にそれぞれ2～4個のヌクレオチドを付加した配列からなる2本鎖RNA

(b) 配列番号34および35で表される配列からなる2本鎖RNA

(c) 配列番号38で表される配列からなるRNA

【請求項24】

以下の(a)～(d)からなる群から選ばれる少なくとも1つを用いて、請求項2～4のいずれか1項に記載の蛋白質の発現を抑制する方法。

30

(a) 請求項6～8のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列中の連続する19～25塩基に相当する配列を含む二本鎖RNA

(b) 請求項23に記載のRNA

(c) 請求項6～8のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列中の連続する19～25塩基に相当する配列および該配列と相補的な配列を含みヘアピン構造を形成するRNA

(d) 請求項6～8のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列中の連続する20～100塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体

40

【請求項25】

以下の(a)～(d)からなる群から選ばれる少なくとも1つを用いて、細胞内のp27^{Kip1}のコピキチン化を阻害する方法。

(a) 請求項6～8のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列中の連続する19～25塩基に相当する配列を含む二本鎖RNA

(b) 請求項23に記載のRNA

(c) 請求項6～8のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列中の連続する19～25塩基に相当する配列および該配列と相補的な配列を含みヘアピン構造を形成するRNA

(d) 請求項6～8のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列中

50

の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体

【請求項 26】

以下の (a) ~ (d) からなる群から選ばれる少なくとも 1 つを用いて、細胞内の p 27^{Kip1} の分解を抑制する方法。

(a) 請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 19 ~ 25 塩基に相当する配列を含む二本鎖 RNA

(b) 請求項 23 に記載の RNA

(c) 請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 19 ~ 25 塩基に相当する配列および該配列と相補的な配列を含みヘアピン構造を形成する RNA

(d) 請求項 6 ~ 8 のいずれかの 1 項に記載の DNA が有する塩基配列と相補的な配列中の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体

【請求項 27】

以下の (a) ~ (d) からなる群から選ばれる少なくとも 1 つを有効成分として含有する、細胞周期の異常を原因とする疾患または細胞周期を調節することにより症状を軽減できる疾患の治療薬。

(a) 請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 19 ~ 25 塩基に相当する配列を含む二本鎖 RNA

(b) 請求項 23 に記載の RNA

(c) 請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 19 ~ 25 塩基に相当する配列および該配列と相補的な配列を含みヘアピン構造を形成する RNA

(d) 請求項 6 ~ 8 のいずれかの 1 項に記載の DNA が有する塩基配列と相補的な配列中の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体

【請求項 28】

疾患が癌である請求項 26 に記載の治療薬。

【請求項 29】

請求項 6 ~ 8 のいずれかの 1 項に記載の DNA を導入することにより作製した非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 30】

請求項 29 に記載の非ヒトトランスジェニック動物を細胞周期の異常を原因とする疾患のモデル動物として用いる方法。

【請求項 31】

疾患が癌である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

請求項 29 に記載の非ヒトトランスジェニック動物を用いて薬剤を評価する方法。

【請求項 33】

薬剤が抗癌剤である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする遺伝子が欠損した非ヒト動物。

【請求項 35】

被験試料の存在下および非存在下で、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質または請求項 5 に記載の複合体と p 27^{Kip1} とを接触させる工程、該蛋白質または該複合体と p 27^{Kip1} との結合量を測定する工程、および被験試料の存在下および非存在下での該蛋白質または該複合体と p 27^{Kip1} との結合量を比較する工程を含む、p 27^{Kip1} と請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質との結合を阻害する物質のスクリーニング方法。

10

20

30

40

50

【請求項 36】

被験試料の存在下および非存在下で、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質または請求項 5 に記載の複合体と $p27^{Kip1}$ を接触させる工程、該蛋白質または該複合体と $p27^{Kip1}$ との結合量を測定する工程、および被験試料の存在下および非存在下での該蛋白質または該複合体と $p27^{Kip1}$ との結合量を比較する工程を含む、 $p27^{Kip1}$ のユビキチン化を抑制する物質のスクリーニング方法。

【請求項 37】

被験試料の存在下および非存在下で、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質または請求項 5 に記載の複合体と $p27^{Kip1}$ を接触させる工程、該蛋白質または該複合体と $p27^{Kip1}$ との結合量を測定する工程、および被験試料の存在下および非存在下での該蛋白質または該複合体と $p27^{Kip1}$ との結合量を比較する工程を含む、 $p27^{Kip1}$ の分解を抑制する物質のスクリーニング方法。

10

【請求項 38】

被験試料の存在下および非存在下で、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質または請求項 5 に記載の複合体と $p27^{Kip1}$ を接触させる工程、該蛋白質または該複合体と $p27^{Kip1}$ との結合量を測定する工程、および被験試料の存在下および非存在下での該蛋白質または該複合体と $p27^{Kip1}$ との結合量を比較する工程を含む、細胞周期の異常を原因とする疾患または細胞周期を調節することにより症状を軽減できる疾患の治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 39】

疾患が癌である、請求項 38 に記載の方法。

20

【請求項 40】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質または請求項 5 に記載の複合体、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン結合酵素、ユビキチンおよび $p27^{Kip1}$ を含む系において被験試料の存在下および非存在下で $p27^{Kip1}$ のユビキチン化を行う工程、 $p27^{Kip1}$ にとりこまれたユビキチンの量を測定する工程、および被験試料の存在下および非存在下での $p27^{Kip1}$ にとりこまれたユビキチンの量を比較する工程を含む、 $p27^{Kip1}$ のユビキチン化を抑制する物質のスクリーニング方法。

【請求項 41】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質または請求項 5 に記載の複合体、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン結合酵素、ユビキチンおよび $p27^{Kip1}$ を含む系において被験試料の存在下および非存在下で $p27^{Kip1}$ のユビキチン化を行う工程、および $p27^{Kip1}$ にとりこまれたユビキチンの量を測定する工程、および被験試料の存在下および非存在下での $p27^{Kip1}$ にとりこまれたユビキチンの量を比較する工程を含む、 $p27^{Kip1}$ の分解を抑制する物質のスクリーニング方法。

30

【請求項 42】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質または請求項 5 に記載の複合体、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン結合酵素、ユビキチンおよび $p27^{Kip1}$ を含む系において被験試料の存在下および非存在下で $p27^{Kip1}$ のユビキチン化を行う工程、および $p27^{Kip1}$ にとりこまれたユビキチンの量を測定する工程、および被験試料の存在下および非存在下での $p27^{Kip1}$ にとりこまれたユビキチンの量を比較する工程を含む、細胞周期の異常を原因とする疾患または細胞周期を調節することにより症状を軽減できる疾患の治療薬のスクリーニング方法。

40

【請求項 43】

疾患が癌である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 44】

請求項 1 ~ 4 のいずれかの 1 項に記載の蛋白質、または請求項 5 に記載の複合体と特異的に結合する抗体。

【請求項 45】

抗体が、 $p27^{Kip1}$ と請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質または請求項 5 に

50

記載の複合体との結合を阻害する抗体である、請求項 4 4 に記載の抗体。

【請求項 4 6】

抗体が、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質または請求項 5 に記載の複合体が有する p 2 7^{Kip1} をユビキチン化する活性を阻害する作用を示す抗体である、請求項 4 4 に記載の抗体。

【請求項 4 7】

請求項 4 4 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の抗体を用いる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質または請求項 5 に記載の複合体を免疫学的に検出又は定量する方法。

【請求項 4 8】

請求項 4 4 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の抗体を用いて、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の発現量が、健常人と比較して蛋白質レベルで増加または減少している疾患を判定または診断する方法。

10

【請求項 4 9】

請求項 4 4 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の抗体を含有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の発現量が、健常人と比較して蛋白質レベルで増加または減少している疾患の診断薬。

【請求項 5 0】

請求項 4 5 または 4 6 に記載の抗体を用いて、p 2 7^{Kip1} のユビキチン化を阻害する方法。

【請求項 5 1】

請求項 4 5 または 4 6 に記載の抗体を用いて、p 2 7^{Kip1} の分解を抑制する方法。

20

【請求項 5 2】

請求項 4 5 または 4 6 に記載の抗体を有効成分として含有する細胞周期の異常を原因とする疾患または細胞周期を調節することにより症状を軽減できる疾患の治療剤。

【請求項 5 3】

疾患が癌である、請求項 5 2 に記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は p 2 7^{Kip1} をユビキチン化する活性を有するユビキチンリガーゼ蛋白質、該蛋白質を含む複合体、該蛋白質をコードする DNA、該 DNA を含む組換え体 DNA を導入した形質転換体、該形質転換体を用いた該蛋白質の製造方法、該 DNA に由来するポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを用いた、該蛋白質をコードする mRNA の検出または定量する方法および該蛋白質の発現を抑制する方法に関する。また本発明は、該蛋白質、該複合体または該形質転換体を用いた、p 2 7^{Kip1} のユビキチン化を阻害する物質のスクリーニング方法に関する。さらに、該蛋白質と特異的に結合する抗体、該抗体を用いて該蛋白質を免疫学的に検出または定量する方法、該ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドまたは該抗体を含む診断薬、治療薬に関する。

30

背景技術

真核細胞の細胞周期は、一連のサイクリンとサイクリン依存性キナーゼ（以下、CDK と略す）の複合体が適切な時期に適切な順序で活性化されることにより進行する。この酵素活性は種々の機構により制御されている。例えば、サイクリン蛋白質の分解、CDK のリン酸化、脱リン酸化、CDK 阻害蛋白質（以下、CKI と略す）との結合と解離、などがその制御機構に関与している。CKI による CDK / サイクリンの適切な制御は正常な細胞周期の進行に必須であり、この制御の異常は細胞の癌化につながるようになってきている〔*Genes Dev.*, 13, 1501 (1999); *BioEssays*, 20, 1020 (1998)〕。

40

なかでも細胞周期の G 1 期から S 期への進行の制御が、細胞癌化の抑制に重要であることが明らかになってきており、その過程で最も重要な役割を担っているのが CKI の一つである p 2 7^{Kip1} の量の制御である。〔*FEB S Lett.*, 490, 179 (2001); *Exp. Cell Res.*, 264, 148 (2001); *Biochem.*

50

Biophys. Res. Commun., 282, 853 (2001)]。G0期からG1期、そしてS期の移行には、G1サイクリンとCDKの複合体の活性化が重要であり、p27^{Kip1}はこの活性化を阻害する活性を有する。正常細胞では、G0期においてはp27^{Kip1}の発現量は高く、増殖刺激に伴い、G1後期からS期にかけて減少する [Nature, 372, 570 (1994); Genes Dev., 9, 1831 (1995)]。p27^{Kip1}の強制発現で細胞周期はG1期に停止し、またp27^{Kip1}のアンチセンスオリゴヌクレオチドによる発現抑制は、S期細胞の割合を増加させる [Cell, 78, 59 (1994); Cell, 78, 67 (1994); Science, 272, 877 (1996)]。さらにp27^{Kip1}をホモに欠失したマウスは、通常のマウスより大きく、胸腺、精巣、卵巣、子宮、下垂体、副腎、前立腺など多くの組織で過剰な細胞増殖による過形成が認められ、さらに放射線や化学物質による腫瘍形成の頻度が高いことが判明した [Cell, 85, 707 (1996); Cell, 85, 733 (1996); Cell, 85, 721 (1996); Nature, 396, 177 (1998)]。また、ヒト腫瘍においても、p27^{Kip1}の発現量と癌の悪性度には相関関係が認められ、乳癌、大腸癌をはじめ、リンパ腫、胃癌、喉頭癌、甲状腺癌、前立腺癌、神経膠腫、肺癌、卵巣腫瘍など、多くの癌種で悪性度の高さとp27^{Kip1}の発現量の間には負の相関関係があることが報告されている [Nat. Med., 3, 222 (1997); Nat. Med., 3, 227 (1997); Nat. Med., 3, 231 (1997); Nat. Med., 3, 593 (1997)]。従って、p27^{Kip1}の発現制御機構を理解し、発現量の調整を行うことは、細胞周期、癌化機構の解明、癌診断薬、治療薬の開発に重要であると考えられる。

10

20

p27^{Kip1}の発現制御は転写レベルではなく、主として転写後、特に蛋白質分解制御によって行われている。特にユビキチン-プロテアソームによる分解系がその中心である [FEBS Lett., 490, 179 (2001); Exp. Cell Res., 264, 148 (2001); Biochem. Biophys. Res. Commun., 282, 853 (2001)]。

ユビキチン-プロテアソーム系による蛋白質分解は以下のプロセスによる。まず、ユビキチンはユビキチン活性化酵素(E1)とATPによりカルボキシ末端のグリシン残基が活性化され、E1の特定のシステイン残基にチオエステル結合する。次にユビキチンはユビキチン結合酵素(E2)のシステイン残基に転移される。E2に結合したユビキチンは、標的蛋白質を特異的に認識するユビキチンリガーゼ(E3)を介して、標的蛋白質のリジン残基にイソペプチド結合される(標的蛋白質のユビキチン化)。結合したユビキチンの48番目のリジン残基にさらにユビキチン化反応が繰り返されることによって、基質蛋白質にユビキチンが鎖状に付加される(ポリユビキチン化)。最後に、ポリユビキチン鎖が分解シグナルとして、巨大な蛋白質分解酵素複合体であるプロテアソームに認識され、標的蛋白質が分解される。この一連の過程からなるユビキチン-プロテアソーム系において最も重要なのが、基質特異性を担うとされるE3である [Nature, 373, 81 (1995)]。

30

p27^{Kip1}をユビキチン化するE3としては、Skp2、Skp1、Cul1およびRbx1を構成成分として含む蛋白質複合体であるSCFSkp2が知られている。なかでもSkp2がp27^{Kip1}の認識に重要な分子である。Skp2をホモで欠失したマウスは成長遅延、増殖抑制、染色体・中心体異常が見られ、p27^{Kip1}の蓄積が見られたことから、Skp2がp27^{Kip1}の分解に関与していることが示唆される [Nat. Cell Biol., 1, 193 (1999); Nat. Cell Biol., 1, 207 (1999); EMBO J., 19, 2069 (2000)]。しかし、Skp2遺伝子を欠失したノックアウトマウスにおいて、G0-G1移行期におけるp27^{Kip1}の減少はSkp2が存在しなくても起こることが判明し、G0-G1移行期におけるp27^{Kip1}の分解にはSCFSkp2に依存しない他の未知の経路が存在することが示唆された [J. Biol. Chem., 276, 48937 (2001)]。このG0-G1移行期におけるSCFSkp2に依存しないp27^{Kip1}の分解機構を解

40

50

明し、それを司る E 3 を同定することは、細胞周期、癌化機構の解明、癌の診断薬および治療薬の開発に極めて重要であると考えられる。

発明の開示

本発明は S C F S k p 2 およびその構成成分とは異なる、p 2 7^{K i p 1} をユビキチン化する活性を有する新規なユビキチンリガーゼ蛋白質、該蛋白質を含むユビキチンリガーゼ複合体、該蛋白質をコードする D N A、該 D N A を含む組換え体 D N A を導入した形質転換体、該形質転換体を用いた該蛋白質の製造方法、該 D N A に由来するポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを用いた、該蛋白質をコードする m R N A の検出または定量する方法および該蛋白質の発現を抑制する方法を提供することを目的とする。また本発明は、該蛋白質、該複合体または該形質転換体を用いた、p 2 7^{K i p 1} のユビキチン化を阻

10

害する物質のスクリーニング方法、該蛋白質と特異的に結合する抗体、該抗体を用いて該蛋白質を免疫学的に検出または定量する方法、該ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドまたは該抗体を含む診断薬、治療薬を提供することを目的とする。本発明者は、p 2 7^{K i p 1} をユビキチン化する活性を有するユビキチンリガーゼ複合体 K P C を精製し、その構成蛋白質である新規な蛋白質 K P C 1、およびヒトおよびマウスの K P C 1 をコードする D N A を単離し、該 D N A の塩基配列および該 D N A がコードする K P C 1 のアミノ酸配列を明らかにした。さらに K P C 1 が単独で p 2 7^{K i p 1} をユビキチン化する活性を有するユビキチンリガーゼであること、K P C 1 の活性には C 末の R I N G フィンガー (R I N G - f i n g e r) ドメインが必要なこと、K P C 1 を含む複合体を細胞に高発現させることにより、p 2 7^{K i p 1} の分解が促進されることを見出し、本発明を完成した。

20

すなわち、本発明は以下の (1) ~ (5 3) に関する。

(1) p 2 7^{K i p 1} をユビキチン化する活性を有する複合体の構成成分であり、分子量が 1 4 0 k D a である、p 2 7^{K i p 1} をユビキチン化する活性を有する蛋白質。

(2) 配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

(3) 配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列において 1 つ以上のアミノ酸が付加、欠失あるいは置換したアミノ酸配列からなり、かつ p 2 7^{K i p 1} をユビキチン化する活性を有する蛋白質。

(4) 配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列と 6 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ p 2 7^{K i p 1} をユビキチン化する活性を有する蛋白質。

30

(5) 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質および以下の (a) ~ (c) のいずれかに記載の蛋白質を構成成分として含む、p 2 7^{K i p 1} をユビキチン化する活性を有する複合体。

(a) 配列番号 6 または 8 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質

(b) 配列番号 6 または 8 で表されるアミノ酸配列において 1 つ以上のアミノ酸が付加、欠失あるいは置換したアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質

(c) 配列番号 6 または 8 で表されるアミノ酸配列と 6 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質

40

(6) 請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする D N A。

(7) 配列番号 1 または 3 で表される塩基配列を含む D N A。

(8) 配列番号 1 または 3 で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなる D N A とストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつ p 2 7^{K i p 1} をユビキチン化する活性を有する蛋白質をコードする D N A。

(9) (6) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の D N A をベクターに組み込んで得られる組換え体 D N A。

(1 0) (9) に記載の組換え体 D N A を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(1 1) (1 0) に記載の形質転換体を培養液中で培養し、(2) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質を該培養物中に生成、蓄積させ、該培養物中より該蛋白質を採取するこ

50

とを特徴とする(2)~(4)のいずれか1項に記載の蛋白質の製造法。

(12)(6)~(8)のいずれか1項に記載のDNAおよび以下の(a)~(e)のいずれかに記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(a)配列番号6または8で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質をコードするDNA

(b)配列番号6または8で表されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が付加、欠失あるいは置換したアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質をコードするDNA

(c)配列番号6または8で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質をコードするDNA

(d)配列番号5または7で表される塩基配列を含むDNA

(e)配列番号5または7で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質をコードするDNA

(13)(12)に記載の組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(14)(9)に記載の組換え体DNAおよび以下の(a)~(e)のいずれかに記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(a)配列番号6または8で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質をコードするDNA

(b)配列番号6または8で表されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が付加、欠失あるいは置換したアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質をコードするDNA

(c)配列番号6または8で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質をコードするDNA

(d)配列番号5または7で表される塩基配列を含むDNA

(e)配列番号5または7で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質をコードするDNA

(15)(13)または(14)に記載の形質転換体を培養液中で培養し、(5)に記載の複合体を該培養物中に生成、蓄積させ、該培養物中より該複合体を採取することを特徴とする(5)に記載の複合体の製造法。

(16)(6)~(8)のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列からなるポリヌクレオチド。

(17)以下の(a)または(b)を用いて、(2)~(4)のいずれか1項に記載の蛋白質をコードするmRNAの検出または定量を行う方法。

(a)(6)~(8)のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列中の連続する20塩基以上の配列を含むポリヌクレオチド

(b)(6)~(8)のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列中の連続する20~100塩基の配列を含むDNAおよび(6)~(8)のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列中の連続する20~100塩基の配列を含むDNA

(18)以下の(a)または(b)を用いて、(2)~(4)のいずれか1項に記載の蛋白質の発現量が健常人と比較してmRNAレベルで増加または減少している疾患の判定または診断を行う方法。

(a)(6)~(8)のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列中の連続する20塩基以上の配列を含むポリヌクレオチド

(b)(6)~(8)のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列中の連続する20~100塩基の配列を含むDNAおよび(6)~(8)のいずれかの1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な配列中の連続する20~100塩基の配列を含むDNA

(19)以下の(a)または(b)を含む、(2)~(4)のいずれか1項に記載の蛋白

10

20

30

40

50

質の発現量が健常人と比較して mRNA レベルで増加または減少している疾患の診断薬。

(a) (6) ~ (8) のいずれかの 1 項に記載の DNA が有する塩基配列と相補的な配列中の連続する 20 塩基以上の配列を含むポリヌクレオチド

(b) (6) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含む DNA および (6) ~ (8) のいずれかの 1 項に記載の DNA が有する塩基配列と相補的な配列中の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含む DNA

(20) (6) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドおよび (6) ~ (8) のいずれかの 1 項に記載の DNA が有する塩基配列と相補的な配列中の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドのうち少なくとも 1 つを用いて、(2) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の変異を検出する方法。

10

(21) (6) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドおよび (6) ~ (8) のいずれかの 1 項に記載の DNA が有する塩基配列と相補的な配列中の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドのうち少なくとも 1 つを用いて、(2) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする遺伝子に変異を有している疾患を判定または診断する方法。

(22) (6) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドおよび (6) ~ (8) のいずれかの 1 項に記載の DNA が有する塩基配列と相補的な配列中の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドのうち少なくとも 1 つを含む、(2) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする遺伝子に変異を有している疾患の診断薬。

20

(23) 以下の (a) ~ (c) からなる群から選ばれる RNA。

(a) 配列番号 36 で表される配列および該配列と相補的な配列の 3' 端にそれぞれ 2 ~ 4 個のヌクレオチドを付加した配列からなる二本鎖 RNA

(b) 配列番号 34 および 35 で表される配列からなる二本鎖 RNA

(c) 配列番号 38 で表される配列からなる RNA

(24) 以下の (a) ~ (d) からなる群から選ばれる少なくとも 1 つを用いて、(2) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質の発現を抑制する方法。

(a) (6) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 19 ~ 25 塩基に相当する配列を含む二本鎖 RNA

30

(b) (23) に記載の RNA

(c) (6) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 19 ~ 25 塩基に相当する配列および該配列と相補的な配列を含みヘアピン構造を形成する RNA

(d) (6) ~ (8) のいずれかの 1 項に記載の DNA が有する塩基配列と相補的な配列中の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体

(25) 以下の (a) ~ (d) からなる群から選ばれる少なくとも 1 つを用いて、細胞内の p 27^{Kip1} のユビキチン化を阻害する方法。

40

(a) (6) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 19 ~ 25 塩基に相当する配列を含む二本鎖 RNA

(b) (23) に記載の RNA

(c) (6) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 19 ~ 25 塩基に相当する配列および該配列と相補的な配列を含みヘアピン構造を形成する RNA

(d) (6) ~ (8) のいずれかの 1 項に記載の DNA が有する塩基配列と相補的な配列中の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体

(26) 以下の (a) ~ (d) からなる群から選ばれる少なくとも 1 つを用いて、細胞内

50

の $p27^{kip1}$ の分解を抑制する方法。

(a) (6) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 19 ~ 25 塩基に相当する配列を含む二本鎖 RNA

(b) (23) に記載の RNA

(c) (6) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 19 ~ 25 塩基に相当する配列および該配列と相補的な配列を含みヘアピン構造を形成する RNA

(d) (6) ~ (8) のいずれかの 1 項に記載の DNA が有する塩基配列と相補的な配列中の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体

(27) 以下の (a) ~ (d) からなる群から選ばれる少なくとも 1 つを有効成分として含有する、細胞周期の異常を原因とする疾患または細胞周期を調節することにより症状を軽減できる疾患の治療薬。

(a) (6) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 19 ~ 25 塩基に相当する配列を含む二本鎖 RNA

(b) (23) に記載の RNA

(c) (6) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列中の連続する 19 ~ 25 塩基に相当する配列および該配列と相補的な配列を含みヘアピン構造を形成する RNA

(d) (6) ~ (8) のいずれかの 1 項に記載の DNA が有する塩基配列と相補的な配列中の連続する 20 ~ 100 塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体

(28) 疾患が癌である (26) に記載の治療薬。

(29) (6) ~ (8) のいずれかの 1 項に記載の DNA を導入することにより作製した非ヒトトランスジェニック動物。

(30) (29) に記載の非ヒトトランスジェニック動物を細胞周期の異常を原因とする疾患のモデル動物として用いる方法。

(31) 疾患が癌である、請求項 30 に記載の方法。

(32) (29) に記載の非ヒトトランスジェニック動物を用いて薬剤を評価する方法。

(33) 薬剤が抗癌剤である、(32) に記載の方法。

(34) (2) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする遺伝子が欠損した非ヒト動物。

(35) 被験試料の存在下および非存在下で、(1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質または (5) に記載の複合体と $p27^{kip1}$ とを接触させる工程、該蛋白質または該複合体と $p27^{kip1}$ との結合量を測定する工程、および被験試料の存在下および非存在下での該蛋白質または該複合体と $p27^{kip1}$ との結合量を比較する工程を含む、 $p27^{kip1}$ と (1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質との結合を阻害する物質のスクリーニング方法。

(36) 被験試料の存在下および非存在下で、(1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質または (5) に記載の複合体と $p27^{kip1}$ を接触させる工程、該蛋白質または該複合体と $p27^{kip1}$ との結合量を測定する工程、および被験試料の存在下および非存在下での該蛋白質または該複合体と $p27^{kip1}$ との結合量を比較する工程を含む、 $p27^{kip1}$ のユビキチン化を抑制する物質のスクリーニング方法。

(37) 被験試料の存在下および非存在下で、(1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質または (5) に記載の複合体と $p27^{kip1}$ を接触させる工程、該蛋白質または該複合体と $p27^{kip1}$ との結合量を測定する工程、および被験試料の存在下および非存在下での該蛋白質または該複合体と $p27^{kip1}$ との結合量を比較する工程を含む、 $p27^{kip1}$ の分解を抑制する物質のスクリーニング方法。

(38) 被験試料の存在下および非存在下で、(1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質または (5) に記載の複合体と $p27^{kip1}$ を接触させる工程、該蛋白質または該

10

20

30

40

50

複合体と p 2 7^{Kip1} との結合量を測定する工程、および被験試料の存在下および非存在下での該蛋白質または該複合体と p 2 7^{Kip1} との結合量を比較する工程を含む、細胞周期の異常を原因とする疾患または細胞周期を調節することにより症状を軽減できる疾患の治療薬のスクリーニング方法。

(3 9) 疾患が癌である、(3 8) に記載の方法。

(4 0) (1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質または (5) に記載の複合体、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン結合酵素、ユビキチンおよび p 2 7^{Kip1} を含む系において被験試料の存在下および非存在下で p 2 7^{Kip1} のユビキチン化を行う工程、p 2 7^{Kip1} にとりこまれたユビキチンの量を測定する工程、および被験試料の存在下および非存在下での p 2 7^{Kip1} にとりこまれたユビキチンの量を比較する工程を含む、

10

p 2 7^{Kip1} のユビキチン化を抑制する物質のスクリーニング方法。
(4 1) (1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質または (5) に記載の複合体、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン結合酵素、ユビキチンおよび p 2 7^{Kip1} を含む系において被験試料の存在下および非存在下で p 2 7^{Kip1} のユビキチン化を行う工程、および p 2 7^{Kip1} にとりこまれたユビキチンの量を測定する工程、および被験試料の存在下および非存在下での p 2 7^{Kip1} にとりこまれたユビキチンの量を比較する工程を含む、p 2 7^{Kip1} の分解を抑制する物質のスクリーニング方法。

(4 2) (1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質または (5) に記載の複合体、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン結合酵素、ユビキチンおよび p 2 7^{Kip1} を含む系において被験試料の存在下および非存在下で p 2 7^{Kip1} のユビキチン化を行う工程、および p 2 7^{Kip1} にとりこまれたユビキチンの量を測定する工程、および被験試料の存在下および非存在下での p 2 7^{Kip1} にとりこまれたユビキチンの量を比較する工程を含む、細胞周期の異常を原因とする疾患または細胞周期を調節することにより症状を軽減できる疾患の治療薬のスクリーニング方法。

20

(4 3) 疾患が癌である、(3 8) に記載の方法。

(4 4) (1) ~ (4) のいずれかの 1 項に記載の蛋白質、または (5) に記載の複合体と特異的に結合する抗体。

(4 5) 抗体が、p 2 7^{Kip1} と (1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質または (5) に記載の複合体との結合を阻害する抗体である、(4 4) に記載の抗体。

(4 6) 抗体が、(1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質または (5) に記載の複合体が有する p 2 7^{Kip1} をユビキチン化する活性を阻害する作用を示す抗体である、(4 4) に記載の抗体。

30

(4 7) (4 4) ~ (4 6) のいずれか 1 項に記載の抗体を用いる、(1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質または (5) に記載の複合体を免疫学的に検出又は定量する方法。

(4 8) (4 4) ~ (4 6) のいずれか 1 項に記載の抗体を用いて、(1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質の発現量が、健常人と比較して蛋白質レベルで増加または減少している疾患を判定または診断する方法。

(4 9) (4 4) ~ (4 6) のいずれか 1 項に記載の抗体を含有する、(1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の蛋白質の発現量が、健常人と比較して蛋白質レベルで増加または減少している疾患の診断薬。

40

(5 0) (4 5) または (4 6) に記載の抗体を用いて、p 2 7^{Kip1} のユビキチン化を阻害する方法。

(5 1) (4 5) または (4 6) に記載の抗体を用いて、p 2 7^{Kip1} の分解を抑制する方法。

(5 2) (4 5) または (4 6) に記載の抗体を有効成分として含有する細胞周期の異常を原因とする疾患または細胞周期を調節することにより症状を軽減できる疾患の治療剤。

(5 3) 疾患が癌である、(5 2) に記載の治療剤。

本明細書においては、本発明において同定された p 2 7^{Kip1} をユビキチン化する活性を有する新規のユビキチンリガーゼ複合体を K P C (K i p 1 u b i q u i t y l a t

50

ion-promoting complex)、KPCの構成成分である2種の蛋白質を分子量の大きい順にKPC1およびKPC2と称する。KPC1は単独でp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を有するユビキチンリガーゼである。

本発明の蛋白質としては、以下の(1)~(4)に記載の蛋白質をあげることができる。

(1) p27^{Kip1}をユビキチン化する活性を有する複合体の構成成分であり、分子量が140kDaである、p27^{Kip1}をユビキチン化する活性を有する蛋白質

(2) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質

(3) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が付加、欠失あるいは置換したアミノ酸配列からなり、かつp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を有する蛋白質

(4) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を有する蛋白質

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質はヒトKPC1、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質はマウスKPC1である。

上記のアミノ酸の付加、欠失、あるいは置換は、部位特異的変異導入法〔Zoller, M. J. & Smith, M., *Nucleic Acids Res.*, 10, 6487 (1982); Dalbadie-McFarland, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6409 (1982); Wells, J. A. et al., *Gene*, 34, 315 (1985); Carter, P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 13, 4431 (1985); Kunkel, T. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 488 (1985)〕を用いて、配列番号2または4で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより行うことができる。

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、1個から数十個、好ましくは1~25個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。

目的の変異(欠失、置換、付加)を導入した配列をそれぞれの5'端に持つ1組のPCRプライマーを用いたPCR〔*Gene*, 77, 51 (1989)〕によっても、配列番号2または4で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAに変異を導入することができる。すなわち、まず該DNAの5'端に対応するセンスプライマーと、5'端に変異の配列と相補的な配列を有する、変異導入部位の直前(5'側)の配列に対応するアンチセンスプライマーで該DNAを鋳型にしてPCRを行い、該DNAの5'端から変異導入部位までの断片A(3'端に変異が導入されている)を増幅する。次いで、5'端に変異の配列を有する、変異導入部位の直後(3'側)の配列に対応するセンスプライマーと、該DNAの3'端に対応するアンチセンスプライマーで該DNAを鋳型にしてPCRを行い、5'端に変異が導入された該DNAの変異導入部位から3'端までの断片Bを増幅する。これらの増幅断片同士精製後、混合して鋳型やプライマーを加えずにPCRを行うと、増幅断片Aのセンス鎖と増幅断片Bのアンチセンス鎖は変異導入部位が共通しているのでハイブリダイズし、プライマー兼鋳型としてPCRの反応が進行し、変異が導入された該DNAが増幅する。

配列番号2または4で表されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が付加、欠失または置換したアミノ酸配列からなり、かつp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を有する蛋白質としては、配列番号2または4で表されるアミノ酸配列のN末に1~25個のアミノ酸を付加したアミノ酸配列からなる蛋白質、例えば配列番号2で表されるアミノ酸配列のN末に配列番号22で表されるヘキサヒスチジン(以下His6と略す)/FLAGタグを付加したアミノ酸配列からなる蛋白質をあげることができる。

また、本発明の蛋白質がp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を有するためには、配列番号2または4で表されるアミノ酸配列のうち1254~1291番目に存在するRINGフィンガードメインを有し、かつ配列番号2または4で表されるアミノ酸配列と、少な

10

20

30

40

50

くとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。

本明細書に記載される相同性の数値は、特に明示した場合を除き、BLAST〔J. Mol. Biol., 215, 403-410 (1990)〕、FASTA〔Methods. Enzymol., 183, 63-98 (1990)〕等の当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、好ましくはBLASTにおいてデフォルト(初期設定)のパラメータを用いて算出される数値あるいは、FASTAにおいてデフォルト(初期設定)のパラメータを用いて算出される数値である。

本発明の複合体としては、上記の本発明の蛋白質および以下の(a)~(c)に記載の蛋白質を構成成分として含む、 $p27^{Kip1}$ をユビキチン化する活性を有する複合体があげられる。

10

(a) 配列番号6または8で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質

(b) 配列番号6または8で表されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が付加、欠失あるいは置換したアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質

(c) 配列番号6または8で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質

配列番号6で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質はヒトKPC2、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質はマウスKPC2である。アミノ酸の付加、欠失、置換は上記の配列番号2または4で表されるアミノ酸配列のアミノ酸の付加、欠失、置換と同様に行なうことができる。配列番号6または8で表されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が付加、欠失または置換したアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合する蛋白質としては、配列番号6または8で表されるアミノ酸配列のN末またはC末に1~25個のアミノ酸を付加したアミノ酸配列からなる蛋白質、例えば配列番号6で表されるアミノ酸配列のN末に配列番号23で表されるHis6/ヘルペス・シンプレックス・ウイルス・エピトープ(以下His6/HSVと略す)タグを付加したアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号6で表されるアミノ酸配列のC末に配列番号24で表されるインフルエンザ・ウイルス・ヘマグルチニン・エピトープ(以下HAと略す)タグを付加したアミノ酸配列からなる蛋白質をあげることができる。また、この蛋白質が配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と会合するためには、配列番号6または8で表されるアミノ酸配列と、少なくとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。

20

30

本発明のDNAとしては、

(1) 本発明の蛋白質をコードするDNA、

(2) 配列番号1または3で表される塩基配列を含むDNA、

(3) 配列番号1または3で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ $p27^{Kip1}$ をユビキチン化する活性を有する蛋白質をコードするDNA、および

(4) (1)~(3)のDNAの塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAをあげることができる。

40

ストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、例えば配列番号1で表される塩基配列を有するDNAなどの本発明のDNAまたはその一部のDNA断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0mol/Lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/L塩化ナトリウム、15mmol/Lクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることがで

50

きる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) (以下、モレキュラー・クローニング第3版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-2001) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995) 等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1または3で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

10

(1)~(3)のDNAの塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとしては、具体的には配列番号1または3で表わされる塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAをあげることができる。(1)~(3)のDNAは、通常2本鎖DNAとして得られるので、センス鎖である(1)~(3)のDNAと同時にアンチセンス鎖として(1)~(3)のDNAの塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAも得ることができる。(1)~(3)の2本鎖DNAを100℃で5分間熱した後、氷上で急速に冷却することにより、(1)~(3)のDNA(センス鎖)と該DNAの塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNA(アンチセンス鎖)を分離することができる。

20

以下、本発明を詳細に説明する。

1. KPC1およびKPC2の精製と構造決定

(1) KPCの精製

KPCは、p27^{Kip1}をユビキチン化する活性を指標にして、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞、もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、または血球系の細胞もしくはその培養細胞から、精製することができる。p27^{Kip1}をユビキチン化する活性の測定法としては、7.(1)に記載した方法を用いることができる。

KPCの精製法としては、遠心分離、硫酸アンモニウム水溶液による塩析、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換または陽イオン交換カラム、ゲル濾過カラムなどを用いるクロマトグラフィーなどを、単独または組み合わせて処理する方法が上げられる。

30

(2) KPC1およびKPC2の部分アミノ酸配列の決定

精製されたKPCに含まれる構成成分の蛋白質の部分アミノ酸配列の決定は、以下の方法で行うことができる。すなわち、精製したKPCから、KPCに含まれる構成成分の蛋白質をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)などで分離し、クマシー染色などで可視化する。各バンドを切り出し、必要に応じてゲル中での還元、S-カルボキシアミドメチル化、トリプシン等の適当なプロテアーゼによる切断を行なう。適切なカラム、例えばμRPC C2/C18カラム(アマシャム・バイオサイエンシズ社製)等を用いて、その中に含まれるペプチドを分離回収し、Procise 494 Protein Sequencer(アプライド・バイオシステムズ社製)等のペプチドシーケンサーを用いた自動エドマン分解法により、部分アミノ酸配列を決定することができる。あるいは、プロテアーゼ処理後のペプチド混合物をLCQイオントラップ質量分析計、MALDI-TOF(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight)質量分析計、エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析計等により解析し、アミノ酸配列データベース上の配列のプロテアーゼ消化により理論上得られるペプチドの質量と比較することにより、部分アミノ酸配列を決定することができる[Pandey, A. & Mann, M., Nature 405, 837 (2000)]。

40

50

2. KPC1およびKPC2をコードするDNAの調製

(1) KPC1およびKPC2をコードするDNAの調製

得られたKPC1の部分アミノ酸配列をクエリーに用いて、BLAST、FASTA等の
 相同性検索プログラムを用いて、Genpept、PIR、Swiss-Prot等のア
 ミノ酸配列データベースを検索することにより、KPC1と相同性をもつアミノ酸配列を
 検索することができる。ジェンバンク(GenBank)、EMBL、DDBJ等の塩基
 配列データベースを各フレームで翻訳したアミノ酸配列に対して検索をかけることにより
 、KPC1をコードするcDNAと相同性のある塩基配列を検索することができる。得られ
 た配列がEST(Expressed Sequence Tag)の場合は、得られ
 た配列をクエリーにしてさらに相同性を有する配列、同一のcDNAクローンに由来する
 もう一方の端からのESTの配列を検索することにより、さらにKPC1をコードするc
 DNAと推定される配列を検索することができる。ESTの配列を決定したcDNAクロー
 ンを入手し、そのcDNA全体の塩基配列を明らかにすることができる。得られたcD
 NAの塩基配列を各フレームで翻訳し、KPC1の部分アミノ酸配列と同一のアミノ酸配
 列を有するオープン・リーディング・フレーム(ORF)のアミノ酸配列をKPC1のア
 ミノ酸配列とすることができる。

10

このようにして得られるヒトKPC1をコードするcDNAとしては、ヒトcDNAのE
 STの配列(ジェンバンク登録番号BE885419およびBE885914)をそれぞ
 れ有するIMAGEコンソーシアムcDNAクローンIMAGE:3909169および
 IMAGE:3909203(Research Genetics社より入手可能)が
 あげられる。

20

あるいは、上記で得られたcDNAの塩基配列を元にして、以下のようにしてもKPC1
 をコードするDNAを単離することができる。まずKPC1をコードする領域を含むcD
 NAの領域を適当に選択し、選択した領域の塩基配列の5'端20~40塩基の配列を3
 '端に含むDNA、選択した領域の塩基配列の3'端20~40塩基と相補的な配列を3
 '端に含むDNAをそれぞれDNA合成機で合成する。KPC1が発現している組織や細
 胞からcDNAを調製する。調製したcDNAを鋳型とし、2種類の合成DNAをプライ
 マーとして用いたPCRによりKPC1をコードするDNAを増幅し単離することができ
 る。組織や細胞からのcDNAの調製、およびPCRはモレキュラー・クロニング第3
 版に記載の方法に従って行うことができる。

30

以上のようにして得られるKPC1をコードするDNAとして、配列番号1で表される塩
 基配列を有するヒトKPC1のcDNA、配列番号3で表される塩基配列を有するマウス
 KPC1のcDNAをあげることができる。これらのcDNAがコードするヒトKPC1
 、マウスKPC1はそれぞれ、配列番号2および4で表される新規なアミノ酸配列を有す
 る。KPC1をコードするDNAにおいては、KPC1をコードする領域の各コドンの塩
 基配列はcDNAで用いられているコドンに限られるものではなく、同じアミノ酸をコー
 ドするあらゆるコドンの塩基配列を用いることができる。

KPC2は、公知のglioblastoma cell differentiation factor-related protein(GBDR1){Genomic
 s 65, 243(2000)}と同じ蛋白質であった。したがってKPC2をコードす
 るDNAとしては、配列番号5で表される塩基配列を有するDNA(ヒトGBDR1のc
 DNA)、配列番号7で表される塩基配列を有するDNA(マウスGBDR1のcDNA
)をあげることができる。これらのcDNAがコードするヒトKPC2、マウスKPC2
 はそれぞれ、配列番号6および8で表されるアミノ酸配列を有する。

40

(2) KPC1遺伝子を含むゲノムDNAの取得

(1)で得られたKPC1 cDNAの塩基配列をクエリーにして、ジェンバンク等の塩
 基配列データベースから、BLASTやFASTA等の相同性検索プログラムを用いて、
 KPC1 cDNAの一部の領域と連続して一致する配列を有するヒトまたはマウスのゲノ
 ムDNAを検索することにより、KPC1遺伝子を含むゲノムDNAの塩基配列の情報を
 得ることができる。このような塩基配列として、ジェンバンク登録番号:NT_0224

50

39をあげることができる。得られた塩基配列の任意の領域は、その領域の塩基配列の5'端20~40塩基の配列を3'端に含むDNAおよびその領域の塩基配列の3'端20~40塩基と相補的な配列を3'端に含むDNAをプライマー、ヒトまたはマウスゲノムDNAを鋳型としたPCRにより増幅し単離することができる。ゲノムDNAの調製、およびPCRはモレキュラー・クローニング第3版に記載の方法に従って行うことができる。

また、モレキュラー・クローニング第3版に記載の方法に基づいて、マウスあるいはヒトの細胞や組織から単離した染色体DNAを用いて作製したゲノムDNAライブラリーに対して、(2)で得られたマウスあるいはヒトのKPC1 cDNAをプローブにして、ブランク・ハイブリダイゼーション等の方法でスクリーニングすることにより、KPC1遺伝子を含むマウスあるいはヒトのゲノムDNAを得ることができる。

KPC1遺伝子を含むゲノムDNAの塩基配列とcDNAの塩基配列を比較することにより、KPC1遺伝子のエキソン/イントロン構造を明らかにすることができる。また、特にcDNAの5'側の部分をプローブにすることにより、KPC1遺伝子の、プロモーターなど転写を制御する領域のゲノムDNAの塩基配列を明らかにすることができる。この配列はKPC1遺伝子の転写の制御機構を解析するのに役立つ。また、相同性組換えの手法〔Nature, 326, 295(1987); Cell, 51, 503(1987)〕により、染色体上のKPC1遺伝子を不活化または任意の配列と置換したクローンを作製することができる。

3. KPC1、KPC2、ならびにKPC1およびKPC2を構成成分として含む複合体の製造法

KPC1またはKPC2は、モレキュラー・クローニング第3版、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press(1995)等に記載された方法を用いて、上記2.で調製したKPC1またはKPC2をコードするDNAを宿主細胞中で発現させることにより製造することができる。

すなわち、KPC1またはKPC2をコードするDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、KPC1またはKPC2を発現する形質転換体を取得する。該形質転換体を培養することにより、培養物中にKPC1またはKPC2が生成蓄積する。該培養物からKPC1またはKPC2を単離精製することにより、KPC1またはKPC2を製造することができる。以下(1)~(3)にKPC1の製造方法について記載するが、KPC2についても、KPC2をコードするDNAを用いて同様にして製造することができる。

(1) 形質転換体の作製

発現ベクターとしては、宿主細胞において自律複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、宿主細胞中でKPC1をコードするDNAからmRNAを転写できるプロモーターを含有しているものが用いられる。

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

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、発現ベクターは宿主原核生物中で自律複製可能であり、プロモーターおよびその下流にリボソーム結合配列およびKPC1をコードするDNAを挿入するクローニングサイトを有するものを用いる。必ずしも必要ではないが、該クローニングサイトの直後に転写終結配列を配置する方が好ましい。また、形質転換体の選択のため、薬剤耐性遺伝子等のマーカーとなる遺伝子を発現する配列を含むようにする。リボソーム結合配列の下流のクローニングサイトにKPC1をコードするDNAを挿入する。リボソーム結合配列と開始コドンとの間は適当な距離(例えば、大腸菌宿主のベクターの場合6~18塩基)に調節されていることが好ましい。

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば大腸菌を宿主とした場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモ

ーター、T7プロモーター、PRプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター等をあげることができる。またtrpプロモーターを2つ直列させたプロモーター、tacプロモーター、T7lacプロモーター、letIプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。枯草菌を宿主とした場合は、枯草菌のファージであるSPO1やSPO2のプロモーター、PenPプロモーター等をあげることができる。

発現ベクターとしては、例えば、pGEMEX-1(プロメガ社製)、pQE-30(キアゲン社製)、pKYP200[Agric. Biol. Chem., 48, 669(1984)]、pLSA1[Agric. Biol. Chem., 53, 277(1989)]、pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306(1985)]、pTrs30[大腸菌JM109/pTrs30(FERM BP-5407)より調製]、pGEX-5X-3(アマシャム・バイオサイエンシズ社製)、pET14(ノバジェン社製)、pPROTet.E(クロンテック社製)pRSETA(インビトロジェン社製)等を例示することができる。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュドモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli BL21(DE3)pLysS、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

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

酵母を宿主細胞として用いる場合の発現ベクターとしては、宿主酵母で転写を行なうプロモーター、転写の終止配列および酵母での形質転換マーカーとなる遺伝子、たとえば薬剤耐性遺伝子やTRP1、HIS3、LEU2等のアミノ酸合成系の遺伝子を発現できる配列を含有しているものが用いられる。また、発現ベクターの作製や維持を容易にするため、大腸菌内でも自律複製と遺伝子導入マーカーとなる薬剤耐性遺伝子を発現できるものが好ましい。

プロモーターとしては、酵母中で転写を行なえるものであればいずれのものを用いてもよく、例えばSaccharomyces cerevisiaeのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子ADH1、ガラクトース代謝系遺伝子GAL1やGAL10等のプロモータ

10

20

30

40

50

一、酸性フォスファターゼ遺伝子 P H O 5 プロモーター、フォスフォグリセレートキナーゼ遺伝子 P G K プロモーター、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 G A P プロモーター、ヒートショック蛋白質遺伝子プロモーター、接合因子遺伝子 M F 1 プロモーター、銅メタロチオネイン遺伝子 C U P 1 プロモーター、P i c h i a p a s t o r i s のアルコールオキシダーゼ遺伝子 A O X 1 のプロモーター等が用いられる。宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、ピヒア属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e、S c h i z o s a c c h a r o m y c e s p o m b e、P i c h i a p a s t o r i s 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [M e t h o d s E n z y m o l . , 1 9 4 , 1 8 2 (1 9 9 1)]、スフェロプラスト法 [P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 1 , 4 8 8 9 (1 9 8 4)]、酢酸リチウム法 [J . B a c t e r i o l . , 1 5 3 , 1 6 3 (1 9 8 3)] 等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、宿主動物細胞で転写を行なうプロモーター、転写の終止と転写物のポリアデニル化のシグナルの配列を含有しているものが用いられる。またベクターの作製や維持を容易にするため、大腸菌内でも自律複製と遺伝子導入マーカーとなる薬剤耐性遺伝子を発現できるものが望ましい。プロモーターとしては、動物細胞中で転写を行なえるものであればいずれも用いることができるが、S V 4 0 の初期プロモーター、ヒトサイトメガロウイルスの I E (i m m e d i a t e e a r l y) 遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー、ラウス肉腫ウイルス、ヒト T 細胞白血病ウイルス I、モロニーマウス白血病ウイルス等のレトロウイルスの L T R 等のウイルス由来の配列、あるいはメタロチオネイン遺伝子や - アクチン遺伝子、伸長因子 - 1 などの動物細胞由来の遺伝子のプロモーター等をあげることができる。また S V 4 0 の初期プロモーターとヒト T 細胞白血病ウイルス I の L T R を組み合わせた S R プロモーター等これらのプロモーターを人為的に組み合わせたプロモーターも用いられる。

宿主染色体 DNA に K P C 1 をコードする DNA が組み込まれた恒常的な K P C 1 発現細胞は、G 4 1 8、ハイグロマイシン等の薬剤に対する耐性遺伝子を発現できる配列を含む K P C 1 発現ベクターを宿主細胞に導入し、薬剤の存在下で培養することにより選択することができる。また、宿主細胞中での K P C 1 の生産量を上昇させるために、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (d h f r) 遺伝子を発現できるような配列を含む K P C 1 の恒常的発現ベクターを宿主細胞に導入し、d h f r 阻害剤であるメトトレキサート (m e t h o t r e x a t e) の濃度を段階的に上げながら培養することにより、d h f r 遺伝子とともに K P C 1 をコードする DNA のコピー数を増幅させることもできる。この d h f r 遺伝子を用いた遺伝子増幅を行なう場合の宿主細胞としては、d h f r 遺伝子が機能していない細胞、例えば C H O / d h f r - (A T C C : C R L - 9 0 9 6) などを用いる。

具体的な発現ベクターとして、例えば、p E G F P - C 2 (クロンテック社)、p A G E 1 0 7 [特開平 3 - 2 2 9 7 9 ; C y t o t e c h n o l . , 3 , 1 3 3 , (1 9 9 0)]、p A S 3 - 3 (特開平 2 - 2 2 7 0 7 5)、p C D M 8 [N a t u r e , 3 2 9 , 8 4 0 , (1 9 8 7)]、p C M V - T a g 1 (ストラタジーン社製) p c D N A 3 . 1 (+) (インビトロジェン社)、p R E P 4 (インビトロジェン社製)、p M S G (アマシャム・バイオサイエンシズ社製)、p A M o [J . B i o l . C h e m . , 2 6 8 , 2 2 7 8 2 (1 9 9 3)] 等があげられる。

宿主細胞としては、ヒト細胞である H e L a、ナマルバ (N a m a l w a)、2 9 3、アフリカミドリザル腎臓細胞である C O S - 1 や C O S - 7、ハムスターの細胞である C H O や B H K、マウス胎児細胞である N H I 3 T 3、マウス・ミエローマ細胞である S P 2 / 0 や N S O、ラット・ミエローマ細胞である Y B 2 / 0 等の細胞株をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [C y t o t e c h n o l . , 3

10

20

30

40

50

、133(1990)]、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)]等をあげることができる。

あるいは、発現用ウイルスベクターを利用することもできる。発現用ウイルスベクターとしては、該ウイルスのパッケージングに必要なタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも1つが欠損しており、パッケージング細胞において組換えウイルスが生産でき、宿主細胞で導入するDNAがコードする蛋白質を発現させるために好適なプロモーターを含有しているものを用いることができる。例えば、pMX-puro、MFG[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733(1995)]、pBabePuro[Nucleic Acids Res., 18, 3587-3596(1990)]、LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG[J. Virol., 72, 8150(1998)]、およびpAdex1[Nucleic Acids Res., 23, 3816(1995)]等をあげることができる。

ウイルスのパッケージングに必要なタンパク質として、レトロウイルスベクターの場合にはマウスレトロウイルス由来のgag、pol、env等、レンチウイルスベクターの場合にはHIVウイルス由来のgag、pol、env、vpr、vpu、vif、tat、rev、nef等、アデノウイルスベクターの場合にはアデノウイルス由来のE1A、E1B等、アデノ随伴ウイルスの場合はRep(p5, p19, p40)、Vp(Cap)等の蛋白質をあげることができる。

プロモーターとしては、上記の動物細胞を宿主とする発現ベクターに記載のプロモーターを使用することができる。

活性ペプチド前駆体遺伝子をウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入し、組換えウイルスベクターを造成する。造成した該組換えウイルスベクターを、該ウイルスベクターに適合したパッケージング細胞に導入し、組換えウイルスを生産する。

パッケージング細胞としては、該ウイルスベクターが欠損する上記遺伝子のコードするパッケージングに必要なタンパク質を補給できる細胞であればいかなるものも用いることができ、該遺伝子を発現させたヒト腎臓由来のHEK293細胞やマウス線維芽細胞NIH3T3を、レトロウイルスベクターの場合はPlatE細胞[Gene Ther., 7, 1063(2000)]を用いることができる。

上記パッケージング細胞への上記ウイルスベクターの導入法として、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)]等をあげることができる。

生産された組換えウイルスを宿主細胞に感染させることにより、宿主細胞にウイルスベクターを導入することができる。宿主細胞としては、上記の動物細胞を宿主とする発現ベクターの宿主細胞と同様のものをあげることができる。

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合は、バキュロウイルス発現系[Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York(1992); Bio/Technology, 6, 47(1988)]が用いられる。即ち、トランスファベクターにKPC1をコードするDNAを挿入した後、該ベクターとバキュロウイルスを昆虫細胞に同時に導入し、強力なプロモーターであるポリヘドリン遺伝子プロモーター下にKPC1をコードするDNAが挿入された組換えバキュロウイルスを相同組換えによって作製した後、この組換えバキュロウイルスを再度昆虫細胞に感染させることにより、KPC1を発現することができる。

バキュロウイルスとしてはAutographa californica核多角体病ウイルス、カイコ核多角体病ウイルス等が用いられる。昆虫細胞としてはSpodoptera frugiperdaの細胞であるSf9およびSf21[Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York(1992)]、Trichoplusia niの細胞であるHigh5(インビトロジェン社製)等

を用いることができる。また、カイコ幼虫体をそのまま用いることもできる。トランスファクターには、ポリヘドリンプロモーターおよび相同組換えを起こさせるためのバキュロウイルス由来の配列、ベクターの維持・増殖や外来遺伝子の組み込み等の遺伝子操作を大腸菌内で行なうための配列（大腸菌での自律複製可能な配列および薬剤耐性遺伝子）が含まれており、具体的には pV L 1 3 9 2、pV L 1 3 9 3、p B l u e B a c 4 . 5（ともにインビトロジェン社製）、p B a c P A K 9（クロンテック社製）等があげられる。

動物個体を用いて K P C 1 を生産することもできる。例えば、公知の方法〔Am. J. Clin. Nutr., 63, 639S (1996); Am. J. Clin. Nutr., 63, 627S (1996); Bio/Technology, 9, 830 (1991)〕に準じて、K P C 1 をコードする DNA を導入した非ヒトトランスジェニック動物中に K P C 1 を生産することができる。

10

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

(2) 形質転換体の培養

K P C 1 をコードする DNA を組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、K P C 1 を生成蓄積させ、該培養物より K P C 1 を採取することにより、K P C 1 を製造することができる。

20

動物細胞を宿主とした形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている R P M I 1 6 4 0 培地〔J. Am. Med. Assoc., 199, 519 (1967)〕、イーグル (Eagle) の MEM (Minimum Essential Medium)〔Science, 122, 501 (1952)〕、ダルベッコ (Dalbecco) 改変イーグル培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199 培地〔Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)〕またはこれら培地にウシ胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。必要に応じてペニシリンやストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。培養は、通常 pH 6 ~ 8、30 ~ 40、5% CO₂ 存在下等の条件下で 1 ~ 7 日間行う。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM - FH 培地〔ファーマンゲン (Pharminggen) 社製〕、Sf - 9 0 0 I I S F M 培地 (インビトロジェン社製)、Ex Cell 1 4 0 0、Ex Cell 1 4 0 5〔いずれも J R H バイオサイエンス (J R H Biosciences) 社製〕、Grace の昆虫培地〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。培養条件は、pH 6 ~ 7、培養温度 25 ~ 30 がよく、培養時間は、通常 1 ~ 5 日間である。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

30

形質転換体が動物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育し、K P C 1 を生成蓄積させ、該動物個体より K P C 1 を採取することにより、K P C 1 を製造することができる。すなわち、動物個体の場合、例えば、K P C 1 をコードする DNA を保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、K P C 1 を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より K P C 1 を採取することにより、K P C 1 を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

40

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

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

50

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

無機塩としては、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

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

10

誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、培養中に必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。インデューサーとしては、例えば、l a cプロモーターを誘導するイソプロピルガラクトシド、t r pプロモーターを誘導するインドールアクリル酸等があげられる。

(3) 発現させた蛋白質の単離精製

上記形質転換体の培養物中に蓄積したKPC1を単離精製するには、以下のような通常の蛋白質の単離精製法を用いればよい。

20

KPC1が細胞外に分泌される場合には、培地中にKPC1が蓄積する。従って培養終了後、遠心分離等の手法により細胞を含まない培地のみを回収する。該培地から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、DEAEセファロース、DIAION HPA-75(三菱化学社製)、モノQ(Mono Q、アマシャム・バイオサイエンシズ社製)等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、SPセファロース(アマシャム・バイオサイエンシズ社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、および等電電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

30

KPC1が、形質転換体の細胞内に蓄積する場合には、培養終了後の培養物から、形質転換体の細胞を遠心分離等の手法により回収し、緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。KPC1が細胞内で溶解状態で存在する場合には、該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、上記の培地からの精製単離と同様にして精製標品を得ることができる。また、KPC1が細胞内に不溶体を形成して存在する場合は、該無細胞抽出液を遠心分離後、沈殿画分としてKPC1の不溶体を回収する。このKPC1の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化した後、該可溶化液を、蛋白質変性剤の濃度を蛋白質が変性しない程度まで希釈するか、あるいは、蛋白質変性剤を含まないかまたは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度まで希薄な溶液

40

に透析し、KPC1を正常な立体構造に復元させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

また、公知の方法〔J. Biomol. NMR, 6, 129(1998); Science, 242, 1162(1988); J. Biochem., 110, 166(1991)〕に準じて、インビトロ転写・翻訳系を用いてKPC1を生産することができる。すなわち、KPC1をコードするDNAをSP6、T7、T3等のプロモーターの下流につなげ、それぞれのプロモーター特異的なRNAポリメラーゼを反応させることにより大量のKPC1をコードするRNAをインビトロで合成した後、無細胞系の翻訳系例えばウサギ網状赤血球ライセートやコムギ胚芽抽出液を用いた翻訳系を利用して、KPC1を生産することができる。

50

精製したKPC1の構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば「遺伝子クローニングのための蛋白質構造解析」(平野久著、東京化学同人発行、1993年)に記載の方法により実施可能である。

(4) KPC1およびKPC2を構成成分として含む複合体の製造方法

KPC1およびKPC2の両者を発現する形質転換体を作製し、(2)に記載の方法に準じて該形質転換体を培養することにより、培養物中にKPC1およびKPC2を構成成分として含む複合体(以下、KPC1-KPC2複合体とよぶこともある)を生成蓄積させ、(3)に記載の方法に準じて該培養物から該複合体を単離精製することにより、該複合体を製造することができる。KPC1およびKPC2の両者を発現する形質転換体は、(1)に記載した方法で作製したKPC1の発現ベクターとKPC2の発現ベクターの両者を宿主に導入することにより作製できる。あるいは、KPC1の発現ベクターにさらに、プロモーターおよびその下流に接続したKPC2をコードするDNAからなる発現ユニットを挿入して、KPC1およびKPC2の発現ベクターを作製し、宿主細胞に導入することによっても作製できる。

10

KPC1-KPC2複合体は、(1)~(3)に記載の方法に準じて製造したKPC1およびKPC2を混合し、インビトロで会合させることによっても製造することができる。

4. KPC1と特異的に結合する抗体の調製

(1) ポリクローナル抗体の調製

上記3.に記載の方法により取得したKPC1の全長または部分断片の精製標品、あるいはKPC1の一部のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として用い、動物に投与することにより、KPC1と特異的に結合するポリクローナル抗体を作製することができる。抗原としてペプチドを用いる場合は、ペプチドをキーホール・リンペット・ヘモシアニンや牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBOC法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法あるいは、アプライド・バイオシステムズ社、Advanced ChemTech社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することができる。

20

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3~20週令のラット、マウス、ハムスター等の非ヒトほ乳動物を用いることができる。

抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に採血して血清を調製し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法(ELISA)[酵素免疫測定法(第3版)、医学書院(1987); Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1988)]等で確認する。抗原の投与量は動物1匹に投与1回当たり50~200μgが好ましい。

30

ELISAの具体的例として、以下の方法をあげることができる。免疫の際、抗原に用いたKPC1またはペプチドを適当なプレートにコートし、血清を反応させ、さらに抗原を投与した動物のイムノグロブリンに対する抗体をホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ等の酵素で標識した抗体を反応させる。標識酵素により発色する基質を添加して反応を行ない、発色量を分光光度計により測定し、血清の抗体価とする。

40

免疫に用いた抗原に対し、血清が十分な抗体価を示した動物より全血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿[Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)]、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはGカラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

(2) モノクローナル抗体の調製

(a) 抗体産生細胞の調製

50

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

該抗体価を示したマウスまたはラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEMで3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(b) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1〔Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1(1978)、Eur. J. Immunol., 6, 511(1976)〕、SP2/0-Ag14〔Nature, 276, 269(1978)〕、P3-X63-Ag8653〔J. Immunol., 123, 1548(1979)〕、P3-X63-Ag8〔Nature, 256, 495(1975)〕等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地〔RPMI 1640培地に1.5mmol/Lグルタミン、50μmol/L 2-メルカプトエタノール、10μg/mLゲンタマイシンおよび10%ウシ胎児血清を加えた培地(以下、正常培地という)に、さらに15μg/mL 8-アザグアニンを加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3～4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

(c) ハイブリドーマの作製

(a)で取得した抗体産生細胞と(b)で取得した骨髄腫細胞をMEMまたはPBS(1.83g/Lリン酸水素二ナトリウム、0.21g/Lリン酸二水素一カリウム、7.65g/L塩化ナトリウム、pH7.2)でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞:骨髄腫細胞=5～10:1になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、攪拌しながら37℃で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングリコール-1000 2g、MEM 2mLおよびジメチルスルホキシド0.7mLを混合した溶液を0.2～1mL添加し、更に1～2分間毎にMEM1～2mLを数回添加する。添加後、MEMを加えて全量が50mLになるように調製する。該調製液を900rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地〔正常培地に0.4mmol/Lヒポキサンチン、15μmol/Lチミジンおよび0.4μmol/Lアミノプテリンを加えた培地〕100mL中に懸濁する。該懸濁液を96ウェル培養用プレートに100μL/ウェルずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとり、ELISAにより、培養上清中のKPC1に結合する抗体を検出することにより、KPC1に特異的に結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを選択する。

ELISAの具体的例として、以下の方法をあげることができる。免疫の際、抗原に用いたKPC1またはペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマの培養上清を反応させ、さらにホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ等の酵素で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体(抗体産生細胞がラット由来の場合は抗ラットイムノグロブリン抗体)を反応させる。標識酵素により発色する基質を添加して反応を行ない、発色量を分光光度計により測定して、培養上清中のKPC1に特異的に結合する抗体を検出する。

選択したハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する〕、上記と同様にして、ハイブリドーマの培養上清中のKPC1に結合する抗体を検出し、安定して高い抗体生産量を示すハイブリドーマをKPC1に特異的に結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

(d) モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔プリスタン(2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) 0.5 mLを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得したKPC1に特異的に結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞 $5 \sim 2.0 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。得られた上清より、ポリクローナル抗体の精製で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

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

上記(1)および(2)に記載の方法でKPC1と特異的に結合する抗体を得ることができる。また、KPC1に代えてKPC2の全長または部分断片の精製標品、あるいはKPC2の一部のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として用い、上記(1)および(2)に記載の方法に準じて、KPC2と特異的に結合する抗体を得ることができる。

(3) KPC1-KPC2複合体と特異的に結合する抗体

1. または3.(4)に記載の方法で得られるKPC1-KPC2複合体の精製標品を抗原として用い、上記(1)および(2)に記載の方法に準じて、KPC1-KPC2複合体と特異的に結合する抗体を得ることができる。

KPC1またはKPC2と特異的に結合する抗体も、KPC1-KPC2複合体と特異的に結合する抗体として用いられる。

(4) p27^{Kip1}のユビキチン化を阻害する抗体

p27^{Kip1}のユビキチン化を阻害する抗体としては、KPC1またはKPC1-KPC2複合体が有するp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を阻害する抗体、およびp27^{Kip1}とKPC1またはKPC1-KPC2複合体との結合を阻害する抗体があげられる。

KPC1またはKPC1-KPC2複合体が有するp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を阻害する抗体は、7.(1)に記載したp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を測定する系に、(1)~(3)に記載した方法で得られたKPC1またはKPC1-KPC2複合体と特異的に結合する抗体を被験試料として添加して、KPC1またはKPC1-KPC2複合体のp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を測定し、添加しない場合と比較して、KPC1またはKPC1-KPC2複合体の活性が低下した抗体を選択することにより、得ることができる。

p27^{Kip1}とKPC1またはKPC1-KPC2複合体との結合を阻害する抗体は、8.(2)に記載したp27^{Kip1}とKPC1またはKPC1-KPC2複合体との結合を測定する系に、(1)~(3)に記載した方法で得られたKPC1またはKPC1-KPC2複合体と特異的に結合する抗体を被験試料として添加して、p27^{Kip1}とKPC1またはKPC1-KPC2複合体との結合量を測定し、添加しない場合と比較して、結合量が低下した抗体を選択することにより、得ることができる。

5. KPC1遺伝子の染色体上の位置

塩基配列データベース上のヒトゲノムDNAの配列には通常、その配列の染色体の位置についての情報が記載されている。例えば、2.(2)で得られたヒトKPC1ゲノム遺伝子のエキソンを含むヒトゲノムDNAの配列(ジェンバンク登録番号: NT_022439)についてはヒト染色体3p24.3に位置することがデータベース上に記載されている。したがってヒトKPC1遺伝子はヒト染色体3p24.3に位置するということができる。

このようにして得られたKPC1遺伝子の染色体上の位置の情報は、疾患とKPC1遺伝子の関連を研究するのに役立つ。例えば、癌では癌抑制遺伝子の存在する可能性の高い染色体上の領域として、多くの癌について高頻度にLOH(loss of heterozygosity: 2対の内一方の遺伝子に見られる染色体欠失)が検出される領域の

10

20

30

40

50

特定が進んでいるが、このような領域とKPC1遺伝子が存在する染色体の位置が一致すれば、KPC1がこの領域にLOHを持つ癌の発症に關与する可能性があることになる。この場合、このような癌におけるKPC1遺伝子の変異やKPC1の発現量を解析することにより、KPC1と癌との關連が明らかになれば、KPC1をコードするDNAに由来するポリヌクレオチドやオリゴヌクレオチド、KPC1と特異的に結合する抗体を用いて、9.、11.または13.に記載する方法に基づいて、このような癌の診断や治療を行なうことができる。

6. KPC1をコードするDNAを導入した非ヒトトランスジェニック動物およびKPC1遺伝子欠損非ヒト動物の作製

(1) KPC1をコードするDNAを導入した非ヒトトランスジェニック動物の作製

10

KPC1をコードするDNAを導入した非ヒトトランスジェニック動物(以下、単にトランスジェニック動物ともいう)は、文献〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7380 (1980); Nature, 344, 541 (1990); Nature, 315, 680 (1985); Immunol. Immunopathol., 17, 303 (1987)〕に記載の方法に準じて、非ヒト哺乳動物の受精卵へ直接、該動物の細胞内でKPC1を発現させうるプロモーターの下流にKPC1をコードするDNAを連結した遺伝子構築物をインジェクションすることにより作製することができる。また、非ヒト哺乳動物の胚性幹細胞を公知の方法〔Nature, 292, 154 (1981); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634 (1981); US 5453357; US 5670372; Dev. Biol., 163, 288 (1994); Reprod. Fert. Dev., 6, 563 (1994); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7844 (1996)〕に基づいて樹立し、該胚性幹細胞へ通常の培養細胞への遺伝子導入の場合と同様にして該動物の細胞内でKPC1を発現させうるプロモーターの下流にKPC1をコードするDNAを連結した遺伝子構築物を導入後、集合キメラ法や注入キメラ法等の手法によりトランスジェニック動物を作出することができる〔Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)〕。プロモーターとして、3.(1)に記載の動物細胞での発現ベクターに用いることのできるプロモーターを同様に用いることができる。適切なプロモーターを使用することにより、全身あるいは組織特異的にKPC1を高発現するトランスジェニック動物を得ることができる。

20

30

得られた該トランスジェニック動物は、KPC1の活性により、細胞内のp27^{Kip1}のユビキチン化および分解が促進するため、細胞周期の異常が引き起こされ、細胞周期の異常を原因とする疾患、例えば癌等の疾患モデルとなると考えられる。また、該トランスジェニック動物に抗癌剤等の薬剤を投与し、該トランスジェニック動物の疾患症状や病理を観察することにより、薬剤の評価を行なうことができる。

(2) KPC1遺伝子欠損非ヒト動物の作製

40

遺伝子欠損をさせる非ヒト哺乳動物のKPC1遺伝子含むゲノムDNAを2.(2)に記載の方法で単離する。該ゲノムDNAのエキソン部分の全部または一部を欠失させた不活性型KPC1遺伝子を含むターゲティングベクターを作製する。公知の手法〔Nature, 326, 295 (1987); Cell, 51, 503 (1987)〕により、ターゲティングベクターを胚性幹細胞に導入し、染色体上のKPC1遺伝子と導入した不活性型KPC1遺伝子が相同組換えを起こした胚性幹細胞を作製することができる〔Nature, 350, 243 (1991)〕。

選択した胚性幹細胞と非ヒト哺乳動物の受精卵を用い集合キメラ法あるいは注入キメラ法を用い生殖系列キメラ個体を作製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞のKPC1遺伝子が不活性型KPC1遺伝子に置換された個体を

50

得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方のKPC1遺伝子が不活性型に変異したホモ個体を得ることができる。

ターゲティングベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach IRL Press at Oxford University Press (1993)等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲティングベクターは、リプレースメント型、インサクション型いずれでも用いることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリA選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムDNAに対するザンハイブリダイゼーション(モレキュラー・クローニング第3版)やPCR等があげられる。

7. p27^{Kip1}をユビキチン化する活性およびp27^{Kip1}の分解の測定

(1) KPC1またはKPC1-KPC2複合体のp27^{Kip1}をユビキチン化する活性の測定

ユビキチン化反応のインビトロ再構成系〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 2563 (1995); Science, 269, 682 (1995); Cell, 91, 221 (1997)〕を利用し、KPC1またはKPC1-KPC2複合体を用いることにより、以下のようにしてKPC1またはKPC1-KPC2複合体が有するp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を測定することができる。

例えば上記3.に記載の方法により得られる精製したKPC1またはKPC1-KPC2複合体を、p27^{Kip1}、E1およびE2と試験管内で混合したものにユビキチンを添加し反応を行なう。SDS-PAGE等により、ユビキチン化されたp27^{Kip1}を単離し、p27^{Kip1}に取り込まれたユビキチンの量を測定する。p27^{Kip1}に取り込まれたユビキチンの量は、反応時に添加するユビキチンを蛍光、ビオチン、あるいは放射性同位体で標識したものを使用し、該標識に基づいたシグナルを測定する、あるいは抗ユビキチン抗体を用いてユビキチンを検出することにより測定することができる〔Nature, 373, 81 (1995); FEBS Lett., 377, 193 (1995); Science, 269, 682 (1995)〕。また、SDS-PAGE後に、p27^{Kip1}を認識する抗体(p27^{Kip1}と特異的に結合する抗体、またはp27^{Kip1}に付加したタグと特異的に結合する抗体)を利用したイムノプロット解析を行ない、標的蛋白質の分子量の増加を指標にユビキチンの量を測定することもできる〔J. Biol. Chem., 276, 48937 (2001)〕。

また、例えばKPC1またはKPC1-KPC2複合体を発現する形質転換体を3.(1)、3.(4)に記載の方法に準じて作製し、該形質転換体あるいは細胞抽出液等の該形質転換体の処理物にユビキチンおよびプロテアソーム阻害剤を添加し、適当な温度で培養または保温することにより、ユビキチン-プロテアソーム系の反応をポリユビキチン化までで停止させる系を、上記のインビトロ再構成系の代わりに利用して測定することもできる。形質転換体の宿主としては、動物細胞等、内在性にp27^{Kip1}、E1およびKPC1またはKPC1-KPC2複合体が利用できるE2を発現しているものを用いる。この系においてp27^{Kip1}に取り込まれたユビキチンは、上記のインビトロ再構成系と同様の方法により測定することができる。

(2) KPC1またはKPC1-KPC2複合体に依存したp27^{Kip1}の分解の測定
3.(1)、3.(4)に記載の方法に準じて作製したKPC1またはKPC1-KPC2複合体を発現する形質転換体を培養して、経時的に一部を回収し、それぞれの細胞のp27^{Kip1}の含量を測定し、形質転換体の代わりにKPC1またはKPC1-KPC2複合体を発現しない宿主を用いた場合のp27^{Kip1}の含量と比較することにより、KPC1またはKPC1-KPC2複合体に依存したp27^{Kip1}の分解を測定すること

ができる。形質転換体の宿主としては、動物細胞等、内在性に p 2 7^{Kip1}、E 1、K P C 1 または K P C 1 - K P C 2 複合体が利用できる E 2、およびプロテアソームを発現しているものを用いる。

p 2 7^{Kip1}の含量は、形質転換体の培養時に培地に放射性同位体で標識したアミノ酸を添加し、p 2 7^{Kip1}を標識後、S D S - P A G E を行ない放射活性を測定する、あるいは、p 2 7^{Kip1}を認識する抗体を用いてイムノブロット解析を行なうことにより測定することができる。〔Genes Dev., 12, 2587 (1998); Mol. Cell, 1, 565 (1998); Genes Dev., 11, 3046 (1997); Genes Dev., 11, 1548 (1997)〕。

また、細胞抽出液等の K P C 1 または K P C 1 - K P C 2 複合体を発現する上記の形質転換体の処理物、あるいは (1) に記載したインビトロ再構成系から p 2 7^{Kip1}を除きユビキチンおよびプロテアソームを添加した系に、p 2 7^{Kip1}を添加して反応させ、経時的に一部を回収し、p 2 7^{Kip1}の含量を測定し、K P C 1 または K P C 1 - K P C 2 複合体を発現しない宿主の処理物、あるいは K P C 1 または K P C 1 - K P C 2 複合体を含まない上記のインビトロ再構成系の系を用いた場合の p 2 7^{Kip1}の含量と比較することにより K P C 1 または K P C 1 - K P C 2 複合体に依存した p 2 7^{Kip1}の分解を測定することができる。p 2 7^{Kip1}の含量の測定は、上記と同様にして行なうことができる。

8 . p 2 7^{Kip1}のユビキチン化を阻害する物質のスクリーニング方法

p 2 7^{Kip1}のユビキチン化を阻害する物質は、以下 (1) および (2) に示すスクリーニング方法により、取得することができる。

(1) K P C 1 または K P C 1 - K P C 2 複合体による p 2 7^{Kip1}のユビキチン化を測定することに基づくスクリーニング方法

被験試料の存在下および非存在下で p 2 7^{Kip1}、E 1、E 2 およびユビキチンを含む系で p 2 7^{Kip1}のユビキチン化反応を行い、p 2 7^{Kip1}に取り込まれたユビキチンの量を測定し、比較することにより、p 2 7^{Kip1}のユビキチン化を阻害する物質をスクリーニングすることができる。

すなわち、上記 7 . (1) に記載した p 2 7^{Kip1}をユビキチン化する活性を測定する方法に準じて、K P C 1 もしくは K P C 1 - K P C 2 複合体、p 2 7^{Kip1}、E 1、E 2 およびユビキチンを含むインビトロ再構成系または K P C 1 もしくは K P C 1 - K P C 2 複合体を発現する形質転換体もしくは該形質転換体の細胞抽出液等の処理物にユビキチンおよびプロテアソーム阻害剤を添加した系に被験試料を添加した場合、添加しなかった場合それぞれで p 2 7^{Kip1}のユビキチン化反応を行い、p 2 7^{Kip1}に取り込まれたユビキチンの量を測定し、比較する。

被験試料を添加しない場合と比較して、被験試料を添加した場合に、p 2 7^{Kip1}に取り込まれたユビキチンの量が低下した場合は、被験試料を p 2 7^{Kip1}のユビキチン化を阻害する物質として選択する。

被験試料としては、合成化合物、天然に存在する蛋白質、人工的に合成された蛋白質、抗体、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体、誘導体を、また哺乳動物 (例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等) の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、非ペプチド性化合物、発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげることができる。被験試料が単一の物質でなく組織抽出物や細胞培養上清、発酵生産物のように多数の物質の混合物の場合は、選択された被験試料をさらに精製し、各精製画分についてスクリーニングをすることにより、p 2 7^{Kip1}をユビキチン化する活性を阻害する物質を単離、同定することができる。

(2) K P C 1 または K P C 1 - K P C 2 複合体と p 2 7^{Kip1}との結合を阻害する物質をスクリーニングする方法

被験試料を添加した状態で、K P C 1 または K P C 1 - K P C 2 複合体を p 2 7^{Kip1}と接触させた後、K P C 1 または K P C 1 - K P C 2 複合体と p 2 7^{Kip1}との結合量

を測定する。被験試料を添加しなかった場合のKPC1またはKPC1-KPC2複合体とp27^{Kip1}の結合量と比較し、結合量が低下した場合には、KPC1またはKPC1-KPC2複合体、およびp27^{Kip1}の結合を阻害する物質として選択する。被験試料は(1)と同様のものがあげられる。また、被験試料が混合物の場合は該被験試料をさらに精製し、再スクリーニングすることにより、KPC1またはKPC1-KPC2複合体とp27^{Kip1}の結合を阻害する物質を単離、同定することができる。

KPC1またはKPC1-KPC2複合体をp27^{Kip1}と接触させるには、3.(3)に記載の方法により得られる精製したKPC1、あるいは1.または3.(4)に記載の方法により得られる精製したKPC1-KPC2複合体とp27^{Kip1}をインビトロで混合することで行なえる。また、内在性にp27^{Kip1}を発現している宿主を用いて3.(1)または3.(4)に記載の方法により得られるKPC1またはKPC1-KPC2複合体を発現する形質転換体を作製する、あるいは3.(2)に記載の方法に準じてp27^{Kip1}発現用ベクターを作製し、KPC1またはKPC1-KPC2複合体の発現用ベクターと共導入した形質転換体を作製することにより、細胞内で接触させることができる。被験試料の添加は、上記のインビトロの混合物または形質転換体の細胞抽出液等の処理物に被験試料を添加するか、被験試料を添加した培地で形質転換体を培養することにより行なうことができる。

結合量の測定は、抗p27^{Kip1}抗体を用いて免疫沈降を行ない、免疫沈降物の中に含まれるKPC1またはKPC1-KPC2複合体を、4.に記載の方法で作製したKPC1と特異的に結合する抗体を用いたイムノブロット解析により検出することによって、測定することができる。または、KPC1と特異的に結合する抗体を用いて免疫沈降を行ない、免疫沈降物の中に含まれるp27^{Kip1}を、抗p27^{Kip1}抗体を用いたイムノブロット解析により検出することによって、測定することができる。抗p27^{Kip1}抗体およびKPC1と特異的に結合する抗体はそれぞれ、p27^{Kip1}あるいはKPC1に付加したタグと特異的に結合する抗体を用いることもできる。

以上の方法で得られたKPC1またはKPC1-KPC2複合体とp27^{Kip1}との結合を阻害する物質は、KPC1またはKPC1-KPC2複合体によるp27^{Kip1}のコピキチン化を阻害することができる。

(1)または(2)のスクリーニング方法で選択されたp27^{Kip1}のコピキチン化を阻害する物質は、細胞内で、p27^{Kip1}の分解を抑制することができる。さらに、このような物質は、p27^{Kip1}の分解を抑制することにより細胞周期の進行を抑制できるので、細胞周期の異常を原因とする疾患、細胞周期を調節することにより症状を軽減できるような疾患の治療薬として用いることができる。細胞周期の異常を原因とする疾患、細胞周期を調節することにより症状を軽減できるような疾患としては、癌、動脈硬化、慢性関節リウマチ、前立腺肥大症、経皮的経血管的冠動脈形成術後の血管再狭窄、肺線維症、糸球体腎炎、自己免疫疾患等をあげることができ、上記p27^{Kip1}のコピキチン化を阻害する物質は、特に癌の治療に有効である。

p27^{Kip1}のコピキチン化を阻害する物質の例として、RINGフィンガードメインが欠失したKPC1、例えば配列番号2の1~1253番目のアミノ酸配列からなる蛋白質をあげることができる。

9. KPC1をコードするmRNAの検出あるいは定量を行う方法

(a) KPC1をコードするDNAが有する塩基配列と相補的な配列の連続する20塩基以上の配列を含むポリヌクレオチド、または(b) KPC1をコードするDNAが有する塩基配列と相補的な配列の連続する20~100塩基の配列を含むDNAおよびKPC1をコードするDNAが有する塩基配列の連続する20~100塩基の配列を含むDNAを用いてKPC1をコードするmRNAの検出あるいは定量を行うことができる。ポリヌクレオチドはDNAでもRNAでもよい。

KPC1をコードするDNAが有する塩基配列と相補的な配列の連続する20塩基以上の配列を含むDNAは、KPC1をコードする二本鎖DNAあるいはその連続する20塩基以上の配列を含む部分断片のアンチセンス鎖DNAとして得られる。二本鎖DNAを10

10

20

30

40

50

0 で5分間熱した後、氷上で急速に冷却することにより、センス鎖とアンチセンス鎖を分離することができる。また、KPC1をコードするDNAあるいはその連続する20塩基以上の配列を含む部分断片の3'端にT7プロモーター、SP6プロモーターなどのプロモーター配列を結合し、RNAポリメラーゼを用いたイン・ビトロの転写系により、KPC1をコードするDNAが有する塩基配列と相補的な配列の連続する20塩基以上の配列を含むRNAを得ることができる。KPC1をコードするDNAの連続する20塩基以上の配列を含む部分断片は、KPC1をコードするDNAを適当な制限酵素で切断することにより、またはKPC1をコードするDNAを鋳型とし、作製したい部分断片の5'端20~40塩基の配列を3'端に含むDNA、3'端20~40塩基と相補的な配列を3'端に含むDNAをプライマーとしたPCRにより得ることができる。プライマーはDNA合成機で合成できる。KPC1をコードするDNAが有する塩基配列と相補的な配列の連続する20~100塩基の配列を含むDNA、KPC1をコードするDNAが有する塩基配列の連続する20~100塩基の配列を含むDNAはDNA合成機により調製することができる。

10

KPC1をコードするmRNAの発現量を検出する方法としては、例えば(1)ノーザンハイブリダイゼーション、(2)ドットプロットハイブリダイゼーション、(3) in situハイブリダイゼーション、(4)RT-PCR、(5)デファレンシャル・ハイブリダイゼーション、(6)DNAチップ、(7)リボヌクレアーゼ保護アッセイ等があげられる。

上記方法に供する検体としては、生体から採取した細胞あるいは各種組織等の生体試料、生体試料から調製した初代培養細胞、各種の培養細胞株、3.(1)に記載した形質転換体等から取得したmRNAあるいは全RNAが用いられる。以後、該mRNAおよび全RNAを検体由来RNAと称する。検体由来RNAの調製は、モレキュラー・クローニング第3版に記載の方法により行なうことができる。(3)の in situハイブリダイゼーションでは、検体由来RNAではなく、組織の切片や細胞が用いられる。

20

ノーザンハイブリダイゼーションでは、検体由来RNAをゲル電気泳動で分離後、ナイロンフィルター等の支持体に転写し、KPC1をコードするDNAが有する塩基配列と相補的な配列の連続する20塩基以上の配列を含むポリヌクレオチドを標識したプローブを用いて、ハイブリダイゼーションならびに洗浄を行うことで、KPC1をコードするmRNAをバンドとして検出することができる。ハイブリダイゼーションならびに洗浄工程はストリンジентな条件で行うことが望ましい。

30

標識プローブは、例えば、ニック・トランスレーション、ランダム・プライミングまたは5'末端のリン酸化等の方法により放射性同位体、ビオチン、ジゴキシゲニン、蛍光基、化学発光基等を、上記プローブとするポリヌクレオチドに取り込ませることで調製できる。標識プローブの結合量はKPC1をコードするmRNAの量を反映することから、結合した標識プローブの量を定量することでKPC1をコードするmRNAを定量することができる。電気泳動、メンブレンの移行、プローブの調製、ハイブリダイゼーション、mRNAの検出については、モレキュラー・クローニング第3版に記載の方法により行なうことができる。

RNAのドットプロットハイブリダイゼーションは、組織や細胞から抽出したRNAをメンブレン上に点状にスポットして固定し、プローブとなる標識したポリヌクレオチドとハイブリダイゼーションを行ない、プローブと特異的にハイブリダイズするmRNAを検出する方法である。プローブとしてはノーザンハイブリダイゼーションと同様のものを用いることができる。RNAの調製、RNAのスポット、ハイブリダイゼーション、mRNAの検出については、モレキュラー・クローニング第3版に記載の方法により行なうことができる。

40

in situハイブリダイゼーションは、生体から取得した組織のパラフィンまたはクリオスタット切片、あるいは固定化した細胞を検体として用い、標識したプローブとハイブリダイゼーションならびに洗浄の工程を行い、顕微鏡観察により、mRNAの組織や細胞内での分布や局在を調べる方法である〔Methods in Enzymology

50

、254、419（1995））。プローブとしてはノーザンハイブリダイゼーションと同様のものも用いることができる。偽陽性を防ぐためには、ハイブリダイゼーションならびに洗浄工程はストリンジェントな条件で行うことが望ましい。

RT-PCRやデファレンシャル・ハイブリダイゼーションあるいはDNAチップでは、検体由来RNAからオリゴdTプライマーまたはランダムプライマーおよび逆転写酵素を用いて合成したcDNA（以後、該cDNAを検体由来cDNAと称する）を測定に用いる。検体由来RNAがmRNAの場合は、上記いずれのプライマーも用いることができるが、該検体由来RNAが全RNAである場合は、オリゴdTプライマーを用いることが必要である。cDNAの合成は、モレキュラー・クローニング第3版に記載の方法により行なうことができる。

RT-PCRは、検体由来cDNAを鋳型とし、KPC1をコードするcDNAの塩基配列から設計したKPC1特異的なプライマーを用いてPCRを行ない、KPC1をコードするcDNAの断片を増幅することによりmRNAを検出する方法である。KPC1特異的なプライマーとしては、KPC1をコードするcDNAのポリA鎖を除いた適当な領域を選択し、その領域の塩基配列の5'端20～100塩基の配列からなるDNAおよび3'端20～100塩基と相補的な配列からなるDNAの組を用いることができる。プライマーの配列は、プライマー間の結合やプライマー内の結合を起こさず、アニーリング温度で標的cDNAと特異的に結合して、変性条件で標的cDNAからはずれる等の条件に基づき設計するのが好ましい。アクチンやグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（以下G3PDHと略す）等の細胞の種類や培養条件による発現量の変化がほとんどない蛋白質をコードするmRNAを内部コントロールとして置くことで、KPC1をコードするmRNAの量を定量することが可能である。mRNAの定量を行なう場合は、増幅産物が指数関数的に増加している反応サイクルの回数内でPCRを行うことが必要である。この回数は、反応サイクルの回数を段階的に増加させたPCRを行ない、各PCRで増幅するDNA断片を回収してゲル電気泳動で定量することで知ることができる。PCRは、モレキュラー・クローニング第3版に記載の方法により行なうことができる。

検体由来cDNAをプローブとして、KPC1をコードするDNAが有する塩基配列と相補的な配列の連続する20塩基以上の配列を含むポリヌクレオチドを固定化させたフィルターあるいはスライドガラスやシリコンなどの基盤に対してハイブリダイゼーションならびに洗浄を行うことで、KPC1をコードするmRNAの量の変動を検出することができる。このような原理に基づく方法には、デファレンシャルハイブリダイゼーション〔*Trends Genet.*、7、314（1991）〕やDNAチップ〔*Genome Res.*、6、639（1996）〕がある。いずれの方法もフィルターあるいは基盤上にアクチンやG3PDHなどの内部コントロールを固定化することで、対照検体と標的検体の間でのKPC1をコードするmRNAの量の違いを正確に検出することができる。また対照検体と標的検体由来のRNAをもとにそれぞれ異なる標識のdNTP（dATP、dGTP、dCTP、dTTPの混合物）を用いて標識cDNA合成を行い、1枚のフィルターあるいは1枚の基盤に2つの標識cDNAプローブを同時にハイブリダイズさせることで正確なKPC1をコードするmRNAの定量を行うことができる。

リボヌクレアーゼ保護アッセイでは、まずKPC1をコードするDNAの3'端にT7プロモーター、SP6プロモーターなどのプロモーター配列を結合し、標識したNTP（ATP、GTP、CTP、UTPの混合物）およびRNAポリメラーゼを用いたイン・ビトロの転写系により、標識したアンチセンスRNAを合成する。該標識アンチセンスRNAを、検体由来RNAと結合させて、RNA-RNAハイブリッドを形成させた後、1本鎖RNAのみを分解するリボヌクレアーゼAで消化する。該消化物をゲル電気泳動し、RNA-RNAハイブリッドを形成することにより消化から保護されたRNA断片を、KPC1をコードするmRNAとして、検出あるいは定量する。

上記の方法を用いて、KPC1をコードするmRNAの量の変動を検出しKPC1をコードするmRNAの量が健常人と比較して減少あるいは増加している疾患の判定または診断を行うことができる。

10

20

30

40

50

疾患の判定または診断に供する検体としては患者より取得した組織、血液等の生体試料あるいは該生体試料から細胞を取得して試験管内の適当な培地中で培養した初代培養細胞試料から取得したmRNAあるいは全RNAが用いられる。また、生体試料から取得した組織の切片も用いることもできる。

KPC1の発現量がmRNAレベルで減少あるいは増加している疾患は以下のようにして判定または診断できる。まず、複数の患者および健常者の検体についてKPC1をコードするmRNAの量を上記にあげた検出方法で測定して比較し、患者および健常者の該mRNAの量の範囲を決定する。被験者の検体の該mRNAの量を、健常者の量の範囲および患者の量の範囲とそれぞれ比較し、どちらの発現レベルの範囲に入るかを調べることにより判定または診断を行う。

KPC1の発現量がmRNAレベルで増加している疾患としては、細胞周期の異常を原因とする疾患をあげることができる。細胞周期の異常を原因とする疾患としては、癌、動脈硬化、慢性関節リウマチ、前立腺肥大症、肺線維症、糸球体腎炎、自己免疫疾患等をあげることができ、上記の方法は、特に癌の判定または診断に有効である。

また、KPC1をコードするmRNAを定量する方法は、細胞障害性ヌクレオシド誘導体（抗腫瘍剤、抗ウイルス剤）の効果の予測等に用いることができる。

各種病態モデル動物において、該mRNAを定量することにより、病態における該遺伝子産物の重要性を明らかにすることができる。また、薬剤の有無による該mRNAの発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

10．疾患と関連するKPC1遺伝子の変異および多型を検出する方法

KPC1をコードする遺伝子座中に存在する疾患の原因となる変異の存在の有無を評価するための最も明確な試験は、対照集団からの遺伝子と疾患患者からの遺伝子とを直接比較することである。

具体的には疾患患者ならび健常者から、生体試料あるいは該生体試料から樹立した初代培養細胞由来の試料を集め、該生体試料ならびに該初代培養細胞由来試料中からDNAまたはRNAを抽出する。該DNAあるいは、該DNAまたは該RNAより合成したcDNAを鋳型にしてKPC1遺伝子が有する塩基配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRにより増幅したKPC1をコードするDNA（これらのDNAを以下、検体由来DNAと称する）を試料DNAとして用いることができる。

KPC1遺伝子に疾患の原因となる変異があるかどうかを検出する方法として、野生型対立遺伝子を有するDNA鎖と変異対立遺伝子を有するDNA鎖とのハイブリダイズにより形成されるヘテロ二本鎖を検出する方法を用いることができる。

ヘテロ二本鎖を検出する方法には、(1)ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヘテロ二本鎖検出法〔Trends Genet., 7, 5 (1991)〕、(2)一本鎖コンフォメーション多型解析法(SSCP解析; single strand conformation polymorphism analysis)〔Genomics, 16, 325 (1993)〕、(3)ミスマッチの化学的切断法(CCM法、chemical cleavage of mismatches)〔Human Molecular Genetics, BIOS Scientific Publishers Limited (1996)〕、(4)ミスマッチの酵素的切断法〔Nat. Genet., 9, 103 (1995)〕、(5)変性ゲル電気泳動法(denaturing gradient gel electrophoresis、DGGE法)〔Mutat. Res., 288, 103 (1993)〕等の方法が挙げられる。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヘテロ二本鎖検出法は、検体由来DNAを鋳型とし、KPC1遺伝子の塩基配列に基づき設計したプライマーを用いたPCRにより、200bpよりも小さい断片として該遺伝子断片を増幅し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行う。KPC1遺伝子の変異によりヘテロ二本鎖が形成された場合は、変異を持たないホモ二本鎖よりも移動度が遅く、それらは余分なバンドとして検出することができる。HydroLink、MDE等の特製のゲルを用いた方が分離度はよい。200bpよりも小さい断片の検索ならば、挿入、欠失、ほとんどの1塩基置換を検出可能である。ヘテロ

10

20

30

40

50

二本鎖解析は、次に述べる一本鎖コンフォメーション多型解析と組み合わせた一枚のゲルで行うことが望ましい。

SSCP解析では、検体由来DNAを鋳型とし、KPC1遺伝子の塩基配列に基づき設計したプライマーを用いたPCRにより、200bpよりも小さい断片として該遺伝子断片を増幅し、変性後、未変性ポリアクリルアミドゲル中で泳動する。PCRを行う際にプライマーを放射性同位体あるいは蛍光色素で標識するか、または未標識の増幅産物を銀染色することにより、KPC1遺伝子断片をバンドとして検出することができる。野生型のパターンとの相違を明らかにするために、コントロールの検体も同時に泳動すると、変異を持った断片を移動度の違いから検出できる。

CCM法では、検体由来DNAを鋳型とし、KPC1遺伝子の塩基配列に基づき設計したプライマーを用いたPCRにより増幅した該遺伝子断片を、KPC1をコードするDNAに放射性同位体あるいは蛍光色素をとり込ませた標識DNAとハイブリダイズさせ、四酸化オスミウムで処理することでミスマッチしている場所のDNAの一方の鎖を切断させ変異を検出することができる。CCM法は最も感度の高い検出法の1つであり、キロベースの長さの検体にも適応できる。

ミスマッチの酵素的切断法は、上記四酸化オスミウムの代わりにT4エンドヌクレアーゼVIIのような細胞内でミスマッチの修復に関与する酵素トリボヌクレアーゼAと組み合わせることで、酵素的にミスマッチを切断する方法である。

DGGE法では、検体由来DNAを鋳型とし、KPC1遺伝子の塩基配列に基づき設計したプライマーで増幅した該遺伝子断片を化学的変性剤の濃度勾配や温度勾配を有するゲルを用いて電気泳動する。該遺伝子断片はゲル内を一本鎖に変性する位置まで移動し、変性後は移動しなくなる。該遺伝子断片に変異がある場合とない場合ではゲル内での移動度が異なることから、変異の存在を検出することが可能である。検出感度を上げるにはそれぞれのプライマーにポリ(G:C)末端を付けるとよい。

疾患の原因遺伝子を検出する別の方法として、蛋白質短縮試験(protein truncation test: PTT法) [Genomics, 20, 1 (1994)]がある。該試験により蛋白質の欠損を生み出すフレームシフト突然変異、スプライス部位突然変異、ナンセンス突然変異を特異的に検出することができる。PTT法では、KPC1 cDNAのKPC1をコードする領域の5'末端から20~40塩基の配列にT7プロモーター配列と真核生物翻訳開始配列をつないだ特殊なプライマーを設計し、該プライマーを用いて検体由来RNAよりRT-PCR法でcDNAを作製する。該cDNAを用い、イン・ビトロ転写、翻訳を行うとcDNAがコードする蛋白質が生産される。該蛋白質をゲルに泳動して、該蛋白質の泳動位置が完全長蛋白質に相当する位置にあれば欠損を生み出す変異は存在せず、該蛋白質に欠損がある場合は、完全長蛋白質より短い位置に該蛋白質は泳動され、該位置より欠損の程度を知ることができる。

検体由来DNAならびに検体由来cDNAの塩基配列を決定するために本発明のDNAが有する塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いることが可能である。決定された塩基配列を解析することにより、検体由来DNAあるいは検体由来cDNAにの原因となる変異があるか否かを判別できる。

KPC1遺伝子のコード領域以外の変異は、該遺伝子の付近またはその中のイントロンおよび調節配列のような、非コード領域を検査することによって検出し得る。非コード領域中の変異に起因する疾患は、上記に記載した方法に従い対照検体と比較した場合の、疾患患者における異常なサイズの、または異常な生産量のmRNAを検出することで確認することができる。

このようにして非コード領域における変異の存在が示唆された該遺伝子については、2.(2)に記載の方法により、KPC1をコードするDNAをハイブリダイゼーションのプロープとして用いてクローン化することができる。非コード領域における変異は上述のいずれかの方法に準じて探索することができる。

見い出された変異は、Handbook of Human Genetics Lin kage. The John Hopkins University Press, B

10

20

30

40

50

altimore (1994)に記載された方法に従い統計処理を行うことで、疾患との連鎖があるSNPs (シングル・ヌクレオチド・ポリモルフィズム)として同定することができる。また、疾患の病歴を持つ家族から、先に示した方法に従いDNAを取得し、変異および多型を検出することで、疾患の原因遺伝子を同定することができる。

11. KPC1遺伝子に変異を有する疾患を判定または診断する方法

KPC1遺伝子に変異を有する疾患を判定または診断する方法に用いられるオリゴヌクレオチドとしては、KPC1をコードするDNAが有する塩基配列の連続する20~100塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドおよびKPC1をコードするDNAが有する塩基配列と相補的な配列の連続する20~100塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドをあげることができる。オリゴヌクレオチドは、オリゴDNAが好ましい。オリゴヌクレオチドは、DNA合成機により、合成することができる。

KPC1遺伝子に変異を有する疾患は、ヒトのいずれかの組織における遺伝子の変異を検出することによって判定または診断し得る。例えば、生殖細胞系に変異がある場合、当該変異を遺伝した個人は、疾患を発症し易い傾向である可能性がある。当該変異は、該個人の体のいずれかの組織からのDNAを試験することによって検出し得る。例えば、採血しその血液の細胞からDNAを抽出し、このDNAを用い、遺伝子の変異を試験することにより、疾患を判定または診断することができる。また、胎児細胞、胎盤細胞または羊膜細胞を用い、遺伝子の変異を試験することにより、出生前診断を行うことができる。

また疾患を発症した患者から、病巣部位の生体組織を取得してDNAを試験することにより、疾患の種類を判定または診断し、投与する薬物の選択などに利用することができる。組織中の遺伝子の変異を検出するためには、周囲の正常組織から遊離した病巣部位の組織を単離することが有用である。取得した組織をトリプシンなどで処理し、得られた細胞を適当な培地で培養する。培養した細胞からは染色体DNAならびにRNAを抽出することができる。RNAからcDNAを合成できる。

以後、判定または診断を目的としてヒト検体から上記いずれかの方法で取得したDNAまたはcDNAを診断検体由来DNAと称する。

診断検体由来DNAを用い、KPC1をコードするDNAが有する塩基配列の連続する20~100塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドおよびKPC1をコードするDNAが有する塩基配列と相補的な配列の連続する20~100塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドのうち少なくとも1つを利用した疾患の判定または診断を行うには、(1)制限酵素部位の検出、(2)対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドプローブを利用する方法 (ASO: allele specific oligonucleotide hybridization)、(3)対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを用いたPCR (ARMS: amplification refractory mutation system)、(4)オリゴヌクレオチド・ライゲーション・アッセイ (OLA)、(5)PCR-PHFA (PCR-preferential homoduplex formation assay)、(6)オリゴDNAアレイを用いる方法〔蛋白質核酸酵素、43, 2004 (1998)〕等の方法を用いることができる。

単一塩基変化により制限酵素部位が消失あるいは発生する場合は、診断検体由来DNAを、KPC1 cDNAが有する配列に基づき設計したプライマーで増幅し、該制限酵素で消化し、得られた制限酵素切断DNA断片を正常人の場合と比較することで簡便に変異を検出することができる。しかし単一塩基変化が起こることはまれであるので、判定または診断目的には、KPC1 cDNAが有する配列情報ならびに別途同定された変異の情報を組合せることでオリゴDNAプローブを設計し、該オリゴDNAプローブをフィルターに結合させハイブリダイズを行うリバースドットプロット法で変異を検出する。

30塩基以下の短いオリゴDNAプローブは、完全に対合する配列とだけハイブリダイズするので、この特徴を利用して、対立遺伝子特異的なオリゴDNAプローブを用いて、1塩基の変異を容易に検出することができる。判定または診断目的には、ヒトKPC1 cDNAが有する配列と同定された変異に基づき設計したオリゴDNAをフィルターに結合させ、診断検体由来DNAからKPC1 cDNAが有する配列を用いて設計したプライ

10

20

30

40

50

マーと標識した d N T P を用いた P C R で作製したプローブを用いてハイブリダイズを行うリバースドットプロットが用いられることが好ましい。スライドガラスやシリコンなどの基盤に直接、K P C 1 c D N A が有する配列と該変異に基づき設計したオリゴ D N A を合成して、高密度のアレイを作ることからなる D N A チップ法は、少量の診断検体由来 D N A あるいは診断検体由来 c D N A について多様な変異をより簡便に検出できるため大規模な診断目的に適した変異検出法である。

塩基変異は、以下のオリゴヌクレオチド・ライゲーション・アッセイ (O L A) によっても検出できる。

K P C 1 をコードする遺伝子が有する配列より、変異部位を挟んで該変異部位を 3 ' 末端にもつ配列からなるオリゴ D N A とその変異部位の 3 ' 側に隣接する配列からなるオリゴ D N A を 2 本作製する。該診断検体由来 D N A と上記オリゴ D N A とをハイブリダイズさせる。ハイブリダイズ後に、D N A リガーゼで 2 本のオリゴ D N A を連結させる。該診断検体由来 D N A の変異部位に相当する配列がオリゴ D N A の配列と一致していれば、2 本のオリゴ D N A は連結するが、異なっていれば、連結されない。例えば、一方のオリゴ D N A にはビオチンを、他方のオリゴ D N A にジゴキシゲニンのような異なる標識をつけると、連結反応が起こったかどうかを速やかに検出することが可能である。O L A は電気泳動や遠心分離操作が不要なために、多くのサンプルを効率的に短期間で判定または診断するのに適した変異検出法である。

また、以下の P C R - P H F A 法 [B r . J . H a e m a t o l . , 9 5 , 1 9 8 (1 9 9 6)] により微量な変異遺伝子を定量的かつ容易に検出することができる。

P C R - P H F A 法は、P C R、非常に高い特異性を示す液相でのハイブリダイゼーション、E L I S A と同様の操作で P C R 産物を検出する E D - P C R (e n z y m a t i c d e t e c t i o n o f P C R p r o d u c t) の 3 つを組み合わせたものである。ジニトロフェニル (D N P) 標識およびビオチン標識したプライマーセットを用いて、K P C 1 をコードする D N A をテンプレートに P C R 増幅を行い、両末端標識増幅物を調製する。プライマーセットとしては、K P C 1 をコードする D N A が有する塩基配列中の変異部位よりも 5 ' 側に存在する連続する 2 0 ~ 1 0 0 塩基の配列を 5 ' 端に含むオリゴ D N A および変異部位よりも 3 ' 側に存在する連続する 2 0 ~ 1 0 0 塩基の配列と相補的な配列を 5 ' 端に含むオリゴ D N A を用いることができる。これに対して、標識を持たない同じ配列を有するプライマーセットと診断検体由来 D N A あるいは診断検体由来 c D N A をテンプレートに増幅して得た非標識増幅物を 2 0 ~ 1 0 0 倍の大過剰量混合する。そして熱変性後、1 / 5 分 ~ 1 0 分程度の緩やかな温度勾配で冷却し、完全な相補鎖を優先的に形成させる。こうして再形成された標識 D N A はビオチンを介してストレプトアビジン固定化ウェルに捕獲吸着し、D N P を介して酵素標識抗 D N P 抗体を結合させて酵素による発色反応により検出する。検体中に標識 D N A と同じ配列の遺伝子が存在しない場合は、元の二本鎖の標識 D N A が優先的に再形成されて発色を示す。これに対し、同じ配列の遺伝子が存在する場合は、相補鎖の置換がランダムに生じるため再形成される標識 D N A は減少するので、発色は著しく低下する。これにより、既知の変異・多型遺伝子の検出および定量が可能となる。

K P C 1 遺伝子に変異を有する疾患としては、細胞周期の異常を原因とする疾患をあげることができる。細胞周期の異常を原因とする疾患としては、癌、動脈硬化、慢性関節リウマチ、前立腺肥大症、肺線維症、糸球体腎炎、自己免疫疾患等をあげることができ、本発明の判定または診断方法は特に癌の判定または診断に有効である。

1 2 . K P C 1 の発現を抑制する方法

(1) R N A 干渉により K P C 1 の発現を抑制する方法

K P C 1 をコードする D N A の塩基配列中の連続する 1 9 ~ 2 5 塩基に相当する配列を含む二本鎖 R N A [以下 s i R N A (s h o r t i n t e r f e r i n g R N A) とよぶ] または該配列および該配列と相補的な配列を含みヘアピン構造を形成する R N A [以下、s h R N A (s h o r t h a i r p i n R N A) とよぶ] を用いて、R N A 干渉 (以下、R N A i とよぶ) [N a t u r e , 4 1 1 , 4 9 4 (2 0 0 1)] により、K P

C1の発現を抑制することができる。KPC1の発現の抑制に用いるsiRNA、shRNA(以下それぞれ、KPC1 siRNA、KPC1 shRNAともよぶ)は、以下のようにして作製することができる。KPC1をコードするcDNAの塩基配列中からAAで始まる21~27塩基の配列〔AA(N)₁₉₋₂₅、Nは任意の塩基〕、好ましくはAA(N)₁₉TTからなる配列を選択する。選択する配列は、翻訳領域中の開始コドンより50塩基以上下流の領域中にあり、GC含量が30~70%、好ましくは50%前後の配列であって、他の遺伝子の塩基配列と一致せず、KPC1 cDNAに特異的な配列がさらに好ましい。選択した配列の末端のAAを除いた19~25塩基の配列またはAAおよびTTを除いた19塩基の配列(ただし配列中のTはRNAではUとする、以下、配列Xとよぶ)、および該配列Xと相補的な配列それぞれの3'端に2~4個のヌクレオチド、好ましくは2個のdT(デオキシ体のT)またはUを付加した配列を有する2本のRNAを作製する。配列Xとしては、ヒトKPC1 cDNAおよびマウスKPC1 cDNAの塩基配列の1852~1882番目に相当する、配列番号36に示す配列をあげることができる。作製した2本のRNAをアニーリングすることによりsiRNAを作製できる。アニーリングは、2本のRNAを適当なバッファー(例えば、10mmol/L Tris-HCl、50mmol/L NaCl、1mmol/L EDTA、pH7.5)に溶解した後、ヒートブロックまたはサーマサイクラーで90~95℃で1~5分間加熱した後、25℃まで45~60分間かけて冷却することにより行うことができる。KPC1の発現を抑制するsiRNAとしては、配列番号36で表される配列および該配列と相補的な配列の3'端にそれぞれ2~4個のヌクレオチドを付加した配列からなる2本鎖RNA、配列番号34および35でそれぞれ表される配列からなる2本鎖RNAをあげることができる。これらのsiRNAは、ヒトKPC1およびマウスKPC1の発現を抑制することができる。

10

20

shRNAとしては、上記配列Xと該配列Xと相補的な配列とを、3~15塩基からなる適当なスペーサー配列でつないで、3'末端に2~4個のヌクレオチド、好ましくは2個のdTまたはUを付加した配列を有するRNAを作製する。スペーサー配列の5'端はdTdTまたはUUが好ましい。配列Xと配列Xと相補的な配列の位置はどちらが先でもよい。KPC1の発現を抑制するshRNAとして、配列番号38で表される配列からなるRNAをあげることができる。該shRNAは、ヒトKPC1およびマウスKPC1の発現を抑制することができる。shRNAは細胞内で切断を受けて、siRNAに変換される。

30

上記のsiRNAに用いる2本のRNAおよびshRNAはDNA合成機を用いて化学合成することができる。また、サイレンサー(Silencer)siRNA作製キット等を利用して、T7プロモーター配列および作製するRNAの配列を有する2本鎖DNAを作製し、このDNAを鋳型としたT7 RNAポリメラーゼを用いたインビトロ転写系によっても、調製することができる。あるいは、以下のようにして作製できるKPC1 siRNA発現用ベクターを、培養細胞または生体内の細胞に導入することにより、細胞内でsiRNAを発現することができる。KPC1 siRNA発現ベクターは、U6プロモーターあるいはH1プロモーター等RNAポリメラーゼIIIのプロモーターを含むsiRNA発現用ベクターに、上記配列X、TTからはじまる3~15塩基からなるスペーサー配列、配列Xと相補的な配列およびRNAポリメラーゼIIIターミネーターとなる4~6個のTからなる配列を含むDNAを挿入して作製することができる。細胞内で、U6プロモーターからのRNAポリメラーゼIII反応により、配列Xおよび相補的な配列を含むshRNAが合成され、このshRNAが細胞内で切断を受けてsiRNAに変換される。siRNA発現用ベクターとしては、pSilencer 1.0-U6(Ambion社製)、pSilencer 3.0(Ambion社製)、pSUPER(OligoEngine社製)等をあげることができる。レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを利用したsiRNA発現用ベクター〔Science, 296, 550(2002); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 1844(2003); Nat. Genet., 33, 401(2003)〕を用いることもできる

40

50

。KPC1 siRNA発現用ベクターとしては、レトロウイルスベクターpMX-puro-IIのNotI/SalIサイト間に、U6プロモーターおよびその下流に配列番号37に示す配列をつなげたDNAを挿入して作製したKPC1 siRNA発現用レトロウイルスベクターをあげる事ができる。このベクターをヒトまたはマウス細胞に導入することにより、配列番号34および35で表される配列を有するsiRNAが発現し、ヒトKPC1またはマウスKPC1の発現を抑制することができる。

(2) アンチセンス配列を有するオリゴヌクレオチドを利用してKPC1の発現を抑制する方法

アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992); 化学, 46, 681 (1991); Biotechnology, 9, 358 (1992); Trends Biotechnol., 10, 87 (1992); Trends Biotechnol., 10, 152 (1992); 細胞工学, 16, 1463 (1997)〕、トリプル・ヘリックス技術〔Trends Biotechnol., 10, 132 (1992)〕に基づき、KPC1をコードするDNAが有する塩基配列と相補的な配列(アンチセンス配列)の連続する20~100塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチドの誘導体を細胞あるいは生体に投与することにより、細胞あるいは生体内でのKPC1遺伝子の転写または翻訳を抑制し、その結果、KPC1の発現を抑制することができる。特にKPC1をコードする領域の開始コドンを含む20~100塩基と相補的な塩基配列が好ましい。また、デオキシリボヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼによる分解を受けないオリゴヌクレオチド誘導体が好ましい。

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

上記のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体はDNA合成機を用いて合成することができる。

siRNA、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドの誘導体はオリゴフェクトアミン(Oligofectamine)試薬(インビトロジェン社製)、リポフェクトアミン(Lipofectamine)2000(インビトロジェン社製)、トランスメッセンジャー・トランスフェクション(TransMessenger Transfection)試薬(キアゲン社製)等のリポソーム系トランスフェクション用試薬を用いて、細胞に導入することができる。また、KPC1 siRNA発現ベクターは、2.に記載した発現ベクターを動物細胞に導入する方法と同様にして、細胞に導入することができる。ウイルスベクターを利用したKPC1 siRNA発現ベクターの場合は、該ベクターを利用して作製した組換えウイルスを投与し、細胞に感染させることにより、導入することができる。動物やヒトに投与する場合は、siRNA、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドの誘導体、あるいはKPC1 siRNA発現ベクターをそのままあるいはリポソーム調製物として、静脈注射等の方法で投与することができる。

KPC1は、細胞内のp27^{Kip1}をユビキチン化し、その分解を促進するので、(1

）および（２）に示した方法によって、K P C 1の発現を抑制することにより、 $p 27^{K i p 1}$ の分解を抑制することができる。さらに、 $p 27^{K i p 1}$ の分解を抑制することにより細胞周期の進行を抑制できるので、該方法は、細胞周期の異常を原因とする疾患、細胞周期を調節することにより症状を軽減できるような疾患の治療に用いることができる。細胞周期の異常を原因とする疾患、細胞周期を調節することにより症状を軽減できるような疾患としては、癌、動脈硬化、慢性関節リウマチ、前立腺肥大症、経皮的経血管的冠動脈形成術後の血管再狭窄、肺線維症、糸球体腎炎、自己免疫疾患等をあげることができ、特に該方法は癌の治療に有効である。

13. K P C 1と特異的に結合する抗体を用いたK P C 1の検出および定量法

4. で得られるK P C 1と特異的に結合する抗体を用い、抗原抗体反応を行わせることにより、K P C 1またはK P C 1を含む細胞または組織を免疫学的に検出および定量することができる。測定試料としては、細胞や組織の抽出液、培養上清、血液、尿、唾液等の体液、あるいは組織のパラフィン切片やクリオスタット切片等が用いられる。

免疫学的に検出および定量する方法としては、放射免疫測定法（R I A）、免疫染色法、免疫蛍光染色法、イムノブロット法、ドットブロット法、免疫沈降法、サンドイッチE L I S A〔単クローン抗体実験マニュアル（講談社サイエンティフィック）（1987）、続生化学実験講座5，免疫生化学研究法（東京化学同人）（1986）〕等が挙げられる。

R I Aとは、測定試料に、K P C 1と特異的に結合する抗体を反応させ、さらに放射性同位体で標識され、かつ該抗体と結合する抗体を反応させた後、抗原抗体複合体を分離してシンチレーションカウンターなどで放射能を測定し、測定試料中のK P C 1を検出および定量する方法である。該抗体と結合する抗体としては、K P C 1と特異的に結合する抗体の作製時の免疫動物のI g Gと結合する抗体、例えばK P C 1と特異的に結合する抗体がラットを免疫して作製したラット抗体であれば、抗ラットI g G抗体があげられる。

免疫染色法とは、組織切片や細胞等の測定試料に、K P C 1と特異的に結合する抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ等の酵素、ビオチン等で標識した該抗体と結合する抗体を反応させた後、標識物質に応じた発色反応を行い、顕微鏡観察により、測定試料中のK P C 1を検出する方法である。

免疫蛍光染色法は、組織切片や細胞等の測定試料に、K P C 1と特異的に結合する抗体を反応させ、さらにフルオレセインイソチオシアネート（F I T C）、A l e x a 5 4 6、テトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質で標識した該抗体と結合する抗体を反応させた後、蛍光顕微鏡観察により、測定試料中のK P C 1を検出する方法である。

イムノブロット（ウェスタンブロット）法とは、測定試料をS D S - P A G E〔A n t i b o d i e s - A L a b o r a t o r y M a n u a l, C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y, (1988)〕で分画した後、P V D F膜あるいはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜にK P C 1と特異的に結合する抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼなどの酵素、ビオチン、放射性同位体等で標識した該抗体と結合する抗体を反応させた後、標識物質に応じた方法で測定試料中のK P C 1をバンドとして検出および定量する方法である。

ドットブロット法とは、測定試料をニトロセルロース膜にドット状にブロッティングし、該膜にK P C 1と特異的に結合する抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼなどの酵素、ビオチン、放射性同位体等で標識した該抗体と結合する抗体を反応させた後、標識物質に応じた方法で測定試料中のK P C 1を検出および定量する方法である。

免疫沈降法とは、測定試料をK P C 1と特異的に結合する抗体と反応させた後、プロテインA - セファロース等イムノグロブリンと特異的に結合する担体を加えて反応させ、遠心分離等により、抗原抗体複合体と結合した担体を単離する方法である。担体から抗原抗体複合体を溶出させ、イムノブロット法と同様にして測定試料中のK P C 1を検出する。

サンドイッチE L I S Aとは、K P C 1と特異的に結合する抗体を吸着させたプレートに、測定試料を反応させた後、上記抗体とはエピトープが異なるK P C 1と特異的に結合す

10

20

30

40

50

る抗体を反応させ、さらに該抗体と結合するペルオキシダーゼ等の酵素で標識した抗体を反応させた後、酵素に応じた発色反応を行い、測定試料中のKPC1を検出および定量する方法である。

14. KPC1と特異的に結合する抗体の診断および治療への利用

KPC1と特異的に結合する抗体を用いて、KPC1の発現量の変化を検出し、KPC1の発現量が減少または増加している疾患の判定または診断を行なうことができる。KPC1の発現量が減少している疾患としては、細胞周期の異常を原因とする疾患、例えば、癌、動脈硬化、慢性関節リウマチ、前立腺肥大症、肺線維症、糸球体腎炎、自己免疫疾患等をあげることができ、特に癌に有効である。

抗体を用いたKPC1の発現量を定量して判定または診断する方法としては、13.にあげたKPC1を検出および定量する方法をあげることができる。

上記方法による判定または診断に供する検体としては、疾患の患者より取得した組織、血液、血清、尿、便、唾液等の生体試料そのものあるいは、該生体試料から取得した細胞ならびに細胞抽出液が用いられる。また、生体試料から取得した組織のパラフィンあるいはクリオスタット切片を用いることもできる。

KPC1の発現量の変化を伴う疾患は以下のようにして判定または診断できる。まず、複数の患者および健常者の検体についてKPC1の発現量を上記にあげた検出方法で測定して比較し、患者および健常者のKPC1の発現レベルの範囲を決定する。被験者の検体のKPC1の発現レベルを、健常者の発現レベルおよび患者の発現レベルとそれぞれ比較し、どちらの発現レベルの範囲に入るかを調べることにより判定または診断を行う。

KPC1と特異的に結合する抗体のうち、p27^{Kip1}とKPC1との結合を阻害する抗体、あるいはKPC1が有するp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を阻害する作用を示す抗体は、細胞内のKPC1のユビキチン化を抑制し、その分解を抑制することができる。さらに該抗体は、p27^{Kip1}の分解を抑制することにより、細胞周期の進行を抑制できるので、細胞周期の異常を原因とする疾患、細胞周期を調節することにより症状を軽減できるような疾患の治療に用いることができる。細胞周期の異常を原因とする疾患、細胞周期を調節することにより症状を軽減できるような疾患としては、癌、動脈硬化、慢性関節リウマチ、前立腺肥大症、経皮的経血管的冠動脈形成術後の血管再狭窄、肺線維症、糸球体腎炎、自己免疫疾患等をあげることができ、該抗体は特に癌の治療に有効である。

15. KPC1をコードする配列に由来するポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、またはKPC1と特異的に結合する抗体を含有する医薬

12.に記載したKPC1の発現を抑制するオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体、14.に記載したKPC1と特異的に結合する抗体であって、p27^{Kip1}とKPC1との結合を阻害する抗体、あるいはKPC1が有するp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を阻害する作用を示す抗体は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理的に許容される1つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与をあげることができ、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤などがあげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などがあげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造できる

。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトールなどの賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤などがあげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液あるいは両者の混合物からなる担体などを用いて調製される。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて調製される。また、噴霧剤は受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ有効成分を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体などを用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリンなどが例示される。該DNAまたはオリゴヌクレオチド、さらには用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダーなどの製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重などにより異なるが、通常成人1日当たり $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 20 \text{mg}/\text{kg}$ である。

KPC1をコードするDNAの塩基配列の20bp以上の連続した配列と一致する、あるいは相補的な配列を含むポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、またはKPC1と特異的に結合する抗体を含有する診断薬の場合は、目的の診断法に応じて、KPC1をコードするmRNAあるいはKPC1の定量あるいはKPC1遺伝子の変異の検出を行うのに必要な試薬、例えば緩衝剤、塩、反応用酵素、本発明の抗体と結合する標識された抗体、検出用発色剤等を含んでもよい。

以下により具体的な実施例をあげて説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない

発明を実施するための最良の形態

[実施例1] p27^{Kip1}に対する新規なユビキチンリガーゼ複合体KPCの単離、精製とその構成成分の解析

ウサギ網状赤血球抽出液より、p27^{Kip1}をユビキチン化する活性を指標にして新規ユビキチンリガーゼ複合体を分離、精製した。

(1) p27^{Kip1}のユビキチン化反応のインビトロ再構成系の構築およびp27^{Kip1}をユビキチン化する活性の測定

以下に記載する、ユビキチン化反応に必要な分子については、既報の方法〔J. Biol. Chem., 276, 48937 (2001)〕に従い大腸菌で発現、精製した組換え蛋白質を利用した。ユビキチン化反応のE1分子である酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) Uba1は、N末、C末にそれぞれMycタグ、His6タグを融合した蛋白質として、E2分子であるヒトUbch5AはN末、C末にそれぞれHis6タグ、FLAGタグを融合した蛋白質として、またマウスユビキチンはグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合蛋白質(以下、GST-Ubと略す)として、いずれも大腸菌BL21(DE3)pLysS株(ノバジェン社製)で発現し、ProBond resin(インビトロジェン社製)あるいはグルタチオン-セファロースCL-4B(アマシャム・バイオサイエンシズ社製)にて精製を行った。反応の基質になるp27^{Kip1}は、マウスp27^{Kip1}をGST融合蛋白質として上記大腸菌で発現し、グルタチオンビーズ(アマシャム・バイオサイエンシズ社製)で精製を行った後、さらにPreScissionプロテアーゼ(アマシャム・バイオサイエンシズ社)でGST部分を切断、除去し、ミニQカラム(アマシャム・バイオサイエンシズ社)にて精製した標品を利用した。

反応は、活性を測定する試料、50ngのUba1、100ngのUbch5A、3μgのGST-Ub、50ngのp27^{Kip1}を含む10μLの反応緩衝液〔40mmol/L Hepes-NaOH(pH7.9)、60mmol/L 酢酸カリウム、0.5m

mmol/L EGTA、2mmol/Lジチオスレイトール(以下DTTと略す)、5mmol/L塩化マグネシウム、10%(v/v)グリセロール、1.5mmol/L ATP)中で、26で30分間行った。

p27^{Kip1}をユビキチン化する活性は、反応サンプルのSDS-PAGEを行った後、抗p27^{Kip1}抗体(モノクローナル抗体、トランスダクション・ラボラトリー社製)を用いたイムノブロット解析により、ユビキチン化されたp27^{Kip1}分子を検出することにより測定した。本方法は、以下に述べる精製フラクションのアッセイだけでなく、組換えKPC1、KPC2、KPC1-KPC2複合体のp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を評価するすべての実験に共通する方法として利用した。

(2) p27^{Kip1}に対する新規なユビキチンリガーゼ複合体KPCの精製

Hershkoらの方法〔J. Biol. Chem., 258, 8206(1983)〕で調製したウサギ網状赤血球抽出液(約20gの蛋白質量)を緩衝液A〔50mmol/L Tris-HCl(7.4)、0.1mmol/L DTT、10%(v/v)グリセロール〕で処理したDE52レジン700mLと45分間混合した。直径10cmのカラムに充填後、緩衝液Aで洗浄、100および300mmol/L塩化カリウムを含む緩衝液Aにて段階溶出を行い、それぞれ140mLずつを集めた。

(1)で記載した方法にて、各フラクションのp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を測定し、活性のあるフラクションを集め、60%硫酸アンモニウム添加による濃縮を行い、得られた沈殿物を150mmol/L塩化カリウムを含む10mLの緩衝液Aに懸濁した。緩衝液Aに対し透析を行い、残留する硫酸アンモニウムを除去後、遠心分離(12,000×g、15分)にて回収された上清を150mmol/L塩化カリウムを含む緩衝液Aにて前処理したスーパーデックス(Superdex)200ゲルろ過カラム(アマシャムバイオサイエンシズ社製)に10mL/hの速度で通塔した。p27^{Kip1}をユビキチン化する活性を示すフラクションを集め、60,000×gで20分間遠心分離後、得られた上清を緩衝液P〔5mmol/Lリン酸カリウム(pH7.4)、50mmol/L塩化ナトリウム、0.1mmol/L DTT、10%(v/v)グリセロール〕で前処理したセラミック・ハイドロキシアパタイト・タイプ1カラム(バイオラッド社製)に通塔した。5-300mmol/Lのリン酸カリウムを含む60mLの緩衝液Pによる連続的溶出を行い、2mLずつのフラクションを回収した。

活性を示すフラクション(20-50mmol/Lのリン酸カリウムを含む溶出部分に相当)を集め、40mmol/L塩化カリウムを含む緩衝液Aに対して透析を行った。60,000×gで20分間遠心分離して得られた上清を回収し、40mmol/L塩化カリウムを含む緩衝液Aで前処理したモノQカラム(アマシャム・バイオサイエンシズ社製)に通塔した。40-350mmol/Lの塩化カリウムを含む30mLの緩衝液Aによる連続的溶出を行い、1mLずつのフラクションを回収した。活性を示すフラクション(100-160mmol/Lの塩化カリウムを含む溶出部分に相当)を集め、150mmol/L塩化カリウムを含む緩衝液Aで前処理したスーパーロース(Superose)6ゲルろ過カラム(アマシャム・バイオサイエンシズ社製)に通塔し、1mLずつのフラクションを回収した。活性を示すフラクションを集め80mmol/L塩化カリウムを含む緩衝液Aに対して透析後、60,000×gで20分間遠心分離し、上清を80mmol/L塩化カリウムを含む緩衝液Aで前処理したミニQ(MiniQ)カラム(アマシャム・バイオサイエンシズ社製)に通塔した。80-350mmol/Lの塩化カリウムを含む4.5mLの緩衝液Aによる連続的溶出を行い、150μLずつのフラクションを回収した。活性は塩化カリウム濃度130-180mmol/Lのフラクションに検出された。

第1図には精製プロトコールを、第2図にはスーパーロース6ゲルろ過カラム、第3図にはミニQカラムでそれぞれ得られた各フラクションのSDS-PAGEによる蛋白質の解析およびp27^{Kip1}をユビキチン化する活性の測定の結果を示している。活性と一致する蛋白質として140kDaと50kDaのバンドが確認され、それぞれをKPC1およびKPC2とした。

10

20

30

40

50

(3) KPC1およびKPC2の部分アミノ酸配列の決定

KPC1およびKPC2を含むフラクションを10% SDS-PAGEで分離し、クマシー染色で可視化した後、各バンドを切り出した(第4図)。ゲル中での還元、S-カルボキシアミドメチル化、トリプシン消化の各処理後、 μ RPC C2/C18カラム(アマシャム・バイオサイエンス社製)にてペプチドを分離回収し、エドマン分解によるアミノ酸配列解析を行った。KPC1のバンドから得られた11種のペプチドのアミノ酸配列を配列番号9~19に、KPC2のバンドから得られた2種のペプチドのアミノ酸配列を配列番号20および21に記載した。

[実施例2] KPC1およびKPC2をコードするcDNAの単離

実施例1(3)で得られたKPC1およびKPC2の部分アミノ酸配列をコードする塩基配列を塩基配列データベース・ジェンバンクから検索した。その結果、KPC1 cDNAと考えられる塩基配列として、ジェンバンク登録番号BE885419およびBE885914のヒトESTの配列を見出した。これらのESTの配列を有するIMAGEコンソーシアムcDNAクローンIMAGE:3909169およびIMAGE:3909203を、Research Genetics社より入手した。これらのcDNAクローンのcDNAの塩基配列を解析し、ヒトKPC1 cDNAの塩基配列を明らかにした。配列番号1に、両cDNAクローンに含まれるヒトKPC1 cDNAのKPC1をコードする領域の塩基配列を、配列番号2に、配列番号1で表される塩基配列がコードするヒトKPC1のアミノ酸配列を示した。配列番号1で表される塩基配列および配列番号2で表されるアミノ酸配列ともに、塩基配列データベースおよびアミノ酸配列データベースには同一の配列はなく、新規な配列であった。ヒトKPC1のアミノ酸配列中に実施例1(3)で得られたKPC1の部分アミノ酸配列が存在することが確認された(第5図)。また、ヒトKPC1のcDNAの塩基配列をクエリーとした塩基配列データベースの相同性解析から、マウスKPC1 cDNAのKPC1をコードすると推定される領域の5'端の塩基配列と3'端の塩基配列を見出した。これらの配列に基づく配列番号25および26で表されるそれぞれの塩基配列からなるDNA(KPC1-M1、KPC1-M2)をプライマーとし、マウスT細胞cDNAライブラリー(クロンテック社製)を鋳型としたPCRにより、マウスKPC1をコードするcDNA断片を増幅し単離した。このcDNA断片の塩基配列を解析し、マウスKPC1 cDNAの塩基配列を明らかにした。配列番号3にマウスKPC1 cDNAのKPC1をコードする領域の塩基配列を、配列番号4に配列番号3で表される塩基配列がコードするマウスKPC1のアミノ酸配列を示した。配列番号3で表される塩基配列および配列番号4で表されるアミノ酸配列ともに、塩基配列データベースおよびアミノ酸配列データベースには同一の配列はなく、新規な配列であった。

KPC1はヒト、マウスとも1314アミノ酸からなり、132~253番目にSPRYドメインが、C末に近い1254~1291番目にSCF複合体、APC/C複合体、VHL複合体等のRING型ユビキチンリガーゼに共通して存在するRINGフィンガードメインが存在した(第5図a)。

またウサギKPC2は、その部分アミノ酸配列から、ヒトの神経膠芽腫細胞分化因子関連(glioblastoma cell differentiation factor-related protein、GBDR1)蛋白質[Li, C., et al., Genomics 65, 243(2000)]のオルソログと推定された。したがって、ヒトKPC2をコードするcDNAはヒトGBDR1 cDNAと同一であり、ヒトGBDR1 cDNAの塩基配列(ジェンバンク登録番号AF176796)に基づく配列番号27および28で表されるそれぞれの塩基配列からなるDNA(KPC2-H1、KPC2-H2)をプライマーとし、ヒト肝臓cDNAライブラリー(クロンテック社製)を鋳型として用いたPCRにより、そのORFの領域を、ヒトKPC2をコードするcDNA断片として取得した。なお、このPCRにより得られたDNA断片は、実施例3に示した昆虫細胞での発現に用いるため、N末に、プライマーKPC2-H1に由来するHSVタグが付加したヒトKPC2をコードし、5'端にSpeIサイト、3'端にXh

10

20

30

40

50

o Iサイトを有する。

また、マウスKPC2については、塩基配列データベース・ジェンバンクからマウスGBDR1 cDNAの5'側のESTの配列(ジェンバンク登録番号: BE137808)を見出し、このESTの配列を有するIMAGEコンソーシアムcDNAクローンIMAGE: 1547481を、Research Genetics社より入手した。このcDNAクローンのcDNAの塩基配列を解析し、マウスKPC2 cDNAの塩基配列を明らかにした。配列番号7に、このcDNAクローンに含まれるマウスKPC2 cDNAのKPC2をコードする領域の塩基配列を、配列番号8に、配列番号7で表される塩基配列がコードするマウスKPC2のアミノ酸配列を示した。KPC2はN末側にubiquitin-likeドメイン、また2ヶ所のubiquitin-associatedドメインを有していた(第5図a)。

10

[実施例3] 組換えKPC1-KPC2複合体によるp27^{Kip1}のポリユビキチン化

実施例2で取得したcDNAがコードするヒトKPC1およびKPC2が、p27^{Kip1}を基質とするユビキチンリガーゼ複合体を構成することを検証するため、該cDNAを用い組換えKPC1、KPC2を調製し、KPC1-KPC2複合体のp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を測定した。

(1) 組換えKPC1-KPC2複合体の調製

配列番号29および30で表される配列からなるDNA(KPC1-H-1、KPC1-H-2)をプライマーとし、ヒトKPC1 cDNAクローンIMAGE: 3909169を鋳型としたPCRにより、N末にFLAGタグを付加したヒトKPC1をコードするDNAを増幅した。一方、昆虫細胞発現用トランスファーベクターpBacPAK9(クロンテック社製)のXbaI/XhoIサイト間に、ベクターpRSET B(インビトロジェン社製)His6タグをコードする領域含むXbaI-XhoI断片(約140bp)を挿入した。このベクターのNheI/XhoIサイト間に、上記のKPC1増幅断片を5'にあるNheI、3'端にあるXhoIで切断後、挿入することにより、pBacPAK9に、N末に配列番号22で表されるアミノ酸配列からなるHis6/FLAGタグを付加したヒトKPC1をコードするDNAが挿入されたトランスファーベクターを作製した。

20

また、実施例2で増幅したヒトKPC2 cDNA断片は、HSVタグをN末に付加したヒトKPC2をコードしているため、KPC1増幅断片を5'端にあるSpeI、3'端にあるXhoIで切断後、同様に、上記のHis6タグをコードする領域を挿入したpBacPAK9のNheI/XhoIサイト間に挿入することにより、N末に配列番号23で表されるアミノ酸配列からなるHis6/HSVタグを付加したヒトKPC2をコードするDNAが挿入されたトランスファーベクターを作製した。

30

得られたトランスファーベクターそれぞれとBacPAKバキュロウイルス発現システム(クロンテック社製)とを用いて作製した組換えバキュロウイルスをSf21細胞に共感染させ、既報の方法[Kamura et al., Genes Dev., 13, 2928(1999)]に従い、KPC1-KPC2複合体の発現ならびに精製を行った。第6図には、精製したKPC1-KPC2複合体をSDS-PAGEにて分離しクマシー染色した結果を示した。

40

(2) KPC1とKPC2の結合能の確認

KPC1およびKPC2を発現させたSf21細胞の細胞抽出液について、FLAGタグに対する抗体およびプロテインA-セファロースビーズ(シグマ社製)を用いてKPC1を免疫沈降し、共沈するKPC2の有無をHSVタグに対する抗体で検出した。その結果、KPC1に対する免疫沈降物中にKPC2が検出され、両蛋白質が細胞内で結合していることが明らかになった(第7図)。

(3) KPC1-KPC2複合体とp27^{Kip1}の結合

実施例1にて取得した大腸菌発現の組換えp27^{Kip1}と、(1)で調製した組換えKPC1-KPC2複合体を混ぜ合わせた。p27^{Kip1}に対する抗体で免疫沈降を行っ

50

た後、FLAGタグに対する抗体およびHSVタグに対する抗体をそれぞれ用いてKPC1およびKPC2を検出した。その結果、免疫沈降物中にKPC1 - KPC2複合体が含まれることが確認された(第8図)。この結果は、KPC1 - KPC2複合体とp27^{Kip1}が互いに結合する分子であること示している。

(4) 組換えKPC1 - KPC2複合体またはKPC1によるp27^{Kip1}のポリユビキチン化

KPC1 - KPC2複合体が実際にp27^{Kip1}のポリユビキチン化におけるユビキチンリガーゼとして機能するかを以下のようにして調べた。(1)で調製した組換えKPC1 - KPC2複合体200ngと50ngの組換えp27^{Kip1}を用い、実施例1(1)に記載したユビキチン化反応を行ない、反応後のサンプルをSDS - PAGEにて解析した結果を第9図左に示した。E1(Uba1)およびE2(UbcH5A)共存下で明らかでないポリユビキチン化が検出され、KPC1 - KPC2複合体がp27^{Kip1}ポリユビキチン化におけるユビキチンリガーゼとして働くことが確認された。

また、(1)で作製したKPC1発現用トランスファクターに由来する組換えバキュロウイルスのみを感染させたSf21細胞から精製したKPC1を、KPC1 - KPC2複合体の代わりに用いて同様の反応を行なった。その結果、KPC1単独ではKPC1 - KPC2複合体と比較して、ユビキチンが1つだけ付加したp27^{Kip1}の量はほとんど変わらないが、ポリユビキチン化したp27^{Kip1}の量は明らかに多く、効率的にp27^{Kip1}がポリユビキチン化を受けることがわかった(第10図)。したがってKPC1は、単独でp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を有するユビキチンリガーゼであることがわかった。また、KPC2は、1つだけユビキチンが付加したp27^{Kip1}をさらにポリユビキチン化する反応を阻害する可能性がある。

KPC1 - KPC2複合体のp27^{Kip1}に対する特異性を検証するため、Saccharomyces cerevisiaeのCDKインヒビターであるSic1に対するポリユビキチン化作用の有無を検討した。Sic1はHis6/HPC4タグ化蛋白質として既報の方法〔Kamura et al., Science 284, 657 (1999)〕にて大腸菌で発現した蛋白質を用いた。p27^{Kip1}の代わりにSic1を用いて上記と同様の反応を行い、解析した。その結果、p27^{Kip1}と異なりSic1のポリユビキチン化は見られないことから(第9図右)、KPC1 - KPC2複合体はp27^{Kip1}に選択性を有するユビキチンリガーゼ複合体であることが確認された。

(5) p27^{Kip1}のポリユビキチン化におけるKPC1のRINGフィンガードメインの重要性

KPC1のC末に存在するRINGフィンガードメインの機能を調べるため、RINGフィンガードメインを欠損した変異型KPC1〔以下KPC1(R)と称す〕を昆虫細胞で発現させた。配列番号29および31で表される塩基配列からなるDNA(KPC1-H-1、KPC1-H-3)をプライマーとし、ヒトKPC1 cDNAクローンIMAGE:3909169を鋳型としたPCRにより、KPC1(R)(配列番号2の1~1253番目のアミノ酸配列からなる)のN末にFLAGタグを付加した蛋白質をコードするDNA断片を増幅した。このDNA断片を5'にあるNheI、3'端にあるXhoIで切断後、(1)で作製したHis6タグをコードする領域を挿入したpBacPAK9のNheI/XhoIサイト間に挿入することにより、pBacPAK9に、N末にHis6/FLAGタグを付加したKPC1(R)をコードするDNAが挿入されたトランスファクターを作製した。このトランスファクター、および(1)で作製した、N末にアミノ酸配列からなるHis6/HSVタグを付加したヒトKPC2をコードするDNAが挿入されたトランスファクターを用いて、(1)と同様にして、KPC1(R) - KPC2複合体を発現するSf21細胞を作製した。KPC1(R) - KPC2複合体を発現するSf21細胞の細胞抽出液について、(2)と同様に、FLAGタグに対する抗体でKPC1(R)を免疫沈降し、共沈するKPC2の有無を検出した。その結果、KPC1(R)に対する免疫沈降物中にKPC2が検出され、KPC2との結合にはRINGフィンガードメインが関与していないことがわかった(第7図)。

KPC1 (R) - KPC2 複合体を用いて、(4)に記載した方法により p 2 7^{Kip1} のポリユビキチン化反応を行った。第 1 0 図に示すように、野生型 KPC1 - KPC2 複合体で見られるユビキチン化が KPC1 (R) - KPC2 複合体では検出されず、ポリユビキチン化反応において KPC1 の R I N G フィンガードメインが必須であることが確認された。

(6) KPC1 - KPC2 複合体によるポリユビキチン化反応における E 2 の選択性
文献 [J . B i o l . C h e m . , 2 7 6 , 3 3 1 1 1 (2 0 0 1) ; J . B i o l . C h e m . , 2 7 6 , 4 8 9 3 7 (2 0 0 1)] に記載の方法に従い、N末に His 6 タグを付加した各種組換えヒト E 2 (U b c 2 A、U b c 3、U b c 4、U b c H 6、U b c H 7、U b c H 8) を調製し、それらを用いた p 2 7^{Kip1} のポリユビキチン化反応により、どの E 2 が KPC1 - KPC2 複合体の反応に参与するかを解析した。その結果、KPC1 - KPC2 複合体によるユビキチン化反応においては U b c 4 および U b c H 5 A が関与することが明らかになった (第 1 1 図) 。

(7) KPC1 - KPC2 複合体によるポリユビキチン化反応に対する p 2 7^{Kip1} のリン酸化の影響

p 2 7^{Kip1} の細胞内局在と分解調節は、p 2 7^{Kip1} の 2 個所のアミノ酸部位でのリン酸化 (1 0 番目のセリン、1 8 7 番目のスレオニン ; それぞれ Ser - 1 0 , Thr - 1 8 7 と略す) が重要であることが報告されている。KPC1 - KPC2 複合体によるポリユビキチン化反応に対するそれらアミノ酸のリン酸化の影響を見る目的で、リン酸化部位のアミノ酸を置換した変異型 p 2 7^{Kip1} を作製し、KPC1 - KPC2 複合体によるポリユビキチン化を解析した。

変異型 p 2 7^{Kip1} として、Ser - 1 0、Thr - 1 8 7 をそれぞれアラニンに置換したもの (それぞれ S 1 0 A、T 1 8 7 A と称す) とグルタミン酸に置換したもの (それぞれ S 1 0 E、T 1 8 7 E と称す) を、実施例 1 (1) に記載した組換え p 2 7^{Kip1} の調製と同手法により調製した。これら変異型 p 2 7^{Kip1} を基質としてポリユビキチン化反応を行った結果、すべての変異型において野生型 p 2 7^{Kip1} 同様、ユビキチン化が行われることが確認された (第 1 2 図) 。この結果から、従来の分解制御機構と異なり KPC1 - KPC2 複合体による p 2 7^{Kip1} の分解調節においてはこれらアミノ酸のリン酸化は関与していないことがわかり、KPC1 - KPC2 複合体による反応が新規なメカニズムであることを支持する結果といえる。

[実施例 4] 免疫蛍光染色法による KPC1 および KPC2 の細胞内局在解析

実施例 2 (1) で作製した KPC1 の発現用トランスファーベクターの、His 6 / F L A G タグを付加した KPC1 をコードする DNA を含む B a m H I - X h o I 断片を、レトロウイルス発現用ベクター p M X - p u r o [P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 4 , 3 9 3 8 (1 9 9 7)] の B a m H I / X h o I サイト間に挿入し、KPC1 発現用レトロウイルスベクターを作製した。また、配列番号 3 2 および 3 3 で表される塩基配列からなる DNA (KPC2 - H - 3、KPC2 - H - 4) をプライマーとし、実施例 2 で増幅したヒト KPC2 c D N A 断片を鋳型にした P C R により、C 末に配列番号 2 4 で表されるアミノ酸配列からなる H A タグを付加した KPC2 をコードする DNA 断片を増幅した。この DNA 断片を 5 ' 端にある B a m H I および 3 ' 端にある X h o I で切断後、同様に p M X - p u r o の B a m H I / X h o I サイト間に挿入し、KPC2 発現用レトロウイルスベクターを作製した。

これらの組換えレトロウイルス発現用ベクターをそれぞれ、既報 [G e n e T h e r . , 7 , 1 0 6 3 (2 0 0 0)] に従い P l a t E 細胞にトランスフェクトすることにより組換えレトロウイルスを作製した。得られた組換えウイルスを N I H 3 T 3 細胞 (A T C C N o . C R L - 1 6 5 8) に共感染させ、1 0 μ g / m L ピューロマイシンを含む培地で選択することにより、組換え KPC1 および KPC2 を発現する N I H 3 T 3 細胞を作製した。細胞を、抗 F L A G 抗体 (シグマ社) および抗 H A 抗体 (サンタクルーズ社) を用いた免疫蛍光染色法 [J . B i o l . C h e m . , 2 7 6 , 3 3 1 1 1 (2 0 0 1)] により、KPC1 および KPC2 の細胞内局在を解析した。

その結果、両蛋白質は共通して細胞質に局在し、核内には局在しないことが明らかになった。p27^{Kip1}は細胞周期G0 - G1期において核内から細胞質へと輸送されること〔EMBO J., 20, 6672 (2001)〕、またp27^{Kip1}をユビキチン化する活性が細胞質由来の粗精製分画に存在する〔J. Biol. Chem., 276, 48937 (2001)〕という、従来の報告と一致しており、本結果は、KPC1、KPC2が細胞質に局在し、G0 - G1期に核から細胞質に移行したp27^{Kip1}をユビキチン化するという仮説を支持する結果である。

〔実施例5〕 KPC1 - KPC2複合体の過剰発現によるp27^{Kip1}の分解に対する影響

実施例2(1)で作製したKPC1の発現用トランスファーベクターの、His6/FLAGタグを付加したKPC1(R)をコードするDNAを含むBamHI - XhoI断片を、発現用レトロウイルスベクターpMX - puroのBamHI / XhoIサイト間に挿入し、KPC1(R)発現用レトロウイルスベクターを作製した。実施例4と同様の方法で、KPC1(R)およびKPC2を高発現したNIH3T3細胞を作製した。この細胞、実施例4で作製したKPC1およびKPC2を高発現したNIH3T3細胞、およびコントロール用のpMX - puroベクターから作製した組換えレトロウイルスを感染させたNIH3T3細胞を用いて、細胞内でのp27^{Kip1}の分解に対するKPCの機能を調べた。接触阻害により細胞周期G0に同調した細胞を細胞密度約40%で蒔き直すことにより細胞周期G1へのエントリーを可能にし、それ以後のp27^{Kip1}量をイムノプロットにより経時的に解析した(第13図a)。KPC1およびKPC2を高発現した細胞ではコントロール細胞に比べ、p27^{Kip1}の分解が早く起きること、またKPC1(R)およびKPC2の発現細胞では逆に分解が遅れることが確認された。この結果は、KPC1 - KPC2複合体が、細胞内でのp27^{Kip1}のG0 - G1期における分解に関与することを示すと同時にKPC1(R)がドミナントネガティブ型分子として機能することを示している。

同様の実験を、蛋白質の核外移行を阻害する薬剤leptomycin存在下で行った結果、p27^{Kip1}の分解速度に差がないことがわかり、KPC1 - KPC2複合体を介したp27^{Kip1}の分解調節は、p27^{Kip1}の核から細胞質への移行が重要であることが確認された(第13図b)。

〔実施例6〕 KPC1と特異的に結合する抗体およびKPC2と特異的に結合する抗体マウスKPC1のN末端から300アミノ酸を含むKPC1の部分断片、マウスKPC2をそれぞれ抗原として、ウサギを免役し、抗血清を採取することにより、KPC1と特異的に結合するポリクローナル抗体およびKPC2と特異的に結合するポリクローナル抗体を得た。実施例7および第14図に示すように、これらの抗体を用いたイムノプロットにより、NIH3T3細胞で内在性に発現しているKPC1およびKPC2を、それぞれ検出することができた。

〔実施例7〕 RNAiによるKPC1の発現の抑制およびそのp27^{Kip1}の分解および細胞の増殖に対する影響

発現用レトロウイルスベクターpMX〔Exp. Hematol., 24, 324 (1996)〕のHindIII / XhoIサイト間にピューロマイシン耐性遺伝子を挿入し、ベクターpMX - puro IIを作製した。pMX - puro IIのNotI / SalIサイト間に、マウスU6プロモーターおよびその下流に配列番号37で表される配列をつなげたDNAを挿入し、KPC1 siRNA発現用レトロウイルスベクターを作製した。該ベクターを導入した細胞は、マウスKPC1遺伝子(配列番号3)の1852 ~ 1872番目の配列を標的とするsiRNAを発現する。また、コントロールとして、pMX - puro IIのNotI / SalIサイト間に、マウスU6プロモーターおよびその下流に配列番号39に示す配列をつなげたDNAを挿入し、改良型のグリーン蛍光蛋白質であるEGFP〔Gene, 173, 33 (1996)〕のsiRNA発現用レトロウイルスベクターを作製した。該ベクターを導入した細胞は、EGFP遺伝子のコード領域の126 ~ 146番目の配列を標的とするsiRNAを発現する。これらの発現用レトロ

10

20

30

40

50

ウイルスベクターを用いて、実施例 4 と同様にして組換えレトロウイルスを作製し、得られた組換えウイルスをそれぞれ NIH3T3 細胞に感染させ、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ビューロマイシンを含む培地で選択することにより、マウス KPC1 の発現を抑制する siRNA および EGFP siRNA をそれぞれ発現する NIH3T3 細胞を作製した。実施例 6 で作製した抗マウス KPC1 抗体を用いたイムノブロット解析により、コントロールの EGFP siRNA を発現する NIH3T3 細胞と比較して、KPC1 siRNA を発現する NIH3T3 細胞では、KPC1 の発現が特異的に抑制されていることが確認された。なお、KPC2 の発現は、どちらの NIH3T3 細胞も同程度で、抑制はみられなかった（第 14 図）。

これらの NIH3T3 細胞を、接触阻害により細胞周期 G0 に同調した後、細胞密度約 40% で蒔き直すことにより細胞周期 G1 へ進入させ、以後の細胞の p27^{Kip1} 量をイムノブロットにより経時的に解析した（第 14 図）。コントロールとして、GSK-3 の蛋白質量も同時に解析した。その結果、コントロールの EGFP siRNA を発現する NIH3T3 細胞では、時間の経過とともに、p27^{Kip1} の分解が見られるのに対し、マウス KPC1 siRNA を発現する NIH3T3 細胞では、p27^{Kip1} の分解が抑制されていることが確認された。コントロールの GSK-3 の分解は、どちらの細胞でも特に見られなかった。

また、これらの NIH3T3 細胞を、0.1% 血清を含む培地で培養し、p27^{Kip1}、サイクリン A、KPC1、KPC2 および GSK-3 の蛋白質量ならびに細胞数を経時的に解析した（第 15 図および第 16 図）。蛋白質量は、イムノブロットにより測定した。その結果、コントロールの EGFP siRNA を発現する NIH3T3 細胞と比較して、KPC1 siRNA を発現する NIH3T3 細胞では、p27^{Kip1} の分解が抑制されることにより、時間の経過とともに p27^{Kip1} がより多く蓄積すること、p27^{Kip1} により活性化および分解が阻害されるサイクリン A の分解が促進されていることが確認された。KPC1、KPC2 およびコントロールの GSK-3 の蛋白質量の変化は、どちらの細胞でも特に見られなかった。また、コントロールの EGFP siRNA を発現する NIH3T3 細胞では、細胞数が経時的に増加し、細胞周期が進行していると考えられるのに対し、KPC1 siRNA を発現する NIH3T3 細胞では、細胞数の増加が見られず、細胞周期の進行が抑制されていた。したがって、RNAi によって KPC1 の発現を抑制することにより、p27^{Kip1} の分解の抑制、サイクリン A の分解の促進、細胞周期の進行の抑制、および細胞の増殖の抑制をすることができた。

産業上の利用可能性

本発明により、p27^{Kip1} をユビキチン化する活性を有する新規なユビキチンリガーゼ蛋白質、該蛋白質を含む p27^{Kip1} をユビキチン化する活性を有するユビキチンリガーゼ複合体、該蛋白質をコードする DNA、該 DNA を含む組換え体 DNA、該組換え体 DNA で形質転換された形質転換体、および該蛋白質を認識する抗体が提供される。本発明は、癌、動脈硬化、慢性関節リウマチ、前立腺肥大症、経皮的経血管的冠動脈形成術後の血管再狭窄、肺線維症、糸球体腎炎、自己免疫疾患等の細胞周期の異常を原因とする疾患、細胞周期を調節することにより症状を軽減できるような疾患、特に癌の診断、治療等に有用である。

「配列表フリーテキスト」

配列番号 1 - 発明者：中山敬一；嘉村巧

配列番号 22 - His6 / FLAG タグ

配列番号 23 - His6 / HSV タグ

配列番号 24 - HA タグ

配列番号 25 - PCR プライマー KPC1 - M1

配列番号 26 - PCR プライマー KPC1 - M2

配列番号 27 - PCR プライマー KPC2 - H1

配列番号 28 - PCR プライマー KPC2 - H2

配列番号 29 - PCR プライマー KPC1 - H - 1

10

20

30

40

50

配列番号 30 - PCRプライマー KPC1 - H - 2
配列番号 31 - PCRプライマー KPC1 - H - 3
配列番号 32 - PCRプライマー KPC2 - H - 3
配列番号 33 - PCRプライマー KPC2 - H - 4
配列番号 34 - KPC1 siRNAセンス鎖
配列番号 35 - KPC1 siRNAアンチセンス鎖
配列番号 36 - KPC1 siRNA用の配列 X
配列番号 37 - KPC1 siRNA発現ベクターに挿入した DNA
配列番号 38 - KPC1 shRNA
配列番号 39 - EGFP siRNA発現ベクターに挿入した DNA

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

<120> Novel ubiquitin ligase

<130> 1487

<150> JP 2002-156257

<151> 2002-05-29

<160> 39

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3945

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Inventor: Nakayama, Keiichi; Kamura, Takumi

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3945)

<400> 1

atg gca tcc aag ggg gcc ggc atg tct ttc tcc cgc aag agc tat agg 48
Met Ala Ser Lys Gly Ala Gly Met Ser Phe Ser Arg Lys Ser Tyr Arg
1 5 10 15

ctg acc tea gat get gag aaa tcc agg gtc aca ggc att gtg cag gag 96
Leu Thr Ser Asp Ala Glu Lys Ser Arg Val Thr Gly Ile Val Gln Glu
20 25 30

aag ctg ctg aat gac tac ctg aac cgc atc ttt tcc tct tct gaa cat 144
Lys Leu Leu Asn Asp Tyr Leu Asn Arg Ile Phe Ser Ser Ser Glu His
35 40 45

gea ccc cca gca gcc acc agc agg aaa ccc ctg aac ttc cag aac ctg	192
Ala Pro Pro Ala Ala Thr Ser Arg Lys Pro Leu Asn Phe Gln Asn Leu	
50 55 60	
cca gaa cat ttg gac cag ttg cta cag gtg gac aat gag gag gag gaa	240
Pro Glu His Leu Asp Gln Leu Leu Gln Val Asp Asn Glu Glu Glu Glu	
65 70 75 80	
agc cag gga cag gtt gaa ggg cgg ctt ggc cca tcc act gtg gtc ctg	288
Ser Gln Gly Gln Val Glu Gly Arg Leu Gly Pro Ser Thr Val Val Leu	
85 90 95	
gac cac aca ggc ggc ttt gag ggg ctt ctc ctg gtg gat gat gac ctg	336
Asp His Thr Gly Gly Phe Glu Gly Leu Leu Leu Val Asp Asp Asp Leu	
100 105 110	
ctg ggg gtg att gga cac agc aac ttt ggc acc atc cgc tct acc aca	384
Leu Gly Val Ile Gly His Ser Asn Phe Gly Thr Ile Arg Ser Thr Thr	
115 120 125	
tgc gtg tac aaa ggg aaa tgg ctc tac gag gtc ctc atc tcc tcc cag	432
Cys Val Tyr Lys Gly Lys Trp Leu Tyr Glu Val Leu Ile Ser Ser Gln	
130 135 140	
ggg ctc atg cag atc ggc tgg tgc acc atc agc tgc cgc ttc aac cag	480
Gly Leu Met Gln Ile Gly Trp Cys Thr Ile Ser Cys Arg Phe Asn Gln	
145 150 155 160	
gag gag ggg gtt gga gat aca cac aac tcc tat gcc tat gat ggc aac	528
Glu Glu Gly Val Gly Asp Thr His Asn Ser Tyr Ala Tyr Asp Gly Asn	
165 170 175	
cgc gtg cgc aag tgg aat gtg acc aca acg aat tat ggc aag gcg tgg	576
Arg Val Arg Lys Trp Asn Val Thr Thr Thr Asn Tyr Gly Lys Ala Trp	
180 185 190	
gea gcg ggg gac atc gtg agc tgc ctg att gac ctg gat gat ggc act	624
Ala Ala Gly Asp Ile Val Ser Cys Leu Ile Asp Leu Asp Asp Gly Thr	
195 200 205	

ctg tcc ttc tgc ctg aac ggt gta tca ctg ggc act gcc ttt gag aac	672
Leu Ser Phe Cys Leu Asn Gly Val Ser Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn	
210 215 220	
ctg tcc agg ggc ctg ggt atg gcc tac ttc cca gcc atc agc etc tet	720
Leu Ser Arg Gly Leu Gly Met Ala Tyr Phe Pro Ala Ile Ser Leu Ser	
225 230 235 240	
ttc aag gag tcc gtg gcc ttc aac ttt ggc agc cgt cct ctg cgc tac	768
Phe Lys Glu Ser Val Ala Phe Asn Phe Gly Ser Arg Pro Leu Arg Tyr	
245 250 255	
cca gtg gca ggc tac cgg ccc ctg cag gac cca ccg agt gct gac ctg	816
Pro Val Ala Gly Tyr Arg Pro Leu Gln Asp Pro Pro Ser Ala Asp Leu	
260 265 270	
gtg cgg gca cag agg ttg ctg ggc tgc ttc cgg gca gtg ctg agt gtg	864
Val Arg Ala Gln Arg Leu Leu Gly Cys Phe Arg Ala Val Leu Ser Val	
275 280 285	
gag ctg gac cct gtg gag ggg cgg ctg ttg gac aag gag agc tcc aag	912
Glu Leu Asp Pro Val Glu Gly Arg Leu Leu Asp Lys Glu Ser Ser Lys	
290 295 300	
tgg cgg ttg cgg ggc cag ccc acc gtc etc etc aca ctg gcc cac atc	960
Trp Arg Leu Arg Gly Gln Pro Thr Val Leu Leu Thr Leu Ala His Ile	
305 310 315 320	
ttc cat cac ttt gca ccg ctt ctg cgc aag gtg tat ctg gtg gag gct	1008
Phe His His Phe Ala Pro Leu Leu Arg Lys Val Tyr Leu Val Glu Ala	
325 330 335	
gtg etc atg agc ttc ttg ctg ggc atc gtg gag aag ggc aca ccc aca	1056
Val Leu Met Ser Phe Leu Leu Gly Ile Val Glu Lys Gly Thr Pro Thr	
340 345 350	
cag gca cag tcc gtg gtg cac cag gtc ctg gac etc ttg tgg etc ttc	1104
Gln Ala Gln Ser Val Val His Gln Val Leu Asp Leu Leu Trp Leu Phe	
355 360 365	

atg gag gac tac gag gta caa gat tgc ctc aag cag ttg atg atg tct	1152
Met Glu Asp Tyr Glu Val Gln Asp Cys Leu Lys Gln Leu Met Met Ser	
370 375 380	
ctg ctt cgg ctg tac cga ttc tea ccc att gtc cca gac ctg ggc cta	1200
Leu Leu Arg Leu Tyr Arg Phe Ser Pro Ile Val Pro Asp Leu Gly Leu	
385 390 395 400	
cag atc cat tac ctg cgg ctc act atc gcc atc ctg agg cat gag aag	1248
Gln Ile His Tyr Leu Arg Leu Thr Ile Ala Ile Leu Arg His Glu Lys	
405 410 415	
tcc cgc aag ttt ctg ctt agc aat gtc ctc ttc gac gtg ctc cgc tcc	1296
Ser Arg Lys Phe Leu Leu Ser Asn Val Leu Phe Asp Val Leu Arg Ser	
420 425 430	
gtc gtc ttc ttt tac atc aag agc ccc ctg cgt gtg gag gag gcc ggc	1344
Val Val Phe Phe Tyr Ile Lys Ser Pro Leu Arg Val Glu Glu Ala Gly	
435 440 445	
ctg cag gag ctc att ccc acc acc tgg tgg ccc cac tgc tcc agt agg	1392
Leu Gln Glu Leu Ile Pro Thr Thr Trp Trp Pro His Cys Ser Ser Arg	
450 455 460	
gag ggc aaa gag agc acg gag atg aag gag gag acc gca gag gag cgg	1440
Glu Gly Lys Glu Ser Thr Glu Met Lys Glu Glu Thr Ala Glu Glu Arg	
465 470 475 480	
ctg cgg cgg cga gcc tac gaa cgg ggc tgt cag cgg ctc agg aag cgc	1488
Leu Arg Arg Arg Ala Tyr Glu Arg Gly Cys Gln Arg Leu Arg Lys Arg	
485 490 495	
atc gaa gtg gtg gaa gaa cta cag gtc cag atc ctg aag ctg ctg ctg	1536
Ile Glu Val Val Glu Glu Leu Gln Val Gln Ile Leu Lys Leu Leu Leu	
500 505 510	
gac aat aaa gat gac aat ggg ggt gaa gct tct agg tat atc ttc ctg	1584
Asp Asn Lys Asp Asp Asn Gly Gly Glu Ala Ser Arg Tyr Ile Phe Leu	
515 520 525	

acc aag ttt cgc aag ttt ctg cag gag aac gcc agt ggc cgg ggg aac	1632
Thr Lys Phe Arg Lys Phe Leu Gln Glu Asn Ala Ser Gly Arg Gly Asn	
530 535 540	
atg ccc atg ctc tgc ccc cct gag tac atg gtc tgc ttc tta cac cgg	1680
Met Pro Met Leu Cys Pro Pro Glu Tyr Met Val Cys Phe Leu His Arg	
545 550 555 560	
ctg atc tet gcc ctg cgc tac tat tgg gat gaa tac aag gct tcc aat	1728
Leu Ile Ser Ala Leu Arg Tyr Tyr Trp Asp Glu Tyr Lys Ala Ser Asn	
565 570 575	
cct cat gct tcc ttc agt gag gag gcc tac atc ccg ccc cag gtc ttc	1776
Pro His Ala Ser Phe Ser Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Pro Gln Val Phe	
580 585 590	
tat aat ggc aag gtg gac tac ttt gac ctg cag cgc ctg ggg gcc ctc	1824
Tyr Asn Gly Lys Val Asp Tyr Phe Asp Leu Gln Arg Leu Gly Gly Leu	
595 600 605	
ctc teg cac ctg cgg aag acc ctc aaa gat gac ctt gct tcc aaa gcc	1872
Leu Ser His Leu Arg Lys Thr Leu Lys Asp Asp Leu Ala Ser Lys Ala	
610 615 620	
aac att gtg atc gac cca ctg gag ctc cag tca acc gcc atg gat gac	1920
Asn Ile Val Ile Asp Pro Leu Glu Leu Gln Ser Thr Ala Met Asp Asp	
625 630 635 640	
cta gat gag gat gag gag cca gcc cca gct atg gcc cag cgc ccc atg	1968
Leu Asp Glu Asp Glu Glu Pro Ala Pro Ala Met Ala Gln Arg Pro Met	
645 650 655	
cag gcc ctg gct gtt ggg ggg cca ctg ccc ctg ccc cgg ccc gcc tgg	2016
Gln Ala Leu Ala Val Gly Gly Pro Leu Pro Leu Pro Arg Pro Gly Trp	
660 665 670	
ctc agt tet cca act ttg gcc cga gcc aac cgc ttc ctc agc aca gcg	2064
Leu Ser Ser Pro Thr Leu Gly Arg Ala Asn Arg Phe Leu Ser Thr Ala	
675 680 685	

gct gtg agc ctc atg acc cca cgg cgg cct ctg agc acc tcg gag aaa	2112
Ala Val Ser Leu Met Thr Pro Arg Arg Pro Leu Ser Thr Ser Glu Lys	
690 695 700	
gtg aag gtc cgc acg ctg agc gtg gag cag agg acc cgt gag gac att	2160
Val Lys Val Arg Thr Leu Ser Val Glu Gln Arg Thr Arg Glu Asp Ile	
705 710 715 720	
gaa ggc agc cac tgg aat gag ggc ttg ctg ctg ggg cgg ccc ccc gag	2208
Glu Gly Ser His Trp Asn Glu Gly Leu Leu Leu Gly Arg Pro Pro Glu	
725 730 735	
gag cct gag cag ccc ctc acc gag aac tcg ctg ctg gaa gtc ctg gat	2256
Glu Pro Glu Gln Pro Leu Thr Glu Asn Ser Leu Leu Glu Val Leu Asp	
740 745 750	
ggg gcg gtc atg atg tac aac ctc agc gta cac cag cag ctg ggc aag	2304
Gly Ala Val Met Met Tyr Asn Leu Ser Val His Gln Gln Leu Gly Lys	
755 760 765	
atg gtg ggt gtc tcc gat gat gtc aat gaa tac gct atg gct ctg agg	2352
Met Val Gly Val Ser Asp Asp Val Asn Glu Tyr Ala Met Ala Leu Arg	
770 775 780	
gac aca gag gac aag ctc cgc cgg tgc ccc aag agg agg aag gac atc	2400
Asp Thr Glu Asp Lys Leu Arg Arg Cys Pro Lys Arg Arg Lys Asp Ile	
785 790 795 800	
ctt gca gag ttg acc aag agc cag aag gtt ttc tca gaa aag ctg gac	2448
Leu Ala Glu Leu Thr Lys Ser Gln Lys Val Phe Ser Glu Lys Leu Asp	
805 810 815	
cac ctg agc cgc cgt ctt gcc tgg gtc cat gcc act gtc tac tcc cag	2496
His Leu Ser Arg Arg Leu Ala Trp Val His Ala Thr Val Tyr Ser Gln	
820 825 830	
gag aag atg ctg gac atc tac tgg ctg ctg cgc gtc tgc ctg cgg acc	2544
Glu Lys Met Leu Asp Ile Tyr Trp Leu Leu Arg Val Cys Leu Arg Thr	
835 840 845	

att gag cac ggt gat cgc aca ggg tet ctc ttt gcc ttc atg ccc gag	2592
Ile Glu His Gly Asp Arg Thr Gly Ser Leu Phe Ala Phe Met Pro Glu	
850 855 860	
ttc tac ctg agc gtg gcc atc aac agc tac agt gct ctc aag aat tac	2640
Phe Tyr Leu Ser Val Ala Ile Asn Ser Tyr Ser Ala Leu Lys Asn Tyr	
865 870 875 880	
ttt ggt ccc gtg cac agc atg gag gag ctc cca gcc tat gaa gag acc	2688
Phe Gly Pro Val His Ser Met Glu Glu Leu Pro Gly Tyr Glu Glu Thr	
885 890 895	
ctg acc cgc ctg get gcc att ctc gcc aaa cac ttt gcc gac gca cgc	2736
Leu Thr Arg Leu Ala Ala Ile Leu Ala Lys His Phe Ala Asp Ala Arg	
900 905 910	
att gtg ggc act gac atc cga gac tea ctg atg cag gcc ctg gcc agc	2784
Ile Val Gly Thr Asp Ile Arg Asp Ser Leu Met Gln Ala Leu Ala Ser	
915 920 925	
tac gtg tgc tac cca cac tcc ctg cgg get gtg gag cga atc ccc gag	2832
Tyr Val Cys Tyr Pro His Ser Leu Arg Ala Val Glu Arg Ile Pro Glu	
930 935 940	
gag cag cgt atc gcc atg gtg agg aac ctc ctg geg ccc tat gag cag	2880
Glu Gln Arg Ile Ala Met Val Arg Asn Leu Leu Ala Pro Tyr Glu Gln	
945 950 955 960	
cgg ccc tgg gcc cag acc aac tgg atc ctg gtg cgg ctc tgg agg ggc	2928
Arg Pro Trp Ala Gln Thr Asn Trp Ile Leu Val Arg Leu Trp Arg Gly	
965 970 975	
tgt ggc ttc ggg tac cgc tat aca cgg ctg cca cat ctg ctg aaa acc	2976
Cys Gly Phe Gly Tyr Arg Tyr Thr Arg Leu Pro His Leu Leu Lys Thr	
980 985 990	
aaa ctt gag gac gcc aat ttg ccc agc ctc cag aag ccc tgc cct tcc	3024
Lys Leu Glu Asp Ala Asn Leu Pro Ser Leu Gln Lys Pro Cys Pro Ser	
995 1000 1005	

acc ctg	ctg	cag	cag	cac	atg	gcg	gac	ctc	cta	cag	cag	ggt	cct	3069
Thr	Leu	Leu	Gln	Gln	His	Met	Ala	Asp	Leu	Leu	Gln	Gln	Gly	Pro
	1010					1015						1020		
gat gtg	gca	ccc	agc	ttc	ctc	aac	agc	gtc	ctc	aat	cag	ctc	aac	3114
Asp	Val	Ala	Pro	Ser	Phe	Leu	Asn	Ser	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Asn
	1025					1030						1035		
tgg gcc	ttc	tct	gaa	ttc	att	ggc	atg	atc	caa	gag	atc	cag	cag	3159
Trp	Ala	Phe	Ser	Glu	Phe	Ile	Gly	Met	Ile	Gln	Glu	Ile	Gln	Gln
	1040					1045						1050		
gct get	gag	egc	ctg	gag	cgg	aac	ttt	gtg	gac	agc	cgg	cag	ctc	3204
Ala	Ala	Glu	Arg	Leu	Glu	Arg	Asn	Phe	Val	Asp	Ser	Arg	Gln	Leu
	1055					1060						1065		
aag gta	tgt	gcc	acc	tgc	ttt	gac	ctc	tgc	gtc	agc	ctg	ctg	cgt	3249
Lys	Val	Cys	Ala	Thr	Cys	Phe	Asp	Leu	Ser	Val	Ser	Leu	Leu	Arg
	1070					1075						1080		
gtc ttg	gag	atg	act	atc	aca	ctg	gtg	cct	gag	ata	ttc	ctt	gac	3294
Val	Leu	Glu	Met	Thr	Ile	Thr	Leu	Val	Pro	Glu	Ile	Phe	Leu	Asp
	1085					1090						1095		
tgg acc	cgg	cct	acc	tct	gag	atg	ctg	ctg	cgg	cgt	ctt	gca	cag	3339
Trp	Thr	Arg	Pro	Thr	Ser	Glu	Met	Leu	Leu	Arg	Arg	Leu	Ala	Gln
	1100					1105						1110		
ctg cta	aac	cag	gtg	ctg	aac	cgg	gtg	aca	gct	gag	agg	aac	ctg	3384
Leu	Leu	Asn	Gln	Val	Leu	Asn	Arg	Val	Thr	Ala	Glu	Arg	Asn	Leu
	1115					1120						1125		
ttt gat	cgt	gtg	gtc	acc	cta	cgg	ctg	cct	ggc	cta	gag	agc	gtg	3429
Phe	Asp	Arg	Val	Val	Thr	Leu	Arg	Leu	Pro	Gly	Leu	Glu	Ser	Val
	1130					1135						1140		
gac cac	tat	ccc	att	ctg	gtg	gca	gtg	acg	ggc	atc	ctg	gtg	cag	3474
Asp	His	Tyr	Pro	Ile	Leu	Val	Ala	Val	Thr	Gly	Ile	Leu	Val	Gln
	1145					1150						1155		

ctc ctg	gtg cgt ggc cca gcc	tca gag aga gag caa gcc aca tca	3519
Leu Leu	Val Arg Gly Pro Ala	Ser Glu Arg Glu Gln Ala Thr Ser	
1160	1165	1170	
gtg ctc	ctg gca gat ccc tgc	ttc cag cta cgc tca ata tgc tat	3564
Val Leu	Leu Ala Asp Pro Cys	Phe Gln Leu Arg Ser Ile Cys Tyr	
1175	1180	1185	
ctc ctg	gga cag cca gag ccc	cca gca cct ggc act gct ctg cca	3609
Leu Leu	Gly Gln Pro Glu Pro	Pro Ala Pro Gly Thr Ala Leu Pro	
1190	1195	1200	
gcc cct	gac egg aag cgc ttc	tec ctg cag agc tat gcg gat tat	3654
Ala Pro	Asp Arg Lys Arg Phe	Ser Leu Gln Ser Tyr Ala Asp Tyr	
1205	1210	1215	
atc agt	gcc gat gag ctg gcc	caa gtg gaa cag atg ctg gcg cac	3699
Ile Ser	Ala Asp Glu Leu Ala	Gln Val Glu Gln Met Leu Ala His	
1220	1225	1230	
ctg acc	tct gca tct gcc cag	gca gca gct gcc tcc ctg ccc acc	3744
Leu Thr	Ser Ala Ser Ala Gln	Ala Ala Ala Ala Ser Leu Pro Thr	
1235	1240	1245	
agt gag	gag gac ctc tgc ccc	atc tgc tat gcc cac ccc atc tet	3789
Ser Glu	Glu Asp Leu Cys Pro	Ile Cys Tyr Ala His Pro Ile Ser	
1250	1255	1260	
gct gtg	ttc cag ccc tgt ggc	cac aag tcc tgc aaa gcc tgt atc	3834
Ala Val	Phe Gln Pro Cys Gly	His Lys Ser Cys Lys Ala Cys Ile	
1265	1270	1275	
aac cag	cac ctg atg aac aac	aag gac tgc ttc ttc tgc aaa acc	3879
Asn Gln	His Leu Met Asn Asn	Lys Asp Cys Phe Phe Cys Lys Thr	
1280	1285	1290	
acc atc	gtg tct gta gag gac	tgg gag aag gga gcc aat acg agt	3924
Thr Ile	Val Ser Val Glu Asp	Trp Glu Lys Gly Ala Asn Thr Ser	
1295	1300	1305	

act acc tcc tca gct gcc tag
 Thr Thr Ser Ser Ala Ala
 1310

3945

<210> 2
 <211> 1314
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ser Lys Gly Ala Gly Met Ser Phe Ser Arg Lys Ser Tyr Arg
 1 5 10 15

Leu Thr Ser Asp Ala Glu Lys Ser Arg Val Thr Gly Ile Val Gln Glu
 20 25 30

Lys Leu Leu Asn Asp Tyr Leu Asn Arg Ile Phe Ser Ser Ser Glu His
 35 40 45

Ala Pro Pro Ala Ala Thr Ser Arg Lys Pro Leu Asn Phe Gln Asn Leu
 50 55 60

Pro Glu His Leu Asp Gln Leu Leu Gln Val Asp Asn Glu Glu Glu Glu
 65 70 75 80

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

Asp His Thr Gly Gly Phe Glu Gly Leu Leu Leu Val Asp Asp Asp Leu
 100 105 110

Leu Gly Val Ile Gly His Ser Asn Phe Gly Thr Ile Arg Ser Thr Thr
 115 120 125

Cys Val Tyr Lys Gly Lys Trp Leu Tyr Glu Val Leu Ile Ser Ser Gln
 130 135 140

Gly Leu Met Gln Ile Gly Trp Cys Thr Ile Ser Cys Arg Phe Asn Gln
 145 150 155 160

Glu Glu Gly Val Gly Asp Thr His Asn Ser Tyr Ala Tyr Asp Gly Asn
 165 170 175

Arg Val Arg Lys Trp Asn Val Thr Thr Thr Asn Tyr Gly Lys Ala Trp
 180 185 190

Ala Ala Gly Asp Ile Val Ser Cys Leu Ile Asp Leu Asp Asp Gly Thr
 195 200 205

Leu Ser Phe Cys Leu Asn Gly Val Ser Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn
 210 215 220

Leu Ser Arg Gly Leu Gly Met Ala Tyr Phe Pro Ala Ile Ser Leu Ser
 225 230 235 240

Phe Lys Glu Ser Val Ala Phe Asn Phe Gly Ser Arg Pro Leu Arg Tyr
 245 250 255

Pro Val Ala Gly Tyr Arg Pro Leu Gln Asp Pro Pro Ser Ala Asp Leu
 260 265 270

Val Arg Ala Gln Arg Leu Leu Gly Cys Phe Arg Ala Val Leu Ser Val
 275 280 285

Glu Leu Asp Pro Val Glu Gly Arg Leu Leu Asp Lys Glu Ser Ser Lys
 290 295 300

Trp Arg Leu Arg Gly Gln Pro Thr Val Leu Leu Thr Leu Ala His Ile
 305 310 315 320

Phe His His Phe Ala Pro Leu Leu Arg Lys Val Tyr Leu Val Glu Ala
 325 330 335

Val Leu Met Ser Phe Leu Leu Gly Ile Val Glu Lys Gly Thr Pro Thr
 340 345 350

Gln Ala Gln Ser Val Val His Gln Val Leu Asp Leu Leu Trp Leu Phe
 355 360 365

Met Glu Asp Tyr Glu Val Gln Asp Cys Leu Lys Gln Leu Met Met Ser
 370 375 380

Leu Leu Arg Leu Tyr Arg Phe Ser Pro Ile Val Pro Asp Leu Gly Leu
 385 390 395 400

Gln Ile His Tyr Leu Arg Leu Thr Ile Ala Ile Leu Arg His Glu Lys
 405 410 415

Ser Arg Lys Phe Leu Leu Ser Asn Val Leu Phe Asp Val Leu Arg Ser
 420 425 430

Val Val Phe Phe Tyr Ile Lys Ser Pro Leu Arg Val Glu Glu Ala Gly
 435 440 445

Leu Gln Glu Leu Ile Pro Thr Thr Trp Trp Pro His Cys Ser Ser Arg
 450 455 460

Glu Gly Lys Glu Ser Thr Glu Met Lys Glu Glu Thr Ala Glu Glu Arg
 465 470 475 480

Leu Arg Arg Arg Ala Tyr Glu Arg Gly Cys Gln Arg Leu Arg Lys Arg
 485 490 495

Ile Glu Val Val Glu Glu Leu Gln Val Gln Ile Leu Lys Leu Leu Leu
 500 505 510

Asp Asn Lys Asp Asp Asn Gly Gly Glu Ala Ser Arg Tyr Ile Phe Leu
 515 520 525

Thr Lys Phe Arg Lys Phe Leu Gln Glu Asn Ala Ser Gly Arg Gly Asn
 530 535 540

Met Pro Met Leu Cys Pro Pro Glu Tyr Met Val Cys Phe Leu His Arg
 545 550 555 560

Leu Ile Ser Ala Leu Arg Tyr Tyr Trp Asp Glu Tyr Lys Ala Ser Asn
 565 570 575

Pro His Ala Ser Phe Ser Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Pro Gln Val Phe
 580 585 590

Tyr Asn Gly Lys Val Asp Tyr Phe Asp Leu Gln Arg Leu Gly Gly Leu
 595 600 605

Leu Ser His Leu Arg Lys Thr Leu Lys Asp Asp Leu Ala Ser Lys Ala
 610 615 620

Asn Ile Val Ile Asp Pro Leu Glu Leu Gln Ser Thr Ala Met Asp Asp
 625 630 635 640

Leu Asp Glu Asp Glu Glu Pro Ala Pro Ala Met Ala Gln Arg Pro Met
 645 650 655

Gln Ala Leu Ala Val Gly Gly Pro Leu Pro Leu Pro Arg Pro Gly Trp
 660 665 670

Leu Ser Ser Pro Thr Leu Gly Arg Ala Asn Arg Phe Leu Ser Thr Ala
 675 680 685

Ala Val Ser Leu Met Thr Pro Arg Arg Pro Leu Ser Thr Ser Glu Lys
 690 695 700

Val Lys Val Arg Thr Leu Ser Val Glu Gln Arg Thr Arg Glu Asp Ile
 705 710 715 720

Glu Gly Ser His Trp Asn Glu Gly Leu Leu Leu Gly Arg Pro Pro Glu
 725 730 735

Glu Pro Glu Gln Pro Leu Thr Glu Asn Ser Leu Leu Glu Val Leu Asp
 740 745 750

Gly Ala Val Met Met Tyr Asn Leu Ser Val His Gln Gln Leu Gly Lys
 755 760 765

Met Val Gly Val Ser Asp Asp Val Asn Glu Tyr Ala Met Ala Leu Arg
 770 775 780

Asp Thr Glu Asp Lys Leu Arg Arg Cys Pro Lys Arg Arg Lys Asp Ile
 785 790 795 800

Leu Ala Glu Leu Thr Lys Ser Gln Lys Val Phe Ser Glu Lys Leu Asp
 805 810 815

His Leu Ser Arg Arg Leu Ala Trp Val His Ala Thr Val Tyr Ser Gln
 820 825 830

Glu Lys Met Leu Asp Ile Tyr Trp Leu Leu Arg Val Cys Leu Arg Thr
 835 840 845

Ile Glu His Gly Asp Arg Thr Gly Ser Leu Phe Ala Phe Met Pro Glu
 850 855 860

Phe Tyr Leu Ser Val Ala Ile Asn Ser Tyr Ser Ala Leu Lys Asn Tyr
 865 870 875 880

Phe Gly Pro Val His Ser Met Glu Glu Leu Pro Gly Tyr Glu Glu Thr
 885 890 895

Leu Thr Arg Leu Ala Ala Ile Leu Ala Lys His Phe Ala Asp Ala Arg
 900 905 910

Ile Val Gly Thr Asp Ile Arg Asp Ser Leu Met Gln Ala Leu Ala Ser
915 920 925

Tyr Val Cys Tyr Pro His Ser Leu Arg Ala Val Glu Arg Ile Pro Glu
930 935 940

Glu Gln Arg Ile Ala Met Val Arg Asn Leu Leu Ala Pro Tyr Glu Gln
945 950 955 960

Arg Pro Trp Ala Gln Thr Asn Trp Ile Leu Val Arg Leu Trp Arg Gly
965 970 975

Cys Gly Phe Gly Tyr Arg Tyr Thr Arg Leu Pro His Leu Leu Lys Thr
980 985 990

Lys Leu Glu Asp Ala Asn Leu Pro Ser Leu Gln Lys Pro Cys Pro Ser
995 1000 1005

Thr Leu Leu Gln Gln His Met Ala Asp Leu Leu Gln Gln Gly Pro
1010 1015 1020

Asp Val Ala Pro Ser Phe Leu Asn Ser Val Leu Asn Gln Leu Asn
1025 1030 1035

Trp Ala Phe Ser Glu Phe Ile Gly Met Ile Gln Glu Ile Gln Gln
1040 1045 1050

Ala Ala Glu Arg Leu Glu Arg Asn Phe Val Asp Ser Arg Gln Leu
1055 1060 1065

Lys Val Cys Ala Thr Cys Phe Asp Leu Ser Val Ser Leu Leu Arg
 1070 1075 1080

Val Leu Glu Met Thr Ile Thr Leu Val Pro Glu Ile Phe Leu Asp
 1085 1090 1095

Trp Thr Arg Pro Thr Ser Glu Met Leu Leu Arg Arg Leu Ala Gln
 1100 1105 1110

Leu Leu Asn Gln Val Leu Asn Arg Val Thr Ala Glu Arg Asn Leu
 1115 1120 1125

Phe Asp Arg Val Val Thr Leu Arg Leu Pro Gly Leu Glu Ser Val
 1130 1135 1140

Asp His Tyr Pro Ile Leu Val Ala Val Thr Gly Ile Leu Val Gln
 1145 1150 1155

Leu Leu Val Arg Gly Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gln Ala Thr Ser
 1160 1165 1170

Val Leu Leu Ala Asp Pro Cys Phe Gln Leu Arg Ser Ile Cys Tyr
 1175 1180 1185

Leu Leu Gly Gln Pro Glu Pro Pro Ala Pro Gly Thr Ala Leu Pro
 1190 1195 1200

Ala Pro Asp Arg Lys Arg Phe Ser Leu Gln Ser Tyr Ala Asp Tyr
 1205 1210 1215

Ile Ser Ala Asp Glu Leu Ala Gln Val Glu Gln Met Leu Ala His
 1220 1225 1230

Leu Thr Ser Ala Ser Ala Gln Ala Ala Ala Ala Ser Leu Pro Thr
 1235 1240 1245

Ser Glu Glu Asp Leu Cys Pro Ile Cys Tyr Ala His Pro Ile Ser
 1250 1255 1260

Ala Val Phe Gln Pro Cys Gly His Lys Ser Cys Lys Ala Cys Ile
 1265 1270 1275

Asn Gln His Leu Met Asn Asn Lys Asp Cys Phe Phe Cys Lys Thr
 1280 1285 1290

Thr Ile Val Ser Val Glu Asp Trp Glu Lys Gly Ala Asn Thr Ser
 1295 1300 1305

Thr Thr Ser Ser Ala Ala
 1310

<210> 3

<211> 3945

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3945)

<400> 3

atg gcg tcc aag ggg act ggc atg tcg ttc tcc cga aag agc tat agg
 Met Ala Ser Lys Gly Thr Gly Met Ser Phe Ser Arg Lys Ser Tyr Arg

1	5	10	15	
ctg acc tca gat gct gag aag tcc agg gtc aca ggc atc gtg caa gag				96
Leu Thr Ser Asp Ala Glu Lys Ser Arg Val Thr Gly Ile Val Gln Glu				
	20	25	30	
aaa cta ctg agc gac tat ctg tac cgc atc ttt tcc cct cct gac cgt				144
Lys Leu Leu Ser Asp Tyr Leu Tyr Arg Ile Phe Ser Pro Pro Asp Arg				
	35	40	45	
gga ccc gcc gca gcc acc agc agg aaa ccg cta aac ttc cat aac ctg				192
Gly Pro Ala Ala Ala Thr Ser Arg Lys Pro Leu Asn Phe His Asn Leu				
	50	55	60	
cct gag cac gtg gac cag ctg cta cag gtg gac agt gaa gac aac gag				240
Pro Glu His Val Asp Gln Leu Leu Gln Val Asp Ser Glu Asp Asn Glu				
	65	70	75	80
agc cag gga caa gtt gaa ggt cga ctt ggc cca tct act gtg gtc cta				288
Ser Gln Gly Gln Val Glu Gly Arg Leu Gly Pro Ser Thr Val Val Leu				
	85	90	95	
gac cac aca gga ggc ttt gag ggg ctt ctc ctt gtg gat gat gac ctc				336
Asp His Thr Gly Gly Phe Glu Gly Leu Leu Leu Val Asp Asp Asp Leu				
	100	105	110	
ctg ggg gtg att gga cac agc aac ttt ggc act atc cgt tet acc aca				384
Leu Gly Val Ile Gly His Ser Asn Phe Gly Thr Ile Arg Ser Thr Thr				
	115	120	125	
tgt gtg tac aaa ggg aag tgg gtc tac gag gtg ctc atc tcc tcc cag				432
Cys Val Tyr Lys Gly Lys Trp Val Tyr Glu Val Leu Ile Ser Ser Gln				
	130	135	140	
ggc ctc atg cag atc ggc tgg tgc acc atc aac tgc cgc ttt aat cag				480
Gly Leu Met Gln Ile Gly Trp Cys Thr Ile Asn Cys Arg Phe Asn Gln				
	145	150	155	160
gag gaa ggg gtt gga gac aca cat aac tcc tat gcc tat gac ggc aac				528
Glu Glu Gly Val Gly Asp Thr His Asn Ser Tyr Ala Tyr Asp Gly Asn				

165	170	175	
cga gtg cgc aag tgg aat gtt acc acc acg aat tat ggc aag gcg tgg			576
Arg Val Arg Lys Trp Asn Val Thr Thr Thr Asn Tyr Gly Lys Ala Trp			
180	185	190	
gct gcg ggg gac att gtc agc tgc cta att gat ctg gat gat ggg act			624
Ala Ala Gly Asp Ile Val Ser Cys Leu Ile Asp Leu Asp Asp Gly Thr			
195	200	205	
ctg tcc ttc tgc ctg aat ggc gtg tca ctg ggc act gcc ttc gag aac			672
Leu Ser Phe Cys Leu Asn Gly Val Ser Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn			
210	215	220	
ctt tcc agg ggc cta gga atg gcg tac ttc cca gcc atc agc ctg tca			720
Leu Ser Arg Gly Leu Gly Met Ala Tyr Phe Pro Ala Ile Ser Leu Ser			
225	230	235	240
ttc aag gag tct gtg gca ttc aac ttt ggc agc cgt cct ttg cgc tac			768
Phe Lys Glu Ser Val Ala Phe Asn Phe Gly Ser Arg Pro Leu Arg Tyr			
245	250	255	
cca gtt gcg ggc ttc cgg ccc ctg cag gac cct ccg ttt gct gac ctg			816
Pro Val Ala Gly Phe Arg Pro Leu Gln Asp Pro Pro Phe Ala Asp Leu			
260	265	270	
gtc egg gca cag agg ttg ctg ggc tgc ttc cag gca gtg cta agt gtg			864
Val Arg Ala Gln Arg Leu Leu Gly Cys Phe Gln Ala Val Leu Ser Val			
275	280	285	
gag ctg gac cct gtg gaa ggg cgg ctg gtg gag acg gag agc tct gag			912
Glu Leu Asp Pro Val Glu Gly Arg Leu Val Glu Thr Glu Ser Ser Glu			
290	295	300	
tgg cag ctg caa ggg cag ccc act gtc ctc ctc acg ctg gcc cac atc			960
Trp Gln Leu Gln Gly Gln Pro Thr Val Leu Leu Thr Leu Ala His Ile			
305	310	315	320
ttc cat cac ttt gca cca ctg ctg cgc aag gta tac ctg gtg gag gct			1008
Phe His His Phe Ala Pro Leu Leu Arg Lys Val Tyr Leu Val Glu Ala			

325	330	335	
gtg cta atg agc ttc ctg ctg ggc gtt gtg gag aag ggc aca cca gag			1056
Val Leu Met Ser Phe Leu Leu Gly Val Val Glu Lys Gly Thr Pro Glu			
340	345	350	
cag gcg cag tct gtg gta cac cag atc ttg gac ctc ttg tgg ctc ttc			1104
Gln Ala Gln Ser Val Val His Gln Ile Leu Asp Leu Leu Trp Leu Phe			
355	360	365	
atg gag gac tat gag gta cag gat tgc ctg aag cag ttg atg atg tca			1152
Met Glu Asp Tyr Glu Val Gln Asp Cys Leu Lys Gln Leu Met Met Ser			
370	375	380	
ctt cta cgt ctc tac cga ttc tgc cct att gtc cca gac ctg ggt cta			1200
Leu Leu Arg Leu Tyr Arg Phe Ser Pro Ile Val Pro Asp Leu Gly Leu			
385	390	395	400
cag atc cac tac ctg cgc ctc act atg tcc atc ctg aga cac gag aag			1248
Gln Ile His Tyr Leu Arg Leu Thr Met Ser Ile Leu Arg His Glu Lys			
405	410	415	
tcc cgc aag ttc ctg ctt agc aat gtc ctt ttt gac atg ctc cgg tcc			1296
Ser Arg Lys Phe Leu Leu Ser Asn Val Leu Phe Asp Met Leu Arg Ser			
420	425	430	
gtg gtc ttc ttt tat att aag agt ccc ctg cgt gtg gag gaa gct ggc			1344
Val Val Phe Phe Tyr Ile Lys Ser Pro Leu Arg Val Glu Glu Ala Gly			
435	440	445	
ctg aag gaa ctc att ccc acc acc tgg tgg ccc cat cgc tcc agc agg			1392
Leu Lys Glu Leu Ile Pro Thr Thr Trp Trp Pro His Arg Ser Ser Arg			
450	455	460	
gag agc aga gac ggt aag gaa gca agg gag gag acc acc gaa gag cgg			1440
Glu Ser Arg Asp Gly Lys Glu Ala Arg Glu Glu Thr Thr Glu Glu Arg			
465	470	475	480
cag cgg agg cga gcc tat gag cgt ggc tgc caa aga ctc aag aaa cgc			1488
Gln Arg Arg Arg Ala Tyr Glu Arg Gly Cys Gln Arg Leu Lys Lys Arg			

485	490	495	
att gaa gtg gtg gaa gaa ctg cag gtc cag atc ctg aag ctg ctg ttg			1536
Ile Glu Val Val Glu Glu Leu Gln Val Gln Ile Leu Lys Leu Leu Leu			
500	505	510	
gac aat aaa gat gac aat ggg ggt gaa gct tet agg tac atc ttt ctg			1584
Asp Asn Lys Asp Asp Asn Gly Gly Glu Ala Ser Arg Tyr Ile Phe Leu			
515	520	525	
aca aaa ttc cga aag ttc ctg cag gag aat gcc agc ggc cgg ggg aac			1632
Thr Lys Phe Arg Lys Phe Leu Gln Glu Asn Ala Ser Gly Arg Gly Asn			
530	535	540	
aca ccc gtg ctc tgc ecc cct gag tac atg gtc tgc ttc cta cac egg			1680
Thr Pro Val Leu Cys Pro Pro Glu Tyr Met Val Cys Phe Leu His Arg			
545	550	555	560
ctg gtg tet gcc ttg cgc ttc tat tgg gat gaa tac aaa gct tcc aac			1728
Leu Val Ser Ala Leu Arg Phe Tyr Trp Asp Glu Tyr Lys Ala Ser Asn			
565	570	575	
ccc cgt gct tcc ttc agt gag gag gct tac atc ccg ecc cag atc ttc			1776
Pro Arg Ala Ser Phe Ser Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Pro Gln Ile Phe			
580	585	590	
tat aat ggc aag gtg gac tac ttt gac ctt cag cgc ctt ggg ggc ctc			1824
Tyr Asn Gly Lys Val Asp Tyr Phe Asp Leu Gln Arg Leu Gly Gly Leu			
595	600	605	
ctc tca cac ctt cga aag acc ctt aaa gat gac ctt gct tcc aaa gcc			1872
Leu Ser His Leu Arg Lys Thr Leu Lys Asp Asp Leu Ala Ser Lys Ala			
610	615	620	
aac atc gtg atc gac ccc ctg gag ctc cag gca gcc acc atg gat gac			1920
Asn Ile Val Ile Asp Pro Leu Glu Leu Gln Ala Ala Thr Met Asp Asp			
625	630	635	640
ctg gat gag gat gaa gag cct gcc ccc tca gcg gcc cag cgt ccg atg			1968
Leu Asp Glu Asp Glu Glu Pro Ala Pro Ser Ala Ala Gln Arg Pro Met			

645	650	655	
caa gcc ctg gcc atc gga ggg gca ctg ccc ctg ecc cgg cca ggc tgg			2016
Gln Ala Leu Ala Ile Gly Gly Ala Leu Pro Leu Pro Arg Pro Gly Trp			
660	665	670	
etc agt tct cca acc ctg ggc aga gcc aac cgc ttc etc agc acg gca			2064
Leu Ser Ser Pro Thr Leu Gly Arg Ala Asn Arg Phe Leu Ser Thr Ala			
675	680	685	
gct gtg agc etc atg acc cca cgg cgg ctt ctg agc acc atg gag aaa			2112
Ala Val Ser Leu Met Thr Pro Arg Arg Leu Leu Ser Thr Met Glu Lys			
690	695	700	
gtc aaa gtt cgc tca ctg aat gtg gaa cag agg acc cgt gag gac att			2160
Val Lys Val Arg Ser Leu Asn Val Glu Gln Arg Thr Arg Glu Asp Ile			
705	710	715	720
gag ggc agc cac tgg aat gag ggc ctg ctg ttg ggg agg ccc cct gaa			2208
Glu Gly Ser His Trp Asn Glu Gly Leu Leu Leu Gly Arg Pro Pro Glu			
725	730	735	
gag cct gag cag ccg ctt acc gag aac tcg ctg ttg gaa gtc ctg gat			2256
Glu Pro Glu Gln Pro Leu Thr Glu Asn Ser Leu Leu Glu Val Leu Asp			
740	745	750	
ggc aca gtc atg atg tat aac etc agc gtt cac cag cag ctg ggc aag			2304
Gly Thr Val Met Met Tyr Asn Leu Ser Val His Gln Gln Leu Gly Lys			
755	760	765	
atg gtg ggt gtg tct gat gat gtc aac gag tat gca atg gcc cta aga			2352
Met Val Gly Val Ser Asp Asp Val Asn Glu Tyr Ala Met Ala Leu Arg			
770	775	780	
gac aca gag gac aag etc cgt cgg tgc cct aag agg agg aag gat atc			2400
Asp Thr Glu Asp Lys Leu Arg Arg Cys Pro Lys Arg Arg Lys Asp Ile			
785	790	795	800
ctt gca gag ttg acc aag agc cag aag gtt ttc tca gaa aag ctg gac			2448
Leu Ala Glu Leu Thr Lys Ser Gln Lys Val Phe Ser Glu Lys Leu Asp			

805	810	815	
cac ctg agc cgc agg ett gcc tgg gtc cac gcc aca gtc tac tca cag			2496
His Leu Ser Arg Arg Leu Ala Trp Val His Ala Thr Val Tyr Ser Gln			
820	825	830	
gag aaa atg ctg gat atc tac tgg tta ctg cgt gtc tgc cta egg acc			2544
Glu Lys Met Leu Asp Ile Tyr Trp Leu Leu Arg Val Cys Leu Arg Thr			
835	840	845	
att gag cat ggg gac cgc acg ggg tct ctc ttt gcc ttc atg cct gag			2592
Ile Glu His Gly Asp Arg Thr Gly Ser Leu Phe Ala Phe Met Pro Glu			
850	855	860	
ttc tac cta agt gtg get atc aac agc tac agt gcc ctg aag aac tat			2640
Phe Tyr Leu Ser Val Ala Ile Asn Ser Tyr Ser Ala Leu Lys Asn Tyr			
865	870	875	880
ttt ggc cct gtg cac agc atg gag gaa etc cca ggc tat gaa gag acc			2688
Phe Gly Pro Val His Ser Met Glu Glu Leu Pro Gly Tyr Glu Glu Thr			
885	890	895	
ctg aca cgc tta get gcc atc etc gcc aaa cac ttt get gac cct cga			2736
Leu Thr Arg Leu Ala Ala Ile Leu Ala Lys His Phe Ala Asp Pro Arg			
900	905	910	
ata gta ggc act gat att cga gac tca ctg atg cag gcc ctg gcc agc			2784
Ile Val Gly Thr Asp Ile Arg Asp Ser Leu Met Gln Ala Leu Ala Ser			
915	920	925	
tat gtg tgc tac cca cac tcc ctg cgg get gtg gaa cgg att cct gag			2832
Tyr Val Cys Tyr Pro His Ser Leu Arg Ala Val Glu Arg Ile Pro Glu			
930	935	940	
gaa cag cgc atc gcc atg gtg agg aac ctt ttg gca ccc tat gag caa			2880
Glu Gln Arg Ile Ala Met Val Arg Asn Leu Leu Ala Pro Tyr Glu Gln			
945	950	955	960
cgg ccc tgg gcc cag acc aac tgg atc ctg gtg egg ctt tgg agg ggc			2928
Arg Pro Trp Ala Gln Thr Asn Trp Ile Leu Val Arg Leu Trp Arg Gly			

965	970	975	
tgt ggg ttt ggg tac cgc tat aca cgg ctg cca cat ctg ctg aaa acc			2976
Cys Gly Phe Gly Tyr Arg Tyr Thr Arg Leu Pro His Leu Leu Lys Thr			
980	985	990	
aag cca gag gat gcc aat ttg ccc agc ctc caa aag ccc tgc cct tgc			3024
Lys Pro Glu Asp Ala Asn Leu Pro Ser Leu Gln Lys Pro Cys Pro Ser			
995	1000	1005	
acc ttg cta cag cag cac atg gcg gac ctg ctg cga caa ggg tct			3069
Thr Leu Leu Gln Gln His Met Ala Asp Leu Leu Arg Gln Gly Ser			
1010	1015	1020	
gat gtg gca ccg agc ttc ctc aac agt gtc ctt aac cag ctc aac			3114
Asp Val Ala Pro Ser Phe Leu Asn Ser Val Leu Asn Gln Leu Asn			
1025	1030	1035	
tgg gcc ttc tct gag ttc atc ggc atg atc cag gag att caa cag			3159
Trp Ala Phe Ser Glu Phe Ile Gly Met Ile Gln Glu Ile Gln Gln			
1040	1045	1050	
gct gct gaa cgc ctg gag cgg aac ttt gtg gac agc cga cag ctc			3204
Ala Ala Glu Arg Leu Glu Arg Asn Phe Val Asp Ser Arg Gln Leu			
1055	1060	1065	
aag gtc tgt gcc acc tgc ttt gac ctg tgc gtc agc ttg ttg cgc			3249
Lys Val Cys Ala Thr Cys Phe Asp Leu Ser Val Ser Leu Leu Arg			
1070	1075	1080	
gtc ttg gaa atg acc atc acg ctg gta cct gaa ata ttc ctt gac			3294
Val Leu Glu Met Thr Ile Thr Leu Val Pro Glu Ile Phe Leu Asp			
1085	1090	1095	
tgg tcc cgc cct acc tct gag atg ctg ctt cgg cgt ctg gca cag			3339
Trp Ser Arg Pro Thr Ser Glu Met Leu Leu Arg Arg Leu Ala Gln			
1100	1105	1110	
ctg ctg aac cag gtg ctg aac cgg gtg aca gct gag agg aac ctg			3384
Leu Leu Asn Gln Val Leu Asn Arg Val Thr Ala Glu Arg Asn Leu			

1115	1120	1125	
ttt gac cgt gta gtt acc cta	cgg cta cct ggg ctg	gag agt gtg	3429
Phe Asp Arg Val Val Thr Leu	Arg Leu Pro Gly Leu	Glu Ser Val	
1130	1135	1140	
gac cac tac cct atc ctg gtg	gca gtg act ggc atc	ctg gta cgc	3474
Asp His Tyr Pro Ile Leu Val	Ala Val Thr Gly Ile	Leu Val Arg	
1145	1150	1155	
ctc ctg gtg cac ggc cca acc	tca gag aca gag caa	gcc acc tct	3519
Leu Leu Val His Gly Pro Thr	Ser Glu Thr Glu Gln	Ala Thr Ser	
1160	1165	1170	
gtg ctc ctg get gat ccc tgc	ttc cag ctt cgt tcc	ata tgc tat	3564
Val Leu Leu Ala Asp Pro Cys	Phe Gln Leu Arg Ser	Ile Cys Tyr	
1175	1180	1185	
ctc ctg ggg cag cca gag ccc	cta gca cct ggc act	acc ttg cct	3609
Leu Leu Gly Gln Pro Glu Pro	Leu Ala Pro Gly Thr	Thr Leu Pro	
1190	1195	1200	
gcc cct gac cgg aaa cgc ttc	tct cta cag agt tat	aca gat tat	3654
Ala Pro Asp Arg Lys Arg Phe	Ser Leu Gln Ser Tyr	Thr Asp Tyr	
1205	1210	1215	
atc agc gct gag gag ctg gcc	cag gtg gaa cag atg	ctg gct cac	3699
Ile Ser Ala Glu Glu Leu Ala	Gln Val Glu Gln Met	Leu Ala His	
1220	1225	1230	
ctg acc get gca tct gcc cag	gcg gcc gcc gcc tcc	ctg ccc acc	3744
Leu Thr Ala Ala Ser Ala Gln	Ala Ala Ala Ala Ser	Leu Pro Thr	
1235	1240	1245	
aat gaa gag gac ctc tgc cca	atc tgc tac gcc cac	ccc atc tct	3789
Asn Glu Glu Asp Leu Cys Pro	Ile Cys Tyr Ala His	Pro Ile Ser	
1250	1255	1260	
get gtg ttc cag cct tgt ggt	cac aaa tcc tgc aaa	gcc tgc atc	3834
Ala Val Phe Gln Pro Cys Gly	His Lys Ser Cys Lys	Ala Cys Ile	

1265

1270

1275

aac cag cac ctg atg aac aac aag gac tgc ttc ttc tgc aaa gcc 3879
 Asn Gln His Leu Met Asn Asn Lys Asp Cys Phe Phe Cys Lys Ala
 1280 1285 1290

acc att gta tct gta gag gac tgg gac aag gca gcc aac aca agc 3924
 Thr Ile Val Ser Val Glu Asp Trp Asp Lys Ala Ala Asn Thr Ser
 1295 1300 1305

gcc atg tcc tea gct gcc tag 3945
 Ala Met Ser Ser Ala Ala
 1310

<210> 4
 <211> 1314
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 4

Met Ala Ser Lys Gly Thr Gly Met Ser Phe Ser Arg Lys Ser Tyr Arg
 1 5 10 15

Leu Thr Ser Asp Ala Glu Lys Ser Arg Val Thr Gly Ile Val Gln Glu
 20 25 30

Lys Leu Leu Ser Asp Tyr Leu Tyr Arg Ile Phe Ser Pro Pro Asp Arg
 35 40 45

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

Pro Glu His Val Asp Gln Leu Leu Gln Val Asp Ser Glu Asp Asn Glu
 65 70 75 80

Phe Lys Glu Ser Val Ala Phe Asn Phe Gly Ser Arg Pro Leu Arg Tyr
 245 250 255

Pro Val Ala Gly Phe Arg Pro Leu Gln Asp Pro Pro Phe Ala Asp Leu
 260 265 270

Val Arg Ala Gln Arg Leu Leu Gly Cys Phe Gln Ala Val Leu Ser Val
 275 280 285

Glu Leu Asp Pro Val Glu Gly Arg Leu Val Glu Thr Glu Ser Ser Glu
 290 295 300

Trp Gln Leu Gln Gly Gln Pro Thr Val Leu Leu Thr Leu Ala His Ile
 305 310 315 320

Phe His His Phe Ala Pro Leu Leu Arg Lys Val Tyr Leu Val Glu Ala
 325 330 335

Val Leu Met Ser Phe Leu Leu Gly Val Val Glu Lys Gly Thr Pro Glu
 340 345 350

Gln Ala Gln Ser Val Val His Gln Ile Leu Asp Leu Leu Trp Leu Phe
 355 360 365

Met Glu Asp Tyr Glu Val Gln Asp Cys Leu Lys Gln Leu Met Met Ser
 370 375 380

Leu Leu Arg Leu Tyr Arg Phe Ser Pro Ile Val Pro Asp Leu Gly Leu
 385 390 395 400

Gln Ile His Tyr Leu Arg Leu Thr Met Ser Ile Leu Arg His Glu Lys
 405 410 415

Ser Arg Lys Phe Leu Leu Ser Asn Val Leu Phe Asp Met Leu Arg Ser
 420 425 430

Val Val Phe Phe Tyr Ile Lys Ser Pro Leu Arg Val Glu Glu Ala Gly
 435 440 445

Leu Lys Glu Leu Ile Pro Thr Thr Trp Trp Pro His Arg Ser Ser Arg
 450 455 460

Glu Ser Arg Asp Gly Lys Glu Ala Arg Glu Glu Thr Thr Glu Glu Arg
 465 470 475 480

Gln Arg Arg Arg Ala Tyr Glu Arg Gly Cys Gln Arg Leu Lys Lys Arg
 485 490 495

Ile Glu Val Val Glu Glu Leu Gln Val Gln Ile Leu Lys Leu Leu Leu
 500 505 510

Asp Asn Lys Asp Asp Asn Gly Gly Glu Ala Ser Arg Tyr Ile Phe Leu
 515 520 525

Thr Lys Phe Arg Lys Phe Leu Gln Glu Asn Ala Ser Gly Arg Gly Asn
 530 535 540

Thr Pro Val Leu Cys Pro Pro Glu Tyr Met Val Cys Phe Leu His Arg
 545 550 555 560

Leu Val Ser Ala Leu Arg Phe Tyr Trp Asp Glu Tyr Lys Ala Ser Asn
 565 570 575

Pro Arg Ala Ser Phe Ser Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Pro Gln Ile Phe
 580 585 590

Tyr Asn Gly Lys Val Asp Tyr Phe Asp Leu Gln Arg Leu Gly Gly Leu
 595 600 605

Leu Ser His Leu Arg Lys Thr Leu Lys Asp Asp Leu Ala Ser Lys Ala
 610 615 620

Asn Ile Val Ile Asp Pro Leu Glu Leu Gln Ala Ala Thr Met Asp Asp
 625 630 635 640

Leu Asp Glu Asp Glu Glu Pro Ala Pro Ser Ala Ala Gln Arg Pro Met
 645 650 655

Gln Ala Leu Ala Ile Gly Gly Ala Leu Pro Leu Pro Arg Pro Gly Trp
 660 665 670

Leu Ser Ser Pro Thr Leu Gly Arg Ala Asn Arg Phe Leu Ser Thr Ala
 675 680 685

Ala Val Ser Leu Met Thr Pro Arg Arg Leu Leu Ser Thr Met Glu Lys
 690 695 700

Val Lys Val Arg Ser Leu Asn Val Glu Gln Arg Thr Arg Glu Asp Ile
 705 710 715 720

Glu Gly Ser His Trp Asn Glu Gly Leu Leu Leu Gly Arg Pro Pro Glu
 725 730 735

Glu Pro Glu Gln Pro Leu Thr Glu Asn Ser Leu Leu Glu Val Leu Asp
 740 745 750

Gly Thr Val Met Met Tyr Asn Leu Ser Val His Gln Gln Leu Gly Lys
 755 760 765

Met Val Gly Val Ser Asp Asp Val Asn Glu Tyr Ala Met Ala Leu Arg
 770 775 780

Asp Thr Glu Asp Lys Leu Arg Arg Cys Pro Lys Arg Arg Lys Asp Ile
 785 790 795 800

Leu Ala Glu Leu Thr Lys Ser Gln Lys Val Phe Ser Glu Lys Leu Asp
 805 810 815

His Leu Ser Arg Arg Leu Ala Trp Val His Ala Thr Val Tyr Ser Gln
 820 825 830

Glu Lys Met Leu Asp Ile Tyr Trp Leu Leu Arg Val Cys Leu Arg Thr
 835 840 845

Ile Glu His Gly Asp Arg Thr Gly Ser Leu Phe Ala Phe Met Pro Glu
 850 855 860

Phe Tyr Leu Ser Val Ala Ile Asn Ser Tyr Ser Ala Leu Lys Asn Tyr
 865 870 875 880

Phe Gly Pro Val His Ser Met Glu Glu Leu Pro Gly Tyr Glu Glu Thr
 885 890 895

Leu Thr Arg Leu Ala Ala Ile Leu Ala Lys His Phe Ala Asp Pro Arg
 900 905 910

Ile Val Gly Thr Asp Ile Arg Asp Ser Leu Met Gln Ala Leu Ala Ser
 915 920 925

Tyr Val Cys Tyr Pro His Ser Leu Arg Ala Val Glu Arg Ile Pro Glu
 930 935 940

Glu Gln Arg Ile Ala Met Val Arg Asn Leu Leu Ala Pro Tyr Glu Gln
 945 950 955 960

Arg Pro Trp Ala Gln Thr Asn Trp Ile Leu Val Arg Leu Trp Arg Gly
 965 970 975

Cys Gly Phe Gly Tyr Arg Tyr Thr Arg Leu Pro His Leu Leu Lys Thr
 980 985 990

Lys Pro Glu Asp Ala Asn Leu Pro Ser Leu Gln Lys Pro Cys Pro Ser
 995 1000 1005

Thr Leu Leu Gln Gln His Met Ala Asp Leu Leu Arg Gln Gly Ser
 1010 1015 1020

Asp Val Ala Pro Ser Phe Leu Asn Ser Val Leu Asn Gln Leu Asn
 1025 1030 1035

Trp Ala Phe Ser Glu Phe Ile Gly Met Ile Gln Glu Ile Gln Gln
 1040 1045 1050

Ala Ala Glu Arg Leu Glu Arg Asn Phe Val Asp Ser Arg Gln Leu
 1055 1060 1065

Lys Val Cys Ala Thr Cys Phe Asp Leu Ser Val Ser Leu Leu Arg
 1070 1075 1080

Val Leu Glu Met Thr Ile Thr Leu Val Pro Glu Ile Phe Leu Asp
 1085 1090 1095

Trp Ser Arg Pro Thr Ser Glu Met Leu Leu Arg Arg Leu Ala Gln
 1100 1105 1110

Leu Leu Asn Gln Val Leu Asn Arg Val Thr Ala Glu Arg Asn Leu
 1115 1120 1125

Phe Asp Arg Val Val Thr Leu Arg Leu Pro Gly Leu Glu Ser Val
 1130 1135 1140

Asp His Tyr Pro Ile Leu Val Ala Val Thr Gly Ile Leu Val Arg
 1145 1150 1155

Leu Leu Val His Gly Pro Thr Ser Glu Thr Glu Gln Ala Thr Ser
 1160 1165 1170

Val Leu Leu Ala Asp Pro Cys Phe Gln Leu Arg Ser Ile Cys Tyr
 1175 1180 1185

Leu Leu Gly Gln Pro Glu Pro Leu Ala Pro Gly Thr Thr Leu Pro
 1190 1195 1200

Ala Pro Asp Arg Lys Arg Phe Ser Leu Gln Ser Tyr Thr Asp Tyr
 1205 1210 1215

Ile Ser Ala Glu Glu Leu Ala Gln Val Glu Gln Met Leu Ala His
 1220 1225 1230

Leu Thr Ala Ala Ser Ala Gln Ala Ala Ala Ala Ser Leu Pro Thr
 1235 1240 1245

Asn Glu Glu Asp Leu Cys Pro Ile Cys Tyr Ala His Pro Ile Ser
 1250 1255 1260

Ala Val Phe Gln Pro Cys Gly His Lys Ser Cys Lys Ala Cys Ile
 1265 1270 1275

Asn Gln His Leu Met Asn Asn Lys Asp Cys Phe Phe Cys Lys Ala
 1280 1285 1290

Thr Ile Val Ser Val Glu Asp Trp Asp Lys Ala Ala Asn Thr Ser
 1295 1300 1305

Ala Met Ser Ser Ala Ala
 1310

<210> 5

<211> 1218

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1218)

<400> 5

atg ttc gtg cag gag gag aag atc ttc gcg ggc aag gtg ctg cgg ctg 48
 Met Phe Val Gln Glu Glu Lys Ile Phe Ala Gly Lys Val Leu Arg Leu
 1 5 10 15

cac atc tgc gcg tcc gac ggc gcc gag tgg ctg gag gag gcc acc gag 96
 His Ile Cys Ala Ser Asp Gly Ala Glu Trp Leu Glu Glu Ala Thr Glu
 20 25 30

gac acc tcg gtg gag aag ctc aag gag cgc tgc ctc aag cac tgt gct 144
 Asp Thr Ser Val Glu Lys Leu Lys Glu Arg Cys Leu Lys His Cys Ala
 35 40 45

cat ggg agc tta gaa gat ccc aaa agt ata acc cat cat aaa tta atc 192
 His Gly Ser Leu Glu Asp Pro Lys Ser Ile Thr His His Lys Leu Ile
 50 55 60

cac gct gcc tca gag agg gtg ctg agt gat gcc agg acc atc ctg gaa 240
 His Ala Ala Ser Glu Arg Val Leu Ser Asp Ala Arg Thr Ile Leu Glu
 65 70 75 80

gag aac atc cag gac caa gat gtc cta tta ttg ata aaa aag cgt gct 288
 Glu Asn Ile Gln Asp Gln Asp Val Leu Leu Leu Ile Lys Lys Arg Ala
 85 90 95

cca tca cca ctt ccc aag atg gct gat gtc tca gca gaa gaa aag aaa 336
 Pro Ser Pro Leu Pro Lys Met Ala Asp Val Ser Ala Glu Glu Lys Lys
 100 105 110

aaa caa gac cag aaa gct cca gat aaa gag gcc ata ctg cgg gcc acc 384
 Lys Gln Asp Gln Lys Ala Pro Asp Lys Glu Ala Ile Leu Arg Ala Thr
 115 120 125

gcc aac ctg ccc tcc tac aac atg gac cgg gcc gcg gtc cag acc aac	432
Ala Asn Leu Pro Ser Tyr Asn Met Asp Arg Ala Ala Val Gln Thr Asn	
130 135 140	
atg aga gac ttc cag aca gaa ctc cgg aag ata ctg gtg tct ctc atc	480
Met Arg Asp Phe Gln Thr Glu Leu Arg Lys Ile Leu Val Ser Leu Ile	
145 150 155 160	
gag gtg gcg cag aag ctg tta gcg ctg aac cca gat gca gtg gaa ttg	528
Glu Val Ala Gln Lys Leu Leu Ala Leu Asn Pro Asp Ala Val Glu Leu	
165 170 175	
ttt aag aag gcg aat gca atg ctg gac gag gac gag gat gag cgt gtg	576
Phe Lys Lys Ala Asn Ala Met Leu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Arg Val	
180 185 190	
gac gag get gcc ctg cgg cag ctc acg gag atg ggc ttt ccg gag aac	624
Asp Glu Ala Ala Leu Arg Gln Leu Thr Glu Met Gly Phe Pro Glu Asn	
195 200 205	
aga gcc acc aag gcc ctt cag ctg aac cac atg tcg gtg cct cag gcc	672
Arg Ala Thr Lys Ala Leu Gln Leu Asn His Met Ser Val Pro Gln Ala	
210 215 220	
atg gag tgg cta att gaa cac gca gaa gac ccg acc ata gac acg cct	720
Met Glu Trp Leu Ile Glu His Ala Glu Asp Pro Thr Ile Asp Thr Pro	
225 230 235 240	
ctt cct ggc caa gct ccc cca gag gcc gag ggg gcc aca gca get gcc	768
Leu Pro Gly Gln Ala Pro Pro Glu Ala Glu Gly Ala Thr Ala Ala Ala	
245 250 255	
tcc gag gct gcc gcg gga gcc agc gcc acc gat gag gag gcc aga gat	816
Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ala Ser Ala Thr Asp Glu Glu Ala Arg Asp	
260 265 270	
gag ctg acg gaa atc ttc aag aag atc cgg agg aaa agg gag ttt cgg	864
Glu Leu Thr Glu Ile Phe Lys Lys Ile Arg Arg Lys Arg Glu Phe Arg	
275 280 285	

get gat get cgg gcc gtc att tcc ctg atg gag atg ggg ttc gac gag 912
 Ala Asp Ala Arg Ala Val Ile Ser Leu Met Glu Met Gly Phe Asp Glu
 290 295 300

aaa gag gtg ata gat gcc ctc aga gtg aac aac aac cag cag aat gcc 960
 Lys Glu Val Ile Asp Ala Leu Arg Val Asn Asn Asn Gln Gln Asn Ala
 305 310 315 320

gcg tgc gag tgg ctg ctg ggg gac cgg aag ccc tct ccg gag gag ctg 1008
 Ala Cys Glu Trp Leu Leu Gly Asp Arg Lys Pro Ser Pro Glu Glu Leu
 325 330 335

gac aag ggc atc gac ccc gac agt cct ctc ttt cag gcc atc ctg gat 1056
 Asp Lys Gly Ile Asp Pro Asp Ser Pro Leu Phe Gln Ala Ile Leu Asp
 340 345 350

aac ccg gtg gtg cag ctg ggc ctg acc aac ccg aaa aca ttg cta gca 1104
 Asn Pro Val Val Gln Leu Gly Leu Thr Asn Pro Lys Thr Leu Leu Ala
 355 360 365

ttt gaa gac atg ctg gag aac cca ctg aac agc acc cag tgg atg aat 1152
 Phe Glu Asp Met Leu Glu Asn Pro Leu Asn Ser Thr Gln Trp Met Asn
 370 375 380

gat cca gaa acg ggg cct gtc atg ctg cag atc tct aga atc ttc cag 1200
 Asp Pro Glu Thr Gly Pro Val Met Leu Gln Ile Ser Arg Ile Phe Gln
 385 390 395 400

aca cta aat cgc acg tag 1218
 Thr Leu Asn Arg Thr
 405

<210> 6

<211> 405

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Phe Val Gln Glu Glu Lys Ile Phe Ala Gly Lys Val Leu Arg Leu
 1 5 10 15

His Ile Cys Ala Ser Asp Gly Ala Glu Trp Leu Glu Glu Ala Thr Glu
 20 25 30

Asp Thr Ser Val Glu Lys Leu Lys Glu Arg Cys Leu Lys His Cys Ala
 35 40 45

His Gly Ser Leu Glu Asp Pro Lys Ser Ile Thr His His Lys Leu Ile
 50 55 60

His Ala Ala Ser Glu Arg Val Leu Ser Asp Ala Arg Thr Ile Leu Glu
 65 70 75 80

Glu Asn Ile Gln Asp Gln Asp Val Leu Leu Leu Ile Lys Lys Arg Ala
 85 90 95

Pro Ser Pro Leu Pro Lys Met Ala Asp Val Ser Ala Glu Glu Lys Lys
 100 105 110

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

Ala Asn Leu Pro Ser Tyr Asn Met Asp Arg Ala Ala Val Gln Thr Asn
 130 135 140

Met Arg Asp Phe Gln Thr Glu Leu Arg Lys Ile Leu Val Ser Leu Ile
 145 150 155 160

Glu Val Ala Gln Lys Leu Leu Ala Leu Asn Pro Asp Ala Val Glu Leu
 165 170 175

Phe Lys Lys Ala Asn Ala Met Leu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Arg Val
 180 185 190

Asp Glu Ala Ala Leu Arg Gln Leu Thr Glu Met Gly Phe Pro Glu Asn
 195 200 205

Arg Ala Thr Lys Ala Leu Gln Leu Asn His Met Ser Val Pro Gln Ala
 210 215 220

Met Glu Trp Leu Ile Glu His Ala Glu Asp Pro Thr Ile Asp Thr Pro
 225 230 235 240

Leu Pro Gly Gln Ala Pro Pro Glu Ala Glu Gly Ala Thr Ala Ala Ala
 245 250 255

Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ala Ser Ala Thr Asp Glu Glu Ala Arg Asp
 260 265 270

Glu Leu Thr Glu Ile Phe Lys Lys Ile Arg Arg Lys Arg Glu Phe Arg
 275 280 285

Ala Asp Ala Arg Ala Val Ile Ser Leu Met Glu Met Gly Phe Asp Glu
 290 295 300

Lys Glu Val Ile Asp Ala Leu Arg Val Asn Asn Asn Gln Gln Asn Ala
 305 310 315 320

Ala Cys Glu Trp Leu Leu Gly Asp Arg Lys Pro Ser Pro Glu Glu Leu
 325 330 335

Asp Lys Gly Ile Asp Pro Asp Ser Pro Leu Phe Gln Ala Ile Leu Asp
 340 345 350

Asn Pro Val Val Gln Leu Gly Leu Thr Asn Pro Lys Thr Leu Leu Ala
 355 360 365

Phe Glu Asp Met Leu Glu Asn Pro Leu Asn Ser Thr Gln Trp Met Asn
 370 375 380

Asp Pro Glu Thr Gly Pro Val Met Leu Gln Ile Ser Arg Ile Phe Gln
 385 390 395 400

Thr Leu Asn Arg Thr
 405

<210> 7
 <211> 1230
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1230)

<400> 7
 atg ttc gtg cag gag gag aag atc ttc gcg ggc aag gtg ctt cgg ctg 48
 Met Phe Val Gln Glu Glu Lys Ile Phe Ala Gly Lys Val Leu Arg Leu
 1 5 10 15

cac atc tgc gca gcc gac gcc gag tgg ctg gag gag gcg acc gag 96
 His Ile Cys Ala Ala Asp Gly Ala Glu Trp Leu Glu Glu Ala Thr Glu

20	25	30	
gac aca tcg gtg gag aag ctc aag gag agt tgc ctc aaa cat ggt gct			144
Asp Thr Ser Val Glu Lys Leu Lys Glu Ser Cys Leu Lys His Gly Ala			
35	40	45	
cat ggg agc cta gaa gac ccc aag aat gtg acc cac cac aag cta ata			192
His Gly Ser Leu Glu Asp Pro Lys Asn Val Thr His His Lys Leu Ile			
50	55	60	
cat gct gct tca gag agg gtg ctg agt gac agc aaa acg atc ttg gaa			240
His Ala Ala Ser Glu Arg Val Leu Ser Asp Ser Lys Thr Ile Leu Glu			
65	70	75	80
gaa aac atc cag gac caa gac gtc ttg tta ttg ata aaa aag cgt gtt			288
Glu Asn Ile Gln Asp Gln Asp Val Leu Leu Leu Ile Lys Lys Arg Val			
85	90	95	
cct tct cca ctc cct aag atg gct gac gtc tca gca gaa gaa aag aag			336
Pro Ser Pro Leu Pro Lys Met Ala Asp Val Ser Ala Glu Glu Lys Lys			
100	105	110	
aaa caa gag caa aag gct cca gac aaa gat gct att ett cga gca acg			384
Lys Gln Glu Gln Lys Ala Pro Asp Lys Asp Ala Ile Leu Arg Ala Thr			
115	120	125	
gca aac ctg cct gcc tgc agc act gac egg act gct gtc cag acc acc			432
Ala Asn Leu Pro Ala Cys Ser Thr Asp Arg Thr Ala Val Gln Thr Thr			
130	135	140	
atg aga gac ttc cag aca gaa ctc egg aag atc ctc gtg tct ctc att			480
Met Arg Asp Phe Gln Thr Glu Leu Arg Lys Ile Leu Val Ser Leu Ile			
145	150	155	160
gag gtg gca cag aag ctg tta gca ctg aat ccc gat gca gtt gaa ttg			528
Glu Val Ala Gln Lys Leu Leu Ala Leu Asn Pro Asp Ala Val Glu Leu			
165	170	175	
ttt aag aag gca aat gct atg ctg gat gaa gat gag gat gag cga gtg			576
Phe Lys Lys Ala Asn Ala Met Leu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Arg Val			

180	185	190	
gat gag act gcc ttg cgg cag ctc aca gag atg ggc ttt cct gag agc			624
Asp Glu Thr Ala Leu Arg Gln Leu Thr Glu Met Gly Phe Pro Glu Ser			
195	200	205	
aga gcc tca aag gcc ctt cgg ctg aac cac atg tca gtg cct cag gcc			672
Arg Ala Ser Lys Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Val Pro Gln Ala			
210	215	220	
atg gag tgg cta att gaa cac tca gaa gat cca gct att gac aca cct			720
Met Glu Trp Leu Ile Glu His Ser Glu Asp Pro Ala Ile Asp Thr Pro			
225	230	235	240
ctt cca ggc cat gct gct caa gca ggg gcc agt gct gca gcc act acc			768
Leu Pro Gly His Ala Ala Gln Ala Gly Ala Ser Ala Ala Ala Thr Thr			
245	250	255	
tcc tcc acc tcc tct gaa gct gct gtg gga act agt gtt gaa gat gag			816
Ser Ser Thr Ser Ser Glu Ala Ala Val Gly Thr Ser Val Glu Asp Glu			
260	265	270	
gag tcc cgg gat gag ctc aca gaa atc ttc aag aag ata cgc agg aaa			864
Glu Ser Arg Asp Glu Leu Thr Glu Ile Phe Lys Lys Ile Arg Arg Lys			
275	280	285	
aag gaa ttt cga gca gat gct cgg gct gtc att tcg ctg atg gag atg			912
Lys Glu Phe Arg Ala Asp Ala Arg Ala Val Ile Ser Leu Met Glu Met			
290	295	300	
ggc ttt gac gag aag gaa gtg att gat gcc ctc cga gtg aac aac aac			960
Gly Phe Asp Glu Lys Glu Val Ile Asp Ala Leu Arg Val Asn Asn Asn			
305	310	315	320
cag cag aac gct gct tgt gaa tgg ctg ctg ggg gac cgg aag cca tcc			1008
Gln Gln Asn Ala Ala Cys Glu Trp Leu Leu Gly Asp Arg Lys Pro Ser			
325	330	335	
cct gag gaa ttg gac cag gcc atc gat ecc aat agc cct ctc ttt cag			1056
Pro Glu Glu Leu Asp Gln Gly Ile Asp Pro Asn Ser Pro Leu Phe Gln			

His Ala Ala Ser Glu Arg Val Leu Ser Asp Ser Lys Thr Ile Leu Glu
 65 70 75 80

Glu Asn Ile Gln Asp Gln Asp Val Leu Leu Leu Ile Lys Lys Arg Val
 85 90 95

Pro Ser Pro Leu Pro Lys Met Ala Asp Val Ser Ala Glu Glu Lys Lys
 100 105 110

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

Ala Asn Leu Pro Ala Cys Ser Thr Asp Arg Thr Ala Val Gln Thr Thr
 130 135 140

Met Arg Asp Phe Gln Thr Glu Leu Arg Lys Ile Leu Val Ser Leu Ile
 145 150 155 160

Glu Val Ala Gln Lys Leu Leu Ala Leu Asn Pro Asp Ala Val Glu Leu
 165 170 175

Phe Lys Lys Ala Asn Ala Met Leu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Arg Val
 180 185 190

Asp Glu Thr Ala Leu Arg Gln Leu Thr Glu Met Gly Phe Pro Glu Ser
 195 200 205

Arg Ala Ser Lys Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Val Pro Gln Ala
 210 215 220

Met Glu Trp Leu Ile Glu His Ser Glu Asp Pro Ala Ile Asp Thr Pro
 225 230 235 240

Leu Pro Gly His Ala Ala Gln Ala Gly Ala Ser Ala Ala Ala Thr Thr
 245 250 255

Ser Ser Thr Ser Ser Glu Ala Ala Val Gly Thr Ser Val Glu Asp Glu
 260 265 270

Glu Ser Arg Asp Glu Leu Thr Glu Ile Phe Lys Lys Ile Arg Arg Lys
 275 280 285

Lys Glu Phe Arg Ala Asp Ala Arg Ala Val Ile Ser Leu Met Glu Met
 290 295 300

Gly Phe Asp Glu Lys Glu Val Ile Asp Ala Leu Arg Val Asn Asn Asn
 305 310 315 320

Gln Gln Asn Ala Ala Cys Glu Trp Leu Leu Gly Asp Arg Lys Pro Ser
 325 330 335

Pro Glu Glu Leu Asp Gln Gly Ile Asp Pro Asn Ser Pro Leu Phe Gln
 340 345 350

Ala Ile Leu Asp Asn Pro Val Val Gln Leu Gly Leu Thr Asn Pro Lys
 355 360 365

Thr Leu Leu Ala Phe Glu Asp Met Leu Glu Asn Pro Leu Asn Ser Thr
 370 375 380

<400> 15

Arg Lys Asp Ile Leu Ala Glu Leu Thr Lys
1 5 10

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 16

Tyr Tyr Trp Asp Glu Tyr Lys
1 5

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 17

Arg Leu Ala Gln Leu Leu Asn Gln Val Leu Asn Arg
1 5 10

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 18

Asp Ser Leu Met Gln Ala Leu Ala Ser Tyr Val Cys Tyr Pro His Ser
1 5 10 15

Leu Arg

<210> 19
<211> 18
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 19

Gly Asn Met Pro Met Leu Cys Pro Pro Glu Tyr Met Val Cys Phe Leu
1 5 10 15

His Arg

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 20

Ile Leu Val Ser Leu Ile Glu Val Ala Gln Lys
1 5 10

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 21

Ala Pro Asp Arg Asp Ala Ile Phe Arg
1 5

<210> 22
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> His6/FLAG tag

<400> 22

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Asp Tyr
1 5 10 15

Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 20

<210> 23
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> His6/HSV tag

<400> 23

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Gln Pro
1 5 10 15

Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
 20 25

<210> 24
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer KPC2-H1

<400> 27

aaggtcacta gtatgcagcc tgaactcgct ccagaggate cggaagatat gttcgtgcag 60

gaggagaaga tc 72

<210> 28

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer KPC2-H2

<400> 28

ctggagctcg agctgtggcc tgatagcega gtcgaac 37

<210> 29

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer KPC1-H-1

<400> 29

aggtcagcta gcatggagta caaggatgac gacgataaga tggcatccaa gggggccggc 60

atgtc 65

<210> 30

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer KPC1-H-2

<400> 30

ctggagctcg agctcactgt ggccctgact gaaagtc

37

<210> 31

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer KPC1-H-3

<400> 31

ctgggactcg agtcaactgg tgggcagga ggcag

35

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer KPC2-H-3

<400> 32

aaggttgat ccatgttcgt gcaggaggag

30

<210> 33

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer KPC2-H-4

<223> PCR primer KPC2-H-4

<400> 33

aggatcctcg agctatgcgt aatcaggac atcatatggg tacgtgcgat ttagtgtctg 60

g 61

<210> 34

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> KPC1 siRNA sense strand

<400> 34

gaugaccuug cuuccaaagc cuu 23

<210> 35

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> KPC1 siRNA antisense strand

<400> 35

ggcuuuggaa gcaaggucac cuu 23

<210> 36

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequence X for KPC1 siRNA

<400> 36
gaugaccuug cuuccaaagc c 21

<210> 37
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA inserted in KPC1 siRNA expression vector

<400> 37
gatgacctg cttccaaagc cttcaagaga ggctttggaa gcaaggatcat cttttt 56

<210> 38
<211> 53
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> KPC1 shRNA

<400> 38
gaugaccuug cuuccaaagc cuucaagaga ggcuuuggaa gcaaggucac cuu 53

<210> 39
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA inserted in EGFP siRNA expression vector

<400> 39
gctgaccctg aagttcatct gttcaagaga cagatgaact tcagggtcag cttttt 56

【図面の簡単な説明】

第1図 第1図は、ウサギ網状赤血球抽出液からのKPCの精製プロトコルを示す。
第2図 第2図の上段は、Superose 6ゲルろ過カラムで得られた各フラクションの、インビトロ再構成系によるp27^{KIP1}をユビキチン化する活性の測定を示す。
左のp27、p27-(GST-Ub)1、p27-(GST-Ub)2、p27-(G

ST - Ub) 3、p 27 - (GST - Ub) nはそれぞれ、p 27^{Kip1}、GST - Ubが1個付加したp 27^{Kip1}、GST - Ubが2個付加したp 27^{Kip1}、GST - Ubが3個付加したp 27^{Kip1}、GST - Ubが3個以上付加したp 27^{Kip1}のSDS - PAGE上の位置を示す(以下の図面でも同様)。フラクションの上に、分子量マーカーがゲルを過で溶出されるフラクションの位置を示す。下段は、同じフラクションを、SDS - PAGE後、クマシー染色した結果を示す。左に分子量マーカーの位置、右にKPC1およびKPC2の位置を示す。

第3図 第3図は、第2図と同様に、上段は、ミニQカラムで得られた各フラクションの、インビトロ再構成系によるp 27^{Kip1}をユビキチン化する活性の測定を、下段は同じフラクションを、SDS - PAGE後、クマシー染色した結果を示す。左に分子量マーカーの位置、右にKPC1およびKPC2の位置を示す。

第4図 第4図は、ウサギ網状赤血球抽出液から精製したKPCをSDS - PAGE後、クマシー染色した結果を示す。左に分子量マーカーの位置、右にKPC1およびKPC2の位置および、それぞれから得られた部分ペプチドのアミノ酸配列を1文字表記で示す。

第5図 第5図aはKPC1およびKPC2の構造を示す。SPRAYはSPRAYドメインを、RINGはRINGフィンガードメインを、UBLはユビキチン様(ubiquitin-like)ドメインを、またUBAはユビキチン結合(ubiquitin-associated)ドメインをそれぞれ示している。第5図bは、ヒトKPC1のアミノ酸配列を示す。精製サンプルのペプチド解析から得られた配列と一致する部分を下線で、SPRAYドメイン、RINGフィンガードメインをそれぞれ白黒反転および枠囲みで示し、RINGフィンガードメイン中の垂鉛結合部位と予測される配列に*を記す。

第6図 第6図は、昆虫細胞で発現させ、精製した組換えKPC1 - KPC2複合体をSDS - PAGE後、クマシー染色した結果を示す。左に分子量マーカーの位置、右に発現させたHis6 / FLAGタグ付加KPC1およびHis6 / HSVタグ付加KPC2の位置を示す。

第7図 第7図は、昆虫細胞で発現させたKPC1およびKPC1(R)とKPC2の細胞内での会合を免疫沈降により解析した結果を示す。WTは野生型KPC1、RはKPC1(R)を、+はKPC2をそれぞれ発現させたこと、-は発現させなかったことを示す。左は、細胞抽出液のSDS - PAGE、右は抗FLAG抗体(KPC1およびKPC1(R)と結合)による免疫沈降物についてそれぞれ、上段は抗FLAG抗体、下段は抗HSV抗体(KPC2と結合)によるイムノプロット解析を示す。

第8図 第8図は、昆虫細胞で発現させたKPC1 - KPC2複合体とp 27^{Kip1}のインビトロでの結合を免疫沈降により解析した結果を示す。+は添加、-は非添加を示す。左は、KPC1 - KPC2複合体とp 27^{Kip1}の混合物のSDS - PAGE、右は抗p 27^{Kip1}抗体による免疫沈降物についてそれぞれ、上段は抗FLAG抗体(KPC1と結合)、中段は抗HSV抗体(KPC2と結合)、下段は抗p 27^{Kip1}抗体によるイムノプロット解析を示す。

第9図 第9図は、昆虫細胞で発現させたKPC1 - KPC2複合体のp 27^{Kip1}およびリン酸化Sic1(Sic1 - P)をユビキチン化する活性を測定した結果を示す。+はインビトロ再構成系の各成分、KPC1 - KPC2複合体、SCF^{Cdc4}(図中でSCF^{Cdc4}と表記)の添加、-は非添加を示す。左はp 27^{Kip1}を基質とした場合、右はSic1 - Pを基質として添加し、それぞれ抗p 27^{Kip1}抗体、抗HPC4抗体(Sic1 - Pと結合)によりイムノプロット解析した場合を示す。Sic1 - P、Sic1 - P - (GST - Ub)1、Sic1 - P - (GST - Ub)nはそれぞれ、Sic1 - P、GST - Ubが1個付加したSic1 - P、GST - Ubが2個以上付加したSic1 - PのSDS - PAGE上の位置を示す。

第10図 第10図は、昆虫細胞で発現させたKPC1、KPC1(R)、KPC1 - KPC2複合体、KPC1(R) - KPC2複合体のp 27^{Kip1}をユビキチン化する活性を測定した結果を示す。WTは野生型KPC1、RはKPC1(R)を、+はKPC2をそれぞれ発現させたこと、-は発現させなかったことを示す。反応の+はイン

10

20

30

40

50

ビトロ再構成系の反応を行った場合、- はインビトロ再構成系の構成成分を添加せず反応を行わなかったことを示す。

第11図 第11図は、E2として各レーンの上に示す種々の蛋白質を用いたときに、KPC1-KPC2複合体がp27^{Kip1}をユビキチン化する活性を測定した結果を示す。(-)は、E2を添加しなかった場合の結果を示す。

第12図 第12図は、KPC1-KPC2複合体の、p27^{Kip1}およびp27^{Kip1}^{P1}のリン酸化部位変異体(S10A、T187A、S10E、T187E)をユビキチン化する活性を測定した結果を示す。反応の+はインビトロ再構成系の反応を行った場合、- はインビトロ再構成系の構成成分を添加せず反応を行わなかったことを示す。

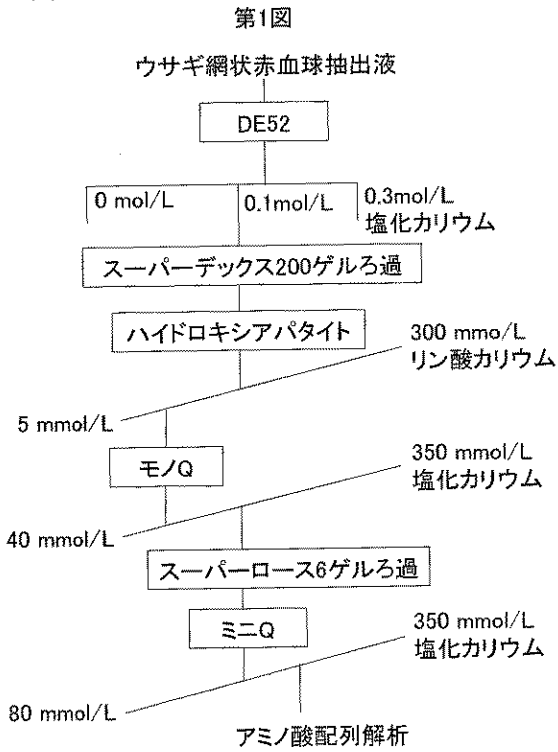
第13図 第13図は、KPC1-KPC2複合体、KPC1(R)-KPC2複合体を高発現させた細胞におけるp27^{Kip1}の分解を解析した結果を示す。第13図aはLeptomycin B非存在下、第13図bはLeptomycin B存在下で蛋白質の核外移行を阻害した場合を示す。左はSDS-PAGEによる解析で上段は抗p27^{Kip1}抗体、下段は抗GSK-3抗体によるイムノプロットを示す。右は、p27^{Kip1}の量の経時的な分解を表すグラフで、横軸は時間、縦軸は0時間を100%としたときの残存するp27^{Kip1}の量(%)を示し、 \square はKPC1-KPC2複合体、 \triangle はKPC1(R)-KPC2複合体をそれぞれ発現させた細胞、 \circ はコントロールのベクターのみを導入した細胞での結果を示す。KPC1(WT)-KPC2はKPC1-KPC2複合体、KPC1(R)-KPC2はKPC1(R)-KPC2複合体をそれぞれ発現させた細胞、コントロールはコントロールのベクターのみを導入した細胞を表す。

第14図 第14図は、RNAiによるKPC1の発現の抑制とp27^{Kip1}の分解を解析した結果を示す。上段は、KPC1 siRNA発現ベクターを導入した細胞におけるKPC1およびKPC2の発現の解析を示す。左は抗KPC1抗体、右は抗KPC2抗体によるイムノプロットを示し、KPC1はKPC1 siRNA発現ベクターを導入した細胞、EGFPは、コントロールのEGFP siRNA発現ベクターを導入した細胞における解析を示す。下段は、KPC1 siRNA発現ベクターを導入した細胞におけるp27^{Kip1}の経時的な分解の解析を示す。上の2つの段は抗p27^{Kip1}抗体、下の2つの段は抗GSK-3抗体を用いたイムノプロットを示し、RNAi:KPC1はKPC1 siRNA発現ベクターを導入した細胞、RNAi:EGFPは、コントロールのEGFP siRNA発現ベクターを導入した細胞における解析を示す。

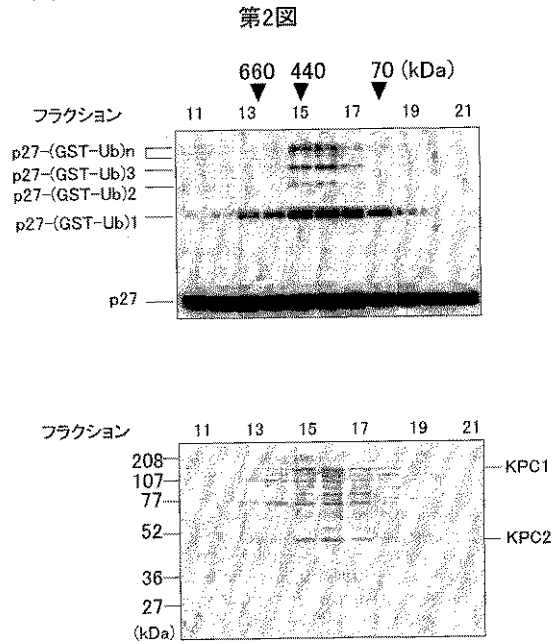
第15図 第15図は、RNAiによりKPC1の発現を抑制した細胞の、各種蛋白質の量を経時的に解析した結果を示す。上から2段ずつそれぞれ、抗p27^{Kip1}抗体、抗サイクリンA抗体、抗GSK-3抗体、抗KPC1抗体、抗KPC2抗体を用いたイムノプロットによる、レーンの上に示す各時間における蛋白質量の解析を示す。KPC1はKPC1 siRNA発現ベクターを導入した細胞、EGFPは、コントロールのEGFP siRNA発現ベクターを導入した細胞における解析を示す。

第16図 第16図は、RNAiによりKPC1の発現を抑制した細胞の、細胞増殖を示すグラフで、横軸は時間(h)、縦軸は細胞数を示す。 \square はKPC1 siRNA発現ベクターを導入した細胞、 \triangle は、コントロールのEGFP siRNA発現ベクターを導入した細胞における細胞数を示す。

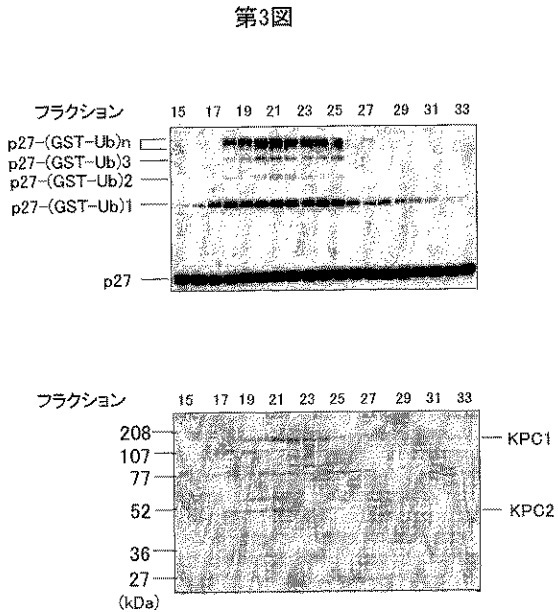
【 図 1 】



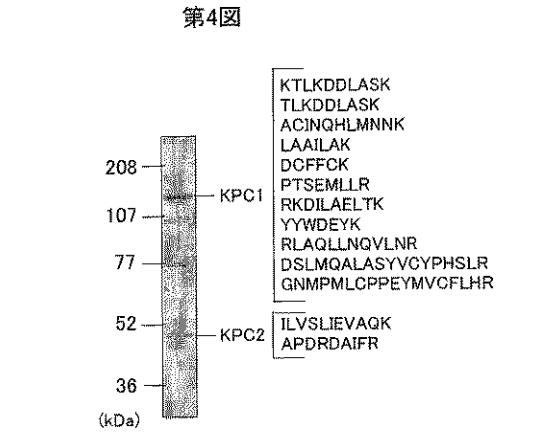
【 図 2 】



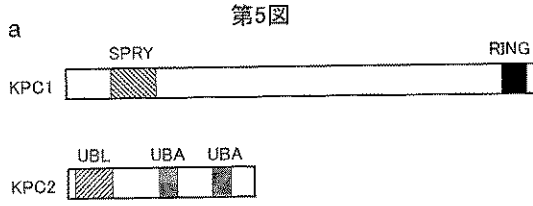
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



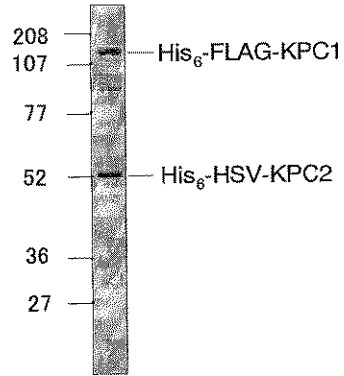
b

```

1  M A S K G A G M S F S R K S Y R L T S D A E K S R V T G I V Q E K L L N D Y L N R I F S S S E H A P
51  P A A T S R K P L N F Q N L P E H L D Q L L Q V D N E E E S Q G Q V E G R L G P S T V V L D H T G
101  G F E G L L L V D D D L L G V I G H S N F G T I R S T T C V Y K G K W L Y E V L I S S Q G L N Q I G
151  W C T I S C R F N Q E E G V G D T H N S Y A Y D G N R V R K W N V T T N Y G K A W A A G D I V S C
201  L I D L D D G T L S F C L N G V S L G T A F E N L S R G L G M A Y P P A I S L S F E S V A F N F G
251  S R P L R Y P V A G Y R P L Q D P P S A D L V R A Q R L L G C F R A V L S V E L D P V E G R L L D K
301  E S S K W R L R G Q P T V L L T L A H I F H H F A P L L R K V Y L V E A V L M S F L L G I V E K G T
351  P T Q A Q S V V H Q V L D L L W F M E D Y E V Q D C L K Q L M M S L L L Y R F S P I V P D L G L
401  Q I H Y L R L T I A I L R H E K S R K F L L S N V L F D V L R S V V F Y I K S P L R V E E A G L Q
451  E L I P T T W W P H C S S R E G K E S T E M K E T A E E R L R R A Y E R G C Q R L E R I E V V
501  E E L Q V Q I L K L L D N K D D N G G E A S R Y I P L T K F R K F L Q E N A S G F G N M P M L C P
551  P E Y M V C F L H R L I S A L R Y Y W D E Y K A S N P H A S F S E E A Y I P P Q V F Y W G K V D Y F
601  D L Q R L G C L L S H L R K Y L K D D L A S K A N I V I D P L E L Q S T A M D D L D E D E F P A P A
651  M A Q R P M Q A L A V G G P L P L P R P G N L S S P T L G R A N R F L S T A A V S L M T P R P L S
701  T S E K V K V R T L S V E Q T R E D I E G S H W N E G L L G R P P E E P Q P L T E N S L L E V
751  L D G A V M M Y N L S V H Q L G M V G V S D D V N E Y A M A L R D T E D K L E R C P E R E K D I
801  L A E L T S Q K V F S E K L D H L S R L L A W H A T V V S Q E K M L D I Y W L R V C L E T I E
851  H G D R T G S L F A F M P E F Y L S V A I N S Y S A L K N Y F G P V H S M R E L P G Y E T L T R L
901  A A I L A R H F A D A R I V G T D I R D S L M Q A L A S Y C Y P H S L R A V E R I P E E Q R I A M
951  V R N L L A P Y E Q R P W A Q T N W I L V R L W R G C G F G Y R T R P H L L K T K L E D A N L P
1001  S L Q K C P C S T L L Q Q H M A D L L Q Q G P D V A P S F L N S V L N Q L N W A F S E F I G M I Q E
1051  I Q Q A A E R L E R N F V D S R Q L K V C A T C F D L S V S L L R V L E M T I T L V P E I F L D W T
1101  R P T S E M L L R L A Q L L N Q V L N R V T A B R N L F D R V V T L E L P G L E S V D H Y P I L V
1151  A V T G I L V Q L L V R G P A S E R E Q A T S V L L A D P C F Q R S I C Y L L G Q P E P P A P G T
1201  A L P A P D E K R F S L Q S Y A D Y I S A D E L A Q V E G M L A H L T S A S A Q A A A S L P T S E
1251  E D L C P I C Y A H P I S A V F Q P C G H K S C K A C I N Q H L M N N K D C F F C K T T I V S V E D
1301  W E K G A N T S T T S S A A
  
```

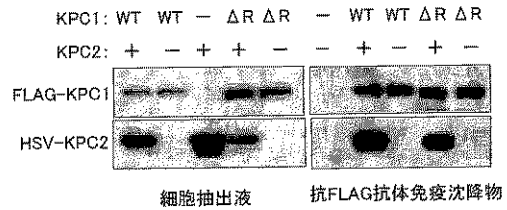
【 図 6 】

第6図



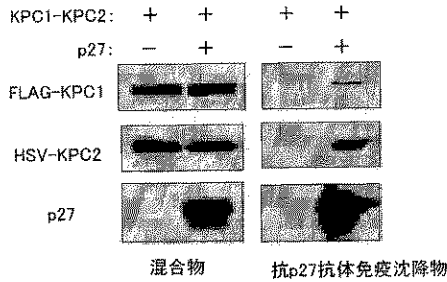
【 図 7 】

第7図



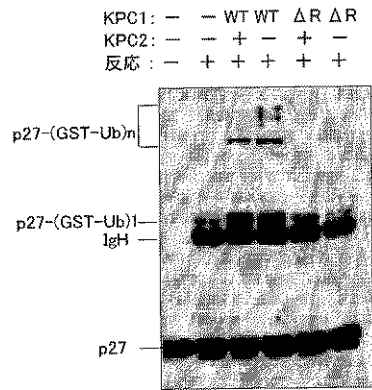
【 図 8 】

第8図



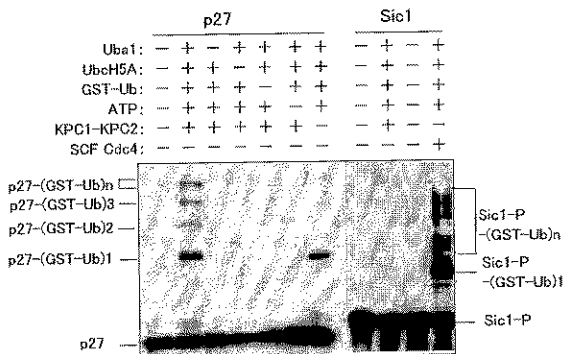
【 図 10 】

第10図



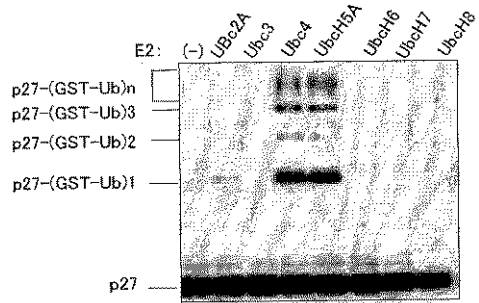
【 図 9 】

第9図

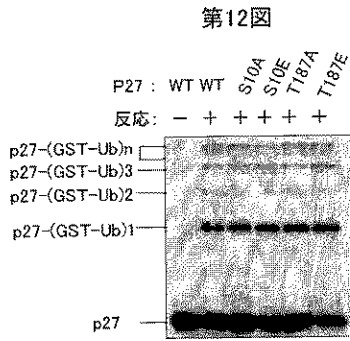


【 図 11 】

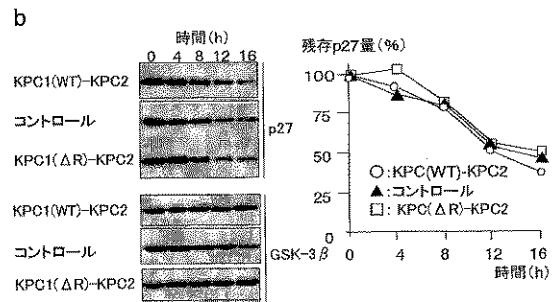
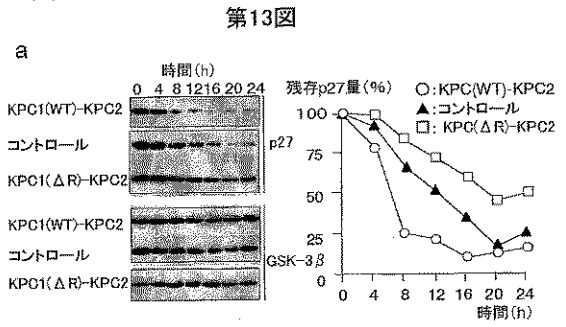
第11図



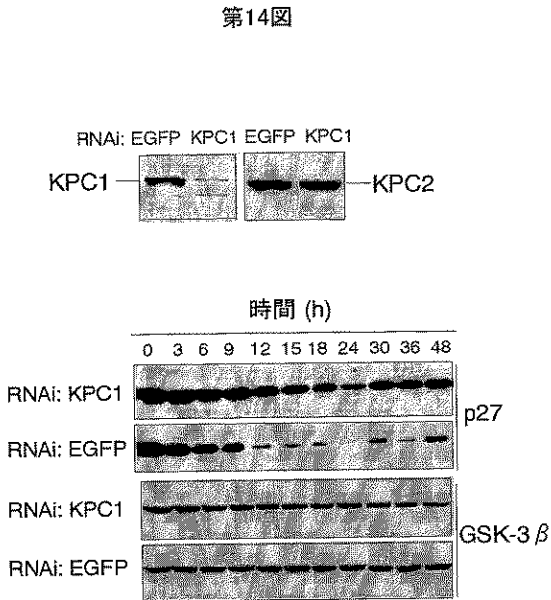
【 図 1 2 】



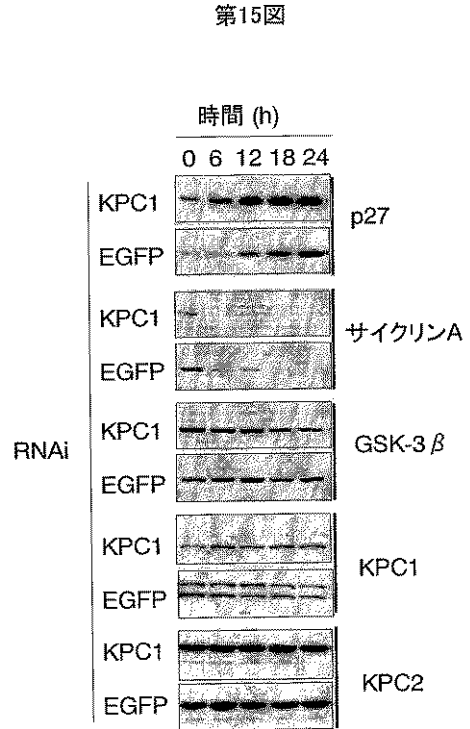
【 図 1 3 】



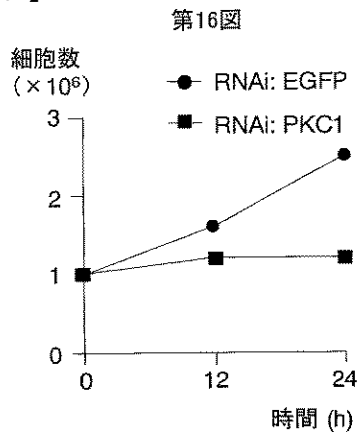
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06749

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/60, 9/88, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q1/527, C07K16/40, A01K67/027, A61K31/7088, A61K38/17, 39/395, 45/00, 48/00, A61P35/00, 43/00, G01N33/50, 33/15, 33/566 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC										
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N15/60, 9/88, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q1/527, C07K16/40, A01K67/027, A61K31/7088, A61K38/17, 39/395, 45/00, 48/00, A61P35/00, 43/00, G01N33/50, 33/15, 33/566 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY (STN), WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), PubMed, EMBL/Genbank/DBBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq										
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT										
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>Li C., et al., Identification of a Glioblastoma Cell differentiation Factor-Related Gene mRNA in Human Microvascular Endothelial Cells. Genomics May 2000, Vol.65, No.3, pages 243 to 252; Fig. 3</td> <td>12-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 99/33981 A2 (Incyte Pharmaceuticals, Inc.), 08 July, 1999 (08.07.99), pages 93 to 94 & EP 1044266 A2 & AU 2095299 A & JP 2002-500009 A & CA 2315617 A</td> <td>12-14</td> </tr> </tbody> </table>	Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	Li C., et al., Identification of a Glioblastoma Cell differentiation Factor-Related Gene mRNA in Human Microvascular Endothelial Cells. Genomics May 2000, Vol.65, No.3, pages 243 to 252; Fig. 3	12-14	X	WO 99/33981 A2 (Incyte Pharmaceuticals, Inc.), 08 July, 1999 (08.07.99), pages 93 to 94 & EP 1044266 A2 & AU 2095299 A & JP 2002-500009 A & CA 2315617 A	12-14	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.								
X	Li C., et al., Identification of a Glioblastoma Cell differentiation Factor-Related Gene mRNA in Human Microvascular Endothelial Cells. Genomics May 2000, Vol.65, No.3, pages 243 to 252; Fig. 3	12-14								
X	WO 99/33981 A2 (Incyte Pharmaceuticals, Inc.), 08 July, 1999 (08.07.99), pages 93 to 94 & EP 1044266 A2 & AU 2095299 A & JP 2002-500009 A & CA 2315617 A	12-14								
<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 but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family									
Date of the actual completion of the international search 25 June, 2003 (25.06.03)	Date of mailing of the international search report 08 July, 2003 (08.07.03)									
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06749

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Strausberg RL, et al., Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequence., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, December 2002, Vol.99, pages 16899 to 16903 & GenBank database Accession No.BC021811	12-14
X	WO 00/55320 A1 (Human Genome Sciences, Inc.), 21 September, 2000 (21.09.00), pages 638 to 639 & EP 1159420 A2 & AU 3619500 A & US 2002/44941 A1	12-14
X	WO 01/32927 A1 (Incyte Genomics, Inc.), 10 May, 2001 (10.05.01), page 161 & EP 1159420 A2 & AU 3619500 A & US 2002/44941 A1	12-14
A	Hara T., et al., Degradation of p27 ^{Kip1} at the G ₀ -G ₁ transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. J.Biol.Chem., December, 2001, Vol.276, No.52, pages 48937 to 48943	1-17,19-20, 22-47,49-53
A	Malek NP, et al., A mouse Knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27 ^{Kip1} in G ₁ and S phase. Nature September 2001, Vol.413, pages 323 to 327	1-17,19-20, 22-47,49-53
A	Schulman BA, et al., Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. Nature November 2000, Vol.408, pages 381 to 386	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06749

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 18, 21, 48
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in claims 18, 21, 48 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and diagnostic methods, under the provision of Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO3/06749
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/60, 9/88, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q1/527, C07K16/40, A01K67/027, A61K31/7088, A61K38/17, 39/395, 45/00, 48/00, A61P35/00, 43/00, G01N33/50, 33/15, 33/566		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/60, 9/88, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q1/527, C07K16/40, A01K67/027, A61K31/7088, A61K38/17, 39/395, 45/00, 48/00, A61P35/00, 43/00, G01N33/50, 33/15, 33/566		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA/REGISTRY (STN), WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), PubMed, EMBL/Genbank/DBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Li C, et al. Identification of a Glialblastoma Cell Differentiation Factor-Related Gene mRNA in Human Microvascular Endothelial Cells. Genomics May 2000, Vol.65, No.3, p.243-252, Fig.3	12-14
x	WO 99/33981 A2 (Incyte Pharmaceuticals, Inc.) 1999.07.08 p.93-94 & EP 1044266 A2 & AU 2095299 A & JP 2002-500009 A & CA 2315617 A	12-14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー		
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」 の日後に公表された文献 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
国際調査を完了した日	25.06.03	国際調査報告の発送日 08.07.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 北村 弘樹	4B 9349
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO3/06749
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Strausberg RL, et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA December 2002, Vol.99, p.16899-16903 & GenBank database Accession No. BC021811	12-14
X	WO 00/55320 A1 (Human Genome Sciences, Inc.) 2000.09.21 p.638-639 & EP 1159420 A2 & AU 3619500 A & US 2002/44941 A1	12-14
X	WO 01/32927 A1 (Incyte Genomics, Inc.) 2001.05.10 p.161 & EP 1159420 A2 & AU 3619500 A & US 2002/44941 A1	12-14
A	Hara T, et al. Degradation of p27 ^{Kip1} at the G ₀ -G ₁ transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. J. Biol. Chem. December 2001, Vol.276, No.52, p.48937-48943	1-17, 19-20, 22-47, 49-53
A	Malek NP, et al. A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27 ^{Kip1} in G1 and S phase. Nature September 2001, Vol.413, p.323-327	1-17, 19-20, 22-47, 49-53
A	Schulman BA, et al. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. Nature November 2000, Vol.408, p.381-386	1

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/06749

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 18, 21, 48 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 18, 21, 48 に記載されている発明は、PCT 規則 39.1(iv) の「人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法」に該当する。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式 PCT/ISA/210 (第 1 ページの続葉 (1)) (1998 年 7 月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 9/10	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 13/08	A 6 1 P 9/10 1 0 1
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 13/08
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 29/00 1 0 1
C 0 7 K 16/40	A 6 1 P 35/00
C 1 2 N 1/15	A 6 1 P 37/06
C 1 2 N 1/19	C 0 7 K 16/40
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 9/00	C 1 2 N 1/21
C 1 2 Q 1/25	C 1 2 N 9/00
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/25
G 0 1 N 33/15	C 1 2 Q 1/68 A
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15 Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50 Z
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53 D
	G 0 1 N 33/566
	C 1 2 N 5/00 A

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

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JPWO2003100064A5	公开(公告)日	2006-07-13
申请号	JP2004508302	申请日	2003-05-29
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社		
[标]发明人	中山敬一 嘉村巧		
发明人	中山 敬一 嘉村 巧		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K39/395 A61K48/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/00 C12Q1/25 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12N5/10		
CPC分类号	A61K31/7088 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00 C12N9/93 C12Q1/25 G01N33/57496 G01N2333/9015 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P37/06 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/00 C12Q1/25 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N5/00.A		
优先权	2002156257 2002-05-29 JP		
其他公开文献	JPWO2003100064A1		

摘要(译)

根据本发明，具有泛素化p27Kip1的活性的新型蛋白质，编码该蛋白质的DNA，该蛋白质的制造方法，使用该蛋白质抑制p27 Kip1 的泛素化的方法，要解决的问题：提供一种筛选方法，一种与蛋白质特异性结合的抗体，以及一种由异常细胞周期引起的疾病（例如癌症）的诊断剂和治疗剂，其中含有多核苷酸，寡核苷酸或衍生自DNA的抗体。有待完成。