(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3920573号

(P3920573)

(45)発行日　平成19年5月30日(2007.5.30)　(24)登録日　平成19年2月23日(2007.2.23)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	A

請求項の数 16　(全 32 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000-581051 (P2000-581051)
(86)(22)出願日　平成11年11月4日 (1999.11.4)
(65)公表番号　特表2002-530056 (P2002-530056A)
(43)公表日　平成14年9月17日 (2002.9.17)
(86)国際出願番号　PCT/US1999/026205
(87)国際公開番号　WO2000/027874
(87)国際公開日　平成12年5月18日 (2000.5.18)
審査請求日　平成13年3月22日 (2001.3.22)
(31)優先権主張番号　60/107,502
(32)優先日　平成10年11月6日 (1998.11.6)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　09/358,755
(32)優先日　平成11年7月22日 (1999.7.22)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(73)特許権者　398062149
セダーズ－シナイ　メディカル　センター
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９００４８　ロサンゼルス　ビバリー　ブールバード　８７００　ＴＢＳ　２９０
(74)代理人　100064908
弁理士　志賀　正武
(74)代理人　100108578
弁理士　高橋　詔男
(74)代理人　100089037
弁理士　渡邊　隆
(74)代理人　100101465
弁理士　青山　正和
(74)代理人　100094400
弁理士　鈴木　三義

最終頁に続く

(54)【発明の名称】トランスフェリン受容体様蛋白質をコードする核酸、及びその関連産物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

（ａ）配列番号：１のアミノ酸配列；

（ｂ）配列番号：２の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列；および

（ｃ）配列番号：３の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列

からなる群から選択される配列を有するポリペプチドをコードする核酸を含む単離された核酸分子であって、

トランスフェリンレセプターを欠失する細胞を当該核酸分子で形質転換し、当該細胞を栄養培地中の５μｇ／ｍｌのトランスフェリンと氷上で３０分間インキュベーションすると、前記ポリペプチドとトランスフェリンとの間に結合を生じる核酸分子。

【請求項２】

請求項１記載の単離された核酸分子に相補的な核酸分子と厳密条件下でハイブリダイズし、かつＴｆＲ２活性を有するポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

【請求項３】

請求項１または２に記載の単離された核酸分子を具備する組換え発現ベクター。

【請求項４】

原核細胞または真核細胞である、請求項３記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項５】

機能的ＴｆＲ２蛋白質を発現する、請求項４記載の宿主細胞。

【請求項６】

請求項１または２に記載の単離された核酸分子に相補的である単離されたｍＲＮＡ。
【請求項７】
ＲＮＡ転写のプロモーターに作動的に連結された、請求項１または２に記載の単離された核酸分子を具備するオリゴヌクレオチド組成物。
【請求項８】
（ａ）配列番号：１のアミノ酸配列；
（ｂ）配列番号：２の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列；および
（ｃ）配列番号：３の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列
からなる群から選択される配列を有する単離されたＴｆＲ２ポリペプチド。
【請求項９】
請求項２記載の単離された核酸分子のいずれか一つにコードされる単離されたＴｆＲ２ポリペプチド。
【請求項１０】
ＴｆＲポリペプチドのアミノ酸配列と比較して異なるいずれかの配列部位において、配列番号：１記載のアミノ酸配列により表されるＴｆＲ２ポリペプチドに特異的に結合する抗体。
【請求項１１】
モノクローナル抗体である、請求項１０記載の抗体。
【請求項１２】
ポリクローナル抗体である、請求項１０記載の抗体。
【請求項１３】
ＴｆＲ２蛋白質の機能を阻害するため、またはＴｆＲ２蛋白質と他の蛋白質若しくはリガンドとの相互作用を阻害するために十分な量の、請求項１０記載の抗体を具備する組成物。
【請求項１４】
（ａ）請求項１０に記載の抗体を準備する工程、
（ｂ）細胞のＴｆＲ２蛋白質に抗体が結合することを許容する条件下で、細胞を抗体に接触させる工程、
（ｃ）前記の細胞に結合した抗体を検出する工程、
を具備する、細胞表面上のＴｆＲ２蛋白質の存在を検出する方法。
【請求項１５】
前記の抗体が、検出可能なマーカーで標識されている、請求項１４記載の方法。
【請求項１６】
前記の検出可能なマーカーが、放射性ヌクレオチド、酵素、蛍光素、発色団、及び化学発光標識からなる群より選択される、請求項１５記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、概してトランスフェリン受容体様ファミリーに関し、特にはトランスフェリン受容体様蛋白質をコードする核酸、及びその関連産物に関する。
本発明は、（米国）国立保険研究所（National Institute of Health）の助成金番号CA 26038-20の補助を受けてなされたものである。
本出願は、１９９８年１１月６日に出願された仮出願番号60/107,502の利益を権利請求するものであり、この仮出願の内容を参照することにより本願に組み込む。
【０００２】
【従来の技術】
本願を通じて、種々の文献を括弧付けで引用する。これらの刊行物の開示事項はその全てを参照することにより本願に組み込み、本発明が関係する技術水準をより完全に記載する。これらの参考文献の完全な文献目録は、この出願書類の後半部にある。また、略語は以下の通りである：ＴｆＲ、トランスフェリン受容体；ＲＴ－ＰＣＲ、逆転写酵素－ＰＣＲ

；Ｔｆ、トランスフェリン；ＰＳＭＡ、前立腺特異的膜抗原；ＲＡＣＥ、ｃＤＮＡ末端の迅速増幅；Ｇ３ＰＤＨ、グリセルアルデヒド-３-リン酸デヒドロゲナーゼ；ＵＴＲ、非翻訳領域；ＩＲＥ、鉄－応答性エレメント；ＩＲＰ、鉄制御蛋白質。

【０００３】

トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）は、細胞による鉄の取り込みに関与する重要な分子である（１、２）。細胞膜上では、このＴｆＲホモ二量体が二つのジ第二鉄トランスフェリン（diferric transferrin）（Ｔｆ）分子に結合して、当該複合体の内部移行が生じる。細胞質内では、鉄は種々の蛋白質（ヘム、アコニターゼ、チトクローム（３）、及びリボ核酸還元酵素（４）を含む）により放出されて補助因子をして利用されされるか、又はフェリチン分子内に保存されることもある。分裂する細胞では、分裂していない細胞以上の鉄が必要であるので、ＴｆＲの発現は、迅速に分裂している細胞内では通常は高く（５）、例えば造血前駆細胞においてはそうである（６）。またＴｆＲの発現は、その正常な細胞対応物と比較すると腫瘍細胞内では高くなっている（７）。ジ第二鉄Ｔｆの、ＴｆＲに対する親和性は、ＨＦＥにより調節される（８、９）。

【０００４】

ＴｆＲの他の相同物で唯一あるものは、ＰＳＭＡであるが、これはマウスＮＡＡＧ－ペプチダーゼのヒトの相同物である（１０、１１）。前立腺癌においてはＰＳＭＡの発現は高いので、ＰＳＭＡに対する抗体が、前立腺癌の転移を検出するための映像化剤（imaging agent）として使用するために認可されている（１２）。ＰＳＭＡの機能は、ＴｆＲのものとは顕著に異なっていることが分かっているが、これはそれらの細胞外ドメインの間で類似性が中程度であることに反する。ＰＳＭＡは、エンドサイトーシスを仲介せず、また、グルタミル－カルボキシペプチダーゼ活性を有する（１１、１３）。

【０００５】

【発明が解決しようとする課題】

細胞の鉄の取り込みプロセスにおけるトランスフェリン受容体の重要性に鑑み、トランスフェリン受容体に対して相同性を有し、トランスフェリン受容体様機能を発揮する潜在的な分子を同定することが望まれる。当該分子の同定により、特定の細胞における鉄の取り込みを変化させるのに有用なツールが提供されるかもしれない。更に、同定された新規の受容体を使用して、他の金属、又は細胞の生命維持に必要な種々のキーとなる蛋白質とともに活性を有する新規のリガンドを同定することもできるかもしれない。更には、ＴｆＲの発現は腫瘍細胞においては高いので、新規に同定された受容体を使用して腫瘍細胞の診断又は治療を行うことができるかもしれない。

本発明の目的は、潜在的なトランスフェリン受容体様蛋白質を同定することである。更に、新規に発見された受容体の、細胞での鉄の代謝における役割を調査することもまた本発明の目的である。

【０００６】

【課題を解決するための手段】

従って本発明は、新規のトランスフェリン受容体様（ＴｆＲ２）ポリペプチドをコードする単離された核酸、又はその断片、及びこれらによりコードされた単離されたＴｆＲ２ポリペプチドを提供する。更に、本発明の核酸を含むベクター、これで形質転換した宿主細胞、それに対してアンチセンスなオリゴヌクレオチド、及び本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を含む組成物も提供される。細胞においてＴｆＲ２を検出する方法も提供される。

本発明は、その完全な範囲を特許請求の範囲に定義しており、また、以下の好ましい態様において記載されている。

【０００７】

【発明の実施の形態】

本発明に関し、上記の及びその他の特徴、並びにそれらを得る方法は、以下の記載を、添付の図面とともに参照することにより明快になるであろうし、また、最もよく理解されるであろう。これらの図面は、本発明の典型的な態様を描画するだけであり、従って、その

範囲を限定するものではない。これらは以下のように、特異性と詳細さを与えるためのものである。
本発明は、トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）に相同性のヒトの遺伝子の発見及びそのクローニングに基づいている。本発明の目的のため、この遺伝子はＴｆＲ２遺伝子と呼ぶ。ＴｆＲ２遺伝子は、クローニングされ、配列決定され、そして染色体７ｑ２２にマッピングされている。この遺伝子から発現される二つの転写産物が同定されたが、それらはα転写産物（約２．９ｋｂ）及びβ（約２．５ｋｂ）転写産物である。それぞれの転写産物の推定のアミノ酸配列は、ＴｆＲ２蛋白質が膜結合型及び細胞内型の両方の形態で発現する可能性を予測している。ＴｆＲ２－α蛋白質のこの推定のアミノ酸配列は、ＩＩ型の膜蛋白質であり、ＴｆＲと４５％の相同性を有し、その細胞外ドメインとは６６％の相同性を有している。ＴｆＲ２－β蛋白質は、推定の経膜ドメインが含まれているＴｆＲ２－αのアミノ末端蛋白質を欠失している。ＦＬＡＧタグ付ＴｆＲ２－αでＴｆＲ欠失細胞を形質転換すると、ビオチン化トランスフェリン（Ｔｆ）の細胞表面への結合が増大することが示された。更に、これらの形質転換した細胞では、Ｔｆ－結合型の^{55}Ｆｅの取り込みが顕著に増大した。

【０００８】
従って本発明は、ＴｆＲ２ポリペプチドをコードする単離された核酸を提供する。このような核酸は、例えばヒトの染色体７ｑ２２より得ることができる。この染色体領域の欠失又はヘテロ接合性の喪失が、複数の悪性疾患においては報告されているが、これらには脊髄形成異常症（myelodisplastic syndromes）、急性骨髄性白血病、並びに、乳癌、卵巣癌、すい臓癌が含まれる。この核酸はまた、ヒトのｃＤＮＡライブラリー、例えばＨＬ６０　ｃＤＮＡライブラリーやＴＦ－１　ｃＤＮＡライブラリーから得ることができるが、これらには限定されない。

【０００９】
「核酸」という用語（ポリヌクレオチドとも呼ばれる）は、デオキシリボ核酸又はリボ核酸であって、より大きい構築物の独立の断片又はその成分の形態をとるものを意味する。本発明のポリペプチドをコードするＤＮＡは、組換え転写ユニット中において発現することが可能な合成遺伝子を提供する、オリゴヌクレオチド又はｃＤＮＡ断片より組み立てることができる。本発明のポリヌクレオチド配列には、ＤＮＡ、ＲＮＡ、及びｃＤＮＡの配列が含まれる。本発明の一の態様によれば、核酸は配列番号：１（図１２を参照）に定義されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。本発明の別の態様によれば、核酸は、配列番号：２又は配列番号：３（それぞれ、図１３及び１４）に定義されるヌクレオチドと実質的に同じヌクレオチドを有する核酸を含むが、これには限定されない。好ましい態様によれば、本発明の核酸には、配列番号：２又は３に定義されるのと同じヌクレオチド配列が含まれる。本願では「実質的に同じヌクレオチド」という語句は、参照用のポリヌクレオチドとの十分な相同性を有し、それが当該参照用ヌクレオチドに典型的な中程度の厳密度条件下でハイブリダイズするＤＮＡを意味する。参照用のヌクレオチド配列と「実質的に同じヌクレオチド配列」を有するＤＮＡは、当該参照用ヌクレオチドの配列と少なくとも６０％の相同性を有する。

【００１０】
本願では、「単離された」という語句は、天然には生じない形態にある核酸を意味する。本発明のＤＮＡの配列は、複数の方法により得ることができる。例えばＤＮＡは、当該技術分野で周知のハイブリダイゼーション法により単離することができる。これらには１）ゲノム又はｃＤＮＡのライブラリーをプローブとハイブリダイズして、相同性のヌクレオチド配列を検出するもの、２）興味あるＤＮＡ配列にアニーリングすることができるプライマーを使用して、ゲノムＤＮＡ又はｃＤＮＡについてＰＣＲを行うもの、そして３）発現ライブラリーの抗体スクリーニングを行って、共通の構造的特徴を有する、クローニングされたＤＮＡ断片を検出するものが含まれるが、これらには限定されない。

【００１１】
好ましくは本発明のポリヌクレオチドは、ほ乳類の生物に由来し、最も好ましくはマウス

、ラット、又はヒトに由来する。核酸のハイブリダイゼーションに依存するスクリーニング方法により、どのような生物からのどのような遺伝子配列も単離することが可能になるが、これは適切なプローブが入手可能であることを前提にする。オリゴヌクレオチドプローブは、問題としている蛋白質をコードする配列の一部に対応するものであるが、これは化学的に合成することができる。これには、アミノ酸配列の短いオリゴペプチド部分が既知である必要がある。蛋白質をコードするＤＮＡ配列は、遺伝コードより推定することができるが、このコードの縮退性を考慮に入れる必要がある。配列が縮退している場合には、混合型の添加反応を行うことができる。これには、変性した二本鎖ＤＮＡの不均一な混合物が含まれる。このようなスクリーニングの場合には、ハイブリダイゼーションは好ましくは一本鎖ＤＮＡ又は変性済の二本鎖ＤＮＡ上で行われる。ハイブリダイゼーションは、興味あるポリペプチドに関係するｍＲＮＡ配列の量が極めて少なくしか存在していない供給源に由来するｃＤＮＡを検出するのに特に有益である。言い換えれば、非特異的な結合を避けるために、厳密なハイブリダイゼーション条件を使用することにより、例えば標的ＤＮＡをその完全な相補性にある、混合物中の単一プローブにハイブリダイゼーションさせることによって、特定のｃＤＮＡをオートラジオグラフィーで視覚化させることができる（Wallace et al., Nucl. Acid Res., 9:879, 1981）。

【００１２】

本発明の特定のＤＮＡ配列はまた、１）ゲノムＤＮＡから二本鎖ＤＮＡ配列を単離すること、２）化学的にＤＮＡ配列を製造して、興味あるポリペプチドの必要なコドンを提供すること、そして３）真核ドナー細胞から単離したｍＲＮＡの逆転写により二本鎖ＤＮＡ配列をin vitroで合成すること、により得ることもできる。最後の場合、二本鎖ＤＮＡ配列は真核ドナー細胞から単離されたｍＲＮＡの逆転写によるものであり、一般にはｃＤＮＡと呼ばれる、ｍＲＮＡの二本鎖ＤＮＡ相補鎖が、結果的に形成される。組換えにおいて使用する特定のＤＮＡ配列を開発するための上記の３つの方法のうち、ゲノムＤＮＡの単離物を単離するものは最も稀である。これはイントロンの存在のために、ほ乳類のポリペプチドを細菌的に発現することが望ましい場合にはそのとおりである。ＤＮＡ配列を合成することは、所望のポリペプチド産物のアミノ酸配列の全配列が既知である場合には頻繁にとられる方法である。所望のポリペプチドのアミノ酸配列の全配列がわからない場合には、ＤＮＡ配列を直接的に合成することは可能ではなく、ｃＤＮＡ配列を合成する方法をとらざるを得ない。興味あるｃＤＮＡ配列を単離するための標準的な方法の中には、ｍＲＮＡの逆転写に由来するｃＤＮＡライブラリーを有するプラスミド又はファージを形成するものがあるが、ここで、そのｍＲＮＡは遺伝的発現が高レベルにあるドナー細胞内で豊富に存在している。ＰＣＲ法と組み合わせて使用する場合、稀な発現産物までもがクローニングされる。ポリペプチドのアミノ酸配列のかなりの部分が既知であるものの場合、一本鎖の形態に変性しておいたｃＤＮＡのクローン化コピー上で行われるＤＮＡ／ＤＮＡハイブリダイゼーション法においては、標的ｃＤＮＡ中に存在することが推定される配列を複製する、標識化された一本鎖又は二本鎖ＤＮＡプローブ又はＲＮＡプローブを使用することができる（Jay, et al., Nucl. Acid. Res., 11:2325, 1983）。

【００１３】

ＴｆＲ２ポリペプチドをコードするＤＮＡ配列は、in vitroで適切な宿主細胞へＤＮＡ転移して発現することができる。「宿主細胞」は、その中でベクターが増殖してそのＤＮＡが発現される細胞である。この用語にはまた、対象の宿主細胞のいずれの子孫もが含まれる。全ての子孫は、親の細胞には同一でないかもしれないと理解されているが、これは複製中に変異が生じる可能性があるためである。しかしながら、「宿主細胞」の用語が使用される場合、このような子孫も含まれる。安定な転移の方法は、外来性ＤＮＡが連続的に宿主内で維持されることを意味するが、これは当該技術分野では既知である。

【００１４】

本発明においては、ポリヌクレオチド配列は、組換え発現ベクター中に挿入することができる。「組換え発現ベクター」という用語は、プラスミド、ウイルスや、当該技術分野で既知の他のビヒクルであって、ＴｆＲ２遺伝子配列の編入物（incorporation）の挿入に

より操作しておいたものを意味する。このような発現ベクターには、宿主に挿入された遺伝子配列の効果的な転写を容易にするプロモーター配列が含まれている。発現ベクターは典型的には、複製起点、プロモーターや、形質転換細胞の表現系選択を可能にする特定の遺伝子を含んでいる。本発明において使用するのに適するベクターには、Ｔ７ベースの細菌内発現用の発現ベクター（Rosenberg, et al., Gene, 56:125, 1987）、ほ乳類細胞内での発現用のｐＭＳＸＮＤ発現ベクター（Lee and Nathans, J. Biol. Chem., 263:3521, 1988）、及び昆虫細胞内での発現用のバキュロルイルス誘導ベクター、が含まれるがこれらには限定されない。ＤＮＡ断片は、制御配列、例えばプロモーター（Ｔ７プロモーター、メタルチオネインプロモーター、ポリヘドリンプロモーター等）に作動的に連結したベクター内に存在することができる。

【００１５】

ＴｆＲ２をコードするポリヌクレオチド配列は、原核細胞又は真核細胞の何れかで発現させることができる。宿主には、細菌、酵母、昆虫、ほ乳類、の生物を含めることができる。真核性、又はウイルス性の配列を有するＤＮＡを、原核細胞内で発現させる方法は、当該技術分野において周知である。生物学的に機能性のウイルスＤＮＡベクター又はプラスミドＤＮＡベクターであって、宿主において発現・複製することが可能なものが、当該技術分野において既知である。このようなベクターを使用して、本発明のＤＮＡ配列を組み込む。

【００１６】

宿主細胞を組換えＤＮＡで形質転換することは、当該技術分野において当業者らに周知の通常の方法により行うことができる。宿主が原核細胞、例えば大腸菌（E.coli）である場合、ＤＮＡ取り込みが可能なコンピテント細胞は、対数増殖期後に回収されて、引き続いて当該技術分野で周知の方法を使用して$CaCl_2$法で処理された細胞より調製することができる。或いは、$MgCl_2$又はＲＢＣｌを使用することができる。形質転換はまた、望まれる場合には、宿主細胞のプロトプラストを形成した後に行うこともできる。

【００１７】

宿主が真核細胞である場合、リン酸カルシウム共沈殿法や、ミクロインジェクション法等の通常の機械的方法、エレクトロポレーション法、リポソーム内に包まれたプラスミドの挿入や、ウイルスベクター等のＤＮＡの形質移入法を使用することができる。真核細胞はまた、本発明のＴｆＲ２のＤＮＡ配列、及び選択可能な表現系をコードする別の外来性ＤＮＡ分子（例えば単純ヘルペスのチミジンキナーゼ遺伝子）で共形質転換することもできる。別の方法では、例えばシミアンウイルス４０（ＳＶ４０）やウシパピローマウイルス等の真核ウイルスベクターを使用して、真核細胞を一過的に、感染又は形質転換して、当該蛋白質を発現させている（例えば、Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed. 1982）。

本発明により提供される、細菌で発現したポリペプチド又はその断片の単離及び精製は、分離用クロマトグラフィー、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を使用する免疫学的分離法を含む通常の方法により行うことができる。

【００１８】

本発明の別の態様は、単離されたＴｆＲ２ポリペプチド、又はその断片、及びその機能的等価物を提供する。本願では、「単離された」という用語は、蛋白質分子であって、細胞成分、及び／又はin vivo環境下での天然物には通常結合している汚染物を含まないもの、を意味する。本発明のポリペプチドには、単離された、天然の対立遺伝子変異体、並びにその組換え体のいずれのものも含まれる。

【００１９】

本発明のペプチドの主要なアミノ酸にマイナーな変化を生じさせることにより、本願の特定のペプチドと比較して実質的に同等の活性を有するペプチドが生じる。このような修飾は、部位特異的突然変異導入による意図的なものや、自発的なものとすることができる。また、この修飾は本発明のペプチドの長さに対して行うこともできる。当業者ならば、本発明のペプチドよりも長いか又は短いペプチドが、実質的に本発明のペプチドと同じ機能

を保持することが可能であることがわかる。これらの修飾により産生される全てのペプチドは、当該ペプチドの生物学的活性が失われていない限り、本願に含まれる。

【００２０】

本発明のポリペプチドは、当業者に周知の種々の方法を使用して単離することができる。本発明のポリペプチドの単離及び精製に用いられる方法には、沈殿、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、又は逆相及びアフィニティークロマトグラフィーが含まれる。他の周知の方法は、DuetscherらのGuide to Protein Purification: Methods in Enzymology, Vol. 182(Academic Press, (1990))に記載されているが、これを参照することにより本願に組み込む。或いは、本発明の単離されたポリペプチドは、例えば実施例に記載された周知の組換え法を使用して得ることもできる。

【００２１】

本発明のポリペプチドを調製する手段の例は、ＴｆＲ２をコードする核酸を、上記の適切な宿主細胞内で発現することである。本発明のポリペプチドは、予め発現ベクターで形質転換しておいた細胞より直接的に単離することができる。このポリペプチド、生物学的に活性な断片、及びその機能的等価物は、化学的合成によっても産生することができる。例えば、合成のポリペプチドは、Applied Biosystems社のモデル430A、又は431Aの自動ペプチド合成機（Forester City, CA） であって、製造者提供の化学を利用しているものにより製造することができる。

【００２２】

本願では、「ＴｆＲ２」とは、実質的に純粋な天然のＴｆＲ２蛋白質、又は組換え発現／産生された蛋白質を意味し、これにはｍＲＮＡによりコードされ、主要な転写産物のオルタナティブなスプライシングにより産生されるその変異体が含まれ、更にはその断片であって、天然の生物学的活性を保持しているものも含まれる。本発明の好ましいポリペプチドは、配列番号：１（図１２）に定義されるものと実質的に同じアミノ酸配列を有するものである。本発明の一の態様によれば、本発明の単離されたＴｆＲ２ポリペプチドは、少なくとも配列番号：２又は配列番号：３のヌクレオチド（それぞれ図１３、及び１４）によりコードされている。本発明の一の態様によれば、ＦＬＡＧのタグ付きＴｆＲ２－α蛋白質は、還元条件下で約１０５ｋＤａであり、非還元条件下では約２１５ｋＤａである。本発明のポリペプチドを使用して、トランスフェリン受容体のリガンドを単離することができる。

【００２３】

本発明の別の態様においては、本発明のペプチドに免疫反応又は結合する抗体が提供される。異なるエピトープ特異性を有する、プールされたモノクローナル抗体を必須としてなる抗体、並びに別個のモノクローナル抗体調製物が提供される。モノクローナル抗体は、抗原を含んだ本発明のペプチド又はその断片より、当該技術分野で周知の方法により調製される（Kohler et al., Nature, 256:495, 1975; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., ed., 1989）。

【００２４】

本発明のペプチド又は本発明のペプチドが提示するＴｆＲ２の領域に結合する抗体は、興味ある、ペプチドを含む断片又は無傷のポリペプチドを免疫用抗原として使用して調製することができる。動物を免疫するのに使用したポリペプチド又はペプチド、例えば配列番号：１のものは、翻訳されたｃＤＮＡ又は化学的な合成物に由来させることができ、必要であれば精製されてキャリア蛋白質に共役される。このような通常用いられるキャリアは化学的にペプチドにカップリングされるものであるが、これにはキーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）、サイログロブリン、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、及び破傷風トキソイドが含まれる。次いでカップリングされたペプチドを使用して、動物（例えばマウス、ラットやウサギ）を免疫する。

所望ならば、ポリクローナル抗体を更に精製するが、例えば抗体を生じさせたポリペプチド又はペプチドが結合したマトリックスに結合及び溶出させることにより行う。当業者ならば、モノクローナル抗体のみならず、ポリクローナル抗体の精製及び／又は濃縮につい

ての免疫学的技術において通常の種々の方法を知っているであろう（例えばColigan, et al., Unit 9, Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991,参照することにより本願に組み込む）。

【００２５】

本願で使用される「抗体」という用語には、無傷の分子並びにその断片、例えばＦａｂ、Ｆａｂ’$_2$、及びＦｖが含まれるが、これらはエピトープ性の決定基に結合することができるものである。これらの抗体断片には、対応する抗原又は受容体に選択的に結合する能力の一部が保持されているが、以下のように定義される：

（１）Ｆａｂは、抗体分子の一価の抗原結合性断片であるが、これは抗体全体をパパイン酵素で消化して無傷の軽鎖及び一の重鎖の一部を生じさせることにより調製することができる。

（２）Ｆａｂ’$_2$は、抗体分子の断片であるが、これは抗体全体をペプシン酵素で消化し、次に還元して無傷の軽鎖及び重鎖の一部を生じさせることにより調製することができる。抗体分子当たり、二つのＦａｂ’断片が得られる。

（３）Ｆａｂ’$_2$は、抗体の断片であって、抗体全体をその後に還元することなくペプシン酵素で消化することにより得ることができる。Ｆａｂ’$_2$は、ジスルフィド結合で保持された二つのＦａｂ’断片の二量体である。

（４）Ｆｖは、遺伝子工学的に調製された断片であって、二の鎖として発現された、重鎖の種々の領域及び軽鎖の種々の領域を含むものである。

（５）単一鎖抗体（ＳＣＡ）は、遺伝子工学的に調製された分子であって、軽鎖の種々の領域及び重鎖の種々の領域を含み、これらが適切なポリペプチドリンカーにより連結されて融合された単一鎖分子となるものである。

これらの断片を調製する方法は、当該技術分野において既知である（例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988)を参照されたし；これは参照することにより本願に組み込む）。

【００２６】

本願では、「決定基」という用語は、抗体のパラトープが結合する、いずれの抗原性決定基又は抗原をも意味する。エピトープ決定基は通常、化学的に活性な、分子の表面の基、例えばアミノ酸や糖の側鎖からなり、通常は特定の三次元構造、並びに特定の電化的特徴を有している。

抗－イディオタイプの技術を用いて、エピトープを模倣するモノクローナル抗体を調製することも可能である。例えば、一のモノクローナル抗体に対して調製された抗－イディオタイプモノクローナル抗体は、当該一のモノクローナル抗体が結合したエピトープの「彫像（イメージ）」である、超可変領域内の結合ドメインを有するであろう。したがって本発明においては、例えば配列番号：１の合成ペプチドに結合する抗体より調製された抗－イディオタイプ抗体は、細胞内の鉄の代謝に要求されるＴｆＲ２の部位に対する競合性阻害因子として作用することができる。

【００２７】

本発明の抗体を使用して、本発明のポリペプチドを単離することもできる。更に、この抗体は、本発明のポリペプチドの存在を検出するのに有益であり、また、染色体位置、並びに構造的及び機能的ドメインの分析にも有益である。

従って、本発明の別の態様は、細胞の表面にある本発明のポリペプチドの存在を検出するための方法を提供する。この方法は、ＴｆＲ２ポリペプチドに結合する抗体と細胞とを、当該抗体が当該ポリペプチドに結合するのを許容するような条件下で接触させ、当該細胞に結合した当該抗体の存在を検出し、これによって本発明のＴｆＲ２ポリペプチドが当該細胞表面に存在することを検出することを含むものである。このようなポリペプチドの検出については、この抗体をin vitroの診断又はin vitroの映像化方法に使用することができる。

【００２８】

試料中の標的ＴｆＲ２ポリペプチドをin vitroで検出するのに有益な免疫学的方法には、

検出可能な抗体を用いる免疫アッセイが含まれるが、この免疫アッセイには例えば、ＥＬＩＳＡ、パンデックスミクロ蛍光アッセイ（Pandex microfluorometry assay）、凝集化アッセイ、フローサイトメトリー、血清診断アッセイ、及び免疫組織染色法等の、当該技術分野で周知の方法がある。抗体は当該技術分野で周知の種々の方法により調製することができる。例えば、検出可能な標識を、抗体に直接的又は間接的に付着させることができるが、有益な標識には例えば、放射性ヌクレオチド、酵素、蛍光団、発色団、化学蛍光標識等が含まれる。

【００２９】

更に本発明の抗体を使用して、生きている動物、生きているヒト、又はこれらより単離された生物学的組織や液体におけるＴｆＲ２ポリペプチドの活性を調節することができる。従って、本発明はキャリア及びＴｆＲ２ポリペプチドに対する天然のリガンドの結合を阻害するのに十分な量の、ＴｆＲ２ポリペプチドへの特異性を有する抗体を含む組成物を提供する。

【００３０】

本発明の別の態様は、ＴｆＲ２ポリペプチドをコードするｍＲＮＡの何れかの部分に、当該ｍＲＮＡの翻訳を防止又は阻害するようにして特異的に結合して、ＴｆＲ２ポリペプチドのｍＲＮＡの翻訳を阻害することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＴｆＲ２ポリペプチドをコードするｃＤＮＡの何れかの配列部分に対して特異的に結合することができる配列を有していてもよい。本願では、「結合特異性」という語句には、核酸配列がその相補的塩基対間での水素結合を形成することにより、それと二重らせんの部分を形成する能力が包含される。アンチセンスオリゴヌクレオチドの例は、ヌクレオチドの化学的類縁体を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【００３１】

本発明によれば、細胞膜を通過し、ＴｆＲ２ポリペプチドをコードするｍＲＮＡに特異的に結合して翻訳を防止することにより、ＴｆＲ２ポリペプチドの発現を低減するのに有効な、上記のアンチセンスオリゴヌクレオチドの一定量と、許容される疎水性のキャリアであって、細胞膜を通過することができるものとを含む組成物が提供される。このアンチセンスオリゴヌクレオチドの組成物は、ＴｆＲ２ポリペプチドをコードするｍＲＮＡの翻訳を阻害するのに有益である。本発明の一の態様によれば、本発明のアンチセンスを含むキットであって、ＴｆＲ２ポリペプチドの発現を阻害するためのものもまた提供される。本発明の別の態様によれば、当該組成物を使用して、ＴｆＲ２ポリペプチドの発現レベルを調節することが可能である。

【００３２】

本発明はまた、許容されるキャリア、及び単離され、精製されたＴｆＲ２ポリペプチド、その活性断片、又は精製された、天然の蛋白質及びその活性断片の何れかを、単独で、又は組み合わせで含んだ組成物をも提供する。これらのポリペプチド又は蛋白質は、組換え由来のもの、化学的に合成されたもの、又は天然の供給源より精製されたものとすることができる。本願では、「許容されるキャリア」という用語は、標準的な薬学的キャリアのいずれをも包含するが、これにはリン酸緩衝済生理食塩水、水や、油／水型、又は水／油型のエマルジョン等のエマルジョン、そして種々のタイプの湿潤剤等がある。

【００３３】

【実施例】

（実験方法）

細胞株：ＨＬ－６０、ＫＧ－１、Ｕ９３７（骨髄性白血病）；ＴＦ－１、Ｋ５６２（赤白血病）；Ｊｕｒｋａｔ、Ｍｏｌｔ－４（Ｔ細胞白血病）；Ｒａｊｉ（バーキットリンパ腫）；ＬＮＣａＰ、ＰＣ－３（前立腺癌）；ＭＣＦ－７、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１（乳癌）；ＩＭＲ－３２（神経芽腫）；ＳＫ－Ｈｅｐ１（肝癌）；ＨｅｐＧ２（肝芽腫）；Ｕ－２ＯＳ（骨肉腫）及びＳＷ４８０（大腸癌）。これらの細胞株は、Americal Type Culture Collection（ATCC, Manassas, VA）より入手した。ＭＬ－１、ＮＢ４、及びＫａｓｕｍｉ３

（骨髄性白血病）、並びにＣＨＯ－ＴＲＶｂ（ＴｆＲ欠損チャイニーズハムスター卵巣）及びＴＲＶｂ－１（ヒトＴｆＲ安定形質移入済ＴＲＶｂ）の細胞は、それぞれMinowada博士（１４）、Lanotte博士（１５）、Asou 博士（１６）、及びMcGraw博士（１７）より提供していただいたものである。ヒトの単球は、健常なボランティアの血液を、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（Pharmasia, Piscataway, NJ）の勾配中で、４００×ｇで３０分間、遠心分離して単離した。これらの患者についてはインフォームドコンセントを実施した。

【００３４】

ｃＤＮＡ及びゲノムＤＮＡの分子クローニング：相補的ＤＮＡライブラリーは、商業的キット（Marathon cDNA Amplication Kit, Clontech, PaloAlto, CA）を利用してＴＦ－１及びＨＬ６０細胞より構築し、５’及び３’ＲＡＣＥ反応に使用して完全長のｃＤＮＡクローンを得た。プライマーＡ及びＢ（表１を参照）をそれぞれ５’及び３’ＲＡＣＥに使用した。ＲＡＣＥ反応の産物をｐＧＥＭ－Ｔｅａｓｙベクター（Promega, Madison, WI）へサブクローニングした。ＴＦ－１及びＨＬ６０のｃＤＮＡライブラリーのそれぞれより、２．９ｋｂ（α）及び２．５ｋｂ（β）の二つの転写産物を単離した。

【００３５】

ＴｆＲ２用のプライマー配列

これらのプライマーを、ＲＡＣＥ分析及びＲＴ－ＰＣＲ分析において使用して、ＴｆＲ２ｃＤＮＡを増幅した。これらのプライマーの一は、ＴｆＲ２－α－転写産物（GenBankアクセス番号AF067864）の配列内でのヌクレオチド数で示してある。更に、プライマーＡ、Ｃ、Ｄ、及びＥの一も図２に示してある。

【００３６】

【表１】

プライマー名	配列	方向	位置
A	5’-CCACACGTGGTCCAGCTTCTGGCGGGAG-3’	逆方向	603-576
B	5’-CAGTTGCATCATCAGGCCTTC-3’	順方向	1061-1082
C	5’-ACGTCTCTGGCATCCTTCC-3’	順方向	ＴｆＲ２-βのみ
D	5’-GTGGTCAGTGAGGATGTCAA-3’	順方向	376-395
E	5’-TGTAGGGGCAGTAGACGTCA-3’	逆方向	733-714

【００３７】

ゲノムＤＮＡは、ヒトのゲノムライブラリー（Lambda FIX II Library, Stratagene, LaJolla, CA）より、ＴｆＲ２ｃＤＮＡの３’末端の２．２ｋｂの断片をプローブ（図１においてプローブ－１として示されている）として使用して単離した。制限酵素地図の作成後、３．８５ｋｂの断片であってエクソン４－６を含むものを、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ（＋）プラスミド（Stratagene）内へサブクローニングした（図１）。相補鎖ＤＮＡ配列及びゲノム配列は、ＡＢＩ　Ｐｒｉｓｍ３７３自動配列決定機（Perkin-Elmer, Foster City, CA）を使用して決定した。

【００３８】

染色体地図：GenBridge4放射性ハイブリッドパネル、ＲＨＯ２（Reserch Genetics, Huntsville, AL）を使用して、ＴｆＲ２遺伝子の位置を、既に報告されているようにして（１８）決定した。プライマーＡ及びＣにより、エクソン４に位置する１７８ｂｐの断片が増幅された（図２）。ＰＣＲ産物を１．５％のアガロースゲルで電気泳動にかけ、サザンブロットし、^{32}Ｐで標識したＴｆＲ２（β型ｃＤＮＡの５’部分の１ｋｂｐの断片；図１においてプローブ－２として表示）のプローブでハイブリダイズして、当該遺伝子を含有するハイブリッドを同定した。結果は、ウェブサイト：http://www.genome.wi.edu/cgi-bin

/contig/rhmapper.pl.のデータベースにアクセスして分析した。

【００３９】

ノーザンブロット及びＲＴ－ＰＣＲ分析

ノーザンブロット分析及びＲＴ－ＰＣＲ分析を、既に報告されている方法（１８）を一部改編して行った。ヒトの組織のノーザンブロットのメンブレン及びｃＤＮＡは、OriGene（Rockville, MD）より購入した。ノーザンブロットの分析には、二つのＴｆＲ２ｃＤＮＡ断片（図１に示されるプローブ－１及びプローブ－２）、一のヒトβアクチンｃＤＮＡ断片（OriGene）、及び約３００ｂｐのＴｆＲｃＤＮＡ断片をプローブとして使用した。ＲＴ－ＰＣＲには、α型特異的プライマー（プライマーＡ及びＤ）、β型特異的プライマー（プライマーＣ及びＥ）を使用した（表１及び図２）。増幅の条件は、９４°Ｃ、３０秒；５６°Ｃ、４０秒；及び７２°Ｃ１分を３５サイクルとした。対照として、グリセルアルデヒド－３－ホスフェートデヒドロゲナーゼ（Ｇ３ＰＤＨ）を、別個の反応において、プライマー：５’－CCATGGAGAAGGCTGGGG－３’、及び５’－CAAAGTTGTCATGGATGACC－３’を使用して２７サイクル増幅させた。産物は、１．５％のアガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレンに転移させ、放射性標識したＴｆＲ２及びＧ３ＰＤＨプローブとハイブリダイズしてオートラジオグラフィーにかけた。

【００４０】

形質移入及び免疫ブロッティング：ＣＨＯ－ＴＲＶｂ細胞は、５％のウシ胎児血清を添加したＦ１２栄養混合物（Gibco－BRL）で維持した。アミノ末端ＦＬＡＧタグ付ＴｆＲ２－αｃＤＮＡを、ｐｃＤＮＡ３（Invitrogen, Carlsbad, CA）へサブクローニングした。このプラスミド（１００μｇ）をＣＨＯ－ＴＲＶｂ細胞内へ、リポフェクチン（Gibco-BRL）を使用して形質移入した。一過性の発現の場合には、細胞は形質移入後４８時間後に回収した。安定に発現するクローンについても、Ｇ４１８（２００μｇ／ｍｌ）の選択及び標準的な制限希釈法で単離した。蛋白質発現は、抗－ＦＬＡＧ（Ｍ５）抗体（Eastman Kodak, New Haven, CT）を使用して免疫ブロッティングで確認した。免疫ブロッティングの分析は、既に報告されているようにして行った（１９）。

【００４１】

細胞表面へのＴｆの結合についてのフローサイトメトリー分析

約３×１０^{5}の細胞を、５μｇ／ｍｌのビオチン化ヒトホロＴｆ（Sigma）添加済５００μｌのＭＥＭα培地（GIBCO）（非標識の、ヒトホロ－Ｔｆ（Sigma）若しくはヒトＬｆ（Calbiochem, San Diego, CA）の存在下又は非存在下）で、氷上で３０分間インキュベーションした。０．１％ウシ血清アルブミン添加のＰＢＳで２回洗浄した後、細胞をストレプトアビジン－ＰＥ（ＤＡＫＯ）とともにインキュベーションした。細胞を再び２回洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。

【００４２】

Tf仲介性の鉄取り込みの分析

０．２５Ｍトリス－ＨＣｌ、１０μＭ　ＮａＨＣＯ３、ｐＨ８．０の０.５ｍｌ中の１ｍｇのヒトアポ－Ｔｆ（Sigma）を、０．５ｍｌの１００ｍＭのニトロトリ酢酸二ナトリウム（０．４ｍＣｉの^{55}ＦｅＣｌ$_{3}$（NEM,Boston, MA）含有）と混合した。この混合物を室温で１時間インキュベーションし、放射性標識したＴｆをＰＤ－１０カラム（Pharmacia）でろ過して分離した。２７，０００ｃｐｍ／ｍｇの比活性が得られた。細胞を、ＭＥＭα培地中の^{55}Ｆｅ－Ｔｆと、２００倍過剰の非標識ホロ－Ｔｆの存在下又は非存在下で、３７°Ｃ、５％CO_{2}でインキュベーションした。ＰＢＳで洗浄した後、細胞を０．１ＮのＮａＯＨで溶解し、放射能を液体シンチレーションカウンターで計測した。

【００４３】

（結果）

ＴｆＲ２遺伝子の、分子クローニング、染色体マッピング、及びゲノム構造

１７個の５’－ＲＡＣＥクローン、及び１０個の３’－ＲＡＣＥクローンを、７Ｆ－１ｃＤＮＡライブラリーより単離した。これらのヌクレオチド配列の集合により、約２．９ｋｂのｃＤＮＡ配列（α型；GenBankアクセス番号AF067864）が示された。５’及び３’の

遺伝子特異的プライマーを使用して、推定の完全長コード配列を包含するｃＤＮＡクローンを、ＴＦ－１ｃＤＮＡライブラリーからのＰＣＲにより作製した。これにより、予想されるｃＤＮＡ配列が、実際に発現しているｍＲＮＡに属していることが判明した。ＨＬ６０のｃＤＮＡライブラリーを使用してＴｆＲ２をクローニングすると、５’－ＲＡＣＥ産物は、ＴＦ－１ライブラリーに由来するものよりも短く、５’末端の配列は、異なっていた（β型）。ＴＦ－１ライブラリーに由来する全ての５’－ＲＡＣＥ産物は、α型に属し、ＨＬ６０に由来する５’－ＲＡＣＥ産物はβ型に属していた。

【００４４】

図１は、ＴｆＲ２遺伝子を示す。図１によれば、約１６ｋｂｐのゲノム断片が、ヒトのゲノムライブラリーよりクローニングされ（ゲノムクローン１）、制限酵素認識部位がマッピングされる。ゲノムクローン１の３．８５ｋｂｐの断片（影付きのバーで示されるもの）を、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ（＋）プラスミド内にサブクローニングし、配列決定した。この図に示されるエクソン－イントロンの境界は、GenBank（アクセス番号　AP053356）に寄託されているデータに基づいているが、本出願人らのデータに基づく改変を一部含んでいる。α転写産物には、１８のエクソン（線上の黒四角）が含まれている。β転写産物は、エクソン１－３を欠失していて、エクソン４の５’末端に１４２塩基が付加されている（線上の中空の丸）。下側の二つの四角は、α型及びβ型の転写産物の構造である。ＩＣ、ＴＭ、ＥＣは、細胞内、経膜、及び細胞外のドメインをコードする配列をそれぞれ意味する。本発明で使用しているプローブの位置は、四角の下に示してある。

【００４５】

放射性ハイブリッドパネル分析によれば、ＴｆＲ２はＤ７Ｓ６５１マーカーとＷＩ－５８５３マーカーとの間の、染色体７ｑ２２にマッピングされる。１６ｋｂのゲノムＤＮＡクローンの制限酵素マッピング及び部分配列決定、並びに寄託されているが未発表のゲノム配列（２０）とに比較により、α型は、１８のエクソン（図１）からなることが判明した。しかしながら、そのエクソン－イントロン境界と、本出願人らのものとの間にはいくらかの違いが認められた。本出願人らの、ＴｆＲ２－α転写産物のＤＮＡ配列を、その予想されているｍＲＮＡ配列（２０）と比較すると、エクソン８（ＴｆＲ２-α転写産物のヌクレオチド１０５３－１１３３；GenBankアクセス番号AF067894）において８１ヌクレオチドが付加されていて、エクソン１８（ヌクレオチド２１６３と２１６４との間）において１８ヌクレオチドを欠失している。これにより、本出願人らの予想したＴｆＲ２－α蛋白質に対しては２７のアミノ酸が付加され、６のアミノ酸が欠失した。更に、本出願人らのｍＲＮＡ配列は、３’非翻訳領域（ＵＴＲ）（ヌクレオチド２５８０乃至２８７７）を含んでいた。

【００４６】

β型は、オルタナティブなスプライシング又はプロモータの使用による産物であるが、これにはエクソン１、２、及び３が欠失していて、その最初のエクソン（α型のエクソン４）には、５’末端に１４２ヌクレオチドの塩基が付加されている（図１及び２）。図２は、エクソン３－５のＤＮＡ配列を示している。囲った配列は、β転写産物のみに見られた。実線の矢印及び破線の矢印は、それぞれα型及びβ型の転写産物をＲＴ－ＰＣＲで合成するのに使用したプライマーを意味する。β転写産物の推定の翻訳開始コドンは、太字のＡＴＧで示してある。-３及び+４位のグアニンは、コザックの開始コドン配列と首尾一貫するが、これには下線を引いた。

【００４７】

ＴｆＲ２蛋白質及びｍＲＮＡの一次構造

ＴｆＲ２-αについて予想されるアミノ酸配列を図３に示してある。図３は、ＴｆＲ２－αの推定のアミノ酸配列を、ヒトのＴｆＲ蛋白質及びＰＳＭＡ蛋白質と整列して示している。同一の残基は囲ってある。推定の経膜部分に位置する疎水性のアミノ酸ストレッチには、影をつけてある。ＴｆＲの内部移行モチーフ及び対応する同等のＴｆＲ２-αのモチーフは、二重線を引いてある。ＴｆＲ２-βの予想される第一メチオニンを太字で示してある。

【００４８】
一対のアルギニンの後に続く、８１位から１０４位までの疎水性のストレッチは、推定の経膜ドメインを表す。これは、アミノ末端に近い部位に位置しているが、ＴｆＲ及びＰＳＭＡの経膜ドメイン（図３－４において、影のついた部分）と同様である（１０、２１）。ＴｆＲ及びＰＳＭＡとの類推により、ＴｆＲ２－αはおそらくＩＩ型の膜蛋白質である。従って、ＴｆＲ２－αの残基１乃至８０は、細胞質ドメインであり、残基１０５乃至８０１は、細胞外ドメインであるかもしれない。細胞外ドメインにおいては、ＴｆＲ-αと、ＴｆＲ又はＰＳＭＡとの間のアミノ酸配列相同性は、非常に高かった。ＴｆＲ－２αの細胞外ドメインは、ＴｆＲのものとは４５％の同一性があり、６６％の相同性があった。ＰＳＭＡとは、同一性は２７％であり、相同性は６０％であった。ＴｆＲの８９位と９８位にあるシステイン残基は、ジスルフィド結合を形成してホモ二量体化する。ＴｆＲ２-αの１０８位と１１１位にあるシステイン残基は、類似の領域内に位置し、同様の機能を発揮するかもしれない。更に、ＴｆＲ２-αにはＹＱＲＶモチーフ（アミノ酸２３－２６）が細胞質ドメインの真ん中に含まれるが、これはＴｆＲのＹＴＲＦモチーフ（図３－４、二重の下線）と同様に、内部移行シグナルとして機能するかもしれない（２２－２４）。

【００４９】
β転写産物には、エクソンの１乃至３が欠失しているが、これらには経膜及び細胞質ドメインの全部、並びに細胞外ドメインであって１０８位及び１１１位の二つのシステイン残基を含むものがコードされている。エクソン４の添加の１４２ヌクレオチドの５’配列には、開始コドンが含まれていない。翻訳はおそらくはヌクレオチド５４２のＡＴＧから開始されるであろうが、これはα転写産物ＯＲＦとフレームがあっている。推定の開始メチオニンは図２に、エクソン４は図３－４にそれぞれ太字のＡＴＧとＭとで示してある。このＡＴＧには-３位及び＋４位のＧが含まれているが、これは翻訳に理想的な部位であることを意味している（２５）。従って、β転写産物についての推定の蛋白質産物には、経膜ドメインとシグナルペプチドの両方が欠失していて、機能するかどうか不明である細胞内蛋白質となるおそれがある。
ＴｆＲ－２蛋白質の一次構造は、ＴｆＲのものに極めて類似しているが、ＴｆＲ２のｍＲＮＡの３’ＵＴＲは、ＴｆＲ転写産物のものよりも短かった。また、典型的な鉄応答性配列（ＩＲＥ）は、ＴｆＲ２転写産物のいずれのＵＴＲにも存在しなかった（２６）。

【００５０】
ＴｆＲ２のｍＲＮＡ発現の特徴付け
図５及び図６は、ヒトの組織のポリＡ＋ＲＮＡのノーザンブロットの結果を示す。ハイブリダイゼーションは、^{32}Ｐで標識したＴｆＲプローブと行った。図５は、ヒトｍＲＮＡの多組織ブロットがＴｆＲ２プローブとハイブリダイズされたことを示している（図１のプローブ番号１）。メンブレンを同じボトル内で同時にハイブリダイズし、１２時間露出下後にオートラジオグラフィーを現像した。図６においては、細胞株由来の全ＲＮＡの３０μｇをそれぞれのレーンにロードし、ＴｆＲ２プローブ（プローブ番号２）及びＴｆＲプローブとハイブリダイズした。^{32}Ｐで標識されたβ-アクチンプローブを全てのブロットにおいて対照として使用した。分子量マーカー又はリボソームＲＮＡの位置は、左側に示した。

【００５１】
ヒトの組織からのポリA+ＲＮＡのノーザンブロット分析により、ＴｆＲ２についての２．９ｋｂのｍＲＮＡが、肝臓において主として発現していて、胃においてはより少ない程度で発現していることが示された（図５）。これは、ＴＦ－１細胞から単離されたＴｆＲ２－αの長さに対応する。更に、４ｋｂ（胃）と、１．７ｋｂ（肝臓、肺、小腸、胃、精巣、及び胎盤）の弱いバンドが観察された。これらのバンドは、ＴｆＲ２ｍＲＮＡのオルタナティブな別の形態の存在を反映しているのかもしれない。種々の細胞株の全ＲＮＡのノーザンブロット分析により、Ｋ５６２（赤白血病）、及びＨｅｐＧ２（肝芽腫）においてＴｆＲ２－αが高発現していることが判明した（図６）。ＴｆＲ２-αの発現レベルは

、ＴｆＲのものとは必ずしも相関関係にはなかった（図６）。ＴｆＲ２-β（２．５ｋｂ）に対応する転写産物はノーザンブロット分析では一切観察されなかった。

【００５２】

α及びβの転写産物の発現を比較するため、それぞれの形態に特異的なプライマーを使用して、ＲＴ－ＰＣＲを実施した。図７及び図８は、ＲＴ－ＰＣＲ分析の代表的な結果を示す。ＲＴ－ＰＣＲは、Ｇ３ＰＤＨ（２７サイクル）、及びＴｆＲ２（３５サイクル）のα及びβ転写産物に特異的なプライマーで行った。産物を１．５％のアガロースゲル電気泳動にかけて、ナイロンメンブレンに転移させ、放射性標識したプローブでハイブリダイズして、オートラジオグラフィーにかけた。図７は、ヒトの組織のｃＤＮＡのパネルを示すものである（ＭＮＣ；ヒト末梢血単球）。図８は、種々のヒトの細胞株に由来するｃＤＮＡを示す。それぞれの試料について少なくとも２回実験を行ったが、図はこれらのうちの代表的な結果を示す。ＭＬ－１、Ｋａｓｕｍｉ－３、ＨＬ６０、及びＭＤＡ-ＭＢ-２３１のｃＤＮＡは陰性であったが、他の実験においてはα型の発現がかすかなレベルで示された。

【００５３】

図７及び図８は、ヒトの組織ｃＤＮＡのパネルを鋳型として使用して、α型の発現が肝臓、脾臓、筋肉、前立腺及び末梢血単球に限られていることを示している（図７）。一方、β型の発現は、調べたヒトの全ての組織において起こった。種々の組織に由来するヒトの癌細胞株を用いて、二つの転写産物の発現を調べた。この細胞株の多くは両方の転写産物を発現したが、次の３つは例外であった：ＳＫ－Ｈｅｐ１（肝細胞癌）は、α及びβの双方の転写産物を欠失していた；ＨｅｐＧ－２（肝芽腫）及びＭＬ－１（骨髄芽球種）はβ転写産物を欠失していた（図８）。ＳＫ－Ｈｅｐ１のサザンブロット分析では、ＴｆＲ２遺伝子の欠失や再配列のいずれも検出されなかった（データは示さず）。

【００５４】

ＴｆＲ２－αで形質転換された細胞へのＴｆの結合

ＴｆＲ２－αの機能を分析するため、ＴｆＲの機能が欠失しているＣＨＯ－ＴＲＶｂ細胞を、ＦＬＡＧのタグ付ＴｆＲ２－αで安定に形質転換した。図９－１１は、ＴｆＲ２－α蛋白質の発現及び機能分析を示す。図９においては、細胞表面へのＴｆ結合は、ネオマイシン耐性の対照ＣＨＯ－ＴＲＶｂ細胞（左側のパネル）、ＦＬＡＧのタグ付ＴｆＲ２－αで安定に形質転換された細胞（中央）、及びＴｆＲが安定に形質転換されたＴＲＶｂ－１細胞（右側）で調べた。細胞は５μｇ／ｍｌのビオチン化ヒトホロ－Ｔｆ添加のＭＥＭα培地中で３０分間、氷上でインキュベーションした。ＰＢＳでの洗浄後、細胞をストレプトアビジン－ＰＥでインキュベーションし、フローサイトメトリーで分析した。実線は競合が無い場合のヒストグラムを示す。競合実験は、１０倍（----）、又は１００倍（－--）過剰の非標識Ｔｆ（上側のパネル）又はＬｆ（下側のパネル）の存在下で行った。図１０においては、Ｔｆ仲介性の^{55}Ｆｅ取り込みを、ネオマイシン耐性対照細胞ＣＨＯ－ＴＲＶｂ（Ｎｅｏ細胞）、ヒトＴｆＲ安定形質転換細胞（ＴｆＲ細胞）、及びＦＬＡＧタグ付ＴｆＲ２－α安定形質転換細胞（ＴｆＲ２細胞）で行った。中黒の記号（－Ｃ）は、非標識のＴｆを２００倍過剰で行ったコールドの競合実験である。４つ一組（競合なし）又は3つ一組（コールドな競合）の何れかの実験の、平均±Ｓ．Ｄ．を示してある。図１１においては、ｐｃＤＮＡ３で一過性の形質転換を行った細胞由来の細胞溶解物（レーン１）、及びＦＬＡＧタグ付ＴｆＲ２形質転換細胞（レーン２、及び３）を、４－１５％のリニアー勾配ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで電気泳動にかけた。レーン３の試料については、２－メルカプトエタノールを試料緩衝液から省いた。ＰＶＤＦメンブレンへ転移した後、ＦＬＡＧ－融合蛋白質を免疫ブロッティングで検出した。分子量マーカーの位置は左側に示してある。

【００５５】

図９－１１においては、ビオチン化したＴｆ及びフローサイトメトリーを使用して、細胞表面のＴｆ結合を調べた。ネオマイシン耐性の対照細胞は、細胞表面のＴｆ結合に関してほとんど陰性であった（図９、左）。ＴＲＶｂ－１はヒトのＴｆＲで安定に形質転換され

た細胞であるが、これはＴｆの細胞表面結合に関して陽性であり、この結合は、非標識のＴｆにより競合されるが、Ｌｆは競合しなかった（図９、中央）。ＴｆＲ２－αを安定に発現しているＣＨＯ－ＴＲＶｂ細胞に関しては、細胞表面のＴｆ結合の平均値は、対照細胞のものよりも明らかに高った（図９、右、実線）。競合実験においては、非標識のＴｆの１０倍過剰量により、ビオチン化Ｔｆの結合が阻害されたが、Ｌｆは１００倍過剰であっても結合を阻害しなかった（図９、右、点線）。ＴｆＲ２－α細胞へのＴｆの結合もまた、ＣＨＯ－ＴＲＶｂ細胞を使用して一過性発現系で調べたが、細胞表面へのＴｆ結合のレベルは、一貫して以下の通りであった：ＴｆＲ細胞＞ＴｆＲ２－α細胞＞ｐｃＤＮＡ３細胞（データは示さず）。

【００５６】

ＴｆＲ２－αで形質転換した細胞の、Ｔｆ仲介性^{55}Ｆｅの取り込み

ヒトのＴｆＲ及びＴｆＲ２－αで安定に形質転換されたＣＨＯ－ＴＲＶｂ細胞を、^{55}Ｆｅ-Ｔｆとインキュベーションし、^{55}Ｆｅの取り込みを測定した。ネオマイシン耐性のＣＨＯ－ＴＲＶｂ細胞を対照として使用した。ＴｆＲ２－α細胞による、Ｔｆ仲介性の^{55}Ｆｅの取り込みは、ＴｆＲ細胞と匹敵した；これらの両方の細胞は、対照細胞よりも明らかに高かった（図１０）。非標識Ｔｆの２００倍過剰量による競合はほぼ完全に、５ｈのインキュベーション後におけるこれら３つの細胞株による^{55}Ｆｅの取り込みを阻害した（図１０）。機能性のＴｆＲが存在しないのにもかかわらず、Ｔｆ仲介性の^{55}Ｆｅのわずかな取り込みが、対照のＴＲＶｂ細胞において観察されたが、これはChanら（２７）で以前報告されている通りである。

【００５７】

ほ乳類細胞で発現した、ＦＬＡＧタグ付ＴｆＲ２－α蛋白質の二量体化

空のベクターであるｐｃＤＮＡ３、又はＦＬＡＧタグ付ＴｆＲ２－αプラスミドで一過性の形質転換した細胞由来の細胞溶解物について、抗－ＦＬＡＧ抗体を使用した免疫ブロッティングにより調べた（図１１）。還元条件下では、ＦＬＡＧ－タグ付きＴｆＲ２－αで形質転換した細胞の溶解物においては、～１０５ｋＤａの二つの近接移動バンドが観察された（レーン２）。２－メルカプトエタノールを試料ローディング緩衝液から省くと、～１０５ｋＤａの二重線が減少したが、～２１５ｋＤａの蛋白質が出現した（レーン３）。～２６０ｋＤａ及び～１２５ｋＤａのかすかなバンドも、非還元条件下で観察された（レーン３、矢印）。

【００５８】

考察

ｍＲＮＡより推定したＴｆＲ２－α蛋白質の一次構造は、ＴｆＲのものと同一であった（結果の欄を参照）。更に、ＴｆＲ２－αで形質転換した細胞は、Ｔｆ結合及びＴｆ仲介性の鉄の取り込みの両方を増大することを示した（図９及び図１０）。しかしながら、ＴｆＲ２及びＴｆＲの発現を制御する機構は異なっているかもしれない。ＴｆＲ蛋白質のレベルは、転写後にその３’－ＵＴＲ中のＩＲＥにより制御されているが、これに対して鉄制御蛋白質Ｉ（ＩＲＰ－１）及びＩＲＰ－２が結合する。十分な鉄が欠乏している細胞内ではＩＲＰは、ＴｆＲのｍＲＮＡの鉄応答性配列に結合し、その転写産物を安定化する。過剰の細胞内鉄が存在する場合、ＩＲＰは放出されてＴｆＲｍＲＮＡの分解が生じる。急速に増殖している細胞においては、原癌遺伝子であるｃ－ＭＹＣがＨ－フェリチンを抑制して、ＩＲＰ－２を上流制御し、ＩＲＰ－２の上流制御によりＴｆＲ蛋白質発現が増大することがある（２８）。ＴｆＲ２のｍＲＮＡの３’、５’－ＵＴＲのいずれも、検出可能なＩＲＥ様構造を有しないが、これは別の機構によりＴｆＲ２発現が制御されることを示唆している。

【００５９】

種々の組織由来の、健常なヒトのポリＡ+ＲＮＡを使用したノーザンブロットにより、ＴｆＲ２－αを主に発現している細胞のタイプは肝臓のみであることが示された（図５）。また、ＴｆＲ２－αは、ヘモグロビン合成が可能な、Ｋ５６２赤白血病細胞株内で高発現していた（図６）。この結果は、赤血球造血細胞もまた、高レベルのＴｆＲ２－αを発現

していることを示唆している。赤血球細胞の主要な産物は、鉄を豊富に含んだヘモグロブリンであり、ＴｆＲ２－αが鉄の輸送に関与するならば、これはこれらの細胞で強く発現するであろう。赤血球細胞においてはCotnerらは、ＴｆＲに対する一組のモノクローナル抗体を使用して、ＴｆＲのオルタナティブな型が存在することを予測した（２９）。彼らの発見は、ＴｆＲ２－αに帰属することができる。

【００６０】

ほ乳類細胞内で発現したＦＬＡＧタグ付のＴｆＲ２－αのサイズは、還元剤の存在下では～１０５ｋＤａであり、還元剤の非存在下では～２１５ｋＤａであるが（図１１）、これはジスルフィド結合によりＴｆＲ２－αの二量体化を意味している。ＦＬＡＧタグ付のＴｆＲ２－αのモノマーは～１０５ｋＤａであるが、これはアミノ酸配列から計算される分子量（～９０ｋＤａ）よりも大きい。このことは、グリコシル化等の蛋白質の翻訳後の修飾を反映しているのかもしれない。実際に、Ｎ－グリコシル化部位が、ＴｆＲ２－α蛋白質において４つ推定されている（アミノ酸２４０－２４３、３３９－３４２、５４０－５４３、及び７５４－７５７）。従って、図１１に見られる～１０５ｋＤａの二重のバンドは、グリコシル化の異なる段階のものによるものかもしれない。更に、それぞれ～２１５ｋＤａ及び～１０５ｋＤａのクリアーなバンドの上にある、～２６０ｋＤａ及び～１２５ｋＤａのかすかなバンドは、非還元条件下において観察された（図１１、レーン３、矢印）。これらのかすかなバンドは、ジスルフィド結合による、ＴｆＲ２－αと小型蛋白質（～２０ｋＤａ）（これはリガンドであるかもしれないし、又はそうではないかもしれない）との相互作用を反映しているものかもしれない。

【００６１】

ＴｆＲ２の機能を調べるため、Ｔｆ及びＴｆファミリーの他のメンバーを、ＴｆＲ２のリガンド候補として考慮した。Ｔｆファミリーの６つのメンバー、Ｔｆ、Ｌｆ、メラノトランスフェリン（３０）、オボトランスフェリン、サキシフィリン（saxiphilin）（３１）、及び炭酸脱水酵素のブタの阻害剤（３２）がこれまでにクローニングされている。最後の２つは、鉄結合性を有さず、最後の３つはヒトにおいては同定されていない。メラノトランスフェリンは、ＴｆＲ２のリガンドではないようであるが、それはメラノーマ細胞の膜結合蛋白質であるからである。Ｔｆ及びｌｆのみが、候補として残る。ＦＬＡＧのタグ付ＴｆＲ２－αで形質転換したＣＨＯ－ＴＲＶｂ細胞は、対照細胞と比較して高レベルの、細胞表面へのＴｆ結合を示した（図９）。このことは、ＦＬＡＧのタグ付のＴｆＲ２－αが、細胞表面に露出し、Ｔｆにより結合されていることを意味している。この結合は、非標識のＴｆで効果的に競合されるが、Ｌｆでは競合されない（図９）。このことは、ＴｆはＬｆよりもＴｆＲ２－αにより特異的に結合することを意味する。更に、ＴｆＲ２－αで形質転換した細胞によるＴｆ仲介性の鉄の取り込みは、対照細胞よりも明らかに高かった（図１０）。

【００６２】

しかしながら、もしＴｆＲ２－αに対する唯一のリガンドがＴｆであり、ＴｆＲ２－αの主な機能が細胞の鉄の取り込みであるならば、なぜ細胞はＴｆに対する二つの受容体を有するのであろうか？ＴｆＲ２－αはただ単に、異なる親和性を有する別のトランスフェリン受容体であるかもしれない。おそらくは、Ｔｆ／ＴｆＲ２－α複合体の細胞表面上での行く末は、Ｔｆ／ＴｆＲ複合体のものとは異なっているかもしれない。ＴｆＲ２－αの推定の内部移行モチーフは、ＴｆＲのものとは同一ではなく、内部移行におけるマイナーな差異でさえもが、エンドソームの到達地を変える可能性がある（２４）。更に、ＴｆＲ２－αが、Ｔｆ以外の別の特異的リガンドを有する可能性が残る。遺伝的ヘモクロマトーシスの患者の多くにおいて変異しているＨＦＥ（８、９）、及び小腸の鉄トランスポーターであるＮｒａｍｐ２（３３、３４）の発見により、鉄の代謝の分野は最近になってかなりの進歩をしている。ＨＦＥは通常はＴｆＲと細胞膜上において複合体を形成するが、これに対してＴｆＲ２－αは結合するのであろうか？もしそうならば、ＴｆＲ２－αはＨＦＥをキレートして細胞の鉄の取り込みに影響を与えるかもしれない。ＴｆＲ２－αはＴｆＲとヘテロ二量体を形成するのであろうか？これもまた、細胞の鉄の取り込みに影響を与え

るかもしれない。ＴｆＲ２の正確な役割が分かれば、細胞の鉄の取り込みの機構と制御を明確にするための重要なステップが供給されるであろう。

【００６３】

我々は、ＴｆＲ２遺伝子の二つの異なる型、αとβをクローニングした。二つの異なる転写産物は、ＴｆＲ様ファミリーの他のメンバーであるＰＳＭＡ遺伝子からも発現される。ＰＳＭＡの短い型は、ＴｆＲ２のβ型と同様に、経膜ドメインをコードする５’末端を欠失している（３５）。ＰＳＭＡのｍＲＮＡについての長い型及び短い型の発現が、ほぼ１００倍の差異の比率で、前立腺癌の進行中に起こることが報告されている（３６）。非常に感受性のあるＲＴ－ＰＣＲ法を使用して、ＴｆＲ２遺伝子（α型及びβ型）の発現を区別することができた。正常な組織のなかでは、α型（長いほう）の発現は、肝臓、脾臓、肺、筋肉、前立腺の細胞、及び末梢血単球で検出された（図７）。β型はより後半に分布していた。興味深いことに、肝臓由来の二つの細胞株（ＳＫ－Ｈｅｐ１及びＨｅｐＧ２）は、β型の発現を欠いていたが、一方、他の組織由来の多くの細胞株においては正常な肝臓の細胞と同様にして、この短い型を発現していた（図７及び図８）。

【００６４】

ＴｆＲ２は、染色体の７ｑ２２へマッピングされた。この染色体領域のヘテロ接合性の欠失又は喪失が、脊髄形成異常症、急性骨髄性白血病や、卵巣癌及び膵臓癌を含む複数の悪性疾患において報告されている（３７－４１）。ＴｆＲ２の変異がこれらの癌において起こるかもしれないと考えられる。

【００６５】

【参考文献】

1. Richardson, D. R. and Ponka, P. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1331, 1-40.

2. Testa, U., Pelosi, E. and Peschle, C. (1993) *Crit. Rev. Oncog.* 4, 241-276.

3. Lash, A. and Saleem, A. (1995) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 25, 20-30.

4. Kauppi, B., Nielsen, B. B., Ramaswamy, S., Larsen, I. K., Thelander, M., Thelander, L. and Eklund, H. (1996) *J. Mol. Biol.* 262, 706-720.

5. Miskimins, W. K., McClelland, A., Roberts, M. P. and Ruddle, F. H. (1986) *J. Cell Biol.* 103, 1781-1788.

6. Gross, S., Helm, K., Gruntmeir, J. J., Stillman, W. S., Pyatt, D. W. and Irons, R. D. (1977) *Eur. J. Haematol.* 59, 318-326.

7. Gatter, K. C., Brown, G., Trowbridge, I. S., Woolston, R. E. and Mason, D. Y. (1983) *J. Clin. Pathol.* 36, 539-545.

8. Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R. J., Ellis, M. C., Fullan, A., Hinton, L. M., Jones, N. L., Kimmel, B. E., Kronmal, G. S., Lauer, P., Lee, V. K., Loeb, D. B., Mapa, F. A., McClelland, E., Meyer, N. C., Mintier, G. A., Moeller, N., Moore, T., Morikang, E., Prass, C. E., Quintana, L., Starnes, S. M., Schatzman, R. C., Brunke, K. J., Drayna, D. T., Risch, N. J., Bacon, B. R. and Wolff, R. K. (1996) *Nature Genet.* 13, 399-408.

9. Feder, J. N., Penny, D. M., Irrinki, A., Lee, V. K., Lebron, J. A., Watson, N., Tsuchihashi, Z., Sigal, E., Bjorkman, P. J. and Schatzman, R. C. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S. A.* 95, 1472-1477.

10. Israeli, R. S., Powell, T., Fair, W. R. and Heston, W. D. W. (1993) *Cancer Res.* 53, 227-230.

11. Carter, R E., Feldman, A. R. and Coyle, J. T. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 749-753.

12. Gregorakis, A. K., Holmes, E. H. and Murphy, G. P. (1998) *Semin. Urol. Oncol.* 16, 2-12.

13. Heston, W. D. W. (1998) *Urology* 49, 104-112.

14. Fukuda, M., Koeffler, H. P. and Minowada, J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 6299-6303.

15. Lanotte, M., Martin-Thouvenin, V., Najman, S., Balerini, P., Valenisi, F. and Berger, R. (1991) *Blood* 77, 1080-1086.

16. Asou, H., Suzukawa, K., Kita, K., K., N., Ueda, H., Morishita, K. and Kamada, N. (1996) *Jap. J. Cancer Res.* 87, 269-274.

17. McGraw, T. E., Greenfield, L. and Maxfield, F. R. (1987) *J. Cell Biol.* 105, 207-214.

18. Yang, R., Morosefti, R. and Koeffler, H. P. (1997) *Cancer Res.* 57, 913-920.

19. Chumakov, A. M., Grillier, I., Chumakova, E., Chih, D., Slater, J. and Koeffier, H. P. (1997) *Mol. Cell Biol.* 17, 1375-1386.

20. Gleockner, G., Rosenthal, A., Scherer, S., Weber, J., Schattevoy, R. and Tsui, L. (1998) *Homo sapiens chromosome 7q22 sequence, complete sequence. GenBank, accession number AP053356.*

21. Schneider, C., Owen, M. J., Banville, D. and Williams, J. G. (1984) *Nature* 311, 675-678.

22. Collawn, J. F., Stangel, M., Kuhn, L. A., Esekogwu, V., Jing, S., Trowbridge, I. S. and Tainer, J. A. (1990) *Cell* 83, 1061-1072.

23. Jing, S. Q., Spencer, T., Miller, K., Hopkins, C. and Trowbridge, I. S. (1990) *J. Cell Biol.* 283-294.

24. Johnson, A. O., Ghosh, R. N., Dunn, K. W., Garippa, R., Park, J., Mayor, S., Maxfield, F. R. and McGraw, T. E. (1996) *J. Cell Biol.* 135, 1749-1762.

25. Kozak, M. (1981) *Nuc. Acids Res.* 9, 5233-5262.

26. Leibold, E. A., Laudano, A. and Yu, Y (1990) *Nuc. Acids Res.* 18, 1819-1824.

27. Chan, R. Y. Y., Ponka, P. and Schulman, H. M. (1992) *Exp. Cell Res.* 202, 326-336.

28. Wu, K., Polack, A. and Dalla-Favera, R. (1999) *Science* 283, 676-679.

29. Cotner, T., Gupta, A. D., Papayannopoulou, T. and Stamatoyannopoulos, G. (1989) *Blood* 73, 214-221.

30. Rose, T. M., Plowman, G. D., Teplow, D. B., Dreyer, W. J., Hellstrom, K. E. and Brown, J. P. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 1261-1265.

31. Llewellyn, L. E. and Moczydlowski, E. G. (1994) *Biochem.* 33, 12312-12322.

32. Wuebbens, M. W., Roush, E. D., Decastro, C. M. and Fierke, C. A. (1997) *Biochem.* 36, 4327-4336.

33. Fleming, M. D., Trenor, C. C. I., Su, M. A., Foernzler, D., Beier, D. R., F., D. W. and Andrews, N. C. (1997) *Nat Genet.* 16, 383-386.

34. Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L. and Hediger, M. A. (1997) *Nature* 388, 482.

35. Su, S. L., Huang, I. P., Fair, W. R., Powell, C. T. and Heston, W. D. (1995) *Cancer Res.* 55, 1441-1443.

36. Weissensteiner, T. (1998) *Nuc. Acids Res.* 26, 687.

37. Johnson, E. and Cotter, F. E. (1997) *Blood Rev.* 11, 46-55.

38. Liang, H., Fairman, J., Claxton, D. F., Nowell, P. C., Green, E. D. and Nagarajan, L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3781-3785.

39. Kristjansson, A. K., Eiriksdottir, G., Ragnarsson, G., Sigurdsson, A., Gudmundsson, J., Barkardottir, R. B., Jonasson, J. G., Egilsson, V. and Ingvarsson, S. (1997) *Anticancer Res.* 17, 93-98.

40. Kerr, J., Leary, J. A., Hurst, T., Shih, Y. C., Antalis, T. M., Friedlander, M., Crawford, E., Khoo, S. K., Ward, B. and Chenevix-Trench, G. (1996) *Oncogene* 13, 815-818.

41. Achille, A., Biasi, M. O., Zamboni, G., Bogina, G., Magalini, A. R., Pederzoli, P., Perucho, M. and Scarpa, A. (1996) *Cancer Res.* 56, 3808-3813.

【００６６】
【図面の簡単な説明】
【図１】　この図は、トランスフェリン受容体２（ＴｆＲ２）遺伝子の遺伝子地図である。
【図２】　この図は、ＴｆＲ２遺伝子のエクソン３－５のＤＮＡ配列を示す。四角でかこった配列は、β転写産物においてのみ見られる。
【図３】　この図は図４とともに、ＴｆＲ２－αの推定のアミノ酸配列を、ヒトのＴｆＲ及びＰＳＭＡ蛋白質のものと整列させて示すものである。
【図４】　この図は図３とともに、ＴｆＲ２－αの推定のアミノ酸配列を、ヒトのＴｆＲ及びＰＳＭＡ蛋白質のものと整列させて示すものである。
【図５】　この図は、ヒトのｍＲＮＡの多組織ブロットでのノーザンブロット分析の結果（Ａ）を示すものである。
【図６】　この図は、全ＲＮＡの細胞株ブロットでのノーザンブロット分析の結果（Ｂ）を示すものである。
【図７】　この図は図８とともに、ＴｆＲ２のα及びβ転写産物に対するプライマーで行ったＲＴ－ＰＣＲ（３５サイクル）、及びＧ３ＰＤＨのα及びβ転写産物に対するプライマーで行ったＲＴ－ＰＣＲ（２７サイクル）の代表的な結果を示すものである。
【図８】　この図は図７とともに、ＴｆＲ２のα及びβ転写産物に対するプライマーで行ったＲＴ－ＰＣＲ（３５サイクル）、及びＧ３ＰＤＨのα及びβ転写産物に対するプライマーで行ったＲＴ－ＰＣＲ（２７サイクル）の代表的な結果を示すものである。
【図９】　この図は図１０、１１とともに、ＴｆＲ２－α蛋白質の発現及び機能的分析を示すものである。
【図１０】　この図は図９、１１とともに、ＴｆＲ２－α蛋白質の発現及び機能的分析を示すものである。
【図１１】　この図は図９、１０とともに、ＴｆＲ２－α蛋白質の発現及び機能的分析を示すものである。
【図１２】　この図は、配列番号：１のＴｆＲ２蛋白質のアミノ酸配列を示す。
【図１３】　この図は、配列番号：２のＴｆＲ２－α遺伝子のＤＮＡ配列を示す。
【図１４】　この図は、配列番号：３のＴｆＲ２－βのＤＮＡ配列を示す。
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KAWABATA, HIROSHI
KOEFFLEER, H. PHILLIP

<120> NUCLEIC ACIDS ENCODING TRANSFERRIN RECEPTOR-LIKE PROTEINS AND PRODUCTS RELATED THERETO

<130> 8708/D7024 CEDERS-SINAI MEDICAL CENTER

<140> 60/107,502
<141> 1998-11-06

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 801
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 1

```
Met Glu Arg Leu Trp Gly Leu Phe Gln Arg Ala Gln Gln Leu Ser Pro
  1               5                  10                  15

Arg Ser Ser Gln Thr Val Tyr Gln Arg Val Glu Gly Pro Arg Lys Gly
             20                  25                  30

His Leu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Gly Ala Glu Thr Leu
         35                  40                  45

Ala His Phe Cys Pro Met Glu Leu Arg Gly Pro Glu Pro Leu Gly Ser
     50                  55                  60

Arg Pro Arg Gln Pro Asn Leu Ile Pro Trp Ala Ala Ala Gly Arg Arg
 65                  70                  75                  80

Ala Ala Pro Tyr Leu Val Leu Thr Ala Leu Leu Ile Phe Thr Gly Ala
                 85                  90                  95

Phe Leu Leu Gly Tyr Val Ala Phe Arg Gly Ser Cys Gln Ala Cys Gly
            100                 105                 110

Asp Ser Val Leu Val Val Ser Glu Asp Val Asn Tyr Glu Pro Asp Leu
        115                 120                 125

Asp Phe His Gln Gly Arg Leu Tyr Trp Ser Asp Leu Gln Ala Met Phe
```

```
    130                 135                 140

Leu Gln Phe Leu Gly Glu Gly Arg Leu Glu Asp Thr Ile Arg Gln Thr
145                 150                 155                 160

Ser Leu Arg Glu Arg Val Ala Gly Ser Ala Gly Met Ala Ala Leu Thr
                165                 170                 175

Gln Asp Ile Arg Ala Ala Leu Ser Arg Gln Lys Leu Asp His Val Trp
            180                 185                 190

Thr Asp Thr His Tyr Val Gly Leu Gln Phe Pro Asp Pro Ala His Pro
        195                 200                 205

Asn Thr Leu His Trp Val Asp Glu Ala Gly Lys Val Gly Glu Gln Leu
    210                 215                 220

Pro Leu Glu Asp Pro Asp Val Tyr Cys Pro Tyr Ser Ala Ile Gly Asn
225                 230                 235                 240

Val Thr Gly Glu Leu Val Tyr Ala His Tyr Gly Arg Pro Glu Asp Leu
                245                 250                 255

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

Val Arg Val Gly Val Ile Ser Phe Ala Gln Lys Val Thr Asn Ala Gln
        275                 280                 285

Asp Phe Gly Ala Gln Gly Val Leu Ile Tyr Pro Glu Pro Ala Asp Phe
    290                 295                 300

Ser Gln Asp Pro Pro Lys Pro Ser Leu Ser Ser Gln Gln Ala Val Tyr
305                 310                 315                 320

Gly His Val His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro
                325                 330                 335

Ser Phe Asn Gln Thr Gln Phe Pro Pro Val Ala Ser Ser Gly Leu Pro
            340                 345                 350

Ser Ile Pro Ala Gln Pro Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ser Arg Leu Leu
        355                 360                 365

Arg Lys Leu Lys Gly Pro Val Ala Pro Gln Glu Trp Gln Gly Ser Leu
    370                 375                 380

Leu Gly Ser Pro Tyr His Leu Gly Pro Gly Pro Arg Leu Arg Leu Val
```

385 390 395 400

Val Asn Asn His Arg Thr Ser Thr Pro Ile Asn Asn Ile Phe Gly Cys
405 410 415

Ile Glu Gly Arg Ser Glu Pro Asp His Tyr Val Val Ile Gly Ala Gln
420 425 430

Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Ala Val Gly Thr Ala
435 440 445

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

Phe Arg Pro Arg Arg Ser Leu Leu Phe Ile Ser Trp Asp Gly Gly Asp
465 470 475 480

Phe Gly Ser Val Gly Ser Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Val
485 490 495

Leu His Leu Lys Ala Val Val Tyr Val Ser Leu Asp Asn Ala Val Leu
500 505 510

Gly Asp Asp Lys Phe His Ala Lys Thr Ser Pro Leu Leu Thr Ser Leu
515 520 525

Ile Glu Ser Val Leu Lys Gln Val Asp Ser Pro Asn His Ser Gly Gln
530 535 540

Thr Leu Tyr Glu Gln Val Val Phe Thr Asn Pro Ser Trp Asp Ala Glu
545 550 555 560

Val Ile Arg Pro Leu Pro Met Asp Ser Ser Ala Tyr Ser Phe Thr Ala
565 570 575

Phe Val Gly Val Pro Ala Val Glu Phe Ser Phe Met Glu Asp Asp Gln
580 585 590

Ala Tyr Pro Phe Leu His Thr Lys Glu Asp Thr Tyr Glu Asn Leu His
595 600 605

Lys Val Leu Gln Gly Arg Leu Pro Ala Val Ala Gln Ala Val Ala Gln
610 615 620

Leu Ala Gly Gln Leu Leu Ile Arg Leu Ser His Asp Arg Leu Leu Pro
625 630 635 640

Leu Asp Phe Gly Arg Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg His Ile Gly Asn

645 650 655

Leu Asn Glu Phe Ser Gly Asp Leu Lys Ala Arg Gly Leu Thr Leu Gln
660 665 670

Trp Val Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Tyr Ile Arg Ala Ala Glu Lys Leu
675 680 685

Arg Gln Glu Ile Tyr Ser Ser Glu Glu Arg Asp Glu Arg Leu Thr Arg
690 695 700

Met Tyr Asn Val Arg Ile Met Arg Val Glu Phe Tyr Phe Leu Ser Gln
705 710 715 720

Tyr Val Ser Pro Ala Asp Ser Pro Phe Arg His Ile Phe Met Gly Arg
725 730 735

Gly Asp His Thr Leu Gly Ala Leu Leu Asp His Leu Arg Leu Leu Arg
740 745 750

Ser Asn Ser Ser Gly Thr Pro Gly Ala Thr Ser Ser Thr Gly Phe Gln
755 760 765

Glu Ser Arg Phe Arg Arg Gln Leu Ala Leu Leu Thr Trp Thr Leu Gln
770 775 780

Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asn Ile Asp Asn Asn
785 790 795 800

Phe

<210> 2
<211> 2877
<212> DNA
<213> human genome

<400> 2
ctgcaggctt caggagggga cacaagcatg gagcggcttt ggggtctatt ccagagagcg 60
caacaactgt ccccaagatc ctctcagacc gtctaccagc gtgtggaagg ccccggaaa 120
gggcacctgg aggaggaaga ggaagacggg gaggaggggg cggagacatt ggcccacttc 180
tgccccatgg agctgagggg ccctgagccc ctgggctcta gacccaggca gccaaacctc 240
attccctggg cggcagcagg acggagggct gccccctacc tggtcctgac ggccctgctg 300
atcttcactg gggccttcct actgggctac gtcgccttcc gagggtcctg ccaggcgtgc 360
ggagactctg tgttggtggt cagtgaggat gtcaactatg agcctgacct ggatttccac 420
cagggcagac tctactggag cgacctccag gccatgttcc tgcagttcct gggggagggg 480
cgcctggagg acaccatcag gcaaaccagc cttcgggaac gggtggcagg ctcggccggg 540

atggccgctc tgactcagga cattcgcgcg gcgctctccc gccagaagct ggaccacgtg 600
tggaccgaca cgcactacgt ggggctgcaa ttcccggatc cggctcaccc caacaccctg 660
cactgggtcg atgaggccgg gaaggtcgga gagcagctgc cgctggagga ccctgacgtc 720
tactgccgct acagcgccat cggcaacgtc acgggagagc tggtgtacgc ccactacggg 780
cggcccgaag acctgcagga cctgcgggcc aggggcgtgg atccagtggg ccgcctgctg 840
ctggtgcgcg tgggggtgat cagcttcgcc cagaaggtga ccaatgctca ggacttcggg 900
gctcaaggag tgctcatata cccagagcca gcggacttct cccaggaccc acccaagcca 960
agcctgtcca gccagcaggc agtgtatgga catgtgcacc tgggaactgg agacccctac 1020
acacctggct tccattcctt caatcaaacc cagttccctc cagttgcatc atcaggcctt 1080
cccagcatcc cagcccagcc catcagtgca gacattgcct cccgcctgct gaggaagctc 1140
aaaggccctg tggcccccca agaatggcag gggagcctcc taggctcccc ttatcacctg 1200
ggccccgggc cacgactgcg gctagtggtc aacaatcaca ggacctccac ccccatcaac 1260
aacatcttcg gctgcatcga aggccgctca gagccagatc actacgttgt catcggggcc 1320
cagagggatg catggggccc aggagcagct aaatccgctg tggggacggc tatactcctg 1380
gagctggtgc ggacctttcc ctccatggtg agcaacggct tccggccccg cagaagtctc 1440
ctcttcatca gctgggacgg tggtgacttt ggaagcgtgg gctccacgga gtggctagaa 1500
ggctacctca gcgtgctgca cctcaaagcc gtagtgtacg tgagcctgga caacgcagtg 1560
ctgggggatg acaagtttca tgccaagacc agccccgttc tgacaagtct cattgagagt 1620
gtcctgaagc aggtggattc tcccaaccac agtgggcaga ctctctatga acaggtggtg 1680
ttcaccaatc ccagctggga tgctgaggtg atccggcccc tacccatgga cagcagtgcc 1740
tattccttca cggcctttgt gggagtccct gccgtcgagt tctcctttat ggaggacgac 1800
caggcctacc cattcctgca cacaaaggag gacacttatg agaacctgca taaggtgctg 1860
caaggccgcc tgcccgccgt ggcccaggcc gtggcccagc tcgcagggca gctcctcatc 1920
cggctcagcc acgatcgcct gctgcccctc gacttcggcc gctacgggga cgtcgtcctc 1980
aggcacatcg ggaacctcaa cgagttctct ggggacctca aggcccgcgg gctgaccctg 2040
cagtgggtgt actcggcgcg gggggactac atccgggcgg cggaaaagct gcggcaggag 2100
atctacagct cggaggagag agacgagcga ctgacacgca tgtacaacgt gcgcataatg 2160
cgggtggagt tctacttcct ttcccagtac gtgtcgccag ccgactcccc gttccgccac 2220
atcttcatgg gccgtggaga ccacacgctg ggcgccctgc tggaccacct gcggctgctg 2280
cgctccaaca gctccgggac ccccgggccc acctcctcca ctggcttcca ggagagccgt 2340
ttccggcgtc agctagccct gctcacctgg acgctgcaag gggcagccaa tgcgcttagc 2400
ggggatgtct ggaacattga taacaacttc tgaggccctg gggatcctca catccccgtc 2460
ccccagtcaa gagctcctct gctcctcgct tgaatgattc agggtcaggg aggtggctca 2520
gagtccacct ctcattgctg atcaatttct cattaccccc acacatctct ccacggagcc 2580
cagaccccag cacagatatc cacacacccc agccctgcag tgtagctgac cctaatgtga 2640
cggtcatact gtcggttaat cagagagtag catccccttca atcacagccc cttccccttt 2700
ctggggtcct ccatacctag agaccactct gggaggtttg ctaagccctg ggacctggcc 2760
agctctgtta gtgggagaga tcgctggcac catagcctta tggccaacag gtggtctgtg 2820
gtgaaagggg cgtggagttt caatatcaat aaaccacctg atatcaataa gccaaaa 2877

<210> 3
<211> 2519
<212> DNA
<213> human genome

<400> 3
gcgtccgcgg ggagcgctct tttcctaaac tcaggaaccc ctcgccgccc ctgccccctgg 60

```
cgaccccacg tctctggcat ccttcccctct tccctccctc tcctccgggc gcccaaaaaa 120
gtccccacct ctccccgctt aggcaaacca gccttcggga acgggtggca ggctcggccg 180
ggatggccgc tctgactcag gacattcgcg cggcgctctc ccgccagaag ctggaccacg 240
tgtggaccga cacgcactac gtggggctgc aattcccgga tccggctcac cccaacaccc 300
tgcactgggt cgatgaggcc gggaaggtcg gagagcagct gccgctggag gaccctgacg 360
tctactgccc ctacagcgcc atcggcaacg tcacgggaga gctggtgtac gcccactacg 420
ggcggcccga agacctgcag gacctgcggg ccaggggcgt ggatccagtg ggccgcctgc 480
tgctggtgcg cgtgggggtg atcagcttcg cccagaaggt gaccaatgct caggacttcg 540
gggctcaagg agtgctcata tacccagagc cagcggactt ctcccaggac ccacccaagc 600
caagcctgtc cagccagcag gcagtgtatg gacatgtgca cctgggaact ggagacccct 660
acacacctgg cttcccttcc ttcaatcaaa cccagttccc tccagttgca tcatcaggcc 720
ttcccagcat cccagcccag cccatcagtg cagacattgc ctcccgcctg ctgaggaagc 780
tcaaaggccc tgtggccccc caagaatggc aggggagcct cctaggctcc ccttatcacc 840
tgggccccgg gccacgactg cggctagtgg tcaacaatca caggacctcc acccccatca 900
acaacatctt cggctgcatc gaaggccgct cagagccaga tcactacgtt gtcatcgggg 960
cccagaggga tgcatgggcc ccaggagcag ctaaatccgc tgtggggacg gctatactcc 1020
tggagctggt gcggaccttt tcctccatgg tgagcaacgg cttccggccc cgcagaagtc 1080
tcctcttcat cagctgggac ggtggtgact ttggaagcgt gggctccacg gagtggctag 1140
aaggctacct cagcgtgctg cacctcaaag ccgtagtgta cgtgagcctg gacaacgcag 1200
tgctgggggа tgacaagttt catgccaaga ccagcccccт tctgacaagt ctcattgaga 1260
gtgtcctgaa gcaggtggat tctcccaacc acagtgggca gactctctat gaacaggtgg 1320
tgttcaccaa tcccagctgg gatgctgagg tgatccggcc cctacccatg gacagcagtg 1380
cctattcctt cacggccttt gtgggagtcc ctgccgtcga gttctccttt atggaggacg 1440
accaggccta cccattcctg cacacaaagg aggacactta tgagaacctg cataaggtgc 1500
tgcaaggccg cctgcccgcc gtggcccagg ccgtggccca gctcgcaggg cagctcctca 1560
tccggctcag ccacgatcgc ctgctgcccc tcgacttcgg ccgctacggg gacgtcgtcc 1620
tcaggcacat cgggaacctc aacgagttct ctggggacct caaggcccgc gggctgaccc 1680
tgcagtgggt gtactcggcg cgggggact acatccgggc ggcggaaaag ctgcggcagg 1740
agatctacag ctcggaggag agagacgagc gactgacacg catgtacaac gtgcgcataa 1800
tgcgggtgga gttctacttc ctttcccagt acgtgtcgcc agccgactcc ccgttccgcc 1860
acatcttcat gggccgtgga gaccacacgc tgggcgccct gctggaccac ctgcggctgc 1920
tgcgctccaa cagctccggg acccccgggg ccacctcctc cactggcttc caggagagcc 1980
gtttccggcg tcagctagcc ctgctcacct ggacgctgca aggggcagcc aatgcgctta 2040
gcggggatgt ctggaacatt gataacaact tctgaggccc tggggatcct cacatccccg 2100
tcccccagtc aagagctcct ctgctcctcg cttgaatgat tcagggtcag ggaggtggct 2160
cagagtccac ctctcattgc tgatcaattt ctcattaccc ctacacatct ctccacggag 2220
cccagacccc agcacagata tccacacacc ccagccctgc agtgtagctg accctaatgt 2280
gacggtcata ctgtcggtta atcagagagt agcatccctt caatcacagc cccttccccт 2340
ttctggggtc ctccatacct agagaccact ctgggaggtt tgctaggccc tgggacctgg 2400
ccagctctgt tagtgggaga gatcgctggc accatagcct tatggccaac aggtggtctg 2460
tggtgaaagg ggcgtggagt ttcaatatca ataaaccacc tgatatcaat aagccaaaa  2519
```

【図１】

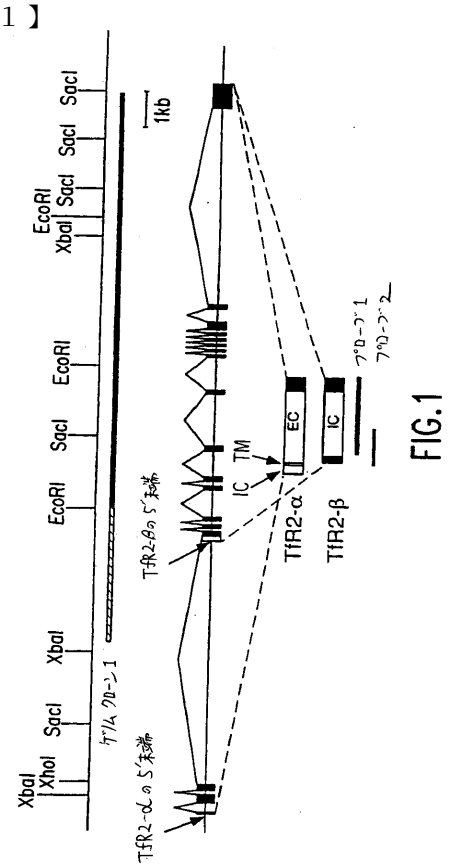


FIG.1

【図２】

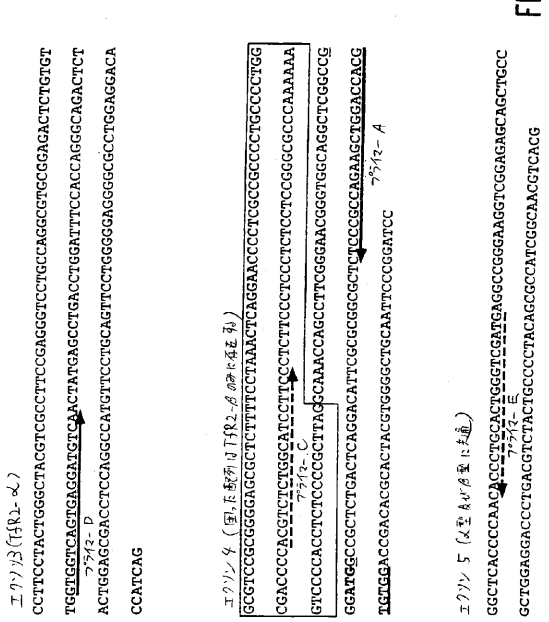


FIG.2

【図３】

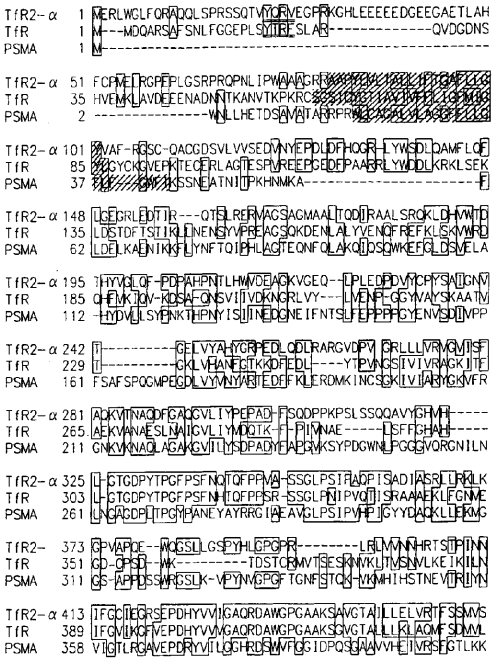


FIG.3A

【図４】

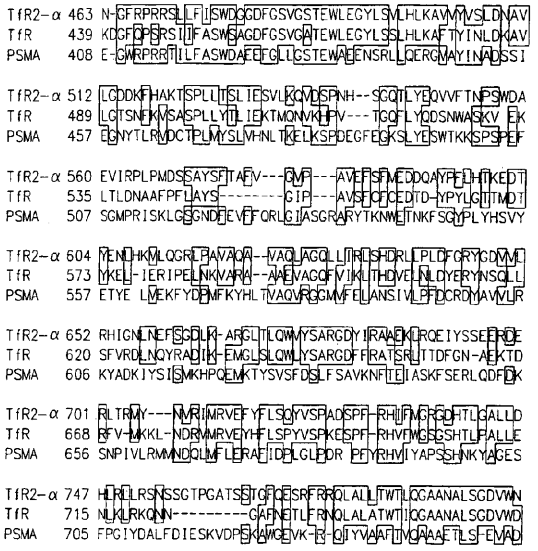
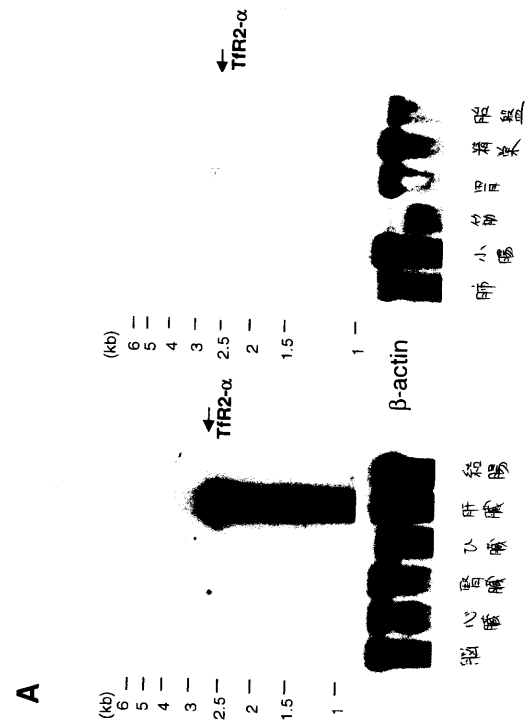
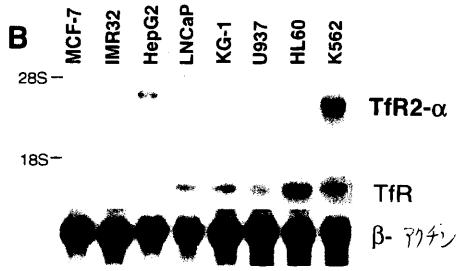


FIG.3B

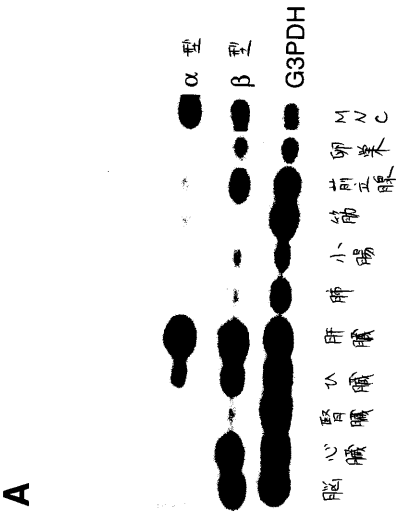
【図５】



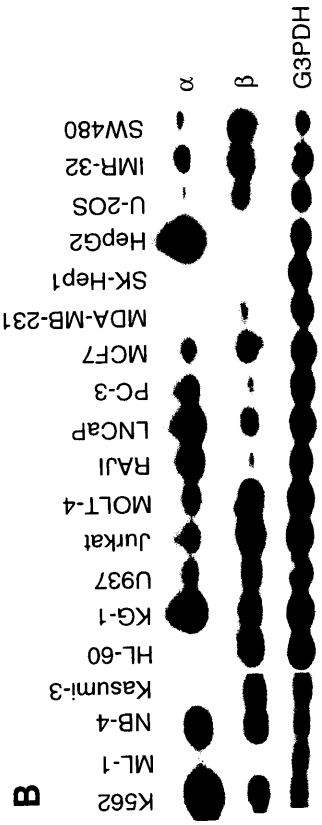
【図６】



【図７】



【図８】



【図９】

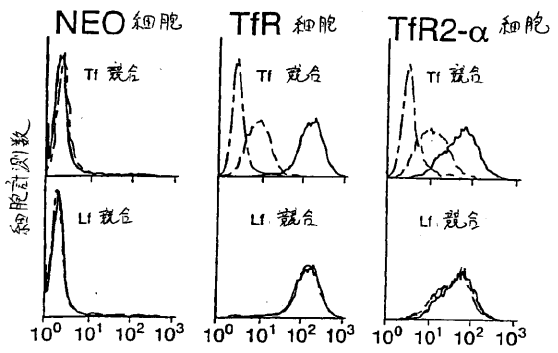


FIG.6A

【図１０】

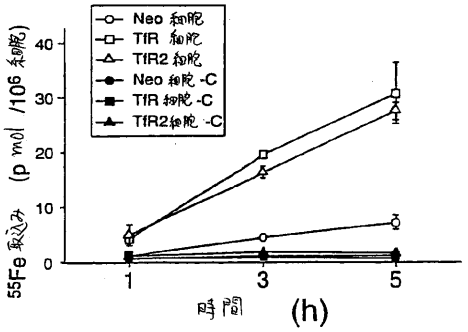
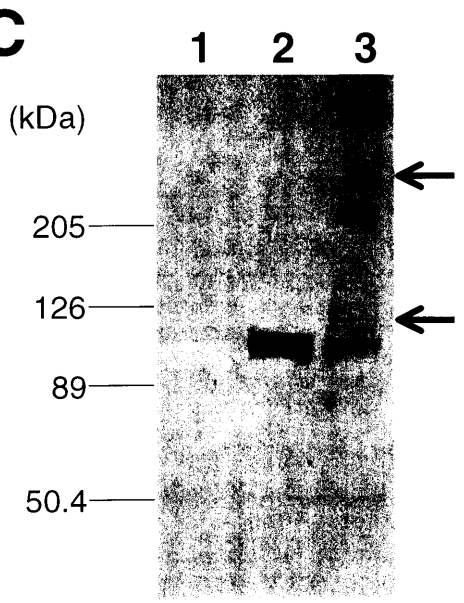


FIG.6B

【図１１】



【図１２】

MERLWGLFQRAQQLSPRSSQTVYQRVEGPRKGHLEEEEEDGEEGAETLAHFCPMELRGPEPLGSRPRQPNLIPWAAAGRR
AAPYLVLTALLIFTGAFLLGYVAFRGSCQACGDSVLVVSEDVNYEPDLDFHQGRLYWSDLQAWFLQFLGEGRLEDTIRQT
SLRERVAGSAGMAALTQDIRAALSRQKLDHVWTDTHYVGLQFPDPAHPNTLHWVDEAGKVGEQLPLEDPDVYCPYSAIGN
VTGELVYAHYGRPEDLQDLRARGVDPVGRLLLVRVGVISFAQKVTNAQDFGAQGVLIYPEPADFSQDPPKPSLSSQQAVY
GHVHLGTGDPYTPGFPSFNQTQFPPVASSGLPSIPAQPISADIASRLLRKLKGPVAPQEWQGSLLGSPYHLGPGPRLRLV
VNNHRTSTPINNIFGCIEGRSEPDHYVVIGAQRDAWGPGAAKSAVGTAILLELVRTFSSMVSNGFRPRRSLLFISWDGGD
FGSVGSTEWLEGYLSVLHLKAVVYVSLDNAVLGDDKFHAKTSPLLTSLIESVLKQVDSPNHSGQTLYEQVVFTNPSWDAE
VIRPLPMDSSAYSFTAFVGVPAVEFSFMEDDQAYPFLHTKEDTYENLHKVLQGRLPAVAQAVAQLAGQLLIRLSHDRLLP
LDFGRYGDVVLRHIGNLNEFSGDLKARGLTLQWVYSARGDYIRAAEKLRQEIYSSEERDERLTRMYNVRIMRVEFYFLSQ
YVSPADSPFRHIFMGRGDHTLGALLDHLRLLRSNSSGTPGATSSTGFQESRFRRQLALLTWTLQGAANALSGDVWNIDNN
F

FIG.7

【図１３】

CTGCAGGCTTCAGGAGGGGACACAAGCATGGAGCGGCTTTGGGGTCTATTCCAGAGAGcGCAACAACTGTCCCCAAGATC
CTCTCAGACCGTCTACCAGCGTGTGGAAGGCCCCCGGAAAGGCCACCTGGAGCAGCAAGACGAACACGGGGAGGAGGGG
CGGAGACATTGGCCCCACTCTGCCCCATGGAGCTGAGGGCCCTGAGCCCCTGGGCTCTAGACCCAGGCAGCCAAACCTC
ATTCCCTGCGCGGCCAGCAGGACGGAGGGCTGCCCCCCTACCTGGTCCTGACGGCCCTGCTGATCTTCACTGGGGCCTTCCT
ACTGGGCTACGTCGCCTTCCGAGGGTCCTGCCAGGCGTGCGGAGACTCTGTGTTGGTGGTCAGTGAGGATGTCAACTATG
AGCCTGACCTGGATTTCCACCAGGGcagactctactggaGcgaccCtccaGgccatgttcctgcagttcctgggggaGggg
CgcctggaGgaCcccaTCAGCCAAACCAGCCTTCGGGAACGGGTGGCAGGCTCGGCCGGGATGCGCCGCTCTGACTCAGGA
CATTCGCCCGGCGCTCTCCCCCCAGAAGCTGGACCACGTGTGGACCGACACGCACTACGTCGGGCTGCAATTCCCGGATC
CGGCTCACCCCAACACCCTGCACTGGCTGCATGAGGCCGGGAAGGTCGGAGAGCAGCTGCCGCTGGAGGACCCTGACGTC
TACTGCCCCTACAGcGCCATCGGCAACGTCACGGGAGAGCTGGTGTAcGCCCACTACGGCGGCCCGAAGACCTGCAGGA
CcTGCGGCCCAGGGGCGTGGATCCAGTGGGCCGCCTGCTGCTGGTGCGCGTGGGGGTGATCagcTTCGCCCAGAAGGTGA
CCAATGCTCAGGACTTCGCGGCTCAAGGAGTGCTCATATACCCAGAGCCAGCGGACTTCTCCCAGGACCCACCCAAGCCA
AGCCTGTCCACCCAGCAGGCAGTGTATGGACATGTGCACCTGGGAACTGGAgACCCcTACACACCTGCCTTCCCTTCCTT
CAATCAAACCCAGTTCCCTCCAGTTGCATCATCAGGCCTTCCCAGCATCCcAGCCCAGCCCATCAGTGCAGACATTGCCT
CCCGCCTGCTGAGGAACCTCAAAGGCCCTGTGGCCCCCCAAGAATGGCAGGGGAGCCTCCTAGGCTCCCCTTATCACCTG
GGCCCCCGGCCCACGACTGCCGCCTAGTGCTCAACAATCACAGGACCTCCACCCCCATCAACAACATCTTCGGCTGCATCGA
AGGCCGCTCAGAGCCAGATCACTACGTTGTCATCGGGGCCCAGAGGGATGCATGGGGCCCAGGAGCAGCTAAATCCGCTG
TGGGCACGGCTATACTCCTGGAGCTGGTGCGGACCTTTTCCTCCATGGTGAGCAACGGCTTCCGGCCCCGCAGAAGTCTC
CTCTTCATCAGCTGGGACGGTGGTGACTTTGGAAGCGTGGCCTCCACGGAGTGGCTAGAAGGCTACCTCAGCGTGCTGCA
CCTCAAAGCCGTAGTGTACGTGAGCCTGGACAACGCAGTGCTGGGGGATGACAAGTTTCATGCCAAGACCAGCCCCCTTC
TGACAAGTCTCATTGAGAGTGTCCTGAAGCAGGTGGATTCTCCCAACCACAGTGGGCAGACTCTCTATGAACAGGTGGTG
TTCACCAATCCCAGCTGGGATGCTGAGGTGATCCGGCCCCTACCCATGGACAGCAGTGCCTATTCCTTCACGGCCTTTGT
GGGAGTCCCTGCCGTGAGTTCTCCTTTATGGAGGACGACCAGGCCTACCCATTCCTGCACACAAAGGAGGACACTTATG
AGAACCTGCATAAGGTGCTGCAAGGCCGCCTGCCCGCCGTGGCCCAGCCGTGCCCCAGCTCGCAGGGCAGCTCCTCATC
CGGCTCAGCCACGATCGCCTGCTGCCCCTCGACTTCGGCCGCTACCGGGACGTCGTCCTCAGGCACATCGGGAACCTCAA
CGAGTTCTCTGGGGACCTCAAGGCCCCCGGCCTGACCCTGCAGTGGGTGTACTCGGCCCGGGGGGACTACATCCGGGCGG
CGGAAAAGCTGCGGCAGGAGATCTACAGCTCGGAGGAGAGACGAGCGACTGACACGCATGTACAACGTCGCCATAATC
CGGGTGGAGTTCTACTTCCTTTCCCAGTACGTGTCGCCAGCCGACTCCCCGTTCCGCCACATCTTCATGGGCCGTGGAGA
CCACACGCTGGGCGCCCTGCTGGACCACCTGCGCCTGCTGCGCCTCCAACAGCTCCGGGACCCCCGGGGCCACCTCCTCCA
CTGGCTTCCAGGAGAGCCGTTTCCGGCGTCAGCTAGCCCTGCTCACCTGGACGCTGCAAGGGCCAGCCAATGGCCTTAGC
GGGGATGTCTGGAACATTGATAACAACTTCTGAGGCCCTGGGGATCCTCACATCCCCGTCCCCCAGTCAAGAGCTCCTCT
GCTCCTCCCTTGAATGATTCAGGCTCAGGGAGGTGGCTCAGAGTCCACCTCTCATTGCTGATCAATTTCTCATTACCCCT
ACACATCTCTCCACGGAGCCCAGACCCCAGCACAGATATCCACACACCCCAGCCCTGCAGTGTAGCTGACCCTAATGTGA
CGGTCATACTGTCGGTTAATCAGAGAGTAGCATCCCTTCAATCACAGCCCCTTCCCCTTTCTGCGGCTCCTCCATACCTAG
AGACCACTcTGGGAGGTTTGCTAGGCCCTGGGACCTGCCCAGCTCTGTTAGTGGGACAGATCCCTGGCACCATAGCCTTA
TGGCCAACAGGTGGTcTGTGGTGAAAGGGCGTGGAGTTTCAATATCAATAAACCACCTGATATCAATAAGCCAAAA

FIG.8

【図１４】


GCGTCCGCGGGGAGCGCTCTTTTCCTAAACTCAGGAACCCCTCGCCGCCCCTGCCCCTGGCGACCCCACGTCTCTGCCAT
CCTTCCCTCTTCCCTCCCTCTCCTCCGGGCGCCCAAAAAAGTCCCCACCTCTCCCCCCTTAGGCAAACCAGCCTTCGGGA
ACGGGTGCCAGGCTCGGCCGGGATGGCCGCTCTGACTCAGGACATTCGCGCGGCGCTCTCCCCCCAGAAGCTGGACCACG
TGTGGACCGACACGCACTACGTGGGGCTGCAATTCCCCGATCCGCCTCACCCCAACACCCTGCACTGGGTCGATGAGGCC
GGGAAGGTCGGAGACGCAGCTGCCGCTGGAGGACCCTGACGTCTACTGCCCCTACAGcGCCATCGGCAACGTCACGGGAGA
GCTGGTGTAcGCCCACTACGGGCGGCCCGAAGACCTGCAGGACcTGCCGGCCCAGGGCCGTGCATCCAGTGGGCCGCCTGC
TGCTGGTGCCGCGTGGGGGTGATCggcTTCGCCCAGAAGGTGACCAATGCTCAGGACTTCGGGGCTCAAGGAGTGCTCATA
TACCCAGAGCCAGCGGACTTCTCCCAGGACCCACCCAAGCCAAGCCTGTCCAGCCACCAGCCAGTGTATGGACATGTGCA
CCTGGGAACTGGAgACCCcTACACACCTGGCTTCCCTTCCTTCAATCAAACCCAGTTCCCTCCAGTTGCATCATCAGGCC
TTCCCAGCATCCcAGCCCAGCCCATCAGTCCAGACATTGCCTCCCGCCTCCTGAGGAAGCTCAAAGCCCCTGTGGCCCCC
CAAGAATGGCAGGGGAGCCTCCTAGGCTCCCCTTATCACCTGGGCCCCCGGCCACGACTCCGGCTACTCGTCAACAATCA
CAGCACCTCCACCCCCCATCAACAACATCTTCGGCTGCATCGAAGGCCGCTCAGAGCCAGATCACTACGTTGTCATCGGGG
CCCAGAGGGATGCATGGGGCCCAGGAGCAGCTAAATCCGCTCTGCGGGACCGCTATACTCCTGGAGCTGGTCCCGACCTTT
TCCTCCATGGTGAGCAACGGCTTCCGGCCCCCGCAGAAGTCTCCTCTTCATCAGCTGCGAGGGTGGTGACTTTCGAAGCGT
GGGCTCCACGGAGTGGCTAGAAGGCTACCTCACCGTGCTGCACCTCAAAGCCGTAGTGTACGTGAGCCTGGACAACGCAG
TGCTGCGGGATGACAAGTTTCATGCCAAGACCAGCCCCCTTCTGACAAGTCTCATTGAGAGTGTCCTGAAGCAGGTGGAT
TCTCCCAACCACAGTGGGCAGACTCTCTATGAACAGGTGGTGTTCACCAATCCCAGCTGGGATGCTGAGGTGATCCGGCC
CCTACCCATGGACAGCAGTGCCTATTCCTTCACGGCCTTTGTGGGAGTCCCTGCCGTCGAGTTCTCCTTTATGGAGGACG
ACCAGGCCTACCCATTCCTGCACACAAAGGAGGACACTTATGAGAACCTGCATAAGGTGCTGCAAGGCCGCCTGCCCGCC
GTGGCCCAGGCCGTGGCCCAGCTCGCAGGGCAGCTCCTCATCCGGCTCAGCCACGATCGCCTGCTGCCCCTCGACTTCGG
CCGCTACGGGGACGTCGTCCTCAGGCACATCGGGAACCTCAACGAGTTCTCTGGGGACCTCAAGGCCCGCGGGCTGACCC
TGCAGTGGGTGTACTCGGCCGCGGGGGACTACATCCGGCCGCGGAAAAGCTGCGGCAGGAGATCTACAGCTCGGAGGAG
AGAGACGAGCGACTGACACGCATGTACAACGTGCGCATAATGCGGGTGGAGTTCTACTTCCTTTCCCAGTACGTGTCGCC
AGCCGACTCCCCGTTCCGCCACATCTTCATGGGCCGTGGAGACCACACGCTGGGCGCCCTGCTGGACCACCTGCGGCTGC
TGCGCTCCAACAGCTCCGGGACCCCCGGGGCCACCTCCTCCACTGGCTTCCAGGAGAGCCGTTTCCGGCGTCAGCTAGCC
CTGCTCACCTGGACGCTGCAAGGGGCAGCCAATGCGCTTAGCGGGGATGTCTGGAACATTGATAACAACTTCTGAGGCCC
TGGGGATCCTCACATCCCCGTCCCCCAGTCAAGAGCCTCCTCTGCTCCTCGCTTGAATGATTCAGGGTCAGGGAGGTGGCT
CAGAGTCCACCTCTCATTGCTGATCAATTTCTCATTACCCCTACACATCTCTCCACGGAGCCCAGACCCCAGCACAGATA
TCCACACACCCCAGCCCTGCAGTGTAGCTGACCCTAATGTGACGGTCATACTGTCGGTTAATCAGAGAGTAGCATCCCTT
CAATCACAGCCCCTTCCCCTTTCTGGGGTCCTCCATACCTAGAGACCACTcTGGGAGGTTTGCTAGGCCCTGGGACCTGG
CCAGCTCTGTTAGTGGGAGAGATCGCTGGCACCATAGCCTTATGGCCAACAGGTGGTcTGTGGTGAAAGGGGCGTGGAGT
TTCAATATCAATAAACCACCTGATATCAATAAGCCAAAA

FIG.9

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12Q	***1/68***	***(2006.01)***	C12Q	1/68	A
C07K	***14/705***	***(2006.01)***	C07K	14/705	
C07K	***16/28***	***(2006.01)***	C07K	16/28	
G01N	***33/53***	***(2006.01)***	G01N	33/53	D
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	C12P	21/08	

(74)代理人 100107836
弁理士 西 和哉
(74)代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦
(74)代理人 100110364
弁理士 実広 信哉
(72)発明者 ヒロシ・カワバタ
アメリカ合衆国・カリフォルニア・９００６４・ロス・アンジェルス・アムハースト・アヴェニュ・２５００
(72)発明者 エイチ・フィリップ・コーフラー
アメリカ合衆国・カリフォルニア・９００４９・ロス・アンジェルス・リヴァーズ・ロード・１３１４１

審査官 三原 健治

(56)参考文献 Nature, Vol.311(1984), p.675-678
Clin.Cancer Res., Vol.1,No.11(1995), p.1259-1265
Scand.J.Immunol., Vol.20,No.5(1984), p.441-447
Genome Res., Vol.8,No.10(1998,Oct.), p.1060-1073
Hepatology, Vol.23,No.6(1996), p.1512-1520

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00-15/90
C07K 14/00-14/825
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
JSTPlus(JDream2)