

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年3月6日 (06.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/018806 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/47 (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.); 〒104-0061 東京都中央区銀座二丁目6番12号 大倉本館 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/08520
- (22) 国際出願日: 2002年8月23日 (23.08.2002) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2001-255198 2001年8月24日 (24.08.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 久光製薬株式会社 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.) [JP/JP]; 〒841-0017 佐賀県鳥栖市田代大官町408 Saga (JP). 千葉県 (CHIBA-PREFECTURE) [JP/JP]; 〒260-8667 千葉県千葉市中央区市場町1番1号 Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中川原 章 (NAKA-GAWARA, Akira) [JP/JP]; 〒260-0801 千葉県千葉市中央区仁戸名町666-2 千葉県がんセンター内 Chiba (JP). 服部 正平 (HATTORI, Masahira) [JP/JP]; 〒183-0023 東京都府中市宮町1-3 6-5 Tokyo (JP). 榊 佳之 (SAKAKI, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒236-0045 神奈川県横浜市金沢区釜利谷南2-5 1-4 2 Kanagawa (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL HUMAN BMCC1 GENE

(54) 発明の名称: 新規ヒトBMCC1遺伝子

(57) Abstract: A human BMCC1 protein characterized by having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 in Sequence Listing and its variant proteins; and a human BMCC1 gene characterized by having the base sequence represented by SEQ ID NO:2 in Sequence Listing and its variant genes.

(57) 要約:

配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とするヒトBMCC1タンパク質およびその変異タンパク質、並びに配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有することを特徴とするヒトBMCC1遺伝子およびその変異遺伝子。

WO 03/018806 A1

明細書

新規ヒトBMCC1遺伝子

技術分野

本発明は、BNIP2の一部が高いホモロジーを有する、新規ヒトBMCC1
5 タンパク質および新規ヒトBMCC1遺伝子に関する。

背景技術

(腫瘍形成と遺伝子)

個々の腫瘍にはそれぞれの個性があり、発がんの基本的な原理は同じであって
も、その生物学的特性は必ずしも同じではない。近年、がんの分子生物学や分子
10 遺伝学が急速に進歩し、発がんやいわゆる腫瘍細胞のバイオロジーが遺伝子レベ
ルで説明できるようになってきた。

(神経芽細胞腫)

神経芽細胞腫は、末梢交感神経系細胞に由来する交感神経節細胞と副腎髄質細
胞から発生する小児癌である。この交感神経系細胞は、発生初期の神経堤細胞が
15 腹側へ遊走し、いわゆる交感神経節が形成される場所で分化成熟したものである。
その一部の細胞は、さらに副腎部へ遊走し、先に形成されつつある副腎皮質を貫
通して髄質部に達し、そこで髄質を形成する。神経堤細胞は、ほかの末梢神経細
胞の起源ともなっており、後根神経節（知覚神経）、皮膚の色素細胞、甲状腺C細
胞、肺細胞の一部、腸管神経節細胞などへ分化する。

20 (神経芽細胞腫の予後)

神経芽細胞腫は多彩な臨床像を示すことが特徴である（中川原：神経芽腫の発
生とその分子機構 小児内科30、143 1998）。例えば、1歳未満で発症
する神経芽細胞腫は非常に予後が良く、大部分が分化や細胞死（アポトーシス）
を起こして自然退縮する。現在、広く実施されている生後6か月時の尿のマスス
25 クリーニングで陽性となる神経芽細胞腫の多くは、この自然退縮を起こしやすい
ものに属する。一方、1歳以上で発症する神経芽細胞腫は悪性度が高く、多くの

場合、治療に抵抗して患児を死に至らしめる。1歳以上の悪性度の高い神経芽細胞腫は、体細胞突然変異 (Somatic mutation) が起こり、モノクローナルであるのに対し、自然退縮する神経芽細胞腫では生殖細胞突然変異 (germline mutation) のみの遺伝子変異でとどまっているとの仮説もある (Knudson AG等: Regression of neuroblastoma IV-S: A genetic hypothesis. N Engl J Med 302, 1254 (1980))。

(神経芽細胞腫の予後を推定する遺伝子)

最近の分子生物学的研究の進展により、神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) の高親和性レセプターである TrkA の発現が分化と細胞死の制御に深くかかわっていることが明らかとなってきた (Nakagawara A. The NGF story and neuroblastoma. Med Pediatr Oncol 31, 113 (1998))。Trk は神経栄養因子の高親和性受容体で、膜貫通型受容体であり、Trk-A、B、C の3つが主なものである。

Trkファミリー受容体は、中枢神経および末梢神経系において、特異的な神経細胞の分化と生存維持に重要な役割を果たしている (中川原等: 神経芽細胞腫におけるニューロトロフィン受容体の発現と予後 小児外科 29: 425-432, 1997)。腫瘍細胞の生存や分化は、TrkチロシンキナーゼやRetチロシンキナーゼからのシグナルで制御されている。なかでも、TrkA受容体の役割は最も重要で、予後良好な神経芽細胞腫ではTrkAの発現が著しく高く、これからのシグナルが腫瘍細胞の生存・分化、または細胞死 (アポトーシス) を強く制御している。一方、予後不良な神経芽細胞腫では、TrkAの発現が著しく抑えられており、これに代わってTrkBあるいはRetからのシグナルが生存の促進という形で腫瘍の進展を助長している。

また、神経の癌遺伝子であるN-mycの増幅が神経芽細胞腫の予後に関連して

いることが明らかになってきた（中川原：脳・神経腫瘍の多段階発癌 *Molecular Medicine* 364, 366 (1999)）。この遺伝子は神経芽細胞腫で初めてクローニングされたが、正常細胞や予後良好な神経芽細胞腫では通常1倍体当たり1つしか存在しないのに対し、予後不良の神経芽細胞腫
5 においては数十倍に増幅されることが見出された。

しかしながら、現在までに神経芽細胞腫に発現されている癌遺伝子は、N-myc以外に知られておらず、その予後の良不良に関する遺伝子情報に関してもN-mycとTrkA以外についてはほとんど知られていなかった。

発明の開示

10 本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、神経芽細胞腫の予後良不良に関係する遺伝子の塩基配列を明らかにし、その遺伝子情報および前記遺伝子の転写産物であるタンパク質の機能に関する情報を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、ヒト神経芽細胞腫の予後を検定し、予後良好および予後不良の臨床組織の各々からcDNAライブラリーを作製することに成功した。この2種類のcDNAライブラリーから
15 各々約2400クローンをクローニングし、神経芽細胞腫の予後の良不良によって分類した。

さらに本発明者らは、分類された遺伝子のうち、神経芽細胞腫の予後良好な臨床組織でのみ発現が増強している遺伝子を見だし、その一つをBMCC1と名付けた。
20

本発明は新規なヒトBMCC1タンパク質を提供し、本発明のタンパク質は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とするタンパク質またはその塩である。

25 ここで、本発明のタンパク質は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ

酸配列を有していてもよい。また、本発明のタンパク質またはその塩は、前記アミノ酸配列を有し、且つ、アポトーシス誘導活性を有することが好ましい。

また、本発明の核酸は、前記タンパク質または前記タンパク質の部分ペプチドをコードすることを特徴とする核酸である。

- 5 さらに、本発明の核酸は、配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有することを特徴とする核酸である。

ここで、本発明の核酸は、前記核酸と、若しくはその相補的な核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする単離された核酸であってもよい。さらに、該核酸がコードするタンパク質がアポトーシス誘導活性を有
10 することが好ましい。また、本発明の核酸は、配列表の配列番号2に記載の塩基配列の一部からなる核酸であってもよい（本発明の核酸断片ともいう）。

さらに、本発明の核酸は、予後良好および不良なヒト神経芽細胞腫との比較において、予後良好なヒト神経芽細胞腫で発現が増強していることを特徴とする前記核酸であることが好ましい。

15 図面の簡単な説明

図1は、予後良好な神経芽細胞腫の臨床サンプルにおけるBMCC1遺伝子の発現をノザンハイブリダイゼーションで確認した結果を示す電気泳動写真に対応する図である。

図2は、半定量的PCRにより予後良好・不良なヒト神経芽細胞腫の臨床サン
20 プルにおけるBMCC1遺伝子の発現量を測定した結果を示す電気泳動写真に対応する図である。

図3は、半定量的PCRにより正常ヒト組織におけるBMCC1遺伝子の発現量を測定した結果を示す電気泳動写真に対応する図である。

図4は、半定量的PCRによりヒト癌細胞株におけるBMCC1遺伝子の発現
25 量を測定した結果を示す電気泳動写真に対応する図である。

図5は、半定量的PCRによりHeLa細胞の分化状態におけるBMCC1遺

伝子の発現量を測定した結果を示す電気泳動写真に対応する図である。

図6は、半定量的PCRによりHeLa細胞の各細胞周期におけるBMCC1遺伝子の発現量を測定した結果を示す電気泳動写真に対応する図である。

図7は、PSORT2を用いてBMCC1、BNIP2およびCdc42GAP-5
P-BCHのドメイン構造を予測した模式図である。

発明を実施するための最良の形態

本明細書で使用する「核酸」という用語は、例えばDNA、RNA、または誘導された活性なDNA若しくはRNAでありうるポリヌクレオチドを指し、好ましくは、DNAおよび/またはRNAをいう。

10 本明細書で使用する「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という用語は、2つの核酸断片が、サンプブルックら(Sambrook, J.)の「大腸菌におけるクローン遺伝子の発現(Expression of cloned genes in E. coli)」(Molecular Cloning: A laboratory manual (1989)) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 15 9.47-9.62および11.45-11.61に記載されたハイブリダイゼーション条件下で、相互にハイブリダイズすることを意味する。

より具体的には、「ストリンジェントな条件」とは約45℃において6.0×SSCでハイブリダイゼーションを行った後に、50℃で2.0×SSCで洗浄することを指す。ストリンジェンシーの選択のため、洗浄工程における塩濃度を、20 例えば低ストリンジェンシーとしての約2.0×SSC、50℃から、高ストリンジェンシーとしての約0.2×SSC、50℃まで選択することができる。さらに、洗浄工程の温度を低ストリンジェンシー条件の室温、約22℃から、高ストリンジェンシー条件の約65℃まで増大させることができる。

25 本明細書で使用する「単離された」とは、組換えDNA技術により作製された場合は細胞物質、培養培地を実質的に含有せず、化学合成された場合には前駆体

化学物質またはその他の化学物質を実質的に含まない核酸を指す。

本明細書で使用する「予後良好」とは、ヒト神経芽細胞腫のうち、腫瘍が限局して存在するか、または退縮や良性の交感神経節細胞腫になった状態を指し、N-mycその他腫瘍マーカーから判断して、悪性度が低いと判断される。本発明の好適な実施の形態では、病期1または2、発症年齢が1歳未満、手術後5年以上再発なく生存し、臨床組織中にN-mycの増幅が認められないものを予後良好としたが、このような特定の例には限定されない。また、本明細書で使用する「予後不良」とは、ヒト神経芽細胞腫のうち、腫瘍の進行が認められる状態を指し、N-mycその他腫瘍マーカーから判断して、悪性度が高いと判断されるものである。本発明の好適な実施の形態では、病期4、発症年齢が1歳以上、手術後3年以内に死亡、臨床組織中にN-mycの増幅が認められたものを予後不良としたが、このような特定の例には限定されない。

本発明の新規なヒトBMCC1遺伝子およびタンパク質は、予後良好なヒト神経芽細胞腫の臨床組織より見出されたものであり、かかる遺伝子およびタンパク質は以下のような特徴を有する。

本発明のヒトBMCC1タンパク質は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する。さらに、本発明のタンパク質は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。また、この場合、本発明のタンパク質は、前記アミノ酸配列を有し、且つ、アポトーシス誘導活性を有することが好ましい。ここで、「アポトーシス誘導活性」とは、生理的条件下で細胞自らが積極的に引き起こす細胞死を誘導する活性と定義され、細胞核の染色体凝集、細胞核の断片化、細胞表層の微絨毛の消失、細胞質の凝集等を引き起こすことが特徴である。

また、本発明には本発明のタンパク質の塩も包含される。このような塩としては特に制限はないが、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、リ

チウム塩、アンモニウム塩等が好ましい。

また、多くのタンパク質には糖鎖が付加され、アミノ酸を1若しくは複数変換することにより糖鎖の付加を調節することができる。従って、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において、前記糖鎖の付加を調節されたタンパク質も本発明のタンパク質に包含される。

また、本発明のヒトBMCC1タンパク質をコードする塩基配列を有する核酸も本発明に含まれる。ここで、「タンパク質をコードする」とは、DNAが2本鎖である場合には、相補2本鎖のいずれか一方がタンパク質をコードする塩基配列を有することを意味するため、本発明の核酸には配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を直接コードする塩基配列からなる核酸、若しくはその相補的な塩基配列からなる核酸も包含される。

本発明のヒトBMCC1遺伝子は、配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有する。

また、本発明の核酸は、前記配列番号2に記載の塩基配列を有する核酸とストリンジентな条件下でハイブリダイズする核酸であってもよく、この条件を満たす限りにおいてはその塩基配列は特に制限されない。さらに、本発明の核酸には前記ストリンジентな条件下でハイブリダイズする核酸に相補的な塩基配列を有する核酸も包含され、具体的には、例えば、前記配列番号2に記載の塩基配列を有する核酸または前記核酸に相補的な塩基配列を有する核酸の塩基のいくつかに欠失、置換、挿入、付加がある核酸が挙げられる。ここで、欠失、置換、挿入、付加とは、1～10塩基の短い欠失、置換、挿入、付加のみならず、10～100塩基の長い欠失、置換、挿入、付加をも含む。

さらに、本発明の核酸は、前記塩基のいくつかに欠失、置換、挿入、付加がある核酸であり、且つ、前記核酸がコードするタンパク質がアポトーシス誘導活性を有することが好ましい。ここで、「アポトーシス誘導活性」とは、生理的条件下で細胞自らが積極的に引き起こす細胞死を誘導する活性と定義され、細胞核の染

色体凝集、細胞核の断片化、細胞表層の微絨毛の消失、細胞質の凝集等を引き起こすことが特徴である。

本発明者らは、BMCC1遺伝子およびタンパク質の構造解析の結果から、BMCC1のアミノ酸配列は2724個のアミノ酸からなり、その一部のアミノ酸配列が、Bcl-2/Adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2 (BNIP2)の一部である314個のアミノ酸と約57%のホモロジーを有することを見出している。また、本発明者らは、BMCC1がCoiled-coil領域、膜貫通領域、核移行性シグナル領域を有していることを見出している。

10 次いで、前記E1B 19kDaタンパク質およびBNIPについて説明する。
(E1B 19kDaタンパク質)

E1B 19kDaタンパク質は、アデノウイルスのE1B遺伝子によってコードされるタンパク質である。この遺伝子に変異を持つアデノウイルスは、宿主に強い細胞障害を起こし、DNAの分解を誘発することが知られている (White E等: Mutation in the gene encoding the adenovirus early region 1B 19,000-molecular-weight tumor antigen causes the degradation of chromosomal DNA. J. Virol. 52 (2), 410-419 (1984))。この細胞障害は、アデノウイルス感染細胞で最初に発現するE1Aタンパク質によって誘導されるアポトーシスであり、E1B 19kDaタンパク質によってこのアポトーシスは抑制されることが報告されている (White E等: Adenovirus E1B 19-kilodalton protein overcomes the cytotoxicity of E1A proteins. J. Virol. 65 (6), 2968-2978 (1991))。また、その後の研究から、E1B 19kDaタンパク質が機能的にBcl-2と相同であると

の報告がなされている (Rao L等: The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1
5 6)、7742-7746 (1992))。

(BNIPの構造と機能)

一方、E1B 19kDaタンパク質と結合するタンパク質としてBcl-2/
Adenovirus E1B 19kDa interacting protein (BNIP) が同定されている (Boyd JM等: Adenovir
10 us E1B 19kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. Cell 79 (2)、341-351 (1994))。BNIP
は、E1B 19kDaタンパク質やBcl-2と相互作用し、アポトーシスを抑制
している可能性が示唆された。このようなBNIPは、現在までに3種類が同
15 定されている。その一つであるBNIP1は、C末端に膜貫通領域を持ち、ミト
コンドリア、核膜、小胞体に局在している。また、BNIP1はBH3領域を有
し、アポトーシスを誘導したり、Bcl-XLとヘテロ2量体を形成することが
報告されている。

BNIP2については核膜、小胞体に局在し、神経芽細胞腫の細胞株であるS
20 K-ER3においてエストロゲンによる発現の抑制や、ラット胎児脳 of 成熟過程
において一過性に発現が高くなる現象が報告されている。また最近、BNIP2
がSmall GTP-binding moleculeの一つであるCdc
42とGTPase-activating protein for Cdc
42 (Cdc42GAP) に結合し、Cdc42を介するシグナル伝達に関与し
25 ていることが示唆されているのみならず、fibroblast growth
factor (FGF) -receptor tyrosine kinaseに

よってリン酸化されCdc42やCdc42GAPへの結合が阻害されるとの報告がなされている (Low BC等: The BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain of BNIP-2 mediates its homophilic association and heterophilic interaction with Cdc42GAP. J. Biol. Chem. 275(48)、37742-37751(2000))。

また、BNIP3は、BH3領域を持ったアポトーシス誘導型のタンパク質であり、C末端に膜貫通領域を持ち、ミトコンドリアに局在していることが知られている (Yasuda M等: Adenovirus E1B-19K/Bcl-2 interacting protein BNIP3 contains BH3 domain and mitochondrial targeting sequence. J. Biol. Chem. 273(20)、12415-12421(1998))。さらに、BNIP3は長時間hypoxia条件下に曝すと強く誘導されるとの報告もある。

一方、予後良好な神経芽細胞腫には頻繁にアポトーシスが観察され、またBMCC1とBNIP2との重複部分の相同性を考慮するとBMCC1は、アポトーシス誘導に直接的に関与しうる機能を有することが推測される。

さらに、BMCC1遺伝子は予後良好な遺伝子において特異的に増強され、分化した細胞に特異的に発現していることから、神経芽細胞腫の予後を良好に向かわせる機能を有する可能性が極めて高い。

以上、本発明のヒトBMCC1遺伝子およびタンパク質について説明してきたが、以下に前記遺伝子およびタンパク質に関連する様々な情報を得ることを可能とする実施形態について説明する。

(1) ハイブリダイゼーションに用いるプローブ

本発明の核酸またはその断片を利用して、本発明の核酸またはその断片をハイブリダイゼーションのプローブとして使用することによって、あらゆる組織、細

胞等において発現しているBMCC1遺伝子を検出することが可能である。また、本発明の核酸またはその断片をハイブリダイゼーションのプロープとして使用し様々な腫瘍、正常組織における遺伝子発現を調べることで、BMCC1遺伝子の発現の分布を同定することも可能である。

5 本発明の核酸またはその断片をハイブリダイゼーションのプロープとして使用する場合、ハイブリダイゼーション法自身については特に限定されない。好適な方法としては、例えばノザンハイブリダイゼーション、サザンハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、ドットハイブリダイゼーション、F
10 l u o r e s c e n c e i n s i t u h y b r i d i z a t i o n (F I S H)、 i n s i t u h y b r i d i z a t i o n (I S H)、 DNAチップ法、マイクロアレイ法等が挙げられる。

前記ハイブリダイゼーションの1つの応用例として、本発明の核酸またはその断片をノザンハイブリダイゼーションのプロープとして用い、検定したサンプル中においてmRNAの長さを測定することや、遺伝子発現を定量的に検出することが可能である。

15 また、本発明の核酸またはその断片をサザンハイブリダイゼーションのプロープとして用いる場合は、検定したサンプルのゲノムDNA中の、当該塩基配列の有無を検出することが可能である。

20 また、本発明の核酸またはその断片をF l u o r e s c e n c e i n s i t u h y b r i d i z a t i o n (F I S H) のプロープとして用いることで、遺伝子の染色体上の位置を同定することも可能である。

また、本発明の核酸またはその断片を i n s i t u h y b r i d i z a t i o n (I S H) のプロープとして用いることでその遺伝子の発現の組織分布を同定することも可能である。

25 本発明の核酸またはその断片をハイブリダイゼーション用プロープとして使用する場合は、少なくとも20個の塩基長が必要であり、本明細書において開示さ

れた塩基配列の一部であって、20個以上の連続した塩基からなる核酸が好ましく用いられる。より好ましくは40個以上の連続した塩基からなる核酸が用いられ、特に好ましくは、60個以上の連続した塩基からなる核酸が用いられる。

当業者には、核酸プローブ技法は周知であり、個々の長さの本発明によるプローブと目的とするポリヌクレオチドとの適当なハイブリダイズ条件は、容易に決定される。種々の長さを含むプローブに対し至適なハイブリダイズ条件を得るためのこのような操作は当業者では周知であり、例えばサンプブックら、「分子クローニング：実験手法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第2版、コールドスプリングハーバー (1989)」を参照して行うことができる。

好ましくは、本発明に係るプローブは、容易に検出されるように標識して用いることができる。検出可能な標識は、目視によって、または機器を用いるかのいずれかによって検出され得るいかなる種類、部分であってもよい。通常使用される検出可能な標識は、例えば、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{35}S 等などの放射性標識である。ビオチン標識ヌクレオチドは、ニックトランスレーション、化学的および酵素的手段等によって、DNAまたはRNAに組み込むことができる。ビオチン標識されたプローブは、アビジン/ストレプトアビジン、蛍光標識剤、酵素、金コロイド複合体等などの標識手段を使用したハイブリダイゼーションの後、検出される。核酸はタンパク質と結合させることによって標識してもよい。放射性または蛍光ヒストン一本鎖結合タンパク質に架橋された核酸を使用してもよい。

(2) PCRに用いるプライマー

遺伝子を検出する方法には他にも、本発明の核酸に含まれる任意の核酸 (DNA) 配列をプライマーとして Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を行うことにより可能である。例えば、検定したいサンプルからRNAを抽出しRT-PCR法により遺伝子発現を半定量的に測定することが可能である。このような方法は当業者にとって周知の方法によって行われるが、

例えばMolecular Cloning A LABORATORY MANUAL (T. Maniatis 著: Cold Spring Harbor Laboratory Press 社)、遺伝子病入門 (高久史麿 著: 南江堂) を参照して行うことができる。

- 5 本発明の核酸またはその断片をPCR用プライマーとして使用する場合は、10個から60個の塩基長が必要であり、本明細書において開示された塩基配列の一部であって、10個から60個の連続した塩基がある核酸が好ましく用いられる。より好ましくは、15個から30個の塩基を有するものが用いられる。また一般的には、プライマー配列中のGC含量が40%から60%であることが好ましい。さらに増幅に用いる2つのプライマー間のT_m値に差が少ないことが望まれる。またプライマーの3'末端でアニールせず、プライマー内で2次構造をとらない塩基配列を有することが望ましい。

(3) 核酸配列のスクリーニング

- 15 本発明の核酸またはその断片を使用することによって様々な組織や細胞で発現している遺伝子発現の分布を検出することが可能である。例えば、本発明の核酸またはその断片をハイブリダイゼーションのプローブ、またはPCRのプライマーとして使用することによって、遺伝子発現の分布を検出することが可能である。

- 20 また、DNAチップ、マイクロアレイ等を用いても遺伝子発現の分布を検出することが可能である。すなわち本発明の核酸またはその断片を直接チップ、アレイ上に張り付けることが出来る。そこに細胞から抽出したRNAを蛍光物質などでラベルし、ハイブリダイズさせ、その遺伝子がどの様な細胞で高発現しているかを解析することが可能である。チップ、アレイに張り付けるために、高精度分注機でかかる核酸等(DNA)を基板にスポットする方法が知られている(例えば、米国特許第5807522号を参照)。そこに被検体試料から抽出したmRNAを蛍光物質などで標識し、ハイブリダイズさせ、遺伝子がどの様な組織の細胞
- 25 で高発現しているかを解析することが可能である。またチップ、アレイ上に張り

付けるDNAは、本発明の核酸またはその断片をプローブとして用いたPCRの反応産物であってもよい。別法として、本発明の核酸断片（DNA断片）を基板上で直接合成してDNAチップ若しくはアレイとすることもできる（例えば、米国特許第5424186号を参照）。

5 (5) 腫瘍の予後同定の方法およびそのために使用可能な腫瘍マーカー

本発明の核酸またはその断片をハイブリダイゼーションのプローブ、またはPCRのプライマーとして使用し、試料細胞中の遺伝子発現の増強の有無を調べることにより、予後同定が可能である。遺伝子発現の増強の有無を調べるには、例えば本発明の核酸またはその断片とハイブリダイズし得るプローブを使用する全
10 すべての方法が提供される。すなわち試料細胞中にプローブ配列とハイブリダイズする核酸の量が増強する場合、予後が良好であると診断することが可能である。またPCRのプライマーとして使用する場合は、例えば、検定したいサンプルからRNAを抽出しRT-PCR法により遺伝子発現を半定量的に測定することが可能である。

15 (6) アンチセンスオリゴヌクレオチド

本発明の別の実施形態として、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドをコードする核酸が提供される。本発明を実施する際に考慮されるように、本発明の遺伝子に対応するRNAに結合して、それによりRNAの合成を阻止することができるアンチセンスオリゴヌクレオチド、および
20 アンチセンスオリゴヌクレオチドをコードする核酸は容易に調製できる。

(7) 遺伝子治療

本発明の別の実施形態として、遺伝子治療に用いられる治療用遺伝子を構成する核酸が提供される。本発明を実施する際に考慮されるように、本発明の遺伝子を構成する核酸を遺伝子運搬に使用されるベクターに導入して、任意の発現プロモーターにより導入遺伝子を発現させ、例えば癌の遺伝子治療に用いることが
25 できる。以下に前記ベクターおよび前記発現プロモーターについて説明する。

1. ベクター

導入されうるウイルスベクターは、DNAまたはRNAウイルスをもとに作製できる。このようなベクターは、MoMLVベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、AAVベクター、HIVベクター、SIVベクター、センダイウイルスベクター等のいかなるウイルスベクターであってもよい。また、ウイルスベクターの構成タンパク質群のうち1つ以上を、異種ウイルスの構成タンパク質に置換する、若しくは、遺伝子情報を構成する核酸配列のうち一部を異種ウイルスの核酸配列に置換する、シュードタイプ型のウイルスベクターも本発明に使用できる。例えば、HIVの外皮タンパク質であるEnvタンパク質を、小水痘性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis Virus: VSV)の外皮タンパク質であるVSV-Gタンパク質に置換したシュードタイプウイルスベクターが挙げられる(Naldini L等: Science 272 263- (1996))。さらに、治療効果を持つウイルスであれば、ヒト以外の宿主域を持つウイルスもウイルスベクターとして使用可能である。ウイルス以外のベクターとしてはリン酸カルシウムと核酸の複合体、リポソーム、カチオン脂質複合体、センダイウイルスリポソーム、ポリカチオンを主鎖とする高分子キャリアー等が使用可能である。さらに遺伝子導入系としてはエレクトロポレーション、遺伝子銃等も使用可能である。

2. 発現プロモーター

さらに、薬物遺伝子に用いられる発現カセットは、標的細胞内で遺伝子を発現させることができるものであれば、特に制限されることなく何でも用いることができる。当業者はそのような発現カセットを容易に選択することができる。好ましくは、動物由来の細胞内で遺伝子発現が可能な発現カセットであり、より好ましくは、哺乳類由来の細胞内で遺伝子発現が可能な発現カセットであり、特に好ましくは、ヒト由来の細胞内で遺伝子発現が可能な発現カセットである。発現カセットに用いられる遺伝子プロモーターは、例えばアデノウイルス、サイトメガ

ロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、シミアンウイルス40、ラウス肉腫ウイルス、単純ヘルペスウイルス、マウス白血病ウイルス、シンビスウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、パピローマウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、インフルエンザウイルス、日本脳炎ウイルス、JCウイルス、パルボウイルスB19、ポリオウイルス等のウイルス由来のプロモーター；アルブミン、SR α 、熱ショック蛋白、エロンゲーション因子等の哺乳類由来のプロモーター；CAGプロモーター等のキメラ型プロモーター；テトラサイクリン、ステロイド等によって発現が誘導されるプロモーターが挙げられる。

(8) 医薬品

10 本発明の別の実施形態として、医薬品に用いられる治療用タンパク質およびペプチドが提供される。本発明を実施する際に考慮されるように、本発明のタンパク質およびペプチドを任意の調製法にて調製し、任意の投与方法、投与量にて用いることで、例えば抗癌剤、癌転移抑制剤に用いることができる。

1. 調製法

15 本発明の医薬品は、例えば上記に示すような治療用にデザインされた薬物遺伝子を含む組換えウイルスベクターとして調製される。より具体的に言えば、BMCC1遺伝子を含む組換えウイルスベクターを、水、生理食塩水、等張化した緩衝液等の適当な溶媒に溶解することで調製できる。また任意に製造されたBMCC1タンパク質を同様に水、生理食塩水、等張化した緩衝液等の適当な溶媒に溶
20 解することで調製することも可能である。その際、ポリエチレングリコール、グルコース、各種アミノ酸、コラーゲン、アルブミン等を保護材として添加しても調製可能である。

2. 投与方法、投与量

25 本発明の医薬品の生体への投与方法については特に制限はない。例えば非経口的投与、例えば注射投与することにより好ましく実施できる。本発明の医薬品の使用量は、その使用方法、使用目的等により異なり、当業者は容易に適宜選択

最適化することが可能である。例えば、注射投与して用いる場合には、1日量約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 1000 \text{mg}/\text{kg}$ を投与するのが好ましく、より好ましくは、1日量約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \text{mg}/\text{kg}$ である。

(9) 抗体、アンチセンス、リボザイム、TFO

5 本発明の別の実施形態として、本発明のタンパク質の活性を抑制する抗体、および本発明の遺伝子の発現を抑制するアンチセンス、リボザイム、TFO等の塩基配列が提供される。本発明を実施する際に考慮されるように、本発明にかかるアンチセンス、リボザイム、TFOをコードする核酸を遺伝子運搬に使用されるベクターに導入して、任意の発現プロモーターにより導入遺伝子を発現させ、例
10 えば初代培養細胞の株化や癌のモデル動物作製に用いることができる。

(10) 遺伝子改変動物

本発明の別の実施形態として、本発明の遺伝子の発現をノックアウトする核酸、およびノックアウト動物（ノックアウトマウス等）が提供される。また、前記遺伝子を強制発現したトランスジェニック動物（トランスジェニックマウス等）、遺
15 伝子に点変異や欠失等の任意の変異を導入した変異遺伝子が導入された遺伝子改変動物等が提供される。このような遺伝子改変動物は、例えば癌のモデル動物作製に用いることができる。

以上説明したように、本発明のBMCC1遺伝子若しくはタンパク質またはこれらから得られる情報を利用することにより、臨床組織からBMCC1遺伝子を
20 検出することが可能となり、神経芽細胞腫の予後の量悪の診断が可能となる。また、前記遺伝子若しくはタンパク質またはこれらから得られる情報を利用することにより、予後同定の方法および前記方法に使用可能な腫瘍マーカーを設計することが可能となる。

(実施例)

25 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

(製造例 1) 神経芽細胞腫の臨床組織

神経芽細胞腫の臨床組織は摘出後直ちに -80°C にて冷凍し保存した。得られたサンプルについて予後の検定を以下の指標をもとに行った。

予後良好：

- 5
- ・病期 1 または 2
 - ・発症年齢が 1 歳未満
 - ・手術後 5 年以上再発なく生存
 - ・MYCN の増幅なし

予後不良：

- 10
- ・病期 4
 - ・発症年齢が 1 歳以上
 - ・手術後 3 年以内に死亡
 - ・MYCN 増幅あり

このうち MYCN 増幅は以下のように確認した。得られた臨床組織を剃刀で細かく切断し、5 ml の TEN バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 1 mM EDTA / 100 mM NaCl) を加え良くホモジナイズした。この混合液に 750 μl の SDS (10%)、125 μl の proteinase K (20 mg/ml) を加え、軽く混和し 50°C で 8 時間放置した。その後、フェノール・クロロホルム処理を行い、最後にエタノール沈殿により、ゲノム DNA を精製した。5 μg の得られたゲノム DNA を制限酵素 EcoRI (NEB 社製) で完全に消化し、MYCN のプローブを用いてサザンハイブリダイゼーション (Sambrook J 等: Molecular Cloning) により MYCN 増幅を調べた。

15

20

(製造例 2) ヒト由来癌細胞株

- 25
- ヒト由来の癌細胞株として、以下の細胞株を用いた。
- 神経芽細胞腫由来細胞株 (MYCN 増幅有り)

SY5Y

NB69

SK-N-AS

OAN

5 SK-N-SH

神経芽細胞腫由来細胞株 (MYCN増幅無し)

RISA

GOTO P3

SK-N-BE

10 CHP901

NGP

RTBM1

IMR32

NMB

15 LAN5

TGW

CHP134

KCN

他の組織由来癌細胞株

20 OST (骨肉腫)

SAOS-2 (骨肉腫)

NOS-1 (骨肉腫)

RMS-MK (横紋筋肉腫)

ASPS-KY (巣状軟部肉腫)

25 COLO320 (結腸腺癌)

SW480 (結腸腺癌)

LOVO (結腸腺癌)

HepG2 (肝癌)

MB453 (乳癌)

MB231 (乳癌)

5 G361 (悪性黒色腫)

G32TG (悪性黒色腫)

A875 (悪性黒色腫)

TTC2 (甲状腺癌)

KATO3 (胃癌)

10 ECG・10 (食道癌)

ASPC-1 (転移性膵臓腺癌)

A549 (肺癌)

NT2 (奇形腫)

HeLa (子宮頸部癌)。

15 HeLaを除く全ての癌細胞株は、10%のFBS、50units/mlのペニシリン、50 μ g/mlのストレプトマイシンを含むRPMI-1640培地で培養した。HeLa細胞は、10%のFBS、50units/mlのペニシリン、50 μ g/mlのストレプトマイシンを含むDMEM培地で培養した。またHeLaを含む全ての癌細胞株は、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂濃度条件下にてインキュベートすることにより培養した。

20

(実施例1) 神経芽細胞腫臨床組織からのトータルRNAの抽出

ヒト神経芽細胞腫臨床組織からのトータルRNAの抽出は、Total RNA Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて行った。抽出したトータルRNAは、フェノール・クロロホルムで精製した後、濃度を決定した。

25

(実施例2) 癌細胞株からのトータルRNAの抽出

癌細胞株からのトータルRNAの抽出は、一般的なグアニジン処理にて行った (Sambrook J等: Molecular Cloning)。抽出したRNAは、フェノール・クロロホルムで精製した後、濃度を決定した。

(実施例3) cDNAライブラリーの調製

5 実施例1において神経芽細胞腫の臨床組織より調製したトータルRNAからオリゴキャッピング法 (Sugano S等: Gene 138 (1-2): 171-174 (1994)) を用いてcDNAライブラリーを調製した。得られたcDNAライブラリーを大腸菌 (TOP-10: Invitrogen社製) にトランスフォーメーションした。

10 (実施例4) cDNAの両末端シーケンスの解析

実施例3で調製した大腸菌からプラスミドDNAを抽出し、DNA Sequencing Kit (ABI社製) を用いてcDNAの両末端のシーケンスを決定した。すなわち、600ngのプラスミドDNA、8 μ lのプレミックス (キット付属品)、3.2pmolのプライマーを混合し滅菌蒸留水で合計20 μ lになるように調製した。この混合液を96 $^{\circ}$ Cで2分間変性させた後、96 $^{\circ}$ C、10秒間・50 $^{\circ}$ C、5秒間・60 $^{\circ}$ C、4分間を1サイクルとして25サイクル繰り返し反応を行った。その後エタノール沈殿で精製した。変性条件下でポリアクリルアミドゲル上、電気泳動を行い、配列解析を行った。解析にはABI377 (ABI社製) を用いた。

20 (実施例5) データベースを用いたホモロジー検索

実施例4で両末端シーケンスの解析が終了したcDNAサンプルについてインターネットを介したDNA配列のホモロジー検索を行った。検索にはNCBI (National Center of Biotechnology Information USA) のBLASTを用いた。ホモロジー検索の結果、cDNAサンプルの一つであるnb1a219は、ヒト9番染色体上のゲノムシーケンス (GenBank accession no. AL161625)

と高い相同性を示した。

(実施例6) n b l a 2 1 9の全長クローニング

実施例5で得られたゲノム配列について、遺伝子転写配列をGENESCAN
(Burge C等: 1997、1998) およびFGENESH (Salam
5 ov AA等: 1999) を用いて予測した。予測された配列をもとにn b l a
2 1 9の全長を以下の方法でクローニングした。

すなわち、予後良好な神経芽細胞腫臨床組織から抽出した15 μ gのトータル
RNAをSuperscript II reverse transcriptase (GIBCO社製) を用いてcDNAに逆転写した。逆転写した2 μ l
10 のcDNAに5 μ lの滅菌蒸留水、1 μ lの10 \times rTaqバッファー(宝酒造
社製)、1 μ lの2mM dNTPs、各々0.5 μ lの合成プライマーセット、
0.5 μ lのrTaq(宝酒造社製)を混合した。この混合液を95 $^{\circ}$ Cで2分間
変性させた後、95 $^{\circ}$ C、15秒間・58 $^{\circ}$ C、15秒間・72 $^{\circ}$ C、20秒間を1サ
イクルとして35サイクル繰り返し、さらに72 $^{\circ}$ Cで20分間放置しPCR反応
15 を行った。PCRで増幅したバンドをpGEM-T easy vector (P
romega社製) にサブクローニングし、一般的手法(Sanger F.等:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467. (1
977)) を用いて塩基配列を決定した。解析にはABI377 (ABI社製) を
用いた。塩基配列は全て両鎖とも解析した。

20 また、前記プライマーとして、以下の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを
用いた。

FW1: 5' ACAGCAATATTACCAGTGAC 3' (配列番号3)

FW2: 5' AGTTTGGTTTTGATGTCCTC 3' (配列番号4)

FW3: 5' AGAACCCCTTGCCTAGAACTG 3' (配列番号5)

25 FW4: 5' GACTGTGGCTGTGATGAGAT 3' (配列番号6)

FW5: 5' AAGGAAGTCATCAACAGGAG 3' (配列番号7)

- FW6 : 5' CAATAGCCGGACATCCTCAA 3' (配列番号 8)
FW7 : 5' ATGATTTGGACTGGGATGAC 3' (配列番号 9)
FW8 : 5' GCTCTCTTGCTGTCACTTTC 3' (配列番号 10)
FW9 : 5' TAAGGGGTCTGAAAATAGCC 3' (配列番号 11)
5 FW10 : 5' GATCGCAAAACTCCTACATT 3' (配列番号 12)
FW11 : 5' CAGAGCTTGGGATTCATTGA 3' (配列番号 13)
FW12 : 5' TAAGTTCTTGGTCACAGCTG 3' (配列番号 14)
FW13 : 5' GCCAGCAGAGAATGAGAATA 3' (配列番号 15)
FW14 : 5' TTTTAAAGCAGCCCTGATCC 3' (配列番号 16)
10 FW15 : 5' CCAGCTTGTA AAAATTAGACC 3' (配列番号 17)
FW16 : 5' CAGATTACAGCAGTGGAGAA 3' (配列番号 18)
FW17 : 5' CACGCAGAGGAAAATAGTTG 3' (配列番号 19)
FW18 : 5' ACCAGTTGACAGAAGAATCC 3' (配列番号 20)
FW19 : 5' ATCCACATTTATCCACAGAG 3' (配列番号 21)
15 FW20 : 5' CTTTGGAGGAAGATTCTCTG 3' (配列番号 22)
FW21 : 5' AGAGCCTGAGCAGATAAAAAT 3' (配列番号 23)
FW22 : 5' TGTTCTTGGGCCATAGTGAG 3' (配列番号 24)
FW23 : 5' GATATCAAGACCAAATGGAC 3' (配列番号 25)
FW24 : 5' AATATACGGCCGAAGAGGAA 3' (配列番号 26)
20 FW25 : 5' CAGATGATTGACAGACGGTT 3' (配列番号 27)
RV1 : 5' TTCTCCAGACCATGCATGTT 3' (配列番号 28)
RV2 : 5' GAGCCTGGTAACATGAATGA 3' (配列番号 29)
RV3 : 5' TCAATTAGTCTCCCTTCCTG 3' (配列番号 30)
RV4 : 5' CTCACCATCTGCTTTCAAAC 3' (配列番号 31)
25 RV5 : 5' ATATCTTGCTTCCCTAGGTC 3' (配列番号 32)
RV6 : 5' GTCACCACCATACAGGAAGT 3' (配列番号 33)

RV7: 5' CTCCTACCGGCAAATAAACG 3' (配列番号 34)

RV8: 5' CTCACTATGGCCCAAGAACA 3' (配列番号 35)

RV9: 5' GTCCATTTGGTCTTGATATC 3' (配列番号 36)

RV10: 5' TTCCTCTTCGGCCGTATATT 3' (配列番号 37)

5 RV11: 5' AACCGTCTGTCAATCATCTG 3' (配列番号 38)

RV12: 5' AAAGGTCGTGTCACAGCAAG 3' (配列番号 39)

RV13: 5' ATAAAAGGTCGTGTCACAGC 3' (配列番号 40)

RV14: 5' ATGCTCTCTGGAATGTGGAT 3' (配列番号 41)

RV15: 5' ATGATGCTCTCTGGAATGTG 3' (配列番号 42)

10 RV16: 5' GGCAAATAGGAAAGTAC 3' (配列番号 43)

RV17: 5' TAAACACCAGTCTAAGGG 3' (配列番号 44)

(実施例 7) BMCC 1 全長シーケンスの登録

実施例 6 で得られた BMCC 1 の遺伝子配列を DDB J、GenBank、EMBL に登録した。受理番号は AB050197 である。

15 (実施例 8) ノザンハイブリダイゼーション

25 μ g のトータル RNA を 1% のアガロースゲルを用いて変性条件下で電気泳動を行った。電気泳動したトータル RNA は、アガロースゲルからキャピラリー法によりナイロンメンブレンにトランスファーした。ヒト BMCC 1 の塩基配列から約 1.5 kb のプローブを設計し、ノザンハイブリダイゼーションを行った。最終的な洗浄は、0.1×SSC、0.1% N-lauroyl sarcosine で 65℃、30 分間行った。用いたプローブの塩基配列 (配列番号 45) を以下に示す。また、得られた結果を図 1 に示す。

25 GTCGACATCTTTGCACAGGTGATTGAGTTTCTCTGACCTCATTGCTTTCACCTCTGTCTCCTCCCGTCCCTTCCGCACGTGCCACACACACGCAGTTCAGCCCTCTTTCCTCCATAAGCCTCCATCGTTTTCTTTTTCTCCTCT

TGATCCTTTCAAGCGAGTATCTTGTTGAATTGTATG
TTCTGTTGGATCTCCTCCTTCATAACATCTGGCTTG
TTGGACAGAAAAACCCTACAGCCCACCCCCTCCCAC
AGCCCACCTCCACTTTTGAAAGCCCAAATTACACCT
5 CTCCCAGAACACAGTGTTGACGTAAATACAGTTACC
CAATATTCCTGTTTGTTCACCTATTTGCTACTTTCA
CTCAGTAGCATCCCATTTTGTA AAAATGAATTCCATG
GTCACCCTGT CACAGGAAGTAATGAAAAATCCAGTG
TTCAGTG TAGTGGTGCAAACCTGAGGGCATAGAGCT
10 GTTCATAGAGGGCTCTTGTTATAGCCAAACAGACAC
AGCAACAATCTCACCATTTATATATATATTTTTAAC
TTGTCCAGCTCATCTATGGAAA ACTACTCAGGTGGT
ATGCTGTTTGAAGCCTCATCTTCCTACATGAAAATT
ATGGGCATTTGTCCCAATGATTTTGT TTCAGCTGTT
15 CTGTAGGCTGCATAACCACTCTGATATTTAGGTATC
TGCTATTTTATTATCTTAAAAGACAAATTAATTTAA
TTGCATGTGCTAGGGAAAAGCTACCATGTACATTCA
CCCCAAGTAAATAGAATCCTAGATGAATCCTAGAAA
AATAATCCCTAAGCAGATAGGTAGACAGAGGTAAAC
20 ATTCACATGATTTAGCTCTCTAGCTCTTGCACTCTG
AACATTCTTGCTTTGGTTCTGACTTCTGGGAACTGC
TTTGCA TTTCTCCTATAGATCTGTAGTTAAGGGAAC
CAAGGGGTCATTGGGGCAAAGCATTGTTTCTCAA
GCTCCTTGATTAAGAGAAAGAACAGAATTTGCACAG
25 AAGATAGTGTC AAGGAGTGAGAAAGTTTGT TTGAGG
GCAGTAGCTCAGTG TGGAAGAAAATCCTGAAGTTTC

TGTTGAAGCCATACAATGTTCTATGGGGTACTCTC
 TAAGACATTCTCTGAGGTGTGTGAGGAAGTCACTAC
 TCCTAGCCTTTGTTAAGATGTAATTTTAAATATTCA
 GTTATGGTACTATGTTTGCAACTCTCGTCTTATCAC
 5 AATGCCTCAGTAGTTTGTTCCTTAGAAACATTTAG
 ATGTGCACAAATTAATCTTTTATATATCTAAAGGTT
 TTTCTATCATGCATTGGATTGCTCAGAATAAAGTGT
 CTGTTAGACTTCGTTTTGGTAAATAAATTCTCCATA
 ATGTAGATTAATAATAATAAAAGTCTTTAATGACACA
 10 ATATATCTATATAGCCTCACTGTATAATTCAGAAAT
 AAAAATTGATTCTGC

(実施例 9) 半定量的 RT-PCR

全ての半定量的 RT-PCR は、以下の方法に従って行った。

(逆転写 (RT) 反応)

15 抽出した 5 μ g のトータル RNA を Superscript II reverse transcriptase (GIBCO 社製) を用いて cDNA に逆転写した。

(PCR 反応)

20 PCR 反応は rTaq (宝酒造社製) を用いて行った。逆転写した 2 μ l の cDNA、5 μ l の滅菌蒸留水、1 μ l の 10 \times rTaq バッファー、1 μ l の 2 mM dNTPs、各々 0.5 μ l の合成プライマーセット、0.5 μ l の rTaq を混合した。この混合液を 95 $^{\circ}$ C で 2 分間変性させた後、95 $^{\circ}$ C、15 秒間・58 $^{\circ}$ C、15 秒間・72 $^{\circ}$ C、20 秒間を 1 サイクルとして 35 サイクル繰り返し、さらに 72 $^{\circ}$ C で 20 分間放置し PCR 反応を行った。BMCC1 のプライマーは、

25 以下の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。

FW: 5' CAATAGCCGGACATCCTCAA 3' (配列番号 46) RV:

5' TTCTCCAGACCATGCATGTT 3' (配列番号 47)

また陽性対照としてGAPDHを用いた。プライマーを以下に示す。

FW: 5' CTGCACCAACAATATCCC 3' (配列番号 48)

RV: 5' GTAGAGACAGGGTTTCAC 3' (配列番号 49)

5 (実施例 10) 半定量的PCRによる予後良好な神経芽細胞腫臨床組織依存的遺伝子発現量の測定

実施例 1 で得られた予後良好・不良神経芽細胞腫のトータルRNAについて、実施例 9 に示した条件でRT-PCR反応を行った。この反応液を 2.5% のアガロースゲルで電気泳動した。この結果、BMCC 1 遺伝子の発現が予後良好な神経芽細胞腫臨床組織に特異的であることが確認された。結果を図 2 に示す。なお、図 2 中、各レーンのサンプルは以下のとおりである。

レーン 1 ~ 16 : 予後良好な神経芽細胞腫臨床サンプルにおけるヒト BMCC 1 の発現

15 レーン 17 ~ 32 : 予後不良な神経芽細胞腫臨床サンプルにおけるヒト BMCC 1 の発現

レーン 33 ~ 48 : 予後良好な神経芽細胞腫臨床サンプルにおける GAPDH の発現

レーン 49 ~ 64 : 予後不良な神経芽細胞腫臨床サンプルにおける GAPDH の発現。

20 (実施例 11) 半定量的PCRによる組織依存的遺伝子発現量の測定

ヒト正常組織の mRNA (Clontech 社製) を用いて実施例 9 に示した条件で RT-PCR 反応を行った。この反応液を 2.5% のアガロースゲルで電気泳動した。この結果、BMCC 1 遺伝子発現の分布はヒト正常組織によって組織特異性があることが確認された。結果を図 3 に示す。

25 (実施例 12) 半定量的PCRによる癌細胞株依存的遺伝子発現量の測定

実施例 2 で得られたヒト癌細胞株のトータルRNAについて、実施例 9 に示し

た条件でRT-PCR反応を行った。この反応液を2.5%のアガロースゲルで電気泳動した。この結果、BMCC1遺伝子発現の分布は癌細胞株によって組織特異性があることが確認された。結果を図4に示す。

(実施例13) 半定量的PCRによる細胞分化依存的遺伝子発現量の測定

5 神経細胞への分化、アポトーシスを誘導する試薬として広く使用されているレチノイン酸を用いて以下の実験を行った。CHP134細胞を 1×10^6 の細胞数で直径10cmのディッシュにまき、100ng/mlのGDNFと最終的に5μMになるようにレチノイン酸(シグマ社製)を添加した無血清培地で培養した。7日間インキュベートした後、実施例2に示した条件で細胞からトータルRNA
10 を抽出し、実施例9に示した条件でRT-PCR反応を行った。この反応液を2.5%のアガロースゲルで電気泳動した。この結果、BMCC1遺伝子の発現が分化した細胞に特異的に増強されることが確認された。結果を図5に示す。なお、図5中、各レーンのサンプルは以下のとおりである。

レーン1：無処理、BMCC1の発現を測定

15 レーン2：レチノイン酸添加5日後、BMCC1の発現を測定

レーン3：レチノイン酸添加7日後、BMCC1の発現を測定

レーン4：レチノイン酸およびGDNF添加5日後、BMCC1の発現を測定

レーン5：レチノイン酸およびGDNF添加7日後、BMCC1の発現を測定

レーン6：無処理、GAPDHの発現を測定

20 レーン7：レチノイン酸添加5日後、GAPDHの発現を測定

レーン8：レチノイン酸添加7日後、GAPDHの発現を測定

レーン9：レチノイン酸およびGDNF添加5日後、GAPDHの発現を測定

レーン10：レチノイン酸およびGDNF添加7日後、GAPDHの発現を測定。

(実施例14) 半定量的PCRによる細胞周期依存的遺伝子発現量の測定

25 BMCC1遺伝子の塩基配列の一部に基づき、PCRプライマーを設計し、HeLa細胞を用いて細胞周期特異的な遺伝子発現量を比較定量した。HeLa細

胞はそれぞれ以下のように処理を行ったものを用いた。

(1) 無処理

(2) 400 μ Mのmimosineで18時間処理し、65%の細胞がG1期の状態

5 (3) 2mMのthymidineで20時間処理し、100%の細胞がS期の状態

(4) 0.6 μ g/mlのNocodazoleで18時間処理し、85%の細胞がG2/M期の状態

10 以上4種類のHeLa細胞から実施例2に示した条件でトータルRNAを抽出し、実施例9に示した条件でRT-PCR反応を行った。この反応液を1%のアガロースゲルで電気泳動した。この結果、BMCC1遺伝子の発現がG1期に特異的に増強されることが確認された。結果を図6に示す。なお、図6中、各レーンのサンプルは以下のとおりである。

レーン1：G1期、BMCC1の発現を測定

15 レーン2：S期、BMCC1の発現を測定

レーン3：G2/M期、BMCC1の発現を測定

レーン4：無処理、BMCC1の発現を測定

レーン5：G1期、GAPDHの発現を測定

レーン6：S期、GAPDHの発現を測定

20 レーン7：G2/M期、GAPDHの発現を測定

レーン8：無処理、GAPDHの発現を測定。

(実施例15) 定量的リアルタイムRT-PCRによる神経芽細胞腫臨床組織依存的遺伝子発現量の測定

(神経芽細胞腫臨床組織の分類)

25 神経芽細胞腫の臨床組織を以下の項目について分類した。

発症年齢：1才未満（1群）、1歳以上（2群）

病期：1または2または4 s（1群）、3または4（2群）

マスキリング：陽性（1群）、陰性（2群）

MYCNの増幅：増幅無し（1群）、増幅有り（2群）

TrkAの発現：高発現（1群）、低発現（2群）

5 発症部位：副腎以外（1群）、副腎（2群）

予後：生存（1群）、死亡（2群）

なお、いずれの項目においても1群が予後良好、2群が予後不良の指標になる事が知られている。

10 分類した臨床サンプルについて、ヒトBMCC1遺伝子の発現量を定量的リアルタイムRT-PCRにより確認した。

（逆転写（RT）反応）

神経芽細胞腫の臨床組織の15 μ gのトータルRNAをSuperscript II reverse transcriptase（GIBCO社製）を用いてcDNAに逆転写した。

15 （PCR反応）

PCR反応は7700Prism（Perkin-Elmer社製）を用いて行った。2 μ lのcDNA、終濃度300 nMのプライマー、終濃度208 nMのプローブ、2.5 μ lの1×TaqMan Universal PCR Master Mix（Perkin-Elmer社製）を混合し滅菌蒸留水で25 μ lとした。この混合液を50°Cで2分間放置し、さらに95°Cで10分間変性させた後、95°C、15秒間・60°C、1分間を1サイクルとして40サイクル繰り返しPCR反応を行った。ヒトBMCC1遺伝子のプライマーおよびプローブは以下の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。

FW：5'GGACAGTGGTCATTGGAGAACA3'（配列番号50）

25 RV：5'TTAGACCGTCCCCATAGTATCCTC3'（配列番号51）

probe：5'FAM-ACATGAAGGTCATCGAGCCCTACAG

GAGAG-TAMRA 3' (配列番号 52)

また陽性対照としてGAPDHを用いた。プライマーおよびプローブ (Perkin-Elmer社製) として、以下の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。

- 5 FW: 5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3' (配列番号 53) RV: 5' GAAGATGGTGATGGGATTTTC 3' (配列番号 54) Probe: 5' CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC 3' (配列番号 55)

BMCC1の定量は、あらかじめ濃度を測定したBMCC1を含むプラスミドとGAPDHとの比較において算定した。いずれの場合も1群でBMCC1は高い発現を示した。結果を表1に示す。

表 1

	患者数	BMCC1の発現量 Mean±SEM	p value
発症年齢			
1才未満	63	1.823±0.23	0.0003
1才以上	36	0.633±0.146	
病期			
1または2または4s	59	1.965±0.232	<.0001
3または4	40	0.542±0.131	
マスキリング			
陽性	55	1.875±0.217	0.0007
陰性	44	0.784±0.220	
MYCNの増幅			
増幅無し	70	1.796±0.205	<.0001
増幅有り	28	0.296±0.098	
TrkAの発現			
高発現	54	1.814±0.221	0.004
低発現	45	0.882±0.223	
病巣			
副腎以外	37	1.862±0.299	0.0306
副腎	60	1.124±0.189	
予後			
生存	77	1.632±0.195	0.007
死亡	21	0.560±0.199	

(実施例16) BMCC1タンパク質の構造解析

BMCC1タンパク質の構造をPSORT II (Nakai K等:Trends Biochem Sci. 24 (1):34-36 (1999))、SOPM (Geourjon C等:Protein Eng. 7 (2):157-164 (1994))、TM pred (Geourjon C等:Protein Eng. 7 (2):157-164 (1994))を用いて解析を行った。得られた結果から推測されるBMCC1タンパク質の構造の模式図を図7に示す。図中、黒で塗りつぶしたバンド部分(1)は、coiled-coil領域(917残基-946残基)を示し、ハッチ・バンド部分(2)は、核移行性シグナル領域(領域1:2434残基-2441残基;領域2:2604残基-2608残基)を示し、ハッチ・バンド部分(3)は、膜貫通領域(領域1:7967塩基-8010塩基;領域2:8215塩基-8291塩基)を示す。

産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明のヒトBMCC1遺伝子およびタンパク質を利用して、神経芽細胞腫の予後良不良に関係する遺伝子の塩基配列を明らかにし、その遺伝子情報および前記遺伝子の転写産物であるタンパク質の機能に関する情報を提供することが可能となる。

請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とするタンパク質またはその塩。
2. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を有することを特徴とするタンパク質またはその塩。
3. 前記アミノ酸配列を有し、且つアポトーシス誘導活性を有することを特徴とする請求項 2 に記載のタンパク質またはその塩。
4. 請求項 1 に記載のタンパク質または該タンパク質の部分ペプチドをコードすることを特徴とする核酸。
5. 配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列を有することを特徴とする核酸。
6. 請求項 4 に記載の核酸と、若しくはその相補的な核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする単離された核酸。
7. 前記核酸がコードするタンパク質がアポトーシス誘導活性を有することを特徴とする請求項 6 に記載の核酸。
8. 配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列の一部からなることを特徴とする核酸。
9. 予後良好および不良なヒト神経芽細胞腫との比較において、予後良好なヒト神経芽細胞腫で発現が増強していることを特徴とする請求項 4～8 のいずれか一項に記載の核酸。

図1

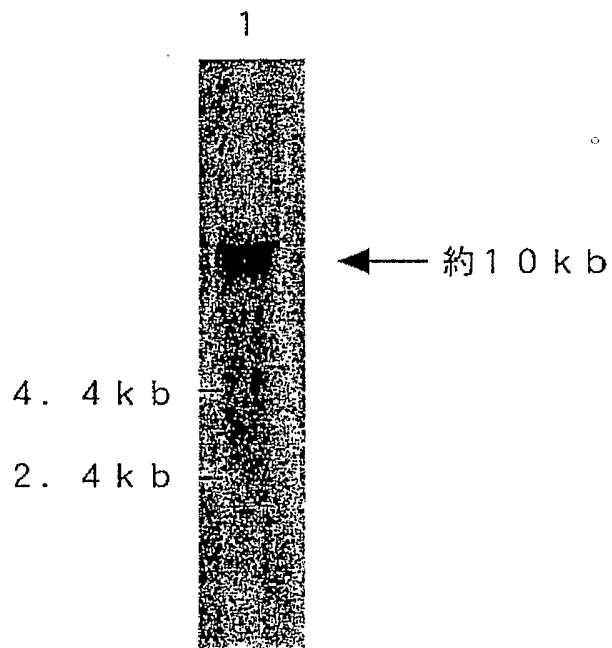


図2

3 3	1
3 4	2
3 5	3
3 6	4
3 7	5
3 8	6
3 9	7
4 0	8
4 1	9
4 2	1 0
4 3	1 1
4 4	1 2
4 5	1 3
4 6	1 4
4 7	1 5
4 8	1 6

4 9	1 7
5 0	1 8
5 1	1 9
5 2	2 0
5 3	2 1
5 4	2 2
5 5	2 3
5 6	2 4
5 7	2 5
5 8	2 6
5 9	2 7
6 0	2 8
6 1	2 9
6 2	0 3
6 3	3 1
6 4	3 2

図3

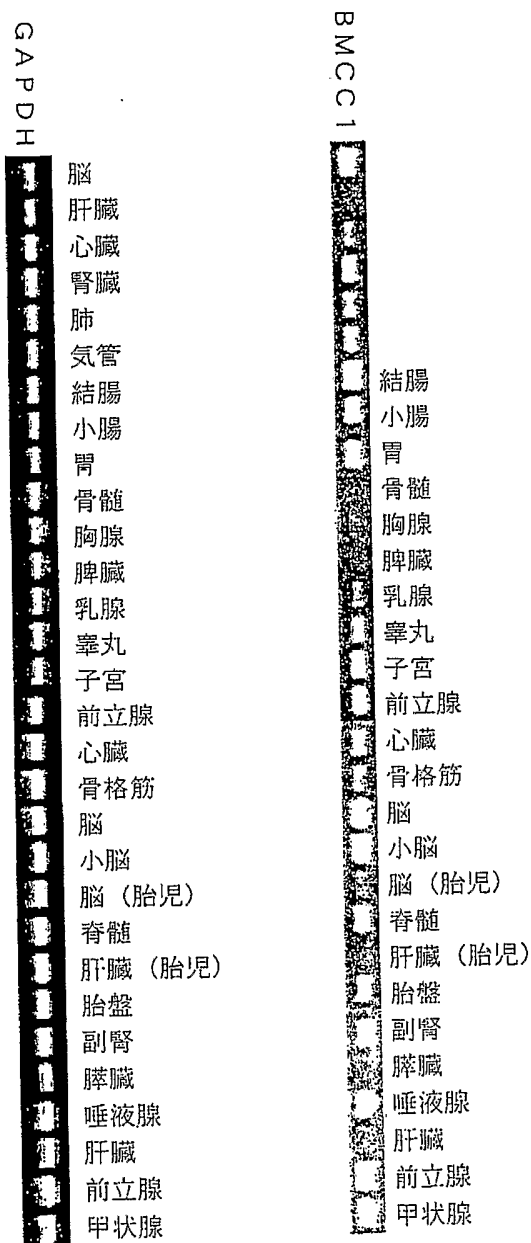


図4

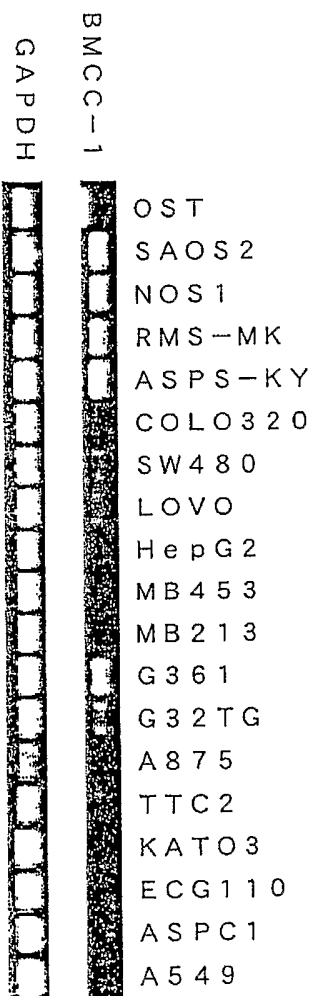


図5

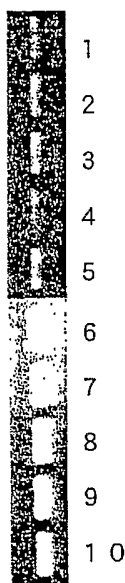
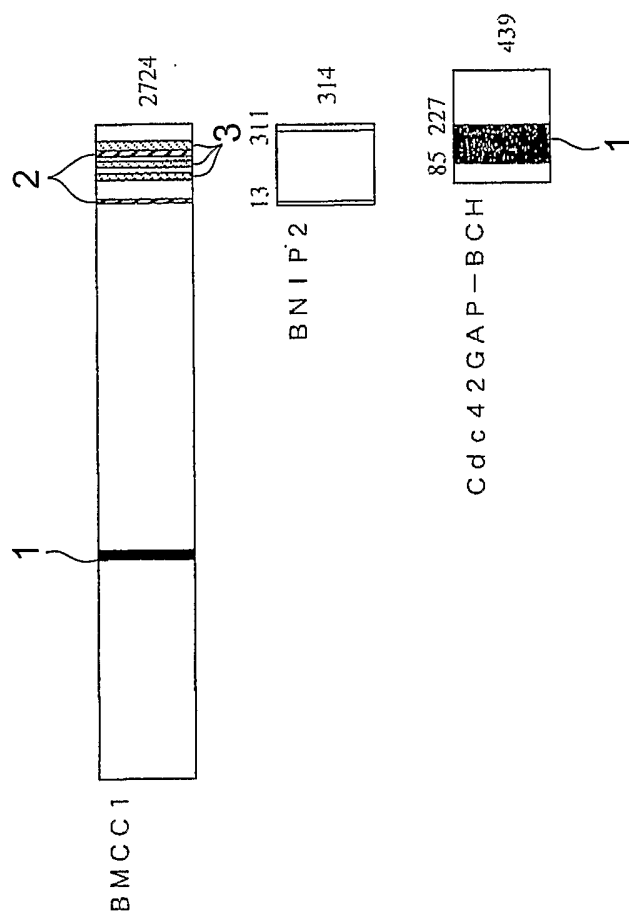


図6



図7



SEQUENCE LISTING

<110> Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

5 <120> Novel human BMCC1 gene

<130> FP02-0208-00WO-HM

<150> JP2001-255198

10 <151> 2001/8/24

<160> 55

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 2724

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 1

Met Val Ser Asn Ser Arg Thr Ser Ser Thr Glu Ala Val Ala Gly Ser

1

5

10

15

25

Ala Pro Leu Ser Gln Gly Ser Ser Gly Ile Met Glu Leu Tyr Gly Ser

20

25

30

Asp Ile Glu Pro Gln Pro Ser Ser Val Asn Phe Ile Glu Asn Pro Pro
 35 40 45
 5 Asp Leu Asn Asp Ser Asn Gln Ala Gln Val Asp Ala Asn Val Asp Leu
 50 55 60
 Val Ser Pro Asp Ser Gly Leu Ala Thr Ile Arg Ser Ser Arg Ser Ser
 65 70 75 80
 10 Lys Glu Ser Ser Val Phe Leu Ser Asp Asp Ser Pro Val Gly Glu Gly
 85 90 95
 Ala Gly Pro His His Thr Leu Leu Pro Gly Leu Asp Ser Tyr Ser Pro
 15 100 105 110
 Ile Pro Glu Gly Ala Val Ala Glu Glu His Ala Trp Ser Gly Glu His
 115 120 125
 20 Gly Glu His Phe Asp Leu Phe Asn Phe Asp Pro Ala Pro Met Ala Ser
 130 135 140
 Gly Gln Ser Gln Gln Ser Ser His Ser Ala Asp Tyr Ser Pro Ala Asp
 145 150 155 160
 25 Asp Phe Phe Pro Asn Ser Asp Leu Ser Glu Gly Gln Leu Pro Ala Gly

		165		170		175										
	Pro	Glu	Gly	Leu	Asp	Gly	Met	Gly	Thr	Asn	Met	Ser	Asn	Tyr	Ser	Ser
		180		185		190										
5	Ser	Ser	Leu	Leu	Ser	Gly	Ala	Gly	Lys	Asp	Ser	Leu	Val	Glu	His	Asp
		195		200		205										
	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Arg	Gln	Asp	Ser	Pro	Arg	Asp	Asn	Ser	Glu	Arg
10		210		215		220										
	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Asp	Phe	Val	Gly	Asp	Glu	Ser	Pro	Ser	Pro	Glu
	225			230		235		240								
15	Arg	Leu	Lys	Asn	Thr	Gly	Lys	Arg	Ile	Pro	Pro	Thr	Pro	Met	Asn	Ser
				245		250		255								
	Leu	Val	Glu	Ser	Ser	Pro	Ser	Thr	Glu	Glu	Pro	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr
20		260		265		270										
	Glu	Asp	Met	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Asp	Thr	Gly	His	Met	Gly	Pro	Pro
		275		280		285										
	Gln	Thr	His	Ala	Arg	Cys	Ser	Ser	Trp	Trp	Gly	Gly	Leu	Glu	Ile	Asp
25		290		295		300										

Ser Lys Asn Ile Ala Asp Ala Trp Ser Ser Ser Glu Gln Glu Ser Val
 305 310 315 320

Phe Gln Ser Pro Glu Ser Trp Lys Glu His Lys Pro Ser Ser Ile Asp
 5 325 330 335

Arg Arg Ala Ser Asp Ser Val Phe Gln Pro Lys Ser Leu Glu Phe Thr
 340 345 350

10 Lys Ser Gly Pro Trp Glu Ser Glu Phe Gly Gln Pro Glu Leu Gly Ser
 355 360 365

Asn Asp Ile Gln Asp Lys Asn Glu Glu Ser Leu Pro Phe Gln Asn Leu
 370 375 380

15 Pro Met Glu Lys Ser Pro Leu Pro Asn Thr Ser Pro Gln Gly Thr Asn
 385 390 395 400

His Leu Ile Glu Asp Phe Ala Ser Leu Trp His Ser Gly Arg Ser Pro
 20 405 410 415

Thr Ala Met Pro Glu Pro Trp Gly Asn Pro Thr Asp Asp Gly Glu Pro
 420 425 430

25 Ala Ala Val Ala Pro Phe Pro Ala Trp Ser Ala Phe Gly Lys Glu Asp
 435 440 445

His Asp Glu Ala Leu Lys Asn Thr Trp Asn Leu His Pro Thr Ser Ser
 450 455 460

5 Lys Thr Pro Ser Val Arg Asp Pro Asn Glu Trp Ala Met Ala Lys Ser
 465 470 475 480

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Ser Glu Leu Leu Asp Asn Ser Pro Ser Glu
 485 490 495

10 Ile Asn Asn Glu Ala Ala Pro Glu Ile Trp Gly Lys Lys Asn Asn Asp
 500 505 510

Ser Arg Asp His Ile Phe Ala Pro Gly Asn Pro Ser Ser Asp Leu Asp
 15 515 520 525

His Thr Trp Thr Asn Ser Lys Pro Pro Lys Glu Asp Gln Asn Gly Leu
 530 535 540

20 Val Asp Pro Lys Thr Arg Gly Lys Val Tyr Glu Lys Val Asp Ser Trp
 545 550 555 560

Asn Leu Phe Glu Glu Asn Met Lys Lys Gly Gly Ser Asp Val Leu Val
 565 570 575

25 Pro Trp Glu Asp Ser Phe Leu Ser Tyr Lys Cys Ser Asp Tyr Ser Ala

	580		585		590
	Ser Asn Leu Gly Glu Asp Ser Val Pro Ser Pro Leu Asp Thr Asn Tyr				
	595		600		605
5					
	Ser Thr Ser Asp Ser Tyr Thr Ser Pro Thr Phe Ala Gly Asp Glu Lys				
	610		615		620
	Glu Thr Glu His Lys Pro Phe Ala Lys Glu Glu Gly Phe Glu Ser Lys				
10	625		630		635
					640
	Asp Gly Asn Ser Thr Ala Glu Glu Thr Asp Ile Pro Pro Gln Ser Leu				
			645		650
					655
15	Gln Gln Ser Ser Arg Asn Arg Ile Ser Ser Gly Pro Gly Asn Leu Asp				
			660		665
					670
	Met Trp Ala Ser Pro His Thr Asp Asn Ser Ser Glu Ile Asn Thr Thr				
	675		680		685
20					
	His Asn Leu Asp Glu Asn Glu Leu Lys Thr Glu His Thr Asp Gly Lys				
	690		695		700
	Asn Ile Ser Met Glu Asp Asp Val Gly Glu Ser Ser Gln Ser Ser Tyr				
25	705		710		715
					720

	995	1000	1005
	Leu Val Ala Ser Glu His Gln Glu Ile Cys Ile Lys Ser Gly Lys Ile		
	1010	1015	1020
5	Ser Ser Leu Ala Val Thr Phe Ser Pro Gln Thr Glu Glu Pro Glu Glu		
	1025	1030	1035 1040
	Val Leu Glu Tyr Glu Glu Gly Ser Tyr Asn Leu Asp Ser Arg Asp Val		
10	1045	1050	1055
	Gln Thr Gly Met Ser Ala Asp Asn Leu Gln Pro Lys Asp Thr His Glu		
	1060	1065	1070
15	Lys His Leu Met Ser Gln Arg Asn Ser Gly Glu Thr Thr Glu Thr Ser		
	1075	1080	1085
	Asp Gly Met Asn Phe Thr Lys Tyr Val Ser Val Pro Glu Lys Asp Leu		
20	1090	1095	1100
	Glu Lys Thr Glu Glu Cys Asn Phe Leu Glu Pro Glu Asn Val Gly Gly		
	1105	1110	1115 1120
	Gly Pro Pro His Arg Val Pro Arg Ser Leu Asp Phe Gly Asp Val Pro		
25	1125	1130	1135

Ile Asp Ser Asp Val His Val Ser Ser Thr Cys Ser Glu Ile Thr Lys
 1140 1145 1150

Asn Leu Asp Val Lys Gly Ser Glu Asn Ser Leu Pro Gly Ala Gly Ser
 5 1155 1160 1165

Ser Gly Asn Phe Asp Arg Asp Thr Ile Ser Ser Glu Tyr Thr His Ser
 1170 1175 1180

10 Ser Ala Ser Ser Pro Glu Leu Asn Asp Ser Ser Val Ala Leu Ser Ser
 1185 1190 1195 1200

Trp Gly Gln Gln Pro Ser Ser Gly Tyr Gln Glu Glu Asn Gln Gly Asn
 1205 1210 1215

15 Trp Ser Glu Gln Asn His Gln Glu Ser Glu Leu Ile Thr Thr Asp Gly
 1220 1225 1230

Gln Val Glu Ile Val Thr Lys Val Lys Asp Leu Glu Lys Asn Arg Ile
 20 1235 1240 1245

Asn Glu Phe Glu Lys Ser Phe Asp Arg Lys Thr Pro Thr Phe Leu Glu
 1250 1255 1260

25 Ile Trp Asn Asp Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Ser Ser Leu Ser Ser
 1265 1270 1275 1280

Pro Glu Thr Gly Lys Tyr Ser Glu His Ser Gly Thr His Gln Glu Ser
 1285 1290 1295

5 Asn Leu Ile Ala Ser Tyr Gln Glu Lys Asn Glu His Asp Ile Ser Ala
 1300 1305 1310

Thr Val Gln Ser Glu Asp Ala Arg Val Ile Ser Thr Ser Ser Gly Ser
 1315 1320 1325

10

Asp Asp Asp Ser Val Gly Gly Glu Glu Ser Ile Glu Glu Glu Ile Gln
 1330 1335 1340

15 Val Ala Asn Cys His Val Ala Glu Asp Glu Ser Arg Ala Trp Asp Ser
 1345 1350 1355 1360

Leu Asn Glu Ser Asn Lys Phe Leu Val Thr Ala Asp Pro Lys Ser Glu
 1365 1370 1375

20 Asn Ile Tyr Asp Tyr Leu Asp Ser Ser Glu Pro Ala Glu Asn Glu Asn
 1380 1385 1390

Lys Ser Asn Pro Phe Cys Asp Asn Gln Gln Ser Ser Pro Asp Pro Trp
 1395 1400 1405

25

Thr Phe Ser Pro Leu Thr Glu Thr Glu Met Gln Ile Thr Ala Val Glu

1410

1415

1420

Lys Glu Lys Arg Ser Ser Pro Glu Thr Gly Thr Thr Gly Asp Val Ala

1425

1430

1435

1440

5

Trp Gln Ile Ser Pro Lys Ala Ser Phe Pro Lys Asn Glu Asp Asn Ser

1445

1450

1455

Gln Leu Glu Met Leu Gly Phe Ser Ala Asp Ser Thr Glu Trp Trp Lys

10

1460

1465

1470

Ala Ser Pro Gln Glu Gly Arg Leu Ile Glu Ser Pro Phe Glu Arg Glu

1475

1480

1485

15

Leu Ser Asp Ser Ser Gly Val Leu Glu Ile Asn Ser Ser Val His Gln

1490

1495

1500

Asn Ala Ser Pro Trp Gly Val Pro Val Gln Gly Asp Ile Glu Pro Val

1505

1510

1515

1520

20

Glu Thr His Tyr Thr Asn Pro Phe Ser Asp Asn His Gln Ser Pro Phe

1525

1530

1535

Leu Glu Gly Asn Gly Lys Asn Ser His Glu Gln Leu Trp Asn Ile Gln

25

1540

1545

1550

Pro Arg Gln Pro Asp Pro Asp Ala Asp Lys Phe Ser Gln Leu Val Lys
1555 1560 1565

Leu Asp Gln Ile Lys Glu Lys Asp Ser Arg Glu Gln Thr Phe Val Ser
5 1570 1575 1580

Ala Ala Gly Asp Glu Leu Thr Pro Glu Thr Pro Thr Gln Glu Gln Cys
1585 1590 1595 1600

Gln Asp Thr Met Leu Pro Val Cys Asp His Pro Asp Thr Ala Phe Thr
10 1605 1610 1615

His Ala Glu Glu Asn Ser Cys Val Thr Ser Asn Val Ser Thr Asn Glu
15 1620 1625 1630

Gly Gln Glu Thr Asn Gln Trp Glu Gln Glu Lys Ser Tyr Leu Gly Glu
1635 1640 1645

Met Thr Asn Ser Ser Ile Ala Thr Glu Asn Phe Pro Ala Val Ser Ser
20 1650 1655 1660

Pro Thr Gln Leu Ile Met Lys Pro Gly Ser Glu Trp Asp Gly Ser Thr
1665 1670 1675 1680

Pro Ser Glu Asp Ser Arg Gly Thr Phe Val Pro Asp Ile Leu His Gly
25 1685 1690 1695

Asn Phe Gln Glu Gly Gly Gln Leu Ala Ser Ala Ala Pro Asp Leu Trp
1700 1705 1710

5 Ile Asp Ala Lys Lys Pro Phe Ser Leu Lys Ala Asp Gly Glu Asn Pro
1715 1720 1725

Asp Ile Leu Thr His Cys Glu His Asp Ser Asn Ser Gln Ala Ser Asp
1730 1735 1740

10

Ser Pro Asp Ile Cys His Asp Ser Glu Ala Lys Gln Glu Thr Glu Lys
1745 1750 1755 1760

15

His Leu Ser Ala Cys Met Gly Pro Glu Val Glu Ser Ser Glu Leu Cys
1765 1770 1775

Leu Thr Glu Pro Glu Ile Asp Glu Glu Pro Ile Tyr Glu Pro Gly Arg
1780 1785 1790

20

Glu Phe Val Pro Ser Asn Ala Glu Leu Asp Ser Glu Asn Ala Thr Val
1795 1800 1805

Leu Pro Pro Ile Gly Tyr Gln Ala Asp Ile Lys Gly Ser Ser Gln Pro
1810 1815 1820

25

Ala Ser His Lys Gly Ser Pro Glu Pro Ser Glu Ile Asn Gly Asp Asn

1825 1830 1835 1840
 Ser Thr Gly Leu Gln Val Ser Glu Lys Gly Ala Ser Pro Asp Met Ala
 1845 1850 1855
 5
 Pro Ile Leu Glu Pro Val Asp Arg Arg Ile Pro Arg Ile Glu Asn Val
 1860 1865 1870
 Ala Thr Ser Ile Phe Val Thr His Gln Glu Pro Thr Pro Glu Gly Asp
 10 1875 1880 1885
 Gly Ser Trp Ile Ser Asp Ser Phe Ser Pro Glu Ser Gln Pro Gly Ala
 1890 1895 1900
 15 Arg Ala Leu Phe Asp Gly Asp Pro His Leu Ser Thr Glu Asn Pro Ala
 1905 1910 1915 1920
 Leu Val Pro Asp Ala Leu Leu Ala Ser Asp Thr Cys Leu Asp Ile Ser
 1925 1930 1935
 20
 Glu Ala Ala Phe Asp His Ser Phe Ser Asp Ala Ser Gly Leu Asn Thr
 1940 1945 1950
 Ser Thr Gly Thr Ile Asp Asp Met Ser Lys Leu Thr Leu Ser Glu Gly
 25 1955 1960 1965

His Pro Glu Thr Pro Val Asp Gly Asp Leu Gly Lys Gln Asp Ile Cys
 1970 1975 1980

Ser Ser Glu Ala Ser Trp Gly Asp Phe Glu Tyr Asp Val Met Gly Gln
 5 1985 1990 1995 2000

Asn Ile Asp Glu Asp Leu Leu Arg Glu Pro Glu His Phe Leu Tyr Gly
 2005 2010 2015

10 Gly Asp Pro Pro Leu Glu Glu Asp Ser Leu Lys Gln Ser Leu Ala Pro
 2020 2025 2030

Tyr Thr Pro Pro Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Thr Glu Pro Ala Gln Ser
 2035 2040 2045

15 Ala Glu Thr Ile Glu Glu Ala Gly Ser Pro Glu Asp Glu Ser Leu Gly
 2050 2055 2060

Cys Arg Ala Ala Glu Ile Val Leu Ser Ala Leu Pro Asp Arg Arg Ser
 20 2065 2070 2075 2080

Glu Gly Asn Gln Ala Glu Thr Lys Asn Arg Leu Pro Gly Ser Gln Leu
 2085 2090 2095

25 Ala Val Leu His Ile Arg Glu Asp Pro Glu Ser Val Tyr Leu Pro Val
 2100 2105 2110

Gly Ala Gly Ser Asn Ile Leu Ser Pro Ser Asn Val Asp Trp Glu Val
2115 2120 2125

5 Glu Thr Asp Asn Ser Asp Leu Pro Ala Gly Gly Asp Ile Gly Pro Pro
2130 2135 2140

Asn Gly Ala Ser Lys Glu Ile Pro Glu Leu Glu Glu Glu Lys Thr Ile
2145 2150 2155 2160

10 Pro Thr Lys Glu Pro Glu Gln Ile Lys Ser Glu Tyr Lys Glu Glu Arg
2165 2170 2175

Cys Thr Glu Lys Asn Glu Asp Arg His Ala Leu His Met Asp Tyr Ile
15 2180 2185 2190

Leu Val Asn Arg Glu Glu Asn Ser His Ser Lys Pro Glu Thr Cys Glu
2195 2200 2205

20 Glu Arg Glu Ser Ile Ala Glu Leu Glu Leu Tyr Val Gly Ser Lys Glu
2210 2215 2220

Thr Gly Leu Gln Gly Thr Gln Leu Ala Ser Phe Pro Asp Thr Cys Gln
2225 2230 2235 2240

25 Pro Ala Ser Leu Asn Glu Arg Lys Gly Leu Ser Ala Glu Lys Met Ser

	2245	2250	2255
	Ser Lys Gly Asp Thr Arg Ser Ser Phe Glu Ser Pro Ala Gln Asp Gln		
	2260	2265	2270
5	Ser Trp Met Phe Leu Gly His Ser Glu Val Gly Asp Pro Ser Leu Asp		
	2275	2280	2285
	Ala Arg Asp Ser Gly Pro Gly Trp Ser Gly Lys Thr Val Glu Pro Phe		
10	2290	2295	2300
	Ser Glu Leu Gly Leu Gly Glu Gly Pro Gln Leu Gln Ile Leu Glu Glu		
	2305	2310	2315
	2320		
15	Met Lys Pro Leu Glu Ser Leu Ala Leu Glu Glu Ala Ser Gly Pro Val		
	2325	2330	2335
	Ser Gln Ser Gln Lys Ser Lys Ser Arg Gly Arg Ala Gly Pro Asp Ala		
	2340	2345	2350
20	Val Thr His Asp Ser Glu Trp Glu Met Leu Ser Pro Gln Pro Val Gln		
	2355	2360	2365
	Lys Asn Met Ile Ser Asp Thr Glu Met Glu Glu Glu Thr Glu Phe Leu		
25	2370	2375	2380

Arg Ile Asp Met Lys Val Ile Glu Pro Tyr Arg Arg Val Ile Ser His
 2530 2535 2540

5 Gly Gly Tyr Tyr Gly Asp Gly Leu Asn Ala Ile Ile Val Phe Ala Ala
 2545 2550 2555 2560

Cys Phe Leu Pro Asp Ser Ser Arg Ala Asp Tyr His Tyr Val Met Glu
 2565 2570 2575

10 Asn Leu Phe Leu Tyr Val Ile Ser Thr Leu Glu Leu Met Val Ala Glu
 2580 2585 2590

Asp Tyr Met Ile Val Tyr Leu Asn Gly Ala Thr Pro Arg Arg Arg Met
 15 2595 2600 2605

Pro Gly Leu Gly Trp Met Lys Lys Cys Tyr Gln Met Ile Asp Arg Arg
 2610 2615 2620

20 Leu Arg Lys Asn Leu Lys Ser Phe Ile Ile Val His Pro Ser Trp Phe
 2625 2630 2635 2640

Ile Arg Thr Ile Leu Ala Val Thr Arg Pro Phe Ile Ser Ser Lys Phe
 2645 2650 2655

25 Ser Ser Lys Ile Lys Tyr Val Asn Ser Leu Ser Glu Leu Ser Gly Leu

2660

2665

2670

Ile Pro Met Asp Cys Ile His Ile Pro Glu Ser Ile Ile Lys Leu Asp

2675

2680

2685

5

Glu Glu Leu Arg Glu Ala Ser Glu Ala Ala Lys Thr Ser Cys Leu Tyr

2690

2695

2700

Asn Asp Pro Glu Met Ser Ser Met Glu Lys Asp Ile Asp Leu Lys Leu

10

2705

2710

2715

2720

Lys Glu Lys Pro

15

<210> 2

<211> 11690

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<400> 2

gaattgtcta tttcacagca atattaccag tgacttgaaa gcatttacag acaagtttgg 60

ttttgatgtc ctcatcctgt tctccagcta tctgtcagag gagcagcagc cgagacgaca 120

gattgctgtg tactcagaaa acatggagct gtgcagtcag atttgctgtg agctggaaga 180

gtgtcagaac ccttgccctag aactggagcc ctttgactgt ggctgtgatg agatcctggt 240

25

gtaccaacaa gaggaccctt cagtgacttg tgatcaggtg gttctcgttg tcaaggaagt 300

catcaacagg aggtgtccag agatgggtctc caatagccgg acatcctcaa cagaagccgt 360

ggcaggcagt gccccctct cccaggggtc ttctgggatt atggaattgt atggttctga 420
catagagcca caaccagct ctgtgaattt catagagaac cctccagatc tcaatgattc 480
taaccaggct caggtggatg ccaatgtaga ccttgtttagc ccagacagcg gactggctac 540
cattaggagc agccgctcat ccaaggagag ctctgttttc ctcaagtacg acagccccgt 600
5 gggagaaggt gctgggcctc accacacct tctcccaggg cttgactcct acagccccat 660
ccctgaaggg gcggtggcgg aggaacatgc atggtctgga gaacacggtg agcacttcga 720
cctcttcaat tttgaccag cacccatggc ttctgggcag tcccagcaat cttctcattc 780
tgcagactac tccccagcag atgacttctt ccccaacagt gacctgtcag aaggacagct 840
ccccgtggg cctgaaggac ttgatggcat gggaaccaac atgtctaatt attcatccag 900
10 ttcacttttg tcaggggctg gcaaagatag ccttggtgaa catgatgagg agtttgtcca 960
gagacaagac agtcccagag ataactctga aagaaattg agcctgacag attttgtggg 1020
agatgaatcc ccttcccag aaaggctaaa aaatactgga aagaggatcc caccaacacc 1080
catgaatagt ttagtagaaa gctcgccatc cactgaagaa ccagcctcac tctatacaga 1140
agatatgacc caaaaagcaa ctgacacagg tcacatgggg ccacctcaga cccatgcacg 1200
15 gtgcagcagc tgggtgggtg gtttggaaat tgactccaaa aatattgcag atgcgtggag 1260
ttccagtga caggaatctg ttttccagag ccctgaatca tggaaagagc ataagccaag 1320
ctccattgat aggagagcct cagattctgt atttcaacca aagagcctcg aatttcaaaa 1380
gtcagggtccc tgggagtctg aatttggta gctgaactg ggtagcaatg atattcaaga 1440
caaaaatgag gaaagcttgc cgttccagaa cctgcccattg gagaagtcac ctttgccaaa 1500
20 tacatctccc caaggaaca accacctgat agaagacttt gcttctttgt ggcattctgg 1560
tcgctctccc acagccatgc ccgagccctg gggaaatcct acagatgatg gtgaaccagc 1620
agctgtggcg ccattcccag cctggagtgc atttggtaaa gaagatcatg atgaagcttt 1680
aaaaaatacc tggaatttgc acccaacaag cagcaagaca ctttctgta gggacccgaa 1740
tgagtgggcc atggcaaaaa gtgggtttgc ctttcttct tcagaactac tggacaattc 1800
25 acccagtgag ataaacaatg aagcagctcc agaaatctgg ggcaagaaaa acaatgactc 1860
cagggatcac atctttgcac ctggaaatcc cagtctgat ctggatcaca catggactaa 1920

ttctaagcca ccaaaagaag atcagaatgg tttagtggat cctaaaacta ggggcaaggt 1980
 atatgaaaag gtagattcct ggaacctttt tgaggagaat atgaagaaag gagggtcaga 2040
 tgtcctagtt ccttggaag attccttctt atcttataaaa tgttctgatt acagtgcatac 2100
 caacctagga gaagattcgg tgccttcccc cttagatacc aattattcca cctcagactc 2160
 5 ttacacatca ccaacatttg ctggagacga aaaggaaact gaacacaagc catttgctaa 2220
 agaggaaggt tttgagtcaa aagatggtaa ctccacggca gaggagactg acattcctcc 2280
 tcagtcaactg caacagtcata ctcgaaatcg aatcagttca ggtcctggga acctagacat 2340
 gtgggcttca cctcatacag ataacagttc tgaataaat accactcaca acctggatga 2400
 aaatgaactc aagacagagc acacagatgg taagaatata tccatggagg atgacgtcgg 2460
 10 ggaaagcagc cagtccagtt acgacgacc cagcatgatg caactgtaca atgaaacaaa 2520
 ccgacaactc aacttttgc acagcagcac caactcccgg cagacggccc ctgacagtct 2580
 cgacttgagg aacagagtga ttttgaggga tactcagtc actgcaacga tctcagatat 2640
 ggacaatgat ttggactggg atgactgcag tgggggtgcg gcaatcccca gtgatggta 2700
 aacagaagga tacatggctg aaggttccga gccgaaacc cgatttacag tgagacagct 2760
 15 ggaaccctgg ggcttgagat atcaggaagc aaatcaggtg gattgggagc tcctgcctc 2820
 tgatgagcat accaaggaca gtgctcccag tgaacatcac acattgaatg agaaaagtgg 2880
 gcagctaatt gcaaacagta tttgggattc tgtcatgaga gataaagaca tgtcatcatt 2940
 catgttacca ggctcctcac atatacacaga ttcagagcaa aggaattgc ctctgaaat 3000
 cccagccat tcagcaaatg ttaaagacac tcattcccca gatgogccag cagcctctgg 3060
 20 aaccagtga tcagaggcac ttatatctca tcttgacaag caggacacag agagggaaac 3120
 cctgcaaagt gatgcagcat ccttgogac taggcttgag aatccagggt atttccaca 3180
 cccagatcca tggaaaggtc atggcgatgg acaaagtga agtgagaagg aagcccaggg 3240
 agccactgac agggggcacc ttgatgaaga ggaggtgatc gcctctggtg tggagaatgc 3300
 ctcagggatt tctgaaaaag ggcagagtga ccaggaactg tcttctctgg ttgcatctga 3360
 25 acatcaggaa atctgcatta aatcaggcaa aatcagctct cttgctgtca cttcagctc 3420
 tcaaaccgag gaaccagagg aagttttaga gtatgaggag ggtcttaca atctagactc 3480

ccgtgatgtg caaacagga tgtccgcaga taacctgcag ccaaaagata cccatgaaaa 3540
acacctcatg agtcaaagaa attcaggtga aactactgag acttcagatg ggatgaattt 3600
cacaaaatat gtatctgtac ctgaaaagga tcttgagaaa actgaagaat gtaactttct 3660
agagccagag aacgtgggtg gagggccacc tcacagagtt ccccgagtc ttgattttgg 3720
5 ggacgtccct atagacagtg atgtgcatgt cagcagcaca tgttctgaga taaccaaaaa 3780
tcttgacgtt aaggggtctg aaaatagcct tccaggagcc ggttcgtctg gaaattttga 3840
cagagatact atttctagtg agtatactca ttcaagtgca tcaagtctg agttaaatga 3900
ctcttcagtt gcaactgtcct cctggggcca gcaaccagt tctgggtatc aagaagaaaa 3960
ccaaggcaac tggagtgaac agaataacca agaatactgaa ctaattacca ctgatggcca 4020
10 agtagaaata gttaccaaag tgaaggattt agagaaaaac agaataaatg agtttgaaaa 4080
gagctttgat cgcaaaactc ctacatTTTT agagatctgg aatgactcag ttgatgggtga 4140
ttccttttcc tctttatcca gtctgaaac aggcaaatat tctgaacatt caggacaca 4200
tcaggaaagc aatctaattg cttagctacca ggagaaaaat gaacatgaca tttctgcaac 4260
tgtgcaatca gaggatgcca gggtcatttc aacaagctca ggttctgatg atgacagtgt 4320
15 cgggtggtgaa gagtcaatag aggaagagat ccaggtggcc aactgccacg ttgctgagga 4380
tgaatccaga gcttgggatt cattgaatga atctaataag ttcttgggtca cagctgatcc 4440
taagtctgaa aatatttatg actacctaga cagctcagag ccagcagaga atgagaataa 4500
gtcaaacca ttctgtgaca atcaaaaag cagccctgat cctggactt tctcaccatt 4560
aacggagact gaaatgcaga ttacagcagt ggagaaggag aagagatctt ctccagaaac 4620
20 agggacaaca ggagatggtg catggcaaat atctcccaa gcttcgttcc caaagaacga 4680
agataattct caactggaaa tgctgggctt ctgagctgat agcaactgagt ggtggaaggc 4740
ctcaccag gaaggagac taattgaaag tccatttgaa agggagctgt ctgactccag 4800
tggtgtgttg gagataaatt cttcagtaca ccaaatgcc agtccctggg gagtaccagt 4860
tcagggtgat attgagcccg tggaacaca ctatactaat ctttttagtg acaaccatca 4920
25 gtcacccttt ctggaaggta atgggaagaa ctcccatgag caactctgga acattcaacc 4980
aaggcagcca gaccagatg ctgacaagtt cagccagctt gtaaaattag accaaattaa 5040

agaaaaggac tcaagagagc aaacctttgt gtctgtctgct ggtgatgagc tgactcctga 5100
aacacctacc caagagcagt gtcaggacac catgctgccca gtctgtgata atccggacac 5160
agcctttact cacgcagagg aaaatagttg tgttacatct aatgtttcaa ctaatgaagg 5220
tcaagaaaca aatcagtggg aacaagaaaa atcataccta ggtgagatga caaattcaag 5280
5 cattgccaca gaaaattttc ctgctgtcag ttctcccacc caactgataa tgaagccagg 5340
ctctgaatgg gatggctcta cccaagtga ggactcccga ggtacctttg tgccagatat 5400
tttacctggc aactttcaag aggggtgggca gctggcctct gccgcgctg acttgtggat 5460
agatgctaag aagcccttca gtttgaaagc agatgggtgag aatcctgata tcttgacgca 5520
ctgcgaacat gacagcaatt ctgaggcttc cgacagccct gatatatgtc acgattctga 5580
10 agcaaagcaa gagactgaga agcacctcag tgcttgcatt ggacctgaag tggaatccag 5640
tgagctttgt ctactgagc cagagataga tgaagaacct atttatgagc ctggacggga 5700
gtttgtccca tccaatgcag aactcgattc tgaaaacgca actgtgctgc ctccaattgg 5760
ctatcaagca gacataaagg gctcctctca gccgcctct cataaaggtt cacctgaacc 5820
ttctgaaata aacggtgaca acagtacagg ttacaagta tcagaaaaag gagccagccc 5880
15 agatatggca ccaattttgg aaccagttga cagaagaatc ccaaggattg aaaatgtggc 5940
aactagcatt tttgtaactc accaagagcc aactccagaa ggtgacggtt cttggatatac 6000
agacagcttt tctcctgaaa gtcagcctgg tgcaagagct ttgtttgatg gtgatccaca 6060
tttatccaca gagaatcctg ctttggttcc tgatgctttg ctgacctcag aacttgtct 6120
ggatataagc gaagctgcct ttgaccacag tttcagcgat gcctcaggte tcaacacatac 6180
20 cacgggaaca atagatgaca tgagtaaact gacattatcc gaaggccatc cggaaacgcc 6240
agttgatggg gacctaggga agcaagatat ctgctcatct gaagcctcgt ggggtgattt 6300
tgaatatgat gtaatgggcc agaatatoga tgaagattta ctgagagagc ctgaacactt 6360
cctgtatggt ggtgaccctc ctttgaggga agattctctg aagcagtcgc tggcaccgta 6420
cacacctccc tttgatitgt cttatctcac agaacctgcc cagagtgtc aaacaataga 6480
25 ggaagctggg tctccagagg atgaatctct gggatgcaga gcagcagaga tagtgctttc 6540
tgcacttctc gatcgaagaa gtgagggaaa ccaggctgag accaaaaaca gactgcctgg 6600

atcccagctg gctgtgctgc atattcgtga agaccctgag tccgtttatt tgccggtagg 6660
agcaggctcc aacattttgt ctccatcaaa cgttgactgg gaagtagaaa cagataattc 6720
tgatttacca gcaggtggag acataggacc accaaatggt gccagcaagg aaataccaga 6780
attggaagaa gaaaaaaciaa ttcttaccaa agagcctgag cagataaaat cagaatacaa 6840
5 ggaagaaaga tgcacagaga agaatgaaga tcgtcatgca ctacacatgg attacatact 6900
tgtaaaccgt gaagaaaatt cactctcaaa gccagagacc tgtgaagaaa gagaaagcat 6960
agctgaatta gaattgtatg taggttccaa agaaacaggg ctgcagggaa ctcaagttagc 7020
aagcttccca gacacatgtc agccagcctc cttaaataaa agaaaaggtc tctctgcaga 7080
gaaaatgtct tctaaaggcg atacgagatc atcttttgaa agccctgcac aagaccagag 7140
10 ttggatgttc ttgggccata gtgaggttgg tgatccatca ctggatgcca gggactcagg 7200
gcctgggtgg tctggcaaga ctgtggagcc gttctctgaa ctgggcttgg gtgagggctc 7260
ccagctgcag attctggaag aatgaagcc tctagaatct ttagcactag aggaagcctc 7320
tggtccagtc agccaatcac agaagagtaa gagccgaggc agggctggcc cggatgcagt 7380
tacctatgac agtgaatggg aatgcttcc accacagcct gttcagaaaa acatgatctc 7440
15 tgacacggaa atggaggagg agacagagtt ccttgagctc ggaaccagga tatcaagacc 7500
aaatggacta ctgtcagagg atgtaggaat ggacatcccc tttgaagagg gcgtgctgag 7560
tcccagtgtc gcagacatga ggccctgaacc tcttaattct ctggatctta atgacactca 7620
tctctggaga atcaagctca cagccccaaa tatcaatctt tctctggacc aaagtgaagg 7680
atctattctc tctgatgata acttggacag tccagatgaa attgacatca atgtggatga 7740
20 acttgatacc cccgatgaag cagattcttt tgagtacact ggccatgatc ccacagccaa 7800
caaagattct ggccaagagt cagagtctat tccagaatat acggccgaag aggaacggga 7860
ggacaaccgg ctttggagga cagtggctcat tggagaacia gagcagcga ttgacatgaa 7920
ggtcatcgag ccctacagga gagtcattc tcacggagga tactatgggg acggtctaaa 7980
tgccatcatt gtgtttgccg cctgttttct gccagacagc agtcgggagg attaccacta 8040
25 tgtcatggaa aatcttttcc tatatgtaat aagtacttta gagttgatgg tagctgaaga 8100
ctatatgatt gtgtacttga atggtgcaac cccaagaagg aggatgccag ggctaggctg 8160

gatgaagaaa tgctaccaga tgattgacag acggttgagg aagaatttga aatcattcat 8220
cattgttcat ccatcttggc tcatcagaac aatccttgct gtgacacgac cttttataag 8280
ttcaaaattc agcagtaaaa ttaaataatgt caatagctta tcagaactca gtgggctgat 8340
cccaatggat tgcatccaca ttccagagag catcatcaaa ctggatgaag aactgagggg 8400
5 agcatcagag gcagctaaaa ctagctgcct ttacaatgat ccagaaatgt cttctatgga 8460
gaaggatatt gacttgaagc tgaagaaaa gccttagttg gccatgctgg aagaagagga 8520
tgcttttctg gttcatggtt ctggtgaaac atatctacct gaaagagaca gggctgatgt 8580
taccttttcc cactttgcac tacctggcgc cattctaaat ttctaagggg aaaaatagaa 8640
agtttgttta ctcttaagat attttatgaa attgtgtgta ctttctatt ttgccaatta 8700
10 tgtgcctcaa agattttagt tgagccttag caagaaagta ggaccttcca tttcaatact 8760
tcattaacac ggtgtagtga tactttgtcc cttagactgg tgtttaccag taagatacct 8820
ttaatccact gttaagtatg agtggatttg tttccataga ttagctggat ttcccttttg 8880
tgattgcatt aggtttaaag tacacagtc tcaactctcc ccaggaaagt ttcccctggt 8940
tgactccacc tttaaaatcc taagcctgac taggacagcc acaaaccaca caaggtgtaa 9000
15 aaccatcacc agctaagtgc ccgttttgtt cttgtttacc agaatctctt ttaacttctc 9060
aaaggggaagc cgggctttct aatccacgct aactttattt tagttgtcaa attgggcatt 9120
atattttatg taaattggc ttttaacacc attttctga tgaatggttg tgaccaccac 9180
attgtgaaat ttaagaatcc gtgttgcac tttggtagct ctctgagttt caggccataa 9240
actcagctcc agaggttacc ttttaagtgc caagaactca agtgcaaggt ggccactca 9300
20 aaaatcattt ggtagcattc agttattcat gaattctctc ctgcacatgca ttataaaaag 9360
tgatctgctt taaaacaccg taatctgac ataggcttaa aattaaatat gagtattact 9420
ttcatgtaca aaatatttcc tttatagtct tcatatgcc tttaaaatgc caacaagatt 9480
tcaagtctgt aggctctag tgagggtggg tggcaaacca cagctaagtc tcgctacca 9540
ctgcaagcta agaatggtt ttacattttg ggttgaaaa atttttttg aatatttcat 9600
25 gacacatgaa aattattcaa atgtagtgc cgataaataa agtggtagctg aaacacagcc 9660
acacaaactt gttttgtac tgtctacagc tactttcaca ctacagccgc agagctgagc 9720

agttcagcag accgtatgtc ccacaatgcc taaaacattg actatgttta cagaaaaagt 9780
ttgctgacce ctgctctagc aaacgcatcc tttcctactc caccccaatt tgtattttaga 9840
tagtttctct aacagaacgg acaaatgagg ctgcaaacta atttatTTTT gtcaaaaatc 9900
aatgttttga catccacaga cagtgaata aaagaaatgg cttgctgaaa aacatgagga 9960
5 gtctagcca caaatcact gcttaggttg caattgcca aatgaagcct tcttagaagc 10020
acttctttag tatatacagg tgttggtga agtccgtgcc tctctctggg aaccattctt 10080
agtctccagt gtctcttatt acaagaagc tggcagaaat aaaaatgaag ggggtgagagc 10140
ggttccacce tagtctcatg gtggaaaatt cattggggag agctgtccag gatatttggga 10200
gtctgggta gaaggagctt gtaactactt taaagtcgac atctttgcac aggtgattga 10260
10 gtttctctga cctcattgct tcaactctgt ctctcccgt cttccgcac gtgcccacac 10320
acacgcagtt cagccctctt tctccataa gctccatcg ttttctctt tctctctttg 10380
atccttcaa gcgagtatct tgttgaattg tatgttctgt tggatctct cttccataac 10440
atctggcttg ttggacagaa aaacctaca gccaccccc tcccacagcc cacctccact 10500
ttgaaagcc caattacac ctctcccaga acacagtgtt gacgtaaata cagttacca 10560
15 atattcctgt ttgttacct atttctact tcaactcagt agcatccat tttgtaaaat 10620
gaattccatg gtcacctgt cacaggaagt aatgaaaaat ccagtgttca gtgtagtggt 10680
gcaaacctga gggcatagag ctgttcatag agggctcttg ttatagccaa acagacacag 10740
caacaatctc accatttata tatatattt taacttgtcc agctcatcta tggaaaacta 10800
ctcaggtggt atgctgtttg aagcctcctc ttctacatg aaaattatgg gcatttgtcc 10860
20 caatgatttt gttcagctg ttctgtaggc tgcataacca ctctgatatt taggtatctg 10920
ctattttatt atcttaaaag acaattaat ttaattgcat gtgctagga aaagctacca 10980
tgtacattca cccaagtaa atagaatcct agatgaatcc tagaaaaata atccctaagc 11040
agataggtag acagagtaa acattccat gatttagctc tctagctctt gcactctgaa 11100
cattcttgct ttggttctga cttctgggaa ctgctttgca tttctctat agatctgtag 11160
25 ttaaggaac caaggggtca ttggggcaaa agcattgttt ctcaaagctc cttgattaag 11220
agaaagaaca gaaatttga cagaagatag tgtcaaggag tgagaaagtt tgtttgaggg 11280

cagtagctca gtgtggaaga aaatcctgaa gtttctgttg aagccataca atgttctatg 11340
 gggttactct ctaagacatt ctctgaggtg tgtgaggaag tcactactcc tagcctttgt 11400
 taagatgtaa ttttaaataat tcagttatgg tactatgttt gcaactctcg tctttacaca 11460
 atgcctcagt agtttgttcc cttagaaaca tttagatgtg cacaaattaa tcttttatat 11520
 5 atctaaaggt ttttctatca tgcattggat tgctcagaat aaagtgtctg ttagacttctg 11580
 ttttggtaaa taaattctcc ataatgtaga ttaataatat aaaagtcttt aatgacacaa 11640
 tatatctata tagcctcact gtataattca gaaataaaaa ttgattctgc 11690

10 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic
 polynucleotide

<400> 3
 20 acagcaatat taccagtgac 20

<210> 4
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 4

agtttggttt tgatgtcctc

20

10

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 5

20

agaacccttg cctagaactg

20

<210> 6

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 6

gactgtggct gtgatgagat

20

10

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 7

20

aaggaagtca tcaacaggag

20

<210> 8

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 8

caatagccgg acatcctcaa

20

10

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 9

20

atgatttgga ctgggatgac

20

<210> 10

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 10

gctctcttgc tgtcactttc

20

10

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 11

20

taaggggtct gaaaatagcc

20

<210> 12

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 12

gatcgcaaaa ctctacatt

20

10

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 13

20

cagagcttgg gattcattga

20

<210> 14

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 14

taagttcttg gtcacagctg

20

10

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 15

20

gccagcagag aatgagaata

20

<210> 16

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 16

ttttaagca gccctgatcc

20

10

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 17

20

ccagcttgta aaattagacc

20

<210> 18

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 18

cagattacag cagtggagaa

20

10

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 19

20

cacgcagagg aaaatagttg

20

<210> 20

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 20

accagttgac agaagaatcc

20

10

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 21

20

atccacattt atccacagag

20

<210> 22

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
 polynucleotide

5

<400> 22

ctttggagga agattctctg

20

10

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
 polynucleotide

<400> 23

20

agagcctgag cagataaaat

20

<210> 24

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 24

tgttcttggg ccatagtgag

20

10

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 25

20

gatatcaaga ccaaattggac

20

<210> 26

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 26

aatatacggc cgaagaggaa

20

10

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 27

20

cagatgattg acagacggtt

20

<210> 28

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 28

ttctccagac catgcatgtt

20

10

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 29

20

gagcctggta acatgaatga

20

<210> 30

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 30

tcaattagtc tcccttctg

20

10

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 31

20

ctcaccatct gctttcaaac

20

<210> 32

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 32

atatcttgct tccctaggtc

20

10

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 33

20

gtcaccacca tacaggaagt

20

<210> 34

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 34

ctcctaccgg caaataaacg

20

10

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 35

20

ctcactatgg cccaagaaca

20

<210> 36

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 36

gtccatttgg tcttgatac

20

10

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 37

20

ttcctcttcg gccgtatatt

20

<210> 38

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 38

aaccgtctgt caatcatctg

20

10

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 39

20

aaaggtcgtg tcacagcaag

20

<210> 40

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 40

ataaaaggtc gtgtcacagc

20

10

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 41

20

atgctctctg gaatgtggat

20

<210> 42

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 42

atgatgctct ctggaatgtg

20

10

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 43

20

ggcaaatag gaaagtac

18

<210> 44

<211> 18

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5

<400> 44

taaacaccag tctaaggg

18

10

<210> 45

<211> 1455

<212> DNA

<213> Homo sapiens

15

<400> 45

gtcgacatct ttgcacaggt gattgagttt ctctgacctc attgcttcac ctctgtctcc 60
tcccgtcctt ccgcaagtgc ccacacacac gcagttcagc cctctttcct ccataagcct 120
ccatcgtttt ctcttttctc ctcttgatcc tttcaagcga gtatcttggt gaattgtatg 180
ttctgttggg tctcctcctt cataacatct ggcttggttg acagaaaaac cctacagccc 240
20 accccctccc acagcccacc tccacttttg aaagcccaaa ttacacctct cccagaacac 300
agtgttgacg taaatacagt tacccaatat tctgtttgt tcacctattt gctactttca 360
ctcagtagca tcccattttg taaaatgaat tccatgggtca ccctgtcaca ggaagtaatg 420
aaaaatccag tgttcagtgt agtgggtgcaa acctgagggc atagagctgt tcatagaggg 480
ctcttgttat agccaaacag acacagcaac aatctcacca tttatatata tatttttaac 540
25 ttgtccagct catctatgga aaactactca ggtggtatgc tgtttgaagc ctcatcttcc 600
tacatgaaaa ttatgggcat ttgtcccaat gattttgttt cagctgttct gtaggctgca 660

taaccactct gatatttagg tatctgctat tttattatct taaaagacaa attaatttaa 720
 ttgcatgtgc tagggaaaag ctaccatgta cattcacccc aagtaaatag aatcctagat 780
 gaatcctaga aaaataatcc ctaagcagat aggtagacag aggtaaacad tcacatgatt 840
 tagctctcta gctcttgcaac tctgaacatt cttgctttgg ttctgacttc tgggaactgc 900
 5 tttgcatttc tcctatagat ctgtagttaa gggaaccaag gggtcattgg ggcaaaagca 960
 ttgtttctca aagctccttg attaagagaa agaacagaat ttgcacagaa gatagtgtca 1020
 aggagtgaga aagtttgttt gagggcagta gctcagtgtg gaagaaaatc ctgaagtttc 1080
 tgttgaagcc atacaatgtt ctatggggtt actctctaag acattctctg aggtgtgtga 1140
 ggaagtcact actcctagcc ttgtttaaga tgtaatttta aatattcagt tatggtacta 1200
 10 tgtttgcaac tctcgtctta tcacaatgcc tcagtagttt gttcccttag aaacatttag 1260
 atgtgcacaa attaatcttt tatatatcta aaggtttttc tatcatgcat tggattgctc 1320
 agaataaagt gtctgttaga ctctgttttg gtaaataaat tctccataat gtagattaat 1380
 aatataaaag tctttaatga cacaatatat ctatatagcc tcaactgtata attcagaaat 1440
 aaaaattgat tctgc 1455

15

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
 polynucleotide

25

<400> 46

caatagccgg acatcctcaa

20

<210> 47

5 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 47

ttctccagac catgcatgtt

20

15

<210> 48

<211> 18

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

25

<400> 48

ctgcaccaac aatatccc

18

<210> 49

5 <211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 49

gtagagacag ggtttcac

18

15

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

25

<400> 50

ggacagtggc cattggagaa ca

22

<210> 51

5 <211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 51

ttagaccgtc cccatagtat cctc

24

15

<210> 52

<211> 30

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

25

<400> 52

acatgaaggt catcgagccc tacaggagag

30

<210> 53

5 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 53

gaaggtgaag gtcggagtc

19

15

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

25

<400> 54

gaagatggtg atgggatttc

20

<210> 55

5 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 55

caagcttccc gttctcagcc

20

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/08520

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47

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.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47

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)
PubMed(internet), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)
SwissProt/PIR/GeneSeq/GeneBank/EMBL/DDBJ/

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/23470 A1 (MILLENNIUM PHARM INC.), 27 April, 2000 (27.04.00), & EP 1123311 A1 Claims 1(C), 4(b); Fig. 3	1-9
A	MAGGI A. et al., Identification of estrogen target gene in human neural cells. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2000, Vol.74, No.5, pages 319 to 325	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 08 November, 2002 (08.11.02)	Date of mailing of the international search report 19 November, 2002 (19.11.02)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N15/12, C07K14/47		
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 C12N15/12, C07K14/47		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) PubMed (internet), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG) SwissProt/PIR/GeneSeq/Genbank/EMBL/DDBJ/		
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	WO 00/23470 A1 (MILLENNIUM PHARM INC) 2000.04.27 & EP 1123311 A1 請求項 1 (c)、請求項 4 (b)、Fig. 3 参照	1-9
A	MAGGI A. et al. Identification of estrogen target gene in human neural cells. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2000, Vol. 74, No. 5, p. 319-325	1-9
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 08.11.02	国際調査報告の発送日 19.11.02	
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) 坂崎 恵美子	4B 3037 電話番号 03-3581-1101 内線 3488