

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4394188号  
(P4394188)

(45) 発行日 平成22年1月6日(2010.1.6)

(24) 登録日 平成21年10月23日(2009.10.23)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 15/00

Z N A A

C 07 K 14/47 (2006.01)

C 07 K 14/47

G 01 N 33/566 (2006.01)

G 01 N 33/566

請求項の数 2 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願平10-316973  
 (22) 出願日 平成10年10月20日(1998.10.20)  
 (65) 公開番号 特開平11-332581  
 (43) 公開日 平成11年12月7日(1999.12.7)  
 審査請求日 平成17年8月23日(2005.8.23)  
 (31) 優先権主張番号 特願平10-76232  
 (32) 優先日 平成10年3月24日(1998.3.24)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 307010166  
 第一三共株式会社  
 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号  
 (74) 代理人 100133905  
 弁理士 石井 良夫  
 (74) 代理人 100113837  
 弁理士 吉見 京子  
 (74) 代理人 100153486  
 弁理士 城所 宏  
 (74) 代理人 100127421  
 弁理士 後藤 さなえ  
 (74) 代理人 100090941  
 弁理士 藤野 清也  
 (74) 代理人 100076244  
 弁理士 藤野 清規

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規蛋白質、DNA、及びその利用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

下記の工程を含む、破骨細胞形成を抑制する活性を有する物質のスクリーニング方法、  
 1) 下記A又はBに記載の蛋白質及び破骨細胞形成促進因子(OCM)の内、一方を固相化す  
 る工程、

A. 下記のいずれかに記載の蛋白質、

- a) 配列表配列番号11に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、
- b) 配列表配列番号11に記載のアミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加したアミノ酸配列からなり、且つ、破骨細胞形成促進因子(OCM)に特異的に結合する蛋白質、
- c) 次のDNAにコードされる蛋白質、

c-a) 配列表配列番号10に記載のヌクレオチド配列からなるDNA、

c-b) c-a)に記載のDNAの相補的な塩基配列と高ストリンジンシーな条件下でハイブリダイズし、且つ、破骨細胞形成促進因子(OCM)に特異的に結合する蛋白質をコードするDNA。

B. 下記のいずれかに記載の蛋白質、

- a) 配列表配列番号7に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、
- b) 配列表配列番号7に記載のアミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加したアミノ酸配列からなり、且つ、破骨細胞形成促進因子(OCM)に特異的に結合する蛋白質、

10

20

c ) 次のDNAにコードされる蛋白質、

c- a ) 配列表配列番号 6 に記載のヌクレオチド配列からなるDNA、

c- b ) c- a ) に記載のDNAの相補的な塩基配列と高ストリンジエンシーな条件下でハイブリダイズし、且つ、破骨細胞形成促進因子 ( OBM ) に特異的に結合する蛋白質をコードするDNA、

2 ) 被験物質を、 1 ) において固相化しなかった蛋白質と共に、 1 ) において固相化した蛋白質と接触させる工程、

3 ) 一定時間経過後洗浄し、固相化しなかった蛋白質の固相化蛋白質との結合量を測定し、該結合量が少ない被験物質を選別する工程。

【請求項 2 】

10

下記A又はBに記載の蛋白質からなる、破骨細胞形成を抑制する活性を有する物質のスクリーニング用ツール、

A. 下記のいずれかに記載の蛋白質、

a ) 配列表配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

b ) 配列表配列番号 1 1 に記載のアミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加したアミノ酸配列からなり、且つ、破骨細胞形成促進因子 ( OBM ) に特異的に結合する蛋白質、

c ) 次のDNAにコードされる蛋白質、

c- a ) 配列表配列番号 1 0 に記載のヌクレオチド配列からなるDNA、

c- b ) c- a ) に記載のDNAの相補的な塩基配列と高ストリンジエンシーな条件下でハイブリダイズし、且つ、破骨細胞形成促進因子 ( OBM ) に特異的に結合する蛋白質をコードするDNA。

20

B. 下記のいずれかに記載の蛋白質、

a ) 配列表配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

b ) 配列表配列番号 7 に記載のアミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加したアミノ酸配列からなり、且つ、破骨細胞形成促進因子 ( OBM ) に特異的に結合する蛋白質、

c ) 次のDNAにコードされる蛋白質、

c- a ) 配列表配列番号 6 に記載のヌクレオチド配列からなるDNA、

c- b ) c- a ) に記載のDNAの相補的な塩基配列と高ストリンジエンシーな条件下でハイブリダイズし、且つ、破骨細胞形成促進因子 ( OBM ) に特異的に結合する蛋白質をコードするDNA。

30

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、破骨細胞形成促進因子 ( OBM ) に特異的に結合する蛋白質、その蛋白質をコードするDNA、このDNAを含有するベクター及びこのベクターを組み込んだ宿主に関する。

さらに本発明は、該蛋白質に対する抗体、破骨細胞形成促進因子と本発明蛋白質又はOBM結合蛋白質 ( OBM-BP ) との結合を特異的に阻害する物質を選択する方法、及び該蛋白質又は前記の選択する方法により得られた物質を有効成分とする医薬に関する。

40

本発明蛋白質は、生化学試薬、あるいは骨粗鬆症等の骨代謝疾患の予防及び/又は治療薬として有用である。又、本発明の破骨細胞形成促進因子 ( OBM ) と該蛋白質又はOBM結合蛋白質 ( OBM-BP ) との結合を特異的に阻害する物質を選択する方法は、破骨細胞の形成を阻害する物質を探索する方法として、又、得られた物質は、生化学試薬、あるいは骨粗鬆症などの骨代謝疾患の予防及び/又は治療薬として有用である。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

骨代謝は、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞の、総合された活性に依存している。骨代謝異常は、骨形成と骨吸収の均衡が崩れることにより発生すると考え

50

られている。骨代謝の異常を伴う疾患として、骨粗鬆症、高カルシウム血症、骨ページェット病、腎性骨異常症、慢性関節リューマチあるいは変形性関節炎等が知られている。これらの骨代謝異常疾患の代表として、骨粗鬆症が挙げられる。この疾患は、破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を上回ることにより発生する疾患であり、骨の石灰質と骨基質とが等しく減少することを特徴とする。この疾患の発生メカニズムについては未だ完全には解明されていないが、骨の疼痛が発生し、骨の脆弱化による骨折が起こる。高齢者人口の増加に伴い、骨折による寝たきり老人の原因にもなるこの疾患は社会問題にもなっており、その治療薬の開発が急務となっている。このような骨代謝異常による骨量減少症は骨吸収の抑制、骨形成の促進、或いはこれらのバランスの改善により治療することができる期待される。即ち、骨形成は、骨形成を担当する骨芽細胞の増殖、分化、機能を促進すること、或いは破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞への分化、成熟を抑制すること、あるいは破骨細胞の骨吸収活性等の機能を抑制することにより促進されると期待される。このような活性を有するホルモン、低分子物質あるいは生理活性蛋白質について、現在精力的な探索及び開発研究が進められている。

#### 【0003】

既に、骨に関わる疾患の治療及び治療期間の短縮を図る医薬品として、カルシトニン製剤、活性型ビタミンD<sub>3</sub> 製剤、エストラジオールを含有するホルモン製剤、イブリフラボン、ビタミンK<sub>2</sub>、ビスフォスフォネート系化合物等があり、さらにより副作用が少なく、有効性に優れた治療薬の開発を目指して活性型ビタミンD<sub>3</sub> 誘導体、エストラジオール誘導体、第2世代又は第3世代のビスフォスフォネート系化合物等の臨床試験が実施されている。

しかし、これらの薬剤を用いた治療法は、その効果並びに治療結果において必ずしも満足出来るものではなく、より安全かつ有効性の高い新しい治療薬の開発が期待されている。又、骨代謝疾患の治療に使用されている薬剤の中には、その副作用により治療可能な疾患が限定されているものもある。このような観点から、従来の医薬品とは異なった作用メカニズムを持ち、しかもより有効性が高くかつ副作用の少ない医薬品の開発が期待されている。

#### 【0004】

前述したように、骨代謝を担当する細胞は骨芽細胞と破骨細胞である。破骨様細胞を *in vitro* で形成させるためには骨芽細胞様細胞と破骨細胞前駆細胞を共存させることが必須であるという観察結果より、骨芽細胞は破骨細胞形成に重要な役割を担っていると考えられている (Takahashi et al., Endocrinology, 123, 2600-2602, 1988)。この共存培養系においては、骨芽細胞様細胞が未熟な破骨細胞前駆細胞と接触することが破骨細胞様細胞の形成に必須であるとされている。この細胞間接着による破骨細胞形成に関与する因子として、骨芽細胞様ストローマ細胞の膜上に発現される破骨細胞分化誘導因子 (osteoclast differentiation factor, ODF) (Suda T. et al.: Endocrine Rev. 13, 66-80, 1992; Suda et al.,: Bone 17, 87S-91S, 1995) という分子が仮想されている。Suda T. らの仮説によれば、破骨細胞の前駆細胞に ODFのレセプターが存在しており、ODFが ODFレセプターに結合することにより破骨細胞が分化成熟すると考えられている。これらの分子の同定、メカニズムの解明は基礎医学領域の進歩に多大な貢献をするだけでなく、新しい作用メカニズムに基づく新規な骨代謝異常症治療薬の開発にも貢献することが期待される。今般、本発明者らはこのような現状に鑑み鋭意探索を進めた結果、ヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90 (ATCC CCL186) の培養液中に共存培養系での破骨細胞形成を抑制する因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF) を見出した (W096/26217号)。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、破骨細胞の分化に関与する因子はOCIFと相互作用するとの仮定のもと、OCIFに結合する蛋白質のcDNAの単離を鋭意推進した結果、骨芽細胞様ストローマ細胞由来のcDNA発現ライブラリーから、OCIF結合蛋白質OBM のcDNAを単離することに成功した。このcDNAを用いてOBM を発現させ生物活性を調べた結果、OBM は細胞質膜上に発現する破骨細

10

20

30

40

50

胞分化誘導因子であることを見出した。さらに本発明者らは、遺伝子組換え型OBMを用いてOBMに結合する蛋白質(OBM-BP)の探索を行った。その結果、マクロファージ系の細胞株、C7細胞のcDNAライブラリー中からOBM-BPをコードするcDNAを分離同定し、さらに、OBMが破骨細胞前駆細胞上のOBM-BPに結合することにより、破骨細胞前駆細胞を破骨細胞へと分化成熟させることを見出すべく至った。

従って本発明の課題は、破骨細胞形成促進因子(OBM)に特異的に結合する特定の新規なアミノ酸配列を有する蛋白質を提供することにある。

また、本発明の課題は、該蛋白質をコードするDNA、これを含有するベクター及び該ベクターを組み込んだ宿主を提供することにある。さらに、本発明の課題は、該蛋白質に対する抗体、破骨細胞形成促進因子(OBM)と本発明蛋白質又はOBM結合蛋白質(OBM-BP)との結合を特異的に阻害する物質を選択する方法、及び該蛋白質又は前記の選択する方法により得られた物質を有効成分とする医薬を提供することにある。

10

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、配列表配列番号11に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質に関する。

また本発明は、該アミノ酸配列の一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加したアミノ酸配列からなり、破骨細胞形成促進因子(OBM)に特異的に結合する蛋白質に関する。さらに本発明は、該蛋白質をコードするDNAに関する。このDNAは、配列表配列番号10のヌクレオチド配列で例示される。

また本発明は、該DNAとハイブリダイズし、破骨細胞形成促進因子(OBM)に特異的に結合する蛋白質をコードするDNAに関する。又、該DNAを発現することにより得られる蛋白質に関する。又、該DNAを含有するベクターに関する。又、該ベクターを組み込んだ宿主に関する。

20

また本発明は、該蛋白質に対する抗体に関する。

さらに本発明は、(1) OBM又はOBMを分子内に含む蛋白質を固相化する工程、(2)(1)の工程で固相化された蛋白質に、被験物質の共存下で該蛋白質又はOBM-BPを結合させる工程、(3)(2)において結合させた該蛋白質又はOBM-BPを、該蛋白質もしくはOBM-BPに対する標識抗体により定量する工程からなる、破骨細胞形成促進因子(OBM)と該蛋白質又は配列表配列番号7に示されるOBM結合蛋白質(OBM-BP)との結合を特異的に阻害する物質を選択する方法に関する。

30

また本発明は、このような選択方法により選択された物質に関する。

さらに本発明は、該蛋白質、該物質又はOBM結合蛋白質(OBM-BP)を有効成分とする医薬に関する。

#### 【0007】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、上記のように、配列表配列番号11に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、又は、該アミノ酸配列の一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加したアミノ酸配列からなり、破骨細胞形成促進因子(OBM)に特異的に結合する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAを含有するベクター及び該ベクターを組み込んだ宿主に関する。さらに本発明は、該蛋白質に対する抗体、破骨細胞形成促進因子(OBM)と本発明蛋白質又は配列表配列番号7に示されるOBM結合蛋白質(OBM-BP)との結合を特異的に阻害する物質を選択する方法、及び該蛋白質又は前記の選択する方法により得られた物質を有効成分とする医薬に関する。

40

本発明のOBM、OBM-BP、及びそれらのcDNAの取得法としては、以下の方法が用いられる。

#### 【0008】

目的の蛋白質をコードするcDNAを分離する(cDNAクローニング)方法としては、発現ベクター中にcDNAライブラリーを構築し、それらを細胞中に導入し、目的の蛋白質の発現の有無をスクリーニングすることにより目的のcDNAを単離する方法(発現クローニング法)が知られている(D'Andrea et al.: Cell 57, 277-285, 1989; Fukunaga et al.: Cell 61, 341-350, 1990)。発現クローニング法では、宿主細胞として細菌、酵母、動物細胞などが

50

目的に応じて使い分けられている。本発明のように、動物細胞の膜表面に存在すると考えられる蛋白質をコードするcDNAをクローニングする際には、動物細胞を宿主とする場合が多い。又DNAの導入効率が高く、導入されたDNAの発現効率の高い宿主が通常使用される。

#### 【0009】

そのような特徴を持つ細胞のひとつが、本発明で用いたサル腎臓細胞 COS-7細胞である。COS-7 細胞ではSV40 large T antigenが発現しているため、SV40の複製開始点を持つプラスミドは細胞中で多コピーのエピソームとして存在し、通常より高発現が期待できる。又、DNAを導入した時点から数日のうちに最高の発現レベルに到達するので迅速なスクリーニングが可能である。この宿主細胞に高発現可能なプラスミドを組み合わせることによって、極めて高レベルの遺伝子発現が可能となる。プラスミド上で最も遺伝子の発現量に影響を与える因子はプロモーターであり、高発現用のプロモーターとしてSR プロモーター やサイトメガロウィルス由来プロモーター等がよく使用される。

10

#### 【0010】

発現クローニングにより膜蛋白質のcDNAをクローニングしようとする際のスクリーニング法として、バインディング法 (binding 法) 、パニング法 (panning 法) 、フィルムエマルジョン法などが考案されている。OBMcDNA は、マウスST2 細胞を $10^{-8}M$  活性型ビタミンD<sub>3</sub>及び $10^{-7}M$  デキサメタゾンを含む培地で培養した細胞のcDNAライブラリーから、OCIFをプローブとして発現クローニング法により単離することができる。OCIFはW096/26217号に従って、ヒト胎児性線維芽細胞株IMR-90の培養液から単離することができる。OBM-BPはマウスC7細胞のcDNAライブラリーから、OBM をプローブとして発現クローニング法により単離することができる。

20

#### 【0011】

又、このマウス由来OBM-BPcDNAをプローブとして、ヒトなど他の哺乳動物のOBM-BPを得ることもできる。OBM あるいはOBM-BPのcDNAを発現ベクターに挿入したプラスミドを作製し、これらを動物細胞や細菌などの細胞中に導入して発現させることにより、組換え型OBM あるいはOBM-BPを製造することができる。発現させる際の哺乳動物細胞の宿主としては COS-7、CHO 、Namalwa などを、又細菌の宿主として大腸菌などを用いることができる。遺伝子組換え型OBM はOCIF固定化カラム、また遺伝子組換え型OBM-BPはOBM 固定化カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィー、及びイオン交換クロマトグラフィー、あるいはゲルろ過クロマトグラフィーなどを組み合わせることにより精製することができる。このようにして得られたOBM-BPは、以下の特性を有する。

30

- (1) 分子量 : 20,000 ~ 30,000
- (2) 結合 : 破骨細胞形成促進因子(OBM) に特異的に結合する。
- (3) 活性 : 破骨細胞形成を抑制する。
- (4) アミノ酸配列 : 配列表配列番号11に示されるアミノ酸配列を有する。

#### 【0012】

さらに、遺伝子組み換え型OBM あるいはOBM-BPは、PCR Protocol記載の方法 (Russell Higuchi, 177-183, Academic Press, New York (1990))等に従い、各々の変異体を得ることができる。即ち、目的とする変異を持つ合成オリゴヌクレオチドをプライマーとし、各々の蛋白質をコードするDNAを鋳型として PCR(Polymerase Chain Reaction) を行うことにより、cDNAに置換、欠失、あるいは付加などの変異を導入することができる。得られた変異体cDNAを発現ベクターに挿入し、細菌、昆虫、動物細胞などで発現させることにより、アミノ酸が置換、欠失、あるいは付加した該蛋白質の変異体を得ることができる。

40

#### 【0013】

このようにして精製したOBM 又はOBM-BPを、マイクロプレート等に添加し一定時間静置することにより、これらの蛋白質が固相化されたプレートを作製できる。固相化の方法としては、これら蛋白質を直接プレートに固相化するか、又は特異的抗体を介して結合させ固相化することができる。OBM 又はOBM-BPは、酵素や放射性同位元素等で標識することができる。標識するための酵素としては、通常用いられるものであれば特に限定されないが、

50

好ましくはアルカリフォスファターゼや西洋ワサビパーオキシダーゼなどが用いられる。又、放射性同位元素としては、通常用いられるものであれば特に限定されないが、好ましくは<sup>125</sup>Iなどが用いられる。OBM 又はOBM-BPのどちらか一方をプレート上に固定しておき、もう一方の蛋白質を標識し、被験物質とともに前記プレートに加えて一定時間反応させることによって、OBM とOBM-BPとの結合を特異的に阻害する物質、即ち骨代謝疾患予防及び/又は治療薬の候補物質を単離することができる。又、OBM とOBM-BPとの結合の検出には、非固相化蛋白質に対する抗体を用いて検出することも可能である。

#### 【 0 0 1 4 】

抗OBM-BP抗体は、分泌型OBM-BP（以下、sOBM-BP と称することもある）を免疫原として常法により作製される。この時用いる抗原としては、分泌型OBM-BP cDNA を用いて微生物や真核細胞を宿主として生産された遺伝子組換え型OBM-BP、あるいはOBM-BPのアミノ酸配列に基づいて設計した合成ペプチドや、OBM-BPの加水分解部分ペプチドなどを用いることができる。これらの抗原を用いて、また必要ならば免疫アジュバントを併用して、適当な哺乳動物を免疫し、その血清から常法により精製することにより、抗OBM -BP ポリクローナル抗体を得ることができる。得られた抗OBM -BP ポリクローナル抗体をアイソトープや酵素で標識することにより、ラジオイムノアッセイ(RIA) やエンザイムイムノアッセイ(EIA) の測定系に使用することができる。この測定系を用いることにより、血液や腹水などの生体試料や細胞培養液などのOBM-BP濃度を容易に測定できる。又、本抗体の性質から、破骨細胞形成を促進あるいは抑制することにより効果が得られる、骨粗鬆症などの骨代謝疾患治療剤として用いることもできる。さらには、上記OBM とOBM-BPを用いた骨代謝疾患治療剤を選択する方法において、OBM とOBM-BPの結合の検出に用いることができる。

10

#### 【 0 0 1 5 】

本発明の蛋白質である分泌型OBM-BPは、その活性から骨粗鬆症などの骨量減少症、リウマチ、変形性関節症、又は多発性骨髄腫などの骨代謝異常疾患、あるいはこれらの骨代謝異常疾患に伴う高カルシウム血症などの治療及び改善を目的とした医薬組成物、あるいはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原、さらには上述のスクリーニングなどに用いる生化学試薬として有用である。本発明蛋白質及び選択する方法により得られた物質は、製剤化して経口あるいは非経口的に、ヒトあるいは動物に対して安全な薬剤として投与することができる。非経口的投与には、例えば静脈注射、筋肉内注射、皮下注射、腹腔内注射、経皮投与、経肺投与、経鼻投与、経腸投与、口腔内投与、経粘膜投与等が挙げられ、これらの製剤が投与される。例えば注射剤、坐剤、エアゾール剤、経皮吸収テープなどが挙げられる。経口投与製剤として例えば錠剤（糖衣錠、コーティング錠、バッカル錠を含む）、散剤、カプセル剤（ソフトカプセルを含む）、顆粒剤（コーティングされたものも含む）、丸剤、トローチ剤、液剤、又はこれらの製剤学的に許容され得る徐放化製剤等が挙げられる。経口投与用液剤には懸濁剤、乳剤、シロップ剤（ドライシロップを含む）、エリキシル剤などが挙げられる。これらの製剤は公知の製剤学的製法に準じ、製剤として薬理学的に許容され得る担体、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤等と共に医薬組成物として投与される。

20

#### 【 0 0 1 6 】

これらの製剤に用いる担体や賦形剤としては、例えば乳糖、ブドウ糖、白糖、マンニトール、馬鈴薯デンプン、トウモロコシデンプン、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、結晶セルロース、カンゾウ末、ゲンチアナ末など、結合剤としては例えばデンプン、トラガントゴム、ゼラチン、シロップ、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースなど、崩壊剤としては例えばデンプン、寒天、ゼラチン末、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、結晶セルロース、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、アルギン酸ナトリウムなど、滑沢剤としては例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、水素添加植物油、マクロゴールなど、着色剤としては医薬品に添加することが許容されているものを、それぞれ用いることができる。錠剤、顆粒剤は必要に応じ白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピル

30

40

50

セルロース、精製セラック、ゼラチン、グリセリン、ソルビトール、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、フタル酸セルロースアセテート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メチルメタクリレート、メタアクリル酸重合体などで被膜しても良く、又これらの2種以上を用いた層で被膜しても良い。さらにエチルセルロースやゼラチンのような物質のカプセルでも良い。又、注射剤を調製する場合は、主薬に必要に応じpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤などを添加して、常法により各注射剤とする。

## 【0017】

## 【実施例】

以下の実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

10

## 【0018】

## 【実施例1】

OBM cDNAのクローニング(1) マウスST2 細胞からのRNAの抽出

マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株ST2 (RIKEN CELL BANK, RCB0224)は、10%牛胎児血清を含む -MEM (ギブコ BRL社)を用いて培養した。一枚の付着細胞用225cm<sup>2</sup>T-フラスコでコンフルエントになるまで培養したST2 細胞を、トリプシン処理してT-フラスコから剥がし洗浄した後、5枚の225cm<sup>2</sup>T-フラスコに分配し、10<sup>-8</sup>M 活性化ビタミンD<sub>3</sub>(Calcitriol、和光純薬社)、10<sup>-7</sup>M デキサメサゾン、及び10%牛胎児血清を添加した -MEM60mlを各々のフラスコに加えてCO<sub>2</sub> インキュベーター中で5日間培養した。培養したST2 細胞からISOGEN (和光純薬) を用いて総RNAを抽出した。総RNA約600 μg からOligo(dT)-celluloseカラム(5'-3'Prime 社)を用いてポリA<sup>+</sup> RNA(約8 μg)を調製した。

20

## 【0019】

(2) 発現ライブラリーの構築

実施例1-(1)で得られたポリA<sup>+</sup> RNA 2 μg からGreat Length cDNA Synthesis kit (Clontech 社)を用い、その説明書に従い二本鎖cDNAを合成した。即ち、ポリA RNA 2 μg とOligo(dT)<sub>25</sub>(dN) プライマーを混合し蒸留水を加えて最終容量を6.25 μl とし、70 で3分保温後、氷中で2分冷却した。この溶液に蒸留水2.2 μl 、5X First-strand buffer 2.5 μl 、100 mM DTT (ジチオスレイトール) 0.25 μl 、PRIME RNase Inhibitor(1U/ml) (5'-3' Prime 社) 0.5 μl 、5倍希釈した [ -<sup>32</sup>P]dCTP(アマシャム社、3000Ci/mmol 、2 μCi/ μl) 0.5 μl 、dNTP (各20mM) 0.65 μl 、MMLV (RNaseH<sup>-</sup>) 逆転写酵素 1.25 μl(250 ユニット)を加え、42 で90分保温した。さらに、蒸留水を 62.25 μl 、5X second-strand buffer 20 μl 、dNTP (各20mM) 0.75 μl 、Second-strand enzyme cocktail 5 μl を添加し、16 で2時間保温した。この反応液にT4 DNA polymerase 7.5 ユニットを加え、16 でさらに30分保温後 0.2 M EDTA 5 μl を添加して反応を停止し、フェノール・クロロフォルム処理後、エタノール沈殿を行った。この二本鎖cDNAの末端にEcoRI-Sall-NotI リンカー(Clontech 社)を付加し、末端をリン酸化した。サイズフラクション用カラムにより500bp 以上のcDNAを分離し、エタノール沈殿を行った。沈殿したDNAを水に溶解し、あらかじめ制限酵素 EcoRI (宝酒造社) 切断及びCIAP (ウシ小腸アルカリフォスファターゼ、宝酒造社) 処理して調製したpcDL-SR 296 (Molecular and Cellular Biology, Vol. 8, pp466-472, 1988) に挿入した。

30

## 【0020】

(3) OCIFとの結合を指標とした発現ライブラリーのスクリーニング

得られたDNAを用い大腸菌、XL2 Blue MRF'(東洋紡社)を形質転換し、ウェルあたり約100コロニーとなるように細胞培養用24ウェルプラスティックプレートに調製したL-カーベニシリン寒天培地 (1%トリプトン、0.5%イーストエキス、1%NaCl、60 μg/mlカーベニシリン、1.5%寒天) 上に増殖させた。各ウェル中の形質転換株を3mlのTerrific Brothアンピシリン培地 (1.2%トリプトン、2.4%イーストエキス、0.4%グリセロール、0.017 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.072 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、100 μg/mlアンピシリン) に懸濁し、37 で一晩振

40

50

温培養した。遠心により集菌しQIAwell kit(QIAGEN社)を用いてプラスミドDNAを調製した。260nmにおける吸光度によりDNA含量を測定し、エタノール沈殿により濃縮し、200ng/μlとなるように蒸留水に溶解した。この様にしてそれぞれ約100個のコロニーから由来するDNAプールを500プール調製し、COS-7細胞(RIKEN CELL BANK, RCB0539)へのトランスフェクションに用いた。COS-7細胞を24ウェルプレートに $8 \times 10^4$ 細胞/ウェルとなるように播種し、10%牛胎児血清を含むDMEMを用いて、CO<sub>2</sub>インキュベーター中に37にて一晩培養した。翌日、培地を除いた後、無血清DMEMで細胞を洗浄した。トランスフェクション用試薬リポフェクタミン(ギブコ BRL社)添付のプロトコールに従い、予めOPTI-MEM(ギブコ BRL社)を用いて希釈しておいた前記プラスミドDNAとリポフェクタミン(ギブコ BRL社)を混合し、15分後この混合液を各ウェルの細胞に加えた。用いたDNA及びリポフェクタミンの量はそれぞれ1μg及び4μlとした。5時間後培地を除去し、1mlの10%牛胎児血清を含むDMEM(ギブコ BRL社)を添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター中に(5%CO<sub>2</sub>)、37で2~3日培養した。

#### 【0021】

上記の様にトランスフェクトし2~3日培養したCOS-7細胞を無血清DMEMで洗浄した後、<sup>125</sup>I標識したOCIF 20ng/mlを加えた結合試験用培地(0.2%牛血清アルブミン、20mM Hepes緩衝液、0.1mg/ml heparin及び0.02% NaN<sub>3</sub>を加えた無血清DMEM)200μlを各ウェルに加えた。CO<sub>2</sub>インキュベーター中に(5%CO<sub>2</sub>)で371時間培養した後、0.1mg/ml heparinを含むリン酸塩緩衝生理食塩水500μlで2回洗浄した。洗浄後、0.1N NaOH溶液500μlを各ウェルに加え、室温に10分間放置することにより細胞を溶解させ、各ウェル中の放射活性をガンマーカウンター(パッカード社)で測定した。計500プールをスクリーニングすることにより、OCIFと特異的に結合する蛋白質(OMB)をコードするcDNAを含むDNAプール1つを分離した。さらにこのDNAプールを細分化し、前記と同様のトランスフェクションとスクリーニング操作を繰り返すことにより、OCIFと結合する蛋白質、OMBをコードするcDNAを単離した。配列を配列表配列番号1に示す。このcDNAを含むプラスミドをpOBM291と名付けた。このプラスミドを含む大腸菌は、pOBM291として通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5953として平成9年5月23日に寄託されている。

#### 【0022】

OCIFの<sup>125</sup>I標識法ならびにELISAによる<sup>125</sup>I標識OCIFの定量法を以下に示す。OCIFはヨードジエン(Iodogen)法により<sup>125</sup>I標識した。2.5mg/ml Iodogen-クロロホルム溶液20μlを1.5mlエッペンドルフチューブに移し、40でクロロホルムを蒸発させて、ヨードジエンコートしたチューブを調製した。このチューブを0.5Mリン酸ナトリウム緩衝液(Na-Pi, pH 7.0)400μlで3回洗浄した後、0.5M Na-Pi, pH 7.0, 5μlを加えた。このチューブにNa-<sup>125</sup>I溶液(Amersham社、NEZ-033H20)1.3μl(18.5MBq)を加えた後、直ちに1mg/ml rOCIF溶液(モノマー型あるいはダイマー型)10μlを加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、室温で30秒間放置した。この溶液を、予め10mg/mlヨウ化カリウム0.5M Na-Pi, pH 7.0溶液80μlと5%牛血清アルブミンを含むリン酸塩緩衝生理食塩水(BSA-PBS)5μlを添加しておいたチューブに移し攪拌した。この溶液をBSA-PBSで平衡化しておいたスピンカラム(1ml, G-25 fine, ファルマシア社)に負荷し、2,000 rpmで5分間遠心した。カラムから溶出された画分にBSA-PBSを400μl加え攪拌した後、2μlを取り、その放射能をガンマーカウンターで測定した。

#### 【0023】

又、<sup>125</sup>I標識OCIF溶液のOCIF生物活性は、WO 96/26217号記載の方法に従い測定した。又、<sup>125</sup>I標識OCIF濃度は以下のようにELISAにより測定した。即ち、WO96/26217号の方法で得られた抗OCIFウサギポリクローナル抗体を2μg/mlになるように溶解させた50mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6を100μlずつ96ウェルイムノプレート(Maxisoap<sup>TM</sup>、Nunc社)の各ウェルに加えて4で一夜放置した。この液を吸い取った後、ブロックエース(雪印乳業社)とリン酸塩緩衝生理食塩水の混合水溶液(混合比25:75)(B-PBS)を200μlずつ各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この液を吸い取った後、各ウェルを0.01% Polysorba

10

20

30

40

50

te 80 を含むリン酸塩緩衝生理食塩水(P-PBS)で3回洗浄し、次いで  $^{125}\text{I}$  標識OCIFサンプルあるいはOCIF標準品を添加したB-PBSを100  $\mu\text{l}$  ずつ各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この液を吸い取った後、P-PBS 200  $\mu\text{l}$  で各ウェルを6回洗浄した。パーオキシダーゼ標識した抗OCIFウサギポリクローナル抗体をB-PBSで希釈した溶液を100  $\mu\text{l}$  ずつ各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この液を吸い取った後、P-PBS 200  $\mu\text{l}$  で各ウェルを6回洗浄した。TMB 溶液 (TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek 社) を100  $\mu\text{l}$  ずつ各ウェルに加え、室温で2~3分放置した後、停止液(Stopping Reagent, Scytek 社)を100  $\mu\text{l}$  ずつ各ウェルに加えた。各ウェルの450 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。OCIF標準品を用いて作製した検量線より  $^{125}\text{I}$  標識OCIFの濃度を求めた。

10

## 【0024】

## 【実施例2】

チオレドキシン-OBM 融合蛋白質(Trx-OBM) 発現ベクターの構築

10  $\mu\text{l}$  の10X ExTaq バッファー(宝酒造社)、8  $\mu\text{l}$  の10mMdNTP(宝酒造社)、77.5  $\mu\text{l}$  の滅菌蒸留水、2  $\mu\text{l}$  のpOBM291 (10ng/ $\mu\text{l}$ )、1  $\mu\text{l}$  のプライマーOBM3 (100pmol/ $\mu\text{l}$ ) (配列表配列番号2)、1  $\mu\text{l}$  のプライマーOBMSalR2 (配列表配列番号3)、0.5  $\mu\text{l}$  のExTaq (5u/ $\mu\text{l}$ ) (宝酒造社)を混合しマイクロ遠心管中でPCR反応を行った。95 5分、50 1秒、55 1分、74 1秒、72 5分の反応後、96 1分、50 1秒、55 1分、74 1秒、72 3分の反応を25サイクル行った。1%アガロースゲル電気泳動により、反応液全量から約750bp のDNA断片をQIAEX II gel extraction kit(QIAGEN社)を用いて精製した。精製したDNA断片(全量)を制限酵素SalI,EcoRI(宝酒造社)で切断した後、1.5%アガロースゲル電気泳動を行い約160bp のDNA断片(断片1)を精製し20  $\mu\text{l}$  の滅菌蒸留水に溶解した。同様に、4  $\mu\text{g}$  のpOBM291を制限酵素BamHIとEcoRI(宝酒造社)で切断して得られる約580bp のDNA断片(断片2)、並びに2  $\mu\text{g}$  のpTrXFus(Invitrogen社)を制限酵素BamHIとSalI(宝酒造社)で切断することにより得られる約3.6kb のDNA断片(断片3)をそれぞれ精製し、20  $\mu\text{l}$  の滅菌蒸留水に溶解した。DNA断片の精製にはQIAEX II gel extraction kitを用いた。断片1、断片2、及び断片3をDNA ligation kit ver.2(宝酒造社)を用い、16 で2時間30分保温することにより結合させた。このライゲーション反応液を用い大腸菌G1724株(Invitrogen社)をThioFusion Expression System(Invitrogen社)添付のInstruction Manualに記載の方法で形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換株から、制限酵素切断により得られるDNA断片地図の解析、ならびにDNA配列の決定により、OBM cDNA断片がチオレドキシン遺伝子に同じ読み枠で結合しているプラスミドを持つ菌株を選び出した。得られた菌株をG1724/pTrxOBM25と名付けた。

20

## 【0025】

## 【実施例3】

大腸菌でのTrx-OBMの発現

G1724/pTrxOBM25株及びpTrxFusを持つG1724株(G1724/pTrxFus)それぞれを2mlのRMG-Amp培地(0.6%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05%NaCl、0.1%NH<sub>4</sub>Cl、2%カザミノ酸(Difco社)、1%グリセロール、1mM MgCl<sub>2</sub>、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン(Sigma社)、pH7.4)で30 で6時間振とう培養した。菌液0.5mlを50mlのInduction培地(0.6%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05%NaCl、0.1%NH<sub>4</sub>Cl、0.2%カザミノ酸、0.5%グルコース、1mM MgCl<sub>2</sub>、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリン、pH 7.4)に添加し、30 で振とう培養した。OD<sub>600nm</sub>での値が約0.5になった時点で最終濃度が0.1mg/mlになるようにL-トリプトファンを添加し、さらに30 での振とう培養を6時間継続した。菌液を3000  $\times$  gで遠心し菌体を集め、12.5mlのPBS(10mMリン酸バッファー、0.15M NaCl, pH7.4)に懸濁した。懸濁液を超音波発生装置(UltraSonic社)にかけ菌体を破碎し、7000  $\times$  gで30分遠心して上清を集め可溶性蛋白質画分とした。この可溶性蛋白質画分液10  $\mu\text{l}$  ずつを還元条件下でのSDSポリアクリルアミド(10%)電気泳動に供した。G1724/pTrxOBM25の可溶性蛋白質画分液にはG1724/pTrxFusの可溶性蛋白質画分液には見られない約40kDaのバンドが検出された。よつ

30

40

50

て、チオレドキシンとOBM の融合蛋白質(Trx-OBM) が大腸菌中で発現していることが確認された。

【 0 0 2 6 】

【実施例 4】

Trx - OBM を生産する大腸菌の大量培養

GI724/pTrxOBM25 をRMG-Amp 寒天培地 (0.6 %Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.3 %KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05%NaCl、0.1 %NH<sub>4</sub>Cl、2 %カザミノ酸、1 %グリセロール、1 mM MgCl<sub>2</sub>、100 μg/mlアンピシリン、1.5 %寒天、pH7.4) に白金耳で塗まつし30 で一晩培養した。菌を10mlのInduction 培地に懸濁し、5 mlずつを500ml のInduction 培地の入った2 L用三角フラスコ計2本に添加し、30 で振とう培養した。OD<sub>600 nm</sub> での値が約0.5 になった時点で最終濃度が0.1m g/mlになるようにL-トリプトファンを添加し、さらに30 で振とう培養を6 時間継続した。菌液を3000 × g で20分間遠心分離して菌体を集め、菌体を160ml のPBS に懸濁した。懸濁液を超音波発生装置 (UltraSonic社) にかけ菌体を破碎し、7000 × g で30分間遠心して上清を集め可溶性蛋白質画分とした。

【 0 0 2 7 】

【実施例 5】

OCIF固定化アフィニティーカラムの調製

TSKgel AF-トレシルトヨパール650 (東ソー社) 2 g に、W096/26217号に記載の方法で調製した遺伝子組換え型OCIF 35.0 mgを含む 1.0 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) 40ml を加え、4 で一晩ゆっくり振とうしてカップリング反応を行った。過剰な活性基を不活性化する為、遠心分離により上清を除去し、沈殿した担体に40mlの0.1 M トリス-HCL緩衝液 (pH 7.5)を加え、室温で1 時間穏やかに振とうした。担体を0.01% Polysorbate 80 と0.2M NaCl を含む0.1 M グリシン - 塩酸緩衝液(pH 3.3)及び0.01% Polysorbate 80 と0.2M NaCl を含む0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.0)で順次洗浄した後、0.01% Polysorbate 80 を含む10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で2 度洗浄し、平衡化した。

【 0 0 2 8 】

【実施例 6】

OCIF固定化アフィニティーカラムによる Trx - OBM の精製

Trx-OBMの精製は、特に断らない限り4 で行った。上記のOCIF固定化アフィニティー担体(10ml)と、実施例4記載の可溶性蛋白質画分液(120ml)とを混合後、50ml遠心管 (4本) 中で、ローテーターを用いて4 で一晩穏やかに振とうした。この混合液中の担体をエコノカラム (バイオラッド社、内径1.5cm 、長さ15cm) に充填した。0.01% Tween 80 を含むPBS 300ml 、0.01% Polysorbate 80 と2M NaClを含む10mMリン酸バッファー (pH 7.0)100ml、及び0.01% Polysorbate 80 と0.2M NaCl を含む0.1 M グリシン - 塩酸緩衝液 (pH 3.3) 100 ml を順次通液してカラムを洗浄した。次に、0.01% Polysorbate 80 と0.2M NaCl を含む0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.0)を通液し、カラムに吸着した蛋白質を溶出した。溶出液は5 mlずつ分取した。分取した画分には、10%容量の2 M トリス溶液(pH 8.0)を加え、直ちに中和した。分取した画分中の Trx-OBMは、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動と銀染色で検出した。Trx-OBMを含む画分を集め、さらに精製した。

【 0 0 2 9 】

【実施例 7】

ゲル濾過による Trx-OBMの精製

実施例6で得られた Trx - OBM フラクション約 25 mlを、Centriplus 10 及び Centricon 10(amicon社) を用いて、約 0.5mlに遠心濃縮した。このサンプルを、予め 0.01 % Polysorbate 80を含む PBSで平衡化した Superose 12 HR 10/30 カラム(1.0 × 30cm、ファルマシア社)にかけた。分離には、0.01% Polysorbate 80を含む PBSを移動相として用い、流速 0.25 ml/minでカラムを展開した。カラムからの溶出液は 0.25 mlずつ分取した。分取した画分の Trx-OBMは、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に負荷し、ゲル中の Trx-OBM蛋白質を銀染色により検出した。純化された Trx-OBMを含むフラクションを集め、Trx-OBMの蛋白質濃度を測定した。蛋白質濃度の測定は、ウシ血清アルブミンを標準品とし、

DC-protein assay kit(バイオラッド社)を用いて行った。この結果、純度90%以上、濃度100 μg/mlのTrx-OBMが得られた。

【0030】

【実施例8】

#### OBM-BP cDNA のクローニング

##### (1) 発現クローニング用ベクターpSR EXの構築

pcDL-SR 296(Molecular and Cellular Biology, Vol.8, pp466-472, 1988)を制限酵素PstI(宝酒造社)及びAsp718(ベーリンガーマンハイム社)で切断しアガロースゲル電気泳動で断片を精製した。合成したオリゴヌクレオチドSR MCS1(配列表配列番号4)ならびにSR MCS2(配列表配列番号5)をアニールした後、上記pcDL-SR 296のPstIとAsp718によって得られたcDNA断片と混合し、ライゲーションキットver.2(宝酒造社)を用いてライゲーションを行い、その反応生成物を用いて大腸菌DH5<sup>+</sup>(ギブコBRL社)を形質転換した。得られたアンビシリン耐性株より、アルカリSDS法によりプラスミドを精製し、その制限酵素による切断並びにDNA塩基配列の決定により、pcDL-SR 296由来3.4kb DNA断片にオリゴヌクレオチドSR MCS1とSR MCS2が挿入されたプラスミドを選びだした。得られたプラスミドをpSR EXと名付けた。

【0031】

##### (2) マウスC7細胞からのRNAの抽出

マウスマクロファージ様細胞株C7(鳥取大学医学部、林教授より分与)は、10%牛胎児血清を含む-T-MEM(ギブコBRL社)を用いて培養した。付着細胞用225cm<sup>2</sup>T-フラスコでコンフルエントになるまで培養したC7細胞を、トリプシン処理してT-フラスコから剥がし洗浄した後、5枚の225cm<sup>2</sup>T-フラスコに分配し、10%牛胎児血清を添加した-T-MEM60mlを各々のフラスコに加えてCO<sub>2</sub>インキュベーター中で5日間培養した。培養したC7細胞からISOGEN(和光純薬)を用いて総RNAを抽出した。総RNA1095.6μgからOligo(dT)-celluloseカラム(5'-3'Prime社)を用いることにより、約50.4μgのポリA<sup>+</sup>RNAを得た。

【0032】

##### (3) 発現ライプラリーの構築

実施例8-(2)で得られたポリA<sup>+</sup>RNA 5μgからcDNA Synthesis kit(Stratagene社)を用い、二本鎖cDNAを合成した。10X first strand buffer 5μl, first-strand methyl nucleotide mixture 3μl, Not "T" directional primer(Invitrogen社、1μg/ml)2μl, 滅菌蒸留水34.5μl, RNase Block Ribonuclease Inhibitor(42ユニット/μl)1μlを混合した。この溶液に前記ポリA<sup>+</sup>RNA 5μg(3μl)を添加しよく混合し、室温で10分放置する事によってprimerをRNAにアニーリングさせた。1.5μlのMMLV逆転写酵素(50ユニット/μl)を反応液に添加し混合後37で1時間、42で30分で保温し、4で保冷した。さらに、反応液に10×second-strand buffer 20μl、second-strand dNTP mixture 6μl、蒸留水109μl、5倍希釈した[<sup>-32</sup>P]dCTP(2μCi/μl)2μl、RNase H(1.5ユニット/μl)2μl、DNA polymerase I(9ユニット/μl)11μlを添加混合し16で2時間30分保温し、その後4で保冷した。この反応液にblunting dNTP mix 23μlとcloned pfu DNA polymerase(2.5ユニット/μl)2μlを添加混合後、72で30分保温した。フェノール・クロロフォルム処理後、エタノール沈殿を行った。この沈殿をキットに添付のEcoRI adaptor 7μl(0.4μg/μl)に溶解し、さらに10×ligase buffer 1μl, 10mM ATP 1μl, T4 DNA ligase(4ユニット/μl)1μlを添加し8で16時間保温した。70で30分保温しligaseを失活させた。この反応液に10×ligation buffer 1μl, 10mM ATP 2μl、滅菌蒸留水6μl, T4 polynucleotide kinase(10ユニット/μl)1μlを添加し混合後、37 30分で保温した。その後70にて30分間保温し、kinaseを失活させた。フェノール・クロロフォルム処理後、エタノール沈殿を行った。DNAを30μlの10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTAに溶解し制限酵素NotI(New England Biolabs社)により切断した後、アガロースゲル電気泳動により1000bp以上のcDNAを分取し、エタノール沈殿を行った。さらに、混入しているアダプターをカラム(Great length cDNA Synthesis Kit, Clontech社)により除去した後、DNAを水に溶解し、あらかじめ制限酵素Ec

10

20

30

40

50

oRI 及びNotI ( 宝酒造社 ) で消化して調製したpcSR EXに挿入した。この操作により $1.05 \times 10^6$  のcomplexityを持つ発現ライブラリーを構築した。

【 0 0 3 3 】

(4) OBM との結合を指標とした発現ライブラリーのスクリーニング

実施例 8 - (3) 記載の発現ライブラリー DNA を用い、大腸菌XL2 Blue MRF' ( 東洋紡社 ) を形質転換し、1 L のTerrific Brothアンピシリン培地 ( 1.2 % トリプトン、2.4 % イーストエキス、0.4 % グリセロール、0.017 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.072 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、100 μg/ml アンピシリン ) に懸濁し、37 で一晩振盪培養した。遠心により集菌しEndo Free Plasmid Mega kit(QIAGEN 社) を用いてプラスミド DNA を調製した。260nm における吸光度により DNA 含量を測定した。得られたDNA をCOS-7 細胞 (RIKEN CELL BANK, RCB0539) に以下に記述した方法によりトランスフェクションした。COS-7 細胞を 6 ウェルプレートに  $3 \times 10^5$  細胞 / ウェルとなるように播種し、10% 牛胎仔血清を含むDMEMを用いて、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で37 にて一晩培養した。翌日、培地を除いた後、無血清IMDMで細胞を洗浄した。トランスフェクション用試薬リポフェクタミン ( ギブコ BRL社 ) 添付のプロトコールに従い、予めOPTI-MEM ( ギブコ BRL社 ) を用いて希釀しておいた前記プラスミドDNA とリポフェクタミン ( ギブコ BRL社 ) を混合し、15分後この混合液を各ウェルの細胞に加えた。用いたDNA 及びリポフェクタミンの量はそれぞれ3 μg 及び12 μl とした。5 時間後、培地を除去し、1 ml の10% 牛胎仔血清を含むDMEM ( ギブコ BRL 社 ) を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中 ( 5 % CO<sub>2</sub> ) 、37 で 2 ~ 3 日培養した。上記の様にトランスフェクトし 2 ~ 3 日培養した COS-7 細胞をウェルあたり 3 ml のPBS で洗浄後、10mM HEPES ( pH7.3 ) 、20mM EDTA、100 μg/ml コンドロイチン硫酸を含むIMDM 1 ml を添加し37 で10分間静置した。ピペッティングし細胞をウェルから剥がした後 PBSで洗浄し、900rpmで 5 分間遠心して細胞を回収した後、 $2 \times 10^6 / 3 \text{ ml}$  になるように 5 % 牛胎仔血清及び0.02% アジ化ナトリウムを含むPBS に懸濁した。3 ml の細胞懸濁液を Trx - OBM をコーティングしたディッシュに添加し室温で 2 時間静置した。Trx-OBMをコーティングしたディッシュは、5 μg/ml の Trx-OBMを含む0.1M NaHCO<sub>3</sub> 溶液 3 ml を 6 cm細胞培養用ペトリディッシュ(Falcon 社) に入れて室温で 2 時間静置した後、0.15M NaClで 3 回洗浄し、5 % 牛胎仔血清、1mM EDTA、及び0.02% アジ化ナトリウムを含むPBS 3 mlを入れ 4 一晩静置することにより調製した。ディッシュから細胞懸濁液を除去した後、5 % 牛胎仔血清及び0.02% アジ化ナトリウムを含むPBS で 3 ~ 6 回穏やかに洗浄し、ディッシュに付着していない細胞を除去した。ディッシュに0.4ml のHirt溶液(0.6% ラウリル硫酸ナトリウム、10 mM EDTA水溶液) を添加し数分静置し付着細胞を溶解させた。細胞溶解液を1.5ml 用微量遠心管に入れ0.1 ml の 5 M NaCl を添加し混合し、一晩氷冷した。遠心管を 4 、15000rpmで15分間遠心し上清を新しい微量遠心管に移し、フェノール・クロロホルムで除タンパクを行った。水相液にparallel paint (Novagen 社) 及び1/10量の 3 M 酢酸ナトリウムを加え、さらに2.5 倍量のエタノールを添加し室温で 2 分静置した。遠心管を 4 、15000rpmで15分間遠心しDNA を沈殿させた。沈殿を70% エタノールで 2 回、99% エタノールで 1 回洗浄した後乾燥させ、20 μl の滅菌蒸留水に溶解した。このDNA 溶液の一部を用い大腸菌XL2 Blue MRF' を形質転換した。以上の操作によりOBM に結合する分子 ( OBM-BP ) の cDNAを濃縮した。上記の操作をさらに 3 回繰り返した後、得られたプラスミドDNA で大腸菌を形質転換し形質転換株中のプラスミドDNA を解析した。10クローンの内 5 クローンが同一の構造を有していた。そのひとつをpOBM-BP1と名付けた。pOBM-BP1中に挿入されたOBM-BP cDNAの塩基配列を配列表配列番号 6 に、又該cDNAがコードするアミノ酸配列を配列表配列番号 7 にそれぞれ示す。尚、このようにして得られたOBM-BP ( 膜結合型 ) をコードするDNA は、pOBM-BPとして、平成10年3月12日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている(FERM P-16702)。

【 0 0 3 4 】

【 実施例 9 】

OBM-BPの発現

24 ウェルプレートの各ウェル中で COS-7 細胞、及びpOBM-BP1をトランスフェクトした COS

10

20

30

40

50

-7細胞を、それぞれ2～3日間培養した。各ウェルの細胞を無血清DMEMで洗浄し、これにボルトンハンター法 (Bolton A.E. and Hunter W.M., Biochem. J., Vol.133, pp529-539 (1973)) にて  $^{125}$ I 標識した Trx-OBM 20ng/ml を含む結合試験用培地 (0.2 % 牛血清アルブミン、20mM Hepes緩衝液、0.1mg/ml heparin、0.2 % Na<sub>3</sub>N<sub>3</sub> を加えた無血清DMEM) 200  $\mu$ l を加えた。又、別のウェルには  $^{125}$ I 標識した Trx-OBM 20ng/ml と非標識 Trx-OBM 8  $\mu$ g/ml を含む結合試験用培地を200  $\mu$ l 加えて実験を行った。CO<sub>2</sub> インキュベーター中 (5 % CO<sub>2</sub>) で37 °C にて1時間培養した後、細胞を0.1mg/ml のheparin を含むPBS 500  $\mu$ l で2回洗浄した。洗浄後、0.1 N NaOH溶液 500  $\mu$ l を各ウェルに加え、室温に10分間放置することにより細胞を溶解させ、細胞溶解液中の放射活性をガンマーカウンターで測定した。その結果、pOBM-BP1をトランスフェクトした細胞にのみ  $^{125}$ I 標識した Trx-OBM が結合することが確認された。又、その結合は、400 倍濃度の非標識 Trx-OBM を添加することで著しく阻害されることが確認された。以上の結果から、pOBM-BP1上の cDNA にコードされる蛋白質OBM-BPは、COS-7 細胞表面でOBM と特異的に結合することが明らかとなった。

【0035】

【実施例10】

#### 分泌型 OBM-BP(sOBM-BP) 発現ベクターの構築

pOBM-BP1を鋳型とし、m NheF (配列表配列番号8) とm XhoR (配列表配列番号9) をプライマーとして、EX Taq (宝酒造社) を用いてPCRを行った。増幅されたDNA断片をアガロースゲル電気泳動により精製し、制限酵素NheI及びXhoI (宝酒造社) で切断した。このDNA断片を予めNheI及びXhoIで切断しておいたpCEP4 (インビトローゲン社) にDNA Ligation Kit Ver.2を用いて挿入し、その反応生成物を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換した。得られたアンピシリン耐性株より、アルカリSDS法によりプラスミドを精製し、制限酵素で切断することにより、目的の構造を持った分泌型OBM-BP (sOBM-BP) 発現プラスミド (pCEP sOBM-BP) を持つ大腸菌株を選び出した。さらにこのプラスミドの塩基配列を、ダイターミネーターサイクルシークエンシングFSキット (パーキン - エルマー社) を用いて決定し、このプラスミドが sOBM-BPをコードする配列を持っていることを確認した (DNA : 配列表配列番号10、アミノ酸 : 配列表配列番号11)。pCEP sOBM-BPを持つ大腸菌株を培養し、キアフィルタープラスミドミディキット (キアゲン社) を用いてpCEPsOBM-BPを精製した。尚、pCEPsOBM-BP中のシグナル配列を含まない部分をコードするDNAを持つプラスミドをpCEPsmOBM-BPと名付け、平成10年3月12日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した(FERM P-16703)。

【0036】

【実施例11】

#### 分泌型OBM-BPの発現

293-EBNA細胞 (インビトローゲン社) を10%FCS を含むIMDM培地 (IMDM-10%FCS) に懸濁し、コラーゲンコートした24ウェルプレート (住友ベークライト社) に  $2 \times 10^5$  個 / 2ml / ウェルになるように播種し、一晩培養した。この細胞に実施例10で得られたpCEPsOBM-BP 1  $\mu$ g をリポフェクタミン (ギブコ社) 4  $\mu$ l を用いて形質導入し sOBM-BP発現細胞を得た。sOBM-BP 発現細胞を225cm<sup>2</sup> フラスコで培養し、コンフルエントになった時点で血清を含有しないIMDMに置換し、さらに培養を3日間行った。得られた培養液計10L を限外ろ過膜により処理し、濃縮液250 mlを得た。

【0037】

【実施例12】

#### OBM 固定化アフィニティカラムによる分泌型OBM-BPの精製

##### (1) OBM 固定化アフィニティカラムの調製

TSKgel AF-トレシルトヨパール650 (東ソー社) 2gを Trx-OBM 35.0 mgを含む 1.0 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) 40mlに混合し、4 °C で一晩ゆっくり振とうしカップリング反応を行った。遠心分離により上清を除去した後、過剰な活性基を不活性化する為、沈殿した担体に40mlの0.1 M トリス-HCL緩衝液 (pH 7.5) を加え、室温で1時間穏やかに振とうし

た。0.01% Polysorbate 80 と 0.2M NaCl を含む 0.1M グリシン - 塩酸緩衝液 (pH 3.3) 及び 0.01% Polysorbate 80 と 0.2M NaCl を含む 0.1M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.0) でそれぞれ担体を洗浄した後、0.01% Polysorbate 80 を含む 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 2 度洗浄し、平衡化した。

【0038】

(2) Trx-OBM 固定化アフィニティカラムによる s OBM-BP の精製

s OBM-BP の精製は、特に断らない限り 4 で行った。上記の Trx-OBM 固定化アフィニティ - 担体 (10ml) と上記実施例 11 記載の s OBM-BP を含む濃縮培養上清 (120ml) とを混合後、50ml 遠心管 (4 本) 中で、ローテーターを用いて 4 で一晩あだやかに振とうした。この混合液中の担体をエコノカラム (バイオラッド社、内径 1.5cm 長さ 15cm) に充填した。0.01% Polysorbate 80 を含む PBS (pH 7.4) 300ml、0.01% Polysorbate 80 と 2M NaCl を含む 10mM リン酸バッファー (pH 7.0) 100ml を順次通液してカラムを洗浄した。次に、0.01% Polysorbate 80 と 0.2M NaCl を含む 0.1M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.0) を通液し、カラムに吸着した蛋白質を溶出した。溶出液は 5 ml ずつ分取した。分取した画分に 10% 容量の 2M トリス溶液 (pH 8.0) を加え、直ちに中和した。溶出液各画分中の s OBM-BP の有無を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により調べた。s OBM-BP を含む画分を集めさらに精製した。

【0039】

(3) ゲル濾過による s OBM-BP の精製

上記の s OBM-BP を含むフラクション約 25 ml を、Centriplus 10 (Amicon, USA) を用いて、約 0.5 ml に遠心濃縮した。このサンプルを、予め 0.01% Polysorbate 80 を含む PBS で平衡化した Superose 12 HR 10/30 カラム (1.0 x 30 cm) にかけた。分離には、0.01% Polysorbate 80 を含む PBS を移動相として用い、流速 0.25 ml/min で展開した。分取した画分の s OBM-BP は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に負荷し、ゲル中の s OBM-BP を銀染色により検出した。純化された s OBM-BP を含むフラクションを集め、s OBM-BP の蛋白質濃度を測定した。蛋白質濃度の測定は、ウシ血清アルブミンを標準品として用い DC-protein assay kit (バイオラッド社) で行った。

【0040】

【実施例 14】

ウサギ抗 s OBM-BP ポリクローナル抗体の作製

雄性日本白色ウサギ (体重 2.5-3.0kg、北山ラバース社より入手) 3 羽に、実施例 13 記載の方法により得られた精製 s OBM-BP 溶液 (200 μg/ml) と同容量のフロイント完全アジュvant (DIFCO 社) とを混合してエマルジョンとしたものを、1 回 1 ml ずつ皮下注射した。免疫は 1 週間間隔で合計 6 回行い、最終免疫後 10 日目に全採血を行った。分離した血清から抗体を以下の様に精製した。PBS で 2 倍希釈した抗血清に最終濃度が 40% (w/v%) となるように硫酸アンモニウムを添加して 4 で 1 時間放置後、8000 × g で 20 分間遠心分離を行い沈殿を得た。沈殿を少量の PBS に融解し、PBS に対して 4 で透析した後、protein G-Sepharose カラム (ファルマシア社) に負荷した。PBS で洗浄後、0.1M グリシン - 塩酸緩衝液 (pH 3.0) で吸着した免疫グロブリン G を溶出し、溶出液に直ちに 1.5M トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.7) を加えて中和した。溶出蛋白質画分を PBS に対して透析後、280 nm における吸光度を測定し、その濃度を決定した (E<sup>1%</sup> 3.5)。

【0041】

さらに、得られた抗体をイムノピュア Fab プレバレーションキット (ピアス社) を用いて、そのプロトコールに従って Fab フラグメントを作製した。西洋ワサビペーオキシダーゼ標識した抗 OBM-BP 抗体は、マレイミド活性化ペーオキシダーゼキット (ピアス社) を用いて作製した。1 mg の精製抗体に 80 μg の N-スクシンイミド-S-アセチルチオ酢酸を添加し、室温で 30 分間反応させた。これに 5 mg のヒドロキシルアミンを添加して脱アセチル化した後、修飾された抗体をポリアクリルアミド脱塩カラムにて分画した。蛋白質画分を 1 mg のマレイミド活性化ペーオキシダーゼと混合し、室温で 1 時間反応させ酵素標識抗体を得た。

10

20

30

40

50

【0042】

【実施例15】

破骨細胞誘導メカニズムの解析

ddY マウス(SLC社)より常法にて採取した脾臓細胞又はマウスC7細胞をそれぞれ  $1.4 \times 10^6$  個/ml、 $5 \times 10^4$  個/ml の細胞密度で10%牛胎仔血清と10ng/ml M-CSF を含む -MEMに懸濁し、24ウェルプレートに1ウェルあたり 500  $\mu$ l 添加した。精製したTrx-OBM を上記培地にて希釈した溶液(40ng/ml) 又は上記培地を、ウェルあたり 250  $\mu$ l 加えた。次いで、精製したsOBM-BPを上記培地にて希釈した溶液(400ng/ml)、精製した抗OBM-BP抗体(Fabフラグメント)を上記培地にて希釈した溶液(400ng/ml)又は上記培地を、ウェルあたり 250  $\mu$ l 追加した。6日間培養後、培養プレートをPBSで1回洗浄したのちアセトン-エタノール溶液(50:50)で1分間細胞を固定した。風乾後、LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASEキット(シグマ社)を用いて破骨細胞特異的マーカーである酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性(TRAP活性)を示す細胞のみを染色した。顕微鏡観察の結果、脾臓細胞及びC7細胞に Trx-OBMのみを添加したウェル中にはそれぞれ480  $\pm$  46個、374  $\pm$  21個(平均  $\pm$  標準偏差、n=3)のTRAP陽性細胞が観察された。これに対し、Trx-OBMを添加しなかったウェル、Trx-OBMとsOBM-BPを添加したウェル、及びTrx-OBMと抗OBM-BP抗体を添加したウェル中には、TRAP陽性細胞は全く検出されなかった。これとは別に、C7細胞を  $1 \times 10^5$  個/mlにて10%牛胎仔血清と1ng/ml M-CSF を含む -MEMに懸濁し、24ウェルプレートに1ウェルあたり 1ml 添加した。一晩培養後 -MEMで1回洗浄し、これに  $^{125}$ I 標識したTrx-OBM 20ng/ml を加えた結合試験用培地(0.2%牛血清アルブミン、20mM Hepes緩衝液、0.1mg/ml heparin、0.2%NaN<sub>3</sub>を加えた -MEM) 200  $\mu$ l を加えた。又、別のウェルには、 $^{125}$ I 標識したTrx-OBM 20ng/ml と非標識Trx-OBM 8  $\mu$ g/mlを含む添加した結合試験用培地を 200  $\mu$ l 加えて実験を行った。CO<sub>2</sub> インキュベーター中(5%CO<sub>2</sub>)で37にて1時間培養した後、細胞を0.1mg/mlのheparinを含むリン酸緩衝生理食塩水500  $\mu$ l で2回洗浄した。洗浄後、0.1N NaOH溶液 500  $\mu$ l を各ウェルに加え、室温に10分間放置することにより細胞を溶解させ、溶解液中の放射活性をガンマカウンターで測定した。その結果、C7細胞に  $^{125}$ I 標識したTrx-OBM が結合することが確認された(7663  $\pm$  125cpm、平均  $\pm$  標準偏差、n = 3)。又、その結合は、400倍濃度の非標識のTrx-OBMを添加することで著しく阻害されることが確認された(2735  $\pm$  158cpm、平均  $\pm$  標準偏差、n = 3)。これらの結果より、Trx-OBMは破骨前駆細胞上に発現しているOBM-BPに直接結合することにより破骨細胞を誘導するシグナルを伝達していることが明らかとなった。即ち、OBMとOBM-BPとの結合を阻害、修飾する物質が発見できれば、破骨細胞の分化誘導を調節することが可能となり、骨代謝異常症に対して極めて有望な治療薬になることが示された。

【0043】

【実施例16】

ウサギ抗sOBM-BP ポリクローナル抗体による破骨細胞の誘導

実施例14に示した方法でウサギ抗sOBM-BP ポリクローナル抗体を作製した。ddY マウス(SLC社)より定法にて脾臓細胞を採取した。 $0.7 \times 10^6$  個/ml の細胞密度の脾臓細胞を、10%牛胎仔血清と20ng/ml M-CSFを含む -MEM中で下記の各条件で培養した場合の破骨細胞形成を調べた。1 抗sOBM-BP 抗体(100  $\mu$ g/ml)を添加、2 抗sOBM-BP 抗体(100  $\mu$ g/ml)およびsOBM-BP(1  $\mu$ g/ml)を添加、3 sOBM-BP(1  $\mu$ g/ml)を添加、4 何も添加しない場合、の4条件で実験をおこなった。培養は24ウェルプレートに1ウェルあたり 1mlの培地を添加しておこなった。6日間培養後、以下の方法にて酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)活性を測定した。細胞をエタノール・アセトン(1:1)にて室温で1分間固定後風乾し、500  $\mu$ l の1.5mg/ml p-nitrophenol phosphate, 20mM 酒石酸ナトリウムを含む50mMクエン酸バッファー、pH4.5 溶液を加えて37 10分反応させた。250  $\mu$ l の1N NaOHを添加して酵素反応を停止させた後、OD405nm の吸光度を測定した。結果を表1に示す。この結果、破骨細胞がOBM-BPを介して誘導されることが明らかとなった。

【0044】

【表1】

10

20

30

40

50

## 培養条件 TRAP酵素活性 (OD405nm)

①	0.715
②	0.071
③	0.069
④	0.063

10

## 【0045】

## 【実施例17】

OBM とOBM-BPとの結合を阻害・修飾する分子のスクリーニング系の構築

96ウェルイムノプレート(Nunc, MaxiSorp<sup>TM</sup>)の各ウェルに10mM炭酸水素ナトリウム水溶液で5000倍に希釈した抗チオレドキシン抗体(Invitrogen社)を100  $\mu$ l ずつ添加し4で一晩放置した。各ウェル中の液を捨てた後、ブロックエース(雪印乳業社)をPBSで2倍希釈した溶液(BA-PBS)を各ウェルに200  $\mu$ l ずつ添加し室温で1時間放置した。液を捨てた後、各ウェルにTrx-OBM(100ng/ml)100  $\mu$ l ずつ添加し室温で2時間放置した。PBS-T(0.05% Tween20を含むPBS)で各ウェルを3回洗浄した後、BA-PBSで希釈したsOBM-BP(0~100ng/ml)を各ウェルに100  $\mu$ l ずつ添加し2時間室温で放置した。PBS-Tで各ウェルを3回洗浄した後、実施例14で得られたパーオキシダーゼ標識ウサギ抗OBM-BP抗体をBA-PBSで2000倍希釈したものを、各ウェルに100  $\mu$ l ずつ添加し2時間室温で放置した。PBS-Tで各ウェルを6回洗浄した後、TMB溶液(TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek社)を100  $\mu$ l ずつ各ウェルに加え、室温で約10分放置した後、停止液(Stopping Reagent, Scytek社)を100  $\mu$ l ずつ各ウェルに加えた。各ウェルの450 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。BA-PBSで段階希釈したOBM-BP(0-100ng/ml)を添加した場合の実験結果を図1に示す。OBM-BP濃度に依存して吸光度が上昇した。従って、この系を利用することによりOBM-BPとOBMの結合を定量化することができる。さらに、上記OBM-BP(50ng/ml)添加時に、同時に一定量(0-200ng/ml)の破骨細胞形成を特異的に阻害する分子OCIFを添加した時の結果を図2に示す。OCIFの濃度に依存して吸光度が低下していることより、OCIFはOBMとOBM-BPの結合を阻害する因子であることがわかる。即ち、このような系を利用することにより、破骨細胞形成を特異的に阻害・修飾する分子を得ることができる。

20

30

## 【0046】

## 【実施例18】

本発明蛋白質を有効成分とする注射剤(1) OBM-BP 20  $\mu$ g

40

ツイーン80 1mg

ヒト血清アルブミン 100mg

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

## 【0047】

(2) OBM-BP	40 $\mu$ g
ソルビトール	4g
ヒト血清アルブミン	50mg

上記組成をpH7.0 の0.01M PBS に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

【0048】

【発明の効果】

本発明は、配列表配列番号11に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、又は、該アミノ酸配列の一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加したアミノ酸配列からなり、破骨細胞形成促進因子( OBM)に特異的に結合する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質に対する抗体、破骨細胞形成促進因子( OBM)と本発明蛋白質又は配列表配列番号7に示されるOBM結合蛋白質( OBM-BP)との結合を特異的に阻害する物質を選択する方法、及び該蛋白質又は前記の選択する方法により得られた物質を有効成分とする医薬に関する。本発明蛋白質は、生化学試薬、あるいは骨粗鬆症等の骨代謝疾患の予防及び/又は治療薬として、又、本発明の破骨細胞形成促進因子( OBM)と該蛋白質又はOBM結合蛋白質( OBM-BP)との結合を特異的に阻害する物質を選択する方法は、破骨細胞の形成を阻害する物質を探索する方法として、又、得られた物質は生化学試薬、あるいは骨粗鬆症などの骨代謝疾患の予防及び/又は治療薬として有用である。

【配列表】

10

20

## SEQUENCE LISTING

⟨110⟩ YUKIJIRUSHI NYUGYO KABUSHIKIGAISHA  
(Snow Brand Milk Products Co., Ltd.)  
SANKYO KABUSHIKI GAISHA  
(Sankyo Company, Limited)

10

⟨120⟩ Novel protein, DNA and use thereof.

⟨130⟩ SNMFP 98382

⟨160⟩ 11

⟨210⟩ 1

20

⟨211⟩ 951

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ mouse

⟨400⟩ 1

atgcgccggg ccagccgaga ctacggcaag tacctgcgca gctcgaggaa gatgggcagc 60  
ggcccccggcg tcccacacga gggtccgctg caccggcgcc ctctgcacc ggctccggcg 120  
ccggccaccccg ccgcctcccg ctccatgttc ctggccctcc tggggctggg actggggccag 180  
gtggtctgca gcatcgctct gttcctgtac tttcgagcgc agatggatcc taacagaata 240  
tcagaagaca gcactcactg ctttataga atcctgagac tccataaaa cgcaggtttg 300  
caggactcga ctctggagag tgaagacaca ctacctgact cctgcaggag gatgaaacaa 360  
gcctttcagg gggccgtgca gaaggaactg caacacattg tggggccaca gcgccttc 420  
ggagctccag ctatgtatgg aggctcatgg ttggatgtgg cccagcggagg caagccgtgag 480  
gcccagccat ttgcacacat caccatcaat gctgccagca tcccatggg ttccataaaa 540  
gtcactctgt cctcttggta ccacgatcga ggctgggcca agatctctaa catgacgtta 600

30

40

agcaacggaa aactaagggt taaccaagat ggcttctatt acctgtacgc caacatttc 660  
tttcggcatt atgaaaacatc gggaaagcgta cctacagact atcttcagct gatgggtgtat 720  
gtcgtaaaaa ccagcatcaa aatcccaagt tctcataacc tggatgaaagg agggagcacg 780  
aaaaactggt cgggcaattc tgaattccac ttttattcca taaatgttgg gggatttttc 840  
aagctccgag cttgtgaaga aattagcatt caggtgtcca acccttcct gctggatccg 900  
gatcaagatg cgacgtacit tggggcttcc aaagttcagg acatagactg a 951

10

⟨2 1 0⟩ 2  
⟨2 1 1⟩ 20  
⟨2 1 2⟩ DNA  
⟨2 1 3⟩ Artificial Sequence

⟨2 2 0⟩

⟨2 2 3⟩ Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

20

⟨4 0 0⟩ 2  
atcagaagac agcactcact

⟨2 1 0⟩ 3  
⟨2 1 1⟩ 33  
⟨2 1 2⟩ DNA  
⟨2 1 3⟩ Artificial Sequence

30

⟨2 2 0⟩  
⟨2 2 3⟩ Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

⟨4 0 0⟩ 3  
ggggtcgacc taggacatcc atgctaatgt tcc

40

⟨2 1 0⟩ 4  
⟨2 1 1⟩ 2 4  
⟨2 1 2⟩ DNA  
⟨2 1 3⟩ Artificial Sequence

⟨2 2 0⟩  
⟨2 2 3⟩ Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

10

⟨4 0 0⟩ 4  
gaattctaga gctagcggcc gcgg

⟨2 1 0⟩ 5  
⟨2 1 1⟩ 3 2  
⟨2 1 2⟩ DNA  
⟨2 1 3⟩ Artificial Sequence

20

⟨2 2 0⟩  
⟨2 2 3⟩ Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

⟨4 0 0⟩ 5  
gtacccgcgg ccgctagctc tagaattctg ca

30

⟨2 1 0⟩ 6  
⟨2 1 1⟩ 2 1 1 6  
⟨2 1 2⟩ DNA  
⟨2 1 3⟩ mouse

⟨4 0 0⟩ 6  
cgcccagccc gccccacccg cgccatggcc ccgcgcgcgg ccagctgccc 60

40

gccccgtgc tggcgtctg cgtgcgtc gttccactgc aggtgactct ccaggtcact 120  
cctccatgca cccaggagag gcattatgag catctggac ggtgttgcag cagatgcgaa 180  
ccagggaaagt acctgtccctc taagtgact cctacctccg acagtgtgt tctgccctgt 240  
ggccccgatg agtacttgga caccgtgaat gaagaagata aatgcttgct gcataaagtc 300  
tgtgatgcag gcaaggccct ggtggcgtg gatcctggca accacacggc cccgcgtcgc 360  
tgtgcttgca cggctggcta ccactggAAC tcagactgcg agtgcgtccg caggaacacg 420  
gagtgtgcac ctggcttcgg agctcagcat cccttgcagc tcaacaagga tacggtgtgc 480  
acacccctgcc tccctggctt ctttcagat gtctttcgt ccacagacaa atgcaaacct 540  
tggaccaact gcaccctccct tggaaagcta gaagcacacc agggacaac ggaatcagat 600  
gtggtctgca gctcttccat gacactgagg agaccacccca aggaggccca ggcttacctg 660  
cccagtccta tcgttctgct cctcttcata tcgtgttag tagtggctgc catcatctc 720  
ggcgtttact acaggaaggg agggaaagcg ctgacagcta atttggaa ttgggtcaat 780  
gatgcttgca gtgtcttaag tggaaataag gagtcctcag gggaccgttgc tgctggttcc 840  
cactcggcaa cctccagtc gcaagaagtgc tgtaaggta tcttactaat gactcgggag 900  
gagaagatgg ttccagaaga cggtgctgga gtctgtggc ctgtgtgtgc ggcaggtggg 960  
ccctggcag aagtcaagaa ttctaggacg ttcacactgg tcagcgaggt tgagacgcaa 1020  
ggagaccctt cggagaaatgc tcccacagag gatgagtaca cggaccggcc ctcgcagcc 1080  
tcgactggtt cactgcctt aatccagcag ggaagcaaat ctatacccccc attccaggag 1140  
ccccctggaag tggggagaa cgacagttt agccagttt tcaccggac tgaaagcag 1200  
gtggattctg agggctgtga cttcactgag cctccgagca gaactgactc tatgcccgtg 1260  
tccccctgaaa agcacctgac aaaagaaata gaaggtgaca gttgcctccc cttgggtggc 1320  
agctccaaact caacagatgg ctacacagggc agtgggaaca ctccctggga ggaccatgaa 1380  
ccctttccag ggtccctgaa atgtggacca ttggccctgtt gtgcctacag catggcttt 1440  
cccagtgaaag cagcagccag catggcagag gcccgggtac gggccctgggac 1500  
gagagggag cctcagggtc cggagactcc cccagtgacc agccacctgc ctcgtggaaac 1560  
gtgacttgaa acagtaactc cacgttcatc tctagcgggc aggtgatgaa ctcaagggt 1620  
gacatcatcg tggtgtatgt cagccagacc tcgcaggagg gcccgggttc cgcagagccc 1680  
gagtgcggagc ccgtggcccg ccctgtgcag gaggagacgc tggcacacag agactccctt 1740  
gcgggcaccg cggccgcgtt cccgcacgtc tggccacccg gggctggct gcaggagcag 1800

ggggcaccgc ggcagaagga cggacatcg cggccggcgc aggagcaggg tggggcgcag 1860  
 acttcactcc ataccagggt gtccggacaa tgtcagaat gacccaccc tctctgtctg 1920  
 cccctgggigc agggcaccag tgcccttccca aaaacatggt gtatctatgcc actgtgcacc 1980  
 tcctcactgg tgcaggctgc tggcatggtg atggagccca cctctcactt cctccagtgc 2040  
 cccctccctc tgccctctac cacctggcat cattcagttt ggccttttt tgcaacgttg 2100  
 gtgtccctgca ttattg 2116

10

⟨2 1 0⟩ 7  
 ⟨2 1 1⟩ 6 2 5  
 ⟨2 1 2⟩ PRT  
 ⟨2 1 3⟩ mouse

⟨2 2 0⟩  
 ⟨2 2 1⟩ SIGNAL 20  
 ⟨2 2 2⟩ (1) . . . (29)

⟨4 0 0⟩ 7

Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Gln Leu Pro Ala Pro Leu Leu  
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Val Leu Leu Val Pro Leu Gln Val Thr Leu Gln Val Thr  
 20 25 30

30

Pro Pro Cys Thr Gln Glu Arg His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys  
 35 40 45

Ser Arg Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Leu Ser Ser Lys Cys Thr Pro Thr  
 50 55 60

Ser Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Thr  
 65 70 75 80

40

Trp Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Ala Gly  
 85 90 95

Lys Ala Leu Val Ala Val Asp Pro Gly Asn His Thr Ala Pro Arg Arg  
                  100                 105                 110  
 Cys Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Asn Ser Asp Cys Glu Cys Cys  
                  115                 120                 125  
 Arg Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Phe Gly Ala Gln His Pro Leu  
                  130                 135                 140  
 Gln Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Thr Pro Cys Leu Leu Gly Phe Phe  
                  145                 150                 155                 160  
 Ser Asp Val Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys  
                  165                 170                 175  
 Thr Leu Leu Gly Lys Leu Glu Ala His Gln Gly Thr Thr Glu Ser Asp  
                  180                 185                 190  
 Val Val Cys Ser Ser Ser Met Thr Leu Arg Arg Pro Pro Lys Glu Ala  
                  195                 200                 205  
 Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Leu Ile Val Leu Leu Leu Phe Ile Ser Val  
                  210                 215                 220  
 Val Val Val Ala Ala Ile Ile Phe Gly Val Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly  
                  225                 230                 235                 240  
 Lys Ala Leu Thr Ala Asn Leu Trp Asn Trp Val Asn Asp Ala Cys Ser  
                  245                 250                 255  
 Ser Leu Ser Gly Asn Lys Glu Ser Ser Gly Asp Arg Cys Ala Gly Ser  
                  260                 265                 270  
 His Ser Ala Thr Ser Ser Gln Gln Glu Val Cys Glu Gly Ile Leu Leu  
                  275                 280                 285  
 Met Thr Arg Glu Glu Lys Met Val Pro Glu Asp Gly Ala Gly Val Cys  
                  290                 295                 300  
 Gly Pro Val Cys Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Glu Val Arg Asp Ser  
                  305                 310                 315                 320  
 Arg Thr Phe Thr Leu Val Ser Glu Val Glu Thr Gln Gly Asp Leu Ser

325	330	335	
Arg Lys Ile Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Thr Asp Arg Pro Ser Gln Pro			
340	345	350	
Ser Thr Gly Ser Leu Leu Leu Ile Gln Gln Gly Ser Lys Ser Ile Pro			
355	360	365	
Pro Phe Gln Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp Ser Leu Ser Gln			
370	375	380	10
Cys Phe Thr Gly Thr Glu Ser Thr Val Asp Ser Glu Gly Cys Asp Phe			
385	390	395	400
Thr Glu Pro Pro Ser Arg Thr Asp Ser Met Pro Val Ser Pro Glu Lys			
405	410	415	
His Leu Thr Lys Glu Ile Glu Gly Asp Ser Cys Leu Pro Trp Val Val			
420	425	430	
Ser Ser Asn Ser Thr Asp Gly Tyr Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Gly			
435	440	445	20
Glu Asp His Glu Pro Phe Pro Gly Ser Leu Lys Cys Gly Pro Leu Pro			
450	455	460	
Gln Cys Ala Tyr Ser Met Gly Phe Pro Ser Glu Ala Ala Ala Ser Met			
465	470	475	480
Ala Glu Ala Gly Val Arg Pro Gln Asp Arg Ala Asp Glu Arg Gly Ala			
485	490	495	30
Ser Gly Ser Gly Ser Ser Pro Ser Asp Gln Pro Pro Ala Ser Gly Asn			
500	505	510	
Val Thr Gly Asn Ser Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ser Gly Gln Val Met			
515	520	525	
Asn Phe Lys Gly Asp Ile Ile Val Val Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln			
530	535	540	
Glu Gly Pro Gly Ser Ala Glu Pro Glu Ser Glu Pro Val Gly Arg Pro			
545	550	555	40
560			

Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala His Arg Asp Ser Phe Ala Gly Thr Ala  
565 570 575

Pro Arg Phe Pro Asp Val Cys Ala Thr Gly Ala Gly Leu Gln Glu Gln  
580 585 590

Gly Ala Pro Arg Gln Lys Asp Gly Thr Ser Arg Pro Val Gln Glu Gln  
595 600 605

Gly Gly Ala Gln Thr Ser Leu His Thr Gln Gly Ser Gly Gln Cys Ala  
610 615 620

Glu

625

$\langle 210 \rangle$  8

$\langle 211 \rangle$  28

$\langle 212 \rangle$  DNA

$\langle 213 \rangle$  Artificial Sequence

10

$\langle 220 \rangle$

$\langle 223 \rangle$  Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

$\langle 400 \rangle$  8

ccgcctagccg cccagccgc ccgcacccg

20

$\langle 210 \rangle$  9

$\langle 211 \rangle$  49

$\langle 212 \rangle$  DNA

$\langle 213 \rangle$  Artificial Sequence

$\langle 220 \rangle$

$\langle 223 \rangle$  Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

30

40

⟨4 0 0⟩ 9

tctagactcg agttacagtg tcatggaaga gctgcagac

⟨2 1 0⟩ 1 0

⟨2 1 1⟩ 6 2 7

⟨2 1 2⟩ DNA

10

⟨2 1 3⟩ mouse

⟨2 2 0⟩

⟨2 2 1⟩ Sig-peptide

⟨2 2 2⟩ (24) . . . (111)

⟨2 2 1⟩ CDS

⟨2 2 2⟩ (112) . . . (627)

20

⟨4 0 0⟩ 1 0

cgcccagccc gccccgacccg cgccatggcc ccgcgcgcgg ggcggcgccc ccagctgccc 60

gccccgcgtgc tggcgctctg cgtgctgctc gttccactgc aggtgactct ccaggtcact 120

cctccatgca cccaggagag gcattatgag catctggac ggtgttgcag cagatgcgaa 180

ccagggaaagt acctgtccctc taagtgcact cctacctccg acagtgtgtg tctgccctgt 240

ggccccgatg agtacttgga caccgttgaat gaagaagata aatgtttgtt gcataaagt 300

tgtgtatgcag gcaaggccc ggtggcggtg gatccctggca accacacggc cccgcgtcgc 360

tgtgttttgcac cggctggctt ccactggaaac tcagactgcg agtgcgtgcg caggaacacg 420

gagtgtgcac ctggcttcgg agtcagcat cccttgcagc tcaacaagga tacgggtgtgc 480

acacccttgcctt tccctggctt ctcttcagat gtcttttgcgtt ccacagacaa atgcaaaacct 540

tggaccaact gcacccttctt tggaaagctt gaagcacacc aggggacaac ggaatcagat 600

gtggtctgcac gctcttccat gacactg 627

30

40

⟨2 1 0⟩ 1 1

⟨2 1 1⟩ 2 0 1

⟨2 1 2⟩ PRT

⟨2 1 3⟩ mouse

⟨2 2 0⟩

⟨2 2 1⟩ SIGNAL

⟨2 2 2⟩ (1) . . . (29)

10

⟨4 0 0⟩ 1 1

Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Gln Leu Pro Ala Pro Leu Leu

1 5 10 15

Ala Leu Cys Val Leu Leu Val Pro Leu Gln Val Thr Leu Gln Val Thr

20 25 30

Pro Pro Cys Thr Gln Glu Arg His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys

35 40 45

Ser Arg Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Leu Ser Ser Lys Cys Thr Pro Thr

50 55 60

Ser Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Thr

65 70 75 80

Trp Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Ala Gly

85 90 95

Lys Ala Leu Val Ala Val Asp Pro Gly Asn His Thr Ala Pro Arg Arg

100 105 110

Cys Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Asn Ser Asp Cys Glu Cys Cys

115 120 125

Arg Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Phe Gly Ala Gln His Pro Leu

130 135 140

Gln Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Thr Pro Cys Leu Leu Gly Phe Phe

145 150 155 160

30

40

Ser Asp Val Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys  
 165 170 175  
 Thr Leu Leu Gly Lys Leu Glu Ala His Gln Gly Thr Thr Glu Ser Asp  
 180 185 190  
 Val Val Cys Ser Ser Met Thr Leu  
 195 200

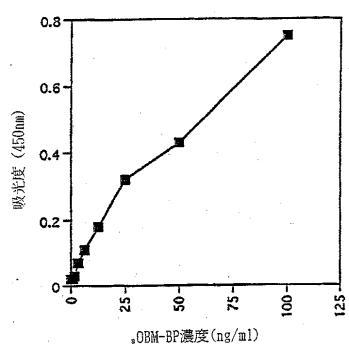
10

## 【図面の簡単な説明】

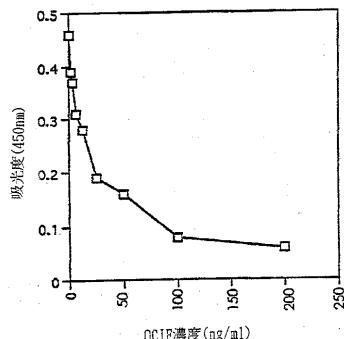
【図1】プレートに抗チオレドキシン抗体を介して固定化したTrx-OBM と段階希釈したsOBM-BP との結合を、パーオキシダーゼ標識した抗sOBM-BP 抗体により検出した結果を示す。

【図2】破骨細胞形成抑制因子(OCIF)が Trx-OBMと sOBM-BPとの結合を阻害することを示す図。抗チオレドキシン抗体を介して Trx-OBMを固相化したプレートに 50ng/mlの sOBM-BP と段階希釈したOCIFを添加し、OCIFが Trx-OBMと sOBM-BPの結合を阻害するかどうかをパーオキシダーゼ標識した抗 sOBM-BP抗体により解析した。

【図1】



【図2】



---

フロントページの続き

(72)発明者 山口 京二  
埼玉県大宮市島町702-12 ライオンズガーデン東大宮1-524

(72)発明者 島 伸行  
栃木県河内郡南河内町緑4-17-28

(72)発明者 津田 英資  
栃木県河内郡南河内町祇園2-13-1 ダイアパレス自治医大5番館407

(72)発明者 森永 伴法  
栃木県下都賀郡壬生町幸町3-11-12

(72)発明者 東尾 侃二  
埼玉県川越市山田1769-10

審査官 引地 進

(56)参考文献 Nature, 1997, Vol.390, pp.175-179

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C07K 14/00-14/825

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq