

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3616089号
(P3616089)

(45) 発行日 平成17年2月2日(2005.2.2)

(24) 登録日 平成16年11月12日(2004.11.12)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C O 7 K 14/51

C O 7 K 14/51

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

G O 1 N 33/15

G O 1 N 33/15

Z

G O 1 N 33/50

G O 1 N 33/50

Z

請求項の数 5 (全 82 頁)

(21) 出願番号 特願平5-505345
 (86) (22) 出願日 平成4年8月28日(1992.8.28)
 (65) 公表番号 特表平6-510432
 (43) 公表日 平成6年11月24日(1994.11.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1992/007359
 (87) 国際公開番号 W01993/005172
 (87) 国際公開日 平成5年3月18日(1993.3.18)
 審査請求日 平成11年8月26日(1999.8.26)
 (31) 優先権主張番号 752,861
 (32) 優先日 平成3年8月30日(1991.8.30)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 501188889
 キュリス インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 02138 マサチュー
 セッツ、ケンブリッジ、モールトン スト
 リート 61
 (74) 代理人 100090941
 弁理士 藤野 清也
 (72) 発明者 スマート, ジョン イー.
 アメリカ合衆国 02193 マサチュー
 セッツ、ウェストン、メドウ ブルック
 ロード 50
 (72) 発明者 オパーマン, ハーマン
 アメリカ合衆国 02053 マサチュー
 セッツ、メドウェイ、サマー ヒル ロー
 ド 25

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形態形成誘導蛋白のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を調節する能力について候補化合物をスクリーニングする方法であって、当該ポリペプチドのアミノ酸配列がヒトOP-1のC-末端の7個のシステイン骨格、配列番号5の残基38-139であり、当該ポリペプチドが第二の当該ポリペプチドとともに二量体をつくるとき、骨形成におけるインビボアッセイにおいて軟骨内骨形成誘導の能力を有する蛋白を形成するものである、以下を含む、当該スクリーニング方法、

(a) 候補化合物と当該蛋白を発現可能な細胞とを、当該細胞内に存在し当該ポリペプチドをコードする当該遺伝子の発現に当該化合物が影響を与えるに十分な時間インキュベートし；さらに

(b) 当該遺伝子の発現産物の存在、非存在または量について当該細胞をアッセイし、ここで当該候補化合物の非存在下での当該細胞内の当該発現産物レベルと比較してそのレベルにおける変化が、当該細胞内での当該遺伝子の発現を調節する当該化合物の能力を表示する。

【請求項2】

当該ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号5で規定される配列を含む請求の範囲第1項の方法。

【請求項3】

当該細胞が、脳または腎組織から培養される上皮細胞、もしくは腎、膀胱または副腎から

培養される上皮細胞、上皮性癌細胞、又は無限分裂化したヒト膀胱癌細胞ラインからの細胞である請求の範囲第1項の方法

【請求項4】

当該遺伝子発現産物の存在または量が、

(a) 当該遺伝子によってコードされるポリペプチドと選択的に反応する抗体でアッセーされる、又は

(b) 当該インキュベートされた細胞によって分泌された形態発生活性を有する当該ポリペプチドの濃度に対して感受性を有する細胞の細胞増殖を測定することによってアッセーされる、又は

(c) 当該遺伝子から転写されたRNAと厳格な条件下でハイブリダイズする核酸プローブを用いてアッセーされる、
請求の範囲第1項の方法。 10

【請求項5】

当該核酸プローブが、

(a) ヒトOP-1、即ち配列番号5のポリペプチド領域N-末端から残基38、又は

(b) ヒトOP-1、即ち配列番号5の遺伝子領域3'から残基139をコードする遺伝子領域までをコードする配列を含む核酸配列を有するmRNA転写物とハイブリダイズする、
請求の範囲第4項の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、組織の形態形成を誘導することができる蛋白質の哺乳類におけるレベルを調節することができる薬剤のスクリーニング方法、並びにいずれの動物組織および／またはある組織内のいずれの細胞型が特定の形態形成誘導蛋白(morphogenic protein)を発現させているかを決定する方法に関する。 20

発明の背景

細胞分化は形態形成の主要特性で、これは胎児に始まり、さらに成人の組織修復および再生メカニズムにおいて生命体の一生を通して様々な程度で継続する。TGF- β スーパーファミリーの仲間には緊密な関係を有する遺伝子のスーパーファミリーが含まれ、これらは、発育中および／または発育後の細胞分化および形態形成に重要な役割を果たすのではないかと今日考えられている。例えば、ショウジョウバエの15番目の遺伝子産物(decapentaplegic gene product (DPP))は、ミバエの背腹面軸索(dorsal-ventral axis)の形成に関係し、アクチビン(activins)の哺乳類の中胚葉および腹側構造形成を誘導し、ミューラー氏管抑制物質(MIS)は哺乳類の雄性発育に必要であるかもしれず、成長／分化因子-1(GDF-1)は神経の発育および維持に関係し、他の形態形成誘導蛋白(BMP-2、-3、-4およびOP-1)は骨形成を誘導する。 30

骨誘導モデル系の開発および研究は、骨の分化が間葉細胞の化学走性、これらの前駆細胞の増殖、軟骨の分化、この軟骨組織の骨化および肥大、脈管侵入、骨生成、再形成さらに最終的には髄の分化から成るような段階的発育であることを確認した(Reddi (1981) Collagen Rel. Res. 1:209-206)。成長した哺乳類で行われるこの骨モデル系は、発育胎児における骨形成において生じる段階的骨分化事象を概括している。他の研究では、膀胱の上皮は新しい骨形成を誘導することが示された。ハッグINS (Huggins, 1931, Arch. Surg. 22: 377-408)は、新しい骨の形成は筋膜壁上に膀胱上皮を外科的に移植することによって誘導されることを示した。ウリスト(Urist, 1956, Science 150:893-899)は、鉱物質消失骨の断片を移植することによって軟骨内骨形成が生じることを示した。後者の研究および観察は、骨形成原蛋白の存在を示唆し、さらにウシの骨幹骨は骨形成原蛋白の濃厚調製物の供給源であることを示した(Sampathら, J. Biol. Chem. 265:13198-13205, 1990; Urist, 上掲書; Reddiら, Proc. Nat. Aca. Sci. 69:1601-1605, 1972; Sampathら, Proc. Natl. Acad. Sci. 80:6591-6595, 1983)。哺乳類でマトリックスとともに移植した場合、軟骨内骨形成を誘導することができる蛋白が、今日、哺乳類のいろいろな種で多数確認され、これらの蛋白をコードする遺伝子も同様である(例えば、米国特許第4968590号、U.S.S.N.第315342号(1989年2月23日出願)およびU.S.S.N.第599543号(1990年10月18日出願)を参照)。 40 50

ヒトのOP-1DNAは、コンセンサスプローブを用いて種々のcDNAおよび遺伝子ライブラリーからクローニングされた (Ozkaynakら、EMBO J.9:2085-2093,1990)。精製ヒト組換え体 (リコンビナント) OP-1 (哺乳類細胞で発現) はインビボで新しい骨形成を誘導することが示された。TGF- β スーパーファミリーの他の仲間同様、OP-1 は前駆体として産生され、糖付加され、さらにプロセッシングを受け成熟二量体として分泌される。成熟OP-1 は、RXXRのパターンをもつ配列に続く成熟部位で切断される (Panganibanら、Mol.Cell Biol.10:2669-2677,1990)。

成人組織における形態形成の度合いは種々の組織間で異なり、とりわけそれぞれの組織の細胞の補充の度合いに依存する。この基準に基づいて組織は3つの広いカテゴリーに分けることができる:1) 静止状態の細胞集団をもつ組織、例えば神経および骨格筋で、ここでは殆どまたは全く細胞分裂はなく、発育中に形成された殆どの細胞は成長後の期間を通して存続し、したがって損傷後の正常な再生能力を殆どまたは全くもたない;2) 条件しだいで再生する集団を含む組織、例えば肝で、ここでは一般に殆ど細胞分裂は生じないが、適切な刺激または損傷に反応して細胞は同じ分化細胞型の娘細胞を生じる;3) 永久的に再生する集団をもつ組織で、血液、骨、および層状うろこ状上皮を含み、これらは成熟体における迅速で持続的な細胞補充という特徴を有する。さて、最終的に分化した細胞は短い一生をもち、幹細胞または前駆細胞として知られている異なる細胞亜集団の増殖によって置き換えられる。

本発明の目的は、ある器官のある組織に投与したとき、その組織によって産生される形態形成誘導蛋白 (モルホーゲン、“morphogen”レベルに変化をもたらす化合物のスクリーニング方法を提供することである。全身的に投与されたとき、そのような化合物は形態形成誘導活性を全身的または局所的に変化させることになるであろう。この形態形成誘導活性は、前駆細胞の増殖およびその後の連続的分化を誘導する活性、および正常な成熟組織の形成をもたらす現象 (臓器の再生を含む) の進行中に分化表現型または一連の表現型を支援し、さらに維持する活性を含む。したがって広く言えば、本発明にさらなる治療様式の開発の鍵を提供するが、これには動物または成熟哺乳類 (例えばヒト) における形態形成誘導蛋白産生の調節、および当然の結果としての組織細胞補充バランスの病理学的変化状態の是正が含まれる。本発明のまた別の目的は、哺乳類において前駆細胞集団を増加させ、前駆細胞を刺激してインビボまたはインビトロで分化させ、組織の分化表現型もしくは一連の表現型を維持し、インビボで組織特異的増殖を誘導し、または病的もしくは損傷組織もしくは器官をインビボで置き換えることができる化合物の組み合わせを同定または選別するための方法論を提供することである。本発明のさらに別の目的は、あるモルホーゲンの由来組織または臓器を決定することである。本発明の別の目的は、あるモルホーゲンの合成および産生に必要な、由来組織もしくは器官内の特異的細胞型、または当該組織に由来する細胞系、または由来器官を決定することである。本発明のこれらの目的および特徴は以下の記載、図面および請求の範囲から明白となるであろう。

発明の要旨

本発明は、生命体における形態形成誘導蛋白の局所的または全身的有効量またはレベルを調節することができる候補化合物のスクリーニング方法を開示する。当該方法は、1つまたは2つ以上の候補化合物を、あるモルホーゲンを産生していることが知られている生命体の被験組織型由来の細胞と、当該化合物が当該細胞によるモルホーゲンの産生 (すなわち発現および/または分泌) に影響を与えることを可能にするに十分な時間インキュベートし、さらに続いて、当該形態形成誘導蛋白レベルを示す指標の変化について、細胞およびこの細胞によって条件付けられた培養液を分析することによって実施される。この方法は、インビボでモルホーゲンの産生を増加または減少させそれによって病的状態を修正することができる、ヒトに使用するための薬剤として有望な化合物を同定するために用いることができる。

関連する局面において、本発明は、組織の細胞が特定のモルホーゲンを産生するか否か、またはどの程度産生するかを調べ、それによって当該モルホーゲンが由来する組織を決定するために臓器の組織をスクリーニングする方法を開示する。これは、スクリーニングに

10

20

30

40

50

用いられる組織細胞型の選別を可能にする。本明細書中で用いられているように、“組織”とは自然の状態で連携している細胞群を指し、臓器を含む。

他の組織型によって産生されるレベルと比較して高レベルのモルホーゲンを産生する組織または臓器の例としては、OP-1（骨組織で最初に発見された）は比較的高レベルで腎臓組織（例えば腎または膀胱）または副腎組織に由来する細胞で産生され、GDF-1は神経（例えば脳組織）に由来する細胞で比較的高いレベルで産生され、DPPは以下のショウジョウバエ組織（背側外胚葉、上皮性成虫板（epithelial imaginal disc）、臓側中胚葉（visceral mesoderm）または消化管内皮（gut endoderm））の1つに由来する細胞で比較的高いレベルで産生され、Vgr-1はマウス肺組織に由来する細胞で比較的高いレベルで産生され、Vglはツメガエル（*xenopus*）胎児内皮組織に由来する細胞で比較的高いレベルで産生されることが発見された。

10

さらに、BMP3およびCBMP2B転写物は肺組織で大量に確認された。本明細書中で用いられているように、“由来する”とは当該細胞が培養組織自体であるか、またはその親細胞が組織自体である細胞株を意味している。

培養細胞におけるモルホーゲンレベルまたはその変化を決定するための好ましい方法は、モルホーゲンに特異的な抗体を例えば免疫アッセイ（例えばELISAまたは放射性免疫アッセイ）で使用し、さらに、厳格な条件下（例えばRNAドットプロットアッセイ）でモルホーゲンRNAとハイブリダイズする核酸プローブを用いてモルホーゲンをコードする核酸（最も好ましくはmRNA）のレベルを決定することを含む。モルホーゲンの存在および／または濃度の変化が認められた場合、候補化合物の存在下および非存在下でのモルホーゲンレベルを測定および比較する必要があるだろう。核酸プローブはモルホーゲンをコードするヌクレオチド配列、または特異的モルホーゲンをコードするRNAとのみ厳格な条件下で特異的にハイブリダイズするために十分な長さを有するフラグメントが可能である。本明細書中で用いられているように、“厳格な条件”とは、非特異的なハイブリッドは溶出されるが、特異的なハイブリッドは維持されるような条件と定義される。すなわち、0.1×SSC（15mMのNaCl、5mMのクエン酸ナトリウム）で50°C 15分インキュベーションするものである。

20

本発明にしたがってそのレベルが決定できるモルホーゲンの例はOP-1、OP-2、GDF-1、Vgr-1、DPP、60A CBMP2A、CBMP2B、BMP 2、3、4、5、6またはVglである。したがって、モルホーゲンの存在および／または濃度を示すために免疫アッセイを用いる場合は、これらのモルホーゲンの1つにのみ特異的で他のモルホーゲンの存在を検出しない抗体が用いられるであろう。同様に、モルホーゲンをコードするRNAレベルを示すために核酸ハイブリダイゼーションが用いられる場合は、これらモルホーゲンの1つにのみ特異的なヌクレオチドプローブが、当該プローブが異なるモルホーゲンをコードするRNAとハイブリダイズすることができないようなハイブリダイゼーション条件の下で用いられるであろう。モルホーゲンは活性なC-末端コア領域（これは少なくとも6個のシステイン残基を含む）および、当該C-末端領域に対するN-末端領域（これは他のモルホーゲンの対応するN-末端領域と比較的相同性がない）を含む。さらに、mRNAの3'非コード領域は各モルホーゲンにとって特有である。したがって、モルホーゲンのC-末端コア領域に対するN-末端配列の全部もしくは部分をコードするか、またはモルホーゲンのコア領域に対するC-末端配列の全部もしくは部分、または3'領域をコードする核酸プローブが、そのモルホーゲンのみをコードするmRNAを検出するプローブとして用いることができる。

30

40

“形態形成誘導蛋白”または“モルホーゲン”とは、本発明書中で用いられているように、骨形成の段階的発育を誘導できる天然に生じる骨形成原蛋白の他に、通常では骨もしくは骨形成に関連しないが骨形成原蛋白と相同な実体的配列を共有するポリペプチド鎖を含む。そのような蛋白は、それらをコードするDNA配列同様、多数の異なる種について分離され特性を調べられている。例えば以下を参照；米国特許第4968590号および第5011691号、米国特許出願第1989;422699号（1989年10月17日出願）、同600024号および同599543号（共に1990年10月18日出願）、Sampathら、（1990）J.Biol.Chem.265:13198-13205、Ozk

50

aynakら, (1990) *EMBO J.* 9:2085-2093、Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:4250-4254 (1991))。これらはすべて参考文献として本明細書中に含まれている。その後これらの蛋白の多くは骨形態形成の他に有用性を有することが発見された。例えばUSSN第667274号(1991年3月11日出願)を参照。モルホーゲンのこれら成熟形は実質的なアミノ酸配列の相同性を、特にこれら蛋白のC-末端コア領域において共有する。特に当該蛋白の殆どはこの領域に他の外見上必要なアミノ酸の他に7個のシステイン骨格を共有する。下記の表IIは、9個のモルホーゲンについて、カルボキシ末端の102個のアミノ酸におけるアミノ酸配列の相同性を示している。

本発明において有用なモルホーゲンの中には骨形成原蛋白として最初に同定された蛋白(例えばOP-1, OP-2 およびCBMP2)が、アミノ酸配列に相関性がある蛋白、例えばDPP(ショウジョウバエ由来)、Vgl(ツメガエル由来)、Vgr-1(マウス由来、Lee (1991) *PNAS* 88:4250-4254を参照)(これらはすべて表IIおよび配列番号5-14に示されている)および最近同定された60A蛋白(ショウジョウバエ由来、配列番号24、Whartonら, (1991) *PNAS* 88:9214-9218参照)同様含まれる。この種類に属する仲間(これらはTGF- β スーパーファミリーの蛋白の仲間を含む)は、それらのC-末端領域において実質的なアミノ酸配列の相同性を共有する。これらの蛋白質は、N-末端シグナルペプチド配列を有する前駆体として翻訳される。シグナルペプチド配列は典型的にはおよそ30残基未満で、切断されて成熟配列を生じる“プロ”ドメインがその後続く。このシグナルペプチドは翻訳に際して、Von Heijne ((1986) *Nucleic Acids Research* 14:4683-4691)の方法を用いれば与えられた配列において予想可能な切断部位で迅速に切断される。下記の表Iは今日までに同定された種々のモルホーゲンを示しているが、本明細書で用いられている命名法、それらの配列番号、および完全な長さの蛋白のアミノ酸配列についての文献(文献リストに含まれていないもの)も記載されている。これらの文献の内容は、本明細書中に含まれている。

表 I

“OP-1”は、属性的にはOP-1蛋白をコードするDNA配列の一部分または全部から発現される形態形成誘導活性を有する蛋白群を指し、その対立形質および種変異体、例えばヒトOP-1 (“hOP-1”、配列番号5、成熟蛋白アミノ酸配列)、マウスOP-1 (“mOP-1”、配列番号6、成熟蛋白アミノ酸配列)を含む。7個の保存システイン骨格は、配列番号5および6の残基38から139に特定される。CDNA配列および完全な長さの蛋白をコードするアミノ酸は、配列番号16および17(hOP1)および配列番号18および19(mOP1)で提供される。成熟蛋白は残基293-431(hOP1)および292-430(mOP1)に特定される。この蛋白の“プロ”領域(形態形成原活性を有する成熟蛋白を生じるために切断される)は、本質的には残基30-292(hOP1)および残基30-291(mOP1)に特定される。

“OP-2”は、属性的にはOP-2蛋白をコードするDNA配列の一部分または全部から発現される活性を有する蛋白群を指し、その対立形質および種変異体、例えばヒトOP-2 (“hOP-2”、配列番号7、成熟蛋白アミノ酸配列)、マウスOP-2 (“mOP-2”、配列番号8、成熟蛋白アミノ酸配列)を含む。7個の保存システイン骨格は、配列番号7および8の残基38から139に特定される。cDNA配列および完全な長さの蛋白をコードするアミノ酸は、配列番号20および21(hOP2)および配列番号22および23(mOP2)で提供される。成熟蛋白は残基264-402(hOP2)および261-399(mOP2)に特定される。形態形成原活性を有する成熟蛋白を生じるために同様に切断されるこの蛋白の“プロ”領域は、実質的には残基18-263(hOP2)および残基18-260(mOP2)に特定される。(別の切断部位は両OP-2蛋白について21残基上流で生じる。)

“CBMP2”は、属性的にはCBMP2蛋白をコードするDNA配列の一部分または全部から発現される活性を有する蛋白群を指し、その対立形質および種変異体、例えばヒトCBMP2A (“CBMP2A (fx) ”、配列番号9)またはヒトCBMP2B DNA (“CBMP2A (fx) ”、配列番号10)を含む。文献ではBMP2AおよびBMP2B、またはBMP2およびBMP4と呼ばれる、完全な長さの蛋白のアミノ酸配列はウォツニーらの文献(Wozneyら、(1988) *Science* 242:1528-1534)に記載されている。BMP2 (BMP2A) についてのプロドメインは同様に残基25-248または25

10

20

30

40

50

ー282を含み、成熟蛋白は残基249ー396または283ー396を含む。BMP4 (BMP2B) についてのプロドメインは同様に残基25ー256または25ー292を、成熟蛋白は残基257ー408または293ー408を含む。

“DPP (fx)” はショウジョウバエのDPP遺伝子によってコードされる蛋白配列を指し、保存された7個のシステイン骨格を明確に示している (配列番号11)。完全な長さの蛋白についてのアミノ酸配列はパジェットらの文献 (Padgettら、(1987) *Nature* 325:81ー84) に記載されている。プロドメインは同様にシグナルペプチド切断部位から残基456にわたり、成熟蛋白は同様に残基457ー588によって特定される。

“Vgl (fx)” はツメガエルのVgl遺伝子によってコードされる蛋白配列を指し、保存された7個のシステイン骨格を明確に示している (配列番号12)。完全な長さの蛋白についてのアミノ酸配列はウィークスの文献 (Weeks (1987) *Cell* 51:861ー867) に記載されている。プロドメインは同様にシグナルペプチド切断部位から残基246にわたり、成熟蛋白は同様に残基247ー360によって特定される。

“Vgr-1 (fx)” はマウスVgr-1 遺伝子によってコードされる蛋白配列を指し、保存された7個のシステイン骨格を明白に示している (配列番号13)。完全な長さの蛋白についてのアミノ酸配列はリヨンらの文献 (Lyonsら、(1989) *PNAS* 86:4554ー4558) に記載されている。プロドメインは同様にシグナルペプチド切断部位から残基299にわたり、成熟蛋白は同様に残基300ー438によって特定される。

“GDF-1 (fx)” はヒトGDF-1 遺伝子によってコードされる蛋白配列を指し、保存された7個のシステイン骨格を明確に示している (配列番号14)。cDNAおよび完全な長さの蛋白のコードされたアミノ酸配列は配列番号32に提示される。プロドメインは同様にシグナルペプチド切断部位から残基214にわたり、成熟蛋白は同様に残基215ー372によって特定される。

“60A” は、属性的には60A蛋白 (配列番号24を参照、そこではcDNAおよび完全な長さの蛋白のためにコードされたアミノ酸配列が提供されている) をコードするDNA配列 (ショウジョウバエ60A遺伝子由来) の一部分または全部から発現される形態形成誘導活性を有する蛋白を指す。60A (fx) は、保存された7個のシステイン骨格を明確に示す蛋白配列 (配列番号24の残基354から455) を指す。プロドメインは同様にシグナルペプチド切断部位から残基324にわたり、成熟蛋白は同様に残基325ー455によって特定される。“BMP3 (fx)” はヒトBMP3遺伝子によってコードされる蛋白配列を指し、保存された7個のシステイン骨格を明確に示している (配列番号26)。完全な長さの蛋白のためのアミノ酸配列はウォツニーらの文献 (Wozneyら、(1988) *Science* 242:1528ー1534) に記載されている。プロドメインは同様にシグナルペプチド切断部位から残基290にわたり、成熟蛋白は同様に残基291ー472によって特定される。

“BMP5 (fx)” はヒトBMP5遺伝子によってコードされる蛋白配列を指し、保存された7個のシステイン骨格を明確に示している (配列番号27)。完全な長さの蛋白のためのアミノ酸配列はセレステらの文献 (Celesteら、(1990) *PNAS* 87:9843ー5847) に記載されている。プロドメインは同様にシグナルペプチド切断部位から残基316にわたり、成熟蛋白は同様に残基317ー454によって特定される。

“BMP6 (fx)” はヒトBMP6遺伝子によってコードされる蛋白配列を指し、保存された7個のシステイン骨格を明確に示している (配列番号28)。完全な長さの蛋白のためのアミノ酸配列はセレステらの文献 (Celesteら、(1991) *PNAS* 87:9843ー9847) に記載されている。プロドメインは同様にシグナルペプチド切断部位から残基374にわたり、成熟蛋白は同様に残基375ー513によって特定される。

このOP-2 蛋白は、この種類の他の蛋白に共通の保存されたシステイン骨格に加え、さらに付加されたシステイン残基をこの領域に有する (例えば配列番号7および8を参照)。GDF-1 蛋白は保存骨格内に4個のアミノ酸挿入物を有するが (配列番号14の残基44ー47)、同様にこの挿入物は折り畳まれた構造のシステインの関係に影響を与えない。さらに、CBMP2蛋白はシステイン骨格内で1個のアミノ酸残基を失っている。

モルホーゲンは還元されたときは不活性であるが、酸化された同種二量体として、さらに

10

20

30

40

50

本発明の他のモルホーゲンと組み合わせて酸化されたとき活性を有する。したがって、本明細書で定義されたように、モルホーゲンは1対のポリペプチド鎖を含む二量体蛋白で、このとき各ポリペプチド鎖は、配列番号5の残基43-139によって範囲を特定される少なくとも6個のC-末端システイン骨格を含むが、これにはこれらシステインの機能等価配置（例えば、当該配列中のシステインの直線的配置を変化させるが、その折り畳み構造における関係は変化させないアミノ酸の挿入または欠失）、例えばポリペプチド鎖が折り畳まれる場合、ポリペプチド鎖対を含む当該二量体蛋白種が適切な三次元構造を有するようなもの（その蛋白が本明細書で定義されたモルホーゲンとして作用することができるような適切な鎖内および鎖間ジスルフィド結合を含む）を含む。特に、モルホーゲンは、形態形成誘導を許容する環境下で一般に以下のように生物学的に機能することができる：前駆細胞の増殖を刺激し；前駆細胞の分化を刺激し；形質転換細胞の再脱分化を含む分化細胞の成熟および維持を支援する。さらに、モルホーゲンは、適切な環境条件下で拘束された細胞の再脱分化を誘発することもできると期待されている。

本発明で有用なモルホーゲンは2種の一般アミノ酸配列（一般配列1（配列番号1）または一般配列2（配列番号2））の1つを含むが、この場合各Xaaは20個の天然のL-異性体、 α -アミノ酸またはその誘導体の1つを指す。一般配列1は保存された6個のシステイン骨格を含み、一般配列2は6個の保存システイン骨格およびOP-2で確認された付加的システインを含む（配列番号2の残基36を参照）。別の好ましい局面では、これらの配列はさらに以下の付加配列をそのN-末端に含んでいる：

C y s X a a X a a X a a X a a （配列番号15）

1

5

前出の一般配列内の好ましいアミノ酸配列には以下のものが含まれる：一般配列3（配列番号3）、一般配列4（配列番号4）、一般配列5（配列番号30）および一般配列6（配列番号31）（下記に一覧）。これらの一般配列は、表IIで確認されるこのモルホーゲン類の種々の好ましい仲間に通じる共通性を、アミノ酸配列の変動同様有している。特に一般配列3および4は、表IIに提示され、配列番号5-14として確認される以下の蛋白の合成アミノ酸配列である：ヒトOP-1（hOP-1, 配列番号5および16-17）、マウスOP-1（mOP-1, 配列番号6および18-19）、ヒトおよびマウスOP-2（配列番号7,8, および20-22）、CBMP2A（配列番号9）、CBMP2B（配列番号10）、DPP（ショウジョウバエ由来、配列番号11）、Vgl（ツメガエル由来、配列番号12）、Vgr-1（マウス由来、配列番号13）GDF1（マウス由来、配列番号14）。この一般配列は、配列内の種々の部位について変更可能な残基同様、表IIの配列に通じる共通のアミノ酸の同一性を含んでいる。これら一般配列は、一般配列3または4においてそれぞれ41位または46位にシステイン付加を許容し、分子間または分子内ジスルフィド結合を形成することができる適切なシステイン骨格を提供すること、および蛋白の三次元構造に影響を与える特定の重要なアミノ酸を含んでいるということに留意すべきである。

10

20

30

一般配列 3

Leu Tyr Val Xaa Phe	
1 5	
Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa	
10	
Xaa Ala Pro Xaa Gly Xaa Xaa Ala	10
15 20	
Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa	
25 30	
Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	
35	
Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa	20
40 45	
Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	
50	
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys	
55 60	
Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	30
65	
Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa	
70 75	
Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa	
80	
Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa	
85 90	40
Xaa Cys Gly Cys Xaa	
95	

ここで、各Xaaは以下のように規定される1個または2個以上の特定のアミノ酸の群からそれぞれ別個に選ばれる：残基4のXaa=(Ser、AspまたはGlu)；残基6のXaa=(Arg、Gln、SerまたはLys)；残基7のXaa=(AspまたはGlu)；残基8のXaa=(LeuまたはVal)；残基11のXaa=(Gln、Leu、Asp、HisまたはAsn)；残基12のXaa=(Asp、ArgまたはAsn)；残基14のXaa=(IleまたはVal)；残基15のXaa=(IleまたはVal)；残基18のXaa=(Glu、Gln、Leu、Lys、ProまたはArg)；残基20のXaa=(TyrまたはPhe)；残基21のX

aa= (Ala、Ser、Asp、Met、His、LeuまたはGln) ; 残基23のXaa= (Tyr、AsnまたはPhe) ; 残基26のXaa= (Glu、His、Tyr、AspまたはGln) ; 残基28のXaa= (Glu、Lys、AspまたはGln) ; 残基30のXaa= (Ala、Ser、ProまたはGln) ; 残基31のXaa= (Phe、LeuまたはTyr) ; 残基33のXaa= (LeuまたはVal) ; 残基34のXaa= (Asn、Asp、AlaまたはThr) ; 残基35のXaa= (Ser、Asp、Glu、LeuまたはAla) ; 残基36のXaa= (Tyr、Cys、His、SerまたはIle) ; 残基37のXaa= (Met、Phe、GlyまたはLeu) ; 残基38のXaa= (AsnまたはSer) ; 残基39のXaa= (Ala、SerまたはGly) ; 残基40のXaa= (Thr、LeuまたはSer) ; 残基44のXaa= (IleまたはVal) ; 残基45のXaa= (ValまたはLeu) ; 残基46のXaa= (GlnまたはArg) ; 残基47のXaa= (Thr、AlaまたはSer) ; 残基49のXaa= (ValまたはMet) ; 残基50のXaa= (HisまたはAsn) ; 残基51のXaa= (Phe、Leu、Asn、Ser、AlaまたはVal) ; 10
残基52のXaa= (Ile、Met、Asn、AlaまたはVal) ; 残基53のXaa= (Asn、Lys、AlaまたはGlu) ; 残基54のXaa= (ProまたはSer) ; 残基55のXaa= (Glu、Asp、AsnまたはGly) ; 残基56のXaa= (Thr、Ala、Val、Lys、Asp、Tyr、SerまたはAla) ; 残基57のXaa= (Val、AlaまたはIle) ; 残基58のXaa= (ProまたはAsp) ; 残基59のXaa= (LysまたはLeu) ; 残基60のXaa= (ProまたはAla) ; 残基63のXaa= (AlaまたはVal) ; 残基65のXaa= (ThrまたはAla) ; 残基66のXaa= (Gln、Lys、ArgまたはGlu) ; 残基67のXaa= (Leu、MetまたはVal) ; 残基68のXaa= (Asn、SerまたはAsp) ; 残基69のXaa= (Ala、ProまたはSer) ; 残基70のXaa= (Ile、ThrまたはVal) ; 残基71のXaa= (SerまたはAla) ; 残基72のXaa= (ValまたはMet) ; 残基74のXaa= (TyrまたはPhe) ; 残基75のXaa= (Phe、TyrまたはLeu) ; 残基76のXaa= (AspまたはAsn) ; 残基77のXaa= (Asp、Glu、AsnまたはSer) 20
; 残基78のXaa= (Ser、Gln、AsnまたはTyr) ; 残基79のXaa= (Ser、Asn、AspまたはGlu) ; 残基80のXaa= (Asn、ThrまたはLys) ; 残基82のXaa= (IleまたはVal) ; 残基84のXaa= (LysまたはArg) ; 残基85のXaa= (Lys、Asn、GlnまたはHis) ; 残基86のXaa= (TyrまたはHis) ; 残基87のXaa= (Arg、GlnまたはGlu) ; 残基88のXaa= (Asn、GluまたはAsp) ; 残基90のXaa= (Val、ThrまたはAla) ; 残基92のXaa= (Arg、Lys、Val、AspまたはGlu) ; 残基93のXaa= (Ala、GlyまたはGlu) ; 残基97のXaa= (HisまたはArg) 。

一般配列 4

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Tyr Val Xaa Phe
 1 5 10
 Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa
 15
 Xaa Ala Pro Xaa Gly Xaa Xaa Ala
 20 25
 Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
 30 35
 Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 40
 Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa
 45 50
 Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 55
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 60 65
 Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 70
 Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 75 80
 Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
 85
 Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa
 90 95

10

20

ここで、各Xaaは以下のように規定される1個または2個以上の特定のアミノ酸の群からそれぞれ別個に選ばれる：残基2のXaa=(LysまたはArg)；残基3のXaa=(LysまたはArg)；残基4のXaa=(HisまたはArg)；残基5のXaa=(Glu、Ser、His、Gly、ArgまたはPro)；残基9のXaa=(Ser、AspまたはGlu)；残基11のXaa=(Arg、Gln、SerまたはLys)；残基12のXaa=(AspまたはGlu)；残基13のXaa=(LeuまたはVal)；残基16のXaa=(Gln、Leu、Asp、HisまたはAsn)；残基17のXaa=(Asp、ArgまたはAsn)；残基19のXaa=(IleまたはVal)；残基20のXaa=(IleまたはVal)；残基23のXaa=(Glu、Gln、Leu、Lys、ProまたはArg)；残基25のXaa=(TyrまたはPhe)；残基26のXaa=(Ala、Ser、Asp、Met、His、LeuまたはGln)；残基28のXaa=(Tyr、AsnまたはPhe)；残基31のXaa=(Glu、His、Tyr、AspまたはGln)；残基33のXaa=(Glu、Lys、AspまたはGln)；残基35のXaa=(Ala、SerまたはPro)；残基36のXaa=(Phe、LeuまたはTyr)；残基38のXaa=(LeuまたはVal)；残基39のXaa=(Asn、Asp、AlaまたはThr)；残基40のXaa=(Ser、Asp、Glu、LeuまたはAla)；残基41のXaa=(Tyr、Cys、His、SerまたはIle)；残基42のXaa=(Met、Phe、GlyまたはLeu)；残基44のXaa=(Ala、SerまたはGly)；残基45のXaa=(Thr、LeuまたはSer)；残基49のXaa=(IleまたはVal)；残基50のXaa=(ValまたはLeu)；残基51のXaa=(GlnまたはArg)；残基52のXaa=(Thr、AlaまたはSer)；残基54のXaa=(ValまたはMet)；残基55のXaa=(HisまたはAsn)；残基56のXaa=(Phe、Leu、Asn、Ser、AlaまたはVal)；残基57のXaa=(Ile、Met、Asn、AlaまたはVal)；残基58のXaa=(Asn、Lys、AlaまたはGlu)；残基59のXaa=(ProまたはSer)；残基60のXaa=(Glu、AspまたはGly)；残基61のXaa=(Thr、Ala、Val、Lys、Asp、Tyr、SerまたはAla)；残基62のXaa=(Val、AlaまたはIle)；残基63のXaa=(ProまたはAsp)；残基64のXaa=(LysまたはLeu)；残基65のXaa=(ProまたはAla)；残基68のXaa=(AlaまたはVal)；残基70のXaa=(ThrまたはAla)；残基71のXaa=(Gln、Lys、ArgまたはGlu)；残基72のXaa=(Leu、MetまたはVal)；残基73のXaa=(Asn、SerまたはAsp)；残基74のXaa

30

40

50

= (Ala、ProまたはSer) ; 残基75のXaa= (Ile、ThrまたはVal) ; 残基76のXaa= (SerまたはAla) ; 残基77のXaa= (ValまたはMet) ; 残基79のXaa= (TyrまたはPhe) ; 残基80のXaa= (Phe、TyrまたはLeu) ; 残基81のXaa= (ASPまたはAsn) ; 残基82のXaa= (Asp、Glu、AsnまたはSer) ; 残基83のXaa= (Ser、Gln、AsnまたはTyr) ; 残基84のXaa= (Ser、Asn、AspまたはGlu) ; 残基85のXaa= (Asn、ThrまたはLys) ; 残基87のXaa= (IleまたはVal) ; 残基89のXaa= (LysまたはArg) ; 残基90のXaa= (Lys、Asn、GlnまたはHis) ; 残基91のXaa= (TyrまたはHis) ; 残基92のXaa= (Arg、GlnまたはGlu) ; 残基93のXaa= (Asn、GluまたはAsp) ; 残基95のXaa= (Val、ThrまたはAla) ; 残基97のXaa= (Arg、Lys、Val、AspまたはGlu) ; 残基98のXaa= (Ala、GlyまたはGlu) ; 残基102のXaa= (HisまたはArg) 。

10

同様に一般配列 5 (配列番号30) および一般配列 6 (配列番号31) は、表IIに示す全てのモルホーゲン蛋白類の仲間に共通の相同性を有する。特に、一般配列 5 および 6 は、ヒトOP-1 (hOP-1、配列番号 5 および16-17)、マウスOP-1 (mOP-1、配列番号 6 および18-19)、ヒトおよびマウスOP-2 (配列番号7,8および20-22)、CBMP2A (配列番号 9)、CBMP2B (配列番号10)、DPP (ショウジョウバエ由来、配列番号11)、Vgl (ツメガエル由来、配列番号12)、Vgr-1 (マウス由来、配列番号13)、およびGDF-1 (マウス由来、配列番号14)、ヒトBMP3 (配列番号26)、ヒトBMP5 (配列番号27)、ヒトBMP6 (配列番号28)、および60 (A) (ショウジョウバエ由来、配列番号24-25) の合成アミノ酸配列である。この一般配列は、6 および 7 個のシステイン骨格によって範囲が特定される (それぞれ一般配列 5 および 6) C-末端ドメインのこれらの配列によって共有されるアミノ酸配列の同一性と当該配列内の種々の部位のまた別の残基の両方を含んでいる。一般配列 3 および 4 のように一般配列 5 および 6 は、41位 (一般配列 5) または46位 (一般配列 6) にシステインの付加を許すが、これは分子内または分子間ジスルフィド結合が形成される適切なシステイン骨格を提供し、さらに当該蛋白の三次元構造に影響を与える特定の重要なアミノ酸を含む。

20

一般配列 5

Leu Xaa Xaa Xaa Phe

1

5

Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa

10

Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Ala

15

20

10

Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa

25

30

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

35

Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa

40

45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20

50

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys

55

60

Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

65

Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa

70

75

30

Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa

80

Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa

85

90

Xaa Cys Xaa Cys Xaa

95

40

Xaa Cys Gly Cys Xaa

100

ここで、各Xaaは下記のように規定される1個または2個以上の特定のアミノ酸の群からそれぞれ別個に選ばれる：残基2のXaa=(TyrまたはLys)；残基3のXaa=(ValまたはIle)；残基4のXaa=(Ser、AspまたはGlu)；残基6のXaa=(Arg、Gln、Ser、LysまたはAla)；残基7のXaa=(Asp、GluまたはLys)；残基8のXaa=(Leu、ValまたはIle)；残基11のXaa=(Gln、Leu、Asp、His、AsnまたはSer)；残基12のXaa=(Asp、Arg、AsnまたはGlu)；残基14のXaa=(IleまたはVal)；残基15のXaa=(IleまたはVal)；残基16のXaa=(AlaまたはSer)；残基18のXaa=(Glu、Gln、Leu、Lys、ProまたはArg)；残基19のXaa=(GlyまたはSer)；残基20のXaa=(TyrまたはPhe)；残基21のXaa=(Ala、

50

Ser、Asp、Met、His、Gln、LeuまたはGly) ; 残基23のXaa= (Tyr、AsnまたはPhe) ; 残基26のXaa= (Glu、His、Tyr、Asp、GlnまたはSer) ; 残基28のXaa= (Glu、Lys、Asp、GlnまたはAla) ; 残基30のXaa= (Ala、Ser、Pro、GlnまたはAsn) ; 残基31のXaa= (Phe、LeuまたはTyr) ; 残基33のXaa= (Leu、ValまたはMet) ; 残基34のXaa= (Asn、Asp、Ala、ThrまたはPro) ; 残基35のXaa= (Ser、Asp、Glu、Leu、AlaまたはLys) ; 残基36のXaa= (Tyr、Cys、His、SerまたはIle) ; 残基37のXaa= (Met、Phe、GlyまたはLeu) ; 残基38のXaa= (Asn、SerまたはLys) ; 残基39のXaa= (Ala、Ser、GlyまたはPro) ; 残基40のXaa= (Thr、LeuまたはSer) ; 残基44のXaa= (Ile、ValまたはThr) ; 残基45のXaa= (Val、LeuまたはIle) ; 残基46のXaa= (GlnまたはArg) ; 残基47のXaa= (Thr、AlaまたはSer) ; 残基48のXaa= (LeuまたはIle) ; 残基49のXaa= (ValまたはMet) ; 残基50のXaa= (His、AsnまたはArg) ; 残基51のXaa= (Phe、Leu、Asn、Ser、AlaまたはVal) ; 残基52のXaa= (Ile、Met、Asn、Ala、ValまたはLeu) ; 残基53のXaa= (Asn、Lys、Ala、Glu、GlyまたはPhe) ; 残基54のXaa= (Pro、SerまたはVal) ; 残基55のXaa= (Glu、Asp、Asn、Gly、ValまたはLys) ; 残基56のXaa= (Thr、Ala、Val、Lys、Asp、Tyr、Ser、Ala、ProまたはHis) ; 残基57のXaa= (Val、AlaまたはIle) ; 残基58のXaa= (ProまたはAsp) ; 残基59のXaa= (Lys、LeuまたはGlu) ; 残基60のXaa= (ProまたはAla) ; 残基63のXaa= (AlaまたはVal) ; 残基65のXaa= (Thr、AlaまたはGlu) ; 残基66のXaa= (Gln、Lys、ArgまたはGlu) ; 残基67のXaa= (Leu、MetまたはVal) ; 残基68のXaa= (Asn、Ser、AspまたはGly) ; 残基69のXaa= (Ala、ProまたはSer) ; 残基70のXaa= (Ile、Thr、ValまたはLeu) ; 残基71のXaa= (Ser、AlaまたはPro) ; 残基72のXaa= (Val、MetまたはIle) ; 残基74のXaa= (TyrまたはPhe) ; 残基75のXaa= (Phe、Tyr、LeuまたはHis) ; 残基76のXaa= (Asp、AsnまたはLeu) ; 残基77のXaa= (Asp、Glu、AsnまたはSer) ; 残基78のXaa= (Ser、Gln、Asn、TyrまたはAsp) ; 残基79のXaa= (Ser、Asn、Asp、GluまたはLys) ; 残基80のXaa= (Asn、ThrまたはLys) ; 残基82のXaa= (Ile、ValまたはAsn) ; 残基84のXaa= (LysまたはArg) ; 残基85のXaa= (Lys、Asn、Gln、HisまたはVal) ; 残基86のXaa= (TyrまたはHis) ; 残基87のXaa= (Arg、Gln、GluまたはPro) ; 残基88のXaa= (Asn、GluまたはAsp) ; 残基90のXaa= (Val、Thr、AlaまたはIle) ; 残基92のXaa= (Arg、Lys、Val、AspまたはGlu) ; 残基93のXaa= (Ala、Gly、GluまたはSer) ; 残基95のXaa= (GlyまたはAla) ; 残基97のXaa= (HisまたはArg) 。

一般配列 6

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Phe
 1 5 10

Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa
 15

Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
 20 25

Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
 30 35

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 40

Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa
 45 50

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 55

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 60 65

Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 70

Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
 85

Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa
 90 95

Xaa Cys Xaa Cys Xaa
 100

ここで各Xaaは下記のように規定される1個または2個以上の特定のアミノ酸の群からそれぞれ別個に選ばれる：残基2のXaa=(Lys、Arg、AlaまたはGln)；残基3のXaa=(Lys、ArgまたはMet)；残基4のXaa=(His、ArgまたはGln)；残基5のXaa=(Glu、Ser、His、Gly、Arg、Pro、ThrまたはTyr)；残基7のXaa=(TyrまたはLys)；残基8のXaa=(ValまたはIle)；残基9のXaa=(Ser、AspまたはGlu)；残基11のXaa=(Arg、Gln、Ser、LysまたはAla)；残基12のXaa=(Asp、GluまたはLys)；残基13のXaa=(Leu、ValまたはIle)；残基16のXaa=(Gln、Leu、Asp、His、AsnまたはSer)；残基17のXaa=(Asp、Arg、AsnまたはGlu)；残基19のXaa=(IleまたはVal)；残基20のXaa=(IleまたはVal)；残基21のXaa=(AlaまたはSer)；残基23のXaa=(Glu、Gln、Leu、Lys、ProまたはArg)；残基24のXaa=(GlyまたはSer)；残基25のXaa=(TyrまたはPhe)；残基26のXaa=(Ala、Ser、Asp、Met、His、Gln、LeuまたはGly)；残基28のXaa=(Tyr、AsnまたはPhe)；残基31のXaa=(Glu、His、Tyr、Asp、GlnまたはSer)；残基33のXaa=(Glu、Lys、Asp、GlnまたはAla)；残基35のXaa=(Ala、Ser、Pro、GlnまたはAsn)；残基36のXaa=(Phe、LeuまたはTyr)；残基38のXaa=(Leu、ValまたはMet)；残基39のXaa=(Asn、Asp、Ala、ThrまたはPro)；残基40のXaa=(Ser、Asp、Glu、Leu、AlaまたはLys)

10

20

30

40

50

；残基41のXaa＝（Tyr、Cys、His、SerまたはIle）；残基42のXaa＝（Met、Phe、GlyまたはLeu）；残基43のXaa＝（Asn、SerまたはLys）；残基44のXaa＝（Ala、Ser、GlyまたはPro）；残基45のXaa＝（Thr、LeuまたはSer）；残基49のXaa＝（Ile、ValまたはThr）；残基50のXaa＝（Val、LeuまたはIle）；残基51のXaa＝（GlnまたはArg）；残基52のXaa＝（Thr、AlaまたはSer）；残基53のXaa＝（LeuまたはIle）；残基54のXaa＝（ValまたはMet）；残基55のXaa＝（His、AsnまたはArg）；残基56のXaa＝（Phe、Leu、Asn、Ser、AlaまたはVal）；残基57のXaa＝（Ile、Met、Asn、Ala、ValまたはLeu）；残基58のXaa＝（Asn、Lys、Ala、Glu、GlyまたはPhe）；残基59のXaa＝（Pro、SerまたはVal）；残基60のXaa＝（Glu、Asp、Gly、ValまたはLys）；残基61のXaa＝（Thr、Ala、Val、Lys、Asp、Tyr、Ser、Ala、ProまたはHis）；残基62のXaa＝（Val、AlaまたはIle）；残基63のXaa＝（ProまたはAsp）；残基64のXaa＝（Lys、LeuまたはGlu）；残基65のXaa＝（ProまたはAla）；残基68のXaa＝（AlaまたはVal）；残基70のXaa＝（Thr、AlaまたはGlu）；残基71のXaa＝（Gln、Lys、ArgまたはGlu）；残基72のXaa＝（Leu、MetまたはVal）；残基73のXaa＝（Asn、Ser、AspまたはGly）；残基74のXaa＝（Ala、ProまたはSer）；残基75のXaa＝（Ile、Thr、ValまたはLeu）；残基76のXaa＝（Ser、AlaまたはPro）；残基77のXaa＝（Val、MetまたはIle）；残基79のXaa＝（TyrまたはPhe）；残基80のXaa＝（Phe、Tyr、LeuまたはHis）；残基81のXaa＝（Asp、AsnまたはLeu）；残基82のXaa＝（Asp、Glu、AsnまたはSer）；残基83のXaa＝（Ser、Gln、Asn、TyrまたはAsp）；残基84のXaa＝（Ser、Asn、Asp、GluまたはLys）；残基85のXaa＝（Asn、ThrまたはLys）；残基87のXaa＝（Ile、ValまたはAsn）；残基89のXaa＝（LysまたはArg）；残基90のXaa＝（Lys、Asn、Gln、HisまたはVal）；残基91のXaa＝（TyrまたはHis）；残基92のXaa＝（Arg、Gln、GluまたはPro）；残基93のXaa＝（Asn、GluまたはAsp）；残基95のXaa＝（Val、Thr、AlaまたはIle）；残基97のXaa＝（Arg、Lys、Val、AspまたはGlu）；残基98のXaa＝（Ala、Gly、GluまたはSer）；残基100のXaa＝（GlyまたはAla）；残基102のXaa＝（HisまたはArg）。

本発明のモルホーゲンとして使用できる特に有用な配列は、C-末端、例えばVgl、Vgr-1、DPP、OP-1、OP-2、CBMP-2A、CBMP-2B、GDF-1のC-末端の96-102アミノ酸残基（下記の表IIおよび配列番号5-14参照）を、60A、BMP3、BMP5およびBMP6のC-末端ドメイン（配列番号24-28参照）同様含んでおり、これらはすべて少なくとも6個または7個の保存されたシステイン骨格を含んでいる。さらに、一般配列（例えばCOP-1、3-5、7、16:米国特許第5011691号参照）からデザインされた生合成構造もまた有用である。他の配列はインヒビン／アクチビン蛋白（例えば米国特許第4968590号および5011691号参照）を含む。したがって、その他の有用な配列は、上記配列のいずれかと少なくとも70%のアミノ酸配列相同性または“相似性”を、好ましくは80%の相同性または類似性を共有するものである。これら是对立形質、変種および変異体並びに生合成変種を、このモルホーゲン蛋白類の新規な仲間同様含むと期待される。関連蛋白類の中で特に考えられるのは、形態形成誘導活性を示す蛋白で、この場合好ましい配列とのアミノ酸の違いは、保存的变化（例えばデイオフら（Dayhoffら、Atlas of Protein Sequence and Structure（蛋白配列および構造図録）第5巻、付録3、345-362ページ、M.O.Dayhoff編、Nat'l BioMed.Research Fdn社刊、ワシントンD.C.1978）によって定義されたようなもの）を含む。本明細書で用いられているように、潜在的に有用な配列は、ニードルマンらの方法（Needlemanら、（1970）J.Mol.Biol.48:443-453）およびアラインプログラム（DNASTAR、Inc社製）によって計算した同一性を用いて既知のモルホーゲン配列と同列のものとしてできる。本明細書で用いられる“相同性”または“類似性”は、デイオフらの定義する、許される保存的变化を含む。

本発明の方法にしたがって検出されるモルホーゲン配列は、hOP-1（例えば配列番号5の残基43-139）の6個の保存システイン骨格に範囲が特定されたアミノ酸配列と60%以上の同一性、好ましくは65%以上の同一性を有するが、しかしこれらに限られるものではない。もっとも好ましいこれらの配列は、OP-1およびOP-2蛋白（ショウジョウバエ60A蛋白を含む）の対立形質および変異種の両方を含む。したがって、本発明によって検出できるモルホーゲンは、一般アミノ酸配列を有するポリペプチド鎖種（本明細書では“OP

X"と呼ぶ)を含むが、これはOP-1およびOP-2の種々の確認された種(配列番号29)の間で相同性を有する。

本発明の方法で検出できるモルホーゲン、天然のものから分離されたか、または組換え体(リコンビナント)DNAもしくは他の合成技術で製造されたかにかかわらず、上記のポリペプチド鎖の何れかを含有する蛋白を含み、さらに、これら蛋白の対立形質およびその変異種、その天然もしくは生合成変異体、第二の種類に属するものの別のドメインまたは領域を機能的に配置したある1つの種類に属するもののドメインまたは領域を有するキメラ変異体を、種々の縮小および融合構造物同様に含む。欠失、挿入または付加変異体もまた活性を有すると考えられるが、これらには、保存されたC-末端システイン骨格を変更(ただしその変更は折り畳まれた構造におけるこれらシステインの関係を機能的に崩壊させないことを条件とする)するものも含まれる。したがって、そのような活性形は、本明細書中の特に記載された構築物と同等のものと考えられる。当該蛋白は、種々の糖付加パターン、種々のN-末端を有する形態、アミノ酸相同性をもつ領域を有する関連蛋白の一群、および天然もしくは生合成蛋白の縮小もしくは変異活性形(宿主細胞中でリコンビナントDNAの発現によって産生される)を含むことができる。

10

形態形成誘導蛋白は、原核または真核細胞中でインタクトなもしくは縮小DNAから、または合成DNAから発現でき、さらに精製、切断、再折り畳みを行ない二量体化して形態形成誘導活性を有する組成物を生成することができる。現時点で好ましい宿主細胞は、大腸菌(*E. coli*)または哺乳類細胞(例えばCHO、COSまたはBSC細胞)を含む。本発明の方法によって検出できるモルホーゲンの詳細な記載は、共に継続中の米国特許出願第752764号(1991年8月30日出願)および第667274号(1991年3月11日出願)に記載されており、それらの内容は参考文献として本明細書に含まれている。

20

本発明のスクリーニング方法は、1つまたは2つ以上の化合物に培養細胞を曝す結果による形態形成誘導蛋白レベルの変化を決定する簡単な方法を提供する。与えられた細胞培養における形態形成誘導蛋白レベル、または1つもしくは2つ以上の化合物に曝すことによって生じるそのレベルの変化は、当該化合物の直接適用が培養細胞によって発現されるモルホーゲンレベルを調節することを示す。例えば、ある化合物が腎細胞株によるOP-1の産生を上昇させる場合、インビトロでOP-1産生を上昇させるかどうかを決定するために、続いて動物モデルでこの化合物の全身的投与試験を実施することが望ましいであろう。この化合物が内因性循環OP-1レベルを上昇させる場合、骨粗鬆症のような骨代謝疾患の矯正のために当該化合物を全身的に投与することは理に叶うであろう。身体のもルホーゲンレベルは、さまざまな身体条件(例えば疾病で生じる組織の変性で関節炎、気腫、骨粗鬆症、腎疾患、肺疾患、心筋疾患および肝硬変を含む)の結果であろう。身体のもルホーゲンレベルは、また加齢の正常な過程の結果であろう。本発明のスクリーニング方法によって例えば組織中のモルホーゲンレベルを増加させるものとして選択される化合物を、組織変性のある形態を防ぐために、または変性組織をその正常な健康状態に回復させるために全身的または局所的に投与することは理に叶うであろう。本発明のその他の利点は、疾患またはモルホーゲン産生レベルが変化した状態を治療するためにモルホーゲンの全身レベルを調節することを目的として化合物を投与するため、そのモルホーゲンが由来する組織を決定することを含む。

30

40

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明の工程において有用なノザンハイブリダイゼーションのプロープとして用いられるOP-1フラグメントを示す。

図2は、異なるOP-1特異的プロープを用いた、RNAのノザンブロットアッセーの結果を示す。

図3は、OP-1プロープで調べた、異なる細胞型に由来するRNAのノザンブロットアッセーの結果を示す。

発明の詳細な説明

本発明は構造的に関係がある形態形成誘導蛋白類(BMPs)(これはまた骨形成原蛋白(OPs)とも呼ばれる)の発見、より具体的にはこれら種々の蛋白は、胚胎発育だけでなく若

50

年および成熟哺乳類における組織および器官の維持と修復に重要な役割を果たしているという発見を基にしている。これまでに確認された形態形成誘導蛋白は、BMP2、3、4、5、6、OP-1およびOP-2（マウスおよびヒト）、Vgr-1、Vgl、DPP、GDF-1、CMBP-2A、CMBP-2B、60Aおよびインヒビン／アクチビンクラスの蛋白を含む。その他のリコンビナント蛋白はCOP1、COP3、COP4、COP5、COP7およびCOP16を含む。一方、本明細書中で説明したようにモルホーゲンは構造に著しい相同性および類似性を有し、形態形成誘導蛋白遺伝子内の異形は特定組織における特定の役割（例えば前駆細胞増殖の刺激、組織特異的もしくは組織にとって好ましい表現型の維持、および／または分裂速度の刺激もしくは調節、頻繁なターンオーバーという特色をもつ組織細胞の成熟および複製を含む）を果たしているかもしれないという仮説が成り立つ。特定のモルホーゲン種による特定の組織の長期的生理、維持および修復は現在のところ詳細には全く未知である。しかしながら、どの特定組織がどの特定モルホーゲンを発現しているかを決定するために、さらにインビボでモルホーゲン発現を刺激もしくは抑制する変化を見つけるために有用な方法は、様々な病的状態の治療方法の発見および開発を可能にし、当該方法を実行するためにデザインされた薬剤を提供するであろう。

10

本発明はそのような方法、より具体的には、特異的な天然の哺乳類モルホーゲンの構造／活性関係の決定およびそれらの産生を調節することができる薬剤の決定を完全に可能にするデータを得るための2つの一般工程を提供する。例えば、本発明のアッセーを用いて、OP-1（最初に骨で発見され、骨誘導性を有することが示された）は主として腎、膀胱および副腎皮質組織で合成されることが分かった。この驚くべき発見は、腎疾患をもつ患者はしばしば骨体の減少を発現するという観察所見と合わせて、これらの患者における骨体減少は腎におけるOP-1合成の病的抑制による可能性があることを示唆し、さらに、OP-1の全身投与または腎によるOP-1発現および分泌の刺激は骨体の減少を停止させ、または骨形成増強による再石化（すなわち骨形成）をもたらしえるということを示唆する。本発明には2つの基本的な局面がある。1つの局面は、モルホーゲンを合成および分泌することができる組織および細胞を決定するためのアッセーを含み、他の局面は、モルホーゲンの発現および／または分泌を調節する（すなわち刺激または抑制する）ために治療的に有用な物質を発見するためにスクリーニング系にこの同定された細胞型を使用することを含む。

20

あるモルホーゲンが由来する組織を決定するためのアッセーは、組織におけるモルホーゲンの産生を示す指標を求めることによって複数の（すなわち2つまたはそれ以上）異なる組織をスクリーニングし、さらにその指標を比較することを含む。当該由来組織は、もちろんのこと、そのモルホーゲンを産生する組織であろう。

30

本発明の他のアッセー、モルホーゲンの全身的または局所的有効濃度を調節する能力について、候補化合物をモルホーゲンを産生する細胞培養とともにインキュベートし、さらにモルホーゲンの産生レベルにおける変化を表示する指標について当該培養を調べることによって候補化合物をスクリーニングすることを含む。続いて、有用な候補化合物をインビボでの有効性について、適切な動物モデルで調べることができる。これらの化合物はその後、疾病治療においてモルホーゲンの有効な集中化を調節するために用いることができる。

40

1. モルホーゲンの組織分布

モルホーゲンは発育中および成熟組織に広く分布している。例えば、DPPおよび60Aは胚胎および発育中のショウジョウバエ組織で発現している。Vglはツメガエルの胎児組織で確認された。Vgr-1転写物は種々のネズミの組織（胎児および発育中の脳、肺、肝、腎および頭蓋冠（真皮骨）組織を含む）で確認された。さらに、CBMP2BおよびCBMP3は肺組織で確認された。最近、Vgr-1転写物もまた成熟ネズミの肺、腎、心および脳組織で（特に肺では高濃度で）確認された（下記参照）。さらに、最近のノザンプロットアッセーによって、OP-1は種々の組織の多数の転写物によってコードされることが示された。この潜在性選択性スプライシングは、より長い転写物が付加蛋白（たとえば2シストロン性mRNA）をコードし、各形態は組織的または発育的に関係を有する可能性があるという仮説と

50

一致する。

OP-1 およびCBMP2蛋白（両方とも骨モルホーゲンとして最初に確認された）は、マウスおよびヒトの胎盤、海馬、頭蓋冠および骨肉腫組織で、これら組織から構築されたcDNAライブラリーでOP-1 およびCMBP2特異的配列を同定することによって確認された（USSN第422699号参照、本明細書中に参考文献として含まれる）。さらに、OP-1 蛋白は、ウェスタンブロットアッセーおよび免疫的局在化法（下記参照）によって決定された通り、様々な胎児組織および発育中の組織（腎、肝、心および脳を含む）に存在する。OP-1 特異的転写物はまた胎児組織および発育中の組織の両方（最も豊富には発育中の腎、膀胱および副腎皮質）で確認された。OP-1 はまた胚胎発育中に存在する中胚葉誘発因子として確認された。のみならず、OP-1 は筋肉のサテライト細胞と関連があり、さらに成熟したネズミの軟骨内骨の損傷後の骨髄中の潜在的多能性幹細胞に関係があることが示されたが、これは組織の修復および再生におけるOP-1 の形態形成誘導の役割を示唆している。さらに、7個のシステイン骨格を含む新規な蛋白GDF-1 は神経組織で確認された（Lee,1991,Proc.Nat.Aca.Sci.88:4250-4254）。

あるモルホーゲンの組織分布の知見は、本発明のスクリーニングのため、さらに治療の目標となる細胞型もしくは組織タイプを選ぶために細胞型を選択するために有用であろう。当該蛋白（またはそのmRNA）は、発現が少ない組織において標準的な方法およびそれをわずかに修飾した方法を用いることによって、種々の組織において容易に確認される。例えば、標準的なウェスタンブロットアッセーまたは免疫細胞化学的手技、および対象となるモルホーゲンに特異的な抗体を用いて蛋白分布を決定できる。同様に、モルホーゲン転写物の分布は、標準的なノザンハイブリダイゼーション手順および転写物特異的プローブとハイブリダイゼーション条件を用いて決定することができる。

2. 有用なモルホーゲン

本明細書で定義されたように、蛋白が、新しく臓器特異的な組織を形成することとなる細胞的、分子的現象の段階的発達を誘発する能力を有し、さらに少なくとも6個の保存的C-末端システイン骨格またはその機能的同等物（下記参照）を含むとき、その蛋白は形態形成誘導性である。特に、モルホーゲンは、一般に形態形成誘導を許容する環境下で下記の生物学的機能のすべての能力を有する：前駆細胞の増殖を刺激し、前駆細胞の分化を刺激し、分化細胞の増殖を刺激し、さらに分化細胞の成熟および維持（形質転換細胞の“再分化”を含む）を支援する。本発明の方法にしたがって検出できるモルホーゲンがまず最初にどのように確認されたかについての詳細は、それらの製造、使用方法およびモルホーゲン活性についての試験方法と同様USSN第667274号（1991年3月11日出願）およびUSSN第752764号（1991年8月30日出願）に開示されており、その開示内容は参考文献として本明細書に含まれている。本明細書に開示されているように、モルホーゲンは天然の物質から精製されるか、または前記出願明細書に開示されている遺伝子配列を用いて原核もしくは真核細胞から遺伝子組み換えで製造することができる。また別に、新規なモルホーゲン配列は、前記の明細書に開示された方法にしたがい確認することができる。

特に有用な蛋白は、表IIに示す天然に得られる配列を有するものを含む。その他の有用な配列は生合成構築物、例えば米国特許第5011691号に開示されたようなもの（その開示内容は参考として本明細書に含まれている）（例えばCOP-1、COP-3、COP-4、COP-5、COP-7およびCOP-16）を含む。

したがって、本発明の方法および構成にしたがって検出できるモルホーゲンはまた、前述の配列のいずれかと70%または好ましくは80%の相同性（類似性）をもつアミノ酸配列を有する形態形成誘導活性をもつ蛋白によって説明することができる（ここで“相同性”とは上記に定義されている）。

本発明の方法にしたがって検出できるモルホーゲンはまた、本明細書に記載されている6個の一般配列（一般配列1、2、3、4、5および6）のいずれかによって説明することができる。一般配列1および2はまたそのN-末端に以下の配列を含むことができる：

C y s X a a X a a X a a X a a (配列番号15)

1

5

下記の表IIは、モルホーゲンとして確認された天然の蛋白の活性領域のアミノ酸配列を比較している。これら蛋白はヒトOP-1 (hOP-1、配列番号5および16-17)、マウスOP-1 (mOP-1、配列番号6および18-19)、ヒトおよびマウスOP-2 (配列番号6、8および20-23)、CBMP2A (配列番号9)、CBMP2B (配列番号10)、BMP3 (配列番号26)、DPP (ショウジョウバエ由来、配列番号11)、Vgl (ツメガエル由来、配列番号12)、Vgr-1 (マウス由来、配列番号13)、GDF-1 (マウス、配列番号13、32および33)、60A蛋白 (ショウジョウバエ、配列番号24および33)、BMP5 (配列番号27) およびBMP6 (配列番号28) を含む。これらの配列はニードルマンらの方法 (Needlemanら、(1970) J.Mol.Biol., 48:443-453) にしたがって、アラインプログラム (DNASTAR, Inc社製) を用いて計算し配列されている。この表で3個の点は、その位置のアミノ酸はhOP-1のアミノ酸と同じであることを示している。3本のダッシュ記号はその位置にはアミノ酸が存在しないことを示しているが、相同性を図示する目的のために挿入されている。例えばCBMP-2AおよびCBMP-2Bのアミノ酸残基60は存在しない。もちろん、この領域においてこれらアミノ酸配列は両方ともAsn-Ser (残基58、59) を含み、続いてCBMP-2Aの場合はLysおよびIleを、一方CBMP-2Bの場合はSerおよびIleを含んでいる。

10

表 II

hOP-1	Cys	Lys	Lys	His	Glu	Leu	Tyr	Val
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	Arg	Arg	...	...	...	...	...
mOP-2	...	Arg	Arg	...	...	...	...	...
DPP	...	Arg	Arg	...	Ser	...	...	...
Vgl	...	...	Lys	Arg	His	...	...	...
Vgr-1	...	...	...	...	Gly	...	...	...
CBMP-2A	...	...	Arg	...	Pro	...	...	...
CBMP-2B	...	Arg	Arg	...	Ser	...	...	...
BMP3	...	Ala	Arg	Arg	Tyr	...	Lys	...
GDF-1	...	Arg	Ala	Arg	Arg	...	...	...
60A	...	Gln	Met	Glu	Thr	...	...	...
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP6	...	Arg	...	...	...	...	...	...
	1				5			

10

20

hOP-1	Ser	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Trp	Gln	Asp
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	...	Gln	...	...	...	...	Leu	...
mOP-2	Ser	...	...	...	...	...	...	Leu	...
DPP	Asp	...	Ser	...	Val	...	...	Asp	...
Vgl	Glu	...	Lys	...	Val	...	...	...	Asn
Vgr-1	...	...	Gln	...	Val	...	...	...	...
CBMP-2A	Asp	...	Ser	...	Val	...	...	Asn	...
CBMP-2B	Asp	...	Ser	...	Val	...	...	Asn	...
BMP3	Asp	...	Ala	...	Ile	...	...	Ser	Glu
GDF-1	...	...	...	Glu	Val	...	...	His	Arg
60A	Asp	...	Lys	...	...	...	...	His	...
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP6	...	...	Gln	...	...	...	...	...	...
		10					15		

30

40

hOP-1	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ala
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	Val	...	...	...	Gln	...	...	Ser
mOP-2	...	Val	...	...	...	Gln	...	...	Ser
DPP	...	...	Val	...	...	Leu	...	...	Asp
Vgl	...	Val	...	...	...	Gln	...	...	Met
Vgr-1	...	...	...	...	...	Lys	...	...	...
CBMP-2A	...	...	Val	...	...	Pro	...	...	His
CBMP-2B	...	...	Val	...	...	Pro	...	...	Gln
BMP3	...	...	...	Ser	...	Lys	Ser	Phe	Asp
GDF-1	...	Val	...	...	...	Arg	...	Phe	Leu
60A	...	...	...	...	...	...	...	...	Gly
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP6	...	...	...	...	...	Lys	...	...	...
			20					25	

10

hOP-1	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ala
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	...	...	...	...	...	...	...	Ser
mOP-2	...	...	...	...	...	...	...	...	...
DPP	...	...	...	...	His	...	Lys	...	Pro
Vgl	...	Asn	...	...	Tyr	...	...	...	Pro
Vgr-1	...	Asn	...	...	Asp	...	...	...	Ser
CBMP-2A	...	Phe	...	...	His	...	Glu	...	Pro
CBMP-2B	...	Phe	...	...	His	...	Asp	...	Pro
BMP3	...	...	...	...	Ser	...	Ala	...	Gln
GDF-1	...	Asn	...	...	Gln	...	Gln	...	...
60A	...	Phe	...	...	Ser	...	...	...	Asn
BMP5	...	Phe	...	...	Asp	...	...	...	Ser
BMP6	...	Asn	...	...	Asp	...	...	...	Ser
				30					35

20

30

hOP-1	Phe	Pro	Leu	Asn	Ser	Tyr	Met	Asn	Ala
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	...	...	Asp	...	Cys	...	...	...
mOP-2	...	...	...	Asp	...	Cys	...	...	...
DPP	...	...	...	Ala	Asp	His	Phe	...	Ser
Vgl	Tyr	...	...	Thr	Glu	Ile	Leu	...	Gly
Vgr-1	...	...	...	...	Ala	His	...	...	...
CBMP-2A	...	...	...	Ala	Asp	His	Leu	...	Ser
CBMP-2B	...	...	...	Ala	Asp	His	Leu	...	Ser
GDF-1	Leu	...	Val	Ala	Leu	Ser	Gly	Ser**	...
BMP3	...	...	Met	Pro	Lys	Ser	Leu	Lys	Pro
60A	...	...	...	...	Ala	His	...	...	...
BMP5	...	...	...	...	Ala	His	Met	...	...
BMP6	...	...	...	...	Ala	His	Met	...	...

40

hOP-1	Thr	Asn	His	Ala	Ile	Val	Gln	Thr	Leu
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	...	...	...	...	Leu	...	Ser	...
mOP-2	...	...	...	...	...	Leu	...	Ser	...
DPP	...	...	...	...	Val	...	...	...	...
Vgl	Ser	...	...	...	...	Leu	...	...	...
Vgr-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
CBMP-2A	...	...	...	...	...	...	...	...	...
CBMP-2B	...	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP3	Ser	...	...	...	Thr	Ile	...	Ser	Ile
GDF-1	Leu	...	...	...	Val	Leu	Arg	Ala	...
60A	...	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP6	...	...	...	...	...	...	...	...	...

45

50

10

20

30

hOP-1	Val	His	Phe	Ile	Asn	Pro	Glu	Thr	Val
mOP-1	...	...	...	...	...	...	Asp	...	...
hOP-2	...	His	Leu	Met	Lys	...	Asn	Ala	...
mOP-2	...	His	Leu	Met	Lys	...	Asp	Val	...
DPP	...	Asn	Asn	Asn	...	...	Gly	Lys	...
Vgl	...	...	Ser	...	Glu	...	...	Asp	Ile
Vgr-1	...	...	Val	Met	...	...	...	Tyr	...
CBMP-2A	...	Asn	Ser	Val	...	Ser	---	Lys	Ile
CBMP-2B	...	Asn	Ser	Val	...	Ser	---	Ser	Ile
BMP3	...	Arg	Ala**	Gly	Val	Val	Pro	Gly	Ile
GDF-1	Met	...	Ala	Ala	Ala	...	Gly	Ala	Ala
60A	...	...	Leu	Leu	Glu	...	Lys	Lys	...
BMP5	...	...	Leu	Met	Phe	...	Asp	His	...
BMP6	...	...	Leu	Met	...	...	...	Tyr	...
		55					60		

10

hOP-1	Pro	Lys	Pro	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Gln
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	...	Ala	...	...	...	...	...	Lys
mOP-2	...	...	Ala	...	...	...	...	...	Lys
DPP	...	...	Ala	...	...	Val	...	...	...
Vgl	...	Leu	...	...	...	Val	...	...	Lys
Vgr-1	...	...	...	...	...	...	...	...	Lys
CBMP-2A	...	...	Ala	...	...	Val	...	...	Glu
CBMP-2B	...	...	Ala	...	...	Val	...	...	Glu
BMP3	...	Glu	...	...	...	Val	...	Glu	Lys
GDF-1	Asp	Leu	...	...	...	Val	...	Ala	Arg
60A	...	...	...	...	...	...	...	...	Arg
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...	Lys
BMP6	...	...	...	...	...	...	...	...	Lys
			65					70	

20

30

hOP-1	Leu	Asn	Ala	Ile	Ser	Val	Leu	Tyr	Phe
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	Ser	...	Thr	...	...	...	...	Tyr
mOP-2	...	Ser	...	Thr	...	...	...	...	Tyr
Vgl	Met	Ser	Pro	...	...	Met	...	Phe	Tyr
Vgr-1	Val	...	...	...	...	...	...	...	...
DPP	...	Asp	Ser	Val	Ala	Met	...	...	Leu
CBMP-2A	...	Ser	...	...	...	Met	...	...	Leu
CBMP-2B	...	Ser	...	...	...	Met	...	...	Leu
BMP3	Met	Ser	Ser	Leu	...	Ile	...	Phe	Tyr
GDF-1	...	Ser	Pro	...	...	...	...	Phe	...
60A	...	Gly	...	Leu	Pro	...	...	...	His
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP6	...	...	...	...	...	...	...	...	...

75

80

hOP-1	Asp	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Ile	Leu	Lys
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	Ser	...	Asn	...	...	...	...	Arg
mOP-2	...	Ser	...	Asn	...	...	...	...	Arg
DPP	Asn	...	Gln	...	Thr	...	Val	...	...
Vgl	...	Asn	Asn	Asp	...	...	Val	...	Arg
Vgr-1	...	...	Asn	...	...	...	...	...	...
CBMP-2A	...	Glu	Asn	Glu	Lys	...	Val	...	...
CBMP-2B	...	Glu	Tyr	Asp	Lys	...	Val	...	...
BMP3	...	Glu	Asn	Lys	...	...	Val	...	...
GDF-1	...	Asn	...	Asp	...	...	Val	...	Arg
60A	Leu	Asn	Asp	Glu	...	...	Asn	...	...
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP6	...	...	Asn	...	...	...	...	...	...

85

10

20

30

hOP-1	Lys	Tyr	Arg	Asn	Met	Val	Val	Arg
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	His	...	...	...	...	...	Lys
mOP-2	...	His	...	...	...	...	...	Lys
DPP	Asn	...	Gln	Glu	...	Thr	...	Val
Vgl	His	...	Glu	...	...	Ala	...	Asp
Vgr-1	...	...	...	...	...	...	...	...
CBMP-2A	Asn	...	Gln	Asp	...	...	...	Glu
CBMP-2B	Asn	...	Gln	Glu	...	...	...	Glu
BMP3	Val	...	Pro	...	...	Thr	...	Glu
GDF-1	Gln	...	Glu	Asp	...	...	...	Asp
60A	...	...	...	...	...	Ile	...	Lys
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP6	...	...	...	Trp	...	...	...	...
	90					95		

10

20

hOP-1	Ala	Cys	Gly	Cys	His
mOP-1	...	...	...	...	...
hOP-2	...	...	...	...	...
mOP-2	...	...	...	...	...
DPP	Gly	...	...	...	Arg
Vgl	Glu	...	...	...	Arg
Vgr-1	...	...	...	...	...
CBMP-2A	Gly	...	...	...	Arg
CBMP-2B	Gly	...	...	...	Arg
BMP3	Ser	...	Ala	...	Arg
GDF-1	Glu	...	...	...	Arg
60A	Ser	...	...	...	...
BMP5	Ser	...	...	...	...
BMP6	...	...	...	...	...

30

100

(脚注) BMP3の残基56と57の間の**はVal残基であり、GDF-1の残基43と44の間にはGly-Gly-Pro-Proのアミノ酸配列が入る。

40

前出のアミノ酸配列の比較から明らかなように、形態形成誘導活性を保持しながら重要なアミノ酸の変化を一般配列内に作ることができる。例えば、表IIに表したGDF-1蛋白配列は、表に記載されているhOP1配列と約50%のアミノ酸同一性しかもたないが、GDF-1配列はhOP1配列と70%以上のアミノ酸配列相同性（または“類似性”）をもつ（ここで“相同性”または“類似性”はデイオフら（Dayhoffら、蛋白配列および構造図解、第5巻、付録345-362ページ（M.O.Dayhoffら編、Nat'l BioMed.Res.Fdn社刊、ワシントンD.C.1978）の定義のように、配列内の許容される保存的アミノ酸変化を含む）。

本発明においてモルホーゲンとして検出できる現在のところ最も好ましい蛋白配列は、hOP1の6個の保存システイン骨格によって特定されるアミノ酸配列（例えば配列番号5の残基43-139）について60%以上、好ましくは65%以上の同一性を有するものを含む。これ

50

ら最も好ましい配列はOP-1およびOP-2蛋白の対立形質および変異種の両方（ショウジョウバエ60A蛋白を含む）を含む。したがって、また別の好ましい局面において、本発明は、本明細書で“OPX”と呼ぶ一般アミノ酸配列を有するポリペプチド鎖種を含むモルホーゲンの検出を含む。OPXは7個のシステイン骨格を特定するもので、確認された種々のマウスおよびヒトOP-1およびOP2蛋白間の同一性を提供する。OPXは配列番号29で提示される。そこに示されているように、ある位置の各Xaaはそれぞれ別個に、マウスおよびヒトOP-1またはOP2のC-末端配列（配列番号5-8および／または配列番号16-23）の対応する位置にある残基から選ばれる。

3.OP-1の組織特異的発現

モルホーゲンが一旦組織で確認されるや、蛋白もしくは核酸レベルのいずれかでそのレベルを決定することができる。種々の組織間であるモルホーゲンの産生レベルを比較することによって、当該モルホーゲンが由来する組織を決定することができる。種々の組織におけるモルホーゲンOP-1の産生レベルは本来の産生組織（すなわち腎で、これは、モルホーゲン（OP-1）産生に対して影響を与える可能性がある種々の化合物を本発明にしたがってスクリーニングするために用いる細胞型としてもまた使用できる細胞型を含んでいる）をもつモルホーゲンの1例である。

OP-1レベルは種々の組織間で異なる。化合物のOP-1産生に対する効果を与えられた細胞型によってスクリーニングするために、どの組織が潜在的減少を示すために十分なほど高いOP-1量を産生し、さらに潜在的増加を示すために十分なほど低いOP-1量を産生しているかを決定することが望ましい。以下のように異なる組織をRNAレベルでスクリー

ングすることができる。

転写物と特異的にハイブリダイズし、対象となる転写物を他の関係がある転写物から識別することができるいずれのプロープも用いることができる。本発明の方法で検出できるモルホーゲンはそのC-末端に高い配列相同性を有するので、特異的モルホーゲン転写物の組織分布は、成熟蛋白の“プロ”領域および／または成熟蛋白の不均一N-末端領域に特異的なプロープを用いて決定するのが一番よい。また別の有用なプロープ配列は終止コドン直後の3'非コード領域である。配列のこれらの部分は本発明のモルホーゲン間で実質的に異なっており、したがって各蛋白に特異的である。例えば、特に有用なVgr-1特異的プロープ配列はPvu II-Sac Iフラグメントで、これは成熟蛋白のプロ領域およびN-末端の両方を暗号化する265塩基対（bp）のフラグメントである。同様に、特に有用なmOP-1特異的フラグメントは0.68kbのBstX I-Bgl IフラグメントでmOP1プロ領域のおよそ2/3（7-システインドメインの直ぐ上流の0.2kbのStu I-Stu Iフラグメントおよび3'非翻訳配列を含む0.3kbのEar I-Pst Iフラグメント）をカバーする。同様なアプローチは、例えばhOP-1（配列番号16）またはヒトもしくはマウスOP-2（配列番号20および22）について用いることができる。

モルホーゲン特異的オリゴヌクレオチドプロープを用いて、当業者に既知の標準的方法にしたがいモルホーゲン転写物を哺乳類組織において確認することができる。簡単に記せば、マウス胎児および出生後の動物の器官の全RNAを酸グアニジンチオシアネートフェノールクロロホルム法（Chomczynskiら、Anal.Biochem.162:156-159,1987）を用いて調製する。このRNAをTES緩衝液（10mM Tris-HCl,1mM EDTA,0.1% SDS,pH7.5）に溶解し、プロテインゼK（およそ1.5mg/g組織サンプル）で1時間45℃で処理する。オリゴ（dT）-セルロースカラム（タイプ7、ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製、ピスカタウェー、ニュージャージー）でのポリ（A）⁺RNA選別を以下のようにバッチ操作で実施してもよい；11mlのRNA溶液（1gの組織から）と0.1gとオリゴ（dT）-セルロースをTES緩衝液および0.5MのNaCl中で混合する。その後、オリゴ（dT）-セルロースを結合緩衝液（0.5M NaCl,10mM Tris-HCl,1mM EDTA,pH7.5）で洗浄し、ポリ（A）⁺RNAを水で溶出させる。ポリ（A）⁺RNA（5または15μg/レーン）を1または1.2%アガロース-ホルムアルデヒドゲル（Selden,“Current Protocols in Molecular Biology”,Ausubelら編、1-4、8、9ページ、Greens Publishing and Wiley-Interscience社、ニューヨーク、1991）で分離する。400μg/mlの臭化エチジウムの1μlを加熱変性前に各サンプルに加える（Rosen

10

20

30

40

50

ら、Focus 12:23-24,1990)。電気泳動の後、ゲルの写真を撮り、Nytranニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell Inc., キーン、ニューハンプシャー) 上で10×SSCで一晩処理してRNAのプロットを得る。この膜を80℃で30-60分乾熱処理し、UV光を照射する (1mW/cm²、25秒)。ノザンハイブリダイゼーションの条件は先に記載したとおりでよい (Ozkanakら、EMBO J.9:2085-2093,1990)。再使用のためには、フィルターを1mMのTris-HCl、1mMのEDTA、0.1%のSDS (pH7.5) 中で90-95℃で脱プローブし、フィルムに曝して先のハイブリダイゼーションシグナルが完全に除去されていることを確認してもよい。

モルホゲンをコードする転写物についてスクリーニングするために用いることができるプローブは、部分的または完全なOP-1cDNAを含むが、これは関連モルホゲンのOP-1mRNAの存在を検出するために用いることができる。マウスのcDNA遺伝子の配列は配列番号14で示されている。

OP-1mRNA発現は、種々のプローブで連続的にハイブリダイズしたフィルターによって17日令のマウス胎児および出生後3日令のマウスで調べた。高度に保存された7-システインドメイン以外の領域からのプローブを、この領域がTGF-βスーパーファミリーの仲間において高度に可変であるという理由から選んだ。図1はノザンハイブリダイゼーションでプローブとして用いたOP-1のフラグメントを示している。黒塗りの四角は推定シグナルペプチドを示し、線付四角は7個のシステイン残基を含むTGF-β様ドメインに対応する。星印は潜在的なN-グリコシレーション部位を示している。矢印はOP-1成熟のための切断部位の位置を示している。図の下に3本の実線は¹²P-標識プローブ (0.68kb Bst XI-Bgl Iフラグメント、0.20kb Stu I-Stu Iフラグメントおよび0.34kb Ear I-Pst I非コードフラグメント) を作成するために用いたOP-1特異的フラグメントを示している。

プロ領域のおよそ2/3をカバーするプローブ (0.68kb Bst XI-Bgl Iフラグメント) でのハイブリダイゼーションは、4kbメッセージ並びに1.8kb、2.2kbおよび2.4kbの3メッセージを明らかにした (図2BおよびD並びに図3)。図2のノザンハイブリダイゼーションでは、等量 (15μg) のポリ (A)⁺RNAを各レーンに適用し、1%のアガロース-ホルムアルデヒドゲルで電気泳動し、プロッティングおよびハイブリダイゼーションを行った。0.24-9.49kbRNAラダー (Bethesda Research Labs, Inc社製) をサイズスタンダードとして用いた。同じフィルターをOP-1 (パネルBおよびD)、Vgr-1 (パネルC) およびEF-Tu (パネルA) に特異的な標識プローブで連続的にハイブリダイズさせるために用いた。パネルA:EF-Tu特異的プローブ (コントロール) は0.4kbHind III-Sac Iフラグメント (コード領域の一部分) で、使用したSac Iはベクターに属する; パネルB:OP-1特異的プローブは0.68kbBst XI-Bgl Iフラグメントであった (プロ領域の2/3および成熟ドメインの上流配列であるが、7-システインドメインからのいずれの配列も含まない); パネルC:Vgr-1特異的プローブは0.26kbPvuI I-Sac Iフラグメントであった (プロ領域の一部分および成熟ドメインのアミノ末端配列であるが、最初のシステインを含む) (Lyonsら、1989、Proc.Nat.Aca.Sci.86:4554 (本明細書に参考として含まれている))。パネルD:OP-1 (3'近接) 特異的プローブは0.34kbEar I-Pst Iフラグメント (OP-1をコードする配列のすぐ後の3'非翻訳配列)。

図3では、RNA調製に用いられる組織は2週令マウス (パネルA) または5週令 (パネルB) から得られたが、例外としてポリ (A)⁺RNAは2週令のマウスの腎副腎から得られた (パネルB)。等量のポリ (A)⁺RNA (パネルAには15μg、パネルBには5μg) を各ウェルに用いた。電気泳動 (1.2%アガロース-ホルムアルデヒドゲル) およびプロッティングの後、図2の説明 (パネルD) に記載したようにOP-1特異的3'近接プローブとRNAをハイブリダイズした。サイズスタンダードとして0.24-9.5kbRNAラダーを用いた。矢印はOP-1特異的メッセージを示している。パネルAおよびBの下部分はEHF-Tu特異的プローブ (コントロール) を用いて得られたハイブリダイゼーションパターンを示している。

Vgr-1特異的メッセージのサイズは4kbOP-1種に近いが (図2パネルC)、CP-1の4kbmRNAの方が幾分大きい。さらに非OP-1メッセージとの交差ハイブリダイゼーションを

10

20

30

40

50

除外するために、7-システインドメインをコードする配列の直ぐ上流の遺伝子特異的配列を表す0.2kbのStu I-Stu Iフラグメントを用いた。このプローブは図2のパネルBに示したハイブリダイゼーションパターンと同じパターンを生じた（データはここでは示さず）。第三のプローブ（0.34kbのEar I-Pst Iフラグメントで3'非翻訳配列を含む）でもまた当該パターンが確認された（図2 パネルD）。したがって、同じ4つのOP-1 特異的メッセージが3つの異なるプローブで観察された。新しい4kbOP-1 mRNA種の出現は、最初Vgr-1 mRNA（これはおよそ当該サイズに等しい）とOP-1 プローブとの交差ハイブリダイゼーションと解釈された。しかし4kbメッセージは3つの異なるOP-1 特異的プローブで検出され、これには3'非翻訳領域に特異的なものが含まれ、しかもサイズを基にそれはVgr-1 メッセージから分離された。したがってもっとも考えられることは、この4kb mRNA（さらに1.8kb、2.2kbおよび2.4kbの3種）はOP-1 転写物のまた別のスプライシングから生じるということである。4kbOP-1 mRNAは2 シストロン性mRNAを表しているということができよう。4kbメッセージは腎では少量の種であるが、一方副腎組織ではより顕著である。

OP-1 発現量を、出生後13日のマウスの脳、脾臓、肺、腎および副腎、心臓並びに肝のポリ(A)⁺ RNAを用いて種々の組織で比較した。このRNAを種々のプローブとのハイブリダイゼーションによってノザンブロットで分析した（図3）。吸光度による判定で等量のmRNAをアガロースホルムアルデヒドゲル上で分画した。ゲルの臭化エチジウム染色は、当該mRNAに加えていくらかのリボソームRNAが残存することを明らかにし、さらにこのmRNAは分解せず、調製物における顕著な量的または質的変動は存在しないというまた別の保証を提供した。mRNA回収のためのコントロールとして、EF-Tu（翻訳伸長因子）mRNAをプローブで調べた（殆どの組織でEF-Tuは均一に発現すると仮定して）。OP-1 発現量における顕著な変動が脾、肺、腎および副腎組織で認められ、一方、EF-TuのmRNA量はこれらの組織において比較的一定しているようであった（図4 パネルA）。OP-1 mRNAの最高レベルは腎で認められた。EF-Tuの均一に低いmRNAレベルは脳、心および肝で認められた（図3 パネルA）。OP-1 mRNAの追加分析によって膀胱に顕著なレベルのOP-1 mRNAが存在することが示された（データは提示せず）。要約すれば、腎、膀胱および副腎組織と並んで脳組織は最高レベルのOP-1 RNAを含んでおり、一方、心および肝は検出可能なシグナルを生じなかった。

OP-1 mRNAパターンは種々の組織において質的变化を示す。脳で発見された4つのメッセージのうち、2.2kbメッセージが最も豊富で、一方、肺および脾では1.8kbメッセージが支配的である。腎OP-1 mRNAにおける1.8-2.4kbのレベルは、17日令の胎児より出生後3日のマウスでは2倍であり、おそらく骨および／または腎の発育の時期を反映しているのであろう。mRNAはまた5週令のマウスの注意深く分離した腎および副腎組織から調製された。ノザンブロットアッセイ（図3、パネルB）は、高レベルの2.2kbのmRNAは腎組織に由来し、一方4kb mRNAは副腎組織で支配的であることを明らかにした。

主として腎（膀胱も同様であるが）におけるOP-1 メッセージの検出は、尿路特異的OP-1 発現にリンクしている。興味深いことには、関連を有するVgr-1 もまた腎において顕著なレベルで発現しているが、その主たる発現部位は肺である。あるモルホーゲンの組織特異的発現が一旦分かれば、当該組織に由来する組織もしくは細胞株に存在することが分かっている細胞型を同様な方法でスクリーニングすることができ、モルホーゲンの組織特異的合成および分泌について実際に必要な当該組織内の細胞型を同定することができる。ある化合物に曝したときモルホーゲンの産生量において増加もしくは減少を検出するために十分なレベルでモルホーゲンを産生している細胞型が一旦分かれば、当該細胞型を組織培養に用い、モルホーゲンの合成および分泌を上昇もしくは低下させる化合物の能力を迅速にスクリーニングすることができる。細胞のモルホーゲン合成もしくは分泌能力に対する化合物の影響を評価するために、化合物の存在下、非存在下で細胞を培養して選ばれた細胞型によるモルホーゲン産生レベルを決定する。これはモルホーゲンの産生レベルを蛋白もしくはmRNAレベルで検出することによって達成できる。

4. 培養細胞の成長

10

20

30

40

50

腎、副腎、膀胱または他の臓器に由来する細胞培養は文献に広く記載されたように調製することができる。例えば、腎は新生児、若年または成熟ゲッ歯類（マウスまたはラット）から取り出すことができ、全組織もしくは薄切り（1-4mm）組織として臓器培養として用いることができる。初代組織培養および継代細胞株（腎、副腎、膀胱、脳または他の器官由来）を、慣用的な細胞培養技術にしたがい多穴プレート（6穴、24穴または96穴）で確立培養とし、一時のあいだ（1-7日）血清の存在下または非存在下で培養する。例えば、細胞は、血清（例えば1-10%ウシ胎児血清、gibco）含有ダルベッコの修飾イーグル培地（Gibco、ロングアイランド、ニューヨーク）または所望の場合は血清無添加培地、または限定培地（例えばインシュリン、トランスフェリン、グルコース、アルブミンまたは他の成長因子含有）で培養することができる。

10

モルホーゲン産生レベルを調べるためのサンプルは培養上清または細胞溶解物質を含む。これらを周期的に採集し細胞培養自体のOP-1産生について免疫ブロット分析によって評価し、また周期的に採集しRNA分析のためのポリ（A）⁺RNAを調製（サンプルックら編、分子クローニング（Molecular Cloning）1989、コールドスプリングハーバープレス、ニューヨーク）するために使用する。OP-1の新たな合成をモニターするために、いくつかの培養を³⁵S-メチオニン/³⁵S-システイン混合物で6-24時間標識し、続いて慣用的な免疫沈降反応（サンプルックら編、分子クローニング（Molecular Cloning）1989、コールドスプリングハーバープレス、ニューヨーク）によってモルホーゲン産生を調べる。また別にモルホーゲン産生またはモルホーゲン産生レベルの決定は、細胞成長の指標（例えば細胞分裂または細胞死）についての簡単なアッセイを用いて確認することができる。例えば、モルホーゲンが培養細胞株によって産生されている場合、モルホーゲン特異的抗体の添加は、細胞成長のモルホーゲンによる抑制の解除をもたらすかもしれない。したがって、細胞増殖の測定は組織によるモルホーゲン産生のインジケーターとして用いることができる。

20

5.形態形成誘導蛋白レベルの決定

細胞型による形態形成誘導蛋白の産生を定量するために、モルホーゲンに特異的なポリクローン抗体またはモノクローン抗体を用いて免疫アッセイを実施しモルホーゲンを検出することができる。例えば、OP-1は、以下のようにOP-1特異的ポリクローン抗体を用いてELISAで検出することができる。

OP-1に特異的なアフィニティ精製ポリクローン抗体の1μg/100μlを96穴プレートの各穴（ウェル）に加え、37°Cで1時間インキュベートする。このウェルを0.1%トゥイーン20を含む、0.15MのNaCl含有0.16Mのホウ酸ナトリウム緩衝液（BSB）（pH8.2）で4回洗浄する。非特異的結合を最少にするために、BSB中の1%ウシ血清アルブミン（BSA）をこのウェルに37°C 1時間満たしブロックする。続いてこのウェルを0.1%トゥイーン20を含むBSBで4回洗浄する。培養細胞上清の被験サンプルの各々を適切に希釈したものの100μlを各ウェルに3ウェル1組として加え、37°C 30分インキュベートする。インキュベーションの後、100μlのビオチン基付加（biotinylated）ウサギ抗-OP-1血清（ストック溶液はおおよそ1mg/mlで使用前に1%BSA含有BSBで1:400に希釈）を各ウェルに加え、37°Cで30分インキュベートする。続いてこのウェルを0.1%トゥイーン20を含むBSBで4回洗浄する。100μlのストレプトアビジン-アルカリン（Southern Biotechnology Associates, Inc.、バーミングハム、アラバマ、使用前に0.1%トゥイーン20含有BSBで1:2000に希釈）を各ウェルに加え、37°C 30分インキュベートする。このプレートを0.5Mトリス緩衝食塩水（TBS, pH7.2）で4回洗浄する。50μlの基質（ELISA増幅システムキット、Life Technologies, Inc., ベセスダ、メリーランド）を各ウェルに加え、室温で15分インキュベートする。続いて、50μlのアンプリファイヤー（同じ増幅システムキットから）を加え、さらに15分室温でインキュベートする。0.3Mの硫酸50μlを加え反応を停止させる。各ウェルの溶液の490nmでのODを記録する。培養液中のOP-1を定量するために、OP-1スタンダード曲線を被験サンプルと平衡して調製する。

30

40

6.ポリクローン抗体の調製

ポリクローン抗体を以下のように調製する。各ウサギを500μlのフロイントの完全アジ

50

ュバントと混合した、0.1% SDS中の100 μ g/500 μ lの大腸菌産生OP-1モノマー（配列番号11のアミノ酸328-431）で一次免疫する。抗原は動物の背中および脇腹の多数の部位に皮下注射する。この動物にフロイントの不完全アジュバントを用いて同じ方法で1か月後に追加免疫を施す。7日後に耳静脈から試験採血を行う。ELISAアッセーを用いて血清中にOP-1抗体が検出されるまで、1か月間隔でさらに2回の追加免疫および試験採血を実施する。その後、このウサギに毎月100 μ gの抗原で追加免疫を施し、追加免疫後7日および10日に採血（15ml/採血）する。

7.モノクローン抗体および中和モノクローン抗体の調製

あるモルホーゲンに対して特異的なモノクローン抗体は以下のように調製される。マウスに大腸菌産生OP-1モノマー（配列番号11のアミノ酸328-431）を2回注射する。最初の注射は100 μ gのOP-1をフロイントの完全アジュバント中に含み、皮下に注射される。

2回目の注射は50 μ gのOP-1をフロイントの不完全アジュバント中に含み、腹腔内に注射される。続いてマウスに8か月の間いろいろな時期に全量230 μ gのOP-1（配列番号11のアミノ酸307-431）を4回腹腔内に注射する。融合の1週間前に100 μ gのOP-1（15-139）およびSMCC架橋剤でウシ血清アルブミンに付加システイン残基を介して結合させた30 μ gのN-末端ペプチド（Ser293-Ans309-Cys）でこのマウスに追加免疫を腹腔内に施す。この追加免疫を融合前5日（腹腔内）、4日（腹腔内）、3日（腹腔内）および1日（静脈内）に繰り返す。その後このマウスの脾細胞をミエローマ細胞（例えば653）とPEG1500（Boehringer Mannheim）を用いて1:1の割合で融合させ、この融合細胞物をプレートにまき、抗原としてOP-1（307-431）を用いてOP-1特異抗体についてスクリーニングする。この細胞融合およびモノクローン抗体スクリーニングは当該技術分野において広く利用されている方法に従う。中和モノクローン抗体は、添加OP-1に対して生物学的に反応する細胞アッセーに添加したときOP-1の生物学的活性を遮断する能力によって確認される。

8.OP-1表面レセプターをもつOP-1産生細胞の同定

種々の細胞株の増殖におけるOP-1およびTGF- β の濃度を増加させる効果を日常的に検査する工程中に、驚くべきことにOP-1を合成および分泌するだけでなく、分泌されてOP-1が結合し、細胞の増殖を抑制するように作用する細胞表面レセプターをもつ細胞株が確認された。この細胞株は以下の観察の後確認された。濃度を増加させたOP-1またはTGF- β を添加しても比較的低い細胞増殖の基礎速度を増加または減少させることはできなかった。しかしOP-1の活性を中和させるモノクローン抗体の添加は細胞増殖において大きな増加をもたらした。さらに、一定量のOP-1に対して同じ量のOP-1中和モノクローン抗体の同時添加は増殖増加をもたらしたが、これはOP-1単独で認められた低い基礎レベルとモノクローン抗体単独で認められた高いレベルとの中間であった。膀胱細胞の癌に由来する上皮細胞株であるこの細胞株は本発明のアッセーに用いることができる。本発明にしたがって検査されるべき指標は細胞増殖である。したがって、OP-1産生レベルを増加または減少させる化合物は、以下のようにこの細胞株で検査することができる。

9.OP-1合成に影響する薬剤を確認するためのアッセー

簡単な培地還流スクリーニングアッセーを標準的な24または96穴マイクロタイターディッシュで構成することができる。この場合、各ウェルは上記の特性を有する細胞株の一定数を含んでいる。濃度を増加させながらOP-1中和モノクローン抗体をディッシュの左から右へと加える。異なる被験物質の一定量をディッシュの上から下へと加える。OP-1の合成および分泌の（その構成的（非誘導）レベルを越える）増加は、OP-1の抗有糸分裂活性から細胞を解放するために必要なOP-1中和抗体量の増加によって示されるであろう。OP-1の合成および分泌の（その構成的（抑制された）レベルを下まわる）減少は、OP-1の抗有糸分裂活性から細胞を解放するために濃度を減少させたOP-1中和モノクローン抗体が必要であるという観察によって示されるであろう。このアッセーの主な利点の1つは、終末点（すなわち細胞増殖に対する効果を示す抗体の希釈）は有糸分裂の測定または1ウェル当たりの細胞数の増加であるということである。細胞数を計るためのいくつかの便利で迅速なアッセーが存在するので、このアッセーはより速く、実施には非常に少ない

10

20

30

40

50

工程を必要とする。

このアッセーは以下のように行うことができる。細胞を含むウェルに適切な濃度の0P-1中和モノクローン抗体および被験物質を添加後、このディッシュを1-3日間37℃でインキュベーターに静置する。インキュベーション／成熟期間の完了後、ディッシュを取り出し各ウェルの細胞を洗浄し、クリスタルバイオレットのような生体染色を施す。洗浄および染色は当該技術分野でよく知られている。続いて細胞を溶解し、エタノールのような溶媒の一定量中に染料を溶解させる。この溶解させた染料の定量（これは自動プレート読み取り器で容易に実施できる）は、各ウェルの細胞数の直接的定量を可能にする。

上記のアッセーは、それがわずかの工程しか必要としないということから、実施が迅速で容易であるという利点をもつ。他の利点はこのアッセーに本質的である。本発明の方法にしたがってスクリーニングされる薬剤で細胞死をもたらすもの（例えば細胞毒性物質）は、確認に実施者の観察を必要とせず直ちに行える。さらに、細胞の成熟を停止させる薬剤（例えば細胞抑制（cytostatic）物質）は細胞数増加を観察させないのでスコアは陽性となるが、0P-1中和モノクローン抗体の最高濃度が0P-1の抗有糸分裂活性から細胞を解放しないので容疑物質として自動的にスコアされる。

10

10.スクリーニングされる候補薬剤

本発明のスクリーニング方法は、与えられた細胞型による形態形成誘導蛋白の産生に対する化合物の影響をテストするために用いられる。スクリーニングできる化合物の例は、生物学的反応修飾物質（例えば、リンホカイン、サイトカイン、ホルモンまたはビタミン）、植物抽出物、真核細胞によって条件づけした微生物ブロスおよび抽出物培地、体液、または組織抽出物を含むが、これらケミカルに限定されるものではない。

20

本発明は、その真髄またはその本質的特徴から外れることなくその他の特徴的な形態として具体化できる。本具体例はしたがってそのすべての局面において説明としてなされたもので限定としてなされたものと考えるべきでなく、本発明の範囲は前述の記載よりむしろ添付の請求の範囲によって示され、当該請求の範囲内に入るすべての変更はしたがって当該請求の範囲内に含まれる。

配列表

(1) 一般的情報

(i) 出願人：ジョン スマート

ハーマン オパーマン

30

エンジン オズカイナック

サンゲーベル クベラサムパス

ディヴット シー．ルーガー

ロイ エッチ．エル．パング

チャールズ エム．コーエン

(ii) 発明の名称：形態形成誘導蛋白のスクリーニング方法

(iii) 配列の数:33

(iv) 郵便物の宛先：

(A) 名宛人：クリエイティブ バイオモレキュルズ

(B) 通り:35サウス ストリート

40

(C) 市：ホプキントン

(D) 州：マサチューセッツ

(E) 国：米国

(F) ジップコード:01748

(v) 使用コンピューター：

(A) 媒体型別：ディスク5.25

容量360kb

(B) コンピューター:IBM XT

(C) オペレーティング システム：ドス3.30

(D) ソフト：アスキーII,テキスト

50

(vi) 先行出願：

(A) 出願番号：US 667,274

(B) 出願日：1991年3月11日

(vii) 先行出願：

(A) 出願番号：US 752,861

(B) 出願日：1991年8月30日

(viii) 代理人：

(A) 氏名：ピッチャー，エドモンド アール．

(B) 登録番号：27,829

(C) ドケット番号：CRP-058PC

10

(ix) 電話番号：

(A) 617/248-7000

(B) ファックス：617/248-7100

(2) 配列番号1についての知見

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：97アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(C) 形態：直線状

(ii) 分子タイプ：蛋白

(ix) 特色：

20

(A) 名称：一般配列1

(D) 他の情報：各Xaaは、20ケの天然で生じるL型異性体、 α -アミノ酸、又はその誘導体の一つを示す。

(xi) 配列表記：配列番号1

```

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      1              5
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      10              15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
      20              25
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      30              35
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      40              45              50
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
      55              60
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      65              70
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      75              80
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
      85              90
Xaa Cys Xaa
      95

```

30

40

(2) 配列番号2についての知見

(i) 配列の特徴：

50

(A) 長さ:97アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

(ix) 特色:

(A) 名称:一般配列 2

(D) 他の情報:各Xaaは、20ヶの天然で生じる L 型異性体、 α -アミノ酸、又はその誘導体の一つを示す。

(xi) 配列表記:配列番号 2

```

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      1                      5
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      10                    15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
      20                    25
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
      30                    35
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      40                    45                    50
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
      55                    60
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      65                    70
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      75                    80
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
      85                    90
Xaa Cys Xaa
      95

```

10

20

30

(2) 配列番号 3 についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:97アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

(ix) 特色:

(A) 名称:一般配列 3

(D) 他の情報:ここで各Xaaは明細書中に定義した 1 つ又は 2 つ以上の特定のアミノ酸の群からそれぞれ別個にえられる。

(xi) 配列表記:配列番号 3

40

Leu Tyr Val Xaa Phe
 1 5
 Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa
 10
 Xaa Ala Pro Gly Xaa Xaa Xaa Ala
 15 20
 Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
 25 30
 Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35
 Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa
 40 45
 Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 55 60
 Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65
 Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 70 75
 Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
 80
 Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa
 85 90
 Xaa Cys Gly Cys Xaa
 95

10

20

30

(2) 配列番号 4 についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 102 アミノ酸

(B) タイプ: アミノ酸

(C) 形態: 直線状

(ii) 分子タイプ: 蛋白

(ix) 特色:

(A) 名称: 一般配列 4

(D) 他の情報: ここで各 Xaa は明細書中に定義した 1 つ又は 2 つ以上の特定の アミノ酸の群からそれぞれ別個にえられる。 40

(xi) 配列表記: 配列番号 4

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Tyr Val Xaa Phe
 1 5 10
 Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa
 15
 Xaa Ala Pro Xaa Gly Xaa Xaa Ala
 20 25
 Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
 30 35
 Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 40
 Asn Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa
 45 50
 Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 55
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 60 65
 Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 70
 Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 75 80
 Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
 85
 Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa
 90 95
 Xaa Cys Gly Cys Xaa
 100

10

20

30

(2) 配列番号5についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:139アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

(ix) 特色:

(A) 名称:hOP-1 (成熟形)

(xi) 配列表記:配列番号5

40

Ser	Thr	Gly	Ser	Lys	Gln	Arg	Ser	Gln	
1				5					
Asn	Arg	Ser	Lys	Thr	Pro	Lys	Asn	Gln	
10					15				
Glu	Ala	Leu	Arg	Met	Ala	Asn	Val	Ala	
	20					25			
Glu	Asn	Ser	Ser	Ser	Asp	Gln	Arg	Gln	
		30					35		
Ala	Cys	Lys	Lys	His	Glu	Leu	Tyr	Val	
			40					45	
Ser	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Trp	Gln	Asp	
				50					
Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ala	
55					60				
Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ala	
	65					70			
Phe	Pro	Leu	Asn	Ser	Tyr	Met	Asn	Ala	
		75					80		
Thr	Asn	His	Ala	Ile	Val	Gln	Thr	Leu	
			85					90	
Val	His	Phe	Ile	Asn	Pro	Glu	Thr	Val	
				95					
Pro	Lys	Pro	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Gln	
100					105				
Leu	Asn	Ala	Ile	Ser	Val	Leu	Tyr	Phe	
	110					115			
Asp	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Ile	Leu	Lys	
		120					125		
Lys	Tyr	Arg	Asn	Met	Val	Val	Arg	Ala	
			130					135	
Cys	Gly	Cys	His						

10

20

30

40

(2) 配列番号6についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:139アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

(ix) 特色:

(A) 名称:m0P-1 (成熟形)

(xi) 配列表記:配列番号6

Ser	Thr	Gly	Gly	Lys	Gln	Arg	Ser	Gln	
1				5					
Asn	Arg	Ser	Lys	Thr	Pro	Lys	Asn	Gln	
10					15				
Glu	Ala	Leu	Arg	Met	Ala	Ser	Val	Ala	
20						25			
Glu	Asn	Ser	Ser	Ser	Asp	Gln	Arg	Gln	
		30					35		
Ala	Cys	Lys	Lys	His	Glu	Leu	Tyr	Val	10
			40					45	
Ser	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Trp	Gln	Asp	
			50						
Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ala	
55					60				
Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ala	
65						70			
Phe	Pro	Leu	Asn	Ser	Tyr	Met	Asn	Ala	20
		75					80		
Thr	Asn	His	Ala	Ile	Val	Gln	Thr	Leu	
			85					90	
Val	His	Phe	Ile	Asn	Pro	Asp	Thr	Val	
				95					
Pro	Lys	Pro	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Gln	
100					105				
Leu	Asn	Ala	Ile	Ser	Val	Leu	Tyr	Phe	30
	110					115			
Asp	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Ile	Leu	Lys	
		120					125		
Lys	Tyr	Arg	Asn	Met	Val	Val	Arg	Ala	
			130					135	

Cys Gly Cys His

(2) 配列番号7についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:139アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

(ix) 特色:

(A) 名称:h0P-2 (成熟形)

(xi) 配列表記:配列番号7

10

20

30

40

Ala	Val	Arg	Pro	Leu	Arg	Arg	Arg	Gln	
1				5					
Pro	Lys	Lys	Ser	Asn	Glu	Leu	Pro	Gln	
10					15				
Ala	Asn	Arg	Leu	Pro	Gly	Ile	Phe	Asp	
20						25			
Asp	Val	His	Gly	Ser	His	Gly	Arg	Gln	
		30					35		
Val	Cys	Arg	Arg	His	Glu	Leu	Tyr	Val	10
			40					45	
Ser	Phe	Gln	Asp	Leu	Gly	Trp	Leu	Asp	
				50					
Trp	Val	Ile	Ala	Pro	Gln	Gly	Tyr	Ser	
55					60				
Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ser	
65						70			
Phe	Pro	Leu	Asp	Ser	Cys	Met	Asn	Ala	20
		75					80		
Thr	Asn	His	Ala	Ile	Leu	Gln	Ser	Leu	
			85					90	
Val	His	Leu	Met	Lys	Pro	Asn	Ala	Val	
				95					
Pro	Lys	Ala	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Lys	
100					105				
Leu	Ser	Ala	Thr	Ser	Val	Leu	Tyr	Tyr	30
	110					115			
Asp	Ser	Ser	Asn	Asn	Val	Ile	Leu	Arg	
		120					125		
Lys	His	Arg	Asn	Met	Val	Val	Lys	Ala	
			130					135	

Cys Gly Cys His

(2) 配列番号8についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:139アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

(ix) 特色:

(A) 名称:mOP-2 (成熟形)

(xi) 配列表記:配列番号8

10

20

30

40

Ala	Ala	Arg	Pro	Leu	Lys	Arg	Arg	Gln	
1				5					
Pro	Lys	Lys	Thr	Asn	Glu	Leu	Pro	His	
10					15				
Pro	Asn	Lys	Leu	Pro	Gly	Ile	Phe	Asp	
20						25			
Asp	Gly	His	Gly	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	
		30					35		
Val	Cys	Arg	Arg	His	Glu	Leu	Tyr	Val	
			40					45	
Ser	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Trp	Leu	Asp	
			50						
Trp	Val	Ile	Ala	Pro	Gln	Gly	Tyr	Ser	
55					60				
Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ala	
65						70			
Phe	Pro	Leu	Asp	Ser	Cys	Met	Asn	Ala	
		75					80		
Thr	Asn	His	Ala	Ile	Leu	Gln	Ser	Leu	
			85					90	
Val	His	Leu	Met	Lys	Pro	Asp	Val	Val	
			95						
Pro	Lys	Ala	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Lys	
100					105				
Leu	Ser	Ala	Thr	Ser	Val	Leu	Tyr	Tyr	
	110					115			
Asp	Ser	Ser	Asn	Asn	Val	Ile	Leu	Arg	
		120					125		
Lys	His	Arg	Asn	Met	Val	Val	Lys	Ala	
			130					135	
Cys	Gly	Cys	His						

10

20

30

(2) 配列番号9についての知見

(i) 配列の特徴:

40

(A) 長さ:96アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

(ix) 特色:

(A) 名称:CBMP-2A (fx)

(xi) 配列表記:配列番号9

Cys Lys Arg His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser
 1 5 10
 Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro
 15 20
 Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu
 25 30
 Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser
 35 40
 Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val Asn
 45 50 55
 Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys
 60 65
 Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu
 70 75
 Tyr Leu Asp Glu Asn Glu Lys Val Val Leu Lys
 80 85
 Asn Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly
 90 95
 Cys Arg
 100

10

20

(2) 配列番号10についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:101アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

30

(ix) 特色:

(A) 名称:CBMP-2B (fx)

(xi) 配列表記:配列番号10

								Cys	Arg	Arg	His	Ser	
								1					5
Leu	Tyr	Val	Asp	Phe	Ser	Asp	Val	Gly	Trp	Asn			
Asp	Trp	Ile	Val	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gln	Ala			
Phe	Tyr	Cys	His	Gly	Asp	Cys	Pro	Phe	Pro	Leu			
Ala	Asp	His	Leu	Asn	Ser	Thr	Asn	His	Ala	Ile			
Val	Gln	Thr	Leu	Val	Asn	Ser	Val	Asn	Ser	Ser			
Ile	Pro	Lys	Ala	Cys	Cys	Val	Pro	Thr	Glu	Leu			
Ser	Ala	Ile	Ser	Met	Leu	Tyr	Leu	Asp	Glu	Tyr			
Asp	Lys	Val	Val	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gln	Glu	Met			
Val	Val	Glu	Gly	Cys	Gly	Cys	Arg						

10

20

(2) 配列番号11についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:102アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

30

(ix) 特色:

(A) 名称:DPP (fx)

(xi) 配列表記:配列番号11

Cys Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser
 1 5 10
 Asp Val Gly Trp Asp Asp Trp Ile Val Ala Pro
 15 20
 Leu Gly Tyr Asp Ala Tyr Tyr Cys His Gly Lys
 25 30
 Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Phe Asn Ser
 35 40
 Thr Asn His Ala Val Val Gln Thr Leu Val Asn
 45 50 55
 Asn Asn Asn Pro Gly Lys Val Pro Lys Ala Cys
 60 65
 Cys Val Pro Thr Gln Leu Asp Ser Val Ala Met
 70 75
 Leu Tyr Leu Asn Asp Gln Ser Thr Val Val Leu
 80 85
 Lys Asn Tyr Gln Glu Met Thr Val Val Gly Cys
 90 95
 Gly Cys Arg
 100

10

20

(2) 配列番号12についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:102アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

30

(ix) 特色:

(A) 名称:Vgr (fx)

(xi) 配列表記:配列番号12

Cys Lys Lys Arg His Leu Tyr Val Glu Phe Lys
 1 5 10
 Asp Val Gly Trp Gln Asn Trp Val Ile Ala Pro
 15 20
 Gln Gly Tyr Met Ala Asn Tyr Cys Tyr Gly Glu
 25 30
 Cys Pro Tyr Pro Leu Thr Glu Ile Leu Asn Gly
 35 40
 Ser Asn His Ala Ile Leu Gln Thr Leu Val His
 45 50 55
 Ser Ile Glu Pro Glu Asp Ile Pro Leu Pro Cys
 60 65
 Cys Val Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Ser Met
 70 75
 Leu Phe Tyr Asp Asn Asn Asp Asn Val Val Leu
 80 85
 Arg His Tyr Glu Asn Met Ala Val Asp Glu Cys
 90 95
 Gly Cys Arg
 100

10

20

(2) 配列番号13についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:102アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

30

(ix) 特色:

(A) 名称:Vgl-1 (fx)

(xi) 配列表記:配列番号13

Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln
 1 5 10
 Asp Val Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro
 15 20
 Xaa Gly Tyr Ala Ala Asn Tyr Cys Asp Gly Glu
 25 30
 Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala
 35 40
 Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His
 45 50 55
 Val Met Asn Pro Glu Tyr Val Pro Lys Pro Cys
 60 65
 Cys Ala Pro Thr Lys Val Asn Ala Ile Ser Val
 70 75
 Leu Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Leu
 80 85
 Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys
 90 95
 Gly Cys His
 100

10

20

(2) 配列番号14についての知見

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：106アミノ酸

(B) タイプ：蛋白

(C) 鎖数：一本鎖

(D) 形態：直線状

30

(ii) 分子タイプ：蛋白

(vi) 由来：

(A) 生物体：ヒト

(F) 組織型：脳

(ix) 特色：

(D) 他の情報：/産生物 = “ GDF-1 (fx) ”

(xi) 配列表記：配列番号14

Cys Arg Ala Arg Arg Leu Tyr Val Ser Phe Arg Glu Val Gly
 1 5 10
 Trp His Arg Trp Val Ile Ala Pro Arg Gly Phe Leu Ala Asn Tyr
 15 20 25
 Cys Gln Gly Gln Cys Ala Leu Pro Val Ala Leu Ser Gly Ser Gly
 30 35 40
 Gly Pro Pro Ala Leu Asn His Ala Val Leu Arg Ala Leu Met His
 45 50 55
 Ala Ala Ala Pro Gly Ala Ala Asp Leu Pro Cys Cys Val Pro Ala
 60 65 70
 Arg Leu Ser Pro Ile Ser Val Leu Phe Phe Asp Asn Ser Asp Asn
 75 80 85
 Val Val Leu Arg Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly
 90 95 100

10

Cys Arg
105

(2) 配列番号15についての知見

(i) 配列の特徴：

20

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖数:一本鎖

(D) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(xi) 配列表記:配列番号15

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

(2) 配列番号16についての知見

(i) 配列の特徴：

30

(A) 長さ:1822塩基対

(B) タイプ:核酸

(C) 鎖数:一本鎖

(D) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:cDNA

(vi) 由来:

(A) 生物:ホモサピエンス

(F) 組織型:海馬

(ix) 特色:

(A) 名称/キー:CDS

40

(B) 部位:49..1341

(D) 他の情報:標準名称="h0P1"

(xi) 配列表記:配列番号16

GGTGCGGGCC CGGAGCCCGG AGCCCGGGTA GCGCGTAGAG CCGGCGCG	ATG CAC GTG	57	
	Met His Val		
	1		
CGC TCA CTG CGA GCT GCG GCG CCG CAC AGC TTC GTG GCG CTC TGG GCA		105	
Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala			
5 10 15			
CCC CTG TTC CTG CTG CGC TCC GCC CTG GCC GAC TTC AGC CTG GAC AAC		153	
Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Asn			
20 25 30 35			
GAG GTG CAC TCG AGC TTC ATC CAC CGG CGC CTC CGC AGC CAG GAG CGG		201	10
Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Gln Glu Arg			
40 45 50			
CGG GAG ATG CAG CGC GAG ATC CTC TCC ATT TTG GGC TTG CCC CAC CGC		249	
Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu Pro His Arg			
55 60 65			

CCG CGC CCG CAC CTC CAG GGC AAG CAC AAC TCG GCA CCC ATG TTC ATG Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro Met Phe Met 70 75 80	297	
CTG GAC CTG TAC AAC GCC ATG GCG GTG GAG GAG GGC GGC GGG CCC GGC Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly Gly Pro Gly 85 90 95	345	
GGC CAG GGC TTC TCC TAC CCC TAC AAG GCC GTC TTC AGT ACC CAG GGC Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr Gln Gly 100 105 110 115	393	
CCC CCT CTG GCC AGC CTG CAA GAT AGC CAT TTC CTC ACC GAC GCC GAC Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr Asp Ala Asp 120 125 130	441	10
ATG GTC ATG AGC TTC GTC AAC CTC GTG GAA CAT GAC AAG GAA TTC TTC Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys Glu Phe Phe 135 140 145	489	
CAC CCA CGC TAC CAC CAT CGA GAG TTC CGG TTT GAT CTT TCC AAG ATC His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser Lys Ile 150 155 160	537	
CCA GAA GGC GAA GCT GTC ACG GCA GCC GAA TTC CGG ATC TAC AAG GAC Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Asp 165 170 175	585	20
TAC ATC CGG GAA CGC TTC GAC AAT GAG ACG TTC CGG ATC AGC GTT TAT Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile Ser Val Tyr 180 185 190 195	633	
CAG GTG CTC CAG GAG CAC TTG GGC AGG GAA TCG GAT CTC TTC CTG CTC Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe Leu Leu 200 205 210	681	
GAC AGC CGT ACC CTC TGG GCC TCG GAG GAG GGC TGG CTG GTG TTT GAC Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu Val Phe Asp 215 220 225	729	30
ATC ACA GCC ACC AGC AAC CAC TGG GTG GTC AAT CCG CGG CAC AAC CTG Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg His Asn Leu 230 235 240	777	
GGC CTG CAG CTC TCG GTG GAG ACG CTG GAT GGG CAG AGC ATC AAC CCC Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser Ile Asn Pro 245 250 255	825	
AAG TTG GCG GGC CTG ATT GGG CGG CAC GGG CCC CAG AAC AAG CAG CCC Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn Lys Gln Pro 260 265 270 275	873	40

TTC ATG GTG GCT TTC TTC AAG GCC ACG GAG GTC CAC TTC CGC AGC ATC Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe Arg Ser Ile 280 285 290	921	
CGG TCC ACG GGG AGC AAA CAG CGC AGC CAG AAC CGC TCC AAG ACG CCC Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro 295 300 305	969	
AAG AAC CAG GAA GCC CTG CGG ATG GCC AAC GTG GCA GAG AAC AGC AGC Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser 310 315 320	1017	
AGC GAC CAG AGG CAG GCC TGT AAG AAG CAC GAG CTG TAT GTC AGC TTC Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe 325 330 335	1065	10
CGA GAC CTG GGC TGG CAG GAC TGG ATC ATC GCG CCT GAA GGC TAC GCC Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala 340 345 350 355	1113	
GCC TAC TAC TGT GAG GGG GAG TGT GCC TTC CCT CTG AAC TCC TAC ATG Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met 360 365 370	1161	
AAC GCC ACC AAC CAC GCC ATC GTG CAG ACG CTG GTC CAC TTC ATC AAC Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn 375 380 385	1209	20
CCG GAA ACG GTG CCC AAG CCC TGC TGT GCG CCC ACG CAG CTC AAT GCC Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala 390 395 400	1257	
ATC TCC GTC CTC TAC TTC GAT GAC AGC TCC AAC GTC ATC CTG AAG AAA Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys 405 410 415	1305	
TAC AGA AAC ATG GTG GTC CGG GCC TGT GGC TGC CAC TAGCTCCTCC Tyr Arg Asn Met Val Arg Ala Cys Gly Cys His 420 425 430	1351	30
GAGAATTCAG ACCCTTTGGG GCCAAGTTTT TCTGGATCCT CCATTGCTCG CCTTGGCCAG	1411	
GAACCAGCAG ACCAACTGCC TTTTGTGAGA CCTTCCCCTC CCTATCCCCA ACTTTAAAGG	1471	
TGTGAGAGTA TTAGGAAACA TGAGCAGCAT ATGGCTTTTG ATCAGTTTTT CAGTGGCAGC	1531	
ATCCAATGAA CAAGATCCTA CAAGCTGTGC AGGCAAAACC TAGCAGGAAA AAAAAACAAC	1591	
GCATAAAGAA AAATGGCCGG GCCAGGTCAT TGGCTGGGAA GTCTCAGCCA TGCACGGACT	1651	
CGTTTCCAGA GGTAATTATG AGCGCCTACC AGCCAGGCCA CCCAGCCGTG GGAGGAAGGG	1711	40
GGCGTGGCAA GGGGTGGGCA CATTGGTGTG TGTGCGAAAG GAAAATTGAC CCGGAAGTTC	1771	
CTGTAATAAAA TGTCACAATA AAACGAATGA ATGAAAAAAA AAAAAAAAAA A	1822	

(2) 配列番号17についての知見

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ:431アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(C) 形態：直線状

(ii) 分子タイプ：蛋白

(ix) 特色：

(D) 他の情報：/産生物 = "OP1-PP"

(xi) 配列表記：配列番号17

Met	His	Val	Arg	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	Ala	Pro	His	Ser	Phe	Val	Ala	
1				5					10					15		
Leu	Trp	Ala	Pro	Leu	Phe	Leu	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	Ala	Asp	Phe	Ser	
			20					25					30			
Leu	Asp	Asn	Glu	Val	His	Ser	Ser	Phe	Ile	His	Arg	Arg	Leu	Arg	Ser	
		35					40					45				
Gln	Glu	Arg	Arg	Glu	Met	Gln	Arg	Glu	Ile	Leu	Ser	Ile	Leu	Gly	Leu	
	50					55					60					
Pro	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Leu	Gln	Gly	Lys	His	Asn	Ser	Ala	Pro	
	65				70					75					80	
Met	Phe	Met	Leu	Asp	Leu	Tyr	Asn	Ala	Met	Ala	Val	Glu	Glu	Gly	Gly	
			85					90						95		
Gly	Pro	Gly	Gly	Gln	Gly	Phe	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Lys	Ala	Val	Phe	Ser	
		100						105					110			
Thr	Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Ala	Ser	Leu	Gln	Asp	Ser	His	Phe	Leu	Thr	
		115					120					125				
Asp	Ala	Asp	Met	Val	Met	Ser	Phe	Val	Asn	Leu	Val	Glu	His	Asp	Lys	
	130					135					140					
Glu	Phe	Phe	His	Pro	Arg	Tyr	His	His	Arg	Glu	Phe	Arg	Phe	Asp	Leu	
	145				150					155					160	
Ser	Lys	Ile	Pro	Glu	Gly	Glu	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Glu	Phe	Arg	Ile	
			165						170					175		
Tyr	Lys	Asp	Tyr	Ile	Arg	Glu	Arg	Phe	Asp	Asn	Glu	Thr	Phe	Arg	Ile	
		180					185						190			
Ser	Val	Tyr	Gln	Val	Leu	Gln	Glu	His	Leu	Gly	Arg	Glu	Ser	Asp	Leu	
		195				200						205				

10

20

30

Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu
 210 215 220
 Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg
 225 230 235 240
 His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser
 245 250 255
 Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn
 260 265 270
 Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe
 275 280 285
 Arg Ser Ile Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser
 290 295 300
 Lys Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu
 305 310 315 320
 Asn Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr
 325 330 335
 Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu
 340 345 350
 Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn
 355 360 365
 Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His
 370 375 380
 Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln
 385 390 395 400
 Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile
 405 410 415
 Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 420 425 430

10

20

30

(2) 配列番号18についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:1873塩基対

(B) タイプ:核酸

(C) 鎖数:一本鎖

(D) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:cDNA

40

(vi) 由来:

(A) 生物体:ネズミ科

(F) 組織型:胎児

(ix) 特色:

(A) 名称/キー:CDS

(B) 部位:104..1393

(D) 他の情報:/注解="MOP1 (CDNA) "

(xi) 配列表記:配列番号18

CTGCAGCAAG TGACCTCGGG TCGTGGACCG CTGCCCTGCC CCCTCCGCTG CCACCTGGGG	60	
CGGCGCGGGC CCGGTGCCCC GGATCGCGCG TAGAGCCGGC GCG ATG CAC GTG CGC	115	
		Met His Val Arg
		1
TCG CTG CGC GCT GCG GCG CCA CAC AGC TTC GTG GCG CTC TGG GCG CCT	163	
Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala Pro		
5 10 15 20		
CTG TTC TTG CTG CGC TCC GCC CTG GCC GAT TTC AGC CTG GAC AAC GAG	211	
Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Asn Glu		
25 30 35		
GTG CAC TCC AGC TTC ATC CAC CGG CGC CTC CGC AGC CAG GAG CGG CGG	259	
Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Gln Glu Arg Arg		
40 45 50		
GAG ATG CAG CGG GAG ATC CTG TCC ATC TTA GGG TTG CCC CAT CGC CCG	307	
Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu Pro His Arg Pro		
55 60 65		
CGC CCG CAC CTC CAG GGA AAG CAT AAT TCG GCG CCC ATG TTC ATG TTG	355	
Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro Met Phe Met Leu		
70 75 80		
GAC CTG TAC AAC GCC ATG GCG GTG GAG GAG AGC GGG CCG GAC GGA CAG	403	
Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Ser Gly Pro Asp Gly Gln		
85 90 95 100		

10

20

GGC	TTC	TCC	TAC	CCC	TAC	AAG	GCC	GTC	TTC	AGT	ACC	CAG	GGC	CCC	CCT	451	
Gly	Phe	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Lys	Ala	Val	Phe	Ser	Thr	Gln	Gly	Pro	Pro		
				105					110					115			
TTA	GCC	AGC	CTG	CAG	GAC	AGC	CAT	TTC	CTC	ACT	GAC	GCC	GAC	ATG	GTC	499	
Leu	Ala	Ser	Leu	Gln	Asp	Ser	His	Phe	Leu	Thr	Asp	Ala	Asp	Met	Val		
			120					125					130				
ATG	AGC	TTC	GTC	AAC	CTA	GTG	GAA	CAT	GAC	AAA	GAA	TTC	TTC	CAC	CCT	547	
Met	Ser	Phe	Val	Asn	Leu	Val	Glu	His	Asp	Lys	Glu	Phe	Phe	His	Pro		
		135					140					145					
CGA	TAC	CAC	CAT	CGG	GAG	TTC	CGG	TTT	GAT	CTT	TCC	AAG	ATC	CCC	GAG	595	10
Arg	Tyr	His	His	Arg	Glu	Phe	Arg	Phe	Asp	Leu	Ser	Lys	Ile	Pro	Glu		
	150				155						160						
GGC	GAA	CGG	GTG	ACC	GCA	GCC	GAA	TTC	AGG	ATC	TAT	AAG	GAC	TAC	ATC	643	
Gly	Glu	Arg	Val	Thr	Ala	Ala	Glu	Phe	Arg	Ile	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Ile		
	165				170					175					180		
CGG	GAG	CGA	TTT	GAC	AAC	GAG	ACC	TTC	CAG	ATC	ACA	GTC	TAT	CAG	GTG	691	
Arg	Glu	Arg	Phe	Asp	Asn	Glu	Thr	Phe	Gln	Ile	Thr	Val	Tyr	Gln	Val		
			185						190					195			
CTC	CAG	GAG	CAC	TCA	GGC	AGG	GAG	TCG	GAC	CTC	TTC	TTG	CTG	GAC	AGC	739	20
Leu	Gln	Glu	His	Ser	Gly	Arg	Glu	Ser	Asp	Leu	Phe	Leu	Leu	Asp	Ser		
			200					205					210				
CGC	ACC	ATC	TGG	GCT	TCT	GAG	GAG	GGC	TGG	TTG	GTG	TTT	GAT	ATC	ACA	787	
Arg	Thr	Ile	Trp	Ala	Ser	Glu	Glu	Gly	Trp	Leu	Val	Phe	Asp	Ile	Thr		
		215					220					225					
GCC	ACC	AGC	AAC	CAC	TGG	GTG	GTC	AAC	CCT	CGG	CAC	AAC	CTG	GGC	TTA	835	
Ala	Thr	Ser	Asn	His	Trp	Val	Val	Asn	Pro	Arg	His	Asn	Leu	Gly	Leu		
	230					235					240						
CAG	CTC	TCT	GTG	GAG	ACC	CTG	GAT	GGG	CAG	AGC	ATC	AAC	CCC	AAG	TTG	883	
Gln	Leu	Ser	Val	Glu	Thr	Leu	Asp	Gly	Gln	Ser	Ile	Asn	Pro	Lys	Leu		
	245				250					255					260		30
GCA	GGC	CTG	ATT	GGA	CGG	CAT	GGA	CCC	CAG	AAC	AAG	CAA	CCC	TTC	ATG	931	
Ala	Gly	Leu	Ile	Gly	Arg	His	Gly	Pro	Gln	Asn	Lys	Gln	Pro	Phe	Met		
			265						270					275			
GTG	GCC	TTC	TTC	AAG	GCC	ACG	GAA	GTC	CAT	CTC	CGT	AGT	ATC	CGG	TCC	979	
Val	Ala	Phe	Phe	Lys	Ala	Thr	Glu	Val	His	Leu	Arg	Ser	Ile	Arg	Ser		
			280					285					290				
ACG	GGG	GGC	AAG	CAG	CGC	AGC	CAG	AAT	CGC	TCC	AAG	ACG	CCA	AAG	AAC	1027	
Thr	Gly	Gly	Lys	Gln	Arg	Ser	Gln	Asn	Arg	Ser	Lys	Thr	Pro	Lys	Asn		
		295					300					305					40
CAA	GAG	GCC	CTG	AGG	ATG	GCC	AGT	GTG	GCA	GAA	AAC	AGC	AGC	AGT	GAC	1075	
Gln	Glu	Ala	Leu	Arg	Met	Ala	Ser	Val	Ala	Glu	Asn	Ser	Ser	Ser	Asp		
	310					315					320						

CAG AGG CAG GCC TGC AAG ¹ AAA CAT GAG CTG TAC GTC AGC TTC CGA GAC Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp 325 330 335 340	1123	
CTT GGC TGG CAG GAC TGG ATC ATT GCA CCT GAA GGC TAT GCT GCC TAC Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr 345 350 355	1171	
TAC TGT GAG GGA GAG TGC GCC TTC CCT CTG AAC TCC TAC ATG AAC GCC Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala 360 365 370	1219	
ACC AAC CAC GCC ATC GTC CAG ACA CTG GTT CAC TTC ATC AAC CCA GAC Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro Asp 375 380 385	1267	10
ACA GTA CCC AAG CCC TGC TGT GCG CCC ACC CAG CTC AAC GCC ATC TCT Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile Ser 390 395 400	1315	
GTC CTC TAC TTC GAC GAC AGC TCT AAT GTC ATC CTG AAG AAG TAC AGA Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg 405 410 415 420	1363	
AAC ATG GTG GTC CGG GCC TGT GGC TGC CAC TAGCTCTTCC TGAGACCCTG Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His 425 430	1413	20
ACCTTTGCGG GGCCACACCT TTCCAAATCT TCGATGTCTC ACCATCTAAG TCTCTCACTG	1473	
CCCACCTTGG CGAGGAGAAC AGACCAACCT CTCCTGAGCC TTCCCTCACC TCCCAACCGG	1533	
AAGCATGTAA GGGTTCCAGA AACCTGAGCG TGCAGCAGCT GATGAGCGCC CTTTCCTTCT	1593	
GGCACGTGAC GGACAAGATC CTACCAGCTA CCACAGCAAA CGCCTAAGAG CAGGAAAAAT	1653	
GTCTGCCAGG AAAGTGTCCA GTGTCCACAT GGCCCCCTGGC GCTCTGAGTC TTTGAGGAGT	1713	
AATCGCAAGC CTCGTTTCAGC TGCAGCAGAA GGAAGGGCTT AGCCAGGGTG GGCGCTGGCG	1773	30
TCTGTGTTGA AGGGAAACCA AGCAGAAGCC ACTGTAATGA TATGTCACAA TAAAACCCAT	1833	
GAATGAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAGAATTC	1873	

(2) 配列番号19についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:430アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

(ix) 特色:

(D) 他の情報:/産生物="mOP1-PP"

(xi) 配列表記:配列番号19

Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala
 1 5 10 15
 Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser
 20 25 30
 Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
 35 40 45
 Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
 50 55 60
 Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
 65 70 75 80
 Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Ser Gly
 85 90 95
 Pro Asp Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr
 100 105 110
 Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr Asp
 115 120 125
 Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys Glu
 130 135 140 20
 Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser
 145 150 155 160
 Lys Ile Pro Glu Gly Glu Arg Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Gln Ile Thr
 180 185 190
 Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Ser Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe
 195 200 205 30

10

20

30

Leu Leu Asp Ser Arg Thr Ile Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu Val
 210 215 220
 Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg His
 225 230 235 240
 Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser Ile
 245 250 255
 Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn Lys
 260 265 270
 Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Leu Arg
 275 280 285
 Ser Ile Arg Ser Thr Gly Gly Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys
 290 295 300
 Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Ser Val Ala Glu Asn
 305 310 315 320
 Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val
 325 330 335
 Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly
 340 345 350
 Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser
 355 360 365
 Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe
 370 375 380
 Ile Asn Pro Asp Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu
 385 390 395 400
 Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu
 405 410 415
 Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 420 425 430

10

20

30

(2) 配列番号20についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:1723塩基対

(B) タイプ:核酸

(C) 鎖数:一本鎖

(D) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:cDNA

40

(vi) 由来:

(A) 生物体:ホモサピエンス

(F) 組織型:海馬

(ix) 特色:

(A) 名称/キー:CDS

(B) 部位:490..1696

(D) 他の情報:/注記=" hOP2 (cDNA) "

(xi) 配列表記:配列番号20

GGCGCCGGCA GAGCAGGAGT GGCTGGAGGA GCTGTGGTTG GAGCAGGAGG TGGCACGGCA	60	
GGGCTGGAGG GCTCCCTATG AGTGGCGGAG ACGGCCCAGG AGGCGCTGGA GCAACAGCTC	120	
CCACACCGCA CCAAGCGGTG GCTGCAGGAG CTCGCCCATC GCCCCTGCGC TGCTCGGACC	180	
GCGGCCACAG CCGGACTGGC GGGTACGGCG GCGACAGAGG CATTGGCCGA GAGTCCCACT	240	
CCGCAGAGTA GCGCCGGCCT CGAGGCGGTG GCGTCCCGGT CCTCTCCGTC CAGGAGCCAG	300	
GACAGGTGTC GCGCGGCGGG GCTCCAGGGA CCGCGCCTGA GGCCGGCTGC CCGCCCGTCC	360	
CGCCCCGCCC CGCCGCCCCG CGCCCGCCGA GCCCAGCCTC CTTGCCGTCG GGGCGTCCCC	420	10
AGGCCCTGGG TCGGCCGCGG AGCCGATGCG CGCCCGCTGA GCGCCCCAGC TGAGCGCCCC	480	
CGGCCTGCC ATG ACC GCG CTC CCC GGC CCG CTC TGG CTC CTG GGC CTG	528	
Met Thr Ala Leu Pro Gly Pro Leu Trp Leu Leu Gly Leu		
1 5 10		
GCG CTA TGC GCG CTG GGC GGG GGC GGC CCC GGC CTG CGA CCC CCG CCC	576	
Ala Leu Cys Ala Leu Gly Gly Gly Gly Pro Gly Leu Arg Pro Pro Pro		
15 20 25		
GGC TGT CCC CAG CGA CGT CTG GGC GCG CGC GAG CGC CGG GAC GTG CAG	624	20
Gly Cys Pro Gln Arg Arg Leu Gly Ala Arg Glu Arg Arg Asp Val Gln		
30 35 40 45		
CGC GAG ATC CTG GCG GTG CTC GGG CTG CCT GGG CGG CCC CGG CCC CGC	672	
Arg Glu Ile Leu Ala Val Leu Gly Leu Pro Gly Arg Pro Arg Pro Arg		
50 55 60		

GCG CCA CCC GCC GCC TCC CGG CTG CCC GCG TCC GCG CCG CTC TTC ATG Ala Pro Pro Ala Ala Ser Arg Leu Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met 65 70 75	720	
CTG GAC CTG TAC CAC GCC ATG GCC GGC GAC GAC GAC GAG GAC GGC GCG Leu Asp Leu Tyr His Ala Met Ala Gly Asp Asp Asp Glu Asp Gly Ala 80 85 90	768	
CCC GCG GAG CCG CGC CTG GGC CGC GCC GAC CTG GTC ATG AGC TTC GTT Pro Ala Glu Arg Arg Leu Gly Arg Ala Asp Leu Val Met Ser Phe Val 95 100 105	816	
AAC ATG GTG GAG CGA GAC CGT GCC CTG GGC CAC CAG GAG CCC CAT TGG Asn Met Val Glu Arg Asp Arg Ala Leu Gly His Gln Glu Pro His Trp 110 115 120 125	864	10
AAG GAG TTC CGC TTT GAC CTG ACC CAG ATC CCG GCT GGG GAG GCG GTC Lys Glu Phe Arg Phe Asp Leu Thr Gln Ile Pro Ala Gly Glu Ala Val 130 135 140	912	
ACA GCT GCG GAG TTC CGG ATT TAC AAG GTG CCC AGC ATC CAC CTG CTC Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Val Pro Ser Ile His Leu Leu 145 150 155	960	
AAC AGG ACC CTC CAC GTC AGC ATG TTC CAG GTG GTC CAG GAG CAG TCC Asn Arg Thr Leu His Val Ser Met Phe Gln Val Val Gln Glu Gln Ser 160 165 170	1008	20
AAC AGG GAG TCT GAC TTG TTC TTT TTG GAT CTT CAG ACG CTC CGA GCT Asn Arg Glu Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp Leu Gln Thr Leu Arg Ala 175 180 185	1056	
GGA GAC GAG GGC TGG CTG GTG CTG GAT GTC ACA GCA GCC AGT GAC TGC Gly Asp Glu Gly Trp Leu Val Leu Asp Val Thr Ala Ala Ser Asp Cys 190 195 200 205	1104	
TGG TTG CTG AAG CGT CAC AAG GAC CTG GGA CTC CGC CTC TAT GTG GAG Trp Leu Leu Lys Arg His Lys Asp Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Val Glu 210 215 220	1152	30
ACT GAG GAC GGG CAC AGC GTG GAT CCT GGC CTG GCC GGC CTG CTG GGT Thr Glu Asp Gly His Ser Val Asp Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly 225 230 235	1200	
CAA CGG GCC CCA CGC TCC CAA CAG CCT TTC GTG GTC ACT TTC TTC AGG Gln Arg Ala Pro Arg Ser Gln Gln Pro Phe Val Val Thr Phe Phe Arg 240 245 250	1248	
GCC AGT CCG AGT CCC ATC CGC ACC CCT CGG GCA GTG AGG CCA CTG AGG Ala Ser Pro Ser Pro Ile Arg Thr Pro Arg Ala Val Arg Pro Leu Arg 255 260 265	1296	40

AGG	AGG	CAG	CCG	AAG	AAA	AGC	AAC	GAG	CTG	CCG	CAG	GCC	AAC	CGA	CTC	1344	
Arg	Arg	Gln	Pro	Lys	Lys	Ser	Asn	Glu	Leu	Pro	Gln	Ala	Asn	Arg	Leu		
270					275					280					285		
CCA	GGG	ATC	TTT	GAT	GAC	GTC	CAC	GGC	TCC	CAC	GGC	CGG	CAG	GTC	TGC	1392	
Pro	Gly	Ile	Phe	Asp	Asp	Val	His	Gly	Ser	His	Gly	Arg	Gln	Val	Cys		
				290					295					300			
CGT	CGG	CAC	GAG	CTC	TAC	GTC	AGC	TTC	CAG	GAC	CTC	GGC	TGG	CTG	GAC	1440	
Arg	Arg	His	Glu	Leu	Tyr	Val	Ser	Phe	Gln	Asp	Leu	Gly	Trp	Leu	Asp		
			305					310					315				
TGG	GTC	ATC	GCT	CCC	CAA	GGC	TAC	TCG	GCC	TAT	TAC	TGT	GAG	GGG	GAG	1488	10
Trp	Val	Ile	Ala	Pro	Gln	Gly	Tyr	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu		
		320				325						330					
TGC	TCC	TTC	CCA	CTG	GAC	TCC	TGC	ATG	AAT	GCC	ACC	AAC	CAC	GCC	ATC	1536	
Cys	Ser	Phe	Pro	Leu	Asp	Ser	Cys	Met	Asn	Ala	Thr	Asn	His	Ala	Ile		
	335					340					345						
CTG	CAG	TCC	CTG	GTG	CAC	CTG	ATG	AAG	CCA	AAC	GCA	GTC	CCC	AAG	GCG	1584	
Leu	Gln	Ser	Leu	Val	His	Leu	Met	Lys	Pro	Asn	Ala	Val	Pro	Lys	Ala		
350					355					360					365		
TGC	TGT	GCA	CCC	ACC	AAG	CTG	AGC	GCC	ACC	TCT	GTG	CTC	TAC	TAT	GAC	1632	20
Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Lys	Leu	Ser	Ala	Thr	Ser	Val	Leu	Tyr	Tyr	Asp		
				370					375					380			
AGC	AGC	AAC	AAC	GTC	ATC	CTG	CGC	AAA	CAC	CGC	AAC	ATG	GTG	GTC	AAG	1680	
Ser	Ser	Asn	Asn	Val	Ile	Leu	Arg	Lys	His	Arg	Asn	Met	Val	Val	Lys		
			385					390					395				
GCC	TGC	GGC	TGC	CAC	T	GAGTCAGCCC	GCCCAGCCCT	ACTGCAG								1723	
Ala	Cys	Gly	Cys	His													
			400														

(2) 配列番号21についての知見

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：402アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(D) 形態：直線状

(ii) 分子タイプ：蛋白

(ix) 特色：

(A) 他情報：/産生物 = "hOP2-PP"

(xi) 配列表記：配列番号21

Met Thr Ala Leu Pro Gly Pro Leu Trp Leu Leu Gly Leu Ala Leu Cys
 1 5 10 15
 Ala Leu Gly Gly Gly Gly Pro Gly Leu Arg Pro Pro Pro Gly Cys Pro
 20 25 30
 Gln Arg Arg Leu Gly Ala Arg Glu Arg Arg Asp Val Gln Arg Glu Ile
 35 40 45
 Leu Ala Val Leu Gly Leu Pro Gly Arg Pro Arg Pro Arg Ala Pro Pro
 50 55 60
 Ala Ala Ser Arg Leu Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu
 65 70 75 80
 Tyr His Ala Met Ala Gly Asp Asp Asp Glu Asp Gly Ala Pro Ala Glu
 85 90 95
 Arg Arg Leu Gly Arg Ala Asp Leu Val Met Ser Phe Val Asn Met Val
 100 105 110
 Glu Arg Asp Arg Ala Leu Gly His Gln Glu Pro His Trp Lys Glu Phe
 115 120 125
 Arg Phe Asp Leu Thr Gln Ile Pro Ala Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala
 130 135 140
 Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Val Pro Ser Ile His Leu Leu Asn Arg Thr
 145 150 155 160
 Leu His Val Ser Met Phe Gln Val Val Gln Glu Gln Ser Asn Arg Glu
 165 170 175
 Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp Leu Gln Thr Leu Arg Ala Gly Asp Glu
 180 185 190
 Gly Trp Leu Val Leu Asp Val Thr Ala Ala Ser Asp Cys Trp Leu Leu
 195 200 205

10

20

30

Lys Arg His Lys Asp Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Val Glu Thr Glu Asp
 210 215 220
 Gly His Ser Val Asp Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Gln Arg Ala
 225 230 235 240
 Pro Arg Ser Gln Gln Pro Phe Val Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Pro
 245 250 255
 Ser Pro Ile Arg Thr Pro Arg Ala Val Arg Pro Leu Arg Arg Arg Gln
 260 265 270
 Pro Lys Lys Ser Asn Glu Leu Pro Gln Ala Asn Arg Leu Pro Gly Ile
 275 280 285
 Phe Asp Asp Val His Gly Ser His Gly Arg Gln Val Cys Arg Arg His
 290 295 300
 Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile
 305 310 315 320
 Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ser Phe
 325 330 335
 Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Gln Ser
 340 345 350
 Leu Val His Leu Met Lys Pro Asn Ala Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala
 355 360 365
 Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn
 370 375 380
 Asn Val Ile Leu Arg Lys His Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly
 385 390 395 400

10

20

Cys His

30

(2) 配列番号22についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:1926塩基対

(B) タイプ:核酸

(C) 鎖数:一本鎖

(D) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:cDNA

(vi) 由来:

(A) 生物体:ネズミ科

(F) 組織型:胎児

(ix) 特色:

(A) 名称/キー:CDS

(B) 部位:93....1289

(D) 他の情報:/注記=" mOP2 cDNA"

40

GCCAGGCACA GGTGCGCCGT CTGGTCCTCC CCGTCTGGCG TCAGCCGAGC	50	
CCGACCAGCT ACCAGTGGAT GCGCGCCGGC TGAAAGTCCG AG ATG GCT ATG CGT	104	
Met Ala Met Arg		
1		
CCC GGG CCA CTC TGG CTA TTG GGC CTT GCT CTG TGC GCG CTG GGA GGC	152	
Pro Gly Pro Leu Trp Leu Leu Gly Leu Ala Leu Cys Ala Leu Gly Gly		
5 10 15 20		
GGC CAC GGT CCG CGT CCC CCG CAC ACC TGT CCC CAG CGT CGC CTG GGA	200	
Gly His Gly Pro Arg Pro Pro His Thr Cys Pro Gln Arg Arg Leu Gly		
25 30 35		
GCG CGC GAG CGC CGC GAC ATG CAG CGT GAA ATC CTG GCG GTG CTC GGG	248	
Ala Arg Glu Arg Arg Asp Met Gln Arg Glu Ile Leu Ala Val Leu Gly		
40 45 50		
CTA CCG GGA CGG CCC CGA CCC CGT GCA CAA CCC GCG GCT GCC CGG CAG	296	
Leu Pro Gly Arg Pro Arg Pro Arg Ala Gln Pro Ala Ala Ala Arg Gln		
55 60 65		
CCA GCG TCC GCG CCC CTC TTC ATG TTG GAC CTA TAC CAC GCC ATG ACC	344	
Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu Tyr His Ala Met Thr		
70 75 80		
GAT GAC GAC GAC GGC GGG CCA CCA CAG GCT CAC TTA GGC CGT GCC GAC	392	
Asp Asp Asp Asp Gly Gly Pro Pro Gln Ala His Leu Gly Arg Ala Asp		
85 90 95 100		

10

20

CTG GTC ATG AGC TTC GTC AAC ATG GTG GAA CGC GAC CGT ACC CTG GGC Leu Val Met Ser Phe Val Asn Met Val Glu Arg Asp Arg Thr Leu Gly 105 110 115	440	
TAC CAG GAG CCA CAC TGG AAG GAA TTC CAC TTT GAC CTA ACC CAG ATC Tyr Gln Glu Pro His Trp Lys Glu Phe His Phe Asp Leu Thr Gln Ile 120 125 130	488	
CCT GCT GGG GAG GCT GTC ACA GCT GCT GAG TTC CGG ATC TAC AAA GAA Pro Ala Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Glu 135 140 145	536	
CCC AGC ACC CAC CCG CTC AAC ACA ACC CTC CAC ATC AGC ATG TTC GAA Pro Ser Thr His Pro Leu Asn Thr Thr Leu His Ile Ser Met Phe Glu 150 155 160	584	10
GTG GTC CAA GAG CAC TCC AAC AGG GAG TCT GAC TTG TTC TTT TTG GAT Val Val Gln Glu His Ser Asn Arg Glu Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp 165 170 175 180	632	
CTT CAG ACG CTC CGA TCT GGG GAC GAG GGC TGG CTG GTG CTG GAC ATC Leu Gln Thr Leu Arg Ser Gly Asp Glu Gly Trp Leu Val Leu Asp Ile 185 190 195	680	
ACA GCA GCC AGT GAC CGA TGG CTG CTG AAC CAT CAC AAG GAC CTG GGA Thr Ala Ala Ser Asp Arg Trp Leu Leu Asn His His Lys Asp Leu Gly 200 205 210	728	20
CTC CGC CTC TAT GTG GAA ACC GCG GAT GGG CAC AGC ATG GAT CCT GGC Leu Arg Leu Tyr Val Glu Thr Ala Asp Gly His Ser Met Asp Pro Gly 215 220 225	776	
CTG GCT GGT CTG CTT GGA CGA CAA GCA CCA CGC TCC AGA CAG CCT TTC Leu Ala Gly Leu Leu Gly Arg Gln Ala Pro Arg Ser Arg Gln Pro Phe 230 235 240	824	
ATG GTA ACC TTC TTC AGG GCC AGC CAG AGT CCT GTG CGG GCC CCT CGG Met Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Gln Ser Pro Val Arg Ala Pro Arg 245 250 255 260	872	30
GCA GCG AGA CCA CTG AAG AGG AGG CAG CCA AAG AAA ACG AAC GAG CTT Ala Ala Arg Pro Leu Lys Arg Arg Gln Pro Lys Lys Thr Asn Glu Leu 265 270 275	920	
CCG CAC CCC AAC AAA CTC CCA GGG ATC TTT GAT GAT GGC CAC GGT TCC Pro His Pro Asn Lys Leu Pro Gly Ile Phe Asp Asp Gly His Gly Ser 280 285 290	968	
CGC GGC AGA GAG GTT TGC CGC AGG CAT GAG CTC TAC GTC AGC TTC CGT Arg Gly Arg Glu Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg 295 300 305	1016	40

GAC CTT GGC TGG CTG GAC TGG GTC ATC GCC CCC CAG GGC TAC TCT GCC Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala 310 315 320	1064	
TAT TAC TGT GAG GGG GAG TGT GCT TTC CCA CTG GAC TCC TGT ATG AAC Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn 325 330 335 340	1112	
GCC ACC AAC CAT GCC ATC TTG CAG TCT CTG GTG CAC CTG ATG AAG CCA Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Gln Ser Leu Val His Leu Met Lys Pro 345 350 355	1160	
GAT GTT GTC CCC AAG GCA TGC TGT GCA CCC ACC AAA CTG AGT GCC ACC Asp Val Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr 360 365 370	1208	10
TCT GTG CTG TAC TAT GAC AGC AGC AAC AAT GTC ATC CTG CGT AAA CAC Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg Lys His 375 380 385	1256	
CGT AAC ATG GTG GTC AAG GCC TGT GGC TGC CAC TGAGGCCCCG CCCAGCATCC Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly Cys His 390 395	1309	
TGCTTCTACT ACCTTACCAT CTGGCCGGGC CCCTCTCCAG AGGCAGAAAC CCTTCTATGT	1369	20
TATCATAGCT CAGACAGGGG CAATGGGAGG CCCTTCACTT CCCCTGGCCA CTTCCCTGCTA	1429	
AAATTCTGGT CTTTCCCAGT TCCTCTGTCC TTCATGGGGT TTCGGGGCTA TCACCCCGCC	1489	
CTCTCCATCC TCCTACCCCA AGCATAGACT GAATGCACAC AGCATCCCAG AGCTATGCTA	1549	
ACTGAGAGGT CTGGGGTCAG CACTGAAGGC CCACATGAGG AAGACTGATC CTTGGCCATC	1609	
CTCAGCCCAC AATGGCAAAT TCTGGATGGT CTAAGAAGGC CGTGGAATTC TAAACTAGAT	1669	
GATCTGGGCT CTCTGCACCA TTCATTGTGG CAGTTGGGAC ATTTTITAGGT ATAACAGACA	1729	30
CATACACTTA GATCAATGCA TCGCTGTACT CCTTGAAATC AGAGCTAGCT TGTTAGAAAA	1789	
AGAATCAGAG CCAGGTATAG CGGTGCATGT CATTAATCCC AGCGCTAAAG AGACAGAGAC	1849	
AGGAGAATCT CTGTGAGTTC AAGGCCACAT AGAAAGAGCC TGTCTCGGGA GCAGGAAAAA	1909	
AAAAAAAAAC GGAATTC	1926	

(2) 配列番号23についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:399アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

(ix) 特色:

(D) 他情報:/産生物 = "mOP2-PP"

(xi) 配列表記:配列番号23

Met	Ala	Met	Arg	Pro	Gly	Pro	Leu	Trp	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys
1				5					10					15	
Ala	Leu	Gly	Gly	Gly	His	Gly	Pro	Arg	Pro	Pro	His	Thr	Cys	Pro	Gln
		20						25					30		
Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Arg	Glu	Arg	Arg	Asp	Met	Gln	Arg	Glu	Ile	Leu
		35					40					45			Ala
Val	Leu	Gly	Leu	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Pro	Arg	Ala	Gln	Pro	Ala	Ala
50					55					60					65
Ala	Arg	Gln	Pro	Ala	Ser	Ala	Pro	Leu	Phe	Met	Leu	Asp	Leu	Tyr	His
				70					75					80	
Met	Thr	Asp	Asp	Asp	Asp	Gly	Gly	Pro	Pro	Gln	Ala	His	Leu	Gly	Arg
		85					90					95			
Ala	Asp	Leu	Val	Met	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Val	Glu	Arg	Asp	Arg	Thr
	100					105					110				
Leu	Gly	Tyr	Gln	Glu	Pro	His	Trp	Lys	Glu	Phe	His	Phe	Asp	Leu	Thr
115					120					125					130
Gln	Ile	Pro	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Glu	Phe	Arg	Ile	Tyr
				135					140					145	
Lys	Glu	Pro	Ser	Thr	His	Pro	Leu	Asn	Thr	Thr	Leu	His	Ile	Ser	Met
			150					155					160		
Phe	Glu	Val	Val	Gln	Glu	His	Ser	Asn	Arg	Glu	Ser	Asp	Leu	Phe	Phe
		165					170					175			
Leu	Asp	Leu	Gln	Thr	Leu	Arg	Ser	Gly	Asp	Glu	Gly	Trp	Leu	Val	Leu
	180					185					190				
Asp	Ile	Thr	Ala	Ala	Ser	Asp	Arg	Trp	Leu	Leu	Asn	His	His	Lys	Asp
195					200					205					210

Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Val Glu Thr Ala Asp Gly His Ser Met Asp
 215 220 225
 Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Arg Gln Ala Pro Arg Ser Arg Gln
 230 235 240
 Pro Phe Met Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Gln Ser Pro Val Arg Ala
 245 250 255
 Pro Arg Ala Ala Arg Pro Leu Lys Arg Arg Gln Pro Lys Lys Thr Asn
 260 265 270
 Glu Leu Pro His Pro Asn Lys Leu Pro Gly Ile Phe Asp Asp Gly His
 275 280 285 290
 Gly Ser Arg Gly Arg Glu Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser
 295 300 305
 Phe Arg Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr
 310 315 320
 Ser Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asp Ser Cys
 325 330 335
 Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Gln Ser Leu Val His Leu Met
 340 345 350
 Lys Pro Asp Val Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser
 355 360 365 370
 Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg
 375 380 385
 Lys His Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly Cys His
 390 395

10

20

(2) 配列番号24についての知見

(i) 配列の特徴:

30

(A) 長さ:1368塩基対

(B) タイプ:核酸

(C) 鎖数:一本鎖

(D) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:cDNA

(ix) 特色:

(A) 名称/キー:CDS

(B) 部位:1..1368

(D) 他の情報:/標準名称="60A"

(x) 出版物情報:

40

(A) 著者:ファートン, クリスティ エイ.;

トムセン, ジェラルド エッチ.;

ゲルバート, ウィリアム エム.

(B) 表題:ショウジョウバエ60A遺伝子

(C) 書名:PROC.NAT'L ACAD.SCI.USA

(D) 巻:88

(E) 配列番号3における対応残基:1から1368

(F) ページ:9214-9218

(G) 日付:1991年10月

(xi) 配列表記:配列番号24

50

ATG	TCG	GGA	CTG	CGA	AAC	ACC	TCG	GAG	GCC	GTT	GCA	GTG	CTC	GCC	TCC	48
Met	Ser	Gly	Leu	Arg	Asn	Thr	Ser	Glu	Ala	Val	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	
1				5				10					15			
CTG	GGA	CTC	GGA	ATG	GTT	CTG	CTC	ATG	TTC	GTG	GCG	ACC	ACG	CCG	CCG	96
Leu	Gly	Leu	Gly	Met	Val	Leu	Leu	Met	Phe	Val	Ala	Thr	Thr	Pro	Pro	
			20					25					30			
GCC	GTT	GAG	GCC	ACC	CAG	TCG	GGG	ATT	TAC	ATA	GAC	AAC	GGC	AAG	GAC	144
Ala	Val	Glu	Ala	Thr	Gln	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ile	Asp	Asn	Gly	Lys	Asp	
		35					40					45				
CAG	ACG	ATC	ATG	CAC	AGA	GTG	CTG	AGC	GAG	GAC	GAC	AAG	CTG	GAC	GTC	192
Gln	Thr	Ile	Met	His	Arg	Val	Leu	Ser	Glu	Asp	Asp	Lys	Leu	Asp	Val	10
	50					55					60					
TCG	TAC	GAG	ATC	CTC	GAG	TTC	CTG	GGC	ATC	GCC	GAA	CGG	CCG	ACG	CAC	240
Ser	Tyr	Glu	Ile	Leu	Glu	Phe	Leu	Gly	Ile	Ala	Glu	Arg	Pro	Thr	His	
65					70				75						80	
CTG	AGC	AGC	CAC	CAG	TTG	TCG	CTG	AGG	AAG	TCG	GCT	CCC	AAG	TTC	CTG	288
Leu	Ser	Ser	His	Gln	Leu	Ser	Leu	Arg	Lys	Ser	Ala	Pro	Lys	Phe	Leu	
				85					90					95		

CTG GAC GTC TAC CAC CGC ATC ACG GCG GAG GAG GGT CTC AGC GAT CAG Leu Asp Val Tyr His Arg Ile Thr Ala Glu Glu Gly Leu Ser Asp Gln 100 105 110	336	
GAT GAG GAC GAC GAC TAC GAA CGC GGC CAT CGG TCC AGG AGG AGC GCC Asp Glu Asp Asp Asp Tyr Glu Arg Gly His Arg Ser Arg Arg Ser Ala 115 120 125	384	
GAC CTC GAG GAG GAT GAG GGC GAG CAG CAG AAG AAC TTC ATC ACC GAC Asp Leu Glu Glu Asp Glu Gly Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ile Thr Asp 130 135 140	432	
CTG GAC AAG CGG GCC ATC GAC GAG AGC GAC ATC ATC ATG ACC TTC CTG Leu Asp Lys Arg Ala Ile Asp Glu Ser Asp Ile Ile Met Thr Phe Leu 145 150 155 160	480	10
AAC AAG CGC CAC CAC AAT GTG GAC GAA CTG CGT CAC GAG CAC GGC CGT Asn Lys Arg His His Asn Val Asp Glu Leu Arg His Glu His Gly Arg 165 170 175	528	
CGC CTG TGG TTC GAC GTC TCC AAC GTG CCC AAC GAC AAC TAC CTG GTG Arg Leu Trp Phe Asp Val Ser Asn Val Pro Asn Asp Asn Tyr Leu Val 180 185 190	576	
ATG GCC GAG CTG CGC ATC TAT CAG AAC GCC AAC GAG GGC AAG TGG CTG Met Ala Glu Leu Arg Ile Tyr Gln Asn Ala Asn Glu Gly Lys Trp Leu 195 200 205	624	20
ACC GCC AAC AGG GAG TTC ACC ATC ACG GTA TAC GCC ATT GGC ACC GGC Thr Ala Asn Arg Glu Phe Thr Ile Thr Val Tyr Ala Ile Gly Thr Gly 210 215 220	672	
ACG CTG GGC CAG CAC ACC ATG GAG CCG CTG TCC TCG GTG AAC ACC ACC Thr Leu Gly Gln His Thr Met Glu Pro Leu Ser Ser Val Asn Thr Thr 225 230 235 240	720	
GGG GAC TAC GTG GGC TGG TTG GAG CTC AAC GTG ACC GAG GGC CTG CAC Gly Asp Tyr Val Gly Trp Leu Glu Leu Asn Val Thr Glu Gly Leu His 245 250 255	768	30
GAG TGG CTG GTC AAG TCG AAG GAC AAT CAT GGC ATC TAC ATT GGA GCA Glu Trp Leu Val Lys Ser Lys Asp Asn His Gly Ile Tyr Ile Gly Ala 260 265 270	816	
CAC GCT GTC AAC CGA CCC GAC CGC GAG GTG AAG CTG GAC GAC ATT GGA His Ala Val Asn Arg Pro Asp Arg Glu Val Lys Leu Asp Asp Ile Gly 275 280 285	864	
CTG ATC CAC CGC AAG GTG GAC GAC GAG TTC CAG CCC TTC ATG ATC GGC Leu Ile His Arg Lys Val Asp Asp Glu Phe Gln Pro Phe Met Ile Gly 290 295 300	912	40

TTC TTC CGC GGA CCG GAG CTG ATC AAG GCG ACG GCC CAC AGC AGC CAC	960	
Phe Phe Arg Gly Pro Glu Leu Ile Lys Ala Thr Ala His Ser Ser His		
305 310 315 320		
CAC AGG AGC AAG CGA AGC GCC AGC CAT CCA CGC AAG CGC AAG AAG TCG	1008	
His Arg Ser Lys Arg Ser Ala Ser His Pro Arg Lys Arg Lys Lys Ser		
325 330 335		
GTG TCG CCC AAC AAC GTG CCG CTG CTG GAA CCG ATG GAG AGC ACG CGC	1056	
Val Ser Pro Asn Asn Val Pro Leu Leu Glu Pro Met Glu Ser Thr Arg		
340 345 350		
AGC TGC CAG ATG CAG ACC CTG TAC ATA GAC TTC AAG GAT CTG GGC TGG	1104	10
Ser Cys Gln Met Gln Thr Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Asp Leu Gly Trp		
355 360 365		
CAT GAC TGG ATC ATC GCA CCA GAG GGC TAT GGC GCC TTC TAC TGC AGC	1152	
His Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Gly Ala Phe Tyr Cys Ser		
370 375 380		
GGC GAG TGC AAT TTC CCG CTC AAT GCG CAC ATG AAC GCC ACG AAC CAT	1200	
Gly Glu Cys Asn Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His		
385 390 395 400		
GCG ATC GTC CAG ACC CTG GTC CAC CTG CTG GAG CCC AAG AAG GTG CCC	1248	20
Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Leu Glu Pro Lys Lys Val Pro		
405 410 415		
AAG CCC TGC TGC GCT CCG ACC AGG CTG GGA GCA CTA CCC GTT CTG TAC	1296	
Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Arg Leu Gly Ala Leu Pro Val Leu Tyr		
420 425 430		
CAC CTG AAC GAC GAG AAT GTG AAC CTG AAA AAG TAT AGA AAC ATG ATT	1344	
His Leu Asn Asp Glu Asn Val Asn Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Ile		
435 440 445		
GTG AAA TCC TGC GGG TGC CAT TGA	1368	
Val Lys Ser Cys Gly Cys His		
450 455		

(2) 配列番号25についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:455アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

(xi) 配列表記:配列番号25

Met Ser Gly Leu Arg Asn Thr Ser Glu Ala Val Ala Val Leu Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Gly Leu Gly Met Val Leu Leu Met Phe Val Ala Thr Thr Pro Pro
 20 25 30
 Ala Val Glu Ala Thr Gln Ser Gly Ile Tyr Ile Asp Asn Gly Lys Asp
 35 40 45
 Gln Thr Ile Met His Arg Val Leu Ser Glu Asp Asp Lys Leu Asp Val
 50 55 60
 Ser Tyr Glu Ile Leu Glu Phe Leu Gly Ile Ala Glu Arg Pro Thr His
 65 70 75 80
 Leu Ser Ser His Gln Leu Ser Leu Arg Lys Ser Ala Pro Lys Phe Leu
 85 90 95
 Leu Asp Val Tyr His Arg Ile Thr Ala Glu Glu Gly Leu Ser Asp Gln
 100 105 110
 Asp Glu Asp Asp Asp Tyr Glu Arg Gly His Arg Ser Arg Arg Ser Ala
 115 120 125
 Asp Leu Glu Glu Asp Glu Gly Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ile Thr Asp
 130 135 140
 Leu Asp Lys Arg Ala Ile Asp Glu Ser Asp Ile Ile Met Thr Phe Leu
 145 150 155 160
 Asn Lys Arg His His Asn Val Asp Glu Leu Arg His Glu His Gly Arg
 165 170 175
 Arg Leu Trp Phe Asp Val Ser Asn Val Pro Asn Asp Asn Tyr Leu Val
 180 185 190
 Met Ala Glu Leu Arg Ile Tyr Gln Asn Ala Asn Glu Gly Lys Trp Leu
 195 200 205
 Thr Ala Asn Arg Glu Phe Thr Ile Thr Val Tyr Ala Ile Gly Thr Gly
 210 215 220

10

20

30

Thr Leu Gly Gln His Thr Met Glu Pro Leu Ser Ser Val Asn Thr Thr
 225 230 235 240
 Gly Asp Tyr Val Gly Trp Leu Glu Leu Asn Val Thr Glu Gly Leu His
 245 250 255
 Glu Trp Leu Val Lys Ser Lys Asp Asn His Gly Ile Tyr Ile Gly Ala
 260 265 270
 His Ala Val Asn Arg Pro Asp Arg Glu Val Lys Leu Asp Asp Ile Gly
 275 280 285
 Leu Ile His Arg Lys Val Asp Asp Glu Phe Gln Pro Phe Met Ile Gly
 290 295 300
 Phe Phe Arg Gly Pro Glu Leu Ile Lys Ala Thr Ala His Ser Ser His
 305 310 315 320
 His Arg Ser Lys Arg Ser Ala Ser His Pro Arg Lys Arg Lys Lys Ser
 325 330 335
 Val Ser Pro Asn Asn Val Pro Leu Leu Glu Pro Met Glu Ser Thr Arg
 340 345 350
 Ser Cys Gln Met Gln Thr Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Asp Leu Gly Trp
 355 360 365
 His Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Gly Ala Phe Tyr Cys Ser
 370 375 380
 Gly Glu Cys Asn Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His
 385 390 395 400
 Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Leu Glu Pro Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Arg Leu Gly Ala Leu Pro Val Leu Tyr
 420 425 430
 His Leu Asn Asp Glu Asn Val Asn Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Ile
 435 440 445
 Val Lys Ser Cys Gly Cys His
 450 455

10

20

30

(2) 配列番号26についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: アミノ酸

(B) タイプ: アミノ酸

(D) 形態: 直線状

(ii) 分子タイプ: 蛋白

(iii) 由来:

(A) 生物体: ホモサピエンス

(ix) 特色:

(A) 名称/キー: 蛋白

(B) 部位: 1..102

(D) 他の情報:/注記 = "BMP3"

(xi) 配列表記: 配列番号26

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 104アミノ酸

40

50

(B) タイプ：アミノ酸

(C) 鎖数：一本鎖

(D) 形態：直線状

(ii) 分子タイプ：蛋白

(ix) 特色：

(A) 名称／キー：蛋白

(B) 部位:1..104

(D) 他の情報:/注記 = “ BMP3”

(xi) 配列表記：配列番号26

Cys Ala Arg Arg Tyr Leu Lys Val Asp Phe Ala Asp Ile Gly Trp Ser
1 5 10 15

10

Glu Trp Ile Ile Ser Pro Lys Ser Phe Asp Ala Tyr Try Cys Ser Gly
20 25 30

Ala Cys Gln Phe Pro Met Pro Lys Ser Leu Lys Pro Ser Asn His Ala
35 40 45

Thr Ile Gln Ser Ile Val Ala Arg Ala Val Gly Val Val Pro Gly Ile
50 55 60

Pro Glu Pro Cys Cys Val Pro Glu Lys Met Ser Ser Leu Ser Ile Leu
65 70 75 80

20

Phe Phe Asp Glu Asn Lys Asn Val Val Leu Lys Val Tyr Pro Asn Met
85 90 95

Thr Val Glu Ser Cys Ala Cys Arg
100

(2) 配列番号27についての知見

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ:102アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(C) 鎖数：一本鎖

(D) 形態：直線状

(ii) 分子タイプ：蛋白

(vi) 由来：

(A) 生物体：ホモサピエンス

(ix) 特色

(A) 名称／キー：蛋白

(B) 部位:1..102

(D) 他の情報:/注記 = “ BMP5”

(xi) 配列表記：配列番号27

30

Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln
 1 5 10 15
 Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Phe Tyr Cys Asp Gly
 20 25 30
 Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His Ala
 35 40 45
 Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Phe Pro Asp His Val Pro Lys
 50 55 60
 Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe
 65 70 75 80
 Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val
 85 90 95
 Arg Ser Cys Gly Cys His
 100

10

(2) 配列番号28についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:102アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

20

(C) 鎖数:1本鎖

(D) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:蛋白

(vi) 由来:

(A) 生物体:ホモサピエンス

(ix) 特色:

(A) 名称/キー:蛋白

(B) 部位:1..102

(D) 他の情報:/注記="BMP6"

(xi) 配列表記:配列番号28

30

Cys Arg Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Leu Gly Trp Gln
 1 5 10 15
 Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Tyr Ala Ala Asn Tyr Cys Asp Gly
 20 25 30
 Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His Ala
 35 40 45
 Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Asn Pro Glu Tyr Val Pro Lys
 50 55 60
 Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe
 65 70 75 80
 Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Trp Met Val Val
 85 90 95
 Arg Ala Cys Gly Cys His
 100

40

(2) 配列番号29についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:102アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

50

(xi) 配列表記：配列番号30

30

```

Leu Xaa Xaa Xaa Phe
  1           5
Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa
          10
Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
 15           20
Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
 25           30
Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
          35
Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa
 40           45
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
          50
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 55           60
Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65
Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 70           75
Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
          80
Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa
 85           90
Xaa Cys Xaa Cys Xaa
 95

```

10

20

(2) 配列番号31についての知見

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：102アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(C) 形態：直線状

(ii) 分子タイプ：蛋白

(ix) 特色：

(A) 名称：一般配列 6

(D) 他の情報：この場合、各Xaaは明細書中に定義された1ケ又は2ケ以上の特定のアミノ酸の群からそれぞれ別個に選ばれる。 30

(xi) 配列表記：配列番号31

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Phe
 1 5 10
 Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa
 15
 Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
 20 25
 Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
 30 35
 Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 40
 Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa
 45 50
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 55
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 60 65
 Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 70
 Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 75 80
 Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
 85
 Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa
 90 95
 Xaa Cys Xaa Cys Xaa
 100

10
20
30

(2) 配列番号32についての知見

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:1238塩基対、372アミノ酸

(B) タイプ:核酸、アミノ酸

(C) 鎖数:一本鎖

(D) 形態:直線状

(ii) 分子タイプ:cDNA

(iii) 由来:

(A) 生物体:ヒト

(F) 組織型:脳

(iv) 特色:

(A) 名称/キー:CDS

(B) 部位:

(D) 他の情報:/産生物="GDF-1"

/注記="GDF-1 cDNA"

(x) 出版物情報:

(A) 著者:リイ, セージン

(B) 表題:生長/分化因子 I の発現

(C) 書名:PROC.NAT'L ACAD.SCI.USA

40

50

(D) 巻:88

(E) 対応残基:1-1238

(F) ページ:4250-4254

(G) 日付:1991年5月

(xi) 配列表記:配列番号32

GGGGACACCG GCCCGCCCT CAGCCCACTG GTCCCGGGCC GCCGCGGACC CTGCGCACTC 60

TCTGGTCATC GCCTGGGAGG AAG ATG CCA CCG CCG CAG CAA GGT CCC TGC GGC 113
 Met Pro Pro Pro Gln Gln Gly Pro Cys Gly
 1 5 10

CAC CAC CTC CTC CTC CTC CTG GCC CTG CTG CTG CCC TCG CTG CCC 158
 His His Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Ser Leu Pro
 15 20 25

CTG ACC CGC GCC CCC GTG CCC CCA GGC CCA GCC GCC GCC CTG CTC 203
 Leu Thr Arg Ala Pro Val Pro Pro Gly Pro Ala Ala Ala Leu Leu
 30 35 40

CAG GCT CTA GGA CTG CGC GAT GAG CCC CAG GGT GCC CCC AGG CTC 248
 Gln Ala Leu Gly Leu Arg Asp Glu Pro Gln Gly Ala Pro Arg Leu
 45 50 55

10

CGG	CCG	GTT	CCC	CCG	GTC	ATG	TGG	CGC	CTG	TTT	CGA	CGC	CGG	GAC	293	
Arg	Pro	Val	Pro	Pro	Val	Met	Trp	Arg	Leu	Phe	Arg	Arg	Arg	Asp	70	
				60					65							
CCC	CAG	GAG	ACC	AGG	TCT	GGC	TCG	CGG	CGG	ACG	TCC	CCA	GGG	GTC	338	
Pro	Gln	Glu	Thr	Arg	Ser	Gly	Ser	Arg	Arg	Thr	Ser	Pro	Gly	Val	85	
				75					80							
ACC	CTG	CAA	CCG	TGC	CAC	GTG	GAG	GAG	CTG	GGG	GTC	GCC	GGA	AAC	383	
Thr	Leu	Gln	Pro	Cys	His	Val	Glu	Glu	Leu	Gly	Val	Ala	Gly	Asn	100	
				90					95							
ATC	GTG	CGC	CAC	ATC	CCG	GAC	CGC	GGT	GCG	CCC	ACC	CGG	GCC	TCG	428	10
Ile	Val	Arg	His	Ile	Pro	Asp	Arg	Gly	Ala	Pro	Thr	Arg	Ala	Ser	115	
				105					110							
GAG	CCT	GTC	TCG	GCC	GCG	GGG	CAT	TGC	CCT	GAG	TGG	ACA	GTC	GTC	473	
Glu	Pro	Val	Ser	Ala	Ala	Gly	His	Cys	Pro	Glu	Trp	Thr	Val	Val	130	
				120					125							
TTC	GAC	CTG	TCG	GCT	GTG	GAA	CCC	GCT	GAG	CGC	CCG	AGC	CGG	GCC	518	
Phe	Asp	Leu	Ser	Ala	Val	Glu	Pro	Ala	Glu	Arg	Pro	Ser	Arg	Ala	145	
				135					140							
CGC	CTG	GAG	CTG	CGT	TTC	GCG	GCG	GCG	GCG	GCG	GCA	GCC	CCG	GAG	563	20
Arg	Leu	Glu	Leu	Arg	Phe	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Glu	160	
				150					155							
GGC	GGC	TGG	GAG	CTG	AGC	GTG	GCG	CAA	GCG	GGC	CAG	GGC	GCG	GGC	608	
Gly	Gly	Trp	Glu	Leu	Ser	Val	Ala	Gln	Ala	Gly	Gln	Gly	Ala	Gly	175	
				165					170							
GCG	GAC	CCC	GGG	CCG	GTG	CTG	CTC	CGC	CAG	TTG	GTG	CCC	GCC	CTG	653	
Ala	Asp	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Arg	Gln	Leu	Val	Pro	Ala	Leu	190	
				180					185							
GGG	CCG	CCA	GTG	CGC	GCG	GAG	CTG	CTG	GGC	GCC	GCT	TGG	GCT	CGC	698	30
Gly	Pro	Pro	Val	Arg	Ala	Glu	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Trp	Ala	Arg	205	
				195					200							
AAC	GCC	TCA	TGG	CCG	CGC	AGC	CTC	CGC	CTG	GCG	CTG	GCG	CTA	CGC	743	
Asn	Ala	Ser	Trp	Pro	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Arg	220	
				210					215							
CCC	CGG	GCC	CCT	GCC	GCC	TGC	GCG	CGC	CTG	GCC	GAG	GCC	TCG	CTG	788	
Pro	Arg	Ala	Pro	Ala	Ala	Cys	Ala	Arg	Leu	Ala	Glu	Ala	Ser	Leu	235	
				225					230							
CTG	CTG	GTG	ACC	CTC	GAC	CCG	CGC	CTG	TGC	CAC	CCC	CTG	GCC	CGG	833	40
Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Asp	Pro	Arg	Leu	Cys	His	Pro	Leu	Ala	Arg	250	
				240					245							

CCG CGG CGC GAC GCC GAA CCC GTG TTG GGC GGC GGC CCC GGG GGC	878	
Pro Arg Arg Asp Ala Glu Pro Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly		
255 260 265		
GCT TGT CGC GCG CGG CGG CTG TAC GTG AGC TTC CGC CAG GTG GGC	923	
Ala Cys Arg Ala Arg Arg Leu Tyr Val Ser Phe Arg Glu Val Gly		
270 275 280		
TGG CAC CGC TGG GTC ATC GCG CCG CGC CCC TTC CTG GCC AAC TAC	968	
Trp His Arg Trp Val Ile Arg Pro Arg Gly Phe Leu Ala Asn Tyr		
285 290 295		
TGC CAG GGT CAG TGC GCG CTG CCC GTC GCG CTG TCG GGG TCC GGG	1013	10
Cys Gln Gly Gln Cys Ala Leu Pro Val Ala Leu Ser Gly Ser Gly		
300 305 310		
GGG CCG CCG GCG CTC AAC CAC GCT GTG CTG CGC GCG CTC ATG CAC	1058	
Gly Pro Pro Ala Leu Asn His Ala Val Leu Arg Ala Leu Met His		
315 320 325		
GCG GCC GCC CCG GGA GCC GCC GAC CTG CCC TGC TGC GTG CCC GCG	1103	
Ala Ala Ala Pro Gly Ala Ala Asp Leu Pro Cys Cys Val Pro Ala		
330 335 340		
CGC CTG TCG CCC ATC TCC GTG CTC TTC TTT GAC AAC AGC GAC AAC	1148	20
Arg Leu Ser Pro Ile Ser Val Leu Phe Phe Asp Asn Ser Asp Asn		
345 350 355		
GTG GTG CTG CGG CAG TAT GAG GAC ATG GTG GTG GAC GAG TGC GGC	1193	
Val Val Leu Arg Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly		
360 365 370		
TGC CGC TAACCCGGGG CGGGCAGGGA CCCGGGCCCA ACAATAAATG CCGCGTGG	1238	
Cys Arg		
372		

(2) 配列番号33についての知見

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：372アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(C) 鎖数：一本鎖

(D) 形態：直線状

(ii) 分子タイプ：cDNA

(iii) 仮説：なし

(iv) アンチセンス：なし

(vi) 由来：

(A) 生物体：ヒト

(F) 組織型：脳

(ix) 特色：

(A) 名称／キー：CDS

(B) 部位：

(D) 他の情報：/機能＝

/産生物＝“GDF-1”

(xi) 配列表記：配列番号33

30

40

10

Glu Pro Val Ser Ala Ala Gly His Cys Pro Glu Trp Thr Val Val
 120 125 130
 Phe Asp Leu Ser Ala Val Glu Pro Ala Glu Arg Pro Ser Arg Ala
 135 140 145
 Arg Leu Glu Leu Arg Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Pro Glu
 150 155 160
 Gly Gly Trp Glu Leu Ser Val Ala Gln Ala Gly Gln Gly Ala Gly
 165 170 175
 Ala Asp Pro Gly Pro Val Leu Leu Arg Gln Leu Val Pro Ala Leu
 180 185 190
 Gly Pro Pro Val Arg Ala Glu Leu Leu Gly Ala Ala Trp Ala Arg
 195 200 205
 Asn Ala Ser Trp Pro Arg Ser Leu Arg Leu Ala Leu Ala Leu Arg
 210 215 220
 Pro Arg Ala Pro Ala Ala Cys Ala Arg Leu Ala Glu Ala Ser Leu
 225 230 235
 Leu Leu Val Thr Leu Asp Pro Arg Leu Cys His Pro Leu Ala Arg
 240 245 250
 Pro Arg Arg Asp Ala Glu Pro Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly
 255 260 265
 Ala Cys Arg Ala Arg Arg Leu Tyr Val Ser Phe Arg Glu Val Gly
 270 275 280
 Trp His Arg Trp Val Ile Arg Pro Arg Gly Phe Leu Ala Asn Tyr
 285 290 295
 Cys Gln Gly Gln Cys Ala Leu Pro Val Ala Leu Ser Gly Ser Gly
 300 305 310
 Gly Pro Pro Ala Leu Asn His Ala Val Leu Arg Ala Leu Met His
 315 320 325
 Ala Ala Ala Pro Gly Ala Ala Asp Leu Pro Cys Cys Val Pro Ala
 330 335 340
 Arg Leu Ser Pro Ile Ser Val Leu Phe Phe Asp Asn Ser Asp Asn
 345 350 355
 Val Val Leu Arg Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly
 360 365 370
 Cys Arg
 372

10

20

30

40

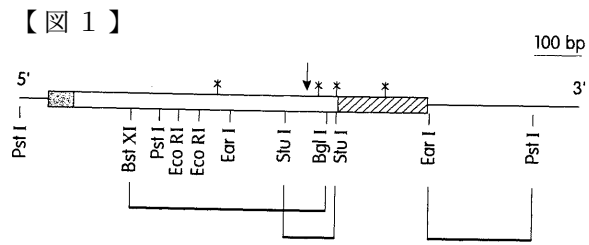


Fig. 1

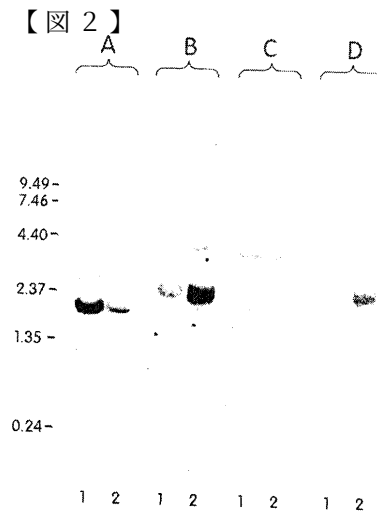


Fig. 2

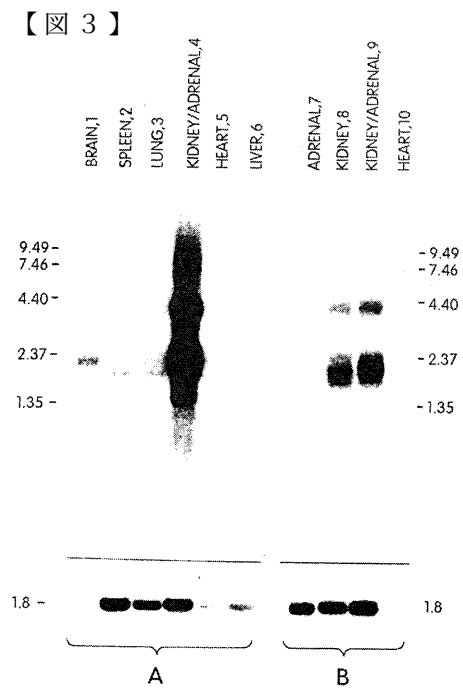


Fig. 3

フロントページの続き

- (72)発明者 オズカイナック, エンジン
アメリカ合衆国 01757 マサチューセッツ, ミルフォード, パーデュー ドライブ 44
- (72)発明者 クベラサムパス, サンゲーベル
アメリカ合衆国 02053 マサチューセッツ, メドウェイ, スプリング ストリート 6
- (72)発明者 ルーガー, ディヴッド シー.
アメリカ合衆国 01748 マサチューセッツ, ホプキントン, ダウネイ ストリート 19
- (72)発明者 パング, ロイ エッチ. エル.
アメリカ合衆国 03750 ニュー ハンプシャー, エトナ, パートリッジ ロード 15
- (72)発明者 コーエン, チャールズ エム.
アメリカ合衆国 02053 マサチューセッツ, メドウェイ, ウインスロプ ストリート 98

審査官 田村 明照

- (56)参考文献 特表平03-503598 (JP, A)
国際公開第91/005802 (WO, A1)
特表平03-500655 (JP, A)
特表平03-502579 (JP, A)