

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4424578号
(P4424578)

(45) 発行日 平成22年3月3日(2010.3.3)

(24) 登録日 平成21年12月18日(2009.12.18)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/47 (2006.01)

C O 7 K 14/47

C O 7 K 16/18 (2006.01)

C O 7 K 16/18

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 9 (全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-535560 (P2001-535560)
 (86) (22) 出願日 平成12年10月31日(2000.10.31)
 (65) 公表番号 特表2003-513631 (P2003-513631A)
 (43) 公表日 平成15年4月15日(2003.4.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2000/010747
 (87) 国際公開番号 W02001/032878
 (87) 国際公開日 平成13年5月10日(2001.5.10)
 審査請求日 平成17年10月26日(2005.10.26)
 (31) 優先権主張番号 09/434,185
 (32) 優先日 平成11年11月4日(1999.11.4)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 9926424.4
 (32) 優先日 平成11年11月8日(1999.11.8)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)

(73) 特許権者 500533547
 ユニバーシティ カレッジ ロンドン
 イギリス国 ロンドン ロウランド ヒル
 ストリート
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (72) 発明者 ローウェ ピーター
 イギリス国 ハートフォードシャー州 イ
 ースト バーネット ウッドフィールド
 ドライブ 23

審査官 野村 英雄

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規ポリペプチドホルモンフォスファトニン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(a)～(h)からなる群より選択されるポリヌクレオチドによりコードされる、ナトリウム依存性リン酸共輸送を調節するポリペプチド；

(a) 配列番号：27に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：26に記載のコード配列を含むポリヌクレオチド；

(c) (a) または (b) のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列への1つまたはいくつかのアミノ酸の置換、欠失及び／または付加により得られるポリペプチドであって、ナトリウム依存性リン酸共輸送を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(d) ナトリウム依存性リン酸共輸送を調節するポリペプチドをコードする、(b) のポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

(e) (a) または (b) のポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、ナトリウム依存性リン酸共輸送を調節するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド；

(f) (a) ～ (e) のいずれか一つのポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドの断片をコードするポリヌクレオチドであって、該断片がナトリウム依存性リン酸共輸送を調節する、ポリヌクレオチド；

(g) 遺伝コードの結果として(a)、(b)、もしくは(f)のいずれか一つのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列に対して縮重したヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド；な

10

20

らびに

(h) コードされるポリペプチドがホモダイマー及び／又はヘテロダイマーを形成することができる、(a)～(g)のいずれか一つのポリヌクレオチド。

【請求項2】

以下の(a)～(b)からなる群より選択される特徴を有するポリペプチドであることをさらに特徴とする、請求項1記載のポリペプチド：

(a) SDS-PAGEで測定すると、約60～75 kDaの範囲の分子量を有すること；

(b) pH7でビス-トリスSDS-PAGEで測定すると、約120 kDaの分子量を有すること；

【請求項3】

請求項1もしくは2記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

10

【請求項4】

請求項3記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項5】

請求項4記載のベクターによって遺伝子操作された宿主細胞。

【請求項6】

請求項3記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを発現させ、該ポリペプチドを回収することを含む、請求項1もしくは2記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項7】

配列番号：27に示されるアミノ酸配列の1～46位もしくは47～96位のアミノ酸残基中に含まれる、またはそれにより形成される抗原決定基に特異的に結合する抗体。

20

【請求項8】

薬学的に許容される担体と、請求項1記載のポリペプチド、請求項3記載のポリヌクレオチド、もしくは請求項7記載の抗体を含む、薬学的組成物。

【請求項9】

以下の段階を含む、フォスファトニンポリペプチドの結合パートナーを同定する方法：

(a) 請求項1もしくは2記載のポリペプチドとスクリーニングに用いる化合物とを接触させる段階；および

(b) 該化合物がナトリウム依存性リン酸共輸送を調節する該ポリペプチドの活性に影響するか否かを決定する段階。

【発明の詳細な説明】

30

【0001】

発明の分野

本発明は、リン酸代謝の調節に関与するポリペプチドに関する。さらに特定すると、本発明は、新規のポリペプチド、転位性腫瘍分泌高リン酸尿物質 (Metastatic-tumor Excreted Phosphaturic-Element: MEPE)、又は「フォスファトニン」に関連し、並びにフォスファトニンポリペプチドをコードする遺伝子及びポリヌクレオチドにも関連する。

【0002】

発明の背景

リン酸は、細胞のさまざまな基本的プロセスや骨のミネラル化の中心的な役割を果たしている。特に、骨格のミネラル化は体内のリン酸とカルシウムの調整に依存しており、リン酸-カルシウムの恒常性が乱れると骨の構造の完全性に著しい影響を及ぼすことがある。腎臓においては、リン酸は受動的に糸球体濾液の中に失われていき、ナトリウム依存性リン酸共輸送分子 (Sodium-Dependent Phosphate Co-Transporter) を通して能動的に再吸収される。小腸においては、リン酸は食物から吸収される。ナトリウム依存性リン酸共輸送分子は、小腸内で存在することが確認され、近年クローニングされた (Hilfiker, PNAS 95(24), 14564-14569)。肝臓、皮膚、腎臓は、ビタミンD3を、リン酸バランスの維持や骨のミネラル化において能動的な役割を果たす活性代謝産物、カルシトリオール、に変換する。

40

【0003】

ビタミンDの欠乏は、小児ではくる病を、大人では骨軟化症を引き起こす。どちらの場合

50

も、骨のマトリックスを作るオステオイド (osteoid) の石灰化がうまく行われないうために起こるものである。くる病には、食事の状態とは無関係でも起こるものもあり、X染色体性ビタミンD抵抗性低リン酸血症性くる病 (X-linked vitamin D resistant hypophosphatemic rickets: HYP)、遺伝性高カルシウム低リン酸血症型くる病 (Hereditary hypercalciuria with hypophosphatemic rickets: HHRH)、ある種の腎ファンコーニ症 (renal Fanconi syndrom) を含むデント病 (Dent's disease)、腎1 α -ヒドロキシラーゼ欠損症 (renal 1 α -hydroxylase deficiency: VDDR 1)、1,25-ジヒドロキシビタミンD3欠損症 (末端組織抵抗) (defects in 1,25-dihydroxy vitaminD3 receptor (end organ resistance, VDDR II))、及び腫瘍形成性低リン酸血症性骨軟化症 (Oncogenic Hypophosphatemic Osteomalacia: OHO) などが含まれる。このように、数多くの家族性の病気がリン酸摂取、ビタミンD代謝、骨の石灰化の異常をきたすものと性格づけられている。

10

【0004】

近年、X染色体性低リン酸血症性くる病 (X-linked hypophosphatemic rickets: PHEX) の患者で欠損が認められる遺伝子がクローニングされ、調べられた (Francis, Nat. Genet. 11 (1995), 130-136; Rowe, Hum. Genet. 97 (1996), 345-352; Rowe, Hum. Mol. Genet. 6 (1997), 539-549)。PHEXの遺伝子はII型糖タンパク質で、Zn メタロエンドペプチダーゼのファミリー (M13) である。PHEXはリン酸の恒常性と骨格のミネラル化に関わる因子を調節する機能をもつと言われている (Rowe, Exp. Nephrol. 5 (1997), 355-363; Rowe, Current Opinion in Nephrology & Hypertension 7 (4) (1998), 367-376)。腫瘍形成性低リン酸血症性骨軟化症 (OHO) は、HYPと病理生理学的な共通点があり、多くの類似点を持つが、根本的な原因は異なる (Rowe, Exp. Nephrol. 5 (1997), 355-363; Rowe, Current Opinion in Nephrology & Hypertension 7 (4) (1998), 367-376; Drezner in Primer on Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism (ed. Favus, M. J.) 184-188 (Am. Soc. Bone and Min. Res., Kelseyville, CA, 1990))。

20

【0005】

骨軟化症はくる病に相当する成人の病で、腫瘍が原因で起こる骨軟化症の主な特徴は、骨が軟化することである。軟化した骨は歪曲し、弓状に曲がった脚やそれに近い変形がおり、家族性くる病を想起させる。血漿中のリン酸濃度の低下やビタミンD代謝不良もまたHYPと良く似た特徴である。腫瘍性骨軟化症は、多くの異なる腫瘍タイプが報告されているが、まれであり、腫瘍は主として間葉系由来である (Rowe, Exp. Nephrol. 5 (1997), 355-363; Francis, Baillieres Clinical Endocrinology and metabolism 11 (1997), 145-163; Ioakimidis, The J. Rheumatology 21(6) (1994), 1162-1164; Lyles, Ann. Intern. Med. 93(1980), 275-278; Rowe, Hum. Genet. 94(1994), 457-467; Shane, Journal of Bone and Mineral Research 12(1997), 1502-1511; Weidner, Cancer 59(1987), 1442-1442)。可能なときは腫瘍を外科的に取り除くが、その結果疾病の症状は消え、骨は治癒する、すなわち、本疾病の病原として、循環型の高リン酸尿因子が働いていることが示唆される。また、ヒト腫瘍のヌードマウスへの異種移植 (Miyauchi, J. Clin. Endocrinol. Metab. 67 (1988), 46-53)、生理食塩水抽出物のラットやイヌへ注射 (Aschiner, J. Paediatr. 91 (1977), 56-60; Popovtzer, Clin. Res. 29(1981), 418A (Abstract))、癌の培養液 (Tumor Conditioned Medium: TCM) 及びヒトや動物の腎細胞株培養液の使用のすべてが、循環型の高リン酸尿因子がこれらの癌から分泌されていることを示している。

30

40

【0006】

X染色体性くる病における基本的な欠陥はZnメタロエンドペプチダーゼ (PHEX) の変異であることが確認されているが、リン酸尿症因子の循環が関係しているという重要な証拠もある (Ecarot, J. Bone Miner. Res. 7 (1992), 215-220; Ecarot, J. Bone Miner. Res. 10 (1995), 424-431; Morgan, Arch. Intern. Med. 134 (1974), 549-552; Nesbitt, J. Clin. Invest. 89 (1992), 1453-1459; Nesbitt, J. Bone. Miner. Res. 10 (1995), 1327-1333; Nesbitt, Endocrinology 137 (1996), 943-948; Qui, Genet. Res., Camb. 62 (1993), 39-43; Lajeunesse, Kidney Int. 50 (1996), 1531-1538; Meyer, J. Bone. Mi

50

ner. Res. 4 (4) (1989), 523-532; Meyer, J. Bone. Miner. Res. 4 (1989), 493-500)。
HYPとOH0の病態生理学的な一致によって、この腫瘍因子が、正常者においては、PHEX遺
伝子産物によって処理されているという、興味深い可能性が高くなった。また、PHEXによ
るタンパク質分解のプロセスは、この未確認の高リン酸尿因子の分解あるいはリン酸保存
カスケードの活性化をもたらすようにもみえる (Carpenter, Pediatric Clinics of Nort
h America 44(1997), 443-466; Econs, Am. J. Physiol. 237(1997), F489-F498; Glorie
ux, Arch. Pediatr. 4 (1997), 102s-105s; Grieff, Current Opinion in Nephrology &
Hypertension 6 (1997), 15-19; Hanna, Current Therapy in Endocrinology & Metaboli
sm 6 (1997), 533-540; Kumar, Nephrol. Dial. Transplant. 12 (1997), 11-13; Takeda
, Ryoikibetsu Shokogun Shirizu (1997), 656-659)。このように、腫瘍性高リン酸尿因
子をクローニングし、性質を明らかにすることによって、腫瘍性骨軟化症と家族性X染色
体性くる病、そして他のリン酸代謝障害との間の関連を明らかにすることが可能になる。

10

【0007】

ロウ (Rowe) ら (1996) は、候補物質56kDaと58kDaタンパク質がOH0における腎の機能不
全を引き起こすと報告している (Rowe, Bone 18, (1996), 159-169)。OH0患者に腫瘍摘
出による治療を施し、本患者由来の施術前後の抗血清を、癌培養液中のタンパク質のウェ
スタンブロット法による識別に使用された。ただし、腫瘍細胞及び抗血清のどちらも、外
部には提供されていない。

【0008】

ロウ (Rowe) ら (1997) はExp. Nephrol. 5 (1997)、335~363の総説中で、上記疾患とPH
EX遺伝子 (以前はPEX遺伝子として知られていた) の役割について述べている。PHEX遺伝
子産物はZnメタロプロテイナーゼとして認識されていた。家族性くる病などの症状では、
PHEXの欠損によって、フォスファトニンが切断されず、その結果、ナトリウム依存性リン
酸共輸送分子の低下や、腎ミトコンドリア24-ヒドロキシラーゼの上昇が起こる。しかし
ながら、フォスファトニンの精製についてはロウ (1997) は何も報告していない。従って
、フォスファトニンの抽出源は、公に提供されていない。さらに、フォスファトニンの精
製、識別、特性の分析はこれまでは不可能であった。

20

【0009】

以上のように、リン酸代謝を調節するポリペプチドに対するニーズが存在するが、それは
、その調節異常が、骨軟化症、特に骨粗鬆症や腎不全といった、低及び高リン酸血症に関
っているかもしれないからである。さらに、そのような機能障害を検出、予防、及び／又
は修正する働きがあり、またそういった機能障害を診断するのに有効なポリペプチドを特
定し、性質を調べることにに対するニーズもある。

30

【0010】

発明の概要

本発明は、新規フォスファトニンポリペプチドと、フォスファトニンをコードするポリヌ
クレオチドに関する。また、本発明は、本ポリペプチドやポリヌクレオチドを製造するた
めのベクター、宿主細胞、抗体、そして遺伝子組換え方法に関する。さらに、それらのポ
リペプチドに関する疾患を検出する診断法、そしてそれらの疾患を治療する方法も提供され
ている。さらにまた、本発明はフォスファトニンの結合パートナーを同定するスクリーニ
ング法にも関する。

40

【0011】

本発明は、フォスファトニンの直接又は間接的活性化によりリン酸塩代謝を調節すること
ができる化合物を同定する方法を提供する。したがって、本発明の方法に従ってそれぞれ
、フォスファトニン活性の阻害剤及び活性化剤であると同定された化合物も同様に、本発
明の範囲に含まれる。

【0012】

上記から明らかであるように、本発明は一般的に、記述のポリヌクレオチド、核酸分子、
ベクター、タンパク質、調節配列、組換えDNA分子、抗体又は化合物の少なくとも一つを
含む組成物に関する。好ましくは、上記の組成物は、本発明の記載の成分に本来会合しな

50

いが、本発明の組成物を特定の使用に適するようにする緩衝液、凍結保護剤等のような成分を含む。

【0013】

上記の組成物は、薬物、診断手段、又はキットとして用いることが都合がよい。薬学的組成物は実施例6及び7において、より詳細に記載する。特に、上記の生物活性断片は、X染色体性くる病及び骨軟化症のようなリン酸代謝障害と共に他の骨ミネラル代謝疾患の治療における薬物として有用となる可能性がある。薬剤として同時、個別、又は連続的に用いるための複合調製物として、フォスファトニン及びPHEXメタロペプチダーゼ又はPHEXと同じもしくは類似の基質特異性を有する他のペプチダーゼをさらに提供する。このように、本明細書において記載するリン酸ミネラル代謝障害の治療に用いられる可能性がある活性フォスファトニン断片を生成するために、PHEXメタロペプチダーゼを用いてフォスファトニンを切断してもよい。これらの疾患は全てヒトにおいて特に重要であるが、他の哺乳類も同様に、本発明に従って治療してもよい。

10

【0014】

本発明は、適切に混入物を含まない実質的に単離又は精製された形で始めてフォスファトニンを提供した。SDS及び／又は他の妨害タンパク質のような混入物を含まない本来のフォスファトニン及びフォスファトニンの本来の断片は、リン酸代謝を調節することができ、リン酸代謝、ビタミンD代謝、及び／又は骨格形成もしくはミネラル化の障害に関連した疾患を治療するための薬学的組成物において活性成分を提供することができる。

20

【0015】

したがって、本発明は、本発明のフォスファトニンポリペプチド又はポリペプチドをコードして発現することができるDNA、抗体、活性化剤／アゴニスト、阻害剤／アンタゴニスト、又は本発明の結合パートナーを、リン酸代謝、ビタミンD代謝、及び／又は骨格形成もしくはミネラル化の障害を治療する薬剤を調製するために用いることに関する。

【0016】

特に、本発明は、それらが細胞内に存在すればフォスファトニン活性が得られる、フォスファトニン活性を有するフォスファトニンポリペプチド、又は上記ポリペプチドをコードして発現することができるDNA、抗体、本発明の活性化剤／アゴニスト、又は結合パートナーを、高リン酸血症を治療するため、好ましくは腎性骨形成異常、腎透析／透析前における高リン酸血症、二次性副甲状腺機能亢進症、嚢胞性線維性骨炎、又は痛風を治療する薬物を調製するために用いることに関する。

30

【0017】

もう一つの態様において、本発明は、抗フォスファトニン活性を有するフォスファトニンポリペプチド、上記ポリペプチドをコードして発現することができるDNA、本発明の抗体、本発明の核酸分子又は阻害剤／アンタゴニストを、低リン酸血症を治療する薬剤を調製するため、好ましくはX染色体性低リン酸血症性くる病、高カルシウム尿症（HHRH）を伴う遺伝性低リン酸血症性くる病、低ミネラル化骨病変、幼少期成長停止、腫瘍形成性低リン酸血症性骨軟化症、腎リン酸漏出、腎性骨形成異常、骨粗鬆症、ビタミンD抵抗性くる病、末端組織抵抗、腎ファンコーニ症候群、常染色体性くる病、パジェット病、腎不全、腎尿細管アシドーシス、嚢胞性線維症、又はスブルーを治療する薬物を調製するために用いることに関する。

40

【0018】

本発明の好ましい態様において、抗フォスファトニン活性を有するフォスファトニンポリペプチド、ポリペプチドをコード及び発現することができるDNA、本発明の抗体、本発明の核酸分子、又は本発明の阻害剤／アンタゴニストは、骨ミネラル減少障害を治療する薬物を製造するために用いられる。

【0019】

もう一つの好ましい態様において、本発明は、リン酸代謝障害を治療するため、同時に、個別に、又は連続的に用いられる複合調製物を製造するために、フォスファトニンポリペプチド及びPHEXメタロペプチダーゼ又はPHEXと同じもしくは類似の基質特異性を有する他

50

のペプチダーゼを用いることに関する。

【0020】

上記の用途及び方法は、実施例6において、より詳細に記載する。

【0021】

もう一つの態様において、本発明は、フォスファトニンを産生及び単離するために、フォスファトニンを過剰発現することができる形質転換した骨芽細胞、骨細胞株、間質細胞株又は癌細胞株を用いることに関する。

【0022】

発明の詳細な説明

本発明の化合物及び方法を記述する前に、本発明は、記述した特定のポリペプチド及び段階は当然のこととして変化する可能性があるために、それらに限定されないと理解すべきである。同様に、本明細書において用いた用語は特定の態様を説明する目的のためであり、本発明の範囲は、添付の請求の範囲によってのみ制限されるため、制限的に解釈されない。

10

【0023】

値の範囲が提供されている場合、本文がそうでないことを明らかに明記していない限り、下限の単位の10分の1までのその範囲の上限と下限内のそれぞれの介在値も同様に特に開示されると理解される。示された範囲におけるいかなる示された値又は介在する値のあいだにあるそれぞれのさらに小規模な範囲、及びその示された範囲におけるいかなるその他の示された値又は介在する値が、本発明に含まれる。これらのさらに小規模な範囲の上限及び下限は個々にその範囲に含めても除外してもよく、限界のいずれかがさらに小規模な範囲に含まれる、又はいずれも含まれない、又は両者が含まれるそれぞれの範囲も同様に、本発明に含まれ、示された範囲におけるいかなる特に除外された限界にも従属する。示された範囲に一つ又は双方の限界が含まれる場合、それらの含まれた限界のいずれか又は両者を除外する範囲も同様に本発明に含まれる。

20

【0024】

特に明記していない限り、本明細書において用いられる全ての科学技術用語は本発明が属する当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載の方法及び材料と類似又は同等の方法及び材料を、本発明の実践又は試験において用いることができるが、好ましい方法及び材料について説明する。本明細書において言及した全ての出版物は、出版物が引用される方法及び／又は材料を開示及び説明するために参照として本明細書に組み入れられる。

30

【0025】

本明細書及び添付の請求の範囲において用いられるように、本文が明らかにそれ以外であることを明記していない限り、単数形「一つ (a)」「及び (and)」及び「それ (the)」には、複数形が含まれることに注意しなければならない。このように、例えば、「ポリペプチド (a polypeptide)」という用語には、そのようなポリペプチドの複数が含まれ、「その配列 (the sequence)」という用語には、当業者に既知の一つ又はそれ以上の配列及びその同等物に対する言及が含まれる。

【0026】

本明細書において記載した出版物は、本発明の提出日以前に単にその開示がなされたために提供している。本明細書のいかなる開示も先行発明に基づいて、本開示がなされた日付をさかのぼって付ける権利が本発明にはないと自認したと解釈されるべきではない。さらに、提供した出版物の日付は、実際の公表日とは異なる可能性があり、それらは個々に確認する必要がある。

40

【0027】

ヒトの体内でのリン酸代謝障害に関連する疾患治療のための診断や治療手段の必要性に鑑み、本発明における技術的課題は、骨塩や腎疾患の治療に特に有効なリン酸代謝を調節する手段や方法を提供することである。

【0028】

50

上に定義した技術的課題は、本発明の特許請求の範囲に具体的に記されている内容によって解決される。すなわち、本発明の一つの局面は、フォスファトニン活性をもつ単離されたポリペプチドに関するものでもある。

【0029】

定義

特に定めなければ、本明細書で使用される用語は「生物工学用語辞典 (A Multilingual glossary of biotechnological terms) : (IUPAC Recommendations)」、ローエンバーガー (Leuenberger, H.G.W.)、ナーゲル (Nagel, B.) 及びカルビ (Kalbl, H.) 編、(1995)、Helvetica Chimica Acta、CH-4010 Basle、Switzerland、ISBN 3-906 390-13-6で定義されているとおりである。次の定義は、本明細書全体に使われている特定の用語を理解しやすくするために記述するものである。

10

【0030】

本明細書で使われる「治療」や「治療する」などといった用語は概して、薬理学的な及び／又は生理学的な効果を得ることを意味する。効果とは、疾患や症状を完全にあるいは部分的に妨げる点で予防的であってもよく、並びに／又は疾患及び／もしくは疾患による副作用を完全にあるいは部分的に治療する点で治療的であっても良い。本明細書で用いられる「治療」という用語は、哺乳類、特にヒトにおける疾患の治療すべてを含んでいる。そしてさらに、(a) 疾患の素因があるが未だ発病していると診断されていない被験者の発病の予防；(b) 疾患の阻害、すなわち進行を抑制すること；又は(c) 疾患の緩和、すなわち疾患を軽減させること；などもこの用語に含まれる。本発明は、リン酸代謝障害に関する医学的症状をもつ患者の治療を目的とする。従って、本発明による治療は、リン酸代謝障害に関するあらゆる医学的症状を予防、阻止、緩和することを含む。

20

【0031】

本発明において、「単離」という用語は、本来の環境（例えば自然に発生するのであればその自然環境）から取り出された物質を指し、その自然状態から「人の手によって」変えられたものである。例えば、単離されたポリヌクレオチドとはベクターあるいは組成物の一部であり、細胞内に含まれていてもやはり「単離された」状態である。なぜなら、そのベクター、組成物又はある種の細胞はポリヌクレオチドにとって本来の環境ではないからである。

【0032】

フォスファトニンポリペプチド

切断型のフォスファトニンポリペプチドをまず単離して、そのcDNAをクローニングした。継続的な研究努力において、完全長の（又は全）フォスファトニンcDNAを本発明においてさらにクローニングした。最初にクローニングされた切断型フォスファトニン（又は切断型MEPE）のcDNAは、430残基（配列番号：2）で長さが1655 bp（配列番号：1）のタンパク質をコードする。完全なフォスファトニンに関して次にクローニングされたcDNAは、525残基（配列番号：27）で長さが1989 bp（配列番号：26）のタンパク質をコードする。本発明に従って単離されたフォスファトニンポリペプチドの切断型は典型的に、12.5%ゲルにおいてトリス-グリシンSDS緩衝液中、pH 8.6で測定すると、分子量が約53~60 kDaであり、より好ましくは58~60 kDである；実施例1を参照のこと。MOPS泳動緩衝液での4~12%勾配ゲルを用いたビス-トリスSDS-PAGEにおいてpH7で測定すると、おおよその分子量は200 kDaとなりうる。そのようなゲルでも同様に、53~60 kDに低分子量バンドを認める可能性がある。ポリペプチドは一般的にグリコシル化されており、かつ好ましくは、実質的に純粋な型のフォスファトニンを含む。本発明のポリペプチドは、その天然のグリコシル化パターンと共にグリコシル化なしのパターン、及びタンパク質が人工的に、例えば従来の組み換えDNA技術又はより最近開発された遺伝子活性化技術によって、合成された場合に得られる、一つ又はそれ以上の異なるグリコシル化パターンを有するポリペプチドを含む。

40

【0033】

驚くべきことに、フォスファトニンは、実施例1で与えられた方法による精製により、培

50

養細胞欧州コレクション (European Collection of Cell Culture) 寄託番号ECACC 89050 205のSaos-2細胞から得られることが判明した。従って本発明のさらなる一局面は、フォスファトニンの製造にSaos-2細胞又はHTB-96細胞を使用することである。形質転換された骨芽細胞や不死化された骨細胞株など、他の形質転換又は不死化細胞株も、フォスファトニンを大量発現できるかもしれない。

【0034】

本発明はまた、上述の腫瘍に由来する、フォスファトニンあるいはMEPE（転移性腫瘍分泌高リン酸尿物質 (Metastatic-tumor Excreted Phosphaturic-Element)）と名づけられた高リン酸尿因子のものと考えられる遺伝子の特徴分析とクローニングについても述べている。要約すると、腫瘍馴化培地 (TCM) 中の高リン酸尿因子に対する特異的な抗血清を使ってOHO腫瘍から抽出されたmRNAで構成されるλZAPII-cDNAライブラリーを発現スクリーニング (Expression Screening) する方法が使用された。タンパク質はグリコシル化されており、SDS-PAGE電気泳動にて2つのバンドを示し (58~60kDa)、スプライシング又は翻訳後修飾により切断されている可能性が示された。最初にクローニングされたcDNAは430残基のタンパク質 (配列番号：2) をコードし、長さ1655塩基対 (配列番号：1) だった。遺伝子の3'末端は存在するが、5'末端の一部が欠失している。二次構造の予測により、このタンパク質は局部的に疎水性の小さな領域を有するが親水性が高く、システイン残基をもたないことが確認されている。たくさんのらせん状の部分があり、2ヶ所の別々のN-グリコシル化モチーフがC末端にある。鍵となる特徴は、オステオポンチンに見られるのと同じ構造様式の細胞接着配列が存在することである。このモチーフに隣接したタンパク質切断部位は、オステオポンチンに見られるように、特定のインテグリンに対するレセプターの特異性を変化させる可能性がある。TremblデータベースでMEPE配列をスクリーニングしたところ、デンティンフォスフォリン (Dentin phosphoryn) (DPP) との配列相同性が示された。特に、MEPEのC末端にはDPP、デンティン基質タンパク質-1 (Dentin-Matrix Protein-1) (DMA-1) 及びオステオポンチン (OPN) に相同な配列の残基が存在する。MEPEのこの領域には、アスパラギン酸とセリン残基の連続を繰り返した配列

(DDSSSESSDSGSSSESD)

を含み、DSP、DMA-1、OPNとそれぞれ80%、65%、62%の相同性を示す。さらに、残基の物理化学的性質を考慮すると、この相似性は93%にまで高まると考えられ、生物学的機能が共通もしくは関連していることが示唆される。また、この構造的なモチーフは、MEPEにおけるカゼインキナーゼIIリン酸化モチーフと重なることも特筆すべきことである。くる病では骨のカゼインキナーゼIIの活性が損なわれ、その結果オステオポンチンのリン酸化が低下する (Rifas, Calcif. Tissue Int. 61(1997), 256-259)。カゼインキナーゼII欠損は、骨マトリックスのミネラル化を低下させる働きをしていると提唱されている (Rifas, loc. cit.)。

【0035】

デンティンフォスフォリン (DPP) は、デンティンシアロフォスフォプロテイン (DSSP) 由来の分解物質の一部であり、残りの部分はデンティンシアロタンパク質 (DSP) として知られている (MacDougall, J. Bios. Chem. 272(1997), 835-842)。特に興味深いのは、DSSP、DMA-1、OPNそしてMEPEが、明確な構造の類似性をもつRGD含有リン酸化糖タンパク質であり、骨-歯のミネラル化の主要な役割を担うことである (Linde, Crit. Rev. Oral Biol. Med. 4(1993), 679-728)。

【0036】

本発明の中で述べているフォスファトニン又はMEPEと名づけられた新規のOHO腫瘍由来高リン酸尿因子は、Na⁺依存的リン酸共輸送、ビタミンD代謝、そして骨ミネラル化を調節することで、骨ミネラルの恒常性を保つ機能をもつものである。

【0037】

フォスファトニンをコードするDNA

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが単離されている；実施例2を参照

のこと。切断型フォスファトニンのヌクレオチド及びアミノ酸配列を図8に示す（それぞれ、配列番号：1及び配列番号：2）。フォスファトニンに関する継続的な研究努力において、フォスファトニンポリペプチドのN末端をコードするさらなるポリヌクレオチドが単離されている；実施例13を参照のこと。完全長のフォスファトニンタンパク質のヌクレオチド及びアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：26及び配列番号：27に示す。配列番号：27に記載したアミノ酸配列は、付加的な95個のアミノ酸残基が図8に示された配列とは異なり、図8に示したアミノ酸配列（配列番号：2）（全長525個に対してこれまでの430個）のN末端において最初のバリンがロイシンに修正されており、N末端は、コンセンサスメチオニン開始コドンに続いて約16個のアミノ酸残基のシグナルペプチドを含む。プライマーの伸長及びノーザンブロット分析により、配列番号：26に示したヌクレオチド配列は、完全なcDNAから4～6ヌクレオチドが不足していることが確認される。同様に、対応する伸長したN末端配列はシステイン2個を含む（完全なフォスファトニン分子にはシステイン1個のみが認められる）。配列番号：27の31位に存在するシステインの一つは、ホモダイマー又はヘテロダイマーの形成にとって最適となるように配置され、もう一つは、メチオニン開始コドンから下流の5残基である（シグナルペプチドの端部）。このことは、シグナルペプチドが切断されて、フォスファトニンが細胞外環境に放出された後、N末端が共有結合タンパク質-タンパク質相互作用に関係する可能性があることを示している。実施例12に記載された実験において用いられる切断型Rec-MEPEは、分子のこの部分を欠損しており（シグナルペプチドを含む95個の残基が欠失しており、及びN末端上の残基がロイシンの代わりにバリンである）、このように、共有結合システイン-システインタンパク質間架橋を形成することができない。その上、切断型rec-MEPEタンパク質の上流の領域は、PHEX、NEP、及びナージリジン（Nardilysine）によって切断される候補であるタンパク質分解切断部位を含む。PHEX、NEPタンパク質分解部位は配列番号：27における46位の残基に存在し（KDNIG(FHHLG)）、システインを含むN末端の一部の除去が起こるであろう。これらのタンパク質溶解部位は非常に保存されており、頻繁に起こらないことを強調すべきである。このように、残りの分子（失われている切断されたN末端）は、切断型rec-MEPEと類似である。これは、実施例12で用いられた切断型rec-MEPEがダイマーを形成することができず、それによってリン酸保持特性が得られるということを意味している。このように、腫瘍由来MEPEは、ダイマーを形成して、腎リン酸処理を妨害し、その結果リン酸の取り込み阻害が起こると予想される。

【0038】

本発明に従って得られたこのさらなるデータに従って、24-ヒドロキシラーゼ発現（1.25（OH）2ビタミンD3の異化に係る酵素で、X染色体性くる病（Hyp）においてアップレギュレートされている）は、切断型rec-MEPEに暴露されたヒト腎細胞株において抑制されていることを示す。このように、リン酸の取り込みとビタミンD代謝発現はいずれも、上記の解釈と一致する。したがって、本発明のポリペプチドは、選択的にその活性に実質的に影響を及ぼさない変異又は欠失を含む配列番号：27のアミノ酸配列を含む。そのような変異には、一つ又はそれ以上のアミノ酸の置換、特にその相同体による置換と共に、特にN又はC末端での一つ又はそれ以上のアミノ酸の付加が含まれる。例えば、配列番号：27のアミノ酸配列における106位のアミノ酸残基で多型性が認められているが、この場合グルタミン酸はグリシンにもなりうる。これまで分析したクローンには等しく分布するようと思われる。欠失には、N又はC末端からの欠失が含まれる。天然アミノ酸及び合成アミノ酸の双方による置換が可能である。同様に、化学修飾又は酵素改変によって改変されたポリペプチドも含まれる。さらに、化学合成又は生物学的方法によって産生された断片ペプチドは、改変又は非改変であれ、本発明の範囲に含まれる。

【0039】

このように、本発明は、フォスファトニンポリペプチドあるいはその免疫学的及び／又は生物学的活性をもつ断片に関するものであり、以下のグループから選択されるポリヌクレオチドによってコード可能なアミノ酸配列を含む。

(a) 配列番号：2（図8）又は配列番号：27に記されたアミノ酸配列からなるポリペプ

10

20

30

40

50

チドの少なくとも成熟型をコードするポリヌクレオチド；

(b) ポリペプチドの少なくとも成熟型をコードする配列番号：1（図8）又は配列番号：26に記されたコード配列を含むポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：27の1～46位、1～96位、17～46位、17～96位、17～125位、17～284位、17～330位、17～525位、47～96位、47～125位、47～284位、47～330位、47～525位、126～284位、126～330位、126～525位、285～330位、285～525位、331～525位のアミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列を少なくとも含むポリヌクレオチド；

(d) ポリヌクレオチド(a)、(b)又は(c)によってコードされるアミノ酸配列の1つあるいは複数のアミノ酸を置換、欠失及び／又は付加することによって、ポリヌクレオチド(a)、(b)又は(c)にコードされるポリペプチドに由来するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(e) (a)～(d)のいずれか一つのポリヌクレオチドとハイブリダイゼーションする相補鎖からなるポリヌクレオチド；

(f) (a)～(e)のいずれか一つのポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドのアミノ酸配列と60%以上の同一性をもつ配列のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(g) (a)～(f)のいずれか一つのポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドの断片又は抗原決定基部位を含み、リン酸代謝調節機能をもったポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(h) 配列番号：2（図8）の約1～40位、141～180位及び／もしくは401～429位のアミノ酸残基、並びに／又は配列番号：27の約17～46位及び／もしくは47～96位のアミノ酸残基を含むフォスファトニンポリペプチドの抗原決定部位をコードするポリヌクレオチド；

(i) (a)～(h)のいずれか一つのポリヌクレオチドの少なくとも15ヌクレオチドを含み、リン酸代謝、ビタミンD代謝、及び／又は骨格形成もしくはミネラル化を調節することが可能なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(j) (a)～(i)のいずれか一つのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの、細胞及び／又はグリコサミノグリカン接着モチーフ、及び／又は骨ミネラルモチーフを含み、リン酸代謝、ビタミンD代謝、及び／又は骨格形成もしくはミネラル化を調節することが可能なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(k) コードされるポリペプチドがホモダイマー及び／又はヘテロダイマーを形成することができる(a)～(j)のいずれか一つのポリヌクレオチド；並びに

(l) そのヌクレオチド配列が(a)～(k)のいずれかのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列に対する遺伝子コードの結果、縮重しているポリヌクレオチド。

【0040】

本明細書において用いられるように、フォスファトニン「ポリヌクレオチド」とは、リン酸代謝、ビタミンD代謝、及び／又は骨格形成もしくはミネラル化を調節するペプチドをコードする分子を意味する。好ましくは、核酸配列は、配列番号：1又は26を含む、又はより好ましくはそれらからなる。より好ましくは、分子は、本発明の特異的フォスファトニンポリペプチドをコードする。例えば、フォスファトニンポリペプチドは、5'及び3'の非翻訳配列、コード領域、核酸配列の断片、抗原決定基、ドメイン、そして変異配列を含むcDNA配列の全長のヌクレオチド配列を含む。さらに、本明細書で使用されているように、フォスファトニン「ポリペプチド」とは、広く定義されているポリヌクレオチドから翻訳されてできるアミノ酸配列をもつ分子を意味する。

【0041】

フォスファトニン「ポリヌクレオチド」とは、さらに、配列番号：1もしくは配列番号：26又はその相補配列に含まれる配列に、ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件下で、ハイブリダイゼーションできるポリヌクレオチドも含む。「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、50%のホルムアミド、5×SSC（塩化ナトリウム750mM、クエン酸ナトリウム75mM）、リン酸ナトリウム50mM、（pH 7.6）、5×デンハルト溶液、10%の硫酸デキストラン、及び20 µg/mlの変性させ細断したサケ精子由来のDNAからなる溶液中で、42℃で一晩インキュベートし、その後、約65℃において、濃度0.1×SSCの液

10

20

30

40

50

でフィルターを洗浄することを指す。より適したハイブリダイゼーションの条件は、実施例に記す。

【0042】

さらに期待されるのは、比較的低ストリンジェントのハイブリダイゼーション条件でフォスファートニンポリヌクレオチドとハイブリダイズする核酸分子も企図される。ハイブリダイゼーション及びシグナル検出のストリンジェンシーを変えるのは、基本的にホルムアミド濃度（ホルムアミドの濃度が低いとストリンジェンシーも低下する）、塩の濃度、あるいは温度を変えることで達成できる。例えば、より低ストリンジェントな条件とは、 $6\times$ SSPE（ $20\times$ SSPE=3M NaCl; 0.2M NaH_2PO_4 ; 0.02M EDTA, pH7.4）、0.5%のSDS、30%のホルムアミド、100 $\mu\text{g/ml}$ のサケ精子由来ブロッキングDNAからなる37°Cの溶液中で一晩インキュベートし、 $1\times$ SSPE、0.1%SDS、50°Cの液で洗浄することを含む。さらにもっと低ストリンジェントな条件にするには、ストリンジェントなハイブリダイゼーションの後に高塩濃度の液（例、 $5\times$ SSC）で洗浄する。上記の条件のバリエーションは、ハイブリダイゼーション実験におけるバックグラウンドを抑制するために使用されるブロッキング試薬に他のものを入れたり他のもので置換したりすることによっても達成されうることを注記しておく。典型的なブロッキング試薬には、デンハルト試薬、BLOTTO、ヘパリン、変性させたサケ精子DNA、市販の特殊な試薬も含まれる。適合性の問題があるため、特定のブロッキング試薬を使用するためには、上述のハイブリダイゼーション条件を改変することが必要かもしれない。もちろん、ポリA⁺配列（配列表に示されたcDNAの3'末端にあるポリA⁺配列など）、あるいはそれと相補的なT（又はU）残基の連続配列は、ポリ（A）連続配列やその相補配列を含むいかなる核酸分子（例えば、事実上すべての二本鎖のcDNAクローン）ともハイブリダイズするので、ここで定義している「ポリヌクレオチド」には含まれない。

【0043】

フォスファートニンポリヌクレオチドは、改変されていないRNAもしくはDNA、又は改変されたRNAもしくはDNAのような、いかなるポリリボヌクレオチドあるいはポリデオキシリボヌクレオチドも含むことができる。例えば、フォスファートニンポリヌクレオチドは、一本鎖と二本鎖のDNA、一本鎖と二本鎖の領域が混在するDNA、一本鎖及び二本鎖のRNA、一本鎖と二本鎖の領域が混在したRNA、一本鎖又はより典型的には二本鎖、又は一本鎖と二本鎖の領域が混在したDNA及びRNAから成るハイブリッド分子によって構成されることもできる。さらに、フォスファートニンポリヌクレオチドは、RNAもしくはDNA、又はRNAとDNAの三本鎖領域によっても構成できる。フォスファートニンポリヌクレオチドは、一つあるいはそれ以上の縮重した塩基又は、安定性付与もしくはそれ以外の目的で改変されたDNA又はRNAのバックボーンを含むものでもよい。「改変された」塩基には、例えば、トリチル化された塩基や、イノシンのような通常は含まれない塩基が含まれる。DNA、RNAには様々な改変を行うことができる、このように、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的、又は代謝的に変換した形をとる。

【0044】

フォスファートニンポリペプチドは、アミノ酸が、ペプチド結合、あるいは縮重したペプチド結合すなわちペプチド同配体（isosteres）によって互いに結合することによって構成され、遺伝子によってコードされる20種類のアミノ酸以外のアミノ酸を含有することもできる。フォスファートニンポリペプチドは、翻訳後プロセッシングなどの自然なプロセッシング、又は当技術分野でよく知られた技術を用いる化学的変換のどちらによって変換してもよい。そのような変換は、基本的なテキストや、より詳しい研究論文、様々な研究文献に記述されている。変換は、ペプチドの基本骨格、アミノ酸側鎖、及びアミノ末端又はカルボキシ末端など、フォスファートニンペプチドのどこに起こしてもよい。同じタイプの変換の場合、与えられたフォスファートニンポリペプチドのいろいろな個所に、同程度もしくは異なる程度に起こすことができることを認識されると思われる。さらに与えられたフォスファートニンポリペプチドが様々なタイプの変換を含んでもよい。フォスファートニンポリペプチドは、例えばユビキチン化によって枝状になってもよいし、あるいは枝状構造の有無に

関らず環状になることもありうる。環状、枝状、そして枝のある環状のフォスファートニンポリペプチドは、翻訳後の自然のプロセッシングによるものでも、合成的な方法によるものでもよい。変換には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合による付加、ヘム構造の共有結合による付加、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合による付加、脂質又は脂質誘導体の共有結合による付加、フォスファチジルイノシトールの共有結合による付加、架橋、環状化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋結合形成、システイン形成、ピログルタミン酸塩形成、製剤、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化 (pegylation)、タンパク質分解による切断、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレン化 (selenoylation)、硫酸化、アルギニン付加やユビキチン付加のようなトランスファーRNAによって媒介されるタンパク質へのアミノ酸の付加が含まれる；例えば、「タンパク質の構造及び分子の特性 (PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES)」、第2版、T.E. Coreighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993)；「タンパク質翻訳後の共有結合性修飾 (POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEIN)」、ジョンソン (b.c. Johnson) 編、Academic Press, New York (1983)、1~2頁；シフター (Seifter)、Meth. Enzymol., 182 (1990)、626~646；ラタン (Rattan)、Ann, NY Acad. Sci. 663 (1992)、48~62参照。例えば、フォスファートニンがプレプロタンパク質として発現し、プレ配列又は場合によってはプロ配列のプロセッシングの後に、二つ又はそれ以上のフラグメントが、例えば水素結合及び／又はジスルフィド架橋の形成によって解離せずにいることも可能である。プレプロ体や成熟型フォスファートニンポリペプチドのプロセッシング及び／又は切断は、切断部位における1つ又はそれ以上のアミノ酸の欠失を伴う場合もありうる。このようなすべての型のフォスファートニンタンパク質が、「フォスファートニンポリペプチド」や「ポリペプチド」又は「タンパク質」の語彙の範囲に含まれると理解されたい。

【0045】

「配列番号：1」及び「配列番号：26」は、フォスファートニンポリヌクレオチド配列を示し、同様に「配列番号：2」及び「配列番号：27」はフォスファートニンポリペプチドの配列を示している。

【0046】

「生物活性をもつ」フォスファートニンポリペプチドとは、後に述べる特定の生物アッセイ法において、投与量依存性であるか否かに関らず、フォスファートニンポリペプチドの活性と、必ずしも一致しなくてもよいが、似たような活性を示すポリペプチドを意味する。投与量依存性がある場合、フォスファートニンポリペプチドの投与量依存性と必ずしも一致する必要はないが、フォスファートニンポリペプチドと比較して、かなり類似した投与量依存的な活性がある必要がある（つまり、候補となるポリペプチドは、フォスファートニンポリペプチドに比べて、より高い活性を示すか、又は約25倍未満、好ましくは約10倍未満、より好ましくは約3倍未満低い活性を示す）。

【0047】

「免疫学的に活性がある」又は「免疫学的活性」とは、本発明のフォスファートニンポリペプチドの断片、類似体、誘導体のうち、その本質的な免疫学的性質が影響を受けずに残っていることを意味する、すなわち本発明のポリヌクレオチドが、上記のポリヌクレオチドにコードされるフォスファートニンタンパク質に特有の抗体に特異的に反応することのできる一つ又は複数のエピトープの少なくとも一部の一次構造及び／又は二次構造を有するタンパク質又はペプチドをコードする全てのヌクレオチド配列を含むことを意味する。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドがコードするペプチドやタンパク質は、配列番号：2の約20~30位、100~130位、145~160位、300~310位、320~340位、もしくは380~430位のアミノ酸残基から成るフォスファートニンポリペプチドの抗原決定基、又は、下記に述べるフォスファートニンポリペプチドの抗原決定基に特異的に反応する抗体によって認識されることが望ましい。380~430位の残基のペプチド／抗体はミネラル化のプロセスを調べるのに特に有用で、145~160位の残基のペプチド／抗体は受容体のリガンド相互作用（イン

テグリン、等)の研究に、そして、20~30位と100~130位の残基は、特にリン酸代謝調節の研究に重要だと思われる部分である。本発明のフォスファトニンポリペプチドにおいて存在するさらに好ましい抗原決定基は、配列番号:27における1~46位、1~96位、17~46位、17~96位、17~125位、17~284位、17~330位、17~525位、47~96位、47~125位、47~284位、47~330位、47~525位、126~284位、126~330位、126~525位、285~330位、285~525位、及び/又は331~525位のアミノ酸残基を含む。特に好ましい態様において、本発明のフォスファトニンペプチドは配列番号:27の17~46位、47~525位のアミノ酸からのアミノ酸配列を含む。

【0048】

好ましくは、免疫学的活性のある本発明のフォスファトニンペプチド断片、フォスファトニンポリペプチドの類似体及び誘導体は、哺乳類、好ましくはマウスやラットに免疫反応を誘発できることが望ましい。

【0049】

本発明の好ましい態様において、フォスファトニンポリペプチドは生物学的活性があり、リン酸代謝を制御もしくは変化させることができ、好ましくは「フォスファトニン活性」がある。

【0050】

フォスファトニン活性

本明細書に使用される「リン酸代謝を制御する又は変化させることができる」という表現は、本発明のフォスファトニンポリペプチドの有無、つまり、被験者体内のフォスファトニンポリペプチドのレベルによってナトリウム依存性リン酸共輸送、ビタミンD代謝及び/又は骨ミネラル化を変化させることを意味する。前述の活性が本発明のポリペプチドによってアップレギュレーションされるかダウンレギュレーションされるかによって、「リン酸代謝を制御する又は変化させることができる」という表現は、それぞれ「フォスファトニン活性」と「抗フォスファトニン活性」を意味する。

【0051】

フォスファトニン活性は、特に、ナトリウム依存性リン酸共輸送のダウンレギュレーション活性、及び/又は腎25-ヒドロキシビタミンD3-24-ヒドロキシラーゼのアップレギュレーション活性、及び/又は腎25-ヒドロキシD-1 α -ヒドロキシラーゼのダウンレギュレーション活性として、通常のアッセイ法によって計測できる。それぞれの場合において、関連する酵素活性の制御は、フォスファトニンによって直接もしくは間接的に影響される可能性がある。例えばナトリウム依存性の放射性リン酸取り込みの計測によって計測される。これらの活性はCL8やOK(細胞培養物欧州コレクション(the European Collection of Cell Cultures)にECACC 91021202として寄託されている)のような適切な腎細胞株を用いてアッセイすることができる。適切なアッセイの方法はロウら(1996)に見出せる。フォスファトニン活性は、さらに、組織培養における骨芽細胞によって媒介されるミネラル化促進活性によって測定してもよい。サンティバン(Santibanez)、Br. J. Cancer 74(1996)、418~422;ストリンガ(Stringa)、Bone 16(1995)、663~670;アロノー(Aronow)、J. Cell Physiol. 143(1990)、213~221を参照、又は添付の実施例中にも記述してある。

【0052】

さらなる一局面として、上記ポリペプチドの生物活性断片を含むポリペプチドも本発明に含まれる。この理論に限定することを意図したものではないが、フォスファトニンには、インビボで1つ又はそれ以上の断片に分解されるポリホルモンとしての機能を持ち、分解された断片の少なくともいくつかは、ホルモン活性のような生物活性を備えているかもしれないと考えられる。インビボでは、フォスファトニンは、例えば、PHEX遺伝子産物によってタンパク質分解的に切断され、少なくとも一つの機能的断片を産生するかもしれない、と考えられる。好ましい態様では、生物活性断片を含むポリペプチドは、例えば、上で論じたフォスファトニン活性をもつことによって、あるいは、後に詳しく述べるようなフォスファトニン活性と正反対の活性をもつことによって、リン酸代謝を調節することがで

きる。生物活性断片とは、N末端、C末端、あるいはその中間の断片でもよい。生物活性断片を含むポリペプチドは、さらに、その生物活性断片の活性が著しい影響を受けないさらに別のアミノ酸配列を付加したものも含まれる。

【0053】

好ましい場合として、当該生物活性断片は、好ましくはRGDを含む細胞接着モチーフをもつ。後に詳しく論じているように、このモチーフは、受容体及び／又は骨のミネラルマトリックス相互作用にも関与するかもしれない。好ましい場合として、生物活性断片には、好ましくはSGDG（配列番号：3）を含むグリコサミノグリカン接着モチーフが存在する。グリコサミノグリカンに接着することから、断片がプロテオグリカンと似た性質をもっていると考えられる。プロテオグリカンは骨の生物活性、特に細胞シグナリングに携わっていることが知られている。これらのモチーフは下記にさらに詳述する。構造的モチーフ及び機能的モチーフを含む完全なフォスファトニン分子の一次構造を、図15に示す。フォスファトニンのいかなる生物活性及び／又は免疫活性断片も、例えば、インビトロ又はインビボでエンドペプチダーゼ及びホスファターゼのような酵素にフォスファトニン分子又はその誘導体を供することによって、組み換えDNA技術及び／又は（生物）化学手段によってそれらから作製することができる。

10

【0054】

本発明の一つの態様において、生物活性断片を含むポリペプチドは、フォスファトニン活性を有する。理論に拘束されるつもりはないが、そのような活性は、PHEXメタロプロテイナーゼによって切断されないフォスファトニン、及び部位
ADAVDVS

20

（配列番号：4）のようなPHEXメタロプロテイナーゼ切断部位を有するいくつかの生物活性断片において予想され、この場合切断は、VD残基（配列番号：27の330位及び331位に対応する図8のアミノ酸配列における235位及び236位の残基）の間、及び／又は配列番号：27のアミノ酸配列における46位と47位のGF残基の間で起こると予想される。生物活性断片は、このPHEXメタロプロテイナーゼ切断部位が断片の一部となるように、図8のアミノ酸配列の少なくとも最初の236残基を含んでもよい。そのようなフォスファトニン活性を有するポリペプチド及びその断片は、高リン酸血症病態の治療に有用であると考えられる。

【0055】

30

本発明に従ってPHEX特異性に関して、好ましくは、切断のための保存されたよい候補部位として、グリシンとフェニルアラニン（GF）とを含むより厳密な定義が用いられると理解すべきである。この点において、完全なフォスファトニン分子においてアミノ酸残基位置におけるそのような部位は3個存在するに過ぎない（配列番号：27における46位、125位、及び284位）；同様に図15を参照のこと。

【0056】

同様に活性断片は、配列番号：27の479残基を含む最初のPHEX部位から下流の全分子、及び推定のシグナルペプチド508残基を差し引いた非切断分子（特にリン酸の取り込みに関して）を含んでもよい。この点において、当初の切断型rec-MEPEに対してN末端のシステイン（31位の残基）は、フォスファトニンホモダイマー及び／又はヘテロダイマーの形成
40

【0057】

この場合も、理論に拘束されたくはないが、切断されていない二量体フォスファトニンは、フォスファトニン活性（腎リン酸漏出、リン酸尿症、Na⁺依存性リン酸共輸送のダウンレギュレーション、及び24-ヒドロキシラーゼ活性の増加、低リン酸血症等）に関連すると考えられる。二量体を形成していない、N末端で切断されたフォスファトニンは、抗フォスファトニン活性（腎リン酸の取り込みの増加、Na⁺依存性リン酸共輸送のアップレギュレーション、及び24-ヒドロキシラーゼの抑制、高リン酸血症、及び1- α -ヒドロキシラーゼ活性の増加等）に関連すると提唱される。

【0058】

50

骨形成及び／又は骨ミネラル化に関して、MEPEモチーフを含むC末端領域（おそらくリン酸化後）は、骨マトリクス（ヒドロキシアパタイト、I型コラーゲン、フィブロネクチン、オステオカルシン）と相互作用して、RGDモチーフはインテグリン受容体を通じて細胞と相互作用する（骨芽細胞及び／又は破骨細胞）と推測される。マトリクス細胞相互作用は、核のミネラル化において重要な役割を有する可能性があり、フォスファトニンも同様に、骨芽細胞／破骨細胞遺伝子調節及び腎内分泌機能に対してオートクライン作用又はパラクライン作用を及ぼす可能性がある。

【0059】

もう一つの可能性があるシナリオは、それぞれが特異的生物活性を有する規定のセグメントにフォスファトニンを切断することである（多くのホルモン及び骨形態形成タンパク質について起こるようなフォスファトニンの切断）。その上、リン酸化による翻訳後改変もまた、フォスファトニン生物活性を調節するために重要な役割を有する可能性がある。例えば、RGDモチーフを含む断片（158残基）は、理論的に配列番号：27の125位及び284位の残基でフォスファトニン分子がPHEX切断されて形成され、これは規定の生物活性を有する可能性がある。配列番号：27における46位と125位の残基（79残基）で切断されて作製されたN末端断片も同様に、リン酸の恒常性において何らかの役割を有する可能性があり、配列番号：27のアミノ酸配列における283位の残基で切断されて作製された241残基のC末端断片が骨ミネラル化において役割を有する可能性も同様に認識される。

【0060】

上記の知見及び事実から、フォスファトニンに変換されるプロフォスファトニン（シグナルペプチド切断）は、PHEX又はその他のエンドペプチダーゼによって切断され、その結果システイン含有N末端ペプチドが失われる。このようにして、残りのC末端タンパク質ではホモダイマー又はヘテロダイマーとはなり得ない（完全なフォスファトニン分子において他にシステインはない）と考えられる。フォスファトニン二量体が形成されると、腎NPT2受容体を遮断する（プロセシングされたフォスファトニンとの競合）、NPT2発現をダウンレギュレートする、NPT2 mRNA安定性に影響を及ぼす、又はNa⁺依存性リン酸共輸送の小胞内移動を変化させる（直接又は間接的のいずれか）ことによって、腎リン酸処理の欠損が起こる可能性がある。PHEX又は他のエンドペプチダーゼによってN末端システイン含有領域を除去すると、リン酸保持活性を有する分子からの切断型又はプロセシング型が得られると考えられる。実施例12の実験において用いられた組換え融合タンパク質は、N末端「システイン含有」領域（配列番号：27のN末端の95残基が欠失しており、そのような95個の残基に隣接するロイシン残基がバリンであった）を欠損しており、したがって、MEPEのリン酸変換型又はプロセシング型（PHEX又はメタロエンドペプチダーゼ切断）を模倣することによって作用する可能性がある。PHEX/NEPに関するN末端領域における独自の垂鉛エンドペプチダーゼ切断部位に関連して、提案された二量体形成モデルは、プロタンパク質コンバーターゼI及びIIに関する単一の部位の存在である。不活性前駆体タンパク質のエンドタンパク質溶解的（endoproteolytic）切断によるプロタンパク質コンバーターゼ（PACE4等）による骨形態形成タンパク質（BMP）活性及び多くの他のホルモン活性（プロメラニン、プロフィブリン、プロサイロトロピン放出ホルモン）の調節が証明されている（コンスタム（Constam）、J. Cell Biol. 144（1999）、139～149；ラグナス（Raghunath）、J. Cell Sci. 112（1999）、1093～1100；バイエール（Viale）、J. Biol. Chem. 274（1999）、6536～6545；シャナー（Schaner）、J. Biol. Chem. 272A（1997）、19958～19968）。同様に、胚形成時の特異的プロコンバーターゼの発現パターンは、動的であり、BMPとの同時移動が起こる（ツジ（Tsuji）、J. Biochem. 126（1999）、591～603）。

【0061】

要約すると、MEPE又はフォスファトニンは、タンパク質溶解的切断及び選択的リン酸化によって連続的に処理されて、多くの生物活性ペプチドを生成すると考えられる。最初の46残基を除去すると、フォスファトニン活性は抗フォスファトニン活性に変化するように思われる（フォスファトニンは低リン酸血症活性として、そして抗フォスファトニンは高リン酸血症活性として定義される）。PHEXは、この過程において重要な役割を有する可能性

10

20

30

40

50

があるが、他のプロテアーゼが関与する可能性は除外されない。例えば、プロタンパク質コンバーターゼは、配列番号：27のアミノ酸配列における54位と383位の残基に可能性がある切断部位を2箇所有し、はるかに大きいRGD含有ペプチド（329残基）を生成しうる。同様に、もう一つのスプライシングが存在する可能性があり、骨髄におけるフォスファトニン転写物がOH腫瘍において認められるものと異なる大きさであることを示唆するいくつかの証拠が存在する。

【0062】

関連するタンパク質

本発明に関するさらなる研究の結果、フォスファトニン（MEPE）、デンティンマトリックスタンパク質-1（Dentin Matrix Protein-1：DMP-1）、デンティンシアロフォスフォロプロテイン（Dentin Sialo Phosphoprotein：DSSP；より具体的にはデンティンフォスフォリン（dentin phosphoryn）C末端）、骨シアロプロテイン（bone sialoprotein：BSP）、及びオステオポンチン（Osteopontin：OPN）の間に、いくつもの高度な類似性があることが明らかになった。特に前記のすべてのマトリックスタンパク質はRGDモチーフをもち、グリコシル化されており、アスパラギン酸とセリンを非常に多く含んでいる。カゼインキナーゼIIのリン酸化モチーフをこれらすべてが保有しており、これら各タンパク質間で高度に相同な領域が存在する。ランビュー-シム（Lanview-sim）分析スイスプロットソフトウェア（Duret. LALNVIEW：「対配列アライメントのグラフィカルビューア（a graphical viewer for pairwise sequence alignments）」Comput. Biosci. 12（1996）、507-510）は、フォスファトニンとDSSPとの高相同性領域をドットマトリックス比較の図で示している。DSSPのデンティンフォスフォリン（DP）部位では、そのモチーフが5回繰り返されており（図12a）、そしてこのモチーフはフォスファトニンのC末端残基と80%の相同性がある。物理化学的変数によれば、93%の相同性があると推論され、この配列相同性は、60～65%の配列類似性をもって、他の骨／象牙質分子群にも見られる。さらに同じ領域に、表2と下記の配列比較に見られるように、DMA-1とフォスファトニンとの間の連続する残基と相同な配列がある。

408 SSRRRDDSSSESSDSGSSSESDDG 429 切断型MEPE（配列番号：5）

443 SSRSKEDSN-STESKSSSEEDG 463 DMA-1（配列番号：6）

【0063】

デンティンシアロフォスフォロプロテイン（DSSP）は、大きなRGD含有糖タンパク質で、インビボでは分解されてそれぞれデンティンシアロプロテイン（DSP）とデンティンフォスフォリン（DP）の2つのタンパク質を産生する（MacDougall, J. Biol. Chem. 272（1997）、853-842）。DSPはN末端ペプチド、DPはC末端ペプチドで、両方とも、最初は異なる遺伝子産物と考えられていた。フォスファトニンとDSSPとの、高ストリンジェント条件及び低ストリンジェント条件における統計的ドットマトリックス比較（dot matrix comparison）を図13に示す。DSSPにおける「相同性のモチーフ」

（DSSSESSDSGSSSES（配列番号：7））

の繰り返しの性質と、その著しい相同性は、どちらも図中に明らかに示されている。MEPEでは、モチーフはC末端に1度だけ現れる。さらに、DSSPのC末端部位（又はDP部位）との全体に低いレベルでの配列類似性は明確に現れている。このように、骨-歯のマトリックスクラスにおいて骨ミネラル相互作用の機能を果たしていると見られる新規の「独特な」特性が見出されたと考えられる。

【0064】

結論として、本明細書に論じられるタンパク質は全て、骨ミネラルや歯の細胞外マトリックスと顕著な相関を持っていると見られ、それらの相互作用はインテグリン／RGDの関係により仲介されると考えられる。さらに、新しい部分モチーフ（セリンとアスパラギン酸に富む）は、リン酸-カルシウム相互作用に理想的である。したがってこれは、フォスフ

ァトニンのC末端が、骨ミネラルの恒常性を保つ役割をし、N末端が腎臓のリン酸調節を担っているという仮説を支持するものである。要約すると、これらのタンパク質が共通してもつ性質には、次のようなものが含まれる：

1. 類似の基本骨格中のRGDモチーフをもつ。
2. 糖タンパク質である。
3. セリンとアスパラギン酸を多く含む。
4. カゼインキナーゼとプロテインキナーゼモチーフをもつ。
5. 明らかにアスパラギン酸・セリンに富んだMEPEモチーフ（DPPにおいては繰り返される）。
6. 多くのリン酸化モチーフとミリストイル化モチーフをもつ。
7. 切断及び/又はオルターナティブスプライシング(Alternative Splicing)の証拠。
8. すべて骨や歯の細胞外マトリックスに関係する。

10

【0065】

このように、本発明の好ましい態様において、フォスファトニンポリペプチドは、上述の骨ミネラルモチーフ、好ましくは配列番号：5又は7のアミノ酸配列、又は既に述べたDMP-1、DSSP、BSP、OPN、もしくはDMA-1タンパク質のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列をもつ。

【0066】

生物活性をもつ断片

本発明のもう一つの態様において、生物活性をもつ断片を含むこのポリペプチドは、フォスファトニンと逆の活性をもつため、低リン酸血症の治療に適していると考えられる。この態様において、このポリペプチドは、直接もしくは間接的にナトリウム依存性リン酸共輸送分子のアップレギュレーション、及び/又は25-ヒドロキシビタミンD3-24-ヒドロキシラーゼのダウンレギュレーション、及び/又は腎25-ヒドロキシD-1-ヒドロキシラーゼのアップレギュレーション機能をもつ。既に述べた活性は、本明細書では「抗フォスファトニン」活性とも呼ばれる。しかしながら、「抗フォスファトニン」活性という用語の使用は、前記活性がリン酸代謝における本当のフォスファトニンの顕著な活性である可能性を除外するものではない。それら「抗フォスファトニン」活性もまた、CL8やOK（細胞培養物欧州コレクション（European Collection of Cell Cultures）ECACC91021202として寄託されている）などの適切な腎細胞株を使ったアッセイ法によってロウら(1996)のアッセイ法で簡便に計測できる。その方法については、上述と添付の実施例参照。こうして本発明のフォスファトニンポリペプチドは、前述の方法、あるいは例えば添付の実施例のような後述の方法のいずれか一法によって、簡単にフォスファトニン又は「抗フォスファトニン」活性を調べることができる；実施例12を参照のこと。好ましくは、フォスファトニン断片は、PHEXメタロペプチダーゼ又はPHEXと同じもしくは類似の基質特異性を有する他のペプチダーゼによってフォスファトニンをタンパク質分解して得られる。PHEX遺伝子はクローニングされ、ロウ(1997)に論じられているように、Znメタロペプチダーゼをコードしていることが見出されている。再び、この理論に限定することを意図したものではないが、構造的にこのような活性をもつ生物活性断片は、図8又は図15のアミノ酸配列のN末端又はC末端の少なくとも一部を欠いているか、好ましくは、N末端及び/又はC末端から、配列番号：2のアミノ酸配列における235位/236位の残基、又は配列番号：27のアミノ酸配列における46位、125位及び/もしくは284位の残基に位置するPHEXメタロプロテイナーゼ分解部位と推定される部位までを少なくとも欠いている断片、と考えられる。よってこのポリペプチドは、好ましくは最大でも、図8のアミノ酸配列の最初の約235残基以下の残基、又は前述のアミノ酸位置のいずれか一つの位置がPHEX切断されて産生した配列番号：27のアミノ酸配列断片を含む。

20

30

40

【0067】

実施例4で説明しているように、本発明のフォスファトニンポリペプチドは、標的cDNAをβ-ガラクトシダーゼ酵素の一部に連結する発現ライブラリーを使用してクローニングされた。そのようにして得られたcDNAにはN末端メチオニンが含まれていなかった。しかし

50

ながら、実施例13に記載しているように、純粋なフォスファトニンは、そのアミノ酸配列中にN末端メチオニンを有する。従って、本発明フォスファトニンポリペプチドの一態様として、ポリペプチドのアミノ酸配列のN末端にはアミノ酸、メチオニンが含まれる。

【0068】

もう一つの態様では、本発明のポリペプチドは融合タンパク質の一部である。この態様についてはこれ以降に論じる。

【0069】

さらに、本明細書に記すフォスファトニンポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明により提供される。そのようなポリヌクレオチドは、cDNAのようなDNA、もしくはmRNAのようなRNA、又は合成もしくは変換した誘導体など他の形態の核酸であってもよく、連続配列もしくは挿入配列によって遮られた複数の配列としてのポリペプチドをコードするものでもよい。どのような形態で存在するにしても、そのポリヌクレオチドは、単離されたポリヌクレオチドであり、天然に存在する状態から分離されたものである。本発明のこの局面はヒトフォスファトニンの遺伝子のクローニングに基づいている。好ましい態様において、このポリヌクレオチドは図8のヌクレオチド配列又は配列番号：26に示すヌクレオチド配列を含み、そのポリヌクレオチドにコードされたポリペプチドの活性に実質的に影響を及ぼさない範囲で、随意に一つ又はそれ以上の変異や欠失を含むことができる。そのような変異には、遺伝子コードの縮重からおこる変異、アミノ酸のどれかに上に述べたような変異や欠失を起こすような変異を含む。すなわち、分子生物学分野の技術者が日常的に使う技術によって、図8又は配列番号：26のヌクレオチド配列を利用し、本発明に有用なポリペプチドをコードするのに適したポリヌクレオチド配列を産生することができる。本明細書で既に述べたように、本発明は、下記に詳しく述べているような、C末端及びN末端のいずれかから連続したヌクレオチドを欠失したヌクレオチド配列であるフォスファトニンポリヌクレオチドも包含する。

【0070】

本発明ポリヌクレオチド配列の延長

実施例4及び13で論じているように、この発現ライブラリーによって得られるフォスファトニンポリヌクレオチドは、5'末端の全長を含んでいないかもしれない。フォスファトニンポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、一部のヌクレオチド配列や、プロモーターや調節因子のような上流の配列を見つけ出すために当技術分野で知られるさまざまな方法を利用して延長されるかもしれない；実施例13も参照。ゴビンダ（Gobinda）（PCR Methods Applic. 2(1993), 318-322）は、「制限酵素部位」ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を、既知の部位に隣接する未知の配列を探し出すユニバーサルプライマーを使用する直接の方法として明らかにしている。はじめに、リンカー配列に対するプライマーと、既知領域に特異的なプライマーの存在下で、ゲノムDNAを増幅する。増幅された配列は、同じリンカーに対するプライマー及び最初のプライマーの中にあるもう一つの特異的なプライマーとともに、二回目のPCRを行う。各回のPCRによる産物は、適切なRNAポリメラーゼによって転写され、逆転写酵素によって配列が決定される。

【0071】

逆PCRは、既知の領域に基づいて逆方向へのプライマーによって、配列を増幅したり延長したりする際に用いることができる（Triglia, Nucleic Acids Res. 16 (1998), 8186）。このようなプライマーは、OLIGO（登録商標） 4.06 Promer Analysis Software(1992; National Biosciences Inc, Plymouth MN)、あるいはその他の適切なプログラムによって、好ましくは長さ22～30ヌクレオチド長で好ましくは50%以上のGCを含み、好ましくは約68～72℃の温度でターゲットとなる配列にアニーリングされるよう設計することができる。この方法は、遺伝子の既知の領域に適切な断片を作るために、いくつかの制限酵素を使用する。その断片は、さらに分子内ライゲーションによって再使用され、PCR鋳型として使用される。

【0072】

検索PCR（Capture PCR）（Lagerstorm, PCR Methods Applic. 1 (1991), 111-119）は、

既知の配列に隣接するDNA断片、例えばヒト酵母人工染色体DNAなどをPCRで増幅する方法である。検索PCR (Capture PCR) でも、PCRの前に遺伝子操作した二本鎖配列をDNA分子の未知の部分に設置するために、複数の制限酵素による消化作用とライゲーションが必要となる。

【0073】

未知の配列を探し出すもう一つの方法としては、パーカー (Parker) (Nucleic Acids Res. 19 (1991), 3055-3060) の方法がある。さらに、ゲノムDNAに入りこむのに、PCR、ネステッドプライマー (Nested Primer)、及びプロモーターファインダーライブラリーを使うこともできる (PromoterFinder (商標) Clontech (Palo Alto CA))。このプロセスだとライブラリーをスクリーニングする必要がなく、イントロンとエクソンの接合点を見つかるのに役に立つ。完全長のcDNAをスクリーニングするための好ましいライブラリーは、より大きなcDNAを含むようにサイズで選別されたものである。さらに、ランダムにプライムされたライブラリーには、遺伝子の5'領域及び上流領域を含む配列をより多く含んでいる点で好ましい。ランダムにプライムされたライブラリーは、オリゴd (T) ライブラリーが完全長のcDNAを生じない場合特に有用である。さらには、プライマー伸長産物の直接シーケンシングを行ってもよい。ゲノムライブラリーは、5'側の非翻訳調節領域への伸長に有用である。毛細管電気泳動は、シーケンシングあるいはPCR産物のヌクレオチド配列のサイズを分析したり確認したりするのに使えるかもしれない。例えば、上述のサムブルック (Sambrook) を参照。迅速なシーケンシングのためのシステムは、パーキンエルマー (Perkin Elmer)、ベックマンインストルメンツ (Beckman Instruments) (Fullerton CA) やその他の会社のものが入手可能である。

【0074】

フォスファトニンポリペプチドとそれらをコードする遺伝子のコンピューターによる同定ベーシックローカルアライメントサーチツール (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul, Nucleic Acids Res. 25 (1997), 3389-3402; Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410) の略であるBLAST2は、局所的な配列のアライメントを検索するのに使用することができる。BLASTは、配列の類似性を見つけるために、ヌクレオチドとアミノ酸配列のアライメントを生成することができる。アライメントの局所的な性質により、BLASTは、完全に適合する配列を決定したり相同体を同定したりするのに特に有効である。BLASTアルゴリズム出力の基本ユニットは、ハイスコアなセグメントペア (High-scoring Segment Pair: HSP) である。HSPは、随意ではあるが同じ長さの2つの断片配列から成り、そのアライメントは局所的に極大であり、そのアライメントスコアは、ユーザーによって設定された閾値又はカットオフスコアに合致するか又はそれを上回るものである。BLASTによるアプローチは、対象の配列とデータベースにある配列との間のHSPを検索するものであり、一致する個所が見つかったらその統計学的有意性を調べ、ユーザーの設定した有意性の閾値を満たすような一致する個所のみを報告する。変数Eは、データベースと一致すると報告された配列の、統計学的に有意な閾値を設定する。Eは、全体のデータベース検索の範囲内で、HSP (もしくはHSPのセット) が現れると予測される頻度の、上方の境界を示す。Eを満たすどんなデータベース配列も、プログラム出力の中に報告される。

【0075】

BLASTを使った類似のコンピューター技術は (Altschul, 1997, 1993, 1990, 上述)、ジェンバンク (Genbank) やEMBLのようなヌクレオチドデータベースの中で完全に同一である、もしくは関連する分子を検索するために使用される。この分析はマルチプルメンブレン-ベースハイブリダイゼーション (multiple membrane-based hybridizations) よりかなり速い。付け加えると、コンピューター検索の感度を変えて、任意のある適合が完全に同一か相同であるかを分類することができる。この検索の基礎となるのは下記式で表すことのできる積スコアであり、そして、二つの配列間の類似性と、適合した配列の長さのどちらも考慮する。

配列同一性 (%) x 最大BLAST値 (%)

100

例えば、積スコアが40であれば1～2%の誤差の範囲内で適合し、積スコアが70であれば完全に適合する。相同の分子は通常、15～40の範囲の積スコアを示す分子を選択することにより同定される。もっと低いスコアであれば関連する分子が同定される。

【0076】

本発明に係るフォスファトニンポリヌクレオチド及びポリペプチド、並びにそれらに由来する分子のさまざまな応用可能な例を、以下に詳細に記す。

【0077】

フォスファトニンポリヌクレオチドとポリペプチド

フォスファトニンは、腫瘍性低リン血症性骨軟化症患者から切除した髄膜リン酸尿症 - 間葉系-腫瘍から抽出したmRNAから作成したcDNAライブラリーから単離された；実施例4及び13を参照。

【0078】

配列番号：1に記したフォスファトニンヌクレオチド配列は、関連したDNAクローンから得た部分的に相同な（「重複した」）配列から組み立てられた。重複した配列は、一本鎖の多数重複した（通常、一つのヌクレオチド部位につき3～5回重複している）連続配列に組み込まれ、その結果、最終的に配列番号：1にある配列となった。フォスファトニンの5'末端をコードする付加的なヌクレオチド配列を含む配列番号：26は、配列番号：1のクローンを単離するために作製された腫瘍cDNAライブラリーと同じライブラリーから単離されている。従って、配列番号：1及び配列番号：26、並びにそれぞれ翻訳された配列番号：2及び配列番号：27は充分に正確なものであり、当技術分野で周知のあるいは後に詳述するいろいろな用途に適したものである。例えば、配列番号：1及び配列番号：26は、配列番号：1及び配列番号：26に含まれる核酸配列を検出する核酸ハイブリダイゼーションプローブを設計するのに有用である。これらのプローブも、生物学的試料において核酸分子とハイブリダイズし、そのために本発明をさまざまな法医学や診断の方法として利用できる。同じく、配列番号：2又は配列番号：27から同定されたポリペプチドもフォスファトニンに特異的に結合する抗体を産生するのに用いられる。

【0079】

しかしながら、シーケンシング反応によって得られたDNA配列は誤配列を含んでいる可能性がある。この誤配列は、誤認されたヌクレオチドとして、又は得られたDNA配列における、ヌクレオチドの挿入もしくは欠失として存在する。不適切なヌクレオチドの挿入もしくは欠失によって、予測されるアミノ酸配列のリーディングフレーム内にフレームシフトを起こすことがある。これらのケースでは、産生されたDNA配列が実際のDNA配列と99.9%以上の同一性を示しても、推定アミノ酸配列は実際のアミノ酸配列と異なる（例えば、1000塩基を超えるオープンリーディングフレームにおいて1塩基が挿入あるいは欠失された場合）。

【0080】

従って、ヌクレオチド配列やアミノ酸配列の正確さが要求されるような応用に関しては、本発明は、配列番号：1及び配列番号：26として提供されたヌクレオチド配列や、それぞれ配列番号：2及び配列番号：27として示された推定翻訳アミノ酸配列だけでなく、配列番号：1及び配列番号：26のヌクレオチド配列に相当するcDNA及びゲノムDNAをクローニングする手段も含まれる。そのようにして得られたフォスファトニクローンの塩基配列は、既知の方法に従って当該クローンの配列を決定することによって容易に決められる。推定フォスファトニンアミノ酸配列は、そのようなcDNA又はゲノムのクローンによって確かめることができる。さらに、そうして得られたクローンにコードされるタンパク質のアミノ酸配列は、ペプチドシーケンシングによって、又は適切な宿主細胞においてタンパク質を発現させ該タンパク質を回収し、本明細書に述べている方法に従って配列と機能を測

10

20

30

40

50

定することによって直接決定することができる。

【0081】

本発明はさらに、配列番号：1及び配列番号：26に相当するフォスファトニン遺伝子にも関する。フォスファトニン遺伝子は本明細書で開示された配列情報を用い公知の方法に従って単離することができる。そのような方法には、開示された配列からプローブやプライマーを調製すること、及び遺伝子素材として適切な供給源からフォスファトニン遺伝子を同定したり増幅したりすることが含まれる。

【0082】

さらに本発明はフォスファトニンの相同体も提供する。相同体は、本明細書に述べている配列から適切なプローブやプライマーを作製し、適切な核酸源を所望の相同体についてスクリーニングすることで、単離し同定できる。

【0083】

このように、配列番号：1及び配列番号：26のヌクレオチド配列や、配列番号：2及び配列番号：27に記したアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列により、他の種又は生物から、フォスファトニンタンパク質をコードする同一もしくは類似する核酸分子を、特にヒト以外の哺乳類のオルソログなフォスファトニン遺伝子を単離することができる。本明細書で使用する「オルソログ」という用語は、種の分化過程で、共通の祖先遺伝子から派生した異なる種における相同な配列を意味する。オルソログな遺伝子は類似した機能の原因となるもしくはならない可能性がある；「バイオインフォマティクスの最新ガイド (Trends Guide to Bioinformatics)」、Trends Supplement 1998、Elsevier Scienceの用語解説を参照。

【0084】

フォスファトニンポリペプチドは適切な方法を用いて調製することができる。そのようなポリペプチドには、単離された天然に存在するポリペプチド、組換えによって作られたポリペプチド、合成によって作られたポリペプチド、又はそれらの方法を組み合わせて作られたポリペプチドなどが含まれる。そのようなポリペプチドを調製する方法は、当技術分野でよく知られている。

【0085】

フォスファトニンポリペプチドは好ましくは単離された形で、好ましくは実質的に純粋なものであることが望ましい。分泌されたポリペプチドを含め、組換えによって作られたフォスファトニンポリペプチドは、スミス (Smith) 及びジョンソン (Johnson)、Gene 67 (1998)、31~40に述べられている一段階の方法によって実質的に精製できる。フォスファトニンポリペプチドは、当技術分野で周知の方法でフォスファトニンタンパク質に対して作られた本発明の抗体を用いて、天然又は組換えの供給源から精製することもできる。

【0086】

ポリヌクレオチド及びポリペプチドの変異体

「変異体」とは、フォスファトニンポリヌクレオチド又はポリペプチドとは異なっているが、免疫学的活性や、特に前述したような生物学的活性など、その本質的な特性を保持しているポリヌクレオチド又はポリペプチドを意味する。一般的に、変異体は全般的に非常に似ており、多くの領域でフォスファトニンポリヌクレオチド又はポリペプチドと同一である。

【0087】

そのようなポリヌクレオチドは、上記のフォスファトニンタンパク質の断片、類似体又は誘導体及び特にオルソログをコードしており、且つ例えばアミノ酸及び／又はヌクレオチドの欠失、挿入、置換、付加、及び／又は組換えもしくは当技術分野で公知の任意の他の修飾のうちの一つもしくはその組み合わせによって、上記のアミノ酸配列又はそれらの基となるヌクレオチド配列と異なるポリヌクレオチドを含む。本発明に係る核酸分子のそのような修飾を導入する方法は、当業者の間にはよく知られている。本発明のタンパク質のそのような断片、類似体、及び誘導体などは、すべて、上で述べたような本質的特性である免疫学的及び／又は生物学的性質が本質的に影響されない限り、本発明の範囲内に含ま

れる。

【0088】

「変異体」という用語は、本明細書では、ヌクレオチドとそれらがコードするアミノ酸配列が、それぞれ、上に述べたフォスファトニンポリヌクレオチドやポリペプチドと一つもしくはそれ以上のヌクレオチドが異なっているが、上記核酸分子と高い相同性をもつことを意味する。相同性とは、配列の同一性が少なくとも40%、好ましくは50%、より好ましくは60%、さらにより好ましくは70%、特に同一性が少なくとも80%、好ましくは90%以上、そしてさらに好ましくは95%以上である配列を指すと理解される。上記の核酸分子配列の変化は、例えばヌクレオチドの置換、欠失、付加、挿入、及び／又は組換えの結果として起こり得る；上記参照。相同性とは、さらに、それぞれの核酸分子又はそれによってコードされるタンパク質が、機能的及び／又は構造的に等価であることも意味する。上記核酸分子と相同であり、上記核酸分子の誘導体である核酸分子としては、例えば、同じ生物学的機能を有する修飾物、特に同じもしくは実質的に同じ生物学的機能をもつタンパク質をコードする修飾物を表す核酸分子変異体がある。それらは天然に存在する変異体、例えば他の哺乳類からの配列や変異体などが考えられる。これらの変異は、自然に発生したり、あるいは変異誘発技術によって得ることができる。対立遺伝子の変異体は、天然に存在する対立遺伝子変異体や合成あるいは遺伝子技術による変異体などがある；上記参照。

10

【0089】

本発明の塩基配列と少なくとも例えば95%「同一な」塩基配列を持つポリヌクレオチドとは、フォスファトニンポリペプチドをコードする参照ヌクレオチド配列の100ヌクレオチドにつき最高5個所までの点突然変異が含まれうるということ以外は、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、参照配列と同一であることを意味している。換言すれば、参照ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一の塩基配列をもつポリヌクレオチドを得るには、参照配列のヌクレオチドの最大5%を欠失したりもしくは他のヌクレオチドと置換することができる、又は参照配列の全ヌクレオチドの最大5%に相当するヌクレオチドを、参照配列中に挿入することができる。対象となる配列は、配列番号：1又は配列番号：26に示された全配列、そのORF（オープンリーディングフレーム）、あるいは本明細書で特定しているあらゆる断片である。

20

【0090】

実際のところ、ある種の核酸分子やポリヌクレオチドが少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%本発明の塩基配列と一致するかどうかは、一般に使われている既知のコンピュータープログラムを使用して決定することができる。対象となる配列（本発明の配列）と実験される配列との最良の全体的な適合を決定するための好ましい方法は、グローバルシーケンサライメントとも呼ぶが、ブルトラグ（Brutlag）ら（Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245）のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータープログラムを使用して決定することができる。対象となる配列と実験される配列の連続するアライメントはどちらもDNA配列である。RNA配列はUをTに置換えて比較することができる。前述のグローバルシーケンサライメントの結果は、一致率で表される。一致率を計算するDNA配列のFASTDBアライメントで用いられる好ましい変数は、Matrix=Unitary、k-tuple=4、Mismatch Penalty=1、Joining Penalty=30、Randomization Group Length=0、Cutoff Score=1、Gap Penalty=5、Gap Size Penalty=0.05、Window Size=500又は実験対象となるヌクレオチド配列の長さのどれでも短い方である。

30

40

【0091】

被験配列が内部の欠失ではなく5'末端又は3'末端の欠失によって本発明の配列より短い場合、実験結果を手動で修正しなければならない。これは、一致率を計算するときにFASTDBプログラムが被験配列の5'末端や3'末端の欠失を考慮に入れないためである。照会配列と比べて5'末端又は3'末端が切り取られた被験配列については、一致率は、被験配列の5'及び3'にある、適合／アラインしていない照会配列の塩基の数を、照会配列の全塩基に対する割合として計算することによって補正される。ヌクレオチドが適合／アラインしているか否かは、FASTDB配列アライメントの結果により決定される。この割合を配列一致率から

50

減じ、特定の変数を用いて上記のFASTDBプログラムにより計算し、最終的な配列同一性スコアを生じる。この補正されたスコアが、本発明の目的に使用されるものである。照会配列と適合／アラインしない被験配列の5'及び3'塩基の外側にある塩基のみが、FASTDBアライメントによって示されるように、配列一致率スコアを手動で調整する目的のために計算される。

【0092】

例えば90塩基の被験配列は、配列一致率を決定するために100塩基の照会配列とアラインされる。被験配列の5'末端に欠失が生じており、従ってFASTDBアライメントは5'末端にある最初の10塩基について適合／アラインを示さない。その10個の対号しない塩基は配列の10%と表され（5'末端及び3'末端の適合しない塩基の数／照会配列の塩基の総数）、そのため10%をFASTDBプログラムにより計算される一致率スコアから減じる。残りの90塩基が完全に適合している場合は、最終的な配列同一性は90%となる。別の例において、90塩基の被験配列を100塩基の照会配列と比較する。この場合欠失が内部欠失であるため、照会配列と適合／アラインしない被験配列の5'末端又は3'末端に位置する塩基は存在しない。この場合、FASTDBによって計算される一致率は手動で補正されない。繰り返すが、照会配列と適合／アラインしない被験配列の5'及び3'の塩基だけが手動で補正される。それ以外には手動での補正は、本発明の目的には行われない。

【0093】

本発明の照会アミノ酸配列と、少なくとも例えば95%「同一な」アミノ酸配列を有するポリペプチドとは、照会アミノ酸配列の100アミノ酸につき被験ポリペプチド配列が最大5つのアミノ酸変化を含むことを除けば、被験ポリペプチドのアミノ酸配列が照会配列と同一であることを意味する。言い換えれば、照会アミノ酸配列と少なくとも95%同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るためには、被験配列の最大5%のアミノ酸残基を、挿入、欠失、付加、又は別のアミノ酸により置換することができる。参照配列のこれらの変化は、参照アミノ酸配列のアミノ末端部位もしくはカルボキシ末端部位で、又はこれらの末端部位の間の任意の場所で、参照配列の残基に個々に点在するか、又は参照配列内の一つもしくは複数の連続する残基に生じてよい。

【0094】

実際問題として、ある特定のポリペプチドが、例えば配列番号:2又は配列番号:27に示されるアミノ酸配列に、少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるか否かは、公知のコンピュータプログラムを用いて慣習的に決定することができる。照会配列（本発明の配列）と被験配列との最良の全体的な適合を決定する好ましい方法は、グローバルシークエンスアライメントとも呼ばれ、Brutlagら（Comp.App.Biosci.6(1990),237-245）のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを用いて決定することができる。配列アライメントにおいて、照会配列及び被験配列は双方ともヌクレオチド配列であるか、又は双方ともアミノ酸配列である。上記グローバルシークエンスアライメントの結果は一致率であらわされる。FASTDBアミノ酸アライメントに用いられる好ましいパラメータは、以下の通りである：Matrix=PAM0、k-tuple=2、Mismatch Penalty=1、Joining Penalty=20、Randomization Group Length=0、Cutoff Score=1、Window Size=配列の長さ、Gap Penalty=5、Gap Size Penalty=0.05、Window Size=500又は被験アミノ酸配列の長さがどれでも短いもの。

【0095】

被験配列が、内部欠失ではなくN末端もしくはC末端の欠失により照会配列より短い場合は、手動での補正を結果に施さねばならない。これは、FASTDBプログラムが全体的な一致率を計算する際に被験配列のN末端及びC末端の短縮を考慮しないためである。照会配列と比べてN末端及びC末端において短縮された被験配列については、相当する被験残基と適合／アラインしない被験配列のN末端及びC末端にある照会配列の残基の数を、照会配列の全塩基に対する割合として計算することによって一致率を補正する。ある残基が適合／アラインしているか否かはFASTDB配列アライメントの結果によって決定される。このパーセンテージを一致率から減じ、特殊な変数を用いて上記のFASTDBプログラムにより計算し、最終

的な一致率スコアを生じる。この最終的な一致率スコアは、本発明の目的に用いられるスコアである。照会配列と適合／アラインしない被験配列のN末端及びC末端に対する残基だけは、手動で一致率スコアを補正するよう考慮に入れる。すなわち、照会残基だけは、被験配列の最も遠くのN末端及びC末端残基より外側に位置する。

【0096】

例えば、90アミノ酸残基の被験配列は、一致率を決定するために100残基の照会配列とアラインする。被験配列のN末端では欠失が生じており、そのためFASTDBアライメントはN末端の最初の10残基の適合／アライメントを示さない。10個の対合しない残基は配列の10%（N末端及びC末端の適合しない残基の数／照会配列の残基の総数）存在するため、10%を、RASTDBプログラムにより算出された一致率スコアから減じる。残りの90残基が完全に適合しているならば最終的な一致率は90%になる。もう一つの例において、90残基の被験配列を100残基の照会配列と比較する。この時欠失が内部欠失であると、被験配列のN末端又はC末端には照会配列と適合／アラインしない残基は存在しない。この場合はFASTDBにより算出された一致率を手動で補正しない。繰り返すが、FASTDBアライメントに示されるように、照会配列と適合／アラインしない、被験配列のN末端及びC末端の外側に位置する残基だけを、手動で補正する。それ以外には手動での補正は本発明の目的には行われない。

10

【0097】

フォスファトニン変異体はコード領域、非コード領域、又はその双方に変化を含みうる。コードされるポリペプチドの特性又は活性を変化させないがサイレントな置換、付加、又は欠失を生じる変化を含むポリヌクレオチド変異体が特に好ましい。遺伝子コードの縮重によるサイレント置換によって生じるヌクレオチド変異体が好ましい。さらに、5～10位、1～5位、又は1～2位のアミノ酸が任意の組み合わせで置換、欠失又は付加された変異体も好ましい。フォスファトニンポリペプチド変異体は、例えば特定の宿主に関するコドン発現を最適化する（ヒトmRNAのコドン、大腸菌などの細菌宿主に好ましいコドンに変化させる）ためなど、様々な理由により作製することができる。

20

【0098】

天然に生じるフォスファトニン変異体は、「対立遺伝子変異体」と呼ばれ、生物の染色体上の所与の座を占めるある遺伝子に変化したいくつかの代替的型の一つを指す。（Genes II, Lewin, B. 編, John Wiley & Sons, New York (1985) 及び最新版。）これらの対立遺伝子変異体は、ポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドのいずれかのレベルで変化する。又は、天然には生じない変異体を変異誘発法又は直接的な合成によって製造してもよい。

30

【0099】

タンパク質工学及び組換えDNA技術の公知の方法を用いて、フォスファトニンポリペプチドの特性を改良又は変化させるために変異体を製造することができる。例えば、一つもしくは複数のアミノ酸を、生物学的機能を実質的に損なわない限り、タンパク質のN末端又はC末端から欠失させることができる。ロン（Ron）、J. Biol. Chem. 268 (1993)、2984～2988の著者は、3、8又は27のアミノ末端アミノ酸残基を欠失させた後ですら、ヘパリン結合活性を有するKGF変異タンパク質を報告している。同様に、インターフェロンガンマは、このタンパク質のカルボキシ末端から8～10アミノ酸残基を欠失させた後で最大10倍高い活性を示した。（Dobeli, J. Biotechnology 7 (1988), 199-216.）

40

【0100】

さらに、変異体はしばしば天然のタンパク質と同様の生物学的活性を保持していることが豊富な証拠により示されている。例えば、ガイル（Gayle）らは、ヒトサイトカインIL-1Aの広範囲にわたる変異解析を行った（J. Biol. Chem. 268 (1993); 22105-22111）。彼らは、ランダム変異誘発を用いて、一変異体につき分子の完全長にわたって平均2.5個のアミノ酸が変化している3,500以上の異なるIL-1a変異体を作製した。複数の変異を、全ての可能なアミノ酸部位において調べた。研究者らは、「分子の大半が、[結合又は生物学的活性]のいずれにもほとんど影響を受けずに変化する」ことを見出した；概要参照。実際、調査された3,500以上のヌクレオチド配列のうち23個のユニークなアミノ酸配列だけが、野

50

生型とは活性の点で有意に異なるタンパク質を産生した。

【0101】

さらに、ポリペプチドのN末端もしくはC末端から一つもしくは複数のアミノ酸を欠失させた結果一つもしくは複数の生物学的機能が改変又は消失した場合ですら、他の生物学的活性は依然保持されたままである場合がある。例えば、欠失変異体の、タンパク質を認識する抗体を誘起する及び／又はそれに結合する能力は、主要なタンパク質残基がN末端又はC末端から除去されていない場合には、保持されている可能性が高い。そのような免疫学的活性を保持するタンパク質のN末端又はC末端残基を持たないある種のポリペプチドは、本明細書に記載の日常的方法もしくは当技術分野で公知の方法により容易に決定できる。さらに、PESTFINDプログラム (Rogers, Science 234 (1986), 364-368) を用いて、不安定なタンパク質に特徴的に存在するPEST配列 (プロリン、グルタミン酸、セリン、及びスレオニンに富む) を同定することができる。タンパク質の安定性及び選択的には活性を増加させるために、そのような配列をフォスファトニンタンパク質から除去することができる。そのような修飾を本発明に係る核酸分子に導入する方法は当業者には周知されている。

10

【0102】

したがって、本発明はさらに、実質的な生物学的活性を示すフォスファトニンポリペプチド変異体を含む。そのような変異体には、活性にほとんど影響を及ぼさないように当技術分野で公知の一般的規則に従って選択される欠失、挿入、逆位、反復、及び置換が含まれる。例えば、表現型にサイレントなアミノ酸置換を行う方法に関する手引きはボーウィー (Bowie, Science 247 (1990), 1306-1310) に提供されており、そこで著者らは、アミノ酸の変化に対する耐性を研究するための2つの主要な方法があることを示している。

20

【0103】

第一の方法は、進化の過程での自然淘汰によるアミノ酸置換の耐性を利用する。異なる種におけるアミノ酸配列を比較することにより、保存的アミノ酸が同定される。これらの保存されたアミノ酸はタンパク質の機能にとって重要である可能性が高い。対照的に、自然淘汰により置換が許容されたアミノ酸部位は、これらの部位がタンパク質の機能にとって重要でないことを示す。したがって、アミノ酸置換が許容された部位は改変されても、なおタンパク質の生物学的活性を維持する。

【0104】

第二の方法は、タンパク質の機能に重要な領域を同定するためクローニングされた遺伝子の特定の部位にアミノ酸変化を導入する遺伝子操作を用いる。例えば、部位特異的変異誘発又はアラニンスキャニング変異誘発法 (分子の全ての残基において単一のアラニン変異を導入する) を用いることができる。(Cunningham及びWells, Science 244 (1989), 1081-1085.) その結果得られた変異分子を生物学的活性について試験することができる。

30

【0105】

この著者らが述べているように、これらの二つの方法により、タンパク質がアミノ酸置換を意外なほど許容することが明らかにされた。著者らはさらに、アミノ酸変化が、タンパク質におけるある特定のアミノ酸部位に起こりやすいことを示している。例えば、一番埋もれた (タンパク質の三次構造内部に) アミノ酸残基は、非極性側鎖を必要とするのに対し、表面側鎖の特徴は一般にほとんど保存されない。さらに、許容される保存的アミノ酸置換には、脂肪族の疎水性アミノ酸Ala、Val、Leu及びIleの置換；水酸基Ser及びThrの置換；酸性残基Asp及びGluの置換；アミド残基Asn及びGlnの置換；塩基性残基Lys、Arg、及びHisの置換；芳香族残基Phe、Tyr、及びTrpの置換；並びにサイズの小さいアミノ酸Ala、Ser、Thr、Met、及びGlyの置換が含まれる。

40

【0106】

保存的アミノ酸置換に加えて、フォスファトニンの変形には以下のものが含まれる：(i) 一つもしくは複数の非保存的アミノ酸残基の置換であって、置換されるアミノ酸残基が遺伝子コードにコードされるものでもされないものであってもよい置換、又は(ii) 置換基を有する一つもしくは複数のアミノ酸残基による置換 (iii) ポリペプチドの安定性及び／もしくは可溶性を増大させる化合物などの別の化合物 (例えばポリエチレングリコー

50

ル)との成熟ポリペプチドの融合、又は(iv) IgG Fc融合領域ペプチドなどの別のアミノ酸、もしくはリーダー配列、分泌配列、もしくは精製が容易な配列とのポリペプチドの融合。そのような変異ポリペプチドは、本明細書の開示から、当業者の技術範囲内であると考えられる。

【0107】

例えば、他の荷電もしくは中性のアミノ酸との荷電アミノ酸の置換を含むフォスファトニンポリペプチド変異体は、より小さな集合体を形成するなど改善された特徴を有するタンパク質を生成する。薬学的処方物の集合は、集合体の免疫学的活性により、活性を低減させ消失を増加させる；例えばピンカード (Pinckard)、Clin.Exp.Immunol.2(1967)、331～340；ロビンス (Robbins)、Diabetes 36(1987)、838～845；クレランド (Cleland)、Crit.Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10 (1993)、307～377。

10

【0108】

ポリヌクレオチド及びポリペプチド断片

本発明において、「ポリヌクレオチド断片」とは、配列番号:1又は配列番号:26に含まれる核酸配列を有する短いポリヌクレオチドを意味する。短いヌクレオチド断片は、長さが好ましくは少なくとも約15ヌクレオチドであり、より好ましくは少なくとも約20ヌクレオチドであり、さらに好ましくは少なくとも約30ヌクレオチドであり、またさらに好ましくは少なくとも40ヌクレオチドである。「長さが少なくとも20ヌクレオチド」の断片とは、例えば、配列番号:1又は配列番号:26に示されるヌクレオチド配列に含まれるcDNA配列の20個もしくはそれ以上の連続する塩基を含むことを意味する。これらのヌクレオチド断片は、本明細書に記載しているような診断的プローブ及びプライマーとして有用である。当然のことながら、より大きな断片（例えば、50ヌクレオチド、150ヌクレオチド、500ヌクレオチド、600ヌクレオチド、1000ヌクレオチド）が好ましい。

20

【0109】

さらに、フォスファトニンポリヌクレオチド断片の代表的な例としては、例えば、配列番号:26の約1～50位、51～100位、101～150位、151～200位、201～250位、251～300位、301～350位、351～400位、401～450位、451～500位、501～550位、551～600位、651～700位、701～750位、751～800位、801～850位、851～900位、901～950位、951～1000位、1001～1050位、1051～1100位、1101～1150位、1151～1200位、1201～1250位、1251～1300位、1301～1350位、1351～1400位、1401～1450位、1451～1500位、1501～1600位、1601～1650位、1651～1700位、1701～1750位、1751～1800位、1801～1850位、1851～1900位、又は1901～1950位のヌクレオチドの配列を有する断片が含まれる。この文脈において「約」とは、具体的に記した範囲、又はいずれかの末端又は両端に位置するいくつかのヌクレオチド（5個、4個、3個、2個、もしくは1個）により、より多くなっているか又はより少なくなっているものを含む。好ましくは、これらの断片は生物学的活性を有するポリペプチドをコードする。より好ましくは、これらのポリヌクレオチドは、本明細書に記載のプローブ又はプライマーとして用いることができる。

30

【0110】

本発明において、「ポリペプチド断片」とは、配列番号:2又は配列番号:27に含まれる短いアミノ酸配列を意味する。タンパク質断片は、「単独で存在」していてもよく、又はより大きなポリペプチドの一部を形成する断片、もしくは領域、最も好ましくは単一の連続する領域として大きなポリペプチド内に含まれていてもよい。本発明に係るポリペプチド断片の代表的な例としては、配列番号:26におけるコード領域の末端までの断片、例えば約1～20位、21～40位、41～60位、61～80位、81～100位、102～120位、121～140位、141～160位、161～180位、181～200位、201～220位、221～240位、241～260位、261～280位、281～300位、301～320位、321～340位、341～360位、361～380位、381～400位、401～420位、421～440位、441～460位、461～480位、481～500位、及び501～520位のアミノ酸に由来する断片が含まれる。さらに、ポリペプチド断片は、長さが約20個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、110個、120個、130個、140個、もしくは150個のアミノ鎖でありうる。本文脈において「約」とは、具体的に記した範囲、又はいずれかの末

40

50

端もしくは両末端に位置するいくつかのアミノ酸（5個、4個、3個、2個、又は1個）により、より多くなっているか又はより少なくなっているものを含む。

【0111】

好ましいポリペプチド断片には、アミノ鎖末端もしくはカルボキシ末端、又はその両方から欠失された残基の連続する配列を有するフォスファトニンタンパク質が含まれる。例えば、1~60個までの任意の数のアミノ酸がフォスファトニンポリペプチドのアミノ末端から欠失していてもよい。同様に、1~30個までの任意の数のアミノ酸がフォスファトニンタンパク質のカルボキシ末端から欠失していてもよい。さらに、上記のアミノ末端とカルボキシ末端の欠失の任意の組み合わせが好ましい。同様に、これらのフォスファトニンポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチド断片も好ましい。特に、フォスファトニンポリペプチドのN末端の欠失は、一般式m-525により表すことができ、ここでmは2~520までの整数であり、mは配列番号:27の示されるアミノ酸残基の位置に相当する。

10

【0112】

また構造的ドメイン又は機能的ドメインにより特徴づけられるフォスファトニンポリペプチド及びポリヌクレオチド断片も好ましい。本発明の好ましい態様として、アルファヘリックス、アルファヘリックス構造領域（「アルファ領域」）、ベータシート、ベータシート構造領域（「ベータ領域」）、回転、回転構造領域（「回転領域」）、コイル、コイル構造領域（「コイル領域」）、親水性領域、疎水性領域、アルファ両親媒性領域、ベータ両親媒性領域、可撓性領域（flexible）、表面構造領域、基質結合領域、及び高抗原性指数領域を含む断片が含まれる。図に示したように、そのような好ましい領域にはGarnier-Robsonアルファ領域、ベータ領域、回転領域、コイル領域、Chou-Fasmanアルファ領域、ベータ領域、回転領域、Kyte-Doolittle親水性領域、疎水性領域、Eisenbergアルファ、ベータ両親媒性領域、Krupp-Schulz可撓性領域、Emini表面構造領域、Jameson-Wolf高抗原性指数領域等が含まれる。保存領域内に整列する配列番号:2及び配列番号:27のポリペプチド断片が本発明によって特に企図され、図に示される。さらに、それらのドメインをコードしているポリヌクレオチド断片も期待できる。さらに、これらのドメインをコードするポリヌクレオチドも企図される。

20

【0113】

他の好ましい断片は、生物学的に活性なフォスファトニン断片である。生物学的に活性な断片は、フォスファトニンポリペプチドの活性と、全く同一である必要はないが、同様の活性を示す断片である。断片の生物学的活性には、改善された望ましい活性又は低減された望ましくない活性が含まれる。

30

【0114】

しかし、EST配列などの多くのポリヌクレオチド配列が、公的に利用可能であり、配列データベースを通して入手可能である。これらの配列の中には、配列番号:1又は配列番号:26に関連するものもあり、本発明の概念に先駆けて公的に利用可能となっているものもありうる。好ましくは、このような関連するポリヌクレオチドは、本発明の範囲から特に排除される。関連する配列をすべて列挙することは厄介である。

【0115】

したがって、一般式a-bとして表されるヌクレオチド配列（ここで、aは配列番号:26の1~1989までの任意の整数であり、bは15~1989の整数であり、a及びbは両者とも配列番号:26に示されるヌクレオチド残基の位置に相当し、bはa+14より大きいもしくはそれに等しい）を含む一つ又は複数のポリヌクレオチドは、本発明から好ましくは排除される。

40

【0116】

抗原決定基及び抗体

本発明において、「抗原決定基」とは動物、例えばラット、ウサギ、ヒト、マウス（ヒト免疫グロブリン遺伝子を有し、ヒト抗体分子を産生するトランスジェニックマウスを含む）などの体内において抗原性又は免疫学的活性を有するフォスファトニンポリペプチド断片を意味する。本発明の好ましい態様は、抗原決定基を含むフォスファトニンポリペプチド断片、並びにこの断片をコードするポリヌクレオチドに関する。抗体が結合することの

50

できるタンパク質分子の領域が、「抗原性抗原決定基」として定義される。対照的に、「免疫性抗原決定基」は、抗体反応を誘起するタンパク質の部分と定義される；例えばゲイセン (Geysen)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1983)、3998～4002を参照のこと。抗原決定基として作り出す断片は、任意の慣習的手段により作製できる；例えばハウテン (Houghten)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(1985)、5131～5135、詳細は米国特許第4,634,211号を参照のこと。

【0117】

本発明において、抗原性抗原決定基は好ましくは、少なくとも7個、より好ましくは少なくとも9個、最も好ましくは約15～約30個のアミノ酸の配列を含む。抗原性抗原決定基は、特に抗原決定基に結合する、モノクローナル抗体を含む抗体を作製するのに有用である；例えばウィルソン (Wilson)、Cell 37(1984)、767～778；ストックリフ (Sutcliffe)、Science 219 (1983)、660～666を参照のこと。

10

【0118】

同様に、免疫性抗原決定基は、当技術分野において周知の方法にしたがって抗体を誘起するのに用いることができる；例えばストックリフ (Sutcliffe)、上記；ウィルソン (Wilson)、上記；チョウ (Chow)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(1985)、910～914；及びビットル (Bittle)、J. Gen. Virol. 66(1985)、2347～2354を参照のこと。好ましい免疫性抗原決定基には可溶性タンパク質が含まれる。免疫性抗原決定基は、動物の系（ウサギやマウスなど）にアルブミンのような担体タンパク質と共に提示されるか、又は十分な長さ（少なくとも約25個アミノ酸）があれば担体タンパク質なしで提示されうる。しかし、8～10個のアミノ酸しかもたない免疫性抗原決定基が、少なくとも縮重されたポリペプチドの線状の抗原決定基に結合できるような抗体を充分産生できることが示されている（例、ウェスタンブロッティング法において）

20

【0119】

ヒトゲノム資源センター (The Human Genome Resource Centre) (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/homepage.html>) から提供されるGCG-ペプチド構造(Rice, Programme Manual for the ECGC package, Cambridge, CB10 1RQ England: Hinxton Hall; 1995)のコンピュータプログラムを使用して、配列番号：2は、図4に示した領域のアミノ酸残基で抗原性であることが判明した。したがって、これらの領域は配列番号：1にコードされるタンパク質に対する抗体を産生する抗原決定基として使用することができる。本発明の抗体は、好ましくは1～96位のアミノ酸残基に、さらに好ましくは配列番号：27の47～96位のアミノ酸残基に組み合わせるか、それらのアミノ酸残基で形成された抗原決定基を特異的に認識する。

30

【0120】

本明細書において用いられる「抗体(Ab)」又は「モノクローナル抗体(MAb)」とは、タンパク質に特異的に結合することのできる完全な分子並びに抗体断片（例えば、Fab及びF(ab')₂断片など）を包含することを意味する。Fab及びF(ab')₂断片は、完全な抗体のFc断片を欠いており、循環血中からより迅速に消失し、完全な抗体に比べて非特異的な組織結合性が少ない；例えばウォール (Wahl)、J. Nucl. Med. 24 (1983)、316～325を参照のこと。このように、これらの断片は、FABの産物又は免疫グロブリン発現ライブラリーと同様に、好ましい。さらに、本発明の抗体には、ファージディスプレイ、ヒト免疫グロブリン遺伝子及び／もしくはヒト染色体を保持するトランスジェニックマウス、ヒトの体から単離された免疫細胞、ヒト免疫細胞のインビトロもしくはエキスポ免疫、又は任意の他の方法により得られる又はそこから得られるキメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体が含まれる。

40

【0121】

別の態様において、本発明は、本発明のフォスファトニンポリヌクレオチドの相補鎖とハイブリダイズし、その免疫学的活性、好ましくは生物学的活性の一つが失われた上記のタンパク質の変異型をコードする核酸分子に関する。この態様は、例えば上記のフォスファトニンタンパク質の対立遺伝子優性変異体を作製するのに有用であることが証明される。該変異体は、好ましくは、上記野生型タンパク質のアミノ酸配列中の1～5位又は5～10位

50

のアミノ酸残基を置換、欠失及び／又は付加することにより作製される。例えば、図15に示される、推定上機能的モチーフ及び構造的モチーフのいずれか一つのモチーフを単独でも組み合わせても、変異及び変化、置換、又はその他の修飾を行うことができる。

【0122】

ベクター、宿主細胞及びタンパク質の製造

本発明はまた、フォスファトニンポリヌクレオチドを含むベクター、宿主細胞、及び組換え技術によるポリペプチドの製造にも関する。ベクターは、例えばファージ、プラスミド、ウイルス、レトロウイルスのベクターでありうる。レトロウイルスベクターは、複製能があっても、複製欠損性であってもよい。後者の場合、ウイルス増殖は一般に、相補的な宿主細胞においてのみ行われる。

10

【0123】

フォスファトニンポリヌクレオチドは、宿主において増殖するための選択可能なマーカを含むベクターに結合していてもよい。一般に、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈殿などの沈殿物、又は荷電脂質との複合体として導入される。ベクターがウイルスである場合、適当なパッケージング細胞株を用いてインビトロでパッケージングし、続いて宿主細胞に形質導入してもよい。

【0124】

フォスファトニンポリヌクレオチド挿入断片は、ほんの数例を挙げると、ファージラムダPLプロモーター、大腸菌lac、trp、phoA、及びtacプロモーター、SV40初期プロモーター及び後期プロモーター、並びにレトロウイルスLTRのプロモーターなどの、適当なプロモーターに機能的に結合されるべきである。他の適当なプロモーターは当業者には公知であると思われる。発現構築物は、転写開始部位、終結部位、及び転写領域、翻訳のためのリボソーム結合部位をさらに含む。構築物により発現される転写物のコード部分は、好ましくは、開始の位置に存在する翻訳開始コドン及び翻訳されるポリペプチドの末端に適切に位置する終結コドン（UAA、UGA、又はUAG）を含む。

20

【0125】

示したように、発現ベクターは好ましくは少なくとも一つの選択可能なマーカを含む。そのようなマーカには、ジヒドロ葉酸還元酵素、真核細胞培養のためのG418もしくはネオマイシン抵抗性、並びに大腸菌及び他の細菌において培養するためのテトラサイクリン、カナマイシン、もしくはアンピシリン抵抗性遺伝子が含まれる。適当な宿主の代表的な例には、大腸菌、ストレプトマイセス及びネズミチフス菌細胞；酵母細胞などの真菌細胞；ショウジョウバエS2及びスポドプテラSf9などの昆虫細胞；CHO、COS、293及びBowes黒腫細胞などの動物細胞；並びに植物細胞が含まれる。上記の宿主細胞の適当な培養培地及び条件は当技術分野では公知である。細菌における使用に好ましいベクターには次のものが含まれる：キアゲン社（QIAGEN, Inc.）から入手可能なpQE70、pQE60、及びpQE-9；ストラタジーンクローニングシステムズ社（Stratagene Cloning Systems, Inc.）から入手可能なpBluescriptベクター、ファージスクリプトベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A；及びファーマシアバイオテック社（Pharmacia Biotech, Inc.）から入手可能なptrc99a、pKK233-3、pDR540、pRIT5。真核細胞ベクターとして好ましいのは、ストラタジーン社（Stratagene）から入手可能なpWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXTI及びpSG；並びにファルマシア社（Pharmacia）から入手可能なpSVK3、pBPV、pMSG、及びpSVLである。他の適当なベクターが当業者には用意に明らかであると思われる。

30

40

【0126】

さらに、例えば、上記のフォスファトニンポリペプチドをコードする核酸分子をすでにそのゲノム中に含んでいるが例えばプロモーターが弱いためにそれを発現しないか適当な様式で発現しない哺乳類細胞を使用して、フォスファトニンポリペプチドの発現を誘導するために、それをコードする内因性核酸分子に非常に近位である強力なプロモーターなどの発現調節配列を哺乳類細胞に導入することができる。

【0127】

本文脈にてにおいて「発現調節配列」という用語は、フォスファトニンコード遺伝子に非常

50

に近位の細胞ゲノム中に組み込まれるためフォスファトニンポリペプチドの発現を増加させるために用いることのできる核酸分子を表す。そのような調節配列にはプロモーター、エンハンサー、不活性化されたサイレンサーイントロン配列、3'UTR及び／又は5'UTRコード領域、タンパク質及び／又はRNA安定化要素、例えばフォスファトニン遺伝子の発現を誘導もしくは始動させることのできる転写因子、又は遺伝子発現を活性化させる、及び／もしくは遺伝子産物の量を増加させることが知られている他の遺伝子発現調節要素などの調節性タンパク質をコードする核酸分子が含まれる。該発現調節配列を導入することにより、フォスファトニンポリペプチドの発現が増加する、及び／又は誘起され、その結果、細胞におけるフォスファトニンポリペプチドの量が増加する。したがって、本発明は、フォスファトニンポリペプチドを新たに発現させること、及び／又は発現を増加させることを目的とする。

10

【0128】

宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染、又は他の方法により行うことができる。そのような方法は、Davis, Basic Methods In Molecular Biology(1986)などの標準的な多くの実験マニュアルに記載されている。フォスファトニンポリペプチドが実際に組換えベクターを持たない宿主細胞により発現されることが特に企図される。

【0129】

フォスファトニンポリペプチドは、硫化アンモニウムもしくはエタノール沈殿、酸抽出、陽イオンもしくは陰イオン交換クロマトグラフィー、リン酸セルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、及びレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法により組換え培養細胞から回収し精製することができる。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）が精製に用いられる。

20

【0130】

また、フォスファトニンポリペプチドは、以下の産物から回収することができる：直接単離されたか又は培養された体液、組織及び細胞を含む天然の供給源から精製された産物；化学合成法による産物；並びに例えば細菌、酵母、高等植物、昆虫、及び哺乳類細胞を含む原核宿主又は真核宿主から組換え法により産生された産物。組換え製造法に用いられる宿主に応じて、フォスファトニンポリペプチドはグリコシル化されていても、されていなくてもよい。さらに、フォスファトニンポリペプチドは、開始の（改変された）メチオニン残基の含みうる。いくつかの場合、それは宿主媒介過程の結果である。したがって翻訳開始コドンによりコードされるN末端メチオニンが概して、真核細胞における翻訳後に任意のタンパク質から高効率で除去されることは周知である。ほとんどのタンパク質のN末端メチオニンがほとんどの原核細胞において効果的に除去されるのに対し、いくつかのタンパク質では、N末端メチオニンが共有結合しているアミノ酸の性質により、この原核細胞除去過程が機能しない。

30

【0131】

特に好ましい態様において、本発明は、以下の段階を含むフォスファトニンポリペプチドの単離方法に関する：

40

(a) 腫瘍馴化培地又は骨軟化細胞を血清含有培地（DMEMイーグルス/10% FCS/グルタミン/抗真菌剤（DMFCS））中でコンフルエンスになるまで培養する段階；

(b) それらの細胞を、一日おきに無血清培地DMEMイーグルス/グルタミン/抗真菌抗生物質（DM）において最高5時間までインキュベートする段階；

(c) 細胞から馴化された無血清培地を回収し、0.06Mリン酸ナトリウムpH 7.2及び0.5M塩化ナトリウム（PBS）で馴化培地を平衡化する段階；

(d) (c)の培地を、平衡化したコンカナバリンAセファロースカラムにかける段階；

(e) カラムをPBSでよく洗浄する段階；

(f) コンカナバリンAカラムを、0.5M α -メチル-D-グルコピラノシドを加えたPBSで溶出

50

する段階；

(g) (f)で溶出した試料を、陽イオン交換クロマトグラフィーにかける段階；及び

(h) 0.5M塩化ナトリウムで、フォスファトニンポリペプチドを含む分画を溶出する段階。
上記の方法は実施例1に説明する。

【0132】

本発明のもう一つの目的は、フォスファトニンポリペプチドを調製する方法であって、ベクターもしくは本発明に係るポリヌクレオチド又は外因性発現調節配列を存在させることによりポリペプチドを発現可能な条件下で該ポリペプチドを発現することのできる本発明の宿主細胞を培養することと、そうして生産されたポリペプチドを培養液から回収することを含む方法である。タンパク質が、例えば当技術分野において公知のインビトロ翻訳アッセイ法を用いて無細胞系で発現させることができることも理解されたい。

10

【0133】

したがって、さらなる態様において、本発明は、フォスファトニンポリペプチド、又は本発明のポリヌクレオチドにコードされる、もしくは上記の方法により製造される免疫学的に及び／もしくは生物学的に活性なその断片に関する。同様に、PHEXメタロペプチダーゼにより上記のフォスファトニンポリペプチドをタンパク質分解することによって得られるフォスファトニンポリペプチドは、本発明の範囲内である。

【0134】

本発明のタンパク質はさらに、例えば薬剤標的化及び画像化の適用のために、上記のような他の分子に結合できることが当業者には明らかであると思われる。そのような結合は、タンパク質の発現後に接合部位に化学的に行ってもよく、又は結合産物をDNAレベルで本発明のタンパク質中に遺伝子操作して組み込んでも良い。その後、DNAを適当な宿主系で発現させ、発現されたタンパク質を回収し、必要に応じて復元させる。

20

【0135】

先に説明したように、配列番号：27に示すアミノ酸配列を含むフォスファトニンは、システイン2個を有するN末端を有し、その一つは選択的にホモダイマー及び／又はヘテロダイマー形成のために配置されている。このように、細胞内において、機能的フォスファトニンは、ホモダイマー又はヘテロダイマーとして存在すると想像される。したがって、本発明の好ましい態様において、フォスファトニンはホモダイマー又はヘテロダイマーを形成する。

30

【0136】

一方、本発明に従って、そのアミノ酸配列において双方のシステイン残基を欠損する組換え切断型フォスファトニンは、リン酸保持活性を有し、このように治療的応用に有用であることを示すことができる。したがって、本発明のもう一つの好ましい態様において、本発明のフォスファトニンポリペプチドにおけるシステイン残基は、フォスファトニンポリペプチドが、例えばジスルフィド架橋によるホモダイマー及び／又はヘテロダイマーを、好ましくは、もはや形成できないように置換、欠失、及び／又は遮断されている。

【0137】

リン酸代謝の調節

本明細書ですでに述べたとおり、本発明のフォスファトニンポリペプチドは、異なる様式でリン酸代謝を調節することができる。従って、一つの態様において本発明は、以下の活性のうちの少なくとも一つを有する点でフォスファトニン活性を有するフォスファトニンポリペプチドに関する：

40

(a) ナトリウム依存的リン酸共輸送をダウンレギュレーションすることができる活性；

(b) 腎25-ヒドロキシビタミンD3-24-ヒドロキシラーゼをアップレギュレーションすることができる活性；及び／又は

(c) 腎25-ヒドロキシD-1 α -ヒドロキシラーゼをダウンレギュレーションすることができる活性。

【0138】

もう一つの態様において、本発明は、以下の活性の少なくとも一つを有するという点にお

50

いて抗フォスファトニン活性を有するフォスファトニンポリペプチドに関する：

- (a) ナトリウム依存性リン酸共輸送をアップレギュレートすることができる活性；
- (b) 腎25-ヒドロキシビタミンD₃-24-ヒドロキシラーゼをダウンレギュレートすることができる活性；及び／又は
- (c) 腎25-ヒドロキシ-D-1 α -ヒドロキシラーゼをアップレギュレートすることができる活性。

【0139】

本発明の特に好ましい態様において、フォスファトニンポリペプチドは上記のような骨ミネラルモチーフを含み、骨のミネラル化を促進する方向に調節する。

【0140】

さらに別の態様において、本発明は、上記の活性の少なくとも一つを失ったフォスファトニンポリペプチドに関する。そのようなポリペプチドは、本発明のフォスファトニンポリペプチドの変異型であってもよく、例えばフォスファトニンコード遺伝子の変異の効果を研究するために用いることができる。特に、そのような変異体は、野生型フォスファトニンの生物活性の内の一つを失うことによって生じる欠損を補償することができる薬剤の開発に有用であることが証明されうる。そのようなフォスファトニンポリペプチドの変異体は本明細書でさらに詳しく後述するスクリーニング方法において最もよく研究されうる。

【0141】

フォスファトニン抗体

さらに、先に述べたように本発明のフォスファトニンポリペプチドを提供することにより、フォスファトニン特異抗体を製造することができる。この点において、ハイブリドーマ技術により、免疫反応を引き起こす本質的にあらゆる所望の物質に対する抗体を分泌する細胞株の産生が可能である。そして、免疫グロブリンの軽鎖と重鎖をコードするRNAをハイブリドーマの細胞質から得ることができる。mRNAの5'末端部分を利用してcDNAを調製し、発現ベクターに挿入できる。そして抗体やその免疫グロブリン鎖をコードするDNAを、好ましくは哺乳類細胞内で発現させることができる。抗体の正しい配置を得るために、宿主細胞に依っては、復元技術が必要とされる可能性がある。必要であれば、本明細書に開示の従来のカセット変異誘発や別のタンパク質操作方法を用いて、結合を最適化するための一部の置換をDNA内で行うこともできる。

【0142】

従って本発明は、本発明のフォスファトニンポリペプチドを特異的に認識する抗体にも関する。

【0143】

本発明の好ましい様態においては、該抗体はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、ヒト抗体もしくはヒト化抗体、霊長類化した抗体、キメラ化抗体、又はFab、Fv、scFv断片等のような二重特異性抗体、合成抗体、もしくは抗体断片を含むペプチドやポリペプチドに特異的に結合するその断片、又はそれらを化学的に修飾した誘導体などである。抗体の一般的な作製方法は周知であり、例えばコーラー（Kohler）及びミルステイン（Milstein）、Nature 256(1975)、494 及びハレル（J.G.R. Hurrell）編、「モノクローナルハイブリドーマ抗体：技術と応用（Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications）」、CRC出版、Boco Raron、FL (1982)、また、ミンス（L.T. Mimm）ら、Virology 176 (1990)、604～619、などに記されている。さらに前述のペプチドに対する抗体やそれらの断片は、例えばハーロウ（Harlow）及びレーン（Lane）「抗体、実験マニュアル（Antibodies, A Laboratory Manual）」やCSH出版、Cold Spring Harbor、1988に記されている方法で得ることができる。

【0144】

実験動物における抗体産生のために、ヤギ、ウサギ、ラット、マウスなどを含む種々の宿主を、免疫原性特性を有する本発明のポリペプチド、又はその任意の断片、オリゴペプチド、もしくは誘導体を注入することによって免疫化することができる。ポリクローナル抗体の産生技術は当技術分野で周知で、メイヤー（Mayer）及びウォーカー（Walker）編、

「細胞と分子生物学の免疫化学方法 (Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology)」、アカデミック出版、London (1987)等に記述されている。ポリクローナル抗体は動物、好ましくは哺乳類からも得られる。抗体の精製については当技術分野で周知で、例えば免疫親和性クロマトグラフィーが含まれる。宿主の種によって、免疫学的応答を高めるためのさまざまなアジュバント又は免疫学的担体が使用される。そのようなアジュバントには完全フロイドアジュバントもしくは不完全フロイドアジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リゾレシチンのような界面活性剤、プルロニック (pluronic) ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイル乳化剤、及びジニトロフェノールなどが含まれるが、これらに限定されるものではない。例えば本発明のペプチドが結合しうる担体の例としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン (KLH) がある。

10

【0145】

キメラ抗体の製造方法は、例えば国際公開公報第89/09622号に記載されている。ヒト化抗体の製造方法は、例えば欧州特許第A10 239 400号や国際公開公報第90/07861号などに記載されている。本発明に従い利用される抗体源はいわゆる外因性の (xenogenic) 抗体である。マウスにおけるヒト抗体のような、外因性抗体を製造する一般原則は、例えば国際公開公報第91/10741号、国際公開公報第94/02602号、国際公開公報第96/34096号、国際公開公報第96/33735号に記載されている。

【0146】

好ましい状態では、本発明の抗体は少なくとも約 10^{-7} Mの親和性を持ち、好ましくは少なくとも約 10^{-8} M、より好ましくは少なくとも約 10^{-9} M、最も好ましくは少なくとも約 10^{-10} Mの親和性を有する。一方、フォスファトニン抗体は約 10^5 M⁻¹の結合親和性を有し、フォスファトニン活性刺激が予想通りの場合には好ましくは 10^7 M⁻¹未満で、もしフォスファトニン活性が抑制される場合は 10^{10} M⁻¹まで、又はそれ以上の結合親和性を好ましくは有する可能性がある。本明細書に上述した通り、本発明の抗体は、好ましくは1~46位及び47~525位のアミノ酸残基を、さらに好ましくは1~46位及び47~96位のアミノ酸残基を含むか、又はそれらのアミノ酸残基で形成された抗原決定基を特異的に認識する。

20

【0147】

フォスファトニンポリヌクレオチドの使用

本明細書において同定されたフォスファトニンポリヌクレオチドは試薬として多様に使用できる。以下の記述は一例として考えられるべきで、既存の技術を使用する。

30

【0148】

現在、実際の配列データ (反復多型) に基づいた染色体マーカー試薬はほとんどないため、新しい染色体マーカーを同定する必要がある。フォスファトニン関連ポリヌクレオチド (ゲノムDNA及び/又はcDNA) を使用すれば、ロウ、Hum. Genet. 94:5(1994)、457~467; ベンハム (Benham)、Genomics 12 (1992)、368~376; ジレット (Gillett)、Ann. Hum. Genet. 60(3) (1996)、201~211; ロウ、Nucleic Acids Res. 22(23) (1994)、5135~5136で詳細に述べられているように制限解析を行うことができる。特に、マイクロサテライトの利用 (Rowe, Hum. Genet. 94:5 (1994)、457-467; Rowe, Nucleic Acids Res. 22(23) (1994)、5135-5136; Rowe, Hum. Genet. 93 (1994)、291-294; Roowe, Hum. Genet. 91(1993)、571-575; Rowe, Hum. Genet. 97 (1996)、345-352; Rowe, Hum. Genet. 89(1992)、539-542)、放射線照射融合遺伝子トランスファーハイブリッドやALU-PCR (Benham, Genomics 12(1992)、368-376) を使用した情報マーカーの単離により、フォスファトニンと誘導体遺伝疾患のスクリーニングのための非常に情報量の多い方法を迅速に単離できるようになる。特に上記の方法は、PHEX遺伝子 (MEPEはPHEX基質とされる) のマッピングと位置決定において成功してきており、そして広範囲の変異分析はPHEXの生物活性に必要な構造部位やモチーフを明らかにしてきた (Rowe, Hum. Mol. Genet. 6 (1997)、539-549; Rowe, Exp. Nephrol. 5 (1997)、355-363; Rowe, Current Opinion in Nephrology & Hypertension 7(4) (1998)、367-376; Rowe, Clinical and Experimental Nephrology 2(3) (1998)、183-193)、これらの同様の方法がフォスファトニンに対して行われる。最近になって、単一ヌクレオチド多型 (SNP's) 及び、ゲルに基づくシーケンシング及び高密度変

40

50

異検出DNAチップ (Wang, Science 280 (1998), 1077-1082) の併用に依存する、有力なゲノムワイドリンクエージ (ゲノム全域を包括する連鎖) 及びスクリーニング方法が開発されている。最近になって、米国マサチューセッツ州ケンブリッジにあるホワイトヘッドバイオメディカル研究所にあるゲノムリサーチ研究所 (Center for Genome Research at the Whitehead Institute for Biomedical Research) (Whitehead-MIT) により、インターネットでSNPデータが公開されている (<http://www-genome.wi.mit.edu/SNP/human/index.html>)。この強力な新規なオリゴヌクレオチドアレイに基づいた方法は、分子発現分析、多形と遺伝子タイピング、疾病療法の未来の道筋となると考えられる (Wang, Science 280 (1998), 1077-1082; Chee, Science 274 (1996), 610-614; Gentelen, Nucleic Acids Res. 27 (1999), 1485-1491; Hacia, Nucleic Acids Res. 26 (1998), 3865-3866; Lipshutz, Nat. Genet. 21 (1999), 20-24; Fan, Eur. J. Hum. Genet. 6 (1998), 134)。この利用にMEPEの配列の情報があれば、先に述べた分野に取り組むために上記の新しい方法と技術が使用される。配列は周知の技術を用いて、特定の染色体又は染色体の特定の領域に位置付けられる。これらの技術には、インサイチューでの染色体スプレッドへのハイブリダイゼーション、フローソーティッド染色体調製、あるいは酵母人工染色体、細菌人工染色体、細菌PI構造などの人工染色体構造、プリース (Price) (Blood Rev. 7 (1993), 127-134) 及びタスク (Task) (Trends Genet. 7 (1991), 149-154) に論じられているような単一染色体cDNAライブラリーが含まれる。染色体スプレッドの蛍光インサイチューハイブリダイゼーションはそれ以外の文献 (Verma, (1988) 「ヒト染色体：実験基礎技術 (Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques)」, Pergamon Press, New York NY) にも論じられている。染色体スプレッドの蛍光インサイチューハイブリダイゼーションやその他の物理的な染色体マッピング技術は別の遺伝子地図データと相関する可能性がある。入手可能な広い範囲のマッピングデータは以下のインターネットのサイトで見つけることができる。英国ヒトゲノムマッピングプロジェクト (Human-Genome-Mapping-Project United Kingdom) (HGMP-RC) 提供によるサイト (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/homepage.html>)、米国国立衛生研究所 (National Institute of Health USA) (NIH) が提供するサイト「National Collection of Biological Information (NCBI)」 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、そして米国マサチューセッツ州ケンブリッジにあるホワイトヘッドバイオメディカルリサーチ研究所のゲノムリサーチ研究所 (Center for Genome Research at the Whitehead Institute for Biomedical Research) (Whitehead-MIT) が提供するサイト (<http://www-genome.wi.mit.edu/>) をインターネット上で見出すことができる。さらに、ヒトゲノム全体をカバーする広範囲のマикроサテライトマップと関連するマッピングツールも Genethon (フランス政府が提供するデータベース) を通じてアクセスできる (http://www.genethon.fr/genethon_en.html)。可能性を秘めたマップも Science 及び Nature (Dib, Nature 380 (1996), 152-154 参照) から公表されているが、インターネットのサイトで最新のデータを調べるべきである。本発明のフォスファトニンポリペプチドをコードする遺伝子の物理的な染色体地図上の位置と、低/高リン酸血症のような特異的な特徴との相関は、この特徴と関連するDNAの領域の決定に役立つ。本発明のヌクレオチド配列は、正常と保因もしくは冒された個体の遺伝子配列における違いを検出するために利用できる。さらに本明細書に記載の方法や手段はマーカーを用いることによる動物育種に使用することができる。さらに本発明のヌクレオチド配列は正常と保因もしくは冒された個体間で、転座や反転等が原因でおこる染色体上の位置の違いを見つかるのに利用することもできる。

【0149】

フォスファトニンポリヌクレオチドはサザンブロットゲル上の分子量マーカー、特定の細胞種にあるmRNAの有無を調べる診断用プローブ、新規ポリヌクレオチドを発見する過程で、「遺伝子チップ」もしくは他の支持体に接着するオリゴマーを選択あるいは産生し、DNA免疫化技術を使って抗DNA抗体を産生するために既知の配列を「引き出す」プローブ、及び免疫反応を誘引する抗原として使用することができる。好ましい態様において、記述のフォスファトニンオリゴヌクレオチドは、配列番号：26のヌクレオチド配列か、又はこのヌクレオチド配列に対して縮重している、及び/もしくはこのヌクレオチド配列に特異的

にハイブリダイズすることができる対応するヌクレオチド配列において、1～335位のヌクレオチドの少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは20ヌクレオチドを含む。後者の場合、ヌクレオチド配列は、配列番号：26における対応する配列、又はその縮重ヌクレオチド配列と少なくとも70%又はそれ以上、好ましくは80%、及び最も好ましくは90%同一であることが好ましい。

【0150】

フォスファトニンポリペプチドと抗体の使用

フォスファトニンポリペプチドとその抗体はさまざまな用途に使用できる。以下の記述は例示と見なされるべきで既知の方法を使用する。

【0151】

フォスファトニンポリペプチドを用いて抗体に基づいた技術を利用し、生物試料におけるタンパク質レベルを分析できる。例えば、組織内のタンパク質発現は典型的な免疫組織学的方法で検査することができる；例えば、ジャルカネン (Jalkanen)、J.Cell.Biol.101(1985)、976～985; ジャルカネン (Jalkanen)、J.Cell.Biol.105 (1987) 3087～3096を参照。タンパク質遺伝子発現を検出する、抗体に基づく他の方法には、固相酵素免疫検定法(ELISA)や放射性免疫検定法(RIA)などのイムノアッセイ法が含まれる。適切な抗体アッセイ標識は当技術分野では既知で、グルコースオキシダーゼのような酵素標識、ヨウ素 (^{125}I 、 ^{121}I)、炭素 (^{14}C)、イオウ (^{35}S)、トリチウム (^3H)、インジウム (^{112}In)、テクネチウム ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) 等の放射性同位体、フルオレセインやローダミン、ビオチンのような蛍光標識などが含まれる。

【0152】

生物試料におけるタンパク質レベルの分析のほか、タンパク質はインビボイメージングによっても検出できる。タンパク質のインビボイメージングのための抗体標識やマーカには、X-ラジオグラフィ、NMR、ESRにより検出可能な方法が含まれる。X-ラジオグラフィにおいては、適切な標識には、放射能を発してはいるが被験物にそれほど悪影響を及ぼさないバリウムやセシウムのような放射性同位体が含まれる。NMRとESRに適したマーカには重水素のように検出可能な特徴的スピンを有するものが含まれ、これらは、関連するハイブリドーマの栄養素を標識することによって抗体に組み込むことが可能である。

【0153】

放射性同位体 (^{131}I 、 ^{121}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ など) や放射線不透過性物質、核磁気共鳴により検出可能な材料で標識した特異的タンパク質抗体や抗体断片は、哺乳類に組み込まれる (例えば非経口、皮下、又は腹腔内)。被験物の大きさ、使用するイメージングシステムによって、診断用画像を作り出すためのイメージング部分の量が決定されることが当業者には理解されると思われる。ヒト試料に放射性同位体を使用する場合、注入する放射能の量は通常 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ で約5～20ミリキュリーである。標識抗体又は抗体断片は、特定のタンパク質が含まれる細胞に選択的に貯えられる。インビボでの腫瘍イメージングは、例えばブリチエル (Burchiel)、「放射性標識抗体及び抗体断片の免疫薬物動態学 (Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments)」第13章、in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, ブリチエル (Burchiel) 及びローデス (Rhodes) 編、Masson Publishing Inc.(1982)に記述されている。

【0154】

従って、本発明は疾患の診断方法を提供し、その方法には次のものが含まれる：(a) 個体の細胞又は組織におけるフォスファトニンポリペプチドの発現、あるいは個体の体液中のフォスファトニン、その活性断片、又は抗原決定基準のレベルのアッセイ、(b) 正常な遺伝子発現レベルと試料の遺伝子発現レベルとの比較。この比較では、試料のフォスファトニンポリペプチド遺伝子レベルが、正常レベルと比べて高いか低いかにによって障害の有無が示唆される。

【0155】

さらにフォスファトニンポリペプチドは疾患の治療にも利用できる。例えば、血漿リン酸レベルを増加又は低下させ、及び／又は、減損した骨形成 (X染色体性高リン酸血症性く

10

20

30

40

50

る病、腫瘍性低リン酸血症性腎軟化症、腎不全、骨粗鬆症、腎性骨形成異常、など）を促進するために、患者にフォスファトニンポリペプチドを投与することができる。そして、ナトリウム依存性リン酸共輸体発現のアップレギュレーション、ダウンレギュレーションの受容体を活性化、あるいは抑制することができる。さらにリン酸代謝特異的障害、特にX染色体性低リン酸血症性くる病の治療のための遺伝子治療にフォスファトニン遺伝子の促進要素、抑制要素が利用できる。そして、一次的又は二次的に不確定な変化により、不適切な遺伝子調節及び／又はMEPEの翻訳後の変性（例、閉経後の女性、骨粗鬆症、加齢）がおこる、骨ミネラル減少異常においてもおそらく、ホルモン置換療法の付加的療法としてホルモン投与（及び／又は、受容体やホルモンの作用薬・遮断剤の投与）をおこなえば、リン酸と骨ミネラルバランスが元に戻る可能性がある。MEPEの生物活性、従って疾患治療の重要な特徴は、N末端配列が腎臓におけるリン酸摂取及び、C末端（つまり、先に述べたMEPEモチーフと関連している領域）が、骨の正常な石灰化と成長の必要条件であるとする予測である。

10

【0156】

腎移植後や慢性高リン酸血症、その他のケースでは、低リン酸血症が主な臨床的併発症を引き起こす主要な特徴である。例えば、男性のHYP患者に正常な腎臓を移植したところ、正常な移植腎臓に「くる病タイプ」のリン酸漏出のような病理学的変化があらわれたことが報告されている（Morgan, Arch. Intern. Med. 134 (1974), 549-552）。MEPEのN末端分解処理断片を臨床学的に用いれば、抗低リン酸血症治療に効果をもたらす可能性がある。逆に、高リン酸血症をひきおこす腎移植のケースでは、組換えMEPE全体や、独特なN末端残基に形成された活性誘導体ペプチドで治療できる可能性がある。MEPE、MEPE誘導体ペプチド、受容体、遮断-作用薬（ペプチドがその作用の効力や特異性を高める）で治療できると考えられるその他の疾患には、腎性骨形成異常、腎毒、骨のパジェット病、常染色体性くる病、ある種の腎ファンコーニ症候群が含まれる。さらに、受容体が腎と同様に組織内（腸管等）に発現すれば、末期腎疾患の患者（例えば、腎機能の完全喪失）を治療できる可能性もある。

20

【0157】

同様に、フォスファトニンポリペプチドに対する抗体も疾患治療に利用できる。例えば、フォスファトニンポリペプチドに対する抗体を投与するとそのポリペプチドに結合して過剰産生を抑制する。同様に、抗体を投与するとポリペプチドに結合し、異なった活性形態への分解などにより、そのポリペプチドを活性化することもできる。

30

【0158】

SDS-PAGEゲル又は分子篩濾過カラムにおいて、当技術分野で周知の技術を用い、フォスファトニンポリペプチドを分子量マーカーとして用いることもできる。また、フォスファトニンポリペプチドを使用して抗体を増加させることができ、次にそれらの抗体を用いて、宿主細胞の形質転換を調べる方法として、組換え細胞からのタンパク質発現を測定することも可能である。

【0159】

さらに、フォスファトニンのポリヌクレオチドとポリペプチドを使って、一つ又はそれ以上の生物活性を分析できる。ある分析で、フォスファトニンポリヌクレオチドやポリペプチドが活性を示したら、その生物活性に関する疾患にフォスファトニンが関与している可能性がある。従って、フォスファトニンは関連疾患の治療に用いることができる可能性がある。

40

【0160】

フォスファトニン遺伝子の調節配列

別の局面では、本発明は、上記本発明のフォスファトニンポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、あるいは本発明ポリヌクレオチドと相同なポリヌクレオチドの発現を自然に調節するプロモーターの調節配列に関する。当技術分野で周知の方法を用い、上記のDNA配列発現を自然に調節するプロモーターの調節配列を単離することができる。例えば、上記核酸分子をプローブとして使用し、ファージや細菌ベクター内にクローニングされた

50

ヒトゲノムDNAから成るゲノムライブラリーを当業者によりスクリーニングできる。そのようなライブラリーは、例えばヒトの血液細胞から調製し、5～50kbの断片に画分し、ラムダGEM11（プロメガ）ファージ内にクローニングしたゲノムDNAで構成される。そして、プローブとハイブリダイズしたファージが精製される。精製されたファージからは、DNAを抽出して配列を決定することができる。例えば、ヒトゲノムP1ライブラリー（Genomic Systems, Inc.）は、実施例11の記載に従い、標識cDNAプローブによってスクリーニングされた。上記フォスファトニタンパク質をコードする遺伝子に対応するゲノム配列を単離すれば、当業者に周知の転写融合や翻訳融合によって、異種DNA配列を、そのプロモーターや、調節配列へ融合させることが可能になる。これらのフォスファトニン遺伝子の調節配列又は特異要素を特定するためには、luc、gfp、GUSコード領域のようなマーカー遺伝子の前に5'末端上流断片をクローニングし、その結果できたキメラ遺伝子を細胞、又は動物に導入し、一時的なもしくは安定した発現を得る。本発明の調節配列の制御下の標識遺伝子を含むトランスジェニック動物や導入哺乳類細胞における発現パターンを、実施例10に記載のフォスファトニン遺伝子の発現パターンと比較し、プロモーターと調節配列の境界を明らかにする。通常、該調節配列は組換えDNA分子の一部分、例えばベクターなどである；上記参照。さらに本発明は、調節配列、又は本発明の調節配列を含むDNA分子もしくはベクターで形質転換された宿主細胞に関する。該宿主細胞は、原核生物細胞、又は真核生物細胞である；上記参照。

10

【0161】

リン酸代謝障害の診断

20

本発明のもう一つの目的は、リン酸代謝障害（例えば実施例6を参照のこと）患者に対するもので、薬剤治療の候補と成り得る薬剤あるいはプロドラッグの薬理ゲノム(pharmacogenomic)選択に関するものである。従って、本発明物質の発見は、遺伝的に変化したフォスファトニタンパク質の機能を正常に戻すために行われる薬剤投与のための新薬開発が可能になる。また、本発明によって遺伝子治療の方法も予想できる。

【0162】

従って、本発明には、障害の診断法として次のものが含まれる：

(a) 個体の細胞あるいは体液中に見られるフォスファトニン遺伝子の発現レベルの定量；

(b) 標準的な遺伝子発現レベルと試料の遺伝子発現レベルとの比較であって、定量されたフォスファトニンポリペプチド遺伝子レベルが、標準的なレベルと比べて高いか低いかによって、例えば腎臓、骨系、又は他の組織のリン酸代謝の障害の有無が示唆される。

30

【0163】

より具体的には、本発明は、

(a) フォスファトニンをコードするポリヌクレオチドの変異の有無の決定、及び

(b) 該変異の有無に基づく、病理学的状態又は病理学的状態への感受性の診断を含む、リン酸代謝障害に関連する被検物における病理学的状態又は病理学的状態への感受性の診断に関する。

【0164】

さらに別の様態においては、本発明は、

40

(a) 生物試料中の、フォスファトニンポリペプチド、又は変異体の発現の存在又は量の決定、及び

(b) 該ポリペプチドの存在又は量に基づく病理学的状態あるいは病理学的状態への感受性の診断を含む、リン酸代謝障害に関連する被検物における病理学的状態又は病理学的状態への感受性の診断に関する。

【0165】

本発明の上記核酸プローブ及び抗体は好ましくは記載の方法のために使用されることは明白である。

【0166】

50

上記の診断方法は該疾患の状態を決定するために利用できる。本発明に関して、「病理学的状態」という用語は該遺伝子、mRNA、タンパク質又は、例えばプロモーター／エンハンサー配列のような転写調節要素が、野生型の正常な遺伝子産物と比較した場合、該遺伝子の全体の活性に影響する変異、欠失、又はあらゆる別の修飾を有する可能性を含む。この用語にはタンパク質の翻訳後修飾が含まれる。

【0167】

本発明の方法のより好ましい状態において、上記被験物の状態は、リン酸代謝におけるある決まった形の障害を示す。さらに、本発明の方法においては、例えば羊水穿刺（aminocentesis）を用いて、胚の状態であるいは新生児の状態に該被験物の該状態を決定することは好都合である。

10

【0168】

胚、新生児又は成人の段階でのリン酸代謝障害（あるいは潜在的障害）状態の特定分析は、それぞれの段階に応じた特定の病状など、さらなる見識を提供してくれる。例えばX染色体性低リン酸血症性くる病（XHL）や腫瘍性低リン酸血症性骨軟化症（OHO）などの病因为、本発明を用いた診断により明らかになると期待される。この知識に基づいた新しい薬学活性をもつ薬剤が開発され試験されるであろう。本発明を用いた方法はまた、研究の目的に応じて様々な動物に用いることができる。従って、好ましい状態において動物はマウスである。本状態は、特にリン酸代謝を調節する異なるタンパク質の相互関係機能をより明確に理解するための基礎研究に役立つ。さらに別の状態では、動物はヒトである。この状態では、好ましくは診断や治療用利用が予想される。

20

【0169】

上述の方法の好ましい状態においては、リン酸代謝障害を止めるあるいは軽減するための薬剤での新生児の治療を含む他の段階が行われる。リン酸代謝障害あるいはその疾患への感受性の早期診断は、特に好都合であり、非常に医学的に重要である。この好ましい状態は、例えば、冠状動脈絨毛（coronar villi）などの状態、すなわち胚移植に先行する状態の診断に応用される。さらに本発明の方法を用いれば、該状態は、羊水穿刺を経て診断することができる。本発明の診断方法の応用に従って早期診断すれば、リン酸摂取及び／又は再吸収の障害を、誕生後、臨床的症状が現れる前に治療することができる。

【0170】

X染色体性くる病と腫瘍性骨軟化症（腫瘍切除前あるいは切除が不可能である）患者は、カルシトリオールあるいは1,25ジヒドロキシビタミンD₃（商品名ではRocaltrol（登録商標）として知られ、ロシュ社（Roche）から販売される：詳しい情報はウェブサイトの公式ページ<http://www.rochecanada.com/rocaltrolpm/w.html>.参照）を大量投与したり、リン酸サプリメント（二塩基のリン酸塩及び／又はリン酸）の経口投与で治療される。ビタミンDの類似体も時には使用され（例えばジヒドロタキステロール）、また、ヒドロクロロサイアザイドやアミロライド（Alon, Paediatrics 75(1985), 754-763）のようなサイアザイド利尿薬を併用することで、尿からのリンやカルシウムの排泄がさらに抑えられると報告されている。現行の治療法の集中的な総説については（Carpenter, Pediatric Clinics of North America 44 (1997), 443-466）を参照。子供の骨では、変形した四肢の切除（骨切り術）が必要で、上記の薬剤は激しい嘔吐と下痢を引き起こす。家系的なくる病に伴う成長欠損は、現在の治療法では満足のいく結果を出せていない。

30

40

【0171】

上記の薬剤をフォスファトニン及び／又はフォスファトニンペプチド誘導体に置き換えることによって、好ましくない副作用や外科的な骨切断術を伴わずに、臨床的症状を治療し、成長欠損を正常化できる可能性がある。

【0172】

上記方法の好ましい状態においては、前述の方法はさらに、リン酸代謝障害やそれへの感受性を有する被験者の細胞への、機能的かつ発現可能なフォスファトニン遺伝子の導入を含む。この文脈においてまた本明細書において用いられる「機能的」フォスファトニン遺伝子とは、先に述べた生物学的活性をもったフォスファトニンポリペプチドの一次的構造

50

配置の一部あるいは全部を含むタンパク質をコードしている遺伝子を意味する。フォスファトニン変異体の発現を検出することにより、リン酸代謝における疾患の発生又は維持に、該発現が関連していると結論できる。また、別の段階を行ったり、又は追加することにより、変異フォスファトニンの発現を低レベルに抑えたり、あるいはまったく発現しないようにすることも可能である。例えばリボザイム、アンチセンス核酸分子、それらタンパク質の変異体に対する細胞内抗体を用いる等の生物学的手段により、変異体の遺伝子の発現を少なくとも部分的には取り除き、これを行うことができる。さらに対応する変異遺伝子の発現レベルを減少させる薬剤製品が開発される可能性がある。

【0173】

結合活性

さらに別の局面において、本発明はフォスファトニンポリペプチドとの結合パートナーを同定する方法に関し、

- (a) 本発明フォスファトニンポリペプチドとスクリーニングする化合物との接触、及び
- (b) 該化合物がポリペプチドの活性に影響するかどうかの決定を含む。

【0174】

フォスファトニンポリペプチドは、フォスファトニンに結合するタンパク質や、フォスファトニンが結合するタンパク質をスクリーニングするために使用される可能性がある。フォスファトニンと該分子の結合は、フォスファトニンや結合した分子の活性を活性化（アゴニスト）上昇、阻害（アンタゴニスト）、又は減少させる。そのような分子の例としては、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質（例えば受容体）、あるいは小さな分子である。

【0175】

好ましくは分子は、例えば、リガンドの断片、あるいは天然其質、リガンド、構造的・機能的な模擬体などの、フォスファトニンの天然リガンドに密接に関係する。（参照 Coligan, Current Protocols in Immunology (2)(1991);第5章）。同様に、該分子はフォスファトニンが結合する天然の受容体、又は少なくともフォスファトニンが結合できる受容体の断片に密接に関係できる（例：活性部位）。どちらの場合でも、分子は既存の技術で合理的に作られる；上記参照。

【0176】

好ましくは、これらの分子のスクリーニングには、分泌されたタンパク質としてあるいは細胞膜の上にフォスファトニンを発現する適切な細胞が含まれる。好ましい細胞は、哺乳類、酵母、ショウジョウバエ、又は大腸菌からの細胞を含む。フォスファトニン発現細胞（発現したポリペプチドを含む細胞膜）は、その後、好ましくは、該分子を含む可能性のある試験化合物と接触させ、フォスファトニンか分子のどちらかの結合、又は活性の促進や阻害を観察する。

【0177】

アッセイ法では候補化合物とフォスファトニンの結合を簡単に試験でき、結合は標識を用いてあるいは標識競合物との競合を含むアッセイ法において検出できる。さらにアッセイ法は、候補物質がフォスファトニンの結合により生じるシグナルを産出するか否かを試験することもできる。

【0178】

あるいは、無細胞調製物、固体支持体に結合したポリペプチド／分子、ケミカルライブラリー、又は天然の混合物を用いてアッセイすることもできる。このアッセイ法には、フォスファトニンを含む溶液と候補物質を混合する手順、フォスファトニン／分子の活性又は結合の測定、そして標準フォスファトニン／分子の活性及び結合との比較方法なども含まれる。

【0179】

好ましくは、固相酵素免疫検定法で、モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体を用いて、標本（例えば生物標本）の活性レベルを測定できる。抗体は、フォスファトニンとの直接あるいは間接的に結合することによって、又はフォスファトニンと其質をめぐっ

10

20

30

40

50

て競合することによって、フォスファトニンのレベルあるいは活性を測定できる。

【0180】

上記に述べたアッセイ法はすべて、診断の又は予後の指標として用いることができる。フォスファトニン／分子を活性化あるいは阻害することにより、これらのアッセイ法で検出された分子は病気の治療あるいは患者に特定の結果（血中リン酸濃度を上昇させる）をもたらすために用いることができる。さらに、これらのアッセイ法は、適切に処理された細胞や組織からのフォスファトニンの産生を促進又は阻害する物質を見つけ出すことができる。

【0181】

従って、本発明は、以下の段階を含む、フォスファトニンと結合する化合物を同定する方法（以下の手順）を含む：

- (a) フォスファトニンと結合する候補の培養、及び
- (b) 結合が起こったかどうかの決定。

【0182】

さらに本発明には、アゴニスト／アンタゴニストを同定する方法を含み、

- (a) フォスファトニンと候補化合物の培養、
- (b) 上述の通りの生物活性のアッセイ、及び
- (c) フォスファトニンの生物活性が結合によって変化したかどうかの決定、の段階を含む。

【0183】

本明細書で既に述べたように、本発明のポリヌクレオチドとポリペプチドは、フォスファトニンやそれをコードする遺伝子を抑制したり活性化させたりする模擬物質を開発する基礎となる。本発明はまた、該抑制剤や活性剤の候補となりうる化合物の高処理量スクリーニング（HTS）を可能にする細胞ベースのスクリーニング法を提供することが理解されると思われる。

【0184】

別の態様において、本発明はリン酸代謝障害の治療のための薬剤候補の同定と入手方法に関し、

- (a) リン酸摂取に応じて検出可能なシグナルを提供できる成分の存在下での、本発明のポリペプチドあるいはそのポリペプチドが発現している細胞と、リン酸代謝が可能な条件下でのスクリーニングする該薬剤候補との接触、及び、
- (b) シグナルの存在又は増加が推定薬剤を示す、リン酸代謝により生じたシグナルの有無、あるいは増加の検出、の段階を含む。

【0185】

例えば、腎細胞株CL8、初代ヒト腎細胞、初代ヒト骨芽細胞を用いて、例えば上記ロウ，1996に記載の方法で、放射性Na⁺ 依存的リン酸摂取及び／又はビタミンD代謝を測定できる。

【0186】

さらに、(a) に述べた細胞から抽出されたポリA+RNA又は全RNA、及びリン酸輸送体遺伝子（NPTIIなど）、腎24-ヒドロキシラーゼ、 α ヒドロキシラーゼ、PTH、オステオポンチンの配列に相補的オリゴヌクレオチドプライマーを、これらの遺伝子の発現を測定するために例えばPCRを使って利用することができる。

【0187】

さらに、ヒト初代骨芽細胞のミネラル化を測定するには、フォン・コッサ染色法が適切である。その方法には例えば次のものが含まれる：

- ー クロンテック社（Clonetics）が推薦する培地材料や条件を用いての、ヒト一次骨芽細胞（Clonetics-Biowhitakerから入手可能）のコンフルエンスまでの培養、ー ミネラル化実験を行うために細胞にリン酸供与体 β -グリセロリン酸塩を加え、対照群としてヒドロコリチゾン-11-ヘミサクシネートを加える、
- ー 被験細胞に β -グリセロリン酸塩とMEPE25ng/mlを加える、

－3週間培養し、Cloneticsの記述に従ってフォン・コッサ染色法を用い、骨ミネラル化に関する骨芽細胞を染色する培地の一連の交換（AgNO₃； silver salt沈殿）、

－さらに、次の測定を含む分析を行う：

－ラットの灌流実験をおこない、腎からのリン酸摂取におけるフォスファトニンの影響を測定する、

－ヒト腎細胞株CL8における一連の関連遺伝子の発現と、MEPE投与の影響を調べる

例えば；

- ・Na⁺依存性リン酸輸送体
- ・24-ヒドロキシラーゼ、1 α ヒドロキシラーゼ
- ・オステオポンチン、オステオカルシン

－COS細胞におけるMEPEとPHEXとの共トランスフェクションシステム、

－少なくとも1つの上記部分を含むペプチド断片を用いたバイオアッセイを行う。従って、他の検出方法は、最新技術を用いて、フォスファトニンや誘導体ペプチドに暴露した細胞における、タンパク質分解酵素C、カゼイン分解酵素II、チロシン分解酵素、その他のシグナル伝達経路の計測を含む。さらに、付記の例に述べたような方法を上記スクリーニングに容易に適応させることができる。

【0188】

薬剤候補は単数あるいは複数の化合物が考えられる。本発明の方法における「複数の化合物」とは、同一のあるいは同一でない複数の物質を意味するものと理解される。

【0189】

この化合物あるいは複数の化合物は、化学的に合成されたり、微生物により産生されたり、及び／又は例えば植物、動物、微生物などから抽出した細胞抽出物のような試料内に含まれる。さらに、該化合物は当技術分野で既知であるかもしれないが、リン酸代謝において、フォスファトニンポリペプチドや他の成分を抑制したり活性化したりできることは今までのところ知られていない。反応混合物は無細胞抽出物か、あるいは細胞又は組織を含む可能性がある。本発明に適した方法の計画は、当業者に知られており、例えば、一般的には、Albertsら、Molecular Biology of the Cell, 第3版(1994)や、付記の例に記されている。複数の化合物は、例えば、反応混合物、培養媒介物質等に添加されたり、細胞に注射されたり、あるいはそうでなければ遺伝子組換え動物に加えられる。本発明の実験に使用される細胞や組織は、好ましくは、宿主細胞、哺乳類細胞、あるいは前述した状態に記載の本発明のヒト以外の遺伝子組換え動物である。

【0190】

本発明の実験において、化合物や複数の化合物を含んだ試料が同定されると、フォスファトニンを抑制又は活性化できるような化合物を含むことが同定されたオリジナルの試料から単離するか、又は、例えばそれが複数の異なる成分で構成されている場合、試料ごとに異なる成分の数を減らすようオリジナルの試料さらに細別し、オリジナルの試料の細別化を繰り返すこともできる。サンプルの複雑さにより、上記の段階は何度も繰り返して行うことができ、好ましくは、本発明に従って同定された試料が限定された数の成分、また単一の物質からのみで成るまで行うことができる。好ましくは該試料は、類似の化学的及び／又は物理的特性の物質を含み、最も好ましくは、該成分は同一である。

【0191】

本発明の方法に従って試験し、同定できる化合物は、例えば、cDNA発現ライブラリー、ペプチド、タンパク質、核酸、抗体、微小な有機化合物、ホルモン、模擬ペプチド、PNA等の（Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell 83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell 79 (1994), 193-198、上記参照）発現ライブラリーである可能性がある。さらに例えば、当技術分野で知られた遺伝子ターゲティングベクター（例えば、核酸、ミトコンドリア、細胞質、pEF/myc/nuc、pEF/myc/mito、pCMV/myc/mito、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cytoをターゲットとして発現するpShooterプラスミドシリーズ、あるいは、哺乳類細胞の表面への組換えタンパクを標的とするpDISPLAY発現ベクター）で、例えば変異誘発を挿入すれば、フォスファトニンタンパク質の推定レギュレーターをコードする推定遺伝子

10

20

30

40

50

又はフォスファトニンタンパク質のタンパク質の上流又は下流に影響を及ぼす推定遺伝子が同定される可能性がある。それらのベクターはすべてInvitrogen社から入手可能である (<http://www.invitrogen.com/>)。

【0192】

化合物がフォスファトニンタンパク質を抑制又は活性化できるかどうかは、例えば、Na⁺ 依存的リン酸摂取や骨のミネラル化の観察などで分析できる；上記参照。さらに、該化合物と接触した本発明の細胞の表現型性質を監視し、野生型の細胞と比較することで決定できる。他の様態では、該性質を、フォスファトニンタンパク質を抑制又は活性化できるあるいはできないことが知られている化合物と接触させた細胞の性質と比較することもできる。

10

【0193】

一旦、前述の化合物を同定し獲得すれば、好ましくは治療的に許容された形態で供給される。従って、本発明は上記発明の方法の段階、及び

(i) 本発明の段階(b)で得られた、又は同定した化合物、あるいはその類似体や誘導体を、治療に有効な量の該薬剤を患者に与えるに十分な量での合成、及び、

(ii) 本発明の段階(b)で得られた、又は同定した化合物、あるいはその類似体や誘導体を、薬学的に許容される担体との組み合わせを含む治療用試薬の製造方法に関する。

【0194】

化学誘導体や類似体の調製方法は、当業者に周知であり、また、ベイルステイン (Beilstein)、「有機化学ハンドブック (Handbook of Organic Chemistry)」、Springer edition New York Inc., 175 Fifth Avenue, New York, N.Y. 10010 U.S.A.、「有機合成 (Organic Synthesis)」、Wiley, New York, USA等にも記述されている。さらに該誘導体は当技術分野で既知の技術に従って合成し、効果を調べることも可能である；上記と下記も参照。

20

【0195】

実施例

以下の実施例は本発明の様々な局面を実施する方法を完全に開示し説明するために当業者に提供するため記載するものであり、本発明者らがそれらを本発明の範囲とみなしたことを意図するものではなく、後述する実験が行った実験の全て又は唯一の実験であることを表したり示したりするものでもない。用いた数値（例えば、量、温度など）に関しては正確性を期すよう注意を払ったが、何らかの実験誤差及び偏差を考慮すべきである。別途定義しない限り、割合は重量による割合であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏温度である。

30

【0196】

実施例1

腫瘍由来のフォスファトニンの精製

患者からリン酸尿症を発現している間葉腫瘍を摘出し、次の試料を得た：

A：大きな豆2つぶ大の純粋な腫瘍組織の試料をDMEMイーグル/10%FCS/グルタミン/抗真菌性抗生物質Gibco-BRLの入った2mlのバイアルに入れた。

B：同じサイズか可能な場合にはさらに小さいサイズの硬膜下腫瘍の試料。Aと同じ培地に入れた。

40

C：異常型の硬膜の試料：硬い白色の試料：Aと同じ培地に入れる。

D：腫瘍液の試料。

【0197】

試料の処理：

1日目：

滅菌した小刀で試料をそれぞれ0.5cm角の小さな立方体に切断した。それぞれ半分量の試料を凍結チューブに入れてN₂ (1) ですばやく冷凍した。組織周辺の液体 (DMEM/10%FCS等) も収集して冷凍した。残りの半分量の試料は、0.2mg/ml (～15ml) のコラーゲナーゼA1を添加したDMEM イーグル/10%FCS/グルタミン/抗真菌性抗生物質に加えて、37℃で一

50

晩放置した。

【0198】

2日目：

1. DMEMを加えた血清で一晩培養したところ、出現した細胞の多くは赤血球で接着性の細胞はほとんど見られなかった。室温で細胞を遠心して沈降させ、上清を集めてすみやかに冷凍した（～15ml）。
2. 抗生物質／抗真菌を加えた10mlのDMEMイーグルにペレットを再懸濁し（中型フラスコ）、さらに8時間10分放置した。
3. 1と同様に無血清上清を集め（～10ml）、細胞を10%のFCSを入れたDMEM EAGsに再懸濁して培養を続けた。上清は-80℃で保存した。

10

【0199】

6日目：

1. 2日目からの培養後、2日目の1と同様に細胞を遠心し沈降させた。10%FCS試料を回収して冷凍した。
2. 2日目と同様に無血清DMEM（10ml）にペレットを再懸濁し、今回は4時間放置した。
3. 2日目の3と同じ処理をおこなった。

【0200】

7日目：

1. 特に硬膜下と腫瘍の培養では、多くの細胞の小集塊が組織培養プレートのプラスチックに接着して形成された。それらのポリープに似た隆起の下には、一層の線維芽細胞様の細胞が腫瘍に似た構造の下から放射状に広がっていた。この細胞の層は、ポリープ様の腫瘍に連結するマトリックスのように作用するよう見えた。これは、硬膜試料では見られず、硬膜試料ではこの段階では細胞が不足しており、線維状のからみあったような構造が見られた。
2. 培養液を遠心して沈降させ、上清を採取した（10%のFCS）。その後ペレットを一方の側に置いた。
3. プレートは、10mlのトリプシンEDTA溶液Gibco/BRLをPBSで1/10に希釈したものと共に～15分間放置された。それからプレートを強くタッピングして、5mlのFCSを加えた。
4. 再懸濁した細胞を2で得られたペレットに加え、再懸濁して遠心して沈降させた。上清は廃棄した。
5. 細胞を、グルタミンと抗生物質抗真菌物質の入った18mlの10%FCS DMEMイーグル培地でプレートアウトした（大きな薄片を使用）。
6. 最後に、細胞を37℃のCO₂環境下で培養した。

20

30

【0201】

9日目：

1. 癌細胞及び、ある程度の硬膜細胞は、多数の小集塊を呈し、トリプシン処理以前の細胞と同じ形態を有するよう見えた。いくつかの小集塊はかなり大きく、肉眼でも見えた。
2. 血清を加えた培地を回収し保存した。大型のフラスコを使用し、フラスコ一つ当り18mlを加えた（DMEM10%FCS抗真菌剤／抗生物質／グルタミン）。

40

【0202】

13日目：

1. 細胞を冷凍し（～15ml）、10%FCS DMEM馴化培地としてファルコン中で保存した。
2. 無血清DMEM Eags（～11ml）11.10amに細胞を再懸濁し、37℃で6時間放置した（CO₂培養器）。
3. 細胞を遠心して沈降させて、上清を集めた（無血清対照培地）。残りの細胞には10%FCS DMEM EAGを加えた。

【0203】

16日目：

上記の手順が繰り返され、数週間に渡って腫瘍馴化培地（TCM）が採取された。また別の

50

方法として、Saos-2細胞（ECACC 89050205）又はU-2 OS細胞（ATCC HTB-96）からもTCMを採取することができる。

【0204】

フォスファトニンの精製：

コンカナバリンAセファロース親和性クロマトグラフィー：

1. 3mlのTCMを1Mのリン酸ナトリウムpH7.2及び5M塩化ナトリウムで調整し、最終的に、0.01%アジ化ナトリウムを含む、0.06Mリン酸ナトリウムpH7.2及び0.5M塩化ナトリウムの溶液とした。
2. 20%エタノール中のコンカナバリンAセファロース（ファルマシアコード番号：17-0440-01）を、はじめにカラムと同容量の水で繰り返し洗浄し、泳動緩衝液中で平衡化した。10
3. 小型のC10/10カラム（ファルマシアコード番号：C10/10 id 10mm）にコンカナバリンAを高さ5.5cm（約4.3～5.0ml容量）になるまで入れた。最大流量0.5ml/分で平衡化した。
4. 試料（pH7.2に調整したリン酸ナトリウム/0.5M塩化ナトリウム/0.01%アジ化ナトリウム）を重力フィード（gravity feed）でカラムに加え、3回繰り返し負荷した。試料の色は、カラムを通過すると視覚化することができる。結合していない材料を回収してのちの基準とするために保存した。
5. Waters LCシステムをつなぎ、カラム容量数杯分の負荷緩衝液で試料を洗浄した。
6. 負荷と洗浄の後、pH7.2の60mMリン酸ナトリウム緩衝液0.5M塩化ナトリウム、0.5M α -メチル-D-グルコピラノシド、0.01%アジ化合物緩衝液）を用いて溶出をおこなった。図1a参照。単一のピークが検出され、それを集めた。20
7. 次に、カラムを最大約40mLのベースラインまで戻し、一晩放置した。
8. メチルグリコサイド緩衝液に入れて一晩放置したところ、第2のピークが～5mlのところで溶出された；図1b参照のこと。
9. 2番目のピークを回収して、0.05Mの酢酸で透析し凍結乾燥させた。コンカナバリンのピークA1（低親和性）とコンカナバリンのピークA2（高親和性）のどちらにも、ヒト腎細胞株（CL8）におけるNa⁺依存性リン酸共輸送体とビタミンD代謝とを阻害する強い活性がある。測定に用いる高親和性分画、ヒト腎細胞株（CL8）、及び条件は、ロウら、1996に記されている。この測定にさらに適している既知の腎細胞株には、ECACC91021202として寄託されているOK細胞株がある。

【0205】

HiTrap SP陽イオン交換 1mlカラム（コード番号17-1151-01；Pharmacia）を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー：

1. 凍結乾燥したタンパク質を0.05Mの酢酸アンモニウムpH5に再溶解し、平衡化した1mlのHiTrap SPセファロース陽イオン交換カラムに入れた。
2. 試料を加える前に、カラムを水に続いて5容量分の開始緩衝液（0.02M酢酸アンモニウム pH5）で洗浄して平衡化した。
3. 次のプロトコルを用いて試料を溶出した；

30

番号	時間 (分)	流出量 (ml/分)	酢酸アンモニウム(%) pH5	酢酸アンモニウム(%) /0.5M NaCl pH 5
1		0.5	100	0
2	15	0.5	25	75
3	20	0.5	0	100
4	25	0.5	0	100
5	35	0.5	100	0
6	50	0.5	100	0

10

【0206】

単一の鋭角的なピークを得て、その後、試料を0.05Mの酢酸で透析し、凍結乾燥させた；図2参照。

【0207】

10mMのリン酸緩衝液pH7.2 20 μ lに再懸濁した後、アリコートにSDS-PAGE試料緩衝液（最終濃度＝125mM トリスHCL pH6；2.5%グリセロール；0.5%w/v SDS；5% β -メルカプトエタノール；0.01%ブロモフェノールブルー）に再懸濁し、煮沸（5分間）して冷却し、SDS PAGEゲル12.5%（クロマトグラム参照）に負荷したところ、55kDのところには二本のバンドが検出された（Roweら、1996参照）。コンカナバリリンAと陽イオン交換カラム由来のバンドは、どちらも、凝縮形態をとっていた。腫瘍馴化培地（1/1000希釈）を含む全ての分画は、ヒト腎細胞株におけるNa⁺依存性リン酸共輸送を阻害し、ビタミンD代謝を変化させる活性をもつ。リン酸輸送とビタミンD代謝の測定方法の完全な記述は、ロウら、1996参照のこと。すべての精製物の調製は、コンピューターミレニアムソフトウェア(computer-millennium software)によってプログラムされたwaters HPLC/FPLCで実施した。最も活性の高かった分画は、OHO腫瘍由来のコンカナバリリンA1分画だった。固定した精製分画のスクリーニングには、患者の手術前抗血清（Anti pre-operation antisera）を使用した。この分画もNaPiを阻害し、ヒト腎細胞株（CL8）におけるビタミンD代謝も変化させる。

20

30

【0208】

実施例2

腫瘍培養上清（TCM）のスクリーニング、及び手術前/後の抗血清で精製した分画：及び糖タンパク質スクリーニング

手術前抗血清と手術後抗血清については、以前にロウら、1996に記述されている。手術前抗血清だけが、TCMにある精製された分画とホルモンとを検出したが、これに際しては、増強された化学発光を用いたウェスタン及び糖タンパク質検出法によって、TCMと精製された分画の検出が行われた。タンパク質マーカーをビオチン化し、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ複合体のタグをつけた。矢印は凝集体と活性糖タンパク質を示している。手術後抗血清とウサギの免疫以前の血清はどの分画も検出しなかった。さらに、リン酸因子を分泌する腫瘍のみが陽性であった。培地と皮膚対照群は陰性であった。NaPiを阻害能力やヒト腎細胞株（CL8）におけるビタミンD代謝の調整力に関して、ConA1と、ConA2とCA1試料でははっきりと異なっていた。精製した分画はすべてSDS-PAGEの上で凝集し移動率が少なくなる傾向がある。精製した分画とTCM活性分画はかなりグリコシル化されている。グリコシル化の程度は、PVDF膜に固定したタンパク質を過ヨウ素塩酸で酸化した後に炭水化物成分をビオチン化することで確かめることができる。次にセイヨウワサビペルオキシダーゼに結合し、化学発光を強めたストレプトアビジンでスクリーニングする。活性型（NaPi阻害等）は58-60kDa分画と関係している。もう一つの強力なタンパク質精製法は、

40

50

MOPS泳動緩衝液とともに4～12%のビス-トリスゲルを用いた中性 (pH7) のSDS-PAGEシステムを使用することである。プリカースト (Pre-caste) ゲルはNovex社から購入することができる。

【0209】

実施例3

4～12%のポリアクリルアミド勾配と、ビス-トリスゲルMOPS泳動緩衝液 (Novex社のNu-PAGEシステム) を用いた中性SDS-PAGE: ホルモンにおいて減少した移動率

このシステム上では、グリコシル化ホルモンは移動率が減少し、～200kDaに泳動する。低分子量形も58/60kDaで見ることができる。～200kDaタンパク質の様子は、タンパク質の等電位 (中性pHでは電荷が異なる) と、炭水化物成分及びゲルマトリックスの相互関係とによるものと考えられる。さらに、勾配ゲルの上方の低濃度のアクリルアミド (4-12%勾配) によって、高分子量化合物に対する電気ブロットの効率が上昇する。このシステム中の泳動分画は分子の純度と同種性を上昇させる。このシステムを用いたウエスタンブロットによって、次の試料のスクリーニングをおこなった (発光度を上げた化学発光を検出することにより、手術前抗血清でブロットのスクリーニングをおこなった)。1. タンパク質マーカー、2. 頭蓋内腫瘍細胞株OH0、3. 腫瘍に隣接した硬膜下細胞、4. 硬膜下に隣接した硬膜細胞、5. HTB6細胞株、7. 定義された対照培地、8. 対照の皮膚線維芽細胞、9. 線状皮脂性母斑ポリープ腫瘍。9の線状皮脂性母斑ポリープ腫瘍は、母斑ポリープ腫瘍がSDS-PAGE中性ゲル上の～200kDaに特異的なリン酸尿症のバンドを示すことが証明された。

【0210】

実施例4

フォスファトニンのクローニングと配列決定

1. ライブラリーの構築:

先に公開された刊行物に記載された患者 (BD, Roweら、1996) から採取した腫瘍から、通常の方法でmRNAを抽出した。逆転写酵素を使ってmRNAをコピーし、cDNAの集団 (population) を作製した。続いてそれをバクテリオファージベクターλ-ZAPIIユニ (ベクターはStratagene Ltd. Unit 140, Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge, CB4 4GF United Kingdomから購入した) にサブクローニングした。クローニングは一方向で、遺伝子の5'末端はT3プロモーターの隣にあり、EcoRI部位に接していた。cDNAの3'末端は細菌T7プロモーターのXho-1部位の上流に接していた。簡単にいうと、患者BDから切除した腫瘍を1mm角に切断し、Streptavidin-Magnisphere paramagnetic particle technology (Poly ATract (登録商標) system Promega) を用いて直接ポリA+RNAを抽出した。次に、ストラタジーン社のcDNA合成キットを使って、精製したmRNAからcDNAテンプレートを作製した。cDNAにリンカープライマーをつけ、λZAPIIユニバクテリオファージベクターに方向を指定してクローニングするために5'末端EcoRI互換性cDNA末端とXhoI互換性3cDNA末端を産生した。組換えバクテリオファージをプレートアウトし、大腸菌XL-1Blue mrf'の上で増幅した。プライマリークローンの、6%の野生型の出現も含めて総数は800,000であった。

【0211】

2. 手術前抗血清を使ったスクリーニング:

cDNAバクテリオファージライブラリーをNZY寒天プレートにプレートアウトし、IPTGを用いてβガラクトシダーゼオペロンを誘導した。次に、発現した融合タンパク質をハイボン

ド-C膜 (Amersham) に転写し、膜を患者由来の手術前抗血清でスクリーニングした。使用した抗血清は先に述べた (Roweら、1996)。抗血清は事前に大腸菌 (E.coli) 溶解物をよく吸収させ、血液全体に対するシグナルのノイズを減少させておいた。患者BDの手術前血清に対して作製されたウサギ抗血清 (Rowe, Bone 18(1996) 159-169) は、大腸菌抗体とヒト血清由来の抗体のバックグラウンドを取り除くため、事前に通常ヒト血清と大腸菌溶解物を吸収させておいた。簡単にいうと、直径80mmのニトロセルロースフィルター5つを総大腸菌溶解物 (Stratagene) に加え、次の5つのフィルターは通常ヒト血清 (10ml) に浸した。浸透させたフィルターを1%のBSA、20mMのトリスHCl (pH7.5)、150mMのNaCl (TBS)、0.02%のNaN₃において、1000倍希釈した抗ウサギ手術前抗血清250ml中でそれぞれ

室温で10分間、順に培養した。そして事前処理した抗血清 (pre-Anti op) をcDNAライブラリーのスクリーニングに使用した。バクテリオファージλZAPIIユニOH cDNAクローンを大腸菌 XL-Blue mrf'上にプレートアウトし、37°Cで3時間培養した。10mMのIPTGとともに前培養したハイボンドN⁺のフィルターを発達中のプラーク上に乗せ、さらに42°Cで3時間培養した。次にフィルターを取り、Tween20を加えたTBS (TBST) で洗い、1%BSA、0.02%のNa₃Nを含むTBS中で、4°Cで一晩ブロッキングした。ブロッキングしたフィルターにpre-Aanti-opを加え、室温で1時間放置した。続いてフィルターを洗い、ヤギ-抗-ウサギアルカリフォスファターゼ結合物で培養した後、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルフォスファターゼ/ニトロブルーテトラゾリウムを用い、Stratagenes picoblue (商標);免疫スクリーニングキットに記述されているように映像化した。~600,000クローンを、スクリーニングすると、9つの陽性クローンが選択され、二次スクリーニング及び三次スクリーニングによって精製された。バクテリオファージのクローンはExAssistヘルパーファージによってファージミドとして救出され、大腸菌 SOLR細胞にクローン化された。ExAssistヘルパーファージとSOLR細胞はストラタジーン社 (Stratagene Ltd. Sunit 140, Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge, CB4 4GF United Kingdom) から購入した。

【0212】

3. クローンの配列決定:

ファージミドを用意し、DNAをシーケンスした。9つのクローンすべての配列を決定した。滅菌したhollow quillで3回スクリーニングした後、陽性バクテリオファージプラークをアガロース培地から取り出した。次に、溶解プラークを含むアガロース栓子 (plug) を0.02%のクロロホルムを加えた0.5mlのSM緩衝液に入れ、4°Cで一晩放置する。ExAssistファージをストラタジーン社によって記述されている通りに使用し、バクテリオファージクローンを救出しBSCPT SKII⁺ファージミドに形質転換した。精製したファージミドには、宿主細胞として大腸菌 SOLP細胞を使用した。プラスミドDNAを通常の方法で準備し (Rowe, Nucleic Acids Res. 22(1994), 5134-5136)、ABI蛍光自動シーケンサーと標準ベクター特異的プライマーを使ってシーケンスした。6つのクローンがβガラクトシダーゼプロモーターとインフレームであり、隣接/重複抗原決定基及び個々の重複DNA配列に発現タンパク質を与えていた。一番長く配列化されたクローンは図8に示したように、他の5つのcDNA配列を含んでいた。この配列 (アミノ酸/cDNA) はN末端を含まない切断型フォスファトニンの配列である。それはクローン化された430のアミノ酸残基と (配列番号: 2)、1655bpのDNA配列 (配列番号: 1) である。予測された二次構造からは、COOH末端がグリコシル化された高親水性タンパク質と、アミノ末端に細胞接着トリペプチドの存在が示されている: 図8参照。タンパク質も高度に抗原化しており、多くのらせん状ドメインを有している (図10)。さらに、BLASTを使用して可能な限りのデータベースをスクリーニングしたが、既知の遺伝子やタンパク質配列と統計学的に意味のある相同性は示されていない。

【0213】

4. 組換えヒトフォスファトニンの精製:

単離cDNAクローンは、Bscpt SKIIベクター (Stratagene vector) の救出されたファージミドとして、SOLR 大腸菌宿主細胞内に含まれている。IPTGによってβ-ガラクトシダーゼプロモーターが誘導されることで、融合タンパク質は低レベルで発現する。フォスファトニクローンの融合産物は、ウェスタンブロット上にある手術前抗血清に反応する。融合タンパク質は、pCAL-n-EKベクター (Stratagene vector) 内にサブクローニングされることにより、発現及び生物活性が上昇する (後述参照)。ヒトフォスファトニンを含む構築物は、大腸菌 (BL21(DE3)pLys S)細胞 (Stratagene社から購入) にある。融合タンパク質のIPTG誘導はもっと高く、本質的に純粋なタンパク質は細胞溶解物のカルモジュリン親和性クロマトグラフィーで得ることができる。融合タグをつけた組換えフォスファトニンは、Ca²⁺存在下でカルモジュリン樹脂と結合する。EGTAで洗浄すると、フォスファトニン融合タンパク質が放出される。エンテロキナーゼで処理して微生物の融合されたタグを取り去ると、純粋なヒトフォスファトニンが残る。

【0214】

4a. フォスファトニンのpCAL-n-EKベクターへのサブクローニング

切断型フォスファトニン（切断型MEPE）の推定総cDNAコード配列（最も大きいcDNAクローンpH011.1から推定）を真核生物発現ベクタープラスミドpCAL-n-EK（Stratagene vector）にサブクローニングし、構築物を大腸菌 XLi-Blue mrf'と大腸菌 BL21(DE3)pLysSそれぞれに形質転換した（菌株はStratageneから入手）。Stratagene Affinity（商標）；クローニングとタンパク質精製キット（cloning and protein purification kit）（カタログ番号：214405及び214407）を用い、ライゲーションインディペンデントクローニング（ligation Independent cloning）（LIC）をおこなった。以下のような付属の張り出しリンカー配列を有するフォスファトニン配列の5'末端と3'末端それぞれから2つのプライマーを設計した（太字の配列はリンカーを示す）。

フォワード 5' **GACGACGACAAG**.GTGAATAAAGAATATAGTATCAGTAA 3'

リンカー

（配列番号：8）

リバーズ 5' **GGAACAAGACCCGT**.CTAGTCACCATCGCTCTCACT 3'

リンカー

（配列番号：9）

始めのバリン残基からフォスファトニン（図8参照）の停止コドンまで（図8参照）、さらにリンカー配列までをコードするDNA配列を含む、フォスファトニンのPCR増幅を行う。PCR断片をPfuポリメラーゼとdATPで処理すると、5'末端に張り出すリンカー配列が産生される。細胞を培養しIPTGを加えると、融合タンパク質の誘導が起こる。PCRの条件は次の通りである：変性前処理として95℃で3分、続いて95℃で45秒の変性、59℃で60秒のアニーリング、72℃で2分を20サイクル、その後、最終伸長を72℃で7分、そして4℃まで冷却。Perkin Elmer 9600サーモサイクラーをプログラムしてPCRをおこなった。使用したPCR緩衝液（PB）は次の通りである：10mMのトリスHCl pH8、50mMのKCl、1μMのプライマー、200μMのdNTPs。PB緩衝液を2mMのMgCl₂に加えた。LICを行うため、増幅産物をストラタジーン社の記述に従ってpfuポリメラーゼとdATPで処理し、アニーリングしてpCAL-n-EKプラスミドベクターを相補的なリンカー張り出し部分と直接的に結合させた。次に、この構築物を大腸菌 XL-Blue mrf'コンピテント細胞に形質転換し、コンピテント大腸菌 BL21(DE3)クローンをアンピシリンプレート上で選抜し、プラスミドを調製して配列決定を行った。ベクターと融合構築物に関する概要は図14に示した。プラスミドのコピー数が多かったのは宿主細胞に大腸菌 XL-Blue mrf'を使用したときで、大腸菌 BL21(DE3)では多くの組換えタンパク質の発現が得られた。

【0215】

4b. カルモジュリン親和性樹脂によるフォスファトニンの精製

Staratagene (cat~214405) に記述されている方法を用いることができる。フォスファトニン特異的残基に由来する上流配列は、カルモジュリン結合配列を含んでいる。カルシウム存在下で粗精製細胞溶解物にカルモジュリン樹脂を加えると、タンパク質が結合できるようになる。カルシウムを含む緩衝液でスラリーを洗浄し、EGTA 2mMをトリス-緩衝液（50mMトリスHCl pH8）に入れた溶液によって、フォスファトニン融合タンパク質を溶出した。従って、カルモジュリン結合タンパク質の除去を部位特異的プロテアーゼEKによる分解によって行い、純粋な組換え切断型ヒトフォスファトニンを得る。好ましくは、本方法は、以下のようにして行われる（緩衝液の組成は以下の表を参照のこと）。

【0216】

1. 細胞を培養し、ストラタジーン社のプロトコールにあるようにプラスミドp1BL21を含むBL23（DE3）大腸菌宿主細胞を使って、pCAL-n-EKベクター（カタログ番号：214405）を誘導する（図14参照）。
2. 再懸濁緩衝液としてCCBB-II（500mlに由来する細胞ペレットを10mlのCCBB-IIに再懸濁したもの）を使用するほかは、ストラタジーン社のプロトコールに記されているとおりに

タンパク質溶解物を調製する。30秒パルスで超音波破碎した後に氷で4分間冷却することが重要である。超音波破碎中は、細胞を入れた管を氷の上に設置しておく。

3. 超音波破碎細胞を10000gで遠心した後、上澄みを回収する。ほとんどの組換え切断型MEPEは上澄み（タンパク質溶解物）に含まれている。

4. タンパク質溶解物はVIVA SCIENCE VIVA SPIN(カタログ番号：VS1521、30,000MWC0 PE Sと呼ばれる)濃縮機を使用し、カットオフ値 分子量30,000で濃縮する。

5. 次に、1mlの平衡化したカルモジュリン樹脂（CCBBII緩衝液を用いてStratageneの記述通りに樹脂を平衡にする）に、1901-200mlの細胞から調製されたタンパク質溶解物（～1.3ml当量のタンパク質溶解物）を加える。

6. 懸濁液を4℃で一晩巡回培養する。

7. 懸濁液を遠心して沈降させ（エッペンドルフ遠心分離機において、3000rpm、2分間）、上清を取り除く。樹脂を1mlのCCBB-II緩衝液に再懸濁する。

8. 樹脂を遠心して沈降させ、初回の洗浄液を除去する。これをあと2回繰り返す（CCBB-II中において合計3回洗浄する）。

9. 次に樹脂をWB-IIIで洗浄する；最終洗浄緩衝液中に界面活性剤が含まれていないように注意する。バイオアッセイに使用する細胞は、ごく微量であっても界面活性剤に対してきわめて感受性が高い。WB-IIIはCCBB-IIと同じであるが、タンパク質分解酵素阻害剤が含まれていない。

10. 非特異的タンパク質は緩衝液をEB-Iで2回（1ml）洗浄すると溶出される。

11. 2～3回（1ml）EB-IIで切断型MEPEを溶出する。

12. flowgwn 10Kマイクロスコープ濃縮機を使って4℃でタンパク質を濃縮する。一般に、3mlのMEPE溶出物を2時間で～170μlまで濃縮できる。

13. SDS-PAGEゲルに試料を泳動して純度と量を評価した後、複数のアリコートをして-80℃で凍結する。繰り返し凍結/融解を行うことはさける。

緩衝液：

化合物	CCBB-II	WBIII	EBI	EBII
トリス緩衝液 pH 8	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	300mM	300 mM	150 mM	1 M
酢酸マグネシウム	1 mM	0	0	0
イミダゾール	1 mM	0	0	0
CaCl ₂	2 mM	2 mM	0	0
プロテアーゼ阻害剤 w/o EDTA	あり	なし	なし	なし
EGTA	0	0	4mM	4mM

緩衝液の使用にあたっては、10mlあたり1錠のプロテアーゼ阻害剤（Boheringer Mannheim、プロテアーゼ阻害剤w/oEDTA(カタログ番号：1836170))を加えた。1MのNaCl、EGTA（4mM）緩衝液における最終溶出物は>95%の純度のフォスファトニンを含む。

【0217】

実施例5

フォスファトニンの構造

1. 一次構造とモチーフ：

タンパク質と核酸配列の一次構造を図8に示した。単離切断型MEPEのcDNAクローンの中で最も大きなものは1655bpで、ポリA⁺テールを含む遺伝子の3'末端すべてと一本鎖のポリアダニル化配列

(AA[T/U]AAA)

を有していた（図8）。430残基のオープンリーディングフレームは、単離された他の小さな切断型MEPEcDNAクローンにわたって重複していることが見出され、分子量47.3kDa及びp17.4と推定される。最も一致している個所はコザックの開始コドン（Nucleic Acids Res.

15（1987）、8125-8148）255bpから始まり、他の二つのメチオニンはこの上流に存在する。付随する5'配列は失われ、さらに前の開始コドン及び／又は伸長した5'非翻訳配列が特徴付けされる必要がある。GCG-二次構造の予測は、このタンパク質が3つの疎水性の低い領域を有する非常に親水性の高いものであることを示唆している（図9）。このタンパク質は382位と385位の残基（NNST）、及び383～386位の残基（NSTR）の部位でグリコシル化モチーフをもつ。また、161～164位の残基（SGDG）でグリコサミノグリカン接着部位を有する。グリコシル化されていない分子量は約54kDaであり、58～60kDaの精製されたグリコシル化形態とかなり一致する。そこには多くのリン酸化部位モチーフがあり（表1参照）、ホルモンやその断片の生物活性に影響していると予測される。

【0 2 1 8】

【表 1】

10

20

	部位 (図8)	モチーフ
プロテインキナーゼCリン酸化	8-10	SNK
	77-79	TPR
	118-120	THR
	203-205	TKK
	228-230	TAK

	部位 (図8)	モチーフ
	311-313	STR
	312-314	TRK
	319-321	SNR
	384-386	STR
	403-405	SNR
	408-410	SSR
	409-411	SRR
カゼインキナーゼリン酸化	8-11	SNKE
	139-142	SDFE
	177-180	TGPD
	194-197	SEAE
	199-202	THLD
	224-227	TRDE
	228-231	TAKE
	238-241	SLVE
	325-328	TLNE
	423-426	SSSE
	425-428	SESD
	427-430	SDGD
CampおよびcGMP依存性プロテインキナーゼリン酸化	405-408	RRFS
チロシンキナーゼリン酸化	40-47	KLHDQEEY
ミリスチン化	16-21	GLRMSI
	143-148	GSGYTD
	119-224	GNTIGT
	266-271	GSQNAH
	291-296	GSSDAA
	315-320	GVDHSN
	389-394	GMPQGK
アミド化	370-373	HGRK
RGD	152-154	RGD
グリコサミノグリカン接着部位	161-165	SGDG
Asu-グリコシル化	382-386	NNST
	383-387	NSTR

【0219】

このタンパク質の鍵となる構造は、152～154位の残基（RGD）にある細胞接着配列である

10

20

30

40

50

。Arg-Gly-Aspの配列は、一般的に受容体の相互作用に影響しており、フィブロネクチンでは、ある種のインテグリンと結合する細胞表面受容体に必要不可欠なものである。さらに注目すべき点は、このモチーフがある種のコラーゲン（骨マトリックスタンパク質）、フィブリノーゲン、ビトロネクチン、フォン-ウィルブランド因子（von Willebrand factor）（VWF）、ヘビジスインテグリン、スライムモールド（Slime mould）ジスコイジンにも存在していることである。これは、フォスファトニンのこの部分が受容体及び／又は骨ミネラルマトリックスの相互作用に関係している可能性が高いことを示している。さらにこれらの相互作用は、以下のような作用を媒介している。

1. 骨のミネラル化（骨芽細胞）
2. Na依存性リン酸共輸体遺伝子の発現調節
3. 24ヒドロキシラーゼ及び／又は1 α -ヒドロキシラーゼ遺伝子の発現調節（腎）
4. 骨と歯のミネラルマトリックス相互作用及び核形成によるミネラルの沈着

【0220】

161～164位の残基（SGDG）にグリコサミノグリカン接着配列があるということは、骨ミネラル化接着及び相互関係に関する重要な意味を持っている。骨におけるプロテオグリカンの役割は、特に細胞のシグナル伝達においてよく研究されている。分子のこの部分が前述の生物活性において重要であり（ポイント1～4）、特に骨芽細胞が媒介する骨のミネラル化において重要な役割を果たしている可能性が高い。

【0221】

RGDモチーフは予測されるターン（turn）領域（Garnier prediction Antheprot）に存在し、2つの β シート領域に隣接している（134～141位の残基、172～178位の残基）。推定されるシート構造は、2つの拡張した α ヘリックス領域（121～134位の残基、196～201位の残基）に隣接し、ターン（turn）内にある。一般的な構造では、予測されるターン（turn）とRGD細胞接着配列の存在は、オステオポンチンに見られるそれと同様である。さらにこのタンパク質は、プロテインキナーゼC、カゼインキナーゼII、チロシンキナーゼ、cAMPcGMP依存性プロテインキナーゼにおける推定リン酸化モチーフを数多く持っている。MEPEにはさらに、多くのN-ミリストレイン酸化部位が見出されており、これらの部位はリン酸糖タンパク質（オステオポンチン、ビトロネクチン、コラーゲン、h-インテグリン、結合タンパク質、デンティンシアロリン酸タンパク質、デンティンマトリックスタンパク質1、骨-シアロタンパク質III、フィブロネクチン）を含むRGDの構造を有することが明らかとなっている。通常、高濃度のアスパラギン酸、セリン、グルタミン酸残基が含まれており（26%）、これはオステオポンチンにも見られる（37%）。特に興味深いのは、MEPE配列にはまったくシスチン残基が存在しないことである。これは、シスチン-シスチンジスルフィド結合が、この分子の二次構造において何の作用もしていないことを示している。MEPEを用いてtrembleデータベースをスクリーニングすると、デンティンフォスフォリン（DPP）との配列の相同性が見出された。MEPEのC末端領域は、アスパラギン酸とセリン残基の配列をもっており（414～427位の残基）、これはDPPに見られる反復モチーフとほぼ同一（80%相同性）である（図26Aと図26B）。MEPEモチーフ

(DDSSSESDSGSSSESD)

及びDSPモチーフ

(SDSSDSSDSSSSSDSS)

を物理化学的に比較すると、その相同性は93%にもなる。MEPEモチーフがMEPE（141～427位の残基）においてC末端から開始すると、DSP相同体は686～699位、636～646位、及び663～677位のDSP残基で繰り返される。さらに関連する2つの配列

DSSDSSDSNSSSDS

及び

10

20

30

40

DSSDSSDSSNSSDS

は、MEPEモチーフと80%の相同性を有し、DSPではそれぞれ576～589位と800～813位にこの配列が見られる。60%の相同性を有する同様のモチーフ

(DDSHQSDSHHSDESD)

はオステオポンチンにも見られ(101～116位の残基)、カゼインキナーゼIIのリン酸化部位は配列の同じ領域内に含まれている(図12)。X染色体性くる病では骨格カゼインキナーゼIIの活性が欠損している(Rifas, loc. cit.)。オステオポンチンのMEPEモチーフはC末端ではなくて中央にあるが、インビボでのオステオポンチンの分解は報告されているので、C末端に存在するMEPEモチーフのあるペプチドが産生されと考えられる(Smith, J. Biol. Chem. 271(1996), 28485-28491)。また、C末端MEPEモチーフとの配列の相同性は、DMA-1の408位～429位の残基

10

(SSRRRDDSSSESDSGSSSESDG)

にも見られる。DSSP、DMA-1、及びOPNにおけるMEPEモチーフとの部分的な配列の相同性は、図12の「ランビュウ (llanview)」統計プロットに図で表している。また表2ではアライメントにおける配列の類似性を示している。

【0 2 2 2】

【表2】

20

MEPE 対 DSSP

上の配列が MEPE である：

414 DSSESSDSGSSSES 427	(配列番号：7)
686 DSSDSSDSSSSSDS 699	(配列番号：13)
414 DSSESSDSGSSSES 427	(配列番号：7)
633 DSSDSSDSSSSSDS 646	(配列番号：13)

30

413 DDSSESSDSGSSSES 427	(配列番号：10)
551 DDSSDSSDSSDSSDS 565	(配列番号：14)
414 DSSESSDSGSSSES 427	(配列番号：7)
576 DSSDSSDSSNSSDS 589	(配列番号：15)

414 DSSESSDSGSSSES 427	(配列番号：7)
663 DSSDSSDSSSSSDS 677	(配列番号：13)

414 DSSESSDSGSSSES 427	(配列番号：7)
------------------------	----------

40

752 DSSESSDSSNSSDS 765 (配列番号：16)

414 DSSESSDSGSSSES 427 (配列番号：7)

800 DSSDSSDSSNSSDS 813 (配列番号：17)

MEPE 対 オステオポンチン:

上の配列が MEPE である

10

413 DDSSESSDSGSSSESD 428 (配列番号：11)

101 DDSHQSDSHHSDESD 116 (配列番号：18)

オステオポンチン 対 DSSP:

上の配列がオステオポンチンである

106 SDESHHSDESD 116 (配列番号：19)

638 SDSSSSSDSSD 648 (配列番号：20)

20

106 SDESHHSDESD 116 (配列番号：19)

846 SDSSDSSDSSD 857 (配列番号：21)

106 SDESHHSDESD 116 (配列番号：19)

857 SDSSDSSDSSN 878 (配列番号：22)

30

MEPE 対 DMA-1

MEPE が上の配列

408 SSRRRDSSSESSDSGSSSESDG 429 (配列番号：12)

443 SSRKEDSN-STESKSSSEEDG 463 (配列番号：23)

【0223】

40

興味深いのは、DSSPやデンティンフォスフォリン部位のC末端領域でモチーフの反復が存在することである。MEPEとDSSPとのドットマトリックス配列比較を、図13に高ストリンジエンシー及び低ストリンジエンシーにおいて表している。これはDSSPにおけるアスパラギン酸、セリンが豊富なMEPEモチーフの反復を図に表したものである。

【0224】

DPPは翻訳後に分解されたより大きいタンパク質、デンティンシアロリン酸タンパク質 (DSSP) からなっており、これが分解されてDPPとデンティンシアロタンパク質 (DSP) になる。MEPEとオステオポンチンには、デンティンフォスフォリン (DPP) とデンティンシアロリン酸タンパク質 (DSSP) の一部にかなりの相同配列がある。しかし、分子においてデンティンシアロタンパク質 (DSP) 部位とは相同性はない (図13)。注目すべきは、DPPと

50

MEPEにおけるRGDモチーフ、カゼインキナーゼIIリン酸化モチーフ、N-グリコシル化部位の配列が類似していることである（図13）。また、DSSPと関連するプロテインキナーゼCの部位はすべて、MEPEとの重複領域（デンティンフォスフォリン部位）に集まっているが、分子においてDSP部位にはそれは見られない。

【0225】

2. 二次構造：

GCGペプチド構造の予測される親水性／疎水性、抗原性、柔軟性は、図3～6に示す。これらの図は、一次アミノ酸配列のGCG構造の予測分析を示したものである。親水性と疎水性はそれぞれ三角と楕円で示してある。グリコシル化モチーフは382～386位の残基のところに棒のついた円で示している。図6ではグリコシル化の様子をさらに明らかにすることができる。タンパク質のターン（turn）はアミノ酸配列の一次構造を示す線の形で表している。αヘリックス構造、コイル構造、シート構造の領域は、部分的に波をつけた線（図7の詳細参照）で示してある。コンピューターによる予測はHGMP resource center Cambridge (Rice, 1995) Programme Manual EGCGパッケージのためのプログラムマニュアル(Cambridge, CB10 1RQ, England: Hinxton Hall) に基づいたGCGソフトウェアを使用した。目立つ構造としては、シスチン残基がなく、高度の親水性を有し、4ヶ所の低疎水性インデックス（48～53位、59～70位、82～89位、234～241位）を含むマイナーな部位を有する。antheorplotソフトウェアを用いた二次構造の予測からは、このタンパク質は膜を通過する性質を持たない。また、このタンパク質は抗原性と柔軟性が高い（図4と5）。全体的な二次構造の特徴から、細胞外で分泌されるタンパク質であることが示され、これは、推測されている分子の機能と一致している。図7はフォスファトニンのヘリックス構造、シート構造、ターン（turn）、コイル領域を示している。これは、antheplot v2.5eパッケージのガルニエ（Garnier）分析を用いて予測した結果に基づいたものである。それぞれのセクション（上と下）の4本の線はアミノ酸一次配列のヘリックス、コイル、シート、ターンと思われる個所を示している。下のグラフは同じデータをブロックの形状で表したものである。注目すべき点は、特にNH₂末端において、またC末端に向けてヘリックス構造が多く存在することで、これは機能をもった構造であると考えられる。

【0226】

実施例6

フォスファトニンとフォスファトニン断片の医学的用途

本発明に関するポリペプチドを使用した治療は、数多くの疾患治療に適している。

【0227】

X染色体性くる病（低リン酸血症）（HYP）：

X染色体性くる病は骨ミネラル代謝に関連する最も一般的な遺伝疾患の一つである（Rowe, 1997）。PHEXに分解されたフォスファトニン生物活性断片と非分解型ホルモンは、この疾患の治療において主要な役割を果たすと考えられる。本明細書に述べたクローン化されたタンパク質は、腎における同系の受容体との相互作用を果たし、その結果、腎Na依存性リン酸共輸体（NaPi）の発現の阻害、及び直接あるいは間接的な腎24ヒドロキシラーゼ発現のアップレギュレーションをおこすと推測される。さらに腎1αヒドロキシラーゼの発現のダウンレギュレーション（直接／間接）をおこすとも予測される。PHEXによる分解又は他の翻訳後修飾の後、ホルモンのペプチド断片誘導体は逆の生物活性（NaPiのアップレギュレーション、24ヒドロキシラーゼのダウンレギュレーション、1α-ヒドロキシラーゼのアップレギュレーション）をもつと推測される。他のペプチド誘導体でも本質的に異なる生物活性をもつ受容体リガンドの相互作用を仲介するが、RGD細胞接着残基（152～154位）を含む断片は、受容体の相互作用における役割を担うと考えられる。さらに、フォスファトニン誘導体は低ミネラル化による骨の損傷を正常に戻す重要な役割をもつ。これは、骨のミネラル化を仲介する骨芽細胞に変化をもたらし、骨ミネラルマトリックスタンパク質（オステオポンチン／オステオカルシン）の発現／リン酸化異常を正常に戻すことによっておこると推測される。RGD細胞接着配列とグリコサミノグリカン接着モチーフは、ヒドロキシアパタイトや骨ミネラルの機能をもった核形成や結晶化にとっても必要とされ得

る。

【0228】

成長障害はHYPの主要な特徴であるが、現在の治療法は最適ではない。フォスファトニン由来の断片を無機物のリン酸やビタミンDサプリメントのかわりに投与すれば、これを正常に戻すことができると考えられる。

【0229】

このように、フォスファトニンペプチド断片の有効な用途としては以下のようなものがあげられる。

1. 低リン酸血症の正常化 (NaPi、腎が望ましい)
2. 24ヒドロキシラーゼ、 1α -ヒドロキシラーゼの活性正常化 (腎)
3. 骨のミネラル化と骨の修復 (正常化／くる病予防)
4. 骨の疼痛症状を完全になくす
5. 成長障害の正常化

10

【0230】

腫瘍低リン酸血性骨軟化症 (OH0) :

OH0の臨床学的性質はHYPと同様である。腎からのリン酸漏出、低レベルの 1.25 ジヒドロキシビタミンD3 (カルシトリオール) の循環、アルカリフォスファターゼの上昇、成人における骨の低ミネラル化などが、骨の軟化 (骨軟化症) と血清中のリン酸低下として一般的に現れる。病理物理学的にはHYPとOH0は明かに重複している。くる病における欠陥は、機能しないPHWX遺伝子のためである。しかし、OH0ではプロセシングされないフォスファトニンの循環が原因である。腫瘍は発見が困難な場合もあり、切除するのは極めて難しく、また危険でもある。腫瘍の切除が進められないような場合には、リン酸代謝と骨のミネラル化の調節が重要となる。ホルモンを分解するために患者にPHEXを投与することは、他の循環ホルモンやタンパク質までもみだりに分解して影響を与える恐れがあるので危険である。その点、フォスファトニン断片は高い受容体親和性と生物活性をもつよう設計できるため、プロセシングされた循環している腫瘍由来のホルモンに効果的に競合する。

20

【0231】

その他のくる病又は低リン酸血症状:

HYPとOH0の他にもくる病の原因となるものは多数存在する。中でも一番多いのは、ビタミンDの異常であるが、他にも低リン酸血症、尿細管性アシドーシス、ある種の薬剤摂取、スプルー、膵嚢胞性線維症などの要因があげられる。フォスフォロニン断片や、フォスフロニン自体を用いることで、それらの疾患を治療できると考えられる。それらの疾患のうちいくつかを下記に簡単に (低リン酸血症をおこす疾患は、全体的なホルモンの使用により治療できる可能性がある) 論じる。

30

【0232】

・腎移植と腎性骨ジストロフィー (骨形成異常) :

腎移植による慢性症状は、腎からのリン酸漏出がすすみ (低リン酸血症)、骨のミネラル化に異常をきたすものである。フォスファトニン断片は、現在使用されている薬剤に伴う副作用をおこすことなく治療する効果がある。

【0233】

骨形成異常 (複合骨疾患) は通常、慢性腎不全 (腎疾患) によりおこる。腎不全は、透析をほどこさないと (腎疾患の末期) 死に至ると考えられる。しかし、通常、骨形成異常患者は透析治療を受けている。この「腎性骨形成異常」ともいわれる骨疾患は、患者に長期の血液透析を行うのが一般的である。ほとんどの患者における慢性腎不全では二次的に副甲状腺機能亢進がおこり、膵嚢胞性線維症が組織学的に見られるようになる。小児、特に非常に年齢が低い場合、この疾患の特徴として、成長障害や重篤な骨変形がおこる。腎性骨形成異常の病因は、リン酸の貯留 (高リン酸血症) と関係しており、カルシウムやカルシトリオール代謝に影響を及ぼす。さらに代謝的アシドーシス、サイトカイン、副甲状腺ホルモンの分解などによって骨形成異常がおこる。リン酸摂取を控えた食事、リン酸結合体、ビタミンD代謝活性剤の使用によって治療が行われる。本発明においては、プロセシ

40

50

ングを受けていないホルモンが血中リン酸レベルを制御する有効な手段であり、骨疾患の治癒に結びつくと考ええる。腎や組織中にフォスファトニン受容性が発現すれば、末期の腎疾患（つまり腎機能を完全に失った）患者の治療法が存在する可能性がある。

【0234】

・骨粗鬆症／骨ミネラル損失：

閉経後の女性は骨ミネラルが不足しがちで、その結果、正常な骨格にダメージを与えやすい。原因は明らかではないが、遺伝的要素と環境的要素の相互関係によるものと考えられている。現在の研究では、骨粗鬆症のような多要因疾患を分析するために、統計モデルを整理することに焦点が集まっている。

【0235】

フォスファトニン誘導体断片を使用することで、骨ミネラルの損失を逆転させ、この疾患を治療できると考えられる。さらに、生物活性ペプチドは、その作用をより可能性が高く、より特異性の高い形に改変することが可能である。

【0236】

・骨のパジエット病：

パジエット病は、骨の再構築が非同調的になるためにおこる。骨のミネラル化（骨芽細胞によって媒介される）や、骨の再吸収（破骨細胞によって媒介される）は段階的でなくなる。破骨細胞による過剰な再吸収活性がおこり（特に初期の再吸収段階において）、骨髄は線維組織と組織化されていない小柱におきかえられる。原因は特定できないが、フォスファトニンのペプチド誘導体を投与することで、この疾患を治療できると考えられる。

【0237】

・腎以外の組織におけるNaPi障害に関する疾患：

ナトリウム依存性リン酸共輸体（NaPi）は、腎以外にもさまざまな組織中に発現する。NaPiには3つのタイプがあり、タイプI、II、IIIについては、本明細書のかかなり前の方で述べている。この3つのタイプはいずれも腎に発現すると言われる。腎以外の組織には、タイプIIIがユビキチン化して発現すると言われ（Murer, Eur. J. Physiol. 433 (1997) 379-389 ; Kavanaugh, Kidney Int. 49 (1996) 956-963）、タイプIは腎の他に肝臓と脳に発現することが確かめられている（Hilfiker, PNAS 95 (1998), 14564-14569）。一方、タイプIIは腎の近位尿細管においてのみに発現すると考えられている。

【0238】

近位尿細管は上記3タイプすべてを発現することがわかっているが、タイプIIが、この部位におけるリン酸再吸収に最も大きな役割を果たしていると考えられている。これはタイプII NaPiをコードする遺伝子（Np+2という）を不活性化した、ノックアウトマウスの実験で証明された。ホモ接合変異体（Np+2-/-）は、尿中リン酸排泄量の増加、低リン酸血症、血清1, 25-ジヒドロキシビタミンD濃度の上昇、その他、高カルシウム尿症（HHRH）を伴う遺伝性低リン酸血性くる病の典型的な症状を示した（Beck, PNAS 95 (1998), 5372-5377）。哺乳類では、リン酸恒常性の調節が腎で行われるため、この実験結果は、全身におけるリン酸恒常性において、3つのタイプのうちタイプIIが最も重要な役割を果たしていることを示す。実施例において、CL8細胞株の結果と合わせると、腎中のフォスファトニンによって調節されるNaPiは明らかにタイプIIであることが示唆される。

【0239】

腎不全患者の最も大きな臨床学的問題の一つは、高リン酸血症である。そのような血清リン酸過剰を制御できれば、臨床学的に非常に有意義なものとなる。したがってNaPiをダウンレギュレートし、血清リン酸レベルを低下させることができるフォスファトニン、その断片あるいは誘導体はとても価値のある可能性を有している。腎不全が進行した患者（いわゆる腎疾患末期＝ESRDより以前）においては、フォスファトニンによって腎内のNaPi発現がダウンレギュレーションされることが大切である。

【0240】

しかし、ESRD段階に到って主要な腎機能を失ってしまうと、糸球体からリン酸が排泄されなくなり、フォスファトニンは腎の中で作用部位を失ってしまう。そのような疾病の段階

10

20

30

40

50

では、食事による消化管からのリン酸吸収を制御すれば、効果があがると考えられる。消化管、特に腸管は、食事で摂取されたリン酸が体内の血中循環系に取り込まれる唯一の器官である。このように、腎機能を失ったあとでも血中循環系に取り込むリン酸を調節することが次の大きな標的である。

【0241】

タイプII NaPiのサブタイプ、タイプIIbは、マウスの腸管でクローニングされることが報告された。(Hilfiker, PNAS 95 (1998), 14564-14569)。フォスファトニンが腸のタイプIIb NaPiに作用することは既に知られているが、さらにこのタイプIIb NaPiが腸管において、食事からのリン酸吸収に主要な役割を果たしていることが期待され、フォスファトニンがそのアップレギュレーションとダウンレギュレーションの重要な因子である可能性を有している。

10

【0242】

実施例7

薬学的組成物

薬学的組成物については、本発明によるポリペプチド、そして適宜に、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、又は担体を製剤化する。このような組成物における化合物のそれぞれの正しい特性や用量については経験的に決定してもよく、かつ組成物の投与経路によって決められるべきものであると思われる。患者への投与経路には、経口、経頬、舌下、局所（経眼を含む）、直腸、膺、鼻腔、非経口（静脈内、動脈内、筋肉内、皮膚下、関節内を含む）などがある。好ましくないタンパク質分解をさけるためにも非経口投与が望ましい。

20

【0243】

本発明分子の適切な投与量は、治療する疾患や障害、投与経路、治療を受ける患者の年齢や体重などの要素によってさまざまである。非経口投与の例をあげると、典型的な成人の治療には、本発明の分子、 $0.1\mu\text{g}$ ～ 1.5mg/kg /日用量における投与が適していると考えられる。さらにいえば、 $1\mu\text{g}$ ～ $150\mu\text{g}$ が最適である。したがって、活性ポリペプチド成分は、ヒト成人の1日量として 0.01 ～ 100mg 、一般には 0.1 ～ 10mg を投与すべきであると考えられる。

【0244】

非経口投与の場合の組成物における例は、通常、適切な担体に溶解した分子溶液、好ましくは水性の担体を用いる。水性担体は、水、緩衝液、 0.4% 食塩水、 0.3% のグリシン等、さまざまである。それらの液体は、あらかじめ滅菌し、凝固物やその他の粒子を取り除いておく。薬学的に許容される緩衝液はpHを調整し、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどの毒性を変性させるために含まれる。それらの製剤における分子濃度は、広い範囲にわたってさまざまであり、例えば、重量で 0.5% 以上、 15 ～ 20% までである。この濃度については、当業者によって正しく選択されるべきである。

30

【0245】

一般的な薬学的組成物における例は「レミントンの薬化学 (Remington's Pharmaceutical Science)」、第15版、Mack Publishing Company、Easton、Pennsylvania (1980)に詳しく述べられている。例をあげると、注射のための薬学的組成物は、 1ml の滅菌緩衝液と 50mg の分子が含まれるように製造される。点滴注入用の典型的な組成物は、 250ml のリンゲル液と 150mg の分子が含まれるように製造される。実際にこの組成物を調製する方法は当業者に既知である。ポリペプチドの医薬用途としての製剤化や投与方法については、当業者に既知であり、ゴッダード (P. Goddard)、最新の薬剤送達の総説 (Advanced Drug Delivery Reviews)、6 (1991) 103～131による例も論じられている。

40

【0246】

実施例8

フォスファトニン (MEPE) の特徴付けとそれをコードする遺伝子
腫瘍性骨軟化症患者 (BD、ND、EM、及びDS) の臨床プロフィール：

50

患者BDは先に公表された論文に記されており (Rowe, Bone 18 (1996), 159-169)、患者NDについての報告も既に公開されている (David, J. Neurosurg. 84 (1996), 288-292)。両方とも古典的な腫瘍性骨軟化症の患者で、血中にリン酸濃度の低下、放射線医学的骨軟化症、及び血中1.25ビタミンD3低下の症状が見られた。患者BD (44歳、女性) と患者ND (66歳、女性) はそれぞれ、左鼻腔の腫瘍 (血管外皮細胞腫)、頭蓋骨内腫瘍 (腫瘍様の間葉血管細胞腫) を摘出した後、症状が著しく軽減した。患者NDは20年間でそのような手術を3回受け、手術の度ごとに寛解が見られた。

【0247】

腫瘍馴化培地：

患者BD、ND、及びEMの腫瘍試料は切除後すぐに集められた。試料は～1mm大に切断され、一部は液体窒素で凍結された。残った腫瘍組織片は前章で述べたように組織培養をおこなった (Rowe, Bone 18 (1996), 159-169)。簡単に述べると、試料はコラーゲナーゼで一晩分解され、血清が含まれる培地と含まれない培地を用い (DME培地)、異なるサイクルの培養をおこなった。患者NDについては、硬膜下周辺からの試料と、硬膜が収集され、上記と同様の処理が施された。さらに患者BDからは、腫瘍切除と同日に、対照の皮膚線維芽細胞培養物も得て、腫瘍試料と同様の処理が施した。患者BDから収集した試料には次のようなラベルがつけられた。1：腫瘍馴化培地 (TCM-BD)；2：皮膚馴化培地 (SCM-BD)。患者NDから収集した試料には次のようなラベルがつけられた。1：腫瘍馴化培地 (TCM-ND)；2：硬膜下馴化培地 (SDCM-ND)；3：硬膜馴化培地 (DCM-ND)；4：頭蓋内腫瘍周辺液 (FST-ND)。本明細書において、特に上記の略語に「血清を加えた」という付記がない限り、すべての試料は血清を加えないDMEM媒液中で増殖した細胞から採取されたものであることを示す。

【0248】

TCMにおけるコンカナバリンA親和性クロマトグラフィー：

患者NDから採取した腫瘍馴化培地 (TCM) は、実施例1にしたがってコンカナバリンA親和性クロマトグラフィーにかけ、高親和性分画と低親和性分画 (それぞれHCA、LCA) の分離をおこなった。HCAとLCAのどちらの分画も α -メチル-D-グルコピラノシド (0.5M) 溶出緩衝液とともに溶出された。簡単にいうと、コンカナバリンA親和性クロマトグラフィーを用いて、TCMの部分精製をおこなった。方法は、(Wagner, Gen. Comp. Endocrinol. 63 (1986), 481-491) に記されている手順を改変した。20%のエタノール中のコンカナバリンAセファロース (ファルマシアコード番号：17-0440-01、14ml) は、はじめに数カラム容量の水で洗い流し、次に泳動緩衝液 (CRB；0.06Mリン酸ナトリウム pH7.2と0.5M塩化ナトリウム) で平衡化した。次に平衡化されたスラリーを、12mm x 115mmのファルマシアスクリュートップカラムに加え、カラム3容量の泳動緩衝液を0.4ml/分の流出量で加えた (FPLC/HPLC millennium Watersクロマトグラフィーシステム)。CRB緩衝液 (10ml) の中で平衡化された馴化培地をカラムに加え結合させた。続いて数カラム容量のCRB負荷緩衝液で洗い流し、リン酸ナトリウム溶出緩衝液 (ERB；60mM pH7.2/0.5MのNaCl/0.5Mの α -メチル-D-グルコピラノシド/0.01%のアジ化合物) を0.2ml/分 (40ml) の流出量で加えることで、結合タンパク質が溶離された。ERB緩衝液中で一晩インキュベートして高親和性タンパク質を溶離し、続いて2度目のERB緩衝液処理を0.2ml/分の流出量でおこなった。高及び低コンカナバリンA親和性TCMタンパク質の溶出特性は等しく、カラムの量が～1.6のときに左右対称の単一のピークを示した。LCAのピークは、HCAのピーク全体の1/3を表し、1 μ gのHCA物質が、患者NDの10mlの腫瘍馴化培地 (TCM) から採取された。

【0249】

TCMとコンカナバリンA分画のSDS-PAGE：

腫瘍馴化培地、馴化培地、及びコンカナバリンAのピーク (HCAとLCA) はSDS-PAGEによって分離され、Sybr-オレンジ染色法で画像化された。Novex NuPAGE (商標) 電気泳動システムを用いて、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこなった。これは4～12%のビス-トリスアクリルアミド勾配ゲル (pH6.4) と、MOPS-SDS (50mMの3-[N-モルホリノ]プロパンスルホン酸；50mMのトリスベース；3.5mMのSDS；1.0mMのETDA；pH7.7) 泳動緩衝液で構

成される。200V一定で50分間の電気泳動をおこなった。NuPage LDS検体緩衝液（10%のグリセロール；1.7%のトリスベース；1.7%のトリスHCl；2%のリチウムドデシル硫酸；ジチオトレイトール50mM；0.015%のEDTA；0.075%のセルバブルーG250；0.025%のフェノールレッド；pH7.5、最終濃度）の中に入れて70℃、10分間で変性させた。製造者のすすめに従って、NuPage抗酸化薬を電気泳動チャンバーの上方に加えた。電気泳動に続けて、SYPRO-オレンジを加えた7.5%の酢酸の中でゲルをインキュベートするとタンパク質が染色された。バイオラッド蛍光画像（Bio-Rad FluorImager）ゲル画像化システムを使ったUV照射により、タンパク質の視覚化をおこなった。HCA及びLCA分画を染色した。それぞれ同一の性質を示し、56kDa及び200kDaの2つのタンパク質が染色された。患者NDの頭蓋内腫瘍、硬膜下（患者の腫瘍に隣接している）、及び硬膜物質から摂取した馴化培地には、～50kDaから80kDaの長さにはわたる多数のバンドが含まれていることがわかった。主要なバンドを見ると、すべての検体で～66kDaに脆弱なバンドが存在し、腫瘍と硬膜下の試料では～200kDaに高分子量の抗生物質が観察された。腫瘍材料における～200kDaの強度が最も高く、硬膜には存在しなかった。腫瘍と硬膜下では55～60kDaに拡散したバンドが見られたが、硬膜馴化培地（患者ND）には存在しなかった。皮膚馴化培地と対照群培地では、タンパク質の染色は見られなかった。患者BDとEMの馴化培地は、200kDaに高分子量タンパク質が存在しなかったことを除けば同じ性質を示した。患者LAと患者SLに由来するリン酸尿症でない、腫瘍組織及び皮膚の対照群のすべてに66kDaバンドと、50～60kDaにおける拡散した染色が見られた。コンカナバリンA親和性のピークHCAとLCAでは、高分子量の200kDaのバンドに富んでおり、さらに50～60kDaの範囲のタンパク質が含まれていた。骨細胞株H TB96とSaOs2由来の馴化培地のタンパク質性質は、OHO患者NDから摂取した腫瘍馴化培地とほぼ同じであった。SaOs2における200kDaのバンド強度は、患者NDの脳腫瘍、患者NDの硬膜下由来のTCMやHTB96のCMより低かった。

【0250】

TCM及び精製断片の免疫ブロット法と糖タンパク質染色法：

ウェスタンブロットを行うために、サブマリン電気泳動を用いてタンパク質をPVDF膜に転写させた（Amersham）。SDS-PAGE電気泳動をおこなった後、ゲルを転写緩衝液（25mMのトリスHCl、0.38Mのグリシン、0.2%のSDS（TB））の中に入れ、室温で1時間おいて平衡化した。PVDF膜を適当な大きさに切断し、メタノールですばやくすすいだ後に滅菌した水で洗浄し、TBに入れて平衡化した。平衡化したゲルとPVDF膜をフィルターの間にサンドイッチ状にはさみ、カセットに設置した。TB緩衝液を入れたHoefferシステムサブマリン電気ブロッティング装置にカセットを設置し、サーモクーラーで4℃に維持して冷却した。サンドイッチ状のPVDF端を陽極に置き、45分間連続して、0.4A（45V）の電気泳動をおこなったところ、タンパク質が転写された。増感化学発光（Enhanced-Chemiluminescence）キット（Amersham；ECL+）又はカルモジュリン親和性検出キット（Stratagene）それぞれに記述されている方法を用い、pre-Anti-op 抗血清、post-Anti-op抗血清、又はアルカリフォスファターゼ結合カルモジュリン液を1000倍に希釈し、ブロットをスクリーニングした。化学発光を検出し、バイオラッド蛍光画像化システムを使って撮影を行い、かつ先にクローン検出で述べた比色定量システム（Stratagene）を用いてカルモジュリン親和性結合を視覚化した。転写と分子量の測定のための標準として、ビオチン化分子量マーカー（Amersham）を使用した。化学発光によるビオチン化マーカーの視覚化を容易にするために、セイヨウワサビペルオキシラーゼ（HRP）と結合させたストレプトアビジンを、二次抗体に加えた（ヤギ-抗-ウサギのIgGをHRPと結合）。

【0251】

OHO患者由来のリン酸尿症腫瘍馴化培地（TCM）をウェスタンブロットから、事前処理した手術前抗血清をスクリーニングした際に明らかな化学発光バンドが見られた。リン酸尿症でない腫瘍、皮膚組織対照群、培地対照群を同じように事前処理した手術前抗血清でスクリーニングした場合には、すべて陰性であった。さらに、手術後抗血清でスクリーニングした場合には、TCMも馴化培地もすべて陰性であった。

【0252】

事前処理した手術前抗血清で、患者ND由来のTCMタンパク質、骨肉腫細胞株HTB96、及びSaOS2をスクリーニングしたことによって、～54kDaから57kDa及び～200kDaの位置に明白な免疫陽性バンドがあることが判明した。患者NDの腫瘍試料と隣接した硬膜下組織は、硬膜-脳試料の馴化培地に比べて、54～57kDaでより強いシグナルを発した。硬膜馴化培地では、200kDaのバンドの染色は見られなかった。HCAとLCAコンカナバリンA分画はどちらも200kDaのバンドで強いシグナルを示し、54～57kDaでは、微弱ではあるが目に見えるシグナルをとらえた。SaOS2とHTB96細胞株も同じバンドにおいて陽性を示したが、SaOS2馴化培地では200kDaにおいて、TCMやHTB96に比べてシグナルが弱かった。

【0253】

患者NDと患者BD由来の皮膚馴化培地と培地対照群を手術後抗血清でスクリーニングしたところ陰性であった(Rowe, Bone 18 (1996), 159-169)。組換え切断型MEPE(切断型rec-MEPE)を事前処理した手術前抗血清で陽性に染色したが、これは切断型rec-MEPEを加えた場合に可能となる。54～57kDaのバンドはSybr-オレンジ染色タンパク質で陽性であることが確かめられ、事前処理した手術前抗血清は切断型rec-MEPEをスクリーニングした。これは55～57kDaのバンドと同じ大きさであり(事前処理した手術前抗血清のウェスタン法でスクリーニング)、患者NDの腫瘍馴化培地と骨肉腫細胞株HTB96とSaOS2に見られた。切断型rec-MEPEのN末端には付加的な4.5kDaCBPタグがついている。これによって移動率が減少し、その結果SDS-PAGEゲルにおける分子量が明らかに増加している。このように等価のサイズの腫瘍由来タンパク質と切断型rec-MEPEは、腫瘍由来MEPEに翻訳後修飾を起こしていると考えられる(グリコシル化の可能性が大きい)。

【0254】

OH0腫瘍患者BDとEMのTCMをウェスタンブロットしたところ、多少分子量の低い位置に(48～52kDa)事前処理した手術前抗血清に対して陽性のバンドが見られ、同時に55～57kDaに、切断型rec-MEPEと共に移動するバンドが見られた。それ以外の高分子量のバンドは、61kDa、75kDa、80kDa、及び93kDa(シグナルは弱い)で見られた。

【0255】

事前処理した手術前抗血清でスクリーニングしたところ、すべての試料で66kDaのSYBR-オレンジ染色タンパク質バンドが陰性であった。重複ブロットにおける糖タンパク質スクリーニングは、事前処理した手術前抗血清のスクリーニングと同じ結果であり、54～57kDaと200kDaのどちらもバンドが陽性に染色され、これらのタンパク質がグリコシル化されていることを示した。タンパク質をSDS-PAGEで分離して、先に述べた方法でPVDF膜にブロッキングした。糖タンパク質を検出するための免疫ブロットキット(Bio-Rad)を用いて糖タンパク質を特異的に検出した。内部の対照にはアマシャム社(Amersham)のビオチン化マーカーを加えて使用した。簡潔にいうと、転写後の膜を10mMの過ヨウ素ナトリウムを酢酸ナトリウム/EDTA緩衝液で処理し、炭化水素分子を酸化させた。次にブロットをPBSで洗浄し、ナトリウム/酢酸/EDTA緩衝液に入れ、室温で60分間インキュベートして、ハイブリダイズさせた。続いてフィルターをTBSで3回洗浄(10分)した。増感化学発光(Enhanced Chemiluminescence)キット(Amarsham)とストレプトアビジン、セイヨウワサビペルオキシダーゼを用いて、先に述べたようにブロッキングと検出をおこなった。一次抗体とヤギ-抗-ウサギ-HRP二次抗体は使用しなかった。

【0256】

結果として、事前処理した手術前抗血清は、腫瘍性低リン酸血性骨軟化症-TCM由来のタンパク質を特異的に検出した。主要なタンパク質は、2～3の限定された分子量、48～52kDa、54～57kDa、200kDaで検出された。OH0-TCM試料はすべて54-57kDaのタンパク質で陽性を示し、事前処理した手術前抗血清が検出したすべてのタンパク質は、糖タンパク質の状態を調べるスクリーニングで陽性に染色された。OH0腫瘍でない組織対照培地を事前処理した手術前抗血清でスクリーニングしたところ、陰性であった。

【0257】

実施例9

pCAL-n-EKベクター由来の切断型MEPE融合タンパク質発現

10

20

30

40

50

切断型MEPEの配列をコードしている完全なcDNAを例4に述べたようにpCAL-n-EKにサブクローニングした。手術前抗血清とアルカリフォスファターゼに結合させたカルモジュリンで先に記したようにウェスタンブロットによるスクリーニングをおこない、大腸菌宿主BL21 (DE3) のIPTG導入が産生された融合構築物を確認した。カルモジュリンペプチド、エンテロキナーゼ部位、トロンビン部位を含み、微生物性CBPタグをもつ融合タンパク質 (4.5 kDaのカルモジュリン結合ペプチド) が、SDS-PAGEによって56kDaであることが予測された。これは予想していた分子の大きさとほぼ一致している (~48kDa)。タンパク質の精製は先に述べたようにカルモジュリン親和性クロマトグラフィーでおこなった。精製された融合構造を持つインキュベーション前の手術前抗血清をTCMウェスタンブロットでスクリーニングしたところ、55~57kDaで微弱なシグナルが観察されたが、200kDaのバンドは見られなかった。55~57kDaのシグナルが完全に消えなかったのは、抗体性の高いグリコシル化部分が未完成のMEPEタンパク質 (TCN) に存在し、rec-MEPEの微生物融合構築物には存在しなかったためと考えられる。融合タンパク質は水性のトリス緩衝液に溶解した。界面活性剤は精製プロセスのどの段階においても用いなかった。

【0258】

実施例10

組織発現 (RT/PCRとノーザンブロット分析)

ポリA+RNAを含むノーザンブロットにおいてMEPEcDNAをスクリーニングしたが、胃、甲状腺、脊髄、リンパ節、気管、副腎腺、骨髄、心臓、脳、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓へのハイブリダイゼーションは検出されなかった (Clontech MTNブロットI及びIII)。ノーザン分析を行うために、次の1~15のポリA+RNAを含む、2つのブロット (MTN (商標); とMTN (商標); III) をクロンテック社 (Clontech) から得た。1. 心臓、2. 脳、3. 胎盤、4. 肺、5. 肝臓、6. 骨格筋、7. 腎臓、8. 脾臓、9. 胃、10. 甲状腺、11. 脊髄、12. リンパ節、13. 気管、14. 副腎腺、15. 骨髄。そしてそれらを特異的な内部プライマー (Pho433-111FとPH0877-111R) で増幅したMEPE cDNAを使ってスクリーニングをおこなった。Pho433-111FとPH0877-111Rのプライマー配列は図8に強調して示している (核酸の位置はそれぞれ433~456位 (配列番号: 24) と877~900位 (配列番号: 25) である)。また、使用したPCR条件は次の通りである。変性前処理: 95°Cで3分; 続いて95°Cで45秒間の変性処理、65°Cで30秒のアニーリング、72°Cで45秒の重合を30サイクル; 72°Cで7分の最終伸長; そして4°Cまでの冷却。PCR緩衝液 (PB) は、最終濃度が2mMのMgCl₂を使用した。次に444bpに増幅したMEPEcDNAを、アガロースを用いたサブマリン電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色で視覚化し、ガラスビーズを使って精製した (Gene-cleanIIキット; Bio 101 INC)。精製したDNAはアマシャム社のメガプライム (Mega Prime) ラベリングキットと結合させた α P³² dCTP (3000 ci/mmol) を使って放射線標識をつけた。5×10⁹cpm/μgの特異的な活性が繰り返し得られた。ブロットにおけるハイブリダイゼーション (60°C) とプレハイブリダイゼーション (60°C) は、既に公開されている方法を用いておこなった (Rowe, Hum. Genet. 97 (1996), 354-352)。そして次のストリンジェンシーで洗浄した。1; 2×SSC 0.1% SDS中で、室温で30分2回洗浄、0.1×SSC 0.1% SDSに入れ、60°Cで30分2回洗浄。-80°Cで7日間フィルターをフィルムに露出し、フィルムを現像した。副腎腺、脳、十二指腸、心臓、腎臓、肝臓、肺、皮膚、脾臓、胸腺、甲状腺、扁桃腺由来のヒトRNAについては、RT/PCRとMEPE特異的プライマーを使った増幅を行わなかったが、cDNAテンプレートをを用いた発現検査では、脳、腎臓、肝臓、及び脾臓に低レベルの発現が確認された。この実験のために、以下のヒト組織から総RNAを取り出した。1. 胸腺、2. 脳、3. 精巢、4. 十二指腸、5. 心臓、6. 皮膚、7. 肝臓、8. 扁桃腺、9. 脾臓、10. 甲状腺、11. 副腎、12. 肺、13. 腎臓、14. OH0腫瘍組織、14. ヒト一次骨芽細胞。ラット一次骨芽細胞からも総RNAを抽出した。前述のMEPE内部プライマー (Pho433-111FとPH0877-111R) を使用し、逆転写酵素-PCRとperkin Elmer-Roche RNA PCRキットを用いて総RNAをコピーした。簡単に言うと、1μgの総RNAを、10mlのトリスHCl (pH8.3)、50mMのKCl、5mMのMgCl₂、1mMのdNTPs、1単位/μlのリボ核酸阻害剤、2.54単位/μlのMULV逆転写酵素、0.75μMの下流プライマー (PH0877-111R) の溶液20μlに入れて溶解した。そしてその混合物を37°C

10

20

30

40

50

で10分間インキュベートした。次に、上流プライマー（Pho433-111F）とdNTPs、MgCl₂、及びAmpliTaq DNAポリメラーゼを、最終濃度がそれぞれ0.15 μM、200 μM、2mM、2.5単位／100 μlで総量が100 μlになるように加えた。Perkin Elmerサーモサイクラー（システム9700）を以下のプログラムにセットし、PCRをおこなった。95℃で3分の変性前処理；続いて95℃で45秒の変性、65℃で30秒のアニーリング、72℃で45秒の重合を35サイクル；72℃で7分の最終伸長；そして4℃になるまでの冷却。アガロースゲルを用いて増幅された物質を分離し、サザンブロットで確認した後、配列決定した。OHOではない腫瘍（乳癌、肺癌I、結腸腺癌I、肺癌II、前立腺癌、結腸腺癌II、卵巣癌、膵臓癌；（Clontechヒト腫瘍パネル#K1422-1）に由来するcDNAの標準パネルは、結腸腺癌、卵巣癌、及び前立腺癌でそれぞれ低レベルの発現が見られたのを除き（放射線標識をしたMEPEcDNAでRT／PCR増幅産物をサザン法でスクリーニングした後検出された）、すべてMEPE PCRが陰性を示した。それとは全く対照的に、BD、DM、EM、DSの4患者由来のOHO腫瘍の増幅ポリA+RNAを、MEPEプライマーを用いてRT／PCRにかけたところ、高レベルの発現が確認された（グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ及びトランスフェリンに対し標準化）。リン酸尿症ではない腫瘍、OHO患者由来の対照組織（皮膚と腫瘍に隣接した材料）、CL8ヒト腎細胞株、ヒト一次骨芽細胞（Clontech社のH-OSTから購入、材料参照）のポリA+RNA、並びに線状脂肪母斑症候群の患者から採取した腫瘍ポリプ由来のポリA+RNA（ポリプのTCMはヒト腎細胞株CL8においてリン酸摂取を阻害しなかった）は、MEPE特異的プライマーを使っても増幅しなかった。クロンテック社から購入した心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、及び膵臓（ヒトパネルI#K1420-1）由来のcDNAをMEPEプライマーPCRのテンプレートとして使用したところ、脳、肝臓、肺、及び膵臓に低レベルの発現が確認された。MEPEプライマー増幅バンドについて配列決定したことで、MEPEcDNAと完全に相同であることがわかった。また、MEPEcDNAで増幅バンドをサザンスクリーニングしたことによって、配列決定を確認した。全てのOHO患者由来のOHOテンプレートポリA+RNAは一貫して、予測された480 bpのバンドと190bpの低い位置のバンドを増幅した。上の方のバンドは、配列決定とサザンオートラジオグラフィーによって、MEPE配列と完全に相同であることが確認された。そして低い位置のバンドはMEPE誘導体であることがサザン分析で確認された。正常組織やOHOではない腫瘍における低レベル発現では、この低い位置のバンドは現れなかった。これは、選択的スプライシングが腫瘍由来のMEPEにおいて役割を果たすことを示している。すべてのRT／PCR実験及びPCR実験は、G3PDHとトランスフェリンに対して標準化した。

【0259】

要約すると、MEPEの高レベル発現（mRNAレベルで測定）はOHO腫瘍試料においてのみ見られ、非常に低レベルの発現（異所性の可能性が高い）は、脳、肝臓、腎臓、及びOHOでない腫瘍11のうち3つの試料で見られた。11の腫瘍のうち8つの腫瘍では、MEPE mRNA発現について陰性であった（RT／PCR）。結果はすべてGA3PDHとトランスフェリンRT／PCRプライマーに対して標準化した。

【0260】

実施例11

サザン分析（ゲノムブロット）

常染色体性くる病（Rowe, Hum. Genet. 91(1993), 571-575）ファミリー由来の固定化されたDNA、並びにPstI、EcoRI、PvuII、及びMspIそれぞれに消化された固定化されたDNAを含むゲノムブロットを、先に述べたように放射線で標識したMEPE cDNAを用いてスクリーニングした。サザン分析は、前述の、血液から抽出したDNAのゲノム消化（Rowe, Hum. Genet. 93 (1994), 291-294）を用いておこなった。PstIのブロットにより、スクリーニングされた16のファミリーのメンバーの1つにおいて、11kbのバンドと4kbの多形性のバンドがあることがわかった。EcoRI、PvuII、MspIのブロットではそれぞれ、6kb、6.5kb、及び4kbの陽性の単一のバンドが示され、遺伝子のヒト起源が確認された。遺伝子の情報が不足しているため、この常染色体性くる病ファミリーにおける疾患が遺伝子によって分離されているかどうかは推測不可能であった。

【0261】

実施例12

ヒト腎細胞株CL8におけるリン酸摂取：TCMとMEPE投与

リン酸とグルコースの摂取実験は、前に述べたようにヒト腎細胞株（CL8）でおこなった（Rowe, Bone.18 (1996), 159-169）。簡単にいうと、細胞を定義された培地（DM）に入れ、24ウェル平底組織培養プレート（Falcon 3047）中で、混合又は一晩培養した。次にそのDMを、精製した融合タンパク質又はコンカナバリン親和性の精製TCMを加えた新しいDMと交換し、37℃で一晩置いた。そして P^{32} と C^{14} メチルグルコースの摂取量を測定した（Rowe, Bone.18 (1996), 159-169）。

【0262】

ヒト腎細胞株にTCM（1/20希釈液）を加えると、以前に報告されたように、Na⁺依存性リン酸摂取が大きく減少した（Rowe, Bone.18 (1996), 159-169）。これも以前に報告されたように、インキュベーション前の手術前抗血清を加えたTCMではこの阻害が防止されたが、手術後抗血清の場合は防止されなかった（Rowe, Bone.18 (1996), 159-169）。高親和性及び低親和性コンカナバリンA精製分画（それぞれHCAとLCA）を40ng/mlの濃度で加えても、Na⁺依存性リン酸摂取（NaPi）の阻害が起こった。TCMとコンカナバリンA分画のどちらにおいても、阻害はリン酸摂取にだけ起こり、Na⁺依存性 α メチルグルコースの摂取には影響が現れなかった。すべての場合において、その影響の大きさは投与量と関係していた。

【0263】

カルモジュリン親和性クロマトグラフィーを使って精製した切断型MEPE融合タンパク質を用いて、同様の実験をおこなった。切断型rec-MEPEはNa⁺依存性リン酸共輸送を阻害しなかったが、投与量に応じてリン酸摂取量が増加した（表24参照）。1000ng/mlでは2倍のリン酸摂取量が観察された（ $p < 0.001$ ）。これらの実験によって、切断型MEPE融合タンパク質は、ヒト腎細胞株CL8におけるNa⁺依存性リン酸共輸送を特異的に促進することが確認された。

【0264】

実施例13

フォスファトニンタンパク質のN末端をコードするcDNAのクローニング

実施例4において記述した λ ZAPIIユニライブラリを、フォスファトニンタンパク質の付加的N末端をコードするcDNA断片をクローニングするために用いた。実施例4に記載した λ ZAPIIライブラリ5 μ lを、以下の成分からなる基質（全体で100,000ブランク形成単位）として総量50 μ lを用いた：10mM トリス塩酸pH8、50mM KCl、200 μ M dNTPs、2.5mM MgCl₂、1 μ M GSP2プライマー

(5' TCTTCCCCCAGGAGTTTAATC 3' 配列番号：28)

1 μ M T3 λ ZAP II特異的プライマー

(5' ggc cgc aat taa ccc tca cta aag g 3' 配列番号：29)

及び2.5単位プロメガTaqポリメラーゼ。PCR増幅／サーモサイクリングは以下の通りであった：94℃を2分間、94℃を30秒間、63℃を1分間、72℃を50秒間を30サイクル行った後、72℃を10分間、そして4℃まで冷却した。ジーンアンプパーキンエルマーサイクラー9700を用いた。次に、増幅したPCR産物を、トリス酢酸緩衝液中での従来のサブマリンヌシーブ（Nusieve）アガロース電気泳動を用いて分離した。次に、DNAバンドをUVdで可視化して、インビトロゲン社のTAベクターpCR2.1に直接ライゲーションした（インビトロゲン社の方法を用いた）。次に、従来の技術及びストラタジーン社によって記載されるコンピテント細胞を用いて、ライゲーションした分子を大腸菌XL1 blue-mrf（ストラタジーン細胞）に形質導入した。従来の自動シークエンシング（ABI）とベクター及びインサート由来のプライマーとを用いて、シークエンシングした。インサートは、配列番号：26の1～549位のヌクレオチドを含み、このように、図8のヌクレオチド配列（配列番号：1）の5'末端と3'末端で約215ヌクレオチドの重なりを含んだ。併せると、配列番号：26及び27にそれ

10

20

30

40

50

それぞれ完全なフォスファトニン分子をコードする完全長のcDNAが確立された。これは、新しい配列

(5' CAC ACA GCT TTG CTT AGT TTT CTC 3' 配列番号：30)

に対するプライマー（PEP）を用いて、～150bp産物を生成するプライマー伸長実験によって確認され、146bp伸長産物が予想された。このように、これは完全なcDNAに非常に近い。表1における部分的アミノ酸配列についてこれまで同定されたモチーフを含む完全なフォスファトニンタンパク質の一次構造と共に、タンパク質のN末端における付加的な構造を図15に示す。

【0265】

例えばN末端及び選択的に完全なフォスファトニン分子及びその相補鎖をコードするポリヌクレオチド、同様に配列番号：28又は30のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーをコードするポリヌクレオチド等の新しい配列データは、適当なライブラリからのプロモーター配列を含むフォスファトニンのゲノムクローンを同定及び単離するために特に適している。

【0266】

実施例14

完全長のMEPEによるヒト腎細胞株CL8：TCMにおけるリン酸の取り込み

細胞に完全長のMEPE（フォスファトニン）をコードする配列を形質導入することを除いて、実施例12に記載した技法プロトコールに従った。完全長のMEPEは昆虫細胞株に形質導入して、発現させた。発現されたフォスファトニンポリペプチドを昆虫細胞培地に排泄させて、その有無を、上記の抗血清を用いるウェスタンブロットによって確認した。フォスファトニンポリペプチドバンドは約66kD及び120kD付近で検出された。より大きいバンドは完全長のフォスファトニンのホモダイマーを反映する。CL8ヒト腎近位尿管細胞株によるリン酸の取り込み効率を決定するために培地を利用した。得られた結果は、実施例12で得られた結果と反対であった。特に、実施例12の切断型MEPEは、リン酸の取り込みを増加させた。しかし、培地中に完全長のMEPEが存在するとリン酸取り込みを減少させた。結果を図16の棒グラフにおいて示し、緩衝液である対照と比較して、培地中の完全長MEPEによるリン酸取り込みの有意な減少（ $p < 0.001$ ）を示す。これらの結果は、完全長のフォスファトニンがリン酸取り込みをダウンレギュレートすることを証明する。

【0267】

実施例15

切断型MEPEに関するインビボラット実験

上記の実施例12に記載した型の実験プロトコールを利用して、実施例12に関する組換え大腸菌によって発現されたMEPE融合タンパク質を用いた。しかし、この実験では、MEPE20 μ g（ボーラス）を図17に示すように0時間に注射し、グラフ上ではデータポイントを四角の点で示した線で表す。又は、MEPE 40 μ g/時間を連続的に注入した。図17のグラフ上ではデータポイントを三角の点で示し、これはMEPEinfを表す。これらの2組のデータを、図17のグラフ上ではデータポイントが菱形の点で示される対照と比較した。データは、ボーラス注射又は持続注入開始後、1～4時間における尿中のリン酸容積の変化を示している。尿中リン酸容積（特に、尿中リン酸排泄）は、調べた4時間の間にボーラス注射群において経時的に減少している。尿中リン酸容積は、持続的注入群においては、ほぼゼロに減少する。図18に示すように、ボーラス注射又は持続的注入のいずれかが、尿から血液へのリン酸再吸収（6時間以上）を増加させ、それによって正常な糸球体濾過機能（GFR）に影響を及ぼすことなく尿中リン酸漏出が減少する。

【0268】

本発明は、特定の態様における参照において記述されており、様々な変更が当業者によって行われることが理解されるべきであり、これらの等価物は、本発明の範囲及び精神に逸脱することなく置き換えることができる。さらに、特定の状況、材料、物質の組成、プロセス、又は段階などに対して、本発明の目的、精神、又は範囲に適応させるために、多

10

20

30

40

50

くの変更がなされ得る。それらの変更や変化は、本明細書に添付の特許請求の範囲に含まれるものとする。

【0269】

本発明の背景として本明細書に引用した文書（特許、特許出願、雑誌の記事、実験マニュアル、書籍、又はその他の開示を含む）、詳細な説明、及び実施例は全て、参照として本明細書に組み入れられる。さらに、配列表もまた、参照として本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1(a)と(b)は、それぞれ、コンカナバリンAカラム由来の低親和性及び高親和性タンパク質含有のピークを有するクロマトグラムを示している。

10

【図2】 コンカナバリンAカラム由来の分画における、陽イオン交換クロマトグラム。

【図3】 コンピューターによる切断型フォスファトニンの親水性及び疎水性の予測。

【図4】 コンピューターによる切断型フォスファトニンの抗原性の予測。

【図5】 コンピューターによる切断型フォスファトニンの柔軟性の予測。

【図6】 コンピューターによる切断型フォスファトニンの二次構造表面確率（surface probability）の予測。

【図7】 コンピューターによる切断型フォスファトニンの二次構造の予測。

【図8】 単離された切断型MEPEクローン（pH011.1）における全長cDNA配列（配列番号：1）とアミノ酸配列（配列番号：2）。単離された他の5つのクローンは、この最大クローン中に含まれ、すべてのクローンはクローニング媒体であるpBSCPT SKII-とインフレーションである。PCRに使用したプライマーは太字で示され、残基数の合計は、それぞれ430bpと1655bpである。原核生物発現ベクターpCal-n-EKは、切断型MEPE残基Vから1291～1293bpのMEPE停止コドン（TAG）までのすべての残基を、インフレーションで含んでいた。1つのポリアデニル化配列AA {T/U} AAAは二重下線で示されている。DMA-1、DSSP、及びOPNと局所的相同性を持つ部分は波線で示され（MEPE-モチーフ C-末端）RGD残基は楕円の囲まれ、ムコ多糖類接着部位は実線の枠で囲まれ、チロシンキナーゼ部位は一重下線で示され、N-グリコシル化モチーフは点線の枠で囲んである。カゼインキナーゼII、プロテインキナーゼCなどを含むモチーフの全リストについては、プロサイトスクリーン（prosite screen）表1を参照のこと。

20

【図9】 切断型MEPEのGCG-ペプチド構造二次構造予測。アミノ酸の主要な骨格は中央の実線で示してあり、屈曲すると予測される領域においてカーブを描いている。親水性及び疎水性領域は楕円及びダイヤモンド型でそれぞれ示されており、RGDモチーフも明示されている。N-グリコシル化部位は棒の先に楕円のついた形で示し（C末端側）、かつαヘリックスは主要な骨格が波状になっている領域に示されている。

30

【図10】 棒グラフは、それぞれ異なる量のMEPE存在下でのリン酸取り込み量を示す（A：92ng/ml、B：300ng/ml、C：500ng/ml、及びD：1000ng/ml）。コリンのグラフは、NaClに塩化コリンを置換したときの、対照のナトリウム非依存性の結果を示す。誤差バー（error bar）はSEMであり、P値は、MEPEと対照との差に関する値であり、CとDの実験では、 $P < 0.001$ である。実験A（92ng/ml）では $P < 0.05$ 、及びBでは（300ng/ml、P、0.01）である。AとBにおけるNの値は4であり、CとDではそれぞれ5と6である。Anova分析及びその後でニューマン-クールズ（Newman-Keuls）複合比較検定法（multiple comparison test）を使用した。

40

【図11】 SEM誤差バー（error bar）を含むMEPE投与量とリン酸摂取量における用量曲線。

【図12】 「シム」及びランビュー数学及びソフトウェアツール（「sim」 and llanview mathematical and software tool）（Duret, Comput. Appl. Biosci. 12 (1996), 507-510）を用いた配列の類似性分析。それぞれの計算において、ギャップ・オープン・ペナルティ（gap open penalty）は12に、ギャップ・エクステンション・ペナルティ（gap extension penalty）は4にセットされている。比較マトリックスは、それぞれ、Aに関しては「PAM40」、BとCは「BLOSUM62」である（Duret, Comput. Appl. Biosci, 12 (1996), 5

50

07-510; Hurang, Comput. Appl. Biosci. 8 (1992), 155-165; Huang, Comput. Appl. Biosci (1990) 6, 373-381参照)。類似性スコアの閾値は、Aでは70%、BとCでは40%であった。それぞれのタンパク質スキーム上の太字ブロックは、Aにおいては>80%、BとCでは>62%である。特筆すべきは、切断型MEPE対DSSP (A) において、切断型MEPEの一箇所のモチーフ

(DSSESSDSGSSSES)

と>80%の相同性を示すブロックが、DSSP中に5箇所あるということである。同様の配列相同性がDMA-1及びOPN対切断型MEPEにも明らかに見られ、切断型MEPEはこれら3つのタンパク質すべての特徴をもつ。

10

【図13】 Antheprot統計解析 (Deleage, G. Software for protein analysis: Antheprot V2.5e. Microsoft group. (7 Passages du Vercours 69-367 Vercors Lyon Cedex 07, 1997)) を用いたDSSPと切断型MEPEのドットマトリックス (Dot matrix) 比較。(A) では、スクリーン変数としてウィンドウを13にセットした低厳密性比較を、(B) では、ウィンドウを15にセットした比較を行った。色の濃淡は、図中に示された同一性マトリックススコアを示す。MEPEモチーフのC末残基は、>80%のシーケンス相同性をもち、縞模様のパターンでモチーフの繰り返し構造が示されている。

【図14】 切断型フォスファトニン融合構造分子を含むp1BL21及びp6XL1組換えプラスミド。LacI: (lacプロモータ); LIC: (ライゲーション非依存クローニング配列); EK: エンテロキナーゼ切断部位; Thrombin (トロンبینターゲット配列); Amp: アンピシリン耐性遺伝子; Cal peptide (カルモジュリンペプチド配列); Phosphatoin (切断型フォスファトニンコード配列)。

20

【図15】 完全なフォスファトニン分子の一次構造。フォスファトニンのアミノ酸配列 (配列番号: 27) における構造及び機能的モチーフを示す。詳しい説明に関しては、本文と図8及び表1の説明文を参照のこと。

【図16】 全リン酸の取り込みをCPM/ngで示すインビトロ研究の結果を示す棒グラフを、昆虫培地 (完全長のMEPE) (Bac-1) 及び緩衝液対照 (CON) について示す。

【図17】 尿中のリン酸排泄 (UP₁V) を経時的に (1~4時間) を示すインビボラット試験の結果を示すグラフである。

【図18】 糸球体濾過速度 (GFR) をml/分で経時的に (1~6時間) 示すインビボラット試験の結果を示すグラフである。

30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITY COLLEGE LONDON

<120> A NOVEL POLYPEPTIDE HORMONE PHOSPHATONIN

<130> D 2507 PCT

<140>

<141>

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1655

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gtgaataaag aatatagtat cagtaacaaa gagaatactc acaatggcct gaggatgtca 60
atztatccta agtcaactgg gaataaaggg tttaggagtg gagatgatgc tatcagcaaa 120
ctacatgacc aagaagaata tggcgcagct ctcatcagaa ataacatgca acatataatg 180
gggccagtgga ctgcgattaa actcctgggg gaagaaaaca aagagaacac acctaggaat 240
gttctaaaca taatcccagc aagtatgaat tatgctaaag cacactcgaa ggataaaaaag 300
aagcctcaaaa gagattccca agcccagaaa agtccagtaa aaagcaaaaag caccatcgt 360
attcaacaca acattgacta cctaaaaacat ctctcaaaaag tcaaaaaaat ccccatgtat 420
tttgaaggga gcggttatac agatcttcaa gagagagggg acaatgatat atctcctttc 480
agtggggagc gccaaccttt taaggacatt cctggtaaag gagaagctac tggtcctgac 540
ctagaaggga aagatattca aacagggttt gcaggcccaa gtgaagctga gagtactcat 600
cttgacacaa adaagccagg ttataatgag atcccagaga gagaagaaaa tggtggaat 660
accattggaa ctagggatga aactgcgaaa gaggcagatg ctgttgatgt cagccttgta 720
gagggcagca acgatatcat gggtagtacc aattttaagg agctccctgg aagagaagga 780
aacagagtgg atgctggcag ccaaaatgct caccaaggga aggttgagtt tcattaccct 840
cctgcaccct caaaaagagaa aagaaaagaa ggcagtagtg atgcagctga aagtaccaac 900
tataatgaaa ttcttaaaaa tggcaagggc agtaccagaa aggggtgtaga tcattctaata 960
aggaaccaag caaccttaaa tgaaaaacaa aggtttccta gtaagggcaa aagtcagggc 1020
ctgcccattc cttctcgttg tcttgataat gaaatcaaaa acgaaatgga ttctttaat 1080
ggccccagtc atgagaatat aataacacat ggcagaaaat atcattatgt acccacaga 1140
caaaataatt ctacacggaa taagggtatg ccacaaggga aaggctcctg gggtagacaa 1200
ccccattcca acaggaggtt tagttccctg agaaggatg acagtagtga gtcactgtac 1260
agtggcagtt caagtggagc cgatgggtgac tagtccacca ggagttccca gcgggggtgac 1320
agtctgaaga cctcgtcacc tgtgagttga tgtagaggag agccacctga cagctgacca 1380
ggtgaagaga ggatagagtg aagaactgag tgagccaaga atcctgggtc ccttggggga 1440
atttttgcta tcttaatatg cacagtataa aattctatta aaggctataa tgtttttaag 1500
caaaaaaaaaa tcattacaga tctatgaaat aggtaacatt tgagtaggtg tcatttaaaa 1560
atagttggtg aatgtcacaa atgccttcta tgttgtttgc tctgtagaca tgaaaaataaa 1620
caatatctct cgatgataaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1655

```

<210> 2

<211> 430

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Val Asn Lys Glu Tyr Ser Ile Ser Asn Lys Glu Asn Thr His Asn Gly
  1                               5                               10                               15
Leu Arg Met Ser Ile Tyr Pro Lys Ser Thr Gly Asn Lys Gly Phe Glu
                20                               25                               30

```

10

20

30

Asp Gly Asp Asp Ala Ile Ser Lys Leu His Asp Gln Glu Glu Tyr Gly
 35 40 45
 Ala Ala Leu Ile Arg Asn Asn Met Gln His Ile Met Gly Pro Val Thr
 50 55 60
 Ala Ile Lys Leu Leu Gly Glu Glu Asn Lys Glu Asn Thr Pro Arg Asn
 65 70 75 80
 Val Leu Asn Ile Ile Pro Ala Ser Met Asn Tyr Ala Lys Ala His Ser
 85 90 95
 Lys Asp Lys Lys Lys Pro Gln Arg Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro
 100 105 110
 Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg Ile Gln His Asn Ile Asp Tyr Leu
 115 120 125
 Lys His Leu Ser Lys Val Lys Lys Ile Pro Ser Asp Phe Glu Gly Ser
 130 135 140
 Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu Arg Gly Asp Asn Asp Ile Ser Pro Phe
 145 150 155 160
 Thr Gly Pro Asp Leu Glu Gly Lys Asp Ile Gln Thr Gly Phe Ala Gly
 165 170 175
 Ser Gly Asp Gly Gln Pro Phe Lys Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala
 180 185 190
 Pro Ser Glu Ala Glu Ser Thr His Leu Asp Thr Lys Lys Pro Gly Tyr
 195 200 205
 Asn Glu Ile Pro Glu Arg Glu Glu Asn Gly Gly Asn Thr Ile Gly Thr
 210 215 220
 Arg Asp Glu Thr Ala Lys Glu Ala Asp Ala Val Asp Val Ser Leu Val
 225 230 235 240
 Glu Gly Ser Asn Asp Ile Met Gly Ser Thr Asn Phe Lys Glu Leu Pro
 245 250 255
 Gly Arg Glu Gly Asn Arg Val Asp Ala Gly Ser Gln Asn Ala His Gln
 260 265 270
 Gly Lys Val Glu Phe His Tyr Pro Pro Ala Pro Ser Lys Glu Lys Arg
 275 280 285
 Lys Glu Gly Ser Ser Asp Ala Ala Glu Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Ile
 290 295 300
 Pro Lys Asn Gly Lys Gly Ser Thr Arg Lys Gly Val Asp His Ser Asn
 305 310 315 320
 Arg Asn Gln Ala Thr Leu Asn Glu Lys Gln Arg Phe Pro Ser Lys Gly
 325 330 335
 Lys Ser Gln Gly Leu Pro Ile Pro Ser Arg Gly Leu Asp Asn Glu Ile
 340 345 350
 Lys Asn Glu Met Asp Ser Phe Asn Gly Pro Ser His Glu Asn Ile Ile
 355 360 365

10

20

30

Thr His Gly Arg Lys Tyr His Tyr Val Pro His Arg Gln Asn Asn Ser
 370 375 380

Thr Arg Asn Lys Gly Met Pro Gln Gly Lys Gly Ser Trp Gly Arg Gln
 385 390 395 400

Pro His Ser Asn Arg Arg Phe Ser Ser Arg Arg Arg Asp Asp Ser Ser
 405 410 415

Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser Asp Gly Asp
 420 425 430

<210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized
 peptide

<400> 3
 Ser Gly Asp Gly
 1

<210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized
 peptide

<400> 4
 Ala Asp Ala Val Asp Val Ser
 1 5

<210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized
 peptide

30

<400> 5
 Ser Ser Arg Arg Arg Asp Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Ser Glu Ser Asp Gly
 20

<210> 6
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide
 <400> 6
 Ser Ser Arg Ser Lys Glu Asp Ser Asn Ser Thr Glu Ser Lys Ser Ser
 1 5 10 15
 Ser Glu Glu Asp Gly
 20

<210> 7
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Chemical synthesis in laboratory
 <400> 7
 Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser Asp Ser
 1 5 10 15
 Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser
 20 25

<210> 8
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Chemical synthesis in laboratory

<400> 8
 gagcagcaca aggtgaataa agaatatagt atcagtaa 38

<210> 9
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

30

<400> 9
 ggaacaagac ccgtctagtc accatcgctc tcaact 35

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 10
Asp Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser
1 5 10 15

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized
peptide

<400> 11
Asp Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser Asp
1 5 10 15

10

<210> 12
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized
peptide

<400> 12
Ser Ser Arg Arg Arg Asp Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser
1 5 10 15

Ser Ser Glu Ser Asp Gly
20

20

<210> 13
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized
peptide

<400> 13
Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Ser Ser Asp Ser
1 5 10

30

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized
peptide

<400> 14
Asp Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser
1 5 10 15

<210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 15
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Asn Ser Ser Ser Asp Ser
 1 5 10

<210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 16
 Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser
 1 5 10

<210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 17
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser
 1 5 10

<210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 18
 Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu Ser Asp
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

20

30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 19
 Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu Ser Asp
 1 5 10

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

10

<400> 20
 Ser Asp Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Asp
 1 5 10

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

20

<400> 21
 Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp
 1 5 10

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 22
 Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn
 1 5 10

30

<210> 23
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 23
 Ser Ser Arg Ser Lys Glu Asp Ser Asn Ser Thr Glu Ser Lys Ser Ser
 1 5 10 15

Ser Glu Glu Asp Gly
20

<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 24
ggttatacag atcttcaaga gagag 25

10

<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 25
gttggtactt tcagctgcat cact 24

<210> 26
<211> 2013
<212> DNA
<213> Homo sapiens

20

<400> 26
cacacagctt tgcttagttt tctccggcac gagcaggtat tctgaagggtg aaagatacca 60
gagatttctca aagatgcgag ttttctgtgt gggactactc cttttcagtg tgacctgggc 120
agcaccaaca tttcaaccac agactgagaa aactaagcaa agctgtgtgg aagagcagag 180
gcagggaagaa aaaaaaacaag acaatatgtg ttttcaccat ttgggcaaga gaataaatca 240
agagctatca tctaaagaaa atattgtcca ggaaagaaaag aaagatttgt ccctttctga 300
agccagtggg aataagggaa gtagtaaatc tcaaaattat ttcacaaata gacagagact 360
gaataaagaa tatagtatca gtaacaaaga gaatactcac aatggcctga ggatgtcaat 420
ttatcctaag tcaactggga ataaagggtt tgaggatgga gatgatgcta tcagcaaact 480
acatgaccaa gaagaatatg gcgcagctct catcagaaat aacatgcaac atataatggg 540
gccagtgact gcgattaaac tcctggggga agaaaaacaa gagaacacac ctagggaatgt 600
tctaaacata atcccagcaa gtatgaatta tgctaaagca cactcgaagg ataaaaagaa 660
gcctcaaaga gattcccaag cccagaaaag tccagtaaaa agcaaaaagca cccatcgtat 720
tcaacacaaac attgactacc taaaacatct ctcaaaagtc aaaaaaatcc ccagtgattt 780
tgaaggcagc ggttatacag atcttcaaga gagaggggac aatgatatat ctcccttcag 840
tggggacggc caacctttta aggacattcc tggtaaagga gaagctactg gtcctgacct 900
agaaggcaaa gatattcaaa cagggtttgc aggcccaagt gaagctgaga gtactcatct 960
tgacacaaaa aagccagggtt ataatgagat cccagagaga gaagaaaatg gtggaaatac 1020
cattggaact agggatgaaa ctgcgaaaga ggcagatgct gttgatgtca gccttgtaga 1080
gggcagcaac gatatcatgg gtagtaccac ttttaaggag ctccctggaa gagaaggaaa 1140
cagagtggat gctggcagcc aaaatgctca ccaagggaag gttgagtttc attaccctcc 1200
tgccacctca aaagagaaaa gaaaagaagg cagtagtgat gcagctgaaa gtaccaacta 1260
taatgaaatt cctaaaaatg gcaaaaggcag taccagaaag ggtgtagatc attctaatag 1320
gaaccaagca accttaaatg aaaaacaaaag gtttcctagt aaggggcaaaa gtcagggcct 1380
gcccattcct tctcgtggtc ttgataatga aatcaaaaac gaaatggatt cctttaatgg 1440
ccccagtcac gagaatataa taacacatgg cagaaaatat cattatgtac cccacagaca 1500
aaataattct acacggaata aggttatgcc acaagggaaa ggctcctggg gtagacaacc 1560

30

```

ccattccaac aggaggttta gttcccgtag aagggatgac agtagtgagt catctgacag 1620
tggcagttca agtgagagcg atgggtgacta gtccaccagg agttcccagc ggggtgacag 1680
tctgaagacc tcgtcacctg tgagttgatg tagaggagag ccacctgaca gctgaccagg 1740
tgaagagagg atagagtga gaaactgagt agccaagaat cctgggtctcc ttgggggaat 1800
ttttgctatc ttaatagtca cagtataaaa ttctattaaa ggctataatg tttttaagca 1860
aaaaaaaaatc attacagatc tatgaaatag gtaacatttg agtaggtgtc atttaaaaat 1920
agttgggtgaa tgtcacaaat gccttctatg ttgtttgctc thtagacatg aaaataaaca 1980
atatctctcg atgataaaaa aaaaaaaaaa aaa 2013

```

```

<210> 27
<211> 525
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 27
Met Arg Val Phe Cys Val Gly Leu Leu Leu Phe Ser Val Thr Trp Ala
 1           5           10           15
Ala Pro Thr Phe Gln Pro Gln Thr Glu Lys Thr Lys Gln Ser Cys Val
          20           25           30
Glu Glu Gln Arg Gln Glu Glu Lys Asn Lys Asp Asn Ile Gly Phe His
          35           40           45
His Leu Gly Lys Arg Ile Asn Gln Glu Leu Ser Ser Lys Glu Asn Ile
          50           55           60
Val Gln Glu Arg Lys Lys Asp Leu Ser Leu Ser Glu Ala Ser Glu Asn
          65           70           75           80
Lys Gly Ser Ser Lys Ser Gln Asn Tyr Phe Thr Asn Arg Gln Arg Leu
          85           90           95
Asn Lys Glu Tyr Ser Ile Ser Asn Lys Glu Asn Thr His Asn Gly Leu
          100          105          110
Arg Met Ser Ile Tyr Pro Lys Ser Thr Gly Asn Lys Gly Phe Glu Asp
          115          120          125
Gly Asp Asp Ala Ile Ser Lys Leu His Asp Gln Glu Glu Tyr Gly Ala
          130          135          140
Ala Leu Ile Arg Asn Asn Met Gln His Ile Met Gly Pro Val Thr Ala
          145          150          155          160
Ile Lys Leu Leu Gly Glu Glu Asn Lys Glu Asn Thr Pro Arg Asn Val
          165          170          175
Leu Asn Ile Ile Pro Ala Ser Met Asn Tyr Ala Lys Ala His Ser Lys
          180          185          190
Asp Lys Lys Lys Pro Gln Arg Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro Val
          195          200          205
Lys Ser Lys Ser Thr His Arg Ile Gln His Asn Ile Asp Tyr Leu Lys
          210          215          220
His Leu Ser Lys Val Lys Lys Ile Pro Ser Asp Phe Glu Gly Ser Gly
          225          230          235          240
Tyr Thr Asp Leu Gln Glu Arg Gly Asp Asn Asp Ile Ser Pro Phe Ser
          245          250          255

```

10

20

30

Gly Asp Gly Gln Pro Phe Lys Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala Thr
 260 265 270
 Gly Pro Asp Leu Glu Gly Lys Asp Ile Gln Thr Gly Phe Ala Gly Pro
 275 280 285
 Ser Glu Ala Glu Ser Thr His Leu Asp Thr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn
 290 295 300
 Glu Ile Pro Glu Arg Glu Glu Asn Gly Gly Asn Thr Ile Gly Thr Arg
 305 310 315 320
 Asp Glu Thr Ala Lys Glu Ala Asp Ala Val Asp Val Ser Leu Val Glu
 325 330 335
 Gly Ser Asn Asp Ile Met Gly Ser Thr Asn Phe Lys Glu Leu Pro Gly
 340 345 350
 Arg Glu Gly Asn Arg Val Asp Ala Gly Ser Gln Asn Ala His Gln Gly
 355 360 365
 Lys Val Glu Phe His Tyr Pro Pro Ala Pro Ser Lys Glu Lys Arg Lys
 370 375 380
 Glu Gly Ser Ser Asp Ala Ala Glu Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Pro
 385 390 395 400
 Lys Asn Gly Lys Gly Ser Thr Arg Lys Gly Val Asp His Ser Asn Arg
 405 410 415
 Asn Gln Ala Thr Leu Asn Glu Lys Gln Arg Phe Pro Ser Lys Gly Lys
 420 425 430
 Ser Gln Gly Leu Pro Ile Pro Ser Arg Gly Leu Asp Asn Glu Ile Lys
 435 440 445
 Asn Glu Met Asp Ser Phe Asn Gly Pro Ser His Glu Asn Ile Ile Thr
 450 455 460
 His Gly Arg Lys Tyr His Tyr Val Pro His Arg Gln Asn Asn Ser Thr
 465 470 475 480
 Arg Asn Lys Gly Met Pro Gln Gly Lys Gly Ser Trp Gly Arg Gln Pro
 485 490 495
 His Ser Asn Arg Arg Phe Ser Ser Arg Arg Arg Asp Asp Ser Ser Glu
 500 505 510
 Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser Asp Gly Asp
 515 520 525

10

20

30

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 28

tcttccccca ggagtttaat c

21

<210> 29
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 29
ggccgcaatt aaccctcact aaagg

25

<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

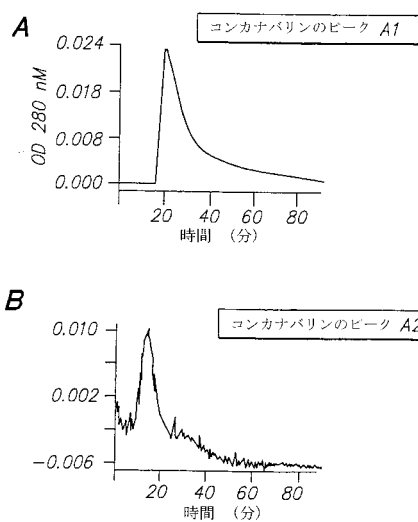
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 30
cacacagctt tgcttagttt tctc

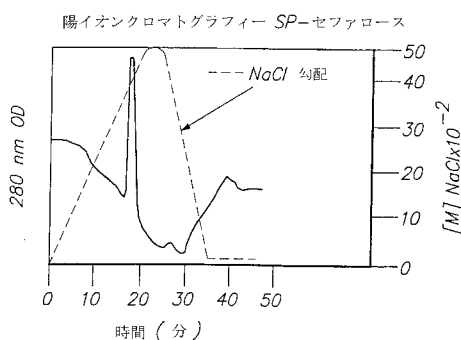
24

10

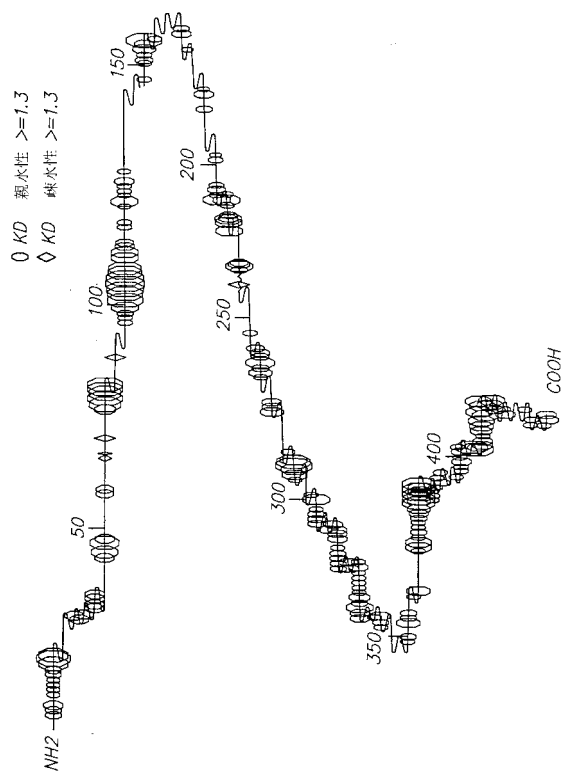
【図 1】



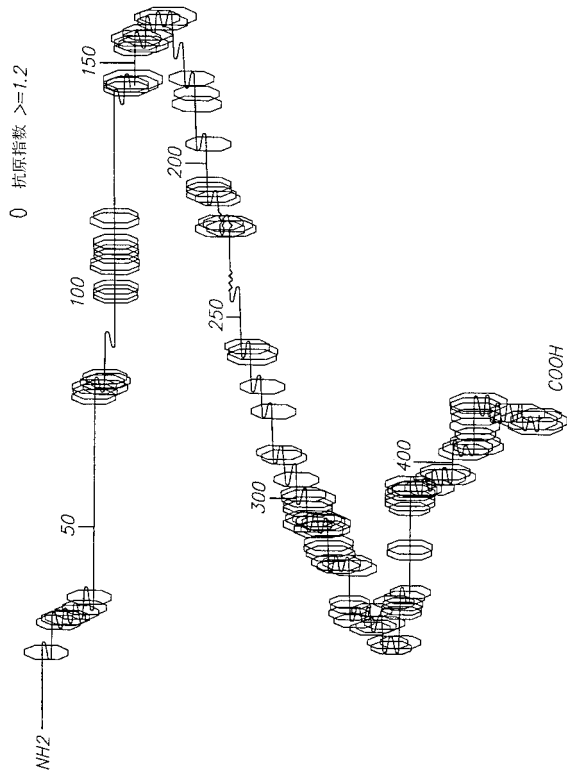
【図 2】



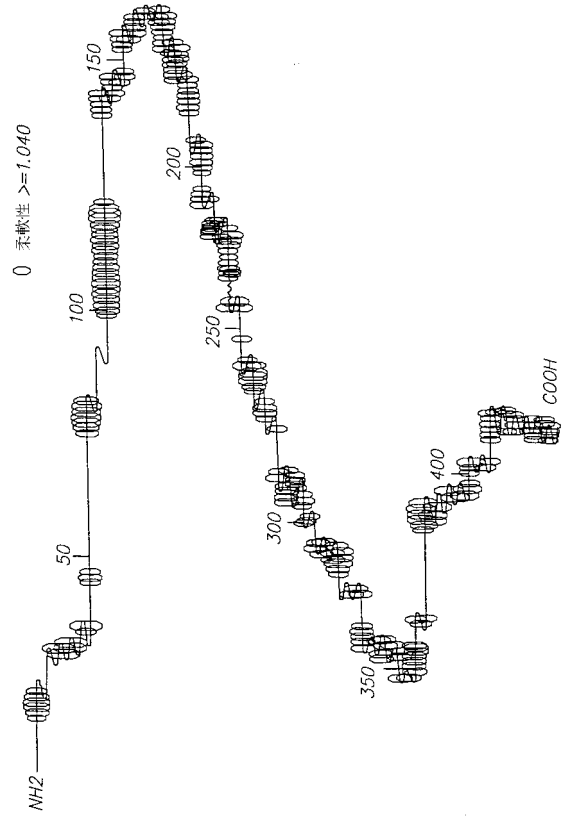
【図 3】



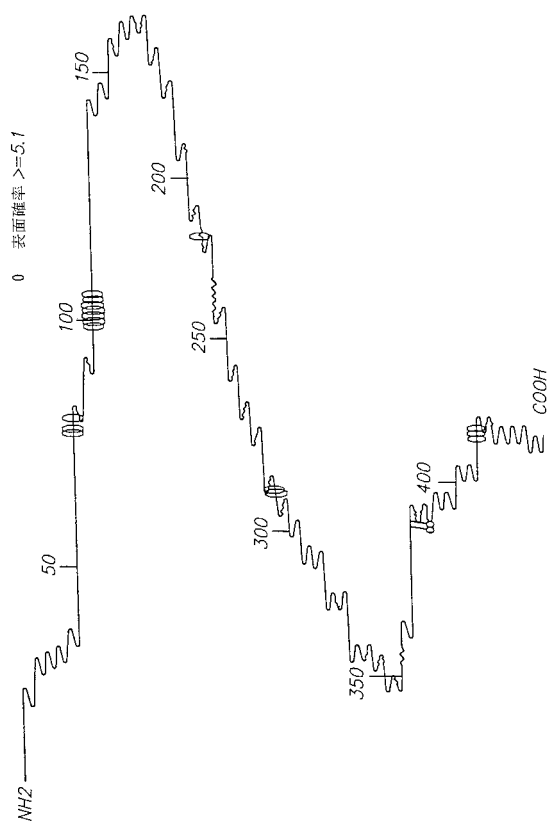
【図 4】



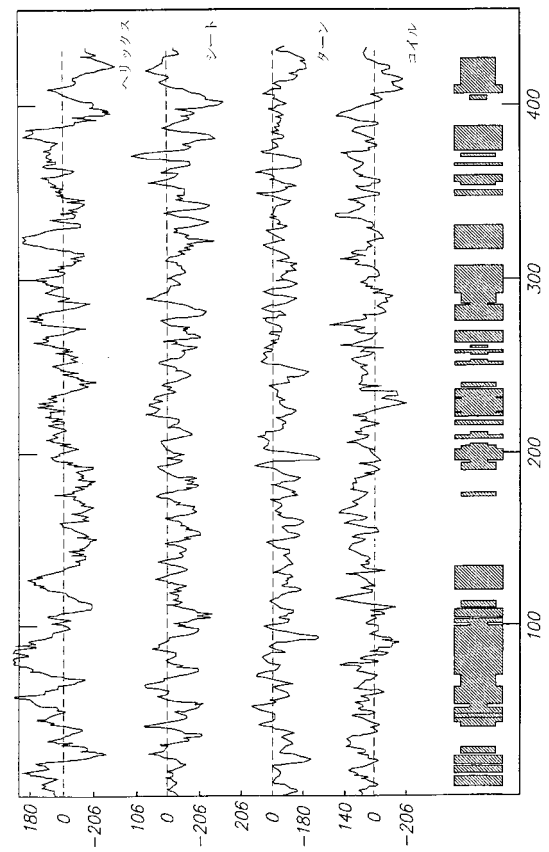
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8-1】

V N K E Y S I S N K E N T H N G L R M S
 GTGAATAAAGATATAGTATCAGTAAAGAGAACTCACAATGGCCTGAGGATGTCA 60

I Y P K S T G N K G F E D G D D A I S K
 ATTTATCCTAAGTCAACTGGGAATAAAGGGTTTGAGGATGGAGATGATGCTATCAGCAA 120

L H D Q E E Y G A A L I R N N M Q H I M
 CTACATGACCAAGAAGATATGGCGAGCTCTCATCAGAAATAACATGCAACATATAATG 180

G P C T A I K L L G E E N K E N T P R N
 GGGCCACTGACTGCGATTAACTCCTGGGGAAGAAAACAAAGAGAACACACCTAGGAAT 240

V L N I I P A S M N Y A K A H S K D K K
 GTTCTAAACATAATCCAGCAAGTATGAATTATGCTAAGACACACTCGAAGGATAAAAG 300

K P Q R D S Q A Q K S P V K S K S T H R
 AAGCCTCAAAGAGATCCCAACCCGAGAAAGTCCAGTAAAGCAAAGCAACCCATCGT 360

I Q H N I D Y L K H L S K V K K I P S D
 ATTCAACACACATTGACTACCTAAACATCTCTCAAAGTCAAAAAATCCCGAGTAT 420

F E G S G Y T D L Q E R G D N D I S P F
 TTTGAAGGCAGCGTTATACAGATCTTCAAGAGACAGGGGACATGATATATCTCCTTTC 480

S G D G P F K D I P G K G E A T G P D
 AGTGGGACGGCCACCTTTAAGGACATCTCGTAAAGGAGAAGCTACTGGTCCTGAC 540

L E G K D I Q T G F A G P S E A E S T H
 CTAGAAGCAAAGATATTCAACAGGGTTTGACAGGCCAAGTGAAGCTGAGAGTACTCAT 600

L D T K K P G Y N E I P E R E E N G G N
 CTTGACACAAAAAGCCAGTTTATAATGACATCCCAGAGAGAGAGAAATGGTGGAAAT 660

T I G T R D E T A K E A D A V D V S L V
 ACCATTGGAACTAGGATGAAACTCCGAAAGAGGCAGATGCTGTTGATGTACCCCTGTGA 720

E G S N D I M G S T N F K E L P G R E G
 GAGGGCACCAACGATATCATGGGTAGTACCAATTTTAAGGAGCTCCCTGGAAGAGAGA 780

【図 8-2】

N R V D A G S Q N A H Q G K V E F H Y P
 AACAGAGTGGATGCTGGCAGCCAAAATGCTCACCAGGGAAGGTGAGTTTCATTACCT 840

P A P S K E K R K E G S S D A A E S T N
 CCTGCACCCCTCAAAGAGAAAAGAAAAGAGGAGTACTGACAGCTCAAAGTACCAAC 900

Y N E I P K N G K G S T R K G V D H S N
 TATAATGAAATTCCTAAAAATGGCAAAGGCAGTACCAGAAAGGTGATGATCATTCTAAT 960

R N Q A T L N E K Q R F P S K G K S Q C
 CTGCCCCATTCCTCTCGTCTTGATAATGAAATCAAAACGAAATGGATTCCTTAAAT 1080

G P S H E N I I T H G R K Y H Y V P H R
 GGCCCCAGTCTGAGAATATAAATACACATGGCAGAAAATATCATTATGTACCCACAGA 1140

Q N N S T R N K G M P Q G K G S W G R Q
 CAAAAATATCTACACGGAATAAGGGTATGCCACAAGGAAAGGCTCTGGGTAGACAA 1200

P H S N R R F S S R R R D D S S E S S D
 CCCCATTCCAACAGGAGTTTAGTTCCTGTAGAGGGATGACAGTAGTGTGATCTGAC 1260

S G S S S E S D G D *
 AGTGGCAGTTCAGTGAGAGCGATGGTGACTAGTCCACAGGAGTCCACGCGGGTGAC 1320

AGTCTGAAGACCTCGTCACCTGTGAGTTGATGTAGAGAGAGCCACCTGACACCTGACCA 1380

GGTGAAGAGAGGATAGCTGAAGAACTGAGTGCCCAAGATCCTGTCTCCTTGGGGA 1440

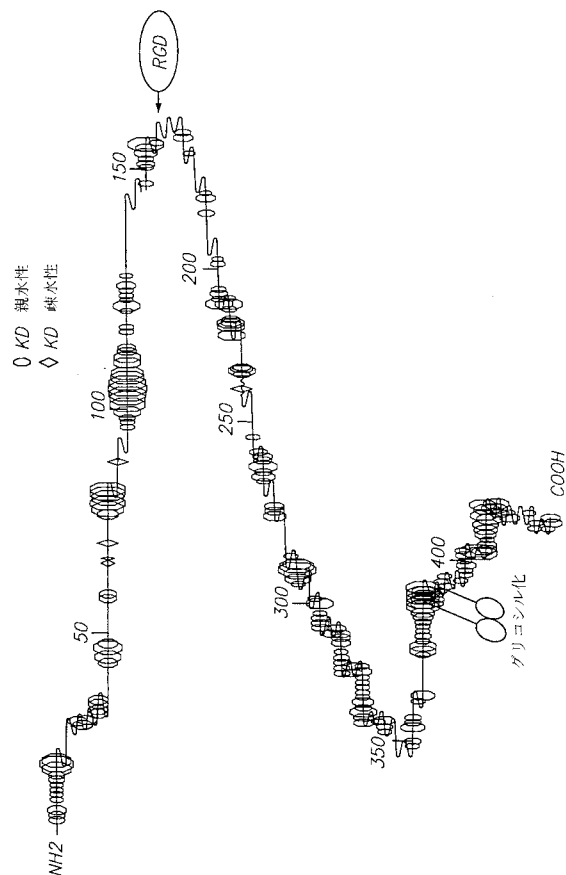
ATTTTGTCTATCTTAATAGTCACAGTATAAAATCTATTAAAGGCTATAATGTTTTAAG 1500

CAAAAAAATCATTACAGATCTATGAAATAGTAACATTTGAGTAGGTGTCATTAAAA 1560

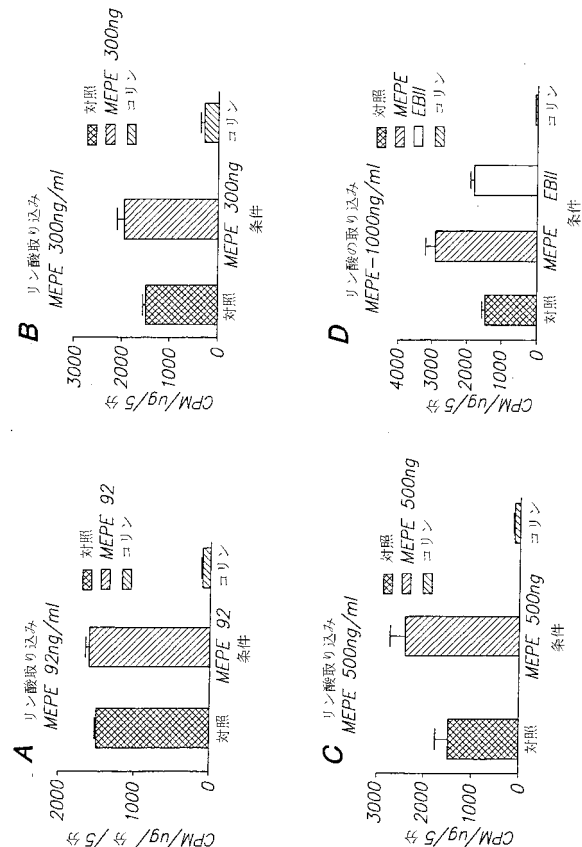
ATAGTTGGTGAATGTCACAAATGCCTTCTATGTTGTTGCTCTGTAGACATGAAATAAA 1620

CAATATCTCTGATGATAAAAAAAAAAAAAAAAA 1655

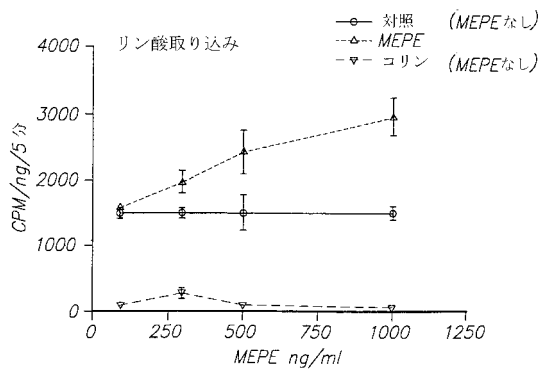
【図 9】



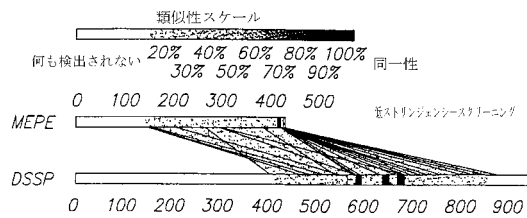
【図 10】



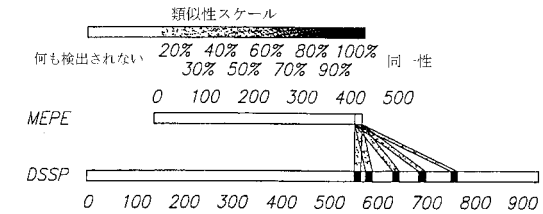
【図 1 1】



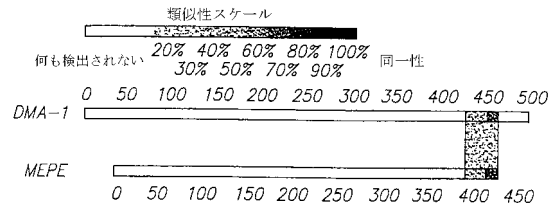
【図 1 2 A】



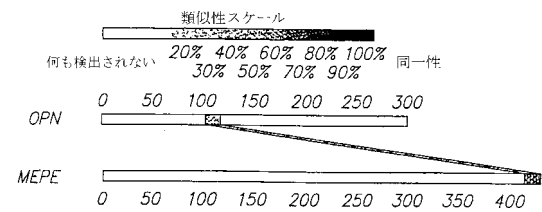
【図 1 2 B】



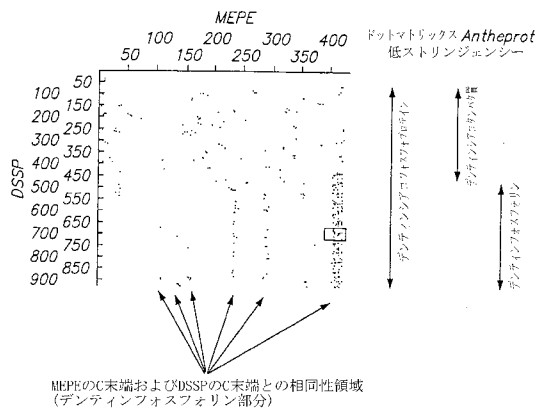
【図 1 2 C】



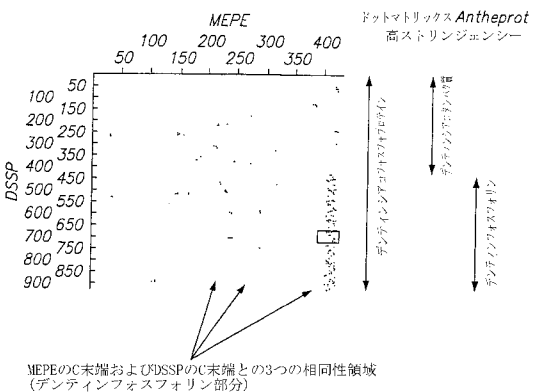
【図 1 2 D】



【図 1 3】

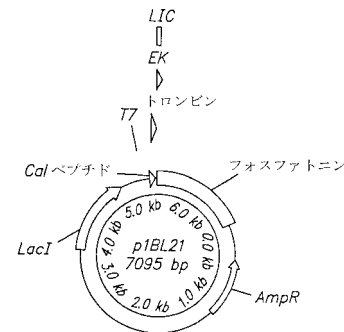


A

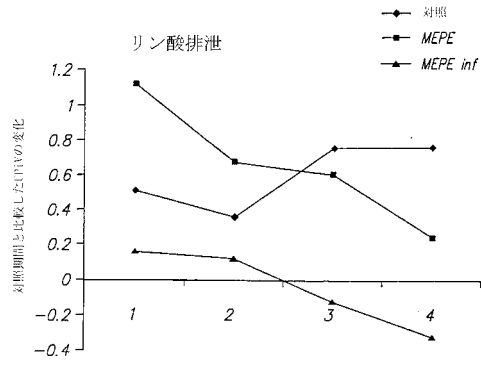


B

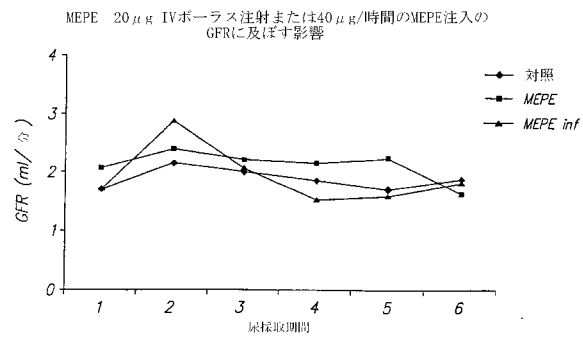
【図 1 4】



【図 17】



【図 18】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/00</i>	<i>1 0 1</i>
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	<i>C</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>38/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>37/02</i>	
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>D</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>48/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>N</i>
			<i>A 6 1 K</i>	<i>48/00</i>	

(56)参考文献 特表 2 0 0 2 - 5 1 5 2 3 2 (J P, A)

ROWE P. S. N. et al., Candidate 56 and 58 kDa Protein(s) Responsible for Mediating the Renal Defects in Oncogenic Hypophosphatemic Osteomalacia, Bone, 1 9 9 6 年, Vol.18, No.2, p.159-169

ROWE P. S. N. et al., MEPE, a New Gene Expressed in Bone Marrow and Tumors Causing Osteomalacia, Genomics, 2 0 0 0 年, Vol.67, p.54-68

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N15/00

C07K1/00-19/00

UniProt/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed

WPI