

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 5 月 1 日 (01.05.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 03/035866 A1**

- (51) 国際特許分類: **C12N 15/09, 5/10, C12Q 1/68**
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/08983
- (22) 国際出願日: 2002 年 9 月 4 日 (04.09.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2001-327576 2001 年 10 月 25 日 (25.10.2001) JP  
特願 2002-34378 2002 年 2 月 12 日 (12.02.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 阪本 英二 (SAKAMOTO, Aiji) [JP/JP]; 〒560-0005 大阪府 豊中市 西緑丘 3 丁目 1 4 番地 2 0 号 3 0 1 号室 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 佐伯 憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都 中央区 日本橋三丁目 1 5 番 2 号 高愛ビル 9 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF EVALUATING AND IDENTIFYING BIOLOGICALLY FUNCTIONAL MOLECULE USING MARKER GENE

(54) 発明の名称: マーカー遺伝子を用いた生体機能分子の評価並びに同定方法

(57) Abstract: It is intended to provide a novel method of screening a biologically active substance with the use of a gene (marker gene) relating specifically to a specific biological phenomenon. It is also intended to provide a gene therefor, a transformant having the gene transferred thereinto, and a kit for detecting, identifying or evaluating a functional molecule containing the same. Namely, a method of screening a functional molecule inducing a specific biological phenomenon with the use of, as an indication, the expression dose of a gene (marker gene) relating specifically to this phenomenon; a gene having a reporter gene fused to the downstream of the promoter of a marker gene; utilization of the gene; a kit for detecting, identifying or evaluating a functional molecule inducing a specific biological phenomenon containing the gene; and cells having been transformed by the gene.

[続葉有]

WO 03/035866 A1



---

(57) 要約:

本発明は、特定の生体现象と特異的に連関する遺伝子（マーカー遺伝子）を利用した生体活性物質の新規なスクリーニング方法を提供する。また本発明は、そのための遺伝子、当該遺伝子を導入した形質転換体、それらを含有一する機能分子を検出、同定又は評価するためのキットを提供する。

本発明は、特定の生体现象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子（マーカー遺伝子）の発現量を指標としてスクリーニングする方法に関する。また本発明は、マーカー遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を融合させた遺伝子、その使用、それを含有一する特定の生体现象を誘起する機能分子を検出、同定又は評価するためのキット、及び当該遺伝子で形質転換された形質転換細胞に関する。

## 明 細 書

## マーカー遺伝子を用いた生体機能分子の評価並びに同定方法

技術分野

本発明は、特定の生体現象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標としてスクリーニングする方法に関する。また、本発明は、特定の生体現象と特異的に連関する遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を融合させた遺伝子、より詳細には当該遺伝子を含有してなる、特定の生体現象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標として検出、同定又は評価するための遺伝子、それを含有してなる、特定の生体現象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標として検出、同定又は評価するためのキット、及び当該遺伝子で形質転換された形質転換細胞に関する。

背景技術

特定の生体現象を誘起する機能分子の同定は、抗ガン剤や降圧剤など古典的な医薬品の開発基盤としては言うまでもなく、新しい医療として期待される再生医療のツールとしても極めて重要である。このような機能分子を同定する方法としては、従来いくつかの戦略が用いられてきた。

最もオーソドックスな方法は、目的とする生体現象のアッセイ系を用い、当該生体現象の活性を指標として、種々の物質が混在した粗な標品からスタートし、粗な標品の中から何段階かの分離精製の後に精製された標的物質を得、この物質が機能分子であることを同定する方法である。こうした生化学的アプローチの例としては、血管収縮物質であるエンドセリン-1 (endothelin-1 (ET-1)) の発見が挙げられる (Yanagisawa M, et al., Nature 1988; 332: 411-5.)。この場合のアッセイ系にはブタ冠動脈のリング標本が、また粗標品には血管内皮細胞の培養上清が用いられた。

その後、アッセイ系自体は具体的な生体現象を用いるが、標的物質の c D N

Aを組み込んだcDNAライブラリーを培養細胞株に発現させるという方法が出現した。この方法は一般に、発現クローニング (expression cloning) と呼ばれ、標的物質の単離・精製を行うことなく、機能分子を同定することができるようになった。この方法の応用例としては、心肥大誘発物質であるカルジオトロフィン-1 (cardiotrophin-1) の発見がある (Pennica D, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92(4):1142-6.)。この場合のアッセイ系には肥大の程度を顕微鏡下で観察することができる新生児ラット心筋細胞が用いられ、標的物質としてはcDNAライブラリーを293細胞株に発現させた培養上清が用いられた。発現クローニング法は、古典的な生化学的手法に伴う面倒な精製作業を省くことを可能にしたが、標的物質毎に個別なアッセイ系を組み立てなければならないという問題点は依然として解決されていない。

ところで、一般に細胞の増殖や再生あるいは血管の収縮など、生体の形態や機能の発現は外界からの刺激によって引き起こされる。この場合、外部からの入力刺激は様々であっても、最終的にはごく少数の遺伝子発現に帰着されることが多い。例えば心臓の筋肉の肥大 (心肥大) は、エンドセリン-1 (endothelin-1)、アンジオテンシン-II (angiotensin-II)、アドレナリン (adrenalin) など様々な分泌型の生理活性物質が、心筋細胞膜表面の特異的受容体に結合して引き起こされるが、いずれの場合にも、細胞内で数段階の情報仲介分子が活性化された後、 $\beta$ -ミオシン重鎖 ( $\beta$ -Myosin Heavy Chain( $\beta$ -MHC)) や脳型ナトリウム利尿ペプチド (Brain Natriuretic Peptide(BNP)) など、ごく少数の遺伝子の発現に至る。

このように様々な外界からの刺激によって引き起こされる細胞の特定の形態や機能の発現に直結する遺伝子を、本明細書では「マーカー遺伝子」と呼ぶこととする。「マーカー遺伝子」は、特定の生体現象と特異的に連関する遺伝子であるということもできる。「マーカー遺伝子」は様々な機能分子により発現されることもあるが、「マーカー遺伝子」の発現は細胞の特定の形態や機能と特異的に関連するものである。

## 発明の開示

本発明は、このようなマーカー遺伝子を利用した新規なスクリーニング方法を

提供する。また本発明は、マーカー遺伝子の発現量を計測するための遺伝子、当該遺伝子を導入した形質転換細胞、それらを含む機能分子を検出、同定又は評価するためのキットを提供する。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の概要を例示したものである。

第2図は、ジラルディハート (Girardi Heart) の G - b a n d 法による核型分析の結果を示す、図面に代わる写真である。

第3図は、ジラルディハート (Girardi Heart) の S K Y 法による核型分析の結果を示す、図面に代わる写真である。

第4図は、ジラルディハート (Girardi Heart) における遺伝子発現の R T - P C R による検討結果を示す、図面に代わる写真である。ジラルディハート (Girardi Heart) では、 $\alpha 1 C$  アドレナリン受容体 ( $\alpha 1 C$  adrenergic receptor ( $\alpha 1 C A R$ )) とホスホリパーゼ  $C \beta$  (phospholipase  $C \beta$  ( $PLC \beta$ )) 以外の心肥大関連遺伝子の発現を認めた。

第5図は、 $\beta$ -MHC プロモーターの P C R による増幅結果を示す。シリアンハムスターのゲノムから、 $\beta$ -MHC 遺伝子のプロモーター領域を P C R で増幅した結果を示す、図面に代わる写真である。M は k b ラダーマーカー (GIBCO BRL) を表す。

第6図は、本発明の発現プラスミド・コンストラクト (p  $\beta$  MHC / d 2 E G F P) の転写・翻訳開始点付近の塩基配列を示す。細字の塩基配列は  $\beta$ -MHC 遺伝子に由来し、その転写開始点 (+1) の 5' 上流 7 2 8 塩基から 3' 下流 9 1 塩基までに対応する。T A T A ボックスと G A T A 転写因子の結合部位を、それぞれボックスと下線で示した。太字の配列はプラスミド p d 2 E G F P に由来し、レポーター遺伝子 d 2 E G F P (destabilized Enhanced Green Fluorescent Protein) の翻訳開始点 (d 2 E F G P →) は  $\beta$ -MHC 遺伝子の転写開始点から 1 1 0 塩基 3' 下流に位置する。d 2 E G F の部分アミノ酸配列を一文字表記で示した。

第7図は、本発明の心肥大アッセイ細胞株 (Girardi/ $\beta$ MHC/d2EGFP) の樹立を示

す。ジラルディハート (Girardi Heart) に p  $\beta$  MHC / d 2 E G F P と p S V 2 n e o を同時にトランスフェクトし、G 4 1 8 で選択した複数のコロニーからゲノムを抽出し、d 2 E G F P に対するプライマーで P C R を行った結果を示す、図面に代わる写真である。レーン 3 の細胞株のゲノムには d 2 E G F P が組み込まれていることが分かる。P C はポジティブコントロール (プラスミド p  $\beta$  MHC / d 2 E F G P) を表す。

第 8 図は、本発明の G i r a r d i /  $\beta$  MHC / d 2 E G F P 細胞における d 2 E G F P の発現レベルの R N A ブロットによる検討結果を示す、図面に代わる写真である。C o n t r o l は G i r a r d i H e a r t を示し、B a s a l は無刺激の G i r a r d i /  $\beta$  MHC / d 2 E G F P を示し、E T - 1 は E T - 1 を一過性発現させた G i r a r d i /  $\beta$  MHC / d 2 E G F P を示す。レーン当たり全 R N A 5  $\mu$  g である。

第 9 図は、本発明の G i r a r d i /  $\beta$  MHC / d 2 E G F P 細胞における d 2 E G F P の発現レベルの蛍光度による検討結果を示す。C o n t r o l は G i r a r d i H e a r t を示し、B a s a l は無刺激の G i r a r d i /  $\beta$  MHC / d 2 E G F P を示し、E T - 1 は E T - 1 を一過性発現させた G i r a r d i /  $\beta$  MHC / d 2 E G F P を示す。

第 10 図は、c - m y c 、G A T A - 4 の一過性発現による G i r a r d i /  $\beta$  MHC / d 2 E G F P 細胞の蛍光上昇を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明は、特定の生体现象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標としてスクリーニングする方法に関する。より詳細には、特定の生体现象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標とする方法が、当該遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を融合させた発現コンストラクトを用い、特定の生体现象を誘起する機能分子をスクリーニングする方法に関する。さらに詳細には、特定の生体现象と特異的に連関する遺伝子のプロモーターとレポーター遺伝子とを融合させた遺伝子を培養細胞株のゲノムに組み込んだ細胞株を用いる前記方法に関する。

また、本発明は、特定の生体现象と特異的に連関する遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を融合させた遺伝子に関する。より詳細には、特定の生体现象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標としてその現象に対する機能分子を検出、同定又は評価するための、特定の生体现象と特異的に連関する遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を融合させた遺伝子に関する。

本発明は、前記した本発明の遺伝子で形質転換された形質転換細胞に関する。より詳細には、特定の生体现象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標として検出、同定又は評価するための前記した本発明の遺伝子で形質転換された形質転換細胞に関する。

さらに、本発明は、前記した本発明の遺伝子又は当該遺伝子で形質転換された形質転換細胞を含有してなる、特定の生体现象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標として検出、同定又は評価するためのキットに関する。

また、本発明は、前記した本発明の遺伝子又は当該遺伝子で形質転換された形質転換細胞を含有してなる、特定の生体现象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標として検出、同定又は評価するためのアッセイ系に関する。

本発明は、前記した本発明のスクリーニング方法によりスクリーニングされた機能分子に関する。即ち、検体物質を、特定の生体现象と特異的に連関する遺伝子を含有する形質転換細胞に接触させて、当該細胞における特定の生体现象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標として、検体物質が当該遺伝子の機能分子であるか否かをスクリーニングすることからなるスクリーニングされた機能分子に関する。

本発明の概要を第1図に示した例により説明する。第1図は外界として細胞外からの刺激を受容体を介して受ける場合を例示している。

生物の形態や機能の発現は、刺激の形態は様々であっても最終的には極少数の「マーカー遺伝子」に帰着されることが多く、第1図は様々なアゴニストにより受容体が活性化される場合を例示している。様々なアゴニストにより活性化された受容体は、トランスデューサーやエフェクターなどの細胞内シグナル伝達系に

より核内に伝達され、核内の転写因子によりマーカー遺伝子のプロモーター領域に作用することになる。

一般に、特定の遺伝子のプロモーターの活性の測定は、それ自身の構造遺伝子に代えて別の測定可能な遺伝子（レポーター遺伝子）に置換して行うことができる。本発明の特徴はマーカー遺伝子のプロモーター領域の下流にこのようなレポーター遺伝子を融合させて、レポーター遺伝子の発現によりマーカー遺伝子の発現量を測定可能にしたことである。

本発明は、マーカー遺伝子とレポーター遺伝子の融合した遺伝子を細胞のゲノムに組み込んだ培養細胞株を樹立させて、様々な標的物質による刺激に対する細胞内のマーカー遺伝子の発現量をレポーター遺伝子の発現量を指標として標的物質（検体物質）の機能分子としての有効性を検出、同定又は評価するためのスクリーニングする方法を提供するものである。

心臓の筋肉（心筋）は、高血圧などの外因的ストレスあるいは心筋症のような内因的ストレスに曝されると、肥大という適応現象を起こす。本発明をさらに、この心肥大を例として説明する。心肥大の場合には、前記した第1図においては、マーカー遺伝子として $\beta$ -MHCをコードする遺伝子が例示され、エフェクターとしてはc-myc、転写因子としてはGATA-4などが例示される。

まず、本発明者はアッセイ細胞株を作成した。

心肥大のモデル系で「マーカー遺伝子」を導入させる細胞株には、ヒト右心筋筋から樹立されたジラルディハート（Girardi Heart）（Girardi AJ, et al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1958; 98: 18-22）を採用し、ジラルディハート（Girardi Heart）の核型分析と心肥大に関連する主要な遺伝子の発現パターンを解析した。

このジラルディハート（Girardi Heart）の核型分析を行うために古典的なG-band染色を行った。結果を第2図に図面に代わる写真で示す。さらに、各染色体を個別の色で検出するために、スペクトルカリオタイピング法（Spectral karyotyping（SKY））を行った。結果を第3図に図面に代わる写真で示す。10細胞を分析した結果、平均染色体数は78（3倍体）で、以下の特徴を有していた。

75-79 <3 n>, XX, del (X) (p11p21) [2], del  
 (X) (q23~24) [10], +der (1) t (1;6) (q11;?)  
 [9], +der (1;16) (q10;p10) [7], der (1) t  
 (1;1) (p?;?) [10], +der (3;5) (p10;q10)  
 [10], der (3;16) (q10;q10) [10], der (3)  
 t (3;20) (q11;?) [10], +i (5) (p10) x3 [10],  
 +der (6) dup (6) (p21p23) del (6) (q14) [9],  
 +7 [4], dup (8) (q22q24) [10], der (11) t  
 (11;11) (p11;?) [10], +12 [8], der (12) t  
 (3;12) (q13;q14) [9], +13 [2], add (15)  
 (q22) [2], add (16) (q12) [9], +17 [7], d  
 er (19) t (13;19) (q14;p13) [10], der (22)  
 t (8;22) (?;q13) [10], +0~4mar

次にジラルディハート (Girardi Heart) における遺伝子の発現を、心肥大に関  
 連する主要な遺伝子についてRT-PCR (Reverse-Transcription PCR) で検討  
 した。ジラルディハート (Girardi Heart) から抽出した全RNA、あるいは正常  
 のヒト心筋の全RNAを用いて、定法に従ってcDNAを合成した (Sakamoto A,  
 et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(25):13873-8.)。cDNA合成の  
 確認として、ハウスキーピング遺伝子 (housekeeping gene) であるGAPDH  
 (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase)を用いた。

結果を第4図に図面に代わる写真で示す。第4図の上側は正常なヒト心筋から  
 の全RNA (Clontech社より購入) によるものであり、第4図の下側がジラルデ  
 ィハート (Girardi Heart) によるものである。第4図の左側はマーカーとしての  
 kbラダーである。第4図のその左から、プレプロエンドセリン-1 (prepro  
 -endothelin-1 (ppET-1))、ETAエンドセリン受容体 (ETA endothe  
 lin receptor (ET<sub>A</sub>R))、ETBエンドセリン受容体 (ETB endothelin rec  
 eptor (ET<sub>B</sub>R))、AT1アンジオテンシン受容体 (AT1 angiotensin recep  
 tor (AT<sub>1</sub>R))、 $\alpha$ 1Cアドレナリン受容体 ( $\alpha$ 1C adrenergic receptor  
 ( $\alpha$ 1cAR))、gp130 (カージオトロフィーン-1受容体 (cardiotrophin

-1 receptor) )、トランスフォーミング成長因子 $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ))、タンパクキナーゼC $\beta$  (protein kinase C $\beta$  (PKC $\beta$ ))、c-myc、c-fos、c-ras、及び $\beta$ -MHCであり、右端はcDNA合成の確認のためのGAPDHである。

ジラルディハート (Girardi Heart) では検討した12の心肥大関連遺伝子のうち、 $\alpha 1$ Cアドレナリン受容体とタンパクキナーゼC $\beta$ を除く10の遺伝子が発現しており、心肥大の機能評価系としてのマーカー遺伝子として十分使用できるものと考えられた。

そこで、心筋肥大に対するマーカー遺伝子として $\beta$ -MHCを採用することにして、この「マーカー遺伝子」のプロモーターとレポーター遺伝子との融合を行った。シリアンハムスターの $\beta$ -MHCのプロモーター領域 (Wang, R., et. al. J. Mol. Cell. Cardiol. 26 (9), 1155-1165 (1994)) をPCRで増幅した。得られたPCR産物を第5図に図面に代わる写真で示す。第5図の右側のMはマーカーとしてのkbラダーである。左側の矢印で示されるバンドがPCR産物である。

得られたPCR産物 (第5図) をXhoIとBamHIで消化し、定法に従い、プラスミドpd2EGFP-1のXhoI/BamHI認識部位に挿入した組み替え体 (p $\beta$ MHC/d2EGFP) を調製した。クローン化したPCR断片の塩基配列はDNAシーケンサー (ABI 310) で確認した。完成した発現コンストラクトの部分塩基配列を第6図に示した。その塩基配列を配列表の配列番号1に示す。レポーター遺伝子の翻訳領域のN末端アミノ酸配列の一部を配列表の記載規則に従って配列番号2に示す。

第6図の細字部分の塩基配列は $\beta$ -MHC遺伝子に由来する部分であり、その転写開始点 (+1) の5'上流728塩基から3'下流91塩基までに対応する。TATAボックスとGATA転写因子の結合部位を、それぞれボックスと下線で示す。太字部分はプラスミドpd2EGFPに由来するものであり、レポーター遺伝子d2EGFの翻訳開始点 (d2EGFP $\rightarrow$ ) は $\beta$ -MHC遺伝子の転写開始点から110塩基3'下流に位置する。d2EGFの部分アミノ酸配列をアミノ酸の一字表記で塩基配列の下に示した。

プラスミド p d 2 E G F P - 1 のコードするレポーター遺伝子 d 2 E G F P は、エンハンスド緑色蛍光蛋白質 (Enhanced Green Fluorescent Protein (E G F P)) の変異体で、E G F P のカルボキシル末端に自身の分解速度を高めるマウスのオルニチンデカルボキシラーゼ (ornithine decarboxylase) の P E S T 配列を融合させたものである。その結果、d 2 E G F P のタンパク質の半減期が 2 時間と短く、測定される蛍光強度はその転写量を良く反映すると考えられる。

得られた融合遺伝子を用いてアッセイ細胞株を樹立した。ジラルディハート (Girardi Heart) に、得られた融合遺伝子 p  $\beta$  M H C / d 2 E G F P と G 4 1 8 耐性遺伝子をコードする p S V 2 n e o とを F u G E N E 6 (Boehringer Mannheim 社) 試薬を用いて同時にトランスフェクションした。翌日から選択培地で培養し、得られた耐性コロニーから細胞株 (G i r a r d i /  $\beta$  M H C / d 2 E G F P) を樹立した。

こうして得られた細胞株のゲノムに、p  $\beta$  M H C / d 2 E G F P が実際に組み込まれているか否かを P C R で検討した。結果を第 7 図に図面に代わる写真で示す。第 7 図は、G 4 1 8 で選択した複数のコロニーからゲノムを抽出し (レーン 1 ~ 3) d 2 E G F P に対するプライマーで P C R を行った。レーン 3 の細胞株のゲノムには d 2 E G F P が組み込まれていることが分かった。第 7 図の右側の P C はポジティブコントロール (プラスミド p  $\beta$  M H C / d 2 E G F P) を表す。

樹立したアッセイ細胞株 (G i r a r d i /  $\beta$  M H C / d 2 E G F P) に既知の心肥大誘発分子であるエンドセリン-1 (endothelin-1) を発現させ、レポーター遺伝子 (d2EGFP) の発現レベルを検討した。S R  $\alpha$  プロモーターの下流にヒト p r e p r o - E T - 1 (p p E T - 1) c D N A を組み込んだプラスミド p M E 1 8 S / p p E T - 1 を、F u G e n e 試薬を用いて G i r a r d i /  $\beta$  M H C / d 2 E G F P に一過性発現させ、トランスフェクション 4 8 時間後にアッセイした。レポーター遺伝子 (d 2 E G F P) の発現レベルは、放射性同位元素を用いた R N A プロットで直接定量した。結果を第 8 図に図面に代わる写真で示す。第 8 図のコントロールはジラルディハート (Girardi Heart) であり、B a s a l は無刺激の形質転換体 G i r a r d i /  $\beta$  M H C / d 2 E G F P であり、E T - 1 は E T - 1 を一過性発現させた G i r a r d i /  $\beta$  M H C / d 2 E G F P

である。レーン当たり 5  $\mu$ g の全 RNA を用いた。

第 8 図に示される G i r a r d i /  $\beta$  M H C / d 2 E G F P 細胞における d 2 E G F P の発現レベルの RNA プロットによる検討結果において、それが発する蛍光強度も測定した。蛍光の測定には、Wallac 1420 ARV0sx を用いた。結果を第 9 図に示す。第 9 図のコントロール、B a s a l、及び E T - 1 は前記第 8 図の場合と同じである。

いずれの場合にも、無刺激で  $\beta$  - M H C プロモーターによる基本転写活性をある程度は認めたが、d 2 E G F P の転写レベルは刺激で有意に上昇し、本発明のアッセイ系の妥当性が確認できた。

先に動作確認に用いたエンドセリン-1 (endothelin-1) は生理活性ペプチドであり、細胞の外側から細胞膜表面の受容体に結合して作用する。心肥大誘発分子はこれ以外にも、細胞質に存在するプロト-オンコジーン (proto-oncogene (c - m y c など)) や核内の転写因子 (G A T A - 4 など) などが知られている。そこで、今回開発したアッセイ細胞株が、こうした様々な部位で機能する心肥大誘発分子の活性も検出できるか否かを検討した。

p M E 1 8 S / c - m y c あるいは p M E 1 8 S / G A T A - 4 を、F u G e n e 試薬を用いて G i r a r d i /  $\beta$  M H C / d 2 E G F P に一過性発現させ、その蛍光を W a l l a c 1 4 2 0 A R V O s x を用いて測定した。結果を第 1 0 図に示す。第 1 0 図のコントロール、B a s a l、及び E T - 1 は前記第 8 図の場合と同じであり、その右側が c - m y c 及び G A T A - 4 である。この結果、いずれの場合にも蛍光は有意に上昇し、細胞内物質についても本発明のアッセイ系が極めて有効であることが確認された。

以上のように本発明の方法は、マーカー遺伝子に着目した新規なアッセイ系を提供するものであり、本発明の方法により、細胞外及び細胞内における様々な刺激に対するアッセイが簡便な方法で可能となった。例えば、単離・同定したい標的分子の細胞内局在を問題にしないのならば、アッセイ細胞株自身に c D N A ライブラリーをトランスフェクションさせれば良い。一方、標的分子をエンドセリン-1 (endotehlin-1) のような分泌型の生理活性物質に的を絞るならば、アッ

セイ細胞株とは別の細胞に cDNA ライブラリー発現させ、両者を共培養させる方法が効果的である。共培養でアッセイ細胞株のレポーター遺伝子の発現レベルが上昇するのは、cDNA 発現細胞から培養上清中に生理活性物質が分泌される場合に限られるからである。もちろん本発明の方法は、古典的な生化学手法で精製した標品（ペプチドに限らず、脂質、ガス性物質を含む）のアッセイにも有用である。また、標的分子の単離は、cDNA ライブラリー全体をトランスフェクションする以外にも、限られた候補 cDNA を個別にトランスフェクションする方法も有効である。

機能分子を探索する方法としては、例えば、未分化と分化状態あるいは正常と病気など発現レベルが異なる cDNA を単離・同定する有力な方法として、サブトラクションハイブリダイゼーション法（subtractive hybridization 法）やディファレンシャルディスプレイ法（differential display 法）など既にいくつかの方法が報告されている。しかし、こうした方法で単離される数多くの cDNA の中から、興味ある形質を誘導するものを同定する方法はこれまで無かった。本発明の方法はこのような方法で探索された cDNA の中から、その機能や作用する遺伝子を特定するための極めて有効な方法となる。

また、ヒトの全ゲノム配列はほぼ決定され、配列から多数の遺伝子の存在が予測されているが、そのほとんどは機能不明である。重要な機能分子を効率よく同定する方法はポストゲノム研究においては必須の技術である。本発明の方法は、発現量や配列をもとにリストアップされた候補 cDNA の中から、目的の活性を有するものを効率よく同定することにも威力を発揮するはずである。したがって、ゲノム解析における機能分析においても本発明の方法は極めて有効な手法となるものである。

本発明の方法には、大きく二つの特徴がある。まず第一に、様々な生物活性を有する機能分子の単離・同定を、培養細胞における「マーカー遺伝子」の発現を指標として行うことで、特殊な生物活性のアッセイ系を不要とした点である。第二に、目的の形質発現に関与する広範な機能分子群の単離・同定を、単一の方法で可能にした点である。すなわち、細胞外から作用する分泌型の生理活性物質のみならず、細胞質内あるいは核内で機能する情報伝達分子や転写因子などの同定

も、本発明の方法により可能である。

さらに、本発明のアッセイ系はきわめて高感度で、96穴や384穴などのマイクロタイタープレートと蛍光プレートリーダーで十分に測定可能である。本発明の方法は、ポストゲノム時代において創薬の対象となりうる有用分子の同定に絶大な威力を発揮するものと期待される。

本発明は、特定の生体现象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標として、スクリーニングする方法を提供するものであり、本発明の特定の生体现象としては、前記した例における心肥大に限定されるものではなく、生体組織や細胞における様々な形態の変化や機能の発現などの各種の現象を包含するものである。これらの現象の中で当該現象と特異的に関連する遺伝子（マーカー遺伝子）が存在していることが必要である。マーカー遺伝子としては前記の例に示した $\beta$ -MHCをコードする遺伝子に限定されるものではなく、当該現象と特異的に関連する遺伝子であればよい。本発明の方法におけるマーカー遺伝子としては、特異的な関連があるものであるが、必ずしも特異的な関連性があることが知られている遺伝子に限定されるものではなく、特定の生体现象に関連性があると推定される遺伝子も使用することができる。このような遺伝子については、本発明の方法により公知の機能分子を用いてその関連性をさらに詳細に計測することが可能である。

本発明の特徴のひとつは、特定の生体现象と特異的に連関する遺伝子（マーカー遺伝子）の発現量を指標とする方法として、当該遺伝子のプロモーター領域に着目した点が挙げられる。マーカー遺伝子のプロモーター領域の入手方法は公知の方法により行うことができる。

また、本発明の方法は、このプロモーター領域の下流にレポーター遺伝子を融合させることにより、マーカー遺伝子の発現量をレポーター遺伝子を用いた簡便な手段により計測可能にしたことを特徴とするものでもある。本発明のレポーター遺伝子としては、レポーターとしての機能を果たすものであればよく、例えば、蛍光蛋白質をコードする遺伝子が好ましいが、これに限定されるものではなく蛍光若しくは放射性的のプローブを用いて検出や同定が可能な遺伝子を本発明のレポーター遺伝子として使用することもできる。

レポーター遺伝子としては、例えば、緑色蛍光蛋白質（Green Fluorescent Protein（GFP））、赤色蛍光蛋白質（Cyan Fluorescent Protein（CFP））、青色蛍光蛋白質（Blue Fluorescent Protein（BFP））、黄色蛍光蛋白質（Yellow Fluorescent Protein（YFP））、ルシフェラーゼ（luciferase）、若しくは $\beta$ -ガラクトシダーゼ（ $\beta$ -galactosidase）、又はこれらの改良型若しくは変異体を使用することができる。

本発明のマーカー遺伝子のプロモーターとレポーター遺伝子の融合遺伝子の製造方法も特に制限はないが、通常はレポーター遺伝子を含有するプラスミドに当該レポーター遺伝子の翻訳開始点よりも上流側にマーカー遺伝子のプロモーター領域を挿入する方法が簡便で好ましい。挿入位置は特に制限はないが、プロモーターの機能に影響を与えない位置であればよい。

また、本発明のマーカー遺伝子のプロモーターとレポーター遺伝子の融合遺伝子は、培養細胞株のゲノムに組み込むのが好ましい。このような細胞株としては、ヒト、マウス、ラットなどの各種の動物細胞や大腸菌や酵母などの微生物が使用できる。

本発明のスクリーニング方法は、検体物質を検出、同定又は定量することができるものであり、また検体物質の機能分子としての作用を評価する方法も包含するものである。

また、本発明のスクリーニング方法では、特定の生体现象と特異的に連関する遺伝子（マーカー遺伝子）として、1種または2種以上のものを同時又は随時に使用することもできる。マーカー遺伝子が複数存在する場合には、同時に複数種のマーカー遺伝子を使用することにより、本発明のスクリーニング方法の精度を上げることができる。例えば、前記の心筋肥大についての例においては、マーカー遺伝子として $\beta$ -MHCのみならずBNPをコードする遺伝子をさらにマーカー遺伝子として使用することもできる。

また、本発明は、特定の生体现象と特異的に連関する遺伝子（マーカー遺伝子）のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を融合させた遺伝子を提供するものである。このような遺伝子としては融合遺伝子だけであってもよいし、適当なベクターに挿入された遺伝子であってもよい。本発明の遺伝子におけるマーカー

遺伝子やレポーター遺伝子としては前記したものが使用される。本発明の遺伝子の例としては、配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列にストリンジントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を挙げられる。

本発明の前記遺伝子は、特定の生体現象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標としてスクリーニングし、検出、同定又は評価するための遺伝子である。したがって、本発明の遺伝子は特定の生体現象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標としてスクリーニングする際に使用されるスクリーニング材料を提供するものである。

本発明は、前記した本発明の遺伝子を含有してなる、特定の生体現象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標として検出、同定又は評価するためのキットを提供するものである。このような遺伝子としては、同種の生体現象と特異的に連関する遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を融合させた遺伝子の 1 種以上をさらに含有することができる。この場合にマーカー遺伝子に対応してレポーター遺伝子を異なる種類、例えばレポーター遺伝子が蛍光蛋白質の遺伝子である場合には蛍光の色をマーカーに対応させて変えることもできる。これにより蛍光の色の変化により多数のマーカー遺伝子の発現を混合した色の色調により目視可能となる。

また、98 穴や 328 穴のマイクロタイタープレートと蛍光プレートリーダーを用いて、1 又は 2 以上のアッセイを同時に行うこともできる。本発明のスクリーニング方法は感度がよく、少量で確実なスクリーニング系を提供するものである。

さらに、本発明は、前記した本発明の遺伝子で形質転換された形質転換細胞を提供するものである。本発明の形質転換細胞は、本発明の方法に適しているのみでなく、細胞におけるマーカー遺伝子の作用を評価するためにも有用なものである。本発明の形質転換細胞は、本発明の遺伝子が転写可能な状態で宿主細胞に挿入されたものであればよいが、好ましくはゲノム中に挿入されたものである。形質転換の方法としては、公知の種々の方法を使用することができる。

## 実施例

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

なお、以下の実施例に示すジラルディハート (Girardi Heart) 細胞株は、ヒト右心房筋から樹立されたものであり (Girardi AJ, et al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1958; 98: 18-22)、大日本製薬から購入した。各種の遺伝子操作は、公知の遺伝子操作手段を採用するか、メーカーのマニュアルに従って操作された。

#### 実施例 1 (ジラルディハート (Girardi Heart) 細胞株の核型分析)

古典的な G-バンド染色を行った。結果を第 2 図に示す。

また、各染色体を個別の色で検出するスペクトルカリオタイピング (Spectral karyotyping (SKY)) を行った。結果を第 3 図に示す。

この結果、10 細胞を分析した結果、平均染色体数は 78 (3 倍体) で、前記した特徴を有していることがわかった。

#### 実施例 2 (遺伝子の発現)

ジラルディハート (Girardi Heart) における発現、心筋肥大に関連する主要な遺伝子のを RT-PCR (Reverse-Transcription PCR) で検討した。

ジラルディハート (Girardi Heart) から抽出した全 RNA (10  $\mu$ g)、あるいは正常のヒト心筋からの全 RNA (10  $\mu$ g、Clontech 社より購入。) から、ランダムプライマー (random primer) を用いた定法に従って cDNA を合成し、全量 100  $\mu$ l に調製した (Sakamoto A, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(25):13873-8.)。PCR は、ABI 9700 を用い、以下の反応系条件で行った。

|                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| H <sub>2</sub> O                      | 6.15 $\mu$ L |
| 10x バッファー                             | 1.0 $\mu$ L  |
| dNTP (各々 2.5 mM)                      | 0.8 $\mu$ L  |
| 順方向プライマー (forward primer: 10 $\mu$ M) | 0.5 $\mu$ L  |
| 逆方向プライマー (reverse primer: 10 $\mu$ M) | 0.5 $\mu$ L  |

|                 |      |         |
|-----------------|------|---------|
| c D N A         | 1    | $\mu$ L |
| E x T a q (宝酒造) | 0.05 | $\mu$ L |
| 合計              | 10   | $\mu$ L |

94℃で1分の後、94℃で20秒、55℃あるいは65℃で30秒、72℃で1分を35サイクル行った。

解析した心肥大関連遺伝子とプライマーセット (forward primer / reverse primer) は以下の通りである。また c D N A 合成の確認として、ハウスキーピング遺伝子 (housekeeping gene) である G A P D H (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) を用いた。

prepro-endothelin-1 (ppET-1):

5' -CCAAGGAGCTCCAGAAACAG-3' / 5' -TTGACCCAGATGATGTCCAG-3'

ETA endothelin receptor (ET<sub>A</sub>R):

5' -TCTGCGCGCTAAGTGTTGACAGGT-3' / 5' -TCATCAGGCTTTAGGACTGGTAAC-3'

ETB endothelin receptor (ET<sub>B</sub>R):

5' -TCTCTGTGGTTCTGGCTGTC-3' / 5' -TGCTGAGGTGAAGGGGAAGC-3'

AT1 angiotensin receptor (AT<sub>1</sub>R):

5' -GCTGAAGACTGTGGCCAGTG-3' / 5' -ATGCAGGTGACTTTGGCTAC-3'

$\alpha$ 1C adrenergic receptor ( $\alpha$ 1cAR):

5' -TCCACGGTGCTGCCCTTCTC-3' / 5' -TTGATCTGGCAGATGGTCTC-3'

gpl30 (cardiotrophin-1 receptor):

5' -CAGAATGTGTATGGAGTCAC-3' / 5' -ACCCAGACTTCAATGTTGAC-3'

transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ):

5' -AACTATTGCTTCAGCTCCAC-3' / 5' -ACGTAGTACACGATGGGCAG-3'

protein kinase C $\beta$  (PKC $\beta$ ):

5' -GCAGCCACTGCACCGACTTC-3' / 5' -ACGTAGGGATCTGACAAGCC-3'

c-myc:

5' -ACAGCAAACCTCCGCACAG-3' / 5' -TGGTCACGCAGGGCAAAAA-3'

c-fos:

5' -GCCCCATCGCAGACCAGAGC-3' / 5' -ATGCTGCTGATGCTCTTGAC-3'

c-ras:

5' -CACCATAGAGGTGAGCTCTG-3' / 5' -TCCTCTTGGCCTGCTGTGTC-3'

$\beta$ -MHC:

5' -CGCATGGACCTGGAGCGAGC-3' / 5' -CGCCGCATCTTCCGGAATC-3'

GAPDH:

5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' / 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

結果を第4図に示す。

ジラルディハート (Girardi Heart) では検討した12の心肥大関連遺伝子のうち、 $\alpha 1C$  adrenergic receptorとprotein kinase  $C\beta$ を除く10の遺伝子が発現しており、心肥大の機能評価系として十分使用に耐えると考えられた。

### 実施例3 (「マーカー遺伝子」のプロモーターとレポーター遺伝子との融合)

心肥大のマーカー遺伝子としては、 $\beta$ -MHC ( $\beta$ -myosin heavy chain) を用いた。シリアンハムスターの $\beta$ -MHCのプロモーター領域 (Wang, R., et. al. J. Mol. Cell. Cardiol. 26 (9), 1155-1165 (1994)) をPCRで増幅した。用いたプライマーは以下の通りである。

Forward primer (F1) : 5' -CGCTCGAGGAAGCTGTGTGACCTTGGAG-3'

Reverse primer (R2) : 5' -CGGGATCCCTCTTCCTGAATCTGGAGCC-3'

下線の配列はゲノムに対応し、それ以外は後にプラスミド (pd2EGFP-1) に組み込むための付加的な制限酵素認識配列である。PCRは以下の反応系条件で行った。

|                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| H <sub>2</sub> O                      | 6.15 $\mu$ L |
| 10xバッファー                              | 1.0 $\mu$ L  |
| dNTP (各々2.5mM)                        | 0.8 $\mu$ L  |
| 順方向プライマー (forward primer: 10 $\mu$ M) | 0.5 $\mu$ L  |
| 逆方向プライマー (reverse primer: 10 $\mu$ M) | 0.5 $\mu$ L  |
| cDNA                                  | 1 $\mu$ L    |
| Ex Taq (宝酒造)                          | 0.05 $\mu$ L |

合計

10

 $\mu$ L

94℃で1分の後、94℃で20秒、65℃で30秒、72℃で1分を35サイクル行った。

得られたPCR産物（第5図）をXhoIとBamHIで消化し、定法に従い、プラスミドp d2EGFP-1のXhoI/BamHI認識部位に挿入した組み換え体（p $\beta$ MHC/d2EGFP）を調製した。クローン化したPCR断片の塩基配列はDNAシーケンサー（ABI 310）で確認した。完成した発現コンストラクトの部分塩基配列を第6図に示した。プラスミドp d2EGFP-1のコードするレポーター遺伝子d2EGFPは、Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) の変異体で、EGFPのカルボキシル末端に自身の分解速度を高めるマウスのオルニチンデカルボキシラーゼ（ornithine decarboxylase）のPEST配列を融合させたものである。その結果、d2EGFPのタンパク質の半減期が2時間と短く、測定される蛍光強度はその転写量を良く反映すると考えられる。

#### 実施例4 （アッセイ細胞株の樹立）

$\phi$  3.5 cmのディッシュに50%の密度で生着させたジラルディハート（Girardi Heart）に、p $\beta$ MHC/d2EGFP（1  $\mu$ g）とG418耐性遺伝子をコードするpSV2neo（0.1  $\mu$ g）とをFuGENE 6（Boehringer Mannheim社）試薬を用いて同時にトランスフェクションした。翌日から選択培地（0.5 mg/mlのG418を含有）で培養し、得られた耐性コロニーから細胞株（Girardi/ $\beta$ MHC/d2EGFP）を樹立した。

こうして得られた細胞株のゲノムに、p $\beta$ MHC/d2EGFPが実際に組み込まれているか否かをPCRで検討した。用いたプライマーセットは、

GFP-F: 5' -TCGCCACCATGGTGAGCAAG-3'

GFP-R: 5' -CCTAGCAGAAGCACAGGCTG-3'

で、反応条件はアニーリング温度を55℃にした以外は、 $\beta$ -MHCの場合と同一で行った。結果を第7図に示す。

#### 実施例 5 (アッセイ細胞株の検定)

樹立したアッセイ細胞株 (G i r a r d i /  $\beta$  M H C / d 2 E G F P) に既知の心肥大誘発分子である e n d o t h e l i n - 1 を発現させ、レポーター遺伝子 (d 2 E G F P) の発現レベルを検討した。S R  $\alpha$  プロモーターの下流にヒト p r e p r o - E T - 1 c D N A を組み込んだプラスミド p M E 1 8 S / p p E T - 1 を、F u G e n e 試薬を用いて G i r a r d i /  $\beta$  M H C / d 2 E G F P に一過性発現させ、トランスフェクション 48 時間後にアッセイした。レポーター遺伝子 (d 2 E G F P) の発現レベルは、放射性同位元素を用いた R N A b l o t で直接定量した (第 8 図) 上で、それが発する蛍光強度でも測定した (第 9 図)。蛍光の測定には、W a l l a c 1 4 2 0 A R V O s x マルチラベルカウンター (e x c i t a t i o n 4 8 5 n m、e m i s s i o n 5 3 5 n m) を用いた。いずれの場合にも、無刺激で  $\beta$  - M H C プロモーターによる基本転写活性をある程度は認めたが、d 2 E G F P の転写レベルは刺激で有意に上昇し、系の妥当性が確認できた。

#### 産業上の利用可能性

本発明は、新規かつ高感度で、簡便な機能分子のアッセイ系及びスクリーニング系を提供する。本発明の方法は、マーカー遺伝子と機能分子の特異性に着目することにより、細胞内外における刺激によるマーカー遺伝子の発現をレポーター遺伝子を用いて簡便に検出、同定、又は測定できる方法を提供するものである。

本発明は、第一に、様々な生物活性を有する機能分子の単離・同定を、培養細胞における「マーカー遺伝子」の発現を指標として行うことで、特殊な生物活性のアッセイ系を不要とし、第二に、目的の形質発現に関与する広範な機能分子群の単離・同定を、単一の方法で可能にしたものである。すなわち、細胞外から作用する分泌型の生理活性物質のみならず、細胞質内あるいは核内で機能する情報伝達分子や転写因子などの同定も、本発明の方法で可能となる。

本発明は、重要な機能分子を効率よく同定する方法であり、ポストゲノム研究においては必須の技術となるものであり、発現量や配列をもとにリストアップさ

れた候補 c D N A の中から、目的の活性を有するものを効率よく同定することにも威力を発揮するものである。

## 請 求 の 範 囲

1. 特定の生体現象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標として、スクリーニングする方法。
2. 特定の生体現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標とする方法が、当該遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を融合させた発現コンストラクトを用いる方法である請求の範囲第1項に記載の方法。
3. レポーター遺伝子が、蛍光蛋白質をコードする遺伝子である請求の範囲第2項に記載の方法。
4. レポーター遺伝子が、緑色蛍光蛋白質 (Green Fluorescent Protein (GFP))、赤色蛍光蛋白質 (Cyan Fluorescent Protein (CFP))、青色蛍光蛋白質 (Blue Fluorescent Protein (BFP))、黄色蛍光蛋白質 (Yellow Fluorescent Protein (YFP))、ルシフェラーゼ (luciferase)、若しくは $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -galactosidase)、又はその改良型である請求の範囲第3項に記載の方法。
5. 特定の生体現象と特異的に連関する遺伝子のプロモーターとレポーター遺伝子のcDNAとを融合させた発現コンストラクトが、培養細胞株のゲノムに組み込むんだ細胞株を用いる請求の範囲第2項～第4項のいずれかに記載の方法。
6. 特定の生体現象と特異的に連関する遺伝子が、2種以上である請求の範囲第1項～第5項のいずれかに記載の方法。
7. 機能分子が、心肥大を誘発する物質である請求の範囲第1項～第6項のいずれかに記載の方法。
8. 培養細胞が、ヒト心臓由来の細胞株であるジラルディハート (Girardi Heart) である請求の範囲第7項に記載の方法。
9. 心肥大と特異的に関連する遺伝子が、 $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC) 及び／又はBrain Natriuretic peptide (BNP) の遺伝子である請求の範囲第7項又は第8項に記載の方法。
10. 特定の生体現象と特異的に連関する遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を融合させた遺伝子。

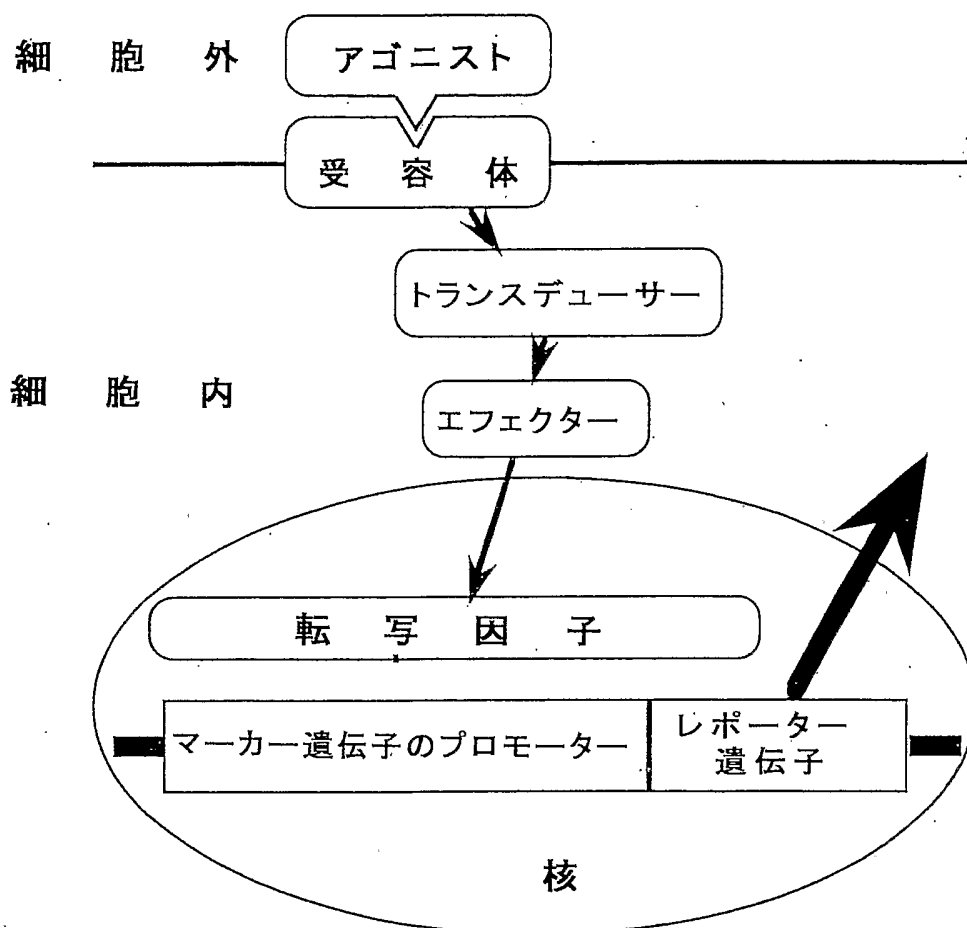
- 1 1. レポーター遺伝子が、蛍光蛋白質をコードする遺伝子である請求の範囲第 1 0 項に記載の遺伝子。
- 1 2. 遺伝子が、レポーター遺伝子を含有するプラスミドのレポーター遺伝子上流に特定の生体现象と特異的に連関する遺伝子のプロモーターが導入されたプラスミドである請求の範囲第 1 0 項又は第 1 1 項に記載の遺伝子。
- 1 3. 特定の生体现象と特異的に連関する遺伝子が、心肥大と特異的に関連する遺伝子である請求の範囲第 1 0 項～第 1 2 項のいずれかに記載の遺伝子。
- 1 4. 心肥大と特異的に関連する遺伝子が、 $\beta$ -MHC 及び／又は BNP の遺伝子である請求の範囲第 1 3 項に記載の遺伝子。
- 1 5. 遺伝子が、配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有するものである請求の範囲第 1 0 項～第 1 4 項のいずれかに記載の遺伝子。
- 1 6. 請求の範囲第 1 0 項～第 1 5 項のいずれかに記載の遺伝子を含有してなる、特定の生体现象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標として検出、同定又は評価するための遺伝子。
- 1 7. 請求の範囲第 1 0 項～第 1 5 項のいずれかに記載の遺伝子を含有してなる、特定の生体现象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標として検出、同定又は評価するためのキット。
- 1 8. 遺伝子が、同種の生体现象と特異的に連関する遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を融合させた遺伝子の 1 種以上をさらに含有するものである請求の範囲第 1 7 項に記載のキット。
- 1 9. レポーター遺伝子が、特定の生体现象と特異的に連関する遺伝子に応じて異種のものである請求の範囲第 1 7 項又は第 1 8 項に記載のキット。
- 2 0. マイクロタイタープレートと蛍光プレートリーダーを用いて、1 又は 2 以上のアッセイを同時に行うための請求の範囲第 1 7 項～第 1 9 項のいずれかに記載のキット。
- 2 1. 請求の範囲第 1 0 項～第 1 5 項のいずれかに記載の遺伝子で形質転換された形質転換細胞。

22. 請求の範囲第10項～第15項のいずれかに記載の遺伝子で形質転換された、特定の生体現象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標として検出、同定又は評価するための形質転換細胞。

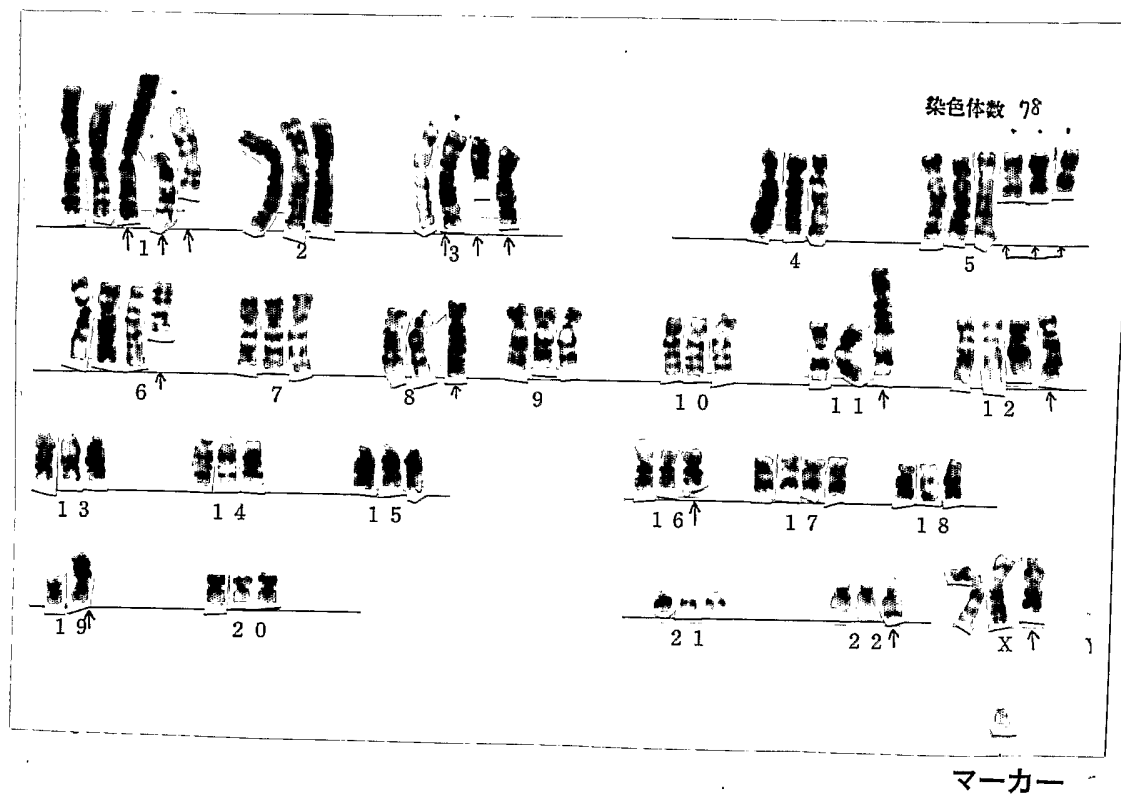
23. 遺伝子がゲノムに導入されたものである請求の範囲第21項又は第22項に記載の形質転換細胞。

24. 細胞が、ヒト心臓由来の細胞株であるジラルディハート (Girardi Heart) である請求の範囲第21項～第23項のいずれかに記載の形質転換細胞。

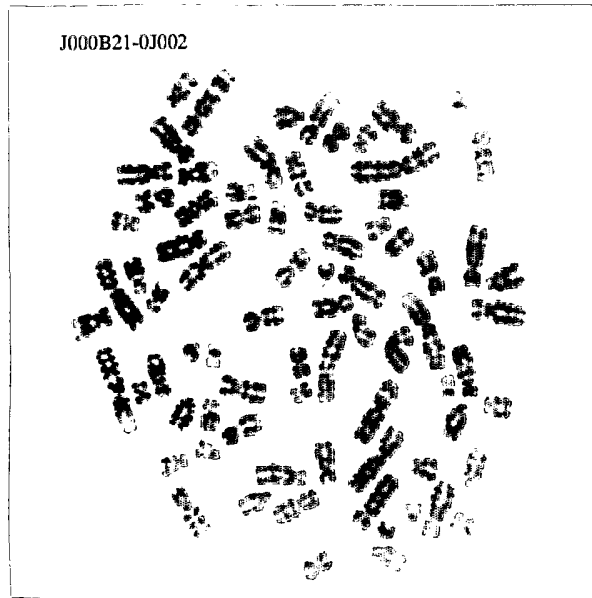
## 第 1 図



第 2 図



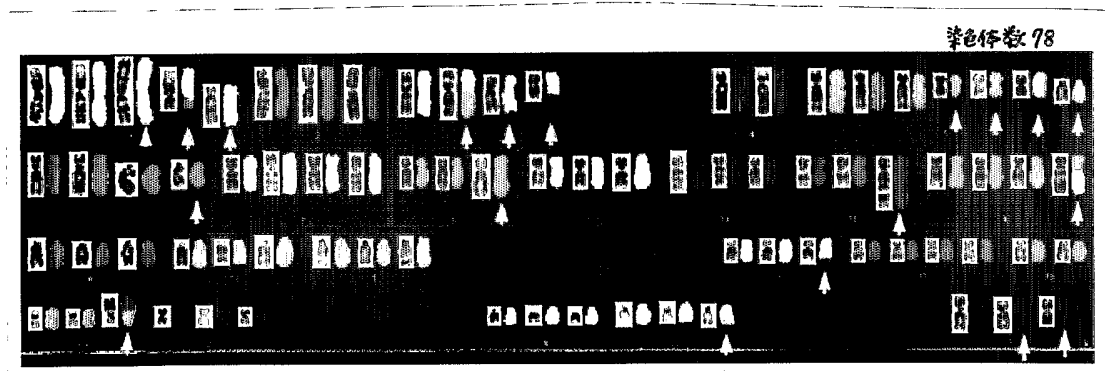
第 3 図



逆DAPIの分染

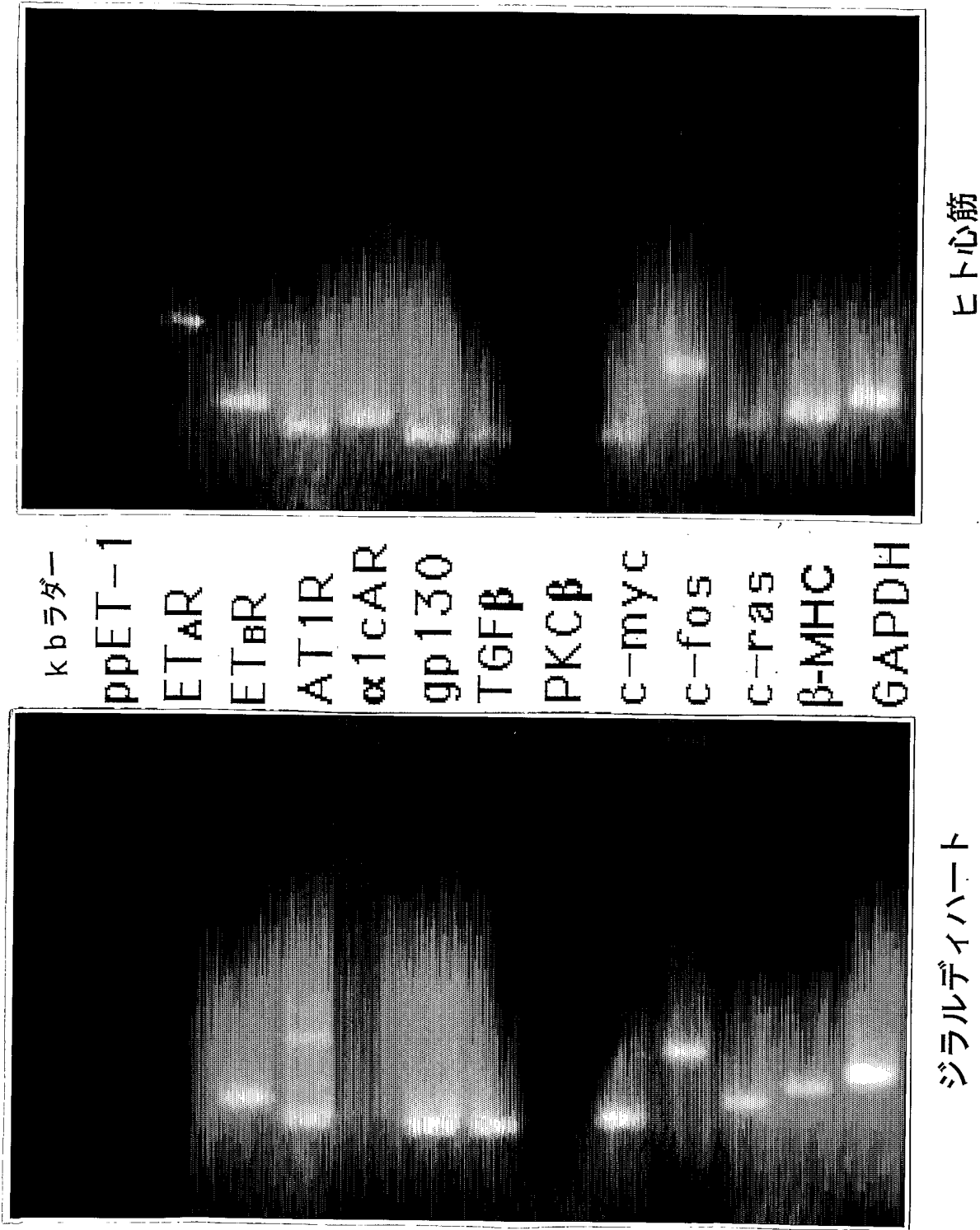


スペクトルカリオタイピング (SKY)

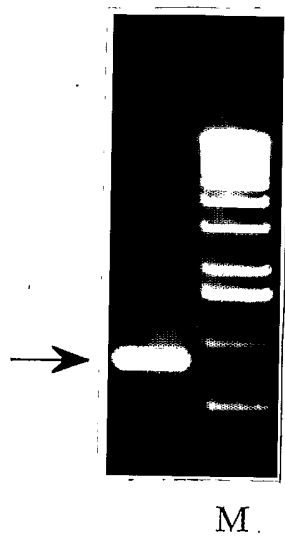


包括的カリオタイピング (左側：逆DAPI; 右側：SKY)

第 4 図



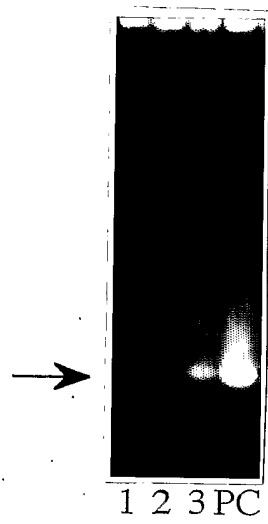
第 5 図



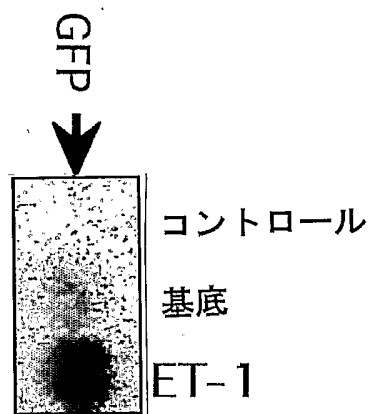
TAGCGCTACC GGACTCAGAT CTCGAGGAAG CTGTGTGACC TTGGAGGAGG CACTCCCACC 60  
TCCATAAACT AAAGCACTCA CTTGGATGGA TCACCAGAGA CCTGTCTGGC TCTGAGGCTC 120  
GGTGACCTCA ACACATTGTC TGTGGCCCA AGGAAAGCGG TGCCTGAGCC AGAGTTCCAG 180  
TGTCATAACT CTGGTCATTC TTCTTCCTCC TTAAC TAGGA AGCTGCCCTCC TAGCTGCTCC 240  
AATCCAGCTG CCATACCAGG GCCATGCCCG ACTCTGCCCT GCCCCTCTTT GCTGTGGTAA 300  
CTAGGCCCCCT TCCCACCTCA GTGAGATGTG GGACTCAGGC CAGTAGAGTA GGGAGGATTC 360  
TGGAACACA GCCAGGCTAG TGCTGGGGGC CAGGACTCCA AGGGCAGCA TGCCAGGGCA 420  
GGGCAGGGCT CTGTCTGCCCT AAGGTCATGG TGGTCGTTGT CAGCTTACTC TGCAGTGAGC 480  
TGTTGGAATGT AAGAGATATT TTCTGTTCGC TTGAGCCAC CCCACCCCTT GGAAC TCAGA 540  
CCCTGAACAT GCCATGCCAC AACAATGACG ACCACTTCCA ATTGTTTCCT GGCTGGGGG 600  
GGAGGGGGAG CACTGTTTGG ACAAGGGAAG GGGGGGAGTC GAGGGGAAA TGC TTTTAGT 660  
GACAAACAGCC CTTTCTAAAT CTGGCTAGGG ACTGGGTGCA GGTGGGGGTG GGGGCACCTT 720  
CTGCCCACTA TATACAACCC CTGAGGCCAG GTCTGACTCT GAGGAGTCTC CTGCTGTTC 780  
CTTCCTTGCT GCCCTCAGGT AGGAGTGGGA GCTGGAGGCC TCCTCTGGGA TAAAGGGCTC 840  
CAGATTCAGG AAGAGGGATC CACCGGTCCG CACCATGGTG AGCAAGGGCG AGGAGCTGTT 900  
M V S K G E L F

編  
号  
記

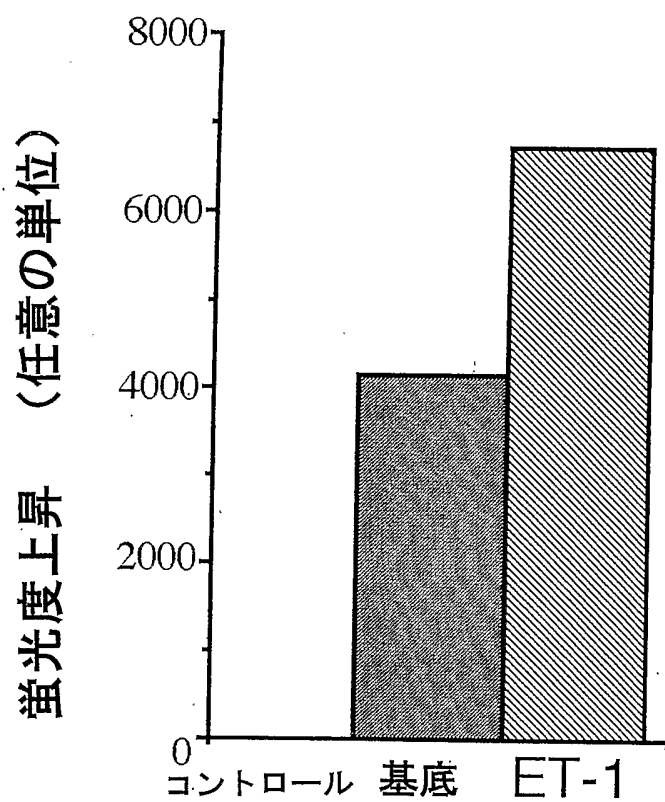
第 7 図



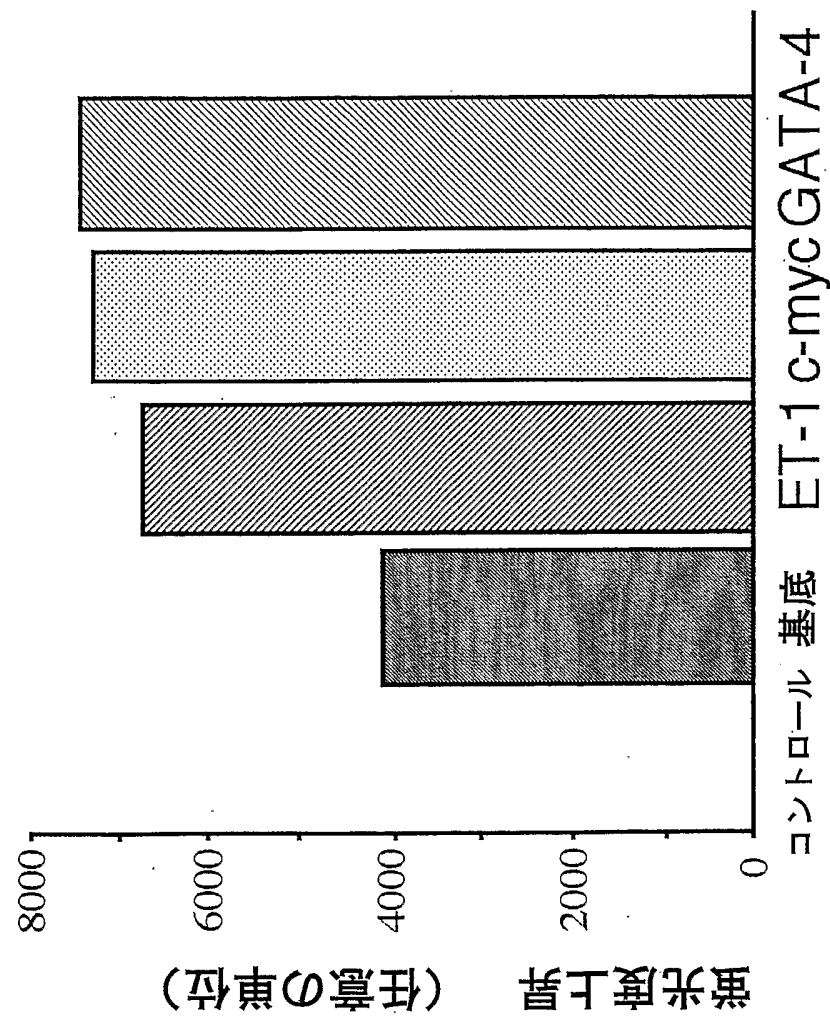
第 8 図



第 9 図



第 10 図



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

<120> A Method for Evalution or Identification for Bioactive Molecules  
with the Use of Marker Genes.

<130> JA902001

<150> JP 2001-327576

<151> 2001-10-25

<150> JP 2002-034378

<151> 2002-02-12

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 900

<212> DNA

<213> Hamster sp.

<220>

<221> CDS

<222> (875)..(901)

<400> 1

tagcgctacc ggactcagat ctcgaggaag ctgctgacc ttggaggagg cactcccacc 60

tccataaact aaagcactca cttggatgga tcaccagaga cctgtctggc tctgaggctc 120

ggtgacctca acacattgtc tgcctggcca aggaagcgg tgcctgagcc agagtccag 180

tgctataact ctggctattc ttcttcttcc ttaactagga agctgcctcc tagctgctcc 240

aatccagctg ccataccagg gccatgcccg actctgccct gccctcttt gctgtggtaa 300

ctaggcccct tcccacctca gtgagatgtg ggactcaggc cagtagagta gggaggattc 360

tggaaacaga gccaggctag tgctgggggc caggactcca aggggcagca tgccagggca 420

gggcagggtc ctgtctgcct aaggctatgg tggctgttgt cagcttactc tgcagtgagc 480

tgtggaatgt aagagatatt ttctgttcgc tttagaccac cccacccctt ggaactcaga 540

ccctgaacat gccatgccac aacaatgacg accacttcca attgtttcct ggctgggggg 600

ggagggggag cactgttttg acaagggaag ggggggagtc gagggggaaa tgcctttagt 660

gacaacagcc ctttctaaat ctggctaggg actgggtgca ggtgggggtg ggggcacctt 720

ctgcccata tatacaacct ctgaggccag gcttgactct gagcagctc ctgctgttcc 780

cttccttgct gccctcaggt aggagtggga gctggaggcc tcctctggga taaggggctc 840

cagattcagg aagagggatc caccggtcgc cacc atg gtg agc aag ggc gag gag 895

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu

1

5

ctg ttc

901

Leu Phe

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Hamster sp.

<400> 2

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe

1

5

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

prepro-endothelin-1 (ppET-1) , forward primer

<400> 3

ccaaggagct ccagaaacag

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

prepro-endothelin-1 (ppET-1) , reverse primer

<400> 4

ttgacccaga tgaatgccag

20

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

ETA endothelin receptor (ET<sub>A</sub>R) , forward primer

<400> 5

tctgcgcgct aagtgttgac aggt

24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

ETA endothelin receptor (ET<sub>A</sub>R) , reverse primer

<400> 6

tcatcaggct ttaggactgg taac

24

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

ETB endothelin receptor (ET<sub>B</sub>R) , forward primer

<400> 7

tctctgtggt tctggctgtc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

ETB endothelin receptor (ET<sub>B</sub>R) , reverse primer

<400> 8

tgctgaggtg aaggggaagc

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

AT1 angiotensin receptor (AT1R) , forward primer

<400> 9

gctgaagact gtggccagtg

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

AT1 angiotensin receptor (AT1R) , reverse primer

<400> 10

atgcagggtga ctttggctac

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

$\alpha$ 1C adrenergic receptor ( $\alpha$ 1cAR) , forward primer

<400> 11

tccacgggtgc tgcccttctc

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

$\alpha$ 1C adrenergic receptor ( $\alpha$ 1cAR) , reverse primer

<400> 12

ttgatctggc agatgggtctc

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

gp130 (cardiotrophin-1 receptor) , forward primer

<400> 13

cagaatgtgt atggagtcac

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

gp130 (cardiotrophin-1 receptor) , reverse primer

<400> 14

accagactt caatgttgac

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) , forward primer

<400> 15

aactattgct tcagctccac

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) , reverse primer

<400> 16

acgtagtaca cgatgggcag

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

protein kinase C $\beta$  (PKC $\beta$ ) , forward primer

<400> 17

gcagccactg caccgacttc

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

protein kinase C $\beta$  (PKC $\beta$ ) , reverse primer

<400> 18

acgtagggat ctgacaagcc

20

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

c-myc , forward primer

<400> 19

acagcaaacc tccgcacag

19

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

c-myc , reverse primer

<400> 20

tggtcacgca gggcaaaaa

19

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

c-fos , forward primer

<400> 21

gccccatcgc agaccagagc

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

c-fos , reverse primer

<400> 22

atgctgctga tgctcttgac

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

c-ras , forward primer

<400> 23

caccatagag gtgagctctg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

c-ras , reverse primer

<400> 24

tcctcttggc ctgctgtgtc

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

$\beta$ -MHC , forward primer

<400> 25

cgcattggacc tggagcgagc

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

$\beta$ -MHC , reverse primer

<400> 26

cgccgcattct tccggaactc

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

GAPDH , forward primer

<400> 27

accacagtcc atgcatcac

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

GAPDH , reverse primer

<400> 28

tccaccaccc tgttgctgta

20

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

forward primer (F1)

<400> 29

cgctcgagga agctgtgtga ccttggag

28

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

reverse primer (R2)

<400> 30

cgggatccct cttcctgaat ctggagcc

28

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:GFP-F

<400> 31

tcgccaccat ggtgagcaag

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:GFP-R

<400> 32

cctagcagaa gcacaggctg

20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08983

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/10, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/10, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                        | Relevant to claim No.              |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| X/Y       | Bidichandani S. et al., Glucocorticosteroids stimulate the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells, Brain Res., 19 May, 2000 (19.05.00), Vol.865, No.1, pages 12 to 16          | 1-6, 10-12, 16-23 / 7-9, 13-15, 24 |
| Y         | Weidong Zhu et al., Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-dependent Kinase II and Calcineurin Play Critical Roles in Endothelin-1-induced Cardiomyocyte Hypertrophy., J.Biol.Chem., 19 May, 2000 (19.05.00), Vol.275, No.20, pages 15239 to 15245  | 7-9, 13-15, 24                     |
| Y         | MORIMOTO T. et al., GATA-5 is Involved in Leukemia Inhibitory Factor-responsive Transcription of the $\beta$ -Myosin Heavy Chain Gene in Cardiac Myocytes., J.Biol.Chem., 30 April, 1999 (30.04.99), Vol.274, No.18, pages 12811 to 12818 | 7-9, 13-15, 24                     |

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

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
27 November, 2002 (27.11.02)Date of mailing of the international search report  
10 December, 2002 (10.12.02)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08983

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08983

## Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Claims 10 to 16 relate to "a gene having a reporter gene fused to the downstream of the promoter of a gene relating specifically to a specific biological phenomenon". Although the terms "specific" and "specifically" are employed in these claims, the extents of these expressions "specific" and "specifically" are unclear even though the statements in the description are considered. Thus, these terms do not always mean exclusively "a certain gene corresponding to a certain biological phenomenon alone". In case of employing this interruption, every "gene" relates to a certain biological phenomenon. Thus, it can be concluded that the inventions as set forth in claims 10 to 16 merely relate to "a gene having a gene serving as a reporter fused to the downstream of the promoter of a gene". Such genes had been commonly employed by those skilled in the art before the priority date of the present application.

On the other hand, claims 1 to 9 relate to "a method of screening a functional molecule inducing a specific biological phenomenon with the use of, as an indication, the expression dose of a gene relating specifically to this phenomenon".

Due to the above-described reason, the inventions as set forth in claims 10 to 16 involve a large number of inventions other than those designed for using the inventions relating to the "screening method" of claims 1 to 9.

Such being the case, the group of the inventions as set forth in claims 1 to 9 and the group of the inventions as set forth in claims 10 to 16 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. For the same reason, the group of the inventions as set forth in claims 21 to 24 and the group of the inventions as set forth in claims 1 to 9 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/10, C12Q1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/10, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                               | 関連する<br>請求の範囲の番号                            |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| X/Y             | Bidichandani S., et al., Glucocorticosteroids stimulate the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells., Brain Res., 2000 May 19, vol.865, no.1, p.12-16 | 1-6, 10-12,<br>16-23<br>/ 7-9, 13-15,<br>24 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 02

国際調査報告の発送日

10.12.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                         |                  |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                       | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| Y                     | Weidong Zhu, et al., Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-dependent Kinase II and Calcineurin Play Critical Roles in Endothelin-1-induced Cardiomyocyte Hypertrophy., J.Biol.Chem., 2000 May 19, vol.275, no.20, p.15239-15245  | 7-9, 13-15, 24   |
| Y                     | Morimoto T., et al., GATA-5 Is Involved in Leukemia Inhibitory Factor-responsive Transcription of the $\beta$ -Myosin Heavy Chain Gene in Cardiac Myocytes., J.Biol.Chem., 1999 April 30, vol.274, no.18, p.12811-12818 | 7-9, 13-15, 24   |

## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

特別ページを参照。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲10-16は、「特定の生体現象と特異的に連関する遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を融合させた遺伝子」に係るものである。ここで、上記請求の範囲の記載では、「特定」及び「特異的」なる文言が用いられてはいるが、「特定」及び「特異的」がどの程度のものを意味しているのかは明細書の記載を参酌しても不明確であるから、該文言は、必ずしも「ある生体現象とある遺伝子が一対一対応」することのみを意味するものではない。そして、そのような解釈をした場合、「遺伝子」はおしなべてある生体現象と連関するものであるから、結局、請求の範囲10-16に係る発明は、単に、「ある遺伝子のプロモーターの下流に、レポーターとして機能する遺伝子を融合させた遺伝子」であるといえ、かつ、このような遺伝子は、本願優先日前から当業者に慣用されていたものである。

一方、請求の範囲1-9は「特定の生体現象を誘起する機能分子を、その現象と特異的に連関する遺伝子の発現量を指標として、スクリーニングする方法」に係るものである。

そして、上述した理由から、請求の範囲10-16に係る発明は、請求の範囲1-9の「スクリーニング方法」に係る発明を使用するために設計したもの以外の多くの発明をも包含している。

したがって、請求の範囲1-9に係る発明と、請求の範囲10-16に係る発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。同様の理由により、請求の範囲21-24に係る発明も、請求の範囲1-9に係る発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。