(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2006-507807
(P2006-507807A)
(43)公表日　平成18年3月9日(2006.3.9)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
A61K 31/7088	(2006.01)	A61K	31/7088		4B024
A61K 35/12	(2006.01)	A61K	35/12		4B063
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4B065
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 153 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2004-524480 (P2004-524480)
(86)(22)出願日　平成15年5月2日 (2003.5.2)
(85)翻訳文提出日　平成16年12月28日 (2004.12.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2003/013743
(87)国際公開番号　WO2004/010925
(87)国際公開日　平成16年2月5日 (2004.2.5)
(31)優先権主張番号　60/377,136
(32)優先日　平成14年5月2日 (2002.5.2)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　501019778
バンダービルト　ユニバーシティー
アメリカ合衆国　テネシー　３７２１２，
ナッシュビル，　スイート　２１０，
１７ティーエイチ　アベニュー　サウス
１２０７
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ウイルス感染および腫瘍抑制に関与する哺乳動物遺伝子

(57)【要約】
本発明は、ウイルス、細菌または寄生物の増殖に対して用いられる細胞遺伝子を同定する方法を提供する。ウイルス、細菌または寄生物の感染に関与する核酸、およびウイルス、細菌または寄生物の感染を減少または防止する方法がまた、本発明により提供される。本発明は、特定の機能に関与する遺伝子から核酸を同定し、単離するための選択プロセスと共に「ジーントラップ」法を利用する。具体的には、本発明は、ウイルス感染に必須であるが、細胞の生存には必須でない細胞遺伝子を単離する手段を提供し、腫瘍の進行を抑制する細胞遺伝子を単離する方法を提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号２１１、配列番号２１２、配列番号２１３、配列番号２１４、配列番号２１５、
配列番号２１６、配列番号２１７、配列番号２１８、配列番号２１９、配列番号２２０、
配列番号２２１、配列番号２２２、配列番号２２３、配列番号２２４、配列番号２２５、
配列番号２２６、配列番号２２７、配列番号２２８、配列番号２２９、配列番号２３０、
配列番号２３１、配列番号２３２、配列番号２３３、配列番号２３４、配列番号２３５、
配列番号２３６、配列番号２３７、配列番号２３８、配列番号２３９、配列番号２４０、
配列番号２４１、配列番号２４２、配列番号２４３、配列番号２４４、配列番号２４５、
配列番号２４６、配列番号２４７、配列番号２４８、配列番号２４９、配列番号２５０、
配列番号２５１、配列番号２５２、配列番号２５３、配列番号２５４、配列番号２５５、
配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５８、配列番号２５９、配列番号２６０、
配列番号２６１、配列番号２６２、配列番号２６３、配列番号２６４、配列番号２６５、
配列番号２６６、配列番号２６７、配列番号２６８、配列番号２６９、配列番号２７０、
配列番号２７１、配列番号２７２、配列番号２７３、配列番号２７４、配列番号２７５、
配列番号２７６、配列番号２７７、配列番号２７８、配列番号２７９、配列番号２８０、
配列番号２８１、配列番号２８２、配列番号２８３、配列番号２８４、配列番号２８５、
配列番号２８６、配列番号２８７、配列番号２８８、配列番号２８９、配列番号２９０、
配列番号２９１、配列番号２９２、配列番号２９３、配列番号２９４、配列番号２９５、
配列番号２９６、配列番号２９７、配列番号２９８、配列番号２９９、配列番号３００、
配列番号３０１、配列番号３０２、配列番号３０３、配列番号３０４、配列番号３０５、
配列番号３０６、配列番号３０７、配列番号３０８、配列番号３０９、配列番号３１０、
配列番号３１１、配列番号３１２、配列番号３１３、配列番号３１４、配列番号３１５、
配列番号３１６、配列番号３１７、配列番号３１８、配列番号３１９、配列番号３２０、
配列番号３２１、配列番号３２２、配列番号３２３、配列番号３２４、配列番号３２５、
配列番号３２６、配列番号３２７、配列番号３２８、配列番号３２９、配列番号３３０、
配列番号３３１、配列番号３３２、配列番号３３３、配列番号３３４、配列番号３３５、
配列番号３３６、配列番号３３７、配列番号３３８、配列番号３３９、配列番号３４０、
配列番号３４１、配列番号３４２、配列番号３４３、配列番号３４４、配列番号３４５、
配列番号３４６、配列番号３４７、配列番号３４８、配列番号３４９、配列番号３５０、
配列番号３５１、配列番号３５２、配列番号３５３、配列番号３５４、配列番号３５５、
配列番号３５６、配列番号３５７、配列番号３５８、配列番号３５９、配列番号３６０、
配列番号３６１、配列番号３６２、配列番号３６３、配列番号３６４、配列番号３６５、
配列番号３６６、配列番号３６７、配列番号３６８、配列番号３６９、配列番号３７０、
配列番号３７１、配列番号３７２、配列番号３７３、配列番号３７４、配列番号３７５、
配列番号３７６、配列番号３７７、配列番号３７８、配列番号３７９、配列番号３８０、
配列番号３８１、配列番号３８２、配列番号３８３、配列番号３８４、配列番号３８５、
配列番号３８６、配列番号３８７、配列番号３８８、配列番号３８９、配列番号３９０、
配列番号３９１、配列番号３９２、配列番号３９３、配列番号３９４、配列番号３９５、
配列番号３９６、配列番号３９７、配列番号３９８、配列番号３９９、配列番号４００、
配列番号４０１、配列番号４０２、配列番号４０３、配列番号４０４、配列番号４０５、
配列番号４０６、配列番号４０７、配列番号４０８、配列番号４０９、配列番号４１０、
配列番号４１１、配列番号４１２、配列番号４１３、配列番号４１４、配列番号４１５、
配列番号４１６、配列番号４１７、配列番号４１８、配列番号４１９、配列番号４２０、
配列番号４２１、配列番号４２２、配列番号４２３、配列番号４２４、配列番号４２５、
配列番号４２６、配列番号４２７、配列番号４２８に示されるヌクレオチド配列を含む、
単離された核酸。
【請求項２】
請求項１に記載の核酸の対立遺伝子改変体またはホモログ。
【請求項３】

配列番号２１１、配列番号２１２、配列番号２１３、配列番号２１４、配列番号２１５、
配列番号２１６、配列番号２１７、配列番号２１８、配列番号２１９、配列番号２２０、
配列番号２２１、配列番号２２２、配列番号２２３、配列番号２２４、配列番号２２５、
配列番号２２６、配列番号２２７、配列番号２２８、配列番号２２９、配列番号２３０、
配列番号２３１、配列番号２３２、配列番号２３３、配列番号２３４、配列番号２３５、
配列番号２３６、配列番号２３７、配列番号２３８、配列番号２３９、配列番号２４０、
配列番号２４１、配列番号２４２、配列番号２４３、配列番号２４４、配列番号２４５、
配列番号２４６、配列番号２４７、配列番号２４８、配列番号２４９、配列番号２５０、
配列番号２５１、配列番号２５２、配列番号２５３、配列番号２５４、配列番号２５５、
配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５８、配列番号２５９、配列番号２６０、
配列番号２６１、配列番号２６２、配列番号２６３、配列番号２６４、配列番号２６５、
配列番号２６６、配列番号２６７、配列番号２６８、配列番号２６９、配列番号２７０、
配列番号２７１、配列番号２７２、配列番号２７３、配列番号２７４、配列番号２７５、
配列番号２７６、配列番号２７７、配列番号２７８、配列番号２７９、配列番号２８０、
配列番号２８１、配列番号２８２、配列番号２８３、配列番号２８４、配列番号２８５、
配列番号２８６、配列番号２８７、配列番号２８８、配列番号２８９、配列番号２９０、
配列番号２９１、配列番号２９２、配列番号２９３、配列番号２９４、配列番号２９５、
配列番号２９６、配列番号２９７、配列番号２９８、配列番号２９９、配列番号３００、
配列番号３０１、配列番号３０２、配列番号３０３、配列番号３０４、配列番号３０５、
配列番号３０６、配列番号３０７、配列番号３０８、配列番号３０９、配列番号３１０、
配列番号３１１、配列番号３１２、配列番号３１３、配列番号３１４、配列番号３１５、
配列番号３１６、配列番号３１７、配列番号３１８、配列番号３１９、配列番号３２０、
配列番号３２１、配列番号３２２、配列番号３２３、配列番号３２４、配列番号３２５、
配列番号３２６、配列番号３２７、配列番号３２８、配列番号３２９、配列番号３３０、
配列番号３３１、配列番号３３２、配列番号３３３、配列番号３３４、配列番号３３５、
配列番号３３６、配列番号３３７、配列番号３３８、配列番号３３９、配列番号３４０、
配列番号３４１、配列番号３４２、配列番号３４３、配列番号３４４、配列番号３４５、
配列番号３４６、配列番号３４７、配列番号３４８、配列番号３４９、配列番号３５０、
配列番号３５１、配列番号３５２、配列番号３５３、配列番号３５４、配列番号３５５、
配列番号３５６、配列番号３５７、配列番号３５８、配列番号３５９、配列番号３６０、
配列番号３６１、配列番号３６２、配列番号３６３、配列番号３６４、配列番号３６５、
配列番号３６６、配列番号３６７、配列番号３６８、配列番号３６９、配列番号３７０、
配列番号３７１、配列番号３７２、配列番号３７３、配列番号３７４、配列番号３７５、
配列番号３７６、配列番号３７７、配列番号３７８、配列番号３７９、配列番号３８０、
配列番号３８１、配列番号３８２、配列番号３８３、配列番号３８４、配列番号３８５、
配列番号３８６、配列番号３８７、配列番号３８８、配列番号３８９、配列番号３９０、
配列番号３９１、配列番号３９２、配列番号３９３、配列番号３９４、配列番号３９５、
配列番号３９６、配列番号３９７、配列番号３９８、配列番号３９９、配列番号４００、
配列番号４０１、配列番号４０２、配列番号４０３、配列番号４０４、配列番号４０５、
配列番号４０６、配列番号４０７、配列番号４０８、配列番号４０９、配列番号４１０、
配列番号４１１、配列番号４１２、配列番号４１３、配列番号４１４、配列番号４１５、
配列番号４１６、配列番号４１７、配列番号４１８、配列番号４１９、配列番号４２０、
配列番号４２１、配列番号４２２、配列番号４２３、配列番号４２４、配列番号４２５、
配列番号４２６、配列番号４２７、配列番号４２８に示されるヌクレオチド配列を含む遺伝子によってコードされるタンパク質をコードする、単離された核酸。

【請求項４】

請求項１、２または３に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項５】

ストリンジェントな条件下で、請求項１、２または３に記載の核酸と選択的にハイブリダイズする、核酸。

【請求項６】
請求項１、２または３に記載の核酸と、少なくとも５０％の相同性を有する領域を、エキソン内に有する、核酸。
【請求項７】
請求項１、２または３に記載の核酸と、少なくとも６０％の相同性を有する領域を、エキソン内に有する、核酸。
【請求項８】
請求項１、２または３に記載の核酸と、少なくとも７０％の相同性を有する領域を、エキソン内に有する、核酸。
【請求項９】
請求項１、２または３に記載の核酸と、少なくとも８０％の相同性を有する領域を、エキソン内に有する、核酸。
【請求項１０】
請求項１、２または３に記載の核酸と、少なくとも９０％の相同性を有する領域を、エキソン内に有する、核酸。
【請求項１１】
請求項１、２または３に記載の核酸と、少なくとも９５％の相同性を有する領域を、エキソン内に有する、核酸。
【請求項１２】
請求項１、２、３、５、６、７、８、９、１０または１１に記載の核酸によってコードされる、タンパク質。
【請求項１３】
配列番号２１１、配列番号２１２、配列番号２１３、配列番号２１４、配列番号２１５、
配列番号２１６、配列番号２１７、配列番号２１８、配列番号２１９、配列番号２２０、
配列番号２２１、配列番号２２２、配列番号２２３、配列番号２２４、配列番号２２５、
配列番号２２６、配列番号２２７、配列番号２２８、配列番号２２９、配列番号２３０、
配列番号２３１、配列番号２３２、配列番号２３３、配列番号２３４、配列番号２３５、
配列番号２３６、配列番号２３７、配列番号２３８、配列番号２３９、配列番号２４０、
配列番号２４１、配列番号２４２、配列番号２４３、配列番号２４４、配列番号２４５、
配列番号２４６、配列番号２４７、配列番号２４８、配列番号２４９、配列番号２５０、
配列番号２５１、配列番号２５２、配列番号２５３、配列番号２５４、配列番号２５５、
配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５８、配列番号２５９、配列番号２６０、
配列番号２６１、配列番号２６２、配列番号２６３、配列番号２６４、配列番号２６５、
配列番号２６６、配列番号２６７、配列番号２６８、配列番号２６９、配列番号２７０、
配列番号２７１、配列番号２７２、配列番号２７３、配列番号２７４、配列番号２７５、
配列番号２７６、配列番号２７７、配列番号２７８、配列番号２７９、配列番号２８０、
配列番号２８１、配列番号２８２、配列番号２８３、配列番号２８４、配列番号２８５、
配列番号２８６、配列番号２８７、配列番号２８８、配列番号２８９、配列番号２９０、
配列番号２９１、配列番号２９２、配列番号２９３、配列番号２９４、配列番号２９５、
配列番号２９６、配列番号２９７、配列番号２９８、配列番号２９９、配列番号３００、
配列番号３０１、配列番号３０２、配列番号３０３、配列番号３０４、配列番号３０５、
配列番号３０６、配列番号３０７、配列番号３０８、配列番号３０９、配列番号３１０、
配列番号３１１、配列番号３１２、配列番号３１３、配列番号３１４、配列番号３１５、
配列番号３１６、配列番号３１７、配列番号３１８、配列番号３１９、配列番号３２０、
配列番号３２１、配列番号３２２、配列番号３２３、配列番号３２４、配列番号３２５、
配列番号３２６、配列番号３２７、配列番号３２８、配列番号３２９、配列番号３３０、
配列番号３３１、配列番号３３２、配列番号３３３、配列番号３３４、配列番号３３５、
配列番号３３６、配列番号３３７、配列番号３３８、配列番号３３９、配列番号３４０、
配列番号３４１、配列番号３４２、配列番号３４３、配列番号３４４、配列番号３４５、
配列番号３４６、配列番号３４７、配列番号３４８、配列番号３４９、配列番号３５０、

配列番号３５１、配列番号３５２、配列番号３５３、配列番号３５４、配列番号３５５、配列番号３５６、配列番号３５７、配列番号３５８、配列番号３５９、配列番号３６０、配列番号３６１、配列番号３６２、配列番号３６３、配列番号３６４、配列番号３６５、配列番号３６６、配列番号３６７、配列番号３６８、配列番号３６９、配列番号３７０、配列番号３７１、配列番号３７２、配列番号３７３、配列番号３７４、配列番号３７５、配列番号３７６、配列番号３７７、配列番号３７８、配列番号３７９、配列番号３８０、配列番号３８１、配列番号３８２、配列番号３８３、配列番号３８４、配列番号３８５、配列番号３８６、配列番号３８７、配列番号３８８、配列番号３８９、配列番号３９０、配列番号３９１、配列番号３９２、配列番号３９３、配列番号３９４、配列番号３９５、配列番号３９６、配列番号３９７、配列番号３９８、配列番号３９９、配列番号４００、配列番号４０１、配列番号４０２、配列番号４０３、配列番号４０４、配列番号４０５、配列番号４０６、配列番号４０７、配列番号４０８、配列番号４０９、配列番号４１０、配列番号４１１、配列番号４１２、配列番号４１３、配列番号４１４、配列番号４１５、配列番号４１６、配列番号４１７、配列番号４１８、配列番号４１９、配列番号４２０、配列番号４２１、配列番号４２２、配列番号４２３、配列番号４２４、配列番号４２５、配列番号４２６、配列番号４２７、配列番号４２８に示されるヌクレオチド配列を含む遺伝子の調節領域を含む、核酸。

【請求項１４】

レポーター遺伝子と機能的に連結されている、請求項１３に記載の調節領域を含む、構築物。

【請求項１５】

細胞におけるウイルスの増殖に必須の細胞遺伝子と、細胞の生存に非必須の細胞遺伝子とを同定する方法であって、該方法は、

（ａ）血清含有培地中で増殖する細胞培養物に、機能的プロモーターを欠く選択マーカー遺伝子をコードするベクターを移す工程、

（ｂ）該マーカー遺伝子を発現する細胞を選択する工程、

（ｄ）該細胞培養物を該ウイルスに感染させる工程、および

（ｅ）該マーカー遺伝子が挿入された細胞遺伝子を、生存細胞から単離し、それによって、細胞におけるウイルスの増殖に必須の遺伝子と、細胞の生存に非必須の遺伝子とを同定する工程

を包含する、方法。

【請求項１６】

被験体におけるウイルス感染を減少または阻害する方法であって、該方法は、配列番号２１１、配列番号２１２、配列番号２１３、配列番号２１４、配列番号２１５、配列番号２１６、配列番号２１７、配列番号２１８、配列番号２１９、配列番号２２０、配列番号２２１、配列番号２２２、配列番号２２３、配列番号２２４、配列番号２２５、配列番号２２６、配列番号２２７、配列番号２２８、配列番号２２９、配列番号２３０、配列番号２３１、配列番号２３２、配列番号２３３、配列番号２３４、配列番号２３５、配列番号２３６、配列番号２３７、配列番号２３８、配列番号２３９、配列番号２４０、配列番号２４１、配列番号２４２、配列番号２４３、配列番号２４４、配列番号２４５、配列番号２４６、配列番号２４７、配列番号２４８、配列番号２４９、配列番号２５０、配列番号２５１、配列番号２５２、配列番号２５３、配列番号２５４、配列番号２５５、配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５８、配列番号２５９、配列番号２６０、配列番号２６１、配列番号２６２、配列番号２６３、配列番号２６４、配列番号２６５、配列番号２６６、配列番号２６７、配列番号２６８、配列番号２６９、配列番号２７０、配列番号２７１、配列番号２７２、配列番号２７３、配列番号２７４、配列番号２７５、配列番号２７６、配列番号２７７、配列番号２７８、配列番号２７９、配列番号２８０、配列番号２８１、配列番号２８２、配列番号２８３、配列番号２８４、配列番号２８５、配列番号２８６、配列番号２８７、配列番号２８８、配列番号２８９、配列番号２９０、配列番号２９１、配列番号２９２、配列番号２９３、配列番号２９４、配列番号２９５、配列番号２

９６、配列番号２９７、配列番号２９８、配列番号２９９、配列番号３００、配列番号３０１、配列番号３０２、配列番号３０３、配列番号３０４、配列番号３０５、配列番号３０６、配列番号３０７、配列番号３０８、配列番号３０９、配列番号３１０、配列番号３１１、配列番号３１２、配列番号３１３、配列番号３１４、配列番号３１５、配列番号３１６、配列番号３１７、配列番号３１８、配列番号３１９、配列番号３２０、配列番号３２１、配列番号３２２、配列番号３２３、配列番号３２４、配列番号３２５、配列番号３２６、配列番号３２７、配列番号３２８、配列番号３２９、配列番号３３０、配列番号３３１、配列番号３３２、配列番号３３３、配列番号３３４、配列番号３３５、配列番号３３６、配列番号３３７、配列番号３３８、配列番号３３９、配列番号３４０、配列番号３４１、配列番号３４２、配列番号３４３、配列番号３４４、配列番号３４５、配列番号３４６、配列番号３４７、配列番号３４８、配列番号３４９、配列番号３５０、配列番号３５１、配列番号３５２、配列番号３５３、配列番号３５４、配列番号３５５、配列番号３５６、配列番号３５７、配列番号３５８、配列番号３５９、配列番号３６０、配列番号３６１、配列番号３６２、配列番号３６３、配列番号３６４、配列番号３６５、配列番号３６６、配列番号３６７、配列番号３６８、配列番号３６９、配列番号３７０、配列番号３７１、配列番号３７２、配列番号３７３、配列番号３７４、配列番号３７５、配列番号３７６、配列番号３７７、配列番号３７８、配列番号３７９、配列番号３８０、配列番号３８１、配列番号３８２、配列番号３８３、配列番号３８４、配列番号３８５、配列番号３８６、配列番号３８７、配列番号３８８、配列番号３８９、配列番号３９０、配列番号３９１、配列番号３９２、配列番号３９３、配列番号３９４、配列番号３９５、配列番号３９６、配列番号３９７、配列番号３９８、配列番号３９９、配列番号４００、配列番号４０１、配列番号４０２、配列番号４０３、配列番号４０４、配列番号４０５、配列番号４０６、配列番号４０７、配列番号４０８、配列番号４０９、配列番号４１０、配列番号４１１、配列番号４１２、配列番号４１３、配列番号４１４、配列番号４１５、配列番号４１６、配列番号４１７、配列番号４１８、配列番号４１９、配列番号４２０、配列番号４２１、配列番号４２２、配列番号４２３、配列番号４２４、配列番号４２５、配列番号４２６、配列番号４２７、配列番号４２８に示される核酸、またはこれらのホモログを含む遺伝子によってコードされる遺伝子産物の発現または機能を阻害する、一定量の組成物を該被験体に投与し、それによって、該ウイルス感染を処置する工程、を包含する、方法。

【請求項１７】

前記組成物が、前記遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する抗体を含む、請求項１６に記載の方法。

【請求項１８】

前記組成物が、前記遺伝子によってコードされるタンパク質に対するレセプターに結合する抗体を含む、請求項１６に記載の方法。

【請求項１９】

前記組成物が、前記遺伝子によってコードされるＲＮＡに結合するアンチセンスＲＮＡを含む、請求項１６に記載の方法。

【請求項２０】

前記組成物が、前記遺伝子によってコードされるＲＮＡに結合するアンチセンスＲＮＡを機能的にコードする核酸を含む、請求項１６に記載の方法。

【請求項２１】

被験体におけるウイルス感染を減少または阻害する方法であって、エキソビボで、該被験体由来の選択された細胞において、示される核酸またはそのホモログを含む内因性遺伝子を、該遺伝子の機能的遺伝子産物を産生し得ない変異遺伝子にか、または、該遺伝子の機能的遺伝子産物の減少した量を産生する変異遺伝子に変異させる工程、および、該被験体内で細胞を置き換え、それによって、該被験体内の細胞のウイルス感染を減少させる工程を包含する、方法。

【請求項２２】

前記細胞が造血細胞である、請求項２１に記載の方法。

【請求項２３】
被験体におけるウイルス感染を減少または阻害する方法であって、エキソビボで、該被験体由来の選択された細胞において、請求項１５に記載の方法によって単離された核酸を含む内因性遺伝子を、該遺伝子の機能的遺伝子産物を産生し得ない変異遺伝子にか、または、該遺伝子の機能的遺伝子産物の減少した量を産生する変異遺伝子に変異させる工程、および、該被験体内で細胞を置き換え、それによって、該被験体内の細胞のウイルス感染を減少させる工程を包含する、方法。
【請求項２４】
前記ウイルスがＨＩＶである、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記細胞が造血細胞である、請求項２３に記載の方法。
【請求項２６】
被験体におけるウイルス感染抵抗性を増加させる方法であって、エキソビボで、該被験体由来の選択された細胞において、請求項１５に記載の方法によって単離された核酸を含む内因性遺伝子を、該遺伝子の機能的遺伝子産物を産生し得ない変異遺伝子にか、または、該遺伝子の機能的遺伝子産物の減少した量を産生する変異遺伝子に変異させる工程、および、該被験体内で細胞を置き換え、それによって、該被験体における細胞のウイルス感染を減少させる工程を包含する、方法。
【請求項２７】
前記ウイルスがＨＩＶである、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記細胞が造血細胞である、請求項２６に記載の方法。
【請求項２９】
ウイルス感染の処置における有効性について、化合物をスクリーニングする方法であって、細胞におけるウイルスの複製には必須であるが、細胞の生存には必須でない遺伝子産物を機能的にコードする細胞遺伝子を含む細胞に、該化合物を投与する工程、および、産生された遺伝子産物のレベルを検出する工程を包含し、該遺伝子産物の減少または消失は、該ウイルス感染の処置に有効な化合物を意味する、方法。
【請求項３０】
前記細胞遺伝子が、配列番号２１１、配列番号２１２、配列番号２１３、配列番号２１４、配列番号２１５、配列番号２１６、配列番号２１７、配列番号２１８、配列番号２１９、配列番号２２０、配列番号２２１、配列番号２２２、配列番号２２３、配列番号２２４、配列番号２２５、配列番号２２６、配列番号２２７、配列番号２２８、配列番号２２９、配列番号２３０、配列番号２３１、配列番号２３２、配列番号２３３、配列番号２３４、配列番号２３５、配列番号２３６、配列番号２３７、配列番号２３８、配列番号２３９、配列番号２４１、配列番号２４２、配列番号２４４、配列番号２４５、配列番号２４６、配列番号２４８、配列番号２４９、配列番号２５０、配列番号２５１、配列番号２５２、配列番号２５３、配列番号２５４、配列番号２５５、配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５８、配列番号２５９、配列番号２６０、配列番号２６１、配列番号２６２、配列番号２６３、配列番号２６４、配列番号２６５、配列番号２６６、配列番号２６７、配列番号２６８、配列番号２６９、配列番号２７０、配列番号２７１、配列番号２７２、配列番号２７３、配列番号２７４、配列番号２７５、配列番号２７６、配列番号２７７、配列番号２７８、配列番号２７９、配列番号２８０、配列番号２８１、配列番号２８２、配列番号２８３、配列番号２８４、配列番号２８５、配列番号２８６、配列番号２８７、配列番号２８８、配列番号２８９、配列番号２９０、配列番号２９１、配列番号２９２、配列番号２９３、配列番号２９４、配列番号２９５、配列番号２９６、配列番号２９７、配列番号２９８、配列番号２９９、配列番号３００、配列番号３０１、配列番号３０２、配列番号３０３、配列番号３０４、配列番号３０５、配列番号３０６、配列番号３０７、配列番号３０８、配列番号３０９、配列番号３１０、配列番号３１４、配列番号３１２、配列番号３１３、配列番号３１４、配列番号３１５、配列番号３１６、配列番号３１７

、配列番号３１８、配列番号３１９、配列番号３２０、配列番号３２１、配列番号３２２
、配列番号３２３、配列番号３２４、配列番号３２５、配列番号３２６、配列番号３２７
、配列番号３３２、配列番号３３３、配列番号３３７、配列番号３３８、配列番号３３９
、配列番号３４０、配列番号３４１、配列番号３４２、配列番号３４３、配列番号３４４
、配列番号３４５、配列番号３４６、配列番号３４７、配列番号３４８、配列番号３４９
、配列番号３５０、配列番号３５１、配列番号３５２、配列番号３５３、配列番号３５４
、配列番号３５５、配列番号３５６、配列番号３５７、配列番号３５８、配列番号３５９
、配列番号３６０、配列番号３６１、配列番号３６２、配列番号３６３、配列番号３６４
、配列番号３６５、配列番号３６６、配列番号３６７、配列番号３６８、配列番号３６９
、配列番号３７０、配列番号３７１、配列番号３７２、配列番号３７３、配列番号３７４
、配列番号３７５、配列番号３７６、配列番号３７７、配列番号３７８、配列番号３７９
、配列番号３８０、配列番号３８１、配列番号３８２、配列番号３８３、配列番号３８４
、配列番号３８５、配列番号３８６、配列番号３８７、配列番号３８８、配列番号３８９
、配列番号３９０、配列番号３９１、配列番号３９２、配列番号３９３、配列番号３９４
、配列番号３９５、配列番号３９６、配列番号３９７、配列番号３９８、配列番号３９９
、配列番号４００、配列番号４０１、配列番号４０２、配列番号４０３、配列番号４０４
、配列番号４０５、配列番号４０６、配列番号４０７、配列番号４０９、配列番号４１０
、配列番号４１５、配列番号４１６、配列番号４１７、配列番号４１８、配列番号４１９
、配列番号４２０、配列番号４２１、配列番号４２２、配列番号４２３、配列番号４２４
、配列番号４２５、配列番号４２６、配列番号４２７、配列番号４２８に示される核酸、
またはそのホモログを含む、請求項２９に記載の方法。

【請求項３１】

前記細胞遺伝子が、請求項１５に記載の方法によって同定される遺伝子である、請求項２９に記載の方法。

【請求項３２】

ウイルス感染を減少または阻害するための化合物をスクリーニングする方法であって、請求項１４に記載の構築物を含む細胞に、該化合物を投与する工程、および産生されたレポーター遺伝子産物のレベルを検出する工程を包含し、該レポーター遺伝子産物の減少または消失が、該ウイルス感染を減少または阻害するための化合物を意味する、方法。

【請求項３３】

細胞における悪性表現型を抑制し得る細胞遺伝子を同定する方法であって、該方法は、

（ａ）軟寒天中でよく増殖し得ない細胞培養物に、機能的プロモーターを欠く選択マーカー遺伝子をコードするベクターを移す工程、

（ｂ）該マーカー遺伝子を発現する細胞を選択する工程、および

（ｃ）該マーカー遺伝子が挿入されている細胞遺伝子を、寒天中で増殖し得る選択された細胞から単離し、それによって、細胞における悪性表現型を抑制し得る遺伝子を同定する工程、

を包含する、方法。

【請求項３４】

細胞における悪性表現型を抑制し得る細胞遺伝子を同定する方法であって、該方法は、

（ａ）非形質転換細胞の細胞培養物に、機能的プロモーターを欠く選択マーカー遺伝子をコードするベクターを移す工程、

（ｂ）該マーカー遺伝子を発現する細胞を選択する工程、および

（ｃ）該マーカー遺伝子が挿入されている細胞遺伝子を、選択され、かつ形質転換された細胞から単離し、それによって、細胞における悪性表現型を抑制し得る遺伝子を同定する工程

を包含する、方法。

【請求項３５】

細胞における悪性表現型を抑制するための化合物をスクリーニングする方法であって、該細胞において悪性表現型の確立に関与する遺伝子産物を機能的にコードする細胞遺伝子を

含む細胞に、該化合物を投与する工程、および、産生された遺伝子産物のレベルを検出する工程を包含し、該遺伝子産物の減少または消失は、該悪性表現型を抑制するために有効な化合物を意味する、方法。
【請求項３６】
被験体の細胞における悪性表現型を抑制する方法であって、配列番号２４０、配列番号２４３、配列番号２４７、配列番号３２１、配列番号３２８、配列番号３２９、配列番号３３０、配列番号３３１、配列番号３３４、配列番号３３５、配列番号３３６、配列番号４０８、配列番号４１１、配列番号４１２、配列番号４１３、配列番号４１４に示される核酸、またはそのホモログを含む遺伝子によってコードされる遺伝子産物の発現または機能を阻害する、一定量の組成物を、該被験体に投与し、それによって悪性表現型を抑制する工程を包含する、方法。
【請求項３７】
前記組成物が、前記遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する抗体を含む、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記組成物が、前記遺伝子によってコードされるタンパク質に対するレセプターに結合する抗体を含む、請求項３６に記載の方法。
【請求項３９】
前記組成物が、前記遺伝子によってコードされるＲＮＡに結合するアンチセンスＲＮＡを含む、請求項３６に記載の方法。
【請求項４０】
前記組成物が、前記遺伝子によってコードされるＲＮＡに結合するアンチセンスＲＮＡを機能的にコードする核酸を含む、請求項３６に記載の方法。
【請求項４１】
被験体におけるウイルス感染を処置する方法であって、その過剰発現がウイルスの複製を減少または阻害する遺伝子の発現を増加する、治療有効量の組成物を、該被験体に投与する工程を包含する、方法。
【請求項４２】
ウイルス感染の処置に有効な化合物をスクリーニングする方法であって、その過剰発現がウイルスの複製を阻害するが、細胞の生存を妨げない遺伝子産物を機能的にコードする細胞遺伝子を含む細胞に、該化合物を投与する工程、および、産生された該遺伝子産物のレベルを検出する工程を包含し、該遺伝子産物の減少が、ウイルス感染の処置のために有効な化合物を意味する、方法。
【請求項４３】
前記過剰発現した遺伝子がＩＧＦ２である、請求項４１に記載の方法。
【請求項４４】
前記組成物がＣＴＣＦのインヒビターである、請求項４１に記載の方法。
【請求項４５】
前記組成物が、配列番号２１１～４２８からなる群から選択される配列の群から選択されるヌクレオチド配列を含む遺伝子を中断するように標的化されたベクターである、請求項１６または３６に記載の方法。
【請求項４６】
前記組成物が、機能的プロモーターを欠く選択マーカー遺伝子をコードするベクターである、請求項１６または３６に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、米国仮特許出願番号６０／３７７，１３６（２００２年５月２日出願）（これは、その全内容が、本明細書中に参考として援用される）に対する優先権を主張する。
【０００２】

（背景）
（発明の分野）
本発明は、ウイルス、細菌もしくは寄生物の増殖、または、腫瘍の進行に対して用いられる細胞遺伝子を同定する方法を提供する。従って、本発明は、ウイルス、細菌もしくは寄生物の感染に関連する遺伝子あるいはこの感染を減少または防止する方法、および、腫瘍の進行を抑制するための方法に関する。本発明はまた、さらなるこのような遺伝子をスクリーニングするための方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
（背景技術）
種々のプロジェクトが、種々の動物（特に、ヒト）のゲノムを単離および配列決定することに向けられている。しかし、多くの方法論は、機能が結びつかないか、または示唆しないヌクレオチド配列を提供し、こうして、このようなデータの直接的な有用性を限定する。
【０００４】
対照的に、本発明は、特異的なプロセス（すなわち、ウイルス感染、細菌もしくは寄生物、または腫瘍の進行）に関与する核酸、そして、さらに、これらのプロセスに対する処置に有用な核酸のみをスクリーニングする方法を提供する。なぜなら、この方法によって、細胞に非必須でもある核酸のみが単離されるためである。このような方法は非常に有用である。なぜなら、これらは、単離された遺伝子の各々に機能を帰し、こうして、単離された核酸が、種々の特定の方法および手順において直接利用され得るためである。
【０００５】
例えば、本発明は、ウイルス感染に対して用いられるが、細胞に対しては必須ではない遺伝子産物をコードする核酸を単離する方法を提供する。腸および肝臓におけるウイルス感染は、ヒトの罹患率および死亡率の有意な原因である。このような感染の分子メカニズムを理解することにより、その処置および制御における新しいアプローチをもたらす。
【０００６】
ウイルスは、種々の型の感染を確立し得る。これらの感染は、一般に、溶解性または持続性として分類され得るが、いくつかの溶解性感染が、持続性であると考えられる。一般に、持続性の感染は、２つの範疇に分類される：（１）慢性（増殖性）感染、すなわち、感染性ウイルスが存在し、従来の生物学的方法により回収され得る感染、および（２）潜伏性感染、すなわち、ウイルスゲノムが細胞内に存在するが、幹先生ウイルスは一般に、再賦活の断続的な発症の間を除いては産生されない、感染。持続性は一般に、増殖性および潜伏性感染の両方のステージを含む。
【０００７】
溶解性感染はまた、全細胞の小さな画分のみが感染される条件下で持続し得る（くすぶり型（循環型）感染）。わずかな感染細胞がウイルスを放出して殺傷されるが、子孫のウイルスが再び、全細胞のうちの少ない数にのみ感染する。このようなくすぶり型感染の例としては、マウスにおける乳酸デヒドロゲナーゼウイルス（Ｍａｈｙ，Ｂ．Ｗ．Ｊ．，Ｂｒ．Ｍｅｄ．Ｂｕｌｌ．４１：５０－５５（１９８５））および、ヒトにおけるアデノウイルスの感染（Ｐｏｒｔｅｒ，Ｄ．Ｄ．ｐｐ．７８４－７９０　Ｂａｒｏｎ，Ｓ．編　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　第２版（Ａｄｄｉｓｏｎ－Ｗｅｓｌｅｙ，Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ，ＣＡ　１９８５））の持続が挙げられる。
【０００８】
さらに、ウイルスは、いくつかの細胞型については溶解し得るが、他の細胞型については溶解し得ない。例えば、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）は、単球／マクロファージよりもＴ細胞に対してより溶解性であり、従って、細胞死をもたらし得るＴ細胞の増殖性の幹線をもたらし、他方では、ＨＩＶ感染した単核食細胞は、細胞溶解を伴わず、かなりの時間、ウイルスを産生し得ることを証拠が示す（Ｋｌａｔｚｍａｎｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２５：５９－６２（１９８４）；Ｋｏｙａｎａｇｉら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４１：１

６７３－１６７５（１９８８）；Ｓａｔｔｅｎｔａｕら、Ｃｅｌｌ　５２：６３１－６３３（１９８８））。

【０００９】

ウイルス感染に対する従来の処置としては、特定のウイルス由来のタンパク質（例えば、ＨＩＶプロテアーゼまたは逆転写酵素）向けの医薬品、または組換え（クローン化）免疫調節因子（宿主由来）（例えば、インターフェロン）が挙げられる。しかし、現在の方法は、抗ウイルス剤を無効にする、高い率のウイルス変異を含む、いくつかの制限および欠点を有する。免疫調節剤について、制限された有効性、制限する副作用、特異性の欠如は全て、これらの薬剤の全体的な適応性を制限する。現在の抗ウイルス剤および免疫調節剤での成功の割合はまた、期待外れである。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１０】

本発明は、一方または両方の対立遺伝子において中断される場合に細胞の生存に必須でないが、ウイルスの複製に必要とされる遺伝子を単離することに焦点をあてる。焦点をあてる。このことは、一方の対立遺伝子のノックアウトが、細胞にウイルス抵抗性の表現型を与え得る場合に、用量効果で生じ得る。治療的介入のための標的として、これらの細胞内遺伝子産物（タンパク質、タンパク質の部分（グリコシル化を含むがこれらに限定されない改変酵素、脂質修飾因子［ミリオレート（ｍｙｒｉｏｌａｔｅ）など］）、脂質、転写エレメントおよびＲＮＡ調節分子を含む）の阻害が、深在性の毒性副作用を有する傾向が少なくなり得、そして、ウイルスの変異が、「ブロック」を克服して、首尾よく複製する傾向を少なくする。

【００１１】

本発明は、増殖のためにウイルスに必要よされる細胞遺伝子に取り組むことによって、ウイルス感染に対して試みられた治療的処置の以前の方法に、有意な改善を提供する。従って、本発明はまた、ウイルス感染に必須の細胞遺伝子を阻害することによってウイルスを処置する方法を提供することによって、ウイルス感染の処置に対する画期的な治療的アプローチを提供する。元々検出される手段によると、これらの遺伝子は、細胞の生存に必須ではないため、これらの処置方法は、以前の方法で見出されているような被験体に対する深刻な有害作用なしに、被験体において用いられ得る。本発明はまた、ウイルス感染した細胞が、血清中の因子に依存して生存するという驚くべき発見を提供する。従って、本発明はまた、この血清の生存因子を阻害することによってウイルス感染を処置するための方法を提供する。最後に、これらの発見はまた、培養物中におけるこの血清生存因子を除去、阻害または崩壊させることによって、細胞培養物からウイルス感染した細胞を除去し、その結果、非感染細胞が選択的に生存する、新規な方法を提供する。

【００１２】

本明細書中で提供される方法はまた、細菌感染および／または寄生物感染に対しても用いられ得る。具体的には、同じ方法が用いられるが、寄生物または細菌がウイルスと置き換えられる。

【００１３】

腫瘍抑制遺伝子の選択は、癌の治療的処置のための新しい標的の発見において、重要な領域になっている。「形質転換された」表現型を抑制し得る特異的な遺伝子によって、細胞が、細胞周期へと無差別に入ることが制限されるという発見のために、かなりの時間が、このような遺伝子の発見に投資された。これらの遺伝子のいくつかとしては、横紋筋肉腫（Ｒｂ）に関する遺伝子およびｐ５３（アポトーシス関連）をコードする遺伝子が挙げられる。本発明は、形質転換されていない細胞から、形質転換された表現型を有する細胞株を選択し、そして、悪性表現型に関与するか、または、悪性表現型を抑制し得る遺伝子を、これらの細胞から単離するための、ジーントラップを用いる方法を提供する。従って、単離プロセスの性質により、機能が単離された遺伝子と関連付けられる。瞬時に腫瘍抑制遺伝子またはオンコジーンを選択する能力は、癌を処置または予防するプロセスにおけ

るユニークな標的を提供し得、そして、癌の診断試験のためのユニークな標的さえ提供し得る。

【課題を解決するための手段】

【００１４】

（発明の詳細な説明）

本発明は、特定の機能に関与する遺伝子から核酸を同定し、単離するための選択プロセスと共に「ジーントラップ」法を利用する。具体的には、本発明は、ウイルス感染に必須であるが、細胞の生存には必須でない細胞遺伝子を単離する手段を提供し、腫瘍の進行を抑制する細胞遺伝子を単離する方法を提供する。

【００１５】

本発明はまた、ウイルス感染した細胞が、生存のために血清中に存在する少なくとも１つの因子に依存し、一方で、非感染細胞はこの依存性を示さないという中心的な発見を提供する。この中心的な発見は、いくつかの方法において、本発明において利用されている。第一に、「血清生存因子」の阻害は、非感染細胞の集団から、持続的にウイルス感染した細胞を根絶するために利用され得る。この因子の阻害は、本明細書中にさらに説明されるように、被験体におけるウイルス感染を処置するのに用いられ得る。さらに、組織培養物における血清生存因子の阻害または除去が、ウイルス複製に必要とされるが、非感染細胞が生存するためには必須ではない細胞遺伝子の検出を可能にする。本発明はさらに、このような細胞遺伝子、ならびに、このような遺伝子の機能を阻害することによってウイルス感染を処置する方法を提供する。

【００１６】

本明細書中で使用される場合、「複製」および「感染」は、細胞におけるウイルスの成功のためのプロセスのいずれか（例えば、感染、増殖、複製および溶解）を含み得る。

【００１７】

さらに、本発明はまた、腫瘍の進行に利用される細胞遺伝子を単離するための方法を提供する。

【００１８】

本発明は、その過剰発現が、ウイルスの増殖および／または複製の阻害に関連する細胞遺伝子を提供する。

【００１９】

本発明の方法は、細胞におけるウイルスの増殖には必須であるが、細胞が生存するのには必須でない、いくつかの細胞遺伝子を提供する。これらの遺伝子は、ウイルスによる溶解性および持続性の感染に重要である。これらの遺伝子は、レトロウイルスジーントラップベクターで細胞を感染させ、ジーントラップ事象（すなわち、ベクターが挿入されて、その結果、プロモーターを欠くマーカー遺伝子が挿入され、結果として、細胞のプロモーターが、マーカー遺伝子（すなわち、機能遺伝子に挿入されたもの）の転写を促進する）が生じた細胞について選択し、細胞に血清を枯渇させ、選択された細胞を血清の枯渇を継続しつつ、選択したウイルスで感染させ、そして、血清を戻して添加し、目に見えるコロニーを出現させることによって単離され、このコロニーを、限界希釈によってクローニングすることによって作製したジーントラップライブラリーにより単離した。レトロウイルスジーントラップベクターに挿入された遺伝子は、次いで、レトロウイルスジーントラップベクターに特異的なプローブを用いて、コロニーから単離された。従って、この方法により単離された核酸は、遺伝子の単離された部分である。さらに、この方法を利用して、その過剰発現が、ウイルス感染または腫瘍増殖を妨げるいくつかの細胞遺伝子が単離され、そして、この方法は、これらの遺伝子の過剰発現によって、ウイルス感染または腫瘍の増殖／抑制を処置する方法を提供する。

【００２０】

本発明は、本発明のジーントラップ法により中断されたゲノム配列を提供することによって、ウイルス複製に必要とされるか、または、悪性表現型を担う遺伝子のゲノム遺伝子座を同定する。中断された遺伝子座の配列を提供することにより、中断される遺伝子を同

定する。従って、本発明は、本発明のジーントラップベクターにより中断される遺伝子座の遺伝子を提供する。中断される遺伝子を同定することによって、本発明は、遺伝子および、抗ウイルス療法のための標的としてのその産物の両方を提供する。

【００２１】

抗ウイルス療法または抗癌療法のための標的としては、本発明は、調節配列のいくつかの例（例えば、転写因子）を提供する。いくつかの場合において、転写因子の中断が、ウイルスの増殖に直接的な影響を有する。他の場合において、転写因子の中断は、その制御下にある遺伝子の転写または翻訳に影響を及ぼすことによって、ウイルスの増殖に影響を及ぼす。本発明のベクターにより中断される転写因子により制御される複数の遺伝子経路の例（例えば、ＣＴＣＦ経路）が、本明細書中に提供される。

【００２２】

従って、本発明は、細胞におけるウイルスの増殖には必須であり、細胞の生存には必須ではない細胞遺伝子を同定する方法を提供し、この方法は、（ａ）機能的プロモーターを欠く選択マーカー遺伝子をコードするベクターを、血清含有培地中で増殖している細胞培養物に移す工程、（ｂ）マーカー遺伝子を発現する細胞を選択する工程、（ｃ）培養培地から血清を除去する工程、（ｄ）ウイルスで細胞培養物を感染させる工程、および（ｅ）マーカー遺伝子が挿入される細胞遺伝子を、生存している細胞から単離し、それによって、細胞におけるウイルスの増殖には必須であり、細胞の生存には必須ではない遺伝子を同定する工程、を包含する。本発明はまた、細胞におけるウイルスの増殖に用いられ、細胞の生存には非必須の細胞遺伝子を同定する方法を提供し、この方法は、（ａ）機能的プロモーターを欠く選択マーカー遺伝子をコードするベクターを、血清含有培地中で増殖している細胞培養物に移す工程、（ｂ）マーカー遺伝子を発現する細胞を選択する工程、（ｃ）培養培地から血清を除去する工程、（ｄ）ウイルスで、細胞培養物を感染させる工程、および（ｅ）マーカー遺伝子が挿入される細胞遺伝子を、生存している細胞から単離し、それによって、細胞におけるウイルスの増殖には必須であるが、細胞の生存には必須ではない遺伝子を同定する工程を包含する。任意の選択された細胞型（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞）において、血清の枯渇が選択に必要であるかどうかは容易に決定され得る。血清の枯渇が必要でない場合、血清の枯渇は、この工程から除外され得る。

【００２３】

従って、本発明は、細胞におけるウイルスの増殖に必須であり、細胞の生存には必須ではない、細胞遺伝子を同定する方法を提供し、この方法は、（ａ）機能的プロモーターを欠く選択マーカー遺伝子をコードするベクターを、血清含有培地中で増殖している細胞培養物に移す工程、（ｂ）マーカー遺伝子を発現する細胞を選択する工程、（ｃ）ウイルスで、細胞培養物を感染させる工程、および（ｄ）マーカー遺伝子が挿入される細胞遺伝子を生存細胞から単離し、それによって細胞におけるウイルス増殖に必須であるが、細胞の生存には必須ではない遺伝子を同定する工程を包含する。本発明はまた、細胞におけるウイルスの増殖に必須であり、細胞の生存には必須ではない、細胞遺伝子を同定する方法を提供し、この方法は、（ａ）機能的プロモーターを欠く選択マーカー遺伝子をコードするベクターを、血清含有培地中で増殖している細胞培養物に移す工程、（ｂ）マーカー遺伝子を発現する細胞を選択する工程、（ｃ）ウイルスで、細胞培養物を感染させる工程、および（ｄ）マーカー遺伝子が挿入される細胞遺伝子を、生存している細胞から単離し、それによって、細胞におけるウイルスの増殖に用いられ、細胞の生存には必須ではない遺伝子を同定する工程を包含する。

【００２４】

あるいは、培養培地から血清を除去する代わりに、増殖するためにウイルスにより必要とされる血清因子が、例えば、この因子に特異的に結合する抗体の投与により、阻害され得る。さらに、培養物中に、持続的に感染した細胞が存在しないか、またはわずかに存在すると考えられる場合、血清枯渇の工程は、除外され得、そして、細胞を、その細胞型のための通常の培地中で増殖させ得る。従って、この方法は、ウイルスが、選択した細胞に対して溶解性（ｌｙｔｉｃ）である場合、血清生存因子とは無関係に使用され得る。

血清枯渇が用いられる場合、血清枯渇は、培養物がウイルスで感染された後、一定期間、継続され得る。次いで、血清が培養物に戻され得る。いくつかの他の方法が因子を不活性化するのに用いられる場合、この因子は、新しい血清を培養物に戻す前に、中止されるか、不活性化されるか、または、（例えば、抗因子抗体を除去して（例えば、その抗体に対して結合する抗体を用いて））除去され得る。生存する細胞は、ウイルスの増殖に必須の遺伝子内に不活性化する挿入を有する変異体である。次いで、挿入を有する遺伝子が、マーカー遺伝子配列を有する配列を単離することによって単離され得る。この変異プロセスは、野生型の機能を妨害する。変異遺伝子は、低いレベルで通常の産物を産生し得るか、これらの細胞において通常は見出されない通常の産物を産生し得るか、通常の産物の過剰産生を生じ得るか、いくつかの機能を有する変更された産物であって、他の産物ではない産物を産生し得るか、または、遺伝子の機能を完全に妨害し得る。さらに、この変異は、機能を有するが、決してタンパク質に翻訳されないＲＮＡを妨害し得る。例えば、α－トロポミオシン遺伝子は、細胞調節において非常に重要であるが、決してタンパク質に翻訳されない３’ＲＮＡを有する（Ｃｅｌｌ　７５　ｐｇ　１１０７－１１１７，１２／１７／９３）。

【００２５】

本明細書中で使用される場合、「細胞の生存に必須ではない」細胞遺伝子は、研究における予防的用途または治療的用途のために、ウイルスの複製が阻害されることを可能にする少なくとも所定の期間、片側または両側対立遺伝子の中断が、細胞を生存可能にするための遺伝子を意味する。「ウイルスの増殖に必須の」遺伝子は、ウイルスが増殖するためのいくつかの方法において、直接または間接的のいずれかで必要である、タンパク質またはＲＮＡのいずれかである遺伝子産物（分泌されたか、または分泌されていない）を意味し、従って、この遺伝子産物（すなわち、機能的に利用可能な遺伝子産物）の不在下では、ウイルスを含む細胞の少なくともいくらかが死ぬ。例えば、このような遺伝子は、細胞周期調節タンパク質、液胞水素ポンプに影響を及ぼすタンパク質、もしくは、タンパク質の折り畳みおよびタンパク質の改変（リン酸化、メチル化、グリコシル化、ミリスチン化、もしくは他の脂質部分、または、酵素プロセシングを介するタンパク質のプロセシングを含むがこれらに限定されない）に関与するタンパク質をコードし得る。このような遺伝子のいくつかの例が本明細書中で例示され、ここで、単離された核酸のいくつかが、例えば、液胞Ｈ＋ＡＴＰａｓｅ、αトロポミオシン、ｇａｓ５遺伝子、ｒａｓ複合体、Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩ　ｍＲＮＡ、およびカルサイクリンのような遺伝子に対応する。

【００２６】

細胞に感染し得る任意のウイルスが、この方法に使用され得る。ウイルスは、研究が所望される特定の感染に依存して選択され得る。しかし、多くのウイルスが、生存のために同じ細胞遺伝子に依存し、従って、１つのウイルスを用いて単離された細胞遺伝子が、他のウイルスに対する治療のための標的としても使用され得ることが、本発明によって意図される。溶解性感染を用いて分類され得るか、または、（その細胞株が、全体的には溶解性でない場合）複数のラウンドの自動感染によって選択され得る全てのウイルスは、同じライブラリーにおける複数ラウンドの選択を用いることによって、ＰＩ細胞に対して分類され得る。このプロセスの間、ＰＩ細胞への挿入物は、中断された遺伝子が、ＰＩ状態の確率に重要である限り、ランダムであるはずである。感染に抵抗性である、選択された他の遺伝子が、細胞中に存在するはずであり、従って、このプロセスは、複数ラウンドの選択が達成され得るように、自動選択により促進される。

【００２７】

任意の細胞遺伝子が、本明細書中に示される方法を用いて、（すなわち、一般に、細胞において遺伝子またはその遺伝子産物を阻害し、所望のウイルスがその細胞中で増殖し得るか否かを決定することによって）、任意の所望のウイルスに対する適合性について試験され得る。ウイルスのいくつかの例としては、以下が挙げられる：ＨＩＶ（ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２を含む）；パルボウイルス；パピローマウイルス；ＳＡＲＳ（重篤急性呼

吸器症候群）ウイルス；ハンタウイルス；インフルエンザウイルス（例えば、インフルエンザＡ、ＢおよびＣウイルス）；Ａ～Ｇ型の肝炎ウイルス；カリシウイルス；アストロウイルス；ロタウイルス；コロナウイルス（例えば、ヒト呼吸器コロナウイルス）；ピコルナウイルス（例えば、ヒトライノウイルスおよびエンテロウイルス）；エボラウイルス；ヒトヘルペスウイルス（例えば、ＨＳＶ－１～９）（帯状疱疹ウイルス、エプスタイン－バーウイルスおよびヒトサイトメガロウイルスを含む）；ヒトサイトメガロウイルス；ヒトアデノウイルス；ハンタウイルス；動物については、上記に列挙されるヒトウイルスのいずれかに対する動物の対応物である、動物レトロウイルス（例えば、サル免疫不全ウイルス、鳥類免疫不全ウイルス、ウシ免疫不全ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ウマ感染性貧血ウイルス、ヤギ関節炎脳炎ウイルスまたは、ビスナウイルス）。

【００２８】

本発明の方法は、細菌を同定し、標的化するのに用いられ得る。標的化され得る細菌の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Ｌｉｓｔｅｒｉａ（ｓｐ．）、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ（全ての型）、Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ、Ｃｈｙｌａｍｉｄａ。本発明によって標的化され得る細菌のさらなる例としては、以下が挙げられる：

【００２９】

【数１】

M. tuberculosis, M. bovis, M. bovis strain BCG, BCG substrains, *M. avium, M. intracellulare, M. africanum, M. kansasii, M. marinum, M. ulcerans, M. avium* subspecies *paratuberculosis, Nocardia asteroides*, 他の *Nocardia* species, *Legionella pneumophila*, 他の *Legionella* species, *Salmonella typhi*, 他の *Salmonella* species, *Shigella* species, *Yersinia pestis, Pasteurella haemolytica, Pasteurella multocida*, 他の *Pasteurella species, Actinobacillus pleuropneumoniae, Listeria monocytogenes, Listeria ivanovii, Brucella abortus*, 他の *Brucella* species, *Cowdria ruminantium, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci, Coxiella burnetti*, 他の *Rickettsial* species, *Ehrlichia* species, *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Bacillus anthracis, Escherichia coli, Vibrio cholerae, Campylobacter* species, *Neiserria meningitidis, Neiserria gonorrhea, Pseudomonas aeruginosa*, 他の *Pseudomonas* species, *Haemophilus influenzae, Haemophilus ducreyi*, 他の *Hemophilus* species, *Clostridium tetani*, 他の *Clostridium* species, *Yersinia enterolitica*, および他の *Yersinia species*.

【００３０】

。

【００３１】

本発明の方法は、寄生物を同定し、標的化するのに用いられ得る。標的化され得る寄生物の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：Ｃｒｙｐｔｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ（全ての種）、Ａｍｅｒｉｃａｎ ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍｅｓ（Ｔ．ｃｒｕｚｉ）。さらに、本発明の方法内で意図される原虫および菌種の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：

【００３２】

【数１Ａ】

Plasmodium falciparum,
他の *Plasmodium* species, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*, *Trypanosoma cruzi*, 他の trypanosomal species, *Leishmania donovani*, 他の Leishmania species, *Theileria annulata*, 他の *Theileria* species, *Eimeria tenella*, 他の *Eimeria* species, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Penicillium marneffei*,および*Candida* species.

【００３３】

。

【００３４】

本発明の細胞遺伝子を含む核酸は、上記の方法により、そして、実施例に示されるようにして単離された。本発明は、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４１、配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５１、配列番号５２、配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、配列番号７３、配列番号７４または配列番号７５、配列番号８４、配列番号８５、配列番号８６、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９０、配列番号９１、配列番号９３、配列番号９４、配列番号９５、配列番号９６、配列番号９７、配列番号９８、配列番号９９、配列番号１００、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３、配列番号１０４、配列番号１０５、配列番号１０６、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１１３、配列番号１１４、配列番号１１５、配列番号１１６、配列番号１１７、配列番号１１８、配列番号１２０、配列番号１２１、配列番号１２２、配列番号１２３、配列番号１２４、配列番号１２５、配列番号１２６、配列番号１２７、配列番号１２８、配列番号１２９、配列番号１３０、配列番号１３１、配列番号１３２、配列番号１３３、配列番号１３４、配列番号１３５、配列番号１３６、配列番号１３７、配列番号１３８、配列番号１３９、配列番号１４０、配列番号１４１、配列番号１４２、配列番号１４３、配列番号１４４、配列番号１４５、配列番号１４６、配列番号１４７、配列番号１４８、配列番号１４９、配列番号１５０、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５３、配列番号１５４、配列番号１５５、配列番号１５６、配列番号１５７、配列番号１５８、配列番号１５９、配列番号１６０、配列番号１６１、配列番号１６２、配列番号１６３、配列番号１６４、配列番号１６５、配列番号１６６、配列番号１６７、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７０、配列番号１７１、配列番号１７２、配列番号１７３、配列番号１７４、配列番号１７５、配列番号１７６、配列番号１７８、配列番号１７９、配列番号１８０、配列番号１８１、配列番号１８２、配列番号１８３、配列番号１８４、配列番号１８５、配列番号１８６、配列番号１８７、配列番号１８８、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９１、配列番号１９２、配列番号１９３、配列番号１９４、配列番号１９５、配列番号１９６、配列番号１９７、配列番号１９８、配列番号１９９、配列番号２００、配列番

号２０１、配列番号２０２、配列番号２０３、配列番号２０４、配列番号２０５、配列番号２０７、配列番号２０８、配列番号２０９、配列番号２１０、配列番号２１１、配列番号２１２、配列番号２１３、配列番号２１４、配列番号２１５、配列番号２１６、配列番号２１７、配列番号２１８、配列番号２１９、配列番号２２０、配列番号２２１、配列番号２２２、配列番号２２３、配列番号２２４、配列番号２２５、配列番号２２６、配列番号２２７、配列番号２２８、配列番号２２９、配列番号２３０、配列番号２３１、配列番号２３２、配列番号２３３、配列番号２３４、配列番号２３５、配列番号２３６、配列番号２３７、配列番号２３８、配列番号２３９、配列番号２４１、配列番号２４２、配列番号２４４、配列番号２４５、配列番号２４６、配列番号２４８、配列番号２４９、配列番号２５０、配列番号２５１、配列番号２５２、配列番号２５３、配列番号２５４、配列番号２５５、配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５８、配列番号２５９、配列番号２６０、配列番号２６１、配列番号２６２、配列番号２６３、配列番号２６４、配列番号２６５、配列番号２６６、配列番号２６７、配列番号２６８、配列番号２６９、配列番号２７０、配列番号２７１、配列番号２７２、配列番号２７３、配列番号２７４、配列番号２７５、配列番号２７６、配列番号２７７、配列番号２７８、配列番号２７９、配列番号２８０、配列番号２８１、配列番号２８２、配列番号２８３、配列番号２８４、配列番号２８５、配列番号２８６、配列番号２８７、配列番号２８８、配列番号２８９、配列番号２９０、配列番号２９１、配列番号２９２、配列番号２９３、配列番号２９４、配列番号２９５、配列番号２９６、配列番号２９７、配列番号２９８、配列番号２９９、配列番号３００、配列番号３０１、配列番号３０２、配列番号３０３、配列番号３０４、配列番号３０５、配列番号３０６、配列番号３０７、配列番号３０８、配列番号３０９、配列番号３１０、配列番号３１１、配列番号３１２、配列番号３１３、配列番号３１４、配列番号３１５、配列番号３１６、配列番号３１７、配列番号３１８、配列番号３１９、配列番号３２０、配列番号３２１、配列番号３２２、配列番号３２３、配列番号３２４、配列番号３２５、配列番号３２６、配列番号３２７、配列番号３３２、配列番号３３３、配列番号３３７、配列番号３３８、配列番号３３９、配列番号３４０、配列番号３４１、配列番号３４２、配列番号３４３、配列番号３４４、配列番号３４５、配列番号３４６、配列番号３４７、配列番号３４８、配列番号３４９、配列番号３５０、配列番号３５１、配列番号３５２、配列番号３５３、配列番号３５４、配列番号３５５、配列番号３５６、配列番号３５７、配列番号３５８、配列番号３５９、配列番号３６０、配列番号３６１、配列番号３６２、配列番号３６３、配列番号３６４、配列番号３６５、配列番号３６６、配列番号３６７、配列番号３６８、配列番号３６９、配列番号３７０、配列番号３７１、配列番号３７２、配列番号３７３、配列番号３７４、配列番号３７５、配列番号３７６、配列番号３７７、配列番号３７８、配列番号３７９、配列番号３８０、配列番号３８１、配列番号３８２、配列番号３８３、配列番号３８４、配列番号３８５、配列番号３８６、配列番号３８７、配列番号３８８、配列番号３８９、配列番号３９０、配列番号３９１、配列番号３９２、配列番号３９３、配列番号３９４、配列番号３９５、配列番号３９６、配列番号３９７、配列番号３９８、配列番号３９９、配列番号４００、配列番号４０１、配列番号４０２、配列番号４０３、配列番号４０４、配列番号４０５、配列番号４０６、配列番号４０７、配列番号４０９、配列番号４１０、配列番号４１５、配列番号４１６、配列番号４１７、配列番号４１８、配列番号４１９、配列番号４２０、配列番号４２１、配列番号４２２、配列番号４２３、配列番号４２４、配列番号４２５、配列番号４２６、配列番号４２７、配列番号４２８（このリストは、簡潔のために、本明細書中で何回か配列番号リスト１として称される）に示されるヌクレオチド配列を含む核酸を含む。このように、これらの核酸は、配列表に示される各配列番号に示されるヌクレオチドに加えて、その分子のいずれかの末端にさらなるヌクレオチドを含み得る。このようなさらなるヌクレオチドは、当該分野で公知であるような任意の標準的な方法（例えば、組換え法および合成法）によって付加され得る。本発明により意図される配列表の任意のエントリーに示されるヌクレオチド配列を含むこのような核酸の例としては、例えば、以下が挙げられるがこれらに限定されない：ベクター内に置かれた核酸；核酸に、特に、機能的な様式（すなわち

、ｍＲＮＡまたはタンパク質が産生され得る様式）で連結された１つ以上の調節領域（例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化部位）を有する核酸；遺伝子のさらなる核酸を含む核酸（例えば、その遺伝子のより大きいか、または、全長のゲノム配列、部分長または全長ｃＤＮＡ、部分長ＲＮＡまたは全長ＲＮＡ）。このようなより大きい核酸を作製および／または単離することは、以下にさらに説明され、当該分野で周知かつ標準的である。

【００３５】

本発明はまた、配列番号１～４２８（配列番号リスト１）に示されるヌクレオチド配列、ならびに、このような遺伝子の各々の対立遺伝子改変体およびホモログを含む遺伝子によりコードされるタンパク質をコードする核酸を提供する。この遺伝子は、以下に説明され、当該分野で公知かつ標準的である標準的な方法を用いて容易に得られる。本発明はまた、これらの遺伝子または配列番号リスト１に列挙する任意の配列に示される核酸の任意の固有のフラグメントを意図する。本発明の遺伝子のフラグメントの例は、その配列が、配列番号リスト１（配列番号１～４２８）に示される配列のいずれかで示される、核酸である。固有であるために、このフラグメントは、他の公知の配列から区別するのに十分なサイズでなければならず、コンピュータデータベース（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ）の任意の核酸フラグメントをこの核酸のヌクレオチド配列と比較することによって、最も容易に決定される。このような比較検索は、当該分野で標準的である。代表的には、プライマーまたはプローブとして有用な固有のフラグメントは、配列の特異的なヌクレオチド含量に依存して、少なくとも約２０～約２５ヌクレオチド長である。さらに、フラグメントは、例えば、少なくとも約３０、４０、５０、７５、１００、２００または５００ヌクレオチド長であり得る。核酸は、その意図される目的に依存して、一本鎖または二本鎖であり得る。

【００３６】

本発明は、さらに、配列番号１～４２８（配列番号リスト１）に示されるヌクレオチド配列を含む遺伝子の調節領域を含む核酸を提供する。機能的にレポーター遺伝子に連結されるこのような調節領域を含む構築物がさらに提供される。このようなレポーター遺伝子構造物は、その配列が上記または配列番号リスト１に列挙される配列のいずれかに示される核酸を含む遺伝子の発現に影響を及ぼす化合物および組成物についてスクリーニングするために用いられ得る。

【００３７】

配列表に示される核酸は、代表的には、遺伝子フラグメントである；全コード配列、ならびに、各フラグメントを含む全遺伝子は、両方、本明細書中で意図され、そして、配列表に提示されるヌクレオチド配列を考慮して、標準的な方法によって容易に得られる（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第2版 Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９；ＤＮＡ ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｖｏｌｕｍｅｓ ＩおよびＩＩ，Ｇｌｏｖｅｒ，Ｄ．Ｍ．編 ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ Ｌｉｍｉｔｅｄ，Ｏｘｆｏｒｄ，１９８５を参照のこと）。ゲノム遺伝子全体を得るために、簡単に言えば、その配列が、上記に示される配列のいずれかに示される核酸、または、そのより小さいフラグメントが、高ストリンジェンシーな条件下で、ゲノムライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして利用され、そして。単離されたクローンが配列決定される。従って、一旦ゲノム遺伝子座が本発明の方法によって中断され、中断された遺伝子の部分配列が得られると、当業者は、部分配列を含む全遺伝子を単離する方法が分かり、従って、その調節領域を含む、遺伝子の全長配列を入手する。例えば、一旦新規なクローンの配列が決定されると、以前のフラグメントに存在しない、新規なクローンの部分から、ライブラリーに対してハイブリダイズし得る、プローブが作製され得、この遺伝子のフラグメントを含むより多くのクローンを単離し得る。この様式において、組織化された様式でこのプロセスを繰り返すことによって、染色体に沿って「歩く」ことができ、最終的には全遺伝子

に対するヌクレオチド配列を入手し得る。同様に、本発明の部分または、オープンリーディングフレームを含むゲノムライブラリーから入手したさらなるフラグメントを用いて、ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングして、この遺伝子の全コード配列を含むｃＤＮＡを入手し得る。必要な場合、上記のようにスクリーニングを繰り返すことにより、複数のクローンから完全な配列を入手し得る。次いで、単離体を配列決定して、ジデオキシヌクレオチド配列決定法のような標準的な手段によってヌクレオチド配列を決定し得る（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第２版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９を参照のこと）。

【００３８】

本発明の遺伝子は、ラットから単離された；しかし、任意の所望の種（好ましくは、ヒトのような哺乳動物）におけるホモログが、提供されるか、またはヒトライブラリー（ゲノムライブラリーまたはｃＤＮＡライブラリー）を、本明細書中の配列表に記載される核酸またはそのフラグメントの配列を含むプローブでスクリーニングし、そして好ましくは比較的高ストリンジェンシーなハイブリダイゼーション条件下でこのプローブと特異的にハイブリダイズする遺伝子を単離することによって、容易に得られ得る。例えば、高塩条件（例えば、６×ＳＳＣまたは６×ＳＳＰＥ中）および／または高温のハイブリダイゼーションが使用され得る。例えば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、代表的に、所定の鎖長についてのT_m（分子の半分がそのパートナーから解離する融解温度）より５℃～２０℃低い。当該分野において公知であるように、ハイブリダイズする領域のヌクレオチド組成は、ハイブリッドの融解温度を決定する要因である。例えば、２０マーのプローブについては、推奨されるハイブリダイゼーション温度は、代表的に、約５５～５８℃である。さらに、ラット配列を利用して、ラットタンパク質の一部についてのアミノ酸配列を決定し、そしてその特定の動物におけるホモログのアミノ酸配列をコードするための最適化されたコドン使用法を有するプローブを選択することによって、任意の種の動物におけるホモログについてのプローブを考案し得る。任意の単離された遺伝子が、その遺伝子を配列決定してその遺伝子が本明細書中にその遺伝子を構成するとして列挙されるヌクレオチド配列を含むことを決定することによって、標的遺伝子として確認され得る。任意のホモログが、その機能によって、ホモログとして確認され得る。ホモログはまた、ラット配列を、容易に利用可能なデータベース上の他の種由来の配列と比較することによって、得られ得る。例えば、ラット配列は、ホモログを得るために、マウス配列と比較され得る。次いで、この比較から得られたホモログは、さらなるホモログを得るために、ヒト配列または他の哺乳動物の配列と比較され得る。ラット配列はまた、データベース上のヒト配列または任意の他の哺乳動物配列と、直接比較され得る。

【００３９】

相同領域において、配列表の配列番号１～配列番号４２８までに記載されるヌクレオチド配列を含む遺伝子によってコードされるタンパク質をコードする核酸のエキソンの領域、またはそのホモログに対して、９８％、９５％、９０％、８５％、８０％、７０％、６０％、または５０％の相同性、あるいはそれより大きい相同性を有する、任意の所望の種（好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはヒト）由来の核酸が、本発明によってさらに意図される。相同領域において、配列表の配列番号１～配列番号４１８までのいずれかに記載されるヌクレオチド配列を含む核酸のエキソンの領域、またはそのホモログに対して、９８％、９５％、９０％、８５％、８０％、７０％、６０％、または５０％の相同性、あるいはそれより大きい相同性を有する、任意の所望の種（好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはヒト）由来の核酸が、本発明によってまた意図される。これらの遺伝子は、合成され得るか、またはホモログを単離するために使用されるのと同じ方法によって、所望であれば、所望の相同性が低下するのに従って、そしてさらに、変動性が検索される任意の領域のＧ－ＣまたはＡ－Ｔの豊富さに依存して、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のストリンジェンシーを低下させて、得られ得る。本発明の遺伝子のいずれかまたは

そのホモログの対立遺伝子改変体が、上記プロトコルに従って、さらなるライブラリーをスクリーニングすることによって、容易に単離および配列決定され得る。合成遺伝子を作製する方法は、米国特許第５，５０３，９９５号、およびそこに引用される参考文献に記載されている。

【００４０】

本発明の任意の選択されたタンパク質をコードする核酸は、そのタンパク質を機能的にコードする任意の核酸であり得る。例えば、機能的にコードするためには、すなわち、核酸が発現されることを可能にするためには、核酸は、例えば、外因性または内因性の発現制御配列（例えば、複製起点、プロモーター、エンハンサー）、および必要な情報プロセシング部位（例えば、リボソーム結合部位、ＲＮＡスプライシング部位、ポリアデニル化部位、および転写ターミネーター配列）を含み得る。好ましい発現制御配列は、メタロチオネイン（ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｉｎｅ）遺伝子、アクチン遺伝子、免疫グロブリン遺伝子、ＣＭＶ、ＳＶ４０、アデノウイルス、ウシパピローマウイルスなどに由来するプロモーターであり得る。発現制御配列は、核酸が内部に配置される細胞における機能性について選択され得る。選択されたタンパク質をコードする核酸は、選択されたタンパク質のアミノ酸配列に基づいて容易に決定され得、そして明らかに、多くの核酸が、任意の選択されたタンパク質をコードする。

【００４１】

本発明は、さらに、ストリンジェントな条件下で、本明細書中に列挙される任意の配列（すなわち、配列番号１～配列番号４２８のいずれか）に記載されるヌクレオチド配列を含む遺伝子によってコードされるタンパク質をコードする核酸と選択的にハイブリダイズする核酸を提供する。このハイブリダイゼーションは、特異的であり得る。ハイブリダイズする核酸と、この核酸がハイブリダイズする配列との間の相補性の程度は、少なくとも、無関係のタンパク質をコードする核酸とのハイブリダイゼーションを排除するために十分であるべきである。従って、本発明のタンパク質コード配列の核酸と選択的にハイブリダイズする核酸は、ストリンジェントな条件下で、異なる無関係のタンパク質についての核酸とは選択的にハイブリダイズせず、そしてその逆もまたそうである。代表的に、選択的ハイブリダイゼーションを達成するための、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、高イオン強度の溶液（６×ＳＳＣまたは６×ＳＳＰＥ）での、T_m（分子の半分がそのパートナーから解離する融解温度）より約１２～２５℃低い温度でのハイブリダイゼーション、引き続く、洗浄温度がハイブリッド分子のT_mの約５℃～２０℃低いように選択された温度および塩濃度の組み合わせでの洗浄を包含する。この温度および塩濃度は、フィルター上に固定された参照ＤＮＡのサンプルが標識された目的の核酸にハイブリダイズされ、次いで異なるストリンジェンシーの条件下で洗浄される、予備実験において、実験的に容易に決定される。ハイブリダイゼーション温度は、代表的に、ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリダイゼーションおよびＲＮＡ－ＲＮＡハイブリダイゼーションについて、より高い。洗浄温度は、当該分野において公知であるように、選択的ストリンジェンシーを達成するために、上記のように使用され得る。（Ｓａｍｂｒｏｏｋら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第2版，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９；Ｋｕｎｋｅｌら，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１９８７．１５４：３６７，１９８７）。任意の所定の核酸に選択的にハイブリダイズする核酸フラグメントが、例えば、さらなるハイブリダイゼーション方法または増幅方法（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ））のためのプライマーおよび／またはプローブとして、使用され得る。ＤＮＡ：ＤＮＡハイブリダイゼーションのために好ましいストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、６×ＳＳＣまたは６×ＳＳＰＥ中約６８℃（水溶液中）、引き続く６８℃での洗浄であり得る。

【００４２】

本発明は、さらに、本明細書中に記載されるヌクレオチド配列のいずれか（すなわち、配列番号１～配列番号４２８のいずれか）を含む遺伝子によってコードされるタンパク質

をコードする核酸によってコードされるタンパク質を提供する。このタンパク質は、いくつかの手段のいずれかによって、容易に得られ得る。例えば、遺伝子のコード領域のヌクレオチド配列が、翻訳され得、次いで、対応するポリペプチドが、標準的な方法によって、機械的に合成され得る。さらに、遺伝子のコード領域が、発現または合成され得、得られるポリペプチドに特異的な抗体が、標準的な方法によって惹起され得（例えば、ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８８を参照のこと）、そしてタンパク質が、抗体との選択的ハイブリダイゼーションによって、他の細胞タンパク質から単離され得る。このタンパク質は、タンパク質精製の標準的な方法（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第２版，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９を参照のこと）によって、所望の程度まで精製され得る。本発明の任意のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列は、核酸配列から推定され得るか、あるいは単離されたかまたは組換え的に産生されたタンパク質を配列決定することによって、決定され得る。

【００４３】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」は、本明細書中で交換可能に使用され、そしてアミノ酸のポリマーをいい、そして全長タンパク質およびそのフラグメントを包含する。本明細書中および特許請求の範囲において使用される場合、「ａ」は、それが使用される文脈に依存して、１つ以上を意味し得る。アミノ酸残基とは、そのペプチド結合におけるポリペプチドの化学的消化（加水分解）の際に形成されるアミノ酸である。本明細書中に記載されるアミノ酸残基は、好ましくは、Ｌ異性体形態である。しかし、所望の機能的特性がポリペプチドによって維持される限り、Ｄ異性体形態の残基が、任意のＬアミノ酸残基と置き換えられ得る。標準的なポリペプチドの命名法（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２４３：３５５２－５９（１９６９）に記載され、そして米国特許法施行規則第１．８２２条第（ｂ）項において承認されている）が、本明細書中で使用される。

【００４４】

当業者によって理解されるように、本発明はまた、アミノ酸配列または他の特性において、わずかなバリエーションを有するポリペプチドを包含する。アミノ酸置換は、公知のパラメータによって、中性であるように選択され得る（例えば、Ｒｏｂｉｎｓｏｎ ＷＥ ＪｒおよびＭｉｔｃｈｅｌｌ ＷＭ．，ＡＩＤＳ ４：Ｓ１５１－Ｓ１６２（１９９０）を参照のこと）。このようなバリエーションは、天然に、対立遺伝子改変体として（例えば、遺伝的多型に起因して）生じ得るか、または人の介在によって（例えば、クローニングされたＤＮＡ配列の変異誘発によって）産生され得る（例えば、誘導された点変異体、欠失変異体、挿入変異体、および置換変異体）。アミノ酸配列における小さい変化（例えば、保存的アミノ酸置換、小さい内部欠失または挿入、および分子の末端における付加または欠失）は、一般的に好ましい。置換は、例えば、Ｄａｙｈｏｆｆらのモデル（Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ １９７８，Ｎａｔ’ｌ Ｂｉｏｍｅｄ．Ｒｅｓ．Ｆｏｕｎｄ．，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．）に基づいて設計され得る。これらの修飾は、アミノ酸配列の変化を生じ得るか、サイレント変異を提供し得るか、制限部位を修飾し得るか、または他の特定の変異を提供し得る。同様に、このようなアミノ酸の変化は、ポリペプチドおよびタンパク質をコードする、異なる核酸を生じる。従って、代替の核酸もまた、このような修飾によって意図される。

【００４５】

本発明はまた、本発明の核酸を含む細胞を提供する。タンパク質をコードする核酸を含む細胞は、代表的に、ＤＮＡを複製し得、そしてさらに、代表的に、コードされるタンパク質を発現し得る。細胞は、原核生物細胞（特に、多量の核酸を産生する目的で）であっ

ても真核生物細胞（特に、哺乳動物細胞）であってもよい。細胞は、好ましくは、コードされるタンパク質を発現し、その結果、得られる産生されたタンパク質が、哺乳動物タンパク質のプロセシング修飾を有する目的で、哺乳動物細胞である。

【００４６】

本発明の核酸は、任意の選択された手段によって、特に、化合物の送達の目的および標的細胞に依存して、細胞内に送達され得る。多くの送達手段が、当該分野において周知である。例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈澱、マイクロインジェクション、カチオン性リポソームまたはアニオン性リポソーム、および核への送達のための核局在シグナルペプチドと組み合わせたリポソームが、当該分野において公知であるように、利用され得る。

【００４７】

本発明はまた、ウイルス増殖のために必要な、本発明の方法によって産生された、変異された細胞遺伝子、およびこれらの変異体を含む細胞もまた有用であり得ることを意図する。これらの変異された遺伝子およびこれらを含む細胞が、本明細書中に記載される方法に従って、標準的な方法を使用して、単離および／または産生され得る。

【００４８】

本明細書中に記載される配列は、小さい配列の誤りを含み得ることが、認識されるべきである。このような誤りは、例えば、記載される配列由来の種々のプローブを使用する、上記ハイブリダイゼーション手順を使用し、その結果、コード配列が再単離および再配列決定されることによって、補正され得る。

【００４９】

実施例に記載されるように、本発明は、特定の持続的にウイルス感染された細胞の生存のために必要な、血清中に存在する「血清生存因子」の発見を提供する。この因子の単離および特徴付けは、この因子がタンパク質であり、約５０ｋＤと１００ｋＤとの間の分子量を有し、低ｐＨ（例えば、ｐＨ２）での不活性化およびクロロホルム抽出に耐え、約５分間にわたる低イオン強度溶液（例えば、約１０ｍＭ～約５０ｍＭ）中での煮沸によって不活性化されることを示した。従って、本発明は、約５０ｋＤと１００ｋＤとの間の分子量を有する、精製された哺乳動物血清タンパク質を提供し、このタンパク質は、低ｐＨでの不活性化に耐え、そしてクロロホルム抽出による不活性化に耐え、煮沸されると不活性化され、そして低イオン強度の溶液中で不活性化され、そして持続的にレオウイルスで感染された細胞を含む細胞培養物から除去される場合に、持続的にレオウイルスで感染された細胞の生存を選択的に実質的に防止する。上記物理的特徴に合う因子は、この因子を血清を含有しない培地（これは以前には、持続的にウイルス感染された細胞の生存を支持し得なかった）に添加し、そして推定因子を添加されたこの培地が持続的にウイルス感染された細胞（特に、レオウイルスで持続的に感染された細胞）をここで支持し得るか否かを決定することによって、容易に確認され得る。本明細書中において使用される場合、「精製」タンパク質とは、およその分子量が決定され得るために少なくとも十分な純度のタンパク質を意味する。

【００５０】

タンパク質のアミノ酸配列は、標準的な方法によって明らかにされ得る。例えば、そのタンパク質に対する抗体が惹起され得、そして発現ライブラリーをスクリーニングするために使用されて、そのタンパク質をコードする核酸配列を得ることができる。次いで、この核酸配列は、単に、対応するアミノ酸配列に翻訳される。あるいは、タンパク質の一部分が、標準的なアミノ酸配列決定方法（アミノ末端配列決定）によって、直接配列決定され得る。次いで、このアミノ酸配列が、そのアミノ酸配列の一部分に対する全ての可能なコード配列を含む核酸プローブのアレイを作製するために使用され得る。このプローブのアレイは、ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングして、コード配列の残りの部分、従って、最終的に、対応するアミノ酸配列を得るために、使用される。

【００５１】

本発明はまた、さらなる血清生存因子を検出および単離する方法を提供する。例えば、

任意の既知の血清成分がウイルス増殖のために必要であるか否かを決定するために、この既知の成分は、培養培地において阻害され得るか、またはこの培養培地から除去され得、そして持続的に感染された細胞が生存しないかどうかを決定することによって、ウイルス増殖が阻害されるか否かが観察され得る。この因子を戻して添加し得（すなわち、阻害を除去し得）、そしてこの因子がウイルス増殖を可能にするか否かを決定し得る。

【００５２】

さらに、他の未知の血清成分もまた、ウイルス増殖のために必須であることが見出され得る。血清は、種々の標準的な手段によって分画され得、そして画分が、無血清培地に添加されて、因子が、以前には血清を欠くことによって阻害されていたウイルスの増殖を可能にする反応中に存在するか否かを決定し得る。次いで、この活性を有する画分が、この因子が他の成分を比較的含まなくなるまで、さらに分画され得る。次いで、この因子が、標準的な方法（例えば、サイズ分画、変性および／または種々の手段による不活性化など）によって、特徴付けられ得る。好ましくは、一旦、因子が所望の精製レベルまで精製されると、この因子は、無血清培地中の細胞に添加されて、この因子が、無血清培地単独では与えなかった場合、ウイルスが増殖することを可能にする機能を与えることが確認される。この方法は、任意の所望のウイルスに対する特定の因子についての要件を確認するために、繰り返され得る。なぜなら、任意の１つのウイルスによって必要とされることが見出された各血清因子はまた、多くの他のウイルスによって必要とされ得るからである。一般に、ウイルスがより密接に関連し、そしてウイルスの感染様式がより類似するほど、１つのウイルスによって必要とされる因子が他のウイルスによって必要とされる可能性がより高くなる。

【００５３】

本発明はまた、本出願人らの発見を利用して、ウイルス感染を処置する方法を提供する。本明細書中に記載される方法の任意の被験体は、ウイルスに依存して、任意の動物、好ましくは、哺乳動物（例えば、ヒト、獣医学的動物（例えば、ネコ、イヌ、ウマ、ブタ、ヤギ、ヒツジまたはウシ）、または実験室動物（例えば、マウス、ラット、ウサギまたはモルモット））であり得る。

【００５４】

本発明は、被験体におけるウイルス感染を減少または阻害し、これによって処置する方法を提供し、この方法は、この被験体に、阻害量の、本明細書中に記載される血清タンパク質の機能を阻害する組成物を投与する工程を包含し、これによって、ウイルス感染を処置する。この血清タンパク質は、すなわち、約５０ｋＤと１００ｋＤとの間の分子量を有する血清タンパク質であり、これは、低ｐＨでの不活性化に耐え、そしてクロロホルム抽出による不活性化に耐え、煮沸される場合に不活性化され、そして低イオン強度溶液中で不活性化され、そして持続的にウイルスで感染された細胞を含む細胞培養物から除去される場合に、ウイルスで持続的に感染された細胞の少なくともいくらかの生存を防止する血清タンパク質である。この組成物は、例えば、血清タンパク質を特異的に結合する抗体、または血清タンパク質を機能的にコードする遺伝子によってコードされるＲＮＡを結合するアンチセンスＲＮＡを含有し得る。

【００５５】

被験体におけるウイルス感染を減少または阻害する方法は、本明細書中においてウイルス増殖に関連すると同定された遺伝子（例えば、配列番号１～４２８）（または遺伝子座）の１つを標的とするベクターを使用し得る。この方法は、この配列に標的化されたベクターの投与を必要とし、これによって、ベクターは、その遺伝子を破壊し得、これによって、破壊された遺伝子に依存するウイルス増殖を阻害し得る。このベクターは、ベクターの投与の際に挿入変異または欠失変異が標的部位において起こるように、相同配列を含むことによって、標的化され得る。

【００５６】

選択された処置されるべき被験体を感染し得る任意のウイルスが、本発明の方法によって処置され得る。上記のように、本発明の方法によって、任意の１つのウイルスの増殖の

ために必要であることが見出された、任意の血清タンパク質または生存因子が、他の多くのウイルスの増殖のために必要であることが見出され得る。任意の所定のウイルスについて、血清タンパク質または因子は、本明細書中に記載される方法によって、増殖のために必要とされることが確認され得る。レオウイルス、哺乳動物病原体、およびラット細胞系を使用する実施例によって同定された細胞遺伝子は、他のウイルス感染に対する一般的な適用性を有し、これらのウイルス感染としては、公知のヒト病原体および発見されるべきヒト病原体の全てが挙げられ、これには、以下が挙げられるが、それらに限定されない：ヒト免疫不全ウイルス（例えば、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２）；パルボウイルス；パピローマウイルス；ハンタウイルス；ＳＡＲＳ（重症急性呼吸器症候群）ウイルスインフルエンザウイルス（例えば、インフルエンザＡ型ウイルス、インフルエンザＢ型ウイルス，およびインフルエンザＣ型ウイルス）；Ａ型～Ｇ型肝炎ウイルス；カリチウイルス；アストロウイルス；ロタウイルス；コロナウイルス（例えば、ヒト呼吸コロナウイルス）；ピコルナウイルス（例えば、ヒトライノウイルスおよびエンテロウイルス）；エボラウイルス；ヒトヘルペスウイルス（例えば、ＨＳＶ－１～９）；ヒトサイトメガロウイルス；ヒトアデノウイルス；エプスタイン－バーウイルス；ハンタウイルス；動物については、上に列挙される任意のヒトウイルスに対する動物対応物、動物レトロウイルス（例えば、サル免疫不全ウイルス、トリ免疫不全ウイルス、ウシ免疫不全ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ウマ感染性貧血ウイルス、ヤギ関節炎脳炎ウイルス、またはビスナウイルス）。

【００５７】

組成物のタンパク質阻害量は、例えば、種々の量を細胞または被験体に投与し、次いで、被験体の血液の体積または体重に従って、タンパク質を阻害するために有効な量を調節することによって、容易に決定され得る。タンパク質に結合する組成物は、推定結合タンパク質をタンパク質ゲル上に流し、そしてそのタンパク質の、ゲルを通る移動の変化を観察することによって、容易に決定され得る。タンパク質の阻害は、任意の所望の手段（例えば、持続的に感染された細胞を維持するために使用した完全培地にインヒビターを添加し、そして細胞の生存率を観察すること）によって決定され得る。この組成物は、例えば、血清タンパク質を特異的に結合する抗体を含有し得る。抗体による特異的結合とは、この抗体が、血清からその因子を選択的に除去するために使用され得るか、またはその因子の生物学的活性を阻害し得、そしてラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、バイオアッセイ、または酵素結合イムノソルベント（ＥＬＩＳＡ）技術によって容易に決定されることを意味する。

【００５８】

細胞内病原体の繁殖と関連する細胞遺伝子の同定は、転写、翻訳、プロセシング、またはタンパク質機能（リン酸化、グリコシル化、タンパク質－タンパク質相互作用など）のレベルでの、効果的な標的化を可能にする。各々の例が存在する。これらの多くは、ウイルスタンパク質またはそれらの未翻訳ＤＮＡ、またはＲＮＡを目的とする。宿主においてよりも病原体において、より大きい遺伝的不安定性が存在するので、これらの標的は、変異をより受けやすく、そして治療アプローチの影響から逃れやすい。標的が変異体である場合に条件的に致死ではない場合、宿主標的は、より安定であるようであり、従って、より実用的であり得る。本特許において採用されるアプローチにおいて利用される選択のプロセスは、変異が作製された後の細胞増殖に依存するので、治療の標的は、変異体である場合、致死ではないようである。従って、この組成物は、例えば、アンチセンスＲＮＡ、または血清タンパク質をコードする遺伝子によってコードされるＲＮＡを特異的に結合するｓｉＲＮＡ（小さい干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ））を含有し得る。アンチセンスＲＮＡは、標準的な方法（例えば、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ＲＮＡ ａｎｄ ＤＮＡ，Ｄ．Ａ．Ｍｅｌｔｏｎ編，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８８））によって、合成および使用され得る。

【００５９】

ＡＮＮＥＸＩＮ Ｉタンパク質、ＡＮＮＥＸＩＮ ＩＩタンパク質およびＡＮＮＥＸＩ

Ｎ　ＩＩＩタンパク質をコードする核酸に対するアンチセンス分子が提供され、そして標的化タンパク質の発現を阻害するために使用され得る。当業者によって理解されるように、アンチセンス分子とは、発現が阻害されるタンパク質をコードするかまたはこのタンパク質の発現のために必要な核酸配列に相補的であるか、または部分的に相補的である、オリゴヌクレオチドである。例えば、これらのタンパク質の発現を阻害するために使用され得るアンチセンス分子としては、特定のタンパク質をコードする核酸に相補的な任意のオリゴヌクレオチドが挙げられる。例えば、ＡＮＮＥＸＩＮ　Ｉの発現を阻害するためには、配列番号６５（これに限定されない）に相補的であるか、または部分的に相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドが、ＡＮＮＥＸＩＮ　Ｉ発現を阻害するために使用され得る。特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、認識できるレベルで持続する二重鎖を形成し得、これによって、選択された条件下で、標的化された遺伝子の発現を減少させ得る。ＡＮＮＥＸＩＮ　Ｉタンパク質発現を標的化するアンチセンスの例としては、配列番号６５の相補体または配列番号６５の相補体の一部を含むオリゴヌクレオチドが挙げられ得る。ＡＮＮＥＸＩＮ　Ｉタンパク質についてのこのようなアンチセンス分子の特定の例としては、

【００６０】

【数１Ｂ】

AACAAGTCAAATGCT, AACAAGTCAAATGCTTTATA,

GTCAAATGCTTTATA,

TTATATATTTGAGT T, TTATATATTTGAGTTAGGGA,

TTTGAGTTAGGGAACATGTATAT, CATGTATATGTCAAAAATAAAAAT,

TGCACATTGAAACCCTTATG, TTCCACGTTTATCTATTTT, および

GGAAACGTTAATGACAGAAAC.

【００６１】

が挙げられる。同様に、ＡＮＮＥＸＩＮ　ＩＩタンパク質の発現を阻害するためには、ＡＮＮＥＸＩＮ　ＩＩタンパク質の発現を阻害するアンチセンス分子は、ＡＮＮＥＸＩＮ　ＩＩタンパク質をコードする核酸に相補的な任意のオリゴヌクレオチドを含み得、これには、配列番号４１が挙げられるが、これに限定されない。ＡＮＮＥＸＩＮ　ＩＩタンパク質についてのこのようなアンチセンス分子の特定の例としては；

【００６２】

【数２】

AAAAGGCGGACAAGGG, CTTCCNGACNCCCCNAAGCC,

CGAANCGGAAGGGC, GCCCGCCCGAA, GGCCGACTCTCTGCCCGCC,および

CCCGGAAAGAGGACAGCG.

【００６３】

が挙げられる。

【００６４】

同様に、ＡＮＮＥＸＩＮ　ＩＩＩタンパク質の発現を阻害するためには、ＡＮＮＥＸＩＮ　ＩＩＩタンパク質の発現を阻害するアンチセンス分子は、ＡＮＮＥＸＩＮ　ＩＩタンパク質をコードする核酸に相補的な任意のオリゴヌクレオチドを含み得、これには、配列番号１８８が挙げられるが、これらに限定されない。ＡＮＮＥＸＩＮ　ＩＩＩタンパク質についてのこのようなアンチセンス分子の特定の例としては；

【００６５】

【数３】
GGTTGGGCCAAAAA, TTAANAAACCGTTCACCCC,
AACCGGTGGTTTGTTGCCGG, GATAACTCACTGCTG,
CTTCTCTTGAACACACCTCCTGGGG,およびGCGAAAGGCCCTAACAATAG.

【００６６】
が挙げられる。
【００６７】
同様に、任意の他のタンパク質コード遺伝子（例えば、ＩＧＦ２ＢＰ　５プロテアーゼ（ｐｒｓｓ１１）遺伝子であるが、これに限定されない）については、アンチセンス分子は、当業者によって、ＡＮＮＥＸＩＮ　Ｉタンパク質、ＡＮＮＥＸＩＮ　ＩＩタンパク質、およびＡＮＮＥＸＩＮ　ＩＩＩタンパク質について上に説明されたように設計され得る。例えば、使用されるアンチセンス分子は、長さが１４ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、１６ヌクレオチド、１７ヌクレオチド、１８ヌクレオチド、２０ヌクレオチド、２２ヌクレオチド、２４ヌクレオチド、２６ヌクレオチド、２８ヌクレオチド、３０ヌクレオチド、３４ヌクレオチド、３８ヌクレオチド、４２ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、６０ヌクレオチド、７０ヌクレオチド、８０ヌクレオチド、または９０ヌクレオチドより大きくあり得る。使用されるアンチセンス分子は、長さが１５０ヌクレオチド、１２５ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、９０ヌクレオチド、８０ヌクレオチド、７０ヌクレオチド、６０ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、４２ヌクレオチド、３８ヌクレオチド、３４ヌクレオチド、３０ヌクレオチド、２８ヌクレオチド、２６ヌクレオチド、２４ヌクレオチド、２２ヌクレオチド、２０ヌクレオチド、１８ヌクレオチド、１７ヌクレオチド、１６ヌクレオチド、または１５ヌクレオチドより短くあり得る。アンチセンス分子は、標的化された遺伝子の標的配列とのミスマッチまたは非ワトソン－クリック塩基対合を含み得る。ミスマッチの数は、０ヌクレオチド、１ヌクレオチド、２ヌクレオチド、３ヌクレオチド、４ヌクレオチド、５ヌクレオチド、６ヌクレオチド、７ヌクレオチド、８ヌクレオチド、９ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、１２ヌクレオチド、１４ヌクレオチド、１６ヌクレオチド、１８ヌクレオチド、または２０ヌクレオチドより大きくあり得る。ミスマッチの数は、２０ヌクレオチド、１８ヌクレオチド、１６ヌクレオチド、１４ヌクレオチド、１２ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、９ヌクレオチド、８ヌクレオチド、７ヌクレオチド、６ヌクレオチド、５ヌクレオチド、４ヌクレオチド、３ヌクレオチド、２ヌクレオチド、または１ヌクレオチドより小さくあり得る。アンチセンス分子の配列におけるミスマッチのレベルは、塩基対の全数の０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、または７％より大きくあり得る。アンチセンス分子の配列におけるミスマッチのレベルは、塩基対の全数の１０％、７％、５％、４％、３％、２％、または１％より小さくあり得る。さらに、アンチセンス配列は、本明細書中に記載されるような相補的配列または部分的相補的配列に対応する配列に加えて、その分子の５’末端または３’末端のいずれかにおけるさらなる連続配列を含み得る。例えば、アンチセンス分子は、標的配列に相補的ではないさらなる配列に連結され得る。
【００６８】
他の実施形態において、アンチセンスとは異なる様式で機能するオリゴヌクレオチドが使用され得る。例えば、干渉ＲＮＡとして使用されるＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）が、コードされるタンパク質（これの発現が阻害または減少される）の配列に基づいて設計され得る。得られる干渉ＲＮＡは、アンチセンス分子の様式と類似の様式で使用されて、特定のタンパク質（例えば、本明細書中で記載されるもの、特に、表２に示されるもの、およびこれらのヒトホモログであるが、これらに限定されない）の発現を減少または阻害し得る。ＲＮＡ干渉の現象、およびサイレンス遺伝子発現におけるその使用に関する、以下の参考文献が、その教示について、特に、遺伝子、推定遺伝子、または潜在的遺伝子のサイレンスな発現を、ＲＮＡ分子で細胞をトランスフェクトまたは形質転換することによる

方法に関する教示について、本明細書中に援用される：

【００６９】

【数３Ａ】

Fire et al., "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*," *Nature* 391: 806-811 (1998); Kennerdell and Carthew, "Use of dsRNA-mediated interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway," *Cell* 95: 1017-1026 (1998); Ngo et al., "Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14687-14692 (1998); Timmons and Fire, "Specific interference by ingested dsRNA," *Nature* 395: 854 (1998); Yang et al., "Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells," *Mol. Cell Biol.* 21: 7807-7816 (2001); Caplen et al., "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9742-9747 (2001); Elbashir et al., "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in mammalian cell culture," *Nature* 411: 494-498 (2001); Hammond et al., "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells," *Nature* 404: 293-296 (2000); Zamore et al., "RNAi:double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21-33 nucleotide intervals," *Cell* 101: 25-33 (2000); Bernstein et al., "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference," *Nature* 409: 363-366 (2001); Nykanen et al., "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway," *Cell* 107: 309-321 (2001); Elbashir et al., "RNA interference is mediated by 21 and 22-nucleotide RNAs," *Genes Dev.* 15:188-200 (2001); Lipardi et al., "RNAi as random degradative PCR, siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs," *Cell* 107: 297-307 (2001); Sijen et al., "On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing," *Cell* 107: 465-476 (2001); Grishok et al., "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing," *Cell* 106: 23-34 (2001); Aravin et al., "Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline," *Curr. Biol.* 11: 1017-1027 (2001); および Hutvagner and Zamore, "RNAi: nature abhors a double-strand," Curr. Opinion Genetics Develop. 12: 225-232 (2002).

【００７０】

効果的な治療の例としては、以下が挙げられる。

【００７１】

ＣＣＲ５は、ｓｉＲＮＡに対する標的を有する。ＣＣＲ５は、ＨＩＶがマクロファージ細胞株に入るために必要な、共レセプター（細胞遺伝子産物）である（Ｑｉｎ ＸＦ，Ａｎ ＤＳ，Ｃｈｅｎ ＩＳ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ Ｄ．，Ｉｎｈｉｂｉｔｉｎｇ ＨＩＶ－１ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｉｎ ｈｕｍａｎ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｂｙ ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｓｍａｌｌ ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ ＲＮＡ ａｇａｉｎｓｔ ＣＣＲ５，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ２００３ Ｊａｎ ７；１００（１）：１８３－８）。約２１ヌクレオチド長

の二本鎖ＲＮＡは、特定の遺伝子の発現を減少させるための強力な試薬として認識される。これらを、ウイルス感染に対して細胞を保護するための試薬として使用するためには、ｓｉＲＮＡを初代細胞に導入するための効果的な方法が必要とされる。ここで、本発明者らは、ＨＩＶ－１共レセプター（ＣＣＲ５）に対するｓｉＲＮＡをヒト末梢血Ｔリンパ球に導入するための、レンチウイルスベースのベクターの構築の成功を記載する。高力価のベクターショックを用いて、末梢血Ｔリンパ球の４０％より多くが形質導入され得、そして強力なＣＣＲ５－ｓｉＲＮＡの発現が、選択の非存在下で２週間の期間にわたる、細胞表面でのＣＣＲ５発現の１０倍までの阻害を生じた。対照的に、別の主要なＨＩＶ－１共レセプターであるＣＸＣＲ４の発現は、影響を受けなかった。重要なことに、ｓｉＲＮＡによるＣＣＲ５発現のブロッキングは、ＣＣＲ５親和性ＨＩＶ－１ウイルス感染からの、リンパ球集団に対するかなりの保護を提供し、感染された細胞を３分の１～７分の１に低下させた；ＣＸＣＲ－４親和性ウイルスによる感染に対する最小の効果のみが、観察された。従って、本発明者らの研究は、ｓｉＲＮＡのレンチウイルスベクター媒介性送達の、ＨＩＶ－１および他のウイルス性疾患の処置のための細胞内免疫の一般的手段としての可能性および潜在性を実証する。

【００７２】

インフルエンザＡ型に対するウイルス標的：Ｇｅ Ｑ，ＭｃＭａｎｕｓ ＭＴ，Ｎｇｕｙｅｎ Ｔ，Ｓｈｅｎ ＣＨ，Ｓｈａｒｐ ＰＡ，Ｅｉｓｅｎ ＨＮおよびＣｈｅｎ，Ｊ．（Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ ２００３ Ｍａｒ ４；１００（５）：２７１８－２３，ＲＮＡ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ ｏｆ ｉｎｆｌｕｅｎｚａ ｖｉｒｕｓ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｂｙ ｄｉｒｅｃｔｌｙ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｍＲＮＡ ｆｏｒ ｄｅｇｒａｄａｔｉｏｎ ａｎｄ ｉｎｄｉｒｅｃｔｌｙ ｉｎｈｉｂｉｔｉｎｇ ａｌｌ ｖｉｒａｌ ＲＮＡ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ）は、インフルエンザＡ型ウイルスが、ヒト気道において広範に広がる感染を引き起こすが、既存のワクチンおよび薬物治療は、価値が制限されることを開示する。ここで、本発明者らは、ウイルスゲノムの保存された領域に特異的な短い干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）が、細胞株と胚含有鶏卵との両方におけるインフルエンザウイルス産生を強力に阻害し得ることを示す。この阻害は、ｓｉＲＮＡ二重鎖における機能的アンチセンス鎖の存在に依存し、このことは、ウイルスｍＲＮＡが、ＲＮＡ感染の標的であることを示唆する。しかし、ヌクレオキャプシド（ＮＰ）またはＲＮＡトランスクリプターゼ（ＰＡ）の成分に特異的なｓｉＲＮＡは、対応するｍＲＮＡのみでなく、ビリオンＲＮＡおよびその相補的ＲＮＡの蓄積を廃止した。これらのｓｉＲＮＡはまた、他のウイルスＲＮＡの蓄積を広範に阻害したが、細胞ＲＮＡを阻害しなかった。この知見は、新たに合成されたＮＰタンパク質およびＰＡタンパク質が、インフルエンザウイルスの転写および複製のために必要とされ、そしてヒトにおけるインフルエンザ感染の予防および治療としての、ｓｉＲＮＡの開発のための基礎を提供することを明らかにする。

【００７３】

本出願は、ＫＬＦ６の破壊を示す。Ｙｏｏｎ ＨＳ，Ｃｈｅｎ ＸおよびＹａｎｇ ＶＷ（Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２００３年1月２４日；２７８（４）：２１０１－５、Ｋｒｕｐｐｅｌ－ｌｉｋｅ ｆａｃｔｏｒ ４ ｍｅｄｉａｔｅｓ ｐ５３－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｇ１／Ｓ ｃｅｌｌ ｃｙｃｌｅ ａｒｒｅｓｔ ｉｎ ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｔｏ ＤＮＡ ｄａｍａｇｅ）は、関連タンパク質ＫＬＦ４に対するｓｉＲＮＡ有効性を示す。腫瘍サプレッサーｐ５３は、ＤＮＡ損傷後のゲノム完全性の維持のために必要とされる。ｐ５３が機能する１つの機構は、細胞周期のＧ（１）期とＳ期との間での移行におけるブロックを誘導することである。以前の研究は、Ｋｒｕｐｐｅｌ様因子４（ＫＬＦ４）遺伝子が、ＤＮＡ損傷後に活性化されること、およびこのような活性化がｐ５３に依存することを示す。さらに、ＫＬＦ４の強制発現によって、Ｇ（１）／Ｓ停止が引き起こされる。本発明の研究は、ＤＮＡ損傷に応答したｐ５３依存性細胞周期停止プロセスを媒介する際のＫＬＦ４の必要条件を調べる。本発明者らは、ｐ５３対立遺伝子についてヌルである（－／－）結腸癌細胞株ＨＣＴ１１６のＧ（１）集団が、野生型ｐ５３（＋／＋）を有

する細胞と比較してγ照射後に破壊されたことを示す。照射したＨＣＴ１１６　ｐ５３－／－細胞のＫＬＦ４の条件的発現は、Ｇ（１）細胞集団を、照射したＨＣＴ１１６　ｐ５３＋／＋細胞において見られたレベルと類似したレベルに戻した。逆に、ＫＬＦ４に特異的な小さい干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）でのＨＣＴ１１６　ｐ５３＋／＋細胞の処理は、γ照射後のＧ（１）期の細胞数を、未処理のコントロールまたは非特異的ｓｉＲＮＡで処理した細胞と比較して有意に減らした。各々の場合、ＫＬＦ４レベルの上昇または低下は、それぞれ、条件的誘導またはｓｉＲＮＡ阻害に起因して、ｐ２１（ＷＡＦ１／ＣＩＰ１）のレベルの上昇または低下を伴った。本発明者らの研究の結果は、ＫＬＦ４が、ＤＮＡ損傷後の細胞周期のＧ（１）／Ｓ進行を制御する際のｐ５３の必須のメディエーターであることを示す。

【００７４】

一旦遺伝子が公知になると、本アプローチを用いて、ヒト（および他の動物）を疾患から保護し得る（Ｏｌｓｏｎ　ＫＥ，Ａｄｅｌｍａｎ　ＺＮ，Ｔｒａｖａｎｔｙ　ＥＡ，Ｓａｎｃｈｅｚ－Ｖａｒｇａｓ　Ｉ，Ｂｅａｔｙ　ＢＪおよびＢｌａｉｒ　ＣＤ，Ｄｅｖｅｌｏｐｉｎｇ　ａｒｂｏｖｉｒｕｓ　ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ　ｉｎ　ｍｏｓｑｕｉｔｏｅｓ，Ｉｎｓｅｃｔ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２００２　Ｏｃｔ；３２（１０）：１３３３－４３）。節足動物媒介ウイルスによって引き起こされる疾患は、ますます重要となる公共の健康問題であり、そして病原体の伝達を制御するために新規方法が必要とされる。本明細書に記載される研究の基礎となる仮説は、Ａｅｄｅｓ　ａｅｇｙｐｔｉ蚊の遺伝子操作が、デング熱ウイルスをヒト宿主に伝達するその能力を大いにかつ永続的に低減し得ることである。近年の重要な知見は、ここで、本発明者らが遺伝子制御仮説を試験することを可能にする。本発明者らは、相同なウイルスの複製および伝達を除去するために、蚊の中腸および唾液腺において発現され得る、ウイルスゲノム由来のＲＮＡセグメントを同定した。本発明者らは、培養蚊細胞中のウイルス由来のエフェクターＲＮＡの一過性発現および遺伝性発現が、ウイルス複製（ｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ）をサイレンシングし得ることを実証し、そしてＲＮＡ媒介抵抗性の機構を特徴付けた。本発明者らは、現在、蚊活性プロモーターからエフェクターＲＮＡを発現する転移因子を用いた形質転換によって、ウイルス抵抗性蚊系統を開発している。

【００７５】

ＩＧＦ２（本発明の方法において破壊した遺伝子のうちの１つ）の標的化は、肝臓の癌において良好な結果を生じた（Ｙａｏ　Ｘ，Ｈｕ　ＪＦ，Ｄａｎｉｅｌｓ　Ｍ，Ｓｈｉｒａｎ　Ｈ，Ｚｈｏｕ　Ｘ，Ｙａｎ　Ｈ，Ｌｕ　Ｈ，Ｚｅｎｇ　Ｚ，Ｗａｎｇ　Ｑ，Ｌｉ　Ｔ，Ｈｏｆｆｍａｎ　ＡＲ，Ａ　ｍｅｔｈｙｌａｔｅｄ　ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　ｉｎｈｉｂｉｔｓ　ＩＧＦ２　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ａｎｄ　ｅｎｈａｎｃｅｓ　ｓｕｒｖｉｖａｌ　ｉｎ　ａ　ｍｏｄｅｌ　ｏｆ　ｈｅｐａｔｏｃｅｌｌｕｌａｒ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ　２００３年１月１日１（２）：２６５－７３）。ＩＧＦ２は、肝細胞腫瘍形成に関連付けられているマイトジェン性ペプチドである。遺伝子発現のサイレンシングは、シトシン－グアニン（ＣｐＧ）ジヌクレオチドでのシトシンメチル化としばしば関連しているで、本発明者らは、ＩＧＦ２プロモーターＰ４を含む領域と相補的な、メチル化されたオリゴヌクレオチド（ＭＯＮ１）を、その場所でＤＮＡメチル化を誘発して、ＩＧＦ２　ｍＲＮＡレベルを低下させる試みにおいて設計した。ＭＯＮ１は、ＩＧＦ２　ｍＲＮＡ蓄積をインビトロで特異的に阻害したが、一方、同じ配列を有するがメチル化シトシンを有さないオリゴヌクレオチド（ＯＮ１）は、ＩＧＦ２　ｍＲＮＡ量に対して影響を有さなかった。ＭＯＮ１処理は、ＩＧＦ２プロモーターｈＰ４の領域におけるデノボＤＮＡメチル化の特異的誘導をもたらした。ヒトの肝細胞癌（ＨＣＣ）細胞株由来の細胞Ｈｅｐ　３Ｂは、ヌードマウスの肝臓に移植されて、大きな腫瘍の増殖をもたらした。ＭＯＮ１で処置した動物は、生理食塩水またはＩＧＦ２　ｍＲＮＡレベルをインビトロで変えなかった短縮型メチル化オリゴヌクレオチドで処置された動物と比較して、顕著に長い生存を有した。この研究は、メチル化されたセンスオリゴヌクレオチドがＩＧＦ２遺伝子の後成的な変化を誘導するために用いられ得ること、およびＩ

ＧＦ２　ｍＲＮＡ蓄積の阻害がＨＣＣのモデルにおける強化された生存をもたらし得ることを実証する。

【００７６】

本発明の方法は、ウイルス感染を処置するための化合物をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、細胞内でのウイルスの繁殖のために必要であるがその細胞の生存のために必要でない遺伝子産物を機能的にコードする細胞遺伝子を含む細胞にこの化合物を投与する工程、および生成された遺伝子産物のレベルを検出する工程を包含し、この遺伝子産物の減少または除去は、この化合物がウイルス感染を処置するためのものであることを示す。本発明の方法はまた、ウイルス感染を処置する際に有効な化合物をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、細胞内でのウイルスの繁殖のために必要であるがその細胞の生存のために必要でない遺伝子産物を機能的にコードする細胞遺伝子を含む細胞にこの化合物を投与する工程、および生成された遺伝子産物のレベルを検出する工程を包含し、この遺伝子産物の減少または除去は、この化合物が、ウイルス感染を処置するために有効であることを示す。この細胞遺伝子は、例えば、本明細書中に提供される任意の遺伝子であり得る、すなわち、配列表１における配列のいずれかにおいて記載されるヌクレオチド配列を含む遺伝子またはこのような遺伝子を得るために本明細書中で提供される方法を用いて得られる任意の他の遺伝子のいずれかであり得る。遺伝子産物のレベルは、任意の標準的手段によって（例えば、そのタンパク質に特異的な抗体を用いた検出によって）測定され得る。遺伝子産物のレベルは、この化合物と接触していないコントロール細胞中の遺伝子産物のレベルと比較され得る。遺伝子産物のレベルは、この化合物の添加前の同じ細胞中の遺伝子産物のレベルと比較され得る。機能の活性は、任意の標準的手段によって（例えば、産物への基質の変換を測定する酵素アッセイ、または例えば核酸へのタンパク質の結合を測定する結合アッセイによって）測定され得る。関連したところでは、この遺伝子の調節領域は、レポーター遺伝子へと機能的に連結され得、そして化合物は、このレポーター遺伝子の阻害についてスクリーニングされ得る。このようなレポーター構築物は、本明細書中に記載されている。

【００７７】

その活性／機能が測定され得、そして本明細書中に開示される、遺伝子産物の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：トリステトラプロリン（ヒトのＺＦＰ－３６）、６－ピルボイル－テトラヒドロプテリンシンターゼ、真核生物ＤｎａＪ様タンパク質、ＩＤ３（ＤＮＡ結合インヒビター３）、Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩ（ｍＧＡＴ－１）、切断刺激因子（ＣＳＴＦ２）、ＴＡＫ１結合タンパク質、ヒトのジンク転写因子ＺＰＦ２０７、Ｄｌｘ２、Ｓｍａｄ７（Ｍａｄ関連タンパク質）、およびＰ糖タンパク質（ｍｄｒ１ｂ）。この活性は、この化合物と接触していないコントロール細胞中の活性またはこの化合物の添加前の同じ細胞中の活性と比較され得る。

【００７８】

本発明はまた、ウイルス感染を処置または予防する際に有効な化合物をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、配列表１の核酸もしくはその任意のホモログを含む細胞遺伝子、または表１もしくは表２さもなければ本願で特定される遺伝子の遺伝子産物とこの化合物とを接触させる工程、およびこの遺伝子産物の機能を検出する工程を包含し、この機能の減少または除去は、化合物が、ウイルス感染を処置または予防するために有効であることを示す。これらの方法において利用され得る遺伝子産物の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：トリステトラプロリン（ヒトのＺＦＰ－３６）、６－ピルボイル－テトラヒドロプテリンシンターゼ、真核生物ＤｎａＪ様タンパク質、ＩＤ３（ＤＮＡ結合インヒビター３）、Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩ（ｍＧＡＴ－１）、切断刺激因子（ＣＳＴＦ２）、ＴＡＫ１結合タンパク質、ＣＴＣＦ、ヒトのジンク転写因子ＺＰＦ２０７、Ｄｌｘ２、Ｓｍａｄ７（Ｍａｄ関連タンパク質）、およびＰ糖タンパク質（ｍｄｒ１ｂ）。この活性は、この化合物と接触していないコントロール細胞中の活性またはこの化合物の添加前の同じ細胞中の活性と比較され得る。

【００７９】

本発明は、血清の不存在下で第１期間の間生存し得る動物細胞培養由来のウイルスに持続して感染している細胞を選択的に除去する方法を提供し、この方法は、この細胞培養物を、血清の不存在下で、持続的に感染した細胞が血清なしでは生存できない第２期間の間繁殖させ、それにより、細胞培養物から、このウイルスに持続的に感染した細胞を選択的に除去する工程を包含する。第２期間は、第１期間より短いべきである。従って、血清を標準培養培地組成からある期間にわたって（例えば、血清含有培地を培養容器から除去し、細胞をリンスし、そして無血清培地をこの容器に添加し戻すことにより）簡便に除去し得、次いで血清飢餓期間の後、血清を培養培地に戻し得る。あるいは、血清飢餓工程の代わりに、培養物由来の血清生存因子を阻害し得る。さらに、代わりに、ウイルス－因子相互作用を妨害し得る。このようなウイルス除去法は、培養細胞がウイルスを含まないままであることを確実にするために、培養細胞について定期的に実施され得る。血清除去の期間は、非常に変化し得、代表的範囲は、約１日間～約３０日間であり；好ましい期間は約３日間～約１０日間であり得、そしてより好ましい期間は約５日間～約７日間であり得る。この期間は、血清なしで特定の細胞が生存する能力ならびにウイルス（例えば、レオウイルス（これは、約２４時間の生活環を有し、細胞の３日間の飢餓が劇的な結果を提供する））の生活環に基づいて選択され得る。

【００８０】

さらに、期間は、飢餓の間細胞を継代することによっても短縮され得る；一般に、継代数を増やすことは、培養物からのこのウイルスの完全なクリアランスを得るために必要とされる血清飢餓（または血清因子阻害）の時間を低減し得る。継代の間、細胞は代表的に、血清に短時間（代表的に約３時間～約２４時間）曝露される。この曝露は、細胞を取り外すために使用されるトリプシンの作用を停止させるとともに、この細胞が別の増殖周期に入るのを刺激して、この選択プロセスを補助する。従って、飢餓／血清サイクルは、選択的効果を最適化するために繰り返され得る。他の標準的培養パラメータ（例えば、培養物のコンフルエンシー、ｐＨ、温度など）は、血清飢餓（または血清生存因子阻害）の必要とされる期間を変更するために変動し得る。この期間は、血清を様々な期間にわたって単に除去し、そして各試験した時間において、この培養物を感染細胞の存在について（例えば、血清の非存在下で生存する能力によって、そして細胞中のウイルスを標準的ウイルス力価測定および免疫組織化学的技術によって定量化することにより確認され得る）試験し、次いでどの血清欠乏時期にウイルス感染細胞が除去されたかを検出することによって、任意の所定のウイルス感染について容易に決定され得る。持続的に感染した細胞の除去を依然として提供する、より短い期間の血清剥奪が用いられることが好ましい。さらに、飢餓、次いで血清の添加、および培養物中に残っているウイルス量の決定のサイクルは、事実上感染した細胞が培養物中に残らなくなるまで繰り返され得る。

【００８１】

従って、本発明の方法は、細胞を継代すること、すなわち、細胞培養物を第１容器から第２容器へと移植することをさらに包含し得る。このような移植は、ウイルスに感染した細胞の生存の選択的欠乏を促進し得る。移植は、数回繰り返され得る。移植は、組織培養の標準的な方法（例えば、Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ，Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ，第２版，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８７を参照のこと）によって達成される。

【００８２】

本発明の方法は、細胞培養物から、ウイルスに持続的に感染した細胞を選択的に除去する方法をさらに提供し、この方法は、細胞培養物を、約５０ｋＤと約１００ｋＤとの間の分子量を有する機能的形態の血清タンパク質の非存在下で繁殖させる工程を包含し、この血清タンパク質は、低ｐＨ中での不活化に耐え、クロロホルム抽出による不活化に耐え、煮沸した場合に不活化し、低イオン強度溶液中で不活化し、レオウイルスに持続的に感染した細胞を含む細胞培養物から除去した場合に、レオウイルスに持続的に感染した細胞の生存を実質的に予防する。この機能的形態が存在しないことは、いくつかの標準的手段の

うちのいずれかにより（例えば、このタンパク質を、それに選択的な抗体に結合することにより（血清を細胞に添加する前または後のいずれかでこの抗体を血清中で結合すること；前である場合、この血清タンパク質は、例えば、この抗体をカラムに結合し、そしてこの血清をカラムに通過させ、次いでこの残存タンパク質を含まない血清を細胞に投与することによって、血清から除去され得る）、このタンパク質を不活化する化合物を投与することにより、またはこのウイルスとこのタンパク質との間の相互作用を妨害する化合物を投与することにより）達成され得る。

【００８３】

従って、本発明は、血清含有培地中で繁殖させた細胞培養物から、ウイルスに持続的に感染した細胞を選択的に除去する方法を提供し、この方法は、この血清中で、約５０ｋＤと約１００ｋＤとの間の分子量を有するタンパク質を阻害する工程を包含し、この血清タンパク質は、低ｐＨ中での不活化に耐え、クロロホルム抽出による不活化に耐え、煮沸した場合に不活化し、低イオン強度溶液中で不活化し、レオウイルスに持続的に感染した細胞を含む細胞培養物から除去した場合に、レオウイルスに持続的に感染した細胞の生存を実質的に予防する。あるいは、このウイルスとこの血清タンパクとの間の相互作用は、持続的にウイルスに感染した細胞を選択的に除去するために破壊され得る。

【００８４】

何らかの形態の持続感染が可能な任意のウイルスは、本発明の除去方法を利用して、血清タンパク質を除去すること、血清タンパク質を阻害すること、さもなければ血清タンパク質を妨害すること（例えば、本明細書中で例示されたもの）を含め、そしてまた、本発明の方法によって、ウイルス増殖に必要であるが細胞には必須ではないことが見出される、任意の細胞遺伝子由来の遺伝子産物を除去すること、この遺伝子産物を阻害すること、さもなければこの遺伝子産物を妨害することを含め、細胞培養物から除去され得る。例えば、ＤＮＡウイルスまたはＲＮＡウイルスが標的とされ得る。選択されたウイルスに感染した細胞が、血清の除去によって培養物から選択的に除去され得るか否かは、そのウイルスに許容性の細胞から血清を飢餓させる（または血清生存因子を阻害する）こと、選択されたウイルスを細胞に添加すること、血清をその培養物に添加すること、および感染した細胞が死ぬか否かを観察することにより（すなわち、生存細胞中でのウイルスのレベルを、このウイルスについて特異的な抗体を用いて力価測定することにより）、容易に決定され得る。

【００８５】

血清の不存在下で一定期間にわたって維持され得る任意の動物細胞の培養物（すなわち、代表的に、血清中の培養物中で増殖および維持される任意の細胞）は、本発明の方法を利用して、ウイルス感染から精製され得る。例えば、初代培養物ならびに確立された培養物および細胞株が用いられ得る。さらに、培養され得かつ血清の非存在下で一定期間維持され得る、任意の動物由来の細胞培養物およびその動物中の任意の組織型または細胞型が用いられ得る。例えば、代表的に、感染性ウイルスに感染した（特に、持続して感染した）組織由来の細胞の培養物が用いられ得る。

【００８６】

特許請求の範囲において用いられる場合、「血清の非存在下」とは、持続的にウイルス感染した細胞が生存しないレベルにあることを意味する。代表的に、閾値レベルは、培地中の約１％の血清である。従って、約１％、約０．７５％、約０．５０％、０．２５％、０．１％または血清なしのような、約１％以下の血清が用いられ得る。

【００８７】

本明細書中で用いられる場合、ウイルスに持続的に感染した細胞を「選択的に除去する」とは、ウイルスに持続的に感染した細胞の実質的に全てが、ウイルスに感染した細胞の存在が除去手順が実施された直後の培養物中で検出できないように、殺傷されることを意味する。さらに、「選択的に除去する」とは、ウイルスに感染していない細胞がこの方法によって一般的に殺傷されないことを包含する。一部の生存細胞は、ウイルスを依然として生成し得るがそのレベルはより低く、一部は、このウイルスによって死がもたらされる

経路が欠損していてもよい。代表的に、実質的に全てが殺傷されるべきである、ウイルスに持続的に感染した細胞については、培養物中のウイルス含有細胞のうちの約９０％より多く、より好ましくは９５％未満、約９８％未満、約９９％未満または約９９．９％未満の細胞が殺傷される。

【００８８】

本発明の方法はまた、任意の遺伝子の調節領域を含む核酸を提供する。このような調節領域は、上記の通りに単離および配列決定されたゲノム配列から単離され得、そしてその種の調節領域に特有の、観察される任意の特徴によって、およびこの遺伝子のコード領域についての開始コドンへのそれらの関連によって、同定され得る。本発明はまた、レポーター遺伝子に機能的に連結された調節領域を含む構築物を提供する。このような構築物は、慣用的なサブクローニング法によって作製され、そして調節領域がマーカー遺伝子の蒸留にサブクローニングされ得る多くのベクターが利用可能である。マーカー遺伝子は、マーカー遺伝子産物の検出の容易さのために選択され得る。

【００８９】

それゆえ、本発明の方法はまた、ウイルス感染を処置するための化合物のスクリーニングの方法を提供し、この方法は、上記の構築物のうちのいずれかを含む細胞にこの化合物を投与する工程、および生成されるレポーター遺伝子産物のレベルを検出する工程を包含し、この構築物は、配列表１中の配列のいずれかに記載されるヌクレオチド配列を含む遺伝子のうちの１つの調節領域を含み、この調節領域は、レポーター遺伝子に機能的に連結されており、このレポーター遺伝子産物の減少または除去は、この化合物がウイルス感染を処置するためのものであることを示す。この方法によって検出される化合物は、調節領域を単離した遺伝子の転写を阻害し、従って、被験体を処置する際に、この遺伝子によって生成される遺伝子産物の産生を阻害し、従って、ウイルス感染を処置する。

【００９０】

いくつかの遺伝子は、レトロウイルス挿入の本発明の方法によって破壊された場合、その遺伝子産物の過剰発現をもたらし、そしてこの過剰発現は、ウイルス複製を阻害した。特に、実施例に記載されるように、本発明の方法を利用することにより、ＣＴＣＦの配列を含むゲノム遺伝子座（６ＢＥ７２＿ｒＥと称されたクローン（配列番号２））が破壊され、そしてこのことは、ＩＧＦ２の過剰発現をもたし、このことは、ウイルス複製の減少をもたらした。それゆえ、本発明は、ＩＧＦ２を過剰発現することによりウイルス複製を減少または阻害する方法を提供する。本発明はまた、ＣＴＣＦ遺伝子を破壊することによって、またはＣＴＣＦ遺伝子の遺伝子産物を阻害することによって、ＩＧＦ２の発現を増加させる方法を提供する。ＩＧＦ２についてのヒトゲノム配列は、公に利用可能なＧｅｎＢａｎｋデータベースにおいて登録番号ＮＴ＿０３３２３８によって見出され得る。ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＮＴ＿０３３２８によって利用可能なこの配列は、この参照により、その全体が、本明細書中に参考として援用される。ＩＧＦ２についてのヒトｍＲＮＡ配列もまた、ＧｅｎＢａｎｋにおいて登録番号ＮＭ＿００６１２の下で見出され得る。ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＮＭ＿００６１２によって入手可能な配列は、この参照により、その全体が本明細書中に参考として援用される。ＣＴＣＦについてのヒトｍＲＮＡ配列は、ＧｅｎＢａｎｋにおいて、登録番号ＮＭ＿０８０６１８の下で見出され得る。ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＮＭ＿００６１２によって入手可能なこの配列は、この参照により、その全体が本明細書中に参考として援用される。ヒト染色体位置１６ｑ２１－ｑ２２．３に位置するＣＴＣＦについてのヒトゲノム配列は、ＧｅｎＢａｎｋにおいて、登録番号ＮＴ＿０１０４７８の下で見出され得る。ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＮＴ＿０１０４７８によって入手可能なこの配列は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【００９１】

別の例では、本発明の方法は、別のクローン（研究室での名称１４＿７＃２（配列番号１１５））を同定した。このクローンは、Ｍｇａｔ－１によってコードされるＮ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩの過剰発現をもたらす。Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩの過剰発現は、ウイルス複製の減少をもたらした。

【００９２】
破壊されると別の遺伝子の過剰発現をもたらす遺伝子が一旦見出されると、過剰発現される遺伝子が、直接的に（すなわち、過剰発現される遺伝子を介して）または間接的に（すなわち、元々破壊された遺伝子（またはその遺伝子産物）を介して）またはその過剰発現される遺伝子と関連した別の遺伝子（またはその遺伝子産物）を介して、調節され得る。例えば、当業者は、ＩＧＦ２の過剰発現をもたらす化合物を投与し得る。この化合物は、ＩＧＦ２遺伝子、ＩＧＦ２　ｍＲＮＡまたはＩＧＦ２タンパク質と相互作用し得る。この化合物はまた、ＣＴＣＦ遺伝子、ＣＴＣＦ　ｍＲＮＡまたはＣＴＣＦタンパク質と相互作用して、ＩＧＦ２発現を増加させ得る。この化合物はまた、ＩＧＦ２経路に関与する他の遺伝子、ｍＲＮＡまたはタンパク質と相互作用して、ＩＧＦ２発現の増加をもたらし得る。

【００９３】
従って、本発明は、ウイルス感染を処置する際の有効性について化合物をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、その過剰発現がウイルスの繁殖を阻害するがその細胞の生存を防止しない遺伝子産物を機能的にコードする細胞遺伝子を含む細胞にこの化合物を投与する工程および生成される遺伝子産物のレベルを検出する工程を包含し、この遺伝子産物の増加は、化合物が、ウイルス感染を処置するために有効であることを示す。代表的に、増加は、この化合物が存在しない場合に生成される遺伝子産物に対する、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１２５％、１５０％、１７５％、２００％、３００％、４００％、５００％またはより多くの増加である。

【００９４】
本発明は、被験体におけるウイルス感染を低減または阻害する方法をさらに提供し、この方法は、この被験体に、配列表のいずれかの配列に示される核酸もしくはそのホモログを含む遺伝子、または表１もしくは表２さもなければ本願で特定される遺伝子によってコードされる遺伝子産物の発現または機能を阻害する量の組成物を投与し、それにより、ウイルス感染を処置する工程を包含する。この組成物は、例えば、この遺伝子によってコードされるタンパク質を結合する抗体を含み得る。この組成物はまた、この遺伝子によってコードされるタンパク質についてのレセプターを結合する抗体を含み得る。このような抗体は、標準的方法により、選択されたタンパク質に対して惹起され得、そしてポリクローナルまたはモノクローナルのいずれかであり得るが、モノクローナルが好ましい。あるいは、この組成物は、この遺伝子によってコードされるＲＮＡを結合するアンチセンスＲＮＡを含み得る。さらに、この組成物は、この遺伝子によってコードされるＲＮＡを結合するアンチセンスＲＮＡを機能的にコードする核酸を含み得る。他の有用な組成物は、当業者に容易に明らかである。

【００９５】
本発明はまた、被験体におけるウイルス感染を処置する方法を提供し、この方法は、その過剰発現がウイルス複製を低減または阻害する遺伝子の発現を増加させる組成物の処置有効量をこの被験体に投与する工程を包含する。代表的には、発現における増加は、この組成物が存在しない場合に生成される遺伝子産物に対する、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１２５％、１５０％、１７５％、２００％、３００％、４００％、５００％またはより多くの増加である。

【００９６】
本発明はさらに、被験体におけるウイルス感染を低減または阻害する方法を提供し、この方法は、被験体由来の選択された細胞において、配列表１に列挙された配列またはそのホモログのいずれかに記載の核酸を含む内因性遺伝子を、この遺伝子の機能的遺伝子産物を生成できない遺伝子形態またはこの遺伝子の低減した量の機能的遺伝子産物を生成する遺伝子形態へと、エキソビボで変異させる工程、およびこの細胞をこの被験体中に再配置し、それにより、被験体中の細胞のウイルス感染を低減する工程を包含する。この細胞は、感染が低減、防止または阻害されるべき、特定のウイルスの代表的標的細胞に従って選

択され得る。いくつかのウイルスについての好ましい細胞は、造血細胞である。選択された細胞が造血細胞である場合、感染が低減または阻害され得るウイルスとしては、例えば、ＨＩＶ（ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２を含む）が挙げられ得る。

【００９７】

本発明はまた、被験体におけるウイルス感染を低減または阻害する方法を包含し、この方法は、（例えば、被験体または同種供給源由来の）選択された細胞において、その過剰発現がウイルス複製の阻害を引き起こす、配列表１に記載の核酸またはそのホモログを含む内因性遺伝子を、この遺伝子を内因性遺伝子よりも高いレベルで発現する遺伝子形態へと、エキソビボで変異させる工程、およびこの細胞をこの被験体中に配置または再配置する工程を包含する。代表的には、より高いレベルは、変異していない内因性遺伝子よりも、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１２５％、１５０％、１７５％、２００％、３００％、４００％、５００％またはより多くである。この細胞は、感染が低減、防止または阻害されるべき、特定のウイルスの代表的標的細胞に従って選択され得る。いくつかのウイルスについての好ましい細胞は、造血細胞である。選択された細胞が造血細胞である場合、感染が低減または阻害され得るウイルスとしては、例えば、ＨＩＶ（ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２を含む）が挙げられ得る。しかし、多くの他のウイルス－細胞組合せが当業者に明らかである。

【００９８】

本発明はさらに、被験体におけるウイルス感染抵抗性を増大させる方法を提供し、この方法は、（例えば、被験体または同種供給源由来の）選択された細胞において、その発現の阻害または低減がウイルス感染抵抗性を引き起こす、配列表１に記載の核酸を含む内因性遺伝子をエキソビボで変異させる工程であって、この内因性遺伝子は、この遺伝子の機能的遺伝子産物を生成できない変異した遺伝子形態または低減した量のこの遺伝子の機能的遺伝子産物を生成する遺伝子形態へと変異される工程、およびこの細胞をこの被験体中に配置し、それにより、この被験体における細胞のウイルス感染抵抗性を増大させる工程を包含する。このウイルスはＨＩＶであり得る（特に、この細胞が造血細胞である場合）。しかし、多くの他のウイルス－細胞組合せが、当業者に明らかである。

【００９９】

本発明はまた、被験体におけるウイルス感染を低減または阻害する方法を提供し、この方法は、被験体由来の選択された細胞において、（ａ）血清含有培地中で増殖している細胞培養物中に、機能的プロモーターを欠く選択的マーカー遺伝子をコードするベクターを移入する工程、（ｂ）このマーカー遺伝子を発現する細胞を選択する工程、（ｃ）この培養培地から血清を除去する工程、（ｄ）この細胞培養物にこのウイルスを感染させる工程、および（ｅ）生存細胞から、マーカー遺伝子が挿入されている細胞遺伝子を単離する工程を含む方法によって単離された核酸を含む内因性遺伝子を、この遺伝子の機能的遺伝子産物を生成できない変異した遺伝子形態またはこの遺伝子の低減した量の機能的遺伝子産物を生成する変異した遺伝子形態へと、エキソビボで変異させる工程、ならびにこの細胞を被験体中に再配置し、それにより被験体中の細胞のウイルス感染を低減する工程を包含する。従って、この変異した遺伝子形態は、例えば、有効量の機能的タンパク質もｍＲＮＡも生成できない遺伝子形態または機能的タンパク質もｍＲＮＡも生成できない遺伝子形態であり得る。このウイルスがＨＩＶである方法が実施され得る。この方法は、ウイルスが有害な結果を伴って感染し得る任意の選択された細胞において実施され得る。例えば、この細胞は、造血細胞であり得る。しかし、多くの他のウイルス－細胞組合せが当業者に明らかである。

【０１００】

本発明はさらに、被験体におけるウイルス感染抵抗性を増大させる方法を提供し、この方法は、被験体由来の選択された細胞において、（ａ）血清含有培地中で増殖している細胞培養物中に、機能的プロモーターを欠く選択的マーカー遺伝子をコードするベクターを移入する工程、（ｂ）このマーカー遺伝子を発現する細胞を選択する工程、（ｃ）この培養培地から血清を除去する工程、（ｄ）この細胞培養物にこのウイルスを感染させる工程

、および（ｅ）生存細胞から、マーカー遺伝子が挿入されている細胞遺伝子を単離する工程を含む方法によって単離された核酸を含む内因性遺伝子を、この遺伝子の機能的遺伝子産物を生成できない変異した遺伝子形態またはこの遺伝子の低減した量の機能的遺伝子産物を生成する遺伝子形態へと、エキソビボで変異させる工程、ならびにこの細胞を被験体中に再配置し、それにより被験体中の細胞のウイルス感染を低減する工程を包含する。このウイルスは、ＨＩＶであり得る（特に、この細胞が造血細胞である場合）。しかし、多くの他のウイルス－細胞組合せが、当業者に明らかである。

【０１０１】

本発明はまた、被験体におけるウイルス感染を低減または阻害する方法を提供し、この方法は、被験体由来の選択された細胞において、（ａ）血清含有培地中で増殖している細胞培養物中に、機能的プロモーターを欠く選択的マーカー遺伝子をコードするベクターを移入する工程、（ｂ）このマーカー遺伝子を発現する細胞を選択する工程、（ｃ）この細胞培養物にこのウイルスを感染させる工程、および（ｄ）生存細胞から、マーカー遺伝子が挿入されている細胞遺伝子を単離する工程を含む方法によって単離された核酸を含む内因性遺伝子を、この遺伝子の機能的遺伝子産物を生成できない変異した遺伝子形態またはこの遺伝子の低減した量の機能的遺伝子産物を生成する変異した遺伝子形態へと、エキソビボで変異させる工程、ならびにこの細胞を被験体中に再配置し、それにより被験体中の細胞のウイルス感染を低減する工程を包含する。従って、この変異した遺伝子形態は、例えば、有効量の機能的タンパク質もｍＲＮＡも生成できない遺伝子形態または機能的タンパク質もｍＲＮＡも生成できない遺伝子形態であり得る。このウイルスがＨＩＶである方法が実施され得る。この方法は、ウイルスが有害な結果を伴って感染し得る任意の選択された細胞において実施され得る。例えば、この細胞は、造血細胞であり得る。しかし、多くの他のウイルス－細胞組合せが当業者に明らかである。

【０１０２】

本発明はさらに、被験体におけるウイルス感染抵抗性を増大させる方法を提供し、この方法は、被験体由来の選択された細胞において、（ａ）血清含有培地中で増殖している細胞培養物中に、機能的プロモーターを欠く選択的マーカー遺伝子をコードするベクターを移入する工程、（ｂ）このマーカー遺伝子を発現する細胞を選択する工程、（ｃ）この細胞培養物にこのウイルスを感染させる工程、および（ｄ）生存細胞から、マーカー遺伝子が挿入されている細胞遺伝子を単離する工程を含む方法によって単離された核酸を含む内因性遺伝子を、この遺伝子の機能的遺伝子産物を生成できない変異した遺伝子形態またはこの遺伝子の低減した量の機能的遺伝子産物を生成する遺伝子形態へと、エキソビボで変異させる工程、ならびにこの細胞を被験体中に再配置し、それにより被験体中の細胞のウイルス感染を低減する工程を包含する。このウイルスは、ＨＩＶであり得る（特に、この細胞が造血細胞である場合）。しかし、多くの他のウイルス－細胞組合せが、当業者に明らかである。

【０１０３】

さらに、本発明は、腫瘍の進行において利用される細胞遺伝子の単離のための方法を提供する。本発明は、細胞中の悪性表現型を抑制し得る細胞遺伝子を同定する方法を提供し、この方法は、（ａ）軟寒天またはＭａｔｒｉｇｅｌ中で充分に増殖できない細胞培養物中に、機能的プロモーターを欠く選択的マーカー遺伝子をコードするベクターを移入する工程、（ｂ）このマーカー遺伝子を発現する細胞を選択する工程、および（ｃ）軟寒天またはＭａｔｒｉｇｅｌ中で増殖し得る、選択された細胞から、マーカー遺伝子が挿入された細胞遺伝子を単離し、それにより、細胞中の悪性表現型を抑制し得る遺伝子を同定する工程を包含する。この方法は、任意の選択された非形質転換細胞株を用いて実施され得、これらのうちの多くが当該分野で公知である。

【０１０４】

本発明はさらに、細胞中の悪性表現型を抑制し得る細胞遺伝子を同定する方法を提供し、この方法は、（ａ）非形質転換細胞の細胞培養物中に、機能的プロモーターを欠く選択的マーカー遺伝子をコードするベクターを移入する工程、（ｂ）このマーカー遺伝子を発

現する細胞を選択する工程、および（ｃ）選択および形質転換された細胞から、このマーカー遺伝子が挿入される細胞遺伝子を単離し、それにより、細胞中の悪性表現型を抑制し得る遺伝子を同定する工程を包含する。非形質転換表現型は、当該分野におけるいくつかの標準的方法（例えば、例示される、軟寒天において増殖できないことまたはＭａｔｒｉｇｅｌにおいて増殖できないこと）のうちのいずれかによって決定され得る。

【０１０５】

本発明はさらに、細胞の悪性表現型を抑制し得る細胞遺伝子を同定する方法を提供し、この方法は、以下（ａ）非形質転換細胞の細胞培養物に、機能性プロモーターを欠く選択マーカー遺伝子をコードするベクターを移す工程、（ｂ）マーカー遺伝子を発現する細胞を選択する工程、および（ｃ）選択され、かつ形質転換された細胞から、マーカー遺伝子が挿入された細胞遺伝子を単離し、それによって細胞内で悪性表現型を抑制し得る遺伝子を同定する工程を包含する。非形質転換表現型は、当該分野のいくつかの標準的な方法（例えば、軟寒天上で増殖できないこと、あるいはＭａｔｒｉｇｅｌ上で増殖できないことが例証される）のいずれかによって決定され得る。この方法は、任意の選択された非形質転換細胞株（その多くは当該分野で公知である）を使用して実施され得る。

【０１０６】

本発明はさらに、細胞で悪性表現型を抑制する化合物をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、細胞内の悪性表現型の確立に関与する遺伝子産物を機能的にコードする細胞遺伝子を含む細胞に化合物を投与する工程を包含し、産生された遺伝子産物のレベルを検出する工程を包含し、遺伝子産物の減少または除去は、悪性表現型を抑制するために効果的な化合物を示唆する。産生された遺伝子産物のレベルまたは量の検出は、タンパク質のレベルまたは量について、当該分野の標準的ないくつかの方法（例えば、タンパク質ゲル、抗体に基いたアッセイ、標識ＲＮＡの検出）のいずれかにより、直接的にかまたは間接的に測定され得、そして、特異的な遺伝子産物に基いて選択され得る。

【０１０７】

本発明はさらに、被験体の細胞で、悪性表現型を抑制する方法を提供し、この方法は、以下：配列番号７６、配列番号７７、配列番号７８、配列番号７９、配列番号８０、配列番号８１、配列番号８２または配列番号８３、配列番号９２、配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、配列番号１１９、配列番号１７７、配列番号２０６、配列番号２４０、配列番号２４３、配列番号２４７、配列番号３２１、配列番号３２８、配列番号３２９、配列番号３３０、配列番号３３１、配列番号３３４、配列番号３３５、配列番号３３６、配列番号４０８、配列番号４１１、配列番号４１２、配列番号４１３、配列番号４１４もしくはこれらのホモログに示される核酸を含む遺伝子またはその過剰発現が細胞の悪性表現型の抑制に関与していることが本発明の方法によって見出され、それによって悪性表現型を抑制する任意の遺伝子（例えば、本出願を通して、本明細書で「Ｘ」と呼ばれる任意のクローン）によってコードされる遺伝子産物の発現または機能を阻害する量の組成物を被験体に投与する工程を包含する。例えば、組成物は、遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する抗体を含み得る。別の例として、組成物は、遺伝子によってコードされるタンパク質に対するレセプターに結合する抗体を含み得る。組成物は、遺伝子によってコードされるＲＮＡに結合するアンチセンスＲＮＡを含み得る。さらに、組成物は、遺伝子によってコードされるＲＮＡに結合するアンチセンスＲＮＡを機能的にコードする核酸を含み得る。

【０１０８】

本発明はさらに、被験体の細胞で悪性表現型を抑制する方法を提供し、この方法は、その過剰発現が細胞内の悪性表現型の抑制に関与する遺伝子産物の発現を増加する量の化合物を被験体に投与する工程を包含する。遺伝子産物は、本発明のベクターによる上流の遺伝子の破壊によって下流の遺伝子の過剰発現が生じる遺伝子の産物であり得、下流遺伝子の過剰発現が形質転換表現型を示す。例えば、組成物は、インヒビター（例えば、ＣＯＸ２酵素の低分子インヒビター）であり得る。

【０１０９】

本発明の診断薬剤または治療薬剤は、治療もしくは診断を、選択した部位に処置する多くの標準的手段または機能実体型を投与する標準的手段のいずれかにより、被験体または動物モデルに投与され得る。例えば、薬剤は、筋肉内注射、腹腔内注射、局所注射、経皮注射などにより、経口投与、非経口投与（例えば、静脈内投与）され得る。薬剤は、例えば、カチオン性リポソームとの複合体として、もしくはアニオン性リポソーム中にカプセル化されて投与され得る。組成物は、薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせて種々の量の選択された薬剤を含み得、さらに所望の場合、他の医薬の薬剤、薬学的薬剤、キャリア、アジュバント、希釈液などを含み得る。非経口投与は、使用される場合、一般的に注射により特徴付けられる。注射剤は、従来の形態（溶液もしくは懸濁液、注射する前の液体中の溶液もしくは懸濁液に適した固体形態、または懸濁液のいずれかとして）で調製され得る。投与様式に依存して、薬剤は、被験体内での分解を避けるために（例えば、カプセル化などにより）最適化され得る。

【０１１０】

投薬量は、投与様式、処置される疾患または状態および個々の被験体の状態に依存するが、抗ウイルス性薬剤または抗癌剤の投与のため、およびそれらに使用される代表的な投薬量である。投薬量はまた、投与される組成物（例えば、タンパク質または核酸）にも依存する。このような投薬量は、当該分野で公知である。さらに投薬量は、処置される特定の疾患または条件に対する代表的な投薬量に従って調節され得る。さらに、標的細胞型の培養細胞物におけるウイルス力価は、インビボでの標的細胞に対する投薬量を最適化するために使用され得、そして、可変の投薬量からの形質転換は、標的細胞型がモニタリングされ得るように、同一細胞型の培養細胞において達成され得る。多くの場合、単回用量は、十分であり得るが、所望の場合、用量は、繰り返され得る。投薬量は、副作用を引き起こすほど大きくてはならない。一般的に、投薬量は、患者の年齢、状態、性別および疾患の程度によって変化し、当業者によって決定され得る。投薬量はまた、いかなる合併症の事象においても、個々の医師によって調節され得る。

【０１１１】

被験体の細胞への投与に関して、組成物は、一旦被験体内に投与されると、当然のことながら被験体の体温に調整する。エキソビボでの投与に関して、組成物は、細胞の生存度を維持する任意の標準的な方法により（例えば、培養培地（標的細胞に適切である）に添加し、この培地を直接細胞に添加することにより）投与され得る。当該分野で公知であるように、この方法で使用される任意の培地は、細胞を生存不可能にしないために、水性かつ非毒性であり得る。加えて、培地は、所望の場合、細胞の生存度を維持するために標準的栄養分を含み得る。インビボでの投与に関して、複合物が、例えば、患者由来の血液サンプルもしくは組織サンプル、または薬学的に受容可能なキャリア（例えば、生理食塩水および緩衝生理食塩水）に添加され得、当該分野で公知の任意のいくつかの手段により投与され得る。投与の例としては、非経口投与（例えば、標的細胞を有する組織または器官への血管供給を介した局所的な灌流を含む静脈内注射またはエアロゾルの吸入による）、皮下もしくは筋肉内注射、例えば、皮膚外傷および皮膚損傷への局所投与、例えば、被験体への移植および後の移植のために調製された骨髄細胞への直接トランスフェクション、ならびに被験体へ後に移植される器官への直接トランスフェクションが挙げられる。さらなる投与方法としては、経口投与（特に組成物がカプセル化される場合）または直腸投与（特に組成物が、坐剤形態である場合）が挙げられる。薬学的に受容可能なキャリアとしては、生物学的に、またはその他の点で、望ましくないものではない任意の物質、すなわち、なんらかの好ましくない生物学的効果を誘導しないか、またはそれが含まれる薬学的組成物の他の任意の成分と有害な様式で相互作用しない選択された複合物と一緒に、個体に投与され得る物質が挙げられる。

【０１１２】

具体的には、（例えば、器官または腫瘍の局所的な灌流によって）インビボでの特定の細胞型が標的化される場合、標的組織由来の細胞は、生検され、複合体の組織への取り込みに対する最適投薬量は、本明細書で記載されるように、そして、当該分野で公知である

ように、インビトロで決定され得、濃度および時間の長さを含むインビボでの投薬量を最適化する。あるいは、同一の細胞型の培養細胞物もまた、インビボでの標的細胞に対する投薬量を最適化するために使用され得る。

【０１１３】

エキソビボまたはインビボ使用でのいずれかに関して、複合体は、任意の有効濃度で投与され得る。有効濃度は、ウイルス感染の減少、阻害もしくは予防、または形質転換した細胞の表現型の減少もしくは阻害を生じる量である。

【０１１４】

核酸は、いくつかの手段の内のいずれかで投与され得、その手段は、使用したベクター、器官または組織を標的化する場合、その器官もしくは組織および被験体の特徴によって選択され得る。核酸は、薬学的に受容可能なキャリア（例えば、生理食塩水）中で所望される場合、全身に（例えば、静脈内に、動脈内に、経口的に、非経口的に、皮下に）投与され得る。核酸はまた、直接注射により器官に投与され得、また注射により標的組織に供給する血管に投与され得る。肺または気管の細胞の感染に関して、核酸は、気管内に投与され得る。核酸はさらに、局所的に、経皮的になどで投与され得る。

【０１１５】

核酸またはタンパク質は、組成物中で投与され得る。例えば、組成物は、他の医薬の薬剤、薬学的薬剤、キャリア、アジュバント、希釈剤などを含み得る。さらに、組成物は、ベクターに加えて、脂質（例えば、リポソーム（例えば、カチオン性リポソーム（例えば、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥ、ＤＣ－コレステロール）またはアニオン性リポソーム）を含み得る。リポソームはさらに、所望の場合、特定の細胞の標的化を促進するタンパク質を含み得る。ベクターおよびカチオン性リポソームを含む組成物の投与は、標的器官への求心性血液に投与され得るかまたは気道の標的細胞への気道へ吸入され得る。リポソームについては、例えば、Ｂｒｉｇｈａｍら、Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐ．Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．１：９５～１００（１９８９）；Ｆｅｌｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ８４：７４１３～７４１７（１９８７）；米国特許第４，８９７，３５５号を参照のこと。

【０１１６】

核酸を含むウイルスベクターに関しては、組成物は、薬学的に受容可能なキャリア（例えば、リン酸緩衝生理食塩水または生理食塩水）を含み得る。ウイルスベクターは、標的細胞によって、当該分野で公知なように選択され得る。例えば、アデノウイルスベクター、特に複製能力のないアデノウイルスベクターは、その広い宿主範囲のために、多数の細胞のいずれを標識するのにも利用され得る。多くの他のウイルスベクターが、利用可能であり、その標的細胞は、公知である。

【実施例】

【０１１７】

（細胞培養物からのウイルス感染細胞の選択的除去）

１０％ウシ胎仔血清を補充した高グルコースＤｕｌｂｅｃｃｏ改変イーグル培地中で、ラット腸細胞株－１細胞（ＲＩＥ－１細胞）を標準的に培養した。実験を開始するために、レオウイルスで持続的に感染した細胞をコンフルーエンス近くまで培養し、次いで、培地を除去し、細胞をＰＢＳで洗浄し、血清を補充していないフラスコ培地に戻すことにより、培養培地から血清を除去した。代表的に、血清含有量は、１％以下まで減少した。細胞を数日間または約１ヶ月間血清を枯渇させ、静止状態にするかまたは増殖を停止する。次いで、静止細胞に１０％血清を含む培地を添加し、細胞の増殖を刺激する。細胞がいずれかの感染性ウイルス（ホモジェナイズされた細胞のｍｌあたり１感染ウイルスの感受性）を含有するか否かを確証するために使用する免疫組織学的技術によって、生存する細胞は、持続的に感染細胞ではないことが見出される。

【０１１８】

（細胞ゲノムＤＮＡの単離）

（ジーントラップライブラリー）

１０細胞あたり１レトロウイルスより少ない割合で、ＲＩＥ－１細胞をレトロウイルスベクター（Ｕ３　ジーントラップ）で感染させることにより、ライブラリーを作製する。Ｕ３ジーントラップレトロウイルスが、能動的に転写された遺伝子内に組み込む場合、Ｕ３ジーントラップレトロウイルスがコードするネオマイシン抵抗性遺伝子も転写され、これにより、抗生物質ネオマイシンに対する抵抗性を細胞に与える。ジーントラップ事象を有する細胞は、ネオマイシンに曝露されても生存し得るのに対して、ジーントラップ事象を有さない細胞は、死滅する。ネオマイシン選択を生存する種々の細胞を、次いで、ジーントラップ事象のライブラリーとして増殖させる。このようなライブラリーは、後の同定のための遺伝子をタグ化する転写活性細胞プロモーターに由来するレポーター遺伝子を発現する特性を有する、任意のレトロウイルスベクターとともに産生され得る。

【０１１９】

（レオウイルス選択）

レオウイルス感染は代表的には、ＲＩＥ－１細胞に対して致死性であるが、持続的な感染細胞の発生を生じ得る。これらの細胞は、感染性レオウイルス粒子を産生する間、増殖し続ける。細胞にレオウイルス抵抗性を与えるジーントラップ事象の同定に関しては、持続的に感染した細胞が、除去されなければならないか、またはそれらは偽陽性として計数される。本発明者らは、レオウイルスで持続的に感染し、継代し、低密度でプレートしたＲＩＥ－１細胞が、血清の枯渇に対してほとんど抵抗性がないことを見出した。従って、本発明者らは、レオウイルス感受性細胞とレオウイルスで持続的に感染される細胞の両方に対して選択するＲＩＥ－１ジーントラップライブラリーのスクリーニングのためのプロトコルを開発した。

１．ＲＩＥ－１ライブラリー細胞をコンフルーエンス近くまで増殖し、次いで、血清を培地から除去する。細胞を、数日間血清を枯渇させ、静止状態にするかまたは増殖を停止する。

２．細胞当たり１０レオウイルスより大きい力価で、ライブラリー細胞をレオウイルスで感染させ、血清の枯渇をさらに数日間継続する。

３．感染細胞を継代（感染細胞を３～６時間血清に曝露するプロセス）し、次いで、さらに数日間血清を枯渇させた。

４．生存する細胞を次いで、血清の存在下で、明らかなコロニーが発生するまで増殖させ、その時点で限界希釈によりクローニングする。

【０１２０】

（培地：高グルコースＤｕｌｂｅｃｃｏ改変イーグル培地（ＤＭＥ／ＨＩＧＨ））
Ｈｙｃｌｏｎｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　カタログ番号ＳＨ３０００３．０２）

（ネオマイシン）

Ｕ３ジーントラップレトロウイルスを有さなかった細胞に対して選択するために、抗生物質を使用した。本発明者らは、ＳｉｇｍａからのＧＥＮＥＴＩＣＩＮ（カタログ番号Ｇ９５１６）を使用した。

【０１２１】

（ラット腸細胞株－１細胞（ＲＩＥ－１細胞））

これらの細胞は、Ｄｒ．Ｒａｙ　Ｄｕｂｏｉｓの研究室（ＶＡＭＣ）に由来する。それらは代表的に、１０％ウシ胎仔血清を補充したＤｕｌｂｅｃｃｏ改変イーグル培地で培養する。

【０１２２】

（レオウイルス）

血清型１または血清型３のいずれかの研究室株を使用する。それらは、もともとＢｅｒｎａｒｄ　Ｎ．Ｆｉｅｌｄｓ（死去した）の研究室から入手した。これらのウイルスは、詳細に記載されている。

【０１２３】

（レトロウイルス）

本明細書に使用されたＵ３ジーントラップレトロウイルスは、Ｄｒ．Ｅａｒｌ　Ｒｕｌ

ｅｙ（ＶＡＭＣ）によって開発され、ライブラリーを、彼により示唆される一般的プロトコルを使用して作製した。

【０１２４】

（血清）

ウシ胎仔血清　Ｈｙｃｌｏｎｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　カタログ番号　Ａ－１１１５－Ｌ

（ウイルス感染に必要な遺伝子）

単離したいくつかの配列の特徴としては、以下が挙げられる：

配列番号１：ラットの小腔のＨ＋ＡＴＰａｓｅのゲノム配列（遺伝子産物の活性の化学的な阻害は、インフルエンザウイルスおよびレオウイルスに対する抵抗性を生じる）

配列番号２：ラットのαトロポミオシンゲノム配列

配列番号３：マウスおよびラットのｇａｓ５遺伝子のラットのゲノム配列（細胞周期調節遺伝子）

配列番号４：マウス、ヒトのｒａｓ複合体のｐ１６２のラットのゲノム配列（細胞周期調節遺伝子）

配列番号５：マウス、ヒトのＮ－アセチル－グルコサミニルトランスフェラーゼＩ　ｍＲＮＡに類似（細胞内のゴルジ領域に位置する酵素；ウイルスを含むＤＮＡの一部として見出された）

配列番号６：マウス、ヒトのカルサイクリンに類似、逆相補体（細胞周期調節遺伝子）

配列番号７：ＬＯＣＵＳ　ＡＡ２５４８０９　３６４ｂｐのｍＲＮＡ　ＥＳＴ　ＤＥＦＩＮＩＴＩＯＮ　ｍｚ７５ａ１０．ｒ１　Ｓｏａｒｅｓマウスリンパ節ＮｂＭＬＮ　Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ　ｃＤＮＡクローン７１９２２６　５’に類似した配列を含む

配列番号８：Ｎｏ　ＳＷ：ＲＳＰ１＿ＭＯＵＳＥ　Ｑ０１７３０　ＲＳＰ－１　ＰＲＯＴＥＩＮに類似した配列を含む

配列番号９：ｇｂ｜Ｕ２５４３５｜ＨＳＵ２５４３５ヒト転写リプレッサー（ＣＴＣＦ）ｍＲＮＡ、完全ｃｄｓ、長さ＝３７８０の５’ＵＴＲを含む

配列番号３８：レトロウイルス起源のｃＤＮＡに類似

配列番号５０：トラップされたＡＹＵ－６遺伝的エレメント。

【０１２５】

（悪性表現型を抑制する細胞遺伝子の単離）

発明者らは、形質転換していない細胞（ＲＩＥ－１親株）の母集団から形質転換した表現型（潜在的に腫瘍細胞である）を有する細胞株の選択に、遺伝子トラップ方法を使用した。親細胞株であるＲＩＥ－１細胞は、軟寒天上で増殖する能力またはマウスに腫瘍を産生する能力を有さない。以下のジーントラップでは、細胞を、軟寒天上で増殖する能力についてスクリーニングした。これらの細胞を、クローニングし、ゲノム配列を、レトロウイルスベクター配列番号７６、配列番号７７、配列番号７８、配列番号７９、配列番号８０、配列番号８１、配列番号８２、配列番号８３、配列番号９２、配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、配列番号１１９、配列番号１７７、配列番号２０６、配列番号２４０、配列番号２４３、配列番号２４７、配列番号３２１、配列番号３２８、配列番号３２９、配列番号３３０、配列番号３３１、配列番号３３４、配列番号３３５、配列番号３３６、配列番号４０８、配列番号４１１、配列番号４１２、配列番号４１３、配列番号４１４の５’または３’から得た。研究室表示（Ｌａｂ　Ｄｅｓｉｇｎａｔｉｏｎ）で、「ｘ」と名付けられた全てのクローンは、本出願全体にわたって、腫瘍発達に関与する代表的な遺伝子を示す。全ての細胞株は、腫瘍細胞株であるかのようにふるまい、またマウスに腫瘍を誘導する。

【０１２６】

細胞株の内、二つは、プロスタグランジン合成酵素遺伝子ＩＩまたはＣＯＸ２の増強された発現に関連する。上流遺伝子のレトロウイルス標的化による遺伝子機能の破壊は、下流の遺伝子産物、ＣＯＸ２の発現の増強につながることが示された。ＣＯＸ２酵素の低分子インヒビターが添加された場合、形質転換した表現型の復帰が生じた。ＣＯＸ２遺伝子

は、ヒトの前悪性腺腫において増加が見出され、ヒト結腸癌において過剰発現が見出された。ＣＯＸ２発現のインヒビターはまた、腫瘍の増殖を停止する。細胞株の１つであるｘ１８（配列番号１７７）は、ＥＳＴ（ｄｂｅｓｔ）データベースで示される遺伝子を破壊していた。

【０１２７】

（配列番号７６）：＞０２－Ｘ１８Ｈ－ｔ７．．、ｇｂ｜Ｗ５５３９７｜Ｗ５５３９７ｍｂ１３ｈ０４．ｒ１　Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈ　マウス脳　Ｍｕｓ　１．０ｅ－１１４に同一。ｘ１８はまた、見出される同一のＥＳＴを含むベクターから配列決定された。（配列番号７７）：＞ｘ８＿ｂ４＿２．．。（配列番号７８）：＞ｘ７＿ｂ４．．。（配列番号７９）：＞ｘ４－ｂ４．．。（配列番号８０）：＞ｘ２－ｂ４．．。（配列番号８１）：＞ｘ１５－ｂ４．．。（配列番号８２）：＞ｘ１３－ｒｅ．．、逆相補体。（配列番号８３）：＞ｘ１２＿ｂ４．．。

【０１２８】

提供された核酸配列が単離される遺伝子のそれぞれは、腫瘍抑制遺伝子を示す。配列が、配列番号７６に示される核酸を含む遺伝子以外の破壊された遺伝子の機構は、現在は未知の形質転換された表現型を抑制し得る。しかし、それぞれは、公知の遺伝子に対応するゲノム配列がない潜在的に固有である腫瘍抑制遺伝子を示す。腫瘍抑制遺伝子を迅速に選択する能力は、癌の処置または予防のプロセス（診断試験に対して強力な）で、固有の標的を提供し得る。

【０１２９】

（全長ゲノム遺伝子の単離）

本発明の単離された核酸（その配列は、配列番号１～配列番号４１８のいずれかに示される）またはその小さいフラグメントを、検出可能な標識で標識し、高ストリンジェンシーな条件下（すなわち、ハイブリダイゼーションを引き起こすために高塩濃度および高温で、ならびに、温度５～２０℃で洗浄する）で、ラットのゲノムライブラリー（λファージライブラリーまたは酵母人工染色体ベクターライブラリー）をスクリーニングするためのプローブとして使用する。クローンを単離し、標準的サンガージデオキシヌクレオチド配列決定法により配列決定する。一旦新規クローンの全長配列が決定すると、それは、プローブ配列と一緒に並べられ、プローブ配列に対するその相対的な向きを決定する。結合したゲノム配列のどちらかの末端それぞれの配列を使用して２番目および３番目のプローブを設計する。これらのプローブを使用して、ライブラリーをスクリーニングし、新規クローンを単離し、それを配列決定する。これらの配列を、前に入手した配列と一緒に並べ、どちらかの末端配列に対応する新規プローブを設計し、全長遺伝子が単離され、位置づけされるまで、この全体のプロセスを繰り返す。配列の１つの末端が、いかなる新規クローンも単離し得ない場合、新規ライブラリーがスクリーニングされ得る。全長配列は、５’末端の調節領域および３’末端のポリアデニル化シグナルを含む。

【０１３０】

（ｃＤＮＡの単離）

オープンリーディングフレームを含む単離された核酸（その配列は、配列番号１～配列番号４１８のいずれかに示される）もしくはその小さなフラグメントまたはゲノムライブラリーから得たさらなるフラグメントは、検出可能な標識によって標識され、本発明のフラグメントの一部を、ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして使用する。ラットのｃＤＮＡライブラリーは、ラットのｃＤＮＡを入手し、ヒトｃＤＮＡライブラリーは、ヒトｃＤＮＡを入手する。繰り返しスクリーニングを上記のように使用し得、必要な場合、いくつかのクローンから遺伝子の全長コード配列を入手する。単離体を次いで、配列決定し、例えば、ジデオキシヌクレオチド配列決定方法のような標準的方法によりヌクレオチド配列を決定し得る。

【０１３１】

（血清生存因子の単離および特徴づけ）

血清枯渇に対する抵抗性の欠如は、血清に存在する血清因子（生存因子）を持続的に感

染した細胞の獲得した依存性のためである。持続的に感染した細胞に対する血清生存因子は、５０ｋＤと１００ｋＤの間の分子量を有し、低ｐＨ（ｐＨ２）での不活性化およびクロロホルム抽出に抵抗性である。５分間煮沸することにより、および低イオン強度溶液（１０～５０ｍＭ）中では、不活性化する（全体の血清（５０～１００ｋＤ画分）から一旦断片化する）。

【０１３２】

因子を、３０ｋｄ～１００ｋｄのサイズを取り除く求心性分子カットオフフィルター（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅおよびＡｍｎｉｃｏｎ）および５０ｋｄの分子を取り除く透析チューブを使用するサイズ分画により、血清から単離した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動および銀染色を使用して、生じたすべての物質が、５０ｋｄ～１００ｋｄの間であることを確定し、初期単離物の多様性を確認した。イオン交換クロマトグラフィーおよびヘパリン硫酸塩吸着カラムを使用し、その後ＨＰＬＣにより、さらなる精製を行った。ＨＣｌを使用して種々のｐＨ条件に対して血清画分（３０～１００ｋｄ　画分）のｐＨを調節し、生物学的活性の評価の前に、ｐＨをｐＨ７．４に再調節した後で、活性を確定した。活性を含む画分を低イオン強度溶液で種々の時間透析し、培地に対して、画分を透析することにより生物学的活性を決定する前に、生理的条件に対するイオン強度を再調整することにより、低イオン強度感受性を確定した。クロロホルム抽出の後、水性溶液中で、生物学的活性を維持した。このことは因子が脂質ではないことを示唆している。３０～１００ｋｄの画分を１００℃の水浴に５分間置くと、生物学的活性を失った。

【０１３３】

（単離された核酸）

単離したタグ化したゲノムＤＩＡＳを、サンガージデオキシヌクレオチド配列決定を使用して標準的方法により配列決定した。これらの核酸のヌクレオチド配列は、本明細書に配列番号１～４２８（配列番号リスト１）として示す。配列を、コンピューターデータバンクにかけて、相同性検索を行なった。「６ｂ」配列（ゲノムライブラリー６、フラスコｂから得た）のいくつかに対する配列（すなわち、配列番号３７、３８、３９、４２、６１、６５、６６，６９）は、公知の遺伝子、αトロポミオシンに一致し、他のいくつかは、小胞－H^+－ＡＴＰａｓｅに一致した。これらの配列は、急性および持続的なウイルス感染に関連し、それら（すなわちαトロポミオシンおよび小胞－H^+－ＡＴＰａｓｅ）を含む細胞遺伝子は、上記の方法を用いたウイルス感染に対する薬物処理の標的になり得る。これらの遺伝子は、特に、対立遺伝子の一方もしくは両方の破壊が、生存可能な細胞を生じるので、治療標的になり得る。

【０１３４】

（単離された核酸に対するタグの同定）

ベクターでタグ化されたゲノム配列（例えば、Ｕ３ジーントラップベクター）に、その配列が、単離された突然変異細胞のゲノムライブラリーに対応する数字およびライブラリーの固有のメンバーを示す文字を与える。同一の数字および文字を有する１つより多い配列は、遺伝子を「タグ化した」ベクター挿入部分の周囲のゲノムから得た複数の固有の配列を示す。このようなゲノム配列は、ベクターに基いた、配列決定が、３’～５’または５’～３’に生じるプライマーを使用して得る。前者の場合、ベクターが挿入される遺伝子の向きを回復するために、ベクタープライマーに由来する配列は、逆になり、相補的であるに違いない。このような逆の相補的な配列は、「ｒＥ」と呼ばれる。５’～３’に生じるプライマー（すなわち、プライマーは、ベクターの３’末端にある）に由来するゲノム配列決定の場合、由来する配列は、破壊された遺伝子に存在するような配列であるので、変化は必要ない。このような配列は、Ｂ４と呼ばれる。相同性は、ネガティブ鎖上に明白に示さない限り、以下の各ゲノム配列が、正向きであることを示す。例として、配列番号１１０は、ポジティブ鎖上に新規のポリペプチドをコードする核酸配列を含み、それに対して、ネガティブ鎖は、フェリチンをコードする。

【０１３５】

さらなる遺伝子に対する配列番号および研究室表示は、以下に示す本発明の方法を使用

して同定した。

【０１３６】

【数４－１】

84	32-3-2#1E/-rE
85	L191B2E#1-RE

【０１３７】

【数４－２】

86 L191B2E#3+-rE

87 21-5-9E-RE
以下と相同: emb/AL021154/HS15005 ヒトDNA配列

88 14A14E-rE

89 4cx-b4

90 5a-b4

91 6BSA12-B4

92 X7B/B4

93 x27b4f_1

94 12C#A-rE

95 10-3b(5/2/96)/-rE

96 10_4B_4-rE

97 6BE60-rE
以下と相同: α-トロポミオシン

98 19D3E-rE

99 L19D16E-rE

100 2b_rE

101 14_24_#6-rE

102 7A7'-rE
以下と相同: アネキシンII／ダイネシンI

103 L12cx#6-rE
以下と相同: gb:X51760 ヒトジンクフィンガータンパク質 ZFP-36

104 L12cx#11-rE

105 19D5E-rE
以下と相同: 6-ピルボイル-テトラヒドロプテリンシンターゼ (gb/M77850/RAT6PTHS)

106 12_3b#7-rE

107 12_3B#8-RE
以下と相同: gb/AA871174/vq32a08.r1 Barskad bowel MPLRBg Mus musculus cDNA
clone 10959265'

108 9B27-2-E
以下と相同: RAT LOCUS RNU53922 04-MAY-1996; Rattus norvegicus DnaJ-様タンパク質 (RDJ1) mRNA, 完全 Cds, ACCESSION U53922 (ネガティブ鎖上)

109 x15-rE

110 X11-rE
以下と相同: フェリチン H (ネガティブ鎖上)

【０１３８】

【数４－３】

111 X20-rE
以下と相同： LOCUS RATGL5A ラットNICERエレメント (GL5-14)5' 長い末端反復
, Acc.No. M59028 M33535N1D

112 X4-rE

113 14A7E-rE
以下と相同： MMSMAD7 3681 bp mRNA ROD 31-JUL-1998 DEFINITION Mus musculus Mad関連タンパク質Smad7に対するmRNA ,149 bases

114 14A13E-rE

115 14_7#2E-rE
以下と相同： N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI

116 12CX#6-rE
以下と相同： gb|AA522204|AA522204 vf98g09_r1 Soares マウス乳腺 NbMMG Mus musculus cDNA clone 851872; また、5' が、gb X51760 ジンクフィンガータンパク質 ZFP-36 (HUMAN)にも類似 , gb L20450 Mus musculus DNA結合タンパク質 mRNA, 完全 cds (MOUSE); Length = 442, 925 bases (配列番号20と相同性を共有する)

117 12C_2B#9E-rE

118 12CX#11E-rE

119 x5-rE

120 8C5_11-rE

121 191E2E-rE

122 19_7AE-rE

123 19_9BE-rE
以下と相同： LOCUS HS347M6 56583 bp DNA PRI 14-JAN-1998 染色体Xq22上の PAC 347M6由来のヒトDNA配列 CSTF2 (切断刺激因子, CF-1, ポリアデニル化因子) 64 kD サブユニット遺伝子

124 191E9E-rE

125 191E8E-rE

126 14C_2E/-rE
以下と相同： gb/H31084/EST104778 Rattus sp. cDNA - 5' 末端が シグナル認識粒子サブユニット (19kDa) (ネガティブ鎖上) に類似する

127 14H1E-rE

128 14G3E-rE

129 14G_2E-rE

130 6_3_6_2E/-rE
以下と相同： Rattus norvegicus cis-golgi gp130 (ネガティブ鎖上); および

【０１３９】

【数４－４】

a HUMAN EST (ポジティブ鎖上) AI127398; qb70g11.x1 Soares 胎児心臓 NbHH19W Homo sapiens cDNA clone (1705508 3' mRNA配列)

131 14H4E/-rE

132 18A_8_4E-rE

133 18A_8_1E-rE

134 SCB2_19E-rE

135 L197B3E-rE

136 L195C5E-rE

以下と相同: H. pylori および C.jeuni

137 21_5_7E-rE

以下と相同: id3遺伝子 ; emb|AL021154|HS150O5 クローン150O5由来のヒトDNA配列 ; HTGS phase 1 [Homo sapiens]; 転写因子E2F-2に対するE2F2遺伝子およびDNA結合3(ドミナントネガティブ ヘリックス-ループ-ヘリックス タンパク質), 1R2, Length = 133667, 971 basesを含む

138 L195B1E-rE

以下と相同: vK72b07.s1 Knowles Solter mouse 2 cell Mus musculus cDNA clone 960181 5'

139 L194c4E-rE

140 L193A1E#A-rE

141 L192A3E-rE

142 L1739E-rE

143 L192B3E#13-rE

以下と同一の配列を含む ; インシュリン増殖因子 II/ マンノース-6-ホスフェートレセプター

144 3 2 4 rE

カルサイクリンと同じゲノムの場所に位置するが、この遺伝子は、反対方向に「読」まれる

145 36 7 1 a-rE

146 36 5 1 4 a-rE

147 34 25 5a-rE

rat satellite DNA (RATRSSID 93 bp, ROD 12-MAR-1984)

148 34 24-126/rE

以下と相同:

HSU49928 (3096 bp mRNA) PRI 06-APR-1998, Homo sapiens TAK1結合タンパク質 (TAB1) mRNA, 完全 cds, ACCESSION U49928 NID g1401125,および HS333H23 (142274 bp DNA) HTG 17-JUL-1998 ヒトDNA配列

149 34 23-1/rE

150 36 5 2-6/rE

【０１４０】

【数４－５】

151 36 5 2-196/rE

152 34 23-3/rE
以下と相同: gb|L16546|RATAP1X ラットP糖タンパク質 (mdr1b) 遺伝子
153 34 25 23-rE

154 36 5 2-196/rE

155 31 3 9/rE
以下と相同: AA798638 568 bp mRNA EST 10-FEB-1998, vw34b06.r1 Soares mouse 乳腺 NbMMG Mus musculus cDNA クローン 1245683 5, mRNA 配列, 824 bases.
156 31 3 6-2-rE

157 31 3 17-rE

158 31 3 5-rE
以下と相同: AF046001 2347 bp mRNA PRI 19-FEB-1998, Homo sapiens ジンクフィンガー転写因子 (ZNF207) mRNA, 完全 Cds, 833 bases.

159 31 3 15#1/rE

160 24 3 5#1/rE

161 31 4 4#1/rE

162 31 3 19#2/rE

163 31 4 5#1/rE

164 24 9 3#2/rE

165 L24_26_1-BL
以下と相同: AI045472 396 bp mRNA EST 06-JUL-1998, UI-R-C1-jz-h-09-0-UI.s2 UI-R-C1 Rattus norvegicus cDNA cloneUI-R-C1-jz-h-09-0-UI 3', mRNA 配列。

166 L24_26_1-B4

167 L22_5A1/rE

168 L24_3_2B/rE

169 L24 4-2/rE

170 L24 5-2/rE

171 L24 5-3/rE

172 (15-)L28AP/rE

173 L24 26-10/rE
以下と相同: LOCUS R06687 403 bp mRNA EST 03-APR-1995; yf10a10.r1 Soares 胎児肝臓脾臓 1NFLS Homo sapiens cDNA クローン 126426 5'

174 L24 26-2A/rE

175 L24 26-2B/rE
以下と相同: gb|AA590026|AA590026 vm22g03.r1 Knowles Solter マウス胚盤胞 B1 Mus musculus cDNA clone 990964 , 459 bases, 139A;およびRattus norvegicus Eker ラット関連腸内A粒子エレメント

【０１４１】

【数４－６】

176 14 7#2E-rE
以下と相同: N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI;
この配列は、配列番号32と相同性を共有する

177 x18

178 31_3_9-rE

179 31_3_6_2-rE

180 31_3_17-rE

181 31_3_15#1-rE

182 24_3_5#1-rE

183 31_4_4#1-rE

184 31_3_19#2-rE

185 31_4_5#1-rE

186 24_9_3#2-rE

187 14XD#12E-rE

188 70A-rE

189 31-3-4-rE

190 3_6_9-NeoG-rE

191 31_4_2-rE

192 3_2_13-rE
以下と相同: カルサイクリン

193 3_2_4-E

194 L25-10/-rE
以下と相同: カルサイクリン

195 L24-4-3/-rE

196 L24-9-1-rE
rat id 配列

197 17-L25-27#7-rE
以下と相同: カルサイクリン

198 L21C1E-rE
以下と相同: カルサイクリン

199 L24-5-3BE-rE.
以下と相同:
LOCUS H32572 310 bp mRNA EST 08-SEP-1995 EST107805 Rat PC-12 cells, untreated Rattus sp cDNA 5' 末端, ACCESSION H32572, および

【０１４２】

【数４－７】

LOCUS AA858747 470 bp mRNA EST 10-MAR-1998 UI-R-A0-bb-e-01-0-UI.s1 UI-R-A0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-A0-bb-e-01-0-UI, 3' similar to gb|AA473081|AA473081 vd44b07-r1 Barstead MPLRB1 Mus musculus cDNA clone 803413 5' mRNA配列

200 L24-4-2BE-rE
以下と相同: LOCUS MMU51002 6495 bp DNA ROD 16-JAN-1997 Mus musculus Dlx-2遺伝子、完全 cds, ACCESSION U51002 NID g1477589

201 17-3-3B-B4

202 L24-26-3/-rE
以下と相同: RNU23776, DNA ROD 10-AUG-1995, Rattus norvegicus Eker ラット関連腸内A粒子エレメント

203 12_2B#2-rE

204 05-17-3-3He-1-T7

205 21_5_8E-rE
以下と相同: emb|AL021154|HS150O5 クローン150O5由来のヒトDNA配列; 1p36_13-36_22, 転写因子E2F-2に対するE2F2遺伝子およびDNA結合3(ドミナントネガティブヘリックス-ループ-ヘリックスタンパク質、1R2のインヒビター)に対するID3遺伝子を含む
Length = 133667, 971 bases

206 X18H-t7

207 18A_8_4E-rE

208 L24-5-2BE-rE

209 L24-4-2AE-rE

210 L24-10-1BE-rE

【０１４３】

（ウイルス感染に必要な遺伝子の特性）

本発明の方法は、ＩＧＦ２転写物（研究室表示６ＢＥ７２＿ｒＥ（配列番号２））を調節するインプリンティング遺伝子（例えば、ＩＦＧ２ｒ（研究室表示Ｌ１９２ｂ３Ｅ＃＃１３－ｒＥ（配列番号１４３）およびＣＴＣＦ（父性的にインプリントされた））を同定した。

【０１４４】

また、ウイルス抵抗性に関して選択された１２０クローンの内、６遺伝子（１６細胞クローン）は、別のライブラリーから１回より多く選択された。カルサイクリンは、１０回選択された。カルサイクリンに加えて、他のクローンは、１回より多く破壊された。選択されたウイルスと、比率の試験による無作為の挿入事象との間の統計的差は、$p < 5 \times 10^{-5}$である。

【０１４５】

データはまた、ＨＳＶ－１レポーター発現が、２つの細胞クローンで増強されることを示した。Ｓ１００Ａ６（研究室表示３＿２＿１３＿ｒＥ（配列番号１９２））およびＡｎｎｅｘｉｎＩＩ（研究室表示７Ａ７’－ｒＥ（配列番号１０２））は、これらのクローンで破壊された配列である。これらは、同一の経路の一部であり、互いに結合し得る。

【０１４６】

本発明はまた、その産物が、結合により関連する遺伝子を同定した。例えば、研究室表示６Ｂ３７Ｈ（配列番号６５）は、破壊されたａｎｘＩ遺伝子を有する。研究室表示６Ｂ６０（配列番号２３７）は、破壊されたＴＰＭ１遺伝子を有する。研究室表示７Ａ７’－

ｒＥ（配列番号１０２）は、破壊されたａｎｘＩＩ遺伝子を有する。研究室表示３＿２＿１３（配列番号１９２）は、破壊されたＳ１００Ａ６遺伝子を有する。研究室表示３２＿３＿２＃１Ｅ（配列番号８４）は、破壊されたｃａｍ２遺伝子を有する。研究室表示Ｌ２４＿５＿３ＢＥ（配列番号１９９）は、破壊されたＴＵＳＰ遺伝子を有する。研究室表示３１＿３＿１５＃１（配列番号１５９）は、破壊されたｆｋｂｐ８遺伝子を有する。研究室表示２４＿９＿３＃２（配列番号１６４）は、破壊されたｃｐｒ８遺伝子を有する。

【０１４７】

データはまた、変異体細胞クローンでは、破壊された遺伝子の発現レベルが変化し得ることを示した。例えば、Ｓ１００Ａ６クローン（研究室表示３＿２＿１３＿ｒＥ（配列番号１９２））では、Ｓ１００Ａ６の発現は減少する。別のクローンでは、Ｐ１６２（ｅｉｆ３ｓ１０）（研究室表示１２ＰＳＡ＃６＿ｒＥ（配列番号４））の発現が増加する。なお別のクローンでは、ＴＰＭ１（研究室表示６ｂ６０＿Ｌａｃ（配列番号２３７））の発現は、転写物の大きさを変化している。

【０１４８】

全体的に、本発明の方法により破壊された遺伝子は、様々であり、タンパク質ファミリーのいくつかの部類に属する。本発明は、ＤＮＡ結合タンパク質（ｚｎｆ２０７、ＨＰ１－ＢＰ７４、ＨＡＴ１）；ＲＮＡ結合タンパク質（ｚｐｆ３６、ｅｉｆ－３、ＣＳＴＦ）；代謝酵素（小胞Ｈ＋ＡＴＰａｓｅ［１６ｋＤａおよび３１ｋＤａ］、ＧｎＴ－１［Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎａｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ）］）；レトロトランスポゾン（嚢内Ａエレメントラットレトロウイルス配列）；細胞表面／マトリックスタンパク質（α－トロポミオシン（ＴＰＭ１））；シグナル伝達タンパク質（ＴＡＫ１およびｓｍａｄ－７）；および分子輸送タンパク質（ｇｍ１３０、ｍ６ｐ／ｉｇｆ２ｒ、アネキシンＩ、アネキシンＩＩ、アネキシンＩＩ、カルサイクリン、ＪＷＡ，ＥＲＢＩＮ、ＡＢＣカセット［ｍｄｒ１］およびＤｎａＪを提供する。

【０１４９】

（実施例ＩＩ　ＩＧＦ２経路における遺伝子の同定）

ウイルス感受性遺伝子に対する体系的なスクリーニングを行なうために、レトロウイルス誘導性細胞溶解に対して抵抗性の腸上皮細胞（ＢｌａｙおよびＢｒｏｗｎ（１９８５ａ）；ＢｌａｙおよびＢｒｏｗｎ（１９８５ｂ））を選択する遺伝子包括アプローチが開発された。選択されたレオウイルス抵抗性クローンの１つは、ＣＴＣＦ転写調節因子に挿入された変異のために、インスリン成長因子－２（ＩＧＦ２）（Ｂｅｌｌら（２０００））を過剰発現する[5]。ＩＧＦ２の過剰発現は、レオウイルス感染に対する抵抗性に関して十分であることが見出された。さらに、選択されたクローンは、軟寒天上で増殖するその能力によって形質転換された細胞表現型を示した[6]。従って、ＩＧＦ２シグナル伝達経路における機能獲得変異は、溶解性ウイルス感染に対して抵抗性を与え、発癌に強力に寄与する。

【０１５０】

プロモータートラップベクター[7]による無作為変異形成によりつくられたＲＩＥ－１細胞のライブラリーを、溶解性レオウイルス感染後の生存株を選択するために使用した。ＲＩＥ－１細胞を、本明細書に記載されるＵ３ＮｅｏＳＶ１ジーントラップシャトルベクターを使用して変異誘発し、生じた、変異した細胞のライブラリーをレオウイルス血清型１／Ｌａｎｇ、ＭＯＩ＝３５で感染させ、溶解性感染に対して抵抗性のクローンを選択した。レオウイルス１型感染の後作製した、持続的に感染した（ＰＩ）細胞（Ａｈｍｅｄ（１９７７））は、血清生存因子を必要とすることが見出された。ＰＩ細胞は、ＲＩＥ－１細胞が、溶解性感染に対する抵抗性を獲得した非遺伝的機構を提供するので[9]、ＰＩ生存株を除去するために、レオウイルス抵抗性クローンを血清を含まない培地で選択した。

【０１５１】

単離されたクローンは、レオウイルス抗原を示さず、プラークアッセイで評価した場合、感染性ウイルスを産生しなかった。このことは、これらのレオウイルス抵抗性クローン

が、ＰＩではないことを示唆している。各ウイルス抵抗性クローン中のＵ３ＮｅｏＳＶ１プロウイルスに隣接する３個のゲノムＤＮＡの領域を、プラスミドレスキューにより単離し、配列決定した。結局、１３０個の単離されたクローンの内、６２％の隣接する配列は、公知または推定上の遺伝子に一致し、さらに２３％は、発現遺伝子配列断片の公共のデータベース（ｄｂＥＳＴ）に示されるかまたは非重複配列（ｎｒ）であった。公知または推定遺伝子に一致する９０個のクローンから、８個の遺伝子が、１回以上示された。多くの破壊された遺伝子は、公知または推定の機能を有し、いくつかは、同一のまたは関連した経路で機能することが公知である。３つの遺伝子が、インスリン成長因子－２（ＩＧＦ２）シグナル伝達経路、すなわち、ＩＧＦ２／マンノース－６－リン酸レセプター（ＩＧＦ２／ｍｐｒ）[10、11]、インスリン成長因子結合タンパク質（ＩＧＦＢＰ）５プロテアーゼ（ｐｒｓｓ１１）[12]およびＣＴＣＦ遺伝子[13、14]（クローン６ｂ７２）と関連していた。ＣＴＣＦは、母系のＩＧＦ２遺伝子発現を差次的に抑制するのに対して、インプリンティングされた父系遺伝子は、ＣＴＣＦ結合部位のメチル化のために抑制を回避する。

【０１５２】

ウエスタンブロット分析によって評価すると、６ｂ７２細胞におけるＣＴＣＦタンパク質のレベルは約５０％減り、これは、１つの対立遺伝子の混乱と一致した。ノーザンブロットによって評価すると、減弱するＣＴＣＦ発現は１ＧＦ２転写物の増加と関係していた。さらに、２つの産物を、ＩＧＦ２コード配列に隣接するプライマーを用いるＲＴ－ＰＣＲによって、６ｂ７２細胞から増幅した。第１の産物は、ラットＩＧＦ２配列（Ｇｅｎｂａｎｋ登録番号Ｘ１７０１２）と同一であったのに対し、第２の産物は、エキソン３の上流に位置する他の選択的スプライシングレセプターに、エキソン２の差次的スプライシングによる１４のさらなるヌクレオチドを含んだ。代替的な転写物は、いかなる公知のタンパク質にも相同でない６０のアミノ酸残基に追加したＥペプチドの最初の１１のアミノ酸からなる異常タンパク質をコードする。６ｂ７２クローンのＩＧＦ２の発現増加がレオウイルスの感染に対する細胞抵抗と関係しているかどうかを試験するために、ＲＩＥ－１および６ｂ７２細胞を、レオウイルス１型（ＭＯＩ＝１０）で感染させた。レオウイルスの力価の約９０％の減少が、感染後２４時間で、ＲＩＥ－１細胞と比較して６Ｂ７２クローンの感染から得られ（4.5×10^{5}　対　5.1×10^{6}）、これは、４８時間維持された。さらに、レオウイルス１型の高い力価への暴露後、６ｂ７２細胞の生存の劇的な差異があった。ＩＧＦ２がレオウイルスでの細胞溶解に対する抵抗の所有物を与えるかどうか決定するために、ＩＧＦ２遺伝子およびそのスプライス改変体を過剰発現する細胞クローンを作製した。細胞は、レオウイルスでの溶解感染に抵抗するそれらの能力について試験した。ＲＩＥ－１細胞におけるスプライス改変体ＩＧＦ２でなく、野生型の過剰発現が、レオウイルスの感染に対する細胞の抵抗性を１００倍以上増加させた。しかし、スプライス改変体ＩＧＦ２が６ｂ７２細胞にトランスフェクトされた場合、感染を持続させる６ｂ７２細胞の能力が消された。逆方向のＩＧＦ２遺伝子の過剰発現は、感染に抵抗する６ｂ７２細胞の能力にわずかな変化を生じた。これらの研究は、６ｂ７２細胞における増加したＩＧＦ２発現が、レオウイルス感染による溶解に抵抗するそれらの能力と関係しており、そして、スプライス改変体ＩＧＦ２がＩＧＦ２の効果をブロックするドミナントネガティブなアイソフォームをコードすることを示唆する。ＩＧＦ２ゲノムインプリンティングの緩みに関するＩＧＦ２の過剰発現が、腫瘍の形成に関与することを示唆する、集積した証拠が存在する。６ｂ７２細胞が、野生型細胞と比べてその細胞周期の速度が異なるかどうかを決定するために、本発明者らは、ＭＴＳ／ＰＭＳの取り込みを試験した。細胞周期に変化がないことが見出された（データ示さず）。ＲＩＥ－１細胞は、軟寒天中で増殖する能力を有さず、げっ歯類における侵襲性の腫瘍を形成する能力についての代替物である[6、15]。中断されたＣＴＣＦ遺伝子を有する６Ｂ７２細胞が、軟寒天中で増殖する能力を生じることが見出された。ＩＧＦ２がこの表現型を与えるかどうかを決定するために、ＩＧＦ２野生型およびその遺伝子改変体でトランスフェクトした細胞を試験した。ＩＧＦ２遺伝子を過剰発現する６ｂ７２細胞は、軟寒天中で増殖することが見出された。スプ

ライス改変体ＩＧＦ２、またはアンチセンスＩＧＦ２の強制発現は、軟寒天中で増殖する６ｂ７２細胞の能力を抑止する。こうして、改変体ＩＧＦ２は、このアッセイにおいて、ＩＧＦ２のトランスドミナントインヒビターとして機能するようである。最終的に、理解されるように、親ＲＩＥ－１細胞においてスプライス改変体ＩＧＦ２遺伝子を過剰発現することと関連する表現型はなかった。軟寒天中で増殖する能力は、ＩＧＦ２経路に変異を含む他のレオウイルス抵抗性クローンの特性でない。従って、中断されたＩＧＦ２レセプター（ＩＧＦ２／ｍｐｒ）またはＩＧＦ２ＢＰ　５プロテアーゼ（ｐｒｓｓ１１）遺伝子を有する細胞クローンが、軟寒天中で増殖しなかった。アネキシンＩＩ（ａｎｘａ２）は、サイトメガロウイルスの複製に関与し[16]、インシュリンおよびインシュリン成長因子－１レセプターに結合する[17]。中断されたａｎｘａ２を有するクローンは、本発明者らのライブラリーで見出され、そしてまた、軟寒天中で増殖しなかった。従って、ＩＧＦ２または関連した経路において中断する遺伝子を含むクローンにおいてさえ、軟寒天において増殖する能力は、レオウイルスに抵抗する細胞の一般的な特性ではない。

【０１５３】

挿入変異誘発は、選択可能な細胞表現型に関する遺伝子を同定するためのアプローチを提供する。本研究において、レオウイルスの溶解性感染に抵抗性の１クローンが、ＣＴＣＦ転写調節因子に挿入されたプロウイルスを含み、ＩＧＦ２を過剰発現した。ＣＴＣＦ結合モチーフは、多くの遺伝子に存在し、この遺伝子とては、以下が挙げられる：ＩＧＦ２[18]／Ｈ１９[19]およびｃ－ｍｙｃ２０。しかし、レオウイルス抵抗性について選択された他の３クローンは、ＩＧＦ２経路に変異を含み、ウイルス抵抗におけるＩＧＦ２の役割が、さらに研究された。親のＲＩＥ－１細胞におけるＩＧＦ２遺伝子の強制過剰発現は、溶解性レオウイルス感染に対する細胞抵抗性を付与するのに十分であった。推定すると、挿入物がＩＧＦシグナル伝達経路における他の遺伝子に影響を与えることが、複数の遺伝子における変異が、共通の経路に作用することによって、同じ表現型に影響を及ぼし得ることを示唆する。

【０１５４】

ウイルスの侵入、分解、転写、翻訳および再梱包が共通の特徴を共有するので、共通の細胞経路が、他のウイルスファミリーによる感染に影響を与えることが可能である。本研究は、まず、ＩＧＦ２遺伝子発現とウイルス感染との間の直接的な関係を示す。

【０１５５】

本明細書中に提示されるデータはまた、ＩＧＦ２発現のレベルが、軟寒天中で増殖する細胞の能力と相関し、侵襲性の細胞増殖の確立に対する代理物であることを示唆する。さらに、本発明は、成熟ホルモンの全配列を実質的に共有するが、Ｅ－エピトープの大部分を欠く、新規な５８のドミナントネガティブな改変体を定義した。

【０１５６】

（取り込み変異誘発およびレオウイルス抵抗性クローンの選択）

レオウイルスの溶解性の感染と干渉し得る遺伝子を同定するために、ジーントラップレオウイルスシャトルベクター（Ｕ３ＮｅｏＳＶ１）を用い、変異したラット腸（ＲＩＥ－１）細胞[1]を産生した。変異したＲＩＥ－１細胞のライブラリーを、作製し、その後、ベクター（感染の多重度＜０．１）で感染させ、Ｇ４１８硫酸塩（０．７ｍｇ／ｍｌ）（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，ＣＡ）、１ｍｇ／ｍｌを含有する培地中で選択した[1]。２０の変異体ＲＩＥ－１細胞ライブラリー（各々が、１０４の独立したＵ３ｎｅｏＳＶ　１ベクターの挿入物からなる）を作製し、各変異事象が約１０３の兄弟細胞の亜系統により反復されるまで、増やした。これらの細胞を、低密度で播種し、これらが静止状態になるまで３日間無血清培地中でインキュベートし、１細胞あたり３０プラーク形成単位（ｐｆｕ）の感染多重度にてレオウイルス血清型１で一晩感染させた。感染した細胞をトリプシンではがし、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（Ｈｙｃｌｏｎｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｌｏｇａｎ，Ｕｔａｈ）を含有するＤＭＥＭ培地を添加し、この細胞を再び付着させた。４～６時間後、培地を無血清培地で置き換えて、数個の細胞のみがプラスチック製のフラスコに付着していることが顕微鏡で観察されるまで、数日間イン

キュベートした。選択に生き残った細胞を１０％　ＦＢＳを含有する培地中で、細胞培養プレートに移し、細胞をＤＮＡの抽出と凍結のために分けた。

【０１５７】

（遺伝子取り込みにより中断された遺伝子の同定）

レオウイルス感染に生き残ったクローンにおいて、ベクターで中断された遺伝子を同定するために、Ｕ３ＮｅｏＳＶ１のシャトルベクター特性を用いた。レオウイルスの溶解性感染に抵抗性のクローンにおいてＵ３ＮｅｏＳＶ１プロウイルス挿入物に隣接するゲノムＤＮＡの領域を、プラスミドレスキューによりサブクローニングして、配列決定した[1]。配列決定は、自動配列決定機（ＡＢＩ　３７００　ＤＮＡ　Ａｎａｌｙｚｅｒ，Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ）を用いて行い、得られた結果を、パブリックドメイン（ＢＬＡＳＴ　ｎｒ、ｅｓｔおよびｈｇｔｓ）で利用可能なデータベースと比較した。データベース中の配列に偶然適合する可能性は、種族間の保存とマッチの長さによって変化する。特徴付けられた遺伝子とのマッチは、可能性スコアが$p<10^{-5}$である場合に、有意であると見なし、非反復配列を含まなかった。示したように、同定された実質的に全ての遺伝子が、$p<10^{-10}$を有するマウス、ラットまたはヒトの遺伝子配列とマッチした。

【０１５８】

（ＩＧＦ２発現を、ノーザンブロットハイブリダイゼーションにより評価した）

Ｔｒｉｚｏｌｅ試薬（Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬ）を用いて全ＲＮＡを培養細胞から単離した。５ｍｇのＲＮＡを１．２％アガロースゲルで分離し、ニトロセルロース膜に移した。膜を、全長ＩＧＦ２　ｃＤＮＡおよびβ－アクチンｃＤＮＡに対応するランダムプライム標識した（Ｓｔｒａｔｅｇｅｎｅ）プローブとハイブリダイズさせた。

【０１５９】

（ＩＧＦ２　ｃＤＮＡの単離および発現）

逆転写酵素ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）を用いて、ラットＩＧＦ２　ｃＤＮＡを得た。Ｔｒｉｚｏｌｅ試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＤＭ）を用いてＲＩＥ細胞および６Ｂ７２細胞から全ＲＮＡを抽出した。１ｍｇの全ＲＮＡでＲＴを実施した（ＰＴＣ－１００　プログラム可能なＴｈｅｒｍａｌ　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｒ，ＭＪ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ．Ｉｎｃ，Ｗａｔｅｒｔｏｗｎ，ＭＡ）。ラットの配列に従って、１対のプライマーを設計した：ＣＴＴＣＣＡＧＧＴＡＣＣＡＡＴＧＧＧＧＡＴＣ（前向き）（配列番号４２９）およびＴＴＴＧＧＴＴＣＡＣＴＧＡＴＧＧＴＴＧＣＴＧ（逆向き）（配列番号４３０）。５００ｂｐ　のＤＮＡを、以下の条件下で増幅した：９５℃（１分）；９５℃（３０秒）、６０℃（３０秒）および６８℃（３分）の４０サイクル；６８℃１０分；４℃。

【０１６０】

（イムノブロッティング分析）

細胞をＰＢＳで洗浄し、ＳＤＳ　Ｌａｍｅｌｌｉ緩衝液に溶解した。タンパク質濃度を、ｂｉｃｉｎｃｈｏｎｉｎｃ酸タンパク質アッセイ（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を使用して決定した。２０ｍｇのタンパク質抽出物を１０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥの各レーンにロードし、１００Ｖで実行した。２２Ｖで一晩、４℃にて、タンパク質をニトロセルロース膜に移した。膜を、ＴＢＳＴ（５０ｍＭトリス（ｐＨ　７．５）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ　２０）で3回洗浄し、室温にて、1時間ブロッキング緩衝液（ＴＢＳＴおよび５％　無脂肪粉ミルク、ｐＨ　７．５）中でインキュベートした。次いで、膜を、４℃にて、一晩、ブロッキング緩衝液中で、抗マウス、ＣＴＣＦ（１：５００、ＢＤ　Ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｒｉｅｓ）およびｂ－アクチン（１：３０００、Ｓｉｇｍａ））とインキュベートした。3回洗浄した後、次いで、膜を、室温にて1時間、ヤギ抗マウス二次抗体（１：２０，０００，Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ，Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ）と共にインキュベートし、その後、１５分間×３回洗浄した。免疫複合体を化学発光試薬（Ｒｅｎａｉｓｓａｎｃｅ，ＤｕＰｏｎｔ　ＮＥＮ，Ｂｏｓｔ

ｏｎ，ＭＡ）を添加して可視化し、膜をＫｏｄａｋ　ＸＡＲ－５フィルム（Ｅａｓｔｍａｎ　Ｋｏｄａｋ　Ｃｏ．，Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，ＮＹ）に露光した。

【０１６１】

（トランスフェクション）

細胞を半分のコンフルーエンスまで培養し、野生型および改変体ＩＧＦ２タンパク質を発現するプラスミドを、ＳｕｐｅｒＦｅｃｔ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｑｉａｇｅｎ，Ｉｎｃ．Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）を用いて、製造業者のプロトコルに従って、ＲＩＥおよび６Ｂ７２細胞にトランスフェクトした。４８時間後に、トランスフェクトした細胞を、１：１０で、ハイグロマイシン（選択培地）含有培地中に所定の濃度で継代し、１００％のトランスフェクトされていない細胞を殺傷した（１５０ｍｇ／ｍｌ）。クローンが生じるまで、細胞を選択培地中で維持した。

【０１６２】

（軟寒天コロニー形成アッセイ）

二重層の海洋性プラークアガロースを、１．６％アガロース溶液　１：１および２×培地の５０：５０混合物からなる最下層で作製した。最下層を４時間置き、次いで、２×培地、１．６％ストックアガロース、および、最終濃度５０００細胞／ｍｌの細胞を含む１×培地からなる５０：２５：２５溶液をコニカルチューブ内でボルテックスし、２ｍｌを各ウェルに添加した。上部層を３０分間室温で置き、プレートを３７℃、５％　ＣＯ２インキュベーターにて７～１０日間インキュベートし、顕微鏡によりコロニーの形成を確認した。

【０１６３】

（細胞増殖アッセイ）

ＲＩＥ－１、６ｂ７２、またはＩＧＦ２をトランスフェクトしたＲＩＥ－１もしくは６ｂ７２細胞を、９６ウェルプレートに、５×１０４細胞で播種し、３７℃、５％ＣＯ２にてインキュベートした。播種後４、６、１８、４８時間後に、ＭＴＳ／ＰＭＳ　２０ｍｌ／ウェル（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ　９６　Ａｑｕｅｒｏｕｓ　Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏａｃｔｉｖｅｒ　Ｃｅｌｌ　Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ　Ａｓｓａｙ、Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）を２時間インキュベートし、次いで、吸光度を４９０ｎｍで測定した。各条件セットを、三連で繰り返した。

【０１６４】

（実施例ＩＩＩ）

（Ｔ．ｃｒｕｚｉ）

本発明の方法は、哺乳動物細胞のＴｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｃｒｕｚｉ感染の病因に関与する細胞遺伝子を同定した。Ｔ．ｃｒｕｚｉは、とりわけ筋肉細胞および上皮細胞を含む多くの細胞に感染する。挿入突然変異を利用して、Ｔ．ｃｒｕｚｉの感染サイクルに必要な遺伝子をコードするＤＮＡを含むＤＮＡの領域を規定する、位置的配列タグを単離した。Ｔ．ｃｒｕｚｉの複製において機能的な役割がある遺伝子の特徴付けのプロセス中に、Ｔ．ｃｒｕｚｉおよびレオウイルスの両方の複製にとって必須である１つのＰＳＴを見出した。

【０１６５】

シャーガス病は、中南米における何百万もの人々を冒している。Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｃｒｕｚｉ（シャーガス病を引き起こす原虫）は、それが哺乳動物細胞に侵入し得る前に、哺乳動物細胞に付着しなければならない。宿主が、昆虫ベクターによって運ばれる侵襲性のトリポマスティゴートによってか、または輸血の間に感染される場合、疾患が獲得される。輸血関連のシャーガス病の場合が、米国において報告されており、ここでは、疾患は一般的でない。米国では、１００，０００人を超える感染者が存在していると見積もられ、増加する数に直面することが示唆されている。トリポマスティゴートは、哺乳動物宿主細胞膜に付着して侵入し、無鞭毛体として細胞内で増殖する。次いで、これらの細胞から放出されるトリポマスティゴートに形質転換され、隣接する細胞に感染し、そして、体内で広がる。

【０１６６】
本発明の方法は、ジーントラップレトロウイルスを用いて、Ｔ．ｃｒｕｚｉ感染に抵抗性のラット腸上皮細胞（ＲＩＥ－１）の細胞変異クローンを選択するのに用いられた。この目的のために、ネオマイシンおよびアンピシリン耐性遺伝子マーカーを含むレトロウイルスベクター（Ｕ３ジーントラップ）でＲＩＥ－１細胞を無作為に変異誘発した。ジーントラップされたＲＩＥ－１細胞のライブラリーを、１細胞あたり２０寄生物の比で、高度に侵襲性のＴ．ｃｒｕｚｉトリポマスティゴート、クローン２０Ａに感染させた。野生型ＲＩＥ－１細胞のコントロール単層をまた、同じ密度のＴ．ｃｒｕｚｉに感染させた。Ｔ．ｃｒｕｚｉ感染の複数サイクルの後、細胞株を、そのＴ．ｃｒｕｚｉ感染に対して抵抗性である能力について選択し、次いで、Ｇ４１８（哺乳動物細胞に細胞毒性であるネオマイシンアナログ）に対して抵抗性であるその能力について選択した。これらの細胞株を、限界希釈によりクローン化し、さらなる研究のために、Ａ：１１：４：Ｃ５およびＣ：８：２：Ｂ４という名の２つのクローンを選択した。Ａ：１１：４：Ｃ５およびＣ：８：２：Ｂ４クローンが、非常に少ないトリパノソーマ（ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａｓ）を放出し、一方で、野生型のＲＩＥ細胞が、多くのトリパノソーマを放出することが見出された。Ａ：１１：４：Ｃ５およびＣ：８：２：Ｂ４クローンならびに、野生型ＲＩＥ－１細胞のＴ．ｃｒｕｚｉでの感染の動力学は、野生型ＲＩＥ－１細胞において見られる高いレベルの感染と比べて、劇的に低い数のこれらの細胞内の細胞内寄生物によって示唆されるように、変異体クローンＡ：１１：４：Ｃ５およびＣ：８：２：Ｂ４がＴ．ｃｒｕｚｉ感染を支持しないことを示唆する。Ａ：１１：４：Ｃ５およびＣ：８：２：Ｂ４クローンに見られる低いＴ．ｃｒｕｚｉ感染のこのパターンは、１～５日で観察されるラット腸上皮細胞におけるＴ．ｃｒｕｚｉの感染のサイクルの間に一定である。２つの細胞クローンのさらなる分析が、寄生物感染サイクルのブロックが、変異細胞への寄生物の結合後に生じることを示す。変異細胞への寄生物の結合が、親細胞への寄生物の結合に類似することが示された。しかし、各細胞株への寄生物の侵入は、減少した。別の変異細胞株について、侵入は、親細胞に類似したが、寄生物が、ファゴリソソームから放出される能力は、劇的に影響された。

【０１６７】
この仮説を検証するために、ジーントラップベクターの特徴を、各クローンからのレスキューされたプラスミドを誘導するために操作した。ＥｃｏＲＩレスキューおよびＢａｍＨＩレスキューにより得られた抵抗性（Ｒ）クローンは、１０ｋｂ以上のＤＮＡを表す2つのプラスミドを与えた。下流配列は、識別され、ＮＩＨのラットゲノム配列決定プロジェクトのために、ジーンバンクに寄託されたいくつかのラットＥＳＴ配列と有意な同一性を有した。

【０１６８】
第２のクローンは、野生型細胞株と比較して、細胞内のＴ．ｃｒｕｚｉ感染に対するその定量的抵抗性に基づいて、最も抵抗して（ＭＲ）示される。このクローンからレスキューされたゲノム配列は、プロテインホスファターゼｐｐ２ａ　Ｂ’調節性サブユニット遺伝子に対して有意な相同性を有する、ほぼ４．５ｋｂである。いくつかの異常のため、ＭＲ細胞株をサブクローニングし、そして、５０のクローンのプールから、ＭＲ－６Ｃ２を選択した。そして、再び、プラスミドレスキューを行うと、ｐｐ２ａ　Ｂ調節性サブユニットと同一性を有する配列を得た。逆転写に続くヒトのｐｐ２ａ　Ｂ調節性サブユニットホモログから設計されるプライマーを使用する、ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）によって、本発明者らは、ＲＩＥ野生型細胞株がｐｐ２ａ　Ｂ’調節性サブユニットを発現する一方で、ＭＲ－６Ｃ２クローンが平行した実験の産物を増幅しないことを示し得た。これらのデータは、この遺伝子が選択されたクローンにおいてもはや発現されないことを示す。

【０１６９】
いくつかの他のクローンが、分離された。これらのうちの１つ（８Ｂ　１）は、細胞表面への寄生物の減弱する結合の表現型を有する。プラスミドレスキューによって、一連の

ゲノムＤＮＡは分離され、そして、このゲノムＤＮＡは、ラットレクチン様酸化ＬＤＬレセプター遺伝子（ＬＯＸ－１）に１００％の相同性を有する。Ｌａｃ（５’の遠位）およびＮｅｏ（ベクターに隣接した５’）プライマーによって配列決定される場合、１．６ｋｂのゲノムフラグメントは１００％の同一性を与える。挿入は、報告された配列$_{19}$の塩基＃６１２０に存在する。本発明者らのゲノムフラグメントは、５’をプロモーター位置（＃４７７４）のＴＡＴＡボックスの直前に、ＥｃｏＲｌ部位まで広げる。この位置的配列タグ（ＰＳＴ）は、この制限部位の位置の公開された報告と一致している。クローンの分析は、挿入が第一エキソンの後のイントロンの配列に起こったことを示し、そして、レスキューされた配列は、第一エキソンによって寄与されるコード配列を含むようである。第一エキソンは、エキソン１およびプロモーター領域についてのラットゲノムＤＮＡのｎｔｓ４８００－４９３７で見出される。ベクターはｎｔ　６１２２に存在し、そして、レポーター遺伝子はＬＯＸ－１遺伝子と同じ鎖から転写されると予測される。ＬＯＸ－１遺伝子は、３．７５ｋｂであり、下流エキソンの組織化は、データベースに報告されていない。

【０１７０】

【数５－１】

MR-b4.., 以下のestと同一： EST230513 標準化ラット肺
(配列番号 419)

GTTAGGCCCTCTGAGTCCNTNACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCACACC
CTTTACCTACCCACCCTGCATCCCAACATGTCATGTGGAAAAGTCCTCAT
TTTTTATATTGAGAAGGGTTTTTTGTTTGTTTGATTAATTTTTGATTTTT
CAGTGAANTCATTTTCTTTGTGTCAATACCTTTTTCTCTACACTTACCAG
GCTGTTGTAAGAAATAAACTGAGAAACATTTGATCTCTCCTCTTCCTCCA
CCAAGTGCTGACCCTCAGGCTGCACCACCAATAAATAGGGACCTGAAGAA
AGGAATGGGAGTTGTGTTTATTTAAAAAAAGATTAGACAGAAGGAATACG
TTTGGTGGATGTGTATTCAGG TTTGGTGGATGTGTATTCAGG

P4c5e/NeoC
(配列番号 420)
CGATCCTCAGCTAGCTTG
CCAACCTACAGGTGGGGTCTTTCACCCTGTACCTGTTAAGCTCATCTCACC
TCCCTGCCATTTTCTGGATGAATTCTTTGTCAAACCAATCTCAAGCCGTTG
GCAAAAATACTCTACAGCACTTCAAAGTGAAGTGCAATCATTTTTCTTTTC
TACCCCAGGAACACAAAGATTTTCCAGCACAATGTAGAACTGACGAGAAA
TGGAGCAGGGGAACATCCAGCACACGAGCAGCTCTGAGGTGTGGGTGTGT
TAGCTCAAACTNCACTTNCCATAAAGTAGAGGTGAGGAGGACAGGGTAAC
TTANAGGAGGCAGAAAGAAAACAACAGNATNATAGTTGACCCTGGGAAG
GGGCTCTACGTGTTGTGGGTGCTNCCAAACCCAGNTGGNCAATNAATGCA
CTNCTACTNCATGGTGGCTTGAGGAAAGGGCTGGAGTNACTAAAGNCGGG
NTGAGGAGGGTGGATNATNGNGNCTGCAGATNGGNCCTGNTTGNAGGTN
GNNCTGNTGNGGNNTGTGGGGNAGACAGGATNGGGTGTGGGGGGGGNTN
GNTGGGNTGGNANTGNCTGTGGNGNCCAGGNTGGGNTGGGNCTGGCNNG
ATGNTGNTGGCTGTGGNNTGNTGGGGGCTNGGNTTGAANGTGTGGCNCNG
GGNGGCNTNGGNTGNGGGNANGGGGNANGGGNTGNGTGGGGGGGGAGT
GGTGGGGGGGTGGGTGNNGGTGGGGGGGNCCCTTGGGGGGGNTNGGGGGTNG
GNTNACGTGGCNNGNGTNGGGGAACTGNGNNGACGACGC
>
gi|18846965|gb|AC109110.2| Rattus norvegicus clone CH230-28... 688 0.0

P4C5c/LacO >
(配列番号 421)>
TTTNCACAGAATNCAAGCCAGAGGCTCAAAAGTAAACCTACACATCCTGT
TCACAAAAGCACTGGGCACAATTGCTAGAGGCTAGAAGAAGCCCAAGTAT
CCACTTAACAGGTAAATGCCACACGCCTGCAGTGCCTTTGCTATTCACCTG
TCAGAGGGAAGGGAAGCCCGTTCATGCTGCAGCATGGGTGTTCTGCACAG
TGAAGAATGAACTATGGTGGCTGTGCTTTCCAGTTCCGATGAGTGGGCATT
TAGGAGGCAAAGAGAGAGAGAGCACACAGCAGACTGAAGCAACCTGTAG

【０１７１】

【数５－２】

ACAGCAAAAGCTCATCCAGTCAGGGCTCACAATAGCCAACAATAGAGAC
GACTACCGCAGCCTGATTGAAAGAGGGAGCAAAAGGCATCAAGTTGGTG
CTCACAACATCCCCCATGAGTCTGCTGTCGGANCAGTAGTCCTGCTGGAGT
TCTGAGTGGAGGGTCCTGGGCAGAGCANANCAGTCTCCATGGATGAGCTT
CATAGTCTGTTGCCAATGGTTACCTTCTAGCTGTTGTCAANAGCTTGTTTTT
ACTGNCAAGATGTGTTGCTGTTGTCAATNCCCANACAANGGCCCTTANAG
GACAATATGAGATAGGCATGGGTGGGCCTGAAATGGGGGGAAGGAGAGG
GGTNAATTGCANNTTGGCAAGGAGGGCANACANCACTTGNTGGCTGCTAC
ACTNTATNGGGGAGGGGACCAAAGGNGCCATGANGAATGGTNNTGATGG
NANTTGCTTGAGGGGGCGTNGNAAAATANAAATNGGNAAAANGATTGTT
TNGCNTTTTTTTTAANNNGANGGGTATGAATNNNNNTANACCTNGNGGNG
GGAAANANCN

> gi|18846965|gb|AC109110.2| Rattus norvegicus clone CH230-28... 605 e-170

P4C5c/NeoC..
(配列番号 422)
CGATTTCTNAGCTACCTTGCCAACCTACANGTGGGGTCTTTCACCCTGTGC
CTGTTNAGCTCATCTGACACTGGCCTGCCATTNTNTGGATGAATTCTTNGT
NGAACCAATCTTAAGNCGGNGGATNAAATACTGNTACAGNAGCTNANNA
GTGAAAGCG
上記の配列一最初の46はベクターである。

注記:この次の遺伝子は、P8A3のLAC(5'がベクター配列に接続されない)である
これは、ラットトリプターゼ2遺伝子内である >
>
P8A3a/LacO.., gb|AF011446|AF011446 Mus musculus グランザイムK遺伝子
完全 cds
Length = 5747,2e_99, and gb|L19694|RATRNKTT2A Rattus
norvegicus トリプターゼ2mRNA、完全 cds. Length = 884,
両方ともネガティブ鎖。
>
(配列番号 423)
TTCACAGAAACCTAGGGTGAAGGGTAAGGCTGGGGAAGTAAGGAATCTG
CAAATCCATCGTGAGTGCATACACGCAGAGTGTCCTCTGCAACATATCTGT
GCTTACTAAATGTGTCAGTTATTCTGAAATACCTTAAAAAATAAAAACAC
CAAGTCTCAAAACCGCACCAAGAAAGAGACAGTAACTTTCCCTTGCACCC
AGGCTTCCTTTCAGCAATTGCAGTTGCTTGTGGTCAACTGCTGTTGAAAGA
TTACATGAAATATTCCAGAGACAAATGATACATGCATTGAAAATTACATA
TTAGAGTAGATTGATTGAATTGTGCTTTGATNGCCATTGTTAATCTTACTG
TACTCAGGNNCTTGACTAGACTTTATGTTATGCGTGTCATTTATCCTGGAC
ATGGACCACCACATACATGGAAAAGCACAGGGGACTGACCGAGAGTAGC
ANTGGGCCGGCTGNTANCACCCACTGCGGATGGATNANGACTGNCTGCCA
AATATNCTGGGCGGGGTGCTGGATGGAAGCCATAGAAGGCGTGNAATGN
GGNTNNNCT
>

gi|3169700|gb|AF011446.1|AF011446 Mus musculus 株 129/SvJ 216 2e-53
gi|8393512|ref|NM_017119.1| Rattus norvegicus グランザイムK (G... 66 4e-08
>

【０１７２】

【数５－３】

P8A3C/e.., 逆向き相補体 , 862ベース, 2600 チェックサム。
(配列番号 424)
CCCCCCCCNCANNCCCCACACACCTCCCCCGCCNCCTTCACCCCANCNCA
GCCCNAGCCCCCNCNCCCACATTTCCACANCCCACCGNGCNTCTTTCCCA
GNNCGNATNTNTCCAANCAGNTCCCNCCACATCCNCCANCCCCCAGTNCA
CGGGGCCNCCCCATCCTNNCNGNCCCACAGGCCANCTTTNCCCCTGTCCC
CATTCCCCACCCTNCCTNTCATGNCCCCTNAGTANCNNTCANCAGCCACN
CTNCCCCTTNATCCCANCNCTGTGCACACCTTTTATTCCTGTGNCCCNCN
CCCAATGTCTCCCACCTTTCTGTTCCATTTTTCCCNCATAGTTCCCAANN
CNATTCTGGGNAAAAGCAGCCATCAAGGCCCACTTTATAGTCCANAATNC
TGGNCCTGCCTTNNAATGTCCTCCTATATTNAGTNACCGCACCGCCTTTA
AATCNACCATCATGCAAAGTGGCAGNATGCANACAAATTGTANAAAAGCT
CTTCGCCTGAGCAGCACTGTGGATCTCCTAGTNAAGTTGGAGTGTGTACA
CTACACCCCAATATCTTAGAAAATTCCCAAGAGAANACTTCATCTTTTCC
TCTATAAATTTGCAAGAGAATAAAAGGATGGTAAGACAATTATGCCAAAT
TAGACCTTTAATCAAGAGATTACAAATTATAATGTCTACTACCCTTCCTG
AATCTATGAAGAAAATTAAAAATACACTATAATAATATTCATAGTTGTTT
ATTTAGAGCATTTGCTTCTCAACTTTAAATATTAGTCTTTTATTTCTTTA
CGCCCATAATATCAGGAACCAGTGAAAGACCCCACCTGTAGGTTGGCAAG
CTAGCTGAGNAT
>

P8A3a/E.., 逆向き相補体 , 640ベース, 55Fチェックサム。
(配列番号 425)
GGGNNTNANGGAGNCNCGNGGCGCNCGGGCNTNGCCCGNTANCGNGGNG
NGCGGGGNGNGGAANNTNAGGNCNGNNAACAGAGGCGGNGNNGCGGCG
CTGGGNNNNGGNCCGGNNGGCCCGGNGGGTANAAGNNGAAGTGNTNAGN
GGTGGGGAGGNANNNGACGNTGGGNNCGANNNNCGCNGGGGANGTGAA
GCCNGCCNGTGCNGGGNAGNGGGCGGNNNTGGGGGNGNGGGCCANNNN
CNGNATGAGGNGATGNTGNGGNTGGGCGNAGGNNAGGCGGGCGNGTGGC
GNGNNGCGGTGGGGNGNGNNGGAANNGANNTGGCGNGCNNCCGAGGGN
GNGATNCNNCGCNCNGNGGAGGGNCNGGNGATGNGTCNNAGANGGTCGG
NGGNNGGCNGGNCAGNNCGTGCNGTNANGNCNTNGNGATCANNGAGGGT
GNCCNNNGGNANGAGTCTAGGGGCGGCCCTNTCGTNNATNCNANGNGGG
CCGATTCNCGCATNCGCNNATAATCATATTCCATAGTTGNTTATNTAGAGC
ATNNGCTTGTCACCTTTNAATATTAGTCTTTNATTTCTTNACGCCCATAAN
ATCAGGNACCAGTCGNAGACCCCACNTGTAGGTTTGGCAAGGGTNGCGAG
NA

P8B1-E.., dbj|AB018097|AB018097S1 レクチン様酸化低密度リポタンパク質レセプター、
に対する Rattus norvegicus 遺伝子,エキソン1., rev, 827ベース, 1EA
チェックサム
(配列番号 426)
TANAAAGANGNCANAAANGCNNCNTTCAGAGNCCCAAANNTATTTTGTGT
GTNNTNAAGNCTGCAAAAATGGGNAGTGTTTTGTNAGTATNTAAGCAGAT
TNGGTATATTCAGNCGGCCAAANANACATTAGACTCTTTGTCCATTGTTG
GCTTTAAAAATTGTAGCTTGTACTTCNCTATCCAGTAAACTTAATTACTT
ANGCTGAATAGATAACTCGATTCTGTAGAAAACTACAGGTAAAACATCTA
TTATTTTATAAAATCGAGAGAAAAAGGCCAGGTAGGTGCACACCTTTAAG

【０１７３】

【数５－４】

CCCAGCACTTGGGAGGCAGAGGCAGGTCACCTGCTCTACAGGGTGAGCTT
TAGGTCATCCAGGAATACACAGAGCAACCCTGACTCAGAANCAAACCCAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGGAACAAATTGTAAGAAGAGGAAGAAAGGCAT
AGTGTGTCTGTAAATAAGCCTGAAATCTCTCAGTGGGTAAGATAAGGCCG
AGTGTGGTGTGATTTAATGTCTGAGTGACTGAACTAGCTCAGAGTCAGGA
CAGTGCTGGAGCTTGGTAGTAGACCCAGCAGCAGTGGAGCTAGCTTAGTG
TGAGAAAGTGCTGGTGTTTAGTAGTAGATGTAGGAGCTAGTACCACGTGT
GAATTTGCTCAACCACTCATTCATTATTTGTGCAGTAAATATTGTTTTCTAA
CCTGACTTTTACCATAAATACAACTAGTTCTTCTTTAGGAGCCCTGGTTAG
ACTATTTACTGTGGTATAAGCTATATACTGAAGTTAGTGTGAAAGACCCCA
CCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTAG
>

gi|4008162|dbj|AB018097.1|AB018097S1 Rattus norvegicus遺伝子 ...743 0.0
>
ベクター配列およびLOX－１ゲノムフラグメントと相同な配列。
dbj|AB018097|AB018097S1 レクチン様酸化低密度リポタンパク質レセプターに対する
Rattus norvegicus遺伝子,エキソン 1
長さ= 8960
602601
ヌクレオチド、関連エントリー、タンパク質、PubMed、リンクアウト

LOW DENSITY LIPOPROTEIN, OXIDIZED, RECEPTOR 1; OLR1
>
LECTIN-LIKE OXIDIZED-LDL RECEPTOR 1; LOX1
OXIDIZED LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR 1
遺伝子マップの遺伝子座 12p13-p12

【０１７４】

酸化的に改変された低密度リポタンパク質（Ｏｘ－ＬＤＬ）によって引き出される内皮細胞の機能不全または活性化は、アテローム性動脈硬化症の病因に関係した。血管内皮細胞は、マクロファージスカベンジャーレセプターを含まない推定のレセプター媒介性経路によってＯｘ－ＬＤＬを内在化して、分解する（ＭＳＲ１；１５３６２２を参照）。Ｏｘ－ＬＤＬレセプターをコードする遺伝子を識別するために、Ｓａｗａｍｕｒａら（１９９７）は、ウシ大動脈の内皮細胞から誘導されたｃＤＮＡ発現ライブラリーを用いて哺乳動物細胞をトランスフェクトし、そして、標識したＯｘ－ＬＤＬの取り込みについてアッセイした。それらはＯｘ－ＬＤＬレセプターをコードするｃＤＮＡを回復し、そして、このレセプターを、レクチン様Ｏｘ－ＬＤＬレセプター－１（ＬＯＸ１）と称した。免疫蛍光研究は、ウシＬＯＸ１が、細胞表面で発現されることを示した。Ｓａｗａｍｕｒａら、（１９９７）はウシＬＯＸ１　ｃＤＮＡを用いてヒトの肺ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることによってＬＯＸ１のヒトのホモログをコードするｃＤＮＡをクローニングした。ヒトＬＯＸ１を安定して発現する細胞は、標識されたＯｘ－ＬＤＬの取り込みを示した。予測された２７３－アミノ酸ヒトＬＯＸ１タンパク質は、ウシＬＯＸ１と７２％同一である。その構造は、Ｃ型レクチン（例えばＣＤ９４（ＫＬＲＤ１）およびＮＫＲ－Ｐ１（ＫＬＲＢ１））の構造と類似している。ノーザンブロット分析は、ヒトＬＯＸ１が種々の組織の２．８ｋｂのｍＲＮＡとして発現され、胎盤において最も豊富な発現があったことを明らかにした。

【０１７５】

Ｙａｍａｎａｋａら（１９９８）は、ＬＯＸ１が脈管の豊富な器官において発現されるが、リンパ球では発現されないことを決定した。Ｙａｍａｎａｋａら（１９９８）は、ＬＯＸ１遺伝子がほぼ１５ｋｂにわたり、６のエキソンから成ることを見出した。蛍光イン

サイチュハイブリダイゼーションによって、ＬＯＸ１遺伝子を１２ｐ１２－ｐ１３にマッピングした。ここで、ナチュラルキラー細胞レセプターの遺伝子がクラスターを形成している。

【０１７６】

（Ｅｒｌｉｃｈｉａ）

本発明の選択方法を、市販されている高感受性の細胞株、ＤＨ８２細胞（ＡＴＣＣから入手した）と共に用いた。細胞を本発明のベクターに感染させ、そして、変異細胞のライブラリーを作製した。変異細胞ライブラリーを、感染した個体由来の研究室のサンプルから得たＥｒｈｌｉｃｈｉａ　ｃｈａｆｆｅｅｎｓｉｓ、Ａｒｋａｎｓａｓ株で選択した。生存細胞を、感染試薬に再び暴露し、１：１００でナイーブ細胞に感染させた［ナイーブ細胞の感染は、細胞－細胞の接触感染のために、感染した細胞の存在を必要とする］。単一細胞のクローンは、約１～３０００の固有の挿入のライブラリー由来であった。このクローンは、中断されたｆａｓｔＫ遺伝子を有する。

【０１７７】

親の細胞は、Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ　ｃｈａｆｆｅｅｎｓｉｓの感染の課程の間、アポトーシスに感受性であるが、変異細胞は感受性でない。しかし、化学的に誘導したアポトーシスが、変異細胞クローン（抗脈管新生薬物に感受性である）において保存される。マクロファージ特異的なプロモーターおよびエンハンサーならびにヒトｆａｓｔＫ遺伝子を用いて、発現カセットを作製した。Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ感受性の表現型は、その適切な方向（正方向）にトランスジーンを発現する細胞において意図され得ることが見出された。負の方向で発現されたトランスジーンは、レシピエントとして用いられる変異細胞クローンを有する表現型を有さなかった。

【０１７８】

【数６－１】

(　配列番号　427)

イヌ由来の11-d11-erlichia 配列　　, Rubin.Seq LENGTH: 1101 CHECK: 332 .., 逆向き相補体、　　, 919ベース, 2339 チェックサム。

ACCGGAACCCCGTTTTTTNTTGNNNGGGNTTTAACCCNNATTTGGNGNCC

【０１７９】

【数６－２】

GGCCCCGGTNCNGGGNTTNNTGGAAAATGNCNNNCTCGNTGGCCTTCCNA
TTAANANGCCNNGGGGAAGCCCGTCTCCCGGNCCCCANNNCNATTAGGA
ACCACCNTCGCNGGNCTTGGNACCCATTTAGGGGTGGCCCTTCCGGNCGG
CTTCGGAAGGNCGNCGGTAGTTGTTGTTGCCNACCGTTAAGACGGTCTCC
GGGCGTCNCCNGGCTTCCCCGGNCCGGTTGGTTTGGGCCCCTAACACCGC
CGACTCCGGCCATTNCAAAGCCGCGCGCTCGGGCTTCCACGGGGCCCCCN
TGCNANCTGGGCGTTGCGTTCTCGTTTCACGGGCGAGNAGGCTTGGCAAA
AAGACGAAGCCACTTTGTCCAAGGTCATGCAGTTGGTAAGTGGAAGCGCC
CCAAGCATTGNAACCCCAGGTCCCGGCCCCGCTTCCCGAAGCCCCGGCGT
TTCCCACCCCTTCCTTTGCCCGCTGCCCGCCTTCCTTGCGGGNAGGGGAGN
TTGNTCAAAAAGGGGCGTGTCGACAGGCAAGTTGGGNTCCAGGTTGGGCC
CGACCCACTAACCCGACTCGTTGCCCTGGGGCTTTACCCCCCCCCCNTTTCC
TTTTTGGNCTTTGGTTTCTCCNCNTGTGAAATGNAGGTAGTGCCAGCCCTG
CCTNCCTCAGAGGCGCGTGCGGAGCATCAGAGATCCATAGTGCATGTGNA
ATTGCTCTGTAAATATCCCTGTGCGAAGNACATGGAAGGTGCTGCTTTAA
AGGATGGAAGGAGNCAGAGAGGGGCGGGGTGGGGAAGACTAGAGCAAT
CACAGAGGAAGGACGAACATGAGTGGGTGTTCTTGAAAGACCCCACNAT
NGGTTTTCNAAGCAANGGG

(配列番号 428)

12-d11-Laco.Seq LENGTH: 1159 Mon, Jan 31, 2000 2:51 PM CHECK: 6877 .., 992 ベース, 15A5 チェックサム。

ATTACNCTTTNNACAAGGCCNGGACGAGACTCAGTGGATTCTGGGAATCA
TGGCCTTTGTGTCACAGAAGATGCCCTGNCAGGCGCCTTCAGGGGGTGTT
NNGGGGATGGGGGGCACNGCGGTCACAGGGTCACTGTTAAGGAAGTTGG
AGCTGGATGGGAATCCAGCTGATTCTGNCCCTCCCTGCTCTGGGAAAGTG
CTCTGCCGCAAATGTCTTCCTTGCCTCACTCCCTATGTGCCTATNNCACCA
AGGNTGTNACCAAAAGGAGCTNGGGGTATTTTAGAGCTGATGGGGAACTT
CTACTTTCTTGNAAGGGCAAAGAATANTCGNTCGNTGTGCCCCACCTGCTT
NAGATCTAGGAGGAAAATCTGGGNANCTCCNGNNTTTGGGGCCCTNNGCT
CACACAAATGCCAACTTCTGGTCCCCACCCNACGGGTGATTTAGGCCANT
TACTTAGATCCACGTTAATGAAGTTTTTCTGTTGCCTAAATTAGTTCACAG
GGAACTNAGCCTTGGGAAGAAAAANAANCTAAGAGGATTTGNTGAAAGG
ACACAAGGAAGTTATGTNNGGNATGTTTCAAGANCAAGGGCANGNACTTT
AGGGTTCAAANNGGGGGTTTTTTACTCCCATCCCAAAAATACTGGAATGG
NTTCTTTNCCCAGGTTGNAGGGGACCCTCCCAAAAGCATAAAAAGGGGGG
GTGTTTTAGNGTTGAAAAAAGGCCCCCAAAAGCNCTNACANCCAATAATG
GGGGAATNTGGACCCCTTAAATTGTNAANGGCCCCAANAAAATGGGGNC
NGGGCCCTTNNNCCCAAAATTCAATGNTNNTTNNCCCCNNNNNNAAAAAA
ANTTNAANGNNCCCCTTTTAAANAAATNTNTTNNNGGNCTNNNNANANGT

【０１８０】

（ウイルス感染のために必要な遺伝子のさらなる特性）

表１は、本発明の方法を利用して、得られた全ての配列のリストを提供する。この表は、左から右に、研究室表示を提供する。そして、遺伝子が３の公的に利用できるデータベース（ＢＬＡＳＴ　ｎｒ、ｅｓｔおよびｈｇｔｓ）で見つかる研究室表示配列、ヒトの染色体場所（利用できるならば）およびいかなるマッチも含む。データベースマッチは、染色体場所指定後の３本の列にすぐ現れる。表２は、研究室表示ｓおよび付加的情報を本発明の方法を利用して分離される多数のクローンに提供する。さらに、識別された遺伝子の説明は、以下の表２に提供される。

【０１８１】

【表１－１】

表1

06_RA2#E_rE.txt	gi|17456622|	8q11.1	0.23	0.20	0.0 AC090206.3 h
10_2A_3_12-rE.txt	gata4	8p23.1-p22	0.58	なし	9e-28 AC099091.2 r
10_3A_2_Lac.txt	PPM1A	14q23.1	0.057	2e-4 AA089084	9e-91 AC107409.2|
10_3b(5-2-96)_rE.txt	na		H	なし	H
10_3bE_rE.txt	hp1-bp74[EIF4G3]	1p36.12	5e-05 AL138784	7e-07 AW533300	6e-05 AL606477
10_3b_2_rE.txt	KLHL6	3q27.3	H	8e-10 AW915888	H
10_4A_8_rE.txt	gas5	1q23.3	1e-07 BC004622	8e-08 BI303289	0.41
10_4b_4_rE.txt	KLHL6	3q27.3	h	2e-69 AW915888	0.018 AC069211.12|
11X#17_Lac.txt	na	na	6e-05 サテライト-S64630	0.17	7e-08 AC107099.2|
12C#A_rE.txt	LOC159772	11p15.3	0.51	4e-04 BF849606	2e-04 AC064304
12CX#11E_rE.txt	LOC168349-[LOC168348-]	7q33	7e-30 AC024913.32|	1.31	H
12CX#6_rE.txt	zfp-36	na	2e-11 AK018350	3e-36 BF548520	e-178
12CXY#7_Lac.txt	prss11	10q25.3-q26.2	2e-17 サテライト	5e-11 repetitive 0.0	AC110392.2/AC087063.17
12CXY#7_rE.txt	prss11	10q25.3-q26.2	H	なし	7e-13 AC087063.16|
12C_2B#9B-B4.txt	na	na	H	なし	H
12C_2B#9E_rE.txt	LOC160196	11q24.1	2e-20	1e-20 BI105708	2e-20 AC016859
12PSA#6_rE.txt	EIF3S10	10q26	9e-47 MMU14172	8e-53 AI597159	1e-30 AC026587
12_3B#10-rE.txt	LOC164360	20p11.22	H	0.18	0.0 AC114195.1|
12_3B#10_Lac.txt	na	h	1e-20 H32702	0.0 AC114195.1|	
12_3B#2_Lac.txt	jiwa [UBE1C+]	3p14	0.23	0.18	e-123 AC109665.2|
12_3B#2_rE.txt	GTRAP3-18- arl6 (jiwa)	3p14	5e-58 AF240182	2e-53 BF543062	e-111 AC102724.1|
12_3B#7_Lac.txt	DKFZP727C091	17q21.31	8e-68 S82611	2e-40 BE122674	1e-85 AC095637.3|
12_3B#8_rE.txt	Aptx	9p13.3 .14	3e-8 AA871174	H	
12_4b#11_rE.txt	na	na	0.13	na	0.15
12_4B#7-rE.txt	LOC13854	9q31.3	5e-73 AL389915 hu	なし	e-102 AC073037 hu
12_4b(#11)-Lac.txt	DKFZP727C091	17q21.31	8e-68	2e-40	1e-85 AC095637.3|
12_4b_9_lac.txt	YWHAE および loc14697	17q21.32	0.20	0.75	7e-14 AC102099.1|
12_4b_9_re.txt			0.037	.031	.042
12_6B#6_Lac.txt	LOC148582	1p31.2	0.066	0.053	4e-13 AL669966.4|
12_6B#6_rE.txt	LOC148582	1p31.2	0.073	0.059	0.002 AL669966.5|
12_L24_5_3-Lac.txt	HCK および KIAA0255	+20q11-q12	e-128 AC078911	0.20	0.001
14A13E_rE.txt	gata4	8p23.1	0.034	1.31	2e-47 AC099091.2|
14A14E_rE.txt			H	なし	H
14A7re	smad7	18q21.1	3e-30 NM_030858.1|	2e-37 AI556846	8e-25 AC024384.4 h
14C_2E_rE.txt	srp19	5q21-q22	6e-19 AC091750	2e-12 BA395473	2E-78 AC099430.2
14G3E_rE.txt			H	なし	H
14H1E_rE.txt			H	1.31	H
14H4Erepeatmasker_rE.txt	反復		1e-04	0.031	5e-08
14H4E_rE.txt	反復		1e-09	3e-09	3e-16
14XD#12E_rE.txt	CLR-B		4e-49 AF320597	0.17	5e-06 AC117852.1
14XD#12E_T7.txt			1e-83 AF320597	8e-16	1e-24
14XD#18B_B4.txt			H	1.31	H
14_24_#6_Lac.txt	LOC94765 [fer1l3-]	10q23.32	4e-06	1e-05	e-167 AC105467.3
14_7#2E_rE.txt	mgat1	5q35	2e-69 abo12876	na	0.0 BF392858
17_3_3B_B4.txt			H	0.70	H

【０１８２】

【表１－２】

17_3_3E-rE.txt			H	なし	H			
17_3_3Ea-E.txt			H	なし	1.31			
17_3_3E_rE.txt			H	なし	H			
17_3_3He_1-T7.	LOC162407+/LOC162406	fksg4-17q23.3	4e-06 ACO05667	なし	2E-70 AL596111.7			
17_3_3He_1_T3_rev.txt			0.23	1.31	0.29			
17_3_3He_2-T7.txt			H	なし	H			
18A_8_1E_rE.txt	loc158333	9p23	0.056	0.011	0.0 AC108575.2|			
18A_8_3E_rE.txt			0.13	4e-63 BF409287	4e-42 AL645668			
18A_8_4E_rE.txt			H	0.0 bf409287	1e-89 AL645668			
18_5#13E_rE.txt			H	na	1.31			
191E2E_rE.txt	CALD1	7q33	6e-05	0.049	3e-35 AC102668.1|			
191E8E_rE.txt			0.059	なし	0.29			
191E9B_B4.txt			0.004	na	0.003			
191E9B_RB2_134.txt	MGC2663	19p13.2	1e-06	5e-05 BF561648	2e-11 AC073773			
191E9E_rE.txt			0.004	0.003	0.005			
191E9E_rN80.	CLクチン反復タンパク質 B		4e-43 AF320598S1	na	0.18			
19D3E_rE.txt			0.052	0.042	4e-37 AC113047.1|			
19D5E_rE.txt	6PTHS		1e-89 MM6PTPS1	1e-36 BF542916	0.0 AC094189.2|			
19_7AE_rE.txt	DKFZP566D193	3q21-q22	H	0.49	5e-60 AC106523.1|			
19_9BE_rE.txt	CTF2		Xq21.33	H	1.31 1e-74			
AL671915.4|								
1A_A549_6_rE.txt	RFP2	13q14	0.0 AF279660	0.0 BI668033	0.21			
1a_b4.txt			H	なし	0.17			
1a_rE.txt			5e-04 反復	0.090	6e-04			
1bw_lac.txt	loc168348	7q33	1e-30 AC024913.32|	なし	0.32			
20_L28AP-Lac.txt	LOC148904	1p36.11	0.41	0.33	1e-84 AL672076.2|			
21_5_7E(2)_Lac.txt	id3 1p36.	13-p36.12	2e-20 反復 K00498.1|RATRSSIE	2e-16 反復 |BE122674	2e-23 AC112345.1|			
21_5_7E_Lac.txt			1e-24 K00498.1|RATRSSIB	2e-20 BE122674	2e-27 AC095096.2|			
21_5_8E(2)_rE.txt			2e-08 AL021154.1|HS150O5	1.31	e-107 AC060772			
21_5_8E_Lac.txt			4e-06 AL021154.1|HS150O5	2e-04 AW917110	4e-55 AC060772			
21_5_9E_Lac.txt			0.003	AC108468.3|	0.009 AI025166			
	0.004 AC113355.1|							
24_3_5#1_Lac.txt			6e-11 AC068627.16|	1e-11 BI302094	e-102 AC098054.2|			
24_3_5#1_rE.txt	LOC162464	17q21.32	0.21	0.67	5e-46 AC069060.3|			
24_9_3#2-re.txt	CLクチンタンパク質C	8e-72	AF320596	0.003	na			
24_9_3#2_Lac.txt	7e-17 サテライト		S64631	5e-08	e-135 AC108952.2|			
24_A#1_rE.txt	TAC3	12q13-q21	e-137 AC068609	2e-102 BG668235	e-150 AC107006.2|			
29A_5_1_Lac.txt	s100a5		5e-15 AF088189	9e-13 AA555734	e-128 AC027648.10|			
2AE_lac.txt			5e-38 サテライト V01570.1|RNSAT1	9e-24	3e-40			
2a_b4.txt			H	なし	H			
2B2_T3.txt			H	H				
2B2_T7.txt			なし	4e-33	1e-68			
2b_b4.txt			e-163 ベクター	6e-40 BF398164	5e-69 AC116251.3|			
2b_lac.txt	loc150800	2q31.1	9e-58 反復 AC079437.2|	.028	3e-09 AC104088.5|			
2b_rE.txt			0.034	なし	0.66			
3'est off l14d#18lac.txt			H	0.0 BF411674	3e-08 AL683884.4|			
31_3_15#1_Lac.txt	fkbp8	19p12	7e-06 反復 AL683884.4|	7e-4 AW935927	5e-86 AC088650			
31_3_15#1_rE.txt	fkbp8	19p12	0.001	5e-36 AI715684	2e-36 AC096171.2|			
31_3_17_Lac.txt			3e-34 反復 AC090529.2|	5e-05	1e-24			
			4e-06					

【０１８３】

【表１－３】

31_3_17_rE.txt				4e-06		5e-05	2e-24	
31_3_19#2_Lac.txt				0.004		0.70	e-161	
31_3_19#2_rE.txtc lectin-related protein C				8e-72		6e-76		
31_3_4_rE.txt				0.016		0.013	8e-05	
31_3_5_rE.txt	znf207	17q11.2		9e-07		1e-54	0	
31_3_6_2_Lac.txt	FKBP8			1e-30 CNS00002		0.64	2e-82 AC107272.2|	
31_3_6_2_rE.txt				3e-34 AC090529.2|		6e-35 AI715684	1e-40 AC108331.2|
31_3_9_rE.txt		3q12.3	mail	1e-92 030612.1|		e-113 AA798638	0.0 AC111450.1|	
31_4_2_Lac.txt				H		なし	H	
31_4_2_Laca.txt		22 q12.2		H		6e-4 BF389250	1e-89 AC095192.2|	
31_4_2_LacO.txt				H		なし	H	
31_4_2_rE.txt				0.27		なし	0.33	
31_4_4#1_Lac.txt				4e-33 AK018434		0.0 AI482382	0.0 AL135899	
31_4_4#1_rE.txt		10q25.3-q26.2	prss11	6e-14 AL583887		3e-12 BB192448	3e-50 AC087063.17|	
31_4_5#1_LacO.txt		22 q12.1		0.054		0.17	0.0 AC095192.2|	
31_4_5#1_rE.txt				0.21		0.67	0.27	
32_3_2#1E-Lac.txt				H		0.73	0.0 AC105839.1|	
32_3_2#1E_rE.txt				H		8e-18 AI021238	0.30	
34X28_1-rE.txt		CAM2		0.004 AC006027.2|		.003 |BF509588	5.8
34X23_3-rE.txt		card4		7p15-p14		1e-91 AJ312410.1|RNO312410	なし	2e-91 AC094362.2|
34X24_126-rE.txt		Abcb1b		7q21.1		2e-20 AC000039	6e-14 BG717658	0.083
34X25_23_Lac.txt		MAP3K7IP1		22q13.1		0.066	0.21	2e-08 AC094592.2|
34X25_23_rE.txt						9e-17 AL109926.9|HSDJ543C6	.20	0.0 AC094592.2|
34x25_5a_rE.txt		PDE4B		1p31.2-32.1		5e-40 反復 K00500.1|RATRSSID	1e-18 BE122674	3e-45 AC095096.3|
36_5_1_4_rE.txt						5e-05 AF267747	2e-04 BF950374	8e-23 AL663067.7|
36_5_2_196-rE.txt						3e-4 AC098729.3|	8e-4 AI552849	2e-08 AC116254.1|
36_5_2_19a_LacO.txt						2e-29 反復 AC091503.2|	1e-30 BI292332	2e-33 反復 AC099104.2|
36_5_2_19b_LacO.txt						8e-10 反復 AL592303.15|	4e-04 AI552849	2e-13 AC094419.2|
36_5_2_6-rE.txt		brd2		6p21.3		4e-64 AF100956	5e-17	e-135 AC098547.2|
36_5_2_6_LacO.txt		RD2					e-126 AF100956	2e-29 BI653651 7e-
21 AL671924.2|					H			
36_7_1_a_rE.txt						5e-12 AK009416	なし	H
38_17#2_rE.txt		SCMH1		1p34		4e-92	0.054	0.0 AC109561.2|
39_2_6-Lac.txt						H	反復 AL645968.6|	8e-84 BI289726
39_2_6-rE-repMa.txt						6e-45 AL591207.15|	なし	H
39_2_6-rE.txt							2e-38 反復 BI290754	3e-53 反復
AC097552.3|								
3_2_13_rE.txt		s100A6		1q21		5e-12 反復 AC025910	8e-60 AA267952	2e-73 AC027648.11|
3_2_4_rE.txt		s100A6 ネガティブ鎖		1q21		5e-21 反復 L47235.1|MUSXPDG1	3e-13 BF556181	7e-55 AC027648.11|
3_6_9_teoG_rE.txt						0.28	なし	0.35
42_8#3_rE.txt		arhgef3		3p21-p13		5e-49 AK016751	e-49 BB642560	0.0 AC108271.2|
49_RA2_A_rE.txt		hnrpl		19q13.2		0.0 AC008982	4e-20 |BG941347	4e-24 反復 AC069503.21|
4ae5_rE.txt		ms4a4Bb		11q13.1		0.047	なし	0.0 AC097387.3|
4a_b4.txt						0.011	0.14	9e-04
4cx_b4.txt						H	none	H
4c_lac.txt						H	none	
4c_rE.txt						0.002	none	0.14
5ad4-rE.txt						H	none	H
5ASE_Lac.txt						3e-12 反復 AF260927	5e-10 BG071839	0.0 反復

【０１８４】

【表１－４】

AC110948.2			H	なし	H		
5a_b4.txt			0.033	6e-15 BF396599	0.0 反復		
5a_lac.txt							
AC112381.1				なし	H		
5a_rE.txt			H	なし	H		
5_1_LacO.txt			H	なし	H		
5_1_LacO.txt	LOC161391	14q24.3	5e-18 反復 AC112870.1	4e-21 BE650278 非反復	2e-21		
6ae_T7.txt			2e-24 RATSIB2513 サテライト	8e-23 BE122674	1e-28 AC095863.2		
6aso1_rE.txt			H	なし	H		
6B37H_T7.txt	anx1	9q 12-q21.2	e-152 U25159.1 RNU25159	0.29	0.0 AC106671.1		
6B52E_rE.txt	LOC94765 [fer1l3-]	10q23.32	8e-04	0.011	e-162 AC105467.3		
6B52_Lac.txt			H	none	2e-05		
6b60_Lac.txt	TPM1	15q22.1	0.0	5e-05	0.0		
6BE1_Lac.txt			0.0	0.0	0.0		
6BE1_rE.txt			8e-75 RNPBUS19	1e-73 BE104253	0.0 AC107332.2		
6BE3_lac.txt			4e-18 反復 RNSAT1	1e-39	e-126 AC098526.5		
6be3_rE.txt	atp6c L or C	-16p13.3	4e-57 AF356008	e-142 AI045498	0.67		
6be5_rE.txt	BAB24609 FLJ23468	4q35.1	3e-31 AK006479	2e-31 BI107987	3e-22 AC117951.1		
6BE60_rE.txt	tpm1	15q22.1	e-106 M15473.1 RATTMA4	4e-98 BF523256	e-141		
					AC095434.2	AC079328.7	
6BE65_T7.txt	abcr [おそらくPARG1]	1p22.1-p21	4e-64 NM_007378.1	0.16	0.0 AC096978.3 and		
human AC105278.1							
6BE72_Lac.txt	na		H	なし	7e-05 AC080168		
6BE72_rE.txt	CTCF	16q21-q22.3	1e-05 BC009129	8e-22 AI071481	なし		
6bh15_T3.txt (188-end-vector)first 188	2e-60 tma3	15q22.1	M16433.1 RATTMA3	1e-14 av681483 RATTMA3	4e-61 AC095434.2		
6BSA#12_T3.txt	ADAM10	15q21.3-q2	2e-17 反復	1e-17 反復 AV681528	1e-09 反復		
AC007412							
6BSA12_B4.txt	na		H	na	なし H		
6BSA12_rE.txt	ADAM10	15q21.3-q2	H	0.72	3e-53 AC093406.1		
6_3_6_2B_B4.txt	na		H	なし	H		
6_3_6_2E-rE.txt	loc169647	9q34.13	1e-08 022596.1	6e-32 BF556068	5e-83 AC068494.11		
6_3_6_2E_Lac.txt	na		2e-32 satellite S64624	2e-16 BE122674	1e-74 AC068494.11		
70A-rE.txt	ANXA3	4q13-q22	H	なし	0.0 AC111410.1		
70A_Lac.txt	na		0.007	0.51	0.0 AC111410.1		
7A10_1-Lac.txt	na		2e-04 反復 RNU77636	2e-04 BI301327	-09 AC112322.1		
7A10_1_rE.txt	タンパク質	3p24	0.22	0.69	4e-31 AC073741		
7A7'_Lac.txt	anx12	15q21-q22	3e-64 AC000399	.026 BE892019	4e-05 AC019146		
7A7'_rE.txt LOC145817(ANXA2) overlap by FLJ11896		15q21.3	2e-97 AC000399	0.045	0.072		
8C5_11-rE.txt			H	1.31	H		
8C5_11_Lac.txt			H	なし	H		
8C5_6-Lac.txt			H	0.16	0.0 AC097795.2		
8C5_6_rE.txt	NPEPPS	17q21	13-15 AC025682 6	0.18	0.0 AC097795.2		
9A#2_3_Lac.txt	na	na		3e-69 AC094412.2			
9A#2_3_rE.txt	MGC20647	22q12.1	なし	na	2e-14 AL731658.9		
9B27_2_rE.txt	hsj1[2] ネガティブ鎖	9p13-p12	0.23	1e-30 BB606068	2e-11 AC107815.1		
B10_3b_2_3Lac.txt	jwa ネガティブ鎖	3p14	2e-32 RNU53922	なし	H		
L11#17_rE.txt	na		H	8e-07 BF455987	e-162 AC111476.1		
L11X#17_Lac.txt	na		1e-6 AL671916.4	1e-06 AC107099.2			
L12cx#11_Lac.txt	na		0.003 0.17	なし			
			H		H		

【０１８５】

【表１－５】

L12cx#11_rE.txt	na		9e-30	なし		H
L14D#18_Lac.txt	na		5e-18	1e-08		1e-15
L14D#8_Lac.txt	na		0.016			なし
L14XD#18_rE.txt	na		H	なし		H
L14XD#2-rE.txt	na		H	なし		H
L14XD#2_Lac.txt	na		H	なし		H
L14XD#8_rE.txt	na		H	なし		0.30
L14XD12E_rN80.txt	na		2e-51	0.18		2e-05
L14_7_2B_B2.txt	na		6e-11	1e-08		2e-17
L14_7_2B_B4.txt	na		H	なし		H
L1739E_rE.txt	na		0.22	なし		0.070
L191B2E#1_Lac.txt	na		e-139	なし		0.063
L191B2E#1_RE.txt	rpa16	7p22	e-117			H
L191B2E#3+_rE.txt	na		9e-07	7e-04		0.0
L192A3E_Lac.txt	na		H	なし		H
L192A3E_rE.txt	fer1l3		0.20	0.62		e-167
L192B3E#13_rE.txt	m6p/igf2r	6q26	2e-60	なし		1e-55
L193A1E#A_Lac.txt	na		3e-16	なし		4e-16
L193A1E#A_rE.txt	na 3e-06		e-157			
L194c4E_rE.txt	na		H	なし		8e-08
L195B1E_Lac.txt	na		H	1e-54		e-132
L195B1E_rE.txt	gtf2e1		0.63	5e-41		0.0
L195C5E-rE	CL2-株 1		20q11.21	3e-16		3e-13 3e-13
L197B3E-rE	na		2e-11	na		0.0
L197B3E-rE.txt	na		H	なし		e-119
L197B3E_Lac.txt	na		4e-06	3e-06		e-146
L19D16E-rE	na		0.004	na		4e-37
L21C1E_Lac.txt	na		H	なし		0.24
L21_5_7#2_Lac.txt	na		3e-06	</PRE>		9e-10
L22_5A1_Lac.txt	na		0.064	</PRE>		0.080
L22_5A1_rE.txt	na		0.063	なし		0.31
L24_10_1BE_rE.txt	na		H BF525273	0.19		9e-48
L24_26_10-Lac.txt	na		e-144	1e-11		H
L24_26_10-rE.txt	loc168348		e-168	e-134		0.27
L24_26_1_B4.txt	na		H	なし		H
L24_26_1_BL-re.txt	na		e-103	4e-24		3e-35
L24_26_2A-rE.txt	na		0.22	</PRE>		0.27
L24_26_2B-Lac.txt	na		e-164	7e-33		0.0
L24_26_2B-rE.txt	na		e-178	8e-33		
L24_3_2B_rE.txt	na		0.26	なし		0.32
L24_4_2-Lac.txt	na		1e-05	0.054		e-107
L24_4_2-rE.txt	na		0.066	0.052		
L24_4_2AE_rE.txt	na		0.066	0.052		0.0
L24_4_2BE_rE.txt	dlx2 ネガティブ	2q32	2e-23	none		2e-82
L24_4_3-Lac.txt	na		e-170	2e-91		e-167
L24_4_3+rE.txt	kiaa0255		4e-71 AC078911	3e-43 プラスミド		4e-47 プラスミド
contamination AC006099						
L24_5_2-Lac.txt	na		1e-37	1e-30		5e-40
L24_5_2-rE.txt	na		0.26	なし		0.33

【０１８６】

【表１－６】

L24_5_2BE_rE.txt	HNF3B	20p11	0.004	0.013	0.0 AC113866.2|
L24_5_3BE_rE.txt	kiaa0255-		e-125 AC078911.11|	3e-06	6e-06
L24_5_3_rE.txt	K|AA0255-	20q11.21	e-125 AC078911.11|	na	3e-06 6e-06
L24_6_3-Lac.txt	na		0.067	0.22	0.0
L24_9_1-Lac.txt	na		0.27	なし	8e-67
L24_9_1_rE.txt	na		9e-23	7e-23	1e-25
L25_10-Lac.txt	s100a6		5e-21	2e-13	e-110
L28AP-rE.txt	TCEB3		1p36.1	0.43	0.40 e-102
AL672076.2|					
RA2#C_Lac.txt	na		7e-66	0.0	
RA2#C_Lacg.txt	na		0.0	4e-06	0.0
RA2#C_rE.txt	na		0.069	e-119	0.0
RA3_A_rE.txt	dj3240	17.1.2	0.0	0.72	0.0
RA5_A_rE.txt	na		1e-51	0.17	
RA5_B_rE.txt	クラリスタリン		0.0	0.003	0.0
SCA6#1_Lac.txt	foc131020		0.25	e-102 BF289981	6e-64 AC103936.2|
SCA6#1_rE.txt	LOC151593	3q24	H	0.68	3e-44 AC103936.2|
SCA7#5-Lac.txt	na		H	なし	H
SCA7#5_rE.txt			H	なし	
SCA9#14_Lac.txt	na		6e-45	0.003	7e-05
SCA9#14_rE.txt	7e-23		6e-20	5e-55	
ScB2#19_Lac.txt	erbin		2e-07	4e-09	
ScB2#19_rE.txt	ERBB2IP	5q13.1	H 1e-27	H	
second est of incyte for 6_3_6_	na	0.0	na	0.0	e-149
seq1a_lac.txt	na 7e-80	3e-83			
seq1b_lac.txt		8q24	0.46	0.092	0.14
sequence match for 34X23_1.txt CAR (RFP2)		13q14	0.0	na	0.0 0.0
X11_rE.txt	na		e-178	8e-84	1e-18
x13_rE.txt	na		H	なし	4e-48
x15_rE.txt	fksg28	10q24.2	H	なし	
x18 estAI647623.txt	kiaa1303	17q25.3	e-167	e-121	e-149
X18H_t7.txt	kiaa1303		2e-10	2e-10	0.0
X20_rE.txt	nicer エレメント		e-104	e-103	e-143
X236E1_T3.txt	na		0.018	0.23	
X236E1_T7.txt	na		0.013	なし e-116	
X23_7-T3-clean.txt	na		H	H	
X23_7-T3-intact.txt	na		4e-18	1e-11	0.001
X23_7_T7.txt	na		H	なし	H
X23_8-T3.txt	na		H </PRE>	0.066	
X24_4_T7.txt	na		H	なし	H
x27b4f_1.txt	na		0.38	0.48	
x2_b4.txt	na		H	なし 0.16	
X3_2_13_Lac.txt	s100a6		5e-15	1e-12	2e-15
X3_2_4_LacO.txts100a6- wrong direction			7e-76	7e-60	6e-83
X4_rE.txt	na		H	1.31	H
x5_rE.txt	na		H	なし	2e-34 AC110459.2|
X7B-B4.txt	na		H	1.31	H

【０１８７】

【表１－７】

EST伸長またはESTマッチblastの結果:	gata4	8p23.1-p22	H	なし	8e-16 AC069185.6
0542234 est of 14a13e_re.txt h			0.0	1e-43	
EST 10_3b_2_rE.txt	2e-70		0.002	5e-62	0.0
est 5ase-lacAA946172.txt			0.69	0.0	H
est for 10_4b_4_rE.txt			e-151	1e-53	
est for scb2#19.txt	2e-76		0.0	0.0	3e-48
est From 12 4b_9re.txt			e-143	6e-86	
est from 12c#A-re-AA972262.	e-116		0.0	aa871174	0.0 1e-07
est from 12_3B#8_RE.txt	APTX	9p13.3	3e-04	0.0	0.0
EST from L193A1E#A_rE-AI230550.			0.0	0.0	5e-77
est of 42_8#3_rE.txt			0.0	0.0	0.0
est of 31_3_9_lac.txt			0.10	0.33	
est of 32_3_2#1E_rE.txt			2e-44	0.0	1e-64
est of 35_5_2_19b_lac.txt			0.0	0.0	e-166
est of 6_3_6_2E-rEa.txt	LOC169647	9q34.13	1e-08	0.0	0.0
est of L195B1E-lac.txt	GTF2E1	3q21-q24	0.34	e-106 BE089756	e-124
est of RA2#C_rE.txt			e-166		
est of sca6#1.txt			2e-92		
Est-31-3-9 incyte10569871.txt			na	0.0	2e-63
est-36_5_2_196-rE AI552849.txt			1e-19	0.0	0.0
est-L24_5_3BE_rE.txt	id3		2e-20	2e-16	2e-23
est191e9b-rb2-124.txt	e-121		e-149		
EST224186 of x18.txt	TUSP	6q25-q26	0.0	0.0	0.0
est_L24_5_3BE_rEa.txt	GTF2e1		6e-08	0.0	0.0
extension of est-L195B1E_rE.txt	APTX	9p13.3	0.0	0.0	0.003
gene of 12_3b#8.txt	na		0.0	e-170	1e-06
incyte cDNA for 24-26-10-human.	na		e-160	0.0	5e-61
incyte est of 6_3_6_2E-rEa est					

【０１８８】

【表２－１】

表2

		配列名	配列注記
1	10_2A_3_12-rE	GATA4:	GATA binding protein 4 human chromosome 8 10,812K-12,275K
2	10_3A_2_Lac	Ppm1a:	protein phosphatase 1A, magnesium dependent, alpha isoform murine chromosome 12 67,344K-67,458K
3	10_3bE gene-F113534	Hp1bp3	heterochromatin protein 1 binding protein 3, 1p36.12 HP1-BP74
4	10_3b_2_rE	LOC239743	similar to kelch-like 6 (Drosophila) [Homo sapiens] murine chromosome 16 A3
6	10_46_4-Lac	aprataxin	5 prime of DnaJ Hsp40 homolog, subfamily A, member 1
7	10_4A_8_rE	gas5	murine chr 1
8	10_4b_4_rE	~	sits at end of LOC287974 in negative strand - positive strand- upstream maybeB3gnt5 1599 bp mRNA
		~	linear ROD 28-JAN-2003 DEFINITION Rattus norvegicus UDP-GlcNAc:betaGal beta-1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase 5 (B3gnt5), mRNA.
9	12C#A_rE	kiaa0750	human chr 11
10	12CX#11E_rE	LOC330280	or Psma3 is listed as being only 853 nts, which seems unlikely murine chromosome 6
11	14A7re	Madh7	MAD homolog 7 (Drosophila)at 18p12 human chr 18 46,230K-46,308K
12	12CX#6_rE	Rattus	norvegicus similar to gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1
13	12CXY#7_rE	HTRA,	PRSS11 murine chromosome 7 119,771K-119,793K, human chromosome 10q25.3-q26.2
14	12C_2B#9E_rE	LOC244819	murine chr 9 993161..1003851 + 99 20888725
15	12PSA#6_rE	ref:NP_003741.1	- eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta, 150/170kD); eukaryotic
16	12_3B#10-rE	murine chr 19 21363609..21370345	- 448 6753740 Eif3 eukaryotic translation initiation factor 3
		LOC241690,	mouse 5 of rin2- which is likely gene mRNA complement(join(45074453..45074634,
		45082032..45082055,	45083667..45083839,45100942..45101235,45140102..45140163))
		LOC241690	/product=similar to ribosomal protein L10 [Rattus norvegicus] /transcript_id=XM_141402.1
17	12_3B#2_Lac	Arl6ip5	
18	12_3B#2_rE	positive	strand chr 4 rat is:ubiquitin-activating enzyme E1C Ube1c and on the other side, similar to
		Neuronal	tropomodulin (N-Tmod) (Tropomodulin 2) LOC312585 negative strand.glutamate transporter EAAC1
		interacting	protein negative strand.
19	12_3B#8_rE	aprataxin,	murine chr 4- this gene is off negative strand, and there may be another rat gene
20	12_4B#7-rE	Peptidyl-prolyl	cis-trans isomerase A (PPIase) (Rotamase) (Cyclophilin A) (Cyclosporin A-binding protein
		NT_039230.	Mm3_39270_30 Mus musculus chromosome 3 genomic contig no gene identified in this murine
21	12_4b#11_rE	sequence	

【０１８９】

【表２－２】

22	12_4b_9_rE	LOC211313 NT_039299.1|Mm5_39339_30 Mus musculus chromosome 5 genomic
23	12_6B#6_rE	murine chr 2 closest murine gene is 1723887..1724855 - 323 20340819 LOC241732 TSPY which is probably not the gene
24	12_L24_5_3-Lac	0542234 est of 14a13e_re murine chr 14 52M-55M next to gata 4
25	14A13E_rE	
26	14A14E_rE	srp19 human chr 5 murine 18
27	14C_2E_rE	
28	14G3E_rE	
29	14H1E_rE	
30	14H4E_rE	CLR-B murine chromosome 6
31	14XD#12E_rE	
32	14XD#18B_B4	region of fer113 human chr 10
33	14_24_#6-rE	Mm11_39560_30 Mus musculus chromosome 11 genomic, mgat-1
34	14_7#2E_rE	murine chr 11 E130113K08Rik
35	17_3_3He_1-T7	18992349..19034645 + 126 21312102 1110029A09Rik murine chr 4
36	18A_8_1E_rE	1469944..1479193 - 91 20840505 E130102H24Rik murine chr 4
37	18A_8_3E_rE	
38	18_5#13E_rE	
40	191E2E_rE	22749957..22802881 - 337 20877992 LOC239186 closest match murine chr 14
41	191E8E_rE	CLR-C 4448981..4475825 + 202 28526608 LOC333160 this is C lectin-related protein C murine chr 9
42	191E9E_rN80	6982588..6999715 + 162 28523464 LOC333094 murine chr 6
43	19D3E_rE	Pts 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase
44	19D5E_rE	
45	19_7AE_rE	Cstf2: cleavage stimulation factor chr X mouse and man
46	19_9BE_rE	
47	1a_rE	LOC195700 closest gene murine chr 6 294812..337018 + 438 28523444
48	1bw_lac	loc279232 murine chr 4
49	20_L28AP-Lac	E2F-2, murine chr 4 5700649..5721013 + 444 28498372 LOC242705
50	21_5_8E(2)_rE	murine chr 11 similar to Collagen alpha1 closest known gene LOC217123
51	24_3_5#1_rE	s100a6 murine chr 3 lac sequence in s100a5
52	29A_5_1_Lac	JNK-binding protein JNKBP1 like murine chr 2 8031390..8107228 - 343 28484974 LOC241298
53	2AE_lac	2281090..2321346 + 162 28485837 LOC329423 murine chr 2 next to dlx1 and 2
54	2b_lac	

【０１９０】

【表２－３】

55	31_3_15#1_Lac	murine chr 8 within gene 8031390..8107228 - 343 28484974 LOC241298 off negative strand and probably disrupts 5790690..5796087 + 356 6857787 Fkbp8
56	31_3_17_rE	cut-like 1 (cutl1) 6647971..6737110 - 1332 7106283 Cutl1 CCAAT displacement protein murine chr 5
57	31_3_19#2_rE	4637984..4643986 + 208 16716407 Ocil-pending C lectin-related protein B murine chr 6
58	31_3_5_rE	murine chr 11 38818453..38830549 + 461 6756051 Zfp207 Zfp207
59	31_3_6_2_Lac	murine chr 12 is equivalent to hu 14 in non-repetitive part 7737091..7806367 + 128 20849473 LOC217541 similar to 3-phosphoglycerate dehydrogenase
60	31_3_9_rE	53077725..53087552 - 729 13447398 Mail-pending definite murine chr 16
61	31_4_2_rE	7424..39696 - 679 28505866 2310047I15Rik murine chr 11
62	31_4_4#1_rE	755214..804073 + 481 9625027 Prss11 murine chr 7
63	32_3_2#1E_rE	21171379..21180079 - 149 6680832 Calm2 calmodulin 2 murine chr 17
64	34X23_1-rE	murine chr 12 closest gene is 9807175..9807651 + 159 20849986 LOC238153
65	34X23_3-rE	two genes in opposite orientations- probably share a promoter region 1999682..2066949 - 1277 6755046 Abcb1b ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B 2067489..2075793 + 142 28501108 LOC330031 vector disrupts loc33031 murine chromosome 5
66	34X24_126-rE	41543381..41569827 + 503 28486603 2310012M03Rik Similar to mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 1 TAK1 murine chr 15
67	34X25_23_Lac	2377737..2727820 + 722 9790151 Pde4b phosphodiesterase 4B, cAMP specific murine chr 4 2377737..2727820 + 722 9790151 Pde4b phosphodiesterase 4B, cAMP specific
68	34X25_23_rE	murine chr 4 2377737..2727820 + 722 9790151 Pde4b
69	34x25_5a_rE	
70	36_5_2_196-rE	
71	36_5_2_6-rE	murine chr 17 LOC309624
72	36_7_1_a_rE	
73	38_17#2_rE	20744318..20811497 + 665 22095027 Scmh1 sex comb on midleg homolog 1 murine chr 4
74	39_2_6-rE	
75	4a_b4	murine chr 5
76	3_2_13_rE	s100a6 murine chr 3
77	3_2_4_rE	s100a6 murine chr 3
78	42_8#3_rE	murine chr 14 657807..709478 + 1499 28477705 4933409E02Rik which is retinoblastoma-associated protein RAP140
79	4ae5_rE	19q13.13
80	4c_rE	
81	4cx_b4	murine chr 1
82	5_1_LacO	32168807..32227960 - 625 28521737 LOC238331 murine chr 12 there is a repeat, but not in the first part of the sequence that matches this

【０１９１】

【表２－４】

83	5a_lac	two ests- perhaps on rat chr 4 gi|20423079|gb|BQ206614.1|BQ206614 gi|11381574|gb|BF396599.1|BF396599
84	6B37H_T7	10964157..10975247 - 347 6754570 Anxa1 murine chr 19
85	6B52E_rE	4257489..4269990 - 151 28551828 E030042N20Rik 4330462..4335374 + 190 20888893 1200008O12Rik murine chr 19
86	6BE1_Re	R.norvegicus mRNA (pBUS19) highly repetitive sequence of retroviral origin
87	6BE3_lac	697470..702328 - 156 6753144 Atp6v0c murine chr 17
88	6BE60_rE	tpm1, murine chr. 9
89	6BE65_T7	8533246..8538206 + 218 20875728 LOC242198 8546745..8685908 + 2269 6671495 Abca4 murine chr 3 t7 sequence is in abca4 but collaborator could not find expression in rie-1 cells
90	6BE72_rE	CTCF, chr 19- rat
91	6BSA12_rE	adam10 and LIPH Gene map locus 15q21-q23
92	6_3_6_2E-rE	golgi matrix protein GM130 and Mnbk-Dyrk1A- binds to grb2 human gene is GG95
93	6be3_rE	chr 17 697470..702328 - 156 6753144 Atp6v0c
94	6be5_rE	2849866..2876267 + 411 20863400 LOC330758 murine chr 8 Similar to serine/threonine protein kinase TAO1
95	6bh15_T3	13360838..13381657 - 285 13270471 Tpm1 tropomyosin 1, alpha murine chr 9
96	70A-rE	murine chr 5 anxa3
97	7A10_1_rE	LOC269872 Mus musculus chromosome 7 genomic contig, strain C57BL 6J - 618181..664133
98	8C5_11-rE	
99	8C5_6_rE	murine chr 11 8625545..8698887 - 921 6679491 Psa puromycin-sensitive aminopeptidase
100	9A#2_3_rE	LOC289895: similar to Emul protein rat 14 Emul is restricted to epithelial extracellular binding
101	9B27_2_rE	murine chr 4 17656746..17665179 - 277 27228977 Aptx aprataxin sits at start of dnajla
102	L11#17_rE	
103	L12cx#11_rE	closest to 276400..276777 - 126 28523321 LOC330280 in region of AAC12943 3037091 proteasome alpha7/C8 subunit [Mus musculus]
104	L14D#18_Lac	
105	L14D#8_Lac	murine chr 16 negative strand between these two genes 42060678..42085522 + 206 21312810 4833409J19Rik RIKEN cDNA 4833409J19 42212422..42245696 + 950 23956172 Ssg1-pending
106	L14XD#18_rE	Gtpat12
107	L14XD#2-rE	
108	L14XD#8_rE	murine chr 16
109	L14XD12E_rN80	4448981..4475825 + 202 28526608 C lectin-related protein C LOC333160 murine chr 6
110	L17139E_rE	R74726 murine chr 9
111	L191B2E#1_Lac	1224295..1225537 + 134 6677791 Rpo1-3 murine chr 5
112	L191B2E#1_RE	

【０１９２】

【表２－５】

		64583664..64585839 + 305 20343300 LOC239678 although this gene appears to be on the negative
113	L191B2B#3+_rE	strand murine chr 15 closest postive strand gene is HOXC13
114	L192A3E_rE	in between E030042N20Rik: RIKEN cDNA E030042N20 gene and 1200008O12Rik: RIKEN cDNA 1200008O12 gene murine chr 19 4257489..4269990 - 151 28551828 E030042N20Rik fer-1 like protein 3 4330462..4335374 + 190 20888893 1200008O12Rik
115	L192B3B#13_rE	5058584..5144689 - 2483 23956054 Igf2r murine chr 17
116	L193A1B#A_rE	
117	L194c4E_rE	34316683..34341462 - 441 21312660 Gtf2e1 general transcription factor II E, polypeptide 1 (alpha subunit) murine chr 16
118	L195B1E_rE	similar to E2IG2 murine chr 7 28480555 LOC244162 rat chr 1 LOC308858murine chr 7
119	L197B3E-rE	1287066..1334911 - 234 6753170 Bcl2l murine chr 2
120	L19D16E-rE	6982588..6999715 + 162 28523464 LOC333094 murine chr 6
121	L22_5A1_rE	murine chr 14 negative strand maybe similar to FSHD Region Gene 2
122	L24_10_1BE_rE	loc276970 murine chr 11 Mm11_39561_30
123	L24_26_10-rE	276400..276777 - 126 28523321 LOC330280 murine chr 6
124	L24_26_1_BL-re	repeat shows up on this
125	L24_26_2A-rE	murine chr 14 7931639..7932322 - 228 20881545 LOC212081
126	L24_26_2B-rE	36668143..36676666 + 254 28524792 LOC332305 murine chr 18
127	L24_4_2AE_rE	
128	L24_4_2BE_rE	2175918..2178442 + 256 6753644 Dlx1 distal-less homeobox 1 2190449..2192321 - 333 6753646 Dlx2 distal-less homeobox 2 murine chr 2
129	L24_4_3-rE	12387618..12442029 + 1221 28500402 2810442I22Rik 12527560..12529296 + 579 7657112 Galnt4 UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 4 12544567..12544764 - 66 6679305 ??Phxr2 murine chr 10
130	L24_5_2BE_rE	47832456..47859226 + 295 20912679 LOC241708 murine chr 2
131	L24_5_3BE_rE	1570784..1576636 + 193 21704056 LOC228788 similar to chromosome 20 open reading frame 160 1623748..1650722 + 504 6754166 Hck hemopoietic cell kinase 1686086..1691690 + 265 28488150 LOC329539 1701920..1708331 + 139 19527062 AU045326 expressed sequence AU045326 1723887..1724855 - 323 20340819 LOC241732 murine chr 2 negative strand
132	L24_6_3-Lac	LOC304968 rat 13q23 similar to RIKEN cDNA 1700009P17 [Mus musculus]
133	L24_9_1-Lac	LOC230761 murine chr 4
134	L24_9_1_rE	12638955..12746974 - 450 28490830 Ddx10 Similar to DEAD/H murine chr 9
135	L25_10-Lac	26660256..26660811 + 90 25048430 S100a6 murine chr 3
136	L28AP-rE	murine chr 4- missing the gene in between 8430427k15 and loc279232
137	SCA6#1_rE	5459137..5476774 - 425 28492548 LOC244982 murine chr 9
138	SCA7#5-Lac	C lectin-related protein B

【０１９３】

【表２－６】

139	SCA9#14_rE	12018184..12022411 - 161 16519535 Erbb2ip the erbb2ip is in the correct orientation for this vector insert, the vector resides next to this gene-12120524..12120802 + 93 28526912 LOC328330 in the wrong orientation murine chr 13
141	X23_7_T7	
142	X23_8-T3	
143	X24_4_T7	
144	seq1b_lac	murine chr 15 mgc6397, related to zinc finger 7 (human)
145	7A7_rE	chr 9 anxa2
146	est12c#A-re-AA972262	
147	est42_8#3_rE	rap140 retinoblastoma-associated Mm14_39638_30 Mus musculus chromosome 14 genomic contig, strain C57BL/6 657807..709478 + 1499 28477705 4933409E02Rik similar to RETINOBLASTOMA-ASSOCIATED PROTEIN RAP140
148	ESTL193A1E#A_rE-AI230550.	AI326792 and 1300010C19-RAGA (RAS-RELATED GTP-BINDING PROTEIN murine chr 4
150	est32_3_2#1E_rE	murine chr 17
151	est36_5_2_19b_lac	CCr4-NOT complex-transcription factor subunit murine chr 6
152	estL195E1E-lac	chr 9 mouse next to loc244982
153	extension_est-L195E1E_rE	anxa2 murine chr 9
154	7a7_rE	A2300530l6Rik murine chromosome 2, human chr 20 maybe Bcl2l Unexpectedly, the smaller mRNA species (BCLXS) encodes a protein that inhibits the ability of BCL2 to enhance the survival of growth factor-deprived cells. In vivo, the smaller BCLX mRNA was expressed at high levels in cells that undergo a high rate of turnover, such as developing lymphocytes. murine chr 2
155	36_5_1_4_rE	
156	L195C5E-rE	4637984..4643986 + 208 16716407 Ocil-pending C lectin-related protein B murine chr 6
157	24_9_3#2-re	

【０１９４】

本発明の方法を利用して単離された２つの配列（研究室表示　１０＿２Ａ＿３＿１２－

ｒＥ（配列番号１７）および研究室表示　１４Ａ１３Ｅ＿ｒＥ（配列番号１１４））は、ＧＡＴＡ結合タンパク質４をコードする配列を含み、かつヒト遺伝子マップの遺伝子座８ｐ２３．１－ｐ２２に位置付けられる。

【０１９５】

ＧＡＴＡ結合タンパク質は、種々の細胞型において遺伝子発現および分化を制御する構造的に関連する転写因子の一群である。このＤＮＡ結合タンパク質のファミリーのメンバーは、多くの遺伝子のプロモーターにおいて重要なシスエレメントである「ＧＡＴＡ」モチーフとして公知の、共通配列を認識する。Ａｒｃｅｃｉら（１９９３）は、保存ジンクフィンガードメインに基づくプライマーを用いて６．５日齢の胚ライブラリーをスクリーニングすることによって、マウスＧＡＴＡ４　ｃＤＮＡをクローン化した。５０－ｋＤの予測タンパク質は、２つのジンクフィンガー含み、そして細胞培養物中で発現した場合、適切なレポーター構築物を活性化した。ＧＡＴＡ４は、アポトーシスと関連付けられるが、任意のウイルスまたは感染症と関連付けられることは今まで知られていなかった。

【０１９６】

別の配列（研究室表示　１０＿３Ａ＿２＿ｌａｃ（配列番号２１３））は、プロテインホスファターゼマグネシウム依存性、１Ａ、αイソ型；ＰＰＭ１Ａをコードする配列を含み、かつ第１４染色体に位置付けられる。このタンパク質はまた、プロテインホスファターゼ２Ｃ、αイソ型；ＰＰ２ＣＡ　ＰＰ２Ｃ－αとして公知である。２ＡＥ　ＪＮＫ結合タンパク質ＪＮＫＢＰ１様マウス染色体２　８０３１３９０．．８１０７２２８～３４３２８４８４９７４　ＬＯＣ２４１２９８に関連付けられる。

【０１９７】

ＰＰＭ１Ａは、真核生物における細胞のストレス応答の調節のために必須の、セリン／スレオニンプロテインホスファターゼである。ラットＰｐ２ｃ－αをプローブとして用いてヒト奇形癌ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることによって、Ｍａｎｎら（１９９２）は、ヒト対応物であるＰＰＭ１Ａをクローン化し、これをＰＰ２Ｃ－αと称した。ＰＰＭ１Ａ　ｃＤＮＡは、ウサギＰｐ２ｃ－αと９９．７％アミノ酸同一性を共有する予測３８２個のアミノ酸のペプチドをコードする。

【０１９８】

ｐ３８（６００２８９）およびＪＮＫ（６０１１５８を参照のこと）ストレス活性化ＭＡＰＫカスケードをネガティブに調節するプロテインホスファターゼを同定するための遺伝子スクリーニングにおいて、Ｔａｋｅｋａｗａら（１９９８）は、３２４個のアミノ酸のペプチドをコードするＰＰ２Ｃ－α　ｃＤＮＡ（最初、彼らはＭＣ４と称した）を得た。この著者らは、ＭＣ４がＰＰ２Ｃ－αの選択的スプライシング産物であると仮定した。彼らがＰＰ２Ｃ－α－１（３８２個のアミノ酸）およびＰＰ２Ｃ－α－２（３２４個のアミノ酸）と称した２つのタンパク質は、そのＣ末端が異なる。ノーザンブロット分析は、それぞれ、ＰＰ２Ｃ－α－１およびＰＰ２Ｃ－α－２に対応する、２．８－ｋｂの転写物および４．４－ｋｂの転写物を検出した。どちらの転写物も、心臓、胎盤、骨格筋、および膵臓において高いレベルで発現され、そして４．４－ｋｂの転写物（ＰＰ２Ｃ－α－２）は、脳において検出された。

【０１９９】

免疫組織化学分析を使用して、Ｄａｓら（１９９６）は、ストレス活性化経路の脱リン酸成分における役割と一致する哺乳動物細胞の細胞質および核の両方において、ＰＰＭ１Ａを検出した。

【０２００】

哺乳動物細胞においてＰＰＭ１Ａを発現させることによって、Ｔａｋｅｋａｗａら（１９９８）は、ＰＰＭ１Ａがストレス応答性ｐ３８およびＪＮＫ　ＭＡＰＫカスケードの活性化を阻害することを実証した。彼らのインビボおよびインビトロでの観察は、ＰＰＭ１Ａが、ストレス応答性ＭＡＰＫカスケード中のＭＡＰＫＫ（ＭＫＫ６（６０１２５４）およびＳＥＫ１（６０１３３５））およびＭＡＰＫ（ｐ３８）を脱リン酸かつ不活性化することを示した。同時免疫沈降アッセイを使用して、この著者らは、ＰＰＭ１Ａがｐ３８と

直接的に相互作用することを示した。ＭＡＰＫ（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ）カスケードは、ＭＡＰＫ－ＭＡＰＫキナーゼ（ＭＡＰＫＫ）およびＭＡＰＫＫキナーゼ（ＭＡＰＫＫＫ）からなる、一般的な真核生物のシグナル伝達モジュールである（Ｔａｋｅｋａｗａら、２Ｃａｌｐｈａ ｉｎｈｉｂｉｔｓ ｔｈｅ ｈｕｍａｎ ｓｔｒｅｓｓ－ｒｅｓｐｏｎｓｉｖｅ ｐ３８ ａｎｄ ＪＮＫ ＭＡＰＫ ｐａｔｈｗａｙｓ ＥＭＢＯ Ｊ １９９８ Ａｕｇ １７；１７（１６）：４７４４－５２ ０）。脱リン酸は、ＭＡＰＫＫおよびＭＡＰＫの両方の活性化のために必須であるため、プロテインホスファターゼは、ＭＡＰＫカスケードを介するシグナル伝達の重要な調節因子である可能性が高い。ストレス応答性ｐ３８およびＪＮＫ ＭＡＰＫカスケードをネガティブに調節するプロテインホスファターゼを同定するために、本発明者らは、活性化過剰の酵母変異体を使用して、そのｐ３８およびＪＮＫ経路と類似性を共有する酵母ＨＯＧ１ ＭＡＰＫ経路をダウンレギュレートする遺伝子について、ヒトｃＤＮＡをライブラリーをスクリーニングした。このスクリーニングにおいて、ヒトプロテインホスファターゼ２Ｃα型（ＰＰ２Ｃα）は、酵母におけるＨＯＧ１経路をネガティブに調節することが見出された。さらに、哺乳動物細胞中で発現した場合、ＰＰ２Ｃαは、環境的ストレスによって誘導されるｐ３８およびＪＮＫカスケードの活性化を阻害した。インビボおよびインビトロの両方での観察は、ＰＰ２Ｃαが、ストレス応答性ＭＡＰＫカスケード中のＭＡＰＫＫ（ＭＫＫ６およびＳＥＫ１）およびＭＡＰＫ（ｐ３８）を脱リン酸かつ不活化したことを示した。さらに、ＰＰ２Ｃαおよびｐ３８の直接的相互作用は、同時免疫沈降アッセイによって実証された。この相互作用は、細胞がストレスで刺激された場合、または触媒的に不活性なＰＰ２Ｃα変異体が使用された場合にのみ観察された。このことは、脱リン酸形態のｐ３８のみがＰＰ２Ｃαと相互作用することを示唆する。

【０２０１】

Ｄａｓら（１９９６）は、彼らがＰＰ２Ｃと称したＰＰＭ１Ａの結晶構造を決定した。その構造は、αヘリックスで周囲を囲まれ、２つのマンガンイオンが結合する中央のβサンドイッチで構成される触媒性ドメインを有する、新規のタンパク質ひだ（ｆｏｌｄ）を明らかにした。この著者らは、タンパク質構築物および推定触媒性機構は、タンパク質セリン／スレオニンホスファターゼのＰＰ１ファミリー、ＰＰ２Ａファミリー、およびＰＰ２Ｂファミリーと類似であると主張した。

【０２０２】

Ｏｆｅｋら（Ｃｅｌｌ Ｃｙｃｌｅ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ａｎｄ ｐ５３ Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｂｙ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ ２Ｃａｌｐｈａ，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２００３ Ａｐｒ １８；２７８（１６）：１４２９９－３０５）は、プロテインホスファターゼ２Ｃ（ＰＰ２Ｃ）が、原核生物および真核生物の両方におけるストレス応答および増殖関連経路を調節する広い範囲の基質を脱リン酸することを言及する。彼らは、主要な哺乳動物のイソ型であるＰＰ２Ｃαｇが、細胞増殖を阻害し、かつｐ５３経路を活性化することを実証する。２９３細胞クローンにおいて、そのクローンにおけるＰＰ２Ｃα発現は、ＰＰ２Ｃα過剰発現がＧ（２）／Ｍ細胞周期停止およびアポトーシスを導くテトラサイクリン誘導性プロモーターによって、調節される。さらに、ＰＰ２Ｃαは、内因性ｐ５３およびｐ５３応答性遺伝子ｐ２１の発現を誘導した。ＰＰ２Ｃαによるｐ５３経路の活性化は、内因性ｐ５３を有する細胞、ならびに外因性ｐ５３を用いてトランスフェクトされたｐ５３の存在しない細胞の両方において生じた。ＰＰ２Ｃαの誘導は、結果として、ｐ５３タンパク質の全体的なレベルの増加ならびにｐ５３転写活性の増大を生じた。酵素的に不活性なＰＰ２Ｃα変異体が過剰発現された場合、これらの効果のいずれも検出されなかったため、ＰＰ２Ｃαの脱リン酸活性が、記載される現象のために必須である。ｐ５３は、ＰＰ２Ｃα指向性細胞周期停止およびアポトーシスにおいて重要な役割を果たす。それは、ヒト乳頭腫ウイルスＥ６によるヒト２９３細胞におけるｐ５３発現の摂動が、細胞生存における有意な増加を導くためである。ｐ５３活性化におけるＰＰ２Ｃαの役割が、議論される。

【０２０３】

別の配列（研究室表示　１０＿３ｂＥ＿ｒＥ（配列番号１５））は、真核生物翻訳開始因子４－γ，３（ＥＩＦ４Ｇ３）をコードする配列を含む。

【０２０４】

哺乳動物真核生物翻訳開始因子４Ｇ（ｅＩＦ４Ｇ）は、ｅＩＦ４Ｅ（１３３４４０）、ｅＩＦ４Ａ（６０２６４１を参照のこと）、ｅＩＦ３（６０２０３９を参照のこと）、および４０Ｓリボソームとの相互作用を介して、４３Ｓ前開始複合体をｍＲＮＡへ補充することについての原因となるようである、足場ポリペプチドである。ｅＩＦ４ＤＩ（６００４９５）を参照のこと。Ｇｒａｄｉｒａ（１９９８）は、ヒトおよびウサギｅＩＦ４ＧＩと相同なタンパク質をコードする部分ヒトｃＤＮＡを同定した。さらなるライブラリーをスクリーニングすることによって、この著者らは、彼らがｅＩＦ４ＧＩＩと称した新規のタンパク質の完全なコード領域に相当するｃＤＮＡを単離した。予測１，５８５個のアミノ酸のｅＩＦ４ＧＩＩタンパク質は、ｅＩＦ４ＧＩに対して４６％同一である。ウエスタンブロットにおいて、両方のｅＩＦ４Ｇタンパク質が、約２２０ｋＤに移動した。インビトロアッセイを使用して、Ｇｒａｄｉら（１９９８）は、ｅＩＦ４ＧＩと同様に、ｅＩＦ４ＧＩＩが、ピコルナウイルスライノウイルス２Ａ（プロ）によって切断されたことを示した。ウエスタン分析および同時免疫沈降実験は、ｅＩＦ４ＧＩＩが、ｅＩＦ４Ｅ、ｅＩＦ４Ａ、およびｅＩＦ３と直接的に相互作用することを実証した。ｅＩＦ４ＧＩＩは、ライノウイルス２Ａ（プロ）を用いて前処理された網状赤血球溶解物におけるキャップ依存性翻訳を復元し、内因性ｅＩＦ４Ｇを切断する。このことは、この著者らが、ｅＩＦ４ＧＩＩがｅＩＦ４ＧＩの機能的相同体であると結論付けるように導いた。ノーザンブロット分析は、ｅＩＦ４ＧＩＩが、５．２－ｋｂのｍＲＮＡおよび６．０－ｋｂのｍＲＮＡとして遍在的に発現されることを明らかにした。Ｉｍａｔａｋａら（１９９８）は、ｅＩＦ４ＧＩおよびｅＩＦ４ＧＩＩのいずれのＮ末端領域も、ＰＡＢＰ（６０４６７９）に結合することを実証した。ｅＩＦ４Ｇは、ポリオウイルスに関連付けられる（Ｉｒｕｒｚｕｎら）。

【０２０５】

他の配列（研究室表示　１０＿４ｂ＿４－ｒＥ（配列番号７）および１０＿３ｂ＿２－ｒＥ（配列番号１３））は、ＫＬＨＬ６タンパク質をコードする配列を含み、かつこれらの配列は染色体３ｑ２７．３に位置付けられる。このタンパク質は、上記のｇａｔａ４タンパク質と同一のドメインを有する。

【０２０６】

別の配列（研究室表示　１０＿４Ａ＿８＿ｒＥ（配列番号３））は、ｇａｓ５タンパク質をコードする配列を含み、かつこの配列は染色体位置１ｑ２３．３に位置付けられる。マウスのｇａｓ５遺伝子は、元々は、細胞周期の増殖停止期における優先的な発現に基づいて単離された（Ｂａｒｏｎｅら）。この遺伝子は、１２のエキソンを含み、それらのエキソンから２つの選択的にスプライシングされた転写物が最初に同定された。つい最近、ヒトｇａｓ５遺伝子およびマウスｇａｓ５遺伝子の両方が、それらのイントロン配列中に、リボソームＲＮＡのプロセシングに関与する核内低分子ＲＮＡとの相同体を含むことが報告された。本明細書中で、本発明者らは、２つの新規の選択的スプライシングマウスｇａｓ５ｍＲＮＡの発現パターンの同定および分析において、それらのｍＲＮＡが、明確なオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含まないことを報告する。ｇａｓ５　ｃＤＮＡから推論される推定アミノ酸配列に対して生成される抗体の使用では、本発明者らは、培養された細胞またはマウス組織抽出物中にいかなるＧａｓ５タンパク質も検出できなかった。ましてや、推定ＯＲＦが最初の１３個のアミノ酸の後の終止コドンによって妨げられることが明らかにされた（このことに相当してＶＶ領域が遺伝子Ｆ９ＬとＡ３８Ｌとの間に位置される、またはこのことはＶＶ領域が遺伝子Ｆ９ＬとＡ３８Ｌとの間に位置されることに相当する）ラットｇａｓ５遺伝子をクローニングおよび配列決定することによって、ｇａｓ５遺伝子がタンパク質をコードし得ないという決定的な証拠が得られた。末端の１３ｋｂｐ内において、共直線性が乱れ、そして複数のポックスウイルス遺伝子相同体が欠けるまたはより低いパーセンテージのアミノ酸同一性を共有する。これらの相違のほ

とんどは、ウイルス毒性および宿主域に関係してあり得る機能を有する遺伝子および遺伝子ファミリーに関係する。３つのオープンリーディングフレーム（ＳＰＶ０１８、ＳＰＶ０１９およびＳＰＶ０２０）は、ＳＷＰＶについて固有である。系統分析、ゲノム組織、およびアミノ酸同定は、ＳＷＰＶが、カプリポックスウイルスランピースキン病ウイスルと最も密接に関連付けられ、次いでヤタポックスウイスルヤバ様病ウイルスおよびレポリポックスウイルスと関連付けられることを示す。ＳＷＰＶの遺伝子相補体は、Ｃｈｏｒｄｏｐｏｘｖｉｒｉｎａｅサブファミリーの Ｓｕｉｐｏｘｖｉｒｕｓをより良く規定し、そして将来的な遺伝子比較のための基準を提供する。

【０２０７】

別の配列は（研究室表示　１２ＣＸ＃６＿ｒＥ（配列番号５０））は、ｚｆｐ－３６をコードする配列を含む。推定ジンクフィンガータンパク質トリステトラプロリン（ＴＴＰ）をコードする遺伝子であるｚｆｐ－３６は、種々の増殖因子によって線維芽細胞において急速に誘導される。最近の遺伝子ノックアウト実験は、ＴＴＰ欠乏性マウスが関節炎、悪液質、および自己免疫（すべてが過剰の腫瘍壊死因子αによって明らかに媒介される）を発症したことを示した。Ｌａｉらは、Ｚｆｐ－３６の完全な血清誘導能が、プロモーター中の要素を必要とすること；さらに、単一のイントロンの除去が、血清誘導性ＴＴＰ発現を著しく阻害することを示した。Ｌａｉらはまた、イントロンの無関係な配列との置換、あるいはイントロンのうちの９５％を除去するがスプライシング部位は保持すること、各々が、結果として完全な血清誘導性発現のうちのそれぞれ約４５％および約１９％の維持を生じたことを示した。さらに、イントロン配列塩基対６０１－６５５の欠失は、ＴＴＰの血清誘導性発現を６５％まで減少させた。配列塩基対６１８－６２６は、転写因子Ｓｐ１に特異的に結合した；この結合モチーフの変異体は、ＴＴＰ発現を７０％まで減少させた。このことは、このモチーフに結合するＳｐ１が、Ｚｆｐ－３６の血清誘導に寄与することを示唆する（Ｌａｉら）。

【０２０８】

別の配列（研究室表示　１２ＣＸＹ＃７＿ｒＥ（配列番号６２））は、プロテアーゼセリン１１またはＰＲＳＳ１１をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＨＴＲＡ；Ｅ．ｃｏｌｉ　ＨＴＲＡの相同体；ＨＴＲＡ；ＨＴＲＡ１として公知であり、そして染色体位置１０ｑ２５．３－ｑ２６．２に位置付けられる。

【０２０９】

インスリン様増殖因子（ＩＧＦ；１４７４４０を参照のこと）は、膨大な数の細胞型の増殖および分化を刺激する。その増殖因子の作用は、ＩＧＦ、２　ＩＧＦレセプター（例えば、１４７３７０）、７つの異なるＩＧＦ結合タンパク質（ＩＧＦＢＰ；１４６７３０を参照のこと）、およびＩＧＦＢＰを切断するいくつかのプロテアーゼのうちの少なくとも２つの異なる形態を含む、成分の複雑な系によって媒介されかつ調節される。

【０２１０】

ＺｕｍｂｒｕｎｎおよびＴｒｕｅｂ（１９９６）は、ヒトタンパク質についてのＬ５６と名付けたｃＤＮＡをクローン化し、そのｃＤＮＡはＩＧＦシグナル伝達系の一部であるようであった。予測されたタンパク質は、５１ｋＤの分子質量を有する４８０個のアミノ酸のポリペプチドをコードする。ＺｕｍｂｒｕｎｎおよびＴｒｕｅｂ（１９９６）は、ＰＲＳＳ１１が、分泌のシグナル配列、ＩＧＦＢＰ結合ドメイン、およびセリンプロテアーゼドメインを含むことを見出した。セリンプロテアーゼドメインは、特定の細菌性セリンプロテアーゼと最も類似している。ノーザンブロット分析によって、ＺｕｍｂｒｕｎｎおよびＴｒｕｅｂ（１９９６）は、ＰＲＳＳ１１が、種々のヒト組織において発現され、胎盤において最も強く発現されることを示した。

【０２１１】

Ｈｕら（１９９８）もまた、ＰＲＳＳ１１をクローン化した。推定４８０個のアミノ酸のタンパク質は、ウシ、モルモット、およびウサギのタンパク質と９８％同一である。それは、保存されたＫａｚａｌ型セリンプロテアーゼモチーフを有するＭＡＣ２５（ＩＧＦＢＰ７；６０２８６７）に相同なＮ末端、ならびにＣ末端ＰＤＺドメインを含む。半定量

的なＲＴ－ＰＣＲおよびイムノブロット分析は、コントロールと比較して骨関節炎軟骨中のＰＲＳＳ１１について約７倍の増加を示した。機能的分析および変異分析は、ＰＲＳＳ１１が位置３２８でのセリンの存在に依存するセリンプロテアーゼであることを示した。

【０２１２】

蛍光インサイチュハイブリダイゼーションを使用して、ＺｕｍｂｒｕｎｎおよびＴｒｕｅｂ（１９９７）は、ＰＲＳＳ１１遺伝子を１０ｑ２５．３－ｑ２６．２に位置付けた。

【０２１３】

別の配列（研究室表示　１２ＰＳＡ＃６－ｒＥ（配列番号４））は、真核生物翻訳開始因子３θをコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＥＩＦ３－θ、ｐ１８０サブユニット、ＥＩＦ３、ｐ１７０サブユニット、細胞質タンパク質ｐ１６７、ＣｅｎｔｒｏｓｏｍｉｎＢのマウス相同体として公知である。この配列は、染色体位置１０ｑ２６に位置付けられる。

【０２１４】

真核生物翻訳開始因子（ＥＩＦ）は、ｍＲＮＡからタンパク質合成を始める。６５０ｋＤでのＥＩＦは、ＥＩＦで最も大きい。Ｊｏｈｎｓｏｎら（１９９７）によると、ＥＩＦ３は、いくつかの役割（４０Ｓリボソームサブユニットおよび他のＥＩＦに結合することを含む）に関係し、おそらく４０Ｓサブユニットへの最初の結合、そしてその後のＡＵＧ開始コドンの同定のために因子を整列させる。ＥＩＦ３タンパク質合成開始因子は、少なくとも８つのサブユニットからなり、その最大のものはｐ１８０である。

【０２１５】

別の配列（研究室表示　１２＿３Ｂ＃２＿Ｌａｃ（配列番号２１８））は、ユビキチン活性化酵素Ｅ１ＣまたはＵＢＥ１Ｃをコードする配列を含む。このタンパク質はまた、Ｓ．Ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、ユビキチン活性化酵素３の相同体、ＵＢＡ３として公知である。この配列は、ヒト染色体座位３ｐ１４に位置付けられる。

【０２１６】

ユビキチン（１９１３２０）は、Ｅ１（ユビキチン活性化）酵素、Ｅ２（ユビキチン接合）酵素、およびＥ３（ユビキチン連結）酵素からなる複数の酵素系によって、標的タンパク質に共有結合される。Ｏｓａｋａら（１９９８）は、ユビキチン様タンパク質であるＮＥＤＤ８（６０３１７１）が、ユビキチン化に類似の様式でタンパク質に接合されることを見出した。彼らは、ＡＰＰ－ＢＰ１（βアミロイド前駆タンパク質結合性タンパク質－１）が、ウサギ網状赤血球溶菌液中のＮＥＤＤ８に結合し得ることを見出した。しかし、ＡＰＰ－ＢＰ１がＥ１酵素のＮ末端ドメインのみに対して類似性を示すので、本発明者らは、ＡＰＰ－ＢＰ１が、Ｅ１酵素のＣ末端領域に対して類似性を示すタンパク質と相互作用する必要があると推論した。配列データベースを検索することによって、Ｏｓａｋａら（１９９８）は、酵母Ｕｂａ３のヒト相同体であるＵＢＡ３をコードするｃＤＮＡを同定した。予測された４４２個のアミノ酸のＵＢＡ３タンパク質は、酵母Ｕｂａ３と４３％配列同一性を有する。インビトロでは、ＵＢＡ３は、ＡＰＰ－ＢＰ１と複合体を形成し、かつＮＥＤＤ８とチオエステル架橋を形成する。Ｏｓａｋａら（１９９８）は、ＡＰＰ－ＢＰ１／ＵＢＡ３複合体が、ＮＥＤＤ８の活性化についてＥ１様酵素として機能することを示唆した。

【０２１７】

別の配列（研究室表示　１２＿４Ｂ＃７ｒＥ（配列番号２１））は、ロタマーゼ（ｒｏｔａｍａｓｅ）、シクロフィリンＡまたはシクロスポリンＡ結合性タンパク質としても公知の、ペプチジル－プロリルシス－トランスイソメラーゼＡ（ＰＰＩＡＳＥ）をコードする配列を含む。このタンパク質は、染色体位置９ｑ３１．３に位置付けられる。

【０２１８】

ヒヨコマメシクロフィリン様抗菌類タンパク質（ＣＬＡＰ）と称されるタンパク質は、ヒヨコマメ（Ｃｉｃｅｒ　ａｒｉｅｔｉｎｕｍ）の種から単離された。ヒヨコマメＣＬＡＰは、１８ｋＤａの分子量およびシクロフィリンと相同なＮ末端配列によって特徴付けられた。そのタンパク質は、Ａｆｆｉゲルの青色ゲルでのアフィニティークロマトグラフィ

ー、およびＣＭ－セファロースでのイオン交換クロマトグラフィーを含む手順を用いて単離された。Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ、Ｍｙｃｏｓｐｈａｅｒｅｌｌａ ａｒａｃｈｉｄｉｃｏｌａおよびＢｏｔｒｙｔｉｓ ｃｉｎｅｒｅａを含む真菌の増殖にに対する阻害効果に加えて、そのタンパク質は、ヒト免疫不全症ウイルス－１逆転写酵素を阻害する能力を有した。ヒヨコマメＣＬＡＰは、レクチン活性およびリボヌクレアーゼ活性を備えなかったが、ウサギ網状赤血球溶菌液系における翻訳を弱く阻害した。そのタンパク質は、マウス脾細胞による３Ｈ－チミジン取り込みを刺激した。

【０２１９】

シクロフィリンＡは、免疫抑制シクロスポリンＡ（ＣｓＡ）の標的であり、酵母からヒトまで保存される単一の固有の遺伝子によってコードされる。病原真菌Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓにおいて、２つの相同な連鎖遺伝子であるＣＰＡ１およびＣＰＡ２が、２つの保存されたシクロフィリンＡタンパク質をコードすることが見出された。シクロフィリンＡ突然変異がほとんど他の表現型にＣｓＡ抵抗を与えない、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅとは対照的に、シクロフィリンＡ突然変異は、Ｃ．ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓにおいて劇的な表現型を与えた。Ｃｐａ１シクロフィリンＡタンパク質およびＣｐａ２シクロフィリンＡタンパク質は、細胞増殖、細胞交接、細胞毒性およびＣｓＡ毒性において共有の役割を果たす。Ｃｐａ１タンパク質およびＣｐａ２タンパク質はまた、種々の機能を有する。Ｃｐａ１変異体は、３９℃で生存不能であり、毒性について減衰するのに対して、Ｃｐａ２変異体は、３９℃で生存可能であり完全に有毒である。Ｃｐａ１ Ｃｐａ２二重変異体は、増殖および毒性において合成的欠陥を示した。シクロフィリンＡ活性部位変異体は、周囲でＣｐａ１ Ｃｐａ２変異体の増殖を復元したが、より高い温度では復元しなかった。このことは、シクロフィリンＡのプロリルイソメラーゼ活性が、インビトロでの機能を有することを示唆した。

【０２２０】

別の配列（研究室表示 １２＿Ｌ２４＿５＿３－Ｌａｃ（配列番号２８３））は、ＨＣＫおよびＫＩＡＡ０２５５としても公知の、造血細胞キナーゼをコードする配列を含む。この配列は、遺伝子マップの遺伝子座２０ｑ１１－ｑ１２に位置付けられる。この遺伝子はまた、この領域におけるネガティブな鎖を崩壊し、そして未知の遺伝子を崩壊させる。

【０２２１】

ヒトＳＲＣ（１９００９０）を表すｃＤＮＡクローンについての調査の間に、Ｑｕｉｎｔｒｅｌｌら（１９８７）は、ＳＲＣに類似のタンパク質－チロシンキナーゼをコードするようである、以前に認知されていない遺伝子に遭遇した。Ｚｉｅｇｌｅｒら（１９８７）は、異なる経路によって同一の遺伝子を見出した。この遺伝子の発現は、特定の造血細胞に限定され得、特に骨髄性の系統、特に好中球および単核細胞の細胞において顕著である。従って、Ｑｕｉｎｔｒｅｌｌら（１９８７）は、造血細胞キナーゼとして遺伝子ＨＣＫ（「ヒック（ｈｉｃｋ）」と発音される）と称した。彼らは、ＨＣＫについてのほとんどまたはすべてのｍＲＮＡ、ＨＣＫによってコードされるタンパク質の推定アミノ酸配列、および種々の造血細胞間でＨＣＫから転写されるＲＮＡの分布を表す、ｃＤＮＡクローンのヌクレオチド配列を記載した。分類された染色体のスポット－ブロット分析およびインサイチュハイブリダイゼーションによって、Ｑｕｉｎｔｒｅｌｌら（１９８７）は、ＨＣＫ遺伝子を２０ｑ１１－ｑ１２に割り当てた。この領域は、いくつかの急性骨髄性白血病および骨髄増殖性障害の中間部欠失によって影響を受けるため、彼らは、ＨＣＫに対する損傷がこれらの状態の発病学に寄与し得ることを示唆した。

【０２２２】

別の配列（研究室表示 Ｌ２４＿５＿２ＢＥ－ｒＥ（配列番号２０８））は、肝細胞核因子３－β（ＨＮＦ３Ｂ）（Ｋａｅｓｔｎｅｒら）をコードする配列を含む。この配列は、遺伝子マップの遺伝子座２０ｐ１１に位置付けられる。

【０２２３】

Ｄｅｌｅｕｚｅら（１９９４）は、胎生期の腸の派生物における胚形成の間の肝臓核因子３－βの発現パターン、およびＡＧＳが位置するヒト第２０染色体とシンテニーな領域

におけるマウス染色体２（Ａｖｒａｈａｍら、１９９２）に対する肝臓核因子３－βの局在化を理由に、アラジル症候群（ＡＧＳ；１１８４５０）のための候補遺伝子として、肝臓核因子３－βを調査した。彼らは、ＡＧＳの欠失の事例において、その遺伝子が欠失されないことを見出した。欠失細胞におけるＨＮＦ３Ｂ遺伝子の存在は、蛍光インサイチュハイブリダイゼーションによる蛍光ではなく、サザンブロットハイブリダイゼーションによって確立された；従って、第２０染色体に対するヒト遺伝子の割り当ては、相同性のみに基づいた。

【０２２４】

Ｍｉｎｃｈｅｖａら（１９９７）は、蛍光インサイチュハイブリダイゼーションを使用して、ＨＮＦ３Ｂ遺伝子をヒト染色体２０ｐ１１に位置付けた。

【０２２５】

別の配列は、Ｄｉｓｃｓ　Ｌａｒｇｅ５のショウジョウバエ相同体；ＤＬＧ５をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、胎盤ＤＬＧおよび前立腺ＤＬＧならびにＰＤＬＧとして公知である。この配列は、遺伝子マップの遺伝子座１０ｑ２３に位置付けられる。

【０２２６】

ショウジョウバエｄｉｓｃｓ　ｌａｒｇｅ（ｄｌｇ）遺伝子の脊椎動物相同体は、ＭＡＧＵＫ（膜関連グアニル酸キナーゼ）ファミリーのメンバーである。ＭＡＧＵＫタンパク質は、ＰＤＺモチーフ、ＳＨ３ドメイン、およびグアニル酸キナーゼ（ＧＵＫ）相同性の領域を含む。ＰＤＺドメインおよびＧＵＫドメインの両方は、タンパク質－タンパク質相互作用に関与すると考えられる。ショウジョウバエｄｌｇに関係する配列についてＥＳＴデータベースを検索することによって、Ｎａｋａｍｕｒａら（１９９８）は、新規のヒト相同体をコードするｃＤＮＡを同定した。ノーザンブロット分析が、９．４－ｋｂの転写が胎盤および前立腺、ならびにいくつかの他の組織において高度に発現されることを明らかにし、このことが、この著者らをその遺伝子をＰＤＬＧ（胎盤および前立腺ＤＬＧ）と称するように導いた。甲状腺においてさらなる８．８－ｋｂ　ＰＤＬＧ　ｍＲＮＡが検出された。予測された８５９個のアミノ酸のＰＤＬＧタンパク質は、３つのＰＤＺドメイン、１つのＳＨ３ドメイン、および１つのＧＵＫ領域を含む。ＰＤＬＧは、ＤＬＧ１（６０１０１４）およびショウジョウバエｄｌｇに対して、それぞれ、４５％同一性および４０％同一性である。ヒト前立腺組織および種々の細胞株の抽出物に関するウエスタンブロット分析は、ＰＤＬＧが１０５ｋＤの見かけの分子量を有することを示した。免疫蛍光法実験は、ＰＤＬＧが細胞膜および細胞質に局在化し、正常な前立腺組織の腺上皮細胞では発現されるが前立腺細胞株では発現しないことを示した。酵母ツーハイブリッドスクリーンを使用して、Ｎａｋａｍｕｒａら（１９９８）は、ＰＤＬＧが、パルミトイル化された赤血球膜ＭＡＧＵＫタンパク質であるｐ５５（ＭＰＰ１；３０５３６０）のＧＵＫドメインと相互作用することを決定した。この著者らは、ＰＤＬＧおよびｐ５５が、細胞膜でヘテロマーＭＡＧＵＫ複合体を形成し、そして種々の細胞内分子をクラスター形成し、上皮細胞の構造を維持する役割および細胞外シグナルを膜および細胞骨格に伝達する役割を果たすことを示唆した。

【０２２７】

独立して、Ｎａｇａｓｅら（１９９８）は、ＤＬＧ５　ｃＤＮＡであるＫＩＡＡ０５８３を同定した。照射ハイブリッド分析によって、彼らは、ＤＬＧ遺伝子を第１０染色体に位置付けた。同様の技術を使用して、Ｎａｋａｍｕｒａら（１９９８）は、ＤＬＧ５遺伝子の座位を１０ｑ２３に洗練した。

【０２２８】

別の配列（研究室表示　Ｌ２８ＡＰ＿ｒＥ（配列番号１７２））は、転写伸長因子Ｂ、３またはＴＣＥＢ３をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＥｌｏｎｇｉｎＡおよびＥｌｏｎｇｉｎ、１１０－ＫＤとして公知である。この配列は、染色体座位１ｐ３６．１に位置付けられる。

【０２２９】

真核生物の転写およびｍＲＮＡ合成は、転写の開始段階および伸長段階の両方でＲＮＡポリメラーゼＩＩの活性を調節する一連の一般の転写因子の協調作用によって、部分的に制御される複雑な生化学プロセスである。Ａｓｏら（１９９５）は、いくつかの一般の開始因子（ＴＦＩＩＡ（６００５２０を参照のこと）、ＴＦＩＩＢ（１８９９６３）、ＴＦＩＩＤ（３１３６５０を参照のこと）、ＴＦＩＩＥ（１８９９６２を参照のこと）、およびＴＦＩＩＨ（１８９９７２を参照のこと）を含む）およびいくつかの補助タンパク質（例えば、ＴＡＦ；６００４７５を参照のこと）が、真核生物の細胞において同定され、ＲＮＡポリメラーゼＩＩのプロモーターへの選択的結合を促進しかつ転写の基礎レベルを支持することが見出されていることに着目した。

【０２３０】

Ａｓｏら（１９９６）は、ヒト相同体をコードする完全長のｃＤＮＡを記載した。予測された７２２個のアミノ酸のタンパク質は、ラットタンパク質と８４％相同性を共有する。ヒトｃＤＮＡのオープンリーディングフレームと、以前に特徴付けされたラットｃＤＮＡのオープンリーディングフレームとの比較は、それらがヌクレオチド配列において８４％保存されていることを示した。

【０２３１】

Ｄｕａｎら（１９９５）およびＫｉｂｅｌら（１９９５）は、ｖｏｎ　Ｈｉｐｐｅｌ－Ｌｉｎｄａｕ腫瘍サプレッサー遺伝子産物（１９３３００）の腫瘍抑制活性が、ＴＣＥＢ２およびＴＣＥＢ１に結合し、転写伸長を阻害するその能力の関数であることを示唆する結果を報告した。

【０２３２】

蛍光インサイチュハイブリダイゼーションによって、Ａｓｏら（１９９５）は、ＴＣＥＢ３遺伝子を１ｐ３６．１に位置付けた。彼らは、この領域がいくつかの悪性の形態における欠失を有することを示唆していると指摘した。

【０２３３】

別の配列（研究室表示　１４Ａ７ｒＥ（配列番号１１３））は、Ｍｏｔｈｅｒｓ抗Ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃ、またはジョウジョウバエ、相同体、７またはＭＡＤＨ７をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＳＭＡ関連タンパク質７およびＭＡＤ関連タンパク質７；ＳＭＡＤ７として公知である。この配列は、遺伝子マップの遺伝子座１８ｑ２１．１に位置付けられる。

【０２３４】

元々はショウジョウバエにおいて同定されたＭＡＤタンパク質は、トランスフォーミング増殖因子βレセプターファミリー（例えば、ＴＧＦＢＲ１；１９０１８１）のシグナル伝達経路の必須成分である。複数の可溶化刺激および生体力学的刺激に供された培養された内皮細胞におけるディファレンシャルディスプレイ方法を使用して、Ｔｏｐｐｅｒら（１９９７）は、ＭＡＤＨ７をコードするヒト内皮細胞ｃＤＮＡを単離し、それをＳＭＡＤ７と呼んだ。予測された４２６個のアミノ酸のＭＡＤＨ７タンパク質は、他のＭＡＤタンパク質に存在するＣ末端推定リン酸化部位を欠いており、このことは、ＭＡＤＨ７タンパク質が明確に調節され得ることを示唆する。ヒト組織におけるインサイチュハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学分析は、ＭＡＤＨ７が脈管内皮において主に発現されることを示した。本発明者らは、ＭＡＤＨ７およびＭＡＤＨ６（６０２９３１）が内皮細胞において複合体を形成し得ることを証明した。ＭＡＤＨ７は、流体の機械的な力によって培養された血管内皮において誘導され、インビトロでの体液刺激および生体力学的刺激の両方に関して内皮遺伝子発現を調節する能力を有した。

【０２３５】

Ｋａｖｓａｋら（２０００）は、Ｅ３ユビキチンリガーゼＳＭＵＲＦ２（６０５５３２）が、ＳＭＡＤ７と本質的に関連することを見出した。ＳＭＵＲＦ２は核であるが、ＳＭＡＤ７への結合が活性化ＴＧＦＢＲへの輸出および補充を誘導し、このことが、プロテアソームの経路およびリソソームの経路を経たレセプターの劣化およびＳＭＡＤ７の劣化を引き起こした。ＳＭＡＤ７の発現を刺激するγ－インターフェロン（ＩＦＮＧ；１４７５

７０）は、ＳＭＡＤ７－ＳＭＵＲＦ２複合体形成を誘導し、そしてＴＧＦＢＲ代謝回転を増加した。このことは、ＳＮＡＤ７またはＳＭＵＲＦ２発現をブロックすることによって安定化される。さらに、レセプターにＳＭＵＲＦ２の補充を妨害されたＳＭＡＤ７変異体は、それらの阻害活性に障害を生じた。これらの研究は、劣化についてＴＧＦＢＲを標的とするＥ３ユビキチンリガーゼ複合体におけるアダプタとして、ＳＭＡＤ７を規定した。

【０２３６】

Ｌａｌｌｅｍａｎｄら（２００１）は、安定してＳＭＡＤ７を発現する細胞が、ＴＧＦＢ（１９０１８０）、ＴＮＦＡ（１９１１６０）、血清離脱、または細胞接着（ａｎｏｉｋｉｓ）の損失によって誘発されるアポトーシスに対する感受性を増加されたことを示した。ＳＭＡＤ７は、ＮＦＫＢ（１６４０１１）活性を減少させ、増加されたアポトーシスについての機構を提供した。安定なＲＡＳ（１９００２０）の発現は、ＮＦＫＢのＳＭＡＤ７抑制およびアポトーシスのＳＭＡＤ７増強を抑制した。

【０２３７】

体細胞ハイブリッド分析によって、Ｔｏｐｐｅｒら（１９９７）は、ＭＡＤＨ７遺伝子をヒト第１８染色体に位置付けた。ＦＩＳＨによって、Ｒｏｉｊｅｒら（１９９８）は、その局在を１８ｑ２１．１に洗練した。

【０２３８】

別の配列（研究室表示　１４Ｃ＿２Ｅ／ｒＥ（配列番号１２６））は、シグナル認識粒子である１９－ＫＤ（ＳＲＰ１９）をコードする配列を含む。この配列は、遺伝子マップの遺伝子座５ｑ２１－ｑ２２に位置付けられる。

【０２３９】

シグナル認識粒子（ＳＲＰ）は、小胞体（ＥＲ）に対するタンパク質の標的化を媒介する、リボヌクレオタンパク質複合体である。その複合体は、７Ｓ（または７ＳＬ）ＲＮＡおよび６つの異なるタンパク質（ＳＲＰ９（６００７０７）、ＳＲＰ１４（６００７０８）、ＳＲＰ１９、ＳＲＰ５４（６０４８５７）、ＳＲＰ６８（６０４８５８）、およびＳＲＰ７２（６０２１２２））からなる。そのタンパク質は、単量体（ＳＲＰ１９およびＳＲＰ５４）またはヘテロ二量体（ＳＲＰ９／ＳＲＰ１４およびＳＲＰ６８／ＳＲＰ７２）として７Ｓ　ＲＮＡに結合される。ＳＲＰ９およびＳＲＰ１４は、７ＳのＡｌｕドメインを構成し、一方、他の４つのタンパク質は、Ｓドメインに属する。ＳＲＰは、タンパク質サブユニットに関係付けられ得る少なくとも３つの別個の機能（シグナル認識、翻訳阻止、およびドッキングタンパク質との相互作用によるＥＲ膜標的化）を有する。

【０２４０】

抗ＳＲＰ１９プローブを用いる肝臓ｃＤＮＡライブラリーのスクリーニングによって、Ｌｉｎｇｅｌｂａｃｈら（１９９８）は、１４４個のアミノ酸のタンパク質をコードするヒトＳＲＰ１９　ｃＤＮＡを単離した。配列分析は、ＳＲＰ１９が、２つのグリシン残基によって割り込まれる非常に基本的なＣ末端ドメインの７つのリジン残基を含むことを示した。ノーザンブロット分析は、ＨｅＬａ細胞における０．９ｋｂの転写物の発現を明らかにした。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析は、ＳＲＰ１９が、大きさではイヌのＳＲＰ１９と同一の１９－ｋＤタンパク質として発現されることを示した。機能分析は、ＳＲＰ１９タンパク質がイヌの膵臓において７ＳＬ　ＲＮＡに結合することを決定した。

【０２４１】

腺種様のポリポーシス大腸菌（ＡＰＣ；１７５１００）を有する患者においてＪｏｓｌｙｎら（１９９１）によって同定された、１００～２６０ｋｂの２つのネスト化欠失において、Ｇｒｏｄｅｎら（１９９１）は、第５染色体における約１００ｋｂの幅の３つの遺伝子を同定した。これらのうちの１つは、ＤＰ１（１２５２６５）であり；第２は、ＡＰＣ（１７５１００）における変異体で、彼らによりＤＰ２．５と呼ばれる遺伝子であった。第３は、ＳＲＰ１９の配列と同一の配列を有することが見出された遺伝子であった。ＳＲＰ１９は、５つのエキソンを有し、かつＤＰ１とＤＰ２．５との間にあることが示された。Ｈｏｒｉｉら（１９９３）は、ＡＰＣ遺伝子内だけでなくＡＰＣ遺伝子と隣接するＳＲＰ１９遺伝子との間での選択的スプライシングの発生を考察した。

【０２４２】
Ｗｉｌｄら（２００１）は、ＳＲＰ　ＲＮＡのヘリックス６における第１の結合部位を有する複合体におけるヒトＳＲＰ１９についての１．８Åの解像度の結晶構造を報告し、その構造は、異常なＧＧＡＧテトラループによって閉じられたステム－ループ構造からなっていた。タンパク質－ＲＮＡ相互作用は、いかなる直接的なタンパク質－塩基接触もなしに、広げられた深い方の溝およびそのテトラループの特異的認識によって媒介され、そして高度に順序づけられた水分子の複雑な網目を含む。Ｗｉｌｄら（２００１）は、結晶学的データおよび生化学データに基づいて、ＳＲＰ１９、ＳＲＰ５４、およびＳＲＰ　ＲＮＡを含む、ＳＲＰ核の集合体のモデルを提案した。
【０２４３】
別の配列（研究室表示　１４Ｃ＿２４＿＃６＿Ｌａｃ（配列番号４７））は、ＦＥＲ－１、Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ、相同体様３；ＦＥＲ１ＬＬ３をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ミオフェーリン（ｍｙｏｆｅｒｌｉｎ）またはＭＹＯＦとして公知である。この配列は、遺伝子マップの遺伝子座１０ｑ２３．３２に位置付けられる。
【０２４４】
肢帯筋ジストロフィー２Ｂ座位（ＬＧＭＤ２Ｂ；２５３６０１）の遺伝子産物であるジスフェーリン（ｄｙｓｆｅｒｌｉｎ）（ＤＹＳＦ；６０３００９）は、Ｃａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ　ｅｌｅｇａｎｓ　ｆｅｒ－１に対する相同性を有する膜関連タンパク質をコードする。ジスフェーリンにおける変異を有するヒトは、近位筋肉および遠位筋肉の両方に影響を及ぼす筋肉虚弱が発生する。著しいことに、ＬＧＭＤ２Ｂ患者におけるその表現型は高度に可変的であるが、ＤＹＳＦにおける変異の型はこの表現型の可変性を説明しない。電子データベース検索を通して、Ｄａｖｉｓら（２０００）は、彼らがミオフェーリンと名付けたジスフェーリンに対して、高度に相同的なタンパク質を同定した。ミオフェーリンのオープンリーディングフレームは、２，０６１個のアミノ酸のタンパク質が予測した。ノーザンブロット分析によって、この著者らは、心筋において高度に発現されかつ骨格筋ではより低い程度である、７．５－ｋｂミオフェーリンｍＲＮＡ転写物を観察した。しかし、ミオフェーリンに対して生じる抗体は、心筋と骨格筋の両方においてミオフェーリン（分子量２３０ｋＤ）の大量発現を示した。細胞内において、ミオフェーリンは、細胞膜に関連付けられるが、ジスフェーリンとは異なり、ミオフェーリンはまた核膜と関連付けられる。フェーリンファミリーメンバーは、Ｃ２ドメインを含み、そしてこれらのドメインは、カルシウム媒介性膜融合現象において役割を果たす。このことを調査するために、Ｄａｖｉｓら（２０００）は、ジストロフィンを欠き、かつその筋肉が退化と再生の反復ラウンドを実施されたｍｄｘマウスにおける、ミオフェーリンの発現を研究した。彼らは、ｍｄｘ骨格筋における膜でのミオフェーリンのアップレギュレーションを見出した。Ｄａｖｉｓら（２０００）は、筋ジストロフィーおよび心筋症についての候補遺伝子として、あるいはおそらく筋ジストロフィー表現型の修飾物質であるとして、ミオフェーリン（ＭＹＯＦ）を示唆した。
【０２４５】
別の配列（研究室表示　１４＿７＃２Ｅ－ｒＥ（配列番号５および配列番号１１５））は、α－１，３－@マンノシル－糖タンパク質β－１，２－Ｎ－アセチルグルコサミンイルトランスフェラーゼまたはＭＧＡＴ１をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＧｌｃＮＡｃ－ＴＩ、ＭＧＡＴ、ＵＤＰ－Ｎ－アセチルグルコサミン：α－３－Ｄ－マンノシドβ－１，２－Ｎ－アセチルグルコサミンイルトランスフェラーゼＩ（ＧＬＣＴ１）として公知である。この配列は、遺伝子マップの遺伝子座５ｑ３５に位置付けられる。
【０２４６】
１００個以上の異なるグリコシルトランスフェラーゼが、タンパク質結合性オリゴ糖および脂質結合性オリゴ糖の合成に関与すると考えられている。これらのうちの１つである、ＵＤＰ－Ｎ－アセチルグルコサミン：α－３－Ｄ－マンノシドβ－１，２－Ｎ－アセチルグルコサミンイルトランスフェラーゼＩ（ＧｌｃＮＡｃ－ＴＩ；ＥＣ　２．４．１．１０１）は、ハブリッドＮ－グリカンおよび複合体Ｎ－グリカンの合成のために必須の内側

ゴルジ酵素である。ＫｕｍａｒおよびＳｔａｎｌｅｙ（１９８９）は、Ｌｅｃ１　チャイニーズハムスターの卵巣（ＣＨＯ）細胞変異体において欠損するグリコシル化の相補性によってＮ－アセチルグルコサミンイルトランスフェラーゼＩをコードする、ヒト遺伝子を同定した。Ｋｕｍａｒら（１９９０）は、その遺伝子をクローン化した。そのｃＤＮＡの全体的な特徴および推測されるタンパク質配列（４４５個のアミノ酸）は、ＩＩ型膜貫通タンパク質である他のゴルジトランスフェラーゼの代表的なものであった。Ｈｕｌｌら（１９９１）は、ＧｌｃＮＡｃ－ＴＩについての単一の２．５－ｋｂエキソンを含む１８ｋｂの幅の、２つの重複するゲノムＤＮＡクローンを単離した。そのエキソンは、５－プリン非翻訳領域、完全なコード配列（１，３３５塩基、４４５アミノ酸）、および完全な３－プリン非翻訳領域のほとんどを含む。サザンブロット分析は、その遺伝子（ＧＬＣＴ１で表される）が、ヒトゲノムにおいて単一の複製物の状態で存在することを示し、そしてヒト－ハムスター体細胞ハイブリッドの研究は、その遺伝子が第５染色体に位置されることを示した。Ｐｏｗｎａｌｌら（１９９２）は、マウス遺伝子Ｍｇａｔ１の配列が、ヒト相同体およびウサギ相同体に関して高度に保存され、かつ単一のタンパク質コード化エキソンとして存在することを実証した。彼らは、多座種間戻し交配の分析によって、その遺伝子を、ＩＬ３（１４７７４０）をコードする遺伝子と密接に関連するマウス第１１染色体に位置付けた。従って、ヒト遺伝子は、ＩＬ３と同一の領域（すなわち、５ｑ２３－ｑ３１）内にあり得る。Ｋｕｍａｒら（１９９２）は、インサイチュハイブリダイゼーションによって、その遺伝子を５ｑ３１．２－ｑ３１．３に位置付けた。Ｔａｎら（１９９５）は、蛍光インサイチュハイブリダイゼーションによって、ＭＧＡＴ１遺伝子が５ｑ３５に位置付けられることを報告した。彼らは、放射活性インサイチュハイブリダイゼーションと比較された蛍光分析の卓越した精度に起因して、Ｋｕｍａｒら（１９９２）の知見が有する矛盾を考慮した。Ｓｈｏｗｓ（１９９９）は、１９９２年の報告（Ｋｕｍａｒら、１９９２）において使用された技術よりも感度のよいＦＩＳＨ技術を使用することによって、彼およびその共同研究者が、ＭＧＡＴ１遺伝子の５ｑ３５への割り当てを確認したと主張した。

【０２４７】

別の配列（研究室表示　１９＿９ＢＥ＿ｒＥ（配列番号１２３））は、切断刺激因子、３－ｐｒｉｍｅ　ｐｒｅ－ＲＮＡ、サブユニット２、６４－ＫＤ（ＣＳＴＦ２）をコードする配列を含む。この配列は、ヒト染色体Ｘｑ２１．３３に位置付けられる。

【０２４８】

ｍＲＮＡのポリアデニル化は、３つの切断刺激因子（ＣＳＴＦ１、６００３６９；ＣＳＦＴ２、およびＣＳＴＦ３、６００３６７）を含む複数のタンパク質因子を必要とする複雑なプロセスである。６４－ｋＤのタンパク質であるＣｓｔＦ２は、Ｎ末端領域におけるリボヌクレオタンパク質（ＲＮＰ）型ＲＮＡ結合ドメインを含む（Ｔａｋａｇａｋｉら、１９９２）。Ｅ．ｃｏｌｉにおいて発現されるＣｓｔＦ２タンパク質は、ポリアデニル化シグナル配列（ＡＡＵＡＡＡ）を含むＲＮＡに対して架橋され得る。

【０２４９】

１つのＣＳＴＦサブユニット（ＣＳＴＦ－６４）の濃度は、Ｂ細胞の活性化の間に増加し、このことは、膜結合形態から分泌形態まで、ＩｇＭ重鎖ｍＲＮＡ発現を転換するのに十分である（Ｔａｋａｇａｋｉら、１９９６）。この観察を拡大するために、ＴａｋａｇａｋｉおよびＭａｎｌｅｙ（１９９８）は、ニワトリＢ細胞株ＤＴ４０中で内因性ＣｓｔＦ－６４遺伝子を分裂させ、そしてそれを調節可能な導入遺伝子で置換した。著しいことに、ＣｓｔＦ－６４濃度における１０分の１の減少は、細胞増殖には顕著に影響しなかったが、ＩｇＭ重鎖ｍＲＮＡの蓄積を、特にかつ劇的に減少させた。さらなる減少は、Ｇ０／Ｇ１期における可逆的な細胞回転停止を引き起こしたが、欠乏はアポトーシス的な細胞死の結果を生じた。

【０２５０】

別の配列（研究室表示　１Ａ＿Ａ５４９＿６－ｒＥ（配列番号３１０））は、ＲｅｔＦｉｎｇｅｒタンパク質２（ＲＥＰ２）をコードする配列を含む。このタンパク質はまた

、ＬＥＵ５として公知である。この配列は、遺伝子マップの遺伝子座１３ｑ１４．３に位置付けられる。

【０２５１】

Ｂ細胞慢性リンパ性白血病は、しばしば網膜芽腫遺伝子（ＲＢ１；１８０２００）と座位Ｄ１３Ｓ２５（Ｌｉｕら、１９９３；Ｌｉｕら、１９９５）との間の染色体１３ｑ１４上における、領域の損失と関連付けられる。このことは、腫瘍サプレッサー遺伝子が、この領域内に位置され得ることを示唆する。最小の欠失領域に相当するコスミドコンティーグを構築し、プレ－Ｂリンパ球ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることによって、Ｋａｐａｎａｄｚｅら（１９９８）は、いくつかのクローンを単離し、そのうちの１つは、予測される４０７個のアミノ酸のタンパク質であるＲＦＰ２をコードするＯＲＦを含み、彼らはそれをＬＥＵ５と呼んだ。ＲＦＰ２は、ＲＩＮＧ型のジンクフィンガードメインを含み、そしてＲＥＴフィンガータンパク質（ＲＦＰ；６０２１６５）および腫瘍サプレッサー遺伝子ＢＲＣＡ１（１１３７０５）と有意な相同性を共有する。Ｋａｐａｎａｄｚｅら（１９９８）は、ＲＦＰ２遺伝子を最小の欠失領域の境を接するＤ１３Ｓ２７２の近隣に位置付けた。

【０２５２】

別の配列（研究室表示　３１＿３＿５＿ｒＥ（配列番号１５８））は、ジンクフィンガータンパク質２０７（ＺＮＦ２０７）をコードする配列を含む。この配列は、遺伝子マップの遺伝子座６ｐ２１．３に位置付けられる。

【０２５３】

Ｐａｈｌら（１９９８）は、彼らがＺＮＦ２０７と称したタンパク質をコードするヒト血管平滑筋細胞ｃＤＮＡを単離した。予測される４７８個のアミノ酸のタンパク質は、ほぼ２０％のプロリン残基で構成され、かつＮ末端よび２　Ｃ２Ｈ２ジンクフィンガーモチーフでの強力な核局在化シグナルを含む。ノーザンブロット分析は、ＺＮＦ２０７が遍在的に発現されることを明らかにした。

【０２５４】

蛍光インサイチュハイブリダイゼーションによって、Ｐａｈｌら（１９９８）は、ＺＮＦ２０７遺伝子を６ｐ２１．３に位置付けた。Ｒａｓｏｏｌｙ（１９９９）は、ＺＮＦ２０７配列が第１７染色体（ＡＣ００５８９９）由来のクローン化領域内に含まれることに着目した。

【０２５５】

別の配列（研究室表示　２１＿５＿７Ｅ＿Ｌａｃ（配列番号１３７））は、ＤＮＡ結合３のインヒビター（ＩＤ３）をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＨＥＩＲ１として公知であり、そしてその配列は、遺伝子マップの遺伝子座１ｐ３６．１３－ｐ３６．１２に位置付けられる。

【０２５６】

Ｅｌｌｍｅｉｅｒら（１９９２）は、染色体１ｐ３６特異的ＣｐＧ島の分子クローニングによって、ヘリックス－ループ－ヘリックス（ＨＬＨ）タンパク質をコードする新規のヒト遺伝子を単離した。最初にＨＥＩＲ１と命名されたＩＤ３遺伝子は、神経芽細胞一致欠失領域である１ｐ３６．２－ｐ３６．１２に局在化された。その予測されたタンパク質は、マウスＨＬＨ４６２タンパク質に対して９５．８％同一であり、かつマウスＩｄおよびショウジョウバエｅｍｃタンパク質に対して明確な相同性を有した。その遺伝子は、成体の肺、腎臓、および副腎髄質において高度な存在量で発現されたが、成体の脳においては発現されなかった。神経芽細胞についての最初の標的である副腎髄質における顕著なＨＥＩＲ１発現にもかかわらず、１２個の神経芽細胞誘導細胞株のうち１０個は、非常に低いレベルのＨＥＩＲ１　ｍＲＮＡを示した。低いＨＥＩＲ１発現は、ＨＭＹＣ（１６４８４０）の過剰発現を有する腫瘍細胞株において、一般に見出されるが、高いＨＥＩＲレベルを示す２つの細胞株は、ＮＭＹＣを過剰発現しなかった。その２つの遺伝子の相互に排他的な発現はまた、発達したマウス組織、特に前脳神経外胚葉におけるインサイチュハイブリダイゼーションによって見出される。Ｅｌｌｍｅｉｅｒら（１９９２）は、特にＨＥ

ＩＲ１発現が、神経芽細胞の過半数において減少され、これらの腫瘍および肺発育においてＨＥＩＲ１とＮＭＹＣ発現との間の逆相関が示唆されると結論付けた。

【０２５７】

Ｄｅｅｄら（１９９４）は、ＩＤ３遺伝子と、先祖遺伝子からの進化と合致する高度に保存されたタンパク質コード化遺伝子組織を示す、ＩＤ１（６００３４９）およびＩＤ２（６００３８６）との比較を報告した。蛍光インサイチュハイブリダイゼーションのためにＩＤ３のＹＡＣクローンを使用することによって、彼らは、ＩＤ３遺伝子を１ｐ３６．１に位置付けた。Ｗｈｉｔｅら（１９９５）は、神経芽細胞研究（ＮＢＳを参照のこと；２５６７００）によって明らかにされた異型接合性の損失（ＬＯＨ）領域の外側に、ＩＤ３があるという理由で、神経芽細胞サプレッサー遺伝子についての候補としてＩＤ３を排除し得た。

【０２５８】

Ｉｄタンパク質は、転写因子のＤＮＡ結合を妨げることによって、細胞分化を調節し得る。Ｌｙｄｅｎら（１９９９）は、マウスにおけるＩｄ１およびＩｄ３の標的化分裂が、細胞周期における神経芽細胞の早熟性放出および神経特異的分化マーカーの発現を生じることを実証した。Ｌｙｄｅｎら（１９９９）は、Ｉｄ１＋／－とＩｄ３＋／－マウスとを交配した。任意の組合わせにおいて１～３つのＩｄ対立遺伝子を欠く子孫は、野生型と識別不能であったが、４つすべてのＩｄ対立遺伝子を欠く動物は産まれなかった。Ｉｄ１－Ｉｄ３ダブルノックアウトマウスは、前脳における血管奇形を示し、かつ神経外胚葉において血管の枝分かれおよび出芽の欠如を示した。脳および腫瘍における血管形成が、内皮細胞による無血管組織の侵襲を必要とするように、Ｌｙｄｅｎら（１９９９）は、腫瘍の異種移植片の増殖を支持する能力について、Ｉｄノックアウトマウスを試験した。３つの異なる腫瘍が、Ｉｄ１＋／－Ｉｄ３－／－マウスにおいて増殖させるおよび／または転移させるのに失敗し、かつ存在した任意の腫瘍増殖は、微弱な血管新生および広範な壊死を示した。Ｌｙｄｅｎら（１９９９）は、Ｉｄ遺伝子が、胚におけるニューロンの分化のタイミングおよび血管系の侵襲性を維持するために必要とされることを結論付けた。Ｉｄ遺伝子が、成体において非常に低いレベルで発現されることを理由に、彼らは、抗血管形成剤の設計のために魅力的な標的を作製する。Ｌｙｄｅｎら（１９９９）はまた、Ｉｄ１－Ｉｄ３ダブルノックアウトマウスにおける早熟性のニューロンの分化が、ＩＤ１またはＩＤ３が、マウスの発生の間に陽性に作用するｂＨＬＨタンパク質に関して、正確に時間の決まった発現および活性化をブロックすることを必要とされることを示す、と結論付けた。

【０２５９】

Ｐａｎら（１９９９）は、Ｉｄ３欠乏性マウスが顕在的な異常性を有さないが、欠落した体液性免疫を有することを見出した。Ｔ細胞依存性抗原またはＴ細胞非依存性抗原を用いての免疫化の後、それぞれ、Ｉｄ３－欠乏性マウスの応答が減弱され、かつ重度に損なわれた。Ｔ細胞増殖性応答はインタクトであるようだが、ＩＦＮＧａｍｍａ発現は損なわれ得る。Ｂ細胞増殖における欠損は、Ｉｄ１の異所性発現によって救助され得る。

【０２６０】

ＩＤ３は、Ｅタンパク質（例えば、Ｅ２Ａ（１４７１４１））のインヒビターである。ノーザンブロット分析およびウエスタンブロット分析によって、Ｋｅｅら（２００１）は、マウスにおいてトランスフォーミング増殖因子β（１９０１８０）が、Ｂリンパ球前駆体における一過性Ｉｄ３発現を急速に誘導することを示した。この誘導は、ＳＭＡＤ（６０２９３２を参照のこと）転写因子経路の活性化に関与する。

【０２６１】

別の配列（研究室表示　３１＿３＿６＿２＿Ｌａｃ（配列番号２４８））は、ＦＫ５０６結合タンパク質８（ＦＫＢＰ８）をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＦＫ５０６結合タンパク質である３８－ＫＤ（ＦＫＢＰ３８）としても公知である。

【０２６２】

ＦＫＢＰは、免疫抑制剤ＦＫ５０６についての細胞内レセプターである。ＦＫＢＰ／Ｆ

Ｋ５０６複合体は、Ｔ細胞活性化の間に重要なシグナル伝達分子として機能するカルシウム依存性およびカルモジュリン（例えば、ＣＡＬＭ１；１１４１８０）依存性セリン／スレオニンホスファターゼである、カルシニュリン（例えば、ＰＰＰ３ＣＡ；１１４１０５）を阻害することによってその免疫抑制効果を及ぼす。ＦＫＢＰの保存された領域に基づいてＪｕｒｋａｔ細胞ｃＤＮＡおよび縮重オリゴヌクレオチドを使用するＰＣＲによって、Ｌａｍら（１９９５）は、ＦＫＢＰ８をコードするｃＤＮＡを同定した。推定３５５個のアミノ酸のＦＫＢＰ８タンパク質は、他の公知のヒトＦＫＢＰと２６～２８％のアミノ酸配列同一性を共有する。ＦＫＢＰ８は、推定のロイシンジッパードメイン、３単位不完全テトラトリコペプチド反復（ＴＰＲ）ドメイン、および推定のカルモジュリン結合ドメインであるＦＫＢＰ１２（ＦＫＢＰ１Ａ；１８６９４５）と、３３％同一なＮ末端ドメインを含む。ノーザンブロット分析は、試験されたヒト組織すべてにおいて、単一な約１．３５－ｋｂ～２．４－ｋｂのＦＫＢＰ８転写物を検出し、それは脳において最も高度に発現された。

【０２６３】

別の配列（研究室表示　３１＿３＿９－ｒＥ（配列番号１３５））は、ＬＰＳ誘導性ＩＬ－６産生を増強する核ＩκＢタンパク質である、ＭＡＩＬをコードする配列を含む。この配列は、遺伝子マップの遺伝子座３ｑ２１．３に位置付けられる。

【０２６４】

Ｋｉｔａｍｕｒａらは、「リポ多糖類によって誘導されるアンキリン反復を有する分子」（ＭＡＩＬ）と名付けられたアンキリン反復ファミリーの新規のメンバーを同定し、かつ特徴付けた。ＭＡＩＬのＣ末端部分は、ＩκＢファミリーと高度な配列相同性を共有する。マウスへのリポ多糖類（ＬＰＳ）の腹腔内注射は、種々の組織において、特に脾臓、リンパ節、および肺において、急速に（０．５時間未満）ＭＡＩＬ　ｍＲＮＡを誘導した。異所的に発現されたＭＡＩＬは、核に局在化され、かつＳｗｉｓｓ　３Ｔ３細胞におけるＬＰＳ誘導性ｍＲＮＡ発現およびインターロイキン（ＩＬ）－６の分泌が著しく増強された。これらの知見は、ＭＡＩＬが、核ＩκＢタンパク質のうちの１つであり、かつＩＬ－６産生の活性化剤であることを示した。

【０２６５】

別の配列（研究室表示　３４Ｘ２３＿１－ｒＥ（配列番号１４９））は、カスパーゼ補充ドメイン含有タンパク質４（ＣＡＲＤ４）をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＮＯＤ１タンパク質（ＮＯＤ１）としても公知である。この配列は、遺伝子マップの遺伝子座７ｐ１５－ｐ１４に位置付けられる。

【０２６６】

哺乳動物におけるＡＰＡＦ１（６０２２３３）および寄生虫におけるＣｅｄ４は、Ｎ末端カスパーゼ補充ドメイン（ＣＡＲＤ）、中心に配置されたヌクレオチド結合ドメイン（ＮＢＤ）、およびＡＰＡＦ１に関してはＷＤ４０の繰り返しからなるＣ末端調節ドメインで構成される、細胞内タンパク質のファミリーのメンバーである。ＡＰＡＦ１　ＷＤ４０繰り返しは、ミトコンドリア損傷についての調節ドメインとして作用し、このことは、ＡＰＡＦ１オリゴメリゼーション、およびカスパーゼ－９（ＣＡＳｐ９；６０２２３４）のプロドメインとの同種親和性ＣＡＲＤ－ＣＡＲＤ相互作用を通じて最終的なアポトーシスを引き起こす。

ＣＡＲＤモチーフをコードする配列について所有されるＥＳＴデータベースを検索し、続いて、内皮細胞ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることによって、Ｂｅｒｔｉｎら（１９９９）は、ＣＡＲＤ４をコードしているｃＤＮＡを得た。推定された９５３－アミノ酸ＣＡＲＤ４タンパク質は、Ｎ末端ＣＡＲＤモチーフ、ＮＢＤ、および異なるＡＰＡＦ１、そのＣ末端において１０個のタンデムなロイシンリッチな反復を含む。ノーザンブロット分析は、成体心臓、脾臓および肺、ならびに多数の癌細胞株および胎児の組織での４．５ｋｂの転写物の大量の発現を明らかにした。胸部、前立腺および脳ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするベイト（ｂａｉｔ）としてＣＡＲＤ４のＣＡＲＤドメインを用いている酵母２－ハイブリッド分析、ならびに同時免疫沈降分析は、ＲＩＣＫのＣＡ

ＲＤを有する優先相互作用を示した（ＲＩＰＫ２；６０３４５５）。ルシフェラーゼリポータ分析法は、ＡＰＡＴ１ではなく、ＣＡＲＤ４のＣＡＲＤドメインが強力に、濃度依存的な方法で、ＪＵＮ　Ｎ末端キナーゼ（６０１１５８を参照のこと）でなく、核因子κ－Ｂ（１６４０１１を参照のこと）の活性化を誘発することを示した。

【０２６７】

類似した方法を使用して、Ｉｎｏｈａｒａら（１９９９）は、ＣＡＲＤ４をクローン化し、そして特徴づけ、それをＮＯＤ１と呼んだ。ノーザンブロット分析は、ＮＯＤ１の広い発現を検出した。インサイチュハイブリッド形成分析は、１日にＮｏｄ１の比較的制限された発現（１５．５マウス胚）を示した。共焦鏡検は、ＮＯＤ１がサイトゾルタンパク質であることを証明した。共免疫沈降分析は、ＮＯＤ１が優先して、ＣＡＲＤを含んでいるプロカスパーゼまたは死エフェクタドメイン（ＤＥＤ）、ＲＩＣＫ、そして、ＣＬＡＲＰ（ＣＦＬＡＲ；６０３５９９）、ならびにそれ自体と相互作用し、しかし、ＲＡＩＤＤ（ＣＲＡＤＤ；６０３４５４）、ＡＰＡＦ１（ＮＩＫ（６０４６５５））または他のＣＡＲＤ－またはＤＥＤを含有するタンパク質と、相互作用しないことが分かった。機能分析は、ＬＲＲでなく、ＮＯＤ１のＣＡＲＤおよびＮＢＤが、他のカスパーゼまたはＣＬＡＲＰでなく、ＣＡＳＰ９によって誘発されるアポトーシスを増強することを示した。ＣＡＲＤが、ＣＡＳＰ９を結合および活性化させるために、ならびにアポトーシスを促進するために、ＮＯＤ　１にとって重要であるとわかった。Ｉｎｏｈａｒａら（１９９９）はまた、ＮＯＤ１がＮＦＫＢ活性化のＲＩＣＫと相互作用することを観察した。

【０２６８】

ゲノム配列分析によって、Ｉｎｏｈａｒａら（１９９９）は、ＮＯＤ１遺伝子が７ｐｌ５－ｐｌ４に７コードエキソンおよび７非コードエキソンおよびマップを含むことを決定した。

【０２６９】

別の配列（研究室表示　３４Ｘ２３＿ｒＥ（配列番号１５２））は、ｍｄｒ１ｂまたはｍｄｒ１をコードしている配列を含む。このタンパク質はまた、Ａｂｃｂ１ｂとして公知である。この配列は、ヒトの染色体位置７ｑ２１．１に対してマップする。

【０２７０】

Ｓｏｎｇら、「Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　ａ　ｈｅｐａｔｏｍａ　ｃｅｌｌ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｅｎｈａｎｃｅｒ　ｉｎ　ｔｈｅ　ｍｏｕｓｅ　ｍｕｌｔｉｄｒｕｇ　ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ　ｍｄｒ１ｂ　ｐｒｏｍｏｔｅｒ」Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．，２７０（４３）：２５４６８－７４）（１０月２７日，１９９５）は、多薬剤耐性／Ｐ－糖タンパク質遺伝子ｍｄｒ１ｂ（ｍｄｒ１）およびｍｄｒ１ａ（ｍｄｒ３）の発現が肝臓癌形成の間、上昇することを証明する。ｍｄｒ１ｂ遺伝子発現の調節を調査するために、それらは、肝癌細胞および非肝癌細胞のさまざまな５’－ｍｄｒ１ｂ隣接配列を含んでいるリポーター構築物の一時的なトランスフェクション発現アッセイを使用した。彼らは、そのヌクレオチド－２３３～－１１６が優先して方向－およびプロモーター内容から独立した方法でマウス肝癌細胞株においてリポーター遺伝子の発現を増強したことを見出した。肝癌細胞および非肝癌細胞から調製された核抽出物を使用しているＤＮａｓｅ　Ｉフットプリンティングは、－２０５～－１８６ヌクレオチド（部位Ａ）、－１８１～－１６４ヌクレオチド（部位Ｂ）、－１５３～－１３５ヌクレオチド（部位Ｃ）、および－１２８～－１２０（部位Ｄ）で４つのタンパク質結合部位を同定した。さらなる分析から、部位Ｂ単独がエンハンサー機能のための主要部分を演じる間、組み合わされた部位ＡおよびＢが完全なエンハンサー活性を与えたことが明らかになった。部位特異的変異誘発結果も、これらの結果を支持した。オリゴヌクレオチド競争物を使用しているゲル遅延実験により、部位Ｂが優位な結合タンパク質を含むことが明らかになった。これは、ｍｄｒ遺伝子座の細胞型に特有のエンハンサーを示している第１の報告であった。肝臓癌形成の間のｍｄｒ１ｂ遺伝子の活性化におけるこのエンハンサーの役割は、著者によって考察される。

【０２７１】

Ｈｓｕら、「Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ ｏｖｅｒｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｔｈｒｅｅ ｍｄｒ ｇｅｎｅ ｆａｍｉｌｙ ｍｅｍｂｅｒｓ ｉｎ ｍｕｌｔｉｄｒｕｇ－ｒｅｓｉｓｔａｎｔ Ｊ７７４．２ ｍｏｕｓｅ ｃｅｌｌｓ．Ｅｖｉｄｅｎｃｅ ｔｈａｔ ｄｉｓｔｉｎｃｔ Ｐ－ｇｌｙｃｏｐｒｏｔｅｉｎ ｐｒｅｃｕｒｓｏｒｓ ａｒｅ ｅｎｃｏｄｅｄ ｂｙ ｕｎｉｑｕｅ ｍｄｒ ｇｅｎｅｓ」Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ，１５；２６４（２０）：１２０５３－６２，（１９８９年７月）は、多剤耐性表現型の特質が集合的にＰ－糖タンパク質と呼ばれている１３０～１８０ｋＤａの一体膜ホスホグリコタンパク質の一系統の過剰生産であることを示す。遺伝子に特異的なハイブリダイゼーションプローブは、マウスＰ－糖タンパク質ｃＤＮＡの３つの種類から誘導された。これらのプローブは、３つの異なるが密接に関連したｍｄｒ遺伝子（ｍｄｒ１ａ、ｍｄｒ１ｂおよびｍｄｒ２）の差示的増幅および／または転写活性化を、独立して選択された多剤耐性Ｊ７７４．２マウス細胞株で明らかにした。ｍｄｒ１ａおよびｍｄｒ１ｂの過剰発現が、一般に、それぞれ、１２０－ｋＤａまたは１２５ｋＤａのＰ糖タンパク質前駆体のいずれかの差示的過剰生産と相関すると見出された。この同じ相互関係は、ｍｄｒ１ｂからｍｄｒ１ａへの遺伝子発現の切り換えが、１２５－ｋＤａから１２０ｋＤａのＰ糖タンパク質前駆体への切り換えになったビンブラスチンに対する耐性について段階的選択の過程の間、単一の細胞株において観察された。これらの発見は、独特なＰ糖タンパク質のアイソフォームをコードする異なったｍｄｒ遺伝子の差示的過剰発現が多剤耐性表現型の多様性を生成する可能な機構であることを示唆する。

【０２７２】

別の配列（研究室表示　３４Ｘ２４＿１２６－ｒＥ（配列番号１４８））は、ＭＩＴＯＧＥＮ－ＡＣＴＩＶＡＴＥＤ ＰＲＯＴＥＩＮ ＫＩＮＡＳＥ ＫＩＮＡＳＥ ＫＩＮＡＳＥ ７ ＩＮＴＥＲＡＣＴＩＮＧ ＰＲＯＴＥＩＮ １（ＭＡＰ３Ｋ７ＩＰ１）をコードしている配列を含む。このタンパク質はまた、ＴＡＫ１－ＢＩＮＤＩＮＧ ＰＲＯＴＥＩＮ １またはＴＡＢ １として公知である。この配列は、Ｇｅｎｅマップ遺伝子座Ｃｈｒ．２２にマップする。

【０２７３】

Ｓｈｉｂｕｙａら（１９９６）は、酵母２－ハイブリッドシステムを使用して、ＴＡＫ１（６０２６１４）と相互作用する脳ｃＤＮＡコードタンパク質を同定した。それらは、それらがＴＡＢ１（ＴＡＫ１－結合タンパク質－１）と呼んだ予測された５０４－アミノ酸タンパク質をコードしている遺伝子を回収した。ノーザンブロットにおいて、ＴＡＢ１は、試験される全ての組織の３．５ｋｂのｍＲＮＡとして表された。

【０２７４】

Ｓｈｉｂｕｙａら（１９９６）は、酵母細胞および哺乳動物細胞の両方で、ＴＡＢ１が直接的な相互作用によってＴＡＫ１のキナーゼ活性を活性化させたことを発見した。それらは、哺乳動物細胞において、ＴＡＢ１のＣ－末端６８アミノ酸がＴＡＫ１の結合および活性化のために十分であり、一方、Ｎ末端４１８アミノ酸が増殖因子－β（ＴＧＦＢ；１９０１８０）誘導遺伝子発現を形質転換するドミナントネガティブなインヒビターとして作用することを示した。ＴＡＫ１がＴＧＦＢシグナリング経路において、ＭＡＰＫＫＫとして機能するので、Ｓｈｉｂｕｙａら（１９９６）は、ＴＡＢ１が、ＴＧＦＢレセプターとＴＡＫ１との間で重要なシグナリング中間体であり得ることを示唆した。

【０２７５】

ｐ３８－α（ＭＡＰＫ１４；６００２８９）を用いる胃腸気管組織のイースト２－ハイブリッドスクリーンをベイトとして使用して、Ｇｅら（２００２）は、ＴＡＢ１をコードしている複数のクローンを単離した。免疫沈降およびＧＳＴプルダウン分析は、ＴＡＢ１が、ＴＮＦ（１９１１６０）を有する処理を行うかまたは行わず、他のＭＡＰＫではなく、ｐ３８αと相互作用することを示した。イムノブロット分析は、ＴＡＢ１およびｐ３８－αの同時発現が、ＭＡＰ２Ｋのドミナントネガティブな形態（例えば、ＭＡＰ２Ｋ３；６０２３１５）およびＴＡＫ１の存在で、ｐ３８－αの自己リン酸化を増強することを示した。ＴＡＢ１の位置３７３と４１８との間のアミノ酸が、ｐ３８－αのリン酸化のため

に必要であるとわかった。ＴＬＲ２（６０３０２８）の発現によってインヒビターの存在下または非存在下でのｐ３８－αリン酸化が生じたのに対して、ＴＬＲ４（６０３０３０）の刺激の後のｐ３８－αリン酸化は、変異体ＴＡＢ１によって阻害され得、これは、ｐ３８－αの活性化が、ＴＡＢ１に従属するかまたは独立し得ることを示唆した。イムノブロット分析は、ＴＲＡＦ６（６０２３５５）－ＴＡＢ１－ｐ３８－α複合体の形成を検出した。これらの複合体の形成は、リポポリサッカリドによる刺激によって増強され得た。Ｇｅら（２００２）は、ＴＡＢ１のような非酵素的なアダプタータンパク質によるｐ３８αの活性化が、細胞内のシグナリングを調整する際のキナーゼカスケードと並列に作動している重要な代わりの活性化経路であり得ると結論した。

【０２７６】

Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｒａｄｉａｔｉｏｎ Ｈｙｂｒｉｄ Ｍａｐｐｉｎｇ Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍは、ＴＡＢ１遺伝子を染色体２２（ＷＩ－１８６９１）にマップした。

【０２７７】

別の配列（研究室表示　３６＿５＿２＿６－ｒＥ（配列番号１５０））は、ＢＲＯＭＯＤＯＭＡＩＮ－ＣＯＮＴＡＩＮＩＮＧ　ＰＲＯＴＥＩＮ　２（ＢＲＤ２）をコードしている配列を含む。このタンパク質はまた、ＦＥＭＡＬＥ　ＳＴＥＲＩＬＥ　ＨＯＭＥＯＴＩＣ－ＲＥＬＡＴＥＤ　ＧＥＮＥ　１、ＭＯＵＳＥ　ＨＯＭＯＬＯＧ　ＯＦ　ＦＳＲＧ１（ＲＩＮＧ３）として公知である。この配列は、遺伝子マップ遺伝子座６ｐ２１．３にマップする。

【０２７８】

染色体６ｐ２１．３でのヒトの主組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩＩ領域の新規な遺伝子の検索において、Ｏｋａｍｏｔｏら（１９９１）およびＢｅｃｋら（１９９２）は、これらをＲＩＮＧ３（「ＲＩＮＧ」は、実際に興味のある新規な遺伝子の頭字語である）と呼んだ遺伝子を同定した。マッピングおよびゲノムシークエンシングに基づいて、ＲＩＮＧ３は、遺伝子ＨＬＡ－ＤＮＡ（１４２９３０）とＨＬＡ－ＤＭＡ（１４２８５５）との間にクラスＩＩ領域の中央に位置した。クラスＩＩ領域にコードされる全ての他の遺伝子とは対照的に、ＲＩＮＧ３は、配列比較に基づいて免疫系と関連する明らかな機能を有さなく見えた。しかし、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ雌性不妊ホメオ遺伝子（ｆｓｈ）遺伝子に対する著しい配列類似性は、保存された生物学的機能をＲＩＮＧ３に示唆した。ＤｅｎｉｓおよびＧｒｅｅｎ（１９９６）は、ＲＩＮＧ３産物が、事実、信号伝達に関係するマイトジェン活性核キナーゼであること、および、それが白血病の特定の種類においてアップレギュレートされるということを発見した。ＲＩＮＧ３の系統発生についてより研究する目的で、Ｔｈｏｒｐｅら（１９９６）は、さらに、異なる種のホモログを識別し、それらの遺伝子構造を決定した。ＲＩＮＧ３の機能分析は、Ｎｏｍｕｒａら（１９９４）によるヒトのＲＩＮＧ３の第２の非ＭＨＣリンクしたコピーを見つけることによって、さらに複雑になった。これは、ＯＲＦＸ（６０１５４１）として、それらによって参照された。ＯＲＦＸ　ｃＤＮＡ配列から誘導されるＰＣＲプローブを使用して、Ｔｈｏｒｐｅら（１９９６）は、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション分析によってＯＲＦＸを９ｑ３４にマップした。いくつかの他のＭＨＣ関連の遺伝子は、９ｑの同じ領域にマップすることが報告された。

【０２７９】

別の配列（研究室表示　３＿２＿１３ｒＥ（配列番号１９２））は、Ｓ１００　ＣＡＬＣＩＵＭ－ＢＩＮＤＩＮＧ　ＰＲＯＴＥＩＮ　Ａ６（Ｓ１００Ａ６）をコードしている配列を含む。このタンパク質は、また、カルサイクリンとして公知である。この配列を、遺伝子マップ座１ｑ２１にマップする。

【０２８０】

カルサイクリンは、最初は、同族のＲＮＡが成長を調整すると分かっており、そして、その配列がＳ－１００タンパク質、カルシウム結合タンパク質の配列ならびにチロシンキナーゼのための主要細胞基質のサブユニットにに強い類似点を示したｃＤＮＡクローン（

２Ａ９）として規定された。全長ｃＤＮＡを使用して、Ｆｅｒｒａｒｉら（１９８７）は、カルサイクリン遺伝子全体および広範囲な隣接配列を単離した。彼らは、カルサイクリン遺伝子が単一コピーに存在して、３のエキソンを有することを発見した。インサイチュハイブリダイゼーションによって、彼らは、ＣＡＣＹ遺伝子が１ｑ２１－ｑ２５セグメントに位置すると決定した。Ｍｕｓ ｓｐｒｅｔｕｓおよびＭｕｓ ｍｕｓｃｕｌｕｓ ｄｏｒｎｅｓｔｉｃｕｓの種間の戻し交雑の結合研究によって、Ｓｅｌｄｉｎ（１９８９）は、Ｃａｃｙ遺伝子がマウス第３染色体に置かれることを証明した。ＣＡＣＹについてのｃＤＮＡプローブを使用して、ｖａｎ Ｈｅｙｎｉｎｇｅｎら（１９８９）およびＤｏｒｉｎら（１９９０）は、遺伝子が、ＣＡＧＡ（Ｓ１００Ａ８；１２３８８５）およびＣＡＧＢ（Ｓ１００Ａ９；１２３８８６）を同時に分離し、これは、１ｑ１２ｑ２１に位置したことを示した。

【０２８１】

ヒトの１ｑ２１－ｑ２３の物理的マップを作ることの間、Ｏａｋｅｙら（１９９２）は、ＣＡＣＹ遺伝子がそのセグメント（ＳＰＴＡ１（１８２８６０）に対する基部）の動原体性端にあると決定した。

【０２８２】

Ｓｃｈａｆｅｒら（１９９５）は、Ｓ１００カルシウム結合タンパク質をコードする９個の異なる遺伝子が局所化され得る１ｑ２１からＹＡＣを単離した。Ｓ１００遺伝子のクラスター化された組織は、染色体上のそれらの物理的配置に基づく新規な論理的命名法の導入を可能にし、Ｓ１００Ａ１（１７６９４０）がテロマーに最も近く、Ｓ１００Ａ９が、セントロメアに最も近い。新規な命名法において、ＣＡＣＹは、ＳＡ１００Ａ６になった。

【０２８３】

ＲｈｏＧＥＦは、さまざまなシグナル伝達カスケードにおいて重要な役割を果たし、癌および精神薄弱のようなヒトの状態に関係する（Ｔｈｉｅｓｅｎら、「Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｗｏ ｎｏｖｅｌ ｈｕｍａｎ ＲｈｏＧＥＦｓ，ＡＲＨＧＥＦ３ ａｎｄ ＡＲＨＧＥＦ４，ｉｎ ３ｐ１３－２１ ａｎｄ ２ｑ２２」Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ，２７３（１）：３６４－９：２０００年６月２４日）。ヒトのニューロンのテラトカルシノーマライブラリのスクリーニングと組み合わされるデータベース検索は、２つの新しいＲｈｏＧＥＦ、ＡＲＨＧＥＦ３およびＡＲＨＧＥＦ４（ＨＧＭＷ認可の記号）を同定した。３５６１のヌクレオチドの広く発現されたＡＲＨＧＥＦ３転写は、ＮＥＴ１に相同性を有する５２６のアミノ酸のポリペチドをコードする。ＡＲＨＧＥＦ４遺伝子は、７２０のアミノ酸残基に翻訳される、３６６５ヌクレオチドと４０００ヌクレオチドの２つの転写物を生成する。ＡＲＨＧＥＦ４の発現は、脳に制限され、そして、コードされたタンパク質はコリビスチン（ｃｏｌｌｙｂｉｓｔｉｎ）に対する相同性を示す。ゲノムクローンのＦＩＳＨ分析は、３ｐ１３－２１に対するＡＲＨＧＥＦ３および２ｑ２２に対するＡＲＨＧＥＦ４にマップした。２０００ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓで著作権で保護する。

【０２８４】

別の配列（研究室表示 ４９＿ＲＡ２＿Ａ－ｒＥ（配列番号３１１））は、ＨＥＴＥＲＯＧＥＮＥＯＵＳ ＮＵＣＬＥＡＲ ＲＩＢＯＰＲＯＴＥＩＮ Ｌ；ＨＮＲＰＬをコード化している配列を含む。

【０２８５】

異種核リボ核タンパク質（ｈｎＲＮＰ）複合体は、ｈｎＲＮＡおよびそれらの関連するタンパク質を含む構造である。ｈｎＲＮＰは、ｍＲＮＡ合成および成熟に直接関係している。それらのタンパク含有量は２つの主要なカテゴリからなる：共通構造特徴を有する３の関連した主な種のファミリー（いわゆるＡ１－Ａ２、Ｂ１－Ｂ２、Ｃ１－Ｃ２コアタンパク質）、ならびにＤ～Ｕと指定されたポリペプチドのより多くの異種の集団。ＨｅＬａ細胞のｈｎＲＮＡと関連する、３４，０００～１２０，０００Ｄａの分子質量範囲の２０を超える異なる主要ポリペチドがある。２の異なった、約６８ｋＤタンパク質（Ｌ（ＨＮ

ＲＰＬ）およびＭと指定された）の一組はこれらの一つである。タンパク質をＲＮＡにＵＶ架橋することおよびＲＮａｓｅ消化の前後での沈降分析によって、Ｐｉｎｏｌ－Ｒｏｍａら（１９８９）は、ＨＮＲＰＬに対するモノクローナル抗体を用いて、ＨＮＲＰＬがｈｎＲＮＰ複合体と安定して関係していることを証明した。彼らはまた、ＨＮＲＰＬが１～３の未確認の離散的な非核小体構造および外側のｈｎＲＮＰ複合体で、ＨＮＲＰＬが核液に存在することを示した。著者は、さまざまな脊椎動物のＨＮＲＰＬを検出して、ＨＮＲＰＬがｎｅｗｔ Ｎ．ｖｉｒｉｄｅｓｃｅｎｓのｌａｍｐｂｒｕｓｈ染色体上の大部分の発生期の転写物と関係していることを発見した。Ｐｉｎｏｌ－Ｒｏｍａら（１９８９）は、ｈｎＲＮＰに対する抗体を含んでいる血清を用いてＨｅＬａ細胞ｃＤＮＡ発現ライブラリーをスクリーニングし、ｃＤＮＡをコードしているＨＮＲＰＬを単離した。ノーザンブロット分析は、ＨｅＬａ細胞の約２．３ｋｂのＨＮＲＰＬ転写物を検出した。予測された５５８－アミノ酸タンパク質は、グリシンおよびプロリンリッチであり、６０，１８７Ｄａの算出分子量を有する。ＨＮＲＰＬは、約８０のアミノ酸の２つのセグメントを含み、各々、互いに、そして、他のｈｎＲＮＰおよびｓｎＲＮＰタンパク質のリボヌクレオタンパク質共通配列型ＲＮＡ結合ドメインにわずかに関連がある。

【０２８６】

別の配列（研究室表示 ６Ｂ３７Ｈ＿Ｔ７（配列番号６５））は、ＡＮＮＥＸＩＮ Ａ１（ＡＮＸＡ１）をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＡＮＮＥＸＩＮ Ｉ（ＡＮＸ１）、ＬＩＰＯＣＯＲＴＩＮ Ｉ（ＬＰＣ１）およびＣＡＬＰＡＣＴＩＮ ＩＩとして公知である。この配列は、Ｇｅｎｅマップ遺伝子座９ｑ１１－ｑ２２にマップされる。

【０２８７】

グルココルチコイドの抗炎症性作用は、一群のタンパク質の誘導に帰された。そして、集合的に、リポコルチン（ホスホリパーゼＡ２を阻害する）と呼ばれていた。これらのタンパク質は、これらの共通前駆体、アラキドン酸、ホスホリパーゼＡ２によってホスホリピドの加水分解を必要とするプロセスの放出を阻害することによって、炎症、プロスタグランジンおよびロイコトリエンの強力なメディエーターの生合成を制御すると考えられる。リポコルチン様タンパク質は、単核細胞、好中球、腎臓延髄細胞および他の細胞型から分離された。支配的な活性形態は、４０，０００の見かけの相対的な分子量を有する。部分的に精製されたリポコルチンは、ステロイドの作用に擬態し、さまざまなインビボでのモデル系の抗炎症作用を媒介する。精製されたラットリポコルチンからのアミノ酸配列情報を使用して、Ｗａｌｌｎｅｒら（１９８６）は、ヒトリポコルチンについてのｃＤＮＡをクローンし、Ｅ．ｃｏｌｉにおいて遺伝子を発現した。それらは、ＬＰＣがホスホリパーゼＡ２の強力なインヒビターであることを確認した。リポコルチンＩは、アネキシンの一系統に帰属する。それは約３５，０００～４０，０００の分子質量を有する構造的に関連したタンパク質である。彼らは、形質膜のサイトゾルな表面に優先してあるホスホリピドにＣａ（２＋）に依存した結合を受ける。この系統の個々のタンパク質は、さまざまな目的をもつ調査者によって発見され、種々の名前を与えられた（Ｋａｐｌａｎら、１９８８）。

【０２８８】

Ｃｒｏｍｔｏｎら（１９８８）は、タンパク質のリポコルチン／カルパクチンファミリーを調べた。Ｐｅｐｉｎｓｋｙら（１９８８）は、彼らがリポコルチンＩＩＩ、リポコルチンＶおよびリポコルチンＶＩと呼んだ３つのタンパク質の特徴を記載した。リポコルチンＩＩＩおよびＩＶは、明らかに同一である。Ｓｈｏｈａｔら、（１９８９）は、その家族性地中海熱（ＦＭＦ；２４９１００）患者は、リポコルチン遺伝子のうちの１に対する変異対立遺伝子のホモ接合であるという仮説を進めた。

【０２８９】

Ｗａｌｔｈｅｒら（２０００）は、ＡＮＸＡＩがヒトの好中球においてホルミルペプチドレセプタ（ＦＰＲ；１３６５３７）で作用することを示した。ＡＮＸＡＩの固有のＮ－末端ドメインから誘導されるペプチドは、用量依存的様式でＦＰＲリガンドとして役立ち

、そして異なるシグナル伝達経路を誘発する。おそらく炎症性の状況で見つかる低いペプチド濃度は、マイトジェン活性プロテインキナーゼ経路を完全に活性化させることのないＣａ（２＋）一時的現象を誘発する。これによって、化学誘引物質チャレンジの方へ好中球のトランス内皮の移動および好中球の除感作の特定の抑制が生じる。これらの知見は、ＡＮＸＡ１ペプチドを新しい、内因性のＦＰＲリガンドと確認して、ＡＮＸＡＩ媒介された抗炎症性効果の機械学の基礎を決めた。

【０２９０】

Ｈｕｅｂｎｅｒら（１９８７、１９８８）は、染色体インサイチュハイブリダイゼーションおよびｃＤＮＡクローンを使用している体細胞ハイブリッドでの分離比分析によってＡＮＸＡ１遺伝子を９ｑ１１－ｑ２２にマップした。

【０２９１】

Ｈｏｒｌｉｃｋら（１９９１）は、Ｌｉｐｏ１のための重なり合うマウスゲノムクローンを単離した。マウスの遺伝子は、約１７ｋｂにわたって、３４６のアミノ酸残基のタンパク質をコード化している１３のエキソンに分けられる。組換近交系の分析によって、それらは、Ｌｉｐｏ１が第１９染色体に置かれることを示した。Ｈｏｒｌｉｃｋら（１９９１）はマウスＬｉｐｏ１とＬｉｐｏ２との間の遺伝子構造の類似性を指し示し、そして、それらが最近の進化の祖先を有することを示唆した。

【０２９２】

別の配列（研究室表示　６Ｂ６０＿Ｌａｃ（配列番号２３７））は、ＴＲＯＰＯＭＹＯＳＩＮ　１（ＴＰＭ１）をコードしている配列を含む。このタンパク質はまた、ＴＲＯＰＯＭＹＯＳＩＮ、ＳＫＥＬＥＴＡＬ　ＭＵＳＣＬＥ　ＡＬＰＨＡ（ＴＭＳＡ）として公知である。この配列は、遺伝子マップ遺伝子座１５ｑ２２．１にマップする。

【０２９３】

Ｔｒｏｐｏｍｙｏｓｉｎｓは、ミオフィブリルおよびストレスファイバのアクチンフィラメントと関連する３５～４５ｋＤの遍在するタンパク質である。脊椎動物において、４つの公知のトロポミオシン遺伝子が、組織特異的様式で発現されて、選択的スプライシング機構によって調節される多様なアイソフォームについてコードする（Ｌｅｅｓ－ＭｉｌｌｅｒおよびＨｅｌｆｍａｎ、１９９１）。脊椎動物のαトロポミオシン遺伝子は、１５のエキソンからなる；５個のエキソンは、全ての転写物で見出されるが、一方、１０個のエキソンは、あるいは、異なるα－トロポマイオシンＲＮＡにおいて使用される（Ｌｅｅｓ－ＭｉｌｌｅｒおよびＨｅｌｆｍａｎ、１９９１）。横紋筋のアイソフォームは、心臓および骨格筋の組織の両方において発現される。

【０２９４】

ＭａｃＬｅｏｄおよびＧｏｏｄｉｎｇ（１９８８）は、ｃＤＮＡクローンを骨格筋α－トロポマイオシンの完全タンパク質－コード配列を含むヒトの骨格筋ライブラリーから単離した。培養されたヒト繊維芽細胞において、ＴＭＳＡ遺伝子が、選択的ｍＲＮＡ－スプライシング機構を用いてα－トロポマイオシンの骨格筋タイプおよび平滑筋タイプの両方をコードすることが見出された。

【０２９５】

Ｅｙｒｅら（１９９５）は、ＴＰＭ１遺伝子の配列タグ化部位（ＳＴＳ）を開発し、そして、遺伝子のゲノムクローンを含んでいる一部分を分離するためにそれを使用した。このクローンを使用して、それらは、蛍光インサイチュハイブリダイゼーションによって１５ｑ２２にＴＰＭ１を局所化した。放射ハイブリッドのＰＣＲによって、Ｔｉｓｏら（１９９７）は、ＴＰＭＩ遺伝子をより正確に１５ｑ２２．１にマップした。Ｓｃｈｌｅｅｆら（１９９３）は、異種間戻し交雑を用いてマウスホモログ（Ｔｐｍ－１）を第９染色体のｄ－ｓｅ領域にマップした。

【０２９６】

Ｂｒｏｗｎら（２００１）は、トロポマイオシン分子の結晶構造を記載した。それらの結果は、筋収縮の調節でのトロポマイオシンの役割にとって重要であるようである２本鎖の高次コイルの軸性の登録、対称性および立体配座の変動性上の中心的なアラニンのクラ

スターの影響を明らかにした。

【０２９７】

ヒトのＴＰＭ１遺伝子と３型家族性肥厚性心筋症（ＣＭＨ３；１１５１９６）（以前に、１５ｑ２にマップされた）との間の結合を評価するために、Ｔｈｉｅｒｆｅｌｄｅｒら（１９９４）は、短いタンデム反復染色体の多型（ＳＴＲ）を同定した。θ＝０．０での６．９４の複合最大の２ポイントのｌｏｄスコアは、２つのファミリーにおけるＣＭＨ３へのＴＰＭ１マーカーの連結のために得られた。点変異は、連鎖研究において使用される２つのファミリーのそれぞれにおいて同定された：一方において、ａｓｐ１７５～ａｓｎ（１９１０１０．０００２）および他方においてｇｌｕ１８０～ｇｌｙ（１９１０１０．０００１）。Ｗａｔｋｉｎｓら（１９９５）はＴＰＭ１遺伝子の変異がＣＭＨのまれな原因であると結論し、約３％のケースを説明した。これらの変異は、心臓トロポニンＴ遺伝子（ＴＮＮＴ２；１９１０４５）と同様に、比較的穏やかで時々無症状の肥大であるが、突然死の高発生率で特徴づけられる。従って、遺伝的試験は、このグループにおいて特に重要であり得る。

【０２９８】

Ｂｌａｎｃｈａｒｄら（１９９７）は、機能的なマウスα－トロポミオシンノックアウトを作るために、胚性幹細胞および胚盤胞媒介されたトランスジェネシスの遺伝子標的化を使用した。ホモ接合体のマウスは、胎児日９．５と１３．５との間で子宮内で死に、αトロポミオシン、ＲＮＡを欠いていた。ヘテロ接合体は、αトポロマイシンｍＲＮＡレベルのほぼ５０％の減少を有するが、α－トロポミオシンタンパク質の減少を有さなかった。筋原線維超微細構造または収縮作用の違いは、発見されなかった。著者らは、マウスがｍＲＮＡの減少にもかかわらず筋原線維トロポミオシンのレベルを維持する調節機構を有すると仮定した。さらに、彼らは、ヒトおよびマウスの心筋が類似すると仮定し、αトロポミオシンのための単一の単不足（ｈａｐｌｏｉｎｓｕｆｆｉｖｉｅｎｃｙ）が、ヒト３型肥大性心筋症（１１５１９６）において見られる病原的な変化を引き起こさず、そしてタンパク質化学量論の変化が、筋節に組み込む際に筋原線維組織を破壊する毒ポリペチドを産生し得ることを結論づけた。

【０２９９】

Ｍｕｔｈｕｃｈａｍｙら（１９９９）は、部位特異的変異によって、ミスセンス変異ａｓｐ１７５～をａｓｎ（１９１０１０．０００２）を導入することによって、ＣＭＨ３のトランスジェニックマウスモデルを構築した。この変異は、心臓トロポニンＴ結合領域に起こる。トランスジェニックＣＭＨ３マウスは、心筋の機能損傷の重要なインビボおよびインビトロの証拠で示した。疾患のヒト形態において報告されるように、トランスジェニックの心筋の組織学的分析は、可変的なミオサイト無秩序および肥大を示した。

【０３００】

（対立遺伝子改変体）

．０００１心筋症、家族性肥厚，３［ＴＰＭ１，ＧＬＵ１８０ＧＬＹ］１５ｑ（１１５１９６）に連結された家族性肥厚心筋症の形態を罹患する家族性ＭＺのメンバーにおいて、Ｔｈｉｅｒｆｅｌｄｅｒら（１９９４）は、ヘテロ接合状態のＴＰＭ１遺伝子のエキソン５のヌクレオチド５９５で、Ａ－からＧへの移行を同定した。置換は、コドン１８０をＧＡＧからＧＧＧに変えて、負に荷電されたグルタミン酸残基を中性のグリシン残基と交換することを予測した。

【０３０１】

．０００２心筋症、家族性肥厚，３［ＴＰＭ１，ＡＳＰ１７５ＡＳＮ］１５ｑ（１１５１９６）に連結される家族性肥大性心筋症の形態に罹患したファミリーＭＩのメンバーにおいて、Ｔｈｉｅｒｆｅｌｄｅｒら（１９９４）は、ＧＡＣからＡＡＣにコドン１７５を変えたヌクレオチド５７９で、GからAへの移行のヘテロ接合性を見出した。置換は、罹患した個体に存在する変異した対立遺伝子が、無影響の個体で見出される負に荷電したアスパラギン酸残基の代わりに中性のアスパラギン残基をコードすると予測した。

【０３０２】

Ｗａｔｋｉｎｓら（１９９５）は、Ｄ１７５Ｎ変異が本当に肥大性心筋症の原因となるかまたは多型だけであるかどうか調査した。その理由は、α－トロポミオシン遺伝子の２つの同定された変異のいくらかの特徴が、ＣＭＨのための他の疾患遺伝子の変異の特徴と対比されるからである。β心臓ミオシン重鎖遺伝子（ＭＹＨ７；１６０７６０）および心臓トロポニンＴ遺伝子と異なって、α－トロポミオシン遺伝子は遍在して発現され、それでも、疾患表現型は、心筋に限られている。Ｗａｔｋｉｎｓら（１９９５）は、ａｓｐ１７５からａｓｎへのミスセンス変異が発端者および２人の罹患した子孫に存在するが、発端者の３つの同胞のいずれでも存在しなかったことを発見した。両親が死亡者であったが、４つの親の染色体のハプロタイプは再構築され得た。（ハプロタイプは、３５ｃＭの範囲にわたっている１０の隣接多型の遺伝子内染色体多型の使用をした。）１つの親染色体は、２つの子孫に移された：１つは、ａｓｐ１７５からａｓｎ変異（影響を受けた発端者）を有し、そして１つは、ＴＰＭ１変異が欠如していた臨床的に無影響の同胞を有する。このように、ａｓｐ１７５からａｓｎへの変異は、新規に起こるにちがいなかい。

【０３０３】

．０００３　心筋症、家族性肥厚，３［ＴＰＭ１，ＶＡＬ９５ＡＬＡ］Ｋａｒｉｂｅら（２００１）は、肥厚性心筋症（１１５１９６）に罹患した多数のメンバー有する大きい中南米のファミリーを記載した。彼らは、ＴＰＭ１で新しいｖａｌ９５からａｌａ（Ｖ９５Ａ）への変異を見出し、疾患表現型を分離した。この変異は、ＭＹＨ７（１６０７６０．００１０、１６０７６０．００１２、１６０７６０．０００１）の特定の突然変異を有しているいくらかのＣＭＨ１系統に示されるように、同じ穏やかな程度の左心室肥大と関係していた。浸透は、異常な心エコー図に基づいて５３％と推定された；しかし、通常の心エコー図および通常のＥＣＧを有する２の突然変異キャリアは、研究時にそれらの中間の３０年だけにおいてあった。浸透はＥＣＧによって正確に評価され得なかった。これは、次のことの故である。６人の年上の変異陰性家族のメンバーは、軽微なＴ波変化があった。この家族の累積的な生残率は、４０年に７３％の＋／－１０％、および６０年に３２％＋／－１３％であった。変異体の発現および細菌系の制御トロポミオシンは、この変異の機能的な評価を可能にした。カルシウム結合および異常なミオシンサイクリングの増加が、観察された；両方とも、疾患発病学の重要な誘因であると考えられた。

【０３０４】

別の配列（研究室表示　６ｂ３＿ｒＥ（配列番号１）は、ＡＴＰアーゼ、Ｈ＋ＴＲＡＮＳＰＯＲＴＩＮＧ、ＬＹＳＯＳＯＭＡＬ（ＡＴＰ６Ｌ）をコードしている配列を含む。このタンパク質はまた、ＡＴＰａｓｅ，Ｈ＋ＴＲＡＮＳＰＯＲＴＩＮＧ、ＬＹＳＯＳＯＭＡＬ、１６－ＫＤとして公知である。この配列を、マップ遺伝子座１６ｐ１３．３にマップする。

【０３０５】

常染色体の優性多発性嚢胞腎疾患（１７３９００）のための候補遺伝子を分離する試みにおいて、Ｇｉｌｌｅｓｐｉｅら（１９９１）は、１６ｐ１３．３から多くのＣｐＧの豊富な島を同定し、この領域は、ＰＫＤ１（６０１３１３）変異の部位を含むとして遺伝的に規定された。これらの島のうちの１つに隣接したゲノム断片は、ｃＤＮＡを４つの推定膜貫通ドメインを有する１５５－アミノ酸ペプチドをコードするＨｅＬａ細胞および培養された嚢状の上皮から分離するために用いた。対応する転写物は、試験される全ての組織で見出されたが、脳および腎臓で最も豊富だった。推定されたアミノ酸配列は、液胞Ｈ（＋）－ＡＴＰａｓｅのプロトンチャネルの一部であると考えられている１６ｋＤプロテオリピド構成要素に、９３％の類似性があった。変異したプロトンチャネルは、嚢胞性疾患の発病学に関係し得る。しかし、影響を受けた人の両方の対立遺伝子に対応するｃＤＮＡのシークエンシングが、推定されたアミノ酸配列の違いを明らかにしなかった。さらに、転写物サイズおよび量は、嚢胞腎において変わらなかった。

【０３０６】

注記：ＡＢＣＲは、マウスの本発明者らの細胞株において発現されない再編成された遺伝子である。この遺伝子はＣｈａｒ４の隣にある：Ｐ．ｃｈａｂａｕｄｉマラリア耐性Ｑ

ＴＬ　４－ならびに未知の機能のいくつかの遺伝子。マウスの染色体３　６０．８１－６１．１９ｃＭは、最も近い齧歯類の標識である。隣にあるヒト遺伝子は、ＰＡＲＧ１；ＬＯＣ１６３４６２；およびＬＯＣ１６３４６３である。

【０３０７】

別の配列（研究室表示　６ＢＥ７２＿ｒＥ（配列番号２））は、ＣＣＣＴＣ－ＢＩＮＤＩＮＧ　ＦＡＣＴＯＲ（ＣＴＣＦ）にコードしている配列を含む。このタンパク質はまた、ＴＲＡＮＳＣＲＩＰＴＩＯＮＡＬ　ＲＥＰＲＥＳＳＯＲ　ＣＴＣＦとして公知である。

【０３０８】

Ｆｉｌｉｐｐｏｖａら（１９９６）は、ヒトのＣＴＣＦ（ＣＣＣＴＣ－結合因子）ｃＤＮＡクローンを単離および分析した。それらは、ヒトのＣＴＣＦタンパク質が１１個のジンクフィンガードメインを含み、例外的に高度に保存され、そして、トリＣＴＣＦアミノ酸配列と９３％の同一性を共有することを示した。それは、ニワトリ、マウスおよびヒトのＭＹＣ（１９００８０）オンコジーンのプロモーター近位領域の調節配列と特異的に結合する。ＣＴＣＦは、異種のＤＮＡ結合ドメインに移動可能な２つの転写リプレッサドメインを含む。１つのＣＴＣＦ結合部位（マウスおよびヒトのＭＹＣ遺伝子において保存される）は、主なＰ２プロモーターのすぐ下流に見出される。マウス細胞およびヒト細胞からの核抽出物のゲルシフトアッセイは、ＣＴＣＦがこの配列に対する支配的な要因結合であることを示した。Ｐ２－近位ＣＴＣＦ結合部位の変異分析および一過性共トランスフェクション実験は、ＣＴＣＦがヒトのＭＹＣ遺伝子の転写リプレッサーであることを証明した。１００％の配列同一性がトリおよびヒトのＣＴＣＦタンパク質のＤＮＡ結合ドメインにあるにもかかわらず、ニワトリおよびヒトのＭＹＣプロモーターのＣＴＣＦによって認識される調節配列は明らかにそらされる。接触ヌクレオチドを変異させることは、ヒトのＭＹＣ遺伝子のＰ２プロモーターに対するＣＴＣＦ結合が、ニワトリＭＹＣ遺伝子のＣＴＣＦ結合部位に存在しない多くのユニークな接触ＤＮＡベースを必要とすることを確認した。さらに、タンパク分解性保護アッセイは、更にいくつかのＣＴＣＦジンクフィンガーが、ニワトリ部位よりヒトのＣＴＣＦ結合部位を接触することに関係していることを示した。連続して欠失されたジンクフィンガードメインを利用するゲルシフトアッセイは、ＣＴＣＦジンクフィンガー２～７がニワトリＭＹＣプロモーターへの結合に関係していることを示し、一方、フィンガー３～１１が、ヒトのプロモーターに対するＣＴＣＦ結合を媒介することを示した。ジンクフィンガー使用のこの柔軟性は、「多価の」転写因子であるＣＴＣＦを明らかにする。ノーザンブロット分析は、ヒトのＣＴＣＦ遺伝子が約４ｋｂの転写物として遍在して発現されることが明らかになった。

【０３０９】

Ｂｅｌｌら（１９９９）は、ヒト細胞のエンハンサーブロッキング活性に必要かつ充分であるニワトリβ－グロビンインスレーターの４２ｂｐ　ＤＮＡフラグメントを同定した。彼らは、この配列（ＦＩＩ）が、ＣＴＣＦのための結合部位であることを示し、そして、これらのＣＴＣＦ結合部位は、検討される脊椎動物エンハンサブロッキング要素の全てに存在した。Ｂｅｌｌら（１９９９）は、ＣＴＣＦによる方向エンハンサブロッキングが脊椎動物の遺伝子調節の保存される構成要素であることを示唆した。

【０３１０】

ＢｅｌｌおよびＦｅｌｓｅｎｆｅｌｄ（２０００）ならびにＨａｒｋら（２０００）は、ＣＴＣＦがＨ１９（１０３２８０）とＩＧＦ２（１４７４７０）との間の非メチル化刷込み（ｉｍｐｒｉｎｔｅｄ）コントロール領域（ＩＣＲ）内で、エンハンサブロッキングに必須ないくつかの部位に結合することを独立して示した。Ｈａｒｋら（２０００）は、ＣＴＣＦ結合が、ＩＣＲのＤＮＡメチル化によって廃止されることを証明した。ＣＴＣＦ結合部位の範囲内のＣｐＧのメチル化は、インビトロでＣＴＣＦの結合を除去し、そしてこれらの部位の欠失は、インビボでエンハンサーブロッキング活性の喪失を生じ、それによって、遺伝子発現を可能にする。このＣＴＣＦに依存するエンハンサーブロッキング要素は、インスレーターとして作用する。ＢｅｌｌおよびＦｅｌｓｅｎｆｅｌｄ（２０００）は、それがＩＧＦ２の刷込みを制御すること、および、このインスレーターの活性

が、父性対立遺伝子の特定のＤＮＡメチル化によって、母性対立遺伝子に制限されることを示した。ＢｅｌｌおよびＦｅｌｓｅｎｆｅｌｄ（２０００）は、ＤＮＡメチル化が、遺伝子プロモーターへのエンハンサー境界の調整によってエンハンサアクセスを調節することによって、遺伝子発現を制御し得ることを結論づけた。

【０３１１】

ＤＭ１遺伝子座のＣＴＧ繰り返しの展開によって、２つの隣接遺伝子、ＤＭＰＫ（６０５３７７）およびＳＩＸ５（６００９６３）の発現を変えることによって、そして、繰り返しを含有するＲＮＡの毒作用で、筋強直性ジストロフィーが生じる。Ｆｉｌｉｐｐｏｖａら（２００１）は、ＣＴＧ繰り返しに隣接し、ＤＭＰＫとＳＩＸ５との間のインスレーターエレメントを形成する２のＣＴＣＦ結合部位を同定した。これらの部位のメチル化は、ＣＴＣＦの結合を妨げ、これは、先天性筋強直性ジストロフィーのＤＭ１遺伝子座メチル化がインスレーター機能を崩壊させることを示す。さらにまた、ＣＴＣＦ結合部位は、いくつかの他の遺伝子座でＣＴＧ／ＣＡＧ繰り返しと関係している。Ｆｉｌｉｐｐｏｖａら（２００１）は、ＣＴＧ／ＣＡＧ繰り返しの一般の役割を、ヒトゲノムの多重サイトでインスレーターエレメントの要素として示唆した。

【０３１２】

Ｃｈａｏら（２００２）は、インスレーターおよび転写因子ＣＴＣＦをマウスのＸ染色体選択のための候補トランス作用性要因として同定した。選択／刷込みセンターは、エンハンサーブロッキングアッセイにおいて機能する直列型のＣＴＣＦ結合部を含む。インビトロ結合は、ＣｐＧメチル化によって減少し、非ＣｐＧメチル化を含むことによって廃止される。Ｃｈａｏら（２００２）は、Ｔｓｉｘ（３００１８１）およびＣＴＣＦが一緒にＸ失活のための調節可能な後成的発現スイッチを決めると仮定した。マウスのＴｓｉｘは、４０を超えるＣＴＣＦのモチーフを含み、そして、ヒト配列は、１０を超えて有する。点－プロット分析は、非常に相同なＤＸＰａｓ３４の連続した頭－尾配置の繰り返しを示した。

【０３１３】

別の配列（研究室表示　７Ａ１０＿１－ｒＥ（配列番号４１））は、ＤＥＬＥＴＥＤ　ＩＮ　ＡＺＯＯＳＰＥＲＭＩＡ－ＬＩＫＥ（ＤＡＺＬ）をコードしている配列を含む。このタンパク質はまた、ＤＡＺＬＡまたはＤＥＬＥＴＥＤ　ＩＮ　ＡＺＯＯＳＰＥＲＭＩＡ　ＨＯＭＯＬＯＧまたはＤＡＺＨまたはＳＰＧＹＬＡとして公知である。この配列は、遺伝子マップ遺伝子座３ｐ２４にマップする。この遺伝子は、本発明の方法を利用しているネガティブ鎖から崩壊させた。

【０３１４】

ほとんどまたは全てのＹ－染色体遺伝子が、一度、Ｘ染色体と共有されたと広く考えられている。ＤＡＺ遺伝子（４０００００３）（「無精子症において欠失する」として名付けられる）は、ＡＺＦ（ヒトのＹ染色体無精子症因子（４１５０００））の候補である。Ｓａｘｅｎａら（１９９６）は、ヒトの第３染色体上のＡＺＦ領域および機能的なＤＡＺホモログ（それらによってＤＡＺＨを象徴した）においてクラスター化されたＤＡＺ（ＤＮＡ配列において９９％より高い同一性）の多数のコピーを報告した。全遺伝子ファミリーは、生殖細胞において発現されるようであった。

【０３１５】

配列分析は、Ｙ染色体ＤＡＺクラスターが（１）Ｙへの常染色体の遺伝子の転位；（２）移行された遺伝子内のエキソンの増幅および剪定；そして、（３）改変された遺伝子の増幅によって、霊長類進化の間、起こることを示した。Ｓａｘｅｎａら（１９９６）はこれらの結果が性染色体進化の一般的な図に疑問を呈すると述べ、常染色体繁殖遺伝子の獲得がＹ染色体進化の重要なプロセスであったことを示唆した。ヒトゲノムの放射ハイブリッドマップ上の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）および位置ぎめによって、ＤＡＺＨ遺伝子を３ｐ２４にマップした（Ｓａｘｅｎａら（１９９６））。Ｓａｘｅｎａらは、ＤＡＺＨがＤＡＺ遺伝子ファミリーの創始メンバーであることを示唆した（１９９６）。

【０３１６】
Ｓｈａｎら（１９９６）は、ｃＤＮＡプローブＳＰＧＹ１を有する異なる精巣ライブラリーをスクリーニングすることによって、ＤＡＺ遺伝子と相同なヒト常染色体遺伝子をクローニングした。この遺伝子（彼らによりＳＰＧＹＬＡと指定された）は、ＦＩＳＨによって第３染色体にマップされた。Ｓｈａｎら（１９９６）は、ＳＰＧＹＬＡ　ｃＤＮＡ配列とＤＡＺおよびＳＰＧＹ１のｃＤＮＡ配列との比較が２つの顕著な違いを明らかにすることを報告した。ＳＰＧＹＬＡがわずか１つの７２ｂｐ配列サブユニットだけを含むので、７２ｂｐ配列ユニット（ＤＡＺは、繰り返す）の直列型の繰り返し構造はＳＰＧＹＬＡにおいて欠失している。このサブユニットの下流に、特異的な１３０ｂｐ配列ドメインが存在している。このドメインは、また、マウスＤａｚｌａ遺伝子（マウス第１７染色体にコードされた）においても、そして、ショウジョウバエ遺伝子「ブール（ｂｏｕｌｅ）」にも存在するが、ＤＡＺには存在しない。Ｓｈａｎら（１９９６）は、ＳＰＧＹＬＡが男性の性腺だけにおいて表されるＲＮＡ結合タンパク質をコードすることを証明した。

【０３１７】
Ｙｅｎら（１９９６）は、ＤＡＺｃＤＮＡクローンを有する精巣に特異的なライブラリーのスクリーニングによって、マウスＤａｚｌａ遺伝子のヒト遺伝子ホモログの単離を報告した。彼らが単離した遺伝子は、ＤＡＺで見出された７つの繰り返しの１つのみが含まれており、マウスＤａｚｌａ遺伝子に高度な相同を示し、染色体３ｐ２４にマップした。

【０３１８】
ＲＢＭおよびＤＡＺ／ＳＰＧＹは、ＲＮＡ結合のモチーフを含んでいるタンパク質をコードするＹ染色体に配置される遺伝子の２つのファミリーであり、両方とも候補ヒト精子発生遺伝子として記載された。どちらの遺伝子ファミリーも、ヒトの男性の精子発生にとって重要なことを示さなかったが、ショウジョウバエのＤａｚｌａホモログは、精子発生のために重要であった（Ｅｂｅｒｈａｒｔら、１９９６）。Ｄａｚｌａに対してウサギにおいて惹起されるポリクローナル抗体およびマウスにおけるノックアウト技術を用いて、Ｒｕｇｇｌｕら（１９９７）は、Ｄａｚｌａタンパク質が雌生殖細胞および雄生殖細胞（核ＲＢＭタンパク質と異なった）において細胞質であることを証明した。Ｄａｚｌａ遺伝子の混乱は生殖細胞の損失および配偶子産生の完全な欠如につながり、そして、Ｄａｚ１ａが生殖細胞の分化にとって重要であることを証明した。

【０３１９】
常染色体ＤＡＺＬＡおよびＹにリンクされたＤＡＺイントロン配列の比較（Ａｇｕｌｎｉｋら（１９９８））によって、雄から雄への突然変異率の比率のための新しい形態を誘導した；彼らは、α（ｍ）＝４であることを見つけた。

【０３２０】
第３染色体上の単一コピー遺伝子ＤＡＺＬ１は、ＲＮＡ結合可能性を有する精巣に特異的なタンパク質をコードする。Ｙ染色体ＤＡＺホモログは、ヒトおよび高等な霊長類に限定される。ＤＡＺが働き得る高等な霊長類の精子発生に独特の機能を調査し、機能的な保存の程度を決定することにより遺伝子の機能的な状態を評価するために、Ｓｌｅｅら（１９９９）はＤａｚｌヌルマウスの生殖不能表現型（これは、重症生殖細胞減少および成熟分裂の失敗によって特徴づけられる）を補足するために２２５ｋｂのＹＡＣに含まれるヒトＤＡＺ遺伝子の能力を試験した。ＤＡＺトランス遺伝子が導かれる場合、Ｄａｚｌ－／－マウスは不妊症のままだったが、組織学的検査は変異体表現型の部分的かつ可変的なレスキュー、すなわち、成熟分裂のパキテン期に細精管および生存の生殖細胞数の顕著な増加としての明示を明らかにした。ＤＡＺ遺伝子産物の精子発生の役割の限定的な証明を構成すると共に、これらの発見はＤＡＺとＤＡＺＬ遺伝子との間の高度な機能的保存を確認し、それらが避妊介入の単一の目標を構成し、無精子症の男性のＤＡＺＬ１遺伝子の治療的なアップレギュレーションの可能性を増加することができることを示唆する。

【０３２１】
他の配列（研究室表示　７Ａ１０＿１－ｒＥ（配列番号４１））は、ＡＮＮＥＸＩＮＡ２（ＡＮＸＡ２）をコードしている配列を含む。このタンパク質はまた、公知のＡＮＮ

ＥＸＩＮ　ＩＩ（ＡＮＸ２）、ＬＩＰＯＣＯＲＴＩＮ　ＩＩ；ＬＰＣ２；ＬＩＰ２、ＡＮＮＥＸＩＮ　ＩＩ　ＰＳＥＵＤＯＧＥＮＥ　１，ＩＮＣＬＵＤＥＤ、ＡＮＸ２Ｐ１、ＩＮＣＬＵＤＥＤ　ＡＮＸ２Ｐ２、ＩＮＣＬＵＤＥＤ　ＡＮＸ２Ｐ３、ＩＮＣＬＵＤＥＤである。この配列は、遺伝子マップ遺伝子座１５ｑ２１－ｑ２２をマップする。

【０３２２】

Ａｎｎｅｘｉｎ　ＩＩ（ＳＲＣオンコジーン（１９００９０）によってコードされるチロシンキナーゼの主要細胞基質）は、Ｃａ（２＋）依存リン脂質のアネキシンファミリーおよび膜結合タンパク質に属する。長期の骨髄培養において形成される高度に精製されたヒトの骨破壊様多核細胞（ＭＮＣ）から発生するｃＤＮＡ発現ライブラリーをスクリーニングすることによって、Ｔａｋａｈａｓｈｉら（１９９４）は、ＭＮＣ形成を刺激した候補クローンを同定した。配列分析は、このｃＤＮＡがアネキシンＩＩをコードすることを示した。さらなる研究が、ＡＮＸ２が破骨細胞形成および骨吸収（この分子について以前に未知の機能）を強化するオートクライン因子であることを示唆する結果を生じた。

【０３２３】

Ｓｐａｎｏら（１９９０）は、リポコルチンＩＩ（ＬＩＰ２）をコードしている遺伝子および３つの偽遺伝子のヒトゲノムのクローンを単離して、特徴づけた。ＬＩＰ２遺伝子は、少なくとも４０ｋｂ長であって、１３のエキソンから成る。３つの偽遺伝子は、レトロポゾンの代表的特徴を示す。Ｓｐａｎｏら（１９９０）は、Ｈｕｅｂｎｅｒら（１９８８）によって発表されるデータと共に、ＬＩＰ２遺伝子が第１５染色体に配置されると結論づけた実験を報告した。これらの３つの偽遺伝子は、第４染色体、第９染色体および第１０染色体に割り当てられた。ＬＩＰ１遺伝子（１５１６９０）およびＬＩＰ偽遺伝子の第９染色体上の共存は、偶然であるとみなされた。Ｒｉｃｈａｒｄら（１９９４）は、ヒト第１５染色体の物理的マップ、発現マップおよび遺伝子マップの統合を示した。これらのマップは領域ＩＶ（すなわち１５ｑ２１－ｑ２２）にＡＮＸＡ２遺伝子を配置し、従って、以前の定位を確認した。

【０３２４】

（偽遺伝子）体細胞ハイブリッド分析およびインサイチュハイブリダイゼーションでのｃＤＮＡの使用により、Ｈｕｅｂｎｅｒら（１９８７、１９８８）はＬＰＣ２Ａ（ＬＩＰ２Ｐ１）座を４ｑ２１ｑ３１にマップした。Ｓｐａｎｏら（１９９０）は、第４染色体にマップするリポコルチンＩＩ様遺伝子がレトロポゾンの代表的特徴を有する偽遺伝子（ＡＮＸ２Ｐ１）であるという証拠を提示した。

【０３２５】

体細胞ハイブリッド分析およびインサイチュ染色体ハイブリダイゼーションのリポコルチンｃＤＮＡによって、Ｈｕｅｂｎｅｒら（１９８７、１９８８）は、ＬＰＣ２Ｂを第９染色体にマップした。従って、ＬＰＣ１およびＬＰＣ２Ｂは、シンテニックである。ＬＰＣ２Ｂは、ＡＢＬ（１８９９８０）の近位に位置する。カルパクチンＩは、リポコルチンＩＩの同義語である。Ｓｐａｎｏらは第９染色体にマップするリポコルチンＩＩ様遺伝子がレトロポゾンを代表する特徴を有する偽遺伝子（ＡＮＸ２Ｐ２）であるという証拠を提示した（１９９０）。ゲノムデータベース（ＧＤＢ）は９ｐ１３として領域の場所を与えた。

【０３２６】

Ｈｕｅｂｎｅｒら（１９８７，１９８８）は、リポコルチンＩＩＣ（ＬＰＣ２Ｃ）遺伝子を１０ｑ２１－ｑ２２にマップした。Ｓｐａｎｏらによれば、第１０染色体にマップするリポコルチンＩＩ様遺伝子は、第１５染色体に配置される機能的なリポコルチンＩＩ遺伝子に関連があるレトロポゾンの構造を有する偽遺伝子（ＡＮＸ２Ｐ３）である（１９９０）。

【０３２７】

他の配列（研究室表示　１０＿４６－４－Ｌａｃ（配列番号２１４））は、ＤＮＡＪ、Ｅ．ＣＯＬＩ、ＨＯＭＯＬＯＧ　ＯＦ、ＳＵＢＦＡＭＩＬＹ　Ａ、ＭＥＭＢＥＲ　１；ＤＮＡＪＡ１をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＨＥＡＴ－ＳＨＯＣＫ　Ｐ

ＲＯＴＥＩＮ（ＤＮＡＪ－ＬＩＫＥ ２）；ＨＳＪ２ ＨＥＡＴ－ＳＨＯＣＫ ４０－ＫＤ ＰＲＯＴＥＩＮ ４；ＨＳＰＦ４，ＨＤＪ２およびＨＳＤＪとして公知である。Ｄｎａｊａ１は、２つの他の遺伝子：ＬＯＣ１５８１８８およびＬＯＣ１５８１８７に重なる。遺伝子ｄｎａｊｌは、また、本発明において崩壊する。ＤＮＡＪＡ１は、負鎖から離れる。

【０３２８】

Ｅ．ｃｏｌｉヒートショックタンパク質ＤＮＡＪは、タンパク質の折畳み、タンパク質分解、リン酸化およびファージの複製に関係した。ヒトの内皮細胞および単核細胞によって特に反応するモノクローナル抗体を有するヒトの臍静脈内皮細胞ｃＤＮＡ発現ライブラリーをスクリーニングすることによって、Ｃｈｅｌｌａｉａｈら（１９９３）はＨＳＪ２をコードしているｃＤＮＡを単離し、これらはＨＤＪ２と名付けられた。予測された３９７－アミノ酸ＨＳＪ２タンパク質はＤＮＡＪと３２％同一であり、Ｎ末端領域において最も高い同一性を有する。Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅにおいて公知のＤＮＡＪホモログの中で、ＨＳＪ２はＹＤＪ１と最も同一であり、それはミトコンドリアおよび小胞体への特定のタンパク質の輸送に関与し得る。

【０３２９】

他の配列（研究室表示 １２＿３Ｂ＃２＿Ｌａｃ（配列番号２１８））はＪＷＡを含み、これは、負鎖において、ＵＢＥ１Ｃ：ユビキチン活性化酵素Ｅ１Ｃ（ＵＢＡ３ホモログ、酵母）に続く。Ｅ１（ユビキチン－活性化酵素）様複合体のサブユニット；はＮＥＤＤ８を活性化させて、そして、ｅｃｕｒｓｏｒタンパク質結合タンパク質－１を分解するためのＨｓ－ｃｕｌｌｉｎ－４Ａ（Ｃｕｌ４Ａ）を標的化し、ウサギ網状赤血球溶菌液のＮＥＤＤ８と結合することができる。しかし、ＡＰＰＢＰ１がＥ１酵素のＮ末端ドメインだけに類似性を示した時から、著者はそれがＥ１ｓのＣ末端の領域に類似性を示しているタンパク質と相互に作用しなければならないと結論した。配列データベースを検索することによって、Ｏｓａｋａら（１９９８）は、ＵＢＡ３（酵母Ｕｂａ３のヒトホモログ）をコードしているｃＤＮＡを同定した。予測された４４２－アミノ酸ＵＢＡ３タンパク質は、４３％の配列同一性を酵母Ｕｂａ３と共有する。インビトロで、ＵＢＡ３は、ＡＰＰＢＰ１との複合体およびＮＥＤＤ８とのチオエステル結合を形成した。Ｏｓａｋａらは、ＡＰＰ－ＢＰ１／ＵＢＡ３複合体がＮＥＤＤ８の活性化のためのＥｌのような酵素として機能することを示唆した（１９９８）。

【０３３０】

他の配列（研究室表示 １２＿３Ｂ＃８－ｒＥ（配列番号１０７））は、ＡＰＲＡＴＡＸＩＮ（ＡＰＴＸ）をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＦＬＪ２０１５７として公知である。この配列は、遺伝子マップ遺伝子座９ｐ１３．３にマップする。

【０３３１】

ＡＰＴＸ遺伝子は、ヒスチジン三つ組（ＨＩＴ）スーパーファミリーのメンバーをコードし、このメンバーに、ヌクレオチド結合活性およびジアデノシンポリホスフェートヒドロラーゼ活性が、起因している。ＡＰＴＸ遺伝子は、運動失調症眼失行症（２０８９２０）の変異体である。

【０３３２】

眼球運動の失行症、運動失調症－眼球運動失行症症候群（２０８９２０）を有する初期の発症運動失調症が、９ｐ１３にマップする。Ｄａｔｅらは、臨床症状が常染色体性劣性遺伝、発病年令前半、フリートライヒ運動失調症（ＦＲＤＡ；２２９３００）様臨床症状および低蛋白血症によって特徴づけられた一団の日本の患者を識別した（２００１）。ＦＲＤＡ座への結合は、除外された。彼らは、これらの患者の障害が運動失調症－眼球運動失行症症候群と同じ座（９ｐ１３）にリンクすることを確認した。彼らは、候補領域を狭くして、原因となる遺伝子としてヒスチジン三つ組スーパーファミリーの部材をコードしている新規な遺伝子を識別した。その産物はアパラタキシン（ａｐｒａｔａｘｉｎ）と呼ばれ、遺伝子記号はＡＰＴＸである。多くのＨＩＴタンパク質（例えば、ＦＨＩＴ、６０１１５３；ＨＩＮＴ、６０１３１４）が識別されたが、アパラタキシンは、第一に異なっ

た表現型に連結された。

【０３３３】

同型接合性マッピングならびにポルトガルおよび日本の創始ハプロタイプ研究によって、Ｍｏｒｅｉｒａら（２００１）は、運動失調症－眼球運動失行症症候群の遺伝子変異体を９ｐ１３．３上に２－ｃＭ間隔で局在化した。彼らは、重要な間隔を３００－ｋＢ領域まで減少させ、ＡＰＲＸ遺伝子における変異を識別し、この遺伝子は、ＦＬＪ２０１５７（ＧｅｎＢａｎｋ　ＡＫ０００１６４）と識別された。

【０３３４】

（代替的転写の発現）

Ｍｏｒｅｉｒａらは、エキソン３の選択的スプライシングから生じているＡＰＴＸの２の主なｍＲＮＡ種を識別した（２００１）：１６８のアミノ酸およびエキソン３のＡＴＧコドンの短い形態、そして、さらなるエキソン３の５プライム部分の中でさらなる１１５ヌクレオチドを有する長い形態から生じて、別の１７４のアミノ酸およびエキソン１の第１のＡＴＧコドンの追加を生じる。Ｍｏｒｅｉｒａら（２００１）およびＤａｔｅら（２００１）は、転写の長い形態および短い形態の両方に従って変異体を番号付けた。

【０３３５】

Ｍｏｒｅｉｒａらは、ＲＴ－ＰＣＲによって、ＡＰＴＸ遺伝子が遍在して発現されることを証明した（２００１）。少量に存在するより短いフレームを移された形については、長い転写は、ヒトの細胞株で見つかる主な形である；肝臓組織は、２つの転写の等しい量を有する。ノーザンブロット分析によって、Ｄａｔｅら（２００１）は、長さ２ｋｂの形態の遍在する発現および１．３５ｋｂの短い形態の制限された発現を示した。

【０３３６】

Ｄａｔｅらは、相同検索によって、ａｐｒａｔａｘｉｎの両方の形が高度に保存されたＨＩＴモチーフ（Ｈｉｓ－Ｘ－Ｈｉｓ－Ｘ－Ｈｉｓ－Ｘ－Ｘ、ここでＸが、疎水性アミノ酸である）（ＨＩＴタンパク質のための基本的モチーフ）を有することを示した（２００１）。ＨＩＴタンパク質は、以下の２の分岐に分類された：動物および真菌類だけで見つかる壊れやすいＨＩＴタンパク質ファミリーおよび全ての細胞寿命の代表を有する古代のＨＩＴヌクレオチド結合タンパク質（ＨＩＮＴ）ファミリー。

【０３３７】

系統樹分析法は、ａｐｒａｔａｘｉｎがＨＩＴタンパク質スーパーファミリーの第３の部材であることを示した。眼球運動の失行症および低蛋白血症を有する初期の発症運動失調症患者で見つかる突然変異は、高度に保存されたアミノ酸を含んだ。

【０３３８】

Ｄａｔｅら（２００１）およびＭｏｒｅｉｒａら（２００１）は、運動失調症－眼球運動失行症の原因としてのＡＰＲＸ遺伝子の突然変異を識別した。Ｄａｔｅらは挿入または欠失突然変異が小児期発症を有する重篤の表現型を生じると述べ（２００１）、一方ｖａｌ１８９からｇｌｙへの（６０６３５０．０００４）およびｐｒｏ３２からｌｅｕへの（６０６３５０．０００２）ための化合物を有する血統において、ミスセンス突然変異は比較的遅い発病年令を有する中程度の表現型を生じた；発症年令は、２５才であった。

【０３３９】

．０００１眼球運動の失行症および低蛋白血症を有する初期の発症運動失調症［ＡＰＴＸ、１－ＢＰ　ＩＮＳ、１６７Ｔ］　Ｄａｔｅら（２００１）は、ＥＡＯＨ（２０８９２０）を有する３つの血統の罹患者がヌクレオチド１６７（１６７ｄｅｌＴ；短い形態の第１のＡＴＧコドンから始まっているヌクレオチド番号）の後のＴの同型接合の挿入を有したことを発見した。これは、早まった停止を有するフレームシフトを生じる。これらの３つのファミリーの影響を受けた個体は、同型接合だった；３つの他の血統の影響を受けるメンバーには、異なる突然変異と合わせて異型接合状態の突然変異があった。それらの患者の中で、Ｍｏｒｅｉｒａらは日本の創始ハプロタイプが同じ突然変異と関係していることを発見した（２００１）。これらのハプロタイプを彼らは遺伝子の長い転写による６８９ｉｎｓＴと呼んだ。

【０３４０】
．０００２　眼球運動の失行症および低蛋白血症を有する初期の発症運動失調症［ＡＰＴＸ，ＰＲＯ３２ＬＥＵ］ＥＡＯＨ（２０８９２０）とファミリーである、Ｄａｔａら（２００１）により見出された第２の最も一般的な突然変異は、ＣからＴへの転移であり、ｐｒｏ３２からｌｅｕへのアミノ酸変化を生じる。この変異体は、ＨＩＴタンパク質の全てのサブファミリーの中で高度に保存されるプロリン残基を取り除く。Ｍｏｒｅｉｒａら（２００１）は、この突然変異をＡＰＴＸ遺伝子の長い転写によるＰＲＯ２０６ＬＥＵと称した。
【０３４１】
．０００３　眼球運動の失行症および低蛋白血症を有する初期の発症運動失調症［ＡＰＴＸ、１－ＢＰ　ＤＥＬ、３１８Ｔ］、１つの血統においてＤａｔｅらは、ＥＡＯＨ（２０８９２０）を有する部材が３１８ｄｅｌＴ単一ヌクレオチド欠失についての同型接合であり、早まった停止を有するフレームシフトを結果として生じると述べた（２００１）。３つの血統（１６７ｉｎｓＴ（６０６３５０．０００１）、Ｐ３２Ｌ（６０６３５０．０００２）および３１８ｄｅｌＴ）において突然変異は、異型接合状態の化合物に存在した。
【０３４２】
．０００４．眼球運動の失行症および低蛋白血症を有する初期の発症運動失調症［ＡＰＴＸ、ＶＡＬ８９ＧＬＹ］ＥＡＯＨ（２０８９２０）を有するファミリーにおいて、Ｄａｔｅら（２００１）は、影響を受けた部材がヒスチジン三つ組の高度に保存された疎水性アミノ酸のうちの１つを含んでいるｖａｌ８９からｇｌｙへの（Ｖ８９Ｇ）ミスセンス突然変異を有すると述べた。ＨＩＴモチーフがリン酸塩結合ループの一部を形成するにつれて、Ｖ８９Ｇ突然変異は多分リン酸塩－結合活性に影響を及ぼす。
【０３４３】
他の配列（研究室表示　Ｌ１９５ＢＩＥ＿ｒＥ（配列番号１３８）は、ＧＥＮＥＲＡＬ　ＴＲＡＮＳＣＲＩＰＴＩＯＮ　ＦＡＣＴＯＲ　ＩＩＥ　ＰＯＬＹＰＥＰＴＩＤＥ　１（ＧＴＦ２ＥＩ）をコードしている配列を含む。
【０３４４】
真核生物タンパク質コード遺伝子からの転写の開始は、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ（ＰｏｌＩＩ；１８０６６０を参照のこと）および、転写因子の幹部を必要としている複雑なプロセスである。これらの因子は、それらの機能に基づいて２つのクラスに分けられることができる：全てのＰｏｌｌｆ遺伝子の転写のために必要である一般の因子および発現を調節するために必要である配列特異的の因子。一般の転写因子およびＰｏｌＩＩは、コアプロモータ要素と相互作用することによって、転写開始点の近くで特定の多タンパク質複合体を形成する。最も一般的なコアエレメントはＴＡＴＡボックスである。そして、転写開始部位またはイニシエーターエレメントの上流２５－３０ｂｐに代表的に位置する。コアプロモーターエレメントの近位または遠位に位置するＤＮＡ配列エレメントに結合する配列特異的転写因子が、転写を劇的に強化または抑制することができる。識別された一般的な転写因子は、ＴＦＩＩＡ、ＴＦＩＩＢ（１８９９６３）、ＴＦＩＩＤ（３１３６５０）、ＴＦＩＩＥ（１８９９６４をまた参照のこと）、ＴＦＩＩＦ（１８９９６８、１８９９６９）、ＴＦＩＩＧ／ＪおよびＴＦＩＩＨ（１８９９７２）である。ヒトＴＦＩＩＥは、相対分子質量５６，０００と３４，０００の２のサブユニットを含む。ＴＦＩＩＥの構造は、２つのαサブユニットおよび２つのβサブユニットのヘテロテトラマーであるように見え、両方のサブユニットが最適に再構成された基礎レベル転写のために必要である。Ｐｅｔｅｒｓｏｎら（１９９１）は、一般の転写因子ＩＬＥの両方のサブユニットのためのヒトｃＤＮＡクローンを単離した。精製した組換えタンパク質を使用して、Ｐｅｔｅｒｓｏｎらは、両方のサブユニットが、安定なプレイニシエーション複合体を形成し、インビトロでの基礎レベルの転写およびＳｐ１活性化された（１８９９０６）転写を再構成するのに重要であることを見出した。Ｏｈｋｕｒｎａら（１９９１）はまた、ＴＦ２Ｅ１遺伝子をクローニングして、細菌σ因子に配列類似性を示し、転写開始の調節の直接的間係を

示唆した。

【０３４５】

ＲＮＡポリメラーゼＩＩによる高いレベルの遺伝子転写は、転写開始および再開（ｒｅｉｎｉｔｉａｔｉｏｎ）の高い率に依存する。開始はプロモーターに完全な転写機械の補充、アクチベータによって容易になるプロセスおよびクロマチン再モデル化因子を必要とする。再開は、異なる経路を介して起こると考えられる。開始の後、転写機械のサブセットはプロモーターで残り、第２の転写複合体のアセンブリのためのプラットフォームを形成する。Ｙｕｄｋｏｖｓｋｙらは、転写因子ＴＦ１１Ｄ、ＴＦＩＩＡ（６００５２０を参照のこと）、ＴＦ１１Ｈ、ＴＦＩＩＥおよびＭｅｄｉａｔｏｒ（６０２９８４を参照のこと）を含む酵母における再開中間体の単離を記載した（２０００）。この中間体は、機能的な再開複合体の形成のための足場として作用し得る。この鋳型の形成は、ＡＴＰおよびＴＦＩＩＨに依存している。酵母において、鋳型は、Ｇａｌ４－ＡＨでない、アクチベータＧａｌ４－ＶＰ１６の存在下で、安定化し、高レベルの転写を促進するいくつかのアクチベータおよび媒介物のための新しい役割を提案する。

【０３４６】

別の配列研究室表示　ｅｓｔ＿Ｌ２４＿５＿３ＢＥ＿ｒＥａ（配列番号３５９）は、ＴＵＳＰをコードする配列を含む。この配列は、遺伝子マップ遺伝子座６ｑ２５－ｑ２６にマップする。

【０３４７】

ずんぐりした肥満症表現型の原因である変異した遺伝子は、位置決めクローニングにより同定される（Ｋｌｅｙｎら、‘‘Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｍｏｕｓｅ ｏｂｅｓｉｔｙ ｇｅｎｅ ｔｕｂｂｙ：ａ ｍｅｍｂｅｒ ｏｆ ａ ｎｏｖｅｌ ｇｅｎｅ ｆａｍｉｌｙ’’Ｃｅｌｌ ８５（２）：２８１－９０ Ａｐｒｉｌ １９，１９９６）。スプライスドナー部位中の単一の塩基変化は、成熟肥満（ｔｕｂ）ｍＲＮＡ転写における単一のイントロンの誤った保持を生じる。この突然変異の結果は、２４のイントロンでコードされたアミノ酸を有するカルボキシ末端の４４アミノ酸の置換である。通常の転写は、視床下部（体重調節に関与する脳の領域）において非常に発現されるように見える。相対的に多くの選択的スプライシング産物におけるバリエーションが、同系のマウス株の間で観察され、イントロン長多型と相関しているように見える。この肥満の対立遺伝子は、以前に報告されたマウス第７染色体における食餌誘導肥満症定量的特性座についての候補である。

【０３４８】

別の配列（研究室表示　Ｌ１９１Ｂ２Ｅ＃１（配列番号８５））は、ＲＥＰＬＩＣＡＮ　ＰＲＯＴＥＩＮ　Ａ３，１４－ＫＤ（ＲＰＡ３）をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＲＰＡ１４またはＲＥＰ３として公知である。この配列は、遺伝子マップ遺伝子座７ｐ２２をマップする。

【０３４９】

Ｕｍｂｒｉｃｈｔら（１９９３）は、ＨｅＬａ細胞ｃＤＮＡライブラリーからヒトＲＰＡの１４－ｋＤサブユニットをクローニングした。ＲＰＡ３遺伝子は、１２１アミノ酸の遺伝子をコードするオープンリーディングフレームを有する６９２塩基対配列を有することが見出された。推測されたアミノ酸配列は、酵母ＲＰＡの小さなサブユニットに対する限定された類似性のみを示した。げっ歯類－ヒトハイブリッド細胞株由来のゲノムＤＮＡのＰＣＲ増幅を使用して、Ｕｍｂｒｉｃｈｔら（１９９３）は、第７染色体にヒトＲＥＰＡ３遺伝子をマップした。第７染色体の体細胞ハイブリッドのサザン分析およびＰＣＲ増幅により、そして蛍光インサイチュハイブリダイゼーションにより、Ｕｍｂｒｉｃｈｔら（１９９４）は、ＲＰＡ３を７ｐ２２にマップした。ＲＰＡ１（１７９８３５）およびＲＰＡ２（１７９８３６）をまた、参照のこと。

【０３５０】

別の配列は、ＲＥＰＬＩＣＡＴＩＯＮ　ＳＥＱＵＥＮＣＥ　Ａ１，７０－ＫＤ（ＲＰＡ－１）をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＲＰＡ７０またはＲＥＰＡ１と

して公知である。この配列を、遺伝子マップ遺伝子座１７ｐ１３．３にマップする。

【０３５１】

複製タンパク質Ａ（ＲＰＡ）は、ヒト細胞から単離された３－サブユニット一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質であり、パポバウイルスＳＶ４０のインビトロ複製のために重要であることが、見出されてきた。Ｅｒｄｉｌｅら（１９９１）は、７０－ｋＤａサブユニットをコードするｃＤＮＡの配列を報告した。ヒトタンパク質の７０－ｋＤサブユニットに対して向けられるモノクローナル抗体と反応したＥ．ｃｏｌｉ中の７０－ｋＤａタンパク質の産生に向けられた。細菌から精製された組換えサブユニットは、完全ＲＰＡ複合体の結合活性に匹敵する一本鎖ＤＮＡ結合活性を示した。これは、ＤＮＡポリメラーゼα－プライマーゼの活性を刺激する際に完全複合体へ置換し得るが、インビトロＳＶ４０　ＤＮＡ複製における完全複合体へ置換し得ず、これは、他のサブユニットについての重要な機能的役割を示唆する。げっ歯類－ヒト細胞株由来のゲノムＤＮＡのＰＣＲ増幅を使用して、Ｕｍｂｒｉｃｈｔら（１９９３）は、第１７染色体に対して７０－ｋＤａサブユニットに対する遺伝子をマップした。同じ方法により、第１染色体および第７染色体それぞれに対する３２－ｋＤａ（１７９８３６）サブユニットおよび１４－ｋＤａ（１７９８３７）サブユニットについての遺伝子をマップした。第１７染色体フラグメントを含む体細胞ハイブリッドおよび放射ハイブリッドのＰＣＲ増幅の組み合わせを使用して、Ｕｍｂｒｉｃｈｔら（１９９４）は、ＲＰＡ１を１７ｐ１３．３にマップした。

【０３５２】

ＧｏｍｅｓおよびＷｏｌｄ（１９９６）は、ＲＰＡ７０の一連の欠失を構築し、タンパク質の機能を探求した。彼らのデータは、ＲＰＡ７０が、以下の３機能性ドメインから構成されることを示した：一本鎖ＤＮＡ結合またはＳＶ４０複製に必要とされないＮ末端ドメイン、中心ＤＮＡ結合ドメイン、およびサブユニット相互作用に重要なＣ末端ドメイン。

【０３５３】

増大する一連の証拠が、ｍＲＮＡの折り畳みが、ｍＲＮＡスプライシングおよびプロセシング、ならびに翻訳コントロールおよび翻訳調節のような生物学的事象の多様な範囲に影響する。ｍＲＮＡの構造が、そのヌクレオチド配列およびその環境によって決定されるために、Ｓｈｅｎら（１９９９）は、ｍＲＮＡの折り畳みが、一本鎖ヌクレオチド多型（ＳＮＰ）により影響され得るか否かを試験した。彼らは、２つのヒトｍＲＮＡ：アラニル－ｔＲＮＡシンセターゼ（６０１０６５）および複製タンパク質Ａ、７０－ｋＤサブユニットのコード領域におけるＳＮＰと結合したｍＲＮＡ二次構造における顕著な違いを報告した。ｍＲＮＡのＳＮＰ含有フラグメントの酵素的プロービングが、ＳＮＰから離れた１４または１８のヌクレオチド部位にて開裂パターンにおける顕著な対立遺伝子の差を明らかにし、単一ヌクレオチドバリエーションが、異なるｍＲＮＡ折りたたみ（ｆｏｌｄ）を生じ得ることを示唆する。ＲＰＡ７０ｍＲＮＡにおける異なる対立遺伝子構造に相補的であるが、ＳＮＰ自体までは延びない、オリゴデオキシリボヌクレオチドを使用することにより、ＳＮＰが内因性ヒトＲＰＡ７０ｍＲＮＡにおける隣接部位の接近しやすさにおける対立遺伝子に特有の効果を発揮することを見出した。この結果が、ｍＲＮＡの構造的多様性を介する一般的な遺伝的バリエーションの寄与を示し、ｍＲＮＡ構造についてのＳＮＰの効果、そして究極的には、生物学的機能についての以前の考えよりもより広い役割を示唆した。

【０３５４】

Ｎａｋａｙａｍａら（１９９９）は、内皮一酸化窒素シンターゼ（ｅＮＯＳ）遺伝子のプロモーター領域における、－７８６Ｔ－Ｃ変異（１６３７２９．０００２）が、遺伝子の転写を減少し、冠状動脈痙攣性狭心症および心筋梗塞に強く関連すると報告した。Ｍｉｙａｍｏｔｏら（２０００）は、ＲＰＡ１が、ＨｅＬａ細胞由来の核抽出物中の変異体対立遺伝子に特異的に結合すると決定した。ヒト臍静脈内皮細胞において、アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用するＲＰＡ１発現の阻害は、変異したプロモーター配列によって駆動される転写を回復したが、ＲＰＡ１の過剰発現はさらに、これを減少した。－７８６

Ｔ－Ｃ変異を保有する個体間での血清亜硝酸－硝酸レベルは、変異を有さない個体間より有意に低かった。本発明者らは、ＲＰＡ１が、明らかに、冠状動脈疾患の発症に関連するｅＮＯＳ遺伝子転写の－７８６Ｔ－Ｃ変異が関連する減少における抑制遺伝子として機能すると結論付けた。

【０３５５】

別の配列（研究室での名称Ｌ１９２Ｂ３Ｅ＃１３＿ｒＥ（配列番号１４３）は、インスリン様増殖因子２レセプター（ＩＧＦ２Ｒ）をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、インスリン様増殖因子ＩＩ、マンノース６－ホスフェートレセプターに対するレセプター、カチオン非依存性のＭＩＰＲまたはＣＩＭＰＲとしても公知である。この配列は、遺伝子マップ遺伝子座６ｑ２６にマッピングされる。

【０３５６】

インスリン様増殖因子ＩＩ（１４７４７０）は、インスリンおよびＩＧＦ　Ｉと構造的相同性を有するポリペプチドホルモンである。ＩＧＦ　ＩＩは、単離された細胞において広範な生物学的応答を刺激し得るが、これらの応答は、インスリンレセプターおよびＩＧＦ　Ｉレセプター（１４７６７０，１４７３７０）によって媒介されるようである。ＩＧＦ　ＩＩに対するレセプターはまた、マンノース６－ホスフェートに対するレセプターであることが見出され、これは、リソソーム酵素の標的化に関連する（ＭａｃＤｏｎａｌｄら，１９８８；Ｒｏｔｈ，１９８８；Ｔｏｎｇら，１９８８）。精製されたヒトＩＧＦ２レセプターおよびラットＩＧＦ２レセプターは、マンノース６－ホスフェートレセプターに対する抗体およびマンノース６－ホスフェートと相互作用する。Ｏｓｈｉｍａら（１９８８）は、ＭＰＲＩに対する全長ｃＤＮＡをクローニングし、配列決定した；７，４７３ヌクレオチドは、２，４９１アミノ酸のタンパク質をコードすることが見出された。このアミノ酸配列は、以下を含んだ：４０アミノ酸の推定シグナル配列および１３４～１６７アミノ酸の１５の相同性反復配列からなる細胞質外ドメイン、２３アミノ酸の膜貫通領域ならびに１６４アミノ酸の細胞質ドメイン。予測される分子サイズは、２７０ｋＤより大きかった。報告されたＩＧＦ２Ｒの構造（Ｍｏｒｇａｎら，１９８７）と比較すると、ＭＰＲＩは、ヌクレオチドレベルでは９９．８％の同一性およびアミノ酸レベルでは９９．４％の同一性を示すことが見出された。ｃＤＮＡ配列決定によって、Ｌａｕｒｅｙｓら（１９８８）は、カチオン非依存性マンノース６－ホスフェートレセプターおよびＩＧＦ２レセプターが同一であることを示した。

【０３５７】

ＳｚｅｂｅｎｙおよびＲｏｔｗｅｉｎ（１９９４）は、マウスＩｇｆ２ｒ遺伝子をクローニングし、特徴付けた。彼らは、それが９３ｋｂ長であり、４８のエキソンを有し、２，４８２アミノ酸の予測されるタンパク質をコードすることを見出した。

【０３５８】

Ｌａｕｒｅｙｓら（１９８８）は、インサイチュ染色体ハイブリダイゼーションのために、クローニングしたｃＤＮＡを使用して体細胞ハイブリッドＤＮＡのサザンブロットをプローブして、ヒトＩＧＦ２Ｒ遺伝子を６ｑ２５－ｑ２７にマッピングした。対応するマウス遺伝子を第１７染色体にマッピングした。カチオン依存性マンノース６－ホスフェートレセプター（ＭＰＲＤ；１５４５４０）は、第１２染色体によってコードされる。蛍光インサイチュハイブリダイゼーションによって、Ｒａｏら（１９９４）は、ＩＧＦ２Ｒ遺伝子の６ｑ２６への割り当てを狭めた。

【０３５９】

Ａｃｑｕａｔｉら（１９９４）は、動原体末端にプラスミノーゲン－アポリポタンパク質（ａ）遺伝子ファミリーおよびテロメア末端にＩＧＦ２Ｒを含む６ｑのテロメア領域由来の２－Ｍｂ　ＹＡＣを記載した。約３５０ｋｂは、遺伝子のＰＬＧ／ＬＰＡクラスターの最も近いメンバー由来のＩＧＦ２Ｒを分離した。

【０３６０】

ＭＰＲＤまたはＭＰＲＩのいずれかにおける変異は、ムコリピドーシスに類似する臨床的な障害を生じ得る（２５２５００，２５２６００）。Ｗａｈｅｅｄら（１９８８）は、

Ｍ６ＰおよびＩＧＦ２の結合部位が、このレセプターの異なるセグメント上に位置することを示した。Ｋｉｅｓｓら（１９８８）は、ＩＧＦ２レセプターおよびカチオン非依存性マンノース６－ホスフェートレセプターが同じタンパク質であるが、この２つのリガンドに対する結合部位は別個であるという生化学的証拠を提示した。マンノース６－ホスフェートレセプターのようなその外観において、ＩＧＦ２レセプターは、リソソーム酵素上のマンノース６－ホスフェート残基に結合し、これらをリソソームに輸送する（ＫｏｒｎｆｅｌｄおよびＭｅｌｌｍａｎ，１９８９）。

【０３６１】

マウス胚は、母系染色体に由来するＩＩ型レセプターの転写物を産生するが、父系染色体に由来するＩＩ型レセプターの転写物は産生しない。このことにより、この遺伝子座を欠失しているヘテロ接合性のマウスは、父系対立遺伝子を消失している場合でも正常に発生するが、母系対立遺伝子を消失している場合には初期の発生の間に死ぬことの理由が説明される。トランスジェニックマウスの研究（Ｂａｒｌｏｗら、１９９１）により、Ｉｇｆ２ｒ遺伝子の父系インプリンティング、すなわち１対立遺伝子性の発現が示されている。Ｉｇｆ２ｒ遺伝子は、マウス第１７染色体上のＴ関連母系効果遺伝子座（Ｔｍｅ）に位置している。ＩＧＦ２遺伝子および２型レセプターの遺伝子が逆にインプリンティングされることは、おそらく偶然の一致ではない（ＤｅＣｈｉａｒａら、１９９１）。ＨａｉｇおよびＧｒａｈａｍ（１９９１）は、逆にインプリンティングされた遺伝子は、母系対立遺伝子からのＩＧＦ２の過剰な産生の究極的には有害である効果を制御するように機能するということを提案している。この示唆はＨａｉｇおよびＷｅｓｔｏｂｙ（１９８９）のモデルに基づいている。このモデルでは、ゲノムインプリンティングの進化は、雌はその生涯の間に１つよりも多くの雄によって子を出産するという交配システム、および子は受精後の栄養の大部分を１つの親（通常は母）から受け、従って、他の雄が父である子と競合するという親によるケアについてのシステムの両方を有する生物において予想されることが提唱されている。厳格には、個体の交互作用が母系の親族および父系の親族について非対称である場合にはいつでも、インプリンティングは可能である。

【０３６２】

マウスにおいては、Ｍ６Ｐ／ＩＧＦ２Ｒ遺伝子は母系でインプリンティングされている（Ｂａｒｌｏｗら、１９９１）が、ヒトでは、インプリンティングは多型的形質であるようである（Ｘｕら、１９９３；Ｋａｌｓｃｈｅｕｅｒら、１９９３；Ｏｇａｗａら、１９９３）。従って、マウスおよびインプリンティングされている任意のヒトは、この遺伝子を不活性化するにはただ１つの変異が必要なだけであるので、肝細胞癌腫に対して大きな感受性を有し得る。Ｄｅ　Ｓｏｕｚａら（１９９５）は、Ｍ６Ｐ／ＩＧＦ２Ｒタンパク質は循環中に正常に存在するので、血漿中の変異レセプターは肝臓腫瘍の検出の役に立ち得ることを記載した。さらに、彼らは、肝臓腫瘍細胞の形質膜上の変異したレセプターは、治療的薬剤および診断的薬剤を肝臓腫瘍に標的化するための表面抗原を提供し得ることを述べた。

【０３６３】

セリンプロテイナーゼであるグランザイムＢ（ＧＺＭＢ；１２３９１０）は、細胞傷害性Ｔ細胞による標的細胞のアポトーシスの迅速な誘導のために重要である。ＧＺＭＢはパーフォリン非依存的な様式で細胞に入る。このことから細胞表面レセプターの存在が予測される。Ｍｏｔｙｋａら（２０００）は、このレセプターがＩＧＦ２Ｒであるという証拠を提示した。ＧＺＭＢ－ＩＧＦ２Ｒ相互作用を阻害することによりＧＺＭＢの細胞表面への結合、取りこみ、そしてアポトーシスの誘導が防止された。重要なことに、ＩＧＦ２Ｒの発現は、インビトロでの標的細胞の細胞傷害性Ｔ細胞媒介性のアポトーシス、およびインビボでの同種異系細胞の拒絶にとって必須であった。

【０３６４】

カチオン非依存性のマンノース６リン酸受容体およびカチオン依存性（１５４５４０）のマンノース６リン酸受容体の両方の細胞質ゾル中の尾部は、酸性クラスター－ジロイシンシグナルを有し、このシグナルは、トランスゴルジネットワークからエンドソーム－リ

ソソーム系への分配を導く。Ｐｕｅｒｔｏｌｌａｎｏら（２００１）は、これらのシグナルがゴルジ局在タンパク質、γ－ｅａｒ含有タンパク質、およびＡＲＦ結合タンパク質（ＧＧＡ１（６０６００４）；ＧＧＡ２（６０６００５）；ＧＧＡ３（６０６００６））のＶＨＳドメインと結合することを見出した。これらのレセプターおよびＧＧＡは、同じ環状小胞状キャリア上にゴルジ体ネットワークを残す。ドミナントネガティブなＧＧＡ変異体は、これらのレセプターのトランスゴルジネットワークからの脱出を阻止する。Ｐｕｅｒｔｏｌｌａｎｏら（２００１）は、ＧＧＡはマンノース６リン酸レセプターのトランスゴルジネットワークへの分配を媒介するようであると結論付けた。

【０３６５】

Ｚｈｕら（２００１）は、ＧＧＡ２のＶＨＳドメインが、カチオン非依存性マンノース６リン酸レセプターの細胞質ゾル中の尾部の酸性クラスター－ジロイシンモチーフに結合することを見出した。このモチーフ中に変異を有するレセプターは、リソソーム酵素の分配に欠陥がある。ＧＧＡ２のヒンジドメインはクラスリンに結合し、このことは、ＧＧＡ２が荷物分子とクラスリン被覆ビヒクルアセンブリとの間の結合因子であり得ることを示唆する。従って、Ｚｈｕら（２００１）は、カチオン非依存性マンノース６リン酸レセプターに結合しているＧＧＡ２は、リソソーム酵素の標的化にとって重要であると結論付けた。

【０３６６】

家畜のクローン体作製およびインビボでの胚培養は、生じる仔ヒツジおよび仔ウシのいくつかの異常なサイズにより有害な影響を受けている。「巨大子症候群」（ＬＯＳ）に関連する複数の異常により、これらの技術の適用が制限されている。ヒトおよびマウスにおける同様の胎児の過剰成長により、１つの親対立遺伝子からのみ発現されるいくつかのインプリンティングされた遺伝子（ＩＧＦ２Ｒを含む）の発現の変化が生じ得る。クローン体作製または非生理学的な胚培養環境により、初期の胚発生の間（この期間に多くの対立遺伝子特異的インプリンティングが確立または維持される）のインプリンティングされた遺伝子の不適切な後成改変が生じ得る。Ｙｏｕｎｇら（２００１）により、胎児のメチル化およびヒツジＩＧＦ２Ｒの発現の減少が示され、このことは、着床前胚手順がインプリンティングされた遺伝子における後成変化には弱いかもしれないことを示唆する。これは、発生中胚手順における後成診断スクリーニングの潜在的有効性を強調する。

【０３６７】

３つのインプリンティングされた母系で発現されるタンパク質をコードする遺伝子（ＩＧＦ２Ｒ；ＳＬＣ２２Ａ２，６０２６０８；ＳＬＣ２２Ａ３，６０４８４２）を含む４００ｋｂの領域についての両方向性サイレンサーは、３．７ｋｂの配列に位置することが、標的化欠失により示されている。この配列はまた、インプリンティングされた父系で発現される非コードＡｉｒ　ＲＮＡ（６０４８９３）についてのプロモーターも含む。Ａｉｒの発現は、父系対立遺伝子上の３つの遺伝子の全ての抑制と相関するが、Ａｉｒ　ＲＮＡは、アンチセンス方向でこれらの遺伝子のただの１つとしか重複していない。ＲＮＡ転写物の９６％を切断する、ポリアデニル化シグナルの挿入により、Ｓｌｅｕｔｅｌｓら（２００２）は、Ａｉｒ　ＲＮＡがサイレンシングに必要であることを示した。切断されたＡｉｒ対立遺伝子は、インプリンティングされた発現およびＡｉｒプロモーターのメチル化を維持するが、父系染色体上のＩＧＦ２Ｒ／ＳＬＣ２２Ａ２／ＳＬＣ２２Ａ３遺伝子クラスターのサイレンシングの完全な消失を示す。Ｓｌｅｕｔｅｌｓら（２００２）は、非コードＲＮＡはゲノムインプリンティングにおいて活発な役割を果たしていると結論した。

【０３６８】

マンノース６－リン酸／インスリン様増殖因子ＩＩレセプターは、リソソーム酵素の細胞内移動、潜在的な増殖阻害因子、トランスフォーミング増殖因子βの活性化、およびＩＧＦ２（腫瘍中でしばしば過剰産生されるマイトジェン）の分解において機能する。Ｄｅ　Ｓｏｕｚａら（１９９５）は、ヒト肝細胞腫瘍の７０％が、６ｑ２６のＭ６Ｐ／ＩＧＦ２Ｒ遺伝子座でヘテロ接合性（ＬＯＨ）の損失を有することを実証した。別のレポートでは、Ｄｅ　Ｓｏｕｚａら（１９９５）は、ＬＯＨを有するヒト肝細胞癌の残りの２５％の

対立遺伝子において点変異を同定した、変異スクリーニングを記載した。１つの変異は、イントロン（マウスのイントロン４０に対応する）内の選択的スプライシング部位を生じ、短縮型レセプターを生じ；他の２つ（１４７２８０．０００１、１４７２８０．０００２）は、有意なアミノ酸置換を生じた。これらの変異は、Ｍ６Ｐ／ＩＧＦ２Ｒ遺伝子がヒト肝臓癌発生における腫瘍抑制因子として機能するという証拠を著者らに提供した。

【０３６９】

Ｓｏｕｚａら（１９９６）は、ＩＧＦ２Ｒ遺伝子がそのコード配列内で多くのマイクロサテライト反復を含むことを報告した。彼らは、複製／修復エラー陽性であった、研究した９２例の胃腸管腫瘍のうちの１２例において、この遺伝子におけるマイクロサテライト不安定性を実証した。変異は、６例の分化程度の低い腫瘍において生じていた。これらは、ＩＧＦ２ＲまたはＴＧＦＢＲ２（１９０１８２）変異の不一致を示す。ＩＧＦ２ＲまたはＴＧＦＢＲ２変異を有する研究した３１例の胃腸管病変のうち、９０％（２８例）が、これらの遺伝子の一方または他方において変異を含んだが、両方の遺伝子ともには変異を含まなかった。Ｓｏｕｚａら（１９９６）は、これらの変異の１つを除く全てが、ＩＧＦ２Ｒコード配列のヌクレオチド４０８９－４０９６にわたる８－ポリデオキシグアニン領域内に生じていることを実証した。１例の胃腺癌において、変異は、ヌクレオチド６１６９－６１８０にわたるポリＣＴ領域において生じていた。これらの変異は全て、マイクロサテライト領域内に１ｂｐまたは２ｂｐの欠失または挿入を含み、これらは、フレームシフトおよび成熟前停止コドンを下流に生じた。Ｓｏｕｚａら（１９９６）は、ＴＧＦＢＲ２遺伝子がまた、そのコード領域内にマイクロサテライト不安定性を生じていることを示した。彼らはさらに、ＩＧＦ２Ｒ遺伝子およびＴＧＦＢＲ２遺伝子が、彼らが分析した胃腸管腫瘍の９０％においてこれらのいずれかの遺伝子のみに変異が生じていることから、同じ腫瘍発生経路において連続した点を含むことを示した。

【０３７０】

癌におけるヒトＭ６Ｐ／ＩＧＦ２Ｒの刷り込み状態およびこの遺伝子座でのヘテロ接合性の損失の遺伝子分析を容易にするために、Ｋｉｌｌｉａｎら（２００１）は、Ｍ６Ｐ／ＩＧＦ２Ｒ単一ヌクレオチド多型（ＳＮＰ）について、米国人および日本人集団をスクリーニングした。彼らは、ヒトにおける選択下にあり得る、Ｍ６Ｐ／ＩＧＦ２Ｒのリガンド結合ドメインにおける９個の新しい遺伝子内ＳＮＰおよび３個のアミノ酸改変体を同定した。

【０３７１】

ＩＧＦ２Ｒ遺伝子の父性発現がマウスの発生初期に必要か否かを決定するために、Ｌａｕら（１９９４）は、胚性幹（ＥＳ）細胞における標的化変異誘発によって破壊し、その後のマウス生殖系列への変異の導入によってこの遺伝子を破壊したマウスを誘導した。Ｌａｕら（１９９４）は、父系由来の非機能性ＩＧＦ２Ｒを遺伝したマウス胚が生存し、成体へと正常に発生するが；母系から同じ変異対立遺伝子を遺伝したほとんどのマウスの多くが、心不全の結果、誕生時に死亡したことを見出した。母系からの変異対立遺伝子を遺伝するマウスは、その組織においてＩＧＦ２Ｒを発現せず、正常な同胞より２５～３０％長く、循環中のＩＧＦ２およびＩＧＦ結合タンパク質のレベルが高く、そして尾にわずかなねじれを生じる。この過成長の知見は、ＩＧＦ２の母性刷り込みの緩和が、Ｂｅｃｋｗｉｔｈ－Ｗｉｅｄｅｍａｎｎ症候群の特徴において役割を果たすという示唆を支持し得る（１３０６５０）（Ｆｅｉｎｂｅｒｇ，１９９３）。

【０３７２】

（対立遺伝子改変体）

（選択実施例）

．０００１　肝細胞癌、体細胞性［ＩＧＦ２Ｒ，ＧＬＹ１４４９ＶＡＬ］

Ｄｅ　Ｓｏｕｚａら（１９９５）は、ＩＧＦ２Ｒ遺伝子の１つの対立遺伝子におけるＣからＡへの変換を見出し、これは、この遺伝子産物におけるｇｌｙ１４４９からｖａｌへのアミノ酸置換を生じる。この変異は、ヘテロ接合性の損失（ＬＯＨ）によって判断される他方の対立遺伝子の欠失を示す腫瘍において見出された。

【０３７３】
．０００２　肝細胞癌、体細胞性［ＩＧＦ２Ｒ，ＧＬＹ１４６４ＧＬＵ］
Ｄｅ　Ｓｏｕｚａら（１９９５）は、ＩＧＦ２Ｒ遺伝子の１つの対立遺伝子におけるＧからＡへの変換を見出し、これは、この遺伝子産物におけるｇｌｙ１４６４からｇｌｕへのアミノ酸置換を生じる。この変異は、ヘテロ接合性の損失（ＬＯＨ）によって判断される他方の対立遺伝子の欠失を示す腫瘍において見出された。
【０３７４】
別の配列（研究所番号Ｌ２４＿４＿２ＢＥ＿ｒＥ（配列番号２００））は、末梢低下ホメオボックス２（ＤＬＸ２）をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＴＥＳ１として公知であり、この配列は、遺伝子地図座２ｑ３２にマッピングされる。
【０３７５】
前脳発生に関与する遺伝子を単離するために、Ｐｏｒｔｅｕｓら（１９９２）は、ｃＤＮＡライブラリーのサブトラクティブハイブリダイゼーションを使用して、マウス妊娠期１５日の終脳において優先的に発現されている遺伝子によってコードされるｃＤＮＡを富化した。前脳発生の調節のための候補である遺伝子を見出す試みにおいて、サブトラクトｃＤＮＡライブラリーを、このホメオボックスに相同なプローブでスクリーニングし、保存されたモチーフが、よく発生を制御する転写調節因子において見出された。ホメオドメインをコードする新規のｃＤＮＡ（Ｔｅｓ１と名付けた）が同定された。その配列は、Ｔｅｓ１がホメオドメインコード遺伝子の「末梢低下」ファミリーのメンバーであることを示した。これらのホメオドメイン内のアミノ酸相同性によって関連される、このファミリーの公知のメンバーは、Ｔｅｓ１、Ｄｌｘ１（マウス遺伝子）およびＤｌｌ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ遺伝子）である。Ｏｚｃｅｌｉｋら（１９９２）は、マウスおよびヒトにおけるＴｅｓ１遺伝子の染色体位置を決定した。Ｔｅｓ１はＤｌｘ遺伝子ファミリーの１つのメンバーであるので、この遺伝子座の遺伝子記号を、ＤＬＸ２（ヒト）およびＤｌｘ２（マウス）とした。体細胞ハイブリッド株のサザン分析によって、彼らは、このヒト遺伝子座を染色体２ｃｅｎ－ｑ３３に割り当て、マウス遺伝子座を第２染色体に割り当てた。ＥｃｏＲＩ二形性を、このマウスの組換え近交系株マッピングのために使用した。この結果は、マウス第２染色体上のＨｏｘ４クラスター近くにＤｌｘ２遺伝子を配置した。
【０３７６】
Ｑｉｕら（１９９５）は、マウスＤｌｘ２遺伝子のゲノム構造についての情報を利用し、遺伝子ターゲティング実験を行い、トランスジェニックマウスにおける使用のためにマウス胚性幹細胞のＤｌｘ２遺伝子に欠失を作製した。彼らは、ヘテロ接合性マウスが正常であり、ホモ接合性マウスが誕生時に死亡したことを報告した。変異体マウスは、嗅球のニューロン内の改変された分化、ならびに近位の第１および第２鰓弓から形成される脳神経堤由来骨格構造の異常形成（これは、口蓋裂を生じる）を有した。
【０３７７】
ＭｃＧｕｉｎｎｅｓｓら（１９９６）は、ヒトＤＬＸ２遺伝子のＤＮＡ配列を報告し、これをマウス遺伝子と比較した。配列分析は、ヒトＤＬＸ２遺伝子が３つのエキソンと２つのイントロンを有することを示した。ヒトＤＬＸ２タンパク質の推定配列は、ヒトおよびマウスのＤＬＸ２タンパク質が９２％同一であることを示す。ヒトＤＬＸ２タンパク質は、３３０アミノ酸長を有し、一方、マウスＤＬＸ２タンパク質は、３３２アミノ酸を有する。イントロンは、６３～７１％の同一性を有する。ヒトおよびマウスのＤＬＸ２遺伝子において同定されたドメインは、ホメオドメインおよびいくつかの転写因子に相同な短いストレッチを含む。ＭｃＧｕｉｎｅｓｓら（１９９６）は、ヒトＤＬＸ２遺伝子の配列の利用能が、異常発生におけるＤＬＸ２のヒト変異をスクリーニングするためのＰＣＲ分析の使用を容易にすることを示した。
【０３７８】
別の配列（研究所番号ｓｅｑ１ｂ＿ｌａｃ（配列番号２６７））は、ジンクフィンガータンパク質７（ＺＮＦ７）をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＫＯＸ４と

しても公知である。この配列は、遺伝子地図座８ｑ２４にマッピングされる。

【０３７９】

反復されたジンクフィンガードメインにおける配列類似性に基づいて、Ｌａｎｉａら８１９９０）は、２つのヒトｃＤＮＡクローンを同定し、特徴づけ、ＺＮＦ７およびＺＮＦ８と名付け、これら両方は、潜在的なフィンガー様核酸結合モチーフを含むタンパク質をコードした。推定６８６アミノ酸ＺＮＦ７タンパク質は、１５個のジンクフィンガードメインを含み、これらは、タンパク質の約７０％を含む。ノーザンブロット分析は、ＺＮＦ７が種々のヒト細胞株において２．８ｋｂおよび３．３ｋｂのｍＲＮＡとして発現されることを明らかにした。

【０３８０】

インサイチュハイブリダイゼーションによって、Ｌａｎｉａら（１９９０）は、ＺＮＦ７を８ｑ２４に位置づけ、ＺＮＦ８を２０ｑ１３に位置づけた。Ｂｒａｙら（１９９１）は、同様に、蛍光プローブ検出を用い染色体インサイチュ抑制ハイブリダイゼーションによって８ｑｔｅｒにマッピングした。Ｂｒａｙら（１９９１）は、ＺＮＦ７と名付けたゲノム遺伝子座が、Ｔ細胞ライブラリーから以前に単離された３０個のジンクフィンガータンパク質コードｃＤＮＡ（ＫＯＸ１－ＫＯＸ３０）のセット（Ｔｈｉｅｓｅｎ、１９９０）のＫＯＸ４に対応することを示した。彼らは、ヒトゲノムが、コンセンサスｈｉｓ／ｃｙｓ（Ｈ／Ｃ）結合領域を有する多くの（おそらく数百個の）ジンクフィンガー遺伝子を含むと結論づけた。Ｈｕｅｂｎｅｒら（１９９３）は、げっ歯類／ヒト体細胞ハイブリッドの分析およびインサイチュハイブリダイゼーションによってＺＮＦ７の８ｑ２４への割り当てを確認した。彼らは、ＺＮＦ７がＭＹＣ遺伝子座（１９００８０）にテロメリックであることを示した。

【０３８１】

別の配列（研究所番号Ｌ１９７Ｂ３Ｅ－ｒＥ（配列番号１３５））は、ＢＣＬ２様１（ＢＣＬ２Ｌ１）をコードする配列を含む。

【０３８２】

Ｂｏｉｓｅら（１９９３）は、ＢＣＬ２関連遺伝子（彼らは、ＢＣＬＸと名付けた）を単離し、それが、プログラムされた細胞死（アポトーシス）のＢＣＬ２非依存性調節因子として機能し得ることを示した。選択的スプライシングが、２つの別々のＢＣＬＸ　ｍＲＮＡを生じた。より大きいｍＲＮＡのタンパク質産物（ＢＣＬＸＬ）は、ＢＣＬ２とサイズおよび推定構造において類似した。ＩＬ３依存性細胞株へ安定にトランスフェクトした場合、それは、少なくともＢＣＬ２と同様に、増殖因子撤退時に細胞死を阻害した。予期せぬことに、より小さいｍＲＮＡ種（ＢＣＬＸＳ）は、ＢＣＬ２の能力を阻害し、増殖因子枯渇細胞の生存を増強するタンパク質をコードする。インビボにおいて、このより小さいＢＣＬＸ　ｍＲＮＡは、発生中のリンパ球のような高いターンオーバー数を生じる細胞において高レベルで発現された。対照的に、ＢＣＬＸの大きい形態が、成体脳のような長期生存の有糸分裂後細胞を含む組織で見出された。これらのデータはともに、ＢＣＬＸがプログラム細胞死の陽性調節および陰性調節の両方において重要な役割を果たすことを示唆する。Ｂｏｉｓｅら（１９９３）は、ＢＣＬＸが脊椎動物の進化において高度に保存されていることを見出した。Ｖａｎｄｅｒ　Ｈｅｉｄｅｎら（１９９７）は、多くの種々のアポトーシス性および壊死性の刺激が進行性のミトコンドリア膨潤および外側のミトコンドリア膜の破裂を誘導することを、Ｊｕｒｋａｔ細胞において観察した。外側のミトコンドリア膜の不連続性は、膜内空間からサイトゾルへのチトクロムｃ再分布を生じ、その後、ミトコンドリア内膜分極を生じた。ミトコンドリア膜タンパク質ＢＣＬＸは、アポトーシス刺激因子で処理された細胞において、これらの変化を阻害し得た。さらに、ＢＣＬＸ発現細胞は、減少したミトコンドリア膜ポテンシャルを維持することによって、増殖因子の停止またはストラウロスポリン（ｓｔｒａｕｒｏｓｐｏｒｉｎｅ）処理に適合する。ＢＣＬＸ発現はまた、酸化的リン酸化を阻害する因子に応答してミトコンドリアの膨張を防止する。Ｖａｎｄｅｒ　Ｈｅｉｄｅｎ　ら（１９９７）に対するこれらのデータは、ＢＣＬＸが、ミトコンドリアの電気的ホメオスタシスおよび浸透圧ホメオスタシスを調節する

ことによって、細胞生存を促進することを示唆した。

【０３８３】

Ｓｉｌｖａら（１９９８）は、真性赤血球増加症を有する患者由来の赤血球細胞（２６３３００）が、エリスロポイエチンなしで、インビトロで生存したことを見出した。この知見は、通常はＢＣＬＸを発現しない成熟赤芽球においてでさえ、ＢＣＬＸタンパク質の発現と関連した。大きなＢＣＬＸ　ｍＲＮＡは、エリスロポイエチン非依存性赤血球において検出される優勢な形態であった。彼らは、ＢＣＬＸの調節解除された発現が、真性赤血球増加症における赤血球系細胞のエリスロポイエチン非依存性生存に寄与し得、それによりこの障害の病因に寄与すると結論付けた。Ｍｏｌｉｔｅｒｎｏら（１９９８）は同時に、真性赤血球増加症を有する患者由来の血小板によるトロンボポイエチンレセプター（ＭＰＬ；１５９５３０）の不十分な発現を報告した。

【０３８４】

細胞へのアポトーシスシグナルの導入の間、細胞のミトコンドリアの膜の透過性の変化が存在し、これは細胞質へのアポトーシスタンパク質シトクロムＣの移動を引き起こし、次いで、カスパーゼとして公知の死駆動性タンパク質分解性タンパク質を活性化する（１４７６７８を参照のこと）。ＢＣＬ２ファミリーのタンパク質（この膜は、抗アポトーシス性またはアポトーシス促進性であり得る）は、アポトーシスの間にこのミトコンドリア膜の透過性を制御することによって細胞死を調節する。Ｓｈｉｍｉｚｕら（１９９９）は、組換えアポトーシス促進性タンパク質のＢａｘ（６０００４０）およびＢａｋ（６００５１６）が、ＶＤＡＣの開放を促進し、一方、抗アポトーシス性タンパク質のＢＣＬＸＬは、ＶＤＡＣに直接結合することによってこれを閉鎖することを示す。ＢａｘおよびＢａｋは、シトクロムｃをリポソームからＶＤＡＣを通過させるが、通過はＢＣＬＸＬによって妨げられない。これと一致して、変異酵母由来のＶＤＡＣ１欠失ミトコンドリアは、膜電位のＢａｘ／ＢＡＫ誘導性の損失およびシトクロムｃの放出を示さず、この両方はＢＣＬＸＬによって阻害された。Ｓｈｉｍｉｚｕら（１９９９）は、ＢＣＬ２ファミリーのタンパク質が、ミトコンドリア膜電位およびアポトーシスの間のシトクロムｃの放出を調節するためにＶＤＡＣに結合すると結論付けた。

【０３８５】

ＦＵＳ関連タンパク質およびＴＬＳも同じようである；

Ｕｒａｎｉｓｈｉら（「Ｉｎｖｏｌｖｅｍｅｎｔ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｐｒｏ－ｏｎｃｏｐｒｏｔｅｉｎ　ＴＬＳ（ｔｒａｎｓｌｏｃａｔｅｄ　ｉｎ　ｌｉｐｏｓａｒｃｏｍａ）ｉｎ　ｎｕｃｌｅａｒ　ｆａｃｔｏｒ－ｋａｐｐａ　Ｂ　ｐ６５－ｍｅｄｉａｔｅｄ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　ａｓ　ａ　ｃｏａｃｔｉｖａｔｏｒ」Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２０；２７６（１６）：１３３９５－４０１，Ａｐｒ．２００１）は、脂肪肉腫（ＴＬＳ）における転移（ＦＵＳとも呼ばれる）が、酵母ツーハイブリッドスクリーンを使用して、転写因子核因子κＢ（ＮＦ－κＢ）のｐ６５（ＲｅｌＡ）サブユニットの相互作用分子であることを証明する。本発明者らは、インビトロにおけるプルダウンアッセイ（ｐｕｌｌ－ｄｏｗｎ　ａｓｓａｙ）およびインビボで培養された細胞の免疫共沈降実験、その後のウエスタンブロットによって、ＴＬＳとｐ６５との間の相互作用を確認した。ＴＬＳは、元々、ヒト脂肪腫性粘液腫における染色体転移から生じるＣＨＯＰとの融合タンパク質の一部として同定された。ＴＬＳは、ＴＦＩＩＤ複合体の形成に関与し、ＲＮＡポリメラーゼＩＩに関連することが示されている。しかし、転写調節におけるＴＬＳの役割は、未だ、明確には解明されていない。本発明者らは、ＴＬＳが、生理学的刺激因子（例えば、主要壊死因子α、インターロイキン－１β、およびＮＦ－κＢ誘導キナーゼの過剰発現）によって誘導されるＮＦ－κＢ媒介性トランス活性化を促進することを見出した。ＴＬＳは、細胞内付着分子－１遺伝子およびインターフェロンβ遺伝子のＮＦ－κＢ依存性プロモーター活性を増大した。これらの結果は、ＴＬＳがＮＦ－κＢの同時活性化因子として働き、そしてＮＦ－κＢ媒介性トランス活性化における中心的な役割を果たすことを示唆する。

【０３８６】

進化的に保存された多面的ＣＯＰ／ＤＥＴ／ＦＵＳタンパク質の群は、最初、アラビドプシスにおける光形態形成を抑制する能力によって規定された（Ｓｕｚｕｋｉら「Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ＣＯＰ１０ ｉｓ ａ ｕｂｉｑｕｉｔｉｎ－ｃｏｎｊｕｇａｔｉｎｇ ｅｎｚｙｍｅ ｖａｒｉａｎｔ ｔｈａｔ ａｃｔｓ ｔｏｇｅｔｈｅｒ ｗｉｔｈ ＣＯＰ１ ａｎｄ ｔｈｅ ＣＯＰ９ ｓｉｇｎａｌｏｓｏｍｅ ｉｎ ｒｅｐｒｅｓｓｉｎｇ ｐｈｏｔｏｍｏｒｐｈｏｇｅｎｅｓｉｓ」Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ１６（５）：５５４－９，Ｍａｒｃｈ １，２００２）。この調節は、光形態形成を促進する重要な細胞調節因子の分解を標的化することによって媒介されることが提唱された。これらの中で、ＣＯＰ１およびＣＯＰ９シグナロソーム（ｓｉｇｎａｌｏｓｏｍｅ）が、ユビキチンリガーゼ（Ｅ３）および必須Ｅ３モジュレータとしての役割を果たすと仮定された。本明細書で、本発明者らは、ＣＯＰ１０がユビキチン結合体化酵素（Ｅ２）改変タンパク質（ＵＥＶ）と類似のタンパク質をコードすることを報告する。ＣＯＰ１０は、核タンパク質複合体の一部であり、ＣＯＰ１およびＣＯＰ９シグナロソームの両方と直接相互作用し得る。本発明者らのデータは、ＣＯＰ１０が潜在的なＥ２活性を規定し、従って、多面的ＣＯＰ／ＤＥＴ／ＦＵＳ群のタンパク質がタンパク質ユビキチン化経路を規定するという作業仮説を確認する。

【０３８７】

別の配列（研究室表示　８Ｃ５＿６＿ｒＥ（配列番号４６））は、アミノペプチダーゼ、ピューロマイシン感受性（ＮＰＥＰＰＳ）をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、ＰＳＡおよびメタロプロテイナーゼ　ＭＰ１００（ＭＰ　１００）としても公知である。この配列は、遺伝子マップ位置１７ｐ２１にマッピングされる。

【０３８８】

アミノペプチダーゼは、ペプチド基質のＮ末端由来のアミノ酸を加水分解するエキソペプチダーゼの群である。ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ（ＥＣ３．４．１１．１４）は、亜鉛メタロプロテアーゼに特徴的なグルジンシン（ｇｌｕｚｉｎｃｉｎ）基の亜鉛結合ドメインを含む（６０５８９６を参照のこと）。

【０３８９】

Ｔｏｂｌｅｒら（１９９７）は、マウスＰＳＡ　ｃＤＮＡをプローブと使用して、ヒト胎児脳ｃＤＮＡライブラリー由来のＰＳＡをクローニングした。彼らは、翻訳が２つの可能な開始コドンの２番目で開始され、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって９９ｋＤの分子量を有する推定８７５アミノ酸タンパク質を生じることを証明した。ＰＳＡは、グルジンシンアミノペプチダーゼで保存された亜鉛結合モチーフを含み、マウスタンパク質と９８％の配列同一性を共有する。ノーザンブロット分析は、４．８ｋｂ転写物の遍在性の発現を検出し、これは脳において最も高レベルで発現される。成体ヒト脳切片のインサイチュハイブリダイゼーションによって、発現は、皮質および小脳のニューロンの細胞質に局在した。トランスフェクトされたＨｅＬａ細胞の免疫蛍光局在化を使用して、Ｔｏｂｌｅｒら（１９９７）は、ＰＳＡが核周辺細胞質に局在し、糸状染色パターンを示すことを見出した。Ｂａｕｅｒら（２００１）は、ヒト骨格筋ライブラリー由来のＰＳＡ　ｃＤＮＡをクローニングした。ノーザンブロット分析は、それぞれ、４．８ｋｂおよび４．２ｋｂの主要な転写物および少量の転写物を検出した。

【０３９０】

Ｈｕｂｅｒら（１９９９）は、ＰＳＡが、元々、Ｓｃｈｏｎｌｅｉｎら（１９９４）によりヒト脳由来のβセクレターゼ候補物として単離されたメタロプロテアーゼＭＰ１００と同一であることを決定した。

【０３９１】

Ｈｕｂｅｒら（１９９９）は、βアミロイド前駆体タンパク質と、共存し、そしてＰＳＡを、βアミロイド前駆体タンパク質と免疫共沈降させ得た（１０４７６０）；しかし、ＰＳＡは、同時トランスフェクトされた細胞におけるアミロイド－βペプチドの生成を増加させなかった。ノーザンブロット分析ではなく、ＲＴ－ＰＣＲによって、Ｂａｕｅｒら（２００１）は、ＰＳＡが、ビタミンＤ刺激後のヒト白血病細胞においてアップレギュレ

ートされることを見出した。
【０３９２】
Ｔｈｏｍｐｓｏｎら（１９９９）は、ＰＳＡ遺伝子が、約４０ｋｂにわたる２３個のエキソンを含むことを決定した。彼らは、活性部位モチーフが、エキソン９とエキソン１０との間で分割されていることを見出した。５プライム隣接領域の分析は、この遺伝子が、ＴＡＴＡボックスを欠き、ＧＣリッチであり、かつ５つの推定ＳＰ１（１８９９０６）結合部位を含むことを示した。
【０３９３】
ＦＩＳＨによって、Ｂａｕｅｒら（２００１）は、ＰＳＡ遺伝子を第染色体１７ｑ２１にマッピングした。Ｏｓａｄａら（１９９９）は、マウスＰｓａ遺伝子を第１１染色体上のシンテニー相同性領域にマッピングされた。
【０３９４】
別の配列（研究室表示　７０Ａ＿ｒＥ（配列番号１８８））は、アネキシンＡ３（ＡＮＺＡ３）をコードする配列を含む。このタンパク質はまた、アネキシンＩＩＩ（ＡＮＸ３）およびリポコルチンＩＩＩとしても公知である。この配列は、遺伝子マップ位置４ｐ２１にマピングする。
【０３９５】
アネキシンは、カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質のファミリーである。このファミリーは、少なくとも１０個の異なるメンバーから構成され、これらのメンバーの各々は、最初にリポコルチン／アネキシンＩにおいて同定された４または８コピー数の８０アミノ酸反復単位を含む。アネキシンＩＩＩは、先に、イノシトール、１，２－環状ホスフェート２－ホスホヒドロラーゼ（ＥＣ３．１．４．３６）（イノシトールホスフェート代謝の酵素）として、そしてまた胎盤抗凝固タンパク質ＩＩＩ、リポコルチンＩＩＩ、カルチミジン（ｃａｌｃｉｍｅｄｉｎ）３５－α、および多量の好中球細胞質タンパク質として同定された。成熟アネキシンＩＩＩタンパク質は、３２２のアミノ酸を含み、そして他のアネキシンと同様に、複数の４コピー数の７０～８０アミノ酸反復単位を含む。増幅されたゲノムＤＮＡおよびλ期の６ゲノムクローンから直接遺伝子を特徴付けることにより、Ｔａｉｔら（１９９３）は、転写領域が５８ｋｂにわたり、そして０．３～１９．１ｋｂの範囲の１２個のイントロン、および５３から３７４ベースの範囲の１３個のエキソンを含むことを決定した。ノーザンブロットは、試験された全ての組織において、約１．７ｋｂを有する１つのｍＲＮＡ種を示した。
【０３９６】
Ｔａｉｔら（１９９１）は、ヒトーげっ歯類ハイブリッドパネルのＰＣＲ分析によって、ＡＮＸＡ３遺伝子を４ｑ２１（ｑ１３－ｑ２２）に位置決めし、ｃＤＮＡプローブを用いる同じパネルのゲノムサザンブロット分析によって、およびｃＤＮＡプローブとのインサイチュハイブリダイゼーションによって、確認した。
【０３９７】
別の配列（研究室表示　６ＢＳＡ　＃１２－ｒＥ（配列番号３９）は、ＡＤＡＭ１０をコードする配列を含む。この配列は、ヒト染色体位置１５ｑ２１．－ｑ２にマッピングされる。
【０３９８】
Ｌａｎｎら（「Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ＡＤＡＭ　１０　ｆｒｏｍ　ｂｏｖｉｎｅ　ｓｐｌｅｅｎ　ａｓ　ａ　ＴＮＦ　α　ｃｏｎｖｅｒｔａｇｅ」ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ　４００（３）：３３３－５，Ｊａｎ　６，１９９７）は、ウシ脾臓膜からＴＮＦαコンバターゼの特徴を有するプロテアーゼを精製した。この精製されたタンパク質のペプチド配列決定によって、これはＡＤＡＭ１０（Ｇｅｎｂａｎｋ登録番号Ｚ２１９６１）と同定される。このメタロプロテアーゼは、組換えプロＴＮＦα基質を切断して成熟ＴＮＦαにし、そして合成ペプチド基質を切断して、インビトロで成熟ＴＮＦαアミノ末端を生成し得る。この酵素は、ＭＭＰのヒドロキサメート（ｈｙｄｒｏｘａｍａｔｅ）インヒビターに対して感受性であるが、ホスホルアミドン（ｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｏｎ）に対

して非感受性である。さらに、クローン化されたＡＤＡＭ１０は、プロセシング中のインコンピテント細胞株においてプロＴＮＦαのプロセシングを媒介する。

【０３９９】

研究室表示　６ｂ６５は、再配置されたベクターであり、タグ部位はｐｔｐｌ１に存在し得、配列はａｂｃｒ（親細胞または変異体において発現しないａｂｃａ４）に存在し、そして染色体位置１ｐ２２．１－ｐ２１にマッピングされる。本発明者らは、他のｒｈｏ関連遺伝子を分裂させた。ＰＴＬＰ１関連ＲｈｏＧＡＰ１（ＧＴＰ活性化タンパク質）は、ｒａｓ関連ＧＴＰ結合タンパク質のＲｈｏサブファミリーのメンバーを活性化し、システインリッチドメインを有する。

【０４００】

別の配列（研究室表示　４ＡＥ５　ｒＥ（配列番号６４））は、膜貫通４－ドメイン、サブファミリーＡ、膜８Ｂ（ＭＳ４Ａ８Ｂ）をコードする配列を含む。この配列は、遺伝子マップ位置１１ｑ１２－ｑ１３にマッピングされる。

【０４０１】

ＭＳ４Ａファミリーのタンパク質は、構造類似性、アミノ酸配列相同性および染色体位置を共有する。これらは、Ｎ末端およびＣ末端の細胞質領域に隣接する４つの高度に保存された膜貫通ドメインを含む。

【０４０２】

ＣＤ２０（ＭＳ４Ａ１；１１２２１０）のホモログのデータベース検索によって、ＬｉａｎｇおよびＴｅｄｄｅｒ（２００１）は、ＭＳ４Ａ８ＢをコードするｃＤＮＡを得た。推定２５０アミノ酸タンパク質は、そのマウスホモログに６３％同一である。ＰＣＲ分析は、３つのＢ細胞株由来のｃＤＮＡにおけるＭＳ４Ａ８Ｂの弱い発現を検出した。

【０４０３】

ゲノム配列分析によって、ＬｉａｎｇおよびＴｅｄｄｅｒ（２００１）は、ＭＳ４Ａ２（１４７１３８）およびＭＳ４Ａ３（６０６４９８）と同じ領域で、ＭＳ４Ａ８Ｂ遺伝子を染色体１１ｑ１２－ｑ１３にマッピングした。

【０４０４】

Ｒｈｏ　ＧＴＰａｓｅは、Ｇタンパク質結合レセプターを通して作用する細胞外刺激因子によって開始される多数の細胞プロセスにおいて機能的役割を果たす。コードされたタンパク質は、Ｇタンパク質と複合体を形成しえ、そしてＲｈｏ依存性シグナルを刺激し得る。このタンパク質は、ＮＥＴ１Ａタンパク質と類似している。

【０４０５】

Ｒｈｏグアニンヌクレオチドは、第３因子（ＲｈｏＧＥＦ）を交換し、シグナル伝達カスケードにおいて機能し得る。

【０４０６】

別の配列（研究室表示　４２＿８＃３＿ｒＥ（配列番号３２４））は、ＡＲＨＧＥＦ３をコードする配列を含む。この配列は、遺伝子マップ位置３ｐ２１－ｐ１３にマッピングされる。

【０４０７】

ＲｈｏＧＥＦは、種々のシグナル伝達カスケードにおいて重要な役割を果たし、そして癌および精神遅滞のようなヒトの状態に関連する（Ｔｈｉｅｓｅｎら「Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｔｗｏ　ｎｏｖｅｌ　ｈｕｍａｎ　ＲｈｏＧＥＦ，ＡＲＨＧＥＦ３　ａｎｄ　ＡＲＨＧＥＲ４，ｉｎ　３ｐ１３－２１　ａｎｄ　２ｑ２２」　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍｕｎ；２７３（１）：３６４－９，Ｊｕｎ　２４，２０００）。データベース検索は、ヒトニューロン奇形癌ライブラリーのスクリーニングと組合わせて、２つの新規のＲｈｏＧＥＦである、ＡＲＨＧＥＦ３およびＡＲＨＧＥＦ４（ＨＧＭＷの承認された記号）を同定した。広範に発現された３５６１ヌクレオチドのＡＲＨＧＥＦ３転写物は、ＮＥＴ１に対して相同性を有する５２６アミノ酸のポリペプチドをコードする。ＡＲＨＧＥＦ４遺伝子は、７２０アミノ酸残基に翻訳される３６６５ヌクレオチドおよび４０００ヌクレオチドの２つの転写物の２つの転写物を生成する。ＡＲＨＧＥＦ４

の発現は、脳に限定され、そしてそのコードされたタンパク質は、コリビスチン（ｃｏｌｌｙｂｉｓｔｉｎ）に対して相同性を示す。ゲノムクローンのＦＩＳＨ分析は、ＡＲＨＧＥＦ３を３ｐ１３－２１にマッピングし、ＡＲＨＧＥＦ４を２ｑ２２にマッピングした。２０００　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ版。

【０４０８】

別の配列（研究室表示　３４Ｘ２５　２３　ｒＥ（配列番号１５３））は、ホスホジエステラーゼ４Ｂ、ｃＡＭＰ特異的（ＰＤＥ４Ｂ）；マウスｃｈｒ４２３７７７３７．．２７２７８２０をコードする配列を含む。このタンパク質は、ダンス（ｄｕｎｃｅ）様ホスホジエステラーゼＥ４（以前は、ＤＰＤＥ４）としても公知である。この配列は、遺伝子マップ位置１ｐ３１にマッピングされる。

【０４０９】

ヒトリンパ球Ｂ細胞株由来のＲＮＡおよびＰＤＥ　ＩＶメンバーＢプローブを使用して、ＯｂｅｒｎｏｌｔｅＲＡ（１９９３）は、３．８ｋｂのｃＤＮＡを単離した。１つの大きなオープンリーディングフレームは、ラットＰｄｅ４ｂに対して９２．９％の同一性を有する５６４アミノ酸タンパク質を予測し、ヌクレオチドレベルでは、その同一性は、８６．３％であった。彼らは、Ｌｉｖｉら（１９９０）によってヒト単球から単離された関連のｃＤＮＡクローンが、ラットＰｄｅ４Ａ（６００１２６）のヒトホモログであることを決定した。サザンブロット分析は、別個の遺伝子がこれらの２ＰＤＥ　ＩＶファミリーメンバーをコードすることを示した。

【０４１０】

Ｈｕｓｔｏｎら（１９９７）は、新規のヒト（＋その同族ラット）のＰＤＥ４Ｂスプライス改変体をクローニングし、そしてその活性を、この遺伝子座由来の２つの他のスプライス改変体と比較した。ヒトＰＤＥ４Ｂ遺伝子およびラットＰＤＥ４Ｂ遺伝子の両方から生成されるｍＲＮＡの選択的スプライシングは、特有のＮ末端領域を有する長いスプライス改変体および短いスプライス改変体を生成した。これらの選択的スプライシングされた領域は、アイソフォームの最大触媒活性における変化、ロリプラムによる阻害に対するその感受性、および粒子画分との相互作用の様式を決定することが示唆された。

【０４１１】

Ｍｉｌａｔｏｖｉｃｈら（１９９４）は、体細胞ハイブリッド株のサザン分析と蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）とを組合わせることによって、ＰＤＥ４Ｂ遺伝子をヒト１ｐ３１にマッピングした；彼らは、組換え同系（ＲＩ）マウス株のサザン分析によって、マウスホモログを第４染色体に割当てた。ヒト染色体またはラット染色体のいずれかを分離する体細胞ハイブリッドの使用によって、Ｓｚｐｉｒｅｒら（１９９５）は、ＰＤＥ４Ｂ遺伝子をヒト第１染色体およびラット第５染色体にマッピングした。

【０４１２】

Ｘｕら（２０００）は、１．７７Åの分解に対するホスホジエステラーゼ４Ｂ２Ｂの触媒ドメインの３次元構造を決定した。活性部位が同定され、そして２つの金属原子のクラスターを含む。Ｘｕら（２０００）は、この構造が作用機構および特性の基礎を示唆し、ホスホジエステラーゼファミリーのメンバーの構造援助薬物設計のためのフレームワークを提供すると結論付けた。

【０４１３】

Ｇａｌｅらは、健常なボランティアにおけるホスホジエステラーゼ（ＰＤＥ）４インヒビターであるＶ１１２９Ａの経口投与後の薬物動態的プロフィールおよび薬力学的プロフィールを記載している（Ｂｒ　Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ　２００２　Ｎｏｖ；５４（５）：４７８－８４）。これらの目的は、健常な男性ボランティアにおける新規のＰＤＥ４インヒビターＶ１１２９４Ａ（３－（３－シクロペプチルオキシ－４－メトキシベンジル）－６－エチルアミノ－８－イソプロピル－３Ｈプリン塩酸塩）：これは、Ｖ１１２９Ａ（３００ｍｇ）またはプラセボの単回経口絶食用量を受けた８人の健常なボランティアにおける二重盲目的な、単回用量の、無作為化クロスオーバー研究である。血液サンプルを、Ｖ１１２９Ａの血漿濃度の決定のために、経口投薬の０．５、１、２、２．５

、３、４、６、９、１２、１８および２４時間後に採取した。血液サンプルをまた、全血中の単核細胞増殖および腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）の放出に対するＶ１１２９Ａの効果を評価するために、投薬の３時間前および投薬の２４時間後に採取した。結果：３００ｍｇのＶ１１２９Ａの単回経口投薬の後、Ｖ１１２９Ａおよびその活性代謝産物であるＶ１０３３２の血漿濃度は、それぞれ、２．６３＋／－０．７９時間および５．９＋／－２．３時間後に、C_{max}（ｎｇ　ｍｌ$^{-1}$；平均＋／－ｓ．ｄ．；それぞれ、１３９８＋／－２９８，１０００＋／－４００）に達した。Ｖ１１２９４ＡおよびＶ１０３３２について、ｔ１／２は、それぞれ、９．７＋／－３．９および９．５＋／－１．７時間であり、そしてＡＵＣ（０、無限）は、それぞれ、１８１００＋／－６１００ｎｇおよび１８６００＋／－８５００ｎｇｍｌ$^{-1}$ｈであった。投薬の３時間目、Ｖ１１２９４ＡおよびＶ１０３３２（３－（３－シクロペンチルオキシ－４－メトキシ－ベンジル）－８－イソプロピル－３Ｈ－プリン－６－イルアミン）の血漿濃度は、それぞれ、１３００＋／－３３０ｎｇｍｌ$^{-1}$および８６０＋／－３００ｎｇｍｌ$^{-1}$であり、それぞれ、ＴＮＦの放出および増殖の阻害についてのインビトロＩＣ５０の７倍および３倍であった。Ｖ１１２９４Ａでの処置により、接種の３時間後（Ｐ＜＜０．００１）および２４時間後（Ｐ＜＜０．０５）で、リポポリサッカリド（ＬＰＳ）誘導性ＴＮＦ放出は有意に減少した。ＬＰＳの最大以下濃度（４ｎｇ　ｍｌ$^{-1}$）に応答して放出されるＴＮＦの量（ｐｍｏｌ　ｍｌ$^{-1}$）は、プラセボ処置後に有意には変化しなかった（処置前：６８１＋／－６８　対　投薬後３時間：７７３＋／－１０９、Ｐ＝０．２７）。逆に、Ｖ１１２９４Ａでの処置後に放出されるＴＮＦの量の有意な減少が存在した（処置前：７７８＋／－８７　対　投薬３時間後：５６６＋／－７２、Ｐ＝０．０２）。フィトヘマグルチニン（ＰＨＡ）は、薬物投与の前の全血における［３Ｈ］チミジンの取り込みを刺激した。Ｖ１１２９４Ａは、３時間目で、ＰＨＡ誘導性の増殖を阻害した（Ｐ＜＜０．０５）。有害な反応は、Ｖ１１２９４Ａの単回経口投与の後には観察されなかった。結論：健常なボランティアに１回経口投与された３００ｍｇ用量のＶ１１２９４Ａは、エキソビボで炎症細胞の活性化を阻害するのに適切な血漿濃度を生じ、これは、いかなる有害な反応も伴うことなく、少なくとも２４時間持続する。

【０４１４】

別の配列は、糖質コルチコイドレセプター（ＧＣＣＲ）をコードする配列を含む。この配列は、遺伝子マップ位置５ｑ３１にマッピングされる。

【０４１５】

Ｖｉｎｇｅｒｈｏｅｄｓら（１９７６）は、コルチゾール耐性の事例を報告した。高レベルのコルチゾール（クッシング症候群の徴候を伴わない）、デキサメタゾンに対する視床下部－下垂体－副腎軸の耐性、および糖質コルチコイドレセプターの親和性欠失は、障害を特徴付けた。Ｃｈｒｏｕｓｏｓら（１９８２）は、Ｖｉｎｇｅｒｈｏｅｄｓら（１９７６）によって報告されたファミリーを再び研究した。おそらくホモ接合性である男性は、電解質コルチコイド過剰を有し、高血圧、低カリウム血症、および代謝性アルカローシスを生じる。この男性の兄弟の一人であって、重篤な高血圧を有し、そして５４歳で脳血管の偶発症候で死亡した人もまた、ホモ接合性であり得る。別の兄弟および彼の息子は、明らかにヘテロ接合性であった；彼らは、２４時間わずかに上昇した平均血漿コルチゾールレベルを示し、そして尿を含まないコルチゾールを上昇させた。Ｌｉｐｓｅｔｔら（１９８６）は、Ｖｉｎｇｅｒｈｏｅｄｓら（１９７６）によって元々報告された４世代ファミリーの追跡調査を提供した。糖質コルチコイド耐性の常染色体優性遺伝が、明確に実証された。Ｌｉｐｓｅｔｔら（１９８６）は、糖質コルチコイドレセプターにおける変異が原因であるが、他の説明が求められ得ると考えた。このファミリーにおける１つのホモ接合体は発端であった。上昇した血漿コルチゾールレベルおよび上昇した尿を含まないコルチゾールを有する他の人は、ヘテロ接合性を示した。この発端者は、１６世紀前に起こった血縁を有するファミリーに由来した。二親ファミリーは、多世代にわたって密接に近接して生存している。このコルチゾール耐性は、おそらく、まだ記載されていない処置可能な高血圧の最も稀な原因である。糖質コルチコイドレセプターが減少した罹患した母親お

よび息子は、Ｉｉｄａら（１９８５）によって報告された。
【０４１６】
Ｂｒｏｎｎｅｇａｒｄら（１９８６）は、上昇した２４時間の平均血漿コルチゾールレベルおよび増加した遊離尿コルチゾールによって示されるようなコルチゾールに対するレセプター媒介性耐性を有する女性を記載した。血漿ＡＣＴＨ濃度は正常であったが、彼女は、デキサメタゾンによる副腎抑制に対して耐性であった。クッシング症候群の徴候はなかった。この患者は、著しい疲労の症状を有していた。閉経が、４３歳で生じていた。この患者のただ一人の子供（息子、２９歳）は、不可解な疲労の期間を有し、このことにより彼は、学校および仕事をせず自宅にいた。この母親がわずか３０分しか働けなくなる究極の疲労に起因して、アディソン病が疑われたが、高コルチゾン症（ｈｙｐｏｃｏｒｔｉｓｏｌｉｓｍ）よりも、尿コルチゾール値の上昇が見出された。Ｂｒｏｎｎｅｇａｒｄら（１９８６）は、コルチゾールに対する末端器官（ｅｎｄ－ｏｒｇａｎ）非感受性が、減少した濃度またはレセプターのリガンド親和性に起因することを見出した。むしろ、この女性および彼女の息子が、増加したコルチゾールレセプターの熱不安定性を示し、精巣性女性化症候群を有する患者におけるアンドロゲンレセプターを伴う現象もまた観察された（３００６８）。
【０４１７】
Ｌａｍｂｅｒｔｓら（１９８６）は、多毛、軽い男性化および月経困難症を有する２６歳の女性におけるコルチゾール耐性を記載した。かれらは、この異常性は、常染色体優性であると考えた。なぜなら、彼女の父親および二人の兄弟がが、デキサメタゾンに対して通常は抑制しない血漿コルチゾール濃度の上昇を有していたからである。高血圧も低カリウムアルカローシスもなかった。この発端者は、男性型頭皮禿頭症を有した。Ｎａｗａｔａら（１９８７）は、糖質コルチコイド耐性の症状を有する２７歳の女性を研究した。彼女は、最初は、高い血漿ＡＣＴＨレベルおよび血清コルチゾールレベル、上昇した尿コルチゾール分泌、デキサメタゾンを用いる副腎抑制に対する耐性、およびコンピュータ断層撮影法および新地グラフィーによる両側副腎肥大に基づいて、クッシング病を有すると考えられた；しかし、彼女は、クッシング症候群の臨床的徴候も症状も有さなかった。研究室の研究によって、この患者の糖質コルチコイド耐性は、糖質コルチコイドに対するレセプターの親和性の減少、およびＧＣＣＲ複合体のＤＮＡへの結合の減少に起因することを示した。
【０４１８】
（コルチコトロフィノマス（Ｃｏｒｔｉｃｏｔｒｏｐｈｉｎｏｍａｓ））
コルチゾール耐性は、ＧＲＬ遺伝子における遺伝的異常によって引き起こされ得るので、Ｈｕｉｚｅｎｇａら（１９９８）は、コルチゾールに対するコルチコトロピノマスの非感受性もまたデノボＧＲＬ変異によって引き起こされるか否かを調査した。１つのサイレント点変異を除いて、彼らは、Ｃｕｓｈｉｎｇ病に罹患する２２人の患者からの白血球またはコルチコトロピノマスにおけるＧＲＬ遺伝子の変異を同定しなかった。２２人の患者のうち、１８人は、少なくとも１つの多型において異型接合であり、１８人のうち６人は、腫瘍ＤＮＡにおいて異型接合の損失（ＬＯＨ）を有した。彼らは、ＧＲＬ遺伝子座におけるＬＯＨがＣｕｓｈｉｎｇ病に罹患する患者の下垂体腺腫において比較的頻繁な現象であり、このことにより、ＡＣＴＨ分泌に対するコルチゾールの阻害性フィードバック作用に対して腺腫細胞の相対的耐性が説明され得ると結論付けた。
【０４１９】
コルチゾール耐性の例は公知であり；モルモットは「コルチコ耐性（ｃｏｒｔｉｃｏｒｅｓｉｓｔａｎｔ）」種である（Ｖｉｎｇｅｒｈｏｅｄｓら、１９７６）。
【０４２０】
２種の新世界の霊長類である、リスザルおよびキヌザルは、糖質コルチコイドホルモン過剰の生理学的証拠はないが、顕著に上昇した血漿コルチゾールレベルを有する。Ｃｈｒｏｕｓｏｓら（１９８２）は、それらの視床下部－下垂体－副腎の軸は、デキサメタゾンによる抑制に対して耐性があることを示した。彼らは、新世界および旧世界のサルの循環

する単球および培養した皮膚線維芽細胞における糖質コルチコイドレセプターを研究し、このレセプター含有量は全ての種で同じではないが、２種の新世界種は、デキサメタゾンに対して顕著に減少した結合親和性を有することを見出した。予想される変異は、旧世界および新世界の霊長類の分岐後（約６０００万年前）でかつ２種の新世界種の転換前（１５００万年前）に生じたに違いない。糖質コルチコイドレセプターの親和性欠損を有するヒトにおける障害と新世界のサルの障害との間の差は、重症の形態のヒト疾患において、ナトリウム保持コルチコイド（コルチコステロンおよびデオキシコルチコステロン）が数倍にも上昇し、高血圧および低カリウム血症アルカローシスを発生することである。鉱質コルチコイドの過剰生成は、新世界のサルでは生じないが、恐らく副腎皮質のコルチコトロピン過剰刺激に起因する。

【０４２１】

糖質コルチコイドホルモンは、他の種類のステロイドホルモンと同様に、特異的細胞質レセプターと複合体化し、次いで、核に移行し、クロマチン上の特定の部位に結合することによってそれらの細胞作用を発揮する。糖質コルチコイドレセプターは、単離され、詳細に研究された最初の転写因子であった（ＭｕｌｌｅｒおよびＲｅｎｋａｗｉｔｚ，１９９１）。糖質コルチコイドレセプター（ＧＣＣＲ）は、遺伝子発現に非常に重要である。それは、９４ｋＤａのポリペプチドであり、１つの方法によると、別個のステロイド結合ドメインおよびＤＮＡ結合ドメインを有すると考えられる。Ｗｅｉｎｂｅｒｇｅｒら（１９８５）は、発現クローニング技術を使用して、ヒト糖質コルチコイドレセプターｃＤＮＡを選択した。

【０４２２】

Ｈｏｌｌｅｎｂｅｒｇら（１９８５）は、ヒト糖質コルチコイドレセプター（以降、ｈＧＲと表す）をコードするｃＤＮＡを同定した。これらのＤＮＡは、７７７（α）および７４２（β）アミノ酸の２つのタンパク質形態が予想され、これらは、それらのカルボキシ末端で異なる。これらのタンパク質は、ＤＮＡ結合ドメインを規定し得るシステイン／リジン／アルギニンリッチ領域を含む。

【０４２３】

Ｗｅｉｎｂｅｒｇｅｒら（１９８５、１９８７）は、彼らがクローニングした糖質コルチコイドレセプターが、オンコジーンのｅｒｂ－Ａファミリーに関連することを指摘した（１９０１２０および１９０１６０を参照のこと）。ｅｒｂオンコジーンファミリーのクローニングされたメンバーは、糖質コルチコイドレセプターのＤＮＡ結合ドメインへの強い関連性を示した。ＧＲＬの短い領域は、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａの特定のホメオティックタンパク質と相同であった。Ｃａｒｌｓｔｅｄｔ－Ｄｕｋｅら（１９８７）は、ラットの肝臓ＧＣＲタンパク質のドメイン構造を分析した。特有のトリプシン性切断によって規定されるステロイド結合ドメインは、残基５１８の領域におけるドメイン境界を有するＣＯＯＨ末端タンパク質に対応した。キモトリプシン性切断部位を有する領域によって規定されるＤＮＡ結合ドメインは、残基４１０～４１４の領域にその境界を有するステロイド結合ドメインに隣接していた。

【０４２４】

選択的スプライシングによって生成される糖質コルチコイドレセプターの２つのアイソフォームのうち、ＧＲ－αは、リガンド活性化転写因子であり、これは、ホルモン結合状態において、特定の糖質コルチコイド応答エレメント（ＧＲＥ）ＤＮＡ配列への結合による糖質コルチコイド－応答性遺伝子の発現を調節する。対照的に、ＧＲ－βは、糖質コルチコイドに結合せず、転写的に不活性である。Ｂａｍｂｅｒｇｅｒら（１９９５）は、ＧＲ－βが濃度依存性様式で糖質コルチコイド応答性レセプター遺伝子に対するホルモン活性化ＧＲ－αの作用を阻害できること実証した。その阻害効果は、ＧＲＥ標的部位への競合に起因すると思われる。ＲＴ－ＰＣＲ分析は、複数のヒト組織においてＧＲ－β　ｍＲＮＡの発現を示したので、ＧＲ－βは、生理学的にも病理学的にも糖質コルチコイド作用の関連する内因性インヒビターであり得、糖質コルチコイドに対する組織の感受性の規定に関与し得る。

【０４２５】
Ｒｏｕｘら（１９９６）は、ＮＲ３Ｃ１のリガンド結合ドメインのＣ末端部分におけるスレオニンへのイソロイシン７４７の変異が、トランス活性化に対するリガンドの特異性を変更することを見出した。天然の糖質コルチコイド（例えば、コルチゾールまたはコルチコステロン）は、完全に不活性であったが、デキサメタゾンのような合成ステロイドは、Ｉ７４７Ｔ変異体ＮＲ３Ｃｌ媒介性トランス活性化を効率的に刺激した。コルチゾールがＩ７４７Ｔを活性化できないことについての基礎は、核レセプターリガンド結合ドメインの正準３次元構造から予測された。なぜなら、イソロイシン７４７は、リガンド結合ポケットに寄与する残基に近接しているからである。
【０４２６】
オリゴヌクレオチド特異的変異誘発を使用して、Ｌｉｎｄら（１９９６）は、残基７３６のセリン（Ｃｙｓ７３６からＳｅｒ）およびスレオニン（Ｃｙｓ７３６からＴｈｒ）による機能的置換を見出した。Ｃｙｓ７３６からセリンのタンパク質は、トランス活性化アッセイで試験した全てのホルモンに対する減少した感受性、および減少したホルモン結合親和性を示した。トランス活性化アッセイでのホルモンに対する感受性とホルモン結合親和性との間の対応はまた、Ｃｙｓ７３６からＴｈｒのタンパク質についても観察された。本発明者らは、Ｃｙｓ７３６の非常に保存的な置換（セリンおよびスレオニンを含む）は、異なる糖質コルチコイドステロイドホルモン間を区別するホルモン結合に対して多用な効果を引き起こすと結論付けた。
【０４２７】
Ｄｉａｍｏｎｄら（２０００）は、種々の細胞型において、糖質コルチコイドが、アンドロゲンレセプター（ＡＲ；３１３７００）またはハンチントン（ＨＤ；１４３１００）由来の拡張したポリグルタミンポリペプチドの凝集および核局在化を特定の遺伝子発現の調節を介して上方調節および下方調節し得ることを示した。野生型糖質コルチコイドレセプターおよびＣ末端欠失誘導体は、これらのポリペプチドの凝集および核局在化を抑制したが、ＧＣＲのＤＮＡ結合ドメインおよびＮ末端内での変異は、この活性を廃止した。驚くべきことに、ＧＣＲ　Ｎ末端内の転写調節ドメインの欠失は、拡張したポリグルタミンタンパク質の凝集および核局在化を顕著に増加した。従って、拡張したポリグルタミンタンパク質の凝集および核局在化は、十分に特徴付けられた転写レギュレーターであるＧＣＲによって調節され得る調節された細胞プロセスである。この知見は、ポリグルタミン拡張疾患の分子病原性および選択的神経変性を研究するためのアプローチを示唆する。
【０４２８】
（糖質コルチコイドレセプターβ）
Ｏａｋｌｅｙら（１９９６）は、ＧＲ－βの発現、生化学的特性、および生理学的機能を試験した。彼らは、ＧＲ－βメッセージが、広範な組織分布を有することを見出した。ＧＲＬ遺伝子は、１０個のエキソンからなると以前に報告されている（ＥｎｃｉｏおよびＤｅｔｅｒａ－Ｗａｄｌｅｉｇｈ、１９９１）が、Ｏａｋｌｅｙら（１９９６）は、以前はエキソン－９－α、イントロンＪおよびエキソン９－βとして同定されたＧＲＬ配列が約４．１ｋｂの１つの大きな末端エキソン（エキソン９）を含み、ＧＲＬ遺伝子が、１０個のエキソンではなく９個のエキソンに組織化されていることを示唆した。彼らは、ＧＲ－βが、主に、ホルモン処置とは独立するトランスフェクト細胞の核に存在することを実証した。Ｏａｋｌｅｙら（１９９６）は、ドミナントネガティブ活性が内因性ＧＲ－αレセプターを有する細胞で生じること示した。さらに、彼らは、ＧＲ－α活性の抑制が、単純なプロモーターであるｐＧＲＥ２ＣＡＴと共に生じることを実証した。このことは、その発現が糖質コルチコイド応答性プロモーターの一般的な現象であり、ＧＲＥ－媒介性転写が実際に阻害されたことを示す。
【０４２９】
コルチコステロイドは、心臓構造に対して特異的な効果を有し、鉱質コルチコイドレセプターおよび糖質コルチコイドレセプター（それぞれ、ＭＲおよびＧＲ）によって媒介される特異的な機能を有する。アルドステロンおよびコルチコステロンは、ラットの心臓で

合成される。それらがまた、ヒト心臓血管系においても合成され得るか否かを見るために、Ｋａｙｅｓ－ＷａｎｄｏｖｅｒおよびＷｈｉｔｅ（２０００）は、ステロイド形成性酵素についての遺伝子ならびにＧＲ、ＭＲ、および１１－ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ（ＨＳＤ１１Ｂ２；２１８０３０）（これは、ＭＲの特異性を維持する）についての遺伝子の発現を試験した。ヒトサンプルは以下に由来した：左心房および右心房、左心室および右心室、大動脈、尖、心室内隔壁、および房室結節、ならびに全成人および胎児の心臓。ＲＴ－ＰＣＲを使用して、ＣＹＰ１１Ａ（１１８４８５）、ＣＹＰ２１（２０１９１０）、ＣＹＰ１１Ｂ１（２０２０１０）、ＧＲ、ＭＲおよびＨＳＤ１１Ｂ２をコードするｍＲＮＡを、心室（これは、ＣＹＰ１１Ｂ１を発現しなかった）を除く全てのサンプルにおいて検出した。ＣＹＰ１１Ｂ２（１２４０８０）ｍＲＮＡは、大動脈および胎児心臓において検出されたが、成人心臓のいずれの領域でも検出されなかった。そしてＣＹＰ１７（２０２１１０）は、いずれの心臓サンプルにおいて検出されなかった。ステロイド形成性酵素遺伝子発現のレベルは、代表的に、副腎において０．１％レベルであった。本発明者らは、これらの知見が、正常な成人ヒト心臓におけるコルチゾールまたはアルドステロンではなく、コルチコステロンおよびデオキシコルチコステロンに対するオートクラインまたはパラクラインの役割と一致すると結論付けた。

【０４３０】

好中球は、Ｔリンパ球よりも糖質コルチコイドに対して非常に感受性が低い。免疫蛍光分析、ウエスタンブロット分析、およびＲＮＡブロット分析を使用して、Ｓｔｒｉｃｋｌａｎｄら（２００１）は、ＧＲ－αおよびＧＲ－βは、単核細胞および好中球の両方において発現され、好中球でのＧＲ－αより幾らか多くＧＲ－βが発現することを示した。好中球のＩＬ８（１４６９３０）刺激により、好中球におけるＧＲ－αではなくＧＲ－βの発現の有意な増加が生じた。ヒト好中球とは違って、マウス好中球は、ＧＲ－βを発現しない。マウス好中球へのＧＲ－βのトランスフェクションは、デキサメタゾンに曝露される場合、細胞死率の有意な減少をもたらす。Ｓｔｒｉｃｋｌａｎｄら（２００１）は、好中球におけるＧＲ－βの高構築性の炎症促進性（ｐｒｏｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ）サイトカイン誘導性アップレギュレーションが、炎症の糖質コルチコイド処置の間のそれらの生存を増強させると結論付けた。彼らは、この知識が新規な抗炎症性戦略の発展に役立ち得ると提唱した。

【０４３１】

（糖質コルチコイドレセプターγ）

Ｒｉｖｅｒｓら（１９９９）は、ＧＣＣＲの新規な改変体であるＧＲ－γを記載し、ここで、選択的スプライシングの結果として、３つの塩基はエキソン３および４とは別にイントロンから保持される。これらの３つの塩基は、このレセプターのＤＮＡ結合ドメインにおけるさらなるアミノ酸（アルギニン）をコードする。この部位でのアルギニンの挿入は、ＧＲによりＧＲ－αの４８％までに転写活性を減少することが以前に示されている（Ｒａｙら、１９９６）。異なる組織由来のｃＤＮＡの分析は、ＧＲ－γが比較的高いレベルで広範に発現されることを示した（全ＧＲのうち３．８％～８．７％）。

【０４３２】

Ｇｅｈｒｉｎｇら（１９８４、１９８５）は、ヒトリンパ球細胞株（これは、糖質コルチコイド感受性であり、野生型特性の糖質コルチコイドレセプターを含む）とマウスリンパ球細胞株（これは、異常なＤＮＡ結合を呈する変異体レセプターに起因して糖質コルチコイドによる溶解に耐性がある）とのハイブリッドの研究によって第５染色体に対するＧＲＬのマッピングを達成した。

【０４３３】

Ｗｅｉｎｂｅｒｇｅｒら（１９８５）は、第５染色体を含む種々の転位を有する体細胞性ハイブリッド細胞のパネルと組み合わせてｃＤＮＡクローンを使用し、ＧＣＣＲを５ｑ１１－ｑ１３に割り当てた。しかし、ＦｒａｎｃｋｅおよびＦｏｅｌｌｍｅｒ（１９８９）は、ＧＲＬ遺伝子が５ｑ３１－ｑ３２に位置することをインサイチュハイブリダイゼーションにより実証した。この新たな割り当ては、同じ領域にマッピングするＤＮＡマー

カーへの結合に一致し（Ｇｉｕｆｆｒａら，、１９８８）、そしてまた、ヒト／マウス競合マッピングデータに一致する。ファミリー結合研究について、Ｇｉｕｆｆｒａら（１９８８）は同様に、ＧＲＬ遺伝子座が第５染色体の長腕の末端に向かって位置すると結論付けた。

【０４３４】

Ｈｏｌｌｅｎｂｅｒｇら（１９８５）は、第５染色体のみを含むハイブリッド細胞株のサザン分析により、第５染色体への糖質コルチコイドレセプター遺伝子の割り当てを確認した。さらに、２つのフラグメント（ＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄ　ＩＩＩ）を全ヒトＤＮＡにおいて見出したが、ハイブリッド株においては見出さなかった。これらをマッピングするために、Ｈｏｌｌｅｎｂｅｒｇら（１９８５）は、二重レーザー蛍光活性化細胞ソーターおよびスポットブロッティングを使用した。これにより、第５染色体への割り当てが確認され、さらに、第１６染色体上でのｈＧＲ配列を示した。第１６染色体への割り当てを、ヒト第１６染色体を含むマウス赤白血病細胞株由来のＤＮＡのサザン分析により確認した。彼らは、αおよびβレセプタータンパク質の両方が恐らく、第５染色体上の単一の遺伝子によってコードされ、選択的スプライシングによって生成されると結論付けた。さらに、彼らは、第１６染色体上の遺伝子は、少なくともヌクレオチド５７０と１，６４０との間で、糖質コルチコイドレセプター遺伝子に対して相同性を有すると結論付けた。これは、関連するステロイド、プロセッシングされた遺伝子または偽遺伝子、またはＧＲＬ遺伝子を有するドメインを共有する他の機能を有する遺伝子に対するレセプター遺伝子であり得る。１３８０６０を参照のこと。

【０４３５】

Ｔｈｅｒｉａｕｌｔら（１９８９）は、ヒト第５染色体ｑ３１へヒトＧＲＬ遺伝子を局在化するために、ビオチン化ｃＤＮＡプローブを用いるインサイチュハイブリダイゼーションを使用した。この割り当てを、平衡化した相互転座（５；８）（ｑ３１；ｑ１３）を有する個体由来の染色体に対するハイブリダイゼーションによって確認した。部分的第５染色体を保持する体細胞ハイブリッドを研究するための第５染色体結合ＤＮＡプローブおよび５ｑの後天性欠失を有する患者由来の臨床サンプルを使用して、Ｈｕｅｂｎｅｒら（１９９０）は、このＧＲＬ遺伝子がＣＳＦ２　（１２８９６０）に対してテロメア性（ｔｅｌｅｍｅｒｉｃ）であり、ＥＣＧＦ（１３１２２０）の付近のＣＳＦ１Ｒ（１６４７７０）／ＰＤＧＦＲＢ（１７３４１０）に対して動原体性であると結論付けた。

【０４３６】

Ｈｕｉｚｅｎｇａら（２０００）は、生化学的かつ臨床的コルチゾール耐性を有する５人の患者を記載する。彼らは、レセプター数もしくはリガンド親和性の変化、および／またはデキサメタゾンがマイトジェン誘導性細胞増殖を阻害する能力を見出した。これらの患者における臨床状況および生化学的状況に至る分子欠損を調査するために、彼らは、ＰＣＲ－ＳＳＣＰ配列分析を使用して、ＧＣＣＲ遺伝子をスクリーニングした。これらの患者においてＧＣＣＲ遺伝子変化は見出されなかった。本発明者らは、ＧＣＣＲタンパク質へのリガンド結合により開始し、最終的に糖質コルチコイド応答性遺伝子の発現の調節またはレセプター後欠損（ｐｏｓｔｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｄｅｆｅｃｔ）または他の核因子との相互作用を生じる事象のカスケードのどこかでの変化は、これらの患者におけるコルチゾール耐性の病理学的基礎を形成すると結論付けた。

【０４３７】

多くの細胞型における炎症性応答は、ＮＦ－κ－Ｂ（１６４０１１）および糖質コルチコイドレセプターの反対の作用によって協調的に調整される。Ｗｅｂｓｔｅｒら（２００１）は、ＨｅＬａＳ３細胞（これは、糖質コルチコイドおよびアイソフォームの両方を内因的に発現する）において、ＧＲ－α　ｍＲＮＡでは１．５倍の増加およびＧＲ－β　ｍＲＮＡでは２．０倍の増加をもたらす、ＧＣＣＲプロモーターに対する腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）応答性ＮＦ－κ－Ｂ　ＤＮＡ結合部位５－プライムの同定を報告した。しかし、ＴＮＦ－α（１９ＬＩ６０）処置は、ＧＲ－αよりＧＲ－βタンパク質アイソフォームの定常状態レベルを不相応に増加させ、ＧＲ－βをドミナントの内因性レセプターアイソフォ

ームにした。同様の結果が、ＴＮＦ－αまたはインターロイキン－１（ＩＬ－１；１４７７６０を参照のこと）でのヒトリンパ球の処置後に観察された。ＧＲ－βタンパク質発現の増加は、糖質コルチコイド耐性の発生に相関した。

【０４３８】

（動物モデル）

Ｐｅｐｉｎら（１９９２）は、糖質コルチコイドレセプターｍＲＮＡの３－プライム非コード領域に相補的なアンチセンスＲＮＡにより、神経組織においてドミナント的に糖質コルチコイドレセプター能力および機能が減少されたトランスジェニックマウスを開発した。Ｍｏｎｔｋｏｗｓｋｉら（１９９５）は、このトランスジェニックマウスが、ストレスに応答して深在性の行動変化および上昇した血漿コルチコトロピン濃度を有することを実証した。モクロベミド（モノアミンオキシダーゼＡ型のインヒビター（３０９８５０））による処置は、このマウスモデルにおける行動欠損を逆転させた。

【０４３９】

糖質コルチコイドレセプターは、ＤＮＡ結合依存性機構およびＤＮＡ結合非依存性機構の両方を介して転写に影響し得るので、Ｒｅｉｃｈａｒｄｔら（１９９８）は、Ｃｒｅ／ｌｏｘ．Ｐ系を使用する遺伝子標的化による糖質コルチコイドレセプターへのＡｒｇ４５８からＴｈｒの点変異を誘導することによって、これらの作用モデルを分離しようとした。この変異は、二量化を害し、それゆえにＧＲＥ依存性トランス活性化を害するが、他の転写因子とのクロストークを必要とする機能（例えば、ＡＰ－１駆動性遺伝子のトランス抑制）は、インタクトのままである。ＧＲ－／－マウスとは対照的に、これらの変異体（ＧＲ－ｄｉｍと称する）は育成可能であり、糖質コルチコイドレセプターのＤＮＡ結合非依存性活性のインビボでの関連性を明らかにした。ＧＲ－ｄｉｍ／ｄｉｍマウスは、共同的ＤＮＡ結合による遺伝子転写をトランス活性化する能力を喪失しているが、糖質コルチコイドレセプターの機能を抑制する機能は保持している。さらに、副腎髄質の発達および機能は、これらのマウスにおいては害されない。

【０４４０】

糖質コルチコイドレセプターは、ＤＮＡ調節エレメントとの相互作用により直接的に、そして他の転写因子とのクロストークにより間接的に標的遺伝子の転写を制御する。種々の刺激（ストレスを含む）に応答して、糖質コルチコイドは、代謝応答、内分泌応答、免疫応答、および神経系応答を調整し、そして転写の適切なプロファイルを確実にする。脳において、糖質コルチコイドレセプターは、感情的行動、認知機能、および習慣性の状態を調節すると考えられている。これらの局面は、機能的糖質コルチコイドレセプターの非存在下では研究され得ない。なぜなら、マウスにおけるＧＲｌ１遺伝子の不活性化は、誕生時に致死性を引き起こすからである。従って、Ｔｒｏｎｃｈｅら（１９９９）は、Ｃｒｅ／ｌｏｘＰ組換え系を使用して、この遺伝子の組織特異的変異を作製した。これにより、彼らは、選択した組織において糖質コルチコイドレセプター機能を喪失する生存可能な成体マウスを育成することができた。神経系における糖質コルチコイドレセプター機能の喪失は、視床下部－下垂体－副腎の軸の調節を害し、Ｃｕｓｈｉｎｇ症候群において観察される糖質コルチコイドを連想させる症状に至る糖質コルチコイドレベルの増加を生じた。神経系における糖質コルチコイドレセプターの条件付き変異誘発は、感情的行動における糖質コルチコイドレセプターシグナル伝達の重要性についての遺伝的証拠を提供した。なぜなら、変異動物は、ストレスに対して損なわれた行動応答を示し、減少した不安を示したからである。

【０４４１】

マウス哺乳動物腫瘍ウイルスレポーターエレメントおよび緑色蛍光タンパク質により標識された糖質コルチコイドレセプターの形態の並列アレイを使用して、ＭｃＮａｌｌｙら（２０００）は、生存マウス細胞において応答エレメントへのレセプターの標的化を観察した。光退色実験は、ホルモン占有レセプターが、クロマチンと核細胞質区画との間で迅速な交換を受けることの直接的な証拠を提供した。従って、ＭｃＮａｌｌｙら（２０００）は、調節タンパク質とクロマチンにおける標的部位との相互作用が、考えられていたよ

りも動力学的プロセスであると結論付けた。

【０４４２】

０００１．糖質コルチコイド耐性、家族性［ＮＲ３Ｃ１、ＡＳＰ６４１ＶＡＬ］

Ｖｉｎｇｅｒｈｏｅｄｓら（１９７６）によって初めに報告され、Ｃｈｒｏｕｓｏｓら（１９８２、１９８３）およびＬｉｐｓｅｔｔら（１９８５）によって研究された家系において、Ｈｕｒｌｅｙら（１９９１）は、３つの罹患したメンバー由来の糖質コルチコイドレセプターを配列決定した。ヌクレオチド２０５４における変化は、アミノ酸残基６４１におけるバリンのアスパラギン酸での置換を予測した。この祖先は同型接合であったが、他の関連するものは、この変異について異型接合であった。この点変異は、このレセプターのステロイド結合ドメインに存在した。

【０４４３】

０００２．糖質コルチコイド耐性、家族性［ＮＲ３Ｃ１、ＩＶＳ６ＤＳ、４－ＢＰ　ＤＥＬ］

オランダ家系の３人の罹患したメンバー全てにおいて、Ｋａｒｌら（１９９３）は、１つのＮＲ３Ｃ１対立遺伝子が、エキソンの最後の２塩基およびイントロン６の最初の２ヌクレオチドに作用するドナースプライシング部位を除去した４ｂｐ欠失を有したことを見出した。父および５人中３人の子供は罹患していた。罹患したメンバーは、コルチゾール過多症（ｈｙｐｅｒｃｏｒｔｉｓｏｌｉｓｍ）を有し、正常な糖質コルチコイドレセプターの約半分であった。この発端者は、コルチゾール過多症を有する娘であった。さらに、発端者において、彼女の罹患した兄弟のうちの１人、および彼女の罹患した姉妹のうちの１人において、Ｋａｒｌら（１９９３）は、エキソン２（Ｇ１２２０）のコドン３６３におけるアスパラギンからセリンへの単一のヌクレオチド置換を見出した。トランスフェクション研究は、このアミノ酸置換が、糖質コルチコイドレセプターの機能を変化させないことを示した。この家族でのヌル対立遺伝子の存在は、共存するアンドロゲン過多症を犠牲にする増加したコルチゾール産生によって明らかに補正された。

【０４４４】

０００３．糖質コルチコイド耐性、細胞性［ＮＲ３Ｃ１、ＬＥＵ７５３ＰＨＥ］

ＡｓｈｒａｆおよびＴｈｏｍｐｓｏｎ（１９９３）は、２つの糖質コルチコイド耐性細胞株がＬｅｕ７５３からＰｈｅ変異に対して半接合であることを示した。両方は、この変異に対して異型接合である野生型細胞株由来であり；これらの耐性細胞株は、正常な対立遺伝子の喪失を経験していた。

【０４４５】

０００７．糖質コルチコイドレセプター多型［ＮＲ３ＣＩ、ＡＳＮ３６３ＳＥＲ］

Ｋｏｐｅｒら（１９９７）は、ヌクレオチド１２２０位（ＡＡＴ～ＡＧＴ）に位置する多型を同定し、これは、ＮＲ３Ｃ１タンパク質のコドン３６３におけるアスパラギンからセリンの変化を生じる。Ｈｕｉｚｅｎｇａら（１９９８）は、この多型が糖質コルチコイドに対する変化した感受性に関連するか否かを調査した。２１６人の年配の人のグループにおいて、彼らは、ＰＣＲ／ＳＳＣＰ分析によってＡｓｐ３６３からＳｅｒの多型に対して１３人の異型接合を同定した。従って、彼らは、研究した集団の６．０％で多型を見出した。Ｈｕｉｚｅｎｇａら（１９９８）は、この多型を保有する個体は、臨床的に健常であるが、コルチゾール抑制およびインスリン応答の両方に対して、外因的に投与された糖質コルチコイドに対してより高い感受性を有すると結論付けた。Ｈｕｉｚｅｎｇａら（１９９８）は、変異した対立遺伝子に対する生涯にわたる曝露が、血圧に対して何ら作用を伴わない腰椎における増加した体重指数および低下した骨鉱質密度を伴い得るを推測した。

【０４４６】

Ｄｏｂｓｏｎら（２００１）は、英国の北東に住む欧州起源の集団において、３６３Ｓ対立遺伝子と冠状動脈心疾患および真性糖尿病に対する危険因子との間の関連を調査した。１３５人の男性および２４０人の女性からの血液サンプルを３６３対立遺伝子状態について特徴付けた。３６３Ｓ対立遺伝子の全体の頻度は、３．０％；２３の異型接合（７人

の男性および１６人の女性）であったが、３６３Ｓ対立遺伝子は同定されなかった。これらのデータは、女性ではなく男性において３６３Ｓ対立遺伝子と増加したウェストからヒップ比との有意な関連性を示した。この対立遺伝子は、血圧、体重指数、血清コレステロール、トリグリセリド、低密度リポタンパク質および高密度リポタンパク質コレステロールレベル、またはグルコース耐性状態とは関連がなかった。本発明者らは、このＧＲ多型が男性における中心性肥満に寄与し得ると結論付けた。

【０４４７】

別の配列は、メチオニンアミノペプチダーゼ様１に類似するＭｅｔａｐｌ１ＬＯＣ　１６５４７０をコードする配列を含む。

【０４４８】

別の配列は、ＴＣＦ４：転写因子４をコードする配列を含む。

【０４４９】

ＴＣＦ４は、転写因子４（塩基性ヘリックス－ターン－ヘリックス転写因子）をコードする。このタンパク質は、Ｅｐｈｒｕｓｓｉ－ボックス（「Ｅ－ボックス」）結合部位（「ＣＡＮＮＴＧ」）を認識する－これは、免疫グロブリンエンハンサーにおいて最初に同定されたモチーフである。ＴＣＦ４は、前Ｂ細胞においてドミナント的に発現されるが、他の組織においても見出される。ＴＣＦ４は、複数の転写産物を産生することが知られている；しかし、この完全な構造は、ｂアイソフォームをコードする転写産物についてのみ知られているので、それは、本明細書中で表される改変体である。

【０４５０】

別の配列は、免疫グロブリン転写因子２（ＩＴＦ２）をコードする配列を含む。この配列は、遺伝子マップ座１８ｑ２１．１にマッピングされる。

【０４５１】

Ｃｏｍｅｌｉｕｓｓｅｎら（１９９１）は、マウス白血球ウイルスＳＬ３のエンハンサーにおける糖質コルチコイド応答エレメント（ＧＲＥ）のモチーフに結合する核タンパク質のファミリーを同定した。このモチーフは、Ｅｐｈｒｕｓｓｉ，またはＥ，ボックスにおいて見出されるものと類似していた（１４１１４１を参照のこと）。Ｃｏｍｅｌｉｕｓｓｅｎら（１９９１）は、このファミリーを「ＳＬ３－３エンハンサー因子２に対するＳＥＦ２」と名づけた。彼らは、ヒト胸腺細胞由来のこれらのタンパク質であるＳＥＦ２－１Ｂの１つをコードする遺伝子をクローニングした。Ｃｏｒｎｅｌｉｕｓｓｅｎら（１９９１）は、ＳＥＦ２－１１３遺伝子が、他の塩基性ヘリックス－ループ－ヘリックス（ｂＨＬＨ）転写因子に対して相同性を有する６６７アミノ酸ポリペプチドをコードすることを見出した。Ｃｏｒｎｅｌｉｕｓｓｅｎら（１９９１）は、複数の関連するｍＲＮＡ種が、異なるスプライシングの結果であると推定されることを見出した。

【０４５２】

Ｈｅｎｔｈｏｒｎら（１９９０）は、免疫グロブリン重鎖エンハンサーのｍｕ－Ｅ５モチーフおよび軽鎖エンハンサーにおいて見出されるκ－Ｅ２モチーフに結合するヘリックス－ループ－ヘリックス転写因子を同定し、これを「免疫グロブリン転写因子２」に対するＩＴＦ２を指定した。ＩＴＦ２は、推定される６２３アミノ酸タンパク質をコードする（Ｈｅｎｔｈｏｒｎら、１９９０）。

【０４５３】

Ｐｓｃｈｅｒｅｒら（１９９６）は、ソマトスタチンレセプター２（ＳＳＴＲ２；１８２４５２）のプロモーター領域を単離し、新規な開始因子エレメントを同定した。マウス脳ｃＤＮＡ発現ライブラリーおをスクリーニングすることによって、Ｐｓｃｈｅｒｅｒら（１９９６）は、ＳＳＴＲ２開始因子エレメントのＥボックスに結合する転写因子（彼らは、ＳＥＦ２と名付けた）を単離した。配列決定により、この因子がヒトＳＥＦ２－１Ｂのマウスホモログであったことが明らかとなった。ＤＮＡ結合研究は、基礎的な転写因子ＴＦＩＩＢ（１３１９６３）が、ＳＥＦ２との物理的相互作用を介してＳＳＴＲ２開始因子エレメントにテザーされ得ることを実証した。ノーザンブロッティングにより、ＳＥＦ２－１Ｂが、ヒト成人組織および胚性組織（心臓、脳、胎盤、骨格筋、および肺を含む）

において発現されることが明らかとなった。

【０４５４】

二極性障害についての候補遺伝子としての多型ＣＴＧ反復についての探索において、Ｂｒｅｓｃｈｅｌら（１９９７）は、ゲノムヒト第１８染色体特異的ライブラリーをスクリーニングし、１８ｑ２１にマッピングされたＣＴＧ（２４）反復を有する１．６ｋｂクローンを同定した。この拡張は、ＳＥＦ２のイントロンに位置した。この反復は、二極性被験体および８４％の観察された異型接合性を有するコントロール被験体の両方において高度に多型性であった。ＣＴＧ（２１００）までの拡張が可能であったが、明らかな異常な表現型とは関連がなかった。この反復の位置を放射ハイブリッドマッピングおよび結合分析によって決定した。マウスＳｅｆ２－１遺伝子の分析は、これが、２２エキソンを含み、多くのイントロンが１０ｋｂ長より長いことを示した。

【０４５５】

別の配列は、ＣＲＹＺ：クリスタリン、ζ（キノンレダクターゼ）をコードする配列；ＬＯＣ３４８４６２を含む。この配列は、遺伝子マップ座１ｐ３１－ｐ２２にマッピングされる。ＣＲＹＺに関連する２つの配列；研究室での名称ＲＡ５Ａ－ｒｅ（配列番号３１７）－１ｑ２１．２　シナプトタグミン（ｓｙｎａｐｔｏｔａｇｍｉｎ）ＸＩ；および研究室での名称ＲＡ５１３－ｒｅ（配列番号３１６）－１ｐ３１．１が存在する。２つの遺伝子：ＣＲＹＺおよびＬＯＣ３４８４６２が存在し、ｃｒｙｚは、両方の開始点に座する。

【０４５６】

クリスタリンは、２つの分類：分類群に特異的（すなわち酵素）および偏在性に分けられる。後者のクラスは、脊椎動物の眼レンズの主要なタンパク質を構成し、レンズの透明性および反射率を維持する。前者のクラスはまた、系統発生的に制限されているクリスタリンとも呼ばれる。この遺伝子は、分類分特異的クリスタリンタンパク質をコードし、このタンパク質は、他の公知のキノンレダクターゼとは異なるＮＡＤＰＨ－依存性キノンレダクターゼを有する。この遺伝子は、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を欠くが、類似性によって、鉛含有アルコールデヒドロゲナーゼファミリーのメンバーと考えられる。他の哺乳動物種とは違って、ヒトにおいてレンズ発現は低い。１つの偽遺伝子が存在することが知られている。

【０４５７】

α、β、およびγクリスタリンファミリー（これらは、全ての脊椎動物の眼内レンズに存在する）に加えて、他のクリスタリンの数が、系統発生的に制限された群からのレンズ中に多量に存在することが見出されている。これら「分類群特異的」クリスタリンのほとんどは、非レンズ状組織中の酵素的レベルでまた存在するピリジンヌクレオチド依存性オキシドレダクターゼである。レンズクリスタリンとしてのこの新たな機能の獲得は、一般的に遺伝子複製を伴わず、かつ、明らかに酵素の触媒的な役割に影響を与えずに生じる。ζ－クリスタリン／キノンレダクターゼは、モルモットのレンズ中の主要なタンパク質として最初に記載され（Ｈｕａｎｇら、１９８７）、ここで、この遺伝子の変異は、遺伝性白内障に関連する（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚら、１９９２）。これは後に、ラクダのレンズ中に多量に存在し（Ｇａｒｌａｎｄら，１９９１）、多様な種の多くの非レンズ状組織中に酵素的レベルで存在することもまた見出された。モルモットおよびラクダのレンズにおいて、レンズは、全水溶性タンパク質の約１０％を含む。Ｇｏｎｚａｌｅｚら（１９９４）は、ヒトζ－クリスタリン遺伝子およびそのプロセッシングされた偽遺伝子を単離および特徴付けた。この機能的遺伝子は、９つのエキソンから構成され、約２０ｋｂにわたる。この遺伝子の５－プライム隣接領域は、ＧおよびＣが豊富であり（５８％）、ＴＡＴＡボックスおよびＣＡＡＴボックスを欠く。モルモット遺伝子の以前の分析により、２つの異なるプロモーター（一方は、高いレンズ特異的発現の原因であり、他方は、多くの組織における酵素的レベルでの発現の原因である）の存在が明らかになった。モルモット遺伝子を用いる比較分析は、モルモットにおけるレンズ中での高発現の原因であるプロモーターを含む約２．５ｋｂの領域が、ヒト遺伝子には存在しないことを示した。

【０４５８】
ヒト／マウス体細胞ハイブリッドのサザン分析によって、Ｈｅｉｎｚｍａｎｎら（１９９４）は、ヒト第１染色体へＣＲＹＺ遺伝子を割り当て、蛍光インサイチュハリブリダイゼーションによって１ｐ３１－ｐ２２への割り当てを領域に分けた。彼らはまた、５つのＲＦＬＰを同定した。
【０４５９】
別の配列（研究室での名称ＲＡ３＿Ａ＿ｒＥ．ｔｘｔ（配列番号３１７））は、ＨＭ１３をコードする配列；組織適合性（マイナー）１３を含む。この配列は、遺伝子マップ座２０ｑ１１．２１にマッピングされる。
【０４６０】
シグナルペプチドペプチダーゼ、すなわちＳＰＰは、それらが前タンパク質から切断された後に、幾つかのシグナルペプチドの膜内タンパク質分解を触媒する。ヒトにおいて、ＳＰＰ活性は、免疫系によって認識されるシグナル配列由来ヒトリンパ球抗原－Ｅエピトープを生成し、Ｃ型肝炎ウイルスコアタンパク質をプロセッシングするのに必要である。Ｗｅｉｈｏｆｅｎら（２００２）［ＰｕｂＭｅｄ　１２０７７４１６］は、プレセニリン型アスパラギン酸プロテアーゼ（ＯＭＩＭにより供給された）に特徴的な配列モチーフを有するポリトピック膜タンパク質としてヒトＳＰＰを同定した。
【０４６１】
本出願全体を通じて、種々の刊行物が参照されている。これらの刊行物のそれらの全体における開示およびこれらの刊行物に引用される参考文献は、本発明が関連する最新技術の状態をより完全に記載するために本出願において参考として援用される。本明細書中に記載されたタンパク質の配列を含む参照、参考文献はまた、本出願全体を通じて引用される。これらの参考文献およびこれらの参考文献に含まれる配列はまた、本明細書中に記載される遺伝子配列、染色体位置、この遺伝子の構造的特性および機能的特性、ならびに遺伝子産物を記載する目的で、本明細書中で参考として援用される。
【０４６２】
（参考文献）
【０４６３】

【表３－１】

Hicks, G. G. et al. "Functional genomics in mice by tagged sequence mutagenesis." *Nat Genet* **16**, 338-44. (1997).

Blay, J. & Brown, K. D. "Functional receptors for epidermal growth factor in an epithelial-cell line derived from the rat small intestine." *Biochem J* **225**, 85-94 (1985).

Blay, J. & Brown, K. D. "Epidermal growth factor promotes the chemotactic migration of cultured rat intestinal epithelial cells." *J Cell Physiol* **124**, 107-12 (1985).

Bell, A. C. & Felsenfeld, G. "Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene." *Nature* **405**, 482-5. (2000).

Ohlsson, R., Renkawitz, R. & Lobanenkov, V. "CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease" *Trends Genet* **17**, 520-7 (2001).

Oldham, S. M., Clark, G. J., Gangarosa, L. M., Coffey, R. J., Jr. & Der, C. J. "Activation of the Raf-1/MAP kinase cascade is not sufficient for Ras transformation of RIE-1 epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6924-8 (1996).

von Melchner, H., Reddy, S. & Ruley, H. E. "Isolation of cellular promoters by using a retrovirus promoter trap." *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 3733-7 (1990).

Ahmed, R. & Graham, A. F. "Persistent infections in L cells with temperaturesensitive mutants of reovirus." *J Virol* **23**, 250-62 (1977).

Ahmed, R. et al. "Role of the host cell in persistent viral infection: coevolution of L cells and reovoirus during persistent infection." *Cell* **25**, 325-32 (1981).

Morgan, D. O. et al. "Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein." *Nature* **329**, 301-7 (1987).

Tong, P. Y., Tollefsen, S. E. & Kornfeld, S. "The cation-independent mannose 6-phosphate receptor binds insulin-like growth factor II." *J Biol Chem* **263**, 2585-8 (1988).

Bakay, M., Zhao, P., Chen, J. & Hoffman, E. P. "A web-accessible complete transcriptome of normal human and DMD muscle." *Neuromuscul Disord* **12** Suppl 1, S125-41 (2002).

Hark, A. T. et al. "CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus." *Nature* **405**, 486-9 (2000).

Bell, A. C. & Felsenfeld, G. "Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene." *Nature* **405**, 482-5 (2000).

McFall, A. et al. "Oncogenic Ras blocks anoikis by activation of a novel effector pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase." *Mol Cell Biol* **21**, 5488-99

【０４６４】

【表３－２】

(2001).

Wright, J. F., Kurosky, A. & Wasi, S. "An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus." *Biochem Biophys Res Commun* **198**, 983-9 (1994).

Zhao, W. Q. et al. "Secretion of Annexin II via activation of insulin receptor and insulin-like growth factor receptor." *J Biol Chem* **278**, 4205-15 (2003).

Nakagawa, H. et al. "Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs by biallelic methylation in a core region of H19-associated CTCF-binding sites in colorectal cancer." *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 591-6 (2001).

Rainier, S. et al. "Relaxation of imprinted genes in human cancer." *Nature* **362**, 747-9 (1993).

Arceci, R. J.; King, A. A.; Simon, M. C.; Orkin, S. H.; Wilson, D. B. "Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart." *Molec. Cell. Biol.* **13**: 2235-2246, 1993

Das, A. K.; Helps, N. R.; Cohen, P. T. W.; Barford, D. "Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 angstrom resolution." *EMBO J.* **15**: 6798-6809, 1996.

Mann, D. J.; Campbell, D. G.; McGowan, C. H.; Cohen, P. T. W.: "Mammalian protein serine/threonine phosphatase 2C: cDNA cloning and comparative analysis of amino acid sequences." *Biochim. Biophys. Acta* **1130**: 100-104, 1992.

Takekawa, M ; Maeda, T ; Saito, H.: "Protein phosphatase 2C-alpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways." *EMBO J.* **17**: 4744-4752, 1998.

Gradi, A.; Imataka, H.; Svitkin, Y. V.; Rom, E.; Raught, B.; Morino, S.; Sonenberg, N. : "A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G." *Molec. Cell. Biol.* **18**: 334-342, 1998.

Imataka, H.; Gradi, A ; Sonenberg, N.: "A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation." *EMBO J.* **17**: 7480-7489, 1998.

Irurzun A, Sanchez-Palomino S, Novoa I, Carrasco L. "Monensin and nigericin prevent the inhibition of host translation by poliovirus, without affecting p220 cleavage." *J Virol* 1995 Dec;69 (12):7453-60

Raho G, Barone V, Rossi D, Philipson L, Sorrentino V. "The gas 5 gene shows four alternative splicing patterns without coding for a protein." DIBIT, Istituto Scientifico San Raffaele, Milan, Italy. *Gene* **256** (1-2):13-7 Oct. 3, 2000.

Lai WS, Thompson MJ, Blackshear PJ. "Characteristics of the intron involvement in the mitogen-induced expression of Zfp-36." *J Biol* Chem **273(1)**:506-17 1998 Jan 2;

Hu, S.-I.; Carozza, M.; Klein, M.; Nantermet, P.; Luk, D.; Crowl, R. M. :

【０４６５】

【表３－３】

"Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage." *J. Biol.* Chem. 273: 34406-34412, 1998.

Zumbrunn, J.; Trueb, B. "Localization of the gene for a serine protease with IGF-binding domain (PRSS11) to human chromosome" 10q25.3-q26.2. *Genomics* **45**: 461-462, 1997.

Zumbrunn, J.; Trueb, B. "Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins." *FEBS Lett.* **398**: 187-192, 1996.

Johnson, K. R.; Merrick, W. C.; Zoll, W. L.; Zhu, Y. "Identification of cDNA clones for the large subunit of eukaryotic translation initiation factor 3: comparison of homologues from human, Nicotiana tabacum, Caenorhabditis elegans, and Saccharomyces cerevisiae" *J. Biol.* Chem. **272:** 7106-7113, 1997.

Osaka, F.; Kawasaki, H.; Aida, N.; Saeki, M.; Chiba, T.; Kawashima, S.; Tanaka, K.; Kato, S. "A new NEDD8-ligating system for cullin-4A." *Genes Dev.* **12:** 2263-2268, 1998.

Ye XY, Ng TB "Isolation of a new cyclophilin-like protein from chickpeas with mitogenic, antifungal and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities." *Life Sci* 2002 Jan 25;70(10):1129-38

Wang P, Cardenas ME, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. "Two cyclophilin A homologs with shared and distinct functions important for growth and virulence of Cryptococcus neoformans." *EMBO* Rep 2001 Jun;2(6):511-8

Quintrell, N.; Lebo, R.; Varmus, H.; Bishop, J. M.; Pettenati, M. J.; Le Beau, M. M.; Diaz, M. O.; Rowley, J. D. "Identification of a human gene (HCK) that encodes a protein-tyrosine kinase and is expressed in hemopoietic cells." *Molec. Cell. Biol.* **7:** 2267-2275, 1987.

Ziegler, S. F.; Marth, J. D.; Lewis, D. B.; Perlmutter, R. M. "Novel protein-tyrosine kinase gene (hck) preferentially expressed in cells of hematopoietic origin." *Molec. Cell.Biol.* **7:** 2276-2285, 1987.

Deleuze, J. F.; Dhorne, S.; Hazan, J.; Borghi, E.; Raynaud, N.; Pollet, N.; Meunier-Rotival, M.; Deschatrette, J.; Alagille, D.; Hadchouel, M. "Deleted chromosome 20 from a patient with Alagille syndrome isolated in a cell hybrid through leucine transport selection: study of three candidate genes." *Mammalian Genome* **5**: 663-669, 1994.

Kaestner, K. H.; Hiemisch, H.; Luckow, B.; Schutz, G. "The HNF-3 gene family of transcription factors in mice: gene structure, cDNA sequence, and mRNA distribution." *Genomics* **20**: 377-385, 1994.

Mincheva, A.; Lichter, P.; Schutz, G.; Kaestner, K. H. "Assignment of the human genes for hepatocyte nuclear factor 3-alpha, -beta, and -gamma (HNF3A, HNF3B, HNF3G) to 14q12-q13, 20p11, and 19q13.2-q13.4." *Genomics* **39**: 417-419, 1997.

【０４６６】

【表３－４】

Nagase, T.; Ishikawa, K; Miyajima, N.; Tanaka, A.; Kotani, H.; Nomura, N.; Ohara, O. "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro." *DNA Res.*"**5**: 31-39, 1998.

Nakamura, H.; Sudo, T.; Tsuiki, H.; Miyake, H.; Morisaki, T.; Sasaki, J.; Masuko, N.; Kochi, M.; Ushio, Y.; Saya, H. "Identification of a novel human homolog of the Drosophila dlg, P-dlg, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55." *FEBS Lett.* **433**: 63-67, 1998.

Aso, T.; Haque, D.; Fukudome, K.; Brower, C. S.; Conaway, J. W.; Conaway, R. C. "A human cDNA encoding the 110-kDa A subunit of RNA polymerase II transcription factor elongin." *Gene* **168**: 277-278, 1996.

Aso, T.; Lane, W. S.; Conaway, J. W.; Conaway, R. C. "Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II."*Science* **269**: 1439-1443, 1995.

Aso, T; Mokady, N.; Haque, D.; Conaway, R. C.; Conaway, J. W. "Assignment of a human gene encoding the 110-kDa subunit of general transcription factor elongin (SIII) to chromosome 1p36.1." *Genomics* **30**: 393-394, 1995.

Duan, D. R ; Pause, A.; Burgess, W. H.; Aso, T.; Chen, D. Y. T.; Garrett, K. P.; Conaway, R. C.; Conaway, J. W.; Linehan, W. M.; Klausner, R. D. "Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein." *Science* **269**: 1402-1406, 1995.

Kibel, A.; Iliopoulos, O.; DeCaprio, J. A.; Kaelin, W. G., Jr. "Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to elongin B and C." *Science* **269**: 1444-1446, 1995.

Kavsak, P.; Rasmussen, R. K.; Causing, C. G.; Bonni, S.; Zhu, H.; Thomsen, G. H.; Wrana, J. L. "Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF-beta receptor for degradation." *Molec. Cell* 6: 1365-1375, 2000.

Lallemand, F.; Mazars, A.; Prunier, C.; Bertrand, F.; Kornprost, M.; Gallea, S.; Roman-Roman, S ; Cherqui, G.; Atfi, A. "Smad7 inhibits the survival nuclear factor kappa-B and potentiates apoptosis in epithelial cells." *Oncogene* **20**: 879-884, 2001.

Roijer, E.; Moren, A.; ten Dijke, P.; Stenman, G. "Assignment of the Smad7 gene (MADH7) to human chromosome 18q21.1 by fluorescence in situ hybridization." *Cytogenet. Cell Genet.* **81**: 189-190, 1998.

Topper, J. N.; Cai, J.; Qiu, Y.; Anderson, K. R.; Xu, Y.-Y.; Deeds, J. D.; Feeley, R.; Gimeno, C. J.; Woolf, E. A.; Tayber, O.; Mays, G. G.; Sampson, B. A.; Schoen, F. J.; Gimbrone, M. A., Jr.; Falb, D. "Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium. Proc. Nat. Acad." *Sci.* **94**: 9314-9319, 1997.

Groden, J.; Thliveris, A.; Samowitz, W.; Carlson, M.; Gelbert, L.; Albertsen, H ; Joslyn, G.; Stevens, J.; Spirio, L.; Robertson, M.; Sargeant, L.; Krapcho, K.; Wolff, E.; Burt, R.; Hughes, J. P.; Warrington, J.; McPherson, J.; Wasmuth, J.; Le Paslier, D.; Abderrahim, H ;

【０４６７】

【表３－５】

Cohen, D.; Leppert, M.; White, R. "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene." *Cell* **66**: 589-600, 1991.

Horii, A.; Nakatsuru, S.; Ichii, S.; Nagase, H.; Nakamura, Y. "Multiple forms of the APC gene transcripts and their tissue-specific expression." *Hum. Molec. Genet.* **2**: 283-287, 1993.

Joslyn, G.; Carlson, M.; Thliveris, A.; Albertsen, H.; Gelbert, L.; Samowitz, W.; Groden, J.; Stevens, J.; Spirio, L.; Robertson, M.; Sargeant, L.; Krapcho, K.; Wolff, E.; Burt, R.; Hughes, J. P.; Warrington, J.; McPherson, J.; Wasmuth, J.; Le Paslier, D.; Abderrahim, H.; Cohen, D.; Leppert, M.; White, R. "Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus." *Cell* **66**: 601-613, 1991.

Larsen, N.; Samuelsson, T.; Swieb, C. "The Signal Recognition Particle Database (SRPDB)." *Nucleic Acids Res.* **26**: 177-178, 1998.

Lingelbach, K.; Zweib, C.; Webb, J.; Marshallsay, C.; Hoben, P.; Walter, P.; Dobberstein, B. "Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 19 kDa protein of signal recognition particle (SRP): expression and binding to 7SL RNA." *Nucleic Acids Res.* **16** 9431-9442, 1988.

Wild, K.; Sinning, I.; Cusack, S. "Crystal structure of an early protein-RNA assembly complex of the signal recognition particle." *Science* **294**: 598-601, 2001.

Davis, D. B.; Delmonte, A. J.; Ly, C. T.; McNally, E. M. "Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy." *Hum. Molec. Genet.* **9**: 217-226, 2000.

Hull, E.; Sarkar, M.; Spruijt, M. P. N.; Hoppener, J. W. M.; Dunn, R.; Schachter, H. "Organization and localization to chromosome 5 of the human UDP-N acetylglucosamine:alpha-3-D-mannoside beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1 gene." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**: 608-615, 1991.

Ioffe, E.; Stanley, P. "Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates." *Proc. Nat. Acad. Sci.* **91**: 728-732, 1994.

Kumar, R.; Stanley, P. "Transfection of a human gene that corrects the Lec1 glycosylation defect: evidence for transfer of the structural gene for N-acetylglucosaminyltransferase I." *Molec. Cell. Biol.* **9**: 5713-5717, 1989. Note: Erratum: Molec. Cell. Biol. 10: 3857 only, 1990.

Kumar, R.; Yang, J.; Eddy, R. L.; Byers, M. G.; Shows, T. B.; Stanley, P. "Cloning and expression of the murine gene and chromosomal location of the human gene encoding N-acetylglucosaminyltransferase I." *Glycobiology* **2**: 383-393, 1992.

Kumar, R.; Yang, J.; Larsen, R. D.; Stanley, P. "Cloning and expression of N-acetylglucosaminyltransferase I, the medial Golgi transferase that initiates complex N-linked carbohydrate formation." *Proc. Nat. Acad. Sci.* **87**: 9948-9952, 1990.

Metzler, M.; Gertz, A.; Sarkar, M.; Schachter, H.; Schrader, J. W.; Marth, J. D. "Complex

【０４６８】

【表３－６】

asparagine-linked oligosaccharides are required for morphogenic events during post-implantation development." *EMBO J.* **13**: 2056-2065, 1994.

Pownall, S.; Kozak, C. A.; Schappert, K.; Sarkar, M.; Hull, E.; Schachter, H.; Marth, J. D. "Molecular cloning and characterization of the mouse UDP-N-acetylglucosamine:alpha-3-D-mannoside beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I gene." *Genomics* **12**: 699-704, 1992.

Puthalakath, H.; Burke, J.; Gleeson, P. A. "Glycosylation defect in lec1 Chinese hamster ovary mutant is due to a point mutation in N-acetylglucosaminyltransferase 1 gene" *J. Biol. Chem.* 271: 27818-27822, 1996.

Tan, J.; D'Agostaro, G. A. F.; Bendiak, B.; Reck, F.; Sarkar, M.; Squire, J. A.; Leong, P.; Schachter, H. "The human UDP-N-acetylglucosamine:alpha-6-D-mannoside-beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransfe rase II gene (MGAT2): cloning of genomic DNA, localization to chromosome 14q21, expression in insect cells and purification of the recombinant protein." *Europ. J. Biochem.* **231**: 317-328, 1995.

Yip, B.; Chen, S.-H.; Mulder, H.; Hoppener, J. W. M.; Schachter, H. "Organization of the human beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I gene (MGAT1), which controls complex and hybrid N-glycan synthesis." *Biochem. J.* **321**: 465-474, 1997.

Takagaki, Y.; MacDonald, C. C.; Shenk, T.; Manley, J. L. "The human 64-kDa polyadenylylation (sic) factor contains a ribonucleoprotein-type RNA binding domain and unusual auxiliary motifs." *Proc. Nat. Acad. Sci.* **89**: 1403-1407, 1992.

Takagaki, Y.; Manley, J. L. "Levels of polyadenylation factor CstF-64 control IgM heavy chain mRNA accumulation and other events associated with B cell differentiation." *Molec. Cell* **2**: 761-771, 1998.

Takagaki, Y.; Seipelt, R. L.; Peterson, M. L.; Manley, J. L. "The polyadenylation factor CstF-64 regulates alternative processing of IgM heavy chain pre-mRNA during B cell differentiation." *Cell* **87**: 941-952, 1996.

Kapanadze, B.; Kashuba, V.; Baranova, A.; Rasool, O.; van Everdink, W.; Liu, Y.; Syomova, A.; Corcoran, M.; Poltaraus, A.; Brodyansky, V.; Syomova, N.; Kazakov, A.; Ibbotson, R.; van den Berg, A.; Gizatullin, R.; Fedorova, L.; Sulimova, G.; Zelenin, A.; Deaven, L.; Lehrach, H.; Grander, D.; Buys, C.; Oscier, D.; Zabarovsky, E. R.; Einhorn, S.; Yankovsky, N. "A cosmid and cDNA fine physical map of a human chromosome 13q14 region frequently lost in B-cell chronic lymphocytic leukemia and identification of a new putative tumor suppressor gene, Leu5." *FEBS Lett.* **426**: 266-270, 1998.

Liu, Y.; Hermanson, M.; Grander, D.; Merup, M.; Wu, X.; Heyman, M.; Rasool, O.; Juliusson, G.; Gahrton, G.; Detlofsson, R. "13q deletions in lymphoid malignancies." *Blood* **86**: 1911-1915, 1995.

Liu, Y.; Szekely, L.; Grander, D.; Soderhall, S.; Juliusson, G.; Gahrton, G.; Linder, S.; Einhorn, S. "Chronic lymphocytic leukemia cells with allelic deletions at 13q14 commonly have one intact RB1 gene: evidence for a role of an adjacent locus." *Proc. Nat. Acad. Sci.* **90**: 8697-8701, 1993.

【０４６９】

【表３－７】

Pahl, P. M. B.; Hodges, Y. K.; Meltesen, L.; Perryman, M. B.; Horwitz, K. B.; Horwitz, L. D. "ZNF207, a ubiquitously expressed zinc finger gene on chromosome 6p21.3." *Genomics* **53**: 410-412, 1998.

Deed, R. W.; Hirose, T.; Mitchell, E. L. D.; Santibanez-Koref, M. F.; Norton, J. D. "Structural organisation and chromosomal mapping of the human Id-3 gene." *Gene* **151**: 309-314, 1994.

Ellmeier, W.; Aguzzi, A.; Kleiner, E.; Kurzbauer, R.; Weith, A. "Mutually exclusive expression of a helix-loop-helix gene and N-myc in human neuroblastomas and in normal development." *EMBO J.* **11**: 2563-2571, 1992.

Kee, B. L.; Rivera, R. R.; Murre, C. "Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF-beta." *Nature Immun.* **2**: 242-247, 2001.

Lyden, D.; Young, A. Z.; Zagzag, D.; Yan, W.; Gerald, W.; O'Reilly, R.; Bader, B. L.; Hynes, R. O.; Zhuang, Y.; Manova, K.; Benezra, R. "Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts." *Nature* **401**: 670-677, 1999.

Pan, L.; Sato, S.; Frederick, J. P.; Sun, X.-H.; Zhuang, Y. "Impaired immune responses and B-cell proliferation in mice lacking the Id3 gene." *Molec. Cell. Biol.* **19**: 5969-5980, 1999.

White, P. S.; Maris, J. M.; Beltinger, C.; Sulman, E.; Marshall, H. N.; Fujimori, M.; Kaufman, B. A.; Biegel, J. A.; Allen, C.; Hilliard, C.; Valentine, M. B.; Look, A. T.; Enomoto, H.; Sakiyama, S.; Brodeur, G. M. "A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3." *Proc. Nat. Acad. Sci.* **92**: 5520-5524, 1995.

Lam, E.; Martin, M.; Wiederrecht, G. "Isolation of a cDNA encoding a novel human FK506-binding protein homolog containing leucine zipper and tetratricopeptide repeat motifs." *Gene* **160**: 297-302, 1995.

Kitamura H, Kanehira K, Okita K, Morimatsu M, Saito M. "A novel nuclear I kappa B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production." *FEBS Lett* 17;485(1):53-6 2000 Nov

Bertin, J.; Nir, W.-J.; Fischer, C. M.; Tayber, O. V.; Errada, P. R.; Grant, J. R.; Keilty, J. J.; Gosselin, M. L.; Robison, K. E.; Wong, G. H. W.; Glucksmann, M. A.; DiStefano, P. S. " Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappa-B." *J. Biol. Chem.* **274**: 12955-12958, 1999.

Inohara, N.; Koseki, T.; del Peso, L.; Hu, Y.; Yee, C.; Chen, S.; Carrio, R.; Merino, J.; Liu, D.; Ni, J.; Nunez, G. "Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappa-B " *J. Biol Chem.* **274**: 14560-14567, 1999.

Ge, B.; Gram, H.; Di Padova, F.; Huang, B.; New, L.; Ulevitch, R. J.; Luo, Y.; Han, J. 'MAPKK-independent activation of p38-alpha mediated by TAB1-dependent

【０４７０】

【表３－８】

autophosphorylation of p38-alpha." *Science* **295**: 1291-1294, 2002.

Shibuya, H.; Yamaguchi, K.; Shirakabe, K.; Tonegawa, A.; Gotoh, Y.; Ueno, N ; Irie, K.; Nishida, E.; Matsumoto, K. TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* **272**: 1179-1182, 1996.

Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y, Han J. "MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha." *Science*; **295**(5558):1291-4 2002 Feb 15

Beck, S.; Hanson, I.; Kelly, A.; Pappin, D. J.; Trowsdale, J. "A homologue of the Drosophila female sterile homeotic (fsh) gene in the class II region of the human MHC." *DNA Sequence* **2**: 203-210, 1992.

Denis, G. V.; Green, M. R. "A novel, mitogen-activated nuclear kinase is related to a Drosophila developmental regulator." *Genes Dev.* **10**: 261-271, 1996.

Nomura, N.; Nagase, T.; Miyajima, N ; Sazuka, T.; Tanaka, A.; Sato, S.; Seki, N.; Kawarabayasi, Y.; Ishikawa, K.; Tabata, S. "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. II. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0041-KIAA0080) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1." *DNA Res.* **1**: 223-229, 1994.

Okamoto, N.; Ando, A.; Kawai, J.; Yoshiwara, T.; Tsuji, K.; Inoko, H. "Orientation of HLA-DNA gene and identification of a CpG island-associated gene adjacent to DNA in human major histocompatibility complex class II region." *Hum. Immun.* **32**: 221-228, 1991.

Thorpe, K. L.; Abdulla, S.; Kaufman, J.; Trowsdale, J.; Beck, S. "Phylogeny and structure of the RING3 gene." *Immunogenetics* **44**: 391-396, 1996.

Dorin, J. R.; Emslie, E.; van Heyningen, V. "Related calcium-binding proteins map to the same subregion of chromosome 1q and to an extended region of synteny on mouse chromosome 3." *Genomics* **8**: 420-426, 1990.

Ferrati, S.; Calabretta, B.; deRiel, J. K.; Battini, R.; Ghezzo, F.; Lauret, E.; Griffin, C.; Emanuel, B. S.; Gurrieri, F.; Baserga, R. "Structural and functional analysis of a growth-regulated gene, the human calcyclin." *J. Biol. Chem.* **262**: 8325-8332, 1987.

Oakey, R. J.; Watson, M. L.; Seldin, M. F. "Construction of a physical map on mouse and human chromosome 1: comparison of 13 Mb of mouse and 11 Mb of human DNA." *Hum. Molec. Genet.* **1**: 613-620, 1992.

Schafer, B. W.; Wicki, R.; Engelkamp, D.; Mattei, M.-G.; Heizmann, C. W. "Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family." *Genomics* **25**: 638-643, 1995.

Seldin, M. F.van Heyningen, V.; Emslie, E.; Dorin, J. R. "Related calcium binding proteins map to the same sub-region of chromosome 1q and to an extended region of

【０４７１】

【表３－９】

synteny on mouse chromosome 3." *Cytogenet. Cell Genet.* **51**: 1095 only, 1989.

Pinol-Roma, S.; Swanson, M. S.; Gall, J. G.; Dreyfuss, G. :
"A novel heterogeneous nuclear RNP protein with a unique distribution on nascent transcripts." *J. Cell Biol.* **109:** 2575-2587, 1989.

Crompton, M. R.; Moss, S. E.; Crumpton, M. J. "Diversity in the lipocortin/calpactin family." *Cell* **55**: 1-3, 1988.

Horlick, K. R.; Cheng, I. C.; Wong, W. T.; Wakeland, E. K.; Nick, H. S. "Mouse lipocortin I gene structure and chromosomal assignment: gene duplication and the origins of a gene family." *Genomics* **10**: 365-374, 1991.

Huebner, K.; Cannizzaro, L. A.; Croce, C. M.; Frey, A. Z.; Wallner, B. P.; Hecht, B. K.; Hecht, F. "Chromosome localization of the human genes for lipocortin I and the lipocortin II family. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 46: 631 only, 1987.

Huebner, K.; Cannizzaro, L. A.; Frey, A. Z.; Hecht, B. K.; Hecht, F.; Croce, C. M.; Wallner, B. P. "Chromosomal localization of the human genes for lipocortin I and lipocortin II." *Oncogene Res.* **2**: 299-310, 1988.

Kaplan, R.; Jaye, M.; Burgess, W. H.; Schlaepfer, D. D.; Haigler, H. T.
"Cloning and expression of cDNA for human endonexin II, a Ca(2+) and phospholipid binding protein." *J. Biol. Chem.* **263**: 8037-8043, 1988.

Pepinsky, R. B.; Tizard, R.; Mattaliano, R. J.; Sinclair, L. K.; Miller, G. T.; Browning, J. L.; Chow, E. P.; Burne, C.; Huang, K.-S.; Pratt, D.; Wachter, L.; Hession, C.; Frey, A. Z.; Wallner, B. P. "Five distinct calcium and phospholipid binding proteins share homology with lipocortin I." *J. Biol. Chem.* **263**: 10799-10811, 1988.

Shohat, M.; Korenberg, J. R.; Schwabe, A. D.; Rotter, J. I. "Hypothesis: familial Mediterranean fever--a genetic disorder of the lipocortin family?" *Am. J. Med. Genet.* **34**: 163-167, 1989.

Wallner, B. P.; Mattaliano, R. J.; Hession, C.; Cate, R. L.; Tizard, R.; Sinclair, L. K.; Foeller, C.; Chow, E. P.; Browning, J. L.; Ramachandran, K. L.; Pepinsky, R. B.
"Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity." *Nature* **320**: 77-81, 1986.

Walther, A.; Riehemann, K.; Gerke, V. "A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR." *Molec. Cell* **5**: 831-840, 2000.

Blanchard, E. M.; Iizuka, K.; Christe, M.; Conner, D. A.; Geisterfer-Lowrance, A.; Schoen, F. J.; Maughan, D. W.; Seidman, C. E.; Seidman, J. G. "Targeted ablation of the murine alpha-tropomyosin gene." *Circulation Res.* **81**: 1005-1010, 1997.

Brown, J. H.; Kim, K.-H.; Jun, G.; Greenfield, N. J.; Dominguez, R.; Volkmann, N.; Hitchcock-DeGregori, S. E.; Cohen, C. "Deciphering the design of the tropomyosin molecule." *Proc. Nat. Acad. Sci.* **98**: 8496-8501, 2001.

【０４７２】

【表３－１０】

Eyre, H.; Akkari, P. A.; Wilton, S. D.; Callen, D. C.; Baker, E.; Laing, N. G. "Assignment of the human skeletal muscle alpha-tropomyosin gene (TPM1) to band 15q22 by fluorescence in situ hybridization." *Cytogenet. Cell Genet.* 69: 15-17, 1995.

"Karibe, A.; Tobacman, L. S.; Strand, J.; Butters, C.; Back, N.; Bachinski, L. L.; Arai, A. E.; Ortiz, A.; Roberts, R.; Homsher, E.; Fananapazir, L. "Hypertrophic cardiomyopathy caused by a novel alpha-tropomyosin mutation (V95A) is associated with mild cardiac phenotype, abnormal calcium binding to troponin, abnormal myosin cycling, and poor prognosis." *Circulation* **103:** 65-71, 2001.

Lees-Miller, J. P.; Helfman, D. M. "The molecular basis for tropomyosin isoform diversity." *BioEssays* **13:** 429-437, 1991.

MacLeod, A. R.; Gooding, C. "Human hTM-alpha gene: expression in muscle and nonmuscle tissue." *Molec. Cell. Biol.* **8:** 433-440, 1988.

Muthuchamy, M.; Pieples, K.; Rethinasamy, P.; Hoit, B.; Grupp, I. L.; Boivin, G. P.; Wolska, B.; Evans, C.; Solaro, R. J.; Wieczorek, D. F. "Mouse model of a familial hypertrophic cardiomyopathy mutation in alpha-tropomyosin manifests cardiac dysfunction." *Circ. Res.* **85:** 47-56, 1999.

Schleef, M.; Werner, K.; Satzger, U.; Kaupmann, K.; Jockusch, H. "Chromosomal localization and genomic cloning of the mouse alpha-tropomyosin gene Tpm-1." *Genomics* **17:** 519-521, 1993.

Thierfelder, L.; Watkins, H.; MacRae, C.; Lamas, R.; McKenna, W.; Vosberg, H.-P.; Seidman, J. G.; Seidman, C. E. "Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere." *Cell* **77:** 701-712, 1994.

Tiso, N.; Rampoldi, L.; Pallavicini, A.; Zimbello, R.; Pandolfo, D.; Valle, G.; Lanfranchi, G.; Danieli, G. A. "Fine mapping of five human skeletal muscle genes: alpha-tropomyosin, beta-tropomyosin, troponin-I slow-twitch, troponin-I fast-twitch, and troponin-C fast." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230:** 347-350, 1997.

Watkins, H.; Anan, R.; Coviello, D. A.; Spirito, P.; Seidman, J. G.; Seidman, C. E.: "A de novo mutation in alpha-tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy." *Circulation* **91:** 2302-2305, 1995.

Watkins, H.; McKenna, W. J.; Thierfelder, L.; Suk, H. J.; Anan, R.; O'Donoghue, A.; Spirito, P.; Matsumori, A.; Moravec, C. S.; Seidman, J. G.; Seidman, C. E. "Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy." *New Eng. J. Med.* **332:** 1058-1064, 1995.

Gillespie, G. A. J.; Somlo, S.; Germino, G. G.; Weinstat-Saslow, D.; Reeders, S. T.: CpG island in the region of an autosomal dominant polycystic kidney disease locus defines the 5-prime end of a gene encoding a putative proton channel. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88: 4289-4293, 1991.

【０４７３】

【表３－１１】

Bell, A. C; Felsenfeld, G. :
Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 405: 482-485, 2000.

Bell, A. C.; West, A. G; Felsenfeld, G. : "The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators." *Cell* 98: 387-396, 1999.

Chao, W.; Huynh, K. D.; Spencer, R. J.; Davidow, L. S.; Lee, J. T. :
"CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice." *Science* 295: 345-347, 2002.

Filippova, G. N.; Fagerlie, S.; Klenova, E. M.; Myers, C.; Dehner, Y.; Goodwin, G.; Neiman, P. E.; Collins, S. J.; Lobanenkov, V. V. : "An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes." *Molec. Cell. Biol.* 16: 2802-2813, 1996.

Filippova, G. N.; Thienes, C. P.; Penn, B. H.; Cho, D. H.; Hu, Y. J.; Moore, J. M.; Klesert, T. R.; Lobanenkov, V. V.; Tapscott, S. J. :
CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nature Genet.* 28: 335-343, 2001.

Hark, A. T.; Schoenherr, C. J; Katz, D. J.; Ingram, R. S.; Levrose, J. M.; Tilghman, S. M. :
CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405: 486-489, 2000.

Agulnik, A. I; Zharkikh, A.; Boettger-Tong, H.; Bourgeron, T.; McElreavey, K.; Bishop, C. E. :
Evolution of the DAZ gene family suggests that Y-linked DAZ plays little, or a limited, role in spermatogenesis but underlines a recent African origin for human populations. *Hum. Molec. Genet.* 7: 1371-1377, 1998.

Eberhart, C. G.; Maines, J. Z.; Wasserman, S. A. : Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia. *Nature* 381: 783-785, 1996.

Rugglu, M.; Speed, R.; Taggart, M.; McKay, S. J.; Kilanowski, F.; Saunders, P.; Derin, J.; Cooke, H. J. : The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389: 73-77, 1997.

Saxena, R; Brown, L. G.; Hawkins, T.; Alagappan, R. K.; Skaletsky, H.; Reeve, M. P.; Reijo, R.; Rozen, S.; Dinulos, M. B.; Disteche, C. M.; Page, D. C. : The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nature Genet.* 14: 292-299, 1996.

Shan, Z.; Hirschmann, P.; Seebacher, T.; Edelmann, A.; Jauch, A.; Morell, J.; Urbitsch, P.; Vogt, P. H. : A SPGY copy homologous to the mouse gene Dazla and the Drosophila gene boule is autosomal and expressed only in the human male gonad. *Hum. Molec. Genet.* 5: 2005-2011, 1996.

【０４７４】

【表３－１２】

Slee, R.; Grimes, B.; Speed, R. M.; Taggart, M.; Maguire, S. M.; Ross, A.; McGill, N. I.; Saunders, P. T. K.; Cooke, H. J. : A human DAZ transgene confers partial rescue of the mouse Daz1 null phenotype. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 8040-8045, 1999.

Yen, P. H; Chai, N. N.; Salido, E. C. : The human autosomal gene DAZLA: testis specificity and a candidate for male infertility. *Hum. Molec. Genet.* 5: 2013-2017, 1996.

Huebner, K.; Cannizzaro, L. A ; Croce, C. M.; Frey, A. Z.; Wallner, B. P.; Hecht, B. K.; Hecht, F. : Chromosome localization of the human genes for lipocortin I and the lipocortin II family. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 46: 631 only, 1987.

Huebner, K.; Cannizzaro, L. A.; Frey, A. Z.; Hecht, B. K.; Hecht, F.; Croce, C. M.; Wallner, B. P. : Chromosomal localization of the human genes for lipocortin I and lipocortin II. *Oncogene Res.* 2: 299-310, 1988.

Richard, I.; Broux, O.; Chiannilkulchai, N.; Fougerousse, F ; Allamand, V.; Bourg, N.; Brenguier, L.; Devaud, C.; Pasturaud, P.; Roudaut, C ; Lorenzo, F.; Sebastiani-Kabatchis, C.; Schultz, R. A.; Polymeropoulos, M. H.; Gyapay, G.; Auffray, C.; Beckmann, J. S. : Regional localization of human chromosome 15 loci. *Genomics* 23: 619-627, 1994.

Spano, F.; Raugei, G.; Palla, E.; Colella, C.; Melli, M. : Characterization of the human lipocortin-2-encoding multigene family: its structure suggests the existence of a short amino acid unit undergoing duplication. *Gene* 95: 243-251, 1990.

Takahashi, S.; Reddy, S. V.; Chirgwin, J. M.; Devlin, R.; Halpek, C.; Anderson, J.; Roodman, G. D. : Cloning and identification of annexin II as an autocrine/paracrine factor that increases osteoclast formation and bone resorption. *J. Biol. Chem.* 269: 28696-28701, 1994.

Chellaiah, A.; Davis, A.; Mohanakumar, T. : Cloning of a unique human homologue of the Escherichia coli DNAJ heat shock protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1174: 111-113, 1993.

Osaka, F.; Kawasaki, H.; Aida, N.; Saeki, M.; Chiba, T.; Kawashima, S ; Tanaka, K.; Kato, S. : A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes Dev.* 12: 2263-2268, 1998.

Date, H.; Onodera, O.; Tanaka, H.; Iwabuchi, K ; Uekawa, K.; Igarashi, S.; Koike, R.; Hiroi, T.; Yuasa, T.; Awaya, Y.; Sakai, T.; and 9 others : Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nature Genet.* 29: 184-188, 2001.

Moreira, M.-C.; Barbot, C ; Tachi, N.; Kozuka, N.; Uchida, E.; Gibson, T.; Mendonca, P.; Costa, M.; Barros, J.; Yanagisawa, T.; Watanabe, M.; Ikeda, Y.; Aoki, M.; Nagata, T.; Coutinho, P.; Sequeiros, J.; Koenig, M. : The gene mutated in ataxia-oculomotor apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nature Genet.* 29: 189-193, 2001.

Ohkuma, Y.; Sumimoto, H.; Hoffmann, A.; Shimasaki, S.; Horikoshi, M.; Roeder, R. G. : Structural motifs and potential sigma homologies in the large subunit of human general transcription factor TFIIE. *Nature* 354: 398-401, 1991.

【０４７５】

【表３－１３】

Peterson, M. G.; Inostroza, J.; Maxon, M. E.; Flores, O.; Admon, A.; Reinberg, D.; Tjian, R.: Structure and functional properties of human general transcription factor IIE. *Nature* 354: 369-373, 1991.

Yudkovsky, N.; Ranish, J. A.; Hahn, S.:
A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408: 225-229, 2000.

Umbricht, C. B.; Erdile, L. F.; Jabs, E. W.; Kelly, T. J.: Cloning, overexpression, and genomic mapping of the 14-kDa subunit of human replication protein A. *J. Biol. Chem.* 268: 6131-6138, 1993.

Umbricht, C. B.; Griffin, C. A.; Hawkins, A. L.; Grzeschik, K. H.; O'Connell, P.; Leach, R.; Green, E. D.; Kelly, T. J.: High-resolution genomic mapping of the three human replication protein A genes (RPA1, RPA2, and RPA3). *Genomics* 20: 249-257, 1994.

Erdile, L. F.; Heyer, W.-D.; Kolodner, R.; Kelly, T. J.: Characterization of a cDNA encoding the 70-kDa single-stranded DNA-binding subunit of human replication protein A and the role of the protein in DNA replication. *J. Biol. Chem.* 266: 12090-12098, 1991.

Gomes, X. V.; Wold, M. S.: Functional domains of the 70-kilodalton subunit of human replication protein A. *Biochemistry* 35: 10558-10568, 1996.

Miyamoto, Y.; Saito, Y.; Nakayama, M.; Shimasaki, Y.; Yoshimura, T.; Yoshimura, M.; Harada, M.; Kajiyama, N.; Kishimoto, I.; Kuwahara, K.; Hino, J.; Ogawa, E.; Hamanaka, I.; Kamitani, S.; Takahashi, N.; Kawakami, R.; Kangawa, K.; Yasue, H.; Nakao, K.:
Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum. Molec. Genet.* 9: 2629-2637, 2000.

Nakayama, M.; Yasue, H.; Yoshimura, M.; Shimasaki, Y.; Kugiyama, K.; Ogawa, H.; Motoyama, T.; Saito, Y.; Ogawa, Y.; Miyamoto, Y.; Nakao, K.:
T(-786)-C mutation in the 5-prime-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99: 2864-2870, 1999.

Shen, L. X.; Basilion, J. P.; Stanton, V. P., Jr.: Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 7871-7876, 1999

Umbricht, C. B.; Erdile, L. F.; Jabs, E. W.; Kelly, T. J.: Cloning, overexpression, and genomic mapping of the 14-kDa subunit of human replication protein A. *J. Biol Chem.* 268: 6131-6138, 1993.

Umbricht, C. B.; Griffin, C. A.; Hawkins, A. L.; Grzeschik, K. H.; O'Connell, P.; Leach, R.; Green, E. D.; Kelly, T. J.:
High-resolution genomic mapping of the three human replication protein A genes (RPA1, RPA2, and RPA3). *Genomics* 20: 249-257, 1994.

Acquati, F.; Malgaretti, N.; Hauptschein, R.; Rao, P.; Gaidano, G.; Taramelli, R.:
A 2-Mb YAC contig linking the plasminogen-apoprotein(a) gene family to the insulin-like

【０４７６】

【表３－１４】

growth factor 2 receptor (IGF2R) gene on the telomeric region of chromosome 6 (6q26-q27). *Genomics* 22: 664-666, 1994.

Barlow, D. P.; Stoger, R.; Herrmann, B. G.; Saito, K.; Schweifer, N. :
The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* 349: 84-87, 1991.

DeChiara, T. M.; Robertson, E. J.; Efstratiadis, A. :
Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64: 849-859, 1991.

De Souza, A. T.; Hankins, G. R.; Washington, M. K.; Fine, R. L.; Orton, T. C.; Jirtle, R. L. :
Frequent loss of heterozygosity on 6q at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor locus in human hepatocellular tumors. *Oncogene* 10: 1725-1729, 1995.

De Souza, A. T.; Hankins, G R.; Washington, M. K.; Orton, T. C.; Jirtle, R. L. :
M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nature Genet.* 11: 447-449, 1995.

Feinberg, A. P. :
Genomic imprinting and gene activation in cancer. *Nature Genet.* 4: 110-113, 1993.

Haig, D.; Graham, C. :
Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor. *Cell* 64: 1045-1046, 1991.

Haig, D.; Westoby, M. :
Parent-specific gene expression and the triploid endosperm. *Am. Nat.* 134: 147-155, 1989.

Kalscheuer, V. M.; Mariman, E. C.; Schepens, M. T.; Rehder, H.; Ropers, H.-H :
The insulin-like-growth factor type-2 receptor gene is imprinted in the mouse but not in humans. *Nature Genet.* 5: 74-78, 1993.

Kiess, W.; Blickenstaff, G. D.; Sklar, M. M.; Thomas, C. L.; Nissley, S. P.; Sahagian, G. G. :
Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor receptor is identical to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 9339-9344, 1988.

Killian, J. K.; Oka, Y.; Jang, H.-S.; Fu, X.; Waterland, R. A.; Sohda, T.; Sakaguchi, S.; Jirtle, R. L. :
Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) variants in American and Japanese populations. *Hum. Mutat.* 18: 25-31, 2001.

Kornfeld, S.; Mellman, I. :
The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5: 483-525, 1989.

Lau, M. M. H.; Stewart, C. E. H.; Liu, Z.; Bhatt, H.; Rotwein, P.; Stewart, C. L. :
Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev.* 8: 2953-2963, 1994.

【０４７７】

【表３－１５】

Laureys, G.; Barton, D. E.; Ullrich, A.; Francke, U. :
Chromosomal mapping of the gene for the type II insulin-like growth factor receptor/cation-independent mannose 6-phosphate receptor in man and mouse. *Genomics* 3: 224-229, 1988.

MacDonald, R. G.; Pfeffer, S. R.; Coussens, L.; Tepper, M. A.; Brocklebank, C. M.; Mole, J. E.; Anderson, J. K. :
A single receptor binds both insulin-like growth factor II and mannose-6-phosphate. *Science* 239: 1134-1137, 1988.

Morgan, D. O.; Edman, J. D.; Standring, D. N.; Fried, V. A.; Smith, M. C.; Roth, R. A.; Rutter, W. J. :
Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329: 301-307, 1987.

Motyka, B.; Korbutt, G.; Pinkoski, M. J.; Heibein, J. A.; Caputo, A.; Hobman, M.; Barry, M.; Shostak, I.; Sawchuk, T.; Holmes, C. F. B.; Gauldie, J.; Bleackley, R. C. :
Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103: 491-500, 2000.

Ogawa, O.; McNoe, L. A.; Eccles, M. R.; Morison, I. M.; Reeve, A. E. :
Human insulin-like growth factor type I and type II receptors are not imprinted. *Hum. Molec. Genet.* 2: 2163-2165, 1993.

Oshima, A.; Nolan, C. M.; Kyle, J. W.; Grubb, J. H.; Sly, W. S. :
The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor: cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in COS cells. *J. Biol. Chem.* 263: 2553-2562, 1988.

Puertollano, R.; Aguilar, R. C.; Gorshkova, I.; Crouch, R. J.; Bonifacino, J. S. :
Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* 292: 1712-1716, 2001.

Rao, P. H.; Murty, V. V. V. S.; Gaidano, G.; Hauptschein, R.; Dalla-Favera, R.; Chaganti, R. S. K. :
Subregional mapping of 8 single copy loci to chromosome 6 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 66: 272-273, 1994.

Roth, R. A. :
Structure of the receptor for insulin-like growth factor II: the puzzle amplified. *Science* 239: 1269-1271, 1988.

Sleutels, F.; Zwart, R.; Barlow, D. P. :
The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* 415: 810-813, 2002.

Souza, R. F.; Appel, R.; Yin, J.; Wang, S.; Smolinski, K. N.; Abraham, J. M.; Zou, T.-T.; Shi, Y.-Q.; Lei, J.; Cottrell, J.; Cymes, K.; Biden, K.; Simms, L.; Leggett, B.; Lynch, P. M.; Frazier, M.; Powell, S. M.; Harpaz, N.; Sugimura, H.; Young, J.; Meltzer, S. J :

【０４７８】

【表３－１６】

Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. (Letter) *Nature Genet.* 14: 255-257, 1996.

Szebeny, G.; Rotwein, P. :
The mouse insulin-like growth factor II/cation-independent mannose 6-phosphate (IGF-II/MPR) receptor gene: molecular cloning and genomic organization. *Genomics* 19: 120-129, 1994.

Tong, P. Y.; Tollefsen, S. E.; Kornfeld, S. :
The cation-independent mannose 6-phosphate receptor binds insulin-like growth factor II. *J. Biol. Chem.* 263: 2585-2588, 1988.

Waheed, A.; Braulke, T.; Junghans, U.; von Figura, K. :
Mannose 6-phosphate/insulin like growth factor II receptor: the two types of ligands bind simultaneously to one receptor at different sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152: 1248-1254, 1988.

Xu, Y.; Goodyer, C. G.; Deal, C.; Polychronakos, C. :
Functional polymorphism in the parental imprinting of the human IGF2R gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 747-754, 1993.

Young, L. E.; Fernandes, K.; McEvoy, T. G.; Butterwith, S. C.; Gutierrez, C. G.; Carolan, C.; Broadbent, P. J.; Robinson, J. J.; Wilmut, I.; Sinclair, K. D. :
Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genet.* 27: 153-154, 2001.

Zhu, Y.; Doray, B.; Poussu, A.; Lehto, V.-P.; Kornfeld, S. "Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor." *Science* 292: 1716-1718, 2001.

McGuinness, T.; Porteus, M. H.; Smiga, S.; Bulfone, A.; Kingsley, C.; Qiu, M.; Liu, J. K.; Long, J. E.; Xu, D.; Rubenstein, J. L. R. "Sequence, organization, and transcription of the Dlx-1 and the Dlx-2 locus. *Genomics* 35: 473-485, 1996.

Ozcelik, T.; Porteus, M. H.; Rubenstein, J. L. R.; Francke, U. "DLX2 (TES1), a homeobox gene of the Distal-less family, assigned to conserved regions on human and mouse chromosomes 2." *Genomics* 13: 1157-1161, 1992.

Porteus, M. H.; Brice, A. E. J.; Bulfone, A ; Usdin, T. B ; Ciaranello, R. D.; Rubenstein, J. L. R. "Isolation and characterization of a library of cDNA clones that are preferentially expressed in the embryonic telencephalon." *Molec. Brain Res.* 12: 7-22, 1992.

Qiu, M.; Bulfone, A.; Martinez, S.; Meneses, J. J.; Shimamura, K.; Pedersen, R. A.; Rubenstein, J. L. "Null mutation of Dlx-2 results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain." *Genes Dev.* 9: 2523-2538, 1995.

Bray, P.; Lichter, P.; Thiesen, H.-J.; Ward, D. C ; Dawid, I. B. "Characterization and mapping of human genes encoding zinc finger proteins." *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88: 9563-9567, 1991.

【０４７９】

【表３－１７】

Huebner, K.; Druck, T.; LaForgia, S.; Lasota, J.; Croce, C. M.; Lanfrancone, L.; Donti, E.; Pengue, G.; La Mantia, G.; Pelicci, P.-G.; Lania, L. "Chromosomal localization of four human zinc finger cDNAs." *Hum. Genet.* 91: 217-222, 1993.

Lania, L.; Donti, E.; Pannuti, A.; Pascucci, A.; Pengue, G.; Feliciello, I.; La Mantia, G.; Lanfrancone, L.; Pelicci, P.-G. "cDNA isolation, expression analysis, and chromosomal localization of two human zinc finger genes." *Genomics* 6: 333-340, 1990.

Thiesen, H.-J. "Multiple genes encoding zinc finger domains are expressed in human T cells." *New Biologist* 2: 363-374, 1990.

Boise, L. H.; Gonzalez-Garcia, M.; Postema, C. E.; Ding, L.; Lindsten, T.; Turka, L. A.; Mao, X.; Nunez, G.; Thompson, C. B. "Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." *Cell* 74: 597-608, 1993.

Moliterno, A. R.; Hankins, W. D.; Spivak, J. L. "Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera." *New Eng. J. Med.* 338: 572-580, 1998.

Shimizu, S.; Narita, M.; Tsujimoto, Y. "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC." *Nature* 399: 483-487, 1999.

Silva, M.; Richard, C.; Benito, A.; Sanz, C.; Olalla, I.; Fernandez-Luna, J. L. "Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera." *New Eng. J. Med.* 338: 564-571, 1998.

Vander Heiden, M. G.; Chandel, N. S.; Williamson, E. K.; Schumacker, P. T.; Thompson, C. B. "Bcl-X(L) regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria." *Cell* 91: 627-637, 1997.

Bauer, W. O.; Nanda, I.; Beck, G.; Schmid, M.; Jakob, F. "Human puromycin-sensitive aminopeptidase: cloning of 3-prime UTR, evidence for a polymorphism at aa 140 and refined chromosomal localization to 17q21." *Cytogenet. Cell Genet.* 92: 221-224, 2001.

Huber, G.; Thompson, A.; Gruninger, F.; Mechler, H.; Hochstrasser, R.; Hauri, H.-P.; Malherbe, P. "cDNA cloning and molecular characterization of human brain metalloprotease MP100: a beta-secretase candidate?" *J. Neurochem.* 72: 1215-1223, 1999.

Osada, T.; Sakaki, Y.; Takeuchi, T. "Puromycin-sensitive aminopeptidase gene (Psa) maps to mouse chromosome 11." *Genomics* 56: 361-362, 1999.

Schonlein, C.; Loffler, J.; Huber, G. "Purification and characterization of a novel metalloprotease from human brain with the ability to cleave substrates derived from the N-terminus of beta-amyloid protein." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 45-53, 1994.

Thompson, M. W.; Tobler, A.; Fontana, A; Hersh, L. B. "Cloning and analysis of the gene for the human puromycin-sensitive aminopeptidase." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258: 234-240, 1999.

【０４８０】

【表３－１８】

Tobler, A. R.; Constam, D. B.; Schmitt-Graff, A.; Malipiero, U.; Schlapbach, R.; Fontana, A. "Cloning of the human puromycin-sensitive aminopeptidase and evidence for expression in neurons." *J. Neurochem.* 68: 889-897, 1997.

Tait, J. F.; Frankenberry, D. A.; Miao, C. H.; Killary, A. M.; Adler, D. A.; Disteche, C. M. "Chromosomal localization of the human annexin III (ANX3) gene." *Genomics* 10: 441-448, 1991.

Tait, J. F.; Smith, C.; Xu, L.; Cookson, B. T. "Structure and polymorphisms of the human annexin III (ANX3) gene." *Genomics* 18: 79-86, 1993.

Liang, Y.; Tedder, T. F. "Identification of a CD20-, Fc-epsilon-RI-beta-related gene family: sixteen new MS4A family members expressed in human and mouse." *Genomics* 72: 119-127, 2001.

Huston, E.; Lumb, S.; Russell, A.; Catterall, C.; Ross, A. H.; Steele, M. R.; Bolger, G. B.; Perry, M. J.; Owens, R. J.; Houslay, M. D. "Molecular cloning and transient expression in COS7 cells of a novel human PDE4B cAMP-specific phosphodiesterase, HSPDE4B3." *Biochem. J.* 328: 549-558, 1997.

Livi, G. P.; Kmetz, P.; McHale, M. M.; Cieslinski, L. B.; Sathe, G. M.; Taylor, D. P.; Davis, R. L.; Torphy, T. J.; Balcarek, J. M. "Cloning and expression of cDNA for a human low-K(m), rolipram-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase." *Molec. Cell. Biol.* 10: 2678-2686, 1990.

Milatovich, A.; Bolger, G.; Michaeli, T.; Francke, U. "Chromosome localizations of genes for five cAMP-specific phosphodiesterases in man and mouse." *Somat. Cell Molec. Genet.* 20: 75-86, 1994.

Obernolte, R.; Bhakta, S.; Alvarez, R.; Bach, C.; Zuppan, P.; Mulkins, M.; Jarnagin, K.; Shelton, E. R. "The cDNA of a human lymphocyte cyclic-AMP phosphodiesterase (PDE IV) reveals a multigene family." *Gene* 129: 239-247, 1993.

Szpirer, C.; Szpirer, J.; Riviere, M.; Swinnen, J.; Vicini, E.; Conti, M. "Chromosomal localization of the human and rat genes (PDE4D and PDE4B) encoding the cAMP-specific phosphodiesterases 3 and 4." *Cytogenet. Cell Genet.* 69: 11-14, 1995.

Xu, R. X.; Hassell, A. M.; Vanderwall, D.; Lambert, M. H.; Holmes, W. D.; Luther, M. A.; Rocque, W. J.; Milburn, M. V.; Zhao, Y.; Ke, H.; Nolte, R. T. "Atomic structure of PDE4: insights into phosphodiesterase mechanism and specificity." *Science* 288: 1822-1825, 2000.

Ashraf, J.; Thompson, E. B. "Identification of the activation-labile gene: a single point mutation in the human glucocorticoid receptor presents as two distinct receptor phenotypes." *Molec. Endocr.* 7: 631-642, 1993.

Bamberger, C. M.; Bamberger, A.-M.; de Castro, M.; Chrousos, G. P. "Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans." *J. Clin. Invest.* 95: 2435-2441, 1995.

【０４８１】

【表３－１９】

Bronnegard, M.; Werner, S.; Gustafsson, J.-A. "Primary cortisol resistance associated with a thermolabile glucocorticoid receptor in a patient with fatigue as the only symptom." *J. Clin. Invest.* 78: 1270-1278, 1986.

Carlstedt-Duke, J.; Stromstedt, P.-E.; Wrange, O.; Bergman, T.; Gustafsson, J.-A.; Jornvall, H. "Domain structure of the glucocorticoid receptor protein." *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84: 4437-4440, 1987.

Chrousos, G. P.; Renquist, D.; Brandon, D.; Eil, C.; Pugeat, M.; Vigersky, R.; Cutler, G. B., Jr.; Loriaux, D. L.; Lipsett, M. B. "Glucocorticoid hormone resistance during primate evolution: receptor-mediated mechanisms." *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79: 2036-2040, 1982.

Chrousos, G. P.; Vingerhoeds, A.; Brandon, D.; Eil, C.; Pugeat, M.; DeVroede, M.; Loriaux, D. L.; Lipsett, M. B. "Primary cortisol resistance in man: a glucocorticoid receptor-mediated disease." *J. Clin. Invest.* 69: 1261-1269, 1982.

Chrousos, G. P.; Vingerhoeds, A. C. M.; Loriaux, D. L.; Lipsett, M. B. "Primary cortisol resistance: a family study." *J. Clin. Endocr. Metab.* 56: 1243-1245, 1983.

Diamond, M. I.; Robinson, M. R.; Yamamoto, K. R. "Regulation of expanded polyglutamine protein aggregation and nuclear localization by the glucocorticoid receptor." *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97: 657-661, 2000.

Dobson, M. G.; Redfern, C. P. F.; Unwin, N.; Weaver, J. U. "The N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor: potential contribution to central obesity in men and lack of association with other risk factors for coronary heart disease and diabetes mellitus." *J. Clin. Endocr. Metab.* 86: 2270-2274, 2001.

Encio, I. J.; Detera-Wadleigh, S. D. "The genomic structure of the human glucocorticoid receptor." *J. Biol. Chem.* 266: 7182-7188, 1991.

Francke, U.; Foellmer, B. E. "The glucocorticoid receptor gene is in 5q31-q32." *Genomics* 4: 610-612, 1989.

Gehring, U.; Segnitz, B.; Foellmer, B.; Francke, U. "Chromosome assignment of the human gene for the glucocorticoid receptor (GRL)." (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 37: 476, 1984.

Gehring, U.; Segnitz, B.; Foellmer, B.; Francke, U. "Assignment of the human gene for the glucocorticoid receptor to chromosome 5." *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82: 3751-3755, 1985.

Giuffra, L. A.; Kennedy, J. L.; Castiglione, C. M.; Evans, R. M.; Wasmuth, J. J.; Kidd, K. K. "Glucocorticoid receptor maps to the distal long arm of chromosome 5." *Cytogenet. Cell Genet.* 49: 313-314, 1988.

Hollenberg, S. M.; Weinberger, C.; Ong, E. S.; Cerelli, G.; Oro, A.; Lebo, R.; Thompson, E. B.; Rosenfeld, M. G.; Evans, R. M. "Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA." *Nature* 318: 635-641, 1985.

【０４８２】

【表３－２０】

Huebner, K.; Nagarajan, L.; Besa, E.; Angert, E.; Lange, B. J.; Cannizzaro, L. A.; van den Berghe, H.; Santoli, D.; Finan, J.; Croce, C. M.; Nowell, P. C. "Order of genes on human chromosome 5q with respect to 5q interstitial deletions." *Am. J. Hum. Genet.* 46: 26-36, 1990.

Huizenga, N. A. T. M.; de Lange, P.; Koper, J. W.; Clayton, R. N.; Farrell, W. E.; van der Lely, A. J.; Brinkmann, A. O.; de Jong, F. H.; Lamberts, S. W. J. "Human adrenocorticotropin-secreting pituitary adenomas show frequent loss of heterozygosity at the glucocorticoid receptor gene locus." *J. Clin. Endocr. Metab.* 83: 917-921, 1998.

Huizenga, N. A. T. M.; De Lange, P.; Koper, J. W.; De Herder, W. W.; Abs, R.; Kasteren, J. H. L. M. V.; De Jong, F. H.; Lamberts, S. W. J. "Five patients with biochemical and/or clinical generalized glucocorticoid resistance without alterations in the glucocorticoid receptor gene." *J. Clin. Endocr. Metab.* 85: 2076-2081, 2000.

Huizenga, N. A. T. M.; Koper, J. W.; de Lange, P.; Pols, H. A. P.; Stolk, R. P.; Burger, H.; Grobbee, D. E.; Brinkmann, A. O.; de Jong, F. H.; Lamberts, S. W. J. "A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with an increased sensitivity to glucocorticoids in vivo." *J. Clin. Endocr. Metab.* 83: 144-151, 1998.

Hurley, D. M.; Accili, D.; Stratakis, C. A.; Karl, M.; Vamvakopoulos, N.; Rorer, E.; Constantine, K.; Taylor, S. I.; Chrousos, G. P. "Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance." *J. Clin. Invest.* 87: 680-686, 1991.

Iida, S.; Gomi, M.; Moriwaki, K.; Itoh, Y.; Hirobe, K.; Matsuzawa, Y.; Katagiri, S.; Yonezawa, T.; Tarui, S. "Primary cortisol resistance accompanied by a reduction in glucocorticoid receptors in two members of the same family." *J. Clin. Endocr. Metab.* 60: 967-971, 1985.

Karl, M.; Lamberts, S. W. J.; Detera-Wadleigh, S. D.; Encio, I. J.; Stratakis, C. A.; Hurley, D. M.; Accili, D.; Chrousos, G. P. "Familial glucocorticoid resistance caused by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene." *J. Clin. Endocr. Metab.* 76: 683-689, 1993.

Kayes-Wandover, K.; White, P. C. "Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart." *J. Clin. Endocr. Metab.* 85: 2519-2525, 2000.

Kontula, K.; Pelkonen, R.; Andersson, L.; Sivula, A. "Glucocorticoid receptors in adrenocorticoid disorders." *J. Clin. Endocr. Metab.* **51**: 654-657, 1980.

Koper, J. W.; Stolk, R. P.; de Lange, P.; Huizenga, N. A.; Molijn, G. J.; Pols, H. A.; Grobbee, D. E.; Karl, M.; de Jong, F. H.; Brinkmann, A. O.; Lamberts, S. W. "Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance." *Hum. Genet.* 99: 663-668, 1997.

Lamberts, S. W. J.; Poldermans, D.; Zweens, M.; de Jong, F. H. "Familial cortisol resistance: differential diagnostic and therapeutic aspects." *J. Clin. Endocr. Metab.* 63:

【０４８３】

【表３－２１】

1328-1333, 1986.

Lind, U.; Carlstedt-Duke, J.; Gustafsson, J.-A.; Wright, A. P. H. "Identification of single amino acid substitutions of cys-736 that affect the steroid-binding affinity and specificity of the glucocorticoid receptor using phenotypic screening in yeast." *Molec. Endocr.* 10: 1358-1370, 1996.

Lipsett, M. B.; Chrousos, G. P.; Tomita, M.; Brandon, D. D ; Loriaux, D. L. "The defective glucocorticoid receptor in man and nonhuman primates." *Recent Prog. Horm. Res* 41: 199-247, 1985.

Lipsett, M. B.; Tomita, M.; Brandon, D. D ; De Vroede, M. M.; Loriaux, D. L.; Chrousos, G. P. "Cortisol resistance in man.In: Chrousos, G. P.; Loriaux, D. L.; Lipsett, M. B. : Steroid Hormone Resistance: Mechanisms and Clinical Aspects." *New York: Plenum Press* (pub) 1986. Pp. 97-109.

McNally, J. G.; Muller, W. G.; Walker, D.; Wolford, R.; Hager, G. L. "The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells." *Science* 287: 1262-1265, 2000.

Montkowski, A.; Barden, N.; Wotjak, C.; Stec, I.; Ganster, J.; Meaney, M.; Engelmann, M.; Reul, J. M. H. M.; Landgraf, R.; Holsboer, F. "Long-term antidepressant treatment reduces behavioural deficits in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function." *J. Neuroendocrinology* 7: 841-845, 1995.

Muller, M.; Renkawitz, R. "Review: the glucocorticoid receptor." *Biochim. Biophys. Acta* 1088: 171-182, 1991.

Nawata, H.; Sekiya, K.; Higuchi, K.; Kato, K.-I.; Ibayashi, H. "Decreased deoxyribonucleic acid binding of glucocorticoid-receptor complex in cultured skin fibroblasts from a patient with the glucocorticoid resistance syndrome." *J. Clin. Endocr. Metab.* 65: 219-226, 1987.

Oakley, R. H.; Sar, M.; Cidlowski, J. A. "The human glucocorticoid receptor isoform: expression, biochemical properties, and putative function." *J. Biol. Chem.* 271: 9550-9559, 1996.

Pepin, M.-C.; Pothier, F.; Barden, N. "Impaired type II glucocorticoid-receptor function in mice bearing antisense RNA transgene." *Nature* 355: 725-728, 1992.

Ray, D. W.; Davis, J. R. E.; White, A.; Clark, A. J. L. "Glucocorticoid receptor structure and function in glucocorticoid-resistant small cell lung carcinoma cells." *Cancer Res.* 56: 3276-3280, 1996.

Reichardt, H. M.; Kaestner, K. H.; Tuckermann, J.; Kretz, O.; Wessely, O.; Bock, R.; Gass, P.; Schmid, W.; Herrlich, P.; Angel, P.; Schutz, G. "DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival." *Cell* **93**: 531-541, 1998.

Rivers, C.; Levy, A.; Hancock, J.; Lightman, S.; Norman, M. "Insertion of an amino acid

【０４８４】

【表３－２２】

in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing." *J. Clin. Endocr. Metab.* 84: 4283-4286, 1999.

Roux, S.; Terouanne, B.; Balaguer, P.; Jausons-Loffreda, N.; Pons, M.; Chambon, P.; Gronemeyer, H.; Nicolas, J.-C. "Mutation of isoleucine 747 by a threonine alters the ligand responsiveness of the human glucocorticoid receptor." *Molec. Endocr.* 10: 1214-1226, 1996.

Strickland, I.; Kisich, K.; Hauk, P. J.; Vottero, A.; Chrousos, G. P.; Klemm, D. J.; Leung, D. Y. M. "High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids." *J. Exp. Med.* 193: 585-593, 2001.

Theriault, A.; Boyd, E.; Harrap, S. B.; Hollenberg, S. M.; Connor, J. M. "Regional chromosomal assignment of the human glucocorticoid receptor gene to 5q31." *Hum. Genet.* 83: 289-291, 1989.

Theriault, A.; Harrap, S. B.; Hollenberg, S. M.; Boyd, E.; Connor, J. M. "Regional chromosomal assignment of the glucocorticoid receptor gene to 5q31." (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 51: 1089, 1989.

Tronche, F.; Kellendonk, C.; Kretz, O.; Gass, P.; Anlag, K.; Orban, P. C.; Bock, R.; Klein, R.; Schutz, G. "Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety." *Nature Genet.* 23: 99-103, 1999.

Vingerhoeds, A. C. M.; Thijssen, J. H. H.; Schwarz, F. "Spontaneous hypercortisolism without Cushing's syndrome." *J. Clin. Endocr. Metab.* 43: 1128-1133, 1976.

Webster, J. C.; Oakley, R. H.; Jewell, C. M.; Cidlowski, J. A. "Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta-isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance." *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98: 6865-6870, 2001.

Weinberger, C.; Evans, R.; Rosenfeld, M. G.; Hollenberg, S. M.; Skarecky, D.; Wasmuth, J. J. "Assignment of the human gene encoding the glucocorticoid receptor to the q11-q13 region on chromosome 5." (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 40: 776, 1985.

Weinberger, C.; Giguere, V.; Hollenberg, S. M.; Thompson, C.; Arriza, J.; Evans, R. M. "Human steroid receptors and erb-A gene products form a superfamily of enhancer-binding proteins." *Clin. Physiol. Biochem.* 5: 179-189, 1987.

Weinberger, C.; Hollenberg, S. M.; Ong, E. S.; Harmon, J. M.; Brower, S. T.; Cidlowski, J.; Thompson, E. B.; Rosenfeld, M. G.; Evans, R. M. "Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection." *Science* 228: 740-742, 1985.

Weinberger, C.; Hollenberg, S. M.; Rosenfeld, M. G.; Evans, R. M. "Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-erb-A oncogene product." *Nature* 318: 670-672, 1985.

【０４８５】

【表３－２３】

Breschel, T. S.; McInnis, M. G.; Margolis, R. L.; Sirugo, G.; Corneliussen, B.; Simpson, S. G.; McMahon, F. J.; MacKinnon, D. F.; Xu, J. F.; Pleasant, N.; Huo, Y.; Ashworth, R. G.; Grundstrom, C.; Grundstrom, T.; Kidd, K. K.; DePaulo, J. R.; Ross, C. A. "A novel, heritable, expanding CTG repeat in an intron of the SEF2-1 gene on chromosome 18q21.1." *Hum. Molec. Genet.* 6: 1855-1863, 1997.

Corneliussen, B.; Thornell, A.; Hallberg, B.; Grundstrom, T. "Helix-loop-helix transcriptional activators bind to a sequence in glucocorticoid response elements of retrovirus enhancers." *J. Virol.* 65: 6084-6093, 1991.

Henthorn, P.; Kiledjian, M.; Kadesch, T. "Two distinct transcription factors that bind the immunoglobulin enhancer mu-E5/kappa-E2 motif." *Science* **247**: 467-470, 1990.

Henthorn, P.; McCarrick-Walmsley, R.; Kadesch, T. "Sequence of the cDNA encoding ITF-2, a positive-acting transcription factor." *Nucleic Acids Res.* **18**: 678, 1990.

Pscherer, A.; Dorflinger, U.; Kirfel, J.; Gawlas, K.; Ruschoff, J.; Buettner, R.; Schule, R. "The helix-loop-helix transcription factor SEF-2 regulates the activity of a novel initiator element in the promoter of the human somatostatin receptor II gene." *EMBO J.* **15**: 6680-6690, 1996.

Garland, D.; Rao, P. V.; Del Corso, A.; Mura, U.; Zigler, J. S., Jr. "Zeta-crystallin is a major protein in the lens of Camelus dromedarius." *Arch. Biochem. Biophys.* **285**: 134-136, 1991.

Gonzalez, P.; Rao, P. V.; Zigler, J. S., Jr. "Organization of the human zeta-crystallin/quinone reductase gene (CRYZ)." *Genomics* **21**: 317-324, 1994.

Heinzmann, C.; Kojis, T. L.; Gonzalez, P.; Rao, P. V.; Zigler, J. S., Jr.; Polymeropoulos, M. H.; Klisak, I.; Sparkes, R. S.; Mohandas, T.; Bateman, J. B. "Assignment of the zeta-crystallin gene (CRYZ) to human chromosome 1p22-p31 and identification of restriction fragment length polymorphisms." *Genomics* **23**: 403-407, 1994.

Huang, Q.-L.; Russell, P.; Stone, S. H.; Zigler, J. S., Jr. "Zeta-crystallin, a novel lens protein from the guinea pig." *Curr. Eye Res.* **6**: 725-732, 1987.

Rodriguez, I. R.; Gonzalez, P.; Zigler, J. S., Jr.; Borras, T. "A guinea-pig hereditary cataract contains a splice site deletion in a crystallin gene." *Biochim. Biophys. Acta* **1180**: 44-52, 1992.

Sawamura, T.; Kume, N.; Aoyama, T.; Moriwaki, H.; Hoshikawa, H.; Aiba, Y.; Tanaka, T.; Miwa, S.; Katsura, Y.; Kita, T.; Masaki, T. "An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein." *Nature* **386**:73-77, 1997.

Yamanaka, S.; Zhang, X.-Y.; Miura, K.; Kim, S.; Iwao, H. "The human gene encoding the lectin-type oxidized LDL receptor (OLR1) is a novel member of the natural killer gene complex with a unique expression profile." *Genomics* **54**: 191-199, 1998.

【配列表】

2006507807000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
A61K 48/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	48/00		４Ｃ０８５
A61P 31/12	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	31/12		４Ｃ０８６
A61P 31/18	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	31/18		４Ｃ０８７
A61P 43/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	４Ｈ０４５
C07K 14/47	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｋ	14/47		
C12N 1/15	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	1/15		
C12N 1/19	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	1/19		
C12N 1/21	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	1/21		
C12Q 1/02	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｑ	1/02		
C12Q 1/68	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｑ	1/68	Ａ	
C12Q 1/70	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｑ	1/70		
G01N 33/15	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ	33/15	Ｚ	
G01N 33/50	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ	33/50	Ｚ	
C12N 5/10	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	5/00	Ａ	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ルビン, ドナルド エイチ.
アメリカ合衆国 テネシー ３７２１５, ナッシュビル, エデンブリッジ ウェイ １９３７

Ｆターム(参考) 2G045 AA35 CB01 DA13
4B024 AA01 BA80 CA04 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 FA02 GA11 GA27
4B063 QA18 QQ08 QQ10 QQ42 QR32 QR33 QR40 QR60 QR77 QR79 QS38
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 BA02 BA21 CA24 CA44
4C084 AA13 AA17 NA14 ZB33 ZC55
4C085 AA13 BB31 CC21 DD88 EE01
4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB33 ZC55
4C087 AA01 BB63 BB65 CA12 NA14 ZB33 ZC55
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 EA20 EA29 FA74