

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4742483号
(P4742483)

(45) 発行日 平成23年8月10日 (2011.8.10)

(24) 登録日 平成23年5月20日 (2011.5.20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 0 7 K 14/72 (2006.01)
 C 1 2 N 7/00 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 1 2 N 5/00 1 O 2
 C 0 7 K 14/72
 C 1 2 N 7/00
 C 1 2 Q 1/68 Z

請求項の数 17 (全 162 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-543602 (P2001-543602)
 (86) (22) 出願日 平成12年12月1日 (2000.12.1)
 (65) 公表番号 特表2003-516137 (P2003-516137A)
 (43) 公表日 平成15年5月13日 (2003.5.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2000/008553
 (87) 国際公開番号 W02001/042307
 (87) 国際公開日 平成13年6月14日 (2001.6.14)
 審査請求日 平成19年11月16日 (2007.11.16)
 (31) 優先権主張番号 特願平11-348022
 (32) 優先日 平成11年12月7日 (1999.12.7)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)
 (31) 優先権主張番号 特願平11-370667
 (32) 優先日 平成11年12月27日 (1999.12.27)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000002093
 住友化学株式会社
 東京都中央区新川二丁目27番1号
 (74) 代理人 100113000
 弁理士 中山 亨
 (72) 発明者 斎藤 幸一
 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号
 住友化学工業株式会社内
 (72) 発明者 大江 師久
 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号
 住友化学工業株式会社内
 (72) 発明者 佐藤 日出夫
 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号
 住友化学工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異ER α および転写活性化の試験系

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) エストロゲン応答配列 (以下、EREという)、TATA配列および前記EREにとって本来外来であるレポーター配列を含むレポーター遺伝子を含む染色体、ならびに

(ii) 以下の (ii-a) および (ii-b) から選択される1または複数の因子、

(ii-a) 前記レポーター遺伝子を転写活性化する活性を持つ変異エストロゲンレセプタータンパク質 (以下、ER という) (ここに、部分抗エストロゲンおよびエストラジオール (以下、E2という) の存在下における前記活性は部分抗エストロゲンおよびE2の存在下における正常ER の活性よりも高いか、または部分抗エストロゲンの存在下における前記活性は部分抗エストロゲンの存在下における正常ER の活性よりも高いものとする)、および

(ii-b) 前記変異ER をコードする遺伝子、

を含む人工細胞であり、前記変異ER は以下の (a) ~ (e) のいずれかであることを特徴とする人工細胞。

(a) 配列番号2で示されるアミノ酸配列からなる変異ER。

(b) 配列番号3で示されるアミノ酸配列からなる変異ER。

(c) 配列番号4で示されるアミノ酸配列からなる変異ER。

(d) 配列番号9で示されるアミノ酸配列からなる変異ER。

(e) 配列番号10で示されるアミノ酸配列からなる変異ER。

ここで、部分抗エストロゲンとは、正常ER のエストロゲン受容体活性化機能1 (Estrog

en Receptor Activation Function 1、略称：AF 1）領域には拮抗性を示さないが、正常ER のエストロゲン受容体活性化機能 2（Estrogen Receptor Activation Function 2、略称：AF 2）領域に拮抗性を示すものを意味する。

【請求項 2】

前記部分抗エストロゲンが、タモキシフェン、ラロキシフェン、および 4 - ヒドロキシタモキシフェンからなる群より選択される一つである請求項 1 記載の人工細胞。

【請求項 3】

（ii-b）の遺伝子が（i）の染色体に含まれる請求項 1 乃至 2 記載のいずれかの人工細胞。

【請求項 4】

（ii-b）の遺伝子がベクターに含まれる請求項 1 乃至 2 記載のいずれかの人工細胞。

【請求項 5】

配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなる変異エストロゲンレセプター タンパク質（以下、ER という）。

【請求項 6】

配列番号 3 で示されるアミノ酸配列からなる変異エストロゲンレセプター タンパク質（以下、ER という）。

【請求項 7】

配列番号 4 で示されるアミノ酸配列からなる変異エストロゲンレセプター タンパク質（以下、ER という）。

【請求項 8】

配列番号 9 で示されるアミノ酸配列からなる変異エストロゲンレセプター タンパク質（以下、ER という）。

【請求項 9】

配列番号 10 で示されるアミノ酸配列からなる変異エストロゲンレセプター タンパク質（以下、ER という）。

【請求項 10】

請求項 5 記載の変異ER のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 11】

請求項 6 記載の変異ER のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項 7 記載の変異ER のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項 8 記載の変異ER のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 14】

請求項 9 記載の変異ER のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 15】

請求項 10 乃至 14 記載のいずれかのポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 16】

請求項 15 記載のベクターを含むウイルス。

【請求項 17】

変異エストロゲンレセプター タンパク質（以下、ER という）に由来する乳癌の処置に有用な化合物をスクリーニングする方法であって、

請求項 1 乃至 4 記載のいずれかの人工細胞を試験化合物にばく露すること、

前記人工細胞のレポーター遺伝子の転写活性化量を測定すること、

10

20

30

40

50

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はER などのリガンド依存性転写因子およびリガンド依存性転写因子をコードする遺伝子に関する。また本発明は、リガンド依存性転写因子と前記リガンド依存性転写因子用の所定のレポーター遺伝子とを含有する細胞に関する。

【0002】

【従来の技術】

様々な細胞機構はリガンド依存性転写因子によって調節される。リガンド依存性転写因子による調節は通常、当該リガンド依存性転写因子が遺伝子を転写活性化する活性を持っているために達成される。転写活性化では、リガンド依存性転写因子とRNAポリメラーゼII複合体とがある遺伝子上で同時に相互作用して遺伝子発現の速度を上昇させると考えられている。転写活性化は多くの場合、真核細胞中で、ある遺伝子が十分に発現されて様々な細胞機構を調節するかどうかを決定することができる。

【0003】

リガンド依存性転写因子によるこのような転写活性化は、リガンド依存性転写活性化因子がその同系のリガンドおよび同系の応答配列に選択的に結合したときに起こりうる。リガンド依存性転写因子がある遺伝子を転写活性化できるかどうかは、当該遺伝子に同系の応答配列が存在するかどうか、または細胞中にその同系のリガンドが存在するかどうかによって決定されうる。

【0004】

ER は上記のようなリガンド依存性転写因子の一例である。ER は、エストロゲンの標的細胞、例えば卵巣細胞、乳腺細胞、子宮細胞、骨細胞などに天然に見出される。ER の転写活性化活性は、通例、ER がEREとエストロゲン（E2など）に選択的に結合したときに起こる。ER による異常トランス活性化は様々な疾患の一因になりうると報告されている。正常ER に対して拮抗性である抗エストロゲンを使用する試みがなされている。上記の疾患に使用されるそのような抗エストロゲンの例には、タモキシフェン、ラロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェンなどがある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明は概して、人工細胞、単離された変異ER 、変異ER をコードする単離されたポリヌクレオチド、試験ER によるレポーター遺伝子転写活性化活性を定量的に解析する方法、変異リガンド依存性転写因子をスクリーニングする方法、試験ER によるレポーター遺伝子転写活性化活性を評価する方法、変異ER の疾患の処置に有用な化合物をスクリーニングする方法、変異ER のエストロゲン疾患の処置に有用な医薬、変異ER の使用、試験ER をコードするポリヌクレオチドの遺伝子型を診断する方法、試験ER をコードするポリヌクレオチドの遺伝子型を診断する方法、および試験ER の表現型を診断する方法を提供する。

【0006】

【発明の実施の形態】

5.1. 定義

AR：アンドロゲン受容体タンパク質を意味する。

E2：エストラジオールを意味する。

ER ：エストロゲン受容体 タンパク質を意味する。本明細書では「変異ER 」という語句に続けて文字-数字-文字の組み合わせを記すことによって、特定のER 変異体を表す（例えばK303R、S309F、G390D、M396V、G415V、G494V、K531EおよびS578Pなど）。文字-数字-文字の組み合わせにおいて、数字は変異ER 中の置換アミノ酸の相対位置を示し、数字の前にある文字は表示した相対位置における正常ER 中のアミノ酸を示し、数字の後に続く文字は表示した相対位置における与えられた変異ER 中の置換アミノ酸を示す。変異

10

20

30

40

50

ER 中に2つの置換アミノ酸がある場合は、「変異ER」という語句に続けて2組の文字-数字-文字の組み合わせを記す(例えばG390D/S578Pなど)。

ER : エストロゲン受容体タンパク質を意味する。

GR : グルココルチコイド受容体タンパク質を意味する。

MR : 鉱質コルチコイド受容体タンパク質を意味する。

PPAR : ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体タンパク質を意味する。

PR : プロゲステロン受容体タンパク質を意味する。

PXR : プレグナンX受容体タンパク質を意味する。

TR : 甲状腺ホルモン受容体タンパク質を意味する。

VDR : ビタミンD受容体タンパク質を意味する。

10

DR1 : 次のヌクレオチド配列を持つ受容体応答配列を意味する :

5'-AGGTCA_nAGGTCA-3'

(上記配列中、nはA、C、TまたはGを表す)。

DR3 : 次のヌクレオチド配列を持つ受容体応答配列を意味する :

5'-AGGTCA_{nnn}AGGTCA-3'

(上記配列中、nはA、C、TまたはGを表す)。

DR4 : 次のヌクレオチド配列を持つ受容体応答配列を意味する :

5'-AGGTCA_{nnnn}AGGTCA-3'

(上記配列中、nはA、C、TまたはGを表す)。

ERE : エストロゲン応答配列を意味する。

20

MMTV : マウス乳癌ウイルスを意味する。

【0007】

5.2. 細胞

本発明の細胞は、レポーター遺伝子を含む染色体を含む。染色体中のレポーター遺伝子はERE、TATA配列およびレポーター配列を含む。また本細胞は、変異ER または変異ER をコードする遺伝子も含む。この点で、本細胞は、前記変異ER が前記レポーター遺伝子を転写活性化する活性を持ちうる生物学的システムになる。E2および部分抗エストロゲンが存在する状態での変異ER によるレポーター遺伝子転写活性化活性は、E2および前記部分抗エストロゲンが存在する状態での正常ER による活性よりも一般に高い。あるいは、変異ER を刺激する可能性がある単独の薬剤として部分抗エストロゲンが存在する状態での変異ER によるレポーター遺伝子転写活性化活性は、正常ER を刺激する可能性がある単独の薬剤として部分抗エストロゲンが存在する状態での正常ER による活性よりも一般に高い。

30

【0008】

通例、ERE、TATA配列およびレポーター配列は、レポーター遺伝子中で、当該レポーター遺伝子の転写活性化が可能になるような構成をとる。例えばレポーター遺伝子は、TATA配列の上流に作動的に配置されたEREと、TATA配列の下流に作動的に配置されたレポーター配列とを持つことができる。所望により、レポーター遺伝子は、当該レポーター遺伝子の発現に有利な通常のヌクレオチド配列をさらに含有してもよい。

【0009】

40

TATA配列は次のヌクレオチド配列を持ちうる :

5'-TATAA-3'。

【0010】

天然の細胞では、EREは正常ER の受容体応答配列である。正常ER がE2に結合し、正常ER-E2複合体がEREに結合すると、正常ER は転写活性化活性を発揮する。本細胞では、変異ER に結合して変異ER にレポーター遺伝子転写活性化活性を持たせることが、EREの機能である。通例、このようなEREは次のヌクレオチド配列に包含される :

5'-AGGTCA_{nnn}TGACCTT-3'

(上記配列中、nはA、G、CまたはTを表す)。また、レポーター遺伝子におけるEREの縦列反復により、より効率のよいレポーター遺伝子転写活性化活性を得ることができる。レポ

50

ーター遺伝子にはEREの2～5回の縦列反復を使用することができる。レポーター遺伝子中に使用することができるEREの一例として、アフリカツメガエル・ピテログニン遺伝子由来のERE (Cell, 57, 1139-1146) がある。レポーター遺伝子用EREは、化学合成によって、またはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅法を用いるクローニングによって調製することができる。

【0011】

レポーター遺伝子中のレポーター配列は、EREにとって本来外来であるレポーター配列である。したがってレポーター配列とEREとが天然遺伝子と一緒に見出されることはない。また、かかるレポーター配列がレポータータンパク質をコードする場合、当該レポーター配列は通例、細胞中で多かれ少なかれ活性なレポータータンパク質をコードする。レポータータンパク質の例としては、ルシフェラーゼ、分泌アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、成長ホルモンなどがある。

10

【0012】

ERE、TATA配列およびレポーター配列の結合には、従来を使用することができる。レポーター遺伝子を作製した後、そのレポーター遺伝子を染色体に挿入することができる。レポーター遺伝子を宿主細胞に導入すると、レポーター遺伝子の染色体への挿入が起こりうる。このような宿主細胞へのレポーター遺伝子導入法については後述する。

【0013】

細胞中の変異ER は通例、E2および部分抗エストロゲンの存在下または変異ER を刺激する可能性がある単独の薬剤としての部分抗エストロゲンの存在下にレポーター遺伝子を転写活性化する特別な活性を持っている。E2および部分抗エストロゲンの存在下に変異ER がもたらす転写活性化活性は、通例、E2および前記部分抗エストロゲンの存在下に正常ER がもたらす活性よりも高い。変異ER を刺激する可能性がある単独の薬剤として部分抗エストロゲンが存在する状態での変異ER によるレポーター遺伝子転写活性化活性は、正常ER を刺激する可能性がある単独の薬剤として当該部分抗エストロゲンが存在する状態での正常ER による活性よりも高い。トランス活性は転写速度の増加を伴うので、正常ER および変異ER によるこのような転写活性化は、レポーター遺伝子の発現レベルを測定することによって観察することができる。変異ER および正常ER がもたらすレポーター遺伝子の発現レベルを同一の点でゼロになるように調節した場合、変異ER は正常ER よりも高い発現レベルをもたらすだろう。

20

30

【0014】

また変異ER は、完全抗エストロゲンの存在下では、そのレポーター遺伝子転写活性化活性が阻害されうることに注目すべきである。変異ER がもたらすこのようなレポーター遺伝子転写活性化活性は、完全抗エストロゲンの存在下に正常ER がもたらすレポーター遺伝子転写活性化活性の阻害に似ている。

【0015】

正常ER は、ある種 (ヒト、サル、マウス、ウサギ、ラットなど) が最も普通に持っているとするER を包含する。例えば、ヒト正常ER は配列番号1に示すアミノ酸配列を持つ。このようなヒト正常ER はTora L.ら, EMBO, 第8巻, 第7号, 1981-1986 (1989) に記載されている。

40

【0016】

部分抗エストロゲンは通例、正常ER のAF1領域には拮抗性でなく正常ER のAF2領域に対して拮抗性である。正常ER のAF2領域と、正常ER のAF1領域は、それぞれ正常ER による転写活性化に関与する正常ER 中の領域である (Metzger D.ら, J. Biol. Chem., 270 : 9535-9542 (1995))。

【0017】

部分抗エストロゲンのこのような性質は、例えばBerry M.ら, EMBO J., 9 : 2811-2818 (1990) に記載のレポーターアッセイを行うことによって観察することができる。このようなレポーターアッセイでは、例えば初代培養ニワトリ胚線維芽細胞 (この細胞は例えばSo

50

lomon, J.J., Tissue Cult. Assoc. Manual., 1: 7-11 (1975) の説明に従って調製することができる) など、内因性正常ER のAF1領域が強い転写活性化活性を持つ細胞を使用する。ニワトリ胚線維芽細胞を使用する場合は、同線維芽細胞に改変を施して、当該改変線維芽細胞が正常ER をコードする遺伝子とその細胞内で発現させ、かつ当該改変線維芽細胞がレポーター遺伝子を持つようにする(以下、AF1評価用線維芽細胞という)。AF1評価用線維芽細胞を十分量の部分抗エストロゲンにばく露すると、当該部分抗エストロゲンが正常ER のAF1領域に対して拮抗性を示しえないかどうかを決定することができる。このような場合、部分抗エストロゲンはAF1評価用線維芽細胞におけるレポーター遺伝子の発現レベルを増大させる。さらに初代培養ニワトリ胚線維芽細胞に2回目の改変を施して、当該第2改変線維芽細胞がAF1領域を欠失させた切断型正常ER をコードする遺伝子を発現させ、かつ当該第2改変線維芽細胞がレポーター遺伝子を持つようにする(以下、AF2評価用線維芽細胞という)。AF2評価用線維芽細胞を十分量の部分抗エストロゲンにばく露すると、当該部分抗エストロゲンが正常ER のAF2領域に対して拮抗性を示すかどうかを決定することができる。このような場合、部分抗エストロゲンはAF2評価用線維芽細胞におけるレポーター遺伝子の発現レベルを増大させることができない。

10

【0018】

このような部分抗エストロゲンの例にはタモキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、ラキシフェンなどがある。

【0019】

完全抗エストロゲンは通例、正常ER に対して完全な拮抗性を示す抗エストロゲンである。この点で、完全抗エストロゲンはER に対して部分的作動性を示すことはできない。AF1評価用線維芽細胞またはAF2評価用線維芽細胞を使ったレポーターアッセイでは、完全抗エストロゲンは、前記細胞中の正常ER または切断型正常ER によるレポーター遺伝子転写活性化活性を実質上示さない。したがって、完全抗エストロゲンとAF1評価用線維芽細胞またはAF2評価用線維芽細胞のいずれかを用いるこのようなレポーターアッセイでは、レポーター遺伝子の発現レベルは実質上増加しない。

20

【0020】

このような完全抗エストロゲンの例にはICI182780 (Wakeling AEら, Cancer Res., 512: 3867-3873 (1991))、ZM189154 (Dukes Mら, J. Endocrinol., 141: 335-341 (1994)) などがある。

30

【0021】

変異ER は、E2および部分抗エストロゲンの存在下または変異ER を刺激する可能性がある単独の薬剤としての部分抗エストロゲンの存在下で上述のようなレポーター遺伝子転写活性化活性を付与する1または複数の置換アミノ酸を含む。通例、前記1または複数の置換アミノ酸は、変異ER 中の303から578までの1または複数の相対位置に存在する。例えば変異ER は303、309、390、396、415、494、531、578などから選択される1または複数の相対位置に置換アミノ酸を含みうる。通例、変異ER 中のこのような相対位置は、配列番号1に示すアミノ酸配列とのホモロジー整列に基づく。

【0022】

一般にホモロジー整列には、与えられたアミノ酸配列のホモロジーに基づくアミノ酸配列の整列が包含される。例えば下記表1に、配列番号1に示すアミノ酸配列(ヒト正常ER)、マウスER (Genbankアクセッション番号M38651)、ラットER (X6) (Genbankアクセッション番号X61098) およびラットER (Y0) (Genbankアクセッション番号Y00102) のホモロジー整列を記載する。

40

【0023】**【表1】**

hERa.txt	1:MTMTLHTKASGMAALLHQIQGNELEPLNRPQLKPMENALGEVYDMSKPAWNYPEGAAY	60
mER.txt	1:MTMTLHTKASGMAALLHQIQGNELEPLNRPQLKPMENALGEVYDMSKPAWNYPEGAAY	60
ratER(X6).txt	1:MTMTLHTKASGMAALLHQIQGNELEPLNRPQLKPMENALGEVYDMSKPAWNYPEGAAY	60
ratER(Y0).txt	1:MTMTLHTKASGMAALLHQIQGNELEPLNRPQLKPMENALGEVYDMSKPAWNYPEGAAY	60
hERa.txt	61:EFNAAAAANNAQVYQGTGLTYGPGSEAAAFSAHSLGAFPLNSVSPSPLMLLHPPF	115
mER.txt	61:EFNAAAAANNAASAPVYQSGIAYGPGSEAAAFSAHSLGAFPLNSVSPSPLMLLHPPF	119
ratER(X6).txt	61:EFNAAAAANNAASAPVYQSSITTYGPGSEAAAFSAHSLGAFPLNSVSPSPLMLLHPPF	120
ratER(Y0).txt	61:EFNAAAAANNAASAPVYQSSITTYGPGSEAAAFSAHSLGAFPLNSVSPSPLMLLHPPF	120
hERa.txt	116:QLSPFLPHKQVPPYLENEPSATAVHDTGPPAFYRNSDNRRCGRERLSSSEKGM	175
mER.txt	120:QLSPFLPHKQVPPYLENEPSATAVHDTGPPAFYRNSDNRRCGRERLSSSEKGM	176
ratER(X6).txt	121:HVSPFLPHKQVPPYLENEPSATAVHDTGPPAFYRNSDNRRCGRERLSSSEKGM	180
ratER(Y0).txt	121:HVSPFLPHKQVPPYLENEPSATAVHDTGPPAFYRNSDNRRCGRERLSSSEKGM	180
hERa.txt	176:MESAKETRYCAVCNDYASGYHYGVNSCEGCKAFFKRSIQGHNDYMCPTAQCTIDKNRRN	235
mER.txt	180:MESAKETRYCAVCNDYASGYHYGVNSCEGCKAFFKRSIQGHNDYMCPTAQCTIDKNRRN	238
ratER(X6).txt	181:MESAKETRYCAVCNDYASGYHYGVNSCEGCKAFFKRSIQGHNDYMCPTAQCTIDKNRRN	240
ratER(Y0).txt	181:MESAKETRYCAVCNDYASGYHYGVNSCEGCKAFFKRSIQGHNDYMCPTAQCTIDKNRRN	240
hERa.txt	236:SCQACRLRKCYEVGMKGGIRKDRRGGRMLKHKRQDDLEGRVEMTSQDMRAANLWPSF	295
mER.txt	240:SCQACRLRKCYEVGMKGGIRKDRRGGRMLKHKRQDDLEGRVEMTSQDMRAANLWPSF	299
ratER(X6).txt	241:SCQACRLRKCYEVGMKGGIRKDRRGGRMLKHKRQDDLEGRVEMTSQDMRAANLWPSF	300
ratER(Y0).txt	241:SCQACRLRKCYEVGMKGGIRKDRRGGRMLKHKRQDDLEGRVEMTSQDMRAANLWPSF	300
hERa.txt	296:LVTHQKNSALSLTADQVYSALLDAEPPIIYSEYDPRPFSEASMGILLTNADREL	355
mER.txt	300:LVTHQKNSALSLTADQVYSALLDAEPPIIYSEYDPRPFSEASMGILLTNADREL	359
ratER(X6).txt	301:LVTHQKNSALSLTADQVYSALLDAEPPIIYSEYDPRPFSEASMGILLTNADREL	360
ratER(Y0).txt	301:LVTHQKNSALSLTADQVYSALLDAEPPIIYSEYDPRPFSEASMGILLTNADREL	360
hERa.txt	356:IMINNAKRVPGFDLMLHDQVHLECAWLEILMIGLVRSMEHPCKLLFAPMLLDRNQ	415
mER.txt	360:IMINNAKRVPGFDLMLHDQVHLECAWLEILMIGLVRSMEHPCKLLFAPMLLDRNQ	419
ratER(X6).txt	361:IMINNAKRVPGFDLMLHDQVHLECAWLEILMIGLVRSMEHPCKLLFAPMLLDRNQ	420
ratER(Y0).txt	361:IMINNAKRVPGFDLMLHDQVHLECAWLEILMIGLVRSMEHPCKLLFAPMLLDRNQ	420
hERa.txt	416:KCYEGMVEIFDMLLATSSRFMMNLQGEFVCLKSILLNSGVYTFLLSTLKSLEEKDH	475
mER.txt	420:KCYEGMVEIFDMLLATSSRFMMNLQGEFVCLKSILLNSGVYTFLLSTLKSLEEKDH	479
ratER(X6).txt	421:KCYEGMVEIFDMLLATSSRFMMNLQGEFVCLKSILLNSGVYTFLLSTLKSLEEKDH	480
ratER(Y0).txt	421:KCYEGMVEIFDMLLATSSRFMMNLQGEFVCLKSILLNSGVYTFLLSTLKSLEEKDH	480
hERa.txt	476:FRVLDRITDTLHLMNAKAGLYLQQQFRLAQILLSHIRMSNKGMEHLYNKKCKNVVP	535
mER.txt	480:FRVLDRITDTLHLMNAKAGLYLQQQFRLAQILLSHIRMSNKGMEHLYNKKCKNVVP	539
ratER(X6).txt	481:FRVLDRITDTLHLMNAKAGLYLQQQFRLAQILLSHIRMSNKGMEHLYNKKCKNVVP	540
ratER(Y0).txt	481:FRVLDRITDTLHLMNAKAGLYLQQQFRLAQILLSHIRMSNKGMEHLYNKKCKNVVP	540
hERa.txt	536:LYDLLLENLDAHRLHAPASMAVVPPEEPSSQLITITSTSAHSLQTYIIPPEAEGFNTI	595
mER.txt	540:LYDLLLENLDAHRLHAPASMAVVPPEEPSSQLITITSTSAHSLQTYIIPPEAEGFNTI	599
ratER(X6).txt	541:LYDLLLENLDAHRLHAPASMAVVPPEEPSSQLITITSTSAHSLQTYIIPPEAEGFNTI	600
ratER(Y0).txt	541:LYDLLLENLDAHRLHAPASMAVVPPEEPSSQLITITSTSAHSLQTYIIPPEAEGFNTI	600

【0024】

表1において「hERa.TXT」は配列番号1に示すアミノ酸配列、「mER.TXT」はマウスER のアミノ酸配列、「ratER(X6).TXT」はラットER (X6)のアミノ酸配列、「ratER(Y0)」はラットER (Y0)のアミノ酸配列を示し、アミノ酸配列はアミノ酸の1文字表記を使って記載されている。この整列は市販のソフトウェアGENETYX-WIN SV/Rバージョン4.0 (Software Development Co.) を使って作製した。「*」という記号は相対位置303および578に位置するアミノ酸を示している。

【0025】

ホモロジー整列下での相対位置は配列番号1に示すアミノ酸の絶対位置に対応する。例えば相対位置303はホモロジー整列下に配列番号1に示すアミノ酸配列中のN末端から303番目のアミノ酸と整列する変異ER 中のアミノ酸を包含する。また、相対位置578はホモロジー整列下に配列番号1に示すアミノ酸配列中のN末端から578番目のアミノ酸と整列する変異ER 中のアミノ酸を包含する。表1に関して、相対位置303の例には、配列番号1に示すアミノ酸配列においてアミノ末端から303番目のアミノ酸であるリジン、マウスER のアミノ酸配列においてアミノ末端から307番目のアミノ酸であるリジン、ラットER (X6)のアミノ酸配列においてアミノ末端から308番目のアミノ酸であるリジン、およびラットER (Y0)のアミノ酸配列においてアミノ末端から308番目のアミノ酸であるリジンがある。また、表1に関して相対位置578の例には、配列番号1に示すアミノ酸においてアミノ末端から578番目のアミノ酸であるセリン、マウスER のアミノ酸配列においてアミノ末端から582番目のアミノ酸であるセリン、ラットER (X6)のアミノ酸配列においてアミノ末端

10

20

30

40

50

から583番目のアミノ酸であるセリン、およびラットER (Y0)のアミノ酸配列においてアミノ末端から583番目のアミノ酸であるセリンがある。

【0026】

本発明に関連して行われるホモロジー整列では、配列番号1に示すアミノ酸配列を、変異ER と配列番号1に示すアミノ酸配列とのホモロジーに基づいて、変異ER をコードするアミノ酸配列と整列する。ホモロジー整列で配列番号1のアミノ酸配列に対してアミノ酸配列を整列させると、変異ER は通例、配列番号1に示すアミノ酸配列と少なくとも80%のホモロジーを持つ。

【0027】

変異ER は哺乳動物などの動物から得ることができる。前記哺乳動物の例としてはヒト、サル、ウサギ、ラット、マウスなどが挙げられる。ヒト変異ER の場合、変異ER は一般に595アミノ酸のアミノ酸長を持つ。

10

【0028】

相対位置303に置換アミノ酸を持つ場合、変異ER は、正常ER の相対位置303に存在するリジンを置換アミノ酸に変化させることによって得ることができる。このような場合、変異ER は相対位置303に置換アミノ酸アルギニンを持つことができる(変異ER K303Rなど)。ヒト変異ER K303Rは配列番号2に示すアミノ酸配列を持つ。

【0029】

相対位置309に置換アミノ酸を持つ場合、変異ER は、正常ER の相対位置309に存在するセリンを置換アミノ酸に変化させることによって得ることができる。このような場合、変異ER は相対位置309に置換アミノ酸フェニルアラニンを持つことができる(変異ER S309Fなど)。ヒト変異ER S309Fは配列番号3に示すアミノ酸配列を持つ。

20

【0030】

相対位置390に置換アミノ酸を持つ場合、変異ER は、正常ER の相対位置390に存在するグリシンを置換アミノ酸に変化させることによって得ることができる。このような場合、変異ER は相対位置390に置換アミノ酸アスパラギン酸を持つことができる(変異ER G390Dなど)。ヒト変異ER G390Dは配列番号4に示すアミノ酸配列を持つ。

【0031】

相対位置396に置換アミノ酸を持つ場合、変異ER は、正常ER の相対位置396に存在するメチオニンを置換アミノ酸に変化させることによって得ることができる。このような場合、変異ER は相対位置396に置換アミノ酸バリンを持つことができる(変異ER M396Vなど)。ヒト変異ER M396Vは配列番号5に示すアミノ酸配列を持つ。

30

【0032】

相対位置415に置換アミノ酸を持つ場合、変異ER は、正常ER の相対位置415に存在するグリシンを置換アミノ酸に変化させることによって得ることができる。このような場合、変異ER は相対位置415に置換アミノ酸バリンを持つことができる(変異ER G415Vなど)。ヒト変異ER G415Vは配列番号6に示すアミノ酸配列を持つ。

【0033】

相対位置494に置換アミノ酸を持つ場合、変異ER は、正常ER の相対位置494に存在するグリシンを置換アミノ酸に変化させることによって得ることができる。このような場合、変異ER は相対位置494に置換アミノ酸バリンを持つことができる(変異ER G494Vなど)。ヒト変異ER G494Vは配列番号7に示すアミノ酸配列を持つ。

40

【0034】

相対位置531に置換アミノ酸を持つ場合、変異ER は、正常ER の相対位置531に存在するリジンを置換アミノ酸に変化させることによって得ることができる。このような場合、変異ER は相対位置531に置換アミノ酸グルタミン酸を持つことができる(変異ER K531Eなど)。ヒト変異ER K531Eは配列番号8に示すアミノ酸配列を持つ。

【0035】

相対位置578に置換アミノ酸を持つ場合、変異ER は、正常ER の相対位置578に存在するセリンを置換アミノ酸に変化させることによって得ることができる。このような場合、変

50

異ER は相対位置578に置換アミノ酸プロリンを持つことができる（変異ER S578Pなど）。ヒト変異ER S578Pは配列番号9に示すアミノ酸配列を持つ。

【0036】

相対位置390および578に置換アミノ酸を持つ場合、変異ER は、正常ER の相対位置390に存在するグリシンを置換アミノ酸に変化させると共に、相対位置578に存在するセリンをもう1つの置換アミノ酸に変化させることによって得ることができる。このような場合、変異ER は相対位置390に置換アミノ酸アスパラギン酸を、また相対位置578に置換アミノ酸プロリンを持つことができる（変異ER G390D/S578Pなど）。ヒト変異ER G390D/S578Pは配列番号10に示すアミノ酸配列を持つ。

【0037】

変異ER を得るには、周知の標準遺伝コードに従って変異ER をコードする遺伝子を、細胞によって発現させることができる。このような変異ER 遺伝子は、通例、変異ER をコードするポリヌクレオチドおよびプロモーターを含む。変異ER 遺伝子は組織試料から単離することができる。また、正常ER をコードするポリヌクレオチドを変異導入法により変異ER をコードするように変異させ、その結果得られる変異ER をコードするポリヌクレオチドの上流にプロモーターを作動的に連結することによって、変異ER を作製してもよい。正常ER ポリヌクレオチドに1または複数の変異を導入して、変異ER ポリヌクレオチドを得るには、部位特異的変異導入法などの変異導入法を利用することができる。ヒト正常ER ポリヌクレオチドを変異させる場合は、Tora L.ら, EMBO J., 第8巻, 第7号: 1981-1986 (1989) に記載のヌクレオチド配列を持つヒト正常ER ポリヌクレオチドを利用する。

【0038】

変異ER 遺伝子中のプロモーターは、変異ER を発現させて細胞中に変異ER をもたらしことができるように転写を開始する。この点で、通常は、当該細胞内で機能することができるプロモーターが、変異ER をコードするポリヌクレオチドの上流に作動的に連結される。例えば、細胞が動物宿主細胞または分裂酵母縮重細胞に由来する場合、プロモーターの例としては、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、シミアンウイルス (SV40) の初期および後期プロモーター、MMTVプロモーターなどを挙げるができる。細胞が出芽酵母宿主細胞由来である場合、プロモーターの例としてADH1プロモーターなどを挙げるができる。

【0039】

変異導入法を使用する場合は、正常ER をコードするポリヌクレオチドを単離し、次に単離されたER ポリヌクレオチドにオリゴヌクレオチドを使って変異を起こさせることができる。次に、得られた変異ER ポリヌクレオチドを利用して、変異ER 遺伝子を作製することができる。

【0040】

オリゴヌクレオチドは、cDNAライブラリーまたは動物のcDNAから正常ER をコードするcDNAが特異的に増幅されるように設計し合成する。そのようなオリゴヌクレオチドは、正常ER をコードする周知のヌクレオチド配列（例えばTora L.ら, EMBO J., 第8巻, 第7号: 1981-1986 (1989) またはGenbankなどのデータベースに見出される正常ER ヌクレオチド配列）に基づいて設計することができる。そのような正常ER ヌクレオチド配列としては、ヒト、サル、ウサギ、ラット、マウスなどに由来する正常ER ヌクレオチド配列を利用することができる。設計したオリゴヌクレオチドは、次にDNAシンセサイザー（モデル394, Applied Biosystems）で合成することができる。次にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅を利用して、正常ER ポリヌクレオチドをcDNAライブラリーまたはcDNAから単離することができる。ヒト正常ER 遺伝子の場合は、配列番号11および配列番号12に記載のオリゴヌクレオチドを利用して、Tora L.ら, EMBO J., 第8巻, 第7号: 1981-1986 (1989) に記載のヌクレオチドを配列を持つヒト正常ER ポリヌクレオチドをPCR増幅することができる。

【0041】

cDNAはJ. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis「Molecular Cloning (第2版)」(コールドスプリングハーバー研究所, 1989)に記載の遺伝子工学的手法に従って動物組織(例えばヒト、サル、ウサギ、ラットまたはマウス組織)から得ることができる。このような手法では、肝臓または子宮などの動物組織中のRNAを当該組織から一括して抽出し、そのRNAを一括して当該動物のcDNAに逆転写する。例えば、まず、グアニジン塩酸塩またはグアニジンチオシアネートなどのタンパク質変性剤を含む緩衝液中で動物組織をホモジナイズする。動物組織をホモジナイズすることによって得たタンパク質を変性させるために、フェノールとクロロホルムを含む混合液(以下フェノール-クロロホルムという)などの試薬をさらに加える。変性したタンパク質を遠心分離によって除去した後、回収した上清画分からRNAを一括して抽出する。RNAは、グアニジン塩酸塩/フェノール法、SDS-フェノール法、グアニジンチオシアネート/CsCl法などの方法によって、一括して抽出することができる。ISOGEN(ニッポンジーン)は、上記のRNA一括抽出法に基づく市販キットの一例である。RNAを一括して抽出した後、オリゴdTプライマーをRNA中のポリA配列にアニールさせて、テンプレートたるRNAを一括して逆転写する。逆転写酵素を利用することで、RNAを一本鎖cDNAに一括して逆転写することができる。大腸菌DNAポリメラーゼIを前記一本鎖cDNAと共に使用することにより、一本鎖cDNAからcDNAを合成することができる。大腸菌DNAポリメラーゼIを使用する際は、大腸菌DNAポリメラーゼIをより効率よく作動させるプライマーが生成するように、大腸菌RNaseHも使用する。cDNAは通常の精製法を使って、例えばフェノール-クロロホルム抽出とエタノール沈殿などによって精製することができる。このような方法に基づく市販キットの例には、cDNA Synthesis System Plus (Amersham Pharmacia Biotech)、TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech) などがある。

【0042】

次に、正常ER ポリヌクレオチドをcDNAから単離する。正常ER ポリヌクレオチドの単離に利用することができる単離法としては、PCR増幅の使用を挙げることができる。PCR増幅では通例、cDNAから正常ER ポリヌクレオチドを増幅する。このPCR増幅におけるPCR混合物は、十分量のcDNA、十分量のフォワードオリゴヌクレオチドとリバースオリゴヌクレオチド、耐熱性DNAポリメラーゼ(LT-Taqポリメラーゼ(宝酒造)など)、dNTP(dATP、dTTP、dGTP、dCTP)およびPCR増幅緩衝液を含みうる。ヒト正常ER ポリヌクレオチドを増幅するPCR混合物には、10ngのcDNAおよび各10pmolのフォワードオリゴヌクレオチドおよびリバースオリゴヌクレオチド(配列番号11および配列番号12)を使用することができる。次に、PCR増幅では、PCR混合物を、アニーリング、伸長および変性のためのインキュベーションサイクルにかける。例えばPCR増幅では、PCRsystem 9700(Applied Biosystems)などのサーマルサイクラーを使って、95℃で1分間のインキュベーションの後、68℃で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを35回繰り返すことができる。cDNAを用いたPCR増幅後に、得られたPCR混合物の全量を低融点アガロースゲル電気泳動(ニッポンジーン、アガロースL)にかける。正常ER ポリヌクレオチドを含むバンドが存在することを確認した後、正常ER ポリヌクレオチドを低融点アガロースゲルから回収する。

【0043】

cDNAライブラリーとしては、QUICK clone cDNAs (CLONETECH製)などの市販の動物由来cDNAライブラリーを利用することができる。cDNAライブラリーは上述のように単離することができる。

【0044】

回収された正常ER ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は、ダイレクトシーケンシング用の正常ER ポリヌクレオチド試料を調製することによって確認することができる。また、DNA蛍光シーケンシング法を使って、正常ER ポリヌクレオチドを配列決定してもよい。この点に関して、正常ER ポリヌクレオチド試料の調製には、Dye Terminator Sequencing Kit FS (Applied Biosystems)などの市販の蛍光シーケンシング用試薬を利用することができる。正常ER ポリヌクレオチドの蛍光シーケンシングは、ABI自動シー

クエンサー（モデル377、Applied Biosystems）などの自動シーケンサーを使って行うことができる。また、正常ER ポリヌクレオチドは手作業で配列決定してもよい（Biotec hniques , 7 , 494 (1989) ）。

【 0 0 4 5 】

便宜上、単離された正常ER ポリヌクレオチドを大腸菌などの宿主中で複製する能力を持つベクターに挿入することができる。例えば、与えられた単離正常ER ポリヌクレオチドが突出末端を持つ場合は、単離された正常ER ポリヌクレオチド約1 μ gの末端をDNA Blun ting Kit（宝酒造）で処理することによって平滑化する。次にT4ポリヌクレオチドキナーゼを使って、平滑末端化正常ER ポリヌクレオチドの末端をリン酸化することができる。フェノール処理の後、正常ER ポリヌクレオチドをエタノール沈殿によって精製し、大腸菌中で複製する能力を持つベクターに挿入することができる。正常ER ポリヌクレオチドを含むこの大腸菌ベクターは、大腸菌宿主細胞にクローニングすることができる。

10

【 0 0 4 6 】

次に、正常ER ポリヌクレオチドを含む大腸菌ベクターをクローン化大腸菌細胞から単離することができる。次に、正常ER ポリヌクレオチドを含む単離された大腸菌ベクターをテンプレートとして使用して、最終的に得られる変異ER ポリヌクレオチドが所望の相対位置に置換アミノ酸をコードする変異コドンを含むように、正常ER ポリヌクレオチドに変異を起こさせる（すなわちヌクレオチド置換を導入する）。

【 0 0 4 7 】

所望のヌクレオチド置換は、J . Sambrook , E.F. Frisch , T . Maniatis 「Molecular Cloni ng（第2版）」（コールドスプリングハーバー研究所，1989）に記載の部位特異的変異導入法またはMcClary JAら , Biotechniques 1989(3) : 282-289に記載の部位特異的変異導入法に従って、正常ER ポリヌクレオチドに導入することができる。例えば所望のヌクレオチド置換は、Stratagene製のQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kitなどの市販キットを使用することによって、正常ER ポリヌクレオチドに導入することができる。通例、このような部位特異的変異導入法では、所望のヌクレオチド置換を導入するオリゴヌクレオチドを使用する。正常ER ポリヌクレオチドに使用した部位特異的変異導入法を、Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kitに関して、以下に詳述する。

20

【 0 0 4 8 】

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kitでは、2つのオリゴヌクレオチドを利用して、正常ER ポリヌクレオチドに所望のヌクレオチド置換をもたらす。このような2つのオリゴヌクレオチドの組み合わせとして、配列番号13に記載のオリゴヌクレオチドと配列番号14に記載のオリゴヌクレオチドとを含む組み合わせ、配列番号15に記載のオリゴヌクレオチドと配列番号16に記載のオリゴヌクレオチドとを含む組み合わせ、配列番号17に記載のオリゴヌクレオチドと配列番号18に記載のオリゴヌクレオチドとを含む組み合わせ、配列番号19に記載のオリゴヌクレオチドと配列番号20に記載のオリゴヌクレオチドとを含む組み合わせ、配列番号21に記載のオリゴヌクレオチドと配列番号22に記載のオリゴヌクレオチドとを含む組み合わせ、配列番号23に記載のオリゴヌクレオチドと配列番号24に記載のオリゴヌクレオチドとを含む組み合わせ、配列番号25に記載のオリゴヌクレオチドと配列番号26に記載のオリゴヌクレオチドとを含む組み合わせ、または配列番号27に記載のオリゴヌクレオチドと配列番号28に記載のオリゴヌクレオチドとを含む組み合わせを、正常ER ポリヌクレオチドに使用することができる。下記表2に、ヌクレオチド置換の位置にコードされるアミノ酸の相対位置と、上述したオリゴヌクレオチドの組み合わせを使用することによって得られる変異コドンを示す。

30

40

【 0 0 4 9 】

【表 2】

オリゴヌクレオチドの配列番号	相対位置	正常ER α をコードする配列中のヌクレオチド配列	変異ER α をコードする配列中の変異コドン
13&14	303	AAG (リジン)	AGG (アルギニン)
15&16	309	TCC (セリン)	TTC (フェニルアラニン)
17&18	390	GGT (グリシン)	GAT (アスパラギン酸)
19&20	396	ATG (メチオニン)	GTG (バリン)
21&22	415	GGA (グリシン)	GTA (バリン)
23&24	494	GGC (グリシン)	GTC (バリン)
25&26	531	AAG (リジン)	GAG (グルタミン酸)
27&28	578	TCC (セリン)	CCC (プロリン)

10

20

得られた変異ER ポリヌクレオチドを配列決定することで、所望のヌクレオチド置換が正常ER ポリヌクレオチド中に導入されていることを確認することができる。

【 0 0 5 0 】

本発明細胞を作出するには、通常、変異ER 遺伝子とレポーター遺伝子とを宿主細胞に導入する。レポーター遺伝子は、当該レポーター遺伝子が宿主細胞の染色体に挿入されるような形で、宿主細胞に導入される。変異ER 遺伝子は一過性発現が起こるように宿主細胞に導入されるか、または宿主細胞の染色体に挿入される。変異ER 遺伝子を宿主細胞の染色体に挿入する場合、変異ER 遺伝子とレポーター遺伝子とを1つの染色体に導入してもよいし、変異ER 遺伝子をレポーター遺伝子に利用する染色体とは異なる染色体に挿入してもよい。

30

【 0 0 5 1 】

宿主細胞は通例、正常または変異ER を発現させない。宿主細胞の例としては、CG1945 (CLONETECH) などの出芽酵母細胞、HeLa細胞、CV-1細胞、Hepa1細胞、NIH3T3細胞、HepG2細胞、COS1細胞、BF-2細胞、CHH-1細胞および昆虫細胞などの動物細胞を挙げることができる。

【 0 0 5 2 】

変異ER 遺伝子およびレポーター遺伝子は、変異ER 遺伝子およびレポーター遺伝子を宿主細胞に導入できるように、ベクターに挿入することができる。そのようなベクターは通例、当該ベクターが細胞中で複製できるように複製起点を持つ。所望により、ベクターは選択マーカー遺伝子を持ってもよい。

40

【 0 0 5 3 】

出芽酵母細胞を宿主細胞として使用する場合、ベクターの例としては、プラスミドpGBT9、pGAD424、pACT2 (CLONETECH) などを挙げることができる。哺乳類細胞を宿主細胞として使用する場合、ベクターの例としては、pRc/RSV、pRc/CMV (Invitrogen) などのプラスミド、ウイルス由来の自律複製起点を含むベクター、例えばウシ乳頭腫ウイルスプラスミドpBPV (Amersham Pharmacia Biotech)、EVウイルスプラスミドpCEP4 (Invitrogen) などを挙げることができる。

【 0 0 5 4 】

50

変異ER をコードするベクター（以下、変異ER ベクターという）を作製する場合、変異ER ポリヌクレオチドをベクターに挿入することで、変異ER ベクターと一緒に変異ER 遺伝子も作製することができるように、当該ベクターはさらにプロモーターを含むことが好ましい。同様に、レポーター遺伝子をコードするベクター（以下、レポーターベクターという）を作製する場合、レポーターベクターと一緒にレポーター遺伝子も作製することができるように、当該ベクターはTATA配列またはEREを含むことが好ましい。

【0055】

変異ER ベクターを動物宿主細胞用の変異ER 遺伝子と一緒に作製する際には、pRc/RSV またはpRc/CMVを利用することができる。プラスミドpRc/RSVおよびpRc/CMVは、動物宿主細胞由来の細胞内で機能することができるプロモーターと、前記プロモーターの下流に作動的に配置されたクローニング部位とを含んでいる。この点で、変異ER ベクターは、変異ER ポリヌクレオチドをpRc/RSVまたはpRc/CMVのクローニング部位に挿入することにより、変異ER 遺伝子と一緒に作製することができる。pRc/RSVおよびpRc/CMVはSV40の自律複製起点（ori）も含んでいるので、pRc/RSVおよびpRc/CMVは、所望によりori(-)SV40ゲノムで形質転換した動物宿主細胞に変異ER 遺伝子を導入するために使用することができる。ori(-)SV40ゲノムで形質転換したそのような動物宿主細胞としてはCOS細胞が挙げられる。ori(-)SV40ゲノムで形質転換したそのような動物宿主細胞に導入すると、pRc/RSVまたはpRc/CMVから作製した変異ER ベクターは、細胞中でかなり大きいコピー数まで増加することができるので、変異ER 遺伝子を大量に発現させることができる。

【0056】

変異ER ベクターを出芽酵母宿主細胞に導入する場合は、pACT2を使って変異ER ベクターを作製することが好ましい。pACT2はADH1プロモーターを持っているので、変異ER ポリヌクレオチドをADH1プロモーターの下流に挿入することにより、変異ER ベクターと一緒に変異ER 遺伝子を作製することができる。このような場合、変異ER ベクターは変異ER遺伝子を大量に発現させることができる。

【0057】

変異ER 遺伝子の導入には、宿主細胞のタイプに応じて、従来技術を使用することができる。哺乳類細胞または昆虫細胞を宿主細胞として使用する場合は、例えばリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション、リポフェクションなどを使用することができる。酵母細胞を宿主細胞として使用する場合は、リチウム法（例えばYeast Transformation Kit（CLONETECH）を用いる方法）などを使用することができる。

【0058】

また、変異ER 遺伝子をウイルスDNAとして宿主細胞に導入する場合、変異ER 遺伝子は上記の技術によって宿主細胞に導入することができるばかりでなく、宿主細胞をウイルス型のレポーター遺伝子および変異ER 遺伝子を含む組換えウイルス粒子に感染させることによって、変異ER 遺伝子を宿主細胞に導入することもできる。例えば、動物宿主細胞にはワクシニアウイルスなどのウイルスを利用することができ、昆虫動物細胞を宿主細胞として使用する場合は、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスを利用することができる。

【0059】

変異ER ベクターまたはレポーターベクターが上述のように選択マーカー遺伝子を含む場合は、その選択マーカー遺伝子を使って本発明の細胞をクローニングすることができる。このような場合は、選択マーカー遺伝子を利用することにより、細胞に対して致死活性を示す選択薬に対する薬剤耐性を付与することができる。この場合は、当該選択薬を添加した培地で細胞を培養することによって、本発明の細胞をクローニングすることができる。選択マーカー遺伝子と選択薬の代表的な組み合わせには、ネオマイシン耐性付与選択マーカー遺伝子とネオマイシンの組み合わせ、ハイグロマイシン耐性付与選択マーカー遺伝子とハイグロマイシンの組み合わせ、およびブラストサイジンS耐性付与選択マーカー遺伝子とブラストサイジンSとの組み合わせなどがある。選択マーカー遺伝子が細胞の栄養要求性を補足する栄養素をコードする場合は、栄養素を実質上含まない最少培地を使って細胞を培養することができる。また、エストロゲン結合活性を測定するアッセイも、

細胞のクローニングに使用することができる。

【0060】

レポーター遺伝子を宿主細胞に導入する場合、レポーター遺伝子は通常、線状遺伝子として導入される。線状レポーター遺伝子により、宿主細胞染色体へのレポーター遺伝子の挿入が可能になる。レポーターベクターを利用する場合、レポーターベクターは制限酵素消化によって線状化することができる。線状レポーター遺伝子は、リポフェクション法を利用して、宿主細胞に導入することができる。

【0061】

また、変異ER 遺伝子を導入する前にレポーター遺伝子を宿主細胞に導入して、安定形質転換力セット細胞を得ることができることに注意すべきである。安定形質転換力セット細胞はその染色体にレポーター遺伝子を安定に含むので、レポーター遺伝子は遺伝的に子孫世代に受け継がれることができる。安定形質転換力セット細胞を作製するために、レポーター遺伝子を宿主細胞の染色体に導入し、その宿主細胞を数週間培養することができる。選択マーカー遺伝子を利用する場合は、数週間の培養後に、選択マーカー遺伝子を使って、安定形質転換力セット細胞をクローニングすることができる。例えば、選択薬を補足した培地で形質転換宿主細胞を数週間継続的に培養して、安定形質転換力セット細胞をクローニングすることができる。次に変異ER 遺伝子を安定形質転換力セット細胞に導入して、本発明の細胞を作製することができる。

【0062】

また、変異ER 遺伝子は、宿主細胞がレポーター遺伝子と変異ER 遺伝子とで安定に形質転換されるような形で、レポーター遺伝子を持つ宿主細胞に導入することもできる。

【0063】

本発明の細胞は、変異ER の疾患の処置に有用な化合物をスクリーニングするために利用することができる。そのような変異ER の疾患として、変異ER による異常な転写活性化を伴う疾患（乳癌など）を挙げることができる。そのような化合物をスクリーニングするには、変異ER に対して拮抗性または作動性であると思われる有効量の試験化合物に細胞をばく露して、レポーター遺伝子の転写活性化レベルを測定する。

【0064】

細胞は通例、1～数日間にわたって十分量の試験化合物にばく露する。細胞は変異ER に対する作動条件または拮抗条件下で試験化合物にばく露することができる。作動条件では通例、変異ER を刺激する可能性がある単独の薬剤としての試験化合物にアッセイ細胞をばく露する。拮抗条件では通例、試験化合物およびE2にアッセイ細胞をばく露する。

【0065】

ばく露後に、レポーター遺伝子の発現レベルを測定することによって、レポーター遺伝子の転写活性化レベルを測定する。このような場合、レポータータンパク質またはレポーターRNA（レポーター配列によってコードされるもの）は細胞内に貯蔵されるか、細胞から分泌されるので、発現レベルはそれらを使って測定することができる。レポーター遺伝子の発現レベルはノーザンブロット解析もしくはウェスタンブロット解析によって、またはレポータータンパク質の活性レベルを測定することによって測定することができる。レポータータンパク質の活性レベルは通例、レポーター遺伝子の発現レベルを示す。

【0066】

例えば、レポーター遺伝子がレポータータンパク質としてルシフェラーゼをコードする場合、レポーター遺伝子の発現レベルは、ルシフェリンとルシフェラーゼとを反応させることによって得られるルミネセンスによって測定することができる。このような場合は、粗細胞抽出物を細胞から調製し、その粗細胞抽出物にルシフェリンを加える。ルシフェリンは細胞抽出物中のルシフェラーゼと室温で反応させることができる。ルシフェリンの添加によって得られるルミネセンスは、通常、レポーター遺伝子の発現レベルの指標として測定される。というのも、粗細胞抽出物は、細胞内で発現され粗細胞抽出物中に存在するルシフェラーゼのレベルに比例する強度のルミネセンスをもたらすからである。得られた粗細胞抽出物中のルミネセンスを測定するには、ルミノメーターを利用することができる。

10

20

30

40

50

【0067】

次に、測定された転写活性化レベルをコントロールと比較して、試験化合物の作動または拮抗作用を評価することができる。試験化合物のスクリーニングにおけるそのようなコントロールは、細胞を試験化合物にばく露しなかった場合のレポーター遺伝子の予想転写活性化レベルとすることができる。作動条件下で変異ER によるレポーター遺伝子の転写活性化レベルがコントロールより高い場合、当該試験化合物は変異ER に対するアゴニストとして評価される。

【0068】

また、細胞を拮抗条件下でE2および試験化合物にばく露する場合は、試験化合物を変異ER に対するアンタゴニストとして評価することができる。このような場合、コントロールは、等量のE2の存在下で予想される変異ER によるレポーター遺伝子の転写活性化レベルとすることができる。変異ER によるレポーター遺伝子の転写活性化レベルがコントロールより低い場合、当該試験化合物は変異ER に対して拮抗性であると評価される。

【0069】

次に、変異ER に対して作動性または拮抗性である上述のような試験化合物を、変異ER の疾患の処置に有用な化合物として選択することができる。このような場合、細胞を作動条件下でばく露する時は、コントロールより有意に高いレポーター遺伝子の転写活性化レベルを与える試験化合物を通常は選択する。細胞を拮抗条件下でばく露する時は、コントロールよりも有意に低いレポーター遺伝子の転写活性化レベルを与える試験化合物を通常は選択する。

【0070】

また、正常リガンド依存性転写因子の疾患を処置するための化合物をスクリーニングすることもできる。そのような場合は、変異ER 遺伝子の代わりに正常リガンド依存性転写因子をコードする遺伝子を宿主細胞に導入する。そのような正常リガンド依存性転写因子の例には、正常ER (Genbankアクセッション番号AB006590)、正常AR (Genbankアクセッション番号M23263)、正常GR (Genbankアクセッション番号M10901)、正常TR (M24748)、正常PR (Genbankアクセッション番号15716)、正常PXR (Genbankアクセッション番号AF061056)、正常VDR (Genbankアクセッション番号J03258)などの正常親油性ビタミン受容体、正常RAR (Genbankアクセッション番号06538)、正常MR (Genbankアクセッション番号M16801)、正常PPAR (Genbankアクセッション番号U79012)などがある。このような場合、レポーター遺伝子はEREの代わりに当該正常リガンド依存性転写因子に対応する適切な受容体応答配列を含む。

【0071】

5.3. 診断方法

本発明の診断方法では、試験ER の表現型または試験ER をコードするポリヌクレオチドの遺伝子型の診断が行われる。遺伝子型診断法では、上記5.2項で述べたように、試験ER をコードするポリヌクレオチドがその中にレポーター遺伝子転写活性化活性を付与する1または複数の置換アミノ酸を与える変異コドンを含むかどうかを決定することができる。表現型診断法では、上記5.2項で述べたように、試験ER がその中にレポーター遺伝子転写活性化活性を付与する1または複数の置換アミノ酸を含むかどうかを決定することができる。

【0072】

遺伝子型診断法では通例、試験ER ポリヌクレオチドを調製し、変異コドンを検索し、もし存在すればその変異コドン中の変異を決定する。そのような遺伝子型診断法の例には、PCR増幅およびヌクレオチド配列決定法、一本鎖高次構造多型 (SSCP) 法、制限酵素切断断片長多型 (RFLP) 法、ハイブリダイゼーション法などがある。

【0073】

遺伝子型診断法用の試験ER ポリヌクレオチドは、試験ゲノムDNAまたは試験cDNAを調製することによって調製できる。このような場合、試験ER ポリヌクレオチドを含有する試験ゲノムDNAまたは試験cDNAは、試験動物 (例えば被験者) から得た試験試料から一括し

10

20

30

40

50

て調製される。そのような試験試料は非外科的方法、外科的方法（例えば細針または生検）などによって得ることができる。そのような試験試料の例には、試験哺乳動物の細胞組織、例えば毛髪、末梢血、口内上皮組織、肝臓、前立腺、卵巣、子宮、乳腺などがあり、そこから試験DNAまたは試験cDNAを抽出することができる。

【0074】

例えば試験ゲノムDNAはTAKARA PCR Technical news No. 2（宝酒造、1991年9月）に記載の方法に従って調製することができる。このような場合、試験哺乳動物から得た毛髪2～3本の試験試料を滅菌水とエタノールで洗浄し、長さ2～3mmに切断する。次に毛髪中の試験細胞を十分量（例えば200 μ l）のBCL緩衝液（10mM トリス-HCl（pH7.5）、5mM $MgCl_2$ 、0.32Mショ糖、1%トリトンX-100）で溶解する。溶解した試験細胞にプロテイナーゼKおよびSDSをそれぞれ100 μ l/mlおよび0.5%（w/v）の最終濃度で添加し、混合することによって、試験ゲノムDNAから不要なタンパク質を除去する。反応混合物を70℃でインキュベートした後、試験ゲノムDNAをフェノール-クロロホルム抽出によって精製することができる。

【0075】

また、試験試料が末梢血である場合は、例えばDNA Extraction Kit（Stratagene）で試験試料を処理することにより、試験ゲノムDNAを一括して得ることができる。

【0076】

また、試験試料を生検試料から得る場合は、細胞組織中のRNAを一括して逆転写することにより、試験試料から試験cDNAを調製することができる。RNAは、好ましくは当該細胞組織がまだ新鮮なうちに、TRIZOL試薬（Gibco）を使用することによって、細胞組織から一括して得ることができる。

【0077】

また、試験ゲノムDNAは、村松正實編「ラボマニュアル遺伝子工学」（丸善、1988）に記載の方法に従って調製することもできる。

【0078】

さらに試験cDNAは、上記5.2項で述べたように、J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis「Molecular Cloning（第2版）」（コールドスプリングハーバー研究所、1989）に記載の遺伝子工学的手法に従って調製してもよい。

【0079】

遺伝子型診断法において変異コドンを検索する場合、試験ER ポリヌクレオチド中の検索領域には、変異コドンであると思われるコドンが含まれる。したがって試験ER ポリヌクレオチド中の検索領域は、試験ER 中の相対位置303～578にあるアミノ酸をコードする試験ER ポリヌクレオチド中のコドンを含みうる。例えばこのような遺伝子型診断法では、303、309、390、396、415、494、531、578などから選択される相対位置のアミノ酸をコードする試験ER ポリヌクレオチド中のコドンを検索領域に含めることができる。

【0080】

次に、PCR増幅および配列決定法ならびにSSCP法では、調製した試験cDNAまたは試験ゲノムDNAを使って、そこから試験ER ポリヌクレオチド中の検索領域を特異的にPCR増幅することができる。試験ER ポリヌクレオチド中に存在する検索領域を試験cDNAまたは試験ゲノムDNAから特異的にPCR増幅するには、検索オリゴヌクレオチドを利用することができる。

【0081】

このPCR増幅における検索オリゴヌクレオチドは通例、試験ER ポリヌクレオチド中の検索領域を特異的にPCR増幅するように設計される。検索オリゴヌクレオチドは8～50bp（好ましくは15～40bp）のサイズと30%～70%のGC含量を持ちうる。このような検索オリゴヌクレオチドは、DNAシンセサイザーにより、 α -シアノエチルホスホアミダイト法、チオホスファイト法などを用いて合成することができる。また、検索オリゴヌクレオチドは標識を持たないか、非放射性の標識を持つか、または ^{32}P などによる放射性標識を持つことができる。PCR増幅では通例、フォワード検索オリゴヌクレオチドとリバース検索オリゴヌクレオチドとの組み合わせを利用して、試験ER ポリヌクレオチド中の検索領域を特異的

にPCR増幅する。ヒト試験ER ポリヌクレオチド用のこのようなフォワードおよびリバース検索オリゴヌクレオチドの例を、検索領域にコードされるアミノ酸の相対位置と共に下記表3に示す。

【 0 0 8 2 】

【 表 3 】

検索オリゴヌクレオチドを表す配列番号		相対位置
フォワード検索 オリゴヌクレオチド	リバーズ検索 オリゴヌクレオチド	
SEQ ID:29, SEQ ID:30, SEQ ID:31, SEQ ID:32 or SEQ ID:33	SEQ ID:34, SEQ ID:35, SEQ ID:36, SEQ ID:37 or SE Q ID:38	303
SEQ ID:39, SEQ ID:40, SEQ ID:41, SEQ ID:42 or SEQ ID:43	SEQ ID:44, SEQ ID:45, SEQ ID:46, SEQ ID:47 or SE Q ID:48	309
SEQ ID:49, SEQ ID:50, SEQ ID:51, SEQ ID:52 or SEQ ID:53	SEQ ID:54, SEQ ID:55, SEQ ID:56, SEQ ID:57 or SE Q ID:58	390
SEQ ID:59, SEQ ID:60, SEQ ID:61, SEQ ID:62 or SEQ ID:63	SEQ ID:64, SEQ ID:65, SEQ ID:66, SEQ ID:67 or SE Q ID:68	396
SEQ ID:69, SEQ ID:70, SEQ ID:71, SEQ ID:72 or SEQ ID:73	SEQ ID:74, SEQ ID:75, SEQ ID:76, SEQ ID:77 or SE Q ID:78	415
SEQ ID:79, SEQ ID:80, SEQ ID:81, SEQ ID:82 or SEQ ID:83	SEQ ID:84, SEQ ID:85, SEQ ID:86, SEQ ID:87 or SE Q ID:88	494
SEQ ID:89, SEQ ID:90, SEQ ID:91, SEQ ID:92 or SEQ ID:93	SEQ ID:94, SEQ ID:95, SEQ ID:96, SEQ ID:97 or SE Q ID:98	531
SEQ ID:99, SEQ ID:100, SEQ ID:101, SEQ ID:102 or S EQ ID:103	SEQ ID:104, SEQ ID:105, SEQ ID:106, SEQ ID:107 or SEQ ID:108	578

【 0 0 8 3 】

試験ER ポリヌクレオチド中の検索領域は、Saikiら，Science，第230巻，1350-1354頁（1985）に記載の方法に従って、試験cDNAまたは試験ゲノムDNAから特異的にPCR増幅するこ

とができる。このPCR増幅におけるPCR混合物は、1.5mM～3.0mMの塩化マグネシウム、耐熱性DNAポリメラーゼ、dNTP（dATP、dTTP、dGTPおよびdCTP）、リバーソ検索オリゴヌクレオチドの1つと組み合わせたフォワード検索オリゴヌクレオチドの一つ、および試験ゲノムDNAまたは試験cDNAを含みうる。このPCR増幅では、変性インキュベーション、アニーリングインキュベーションおよび伸長インキュベーションを課すインキュベーションサイクルを20～50回（好ましくは25～40回）繰り返すことができる。変性インキュベーションでは、90～95（好ましくは94～95）で1分～5分間（好ましくは1分～2分間）PCR混合物をインキュベートすることができる。変性インキュベーションに続くアニーリングインキュベーションでは、30～70（好ましくは40～60）で3秒～3分間（好ましくは5秒～2分間）PCR混合物をインキュベートすることができる。変性インキュベーションに続く伸長インキュベーションでは、70～75（好ましくは72～73）で約15秒～5分間（好ましくは30秒～4分間）PCR混合物をインキュベートすることができる。

10

【0084】

PCR増幅およびヌクレオチド配列決定法を利用する場合、遺伝子型診断法では、得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動にかけることができる。増幅された検索領域を含むポリヌクレオチド（以下、検索領域ポリヌクレオチドという）を低融点アガロースゲルから回収し、配列決定することにより、検索領域ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を得る。

【0085】

次に、検索領域ポリヌクレオチドを配列決定し、そのヌクレオチド配列中の変異を決定することにより、変異コドンがあればその変異コドン中の変異を決定することができる。検索領域ポリヌクレオチドを配列決定する際には、ダイレクトシーケンシング法または自動シーケンシング法を利用することができる。ダイレクトシーケンシング法の例には、手作業によるシーケンシング法（Maxam, A.M.およびW. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560, 1977に記載のMaxam Gilbert法）、Sanger法（Sanger, F.およびA. R. Coulson, J. Mol. Biol., 94, 441, 1975ならびにSanger, F., NicklenおよびA. R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977に記載）、BioTechniques, 7, 494（1989）に記載の方法などがある。ABI自動シーケンサー（モデル377, Applied Biosystems）などの自動DNAシーケンサーを使用する場合は、ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitなどの適当なDNAシーケンシングキットを使って、自動DNAシーケンサー用の検索領域を調製することができる。配列決定が終わったら、次に、検索領域ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を正常ERをコードするヌクレオチド配列と比較して、検索領域中に変異コドンがあればその中の変異を決定することができる。

20

30

【0086】

SSCP法を利用する場合は、得られたPCR混合物を、Hum. Mutation, 第2巻, 338頁に従って非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかける。このような場合、検索領域ポリヌクレオチドが放射標識され、その放射能を使って非変性ポリアクリルアミドゲル中の検索領域ポリヌクレオチドを検出できるように、上記PCR増幅では放射標識オリゴヌクレオチドを利用することが好ましい。このようなSSCP法では、放射標識された検索領域ポリヌクレオチドを一本鎖ポリヌクレオチドに熱変性し、緩衝液中で非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて、各一本鎖ポリヌクレオチドを分離することができる。非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動に利用することができる緩衝液の例には、トリス-リン酸（pH7.5～8.0）、トリス-酢酸（pH7.5～8.0）、トリス-ホウ酸（pH7.5～8.3）などがあり、トリス-ホウ酸（pH7.5～8.3）は好ましい。さらに、EDTAなどの非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動用補助成分を利用してもよい。このような非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動の条件としては、30～40Wの定電力、4～室温（約20～25）で1時間～4時間を挙げることができる。

40

【0087】

非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に、その非変性ポリアクリルアミドゲルをろ紙

50

に転写し、X線フィルムと接触させて、放射標識検索領域ポリヌクレオチドからの放射線にX線フィルムを露出する。X線フィルムの露出には適当なカセットを利用することができる。X線フィルムの現像によって得られるオートラジオグラムにより、放射標識検索領域ポリヌクレオチドの移動度を標準物質の移動度と比較することができる。前記標準物質の移動度は、検索領域ポリヌクレオチドが正常ER ポリヌクレオチドの正常コドンだけからなる場合に予想される移動度とすることができる。標準物質の移動度とは異なる放射標識検索領域ポリヌクレオチドの移動度は、通例、当該放射標識検索領域中に1または複数の変異コドンが存在することを示す。

【0088】

次に、熱水または沸騰水を使って、放射標識検索領域ポリヌクレオチドを非変性ポリアクリルアミドゲルから回収することができる。得られた放射標識検索領域は再びPCR増幅した後、配列決定用に調製することができる。変異コドンがある場合は、上記の方法と同様にPCR増幅およびヌクレオチド配列法で、変異コドン中の変異を決定することができる。

【0089】

ハイブリダイゼーション法では、通例、プローブオリゴヌクレオチドを利用して、当該プローブオリゴヌクレオチドが検索領域にハイブリダイズすることができるかどうかを観察する。ハイブリダイゼーション法では、検索領域ポリヌクレオチド、調製した試験cDNA、調製した試験ゲノムDNA、精製した試験ER ポリヌクレオチドなどを利用することによって、検索領域を用意することができる。また、ハイブリダイゼーション法では、検索領域ポリヌクレオチドを制限酵素消化した後、制限酵素消化された検索領域ポリヌクレオチドを利用して、プローブオリゴヌクレオチドがそれにハイブリダイズすることができるかどうかを観察してもよい。

【0090】

プローブオリゴヌクレオチドは15～40bpのサイズと30%～70%のGC含量を持つ。このようなプローブオリゴヌクレオチドはDNAシンセサイザーにより、 γ -シアノエチルホスホアミダイト法、チオホスファイト法などを用いて合成することができる。またプローブオリゴヌクレオチドは通例、非放射性的（例えばビオチンなどによる）標識を持つか、または 32 Pなどによる放射標識を持つ。

【0091】

検索領域が正常ER ポリヌクレオチドの正常コドンだけから構成される場合、プローブオリゴヌクレオチドは検索領域のヌクレオチド配列から構成することができる。このようなヌクレオチド配列により、プローブオリゴヌクレオチドは、試験ER ポリヌクレオチド中の検索領域が正常ER ポリヌクレオチドの正常コドンだけから構成される場合には、ストリンジントな条件で試験ER ポリヌクレオチド中の検索領域にハイブリダイズすることができる。ヒト試験ER ポリヌクレオチド用のこのようなプローブオリゴヌクレオチドの例を、検索領域にコードされるアミノ酸の相対位置と共に下記表3に示す。

【0092】

【表4】

10

20

30

プローブオリゴヌクレオチド	相対位置
SEQ ID:111, SEQ ID:112, SEQ ID:113, SEQ ID:114 or SEQ ID:115	303
SEQ ID:116, SEQ ID:117, SEQ ID:118, SEQ ID:119 or SEQ ID:120	309
SEQ ID:121, SEQ ID:122, SEQ ID:123, SEQ ID:124 or SEQ ID:125	390
SEQ ID:126, SEQ ID:127, SEQ ID:128, SEQ ID:129 or SEQ ID:130	396
SEQ ID:131, SEQ ID:132, SEQ ID:133, SEQ ID:134 or SEQ ID:135	415
SEQ ID:136, SEQ ID:137, SEQ ID:138, SEQ ID:139 or SEQ ID:140	494
SEQ ID:141, SEQ ID:142, SEQ ID:143, SEQ ID:144 or SEQ ID:145	531
SEQ ID:146, SEQ ID:147, SEQ ID:148, SEQ ID:149 or SEQ ID:150	578

10

20

30

【 0 0 9 3 】

通例、ハイブリダイゼーション法はストリンジェントな条件で行われる。前記ストリンジェントな条件として、例えばプレハイブリダイゼーション処理またはハイブリダイゼーション処理を、プレハイブリダイゼーション緩衝液およびハイブリダイゼーション緩衝液中で行い、洗浄緩衝液中で15分間の洗浄を2回行う。ハイブリダイゼーション法では、所望により、 $0.1 \times \text{SSC}$ (0.015M NaCl 、 0.0015M クエン酸ナトリウム) および 0.5% SDSを含む緩衝液中で30分間の洗浄をさらに行ってもよい。プレハイブリダイゼーション緩衝液としては、 $6 \times \text{SSC}$ (0.9M NaCl 、 0.09M クエン酸ナトリウム)、 $5 \times$ デンハルト液 (0.1% (w/v) フィコール400、 0.1% (w/v) ポリピロリドンおよび 0.1% BSA)、 0.5% (w/v) SDSおよび $100 \mu\text{g/ml}$ のサケ精子DNAを含む緩衝液を利用することができる。またプレハイブリダイゼーション緩衝液として、サケ精子DNAを $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度になるように添加したDIG EASY Hyb緩衝液 (Boehringer Mannheim) を利用してもよい。さらにプレハイブリダイゼーション緩衝液として、 $6 \times \text{SSPE}$ (0.9M NaCl 、 $0.052\text{M NaH}_2\text{PO}_4$ 、 7.5mM EDTA)、 0.5% SDS、 $5 \times$ デンハルト液および 0.1mg/ml のサケ精子DNAを含む緩衝液を利用してもよい。ハイブリダイゼーション緩衝液としては、プローブオリゴヌクレオチドを十分量になるように添加したプレハイブリダイゼーション緩衝液を利用することができる。プレハイブリダイゼーション処理およびハイブリダイゼーション処理の温度はプローブオリゴヌクレオチドの長さによって変わりうるが、例えばプローブオリゴヌクレオチドの T_m 値 ~ プローブオリゴヌクレオチ

40

50

ドのT_m値より2~3 低い温度とすることができる。洗浄温度もオリゴヌクレオチドの長さによって変わりうるが、例えば室温で行うことができる。このような場合、T_m値は、ハイブリダイゼーション緩衝液中でプローブオリゴヌクレオチド中のヌクレオチド単位と水素結合を形成すべきヌクレオチド単位の量を見積もり、次に、水素結合を形成すべきプローブオリゴヌクレオチド中のAまたはTヌクレオチド単位について2 を加え、水素結合を形成すべきプローブオリゴヌクレオチド中のGまたはCヌクレオチド単位について4 を加えることによって得られる温度を加えることによって得ることができる。

【0094】

例えばハイブリダイゼーション法は、ドットプロットハイブリダイゼーション法、ミスマッチ検出法などを伴ってもよい。

10

【0095】

ドットプロットハイブリダイゼーション法では、通例、試験ER ポリヌクレオチドをメンブレンに固定し、固定された試験ER ポリヌクレオチド中の検索領域にプローブオリゴヌクレオチドがハイブリダイズすることができるかどうかを評価する。試験ER ポリヌクレオチドをメンブレン上に固定する際には、試験ER ポリヌクレオチドとして、検索領域ポリヌクレオチド、調製した試験cDNA、調製した試験ゲノムDNA、精製した試験ER ポリヌクレオチドなどを使用することができる。試験ERポリヌクレオチドは、試験ER ポリヌクレオチドを90~100 で3~5分間インキュベートし、試験ER ポリヌクレオチドをメンブレン上にスポットし、得られたメンブレンを乾燥し、スポットした検索領域をUV光に曝露することによって固定することができる。メンブレンとしては、Hybond N (Amersham Pharmacia) などのナイロンメンブレンを使用することができる。次に、プローブオリゴヌクレオチドを使って、当該プローブオリゴヌクレオチドが検索領域にハイブリダイズすることができるかどうかを評価することができる。プローブオリゴヌクレオチドは、当該プローブオリゴヌクレオチドと試験ER ポリヌクレオチドとを40~50 で10~20時間インキュベートすることによって利用することができる。次に、得られたメンブレンを洗浄し、ハイブリダイズしたプローブオリゴヌクレオチドが存在するなら、それを検出することができる。

20

【0096】

プローブオリゴヌクレオチドが³²Pで放射標識される場合、ハイブリダイズしたプローブオリゴヌクレオチドは（存在するとすれば）、得られたメンブレンをX線フィルムに曝露することによって検出できる。

30

【0097】

プローブオリゴヌクレオチドがビオチンを使って非放射性標識される場合、ハイブリダイズしたプローブオリゴヌクレオチドは（存在するとすれば）、スパーサーおよびハイブリダイゼーション検出酵素（ビオチン化アルカリホスファターゼ、ビオチン化ペルオキシダーゼなど）を使って検出することができる。ビオチンで標識されたプローブオリゴヌクレオチドが検索領域にハイブリダイズすることができる場合、ストレプトアビジンなどのスパーサーは、ハイブリダイズしたビオチン標識プローブオリゴヌクレオチドに結合することができ、その結果、ハイブリダイゼーション検出酵素は、スパーサーを介して、ハイブリダイズしたビオチン標識プローブオリゴヌクレオチドに結合することができるようになる。次に、結合したハイブリダイゼーション検出酵素は反応に参与して、当該プローブオリゴヌクレオチドが試験ER ポリヌクレオチド中の検索領域にハイブリダイズしているかどうかを示すことができる。この酵素反応は色の変化またはルミネセンスをもたらすことができる。

40

【0098】

プローブオリゴヌクレオチドが検索領域にハイブリダイズしない場合は、当該検索領域は1または複数の変異コドンを含むと決定することができる。次に、検索領域を配列決定してもよい。変異コドンが存在する場合、変異コドン中の変異は、上記の方法と同様にして、PCR増幅およびヌクレオチド配列決定法で決定することができる。

【0099】

50

ミスマッチ検出法はBiswas, I.およびHsieh, P., J. Biol. Chem., 271(9), 5040-5048 (1996) ならびに Nippon gene information, 1999, No. 125 (ニッポンジーン、富山) に記載されている。このミスマッチ検出法では、Taq Mut Sなどのミスマッチ検出酵素を利用して、検索領域に対するプローブオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション中の一定のミスマッチを検索する。ミスマッチ検出酵素により、プローブオリゴヌクレオチドと検索領域とのハイブリダイゼーション中のミスマッチを、高温(例えば75 以下の温度)で検出することが可能になる。通例、ミスマッチ検出酵素が結合するこのようなハイブリダイゼーション中のミスマッチは、上述のようなゲルシフトアッセイまたはドットブロットハイブリダイゼーション法によって検出することができる。ミスマッチ検出酵素がプローブオリゴヌクレオチドと検索領域とのミスマッチしたハイブリダイゼーションに結合することができる場合は、検索領域は1または複数の変異コドンを含むと決定することができる。検索領域を配列決定してもよい。変異コドンが存在するなら、その変異コドン中の変異を、上記の方法と同様にして、PCR増幅およびヌクレオチド配列決定法で決定することができる。

【0100】

またRFLP法では、制限酵素を反応条件下で試験ER ポリヌクレオチドと混合する。通例、制限酵素は、変異コドンであると疑われる検索領域中のコドンとオーバーラップする制限部位を持つ。前記制限部位での制限消化の成否により、検索領域中の変異コドンの有無を決定することができる。制限消化の結果は例えば低融点アガロースゲル電気泳動などによるゲル電気泳動分析によって評価することができる。次に必要なら検索領域を配列決定することができる。次に、変異コドンが存在するなら、その変異コドン中の変異は上記の方法と同様にPCR増幅およびヌクレオチド配列決定法で決定することができる。

【0101】

表現型診断法では、試験ER のアミノ酸配列中で、上記5.2項に述べたようなレポーター遺伝子転写活性化活性を付与する1または複数の置換アミノ酸の検索を行うことができる。置換アミノ酸を検索した後、試験ER 中に変異が存在するのであれば、試験ER のアミノ酸配列を正常ER のアミノ酸配列と比較することによって、その変異を決定する。試験ER 中の置換アミノ酸を検索するために、試験ER 中の検索領域は、試験ER 中の相対位置303~578のアミノ酸を含むことができる。例えば、このような表現型診断法では、303、309、390、396、415、494、531、578などから選択される1または複数の相対位置にある試験ER 中のアミノ酸を検索領域に含めることができる。

【0102】

試験ER 中の置換アミノ酸の検索には、試験ER の検索領域中にエピトープを持つ抗体が役立つ。このような抗体の結合の成否により、試験ER の検索領域に置換アミノ酸が存在するかどうかを決定することができる。次に、試験ER 中の変異は、試験ER のアミノ酸配列を正常ER のアミノ酸配列と比較することによって決定することができる。

【0103】

試験ER は試験試料から細胞抽出技術によって調製することができる。また、表現型診断法用の試験ER は、組換え試験ER を精製することによって調製することもできる。

【0104】

5.4. 試験ER を用いるレポーターアッセイ

試験ER は、レポーター遺伝子を含む染色体と当該試験ER とを含むアッセイ細胞を利用することにより、上記5.2に記載のレポーター遺伝子転写活性化活性に関してアッセイすることができる。このような場合は、通例、アッセイ細胞をリガンドにばく露し、レポーター遺伝子の転写活性化レベルを測定することで、試験ER によるレポーター遺伝子転写活性化活性を定量的に解析する。また、試験ER によるレポーター遺伝子転写活性化活性は、試験ER によるレポーター遺伝子の転写活性化レベルを標準物質によるレポーター遺伝子の転写活性化レベルと比較することによって評価することもできる。さらにまた、試験ER によるレポーター遺伝子の転写活性化レベルが標準物質による転写活性化レベルとは異なる試験ER を選択することによって、試験ER をスクリーニングすることもできる

10

20

30

40

50

。

【0105】

アッセイ細胞は、試験ER をコードする遺伝子とレポーター遺伝子とを宿主細胞に導入することによって作製することができる。レポーター遺伝子は宿主細胞の染色体に挿入される。試験ER 遺伝子は一過性発現が起こるように宿主細胞に導入することができ、また試験ER 遺伝子が宿主細胞の染色体に挿入されるように試験ER 遺伝子を宿主細胞に導入することもできる。試験ER 遺伝子を宿主細胞の染色体に挿入する場合、試験ER 遺伝子は、試験ER と一緒に当該染色体に挿入してもよいし、当該宿主細胞中の別の染色体に挿入してもよい。また、上記5.2項に記載したように、レポーター遺伝子を宿主細胞に導入して安定形質転換カセット細胞を作製した後、上記5.2項に記載したように、試験ER 遺伝子を前記安定形質転換カセット細胞に導入することもできる。

10

【0106】

試験ER 遺伝子は、当該試験ER 遺伝子をアッセイ細胞中で発現させて試験ER を得ることができるように、宿主細胞に導入される。この点で、前記試験ER は通例、試験ER をコードするポリヌクレオチドの上流に作動的に連結されたプロモーターを含む。

【0107】

試験ER 遺伝子を宿主細胞に導入するには、上記5.2項に記載したように、宿主細胞のタイプに従って従来の試験ER 遺伝子導入技術を適用することができる。この点に関して、試験ER を一過性発現用の宿主細胞に導入する場合は、環状の試験ER 遺伝子を導入する。試験ER 遺伝子を宿主細胞の染色体に挿入する場合は、線状の試験ER を導入する。また、上記5.2項に記載したように、ベクターを利用して宿主細胞に試験ER 遺伝子またはレポーター遺伝子を導入してもよい。

20

【0108】

また、試験ER 遺伝子を安定形質転換カセット細胞に導入して、アッセイ細胞を得ることもできる。このような場合、試験ER 遺伝子を安定形質転換カセット細胞に導入して安定形質転換バイナリー細胞を得ることもできる。このような安定形質転換バイナリー細胞は、試験ER 遺伝子およびレポーター遺伝子を安定に含む染色体を持っている。

【0109】

アッセイ細胞の作製に利用される宿主細胞は、通例、正常または変異ER を発現させない。宿主細胞の例には、HeLa細胞、CV-1細胞、Hepa1細胞、NIH3T3細胞、HepG2細胞、COS1細胞、BF-2細胞、CHH-1細胞などがある。

30

【0110】

レポーターアッセイでは、通例、アッセイ細胞を十分量のリガンドに1～数日間ばく露する。またリガンドは試験ER に対する作動条件または拮抗条件下でアッセイ細胞にばく露することができる。作動条件では通例、変異ER を刺激する可能性がある単独の薬剤としてのリガンドにアッセイ細胞をばく露する。拮抗条件では通例、リガンドおよびE2にアッセイ細胞をばく露する。

【0111】

リガンドとしては、通常、正常ER に対して純粋にまたは部分的に拮抗性または作動性であるリガンドを利用する。そのようなリガンドの例には、タモキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェンおよびラロキシフェンなどの部分抗エストロゲン、ICI182780 (Wakeling AEら, Cancer Res., 512: 3867-3873 (1991)) およびZM189154 (Dukes Mら, J. Endocrinol., 141: 335-341 (1994)) などの完全抗エストロゲンがある。

40

【0112】

ばく露後に、レポーター遺伝子の発現レベルを測定することによって、レポーター遺伝子の転写活性化レベルを測定する。このような場合、レポータータンパク質またはレポーターRNA (レポーター配列によってコードされるもの) は細胞内に貯蔵されるか、細胞から分泌されるので、発現レベルはそれらを使って測定することができる。レポーター遺伝子の発現レベルはノーザンブロット解析もしくはウェスタンブロット解析によって、またはレポータータンパク質の活性レベルを測定することによって測定することができる。タン

50

パク質の活性レベルは通例、レポーター遺伝子の発現レベルを示す。

【0113】

例えば、レポーター遺伝子がレポータータンパク質としてルシフェラーゼをコードする場合、レポーター遺伝子の発現レベルは、ルシフェリンとルシフェラーゼとを反応させることによって得られるルミネセンスによって測定することができる。このような場合は、粗細胞抽出物を細胞から調製し、その粗細胞抽出物にルシフェリンを加える。ルシフェリンは細胞抽出物中のルシフェラーゼと室温で反応させることができる。ルシフェリンの添加によって得られるルミネセンスは、通常、レポーター遺伝子の発現レベルの指標として測定される。というのも、粗細胞抽出物は、細胞内で発現され粗細胞抽出物中に存在するルシフェラーゼのレベルに比例する強度のルミネセンスをもたらすからである。得られた粗細胞抽出物中のルミネセンスを測定するには、ルミノメーターを利用することができる。

10

【0114】

次に、測定された転写活性化レベルを標準物質によるレポーター遺伝子の転写活性化レベルと比較して、試験ER による転写活性化活性を評価することができる。試験ER による転写活性化活性を評価する場合、前記標準物質によるレポーター遺伝子の転写活性化レベルは、アッセイ細胞が（試験ER の代わりに）正常ER または表現型がわかっているER を発現させる場合に予想されるレポーター遺伝子の転写活性化レベルとすることができる。試験ER が与える転写活性化レベルの測定値が標準物質によるレポーター遺伝子の転写活性化レベルと異なる場合は、当該試験ER を変異ER として選択することができる。

20

【0115】

また、変異リガンド依存性転写因子をスクリーニングすることもできる。このような場合は、試験ER 遺伝子の代わりに試験リガンド依存性転写因子をコードする遺伝子を宿主細胞に導入する。このような試験リガンド依存性転写因子の例には、試験ER 、試験AR、試験GR、試験TR、試験PR、試験PXR、試験親油性ビタミン受容体（例えば試験VDR）および試験RARなどがある。このような場合、レポーター遺伝子は、EREの代わりに、与えられた試験リガンド依存性転写因子にコグネイトである適当な受容体応答配列を含む。

【0116】

【実施例】

6.1. 実施例1 ヒト変異ER をコードするポリヌクレオチド

6.1.1. ヒト正常ER をコードするプラスミドの生成

ヒト肝臓cDNAライブラリー（CLONETECH、QuickクローンcDNA#7113-1）を利用して、そこからヒト正常ER をコードするcDNAを特異的にPCR増幅する。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト肝臓cDNAライブラリー10ng、配列番号11に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、配列番号12に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、LA-Taqポリメラーゼ（宝酒造）、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）を含む。配列番号11および配列番号12に記載のオリゴヌクレオチドはDNAシンセサイザー（モデル394、Applied Biosystems）を使って合成する。このPCR増幅では、PCRsystem 9700（Applied Biosystems）を使って、95 で1分間のインキュベーションの後、68 で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを35回繰り返す。

30

【0117】

得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかけて、PCR増幅によって増幅されたcDNAが約1.8kbのサイズを持つことを確認する。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、Dye Terminator Sequence Kit FS（Applied Biosystems）を使って、回収したcDNAの試料を調製する。調製したcDNA試料をABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定することにより、当該cDNAが配列番号1に示すアミノ酸配列を持つヒト正常ER をコードするヌクレオチド配列を持っていることを明らかにする。

40

【0118】

次に、もう1つのPCR増幅を同様に行って、上記cDNA中の開始コドン（ATG）のすぐ上流にKozakコンセンサス配列を付加する。このPCR増幅では、100ngの上記cDNAg、配列番号151に

50

記載のオリゴヌクレオチドおよび配列番号12に記載のオリゴヌクレオチドを利用する。得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかけて、このPCR増幅で増幅されたcDNAが約1.8kbのサイズを持つことを確認する。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、増幅されたcDNA 1 µgをDNA Blunting Kit（宝酒造）で処理することにより、増幅されたcDNAの末端を平滑化する。次に、前記の処理によって得たcDNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼと反応させて、その末端をリン酸化する。リン酸化したcDNAをフェノール処理した後、リン酸化cDNAをエタノール沈殿させて、精製のリン酸化cDNAを得る。

【0119】

プラスミドpRc/RSV（Invitrogen）を制限酵素HindIIIで制限消化し、次に65℃で1時間、細菌アルカリホスファターゼ（BAP）で処理する。次に、制限消化pRc/RSVをフェノール処理とエタノール沈殿によって精製する。制限消化されたpRc/RSVをDNA Blunting Kit（宝酒造）で処理してその末端を平滑化し、低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかける。制限消化されたpRc/RSVを低融点アガロースゲルから回収した後、制限消化されたpRc/RSV 100ngおよび上記精製型リン酸化cDNAの全てを、T4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。そのライゲーション反応混合物を使って、大腸菌コンピテントDH5⁺細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞は、アンピシリンを50 µg/mlの濃度になるように添加したLB（Luria-Bertani）培地（以下、LB-amp培地という；J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis「Molecular Cloning（第2版）」（Cold Springs Harbor Laboratory Publishing, 1989））で培養する。次に、アンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次に、それらクローンの一部を使って、ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS（Applied Biosystems）を使って調製する。調製したプラスミドをABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定して、配列番号1に示すアミノ酸配列を持つヒト正常ER^αをコードするヌクレオチドを配列を持っているプラスミドが存在することを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pRc/RSV-hER^α Kozakと名づける。

【0120】

6.1.2. ヒト変異ER^α K303R、S309F、M396V、G415V、G494VまたはK531Eをコードするプラスミドの作製

6.1.2.1. 変異導入用プラスミドの作製

プラスミドpRc/RSV-hER^α Kozakを37℃で1時間、制限酵素NotIで制限消化する。その制限消化反応混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかけて、約1.6kbのサイズを持つDNA断片が存在することを確認する。次に、その1.6kb DNA断片を低融点アガロースゲルから回収する。

【0121】

プラスミドpBluescriptII SK(+)（Stratagene）を37℃で1時間、NotIで制限消化した後、65℃で1時間、BAPで処理する。その制限消化反応混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかけて、制限消化されたpBluescriptII SK(+)を低融点アガロースゲルから回収する。次に、上記1.6kb DNA断片100ngと回収されたpBluescriptII SK(+) 100ngとを、T4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。そのライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5⁺細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-amp培地で培養する。次に、アンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次に、それらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を制限酵素NotIおよびHindIIIで制限消化する。その制限消化反応混合物をアガロースゲル電気泳動にかける。次に、プラスミドのプラス鎖がヒト正常ER^αをコードするセンス鎖を作動的なM13ミクロファージ複製起点（f1 ori）と共に含んでいるプラスミドが存在することを確認する。これに関連して、f1 oriがプラスミドの一方の鎖を複製する時に、ヒト正常ER^αをコードするセンス鎖がそれと共に複製されるような構造を持つプラスミドが存

在することを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pSK-NNと名づける。

【 0 1 2 2 】

6.1.2.2. 相対位置303、309、396、415、494および531における部位特異的変異導入
McClary JAら, Biotechniques 1989(3): 282-289に記載の方法に従って、ヒト正常ER を
コードするポリヌクレオチドに指定の変異を導入する。そのような方法を本発明との関連
で以下に説明する。

【 0 1 2 3 】

上記6.1.2.1に記載のプラスミドpSK-NNを利用して大腸菌コンピテントCJ236細胞（宝酒造）を、大腸菌CJ236細胞と一緒に提供されるプロトコールに従って形質転換する。次に、
アンピシリン耐性を示すクローンをLB-amp培地で16時間培養する。次に、そのクローンの
1コロニーを、M13ヘルパーファージを少なくとも 1×10^{11} pfu/ml-培地の濃度になるように
加えた10mlの2×YT培地（以下、2×YT-M13という）に懸濁する。クローンを2×YT-M13培
地中37℃で2時間培養した後、カナマイシンを50 μg/mlの濃度になるように加え、次にそ
のクローンを22時間培養する。得られた懸濁液を遠心分離し、得られた上清8mlを15mlの
試験管に移す。次に、その上清に2mlの2.5M NaCl-40%PEG8000（Sigma）を加え、上清と
共に攪拌する。その上清を4℃で1時間冷蔵し、遠心分離（3,000rpm、2,000×g、10分間、
4℃）して、そこからファージをペレットとして集める。ファージを400 μlの蒸留水に懸
濁した後、同体積のフェノールを加え、得られた懸濁液を穏やかに5分間振とうする。得
られた上清を遠心分離して、そこから水層を取り出す。次に、2回目のフェノール処理を
行うために、水層に同体積のフェノールを加え、激しく振とうする。得られた懸濁液を遠
心分離して、そこから水層を取り出す。2回目のフェノール処理によって得た水層に、同
体積のクロロホルムを加え、激しく振盪する。得られた懸濁液を遠心分離（15,000rpm、
20,000×g、5分、4℃）して、そこから水層を取り出す。クロロホルム処理によって得た水
層に、800 μlの100%エタノールと、50 μlの3M酢酸ナトリウムとを加える。得られた水層
を-80℃に20分間冷却した後、その水層を遠心分離する。これによって得られるペレット
を70%エタノールですすいだ後、乾燥する。滅菌水中の残渣をペレット化した後、水溶液
の吸光度を260nmの波長で測定して、その中に含まれるヒト正常ER をコードする一本鎖
センスDNAの量を計算する。

【 0 1 2 4 】

部位特異的変異導入用のオリゴヌクレオチドを合成して、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および配列番号157に記載のオリゴヌクレオチドを
得る。

【 0 1 2 5 】

配列番号152に記載のオリゴヌクレオチドを使用すると、相対位置303にあるリジンをコー
ドするAAGコドンが、アルギニンをコードするAGGコドンに変化する。

【 0 1 2 6 】

配列番号153に記載のオリゴヌクレオチドを使用すると、相対位置309にあるセリンをコー
ドするTCCコドンが、フェニルアラニンをコードするTTCコドンに変化する。

【 0 1 2 7 】

配列番号154に記載のオリゴヌクレオチドを使用すると、相対位置396にあるメチオニンを
コードするATGコドンが、バリンをコードするGTGコドンに変化する。

【 0 1 2 8 】

配列番号155に記載のオリゴヌクレオチドを使用すると、相対位置415にあるグリシンをコー
ドするGGAコドンが、バリンをコードするGTAコドンに変化する。

【 0 1 2 9 】

配列番号156に記載のオリゴヌクレオチドを使用すると、相対位置494にあるグリシンをコー
ドするGGCコドンが、バリンをコードするGTCコドンに変化する。

【 0 1 3 0 】

配列番号157に記載のオリゴヌクレオチドを使用すると、相対位置531にあるリジンをコー
ドするAAGコドンが、グルタミン酸をコードするGAGコドンに変化する。

【0131】

各オリゴヌクレオチドを、10pmolのポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）を使って、ポリヌクレオチドキナーゼと一緒に提供される緩衝液中でリン酸化する。このリン酸化反応では、2mMのATPを各反応混合物に使用し、反応混合物を37℃で30分間インキュベートする。次に、リン酸化されたオリゴヌクレオチド約1pmolを、正常ERをコードする0.2pmolの一本鎖センスDNAとそれぞれ混合する。次に、10μlのアニーリング反応混合物を調製するために、上記混合物をそれぞれアニーリング緩衝液（20mM トリス-Cl（pH7.4）、2mM MgCl₂、50mM NaCl）に加える。そのアニーリング反応混合物を70℃で10分間のインキュベーション、次いで37℃で60分間のインキュベーションに付した後、4℃でインキュベートする。次に、そのアニーリング反応混合物に、それぞれ2単位（0.25μl）のT7 DNAポリメラーゼ（New England Labs）、2単位（0.25μl）のT4 DNAリガーゼ（宝酒造）および1.2μlの合成緩衝液（175mM トリス-Cl（pH7.4）、375mM MgCl₂、5mM DTT、4mM dATP、4mM dCTP、4mM dGTP、4mM dTTPおよび7.5mM ATP）を加えることによって、合成反応混合物を調製する。その合成反応混合物を4℃で5分間インキュベートし、室温で5分間インキュベートし、次に37℃で2時間インキュベートして、合成DNAプラスミドを得る。

10

【0132】

次に2μlの各合成反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次に、それらクローンの一部を使って上記合成反応で得られたプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS（Applied Biosystems）を使って調製する。単離されたプラスミドをABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定する。

20

【0133】

上記の配列決定により、配列番号152に記載のオリゴヌクレオチドを利用することによって合成される単離プラスミドは、ヒト変異ERをコードするヌクレオチド配列中に相対位置303に相当するAGGコドンを持っていてアルギニンをもたらす単離プラスミドを与えることを確認する。このような単離プラスミドを選択し、pSK-NN303と名づける。

【0134】

上記の配列決定により、配列番号153に記載のオリゴヌクレオチドから合成される単離プラスミドは、ヒト変異ERをコードするヌクレオチド配列中に相対位置309に相当するTTCコドンを持っていてフェニルアラニンをもたらす単離プラスミドを与えることを確認する。このような単離プラスミドを選択し、pSK-NN309と名づける。

30

【0135】

上記の配列決定により、配列番号154に記載のオリゴヌクレオチドから合成される単離プラスミドは、ヒト変異ERをコードするヌクレオチド配列中に相対位置396に相当するGTGコドンを持っていてバリンをもたらす単離プラスミドを与えることを確認する。このような単離プラスミドを選択し、pSK-NN396と名づける。

【0136】

上記の配列決定により、配列番号155に記載のオリゴヌクレオチドから合成される単離プラスミドは、ヒト変異ERをコードするヌクレオチド配列中に相対位置415に相当するGTAコドンを持っていてバリンをもたらす単離プラスミドを与えることを確認する。このような単離プラスミドを選択し、pSK-NN415と名づける。

40

【0137】

上記の配列決定により、配列番号156に記載のオリゴヌクレオチドから合成される単離プラスミドは、ヒト変異ERをコードするヌクレオチド配列中に相対位置494に相当するGTCコドンを持っていてバリンをもたらす単離プラスミドを与えることを確認する。このような単離プラスミドを選択し、pSK-NN494と名づける。

【0138】

上記の配列決定により、配列番号157に記載のオリゴヌクレオチドから合成される単離プラスミドは、ヒト変異ERをコードするヌクレオチド配列中に相対位置531に相当するGAG

50

コドンを持っていてグルタミン酸をもたらす単離プラスミドを与えることを確認する。このような単離プラスミドを選択し、pSK-NN531と名づける。

【 0 1 3 9 】

下記表4に、使用する変異導入用オリゴヌクレオチド、それによって生成するプラスミド、およびその結果得られるヒト変異ER を示す。

【 0 1 4 0 】

【表 5 】

使用するオリゴヌクレオチドの配列番号	生成するプラスミド	ヒト変異ER α
SEQ ID:152	pSK-NN303	ヒト変異ER α K303R
SEQ ID:153	pSK-NN309	ヒト変異ER α S309F
SEQ ID:154	pSK-NN396	ヒト変異ER α M396V
SEQ ID:155	pSK-NN415	ヒト変異ER α G415V
SEQ ID:156	pSK-NN494	ヒト変異ER α G494V
SEQ ID:157	pSK-NN531	ヒト変異ER α K531E

10

20

【 0 1 4 1 】

プラスミドpSK-NN303、pSK-NN309、pSK-NN396、pSK-NN415、pSK-NN494およびpSK-NN531をそれぞれ37 で1時間、制限酵素NotIで制限消化する。次に、各制限消化反応混合物を低融点アガロースゲル電気泳動にかけて、約1.6kbのサイズを持つDNA断片が存在することを確認する。次に、その1.6kb DNA断片を低融点アガロースゲルから回収する。

【 0 1 4 2 】

6.1.1項で得たプラスミドpRc/RSV-hER Kozakを37 で1時間、制限酵素NotIで制限消化し、65 で1時間、BAPで処理する。次にその制限消化反応混合物を低融点アガロースゲル電気泳動にかけて、約5.5kbのサイズを持つDNA断片が存在することを確認する。次にその5.5kb DNA断片を低融点アガロースゲルから回収する。

30

【 0 1 4 3 】

次に、回収された5.5kb DNA断片100ngをそれぞれ上記1.6kb DNA断片100ngと混合して、T4 DNAリガーゼによるライゲーション反応を行う。そのライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5 細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-amp培地で培養する。次に、アンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次に、それらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を制限酵素NotIまたはMluIで制限消化する。次に、その制限消化反応混合物をアガロースゲル電気泳動にかける。各制限消化によって所望のサイズを持つDNA断片を与える単離プラスミドが存在することを確認する。そのような単離プラスミドは、制限酵素NotIによる制限消化では5.5kbと1.6kbのサイズを持つDNA断片を与え、制限酵素MluIによる制限消化では7.1kbのDNA断片を与える。

40

【 0 1 4 4 】

次に、上記各プラスミドを、配列番号158、配列番号159および配列番号160に記載のオリゴヌクレオチドを使ってPCR増幅する。これらのPCR増幅では、PCR混合物は上記プラスミドの1つ、配列番号158に記載のオリゴヌクレオチド、配列番号159に記載のオリゴヌクレオチド、配列番号160に記載のオリゴヌクレオチド、400 μ M dNTP (100 μ M dATP、100 μ M

50

dTTP、100 μ M dGTPおよび100 μ M dCTP)、組換えTaq DNAポリメラーゼ(宝酒造)、前記組換えTaq DNAポリメラーゼと一緒に提供されるPCR緩衝液を含む。これらのPCR増幅では、94 で30秒間のインキュベーション、次いで65 で1分間のインキュベーションの後、72 で1分45秒間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを30回繰り返す。得られた各25 μ lのPCR混合物のうち10 μ lを1%アガロースゲル電気泳動(アガロースS、ニッポンジーン)にかけて、得られたプラスミドが約1.2kbのサイズを持つことを確認する。次に、Dye Terminator Sequence Kit FS(Applied Biosystems)を使ってプラスミドを調製する。調製したプラスミドの試料をそれぞれABI自動シーケンサー(モデル377、Applied Biosystems)で配列決定する。

【0145】

10

上記の配列決定により、pSK-NN303から得られるプラスミドはヒト変異ER K303R(AAG A GG; リジン アルギニン; 相対位置303)をコードすることが確認される。このプラスミドをpRc/RSV-hER K303R Kozakと名づける。

【0146】

上記の配列決定により、pSK-NN309から得られるプラスミドはヒト変異ER S309F(TCC T TC; セリン フェニルアラニン; 相対位置309)をコードすることが確認される。このプラスミドをpRc/RSV-hER S309F Kozakと名づける。

【0147】

上記の配列決定により、pSK-NN396から得られるプラスミドはヒト変異ER M396V(ATG G TG; メチオニン バリン; 相対位置396)をコードすることが確認される。このプラスミドをpRc/RSV-hER M396V Kozakと名づける。

20

【0148】

上記の配列決定により、pSK-NN415から得られるプラスミドはヒト変異ER G415V(GGA G TA; グリシン バリン; 相対位置415)をコードすることが確認される。このプラスミドをpRc/RSV-hER G415V Kozakと名づける。

【0149】

上記の配列決定により、pSK-NN494から得られるプラスミドはヒト変異ER G494V(GGC G TC; グリシン バリン; 相対位置494)をコードすることが確認される。このプラスミドをpRc/RSV-hER G494V Kozakと名づける。

【0150】

30

上記の配列決定により、pSK-NN531から得られるプラスミドはヒト変異ER K531E(AAG G AG; リジン グルタミン酸; 相対位置531)をコードすることが確認される。このプラスミドをpRc/RSV-hER K531E Kozakと名づける。

【0151】

下記表5に、プラスミドの生成に使用したプラスミド、およびそのプラスミドから結果として生成するプラスミドを示す。

【0152】

【表6】

プラスミド	生成するプラスミド	コードされるヒト変異ER α
PSK-NN303	pRc/RSV-hERK303R Kozak	ヒト変異ER α K303R
PSK-NN309	pRc/RSV-hERS309F Kozak	ヒト変異ER α S309F
PSK-NN396	pRc/RSV-hERM396V Kozak	ヒト変異ER α M396V
PSK-NN415	pRc/RSV-hERG415V Kozak	ヒト変異ER α G415V
PSK-NN494	pRc/RSV-hERG494V Kozak	ヒト変異ER α G494V
PSK-NN531	pRc/RSV-hERK531E Kozak	ヒト変異ER α K531E

10

【 0 1 5 3 】

6.1.3. ヒト変異ER G390D、S578PまたはG390D/S578Pをコードするプラスミドの作製

6.1.3.1. ヒト変異ER G390DおよびS578Pをコードするプラスミドの生成

QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を使って、上記6.1.1に記載のプラスミドpRc/RSV-hER Kozakを、変異したプラスミドがヒト変異ER G390Dまたはヒト変異ER S578Pをコードするように変異させた。配列番号17および配列番号18に記載のオリゴヌクレオチドを使用すると、相対位置390にあるグリシンをコードするGGTコドンがアスパラギン酸をコードするGAT変異コドンに変化する。配列番号27および配列番号28に記載のオリゴヌクレオチドを使用すると、相対位置578にあるセリンをコードするTCCコドンがプロリンをコードするCCC変異コドンに変化する。QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kitと一緒に提供されるマニュアルを使って、プラスミドpRc/RSV-hER G390D Kozak (GGT GAT; グリシン アスパラギン酸; 相対位置390) およびpRc/RSV-hER S578P Kozak (TCC CCC; セリン プロリン; 相対位置578) を作製する。プラスミドpRc/RSV-hER G390D KozakとpRc/RSV-hER S578P Kozakとを配列決定して、ヒト変異ER をコードするプラスミドが相対位置390または578に所望の変異を含んでいることを確認する。

20

30

【 0 1 5 4 】

次にQuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を使って、変異したプラスミドがヒト変異ER G390D/S578Pをコードするように、pRc/RSV-hER G390D Kozakを変異させる。配列番号27および配列番号28に記載のオリゴヌクレオチドを使って、プラスミドpRc/RSV-hER G390D/S578P Kozak (GGT GAT; グリシン アスパラギン酸; 相対位置390) およびTCC CCC; セリン プロリン; 相対位置578) を作製する。プラスミドpRc/RSV-hER G390D/S578P Kozakを配列決定して、ヒト変異ER をコードするプラスミドが所望の変異を相対位置390および578に含んでいることを確認する。

【 0 1 5 5 】

6.1.3.2. ヒト変異ER G390D/S578Pをコードするプラスミドの試験ヒト肝組織試料からの調製

40

試験ヒト肝組織の凍結試料を使って、ヒト変異ER G390D/S578Pをコードするポリヌクレオチドを得た。試験ヒト肝組織試料を利用するにあたって、4Mチオシアン酸グアニジウム、0.1M トリス-HCl (pH7.5) および1% -メルカプトエタノールを含む緩衝液5mlにて、0.1gの試験ヒト肝組織試料をホモジナイザーでホモジナイズした。得られた緩衝液を25mlの5.7M CsCl水溶液に重層し、90,000 \times gで24時間超遠心分離することにより、RNAペレットを得た。そのRNAペレットを70%エタノールで濯いだ後、RNAペレットを室温で乾燥させた。次にそのRNAペレットを1.2 μ g/mlの濃度になるように滅菌水10 μ lに溶解した。次に、RNA溶液中のRNAを一括して逆転写反応におけるテンプレートとして使用することにより、試験cDNAを作製した。試験cDNAを作製するにあたって、逆転写酵素 (Superscript II ;

50

GibcoBRL)を1 μ lのRNA溶液、オリゴ-dTオリゴヌクレオチド(Amersham Pharmacia)、および逆転写酵素と一緒に提供される緩衝液と共に使用した。逆転写反応を37℃で1時間行って、上記試験cDNAを得た。

【0156】

上記6.1.1と同様に、1/50体積の試験cDNAを使ってpRc/RSV-hERG390D/S578P Kozakを作製した。この場合、上記試験cDNAを使用して、配列番号11および配列番号12に記載のオリゴヌクレオチドにより、ヒト変異ER G390D/S578PをコードするcDNAを試験cDNAから特異的にPCR増幅した。次に、ヒト変異ER G390D/S578PをコードするcDNAを、配列番号151および配列番号12に記載のオリゴヌクレオチドを使ってPCR増幅して、当該cDNAの開始コドン(ATG)のすぐ上流にKozakコンセンサス配列を加えた。次に増幅産物をプラスミドpRc/RSVのHindIII部位に挿入して、pRc/RSV-hERG390D/S578P Kozakを得た。

10

【0157】

6.2 実施例2 レポーター遺伝子を含むプラスミドの作製

配列番号161に記載のオリゴヌクレオチドと、それに相補的なヌクレオチド配列を持つオリゴヌクレオチドとを、DNAシンセサイザーで合成した。配列番号161に記載のオリゴヌクレオチドは、アフリカツメガエル・ピテロゲニン遺伝子中の上流領域に由来するEREの一方の鎖をコードするように合成した。もう一つのオリゴヌクレオチドは、配列番号161に記載のオリゴヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を持つように合成した。これら2つのオリゴヌクレオチドを互いにアニールさせて、EREをコードするDNA(以下、ERE DNAという)を作製した。次にERE DNAをT4 DNAリガーゼで互いに結合させて、EREが5回縦列反復したERE \times 5 DNAを得た。T4ポリヌクレオチドキナーゼをERE \times 5 DNAと反応させて、その末端をリン酸化した。

20

【0158】

次に配列番号162に記載のオリゴヌクレオチドと配列番号163に記載のオリゴヌクレオチドとをDNAシンセサイザーで合成した。配列番号162に記載のオリゴヌクレオチドは、マウスメタロチオネインI遺伝子に由来するTATA配列のヌクレオチド配列およびそのリーダー配列中の一方の鎖をコードするように合成した。配列番号163に記載のオリゴヌクレオチドは、配列番号162に記載のオリゴヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列をコードするように合成した。配列番号162と配列番号163に記載のオリゴヌクレオチドを互いにアニールさせて、TATA配列をコードするDNAを作製した。T4ポリヌクレオチドキナーゼを、TATA配列をコードする前記DNAと反応させて、その末端をリン酸化した。

30

【0159】

ホタルルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドpGL3(Promega)を、制限酵素BglIIおよびHindIIIで制限消化した後、65℃で1時間、BAPで処理した。次にその制限消化反応混合物を低融点アガロースゲル電気泳動(アガロースL、ニッポンジーン)にかけて、ホタルルシフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を持つDNA断片が存在することを確認した。次に、ホタルルシフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を持つDNA断片を低融点アガロースゲルから回収した。次に、回収したDNA断片100ngと、TATA配列をコードするDNA 1 μ gとをT4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用して、プラスミドpGL3-TATAを得た。

40

【0160】

プラスミドpGL3-TATAを制限酵素SmaIで制限消化した後、65℃で1時間、BAPで処理した。次に、その制限消化反応混合物を低融点アガロースゲル電気泳動(アガロースL、ニッポンジーン)にかけて、TATA配列とホタルルシフェラーゼとをコードするDNA断片が存在することを確認した。そのようなDNA断片を低融点アガロースゲルから回収した後、回収したDNA断片100ngとERE \times 5 DNA 1 μ gとをT4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用して、プラスミドpGL3-TATA-ERE \times 5を得た。

【0161】

プラスミドpUCSV-BSD(フナコシ)を制限酵素BamHIで制限消化して、プラスミドサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAを調製した。また、プラスミドpGL3-TA

50

TA-ERE × 5を制限酵素BamHIで制限消化した後、65℃で1時間、BAPで処理した。次にプラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNA断片を制限消化したpGL3-TATA-ERE × 5と混合した。次にその混合物を、T4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用して、プラスミドを得た。そのライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5⁺細胞を形質転換した。形質転換細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に単離された各プラスミドの部分試料を制限酵素BamHIで制限消化する。次に、その制限消化反応混合物をアガロースゲル電気泳動にかけて、プラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAがpGL3-TATA-ERE × 5のBamHIの制限部位に挿入されている構造を持つプラスミドが存在するかどうかを確認した。そのような構造を持つプラスミドを選択し、pGL3-TATA-ERE × 5-BSDと名づけた。

10

【 0 1 6 2 】

6.3. 実施例3 安定形質転換カセット細胞の作製

染色体の一つに6.2項で作製したレポーター遺伝子（以下、EREレポーター遺伝子という）を安定に含有する安定形質転換カセット細胞を作製するために、プラスミドpGL3-TATA-ERE × 5-BSDを線状化し、HeLa細胞に導入した。

【 0 1 6 3 】

プラスミドpGL3-TATA-ERE × 5-BSDを線状化するために、pGL3-TATA-ERE × 5-BSDを制限酵素SalIで制限消化した。

20

【 0 1 6 4 】

直径約10cmの培養皿（Falcon）を使用し、10%FBSを含むDMEM培地（日水製薬）にて、5%CO₂下にて37℃で、約5 × 10⁵個のHeLa細胞を宿主細胞として1日培養した。

【 0 1 6 5 】

次に、線状化したpGL3-TATA-ERE × 5-BSDをリポフェクトアミン（Life Technologies）を用いるリポフェクション法によって培養HeLa細胞に導入した。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法の条件には、5時間の処理、7 μg/培養皿の上記プラスミドおよび21 μl/培養皿のリポフェクトアミンを含めた。

【 0 1 6 6 】

リポフェクション処理の後、DMEM培地を、10%FBSを含むDMEM培地と交換し、形質転換したHeLa細胞を約36時間培養した。次に、形質転換HeLa細胞をトリプシン処理によって培養皿から除去、収集し、プラストサイジンSを16 μg/mlの濃度になるように添加した培地を含む容器に移した。プラストサイジンS含有培地を3、4日毎に新しいバッチのプラストサイジンS含有培地に交換しながら、前記プラストサイジンS含有培地で形質転換HeLa細胞を1ヶ月培養した。

30

【 0 1 6 7 】

その結果増殖して1～数mmの直径を持つコロニーを形成することができたクローンを、前もって培地を分注しておいた96ウェルViewPlate（Berthold）のウェルに、丸ごと移した。それらクローンのコロニーをさらに培養した。コロニーが増殖してウェルの底面の50%以上を覆うようになったら（移植の約5日後）、それらのクローンをトリプシン処理によって除去、収集した。次にクローンを2つの継代培養物に分割した。一方の継代培養物は96ウェルViewPlateに移して、それをマスタープレートとした。もう1つの継代培養物は96ウェルViewPlateに移して、これをアッセイプレートとした。マスタープレートとアッセイプレートには、クローンを培養することができるよう培地を含めた。マスタープレートは同様の条件で引き続き培養した。

40

【 0 1 6 8 】

アッセイプレート中の継代培養物を2日間培養した後、培地をアッセイプレートのウェルから除去し、ウェル壁に付着したクローンをPBS(-)で2回洗浄した。5倍希釈した溶解緩衝液PGC50（東洋インキ）をアッセイプレートのウェル中の継代培養物に1ウェルあたり20 μlずつ加えた。そのアッセイプレートを室温で30分間静置した後、自動基質注入器を装着

50

したルミノメーターLB96P (Berthold) にセットした。次に、基質溶液PGL100 (東洋インキ) 50 μ l をアッセイプレート中の各溶解クローンに自動的に分注して、各ウェル中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターLB96Pで測定した。高いルシフェラーゼ活性を示すクローン10個をそこから選択した。

【0169】

次に、選択した10クローンに相当するマスタープレート中のクローン試料を、直径約10cmの培養皿 (Falcon) を用いて、培地中、5%CO₂下に、37℃で1~2週間培養した。

【0170】

次に、リポフェクトアミン (Life Technologies) を用いるリポフェクション法により、プラスミドpRc/RSV-hER Kozakを、上で選択したクローンに導入して、2次クローンを得た。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法の条件には、5時間の処理、7 μ g/培養皿の上記プラスミドおよび21 μ l/培養皿のリポフェクトアミンを含めた。次に、得られた2次クローンに、17 β -E2を含有するDMSO溶液を、濃度が10nMになるように添加した。2次クローンを2日間培養した後、各2次クローンについて上記と同様にルシフェラーゼ活性を測定した。最も高いルシフェラーゼ活性の誘導を示す2次クローンを与えるマスタープレート中のクローンを、染色体の一つにEREレポーター遺伝子を安定に含んでいる安定形質転換カセット細胞 (以下、安定形質転換EREカセット細胞という) として選択した。

【0171】

6.4. 実施例4 安定形質転換バイナリー細胞の作製

EREレポーター遺伝子をヒト変異ER G390D、S578PもしくはG390D/S578Dまたはヒト正常ER と共に含有する4つの安定形質転換細胞 (以下、安定形質転換EREバイナリー細胞という) を作製した。第1の安定形質転換EREバイナリー細胞は、その染色体中にレポーター遺伝子をコードする線状化pGL3-TATA-ERE \times 5-BSDと、ヒト正常ER をコードする線状化pRc/RSV-hER Kozakとを含んだ。第2の安定形質転換EREバイナリー細胞は、その染色体中にEREレポーター遺伝子をコードする線状化pGL3-TATA-ERE \times 5-BSDと、ヒト変異ER G390Dをコードする線状化pRc/RSV-hER G390D Kozakとを含んだ。第3の安定形質転換EREバイナリー細胞は、その染色体中にEREレポーター遺伝子をコードする線状化pGL3-TATA-ERE \times 5-BSDと、ヒト変異ER S578Pをコードする線状化pRc/RSV-hER S578P Kozakとを含んだ。第4の安定形質転換EREバイナリー細胞は、その染色体中にEREレポーター遺伝子をコードする線状化pGL3-TATA-ERE \times 5-BSDと、ヒト変異ER G390D/S578Pをコードする線状化pRc/RSV-hER G390D/S578P Kozakとを含んだ。

【0172】

安定形質転換EREバイナリー細胞を作製するために、プラスミドpGL3-TATA-ERE \times 5-BSD、pRc/RSV-hER G390D Kozak、pRc/RSV-hER S578P KozakおよびpRc/RSV-hER G390D/S578P Kozakをそれぞれ線状化し、HeLa細胞に導入した。線状化するために、上記プラスミドを制限酵素SalIで制限消化した。

【0173】

直径約10cmの培養皿 (Falcon) を使用し、10%FBSを含むDMEM培地 (日水製薬) にて、5%CO₂下に37℃で、約5 \times 10⁵個のHeLa細胞を宿主細胞として1日培養した。

【0174】

下記表6に示すように、線状pGL3-TATA-ERE \times 5-BSDをヒト変異ER またはヒト正常ER をコードする線状プラスミドと共にそれぞれHeLa細胞に導入した。線状化したプラスミドは、リポフェクトアミン (Life Technologies) を用いるリポフェクション法によってHeLa細胞に導入した。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法における各処理の条件には、5時間の処理、7 μ g/培養皿のプラスミド (それぞれ3.5 μ g) および21 μ l/培養皿のリポフェクトアミンを含めた。

【0175】

【表7】

10

20

30

40

	線状化したプラスミド
第1 HeLa細胞	pGL3-TATA-EREx5-BSDおよびpRc/RSV-hER α Kozak
第2 HeLa細胞	pGL3-TATA-EREx5-BSDおよびpRc/RSV-hER α G390D Kozak
第3 HeLa細胞	pGL3-TATA-EREx5-BSDおよびpRc/RSV-hER α S578P Kozak
第4 HeLa細胞	pGL3-TATA-EREx5-BSDおよびpRc/RSV-hER α G390D/S578P Kozak

10

【0176】

リポフェクション処理の後、DMEM培地を、10%FBSを含むDMEM培地と交換し、形質転換HeLa細胞を約36時間培養した。次に、形質転換HeLa細胞をトリプシン処理によって培養皿からそれぞれ除去、収集し、プラストサイジンSおよびG418を添加した培地を含む容器に移した。各細胞培養物についてプラストサイジンSの濃度は16 μ g/mlとした。各細胞培養物についてG418の濃度は800 μ g/mlとした。培地を3、4日毎に新しいバッチのプラストサイジンSおよびG418含有培地に交換しながら、前記プラストサイジンSおよびG418含有培地で形質転換HeLa細胞を1ヶ月培養した。

20

【0177】

その結果1～数mmの直径を持つコロニーまで増殖することができたクローンを、前もって培地を分注しておいた96ウェルViewPlate (Berthold)のウェルに、それぞれ移した。それらのクローンをさらに培養した。クローンが増殖してウェルの底面の50%以上を覆うようになったら(移植の約5日後)、それらのクローンをトリプシン処理によって除去、収集した。次に各クローンを3つの継代培養物に分割した。各クローンについて、1つの継代培養物は96ウェルViewPlateに移して、マスタープレートとした。他の2つの継代培養物はそれぞれ96ウェルViewPlateに移して、アッセイプレートとした。マスタープレートとアッセイプレートには、クローンを培養することができるよう培地を含めた。マスタープレートは同様の条件で引き続き培養する。第1アッセイプレート中の各継代培養物に、17- β -E2を含有するDMSO溶液を、濃度が10nMになるように添加した。第2アッセイプレート中の継代培養物には等体積のDMSOを添加した。次に第1および第2アッセイプレートを2日間培養した。

30

【0178】

次に第1および第2アッセイプレートのウェルから培地を除去し、ウェル壁に付着したクローンをPBS(-)で2回洗浄した。5倍希釈した溶解緩衝液PGC50(東洋インキ)を第1および第2アッセイプレートのウェル中のクローンに1ウェルあたり20 μ lずつ加えた。その第1および第2アッセイプレートを室温で30分間静置した後、自動基質注入器を装着したルミノメーターLB96P (Berthold)にセットした。次に、基質溶液PGL100(東洋インキ)50 μ lをアッセイプレート中の各溶解クローンにそれぞれ自動的に分注して、各ウェル中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターLB96Pで測定した。2倍高いルシフェラーゼ活性の誘導(%)を示した第1アッセイプレート中のクローンに相当するマスタープレート中のクローンを、レポーター遺伝子とヒト変異ER G390D、S578PもしくはG390D/S578P遺伝子またはヒト正常ER 遺伝子とを安定に含有する安定形質転換EREバイナリー細胞として選択した。

40

【0179】

6.5. 実施例5 ヒト変異ER のレポーターアッセイ

6.5.1. レポーターアッセイ用安定形質転換EREバイナリー細胞の調製

次に、上記6.4で作製した約 2×10^4 個の安定形質転換EREバイナリー細胞を96ウェルルミノ

50

メータープレート (Corning Coaster) のウェルに移し、活性炭デキストラン処理FBSを濃度が10% (v/v) になるように添加したE-MEM培地 (以下、活性炭デキストランFBS/E-MEMという) 中で安定形質転換EREバイナリー細胞を終夜培養した。

【0180】

6.5.2. ヒト変異ER K303R、S309F、M396V、G415V、G494VまたはK531Eをコードするプラスミドの導入

それぞれに6.3項で作製した安定形質転換EREカセット細胞約 2×10^6 個を含む7つの継代培養物を、直径約10cmの培養皿 (Falcon) を使って、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地で1日培養した。

【0181】

一過性発現のために、プラスミドpRc/RSV-hER Kozak (6.1.1項で作製したもの、正常ERをコードする) および変異ER をコードするプラスミド (6.1.2.2項で作製したもの、すなわちpRc/RSV-hER K303R Kozak、pRc/RSV-hER S309F Kozak、pRc/RSV-hER M396V Kozak、pRc/RSV-hER G415V Kozak、pRc/RSV-hER G494V Kozak、またはpRc/RSV-hER K531E Kozak、それぞれヒト変異ER をコードする) を、リポフェクトアミン (Life Technologies) を用いるリポフェクション法により、安定形質転換EREカセット細胞の継代培養物に、それぞれ導入した。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法における各処理の条件には、5時間の処理、 $7 \mu\text{g}$ /培養皿のプラスミドおよび $21 \mu\text{l}$ /培養皿のリポフェクトアミンを含めた。得られた細胞培養物を5%CO₂下に37で16時間培養した後、その活性炭デキストランFBS/E-MEM培地を新しいバッチの活性炭デキストランFBS/E-MEM培地に交換して、各細胞継代培養物をさらに3時間培養した。次に、その細胞継代培養物をそれぞれ収集し、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地に均一に懸濁した。

【0182】

6.5.3. レポーター遺伝子転写活性化活性の測定

大別して4種類のDMSO溶液を使用して、上記6.5.1および6.5.2で調製した継代培養物中の細胞を、様々な濃度の完全抗エストロゲンまたは部分抗エストロゲンにばく露した。第1のDMSO溶液は様々な濃度の部分抗エストロゲン (4-ヒドロキシタモキシフェンまたはラロキシフェン) を含むように調製した。第2のDMSO溶液は様々な濃度の完全抗エストロゲン (ZM189154) を含むように調製した。第3のDMSO溶液は10nMのE2と様々な濃度の部分抗エストロゲン (4-ヒドロキシタモキシフェンまたはラロキシフェン) とを含むように調製した。第4のDMSO溶液は、10nMのE2と様々な濃度の完全抗エストロゲン (ZM189154) を含むように調製した。

【0183】

次に第1、第2、第3または第4DMSO溶液を上記6.5.1および6.5.2で調製した継代培養物に、下記表7、8、9および10に示すように添加した。第1、第2、第3または第4DMSO溶液は、各ウェルにおける第1、第2、第3または第4DMSO溶液の濃度が約0.1% (v/v) になるように、96ウェルViewPlateのウェルに添加した。また、96ウェルViewPlateのウェル中の各継代培養物について、2つのコントロールを調製した。一方のコントロールはDMSO (部分抗エストロゲンまたは完全抗エストロゲンを含まない) にばく露した。他方のコントロールは本質的に100pMのE2からなるDMSO溶液にばく露した。

【0184】

次に、細胞を5%CO₂下に37で36~40時間培養した。5倍希釈した溶解緩衝液PGC50 (東洋インキ) をウェル中の細胞に1ウェルあたり50 μl ずつ加えた。その96ウェルViewPlateをときどき穏やかに振とうしながら室温で30分間インキュベートした。次に、溶解した細胞10 μl をそれぞれ白色96ウェルサンプルプレート (Berthold) に移し、自動基質注入器を装着したルミノメーターLB96P (Berthold) にセットした。次に、基質溶液PGL100 (東洋インキ) 50 μl を白色96ウェルサンプルプレート中の各溶解細胞にそれぞれ自動的に分注して、各ウェル中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターLB96Pで直ちに5秒間測定した。

【0185】

10

20

30

40

50

6.5.2項で調製した細胞から得られるルシフェラーゼ活性を図1～32に図示する。

【0186】

図1および2は、ヒト正常ER またはヒト変異ER K303Rを刺激する可能性がある単独の薬剤として4-ヒドロキシタモキシフェンまたはZM189154が存在する状態でヒト正常ER またはヒト変異ER K303Rがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

【0187】

図3は、E2とZM189154とが存在する状態でヒト正常ER およびヒト変異ER K303Rがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

【0188】

図4および5は、ヒト正常ER またはヒト変異ER S309Fを刺激する可能性がある単独の薬剤として4-ヒドロキシタモキシフェンまたはZM189154が存在する状態でヒト正常ER およびヒト変異ER S309Fがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

10

【0189】

図6は、E2とZM189154とが存在する状態でヒト正常ER およびヒト変異ER S309Fがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

【0190】

図7および8は、ヒト正常ER またはヒト変異ER M396Vを刺激する可能性がある単独の薬剤として4-ヒドロキシタモキシフェンまたはラロキシフェンが存在する状態でヒト正常ER およびヒト変異ER M396Vがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

【0191】

20

図9～11は、E2と4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェンまたはZM189154とが存在する状態でヒト正常ER およびヒト変異ER M396Vがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

【0192】

図12および13は、ヒト正常ER またはヒト変異ER G415Vを刺激する可能性がある単独の薬剤として4-ヒドロキシタモキシフェンまたはZM189154が存在する状態でヒト正常ER およびヒト変異ER G415Vがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

【0193】

図14および15は、E2と4-ヒドロキシタモキシフェンまたはZM189154とが存在する状態でヒト正常ER およびヒト変異ER G415Vがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

30

【0194】

図16～17は、ヒト正常ER またはヒト変異ER G494Vを刺激する可能性がある単独の薬剤として4-ヒドロキシタモキシフェンまたはラロキシフェンが存在する状態でヒト正常ER およびヒト変異ER G494Vがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

【0195】

図18～20は、E2と4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェンまたはZM189154とが存在する状態でヒト正常ER およびヒト変異ER G494Vがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

【0196】

図21～26は、ヒト正常ER またはヒト変異ER K531Eを刺激する可能性がある単独の薬剤として4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェンまたはZM189154が存在する状態でヒト正常ER およびヒト変異ER K531Eがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

40

【0197】

図27～32は、E2と4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェンまたはZM189154とが存在する状態でヒト正常ER およびヒト変異ER K531Eがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

【0198】

6.5.1項で調製した細胞から得られるルシフェラーゼ活性を図33～48に示す。

【0199】

図33～40は、ヒト正常ER 、ヒト変異ER G390D、ヒト変異ER S578Pおよびヒト変異ER

50

G390D/S578Pを刺激する可能性がある単独の薬剤として4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェンまたはZM189154が存在する状態でヒト正常ER、ヒト変異ER G390D、ヒト変異ER S578Pおよびヒト変異ER G390D/S578Pがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

【 0 2 0 0 】

図41～48は、E2と4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェンまたはZM189154とが存在する状態でヒト正常ER、ヒト変異ER G390D、ヒト変異ER S578Pおよびヒト変異ER G390D/S578Pがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

【 0 2 0 1 】

【表 8】

	使用したヒト正常または変異ER α 用プラスミド	DMSO溶液	曝露した部分抗エストロゲンまたは完全抗エストロゲン
1	pRc/RSV-hER α Kozak	第1溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
2	pRc/RSV-hER α K303R Kozak	第1溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
3	pRc/RSV-hER α Kozak	第2溶液	ZM189154
4	pRc/RSV-hER α K303R Kozak	第2溶液	ZM189154
5	pRc/RSV-hER α Kozak	第4溶液	ZM189154
6	pRc/RSV-hER α K303R Kozak	第4溶液	ZM189154
7	pRc/RSV-hER α Kozak	第1溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
8	pRc/RSV-hER α S309F Kozak	第1溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
9	pRc/RSV-hER α Kozak	第2溶液	ZM189154
10	pRc/RSV-hER α S309F Kozak	第2溶液	ZM189154
11	pRc/RSV-hER α Kozak	第4溶液	ZM189154
12	pRc/RSV-hER α S309F Kozak	第4溶液	ZM189154

10

20

30

【 0 2 0 2 】

【表 9】

	使用したヒト正常または 変異ER α 用プラスミド	DMSO溶液	曝露した部分抗エストロゲン または完全抗エストロゲン
13	pRc/RSV-hER α Kozak	第1溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
14	pRc/RSV-hER α M396V Kozak	第1溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
15	pRc/RSV-hER α Kozak	第1溶液	ラロキシフェン
16	pRc/RSV-hER α M396V Kozak	第1溶液	ラロキシフェン
17	pRc/RSV-hER α Kozak	第3溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
18	pRc/RSV-hER α M396V Kozak	第3溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
19	pRc/RSV-hER α Kozak	第3溶液	ラロキシフェン
20	pRc/RSV-hER α M396V Kozak	第3溶液	ラロキシフェン
21	pRc/RSV-hER α Kozak	第4溶液	ZM189154
22	pRc/RSV-hER α M396V Kozak	第4溶液	ZM189154
23	pRc/RSV-hER α Kozak	第1溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
24	pRc/RSV-hER α G415V Kozak	第1溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
25	pRc/RSV-hER α Kozak	第2溶液	ZM189154
26	pRc/RSV-hER α G415V Kozak	第2溶液	ZM189154
27	pRc/RSV-hER α Kozak	第3溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
28	pRc/RSV-hER α G415V Kozak	第3溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
29	pRc/RSV-hER α Kozak	第4溶液	ZM189154
30	pRc/RSV-hER α G415V Kozak	第4溶液	ZM189154

10

20

30

【 0 2 0 3 】

【 表 1 0 】

	使用したヒト正常または変異ER α 用プラスミド	DMSO溶液	曝露した部分抗エストロゲンまたは完全抗エストロゲン
31	pRc/RSV-hER α Kozak	第1溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
32	pRc/RSV-hER α G494V Kozak	第1溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
33	pRc/RSV-hER α Kozak	第1溶液	ラロキシフェン
34	pRc/RSV-hER α G494V Kozak	第1溶液	ラロキシフェン
35	pRc/RSV-hER α Kozak	第3溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
36	pRc/RSV-hER α G494V Kozak	第3溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
37	pRc/RSV-hER α Kozak	第3溶液	ラロキシフェン
38	pRc/RSV-hER α G494V Kozak	第3溶液	ラロキシフェン
39	pRc/RSV-hER α Kozak	第4溶液	ZM189154
40	pRc/RSV-hER α G494V Kozak	第4溶液	ZM189154
41	pRc/RSV-hER α Kozak	第4溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
42	pRc/RSV-hER α K531E Kozak	第4溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
43	pRc/RSV-hER α Kozak	第1溶液	ラロキシフェン
44	pRc/RSV-hER α K531E Kozak	第1溶液	ラロキシフェン
45	pRc/RSV-hER α Kozak	第2溶液	ZM189154
46	pRc/RSV-hER α K531E Kozak	第2溶液	ZM189154
47	pRc/RSV-hER α Kozak	第3溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
48	pRc/RSV-hER α K531E Kozak	第3溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
49	pRc/RSV-hER α Kozak	第3溶液	ラロキシフェン
50	pRc/RSV-hER α K531E Kozak	第3溶液	ラロキシフェン
51	pRc/RSV-hER α Kozak	第4溶液	ZM189154
52	pRc/RSV-hER α K531E Kozak	第4溶液	ZM189154

10

20

30

40

【 0 2 0 4 】

【 表 1 1 】

	染色体にコードされている ヒト正常または変異ER α	DMSO溶液	曝露した部分抗エストロゲン または完全抗エストロゲン
53	ヒト正常 ER α	第1溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
54	ヒト変異ER α G390D	第1溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
55	ヒト変異ER α S578P	第1溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
56	ヒト変異ER α G390D/S578P	第1溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
57	ヒト正常 ER α	第1溶液	ラロキシフェン
58	ヒト変異ER α G390D/S578P	第1溶液	ラロキシフェン
59	ヒト正常 ER α	第2溶液	ZM189154
60	ヒト変異 ER α G390D/S578P	第2溶液	ZM189154
61	ヒト正常 ER α	第3溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
62	ヒト変異 ER α G390D	第3溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
63	ヒト変異 ER α S578P	第3溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
64	ヒト変異ER α G390D/S578P	第3溶液	4-ヒドロキシタモキシフェン
65	ヒト正常 ER α	第3溶液	ラロキシフェン
66	ヒト変異 ER α G390D/S578P	第3溶液	ラロキシフェン
67	ヒト正常 ER α	第4溶液	ZM189154
68	ヒト変異 ER α G390D/S578P	第4溶液	ZM189154

10

20

30

【 0 2 0 5 】

6.6. 実施例6 比較用二重一過性レポーターアッセイ

約 2×10^6 個のHeLa細胞を、直径約10cmの培養皿（Falcon）を使って、活性炭デキストラン FBS/E-MEM培地中、5%CO₂下に37℃で、1日培養した。HeLa細胞を培養した後、それらHeLa細胞を2つの継代培養物に分割した。

【 0 2 0 6 】

次に、一過性発現のために、3.75 μ gのpRc/RSV-hER Kozakと3.75 μ gのpGL3-TATA-ERE \times 5とを、第1継代培養物中のHeLa細胞に、リポフェクタミンを用いるリポフェクション法で導入した。第2の継代培養物には、一過性発現のために、3.75 μ gのpRc/RSV-hER K531E Kozakと3.75 μ gのpGL3-TATA-ERE \times 5とを、リポフェクタミンを用いるリポフェクション法で導入した。次に、第1および第2継代培養物を5%CO₂下に37℃で16時間培養した。活性炭デキストランFBS/E-MEM培地を新しいバッチの活性炭デキストランFBS/E-MEM培地と交換した後、第1および第2継代培養物を同様に3時間培養した。次に第1および第2継代培養物中の細胞をそれぞれ収集し、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地に均一に懸濁した。

【 0 2 0 7 】

第1および第2継代培養物中の細胞をばく露するために、大別して2種類のDMSO溶液を調製

40

50

した。第1DMSO溶液は様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェンを含むように調製した。第2DMSO溶液は10nMのE2と様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェンを含むように調製した。

【0208】

次に第1および第2DMSO溶液をそれぞれ、96ウェルViewPlate中の第1および第2継代培養物と、各ウェルにおける第1または第2DMSO溶液の濃度が約0.1% (v/v) になるように混合した。

【0209】

次に第1および第2継代培養物を5%CO₂下に37℃で36時間培養した。5倍希釈した溶解緩衝液PGC50 (ニッポンジーン) を、ウェル中の第1および第2継代培養物に、1ウェルあたり50 μlずつ加えた。その96ウェルViewPlateをとときどき穏やかに振とうしながら室温で30分間インキュベートした。次に、得られた溶解細胞10 μlをそれぞれ白色96ウェルサンプルプレート (Berthold) に移し、自動基質注入器を装着したルミノメーターLB96P (Berthold) にセットした。次に、基質溶液PGL100 (東洋インキ) 50 μlを白色96ウェルサンプルプレート中の各溶解細胞にそれぞれ自動的に分注して、各ウェル中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターLB96Pで直ちに5秒間測定した。

【0210】

上記二重-過性レポーターアッセイで得られるルシフェラーゼ活性を図49～52に示す。

【0211】

図49および50は、ヒト正常ER またはヒト変異ER K531Eを刺激する可能性がある単独の薬剤として4-ヒドロキシタモキシフェンが存在する状態でヒト正常ER およびヒト変異ER K531Eがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

【0212】

図51および52は、E2と4-ヒドロキシタモキシフェンとが存在する状態でヒト正常ER およびヒト変異ER K531Eがもたらすルシフェラーゼ活性を表す。

【0213】

6.7. 実施例7 検索オリゴヌクレオチド

ヒト試験ER 中の置換アミノ酸をコードする変異コドンを検索するために、ヒト試験ER 遺伝子がヒト正常ER をコードする場合には検索オリゴヌクレオチドがヒト試験ER 遺伝子中の検索領域にアニールできるように、検索オリゴヌクレオチドを設計する。検索領域は、相対位置303のアミノ酸をコードするコドン、相対位置309のアミノ酸をコードするコドン、相対位置390のアミノ酸をコードするコドン、相対位置396のアミノ酸をコードするコドン、相対位置415のアミノ酸をコードするコドン、相対位置494のアミノ酸をコードするコドン、相対位置531のアミノ酸をコードするコドン、または相対位置578のアミノ酸をコードするコドンを含む。また、上記オリゴヌクレオチドは30～70%のGC含量と20bpのサイズとを持つように設計する。このように設計したオリゴヌクレオチドに基づいて、上記の本発明オリゴヌクレオチドをDNAシンセサイザー (モデル394、Applied Biosystems) で合成する。

【0214】

6.8. 実施例8 PCR増幅およびヌクレオチド配列決定法による遺伝子型診断

試験ヒト肝組織試料を使って、当該試料中の試験ER ポリヌクレオチドの遺伝子型を診断する。試験ヒト肝組織試料を利用するにあたって、4Mチオシアン酸ゲアニジウム、0.1M トリス-HCl (pH7.5) および1% β-メルカプトエタノールを含む緩衝液5mlにて、0.1gの試験ヒト肝組織試料をホモジナイザーでホモジナイズする。得られた緩衝液を25mlの5.7M CsCl水溶液に重層し、90,000 × gで24時間超遠心分離することにより、RNAペレットを得る。そのRNAペレットを70%エタノールで濯いだ後、RNAペレットを室温で風乾する。次にそのRNAペレットを1.2 μg/mlの濃度になるように滅菌水10 μlに溶解する。次に、RNA溶液中のRNAを逆転写反応におけるテンプレートとして一括して使用することにより、試験cDNAの溶液を作製する。試験cDNAを作製するにあたって、Superscript II (Gibco) を1 μlのRNA溶液、オリゴ-dTオリゴヌクレオチド (Amersham-Pharmacia) 、およびオリゴ-dTと一緒に

10

20

30

40

50

に提供される緩衝液と共に使用した。逆転写反応は37 で1時間行った。

【 0 2 1 5 】

1/50体積の試験cDNA試料を使用し、下記表11に示す検索オリゴヌクレオチドの組み合わせを使って、PCR増幅を行う。

【 0 2 1 6 】

【表 1 2】

	検索オリゴヌクレオチド
1	SEQ ID:32 および SEQ ID:38
2	SEQ ID:42 および SEQ ID:48
3	SEQ ID:52 および SEQ ID:58
4	SEQ ID:62 および SEQ ID:68
5	SEQ ID:72 および SEQ ID:78
6	SEQ ID:82 および SEQ ID:88
7	SEQ ID:92 および SEQ ID:98
8	SEQ ID:109 および SEQ ID:110

10

20

【 0 2 1 7 】

これらのPCR増幅では、PCR混合物は試験cDNA、AmpliTaq DNAポリメラーゼ（Perkin Elmer）、100 μMのdNTP（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）、検索オリゴヌクレオチドの組み合わせの一つ、AmpliTaqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液を含む。このPCR増幅では、95 で1分間のインキュベーション、次いで55 で30秒間のインキュベーションの後、72 で1分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを、各PCR増幅について35回繰り返す。得られた検索領域ポリヌクレオチドを1%低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかけて、回収する。回収された検索領域ポリヌクレオチドの全量を用いて、検索領域を配列決定する。検索領域のヌクレオチド配列をヒト正常ER をコードするヌクレオチド配列と比較する。

30

【 0 2 1 8 】

6.9. 実施例9 SSCP法による遺伝子型診断

6.9.1. 試験組織試料からの試験ゲノムcDNAの抽出

TAKARA PCR Technical news No.2（宝酒造、1991年9月）に記載の方法に従って試験組織試料から試験ゲノムDNAを調製する。この方法を本発明との関連で以下に説明する。

40

【 0 2 1 9 】

試験対象の毛髪試料2～3本を滅菌水で洗浄した後、100%エタノールで洗浄する。毛髪試料を風乾した後、毛髪試料を2～3mmに切断してプラスチック製試験管に移す。そこに200 μlのBCL（10mM トリス-HCl（pH7.5）、5mM MgCl₂、0.32Mショ糖、1%トリトンX-100）を加える。次に、プロテイナーゼK溶液とSDS溶液をそれぞれ100 μg/mlおよび0.5%（w/v）になるように混合する。

【 0 2 2 0 】

得られた混合物を70 で1時間インキュベートした後、その混合物をフェノール-クロロホルム抽出して、そこから水層を回収する。フェノール-クロロホルム抽出では、実質的に等体積のフェノール-クロロホルムを上記混合物に加える。その混合物を激しく振とうし

50

、遠心分離する（15,000rpm、20,000×g、5分、4）。そこから、フェノール層を乱さないようにピペットで水層を取り出す。次に、その水層を使って、2回目のフェノール-クロロホルム抽出を同様に行う。

【0221】

実質的に等体積のクロロホルムを2回目のフェノール-クロロホルム抽出で得た水層と混合して、得られたクロロホルム混合物から水層を取り出す。クロロホルムによるこの抽出では、クロロホルム混合物を激しく振とうし、水層をクロロホルム混合物から取り出すことができるように遠心分離する。次に、クロロホルム混合物から取り出した水層に500μlの100%エタノールを加える。その中の試験ゲノムDNAを-80で20分間沈殿させた後、遠心分離して試験ゲノムDNAのペレットを得る。得られた試験ゲノムDNAのペレットを乾燥し、試験ゲノムDNAを試験ERポリヌクレオチドにすることができるよう、滅菌水に溶解する。

10

【0222】

もう1つの選択肢として、末梢血を試験試料として使用し、そこから試験ゲノムDNAを得ることもできる。10mlの血液を試験対象から採取し、DNA Extraction Kit (Stratagene) を使ってその血液から試験ゲノムDNAを抽出する。

【0223】

6.9.2. PCR-SSCP法による試験ゲノムDNAの解析

試験ゲノムDNAを用いるPCR増幅のために、フォワード検索オリゴヌクレオチドとリバース検索オリゴヌクレオチドの組み合わせを選択する。フォワードおよびリバース検索オリゴヌクレオチドは、試験ERポリヌクレオチド中の検索領域の位置に基づいて選択される。下記表12に、フォワードおよびリバース検索オリゴヌクレオチドの組み合わせを、与えられた相対位置の置換アミノ酸をコードする変異コドンを含むと疑われる検索領域と共に示す。

20

【0224】

【表13】

検索領域	フォワード検索 オリゴヌクレオチド	リバース検索 オリゴヌクレオチド	
相対位置303	SEQ ID:29, SEQ ID:30, SEQ ID:31, SEQ ID:32 or SEQ ID:33	SEQ ID:34, SEQ ID:35, SE Q ID:36, SEQ ID:37 or SEQ ID:38	
相対位置309	SEQ ID:39, SEQ ID:40, SEQ ID:41, SEQ ID:42 or SEQ ID:43	SEQ ID:44, SEQ ID:45, SEQ ID:46, SEQ ID:47 or SEQ ID:48	10
相対位置390	SEQ ID:49, SEQ ID:50, SEQ ID:51, SEQ ID:52 or SEQ ID:53	SEQ ID:54, SEQ ID:55, SEQ ID:56, SEQ ID:57 or SEQ ID:58	
相対位置396	SEQ ID:59, SEQ ID:60, SEQ ID:61, SEQ ID:62 or SEQ ID:63	SEQ ID:64, SEQ ID:65, SEQ ID:66, SEQ ID:67 or SEQ ID:68	20
相対位置415	SEQ ID:69, SEQ ID:70, SEQ ID:71, SEQ ID:72 or SEQ ID:73	SEQ ID:74, SEQ ID:75, SEQ ID:76, SEQ ID:77 or SEQ ID:78	
相対位置494	SEQ ID:79, SEQ ID:80, SEQ ID:81, SEQ ID:82 or SEQ ID:83	SEQ ID:84, SEQ ID:85, SEQ ID:86, SEQ ID:87 or SEQ ID:88	30
相対位置531	SEQ ID:89, SEQ ID:90, SEQ ID:91, SEQ ID:92 or SEQ ID:93	SEQ ID:94, SEQ ID:95, SE Q ID:96, SEQ ID:97 or SEQ ID:98	
相対位置578	SEQ ID:99, SEQ ID:100, SEQ ID:101, SEQ ID:102 or SEQ ID:103	SEQ ID:104, SEQ ID:105, SEQ ID:106, SEQ ID:107 o r SEQ ID:108	40

【 0 2 2 5 】

フォワードおよびリバース検索オリゴヌクレオチドの組み合わせをDNAシンセサイザーで合成する。DNA MEGALABEL Kit (宝酒造) を使ってフォワードおよびリバース検索オリゴヌクレオチドのそれぞれを³²Pで標識する。次に試験ゲノムDNAをそれぞれPCR増幅に使用して、増幅された検索領域ポリヌクレオチドを得る。これらのPCR増幅において各PCR混合

物はAmplitaq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer)、400 μ MのdNTP (100 μ M dATP、100 μ M dTTP、100 μ M dGTPおよび100 μ M dCTP)、100pmolの³²P標識フォワード検索オリゴヌクレオチド、100pmolの³²P標識リバーズ検索オリゴヌクレオチド、1 μ gの試験ゲノムDNA、およびAmplitaq DNAポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液を含む。各PCR増幅では、94で1分間のインキュベーション、次いで55で30秒間のインキュベーションの後、72で1分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを、各PCR増幅について35回繰り返す。

【0226】

PCR増幅後に、増幅された各検索領域ポリヌクレオチドから採取した1/20体積の試料を80%ホルムアミド中、80で5分間熱変性させる。次に、熱変性した各検索領域ポリヌクレオチドを、180mM トリス-ホウ酸緩衝液 (pH8.0) を用いる5%非変性ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動にかける。電気泳動の条件には室温空冷かつ40Wの定電力で60分を含める。電気泳動後に、その5%非変性ポリアクリルアミドゲルをX線フィルムを使って従来の方法でオートラジオグラフィーにかけて、検索領域の放射活性を検出する。

【0227】

変異コドンコードする産物は5%非変性ポリアクリルアミドゲルでは正常コドンコードする産物とは異なる移動度を持つので、検索領域ポリヌクレオチドの各移動度を、ヒト正常ER中の対応する領域をコードする標準ポリヌクレオチドと比較することにより、検索領域中の変異の有無が検出される。

【0228】

6.9.3. 変異の決定

検索領域中の変異コドンを検出したら、検索領域ポリヌクレオチドを含む1mm角の切片を5%非変性ポリアクリルアミドゲルから切り出す。1mm角の切片のそれぞれを100 μ lの滅菌水中90で10分間処理して、検索領域ポリヌクレオチドを1mm角の切片から回収する。次に、検索領域ポリヌクレオチドの1/20体積試料をそれぞれ2回目のPCR増幅に使用する。これらのPCR増幅では、上記6.9.2項で使用した検索オリゴヌクレオチドの組み合わせを使用した。これらのPCR増幅における各PCR混合物は、Amplitaq DNAポリメラーゼ (ABI)、400 μ MのdNTP (100 μ M dATP、100 μ M dTTP、100 μ M dGTPおよび100 μ M dCTP)、フォワード検索オリゴヌクレオチド、リバーズ検索オリゴヌクレオチド、試験DNA断片の一つ、およびAmplitaq DNAポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液を含む。各PCR増幅では、94で1分間のインキュベーション、次いで55で30秒間のインキュベーションの後、72で1分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを、35回繰り返す。

【0229】

反応の完了後に、増幅された検索領域ポリヌクレオチドを、低融点アガロースゲル電気泳動 (アガロースL、ニッポンジーン) にかける。増幅された検索領域ポリヌクレオチドを低融点アガロースゲルから回収した後、回収された検索領域ポリヌクレオチドを、Dye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を使って調製する。調製した検索領域ポリヌクレオチドの試料をそれぞれABI自動シーケンサー (モデル377、Applied Biosystems) で配列決定して、検索領域中に変異コドンがあれば、その変異コドン中の変異を決定する。

【0230】

6.10. 実施例10 RFLP法による遺伝子型診断

試験ゲノムDNAまたは試験cDNAを用いるPCR増幅のために、フォワード検索オリゴヌクレオチドとリバーズ検索オリゴヌクレオチドの組み合わせを選択する。フォワードおよびリバーズ検索オリゴヌクレオチドは、試験ERポリヌクレオチド中の検索領域の位置に基づいて選択される。下記表13に、フォワードおよびリバーズ検索オリゴヌクレオチドの組み合わせを、与えられた相対位置の置換アミノ酸をコードする変異コドンを含むと疑われる検索領域と共に示す。

【0231】

【表14】

検索領域	オリゴヌクレオチド
相対位置303	SEQ ID:164 および SEQ ID:165
相対位置309	SEQ ID:166 および SEQ ID:167
相対位置396	SEQ ID:168 および SEQ ID:169
相対位置415	SEQ ID:170 および SEQ ID:171
相対位置494	SEQ ID:172 および SEQ ID:173
相対位置531	SEQ ID:174 および SEQ ID:175

10

【 0 2 3 2 】

PCR増幅に試験ゲノムDNAまたは試験cDNAを使って、約100または160bpのサイズを持つ検索領域ポリヌクレオチドを増幅する。これらのPCR増幅における各PCR混合物は、Amplitaq DNAポリメラーゼ（ABI）、試験ゲノムDNAまたは試験cDNA、dNTP（dATP、dTTP、dGTPおよびdCTP）、フォワード検索オリゴヌクレオチド、リバーズ検索オリゴヌクレオチド、および

20

【 0 2 3 3 】

次に、各検索領域ポリヌクレオチドの試料をそれぞれ制限消化反応用の様々な制限酵素（各制限消化反応につき1制限酵素）と混合し、37℃で1時間インキュベートする。その制限消化反応混合物をアガロースゲル電気泳動にかけて、検索領域ポリヌクレオチドが様々な制限酵素の一つによってうまく制限消化されるかどうかを確認する。下記表14および表15に示す制限酵素による制限消化の成功により、下記表14および表15に示す与えられた相対位置の置換アミノ酸をコードする変異コドンが検索領域中に存在するかどうかを示される

30

【 0 2 3 4 】

【表 1 5】

	相対位置309	相対位置494
制限酵素	Apa I	Stu I
検索領域のおよその長さ	100bp	150bp
<u>正常コドン</u> をコードする場合		
制限消化	Yes	Yes
生成するDNA断片のおよその長さ	40bp/60bp	100bp/50bp

40

【 0 2 3 5 】

表14では、与えられた相対位置のアミノ酸をコードするコドンにおける与えられた制限酵素による制限消化の不成功により、当該コドンは変異コドンであることが示される。この

50

ような場合は、ABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）を使って当該検索領域を配列決定して、検索領域中に変異コドンがあるなら、その変異コドン中の変異を決定する。

【 0 2 3 6 】

【表 1 6】

	相対位置 303	相対位置 396	相対位置 415	相対位置 531
制限酵素	Stu I	ApaL I	Kpn I	Sac I
検索領域のおよその長さ	100 bp	100bp	100bp	100bp
<u>正常コドン</u> をコードする場合				
制限消化	no	no	no	no
生成するDNA断片のおよその長さ	—	—	—	—
<u>変異コドン</u> をコードする場合				
想定される変異コドンの配列	AGG	GTG	GTA	GAG
制限消化	Yes	Yes	Yes	Yes
生成するDNA断片のおよその長さ	40bp/60bp	40bp/60bp	40bp/60bp	40bp/60bp

【 0 2 3 7 】

表15の場合は、与えられた相対位置のアミノ酸をコードするコドンにおける与えられた制限酵素による制限消化の成功により、当該コドンは変異コドンであることが示される。このような場合は、検索領域中に変異コドンがあるとすれば、その変異コドン中の変異は上記表15に記載のヌクレオチド配列であると決定される。

【 0 2 3 8 】

6.11．実施例11 サザンハイブリダイゼーション法による遺伝子型診断

6.9.1項で得た5 µgの試験ゲノムDNAを制限酵素StuIで完全に制限消化する。その制限消化反応混合物を、4%Nusieve 3:1アガロースゲル（FMC BIO）を使って、20Vで16時間の電気泳動にかける。キャピラリーアルカリプロット法（Hybond blotting membrane manual、A

10

20

30

40

50

merscham) を使って、4%Nuseive 3:1アガロースゲル中の分離されたDNA断片をナイロンメンブレンに2時間プロットする。続いて、プロットしたフィルターを2×SSC緩衝液(0.3 M NaCl、0.33M クエン酸Na、pH7.0)で軽く洗浄し、プロットしたナイロンメンブレンを80℃で90分間乾燥する。

【0239】

プロットしたナイロンメンブレンを55℃で16時間、プレハイブリダイゼーション緩衝液(6×SSPE(0.9M NaCl、0.052M NaH₂PO₂、7.5mM EDTA)、0.5%SDS、5×デンハルト液、および0.1mg/mlサケ精子DNA)で処理する。次にプレハイブリダイゼーション緩衝液を等体積のハイブリダイゼーション緩衝液(6×SSPE(0.9M NaCl、0.052M NaH₂PO₂、7.5mM EDTA)、0.5%SDS、5×デンハルト液、0.1mg/mlサケ精子DNAおよび³²P標識プローブオリゴヌクレオチド)と交換する。ハイブリダイゼーション緩衝液中の³²P標識プローブオリゴヌクレオチドの放射能濃度は、ハイブリダイゼーション緩衝液150ml毎に少なくとも10×10⁸ cpmである。³²P標識プローブオリゴヌクレオチドとしては、末端が³²Pで標識された配列番号81に記載のオリゴヌクレオチドを利用する。³²P標識プローブは、T4ポリヌクレオチドキナーゼと一緒に提供される緩衝液中で、³²P-ATP、T4ポリヌクレオチドキナーゼおよび配列番号81に記載のオリゴヌクレオチド1μgを、37℃で1時間インキュベートすることによって作製する。

【0240】

ハイブリダイゼーションの後、プロットしたナイロンメンブレンを、1×SSC(0.15M NaCl、15mMクエン酸ナトリウム)および0.5%SDSを含む洗浄緩衝液で2回洗浄する。プロットしたフィルターを2回洗浄する際には、各洗浄後に、プロットしたナイロンメンブレンを洗浄緩衝液中、62℃で40分間インキュベートする。

【0241】

次にプロットしたメンブレンをX線フィルムで10日間オートラジオグラフィーにかけて、制限酵素StuIが相対位置494の置換アミノ酸をコードする変異コドンと思われる検索領域中のコドンとオーバーラップする制限部位を制限消化することができるかどうかを解析する。制限酵素StuIによる制限消化の成功は、試験ER ポリヌクレオチド中に、相対位置494のアミノ酸をコードするコドンとオーバーラップして、AGGCCTを包含するヌクレオチド配列が存在することを示す。このような場合、試験ER は正常ER であると決定される。対応する部位での制限酵素StuIによる制限消化の失敗は、試験ER ポリヌクレオチドの相対位置494に置換アミノ酸をコードする変異コドンが存在することを示す。このような場合は、ABI自動シーケンサー(モデル377、Applied Biosystems)を使って検索領域を配列決定し、検索領域に変異コドンがあれば、その中の変異を決定する。

【0242】

6.12. 実施例12 ヒト正常ARをコードするプラスミドの作製

ヒト前立腺cDNAライブラリー(CLONETECH、QUICK clone cDNA #7123-1)を利用して、そこからヒト正常ARをコードするcDNA(Genbankアクセッション番号M23263)をPCR増幅する。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト前立腺cDNAライブラリー10ng、配列番号176に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、配列番号177に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、LA-Taqポリメラーゼ(宝酒造)、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP(dATP、dTTP、dGTP、dCTP)を含む。配列番号176および配列番号177に記載のオリゴヌクレオチドは、DNAシンセサイザー(モデル394、Applied Biosystems)を使って合成する。このPCR増幅では、PCRsystem 9700(Applied Biosystems)を使って、95℃で1分間のインキュベーションの後、68℃で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを35回繰り返す。

【0243】

得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動(アガロースL、ニッポンジーン)にかけて、ヒト正常ARをコードするcDNAがPCR増幅されることを臭化エチジウム染色で確認する。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、回収したcDNAの試料をDye Terminator Sequence Kit FS(Applied Biosystems)を使って調製する。調製したcDNA

試料をABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定する。

【0244】

次に、cDNA中の開始コドン（ATG）のすぐ上流にKozakコンセンサス配列を加えるために、新たなPCR増幅を行う。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト正常ARをコードするcDNA 100ng、配列番号178に記載のオリゴヌクレオチドと配列番号179に記載のオリゴヌクレオチド、LA-Taqポリメラーゼ（宝酒造）、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）を含む。このPCR増幅では、95 で1分間のインキュベーションの後、68 で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを25回繰り返す。得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかける。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、1 μgの増幅cDNAをDNA Blunting Kit（宝酒造）で処理して、増幅cDNAの末端を平滑化する。次に、それによって得たcDNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼと反応させて、その末端をリン酸化する。リン酸化されたcDNAをフェノール処理した後、リン酸化cDNAをエタノール沈殿して、精製型のリン酸化cDNAを得る。

10

【0245】

プラスミドpRc/RSV（Invitrogen）を制限酵素HindIIIで消化した後、65 で1時間、BAPで処理する。次に、制限消化pRc/RSVをフェノール処理およびエタノール沈殿によって精製する。次に、制限消化pRc/RSVをDNA Blunting Kit（宝酒造）で処理してその末端を平滑化し、低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかける。制限消化されたpRc/RSVを低融点アガロースゲルから回収した後、その制限消化pRc/RSV 100ng および上記精製型リン酸化cDNAの全てをT4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。そのライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5 細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS（Applied Biosystems）を使って調製する。単離されたプラスミドをABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定して、ヒト正常ARをコードするプラスミドが存在することを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pRc/RSV-hAR Kozakと名づける。

20

【0246】

6.13．実施例13 ヒト正常GRをコードするプラスミドの作製

ヒト肝臓cDNAライブラリー（CLONETECH、QUICK clone cDNA # 7113-1）を利用して、そこからヒト正常GRをコードするcDNA（Genbankアクセス番号M10901）をPCR増幅する。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト肝臓cDNAライブラリー10ng、配列番号180に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、配列番号181に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、LA-Taqポリメラーゼ（宝酒造）、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）を含む。配列番号180および配列番号181に記載のオリゴヌクレオチドは、DNAシンセサイザー（モデル394、Applied Biosystems）を使って合成する。このPCR増幅では、PCRsystem 9700（Applied Biosystems）を使って、95 で1分間のインキュベーションの後、60 で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを35回繰り返す。

40

【0247】

得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかけて、ヒト正常GRをコードするcDNAがPCR増幅されることを臭化エチジウム染色で確認する。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、回収したcDNAの試料をDye Terminator Sequence Kit FS（Applied Biosystems）を使って調製する。調製したcDNA試料をABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定する。

【0248】

次に、cDNA中の開始コドン（ATG）のすぐ上流にKozakコンセンサス配列を加えるために、新たなPCR増幅を行う。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト正常GRをコードするcDNA

50

100ng、配列番号182に記載のオリゴヌクレオチドと配列番号183に記載のオリゴヌクレオチド、LA-Taqポリメラーゼ（宝酒造）、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）を含む。このPCR増幅では、95℃で1分間のインキュベーションの後、60℃で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを25回繰り返す。得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかける。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、1μgの増幅cDNAをDNA Blunting Kit（宝酒造）で処理して、増幅cDNAの末端を平滑化する。次に、それによって得たcDNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼと反応させて、その末端をリン酸化する。リン酸化されたcDNAをフェノール処理した後、リン酸化cDNAをエタノール沈殿して、精製型のリン酸化cDNAを得る。

10

【0249】

プラスミドpRc/RSV（Invitrogen）を制限酵素HindIIIで消化した後、65℃で1時間、BAPで処理する。次に、制限消化pRc/RSVをフェノール処理およびエタノール沈殿によって精製する。次に、制限消化pRc/RSVをDNA Blunting Kit（宝酒造）で処理してその末端を平滑化し、低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかける。制限消化されたpRc/RSVを低融点アガロースゲルから回収した後、その制限消化pRc/RSV 100ngおよび上記精製型リン酸化cDNAの全てをT4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。その反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5⁺細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS（Applied Biosystems）を使って調製する。単離されたプラスミドをABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定して、ヒト正常GRをコードするプラスミドが存在することを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pRc/RSV-hGR Kozakと名づける。

20

【0250】

6.14．実施例14 ヒト正常PRをコードするプラスミドの作製

ヒト肝臓cDNAライブラリー（CLONETECH、QUICK clone cDNA #7113-1）を利用して、そこからヒト正常PRをコードするcDNA（Genbankアクセッション番号M15716）をPCR増幅する。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト肝臓cDNAライブラリー10ng、配列番号184に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、配列番号185に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、LA-Taqポリメラーゼ（宝酒造）、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）を含む。配列番号184および配列番号185に記載のオリゴヌクレオチドは、DNAシンセサイザー（モデル394、Applied Biosystems）を使って合成する。このPCR増幅では、PCRsystem 9700（Applied Biosystems）を使って、95℃で1分間のインキュベーションの後、55℃で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを35回繰り返す。

30

【0251】

得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかけて、ヒト正常PRをコードするcDNAがPCR増幅されることを臭化エチジウム染色で確認する。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、回収したcDNAの試料をDye Terminator Sequence Kit FS（Applied Biosystems）を使って調製する。調製したcDNA試料をABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定する。

40

【0252】

次に、cDNA中の開始コドン（ATG）のすぐ上流にKozakコンセンサス配列を加えるために、新たなPCR増幅を行う。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト正常PRをコードするcDNA 100ng、配列番号186に記載のオリゴヌクレオチドと配列番号187に記載のオリゴヌクレオチド、LA-Taqポリメラーゼ（宝酒造）、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）を含む。このPCR増幅では、95℃で1分間のインキュベーションの後、55℃で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイク

50

ルを25回繰り返す。得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかける。増幅された試験cDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、1 µgの増幅試験cDNAをDNA Blunting Kit（宝酒造）で処理して、増幅試験cDNAの末端を平滑化する。次に、それによって得た試験cDNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼと反応させて、cDNAの末端をリン酸化する。リン酸化された試験cDNAをフェノール処理した後、リン酸化試験cDNAをエタノール沈殿して、精製型のリン酸化試験cDNAを得る。

【0253】

プラスミドpRc/RSV（Invitrogen）を制限酵素HindIIIで消化した後、65℃で1時間、BAPで処理する。次に、制限消化pRc/RSVをフェノール処理およびエタノール沈殿によって精製する。次に、制限消化pRc/RSVをDNA Blunting Kit（宝酒造）で処理してその末端を平滑化し、低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかける。制限消化されたpRc/RSVを低融点アガロースゲルから回収した後、その制限消化pRc/RSV 100ng および上記精製型リン酸化試験cDNAの全てをT4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。その反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5⁺細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS（Applied Biosystems）を使って調製する。単離されたプラスミドをABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定して、ヒト正常PRをコードするプラスミドが存在することを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pRc/RSV-hPR Kozakと名づける。

【0254】

6.15. ヒト正常MRをコードするプラスミドの作製

ヒト肝臓cDNAライブラリー（CLONETECH、QUICK clone cDNA #7113-1）を利用して、そこからヒト正常MRをコードするcDNA（Genbankアクセッション番号M16801）をPCR増幅する。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト肝臓cDNAライブラリー10ng、配列番号188に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、配列番号189に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、LA-Taqポリメラーゼ（宝酒造）、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）を含む。配列番号188および配列番号189に記載のオリゴヌクレオチドは、DNAシンセサイザー（モデル394、Applied Biosystems）を使って合成する。このPCR増幅では、PCRsystem 9700（Applied Biosystems）を使って、95℃で1分間のインキュベーションの後、60℃で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを35回繰り返す。

【0255】

得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかけて、ヒト正常MRをコードするcDNAがPCR増幅されることを臭化エチジウム染色で確認する。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、回収したcDNAの試料をDye Terminator Sequence Kit FS（Applied Biosystems）を使って調製する。調製したcDNA試料をABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定する。

【0256】

次に、cDNA中の開始コドン（ATG）のすぐ上流にKozakコンセンサス配列を加えるために、新たなPCR増幅を行う。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト正常MRをコードするcDNA 100ng、配列番号190に記載のオリゴヌクレオチドと配列番号191に記載のオリゴヌクレオチド、LA-Taqポリメラーゼ（宝酒造）、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）を含む。このPCR増幅では、95℃で1分間のインキュベーションの後、60℃で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを25回繰り返す。得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかける。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、1 µgの増幅cDNAをDNA Blunting Kit（宝酒造）で処理して、増幅cDNAの末端を平滑化する。次に、それによって得たcDNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼと反応させて、その末端を

リン酸化する。リン酸化されたcDNAをフェノール処理した後、リン酸化cDNAをエタノール沈殿して、精製型のリン酸化cDNAを得る。

【0257】

プラスミドpRc/RSV (Invitrogen) を制限酵素HindIIIで消化した後、65℃で1時間、BAPで処理する。次に、制限消化pRc/RSVをフェノール処理およびエタノール沈殿によって精製する。次に、制限消化pRc/RSVをDNA Blunting Kit (宝酒造) で処理してその末端を平滑化し、低融点アガロースゲル電気泳動 (アガロースL、ニッポンジーン) にかける。制限消化されたpRc/RSVを低融点アガロースゲルから回収した後、その制限消化pRc/RSV 100ng および上記精製型リン酸化cDNAの全てをT4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。その反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5⁺ 細胞 (東洋紡) を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS (Applied Biosystems) を使って調製する。単離されたプラスミドをABI自動シーケンサー (モデル377、Applied Biosystems) で配列決定して、ヒト正常MRをコードするプラスミドが存在することを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pRc/RSV-hMR Kozakと名づける。

10

【0258】

6.16. 実施例16 MMTVレポーター遺伝子を染色体の一つに安定に含有する安定形質転換細胞の作製

20

プラスミドpMSG (Pharmacia) を制限酵素HindIIIおよびSmaIで制限消化して、1463bpのサイズを持ちMMTV-LTR領域の部分配列をコードするDNA断片を得る。次にその1463bp DNA断片をDNA Blunting Kit (宝酒造) で処理して、当該1463bp DNA断片の末端を平滑化する。

【0259】

ホタルルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドpGL3 (Promega) を、制限酵素BgIIIおよびHindIIIで制限消化した後、65℃で1時間、BAPで処理する。次にその制限消化反応混合物を低融点アガロースゲル電気泳動 (アガロースL、ニッポンジーン) にかけて、ホタルルシフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を持つDNA断片が存在することを確認した。次に、ホタルルシフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を持つDNA断片を低融点アガロースゲルから回収した。次に、ホタルルシフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を持つ回収したDNA断片100ngと、上記1463bp DNA断片1μgとを、T4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。次に、そのライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5⁺ 細胞 (東洋紡) を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次に、アンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次に、それらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を制限酵素KpnIおよびClaIで制限消化する。その制限消化反応混合物を、アガロースゲル電気泳動にかけて、ホタルルシフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を持つDNA断片の上流に作動的に配された上記1463bp DNA断片1コピー (以下MMTVレポーター遺伝子という) を含有するプラスミドが存在することを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pGL3-MMTVと名づける。

30

40

【0260】

プラスミドpUCSV-BSD (フナコシ) を制限酵素BamHIで制限消化して、ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAを調製する。また、プラスミドpGL3-MMTVを制限酵素BamHIで制限消化した後、65℃で1時間、BAPで処理する。得られたブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットコードDNAと制限消化pGL3-MMTVとを混合して、T4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。そのライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5⁺ 細胞を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に単離された各プラスミドの部分試料をDye Terminator Sequence Kit FS (Applied

50

Biosystems) を使って調製する。単離されたプラスミドをABI自動シーケンサー(モデル377、Applied Biosystems)で配列決定して、ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAがpGL3-MMTVのBamHIの制限部位に挿入されている構造を持つプラスミドが存在することを確認する。そのような構造を持つプラスミドを選択し、pGL3-MMTV-BSDと名づける。

【0261】

染色体の一つにMMTVレポーター遺伝子を安定に含有する安定形質転換細胞(以下、安定形質転換MMTVカセット細胞という)を作製するために、プラスミドpGL3-MMTV-BSDを線状化し、HeLa細胞に導入した。

【0262】

プラスミドpGL3-MMTV-BSDを線状化するために、pGL3-MMTV-BSDを制限酵素SalIで制限消化する。

【0263】

直径約10cmの培養皿(Falcon)を使用し、10%FBSを含むDMEM培地(日水製薬)にて、5%CO₂下に37℃で、約5×10⁵個のHeLa細胞を宿主細胞として1日培養した。

【0264】

次に、線状化したpGL3-MMTV-BSDをリポフェクトアミン(Life Technologies)を用いるリポフェクション法によって培養HeLa細胞に導入する。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法の条件には、5時間の処理、7μg/培養皿の線状化pGL3-MMTV-BSDおよび21μl/培養皿のリポフェクトアミンを含めた。

【0265】

リポフェクション処理の後、DMEM培地を、10%FBSを含むDMEM培地と交換し、形質転換HeLa細胞を約36時間培養する。次に、形質転換HeLa細胞をトリプシン処理によって培養皿から除去、収集し、ブラストサイジンSを16μg/mlの濃度になるように添加した培地を含む容器に移す。ブラストサイジンS含有培地を3、4日毎に新しいバッチのブラストサイジンS含有培地に交換しながら、前記ブラストサイジンS含有培地で形質転換HeLa細胞を1ヶ月培養する。

【0266】

その結果増殖して1～数mmの直径を持つコロニーを形成することができるクローンを、前もって培地を分注しておいた96ウェルViewPlate(Berthold)のウェルに、丸ごと移す。それらクローンのコロニーをさらに培養する。クローンが増殖して各ウェルの底面の50%以上を覆うようになったら(移植の約5日後)、それらのクローンをトリプシン処理によって除去、収集する。次にクローンを2つの継代培養物に分割する。一方の継代培養物は96ウェルViewPlateに移して、それをマスタープレートとする。他方の継代培養物は96ウェルViewPlateに移して、これをアッセイプレートとする。マスタープレートとアッセイプレートには、クローンを培養することができるよう培地が含まれている。マスタープレートは同様の条件で引き続き培養する。

【0267】

次に、培地をアッセイプレートのウェルから除去し、ウェル壁に付着したクローンをPBS(-)で2回洗浄する。5倍希釈した溶解緩衝液PGC50(東洋インキ)をアッセイプレートのウェル中のクローンに1ウェルあたり20μlずつ加える。そのアッセイプレートを室温で30分間静置した後、自動基質注入器を装着したルミノメーターLB96P(Berthold)にセットする。次に、基質溶液PGL100(東洋インキ)50μlをアッセイプレート中の各溶解クローンに自動的に分注して、各ウェル中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターLB96Pで測定する。高いルシフェラーゼ活性を示した複数のクローンをそこから選択する。

【0268】

次に、選択したクローンの試料を、直径約10cmの培養皿(Falcon)を用いて、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地中、5%CO₂下に、37℃で1～2週間培養する。

【0269】

次に、リポフェクトアミン(Life Technologies)を用いるリポフェクション法により、

10

20

30

40

50

プラスミドpRc/RSV-hAR Kozakを、上で選択したクローンに導入して、2次クローンを得る。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法の条件には、5時間の処理、7 μ g/培養皿の上記プラスミド、および21 μ l/培養皿のリポフェクトアミンを含めた。次に、得られた2次クローンに、正常ARの天然のコグネイトリガンドであるジヒドロテストステロン (DHT) を含有するDMSO溶液を、DHT濃度が10nMになるように添加する。2次クローンを2日間培養した後、各2次クローンについて上記と同様にルシフェラーゼ活性を測定する。最も高いルシフェラーゼ活性の誘導を示す2次クローンを与えたマスタープレート中のクローンを、安定形質転換MMTVカセット細胞として選択する。

【0270】

10

ちなみに、安定形質転換MMTVカセット細胞は、AR、GR、PR、MRなどを用いるレポーターアッセイに使用することができる。

【0271】

6.17. 実施例17 ヒト試験ARとしてヒト正常ARを用いるレポーターアッセイ

6.17.1. 安定形質転換MMTVカセット細胞の調製

6.16項で得た安定形質転換MMTVカセット細胞約 2×10^6 個を直径約10cmの培養皿 (Falcon) を使って、5%CO₂下に、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地で1日培養する。

【0272】

一過性発現のために、プラスミドpRc/RSV-hAR Kozakを、リポフェクトアミン (Life Technologies) を用いるリポフェクション法により、安定形質転換MMTVカセット細胞の継代培養物に導入する。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法の条件には、5時間の処理、7 μ g/培養皿のpRc/RSV-hAR Kozak、および21 μ l/培養皿のリポフェクトアミンを含める。得られた細胞継代培養物を5%CO₂下に37℃で16時間培養した後、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地を新しいバッチの活性炭デキストランFBS/E-MEM培地に交換して、細胞継代培養物をさらに3時間培養する。次に、細胞継代培養物を収集し、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地に均一に懸濁して、その継代培養物とする。

20

【0273】

6.17.2. MMTVレポーター遺伝子転写活性化活性の測定

第1DMSO溶液は様々な濃度のフルタミドを含むように調製する。第1DMSO溶液では、正常ARに対するアゴニストとしてフルタミドを使用する。また、第2DMSO溶液は10nMのDHTと様々な濃度のフルタミドとを含むように調製する。第2DMSO溶液では、正常ARに対するアンタゴニストとしてフルタミドを使用する。

30

【0274】

次に、96ウェルViewPlateで、第1および第2DMSO溶液をそれぞれ上記6.17.1項で調製した継代培養物と、各ウェル中の第1または第2DMSO溶液の濃度が約0.1% (v/v) になるように混合する。また、標準物質として、6.17.1項で得た細胞継代培養物の試料を96ウェルViewPlateのウェルで、DHTを含有するDMSO溶液と混合する。

【0275】

次に、細胞を5%CO₂下に37℃で40時間培養する。5倍希釈した溶解緩衝液PGC50 (東洋インキ) をウェル中の継代培養物に1ウェルあたり50 μ lずつ加える。その96ウェルViewPlateをときどき穏やかに振とうしながら室温で30分間インキュベートする。次に、溶解した細胞10 μ lをそれぞれ白色96ウェルサンプルプレート (Berthold) に移し、自動基質注入器を装着したルミノメーターLB96P (Berthold) にセットする。次に、基質溶液PGL100 (東洋インキ) 50 μ lを白色96ウェルサンプルプレート中の各溶解細胞にそれぞれ自動的に分注して、各ウェル中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターLB96Pで直ちに5秒間測定する。

40

【0276】

また、上記レポーターアッセイでは、試験ARとして変異ARを使用することもできる。この場合は、pRc/RSV-hAR Kozakの代わりに変異ARをコードするプラスミドを使用する。変異A

50

Rをコードするプラスミドを得るには、上記と同様にして、変異ARをコードするポリヌクレオチドの上流にKozakコンセンサス配列を作動的に付加し、得られたポリヌクレオチドをプラスミドpRc/RSV (Invitrogen) 中のHindIIIの制限部位に挿入する。

【0277】

6.18. 実施例18 ヒト試験GRとしてヒト正常GRを用いるレポーターアッセイ

6.18.1. 安定形質転換MMTVカセット細胞の調製

6.16項で得た安定形質転換MMTVカセット細胞約 2×10^6 個を直径約10cmの培養皿 (Falcon) を使って、5%CO₂下に、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地で1日培養する。

【0278】

一過性発現のために、プラスミドpRc/RSV-hGR Kozakを、リポフェクトアミン (Life Technologies) を用いるリポフェクション法により、安定形質転換MMTVカセット細胞の継代培養物に導入する。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法の条件には、5時間の処理、7 µg/培養皿のpRc/RSV-hAR Kozak、および21 µl/培養皿のリポフェクトアミンを含める。得られた細胞継代培養物を5%CO₂下に37 °Cで16時間培養した後、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地を新しいバッチの活性炭デキストランFBS/E-MEM培地に交換して、細胞継代培養物をさらに3時間培養する。次に、その細胞継代培養物を収集し、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地に均一に懸濁する。

【0279】

6.18.2. MMTVレポーター遺伝子転写活性化活性の測定

第1DMSO溶液は様々な濃度のプレグナノロン16 カルボニトリル (PCN) を含むように調製する。第1DMSO溶液では、正常GRに対するアゴニストとしてPCNを使用する。また、第2DMSO溶液は10nMのコルチコステロンと様々な濃度のPCNとを含むように調製する。第2DMSO溶液では、正常GRに対するアンタゴニストとしてPCNを使用する。

【0280】

次に、96ウェルViewPlateで、第1および第2DMSO溶液をそれぞれ上記6.18.1項で調製した細胞継代培養物と、各ウェル中の第1または第2DMSO溶液の濃度が約0.1% (v/v) になるように混合する。また、標準物質として、上記細胞継代培養物の試料を、96ウェルViewPlateのウェルで、コルチコステロンを含有するDMSO溶液と混合する。

【0281】

次に、細胞を5%CO₂下に37 °Cで40時間培養する。5倍希釈した溶解緩衝液PGC50 (東洋インキ) をウェル中の継代培養物に1ウェルあたり50 µlずつ加える。その96ウェルViewPlateをときどき穏やかに振とうしながら室温で30分間インキュベートする。次に、溶解した細胞10 µlをそれぞれ白色96ウェルサンプルプレート (Berthold) に移し、自動基質注入器を装着したルミノメーターLB96P (Berthold) にセットする。次に、基質溶液PGL100 (東洋インキ) 50 µlを白色96ウェルサンプルプレート中の各溶解細胞にそれぞれ自動的に分注して、各ウェル中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターLB96Pで直ちに5秒間測定する。

【0282】

また、上記レポーターアッセイでは、試験GRとして変異GRを使用することもできる。この場合は、pRc/RSV-hGR Kozakの代わりに変異GRをコードするプラスミドを使用する。変異GRをコードするプラスミドを得るには、上記と同様にして、変異GRをコードするポリヌクレオチドの上流にKozakコンセンサス配列を作動的に付加し、得られたポリヌクレオチドをプラスミドpRc/RSV (Invitrogen) 中のHindIIIの制限部位に挿入する。

【0283】

6.19. 実施例19 ヒト試験PRとしてヒト正常PRを用いるレポーターアッセイ

6.19.1. 安定形質転換MMTVカセット細胞の調製

6.16項で得た安定形質転換MMTVカセット細胞約 2×10^6 個を直径約10cmの培養皿 (Falcon) を使って、5%CO₂下に37 °Cで、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地で1日培養する。

【0284】

一過性発現のために、プラスミドpRc/RSV-hPR Kozakを、リポフェクトアミン (Life Tech

10

20

30

40

50

nologies)を用いるリポフェクション法により、安定形質転換MMTVカセット細胞の継代培養物に導入する。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法の条件には、5時間の処理、7 µg/培養皿のpRc/RSV-hAR Kozak、および21 µl/培養皿のリポフェクトアミンを含める。得られた細胞継代培養物を5%CO₂下に37 °Cで16時間培養した後、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地を新しいバッチの活性炭デキストランFBS/E-MEM培地と交換して、細胞継代培養物をさらに3時間培養する。次に、その細胞継代培養物を収集し、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地に均一に懸濁する。

【0285】

6.19.2. MMTVレポーター遺伝子転写活性化活性の測定

第1DMSO溶液は様々な濃度のRU486を含むように調製する。第1DMSO溶液では、正常PRに対するアゴニストとしてRU486を使用する。また、第2DMSO溶液は10nMのプロゲステロンと様々な濃度のRU486とを含むように調製する。第2DMSO溶液では、正常PRに対するアンタゴニストとしてRU486を使用する。

10

【0286】

96ウェルViewPlateで、第1および第2DMSO溶液をそれぞれ上記6.19.1項で調製した細胞継代培養物と、各ウェル中の第1または第2DMSO溶液の濃度が約0.1% (v/v) になるように混合する。また、標準物質として、上記細胞継代培養物の試料を、プロゲステロンを含有するDMSO溶液と混合する。

【0287】

次に、細胞を5%CO₂下に37 °Cで40時間培養する。5倍希釈した溶解緩衝液PGC50 (東洋インキ)をウェル中の細胞に1ウェルあたり50 µlずつ加える。その96ウェルViewPlateをときどき穏やかに振とうしながら室温で30分間インキュベートする。次に、溶解した細胞10 µlをそれぞれ白色96ウェルサンプルプレート (Berthold)に移し、自動基質注入器を装着したルミノメーターLB96P (Berthold)にセットする。次に、基質溶液PGL100 (東洋インキ) 50 µlを白色96ウェルサンプルプレート中の各溶解細胞にそれぞれ自動的に分注して、各ウェル中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターLB96Pで直ちに5秒間測定する。

20

【0288】

また、上記レポーターアッセイでは、試験PRとして変異PRを使用することもできる。この場合は、pRc/RSV-hPR Kozakの代わりに変異PRをコードするプラスミドを使用する。変異PRをコードするプラスミドを得るには、上記と同様にして、変異PRをコードするポリヌクレオチドの上流にKozakコンセンサス配列を作動的に付加し、得られたポリヌクレオチドをプラスミドpRc/RSV (Invitrogen)中のHindIIIの制限部位に挿入する。

30

【0289】

6.20. 実施例20 ヒト正常ER をコードするプラスミドの作製

ヒト前立腺cDNAライブラリー (CLONETECH、QUICK clone cDNA #7123-1)を利用して、そこからヒト正常ER をコードするcDNA (Genbankアクセッション番号AB006590)をPCR増幅する。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト肝臓cDNAライブラリー10ng、配列番号192に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、配列番号193に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、LA-Taqポリメラーゼ (宝酒造)、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP (dATP、dTTP、dGTP、dCTP)を含む。配列番号192および配列番号193に記載のオリゴヌクレオチドは、DNAシンセサイザー (モデル394、Applied Biosystems)を使って合成する。このPCR増幅では、PCRsystem 9700 (Applied Biosystems)を使って、95 °Cで1分間のインキュベーションの後、68 °Cで3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを35回繰り返す。

40

【0290】

得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動 (アガロースL、ニッポンジーン)にかけて、ヒト正常ER をコードするcDNAがPCR増幅されることを臭化エチジウム染色で確認する。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、回収したcDNAの試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS (Applied Biosystems)を使って調製する。調製したcDNA試料をABI自動シーケンサー (モデル377、Applied Biosystems)で配列決定する。

50

【0291】

次に、cDNA中の開始コドン（ATG）のすぐ上流にKozakコンセンサス配列を加えるために、新たなPCR増幅を行う。このPCR増幅におけるPCR混合物は、上記cDNA 100ng、配列番号194に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、配列番号195に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、LA-Taqポリメラーゼ（宝酒造）、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）を含む。このPCR増幅では、95℃で1分間のインキュベーションの後、68℃で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを25回繰り返す。得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかける。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、1μgの増幅cDNAをDNA Blunting Kit（宝酒造）で処理して、増幅cDNAの末端を平滑化する。次に、それによって得たcDNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼと反応させて、当該cDNAの末端をリン酸化する。リン酸化されたcDNAをフェノール処理した後、リン酸化cDNAをエタノール沈殿して、精製のリン酸化cDNAを得る。

10

【0292】

プラスミドpRc/RSV（Invitrogen）を制限酵素HindIIIで消化した後、65℃で1時間、BAPで処理する。次に、制限消化pRc/RSVをフェノール処理およびエタノール沈殿によって精製する。次に、制限消化pRc/RSVをDNA Blunting Kit（宝酒造）で処理してその末端を平滑化し、低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかける。制限消化されたpRc/RSVを低融点アガロースゲルから回収した後、その制限消化pRc/RSV 100ngおよび上記精製型リン酸化cDNAの全てをT4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。そのライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS（Applied Biosystems）を使って調製する。単離されたプラスミドをABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定して、ヒト正常ERαをコードするプラスミドが存在することを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pRc/RSV-hERα Kozakと名づける。

20

【0293】

6.21．実施例21 ヒト試験ERαとしてヒト正常ERαを用いるレポーターアッセイ

30

6.21.1．安定形質転換EREカセット細胞の調製

6.3項で得た安定形質転換EREカセット細胞約 2×10^6 個を直径約10cmの培養皿（Falcon）を使って、5%CO₂下に37℃で、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地で1日培養する。

【0294】

一過性発現のために、プラスミドpRc/RSV-hERα Kozakを、リポフェクトアミン（Life Technologies）を用いるリポフェクション法により、安定形質転換EREカセット細胞の継代培養物に導入する。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法の条件には、5時間の処理、7μg/培養皿のpRc/RSV-hERα Kozak、および21μl/培養皿のリポフェクトアミンを含める。得られた細胞継代培養物を5%CO₂下に37℃で16時間培養した後、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地を新しいバッチの活性炭デキストランFBS/E-MEM培地に交換して、細胞継代培養物をさらに3時間培養する。次に、その細胞継代培養物を収集し、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地に均一に懸濁する。

40

【0295】

6.21.2．EREレポーター遺伝子転写活性化活性の測定

第1DMSO溶液は様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェンを含むように調製する。第1DMSO溶液では、ヒト正常ERαに対するアゴニストとして4-ヒドロキシタモキシフェンを使用する。また、第2DMSO溶液は10nMのE2と様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェンを含むように調製する。第2DMSO溶液では、ERαに対するアンタゴニストとして4-ヒドロキシタモキシフェンを使用する。

【0296】

50

96ウェルViewPlateで、第1および第2DMSO溶液をそれぞれ上記6.21.1項で調製した継代培養物と、各ウェル中の第1または第2DMSO溶液の濃度が約0.1% (v/v) になるように混合する。また、標準物質として、96ウェルViewPlateのウェルで、上記細胞の試料を、E2 を含有するDMSO溶液と混合する。

【0297】

次に、細胞を5%CO₂下に37℃で40時間培養する。5倍希釈した溶解緩衝液PGC50（東洋インキ）をウェル中の細胞に1ウェルあたり50μlずつ加える。その96ウェルViewPlateをときどき穏やかに振とうしながら室温で30分間インキュベートする。次に、溶解した細胞10μlをそれぞれ白色96ウェルサンプルプレート（Berthold）に移し、自動基質注入器を装着したルミノメーターLB96P（Berthold）にセットする。次に、基質溶液PGL100（東洋インキ）50μlを白色96ウェルサンプルプレート中の各溶解細胞にそれぞれ自動的に分注して、各ウェル中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターLB96Pで直ちに5秒間測定する。

10

【0298】

また、上記レポーターアッセイでは、試験ER として変異ER を使用することもできる。この場合は、pRc/RSV-hER Kozakの代わりに変異ER をコードするプラスミドを使用する。変異ER をコードするプラスミドを得るには、上記と同様にして、変異ER をコードするポリヌクレオチドの上流にKozakコンセンサス配列を作動的に付加し、得られたポリヌクレオチドをプラスミドpRc/RSV（Invitrogen）中のHindIIIの制限部位に挿入する。

【0299】

6.22．実施例22 ヒト正常TR をコードするプラスミドの作製

20

ヒト肝臓cDNAライブラリー（CLONETECH、QUICK clone cDNA #7113-1）を利用して、そこからヒト正常TR をコードするcDNA（Genbankアクセッション番号M24748）をPCR増幅する。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト肝臓cDNAライブラリー10ng、配列番号196に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、配列番号197に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、LA-Taqポリメラーゼ（宝酒造）、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）を含む。配列番号196および配列番号197に記載のオリゴヌクレオチドは、DNAシンセサイザー（モデル394、Applied Biosystems）を使って合成する。このPCR増幅では、PCRsystem 9700（Applied Biosystems）を使って、95℃で1分間のインキュベーションの後、68℃で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを35回繰り返す。

30

【0300】

得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかけて、ヒト正常TR をコードするcDNAがPCR増幅されることを臭化エチジウム染色で確認する。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、回収したcDNAの試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS（Applied Biosystems）を使って調製する。調製したcDNA試料をABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定する。

【0301】

次に、cDNA中の開始コドン（ATG）のすぐ上流にKozakコンセンサス配列を加えるために、新たなPCR増幅を行う。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト正常TR をコードするcDNA 100ng、配列番号198に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、配列番号199に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、LA-Taqポリメラーゼ（宝酒造）、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）を含む。このPCR増幅では、95℃で1分間のインキュベーションの後、68℃で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを25回繰り返す。得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかける。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、1μgの増幅cDNAをDNA Blunting Kit（宝酒造）で処理して、増幅cDNAの末端を平滑化する。次に、それによって得たcDNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼと反応させて、当該cDNAの末端をリン酸化する。リン酸化されたcDNAをフェノール処理した後、リン酸化cDNAをエタノール沈殿して、精製型のリン酸化cDNAを得る。

40

【0302】

50

プラスミドpRc/RSV (Invitrogen) を制限酵素HindIIIで消化した後、65℃で1時間、BAPで処理する。次に、制限消化pRc/RSVをフェノール処理およびエタノール沈殿によって精製する。次に、制限消化pRc/RSVをDNA Blunting Kit (宝酒造) で処理してその末端を平滑化し、低融点アガロースゲル電気泳動 (アガロースL、ニッポンジーン) にかける。制限消化されたpRc/RSVを低融点アガロースゲルから回収した後、その制限消化pRc/RSV 100ng および上記精製型リン酸化cDNAの全てをT4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。そのライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5 細胞 (東洋紡) を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS (Applied Biosystems) を使って調製する。単離されたプラスミドをABI自動シーケンサー (モデル377、Applied Biosystems) で配列決定して、ヒト正常TR をコードするプラスミドが存在することを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pRc/RSV-hTR Kozakと名づける。

10

【0303】

6.23. 実施例23 ヒト正常TR をコードするプラスミドの作製

ヒト肝臓cDNAライブラリー (CLONETECH、QUICK clone cDNA #7113-1) を利用して、そこからヒト正常TR をコードするcDNA (Genbankアクセス番号M26747) をPCR増幅する。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト肝臓cDNAライブラリー10ng、配列番号200に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、配列番号201に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、LA-Ta

20

【0304】

qポリメラーゼ (宝酒造)、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP (dATP、dTTP、dGTP、dCTP) を含む。配列番号200および配列番号201に記載のオリゴヌクレオチドは、DNAシンセサイザー (モデル394、Applied Biosystems) を使って合成する。このPCR増幅では、PCRsystem 9700 (Applied Biosystems) を使って、95℃で1分間のインキュベーションの後、68℃で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを35回繰り返す。

30

【0305】

得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動 (アガロースL、ニッポンジーン) にかけて、ヒト正常TR をコードするcDNAがPCR増幅されることを臭化エチジウム染色で確認する。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、回収したcDNAの試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS (Applied Biosystems) を使って調製する。調製したcDNA試料をABI自動シーケンサー (モデル377、Applied Biosystems) で配列決定する。

次に、cDNA中の開始コドン (ATG) のすぐ上流にKozakコンセンサス配列を加えるために、新たなPCR増幅を行う。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト正常TR をコードするcDNA 100ng、配列番号202に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、配列番号203に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、LA-Taqポリメラーゼ (宝酒造)、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP (dATP、dTTP、dGTP、dCTP) を含む。このPCR増幅では、95℃で1分間のインキュベーションの後、68℃で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを25回繰り返す。得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動 (アガロースL、ニッポンジーン) にかける。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、1μgの増幅cDNAをDNA Blunting Kit (宝酒造) で処理して、増幅cDNAの末端を平滑化する。次に、それによって得たcDNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼと反応させて、当該cDNAの末端をリン酸化する。リン酸化されたcDNAをフェノール処理した後、リン酸化cDNAをエタノール沈殿して、精製型のリン酸化cDNAを得る。

40

【0306】

プラスミドpRc/RSV (Invitrogen) を制限酵素HindIIIで消化した後、65℃で1時間、BAPで処理する。次に、制限消化pRc/RSVをフェノール処理およびエタノール沈殿によって精製する。次に、制限消化pRc/RSVをDNA Blunting Kit (宝酒造) で処理してその末端を平滑化し、低融点アガロースゲル電気泳動 (アガロースL、ニッポンジーン) にかける。制限

50

消化されたpRc/RSVを低融点アガロースゲルから回収した後、その制限消化pRc/RSV 100ng および上記精製型リン酸化cDNAの全てをT4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。そのライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5 細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS (Applied Biosystems) を使って調製する。単離されたプラスミドをABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定して、ヒト正常TR をコードするプラスミドが存在することを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pRc/RSV-hTR Kozakと名づける。

10

【0307】

6.24．実施例24 DR4レポーター遺伝子を含有するプラスミドの作製

配列番号204に記載のオリゴヌクレオチドと、それに相補的なヌクレオチド配列を持つオリゴヌクレオチドとを、DNAシンセサイザーで合成する。配列番号204に記載のオリゴヌクレオチドは、DR4の一方の鎖をコードするように合成する。もう一つのオリゴヌクレオチドは、第1オリゴヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を持つように合成する。これら2つのオリゴヌクレオチドを互いにアニールさせて、DR4配列をコードするDNA（以下、DR4 DNAという）を作製する。次に、DR4 DNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼと反応させて、DR4 DNAの末端をリン酸化する。次に、DR4 DNAをT4 DNAリガーゼで互いに結合させて、DR4配列が5回縦列反復したDR4×5 DNAを得る。次に、そのライゲーション反応混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかけて、そのゲルからDR4×5 DNAを回収する。

20

【0308】

6.2項で得たプラスミドpGL3-TATAを制限酵素SmaIで制限消化した後、65℃で1時間、BAPで処理する。次に、その制限消化反応混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかける。その低融点アガロースゲルからホタルルシフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を持つDNA断片を回収した後、回収したDNA断片100ngとDR4×5 DNA 1μgとをライゲーション反応に使用する。次に、得られたライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5 細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に単離された各プラスミドの部分試料を制限酵素KpnIおよびXhoIで制限消化する。その制限消化反応混合物をアガロースゲル電気泳動にかけて、DR4×5 DNAがpGL3-TATA中の制限酵素SmaIの制限部位に挿入されている構造を持つプラスミドが存在することを確認する。そのような構造を持つプラスミドを選択し、pGL3-TATA-DR4×5と名づける。

30

【0309】

次に、プラスミドpGL3-TATA-DR4×5を制限酵素SalIで制限消化する。制限消化されたpGL3-TATA-DR4×5の末端をBlunting Kit（宝酒造）で平滑化した後、その制限消化pGL3-TATA-DR4×5を65℃で1時間、BAPで処理する。また、6.2項で得たブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子をコードするDNA断片（BamHI-BamHI断片）の末端も、Blunting Kitを使って平滑化する。

40

【0310】

次に、ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNA断片と、制限消化pGL3-TATA-DR4×5とを混合して、T4 DNAリガーゼによるライゲーション反応を行う。そのライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5 細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次に、アンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS (Applied Biosystems) を使って調製する。単離さ

50

れたプラスミドをABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定して、ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAがpGL3-TATA-DR4×5中の制限酵素SalIの制限部位に挿入されている構造を持つプラスミドが存在するかどうかを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pGL3-TATA-DR4×5-BSDと名づける。

【0311】

6.25．実施例25 DR4レポーター遺伝子を染色体の一つに安定に含有する安定形質転換細胞の作製

DR4レポーター遺伝子を染色体の一つに安定に含有する安定形質転換細胞（以下、安定形質転換DR4カセット細胞という）を作製するために、プラスミドpGL3-TATA-DR4×5-BSDを線状化し、HeLa細胞に導入した。

【0312】

プラスミドpGL3-TATA-DR4×5-BSDを線状化するために、pGL3-TATA-DR4×5-BSDを制限酵素NotIで制限消化する。

【0313】

直径約10cmの培養皿（Falcon）を使用し、10%FBSを含むDMEM培地（日水製薬）にて、5%CO₂下に37℃で、約5×10⁵個のHeLa細胞を宿主細胞として1日培養する。

【0314】

次に、線状化pGL3-TATA-DR4×5-BSDを、リポフェクトアミン（Life Technologies）を用いるリポフェクション法によって培養HeLa細胞に導入する。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法の条件には、5時間の処理、7μg/培養皿の線状化pGL3-TATA-DR4×5-BSD、および21μl/培養皿のリポフェクトアミンを含める。

【0315】

リポフェクション処理の後、DMEM培地を、10%FBSを含むDMEM培地と交換し、形質転換したHeLa細胞を約36時間培養する。次に、形質転換HeLa細胞をトリプシン処理によって培養皿から除去、収集し、ブラストサイジンSを16μg/mlの濃度になるように添加した培地を含む容器に移す。ブラストサイジンS含有培地を3、4日毎に新しいパッチのブラストサイジンS含有培地に交換しながら、前記ブラストサイジンS含有培地で形質転換HeLa細胞を1ヶ月培養する。

【0316】

その結果増殖して1～数mmの直径を持つコロニーを形成することができるクローンを、前もって培地を分注しておいた96ウェルViewPlate（Berthold）のウェルに、丸ごと移す。それらのクローンをさらに培養する。クローンが増殖してウェルの底面の50%以上を覆うようになったら（移植の約5日後）、それらのクローンをトリプシン処理によって除去、収集する。次に、各クローンを2つの継代培養物に分割する。一方の継代培養物は96ウェルViewPlateに移して、それをマスタープレートとする。他方の継代培養物は96ウェルViewPlateに移して、これをアッセイプレートとする。マスタープレートとアッセイプレートは、クローンを培養することができるよう培地を含有する。マスタープレートは同様の条件で引き続き培養する。

【0317】

次に、アッセイプレートのウェル中の培地をウェルから除去し、ウェル壁に付着したクローンをPBS(-)で2回洗浄する。5倍希釈した溶解緩衝液PGC50（東洋インキ）をアッセイプレートのウェル中のクローンに1ウェルあたり20μlずつ加える。そのアッセイプレートを室温で30分間静置した後、自動基質注入器を装着したルミノメーターLB96P（Berthold）にセットする。次に、基質溶液PGL100（東洋インキ）50μlをアッセイプレート中の各溶解クローンに自動的に分注して、各ウェル中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターLB96Pで測定する。ルシフェラーゼ活性を示した複数のクローンをそこから選択する。

【0318】

次に、選択したクローンの試料を、直径約10cmの培養皿（Falcon）を用いて、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地中、5%CO₂下に、37℃で1日培養する。

【0319】

次に、リポフェクトアミン (Life Technologies) を用いるリポフェクション法により、プラスミドpRc/RSV-hTR Kozakを、上で選択したクローンに導入して、2次クローンを得る。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法の条件には、5時間の処理、7 μ g/培養皿の上記pRc/RSV-hTR Kozak、および21 μ l/培養皿のリポフェクトアミンを含めた。次に、得られた2次クローンに、ヒト正常TR の天然のコグネイトリガンドであるトリヨードチロニン (T3) を含有するDMSO溶液を、培地中のT3濃度が10nMになるように加える。それらの2次クローンを2日間培養した後、各2次クローンについて上記と同様にルシフェラーゼ活性を測定する。最も高いルシフェラーゼ活性の誘導を示す2次クローンを与えたマスタープレート中のクローンを、安定形質転換DR4カセット細胞として選択する。

10

【0320】

ちなみに、安定形質転換DR4カセット細胞は、TR 、TR 、CAR、LXR、PXRなどを用いるレポーターアッセイに使用することができる。

【0321】

6.26 . 実施例26 ヒト正常VDRをコードするプラスミドの作製

ヒト肝臓cDNAライブラリー (CLONETECH、QUICK clone cDNA #7113-1) を利用して、そこからヒト正常VDRをコードするcDNA (Genbankアクセッション番号J03258) をPCR増幅する。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト肝臓cDNAライブラリー10ng、配列番号205に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、配列番号206に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、LA-Ta

20

【0322】

qポリメラーゼ (宝酒造)、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP (dATP、dTTP、dGTP、dCTP) を含む。配列番号205および配列番号206に記載のオリゴヌクレオチドは、DNAシンセサイザー (モデル394、Applied Biosystems) を使って合成する。このPCR増幅では、PCRsystem 9700 (Applied Biosystems) を使って、95 で1分間のインキュベーションの後、68 で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを35回繰り返す。

30

【0323】

得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動 (アガロースL、ニッポンジーン) にかけて、ヒト正常VDRをコードするcDNAがPCR増幅されることを臭化エチジウム染色で確認する。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、回収したcDNAの試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS (Applied Biosystems) を使って調製する。調製したcDNA試料をABI自動シーケンサー (モデル377、Applied Biosystems) で配列決定する。

40

【0324】

次に、正常VDRをコードするcDNA中の開始コドン (ATG) のすぐ上流にKozakコンセンサス配列を加えるために、新たなPCR増幅を行う。このPCR増幅におけるPCR混合物は、正常VDRをコードするcDNA 100ng、配列番号207に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、配列番号208に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、LA-Taqポリメラーゼ (宝酒造)、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP (dATP、dTTP、dGTP、dCTP) を含む。このPCR増幅では、95 で1分間のインキュベーションの後、68 で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを25回繰り返す。得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動 (アガロースL、ニッポンジーン) にかける。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、1 μ gの増幅cDNAをDNA Blunting Kit (宝酒造) で処理して、増幅cDNAの末端を平滑化する。次に、それによって得たcDNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼと反応させて、当該cDNAの末端をリン酸化する。リン酸化されたcDNAをフェノール処理した後、リン酸化cDNAをエタノール沈殿して、精製型のリン酸化cDNAを得る。

50

消化されたpRc/RSVを低融点アガロースゲルから回収した後、その制限消化pRc/RSV 100ng および上記精製型リン酸化cDNAの全てをT4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。そのライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5 細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS (Applied Biosystems) を使って調製する。単離されたプラスミドをABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定して、ヒト正常VDRをコードするプラスミドが存在することを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pRc/RSV-hVDR Kozakと名づける。

10

【 0 3 2 5 】

6.27 . 実施例27 DR3レポーター遺伝子を含有するプラスミドの作製

配列番号209に記載のオリゴヌクレオチドと、それに相補的なヌクレオチド配列を持つオリゴヌクレオチドとを、DNAシンセサイザーで合成する。配列番号209に記載のオリゴヌクレオチドは、DR3の一方の鎖をコードするように合成する。もう一つのオリゴヌクレオチドは、第1オリゴヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を持つように合成する。これら2つのオリゴヌクレオチドを互いにアニールさせて、DR3配列をコードするDNA（以下、DR3 DNAという）を作製する。次に、DR3 DNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼと反応させて、DR3 DNAの末端をリン酸化する。次に、DR3 DNAをT4 DNAリガーゼで互いに結合させて、DR3配列が5回縦列反復したDR3×5 DNAを得る。次に、そのライゲーション反応混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかけて、そのゲルからDR3×5 DNAを回収する。

20

【 0 3 2 6 】

6.2項で得たプラスミドpGL3-TATAを制限酵素SmaIで制限消化した後、65 で1時間、BAPで処理する。次に、その制限消化反応混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかける。その低融点アガロースゲルからホタルルシフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を持つDNA断片を回収した後、回収したDNA断片100ngとDR3×5 DNA 1μgとをライゲーション反応に使用する。次に、得られたライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5 細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に単離された各プラスミドの部分試料を制限酵素KpnIおよびXhoIで制限消化する。その制限消化反応混合物をアガロースゲル電気泳動にかけて、DR3×5 DNAがpGL3-TATA中の制限酵素SmaIの制限部位に挿入されている構造を持つプラスミドが存在することを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pGL3-TATA-DR3×5と名づける。

30

【 0 3 2 7 】

次に、プラスミドpGL3-TATA-DR3×5を制限酵素SalIで制限消化する。制限消化されたpGL3-TATA-DR3×5の末端をBlunting Kit（宝酒造）で平滑化した後、その制限消化pGL3-TATA-DR3×5を65 で1時間、BAPで処理する。また、6.2項で得たブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットを含むDNA断片（BamHI-BamHI断片）の末端も、Blunting Kitを使って平滑化する。平滑末端化pGL3-TATA-DR3×5と、ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットを含む平滑末端化DNA断片とを、T4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。次に、得られたライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5 細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次に、アンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットを含むDNA断片がpGL3-TATA-DR3×5中の制限酵素SalIの制限部位に挿入されている単離プラスミドを選択し、pGL3-TATA-DR3×5-BSDと名づける。

40

【 0 3 2 8 】

6.28 . 実施例28 DR3レポーター遺伝子を染色体の一つに安定に含有する安定形質転換力

50

セット細胞の作製

DR3レポーター遺伝子を染色体の一つに安定に含有する安定形質転換細胞（以下、安定形質転換DR3カセット細胞という）を作製するために、プラスミドpGL3-TATA-DR3×5-BSDを線状化し、HeLa細胞に導入した。

【0329】

プラスミドpGL3-TATA-DR3×5-BSDを制限酵素NotIで制限消化することにより、pGL3-TATA-DR3×5-BSDを線状化する。

【0330】

直径約10cmの培養皿（Falcon）を使用し、10%FBSを含むDMEM培地（日水製薬）にて、5%CO₂下に37℃で、約5×10⁵個のHeLa細胞を宿主細胞として1日培養する。

【0331】

次に、リポフェクトアミン（Life Technologies）を用いるリポフェクション法によって線状化pGL3-TATA-DR3×5-BSDを培養HeLa細胞に導入する。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法の条件には、5時間の処理、7μg/培養皿の線状化pGL3-TATA-DR3×5-BSD、および21μl/培養皿のリポフェクトアミンを含める。

【0332】

リポフェクション処理の後、DMEM培地を、10%FBSを含むDMEM培地と交換し、形質転換したHeLa細胞を約36時間培養する。次に、形質転換HeLa細胞をトリプシン処理によって培養皿から除去、収集し、プラストサイジンSを16μg/mlの濃度になるように添加した培地を含む容器に移す。プラストサイジンS含有培地を3、4日毎に新しいバッチのプラストサイジンS含有DMEM培地に交換しながら、前記プラストサイジンS含有培地で形質転換HeLa細胞を1ヶ月培養する。

【0333】

増殖して1～数mmの直径を持つコロニーを形成することができるクローンを、前もって培地を分注しておいた96ウェルViewPlate（Berthold）のウェルに、丸ごと移す。それらのクローンをさらに培養する。クローンが増殖してウェルの底面の50%以上を覆うようになったら（移植の約5日後）、それらのクローンをトリプシン処理によって除去、収集する。次に、各クローンを2つの継代培養物に分割する。一方の継代培養物は96ウェルViewPlateに移して、それをマスタープレートとする。他方の継代培養物は96ウェルViewPlateに移して、これをアッセイプレートとする。マスタープレートとアッセイプレートは、クローンを培養することができるように培地を含有する。マスタープレートは同様の条件で引き続き培養する。

【0334】

次に、アッセイプレートのウェル中の培地をウェルから除去し、ウェル壁に付着したクローンをPBS(-)で2回洗浄する。5倍希釈した溶解緩衝液PGC50（東洋インキ）をアッセイプレートのウェル中のクローンに1ウェルあたり20μlずつ加える。そのアッセイプレートを室温で30分間静置した後、自動基質注入器を装着したルミノメーターLB96P（Berthold）にセットする。次に、基質溶液PGL100（東洋インキ）50μlをアッセイプレート中の各溶解クローンに自動的に分注して、各ウェル中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターLB96Pで測定する。ルシフェラーゼ活性を示した複数のクローンをそこから選択する。

【0335】

次に、選択したクローンの試料を、直径約10cmの培養皿（Falcon）を用いて、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地中、5%CO₂下に、37℃で1～2週間培養する。

【0336】

次に、リポフェクトアミン（Life Technologies）を用いるリポフェクション法により、プラスミドpRc/RSV-hVDR Kozakを、上で選択したクローンに導入して、2次クローンを得る。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法の条件には、5時間の処理、7μg/培養皿の上記pRc/RSV-VDR Kozak、および21μl/培養皿のリポフェクトアミンを含めた。次に、得られた2次クローンに、ヒト正常VDRの天然のコ

10

20

30

40

50

グネイトリガンドである1,25-(OH)ビタミンD₃を含有するDMSO溶液を、培地中の1,25-(OH)ビタミンD₃濃度が10nMになるように加える。それらの2次クローンを2日間培養した後、各2次クローンについて上記と同様にルシフェラーゼ活性を測定する。最も高いルシフェラーゼ活性の誘導を示す2次クローンを与えたマスタープレート中のクローンを、安定形質転換DR3カセット細胞として選択する。

【0337】

6.29. 実施例29 正常PPAR をコードするプラスミドの作製

ヒト肝臓cDNAライブラリー (CLONETECH、QUICK clone cDNA # 7113-1) を利用して、そこからヒト正常PPAR をコードするcDNA (Genbankアクセッション番号U79012) をPCR増幅する。このPCR増幅におけるPCR混合物は、ヒト肝臓cDNAライブラリー10ng、配列番号210に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、配列番号211に記載のオリゴヌクレオチド10pmol、LA-Taqポリメラーゼ (宝酒造)、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP (dATP、dTTP、dGTP、dCTP) を含む。配列番号210および配列番号211に記載のオリゴヌクレオチドは、DNAシンセサイザー (モデル394、Applied Biosystems) を使って合成する。このPCR増幅では、PCRsystem 9700 (Applied Biosystems) を使って、95 で1分間のインキュベーションの後、68 で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを35回繰り返す。

【0338】

得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動 (アガロースL、ニッポンジーン) にかけて、ヒト正常PPAR をコードするcDNAがPCR増幅されることを臭化エチジウム染色で確認する。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、回収したcDNAの試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS (Applied Biosystems) を使って調製する。調製したcDNA試料をABI自動シーケンサー (モデル377、Applied Biosystems) で配列決定する。

【0339】

次に、上記cDNA中の開始コドン (ATG) のすぐ上流にKozakコンセンサス配列を加えるために、新たなPCR増幅を行う。このPCR増幅におけるPCR混合物は、正常PPAR およびKozakコンセンサス配列をコードするcDNA 100ng、配列番号212に記載のオリゴヌクレオチド、配列番号211に記載のオリゴヌクレオチド、LA-Taqポリメラーゼ (宝酒造)、LA-Taqポリメラーゼと一緒に提供される緩衝液、およびdNTP (dATP、dTTP、dGTP、dCTP) を含む。このPCR増幅では、95 で1分間のインキュベーションの後、68 で3分間のインキュベーションを課すインキュベーションサイクルを25回繰り返す。得られたPCR混合物を低融点アガロースゲル電気泳動 (アガロースL、ニッポンジーン) にかける。増幅されたcDNAを低融点アガロースゲルから回収した後、1 µgの増幅cDNAをDNA Blunting Kit (宝酒造) で処理して、増幅cDNAの末端を平滑化する。次に、それによって得たcDNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼと反応させて、当該cDNAの末端をリン酸化する。リン酸化されたcDNAをフェノール処理した後、リン酸化cDNAをエタノール沈殿して、精製型のリン酸化cDNAを得る。

【0340】

プラスミドpRc/RSV (Invitrogen) を制限酵素HindIIIで消化した後、65 で1時間、BAPで処理する。次に、制限消化pRc/RSVをフェノール処理およびエタノール沈殿によって精製する。次に、制限消化pRc/RSVをDNA Blunting Kit (宝酒造) で処理してその末端を平滑化し、低融点アガロースゲル電気泳動 (アガロースL、ニッポンジーン) にかける。制限消化されたpRc/RSVを低融点アガロースゲルから回収した後、その制限消化pRc/RSV 100ngおよび上記精製型リン酸化cDNAの全てをT4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。そのライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5 細胞 (東洋紡) を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS (Applied Biosystems) を使って調製する。単離されたプラスミドをABI自動シーケンサー (モデル377、Applied Biosystems) で配列

決定して、ヒト正常PPAR をコードするプラスミドが存在することを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pRc/RSV-hPPAR Kozakと名づける。

【 0 3 4 1 】

6.30 . 実施例30 DR1レポーター遺伝子を含有するプラスミドの作製

配列番号213に記載のオリゴヌクレオチドと、それに相補的なヌクレオチド配列を持つオリゴヌクレオチドとを、DNAシンセサイザーで合成する。配列番号213に記載のオリゴヌクレオチドは、DR1配列の一方の鎖をコードするように合成する。もう一つのオリゴヌクレオチドは、第1オリゴヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を持つように合成する。これら2つのオリゴヌクレオチドを互いにアニールさせて、DR1配列をコードするDNA（以下、DR1 DNAという）を作製する。T4ポリヌクレオチドキナーゼをDR1 DNAと反応させて、DR1 DNAの末端をリン酸化する。次に、DR1 DNAをT4 DNAリガーゼで互いに結合させて、DR1配列が5回縦列反復したDR1×5 DNAを得る。次に、そのライゲーション反応混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかけて、そのゲルからDR1×5 DNAを回収する。

10

【 0 3 4 2 】

6.2項で得たプラスミドpGL3-TATAを制限酵素SmaIで制限消化した後、65 で1時間、BAPで処理する。次に、その制限消化反応混合物を低融点アガロースゲル電気泳動（アガロースL、ニッポンジーン）にかける。その低融点アガロースゲルからホタルルシフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を持つDNA断片を回収した後、回収したDNA断片100ngとDR1×5 DNA 1μgとをT4 DNAリガーゼによるライゲーション反応に使用する。次に、得られたライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5 細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次にアンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に単離された各プラスミドの部分試料を制限酵素KpnIおよびXhoIで制限消化する。その制限消化反応混合物をアガロースゲル電気泳動にかけて、DR1×5 DNAがpGL3-TATA中の制限酵素SmaIの制限部位に挿入されているプラスミドが存在することを確認する。次に、そのプラスミドをABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定して、DR1配列の5回縦列反復を持つプラスミドが得られたことを確認する。そのようなプラスミドを選択し、pGL3-TATA-DR1×5と名づける。

20

【 0 3 4 3 】

次に、プラスミドpGL3-TATA-DR1×5を制限酵素SalIで制限消化する。制限消化されたpGL3-TATA-DR1×5の末端をBlunting Kit（宝酒造）で平滑化した後、その制限消化pGL3-TATA-DR1×5を65 で1時間、BAPで処理する。また、6.2項で得たブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子をコードするDNA断片（pUCSV-BSD（フナコシ）由来のBamHI-BamHI断片）の末端も、Blunting Kitを使って平滑化する。

30

【 0 3 4 4 】

次に、ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNA断片と、制限消化したpGL3-TATA-DR1×5とを混合して、T4 DNAリガーゼによるライゲーション反応を行う。次に、そのライゲーション反応混合物を使って大腸菌コンピテントDH5 細胞（東洋紡）を形質転換する。形質転換した大腸菌細胞をLB-ampで培養する。次に、アンピシリン耐性を示すクローンを回収する。次にそれらクローンの一部を使って、上記ライゲーション反応によって生成したプラスミドをそこから単離する。次に、単離された各プラスミドの部分試料を、Dye Terminator Sequence Kit FS（Applied Biosystems）を使って調製する。単離されたプラスミドをABI自動シーケンサー（モデル377、Applied Biosystems）で配列決定して、ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAがpGL3-TATA-DR1×5中の制限酵素SalIの制限部位に挿入されている構造をプラスミドが持つかどうかを確認する。そのプラスミドを選択し、pGL3-TATA-DR1×5-BSDと名づける。

40

【 0 3 4 5 】

6.31 . 実施例31 DR1レポーター遺伝子を染色体の一つに安定に含有する安定形質転換カセット細胞の作製

50

DR1レポーター遺伝子を染色体の一つに安定に含有する安定形質転換カセット細胞（以下、安定形質転換DR1カセット細胞という）を作製するために、プラスミドpGL3-TATA-DR1 × 5-BSDを線状化し、HeLa細胞に導入した。

【0346】

プラスミドpGL3-TATA-DR1 × 5-BSDを線状化するために、pGL3-TATA-DR1 × 5-BSDを制限酵素NotIで制限消化する。

【0347】

直径約10cmの培養皿（Falcon）を使用し、10%FBSを含むDMEM培地（日水製薬）にて、5%CO₂下に37℃で、約5 × 10⁵個のHeLa細胞を宿主細胞として1日培養する。

【0348】

次に、リポフェクトアミン（Life Technologies）を用いるリポフェクション法によって線状化pGL3-TATA-DR1 × 5-BSDを培養HeLa細胞に導入する。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法の条件には、5時間の処理、7 μg/培養皿の線状化pGL3-TATA-DR1 × 5-BSD、および21 μl/培養皿のリポフェクトアミンを含める。

【0349】

リポフェクション処理の後、DMEM培地を、10%FBSを含むDMEM培地と交換し、形質転換したHeLa細胞を約36時間培養する。次に、形質転換HeLa細胞をトリプシン処理によって培養皿から除去、収集し、ブラストサイジンSを16 μg/mlの濃度になるように添加した培地を含む容器に移す。ブラストサイジンS含有培地を3、4日毎に新しいバッチのブラストサイジンS含有培地に交換しながら、前記ブラストサイジンS含有培地で形質転換HeLa細胞を1ヶ月培養する。

【0350】

増殖して1～数mmの直径を持つコロニーを形成することができるクローンを、前もって培地を分注しておいた96ウェルViewPlate（Berthold）のウェルに、それぞれ丸ごと移す。それらのクローンをさらに培養する。クローンが増殖してウェルの底面の50%以上を覆うようになったら（移植の約5日後）、それらのクローンをトリプシン処理によって除去、収集する。次に、各クローンを2つの継代培養物に分割する。一方の継代培養物は96ウェルViewPlateに移して、それをマスタープレートとする。他方の継代培養物は96ウェルViewPlateに移して、これをアッセイプレートとする。マスタープレートとアッセイプレートは、クローンを培養することができるように培地を含有する。マスタープレートは同様の条件で引き続き培養する。

【0351】

次に、アッセイプレートのウェル中の培地をウェルから除去し、ウェル壁に付着したクローンをPBS(-)で2回洗浄する。5倍希釈した溶解緩衝液PGC50（東洋インキ）をアッセイプレートのウェル中のクローンに1ウェルあたり20 μlずつ加える。そのアッセイプレートを室温で30分間静置した後、自動基質注入器を装着したルミノメーターLB96P（Berthold）にセットする。次に、基質溶液PGL100（東洋インキ）50 μlをアッセイプレート中の各溶解クローンに自動的に分注して、各ウェル中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターLB96Pで測定する。ルシフェラーゼ活性を示した複数のクローンをそこから選択する。

【0352】

次に、選択したクローンの試料を、直径約10cmの培養皿（Falcon）を用いて、活性炭デキストランFBS/E-MEM培地中、5%CO₂下に、37℃で1～2週間培養する。

【0353】

次に、リポフェクトアミン（Life Technologies）を用いるリポフェクション法により、プラスミドpRc/RSV-hPPAR Kozakを、上で選択したクローンに導入して、2次クローンを得る。リポフェクトアミンと一緒に提供されるマニュアルに従い、このリポフェクション法の条件には、5時間の処理、7 μg/培養皿の上記pRc/RSV-hPPAR Kozak、および21 μl/培養皿のリポフェクトアミンを含めた。次に、得られた2次クローンに、ヒト正常PPAR の天然のコグネイトリガンドである15dプロスタグランジンJ2を含有するDMSO溶液を、培地

10

20

30

40

50

中の15dプロスタグランジンJ2濃度が10nMになるように加える。それらの2次クローンを2日間培養した後、各2次クローンについて上記と同様にルシフェラーゼ活性を測定する。最も高いルシフェラーゼ活性の誘導を示す2次クローンを与えたマスタープレート中のクローンを、安定形質転換DR1カセット細胞として選択する。

【0354】

ちなみに、安定形質転換DR1カセット細胞は、PPAR、RAR、レチノインX受容体、HNF-4、TR-2、TR-4などを用いるレポーターアッセイに使用することができる。

[図面の簡単な説明]

図1～32は、ヒト変異ER またはヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子は細胞の染色体から発現させた。変異ER 遺伝子は細胞中で一過性に発現させた。図1、2、4、5、7、8、12、13、16、17および21～26は、ヒト変異ER またはヒト変異ER を刺激する可能性がある単独の薬剤として様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェンまたはZM189154が存在する状態でのルシフェラーゼ活性を表す。図3、6、9～11、14、15、18～20、27～32は、様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェンまたはZM189154と共に様々な濃度の100pM E2が存在する状態でのルシフェラーゼ活性を表す。安定形質転換カセット細胞を利用して、ヒト変異ER 遺伝子またはヒト正常ER 遺伝子を一過性に発現させると共に、その染色体からレポーター遺伝子を発現させた。図1、2、4、5、7、8、12、13、16、17および21～26では、ヒト変異ER またはヒト正常ER を(4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェンまたはZM189154を含まない) DMSOの存在下に置いたコントロールがもたらすルシフェラーゼ活性を使って、ルシフェラーゼ活性をゼロにする。図3、6、9～11、14、15、18～20、27～32では、100pMのE2を含むDMSO溶液の存在下にヒト変異ER またはヒト正常ER を置いたコントロールがもたらすルシフェラーゼ活性を使って、ルシフェラーゼ活性をゼロにする。ヒト変異ER およびヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性をゼロにする際には、コントロールによるルシフェラーゼ活性を100%に設定した。図1、2、4、5、7、8、12、13、16、17および21～26では、コントロールが与えるルシフェラーゼ活性をDMSOとして示している。図3、6、9～11、14、15、18～20、27～32では、コントロールが与えるルシフェラーゼ活性をDMSO + E2として示している。

図33～48は、ヒト変異ER またはヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子、ヒト変異ER 遺伝子およびヒト正常ER は、細胞の染色体から発現させた。図33～40は、ヒト変異ER またはヒト正常ER を刺激する可能性がある単独の薬剤として様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェン、ZM189154またはラロキシフェンが存在する状態でのルシフェラーゼ活性を表す。図41～48は、様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェン、ZM189154またはラロキシフェンと共に100pMのE2が存在する状態でのルシフェラーゼ活性を表す。安定形質転換バイナリー細胞を利用して、レポーター遺伝子をヒト変異ER 遺伝子と共に、またはヒト正常ER 遺伝子と共に、染色体から発現させた。図33～40では、ヒト変異ER またはヒト正常ER を(4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェンまたはZM189154を含まない) DMSOの存在下に置いたコントロールがもたらすルシフェラーゼ活性をゼロにする。図41～48では、100pMのE2を含むDMSO溶液の存在下にヒト変異ER またはヒト正常ER を置いたコントロールがもたらすルシフェラーゼ活性をゼロにする。ヒト変異ER およびヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性をゼロにする際には、コントロールによるルシフェラーゼ活性を100%に設定した。図33～40では、コントロールが与えるルシフェラーゼ活性をDMSOとして示している。図41～48では、コントロールが与えるルシフェラーゼ活性をDMSO + E2として示している。

図49～52は、比較例として、レポーター遺伝子を細胞中で一過性に発現させた場合にヒト変異ER K531Eまたはヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。図49および50は、ヒト変異ER を刺激する可能性がある単独の薬剤として様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェンが存在する状態でのルシフェラーゼ活性を表す。図51および52は、様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェンと共に100pMのE2が存在する状態でのルシフェラーゼ活性を表す。図49および50では、ヒト正常ER またはヒト変異ER K531Eを(4-ヒドロキシタ

10

20

30

40

50

モキシフェンを含まない) DMSOの存在下に置いたコントロールのルシフェラーゼ活性をゼロにする。図51および52では、100pMのE2を含むDMSO溶液の存在下にヒト変異ER K531Eを置いたコントロールのルシフェラーゼ活性をゼロにする。ヒト変異ER およびヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性をゼロにする際には、結果として得られたコントロールによるルシフェラーゼ活性を100%に設定する。図49および50では、コントロールが与えるルシフェラーゼ活性をDMSOとして示している。図51および52では、コントロールが与えるルシフェラーゼ活性をDMSO + E2として示している。

【 0 3 5 5 】

[配列表フリーテキスト]

配列番号 1	10
ヒト正常 E R	
配列番号 2	
ヒト変異 E R K 3 0 3 R	
配列番号 3	
ヒト変異 E R S 3 0 9 F	
配列番号 4	
ヒト変異 E R G 3 9 0 D	
配列番号 5	
ヒト変異 E R M 3 9 6 V	
配列番号 6	20
ヒト変異 E R G 4 1 5 V	
配列番号 7	
ヒト変異 E R G 4 9 4 V	
配列番号 8	
ヒト変異 E R K 5 3 1 E	
配列番号 9	
ヒト変異 E R S 5 7 8 P	
配列番号 1 0	
ヒト変異 E R G 3 9 0 D / S 5 7 8 P	
配列番号 1 1	30
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー	
配列番号 1 2	
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー	
配列番号 1 3	
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー	
配列番号 1 4	
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー	
配列番号 1 5	
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー	
配列番号 1 6	40
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー	
配列番号 1 7	
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー	
配列番号 1 8	
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー	
配列番号 1 9	
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー	
配列番号 2 0	
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー	
配列番号 2 1	50

変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 2
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 3
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 4
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 5
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 6
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 7
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 8
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 9
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 3 0
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 3 1
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 3 2
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 3 3
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 3 4
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 3 5
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 3 6
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 3 7
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 3 8
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 3 9
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 4 0
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 4 1
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 4 2
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 4 3
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 4 4
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 4 5
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 4 6

10

20

30

40

50

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 4 7
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 4 8
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 4 9
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 5 0
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 5 1
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 5 2
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 5 3
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 5 4
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 5 5
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 5 6
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 5 7
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 5 8
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 5 9
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 6 0
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 6 1
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 6 2
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 6 3
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 6 4
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 6 5
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 6 6
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 6 7
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 6 8
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 6 9
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 7 0
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 7 1

10

20

30

40

50

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 7 2
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 7 3
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 7 4
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 7 5
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 7 6
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 7 7
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 7 8
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 7 9
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 8 0
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 8 1
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 8 2
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 8 3
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 8 4
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 8 5
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 8 6
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 8 7
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 8 8
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 8 9
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 9 0
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 9 1
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 9 2
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 9 3
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 9 4
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 9 5
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 9 6

10

20

30

40

50

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 9 7

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 9 8

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 9 9

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 0 0

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 0 1

10

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 0 2

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 0 3

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 0 4

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 0 5

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 0 6

20

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 0 7

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 0 8

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 0 9

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 1 0

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 1 1

30

サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ
配列番号 1 1 2

サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ
配列番号 1 1 3

サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ
配列番号 1 1 4

サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ
配列番号 1 1 5

サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ
配列番号 1 1 6

40

サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ
配列番号 1 1 7

サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ
配列番号 1 1 8

サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ
配列番号 1 1 9

サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ
配列番号 1 2 0

サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ
配列番号 1 2 1

50

50

サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ 配列番号 1 4 7	
サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ 配列番号 1 4 8	
サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ 配列番号 1 4 9	
サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ 配列番号 1 5 0	
サザンハイブリダイゼーションのために設計されたオリゴヌクレオチドプローブ 配列番号 1 5 1	10
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 5 2	
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 5 3	
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 5 4	
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 5 5	
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 5 6	20
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 5 7	
変異導入のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 5 8	
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 5 9	
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 6 0	
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 6 1	30
合成のために設計されたオリゴヌクレオチド 配列番号 1 6 2	
合成のために設計されたオリゴヌクレオチド 配列番号 1 6 3	
合成のために設計されたオリゴヌクレオチド 配列番号 1 6 4	
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 6 5	
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 6 6	40
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 6 7	
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 6 8	
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 6 9	
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 7 0	
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー 配列番号 1 7 1	50

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 7 2
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 7 3
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 7 4
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 7 5
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 7 6
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 7 7
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 7 8
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 7 9
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 8 0
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 8 1
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 8 1
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 8 2
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 8 3
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 8 4
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 8 5
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 8 6
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 8 7
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 8 8
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 8 9
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 9 0
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 9 1
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 9 2
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 9 3
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 9 4
P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 9 5

10

20

30

40

50

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 9 6

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 9 7

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 9 8

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 1 9 9

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 0 0

10

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 0 1

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 0 2

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 0 3

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 0 4

合成のために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 2 0 5

20

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 0 6

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 0 7

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 0 8

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 0 9

合成のために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 2 1 0

30

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 1 1

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 1 2

P C Rのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2 1 3

合成のために設計されたオリゴヌクレオチド

【 0 3 5 6 】

【 配列表 】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Chemical Company, Ltd.

<120> MUTANT ER alpha AND TEST SYSTEMS FOR TRANSACTIVATION

<130> P152710

<160> 213

10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 595

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Met Thr Leu His Thr Lys Ala Ser Gly Met Ala Leu Leu His
1 5 10 15

20

Gln Ile Gln Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Asn Arg Pro Gln Leu Lys
20 25 30

Ile Pro Leu Glu Arg Pro Leu Gly Glu Val Tyr Leu Asp Ser Ser Lys
35 40 45

Pro Ala Val Tyr Asn Tyr Pro Glu Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Asn Ala
50 55 60

30

Ala Ala Ala Ala Asn Ala Gln Val Tyr Gly Gln Thr Gly Leu Pro Tyr
65 70 75 80

Gly Pro Gly Ser Glu Ala Ala Ala Phe Gly Ser Asn Gly Leu Gly Gly
85 90 95

Phe Pro Pro Leu Asn Ser Val Ser Pro Ser Pro Leu Met Leu Leu His
100 105 110

40

Pro Pro Pro Gln Leu Ser Pro Phe Leu Gln Pro His Gly Gln Gln Val
115 120 125

Pro Tyr Tyr Leu Glu Asn Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Val Arg Glu Ala

130	135	140	
Gly Pro Pro Ala Phe Tyr Arg Pro Asn Ser Asp Asn Arg Arg Gln Gly			
145	150	155	160
Gly Arg Glu Arg Leu Ala Ser Thr Asn Asp Lys Gly Ser Met Ala Met			
	165	170	175
Glu Ser Ala Lys Glu Thr Arg Tyr Cys Ala Val Cys Asn Asp Tyr Ala			10
	180	185	190
Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe			
	195	200	205
Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr			
	210	215	220
Asn Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys			
225	230	235	240
			20
Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Ile Arg			
	245	250	255
Lys Asp Arg Arg Gly Gly Arg Met Leu Lys His Lys Arg Gln Arg Asp			
	260	265	270
Asp Gly Glu Gly Arg Gly Glu Val Gly Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala			
	275	280	285
Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn			30
	290	295	300
Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu			
305	310	315	320
Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro			
	325	330	335
Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg			
	340	345	350
			40
Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val			
	355	360	365
Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu			
	370	375	380
Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Gly			
385	390	395	400

Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys
 405 410 415

Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser
 420 425 430

Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu
 435 440 445

Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser
 450 455 460

10

Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp
 465 470 475 480

Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr
 485 490 495

Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser
 500 505 510

20

His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met
 515 520 525

Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu
 530 535 540

Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val
 545 550 555 560

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

30

His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro
 580 585 590

Ala Thr Val
 595

<210> 2

<211> 595

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 2

Met Thr Met Thr Leu His Thr Lys Ala Ser Gly Met Ala Leu Leu His
 1 5 10 15

Gln Ile Gln Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Asn Arg Pro Gln Leu Lys

20	25	30	
Ile Pro Leu Glu Arg Pro Leu Gly Glu Val Tyr Leu Asp Ser Ser Lys			
35	40	45	
Pro Ala Val Tyr Asn Tyr Pro Glu Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Asn Ala			
50	55	60	
Ala Ala Ala Ala Asn Ala Gln Val Tyr Gly Gln Thr Gly Leu Pro Tyr			10
65	70	75	80
Gly Pro Gly Ser Glu Ala Ala Ala Phe Gly Ser Asn Gly Leu Gly Gly			
85	90	95	
Phe Pro Pro Leu Asn Ser Val Ser Pro Ser Pro Leu Met Leu Leu His			
100	105	110	
Pro Pro Pro Gln Leu Ser Pro Phe Leu Gln Pro His Gly Gln Gln Val			20
115	120	125	
Pro Tyr Tyr Leu Glu Asn Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Val Arg Glu Ala			
130	135	140	
Gly Pro Pro Ala Phe Tyr Arg Pro Asn Ser Asp Asn Arg Arg Gln Gly			
145	150	155	160
Gly Arg Glu Arg Leu Ala Ser Thr Asn Asp Lys Gly Ser Met Ala Met			
165	170	175	
Glu Ser Ala Lys Glu Thr Arg Tyr Cys Ala Val Cys Asn Asp Tyr Ala			30
180	185	190	
Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe			
195	200	205	
Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr			
210	215	220	
Asn Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys			40
225	230	235	240
Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Ile Arg			
245	250	255	
Lys Asp Arg Arg Gly Gly Arg Met Leu Lys His Lys Arg Gln Arg Asp			
260	265	270	
Asp Gly Glu Gly Arg Gly Glu Val Gly Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala			
275	280	285	

Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Arg Asn
 290 295 300
 Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu
 305 310 315 320
 Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro
 325 330 335
 Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg
 340 345 350
 Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val
 355 360 365
 Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu
 370 375 380
 Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Gly
 385 390 395 400
 Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys
 405 410 415
 Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser
 420 425 430
 Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu
 435 440 445
 Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser
 450 455 460
 Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp
 465 470 475 480
 Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr
 485 490 495
 Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser
 500 505 510
 His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met
 515 520 525
 Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu
 530 535 540
 Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val
 545 550 555 560

10

20

30

40

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

His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro
 580 585 590

Ala Thr Val
 595

10

<210> 3
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Met Thr Met Thr Leu His Thr Lys Ala Ser Gly Met Ala Leu Leu His
 1 5 10 15

Gln Ile Gln Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Asn Arg Pro Gln Leu Lys
 20 25 30

20

Ile Pro Leu Glu Arg Pro Leu Gly Glu Val Tyr Leu Asp Ser Ser Lys
 35 40 45

Pro Ala Val Tyr Asn Tyr Pro Glu Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Asn Ala
 50 55 60

Ala Ala Ala Ala Asn Ala Gln Val Tyr Gly Gln Thr Gly Leu Pro Tyr
 65 70 75 80

30

Gly Pro Gly Ser Glu Ala Ala Ala Phe Gly Ser Asn Gly Leu Gly Gly
 85 90 95

Phe Pro Pro Leu Asn Ser Val Ser Pro Ser Pro Leu Met Leu Leu His
 100 105 110

Pro Pro Pro Gln Leu Ser Pro Phe Leu Gln Pro His Gly Gln Gln Val
 115 120 125

40

Pro Tyr Tyr Leu Glu Asn Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Val Arg Glu Ala
 130 135 140

Gly Pro Pro Ala Phe Tyr Arg Pro Asn Ser Asp Asn Arg Arg Gln Gly
 145 150 155 160

Gly Arg Glu Arg Leu Ala Ser Thr Asn Asp Lys Gly Ser Met Ala Met
 165 170 175

Glu Ser Ala Lys Glu Thr Arg Tyr Cys Ala Val Cys Asn Asp Tyr Ala
 180 185 190
 Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe
 195 200 205
 Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr
 210 215 220
 Asn Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys
 225 230 235 240
 Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Ile Arg
 245 250 255
 Lys Asp Arg Arg Gly Gly Arg Met Leu Lys His Lys Arg Gln Arg Asp
 260 265 270
 Asp Gly Glu Gly Arg Gly Glu Val Gly Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala
 275 280 285
 Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn
 290 295 300
 Ser Leu Ala Leu Phe Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu
 305 310 315 320
 Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro
 325 330 335
 Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg
 340 345 350
 Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val
 355 360 365
 Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu
 370 375 380
 Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Gly
 385 390 395 400
 Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys
 405 410 415
 Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser
 420 425 430
 Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu
 435 440 445

10

20

30

40

Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser
 450 455 460

Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp
 465 470 475 480

Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr
 485 490 495

Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser
 500 505 510

His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met
 515 520 525

Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu
 530 535 540

Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val
 545 550 555 560

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

His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro
 580 585 590

Ala Thr Val
 595

<210> 4
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Thr Met Thr Leu His Thr Lys Ala Ser Gly Met Ala Leu Leu His
 1 5 10 15

Gln Ile Gln Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Asn Arg Pro Gln Leu Lys
 20 25 30

Ile Pro Leu Glu Arg Pro Leu Gly Glu Val Tyr Leu Asp Ser Ser Lys
 35 40 45

Pro Ala Val Tyr Asn Tyr Pro Glu Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Asn Ala
 50 55 60

10

20

30

40

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

10

20

30

40

Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg
 340 345 350
 Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val
 355 360 365
 Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu
 370 375 380
 Glu Ile Leu Met Ile Asp Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Gly
 385 390 395 400
 Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys
 405 410 415
 Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser
 420 425 430
 Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu
 435 440 445
 Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser
 450 455 460
 Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp
 465 470 475 480
 Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr
 485 490 495
 Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser
 500 505 510
 His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met
 515 520 525
 Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu
 530 535 540
 Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val
 545 550 555 560
 Glu Glu Thr Asp Gln Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser Ser
 565 570 575
 His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro
 580 585 590
 Ala Thr Val

10

20

30

40

595

<210> 5

<211> 595

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met	Thr	Met	Thr	Leu	His	Thr	Lys	Ala	Ser	Gly	Met	Ala	Leu	Leu	His	10
1				5					10				15			

Gln	Ile	Gln	Gly	Asn	Glu	Leu	Glu	Pro	Leu	Asn	Arg	Pro	Gln	Leu	Lys
			20					25					30		

Ile	Pro	Leu	Glu	Arg	Pro	Leu	Gly	Glu	Val	Tyr	Leu	Asp	Ser	Ser	Lys
		35					40					45			

Pro	Ala	Val	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Glu	Gly	Ala	Ala	Tyr	Glu	Phe	Asn	Ala	20
	50					55					60					

Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Ala	Gln	Val	Tyr	Gly	Gln	Thr	Gly	Leu	Pro	Tyr
65					70					75				80	

Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Ala	Ala	Ala	Phe	Gly	Ser	Asn	Gly	Leu	Gly	Gly
				85					90					95	

Phe	Pro	Pro	Leu	Asn	Ser	Val	Ser	Pro	Ser	Pro	Leu	Met	Leu	Leu	His
			100					105					110		

Pro	Pro	Pro	Gln	Leu	Ser	Pro	Phe	Leu	Gln	Pro	His	Gly	Gln	Gln	Val	30
		115					120					125				

Pro	Tyr	Tyr	Leu	Glu	Asn	Glu	Pro	Ser	Gly	Tyr	Thr	Val	Arg	Glu	Ala
	130					135					140				

Gly	Pro	Pro	Ala	Phe	Tyr	Arg	Pro	Asn	Ser	Asp	Asn	Arg	Arg	Gln	Gly
145					150					155				160	

Gly	Arg	Glu	Arg	Leu	Ala	Ser	Thr	Asn	Asp	Lys	Gly	Ser	Met	Ala	Met	40
				165					170					175		

Glu	Ser	Ala	Lys	Glu	Thr	Arg	Tyr	Cys	Ala	Val	Cys	Asn	Asp	Tyr	Ala
			180					185					190		

Ser	Gly	Tyr	His	Tyr	Gly	Val	Trp	Ser	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Ala	Phe
		195					200					205			

Phe	Lys	Arg	Ser	Ile	Gln	Gly	His	Asn	Asp	Tyr	Met	Cys	Pro	Ala	Thr
	210					215					220				

Asn Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys
 225 230 235 240
 Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Ile Arg
 245 250 255
 Lys Asp Arg Arg Gly Gly Arg Met Leu Lys His Lys Arg Gln Arg Asp
 260 265 270
 Asp Gly Glu Gly Arg Gly Glu Val Gly Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala
 275 280 285
 Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn
 290 295 300
 Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu
 305 310 315 320
 Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro
 325 330 335
 Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg
 340 345 350
 Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val
 355 360 365
 Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu
 370 375 380
 Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Val Glu His Pro Gly
 385 390 395 400
 Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys
 405 410 415
 Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser
 420 425 430
 Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu
 435 440 445
 Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser
 450 455 460
 Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp
 465 470 475 480
 Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr

10

20

30

40

485	490	495	
Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser			
500	505	510	
His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met			
515	520	525	
Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu			10
530	535	540	
Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val			
545	550	555	560
Glu Glu Thr Asp Gln Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser Ser			
565	570	575	
His <u>Ser</u> Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro			
580	585	590	20
Ala Thr Val			
595			
<210> 6			
<211> 595			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 6			
Met Thr Met Thr Leu His Thr Lys Ala Ser Gly Met Ala Leu Leu His			30
1	5	10	15
Gln Ile Gln Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Asn Arg Pro Gln Leu Lys			
20	25	30	
Ile Pro Leu Glu Arg Pro Leu Gly Glu Val Tyr Leu Asp Ser Ser Lys			
35	40	45	
Pro Ala Val Tyr Asn Tyr Pro Glu Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Asn Ala			
50	55	60	40
Ala Ala Ala Ala Asn Ala Gln Val Tyr Gly Gln Thr Gly Leu Pro Tyr			
65	70	75	80
Gly Pro Gly Ser Glu Ala Ala Ala Phe Gly Ser Asn Gly Leu Gly Gly			
85	90	95	
Phe Pro Pro Leu Asn Ser Val Ser Pro Ser Pro Leu Met Leu Leu His			
100	105	110	

Pro Pro Pro Gln Leu Ser Pro Phe Leu Gln Pro His Gly Gln Gln Val
 115 120 125
 Pro Tyr Tyr Leu Glu Asn Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Val Arg Glu Ala
 130 135 140
 Gly Pro Pro Ala Phe Tyr Arg Pro Asn Ser Asp Asn Arg Arg Gln Gly
 145 150 155 160
 Gly Arg Glu Arg Leu Ala Ser Thr Asn Asp Lys Gly Ser Met Ala Met
 165 170 175
 Glu Ser Ala Lys Glu Thr Arg Tyr Cys Ala Val Cys Asn Asp Tyr Ala
 180 185 190
 Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe
 195 200 205
 Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr
 210 215 220
 Asn Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys
 225 230 235 240
 Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Ile Arg
 245 250 255
 Lys Asp Arg Arg Gly Gly Arg Met Leu Lys His Lys Arg Gln Arg Asp
 260 265 270
 Asp Gly Glu Gly Arg Gly Glu Val Gly Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala
 275 280 285
 Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn
 290 295 300
 Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu
 305 310 315 320
 Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro
 325 330 335
 Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg
 340 345 350
 Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val
 355 360 365
 Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu

10

20

30

40

370	375	380	
Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Gly			
385	390	395	400
Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Val Lys			
	405	410	415
Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser			10
	420	425	430
Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu			
	435	440	445
Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser			
	450	455	460
Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp			20
	465	470	475
Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr			
	485	490	495
Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser			
	500	505	510
His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met			
	515	520	525
Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu			30
	530	535	540
Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val			
	545	550	555
Glu Glu Thr Asp Gln Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser Ser			
	565	570	575
His <u>Ser</u> Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro			40
	580	585	590
Ala Thr Val			
	595		

<210> 7

<211> 595

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Thr Met Thr Leu His Thr Lys Ala Ser Gly Met Ala Leu Leu His
 1 5 10 15

Gln Ile Gln Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Asn Arg Pro Gln Leu Lys
 20 25 30

Ile Pro Leu Glu Arg Pro Leu Gly Glu Val Tyr Leu Asp Ser Ser Lys
 35 40 45

10

Pro Ala Val Tyr Asn Tyr Pro Glu Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Asn Ala
 50 55 60

Ala Ala Ala Ala Asn Ala Gln Val Tyr Gly Gln Thr Gly Leu Pro Tyr
 65 70 75 80

Gly Pro Gly Ser Glu Ala Ala Ala Phe Gly Ser Asn Gly Leu Gly Gly
 85 90 95

Phe Pro Pro Leu Asn Ser Val Ser Pro Ser Pro Leu Met Leu Leu His
 100 105 110

20

Pro Pro Pro Gln Leu Ser Pro Phe Leu Gln Pro His Gly Gln Gln Val
 115 120 125

Pro Tyr Tyr Leu Glu Asn Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Val Arg Glu Ala
 130 135 140

Gly Pro Pro Ala Phe Tyr Arg Pro Asn Ser Asp Asn Arg Arg Gln Gly
 145 150 155 160

30

Gly Arg Glu Arg Leu Ala Ser Thr Asn Asp Lys Gly Ser Met Ala Met
 165 170 175

Glu Ser Ala Lys Glu Thr Arg Tyr Cys Ala Val Cys Asn Asp Tyr Ala
 180 185 190

Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe
 195 200 205

Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr
 210 215 220

40

Asn Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys
 225 230 235 240

Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Ile Arg
 245 250 255

Lys Asp Arg Arg Gly Gly Arg Met Leu Lys His Lys Arg Gln Arg Asp

260	265	270	
Asp Gly Glu Gly Arg Gly Glu Val Gly Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala			
275	280	285	
Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn			
290	295	300	
Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu			10
305	310	315	320
Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro			
	325	330	335
Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg			
	340	345	350
Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val			
	355	360	365
			20
Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu			
	370	375	380
Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Gly			
	385	390	395
			400
Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys			
	405	410	415
Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser			30
	420	425	430
Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu			
	435	440	445
Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser			
	450	455	460
Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp			
	465	470	475
			480
			40
Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Val Leu Thr			
	485	490	495
Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser			
	500	505	510
His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met			
	515	520	525

Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu
 530 535 540

Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val
 545 550 555 560

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

His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro
 580 585 590

10

Ala Thr Val
 595

<210> 8

<211> 595

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 8

Met Thr Met Thr Leu His Thr Lys Ala Ser Gly Met Ala Leu Leu His
 1 5 10 15

Gln Ile Gln Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Asn Arg Pro Gln Leu Lys
 20 25 30

Ile Pro Leu Glu Arg Pro Leu Gly Glu Val Tyr Leu Asp Ser Ser Lys
 35 40 45

30

Pro Ala Val Tyr Asn Tyr Pro Glu Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Asn Ala
 50 55 60

Ala Ala Ala Ala Asn Ala Gln Val Tyr Gly Gln Thr Gly Leu Pro Tyr
 65 70 75 80

Gly Pro Gly Ser Glu Ala Ala Ala Phe Gly Ser Asn Gly Leu Gly Gly
 85 90 95

Phe Pro Pro Leu Asn Ser Val Ser Pro Ser Pro Leu Met Leu Leu His
 100 105 110

40

Pro Pro Pro Gln Leu Ser Pro Phe Leu Gln Pro His Gly Gln Gln Val
 115 120 125

Pro Tyr Tyr Leu Glu Asn Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Val Arg Glu Ala
 130 135 140

Gly Pro Pro Ala Phe Tyr Arg Pro Asn Ser Asp Asn Arg Arg Gln Gly

145		150		155		160	
Gly Arg Glu Arg Leu Ala Ser Thr Asn Asp Lys Gly Ser Met Ala Met							
		165		170		175	
Glu Ser Ala Lys Glu Thr Arg Tyr Cys Ala Val Cys Asn Asp Tyr Ala							
		180		185		190	
Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe							
		195		200		205	
Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr							
		210		215		220	
Asn Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys							
		225		230		235	240
Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Ile Arg							
		245		250		255	
Lys Asp Arg Arg Gly Gly Arg Met Leu Lys His Lys Arg Gln Arg Asp							
		260		265		270	
Asp Gly Glu Gly Arg Gly Glu Val Gly Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala							
		275		280		285	
Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn							
		290		295		300	
Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu							
		305		310		315	320
Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro							
		325		330		335	
Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg							
		340		345		350	
Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val							
		355		360		365	
Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu							
		370		375		380	
Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser <u>Met</u> Glu His Pro Gly							
		385		390		395	400
Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys							
		405		410		415	

10

20

30

40

Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser
 420 425 430

Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu
 435 440 445

Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser
 450 455 460

Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp
 465 470 475 480

Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr
 485 490 495

Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser
 500 505 510

His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met
 515 520 525

Lys Cys Glu Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu
 530 535 540

Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val
 545 550 555 560

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

His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro
 580 585 590

Ala Thr Val
 595

<210> 9

<211> 595

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Thr Met Thr Leu His Thr Lys Ala Ser Gly Met Ala Leu Leu His
 1 5 10 15

Gln Ile Gln Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Asn Arg Pro Gln Leu Lys
 20 25 30

Ile Pro Leu Glu Arg Pro Leu Gly Glu Val Tyr Leu Asp Ser Ser Lys

10

20

30

40

35	40	45	
Pro Ala Val Tyr Asn Tyr	Pro Glu Gly Ala Ala Tyr	Glu Phe Asn Ala	
50	55	60	
Ala Ala Ala Ala Asn Ala	Gln Val Tyr Gly Gln Thr	Gly Leu Pro Tyr	
65	70	75	80
Gly Pro Gly Ser Glu Ala	Ala Ala Phe Gly Ser Asn	Gly Leu Gly Gly	10
85	90	95	
Phe Pro Pro Leu Asn Ser	Val Ser Pro Ser Pro Leu	Met Leu Leu His	
100	105	110	
Pro Pro Pro Gln Leu Ser	Pro Phe Leu Gln Pro His	Gly Gln Gln Val	
115	120	125	
Pro Tyr Tyr Leu Glu Asn	Glu Pro Ser Gly Tyr Thr	Val Arg Glu Ala	
130	135	140	20
Gly Pro Pro Ala Phe Tyr	Arg Pro Asn Ser Asp Asn	Arg Arg Gln Gly	
145	150	155	160
Gly Arg Glu Arg Leu Ala	Ser Thr Asn Asp Lys Gly	Ser Met Ala Met	
165	170	175	
Glu Ser Ala Lys Glu Thr	Arg Tyr Cys Ala Val Cys	Asn Asp Tyr Ala	
180	185	190	
Ser Gly Tyr His Tyr Gly	Val Trp Ser Cys Glu Gly	Cys Lys Ala Phe	30
195	200	205	
Phe Lys Arg Ser Ile Gln	Gly His Asn Asp Tyr Met	Cys Pro Ala Thr	
210	215	220	
Asn Gln Cys Thr Ile Asp	Lys Asn Arg Arg Lys Ser	Cys Gln Ala Cys	
225	230	235	240
Arg Leu Arg Lys Cys Tyr	Glu Val Gly Met Met Lys	Gly Gly Ile Arg	
245	250	255	
Lys Asp Arg Arg Gly Gly	Arg Met Leu Lys His Lys	Arg Gln Arg Asp	40
260	265	270	
Asp Gly Glu Gly Arg Gly	Glu Val Gly Ser Ala Gly	Asp Met Arg Ala	
275	280	285	
Ala Asn Leu Trp Pro Ser	Pro Leu Met Ile Lys Arg	Ser Lys Lys Asn	
290	295	300	

Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu
305 310 315 320

Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro
325 330 335

Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg
340 345 350

Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val
355 360 365

10

Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu
370 375 380

Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Gly
385 390 395 400

Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys
405 410 415

20

Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser
420 425 430

Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu
435 440 445

Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser
450 455 460

Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp
465 470 475 480

30

Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr
485 490 495

Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser
500 505 510

His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met
515 520 525

40

Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu
530 535 540

Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val
545 550 555 560

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

His Pro Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro
 580 585 590

Ala Thr Val
 595

<210> 10

<211> 595

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 10

Met Thr Met Thr Leu His Thr Lys Ala Ser Gly Met Ala Leu Leu His
 1 5 10 15

Gln Ile Gln Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Asn Arg Pro Gln Leu Lys
 20 25 30

Ile Pro Leu Glu Arg Pro Leu Gly Glu Val Tyr Leu Asp Ser Ser Lys
 35 40 45

Pro Ala Val Tyr Asn Tyr Pro Glu Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Asn Ala
 50 55 60

Ala Ala Ala Ala Asn Ala Gln Val Tyr Gly Gln Thr Gly Leu Pro Tyr
 65 70 75 80

Gly Pro Gly Ser Glu Ala Ala Ala Phe Gly Ser Asn Gly Leu Gly Gly
 85 90 95

Phe Pro Pro Leu Asn Ser Val Ser Pro Ser Pro Leu Met Leu Leu His
 100 105 110

Pro Pro Pro Gln Leu Ser Pro Phe Leu Gln Pro His Gly Gln Gln Val
 115 120 125

Pro Tyr Tyr Leu Glu Asn Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Val Arg Glu Ala
 130 135 140

Gly Pro Pro Ala Phe Tyr Arg Pro Asn Ser Asp Asn Arg Arg Gln Gly
 145 150 155 160

Gly Arg Glu Arg Leu Ala Ser Thr Asn Asp Lys Gly Ser Met Ala Met
 165 170 175

Glu Ser Ala Lys Glu Thr Arg Tyr Cys Ala Val Cys Asn Asp Tyr Ala
 180 185 190

20

30

40

Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe
 195 200 205
 Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr
 210 215 220
 Asn Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys
 225 230 235 240
 Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Ile Arg
 245 250 255
 Lys Asp Arg Arg Gly Gly Arg Met Leu Lys His Lys Arg Gln Arg Asp
 260 265 270
 Asp Gly Glu Gly Arg Gly Glu Val Gly Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala
 275 280 285
 Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn
 290 295 300
 Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu
 305 310 315 320
 Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro
 325 330 335
 Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg
 340 345 350
 Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val
 355 360 365
 Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu
 370 375 380
 Glu Ile Leu Met Ile Asp Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Gly
 385 390 395 400
 Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys
 405 410 415
 Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser
 420 425 430
 Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu
 435 440 445
 Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser
 450 455 460

10

20

30

40

Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp
 465 470 475 480

Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr
 485 490 495

Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser
 500 505 510

His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met
 515 520 525

Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu
 530 535 540

Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val
 545 550 555 560

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

His Pro Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro
 580 585 590

Ala Thr Val
 595

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 11

cctgcgggga cacggtctgc accctgcccg cggcc

35

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide primer for PCR

10

20

30

40

<400> 12		
cagggagctc tcagactgtg gcagggaac ccctc	35	
<210> 13		
<211> 49		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide for mutagenesis		10
<400> 13		
atgatcaaac gctctaagag gaacagcctg gccttgtccc tgacggccg	49	
<210> 14		
<211> 49		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		20
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide for mutagenesis		
<400> 14		
ggacaaggcc aggcgtgtcc tcttagagcg ttgatcatg agcgggcct	49	
<210> 15		
<211> 49		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide for mutagenesis		
<400> 15		
aagaacagcc tggccttggt cctgacggcc gaccagaagg tcagtgcc	49	
<210> 16		
<211> 49		
<212> DNA		40
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide for mutagenesis		
<400> 16		
catctggctg gccgtcagga acaaggccag gctgttcttc ttagagcgt	49	

<210> 17
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide for mutagenesis

 <400> 17
 gctagagatc ctgatgattg atctcgtctg gcgctccatg gaggc
 44

 <210> 18
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide for mutagenesis
 20

 <400> 18
 gctccatgga gcgccagacg agatcaatca tcaggatctc tagc
 44

 <210> 19
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide for mutagenesis
 30

 <400> 19
 tggctcgtc tggcgctccg tggagcacc agggaagcta ctgtttgct
 49

 <210> 20
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 40

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide for mutagenesis

 <400> 20
 agcaaacagt agcttccttg ggtgctccac ggagcgccag acgagacca
 49

 <210> 21

<211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide for mutagenesis

 <400> 21
 ctcttggaca ggaaccaggt aaaatgtgta gagggcatgg tggagatct 49 10

 <210> 22
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide for mutagenesis

 <400> 22
 catgccctct acacatttta cctgggtcct gtccaagagc aagttagga 49 20

 <210> 23
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide for mutagenesis

 <400> 23
 ccacctgatg gccaaaggcag tcctgaccct gcagcagcag cagcagcac 49 30

 <210> 24
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide for mutagenesis

 <400> 24
 ggtgctgcig ctgcagggtc aggactgcct tggccatcag gtggatcaa 49 40

 <210> 25
 <211> 44
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide for mutagenesis

<400> 25

atcigtacag catgaagtgc gagaacgtgg tgcccctcta tgac 44

10

<210> 26

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide for mutagenesis

<400> 26

gcatagagg ggcaccacgt tctcgacatt catgctgtac agat 44 20

<210> 27

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide for mutagenesis

<400> 27

gcgggcctcta ctcatcgca tcccttgcaa aagtattaca tcacg 45

30

<210> 28

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide for mutagenesis

<400> 28

cgtgatgtaa tacttttgca agggatgcga tgaagtagag cccgc 45

40

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 29

tggagacaatg agagctgcca

20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 30

acctttggcc aagcccgtc

20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 31

ccgctcatga tcaaacgtc

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 32

agggcagggg tgaagtggg

20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

oligonucleotide primer for PCR

<400> 33		
ccaacctttg gccagcccg	20	
<210> 34		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 34		
tactcggaat agagtatggg	20	
<210> 35		
<211> 20		
<212> DNA		20
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 35		
ggctcagcat ccaacaaggc	20	
<210> 36		30
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 36		
tgaccatcig gtcggccgtc	20	40
<210> 37		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		

<400> 37		
aagggtctgg taggatcata	20	
<210> 38		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		10
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 38		
catctggtcg gccgtcaggg	20	
<210> 39		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		20
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 39		
agagctgccca acctttggcc	20	
<210> 40		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 40		
aagcccgctc atgatcaaac	20	
<210> 41		
<211> 20		
<212> DNA		40
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 41		
gctctaagaa gaacagcctg	20	

<210> 42		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		10
<400> 42		
agacatgaga gctgccaacc	20	
<210> 43		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		20
<400> 43		
ggccaagccc gctcatgac	20	
<210> 44		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		30
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 44		
agcttcactg aagggtctgg	20	
<210> 45		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		40
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 45		
taggatcata ctcggaatag	20	
<210> 46		

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 46
 agtatggggg gctcagcatc 20 10

<210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 47
 caacaaggca ctgaccatct 20 20

<210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 48
 aagggtctgg taggatcata 20 20

<210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 49
 gagctgggtc acatgatcaa 20 20

<210> 50
 <211> 20
 <212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 50

tgggcgaaga gggtgccagg

20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 51

tigtggattt gaccciccat

20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 52

atcaggicca cttctagaa

20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 53

gtgcctggct agagatcctg

20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

20

30

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 54

tgggtgctcc atggagcgcc

20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 55

ttaggagcaa acagtagctt

20

<210> 56

<211> 19

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 56

tggttcctgt ccaagagca

19

30

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 57

tccaccatgc cctctacaca

20

40

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

oligonucleotide primer for PCR

<400> 58		
agccagcagc atgtcgaaga	20	
<210> 59		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 59		
ggcttttggtg atttgaccct	20	
<210> 60		
<211> 20		
<212> DNA		20
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 60		
ccaatgacag gtccaccctc	20	
<210> 61		30
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 61		
tagaatgtgc ctggctagag	20	40
<210> 62		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		

<400> 62		
gctggttcac atgatcaact	20	
<210> 63		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		10
<400> 63		
gccaggcttt gtggatttga	20	
<210> 64		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		20
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 64		
atgatgtagc cagcaggtcg	20	
<210> 65		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 65		
gccctctaca cattttcccl	20	
<210> 66		
<211> 20		
<212> DNA		40
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 66		
aagagcaagt taggagcaaa	20	

<210> 67
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 67
ggatcaaagt gtctgtgatc 20

<210> 68
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR 20

<400> 68
tctccaccat gccctctaca 20

<210> 69
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220> 30
<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 69
ggtctcgtct ggcgctccat 20

<210> 70
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 40

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 70
ggagcaccca gtgaagctac 20

<210> 71

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 71
 tgtttgctcc taacttggac 20 10

<210> 72
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 72
 tcctgatgat tggctctcgtc 20 20

<210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 73
 caccagatga agctactgtt 20 30

<210> 74
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 74
 ttcatcatgc ggaaccgaga 20 40

<210> 75
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 75

gatgtagcca gcagcatgtc

20

<210> 76

10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 76

aagatctcca ccatgccccct

20

20

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 77

ctccaccatg cccctctaca

20

30

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 78

atgtcgaaga tctccaccat

20

40

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 79

agagaaggac catatccacc

20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 80

gagtcctgga caagatcaca

20

<210> 81

20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 81

gacactttga tccacctgat

20

30

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 82

ccctgaagtc tctggaagag

20

40

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

oligonucleotide primer for PCR

<400> 83		
acaagatcac agacacttig	20	
<210> 84		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 84		
tgtgcctgat gtgggagagg	20	
<210> 85		
<211> 20		
<212> DNA		20
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 85		
atgaggagga gctgggccag	20	
<210> 86		30
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 86		
ccgctggigc tgctgctgca	20	40
<210> 87		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		

<400> 87		
gcctgggccag ccgctggcgc	20	
<210> 88		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		10
<400> 88		
cccttggttac tcatgtgcct	20	
<210> 89		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		20
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 89		
aggcacatga gtaacaaagg	20	
<210> 90		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 90		
catggagcat ctgtacagca	20	
<210> 91		
<211> 20		
<212> DNA		40
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 91		
ttgtggattt gaccttccat	20	

<210> 92		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 92		10
ccaccgagtc ctggacaaga	20	
<210> 93		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		20
<400> 93		
ggccaaggca ggcctgaccc	20	
<210> 94		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		30
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 94		
gtaggcggig ggcgtccagc	20	
<210> 95		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		40
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 95		
atctccagca gcaggcata	20	
<210> 96		

<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 96		
cagcaggtca tagaggggca	20	10
<210> 97		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 97		20
cagtggccaa gtggctttgg	20	
<210> 98		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		30
<400> 98		
ccacggctag tgggcgcatg	20	
<210> 99		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		40
<400> 99		
aagtgcaaga acgtggtgcc	20	
<210> 100		
<211> 20		
<212> DNA		

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 100

tctatgacct gctgctggag

20

10

<210> 101

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 101

tgctggacgc ccaccgccta

20

20

<210> 102

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

30

<400> 102

atgcgcccac tagccgtgga

20

<210> 103

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

40

<400> 103

gcatccgtgg aggagacgga

20

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 104

tcccccgta tgtaatactt

20

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 105

tctgcctccc ccgtgatga

20

<210> 106

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 106

aaaccctctg cctccccctg

20

<210> 107

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 107

gtggcaggga aaccctctgc

20

<210> 108

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

oligonucleotide primer for PCR

<400> 108

acigtggcag ggaaaccctc

20

<210> 109

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 109

atatgtgtcc agccaccaac

20

<210> 110

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 110

tatctgaacc gtglgggagc

20

<210> 111

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 111

tgatcaaacg ctctaagaag

20

40

<210> 112

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 112		
caaacgcict aagaagaaca	20	
<210> 113		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		10
<400> 113		
cgctctaaga agaacagcct	20	
<210> 114		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		20
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		
<400> 114		
ctaagaagaa cagcctggcc	20	
<210> 115		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		
<400> 115		
gaagaacagc ctggccttgt	20	
<210> 116		
<211> 20		
<212> DNA		40
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		
<400> 116		
agaacagcct ggccttgacc	20	

<210> 117		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		
<400> 117		10
cagcctggcc ttgtccctga	20	
<210> 118		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		20
<400> 118		
ctggccttgt cctgacggc	20	
<210> 119		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		30
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		
<400> 119		
ccctgtccct gacggccgac	20	
<210> 120		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		40
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		
<400> 120		
gtccctgacg gccgaccaga	20	
<210> 121		

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 121
 gagatcctga tgattggtct 20 10

<210> 122
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 122
 atcctgatga ttggtctcgt 20 20

<210> 123
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide probe for Southern hybridization 30

<400> 123
 ctgatgattg gtctcgtctg 20

<210> 124
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide probe for Southern hybridization 40

<400> 124
 atgattggtc tcgtctggcg 20

<210> 125
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 125

attggctctcg tctggcgctc

20

<210> 126

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 126

gtctcgtctg gcgctccatg

20

<210> 127

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 127

acgctcggcg ctccatggag

20

<210> 128

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 128

ggcgctccat ggaggcaccc

20

<210> 129

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

20

30

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 129

gctccatgga ggcacccagg g

21

<210> 130

<211> 20

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 130

catggaggca cccaggggaag

20

<210> 131

20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 131

tcttggacag gaaccaggga

20

30

<210> 132

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 132

ggacaggaac cagggaataat

20

40

<210> 133

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

oligonucleotide probe for Southern hybridization			
<400> 133			
aggaaccagg gaaaatgtgt	20		
<210> 134			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			10
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence:Designed			
oligonucleotide probe for Southern hybridization			
<400> 134			
accagggaaa atgtgtagag	20		
<210> 135			
<211> 20			
<212> DNA			20
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence:Designed			
oligonucleotide probe for Southern hybridization			
<400> 135			
gggaaaatgt gtagaggga	20		
<210> 136			30
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence:Designed			
oligonucleotide probe for Southern hybridization			
<400> 136			
accgatggc caaggcaggc	20		40
<210> 137			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence:Designed			
oligonucleotide probe for Southern hybridization			

<400> 137		
gatggccaag gcaggcctga	20	
<210> 138		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		10
<400> 138		
gccaaggcag gcctgaccct	20	
<210> 139		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		20
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		
<400> 139		
aggcaggcct gaccctgcag	20	
<210> 140		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		
<400> 140		
aggcctgacc ctgcagcagc	20	
<210> 141		
<211> 20		
<212> DNA		40
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		
<400> 141		
ctgtacagca tgaagtgcaa	20	

<210> 142		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		
<400> 142		10
acagcatgaa gtgcaagaac	20	
<210> 143		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		20
<400> 143		
atgaagtgca agaacgtggt	20	
<210> 144		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		30
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		
<400> 144		
agtgcagaagaa cgtggcgccc	20	
<210> 145		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		40
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide probe for Southern hybridization		
<400> 145		
caagaacgtg gtgccccctct	20	
<210> 146		

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 146
 gctctacttc atcgattcc 20 10

<210> 147
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 147
 ctacttcac gcattccttg 20 20

<210> 148
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 148
 cttcatcgca ttccttgcaa 20 30

<210> 149
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 149
 catcgcatlc cttgcaaaag 20 40

<210> 150
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide probe for Southern hybridization

<400> 150

cgcatcctt gcaaaagta

20

<210> 151

10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 151

cccagccacc atgacatga cctccacac caaagcatct

40

20

<210> 152

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for mutagenesis

<400> 152

caggctgttc ctcttagagc g

21

30

<210> 153

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide primer for mutagenesis

<400> 153

tggtcggccg tcaggaacaa ggccaggctg t

31

40

<210> 154

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>			
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for mutagenesis			
<400> 154			
gggtgctcca cggagcgcca g	21		
<210> 155			
<211> 31			
<212> DNA			10
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for mutagenesis			
<400> 155			
ccctctacac attttaccig gtccctgtcc a	31		
<210> 156			
<211> 31			20
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for mutagenesis			
<400> 156			
tgctgcaggg tcaggactgc ctggccatc a	31		
<210> 157			30
<211> 23			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for mutagenesis			
<400> 157			
caaagcctgg ctccctcttc gcc	23		40
<210> 158			
<211> 24			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence:Designed			

oligonucleotide primer for PCR

<400> 158		
ggaatgatga aaggtgggat acga	24	
<210> 159		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 159		
aatttatgct acaacaaggc aaggc	25	
<210> 160		
<211> 24		
<212> DNA		20
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 160		
ggagtggcac cticcagggt caag	24	
<210> 161		30
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide for synthesis		
<400> 161		
tcgacaaagt caggtcacag tgacctgac aag	33	40
<210> 162		
<211> 52		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide for synthesis		

<400> 162
 gatctcgact ataaagaggg caggctgtcc tciaagcgtc accacgacit ca 52

<210> 163
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence :Designed 10
 oligonucleotide for synthesis

<400> 163
 agcttgaagt cgtggtgacg cttagaggac agcctgccct ctttatagtc ga 52

<210> 164
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence :Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 164
 gtggagacat gagagctgcc aacctt 26

<210> 165
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence :Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 165
 gaccatctgg tcggccgtca gggacaaggc caggctaggc 40

<210> 166
 <211> 40
 <212> DNA 40
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence :Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 166
 gcicattgatc aaacgctcta agaagaacag cctgcctggg 40

<210> 167		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 167		10
aatagagtat ggggggctca gcat	24	
<210> 168		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		20
<400> 168		
ggtcacctt ctagaatgtg cctgg	25	
<210> 169		
<211> 39		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		30
<400> 169		
gcaagttagg agcaaacagt agcttccctg ggtggigca	39	
<210> 170		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		40
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 170		
ccatggagca gggagtgaag ctact	25	
<210> 171		

<211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence :Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 171
 cagcatgtcg aagatctcca ccatgccctc tacacatggt 40 10

<210> 172
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence :Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 172
 gagtcctgga caagatcaca gaca 24 20

<210> 173
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence :Designed
 oligonucleotide primer for PCR 30

<400> 173
 tgctgtacag atgtccatg cctt 24

<210> 174
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence :Designed
 oligonucleotide primer for PCR 40

<400> 174
 ctctcccaca tcaggcacat gagt 24

<210> 175
 <211> 40
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 175

agcatctcca gcagcaggtc atagaggggc accacgagct 40

<210> 176

10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 176

gaggcggggt aagggaagta ggtggaagat tcagc 35 20

<210> 177

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 177

gggtggggaa atagggtttc caatgcttca ctggg 35 30

<210> 178

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR 40

<400> 178

cccagccacc atggaagtgc agttagggct gggaagggtc 40

<210> 179

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 179

gggtggggaa atagggtttc caatgcttca ctggg 35

<210> 180

<211> 30

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 180

gcgttcacaa gctaagtigt ttatctcggc 30

<210> 181

<211> 30

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 181

taaatttcac catclactct cccatcacig 30

30

<210> 182

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 182

ccaccaatgga ctccaaagaa tcattaactc ctggtaga 38

40

<210> 183

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed

oligonucleotide primer for PCR

<400> 183

gcagtcactt ttgatgaaac agaagttttt tgata

35

<210> 184

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 184

ccgacccagg aggtggagat ccttccggt

29

<210> 185

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 185

ccacaaaatt taattcttta aaag

24

<210> 186

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 186

ccaccatgac tgagctgaag gcaaagggtc cccgg

35

40

<210> 187

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 187		
cattcacttt ttaigaaaga gaaggggttt cacca	35	
<210> 188		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		10
<400> 188		
gcactcgcctg gcctggatgt ggttggattt	30	
<210> 189		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		20
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 189		
ttcagactgc tctggtctcg ccaaattccac	30	
<210> 190		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 190		
ccaccatgga gaccaaaggc taccacagtc tccc	34	
<210> 191		
<211> 34		
<212> DNA		40
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 191		
cagtcacttc cggtaggaagt agagcggctt ggcg	34	

<210> 192		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 192		10
ttgagttact gatlccgatg aatgtgcttg ctctg	35	
<210> 193		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		20
<400> 193		
aaatgaggga ccacacagca gaaagatgaa gcccc	35	
<210> 194		
<211> 55		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		30
<400> 194		
gccgcggccg cccagccacc atggatataa aaaactcacc atctagccctt aattc	55	
<210> 195		
<211> 41		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		40
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 195		
gggtctagaa atgagggacc acacagcaga aagatgaagc c	41	
<210> 196		

<211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence :Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 196
 tggaattgaa gtgaatggaa cagaagccaa gcaagggt 37 10

<210> 197
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence :Designed
 oligonucleotide primer for PCR

<400> 197
 tggccgacctg aggctttaga ctccctgata ctcaa 35 20

<210> 198
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence :Designed
 oligonucleotide primer for PCR 30

<400> 198
 cccagccacc atggaacaga agccaagcaa ggtggagtgt 40

<210> 199
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence :Designed
 oligonucleotide primer for PCR 40

<400> 199
 tggccgacctg aggctttaga ctccctgata ctcaa 35

<210> 200
 <211> 35
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 200

ttactaacct ataacccccca acagtatgac agaaa

35

<210> 201

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 201

cagtctaatt ctggaacact tccaggaaca aaggg

35

20

<210> 202

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 202

cccagccacc atgacagaaa atggccttac agcttgggac

40

30

<210> 203

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 203

cagtctaatt ctggaacact tccaggaaca aaggg

35

40

<210> 204

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide for synthesis

<400> 204

tcaggtcatt ccaggtcatg

20

<210> 205

<211> 30

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 205

agaagccittt gggctcgaag tgtctgtgag

30

<210> 206

<211> 30

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 206

atggctgagg tctcaaggga ccggggaaaa

30

30

<210> 207

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide primer for PCR

<400> 207

ccaccatgga ggcaatggcg gccagcacit ccc

33

40

<210> 208

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed

oligonucleotide primer for PCR

<400> 208		
tagtcaggag atctcattgc caaacacttc ga	32	
<210> 209		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide for synthesis		
<400> 209		
tcaggcacaca gaggtcatg	19	
<210> 210		
<211> 30		
<212> DNA		20
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 210		
ggattgatct ttgtctagat agagacaaaa	30	
<210> 211		
<211> 33		
<212> DNA		30
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		
<400> 211		
ctagtacaag tccttgtaga tctcctgcag gag	33	
<210> 212		
<211> 33		
<212> DNA		40
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence :Designed oligonucleotide primer for PCR		

<400> 212

ccaccatggg tgaactctg ggagattctc cta

33

<210> 213

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence :Designed
oligonucleotide for synthesis

10

<400> 213

tcaggtcaca ggtcatg

17

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】 ヒト変異ER またはヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子は細胞の染色体から発現させた。変異ER 遺伝子は細胞中で一過性に発現させた。

【図 2】 ヒト変異ER またはヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子は細胞の染色体から発現させた。変異ER 遺伝子は細胞中で一過性に発現させた。

【図 3】 ヒト変異ER またはヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子は細胞の染色体から発現させた。変異ER 遺伝子は細胞中で一過性に発現させた。

30

【図 4】 ヒト変異ER またはヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子は細胞の染色体から発現させた。変異ER 遺伝子は細胞中で一過性に発現させた。

【図 5】 ヒト変異ER またはヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子は細胞の染色体から発現させた。変異ER 遺伝子は細胞中で一過性に発現させた。

【図 6】 ヒト変異ER またはヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子は細胞の染色体から発現させた。変異ER 遺伝子は細胞中で一過性に発現させた。

40

【図 7】 ヒト変異ER またはヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子は細胞の染色体から発現させた。変異ER 遺伝子は細胞中で一過性に発現させた。

【図 8】 ヒト変異ER またはヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子は細胞の染色体から発現させた。変異ER 遺伝子は細胞中で一過性に発現させた。

【図 9】 ヒト変異ER またはヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子は細胞の染色体から発現させた。変異ER 遺伝子は細胞中で一過性に発現させた。

【図 10】 ヒト変異ER またはヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポ

50

【図30】ヒト変異ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子は細胞の染色体から発現させた。変異ER 遺伝子は細胞中で一過性に発現させた。

【図31】ヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子は細胞の染色体から発現させた。

【図32】ヒト変異ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子は細胞の染色体から発現させた。変異ER 遺伝子は細胞中で一過性に発現させた。

図1、2、4、5、7、8、12、13、16、17および21～26は、ヒト変異ER またはヒト変異ER を刺激する可能性がある単独の薬剤として様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェンまたはZM189154が存在する状態でのルシフェラーゼ活性を表す。図3、6、9～11、14、15、18～20、27～32は、様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェンまたはZM189154と共に様々な濃度の100pM E2が存在する状態でのルシフェラーゼ活性を表す。安定形質転換力セット細胞を利用して、ヒト変異ER 遺伝子またはヒト正常ER 遺伝子を一過性に発現させると共に、その染色体からレポーター遺伝子を発現させた。

図1、2、4、5、7、8、12、13、16、17および21～26では、ヒト変異ER またはヒト正常ER を(4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェンまたはZM189154を含まない)DMSOの存在下に置いたコントロールがもたらすルシフェラーゼ活性を使って、ルシフェラーゼ活性をゼロにする。図3、6、9～11、14、15、18～20、27～32では、100pMのE2を含むDMSO溶液の存在下にヒト変異ER またはヒト正常ER を置いたコントロールがもたらすルシフェラーゼ活性を使って、ルシフェラーゼ活性をゼロにする。ヒト変異ER およびヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性をゼロにする際には、コントロールによるルシフェラーゼ活性を100%に設定した。図1、2、4、5、7、8、12、13、16、17および21～26では、コントロールが与えるルシフェラーゼ活性をDMSOとして示している。図3、6、9～11、14、15、18～20、27～32では、コントロールが与えるルシフェラーゼ活性をDMSO + E2として示している。

【図33】ヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト正常ER は、細胞の染色体から発現させた。

【図34】ヒト変異ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト変異ER 遺伝子は、細胞の染色体から発現させた。

【図35】ヒト変異ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト変異ER 遺伝子は、細胞の染色体から発現させた。

【図36】ヒト変異ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト変異ER 遺伝子は、細胞の染色体から発現させた。

【図37】ヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト正常ER は、細胞の染色体から発現させた。

【図38】ヒト変異ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト変異ER 遺伝子は、細胞の染色体から発現させた。

【図39】ヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト正常ER は、細胞の染色体から発現させた。

【図40】ヒト変異ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト変異ER 遺伝子は、細胞の染色体から発現させた。

【図41】ヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト正常ER は、細胞の染色体から発現させた。

【図42】ヒト変異ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト変異ER 遺伝子は、細胞の染色体から発現させた。

【図43】ヒト変異ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト変異ER 遺伝子は、細胞の染色体から発現させた。

【図44】ヒト変異ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト変異ER 遺伝子は、細胞の染色体から発現させた。

【図45】ヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト正常ER は、細胞の染色体から発現させた。

【図46】ヒト変異ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト変異ER 遺伝子は、細胞の染色体から発現させた。

【図47】ヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト正常ER は、細胞の染色体から発現させた。

【図48】ヒト変異ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。レポーター遺伝子およびヒト変異ER 遺伝子は、細胞の染色体から発現させた。

図33～40は、ヒト変異ER またはヒト正常ER を刺激する可能性がある単独の薬剤として様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェン、ZM189154またはラロキシフェンが存在する状態でのルシフェラーゼ活性を表す。図41～48は、様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェン、ZM189154またはラロキシフェンと共に100pMのE2が存在する状態でのルシフェラーゼ活性を表す。安定形質転換バイナリー細胞を利用して、レポーター遺伝子をヒト変異ER 遺伝子と共に、またはヒト正常ER 遺伝子と共に、染色体から発現させた。図33～40では、ヒト変異ER またはヒト正常ER を(4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェンまたはZM189154を含まない)DMSOの存在下に置いたコントロールがもたらすルシフェラーゼ活性をゼロにする。図41～48では、100pMのE2を含むDMSO溶液の存在下にヒト変異ER またはヒト正常ER を置いたコントロールがもたらすルシフェラーゼ活性をゼロにする。ヒト変異ER およびヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性をゼロにする際には、コントロールによるルシフェラーゼ活性を100%に設定した。図33～40では、コントロールが与えるルシフェラーゼ活性をDMSOとして示している。図41～48では、コントロールが与えるルシフェラーゼ活性をDMSO + E2として示している。

【図49】比較例として、レポーター遺伝子を細胞中で一過性に発現させた場合にヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。

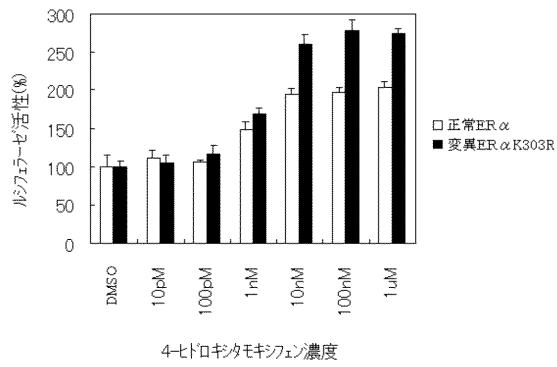
【図50】比較例として、レポーター遺伝子を細胞中で一過性に発現させた場合にヒト変異ER K531Eが与えるルシフェラーゼ活性を表す。

【図51】比較例として、レポーター遺伝子を細胞中で一過性に発現させた場合にヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性を表す。

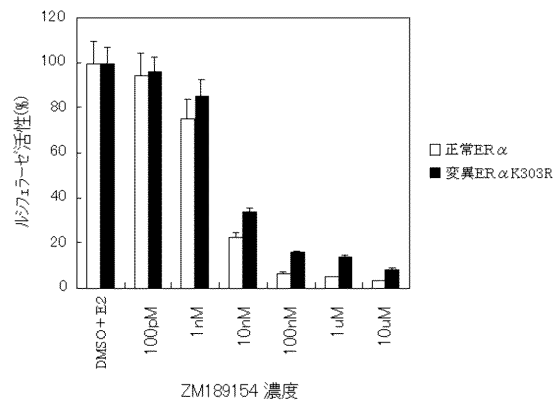
【図52】比較例として、レポーター遺伝子を細胞中で一過性に発現させた場合にヒト変異ER K531Eが与えるルシフェラーゼ活性を表す。

図49および50は、ヒト変異ER を刺激する可能性がある単独の薬剤として様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェンが存在する状態でのルシフェラーゼ活性を表す。図51および52は、様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェンと共に100pMのE2が存在する状態でのルシフェラーゼ活性を表す。図49および50では、ヒト正常ER またはヒト変異ER K531Eを(4-ヒドロキシタモキシフェンを含まない)DMSOの存在下に置いたコントロールのルシフェラーゼ活性をゼロにする。図51および52では、100pMのE2を含むDMSO溶液の存在下にヒト変異ER K531Eを置いたコントロールのルシフェラーゼ活性をゼロにする。ヒト変異ER およびヒト正常ER が与えるルシフェラーゼ活性をゼロにする際には、結果として得られたコントロールによるルシフェラーゼ活性を100%に設定する。図49および50では、コントロールが与えるルシフェラーゼ活性をDMSOとして示している。図51および52では、コントロールが与えるルシフェラーゼ活性をDMSO + E2として示している。

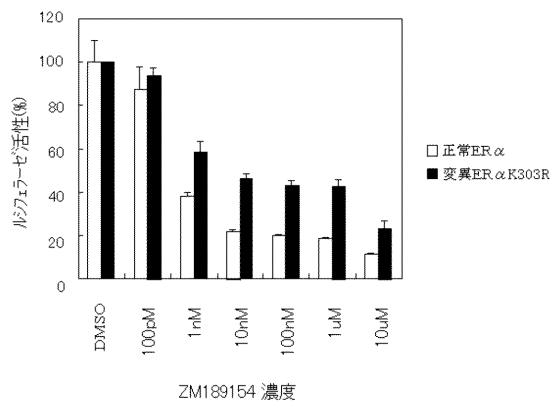
【図 1】



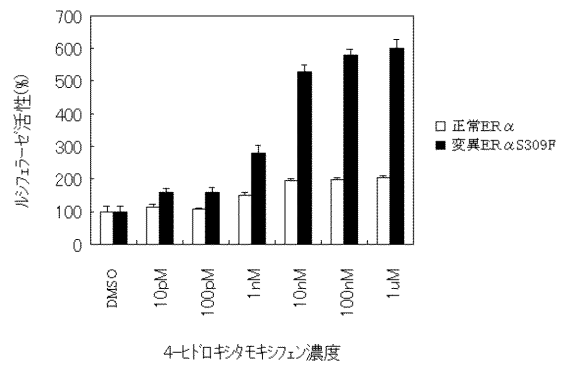
【図 3】



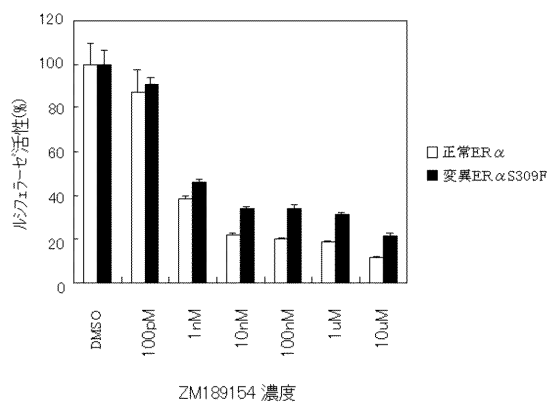
【図 2】



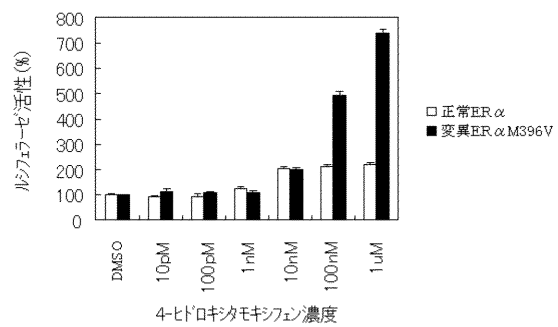
【図 4】



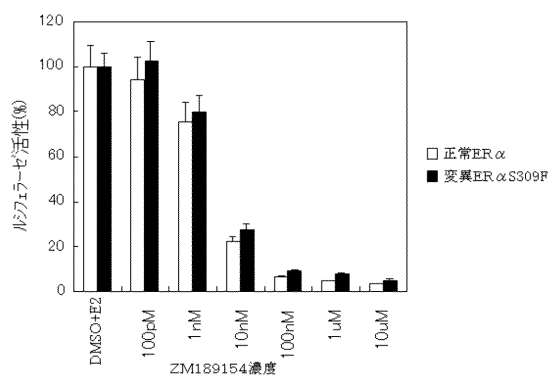
【図 5】



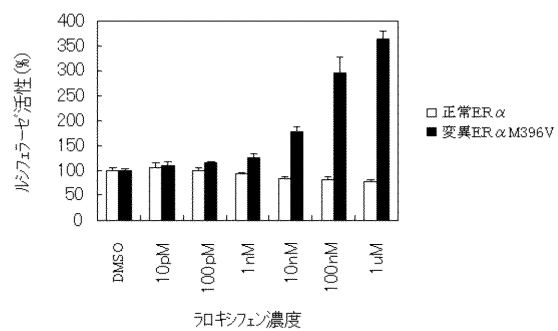
【図 7】



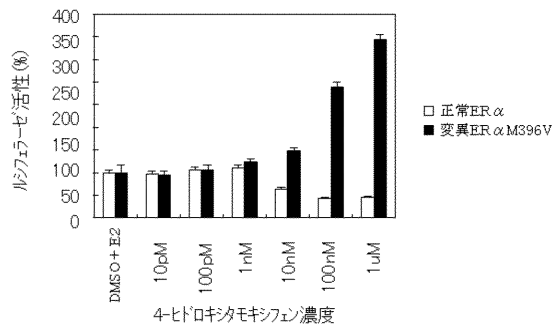
【図 6】



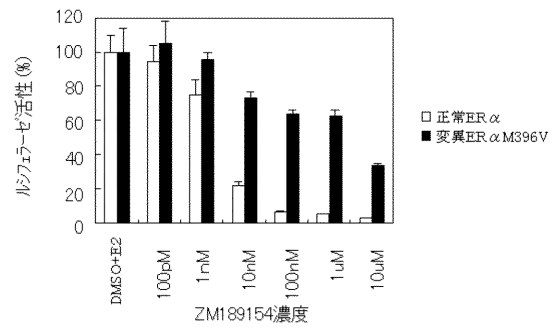
【図 8】



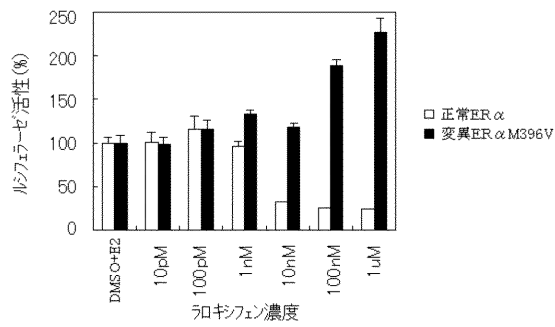
【図 9】



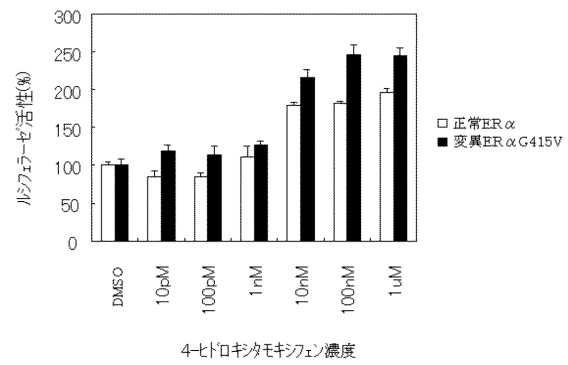
【図 11】



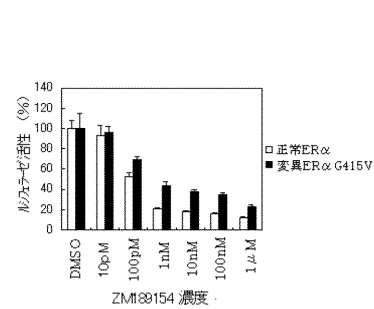
【図 10】



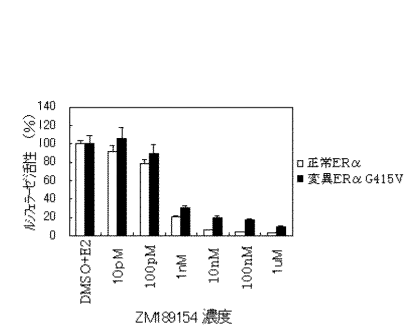
【図 12】



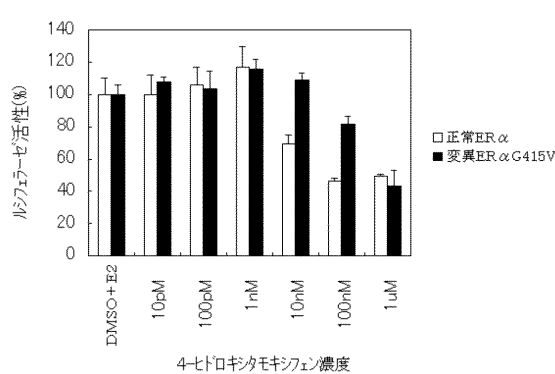
【図 13】



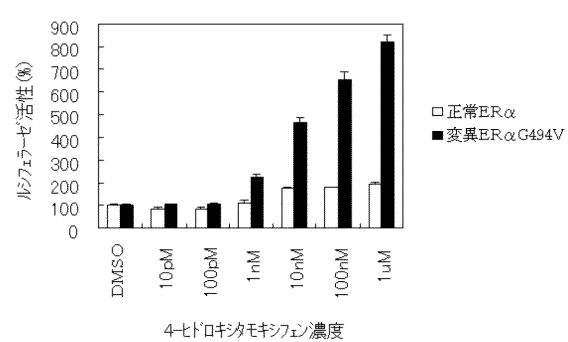
【図 15】



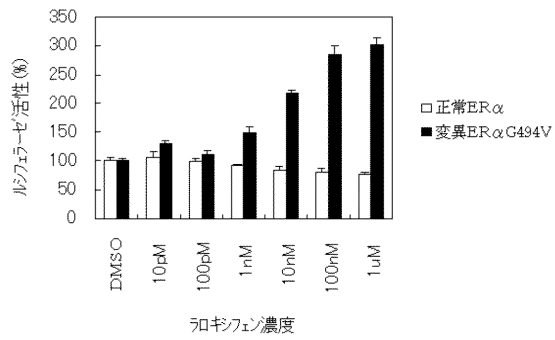
【図 14】



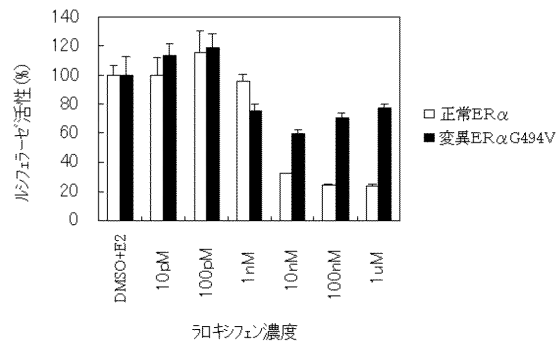
【図 16】



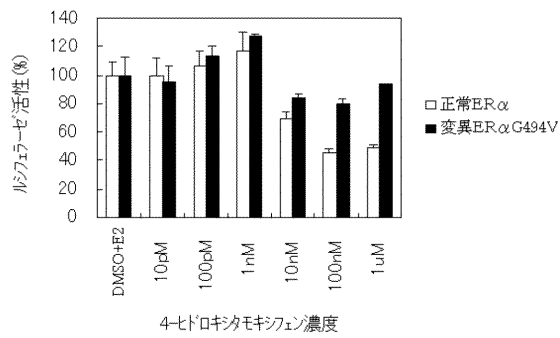
【図 17】



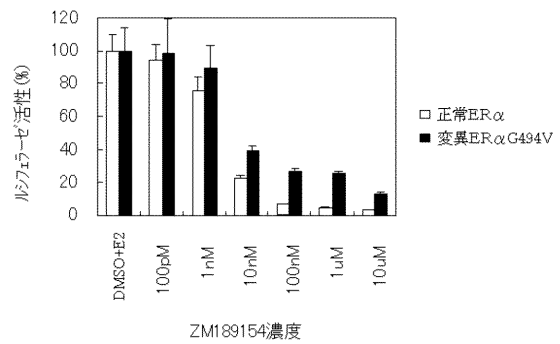
【図 19】



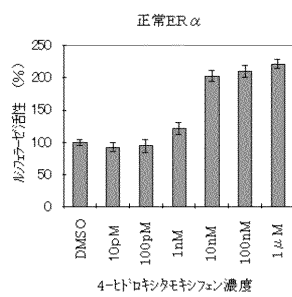
【図 18】



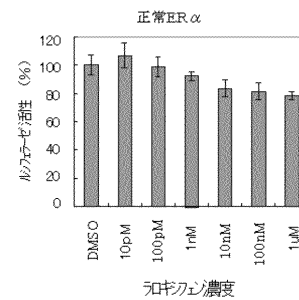
【図 20】



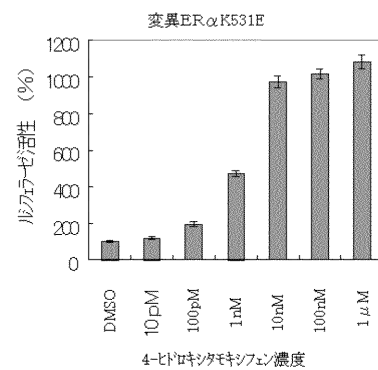
【図 21】



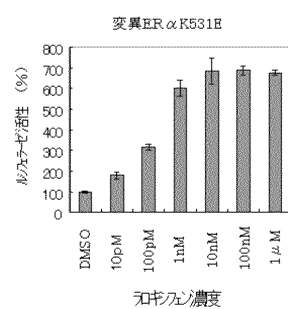
【図 23】



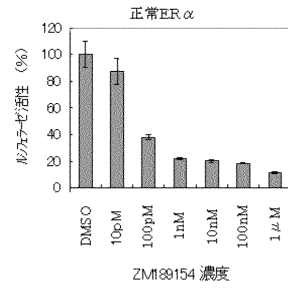
【図 22】



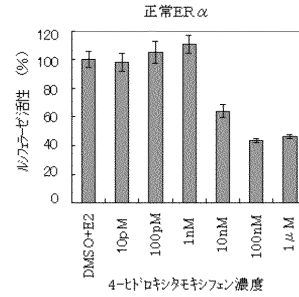
【図 24】



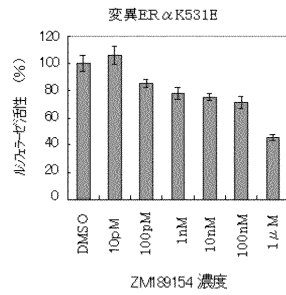
【図 25】



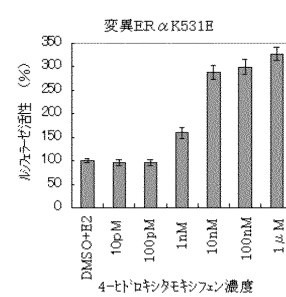
【図 27】



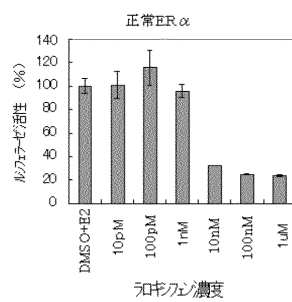
【図 26】



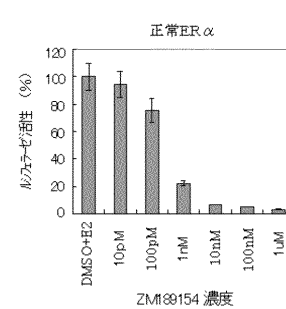
【図 28】



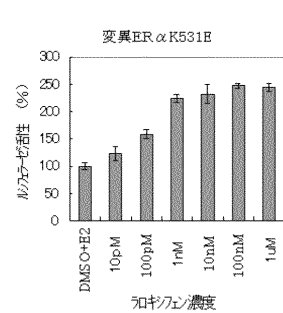
【図 29】



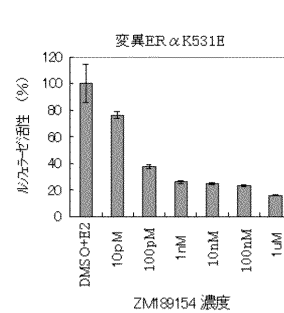
【図 31】



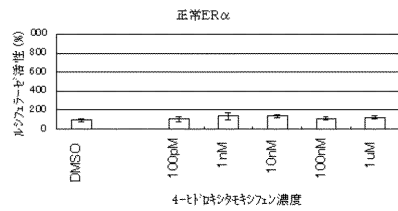
【図 30】



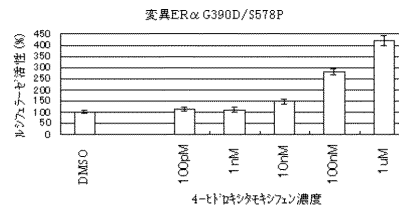
【図 32】



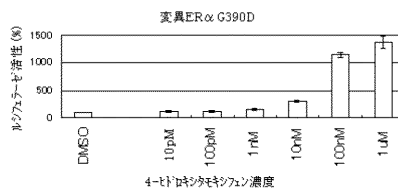
【図 3 3】



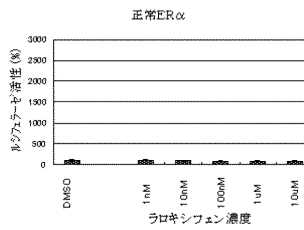
【図 3 6】



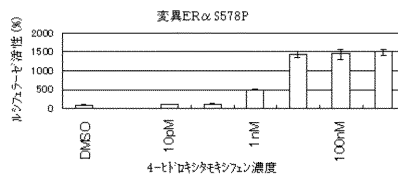
【図 3 4】



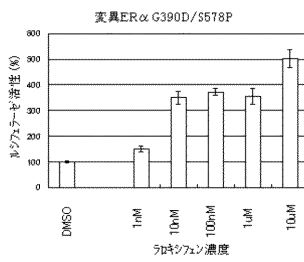
【図 3 7】



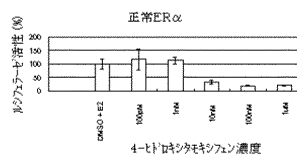
【図 3 5】



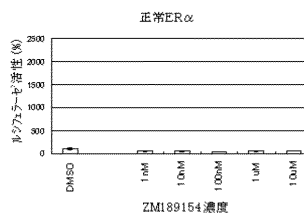
【図 3 8】



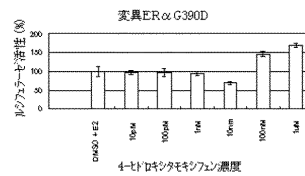
【図 4 1】



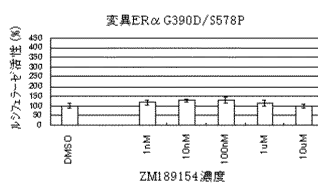
【図 3 9】



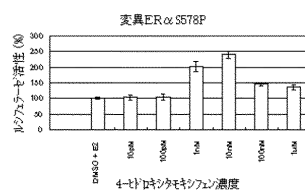
【図 4 2】



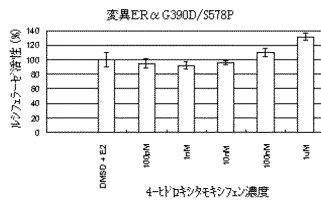
【図 4 0】



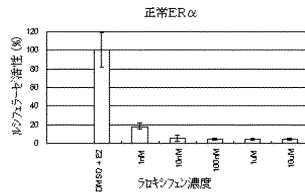
【図 4 3】



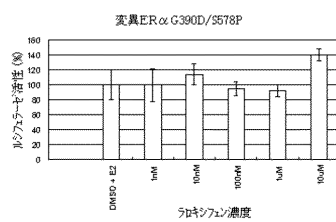
【図 4 4】



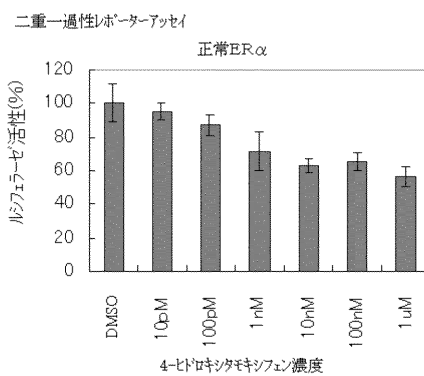
【図 4 5】



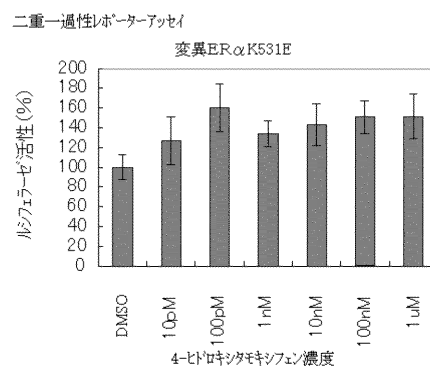
【図 4 6】



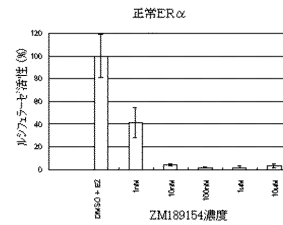
【図 4 9】



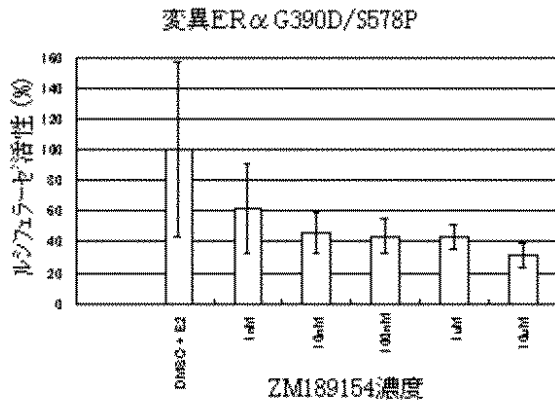
【図 5 0】



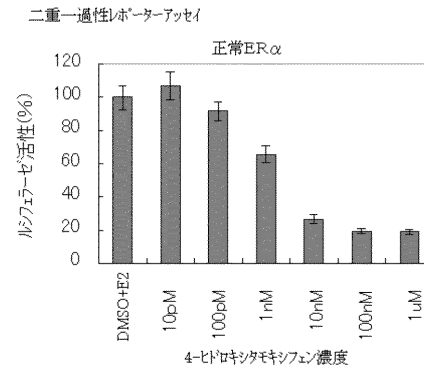
【図 4 7】



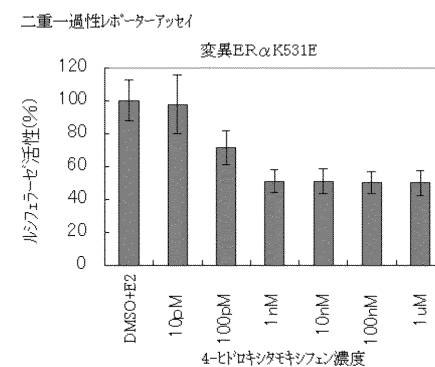
【図 4 8】



【図 5 1】



【図 5 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/15 (2006.01) G 0 1 N 33/15 Z

- (31)優先権主張番号 特願2000-207011(P2000-207011)
 (32)優先日 平成12年7月7日(2000.7.7)
 (33)優先権主張国 日本国(JP)
 (31)優先権主張番号 特願2000-220508(P2000-220508)
 (32)優先日 平成12年7月21日(2000.7.21)
 (33)優先権主張国 日本国(JP)
 (31)優先権主張番号 特願2000-234053(P2000-234053)
 (32)優先日 平成12年8月2日(2000.8.2)
 (33)優先権主張国 日本国(JP)
 (31)優先権主張番号 特願2000-235463(P2000-235463)
 (32)優先日 平成12年8月3日(2000.8.3)
 (33)優先権主張国 日本国(JP)
 (31)優先権主張番号 特願2000-235460(P2000-235460)
 (32)優先日 平成12年8月3日(2000.8.3)
 (33)優先権主張国 日本国(JP)
 (31)優先権主張番号 特願2000-235461(P2000-235461)
 (32)優先日 平成12年8月3日(2000.8.3)
 (33)優先権主張国 日本国(JP)

審査官 伊達 利奈

- (56)参考文献 国際公開第 8 7 / 0 0 5 0 4 9 (WO , A 1)
 The EMBO Journal , 1990, Vol.9, No.9, pp.2811-2818
 Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology , 1997, Vol.62, No.2/3, pp.173-184
 Molecular Endocrinology , 1996, Vol.10, pp.230-242
 Japanese Journal of Cancer Research , 1998, Vol.89, pp.27-32
 Journal of the National Cancer Institute , 1995, Vol.87, No.6, pp.446-451
 MCDONNELL D P , BIO/TECHNOLOGY , 米国 , NATURE PUBLISHING CO , 1 9 9 3 年 1 1 月 1 日 , V11 , P1256-1261

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/00-1/70

PubMed