

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3560252号
(P3560252)

(45) 発行日 平成16年9月2日(2004.9.2)

(24) 登録日 平成16年6月4日(2004.6.4)

(51) Int.Cl.⁷

F I

C O 7 K 14/47

C O 7 K 14/47

C O 7 K 16/18

C O 7 K 16/18

C 1 2 N 15/09

C 1 2 P 21/02

C

C 1 2 P 21/02

C 1 2 P 21/08

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 15/00

Z N A A

請求項の数 7 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願平5-172883

(22) 出願日 平成5年7月13日(1993.7.13)

(65) 公開番号 特開平6-122700

(43) 公開日 平成6年5月6日(1994.5.6)

審査請求日 平成12年6月23日(2000.6.23)

(31) 優先権主張番号 特願平4-230028

(32) 優先日 平成4年8月28日(1992.8.28)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 596124690

アベンティス ファーマ株式会社

東京都港区赤坂二丁目17番51号

(74) 代理人 100091731

弁理士 高木 千嘉

(74) 代理人 100087930

弁理士 佐藤 辰男

(74) 代理人 100080355

弁理士 西村 公佑

(72) 発明者 竹下 淳

埼玉県所沢市けやき台1丁目40番12号

(72) 発明者 岡崎 誠

埼玉県川越市旭町3丁目12番42号

メゾンイシダ305号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨関連カドヘリン様タンパク質およびその製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列表の配列番号1において、25番から796番目までのアミノ酸配列を有するm O S F-4、配列番号2において、25番から796番目までのアミノ酸配列を有するh O S F-4-1、および配列番号3において、25番から693番目までのアミノ酸配列を有するh O S F-4-2、よりなるグループから選ばれたタンパク質。

【請求項2】

配列表の配列番号1において、1番から24番目までのシグナルペプチドを含む、1番から796番目までのアミノ酸配列を有するm O S F-4前駆体タンパク質、配列表の配列番号2において、1番から24番目までのシグナルペプチドを含む、1番から796番目までのアミノ酸配列を有するh O S F-4-1前駆体タンパク質、および配列表の配列番号3において、1番から24番目までのシグナルペプチドを含む、1番から693番目までのアミノ酸配列を有するh O S F-4-2前駆体タンパク質、よりなるグループから選ばれたタンパク質。

【請求項3】

請求項1または2のタンパク質をコードするDNAまたはRNA。

【請求項4】

以下の手順を含む、請求項1のタンパク質を産生させる方法：

(a) 以下のDNA配列より構成される異種のDNAを含む細胞集団を得ること。

(i) 当該細胞で機能しうる転写と翻訳をコントロールする配列。

(i i) 上記のコントロール配列の下に結合した、前記のタンパク質をコードする D N A 配列。

(b) 当該細胞集団を前記のタンパク質が産生される条件下で培養すること。

【請求項 5】

コントロール配列がさらに、請求項 1 のタンパク質を細胞外に分泌させるためのシグナルペプチドをコードする D N A を、前記のタンパク質をコードする D N A 配列のすぐ上流に位置するように含むことを特徴とする請求項 4 のタンパク質を産生させる方法。

【請求項 6】

細胞集団が大腸菌または酵母または哺乳動物細胞である請求項 4 または 5 のタンパク質を産生させる方法。

【請求項 7】

請求項 1 のタンパク質に対するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、新規な骨関連タンパク質を提供する。本発明のタンパク質は O S F - 4 と名付けられたものであり、カドヘリン分子の仲間に属する新規なタンパク質である。この O S F - 4 はマウスまたはヒトを含む哺乳動物の骨組織より得ることができる。本発明で提供される骨関連タンパク質は、骨代謝性疾患の診断及び治療に有用である。

【0002】

【発明の背景】

骨代謝性疾患と総称される疾患の中には、骨粗鬆症 (O s t e o p o r o s i s) 、ページェット病 (P a g e t ' s d i s e a s e) 、骨軟化症、過骨形成症、大理石病等が含まれ、このうち、特に骨粗鬆症は発生頻度が閉経後の女性及び高齢人口の約半分を越える程に高く、その診断と有効な治療法が強く望まれている。

【0003】

骨代謝性疾患とは、何らかの骨組織における、細胞レベルでの、骨に特異的な代謝の変調を伴うものであり、骨の代謝に特異的に関与する因子の発見、分離そして同定は、この代謝の異常を明らかにするのに非常に有効である。本発明者等は、これらの骨の代謝に特異的な因子の発見のために鋭意研究し、ついに、本発明を完成させるに至ったものである。

【0004】

より詳しくは、本発明者等は、特に、骨形成において主要な働きをする骨芽細胞の細胞株を用い、この細胞株により特異的に生成されるタンパク性因子を同定したものである。さらに、本発明は、こうした研究によって得られた、従来知られている種々のカドヘリン型の細胞接着分子とアミノ酸配列上で強いホモロジーを有する実質的に骨特異的な O S F - 4 と名付けられた新規なタンパク質を提供する。

【0005】

本発明の O S F - 4 は、本明細書に記載された D N A 配列から当業者において公知の通常の遺伝子工学的手法によっても生産でき、また本明細書に記載のアミノ酸配列から、化学的なペプチド合成法により、O S F - 4 又はその断片を生産することができる。さらに、本発明に記載された O S F - 4 の D N A 配列のうち特に他のカドヘリン分子と比べて O S F - 4 に特徴的な部分配列を通常のオリゴヌクレオチド化学合成法により、15～50塩基長で合成し、骨由来細胞を識別診断する D N A プローブとして使用することができる。このような骨由来細胞の識別は、特に、転移再発性癌の由来を識別するために有用であり、適切な再発性癌の治療をもたらす。さらに O S F - 4 の部分ペプチドのうち、抗体の認識しうるエピトープ (e p i t o p e) 部分のペプチドは、O S F - 4 に特異的なモノクローナル抗体を作成するために使用できる。こうして得られたモノクローナル抗体は、免疫学的細胞組織染色法により骨由来細胞の同定に有用である。また、O S F - 4 はその細胞接着分子との類似性から、骨折の治療にも有用である。

【0006】

10

20

30

40

50

【従来の技術】

本発明で提供されるOSF-4はカドヘリン様タンパク性因子であると考えられる。カドヘリンは、細胞接着作用を有し、次のことが知られている。

【0007】

細胞群の区画化は動物体構築の最も基本的な要素の一つである。この区画化は発生のごく初期から始まり、各細胞の分化が進むにつれ、同種の細胞が秩序正しく移動し再配置することにより形態形成や組織の構築と維持が行われている。このような秩序正しい細胞の移動をコントロールする要素の一つに、細胞の選択的接着性がある。各細胞は隣接した細胞ないしは隣接した細胞外基質を認識し、特定のものとのみ接着する性質を有する。そして、細胞の分化に伴いこれらの接着特異性が変化することにより、特定の場所から離れて、本来あるべき場所へと移動し集合すると考えられている。これまでに、数多くの細胞接着分子が同定されているが、全て細胞タイプ特異性を示す。これらの分子を大別するとカドヘリンファミリー、免疫グロブリンスーパーファミリー接着分子、インテグリンスーパーファミリー、セレクトイン、およびこれらには属さないものの4つ以上のグループに分けることができる(Hynes et al., (1992), Cell, vol. 68, p. 303~322)。

10

【0008】

これらのなかでも、とりわけカドヘリンはその解析が進んでおり、構造はもちろんのこと機能面においても研究が進んでいる。カドヘリンは分子量約120kDの糖タンパク質であり、カルシウムイオンに依存して働く細胞間接着分子である(Takeichi, (1991), Science, vol. 251, p. 1451~1455)。これまでに10種類近くが同定されており、それぞれのタイプは結合特異性を有し、同じ分子同士がホモフィリックに反応する。その結果、同じタイプのカドヘリンを持つ細胞が選択的に結合し合い、細胞間接着の特異性を決めるために必須の因子であると考えられている。代表的なものに上皮由来のE(Epithelial)カドヘリン、胎盤由来のP(Placenta)カドヘリン、神経細胞由来のN(Neural)カドヘリン、肝細胞由来のL-CAM(liver cell adhesion molecule)などが挙げられる。その構造はどれもほぼ類似しており、約110アミノ酸の4、5回の繰り返しから成る細胞外領域、細胞膜貫通領域と約150アミノ酸から成る細胞内領域で構成されている。各カドヘリンのサブクラスにおいて、それぞれ全体で約50%のホモロジーが見られる。細胞外領域においてはアミノ末端に近い部位でホモロジーが高く膜貫通領域に近づくにつれ徐々に低くなり、細胞内領域において最も高いホモロジーが見られる。近年、新しいカドヘリンが次々と報告されつつある。たとえば、筋肉細胞由来のM(Muscle)カドヘリン、脳細胞由来のB(Brain)カドヘリンや胎児脳由来のT(Truncated)カドヘリン、さらに、デスモソームに局在するデスモグレイニンなど、これら全ては同じ祖先を持つ1つの遺伝子に由来するものでカドヘリンファミリーを形成していると考えられている。

20

30

【0009】

カドヘリン分子の詳細な研究により、そのN末端領域にはカルシウムイオンと結合する部位と接着特異性を決定する部位を有していることがわかっている。さらに、細胞内領域においては接着分子として機能的にも重要であることのみならず、カテニンやアクチン等の裏打ちタンパクと結合していることがわかっており、細胞内伝達に寄与していることが示唆されている。一方、癌細胞の侵入と転移において、これらカドヘリンの量的変化が認められ、腫瘍形成との関連でも興味をもたれている。しかしながら、これら多くのカドヘリン分子の報告があるにもかかわらず、骨細胞に特異性を持つカドヘリン分子の報告はない。

40

【0010】

骨のリモデリングは、骨を形成する骨芽細胞(Osteoblast)と骨を吸収する破骨細胞(Osteoclast)のバランスによって骨の形成・維持が担われている。骨芽細胞は間葉系の細胞由来で筋細胞や脂肪細胞と起源を同じくし、破骨細胞は造血幹細胞

50

由来であり、好中球やマクロファージなどと同様な起源を持つ細胞であると考えられている。細胞接着分子としては、破骨細胞がインテグリンファミリーに属するビトロネクチンレセプターを発現していることが知られているのみであり、骨芽細胞についてはその存在が示唆されているにすぎない。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、骨芽細胞に特異的に発現している新しいタイプの細胞接着因子を見い出すことである。こうした新しい細胞接着因子は、骨芽細胞の増殖、分化、移動や再配置に重要な分子である。この物質は、種々の骨代謝性疾患の診断、治療に用いることが期待できる。

10

【0012】

【課題を解決するための手段】

マウスOSF-4 (mOSF-4) のcDNAは、マウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1由来のcDNAからPCR (Polymerase Chain Reaction) 法とサブトラクション (Subtraction) 法を組み合わせた方法によりcDNAライブラリーを作成し、ディファレンシャルスクリーニング (Differential Screening) 法によりクローン化された。つづいて、マウスOSF-4 cDNAをプローブとして、ヒト骨肉種細胞由来のcDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、2種類のOSF-4が得られ、それぞれ、hOSF-4-1及びhOSF-4-2と名付けられ、その塩基配列を決定した。OSF-4の塩基配列は、マウスとヒトの間で、非常に良く保存されている。mOSF-4とhOSF-4-1、及びhOSF-4-2とのアミノ酸配列との比較では、それぞれ97.1%、及び96.4%のホモロジーを示している (図1~3)。これら種間での非常に高い保存性は、OSF-4が脊椎動物の骨の代謝に必須な働きを持っていることを示唆している。OSF-4は他の脊椎動物の骨抽出物からも分離精製できる。組換え遺伝子技術を用いて、他の動物種のOSF-4を、それぞれの骨、培養骨細胞、及び他の体組織から作成したcDNAライブラリー、またはゲノム遺伝子DNAライブラリーから、本発明のcDNAまたはそのDNA断片をプローブとして用いてクローニングすることが出来る。本発明で示されたcDNAの配列は現在利用できる種々のDNA及びアミノ酸配列データベースによる検索で、新規であることが明らかにされた。

20

30

【0013】

mOSF-4のアミノ酸配列との比較で、hOSF-4-1は全ての領域において非常に保存されている。一方、hOSF-4-2はN末端から631番目のアミノ酸残基まではhOSF-4-1と完全に一致しているのに対し、細胞膜貫通領域の中において、179塩基の挿入がある為にフレームシフトがおり、632番目のアミノ酸残基から693番目のC末端までの62アミノ酸残基は全く異なった構造をしている (図1~3)。従って、細胞膜貫通領域のC末端9アミノ酸残基と細胞内領域はhOSF-4-1とhOSF-4-2では完全に異なっている。このようなC末端領域が欠失したカドヘリンはTカドヘリンに相当するものであり、このタイプのカドヘリンの存在はOSF-4の細胞接着の制御に関与することを示唆している。

40

【0014】

mOSF-4のEC1ドメイン中の101番目から115番目までの親水性 (hydrophilic) の15アミノ酸残基に相当するペプチドを化学合成し、KLH (Keyhole limpet hemacyanin) と架橋し、ウサギの免疫に使用した。得られた抗mOSF-4ペプチド抗血清を新生児マウス全身切片中のOSF-4の免疫組織化学的検出に用いた。OSF-4は骨芽細胞、軟骨細胞等に検出された。

【0015】

一般に、OSF-4は、ヒト、ウシ、マウス、または、その他の材料から、公知の生化学的技術により、直接骨組織または軟骨組織から抽出することが出来る。また、OSF-4をコードするDNAは、脊椎動物の骨組織から抽出したmRNAから作成されたcDNA

50

ライブラリー、または、ゲノムDNAライブラリーから、本明細書中で開示されたヒトまたはマウスのcDNA配列の断片を標識してプローブとして用い、得ることができる。全長cDNAクローンは上記の及び他の標準的な分子生物学的な技術を組み合わせて得る事ができる。

【0016】

このように、OSF-4は既知の代表的なカドヘリン分子とホモロジーはあるが、これまでに報告されているものとは異なり新しいサブクラスに属するカドヘリン分子である。その構造は、細胞外領域において5回の繰り返し構造、細胞膜貫通領域、及び、細胞内領域から構成されている(図4)。OSF-4と他のカドヘリンとの比較をすると、これまでの異なったカドヘリン分子間のホモロジー様式と同様に、細胞外領域ではN末端から膜貫通領域に近づくにつれてホモロジーは低くなり、細胞内領域で最も高いホモロジーが認められた(表1)。

【0017】

【表1】

マウスOSF-4と他のカドヘリン分子とのアミノ酸比較表

比較した カドヘリン のタイプ	相 同 性 (%)							
	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5	TM	CP	MP
OSF-4 : N	39.3	46.8	32.8	29.8	27.4	59.4	50.3	39.4
OSF-4 : E	32.7	40.4	30.7	30.8	17.2	34.4	47.1	33.9
OSF-4 : P	34.6	35.8	36.0	29.1	19.0	23.1	43.8	33.3
OSF-4 : M	31.8	38.5	27.6	26.0	25.4	34.4	45.1	33.2
N : E	60.2	53.5	45.1	43.9	27.0	46.9	64.1	49.8
N : P	51.9	51.8	45.1	49.5	27.9	30.8	57.7	47.3
E : P	65.7	61.1	52.7	46.7	38.9	53.8	79.7	58.7

表1はマウスOSF-4と他のカドヘリン分子とのアミノ酸比較表である。各領域ごとのアミノ酸での相同性を計算し%で表した。領域の略語はEC1~EC5:5つの細胞外領域、TM:細胞膜貫通領域、CP:細胞内領域、そしてMPは成熟タンパク質の全体での比較を示す。また、NはNカドヘリン、EはEカドヘリン、PはPカドヘリン、MはMカドヘリンを示す。比較したカドヘリンのタイプにおいて、OSF-4:NはOSF-4とNカドヘリン間でのアミノ酸配列の各領域ごとの比較を示す。以下同じ。

【0018】

本発明により提供されるタンパク質は、骨形成において重要な役割を担っている新しいサブクラスのカドヘリンに属する糖タンパク質でOSF-4と名付けたグループであり、より具体的には本明細書中に記載されているヒト及びマウスのOSF-4である。OSF-4は骨形成の過程において骨芽細胞で発現し、細胞接着分子及び形態形成関連物質として作用する。これらヒト又はマウスのOSF-4は、塩基配列やアミノ酸配列において類似した他の哺乳類由来のOSF-4タンパク質を分離同定するために使用できる。

【0019】

本発明は、さらに、OSF-4の類似体よりなるポリペプチド、即ち、ミュータント、融合タンパク、及びOSF-4の一部を含む断片を提供する。マウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1から分離したマウスOSF-4のcDNAは、24アミノ酸残基からなるシグナルペプチドを含む796個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしている。ヒト骨肉種細胞(Osteosarcoma)cDNAライブラリーより分離したヒトOSF-

4は2種類あり、その内の1つヒトOSF-4-1のcDNAは24アミノ酸残基からなるシグナルペプチドを含む796個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしている。他の1つヒトOSF-4-2のcDNAは24アミノ酸残基からなるシグナルペプチドを含む693個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしている。本発明は、また組換え遺伝子技術によるOSF-4の製造方法を提供する。

【0020】

【実施例】

〔実施例1〕 サブトラクション／PCRによるcDNAライブラリーの作成この実施例では骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1に特異的なcDNAライブラリーの構築について記述する。このcDNAライブラリーはサブトラクション法とPCR法を組み合わせることにより、マウス肝組織で発現している遺伝子を差し引いたMC3T3-E1cDNAライブラリーであり、各cDNAクローンは平均約300塩基の遺伝子断片を有し、さらに、本来含有量の少ない遺伝子をも増幅されるという特徴を有している。

【0021】

全ての一般的な組換えDNA技術に関する手順(protocol)は、特に他に断らなければ、サムブルック(Sambrook)らによる「Molecular Cloning manual」(1989年、Cold Spring Harbor Laboratory社、米国、Cold Spring Harbor)に準じて行った。総RNAは、グアニジン法により、MC3T3-E1細胞及びマウス肝組織の、それぞれ、 8×10^7 個、約1gから抽出した。ポリA⁺RNAは総RNAから市販の「オリゴdTラテックスmRNA精製キット」(宝酒造(株))により精製した。各1μgポリA⁺RNAをテンプレートとし、cDNA合成キット(Amersham社)を用いてcDNAを合成した。ただし、オリゴdTプライマーの代わりにランダムプライマーを用い、その量は通常使用量の1.5倍使用した。これにより、cDNA鎖伸長反応を平均約300塩基に制限した。上記のキットを用いて2本鎖平滑末端にした後、下記の2種類の合成DNAリンカーをT4DNAリガーゼ(宝酒造(株))により、それぞれ、MC3T3-E1cDNAはATOS-1/2(配列表の配列番号4及び5)と、肝臓cDNAはATOS-4/5(配列表の配列番号6及び7)と結合させた。

【0022】

ATOS-1/2

ATOS-1 5' - CTCTTGCTTGAATTTCGGACTA-3'

ATOS-2 3' - ACACGAGAACGAACCTTAAGCCTGAT-5'

ATOS-4/5

ATOS-4 5' - CTCTTGCTTAAGCTTGGACTA-3'

ATOS-5 3' - ACACGAGAACGAATTTCGAACCTGAT-5'

【0023】

次に、各反応産物をPCR(Polymerase Chain Reaction)法により、プライマーとして、それぞれ、ATOS-1とATOS-4を用いてDNAを増幅した。増幅したDNA濃度測定は「DNA濃度測定キット“DNA Dipstick”」(Invitrogen社)を用いて行った。サブトラクション法はフォトビオチン(Photobiotin, Pierce社)を用いて行った。PCR法により増幅した20μgの肝臓cDNAに20ngのフォトビオチンを加え、サンランプを10cm隔て10分間照射することにより、DNAをビオチンで標識した。この標識した肝臓cDNA3.0μgに、標識していないMC3T3-E1cDNA0.3μgを加え、ハイブリダイゼーションを行った。次いで、これにストレプトアビジン(Streptavidin, 宝酒造(株))を反応し、フェノール抽出する事により、MC3T3-E1cDNAから肝臓cDNAと共通のcDNAを除いた。サブトラクション法を再度繰り返し行い、MC3T3-E1cDNAから肝臓cDNAと共通なものをできるだけ除いた。さらに、上記のATOS-1を用いてPCR法によりDNAを増幅し、DNA濃度を測定した。このcDNA10ngを制限酵素EcoRIで消化した後、EcoRIで消化し末端を脱リン酸

10

20

30

40

50

化したファージベクター λ gt10 (λ gt10/EcoRIクローニングキット、Stratagene社) 1 μ gとT4リガーゼを用いて連結した。これを市販のインビトロパッケージングキット (in vitro packaging kit) 「ギガパックゴールド (Gigapack-gold)」 (Stratagene社) により λ ファージ粒子にパッケージングした。この組換え体ファージを、大腸菌C600 (日本予防衛生研究所、日本癌研究資源バンクにHT003として保存されている) に感染させ、軟寒天培地とともに寒天培地の上にまきファージプラークを形成させ感染効率を測定したところ、1 μ gのcDNAあたり 3×10^6 のファージプラークが得られた。

【0024】

さらに、このcDNAライブラリーをディファレンシャルスクリーニング (differential screening) 法を用い、MC3T3-E1に特異性の高いクローンを選択した。つまり、 2.25×10^4 個のファージを計10枚のプレートにまき、それぞれ2枚 (計20枚) のナイロンメンブレンフィルターに移した。これらの一方を放射能でラベルしたMC3T3-E1のcDNAと、また、他方を同様にラベルした肝臓のcDNAをプローブとして、プラークハイブリダイゼーション法を行った。MC3T3-E1 cDNAプローブでシグナルが認められ、しかも、肝臓のcDNAプローブでシグナルの認められない273クローンをミニライブラリーとし、以後の実験に用いた。

【0025】

〔実施例2〕 マウスOSF-4クローンの単離

この実施例では、上記の実施例1で作成したミニライブラリーから、MC3T3-E1に特異的なクローンとして、OSF-4の部分的cDNA断片を同定し、さらに、これを用いてMC3T3-E1のcDNAライブラリーから完全長cDNAをクローニングする方法について記述している。

【0026】

実施例1で調製したMC3T3-E1及び肝臓の各総RNAを、それぞれ1 μ gずつナイロンメンブレンフィルターにスポットし、このフィルターを273個作成し、以下のハイブリダイゼーションに用いた。一方、実施例1で作成した273個のファージクローンの挿入部分のDNAをPCR法を用いて増幅した。このDNAをアガロースゲル電気泳動した後、主なバンドを切り出し精製し、放射能ラベルしてプローブとして用いた。オートラジオグラフィーの結果、MC3T3-E1でシグナルが認められ、しかも肝臓でシグナルの認められないクローンについてプラスミドベクターにリクローニング (recloning) した。つまり、PCR法により増幅し精製した挿入部分のDNAを制限酵素EcoRIで消化し、プラスミドベクターpUC118 (宝酒造 (株)) のEcoRIサイトにリクローニングした。これらのクローンについて市販の「DNAシーケンスキット」 (宝酒造 (株)) を用いユニバーサルプライマーにて塩基配列を決定した。得られた塩基配列をDNA及びタンパク質データベースを検索したところ、既存のカドヘリンとホモロジーを示すクローンが得られ、これをD45と命名し、これを用いて以後の完全長cDNAのクローニングを行った。

【0027】

完全長cDNAクローニングのために、実施例1で精製したMC3T3-E1のポリA⁺ RNA 5 μ gから「cDNA合成キット」 (cDNA synthesis system plus, Amersham社) を用いて平滑末端2本鎖cDNAを合成した。これにEcoRI/NotIアダプター (宝酒造 (株)) をT4リガーゼを用いて連結した後、アガロースゲル電気泳動し、約700塩基対以上のフラクションを精製した。この断片を λ gt10ファージベクター (Stratagene社) のEcoRIサイトに連結し、実施例1と同様にファージ粒子にパッケージングした後、大腸菌に感染させ感染効率を測定したところ、1 μ gのベクターDNAあたり、 1.5×10^7 であった。前述のD45を放射能ラベルしてプローブとして用い、このcDNAライブラリー 1.0×10^6 個のファージクローンをプラークハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。その結果、14個のポジティブシグナルが得られ、その内、最も挿入断片の長いファージク

ローンのNot I断片をプラスミドベクターpGEM11Zf(+) (Stratagene社)のNot Iサイトにリクローニングし、これをpKOT164と命名した。

【0028】

〔実施例3〕 マウスのOSF-4のDNA配列の決定

pKOT164、及びこのcDNA断片を有するサブクローン(subclone)から「キョーエンス用デレーションキット」(宝酒造(株))を用いて、それぞれ約300塩基対おきに両方向からのデレーションミュータントを作成した。それぞれのデレーションミュータントの塩基配列の決定は、米国Applied Biosystems社製の自動DNAシーケンサー・モデル373A(automatic DNA sequencer)を用いて行った。この完全長cDNAの塩基配列と、塩基配列より翻訳したアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示した。このcDNAにコードされるタンパク質をマウスOSF-4と名付けた。アミノ酸残基の番号1は予想されるマウスOSF-4前駆体タンパク質のN末端に相当する。また、このDNAの制限酵素地図を図5に示した。

10

【0029】

〔実施例4〕 マウスOSF-4の組織特異的発現

マウスOSF-4の組織特異的発現をみるためにRNAドットブロッキング(RNA dot blotting)を行った。マウス(日本クレアから購入)の胸腺、脾臓、脳、腎臓、肝臓、肺、睾丸、及び心臓の総RNAをグアニジン法で調製した。頭蓋冠由来の骨芽細胞を多く含む細胞は、新生児マウスの頭蓋冠より調製し、これを培養して得られた。さらに、この細胞から総RNAを前述と同様な方法で抽出した。上記の組織、頭蓋冠培養細胞、MC3T3-E1及びマウス線維芽細胞株NIH3T3(ATCC CRL 1658)、の各総RNA1µgをナイロンメンブレンフィルター(Biodyne, PALL社)にドットし、加熱固定した後に、ハイブリダイゼーションに用いた。一方、pKOT164をNot Iで消化し、アガロースゲル電気泳動による分離精製を行った後、放射能でラベルしプローブとして用いた。オートラジオグラフィーの結果、頭蓋冠培養細胞とMC3T3-E1に強いシグナルが見られ、睾丸で弱いシグナルが見られた(図6)。

20

【0030】

〔実施例5〕 ヒトOSF-4をコードするcDNAのクローニング

pKOT164のcDNA領域を含むNot I断片を精製し、これをプローブとして用い、 1.3×10^5 個のクローンから成るヒト骨肉腫cDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、21個のポジティブシグナルが得られた。そのうち、5クローンを分離し、挿入断片の大きい2つのクローンについてプラスミドベクターpHSG398にリクローニングした。この結果、得られたプラスミドをpKOT161、およびpKOT170と名付けた。

30

【0031】

〔実施例6〕 ヒトのOSF-4のDNA配列の決定

上記の実施例5でクローン化されたpKOT161、pKOT170、及びそれらのサブクローンについても実施例3に示した方法と同様にデレーションミュータントを作成し、cDNAの塩基配列を決定した。これらのcDNAの塩基配列と予想されるアミノ酸配列を配列表の配列番号2及び3に示した。これらのcDNAにコードされるタンパク質をヒトOSF-4-1、ヒトOSF-4-2と名付けた。各々アミノ酸残基の番号1は予想されるOSF-4前駆体タンパク質のN末端に相当する。

40

【0032】

〔実施例7〕 抗OSF-4抗血清の調製

マウスOSF-4の抗ペプチド抗体を作成するにあたり、Mカドヘリンの実験報告例(Donalies et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, p. 8024-8028)に従い、これに相当するEC1領域内の15アミノ酸残基をペプチド合成機(Applied Biosystems社、モデル430A)により、固相合成法で合成した。合成したペプチドはOS

50

F-4. 1 (F V I D D K S G N I H A T K T : 配列表の配列番号 8) である。合成ペプチドはグルタルアルデヒドをカップリング剤として K L H (K e y h o l e l i m p e t h e m a c y a n i n) 担体と結合し、ウサギの免疫に使用した。得られた抗血清は、新生児マウス全身切片中で、組織免疫化学的に、O S F-4 の存在を検索したり、大腸菌、酵母及び動物細胞での O S F-4 の発現を検出するのに使用できた。

【0033】

〔実施例 8〕 動物細胞での O S F-4 の発現

本実施例ではマウス O S F-4 の動物細胞での発現プラスミドベクターの作製と発現、及び機能解析について記載する。

配列表の配列番号 1 に示される塩基配列中には O S F-4 をコードする領域の 5' 上流に他のオープンリーディングフレームが存在する。このため、この配列による O S F-4 の翻訳効率の低下が予想された。そこで、実施例 3 で作製したデレーションミュータントの中から O S F-4 のコーディング領域のみを含むクローンを選び O S F-4 発現ベクターの作製に用いた。このクローンから配列表の配列番号 1 の 191 番目の G から 2700 番目の A までの断片を切り出し、5' 上流に X h o I と B a m H I サイトのリンカーを、3' 下流に X h o I サイトのリンカーを結合した。ついで、この X h o I 断片を動物細胞発現用プラスミドベクター p C X N 2 (N i w a e t a i . , (1991), G e n e , 108, 193-200) の X h o I サイトに挿入しクローニングした。得られた O S F-4 発現ベクターを p M S S 6 0 と命名した (図 7)。

【0034】

カルシウム・リン酸共沈法を用いて、この発現ベクター p M S S 6 0 をマウス表皮由来繊維芽細胞株の L 細胞に導入した。ついで、この p M S S 6 0 により形質転換した G 4 1 8 耐性のコロニーを分離培養し 12 個のクローン化細胞株を得た。これらのクローン化細胞株のそれぞれから R N A を抽出した。これらの R N A を用いてマウス O S F-4 をプローブとした R N A ドットブロット法により、O S F-4 の m R N A 発現量の高いクローン化細胞株 3 個を選択した。それぞれ、C 1、C 7、C 11 と名付けた。

これらの細胞株を用いてウェスタンブロット法 (W e s t e r n b l o t a n a l y s i s) により生成された蛋白質を解析したところ、抗 O S F-4 抗体に反応する約 100 キロダルトンのバンドが検出された。

【0035】

さらに、これらのクローン化細胞株を用いて、カドヘリンの細胞接着性を調べるアグリゲーションアッセイ法 (A g g r e g a t i o n a s s a y) により O S F-4 の活性の解析を行った。アグリゲーションアッセイ法の詳細は竹市らの方法 (T a k e i c h i , (1977), J . C . B . , v o l . 75, p . 464-474) に従って行った。

まず、各クローン化細胞の単層細胞から T C 処理群と T E 処理群の 2 種類の細胞懸濁液を調製した。

【0036】

T C 処理群は以下の様に調製した。即ち、単層細胞を 1 mM 塩化カルシウムを含む C M F 溶液 (バックの G a₂⁺, M g₂⁺ フリー生理食塩水: J, E x p . M e d . v o l . 108, p . 954-956, 1958) で 3 回洗った後に、0.01% トリプシンと 0.1 mM 塩化カルシウムを含む H C M F 溶液 (H E P E S - 緩衝生理食塩水: N a C l 8.0 g, K C l 0.4 g, N a₂ H P O₄ · 7 H₂ O 0.09 g, グルコース 1 g, H E P E S 2.38 g を水に溶解し、1 N N a O H 4.8 ml を加え pH 7.4 とし、最終的に 1 リットルの水溶液にする) 中で 37℃、15 分間処理し T C 処理群の細胞懸濁液を調製した。

また、T E 処理群の細胞懸濁液は 1 mM E D T A と 0.01% トリプシンを含む H C M F 溶液中で 37℃、15 分間処理する事以外は、T C 処理群と同様の方法により調製した。

【0037】

ついで、それぞれの処理群の細胞懸濁液をCMF溶液で2回洗った後に、各細胞懸濁液をさらに二分し、それぞれ1mM塩化カルシウムを含むものと含まないHCMF溶液に再懸濁し、細胞濃度が3ml当たり 1×10^6 個になるように細胞懸濁液を調製した。これらの各細胞懸濁液を15mlコニカルチューブに移し、37℃で毎分80回転、1時間攪拌する事により細胞のアグリゲーションを行わせた。攪拌前の細胞数(N_0)と1時間攪拌後の細胞の塊の数(N_1)をコールターカウンターにより測定し、その割合(N_1/N_0)を求めた。その結果、以下の表2に示すようにOSF-4を発現しているクローン化細胞株でのみカドヘリンと同様のカルシウム依存性の細胞接着性を示した。カドヘリン分子はカルシウム存在下ではトリプシンの分解を受けない事が知られている。従って、EDTAで処理したトリプシンの分解を受けたものは細胞接着性を示さなかった。

10

【0038】

【表2】

マウスOSF-4を発現したクローン化細胞株のアグリゲーションアッセイ

細胞株	1時間後の細胞塊の数(N_1)/攪拌前の細胞数(N_0)	
	1mM Ca^{2+} 存在下	1mM Ca^{2+} 非存在下
TC処理群		
L (元株)	1.00*	1.00
C1	0.65	1.00
C7	0.29	1.00
C11	0.51	1.00
mock**	1.00	1.00
TE処理群		
C7	1.00	1.00

20

* 1時間後に細胞塊の数が少ないほど細胞同士が凝集している事を示している。その数が1の時は細胞接着性がない。

** mockはベクターのみを導入したL細胞を示す。

【0039】

【発明の効果】

30

本発明により提供されるOSF-4は、骨代謝性疾患の治療剤として用いることができ、また、骨に対する臓器特異性が高いので骨代謝性疾患の診断剤として用いることができる。

【0040】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：3581

配列の型：核酸

鎖の数：二重鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

40

起源：

生物名：マウス (Mus musculus)

株名：骨芽細胞株 MC3T3E1

配列の特徴：

配列

GAATTCGCGG CCGCCTTTGA AGACATTCAG TTCTGTTATT TATTGAATGA CCAATCAGAT 60
 GGGTGGAGCA TGTTATAGGA ATTGGCAGCA GGTATCCAAT GGGTGAAGAA GAAGCTGACT 120
 GCGGAGGTGA CCAACCCTGG CGTGATGTCC TCAGTGAGTG AAGATATTCC ATTCCAGAGG 180
 AGGTCTACTT GACACATCTG GGAGGCCGCC ATCCGAAAGA AAGCCACTCT GTTGGTGTAG 240
 GGAGTGACAG CTGCATTCTC CTGTGCCTAC TGCATAACCA AAA ATG AAG GAG AAC 295

Met Lys Glu Asn

10

1

TAC TGT TTA CAA GCT GCC CTG GTG TGC CTG AGC ATG CTA TAC CAC AGC 343
 Tyr Cys Leu Gln Ala Ala Leu Val Cys Leu Ser Met Leu Tyr His Ser
 5 10 15 20

CAG GCG TTT GCT CTG GAG CGA CGA AGC CAC CTG CAT CCC TCT TTC CAT 391
 Gln Ala Phe Ala Leu Glu Arg Arg Ser His Leu His Pro Ser Phe His
 25 30 35

20

GGA CAC CAT GAG AAG GGC AAG GAG GGG CAG GTG CTG CAA CGC TCC AAG 439
 Gly His His Glu Lys Gly Lys Glu Gly Gln Val Leu Gln Arg Ser Lys
 40 45 50

AGA GGC TGG GTC TGG AAC CAA TTC TTT GTG ATA GAA GAG TAC ACC GGG 487
 Arg Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu Glu Tyr Thr Gly
 55 60 65

CCT GAC CCT GTG CTG GTG GGC AGG CTT CAT TCT GAC ATT GAC TCC GGT 535
 Pro Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp Ile Asp Ser Gly
 70 75 80

30

GAT GGG AAC ATT AAA TAC ATT CTC TCA GGT GAA GGA GCG GGA ACC ATT 583
 Asp Gly Asn Ile Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Glu Gly Ala Gly Thr Ile
 85 90 95 100

TTT GTG ATT GAT GAC AAA TCA GGG AAC ATT CAT GCC ACC AAG ACA TTG 631
 Phe Val Ile Asp Asp Lys Ser Gly Asn Ile His Ala Thr Lys Thr Leu
 105 110 115

40

GAC CGA GAG GAG AGA GCC CAG TAC ACA CTG ATG GCT CAG GCG GTG GAC	679	
Asp Arg Glu Glu Arg Ala Gln Tyr Thr Leu Met Ala Gln Ala Val Asp		
120 125 130		
AGG GAC ACC AAC AGA CCA CTG GAG CCA CCT TCA GAA TTC ATT GTT AAG	727	
Arg Asp Thr Asn Arg Pro Leu Glu Pro Pro Ser Glu Phe Ile Val Lys		
135 140 145		
GTC CAG GAC ATT AAT GAC AAC CCT CCA GAG TTT CTG CAT GAA ATC TAT	775	10
Val Gln Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Glu Phe Leu His Glu Ile Tyr		
150 155 160		
CAT GCC AAT GTG CCT GAG AGG TCC AAT GTG GGA ACA TCA GTT ATC CAA	823	
His Ala Asn Val Pro Glu Arg Ser Asn Val Gly Thr Ser Val Ile Gln		
165 170 175 180		
GTG ACA GCC TCT GAT GCA GAT GAT CCC ACC TAT GGA AAT AGT GCC AAG	871	
Val Thr Ala Ser Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr Gly Asn Ser Ala Lys		20
185 190 195		
TTA GTG TAT AGC ATC CTT GAA GGA CAA CCC TAT TTC TCG GTG GAG GCC	919	
Leu Val Tyr Ser Ile Leu Glu Gly Gln Pro Tyr Phe Ser Val Glu Ala		
200 205 210		
CAA ACA GGT ATC ATC AGG ACA GCC CTT CCC AAT ATG GAC AGA GAA GCC	967	
Gln Thr Gly Ile Ile Arg Thr Ala Leu Pro Asn Met Asp Arg Glu Ala		
215 220 225		30
AAG GAG GAG TAC CAC GTG GTG ATC CAG GCC AAG GAC ATG GGT GGA CAC	1015	
Lys Glu Glu Tyr His Val Val Ile Gln Ala Lys Asp Met Gly Gly His		
230 235 240		
ATG GGT GGA CTC TCA GGG ACA ACC AAA GTG ACG ATC ACT CTG ACT GAT	1063	
Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Lys Val Thr Ile Thr Leu Thr Asp		
245 250 255 260		
GTC AAC GAC AAC CCA CCA AAG TTT CCA CAG AGC GTG TAC CAG ATG TCT	1111	40
Val Asn Asp Asn Pro Pro Lys Phe Pro Gln Ser Val Tyr Gln Met Ser		

265	270	275		
GTA TCA GAA GCA GCT GTC CCG GGG GAG GAA GTA GGA AGG GTG AAG GCT	1159			
Val Ser Glu Ala Ala Val Pro Gly Glu Glu Val Gly Arg Val Lys Ala				
280	285	290		
AAA GAC CCA GAC ATT GGA GAA AAT GGC TTA GTC ACA TAC AAT ATC GTT	1207			
Lys Asp Pro Asp Ile Gly Glu Asn Gly Leu Val Thr Tyr Asn Ile Val				
295	300	305		10
GAT GGA GAC GGC ATA GAA CTG TTT GAA ATT ACA ACA GAC TAT GAA ACA	1255			
Asp Gly Asp Gly Ile Glu Leu Phe Glu Ile Thr Thr Asp Tyr Glu Thr				
310	315	320		
CAG GAT GGT GTG GTG AAG CTG AAA AAG CCT GTA GAT TTT GAA ACC AAA	1303			
Gln Asp Gly Val Val Lys Leu Lys Lys Pro Val Asp Phe Glu Thr Lys				
325	330	335	340	
AGA GCT TAT AGC TTG AAG ATA GAG GCC GCC AAT GTT CAC ATT GAT CCG	1351			20
Arg Ala Tyr Ser Leu Lys Ile Glu Ala Ala Asn Val His Ile Asp Pro				
345	350	355		
AAG TTC ATC AGC AAT GGA CCT TTC AAG GAC ACT GTG ACC GTC AAG ATT	1399			
Lys Phe Ile Ser Asn Gly Pro Phe Lys Asp Thr Val Thr Val Lys Ile				
360	365	370		
TCA GTA GAA GAT GCC GAT GAG CCT CCC ATG TTC TTG GCC CCA AGT TAT	1447			
Ser Val Glu Asp Ala Asp Glu Pro Pro Met Phe Leu Ala Pro Ser Tyr				30
375	380	385		
ATC CAT GAA GTT CAA GAA AAT GCA GCT GCT GGC ACT GTG GTT GGG AGA	1495			
Ile His Glu Val Gln Glu Asn Ala Ala Ala Gly Thr Val Val Gly Arg				
390	395	400		
GTA CAT GCC AAA GAC CCA GAT GCT GCC AAC AGC CCA ATA AGG TAT TCA	1543			
Val His Ala Lys Asp Pro Asp Ala Ala Asn Ser Pro Ile Arg Tyr Ser				
405	410	415	420	40
ATT GAT CGT CAT ACT GAC CTC GAC AGG TTT TTC ACG ATT AAT CCA GAA	1591			

Ile Asp Arg His Thr Asp Leu Asp Arg Phe Phe Thr Ile Asn Pro Glu		
425	430	435
GAT GGT TTT ATT AAA ACT ACG AAA CCT CTA GAT AGG GAA GAA ACT GCC	1639	
Asp Gly Phe Ile Lys Thr Thr Lys Pro Leu Asp Arg Glu Glu Thr Ala		
440	445	450
TGG CTC AAC ATC TCT GTC TTC GCA GCA GAA ATT CAC AAC AGA CAT CAG	1687	
Trp Leu Asn Ile Ser Val Phe Ala Ala Glu Ile His Asn Arg His Gln		10
455	460	465
GAA ACC AAA GTC CCA GTG GCC ATC AGG GTC CTG GAT GTC AAT GAC AAT	1735	
Glu Thr Lys Val Pro Val Ala Ile Arg Val Leu Asp Val Asn Asp Asn		
470	475	480
GCT CCT AAG TTT GCT GCC CCT TAT GAA GGT TTT ATC TGT GAG AGC GAT	1783	
Ala Pro Lys Phe Ala Ala Pro Tyr Glu Gly Phe Ile Cys Glu Ser Asp		
485	490	495
CAC CCC AAG GCA CTC TCC AAC CAG CCA ATA GTT ACA GTT AGT GCA GAT	1831	
His Pro Lys Ala Leu Ser Asn Gln Pro Ile Val Thr Val Ser Ala Asp		
505	510	515
GAC CAG GAC GAC ACA GCC AAT GGA CCA AGA TTT ATC TTC AGC CTA CCC	1879	
Asp Gln Asp Asp Thr Ala Asn Gly Pro Arg Phe Ile Phe Ser Leu Pro		
520	525	530
CCT GAA ATC ATG CAC AAC CCA AAC TTC ACA GTA AGA GAC AAC AGA GAT	1927	30
Pro Glu Ile Met His Asn Pro Asn Phe Thr Val Arg Asp Asn Arg Asp		
535	540	545
AAC ACT GCA GGA GTA TAT GCC CGA CGT GGA GGG TTC AGT CGG CAG AAG	1975	
Asn Thr Ala Gly Val Tyr Ala Arg Arg Gly Gly Phe Ser Arg Gln Lys		
550	555	560
CAG GAC TTC TAC CTC CTG CCC ATT GTG ATC AGT GAT GGT GGC ATT CCA	2023	
Gln Asp Phe Tyr Leu Leu Pro Ile Val Ile Ser Asp Gly Gly Ile Pro		40
565	570	575
		580

CCT ATG AGT AGC ACC AAT ACC CTC ACT ATC AAA GTC TGT GGC TGT GAT	2071	
Pro Met Ser Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Lys Val Cys Gly Cys Asp		
585 590 595		
GTG AAT GGG GCA CTG TTG TCC TGT AAC GCT GAA GCC TAC ATC CTG AAT	2119	
Val Asn Gly Ala Leu Leu Ser Cys Asn Ala Glu Ala Tyr Ile Leu Asn		
600 605 610		
GCC GGT CTG AGC ACT GGG GCA CTG ATC GCC ATC CTT GCC TGC ATC GTC	2167	10
Ala Gly Leu Ser Thr Gly Ala Leu Ile Ala Ile Leu Ala Cys Ile Val		
615 620 625		
ATT CTT CTG GTC ATC GTT GTG CTG TTT GTT ACC CTG AGG AGG CAA AAG	2215	
Ile Leu Leu Val Ile Val Val Leu Phe Val Thr Leu Arg Arg Gln Lys		
630 635 640		
AAA GAA CCA CTC ATT GTA TTT GAA GAG GAG GAT GTC CGT GAG AAC ATC	2263	
Lys Glu Pro Leu Ile Val Phe Glu Glu Glu Asp Val Arg Glu Asn Ile		20
645 650 655 660		
ATA ACC TAT GAT GAT GAA GGG GGT GGT GAG GAA GAC ACT GAA GCC TTC	2311	
Ile Thr Tyr Asp Asp Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp Thr Glu Ala Phe		
665 670 675		
GAC ATA GCC ACC CTG CAG AAT CCT GAC GGC ATC AAT GGA TTT ATC CCT	2359	
Asp Ile Ala Thr Leu Gln Asn Pro Asp Gly Ile Asn Gly Phe Ile Pro		
680 685 690		30
CGC AAA GAT ATC AAA CCT GAG TAT CAG TAT ATG CCT AGA CCT GGG CTG	2407	
Arg Lys Asp Ile Lys Pro Glu Tyr Gln Tyr Met Pro Arg Pro Gly Leu		
695 700 705		
CGA CCA GCA CCC AAC AGT GTG GAT GTG GAC GAC TTC ATC AAC ACA AGA	2455	
Arg Pro Ala Pro Asn Ser Val Asp Val Asp Asp Phe Ile Asn Thr Arg		
710 715 720		
ATA CAG GAG GCA GAT AAT GAT CCC ACA GCC CCT CCC TAT GAC TCC ATC	2503	40
Ile Gln Glu Ala Asp Asn Asp Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Ser Ile		

725	730	735	740		
CAA ATC TAT GGT TAT GAG GGC CGG GGT TCC GTG GCT GGG TCC CTG AGC	2551				
Gln Ile Tyr Gly Tyr Glu Gly Arg Gly Ser Val Ala Gly Ser Leu Ser					
745	750	755			
TCC TTG GAG TCT GCC ACG ACA GAC TCA GAC CTG GAC TAC GAC TAT CTA	2599				
Ser Leu Glu Ser Ala Thr Thr Asp Ser Asp Leu Asp Tyr Asp Tyr Leu					
760	765	770			10
CAG AAC TGG GGA CCT CGT TTT AAG AAA CTG GCA GAC TTG TAT GGC TCC	2647				
Gln Asn Trp Gly Pro Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp Leu Tyr Gly Ser					
775	780	785			
AAA GAC ACT TTT GAT GAT GAC TCT TAACAATAAT GTTACAAATT TGGCCTTAAG	2701				
Lys Asp Thr Phe Asp Asp Asp Ser					
790	795				
AAC TGT GTCT GGC ATTCTCA AGAATCTAGA AGATGTGTAA ACAGGTATTT TTTTAAATCA	2761			20	
AGGAAAGGCT CATTTAAAC AAGCAGAGTT TTACAGAGAG GAAACATTTA ATAAACTGC	2821				
AAGGACATCA AAGTGGAAAA TACTGTGAAG TACCTTTTCC CACTTAAAAA GCAATATTG	2881				
AAGTTGTTTA TCAACTTCAG TAGAAAAAAA AAAACCACTT GGCACACAAA ATATTTAAAT	2941				
GAAGGAGAAG TCCACGGTGA ACTTACAATG AAGGGAAATC GTCTATGTGT TAAGAACATC	3001				
TAAGTCTCTC TTATTTTATT TTTTAATTTG TCAAAGAAGC TTCCACAAAA TTAGAAAGGA	3061				
CAACAGTTCT GAGCTGAAAT TTCGCCTTAA ACTATGGACA CTCTATCTGT AGTGCGTTTT	3121				
TAACTTTGA ATATATAATA TCCAGCCAGC TTAAACCCAT ACAATGTATG TACAATACAA	3181			30	
TGTACAATTA TGTCTCTTGA GCATCAATCT TGTTACTGCT GATTCTTGTA AATCTTTTTG	3241				
CTTCTACTTT CATCCTAAAC TAATACGTGC CAGATATAAC TGTCTTGTTT CAGTGAGGAG	3301				
CACCCTATTT CTATGTCATT TTTAATGTAT CTATTTGTAC AATTTTAAAG TTCTTATTTT	3361				
AGTATACATA CAAATATCAG TATTCTGACA TGTACGAAAA TGTTACAGCA TCACACTTAT	3421				
ATTTTATGAA CATTGTACTG TTGCTTTAAT ATGAGCTTCA ATATAAGAAG CAACCTTTGA	3481				
AATAAAAAAA AGATTCTTTT TTAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA	3541				
AAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAGCGG CCGCGAATTC	3581			40	

【 0 0 4 1 】

配列番号： 2

配列の長さ： 3 7 1 2

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直線状

配列の種類： cDNA to mRNA

起源：

生物名： ヒト (Homo sapiens)

細胞の種類：原発性骨腫瘍

配列の特徴：

配列

GAATTCGGAG ATCTACAGGC GAGGAGAGAT GCCGCGGGGG CCGCTCGCAG CCGCCGCTGA	60	
CTTGTGAATG GGACCGGGAC TGGGGCCGGG ACTGACACCG CAGCGCTTGC CCTGCGCCAG	120	
GGACTGGCGG CTCGGAGGTT GCGTCCACCC TCAAGGGCCC CAGAAATCAC TGTGTTTTCA	180	
GCTCAGCGGC CCTGTGACAT TCCTTCGTGT TGTCATTTGT TGAGTGACCA ATCAGATGGG	240	
TGGAGTGTGT TACAGAAATT GGCAGCAAGT ATCCAATGGG TGAAGAAGAA GCTAACTGGG	300	10
GACGTGGGCA GCCCTGACGT GATGAGCTCA ACCAGCAGAG ACATTCCATC CCAAGAGAGG	360	
TCTGCGTGAC GCGTCCGGGA GGCCACCCTC AGCAAGACCA CCGTACAGTT GGTGGAAGGG	420	
GTGACAGCTG CATTCTCCTG TGCCTACCAC GTAACCAAAA ATG AAG GAG AAC TAC	475	
	Met Lys Glu Asn Tyr	
	1 5	
TGT TTA CAA GCC GCC CTG GTG TGC CTG GGC ATG CTG TGC CAC AGC CAT	523	
Cys Leu Gln Ala Ala Leu Val Cys Leu Gly Met Leu Cys His Ser His		20
	10 15 20	
GCC TTT GCC CCA GAG CGG CGG GGG CAC CTG CGG CCC TCC TTC CAT GGG	571	
Ala Phe Ala Pro Glu Arg Arg Gly His Leu Arg Pro Ser Phe His Gly		
	25 30 35	
CAC CAT GAG AAG GGC AAG GAG GGG CAG GTG CTA CAG CGC TCC AAG CGT	619	
His His Glu Lys Gly Lys Glu Gly Gln Val Leu Gln Arg Ser Lys Arg		30
	40 45 50	
GGC TGG GTC TGG AAC CAG TTC TTC GTG ATA GAG GAG TAC ACC GGG CCT	667	
Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu Glu Tyr Thr Gly Pro		
	55 60 65	
GAC CCC GTG CTT GTG GGC AGG CTT CAT TCA GAT ATT GAC TCT GGT GAT	715	
Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp Ile Asp Ser Gly Asp		
	70 75 80 85	
GGG AAC ATT AAA TAC ATT CTC TCA GGG GAA GGA GCT GGA ACC ATT TTT	763	
Gly Asn Ile Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Glu Gly Ala Gly Thr Ile Phe		40
	90 95 100	

GTG ATT GAT GAC AAA TCA GGG AAC ATT CAT GCC ACC AAG ACG TTG GAT	811	
Val Ile Asp Asp Lys Ser Gly Asn Ile His Ala Thr Lys Thr Leu Asp		
105 110 115		
CGA GAA GAG AGA GCC CAG TAC ACG TTG ATG GCT CAG GCG GTG GAC AGG	859	
Arg Glu Glu Arg Ala Gln Tyr Thr Leu Met Ala Gln Ala Val Asp Arg		
120 125 130		
GAC ACC AAT CGG CCA CTG GAG CCA CCG TCG GAA TTC ATT GTC AAG GTC	907	10
Asp Thr Asn Arg Pro Leu Glu Pro Pro Ser Glu Phe Ile Val Lys Val		
135 140 145		
CAG GAC ATT AAT GAC AAC CCT CCG GAG TTC CTG CAC GAG ACC TAT CAT	955	
Gln Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Glu Phe Leu His Glu Thr Tyr His		
150 155 160 165		
GCC AAC GTG CCT GAG AGG TCC AAT GTG GGA ACG TCA GTA ATC CAG GTG	1003	
Ala Asn Val Pro Glu Arg Ser Asn Val Gly Thr Ser Val Ile Gln Val		20
170 175 180		
ACA GCT TCA GAT GCA GAT GAC CCC ACT TAT GGA AAT AGC GCC AAG TTA	1051	
Thr Ala Ser Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr Gly Asn Ser Ala Lys Leu		
185 190 195		
GTG TAC AGT ATC CTC GAA GGA CAA CCC TAT TTT TCG GTG GAA GCA CAG	1099	
Val Tyr Ser Ile Leu Glu Gly Gln Pro Tyr Phe Ser Val Glu Ala Gln		
200 205 210		30
ACA GGT ATC ATC AGA ACA GCC CTA CCC AAC ATG GAC AGG GAG GCC AAG	1147	
Thr Gly Ile Ile Arg Thr Ala Leu Pro Asn Met Asp Arg Glu Ala Lys		
215 220 225		
GAG GAG TAC CAC GTG GTG ATC CAG GCC AAG GAC ATG GGT GGA CAT ATG	1195	
Glu Glu Tyr His Val Val Ile Gln Ala Lys Asp Met Gly Gly His Met		
230 235 240 245		
GGC GGA CTC TCA GGG ACA ACC AAA GTG ACG ATC ACA CTG ACC GAT GTC	1243	40
Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Lys Val Thr Ile Thr Leu Thr Asp Val		

250	255	260		
AAT GAC AAC CCA CCA AAG TTT CCG CAG AGC GTA TAC CAG ATA TCT GTG	1291			
Asn Asp Asn Pro Pro Lys Phe Pro Gln Ser Val Tyr Gln Ile Ser Val				
265	270	275		
TCA GAA GCA GCC GTC CCT GGG GAG GAA GTA GGA AGA GTG AAA GCT AAA	1339			
Ser Glu Ala Ala Val Pro Gly Glu Glu Val Gly Arg Val Lys Ala Lys				
280	285	290		10
GAT CCA GAC ATT GGA GAA AAT GGC TTA GTC ACA TAC AAT ATT GTT GAT	1387			
Asp Pro Asp Ile Gly Glu Asn Gly Leu Val Thr Tyr Asn Ile Val Asp				
295	300	305		
GGA GAT GGT ATG GAA TCG TTT GAA ATC ACA ACG GAC TAT GAA ACA CAG	1435			
Gly Asp Gly Met Glu Ser Phe Glu Ile Thr Thr Asp Tyr Glu Thr Gln				
310	315	320		
GAG GGG GTG ATA AAG CTG AAA AAG CCT GTA GAT TTT GAA ACC AAA AGA	1483			20
Glu Gly Val Ile Lys Leu Lys Lys Pro Val Asp Phe Glu Thr Lys Arg				
330	335	340		
GCC TAT AGC TTG AAG GTA GAG GCA GCC AAC GTG CAC ATC GAC CCG AAG	1531			
Ala Tyr Ser Leu Lys Val Glu Ala Ala Asn Val His Ile Asp Pro Lys				
345	350	355		
TTT ATC AGC AAT GGC CCT TTC AAG GAC ACT GTG ACC GTC AAG ATC GCA	1579			
Phe Ile Ser Asn Gly Pro Phe Lys Asp Thr Val Thr Val Lys Ile Ala				30
360	365	370		
GTA GAA GAT GCT GAT GAG CCC CCT ATG TTC TTG GCC CCA AGT TAC ATC	1627			
Val Glu Asp Ala Asp Glu Pro Pro Met Phe Leu Ala Pro Ser Tyr Ile				
375	380	385		
CAC GAA GTC CAA GAA AAT GCA GCT GCT GGC ACC GTG GTT GGG AGA GTG	1675			
His Glu Val Gln Glu Asn Ala Ala Ala Gly Thr Val Val Gly Arg Val				
390	395	400		40
CAT GCC AAA GAC CCT GAT GCT GCC AAC AGC CCG ATA AGG TAT TCC ATC	1723			

His Ala Lys Asp Pro Asp Ala Ala Asn Ser Pro Ile Arg Tyr Ser Ile		
410	415	420
GAT CGT CAC ACT GAC CTC GAC AGA TTT TTC ACT ATT AAT CCA GAG GAT	1771	
Asp Arg His Thr Asp Leu Asp Arg Phe Phe Thr Ile Asn Pro Glu Asp		
425	430	435
GGT TTT ATT AAA ACT ACA AAA CCT CTG GAT AGA GAG GAA ACA GCC TGG	1819	
Gly Phe Ile Lys Thr Thr Lys Pro Leu Asp Arg Glu Glu Thr Ala Trp		10
440	445	450
CTC AAC ATC ACT GTC TTT GCA GCA GAA ATC CAC AAT CGG CAT CAG GAA	1867	
Leu Asn Ile Thr Val Phe Ala Ala Glu Ile His Asn Arg His Gln Glu		
455	460	465
GCC AAA GTC CCA GTG GCC ATT AGG GTC CTT GAT GTC AAC GAT AAT GCT	1915	
Ala Lys Val Pro Val Ala Ile Arg Val Leu Asp Val Asn Asp Asn Ala		
470	475	480
485		20
CCC AAG TTT GCT GCC CCT TAT GAA GGT TTC ATC TGT GAG AGT GAT CAG	1963	
Pro Lys Phe Ala Ala Pro Tyr Glu Gly Phe Ile Cys Glu Ser Asp Gln		
490	495	500
ACC AAG CCA CTT TCC AAC CAG CCA ATT GTT ACA ATT AGT GCA GAT GAC	2011	
Thr Lys Pro Leu Ser Asn Gln Pro Ile Val Thr Ile Ser Ala Asp Asp		
505	510	515
AAG GAT GAC ACG GCC AAT GGA CCA AGA TTT ATC TTC AGC CTA CCC CCT	2059	30
Lys Asp Asp Thr Ala Asn Gly Pro Arg Phe Ile Phe Ser Leu Pro Pro		
520	525	530
GAA ATC ATT CAC AAT CCA AAT TTC ACA GTC AGA GAC AAC CGA GAT AAC	2107	
Glu Ile Ile His Asn Pro Asn Phe Thr Val Arg Asp Asn Arg Asp Asn		
535	540	545
ACA GCA GGC GTG TAC GCC CGG CGT GGA GGG TTC AGT CGG CAG AAG CAG	2155	
Thr Ala Gly Val Tyr Ala Arg Arg Gly Gly Phe Ser Arg Gln Lys Gln		40
550	555	560
565		

GAC TTG TAC CTT CTG CCC ATA GTG ATC AGC GAT GGC GGC ATC CCG CCC	2203	
Asp Leu Tyr Leu Leu Pro Ile Val Ile Ser Asp Gly Gly Ile Pro Pro		
570 575 580		
ATG AGT AGC ACC AAC ACC CTC ACC ATC AAA GTC TGC GGC TGC GAC GTG	2251	
Met Ser Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Lys Val Cys Gly Cys Asp Val		
585 590 595		
AAC GGG GCA CTG CTC TCC TGC AAC GCA GAG GCC TAC ATT CTG AAC GCC	2299	10
Asn Gly Ala Leu Leu Ser Cys Asn Ala Glu Ala Tyr Ile Leu Asn Ala		
600 605 610		
GGC CTG AGC ACA GGC GCC CTG ATC GCC ATC CTC GCC TGC ATC GTC ATT	2347	
Gly Leu Ser Thr Gly Ala Leu Ile Ala Ile Leu Ala Cys Ile Val Ile		
615 620 625		
CTC CTG GTC ATT GTA GTA TTG TTT GTG ACC CTG AGA AGG CAA AAG AAA	2395	
Leu Leu Val Ile Val Val Leu Phe Val Thr Leu Arg Arg Gln Lys Lys		20
630 635 640 645		
GAA CCA CTC ATT GTC TTT GAG GAA GAA GAT GTC CGT GAG AAC ATC ATT	2443	
Glu Pro Leu Ile Val Phe Glu Glu Glu Asp Val Arg Glu Asn Ile Ile		
650 655 660		
ACT TAT GAT GAT GAA GGG GGT GGG GAA GAA GAC ACA GAA GCC TTT GAT	2491	
Thr Tyr Asp Asp Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp Thr Glu Ala Phe Asp		
665 670 675		30
ATT GCC ACC CTC CAG AAT CCT GAT GGT ATC AAT GGA TTT ATC CCC CGC	2539	
Ile Ala Thr Leu Gln Asn Pro Asp Gly Ile Asn Gly Phe Ile Pro Arg		
680 685 690		
AAA GAC ATC AAA CCT GAG TAT CAG TAC ATG CCT AGA CCT GGC CTC CGG	2587	
Lys Asp Ile Lys Pro Glu Tyr Gln Tyr Met Pro Arg Pro Gly Leu Arg		
695 700 705		
CCA GCG CCC AAC AGC GTG GAT GTC GAT GAC TTC ATC AAC ACG AGA ATA	2635	40
Pro Ala Pro Asn Ser Val Asp Val Asp Asp Phe Ile Asn Thr Arg Ile		

710	715	720	725	
CAG GAG GCA GAC AAT GAC CCC ACG GCT CCT CCT TAT GAC TCC ATT CAA	2683			
Gln Glu Ala Asp Asn Asp Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Ser Ile Gln				
730	735	740		
ATC TAC GGT TAT GAA GGC AGG GGC TCA GTG GCC GGG TCC CTG AGC TCC	2731			
Ile Tyr Gly Tyr Glu Gly Arg Gly Ser Val Ala Gly Ser Leu Ser Ser				
745	750	755		
CTA GAG TCG GCC ACC ACA GAT TCA GAC TTG GAC TAT GAT TAT CTA CAG	2779			
Leu Glu Ser Ala Thr Thr Asp Ser Asp Leu Asp Tyr Asp Tyr Leu Gln				
760	765	770		
AAC TGG GGA CCT CGT TTT AAG AAA CTA GCA GAT TTG TAT GGT TCC AAA	2827			
Asn Trp Gly Pro Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp Leu Tyr Gly Ser Lys				
775	780	785		
GAC ACT TTT GAT GAC GAT TCT TAA CAATAACGAT ACAAATTTGG CCTTAAGAAC	2881			
Asp Thr Phe Asp Asp Asp Ser				
790	795			
TGTGTCTGGC GTTCTCAAGA ATCTAGAAGA TGTGTAAACA GGTATTTTTT TAAATCAAGG	2941			
AAAGGCTCAT TTAAAACAGG CAAAGTTTTA CAGAGAGGAT ACATTTAATA AAAGTGGCAG	3001			
GACATCAAAG TGGTAAATAC TGTGAAATAC CTTTTCTCAC AAAAAGGCAA ATATTGAAGT	3061			
TGTTTATCAA CTTGCTAGA AAAAAAAAAAC ACTTGGCATA CAAAATATTT AAGTGAAGGA	3121			
GAAGTCTAAC GCTGAACTGA CAATGAAGGG AAATTGTTTA TGTGTTATGA ACATCCAAGT	3181			
CTTTCTTCTT TTTTAAGTTG TCAAAGAAGC TTCCACAAAA TTAGAAAGGA CAACAGTTCT	3241			
GAGCTGTAAT TTCGCCTTAA ACTCTGGACA CTCTATATGT AGTGCATTTT TAACTTGAA	3301			
ATATATAATA TTCAGCCAGC TTAAACCCAT ACAATGTATG TACAATACAA TGTACAATTA	3361			
TGTCTCTTGA GCATCAATCT TGTTACTGCT GATTCTTGTA AATCTTTTTG CTTCTACTTT	3421			
CATCTTAAAC TAATACGTGC CAGATATAAC TGTCTTGTTT CAGTGAGAGA CGCCCTATTT	3481			
CTATGTCATT TTTAATGIAT CTATTTGTAC AATTTTAAAG TTCTTATTTT AGTATACATA	3541			
TAAATATCAG TATTCTGACA TGTAAGAAAA TGTTACGGCA TCACACTTAT ATTTTATGAA	3601			
CATTGTA CTG TTGCTTTAAT ATGAGCTTCA ATATAAGAAG CAATCTTTGA AATAAAAAAA	3661			
GATTTTTTTT TAAAAAAG GAGATCTACA GGCCTGTAGA TCTCCGAATT C	3712			

【 0 0 4 2 】

配列番号：3

配列の長さ：3 9 1 4

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

10

20

30

40

50

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

生物名：ヒト (Homo sapiens)

細胞の種類：原発性骨腫瘍

配列の特徴：

配列

GAATTCGGAG ATCTACAGGC CCGCGACGCT CCCCTCAGCT GCGGGCGGCC GCGGAGAGAT	60	
GCCGCGGGGG CCGCTCGCAG CCGCCGCTGA CTTGTGAATG GGACCGGGAC TGGGGCCGGG	120	10
ACTGACACCG CAGCGCTTGC CCTGCGCCAG GGAAGTGGCGG CTCGGAGGTT GCGTCCACCC	180	
TCAAGGGCCC CAGAAATCAC TGTGTTTTCA GCTCAGCGGC CCTGTGACAT TCCTTCGTGT	240	
TGTCATTTGT TGAGTGACCA ATCAGATGGG TGGAGTGTGT TACAGAAATT GGCAGCAAGT	300	
ATCCAATGGG TGAAGAAGAA GCTAACTGGG GACGTGGGCA GCCCTGACGT GATGAGCTCA	360	
ACCAGCAGAG ACATTCCATC CCAAGAGAGG TCTGCGTGAC GCGTCCGGGA GGCCACCCTC	420	
AGCAAGACCA CCGTACAGTT GGTGGAAGGG GTGACAGCTG CATTCTCCTG TGCCTACCAC	480	
GTAACCAAAA ATG AAG GAG AAC TAC TGT TTA CAA GCC GCC CTG GTG TGC	529	20
Met Lys Glu Asn Tyr Cys Leu Gln Ala Ala Leu Val Cys		
1 5 10		
CTG GGC ATG CTG TGC CAC AGC CAT GCC TTT GCC CCA GAG CGG CGG GGG	577	
Leu Gly Met Leu Cys His Ser His Ala Phe Ala Pro Glu Arg Arg Gly		
15 20 25		
CAC CTG CGG CCC TCC TTC CAT GGG CAC CAT GAG AAG GGC AAG GAG GGG	625	
His Leu Arg Pro Ser Phe His Gly His His Glu Lys Gly Lys Glu Gly		30
30 35 40 45		
CAG GTG CTA CAG CGC TCC AAG CGT GGC TGG GTC TGG AAC CAG TTC TTC	673	
Gln Val Leu Gln Arg Ser Lys Arg Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe		
50 55 60		
GTG ATA GAG GAG TAC ACC GGG CCT GAC CCC GTG CTT GTG GGC AGG CTT	721	
Val Ile Glu Glu Tyr Thr Gly Pro Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu		40
65 70 75		
CAT TCA GAT ATT GAC TCT GGT GAT GGG AAC ATT AAA TAC ATT CTC TCA	769	
His Ser Asp Ile Asp Ser Gly Asp Gly Asn Ile Lys Tyr Ile Leu Ser		
80 85 90		
GGG GAA GGA GCT GGA ACC ATT TTT GTG ATT GAT GAC AAA TCA GGG AAC	817	
Gly Glu Gly Ala Gly Thr Ile Phe Val Ile Asp Asp Lys Ser Gly Asn		

95	100	105		
ATT CAT GCC ACC AAG ACG TTG GAT CGA GAA GAG AGA GCC CAG TAC ACG	865			
Ile His Ala Thr Lys Thr Leu Asp Arg Glu Glu Arg Ala Gln Tyr Thr				
110	115	120	125	
TTG ATG GCT CAG GCG GTG GAC AGG GAC ACC AAT CGG CCA CTG GAG CCA	913			
Leu Met Ala Gln Ala Val Asp Arg Asp Thr Asn Arg Pro Leu Glu Pro				
130	135	140		10
CCG TCG GAA TTC ATT GTC AAG GTC CAG GAC ATT AAT GAC AAC CCT CCG	961			
Pro Ser Glu Phe Ile Val Lys Val Gln Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro				
145	150	155		
GAG TTC CTG CAC GAG ACC TAT CAT GCC AAC GTG CCT GAG AGG TCC AAT	1009			
Glu Phe Leu His Glu Thr Tyr His Ala Asn Val Pro Glu Arg Ser Asn				
160	165	170		
GTG GGA ACG TCA GTA ATC CAG GTG ACA GCT TCA GAT GCA GAT GAC CCC	1057			20
Val Gly Thr Ser Val Ile Gln Val Thr Ala Ser Asp Ala Asp Asp Pro				
175	180	185		
ACT TAT GGA AAT AGC GCC AAG TTA GTG TAC AGT ATC CTC GAA GGA CAA	1105			
Thr Tyr Gly Asn Ser Ala Lys Leu Val Tyr Ser Ile Leu Glu Gly Gln				
190	195	200	205	
CCC TAT TTT TCG GTG GAA GCA CAG ACA GGT ATC ATC AGA ACA GCC CTA	1153			
Pro Tyr Phe Ser Val Glu Ala Gln Thr Gly Ile Ile Arg Thr Ala Leu				30
210	215	220		
CCC AAC ATG GAC AGG GAG GCC AAG GAG GAG TAC CAC GTG GTG ATC CAG	1201			
Pro Asn Met Asp Arg Glu Ala Lys Glu Glu Tyr His Val Val Ile Gln				
225	230	235		
GCC AAG GAC ATG GGT GGA CAT ATG GGC GGA CTC TCA GGG ACA ACC AAA	1249			
Ala Lys Asp Met Gly Gly His Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Lys				
240	245	250		40
GTG ACG ATC ACA CTG ACC GAT GTC AAT GAC AAC CCA CCA AAG TTT CCG	1297			

Val Thr Ile Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Lys Phe Pro		
255	260	265
CAG AGC GTA TAC CAG ATA TCT GTG TCA GAA GCA GCC GTC CCT GGG GAG	1345	
Gln Ser Val Tyr Gln Ile Ser Val Ser Glu Ala Ala Val Pro Gly Glu		
270	275	280
GAA GTA GGA AGA GTG AAA GCT AAA GAT CCA GAC ATT GGA GAA AAT GGC	1393	
Glu Val Gly Arg Val Lys Ala Lys Asp Pro Asp Ile Gly Glu Asn Gly		10
290	295	300
TTA GTC ACA TAC AAT ATT GTT GAT GGA GAT GGT ATG GAA TCG TTT GAA	1441	
Leu Val Thr Tyr Asn Ile Val Asp Gly Asp Gly Met Glu Ser Phe Glu		
305	310	315
ATC ACA ACG GAC TAT GAA ACA CAG GAG GGG GTG ATA AAG CTG AAA AAG	1489	
Ile Thr Thr Asp Tyr Glu Thr Gln Glu Gly Val Ile Lys Leu Lys Lys		
320	325	330
CCT GTA GAT TTT GAA ACC AAA AGA GCC TAT AGC TTG AAG GTA GAG GCA	1537	
Pro Val Asp Phe Glu Thr Lys Arg Ala Tyr Ser Leu Lys Val Glu Ala		
335	340	345
GCC AAC GTG CAC ATC GAC CCG AAG TTT ATC AGC AAT GGC CCT TTC AAG	1585	
Ala Asn Val His Ile Asp Pro Lys Phe Ile Ser Asn Gly Pro Phe Lys		
350	355	360
GAC ACT GTG ACC GTC AAG ATC GCA GTA GAA GAT GCT GAT GAG CCC CCT	1633	30
Asp Thr Val Thr Val Lys Ile Ala Val Glu Asp Ala Asp Glu Pro Pro		
370	375	380
ATG TTC TTG GCC CCA AGT TAC ATC CAC GAA GTC CAA GAA AAT GCA GCT	1681	
Met Phe Leu Ala Pro Ser Tyr Ile His Glu Val Gln Glu Asn Ala Ala		
385	390	395
GCT GGC ACC GTG GTT GGG AGA GTG CAT GCC AAA GAC CCT GAT GCT GCC	1729	
Ala Gly Thr Val Val Gly Arg Val His Ala Lys Asp Pro Asp Ala Ala		40
400	405	410

AAC AGC CCG ATA AGG TAT TCC ATC GAT CGT CAC ACT GAC CTC GAC AGA	1777	
Asn Ser Pro Ile Arg Tyr Ser Ile Asp Arg His Thr Asp Leu Asp Arg		
415 420 425		
TTT TTC ACT ATT AAT CCA GAG GAT GGT TTT ATT AAA ACT ACA AAA CCT	1825	
Phe Phe Thr Ile Asn Pro Glu Asp Gly Phe Ile Lys Thr Thr Lys Pro		
430 435 440 445		
CTG GAT AGA GAG GAA ACA GCC TGG CTC AAC ATC ACT GTC TTT GCA GCA	1873	10
Leu Asp Arg Glu Glu Thr Ala Trp Leu Asn Ile Thr Val Phe Ala Ala		
450 455 460		
GAA ATC CAC AAT CGG CAT CAG GAA GCC AAA GTC CCA GTG GCC ATT AGG	1921	
Glu Ile His Asn Arg His Gln Glu Ala Lys Val Pro Val Ala Ile Arg		
465 470 475		
GTC CTT GAT GTC AAC GAT AAT GCT CCC AAG TTT GCT GCC CCT TAT GAA	1969	
Val Leu Asp Val Asn Asp Asn Ala Pro Lys Phe Ala Ala Pro Tyr Glu		20
480 485 490		
GGT TTC ATC TGT GAG AGT GAT CAG ACC AAG CCA CTT TCC AAC CAG CCA	2017	
Gly Phe Ile Cys Glu Ser Asp Gln Thr Lys Pro Leu Ser Asn Gln Pro		
495 500 505		
ATT GTT ACA ATT AGT GCA GAT GAC AAG GAT GAC ACG GCC AAT GGA CCA	2065	
Ile Val Thr Ile Ser Ala Asp Asp Lys Asp Asp Thr Ala Asn Gly Pro		
510 515 520 525		30
AGA TTT ATC TTC AGC CTA CCC CCT GAA ATC ATT CAC AAT CCA AAT TTC	2113	
Arg Phe Ile Phe Ser Leu Pro Pro Glu Ile Ile His Asn Pro Asn Phe		
530 535 540		
ACA GTC AGA GAC AAC CGA GAT AAC ACA GCA GGC GTG TAC GCC CGG CGT	2161	
Thr Val Arg Asp Asn Arg Asp Asn Thr Ala Gly Val Tyr Ala Arg Arg		
545 550 555		
GGA GGG TTC AGT CGG CAG AAG CAG GAC TTG TAC CTT CTG CCC ATA GTG	2209	40
Gly Gly Phe Ser Arg Gln Lys Gln Asp Leu Tyr Leu Leu Pro Ile Val		

560	565	570		
ATC AGC GAT GGC GGC ATC CCG CCC ATG AGT AGC ACC AAC ACC CTC ACC	2257			
Ile Ser Asp Gly Gly Ile Pro Pro Met Ser Ser Thr Asn Thr Leu Thr				
575	580	585		
ATC AAA GTC TGC GGG TGC GAC GTG AAC GGG GCA CTG CTC TCC TGC AAC	2305			
Ile Lys Val Cys Gly Cys Asp Val Asn Gly Ala Leu Leu Ser Cys Asn				
590	595	600	605	10
GCA GAG GCC TAC ATT CTG AAC GCC GGC CTG AGC ACA GGC GCC CTG ATC	2353			
Ala Glu Ala Tyr Ile Leu Asn Ala Gly Leu Ser Thr Gly Ala Leu Ile				
610	615	620		
GCC ATC CTC GCC TGC ATC GTC ATT CTC CTG GGT TGC CCA AGC TTA ATG	2401			
Ala Ile Leu Ala Cys Ile Val Ile Leu Leu Gly Cys Pro Ser Leu Met				
625	630	635		
GAA CCC CCC TCT CCC AGG GAA GAC ATG AGA TTG CTT TAT CTG GGC TTC	2449			20
Glu Pro Pro Ser Pro Arg Glu Asp Met Arg Leu Leu Tyr Leu Gly Phe				
640	645	650		
CAG CTG ATG CTA TTT TCC TAT GTT AAA GTA AAC AGA AGA TTT TGT CTT	2497			
Gln Leu Met Leu Phe Ser Tyr Val Lys Val Asn Arg Arg Phe Cys Leu				
655	660	665		
CTG GGG GTC TTT ATA AAA CTT CCT TTC CTC TAT GTG GTG GCT ACA GAG	2545			30
Leu Gly Val Phe Ile Lys Leu Pro Phe Leu Tyr Val Val Ala Thr Glu				
670	675	680	685	
AGT CCA ACC ACA CTT ACG TCA TTG TAGTATTGTT TGTGACCCTG AGAAGGCAAA	2599			
Ser Pro Thr Thr Leu Thr Ser Leu				
690				
AGAAAGAACC ACTCATTGTC TTTGAGGAAG AAGATGTCCG TGAGAACATC ATTACTTATG	2659			
ATGATGAAGG GGGTGGGGAA GAAGACACAG AAGCCTTTGA TATTGCCACC CTCCAGAATC	2719			
CTGATGGTAT CAATGGATTT ATCCCCGCA AAGACATCAA ACCTGAGTAT CAGTACATGC	2779			40
CTAGACCTGG GCTCCGGCCA GCGCCCAACA GCGTGGATGT CGATGACTTC ATCAACACGA	2839			

GAATACAGGA GGCAGACAAT GACCCACGG CTCCTCCTTA TGA CTCCATT CAAATCTACG 2899
 GTTATGAAGG CAGGGGCTCA GTGGCCGGT CCCTGAGCTC CCTAGAGTCG GCCACCACAG 2959
 ATTCAGACTT GGACTATGAT TATCTACAGA ACTGGGGACC TCGTTTTAAG AAAC TAGCAG 3019
 ATTTGTATGG TTCCAAAGAC ACTTTTGATG ACGATTCTTA ACAATAACGA TACAAATTTG 3079
 GCCTTAAGAA CTGTGTCTGG CGTTCTCAAG AATCTAGAAG ATGTGTAAAC AGGTATTTTT 3139
 TTAAATCAAG GAAAGGCTCA TTTAAAACAG GCAAAGTTTT ACAGAGAGGA TACATTTAAT 3199
 AAAACTGCGA GGACATCAAA GTGGTAAATA CTGTGAAATA CCTTTTCTCA CAAAAAGGCA 3259
 AATATTGAAG TTGTTTATCA ACTTCGCTAG AAAAAAAAAA CACTTGGCAT ACAAATATT 3319
 TAAGTGAAGG AGAAGTCTAA CGCTGAACTG ACAATGAAGG GAAATTGTTT ATGTGTTATG 3379
 AACATCCAAG TCTTTCTTCT TTTTAAAGTT GTCAAAGAAG CTTCCACAAA ATTAGAAAGG 3439
 ACAACAGTTC TGAGCTGTAA TTTGCGCTTA AACTCTGGAC ACTCTATATG TAGTGCATTT 3499
 TTAAACTTGA AATATATAAT ATTCAGCCAG CTTAAACCCA TACAATGTAT GTACAATACA 3559
 ATGTACAATT ATGTCTCTTG AGCATCAATC TTGTTACTGC TGATTCTTGT AAATCTTTTT 3619
 GCTTCTACTT TCATCTTAAA CTAATACGTG CCAGATATAA CTGTCTTGTT TCAGTGAGAG 3679
 ACGCCCTATT TCTATGTCAT TTTTAATGTA TCTATTTGTA CAATTTTAAA GTTCTTATTT 3739
 TAGTATACAT ATAAATATCA GTATTCTGAC ATGTAAGAAA ATGTTACGGC ATCACA CTTA 3799
 TATTTTATGA ACATTGTACT GTTGCTTTAA TATGAGCTTC AATATAAGAA GCAATCTTTG 3859
 AAATAAAAAA AGATTTTTTTT TTCGGAGATC TACAGGCCTG TAGATCTCCG AATTC 3914

10

20

【 0 0 4 3 】

配列番号：4

配列の長さ：2 1

配列の型：核酸

鎖の数：一重鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

株名：なし

配列の特徴：リンカーDNA。 配列番号5と相補的配列。名称「A T O S - 1」

配列

CTCTTGCTTG AATTCGGACT A 21

30

40

【 0 0 4 4 】

配列番号：5

配列の長さ：2 5

配列の型：核酸

鎖の数：一重鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

50

株名：なし

配列の特徴：リンカーDNA。配列番号4と相補的配列。名称「ATOS-2」

配列

TAGTCCGAAT TCAAGCAAGA GCACA 25

【0045】

配列番号：6

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一重鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

株名：なし

配列の特徴：リンカーDNA。配列番号7と相補的配列。名称「ATOS-4」

配列

CTCTTGCTTA AGCTTGACT A 21

【0046】

配列番号：7

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一重鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

株名：なし

配列の特徴：リンカーDNA。配列番号6と相補的配列。名称「ATOS-5」

配列

TAGTCCAAGC TTAAGCAAGA GCACA 25

【0047】

配列番号：8

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：ペプチド

起源：

生物名：マウス

配列の特徴：OSF-4-1（抗原ペプチド）

存在位置：マウスOSF-4の断片で101番目から115番目まで。

配列

Phe Val Ile Asp Asp Lys Ser Gly Asn Ile His Ala Thr Lys Thr

5

10

15

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【図1】マウスOSF-4とヒトOSF-4-1とヒトOSF-4-2の各々のアミノ酸配列の比較図（alignment）である。マウスとヒトのOSF-4の間で全て共通なアミノ酸残基はコンセンサスとして示した。

【図2】図1のマウスOSF-4とヒトOSF-4-1とヒトOSF-4-2の各々のアミノ酸配列の比較図の続きを示す。マウスとヒトのOSF-4の間で全て共通なアミノ酸残基はコンセンサスとして示した。

【図3】図2のマウスOSF-4とヒトOSF-4-1とヒトOSF-4-2の各々のアミノ酸配列の比較図の続きを示す。マウスとヒトのOSF-4の間で全て共通なアミノ酸残基はコンセンサスとして示した。

【図4】マウスOSF-4前駆体タンパク質の構造の模式図である。OSF-4前駆体タンパク質は8つの領域に分けることができ、シグナル領域（斜線部）、5つの細胞外領域（EC1、EC2、EC3、EC4、及びEC5）、細胞膜貫通領域（TM）、及び細胞内領域（CP）である。

10

【図5】マウスOSF-4をコードするcDNAの制限酵素地図である。太字はOSF-4のアミノ酸をコードする領域を示す。KpnIとSalIサイトは存在しない。

【図6】マウスOSF-4の組織特異的発現を示す図である。RNAを種々の組織や細胞株から精製し、RNAドットプロット法により解析したものであり、オートラジオグラフィの結果を示す。

【図7】発現ベクターpMSS60の模式図である。

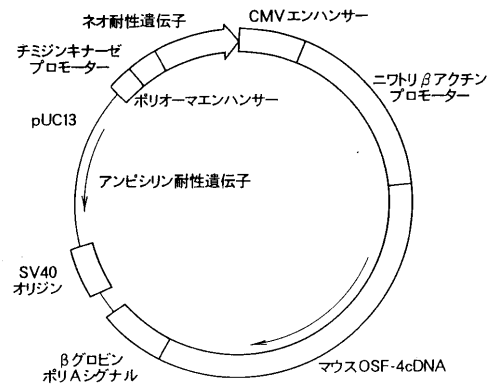
【図1】

1	50	100
■OSF-4	MENTYLAQ LVCGLMCHS QAFALERSH LPSFSGHHE KGEQGVLAR SERGWVNF PYIEYTOP PVVGLRSD INSDGNKY ILSEGAGTI	
■OSF-4-1	MENTYLAQ LVCGLMCHS HAFAPERRH LPSFSGHHE KGEQGVLAR SERGWVNF PYIEYTOP PVVGLRSD INSDGNKY ILSEGAGTI	
■OSF-4-2	MENTYLAQ LVCGLMCHS HAFAPERRH LPSFSGHHE KGEQGVLAR SERGWVNF PYIEYTOP PVVGLRSD INSDGNKY ILSEGAGTI	
コンテナ	MENTYLAQ LVC-L-M-HS -AFA-ERR-H L-PSFSGHHE KGEQGVLAR SERGWVNF PYIEYTOP PVVGLRSD INSDGNKY ILSEGAGTI	
101	150	200
■OSF-4	FYIDKSGNI HATKLDREE RAQYTLMAQA VDRTNRPLE PFSEFVYKQ DINDPPEEL HEYHANPE KSNVGSYVQ VTASADPPT YGNSALVYS	
■OSF-4-1	FYIDKSGNI HATKLDREE RAQYTLMAQA VDRTNRPLE PFSEFVYKQ DINDPPEEL HEYHANPE KSNVGSYVQ VTASADPPT YGNSALVYS	
■OSF-4-2	FYIDKSGNI HATKLDREE RAQYTLMAQA VDRTNRPLE PFSEFVYKQ DINDPPEEL HEYHANPE KSNVGSYVQ VTASADPPT YGNSALVYS	
コンテナ	FYIDKSGNI HATKLDREE RAQYTLMAQA VDRTNRPLE PFSEFVYKQ DINDPPEEL HE-YHANPE KSNVGSYVQ VTASADPPT YGNSALVYS	
201	250	300
■OSF-4	ILEGQPTSY EAQTGLRTA LPNDREANE EHYVIOQAD MGHGGLGSG TTXVITILTD VDNPPKPPQ SYQMSYSEA AVPEEWGRY KADPPDIGN	
■OSF-4-1	ILEGQPTSY EAQTGLRTA LPNDREANE EHYVIOQAD MGHGGLGSG TTXVITILTD VDNPPKPPQ SYQMSYSEA AVPEEWGRY KADPPDIGN	
■OSF-4-2	ILEGQPTSY EAQTGLRTA LPNDREANE EHYVIOQAD MGHGGLGSG TTXVITILTD VDNPPKPPQ SYQMSYSEA AVPEEWGRY KADPPDIGN	
コンテナ	ILEGQPTSY EAQTGLRTA LPNDREANE EHYVIOQAD MGHGGLGSG TTXVITILTD VDNPPKPPQ SYQ-SYSEA AVPEEWGRY KADPPDIGN	

【図2】

301	350	400
■OSF-4	GLTYNTDK DGELEFITT DYTQGVK LKPPDFETK RANSLKEAA WHIDPFIS NGPFDVTV KLVDADEP PHELAPSYH EYQNAAGT	
■OSF-4-1	GLTYNTDK DGESEFITT DYTQGVK LKPPDFETK RANSLKEAA WHIDPFIS NGPFDVTV KLVDADEP PHELAPSYH EYQNAAGT	
■OSF-4-2	GLTYNTDK DGESEFITT DYTQGVK LKPPDFETK RANSLKEAA WHIDPFIS NGPFDVTV KLVDADEP PHELAPSYH EYQNAAGT	
コンテナ	GLTYNTDK DG-E-FEITT DYTQ-GV-K LKPPDFETK RANSLK-EAA WHIDPFIS NGPFDVTV KL-VDADEP PHELAPSYH EYQNAAGT	
401	450	500
■OSF-4	VGRVHAKDP DAANSYRYS IDRTDLDRF FTINPEDEFI KITPELDREE TAMLNLSHFA AEIHNHQET KVPVLRVLD VDNAPKEVA PYEGFICSD	
■OSF-4-1	VGRVHAKDP DAANSYRYS IDRTDLDRF FTINPEDEFI KITPELDREE TAMLNLTFFA AEIHNHQEA KVPVLRVLD VDNAPKEVA PYEGFICSD	
■OSF-4-2	VGRVHAKDP DAANSYRYS IDRTDLDRF FTINPEDEFI KITPELDREE TAMLNLTFFA AEIHNHQEA KVPVLRVLD VDNAPKEVA PYEGFICSD	
コンテナ	VGRVHAKDP DAANSYRYS IDRTDLDRF FTINPEDEFI KITPELDREE TAMLN-LFFA AEIHNHQE- KVPVLRVLD VDNAPKEVA PYEGFICSD	
501	550	600
■OSF-4	HPKALSNQPI VTSADDDQ TANGPRETFS LPPELHNPIN FTVENDRMT AGYVARGGF SRQKQVYLL PVIYSKQGP PMSNTVILI KYGQDNGA	
■OSF-4-1	QTPLSNQPI VTSADDDQ TANGPRETFS LPPELHNPIN FTVENDRMT AGYVARGGF SRQKQVYLL PVIYSKQGP PMSNTVILI KYGQDNGA	
■OSF-4-2	QTPLSNQPI VTSADDDQ TANGPRETFS LPPELHNPIN FTVENDRMT AGYVARGGF SRQKQVYLL PVIYSKQGP PMSNTVILI KYGQDNGA	
コンテナ	-E-LSNQPI VT-SDD-QD TANGPRETFS LPPE-LHNPIN FTVENDRMT AGYVARGGF SRQKQ-YLL PVIYSKQGP PMSNTVILI KYGQDNGA	

【図 7】



フロントページの続き

- (72)発明者 河合 伸治
埼玉県富士見市鶴馬1丁目12番27号
- (72)発明者 辻村 敦
京都府向日市物集女町御所海道5番地 コーポ春日105号
- (72)発明者 アマン・エゴン
東京都世田谷区駒沢5丁目1番13号

審査官 鈴木 恵理子

- (56)参考文献 特表平07-500019 (JP, A)
Cell Regulations, Vol.2(1991), p.261-270

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
- C07K 14/47
 - C12N 15/09
 - C12P 21/02
 - BIOSIS(DIALOG)
 - SwissProt/PIR/GeneSeq