

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3832973号

(P3832973)

(45) 発行日 平成18年10月11日(2006.10.11)

(24) 登録日 平成18年7月28日(2006.7.28)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 14/47 (2006.01)

C O 7 K 14/47

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A

C O 7 K 16/18 (2006.01)

C O 7 K 16/18

請求項の数 6 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願平10-235901	(73) 特許権者	503360115
(22) 出願日	平成10年8月21日(1998.8.21)		独立行政法人科学技術振興機構
(65) 公開番号	特開2000-60562(P2000-60562A)		埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(43) 公開日	平成12年2月29日(2000.2.29)	(74) 代理人	100093230
審査請求日	平成13年2月8日(2001.2.8)		弁理士 西澤 利夫
		(72) 発明者	小室 晃彦
			神奈川県相模原市上鶴間2759-2
			スクエアK111
			602
		(72) 発明者	佐伯 美帆呂
			神奈川県相模原市西大沼2-52-12
			グリーンヴィラ 3
			01号
		(72) 発明者	加藤 誠志
			神奈川県相模原市若松3-46-50
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト転写関連蛋白質とこの蛋白質をコードする c D N A

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のアミノ酸配列を含むヒト転写関連蛋白質。

【請求項 2】

請求項 1 記載のヒト転写関連蛋白質をコードするヒト遺伝子。

【請求項 3】

請求項 2 のヒト遺伝子の c D N A であって、配列番号 2 の塩基配列を含む c D N A。

【請求項 4】

配列番号 2 の塩基配列における 10 b p 以上の連続配列からなり、請求項 2 の遺伝子または請求項 3 の c D N A に対するプローブとして機能する D N A 断片。

【請求項 5】

請求項 3 の c D N A を保有する組換えベクター。

【請求項 6】

請求項 1 のヒト転写関連蛋白質に対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、ヒト核蛋白質 N p w 38 と結合する新規なヒト転写関連蛋白質と、この蛋白質をコードしているヒト遺伝子、この遺伝子の c D N A、および上記蛋白質に対する抗体に関するものである。この発明の蛋白質および抗体は、各種疾患の診断および治療に有

用であり、ヒト cDNA は遺伝子診断用プローブや遺伝子治療用遺伝子源として有用である。また、cDNA は、この発明の蛋白質を大量生産するための遺伝子源として用いることが出来る。

【0002】

【従来の技術】

ヒト核蛋白質 Npw38 は、WWドメインを有する 38 kDa の核蛋白質として見いだされた [小室ら、第 70 回日本生化学会大会講演要旨集、p.548]。WWドメインとは SH2、SH3、PH、PTBドメインと類似した蛋白質-蛋白質相互作用モチーフの新しいファミリーである。このドメインは、2 個の保存されたトリプトファンを持つ約 40 アミノ酸残基からなり、SH3ドメインと同様にプロリンリッチなアミノ酸配列に結合することが知られている [H. I. Chen and M. Sudol. (1995) Proc. Natl. Sci. 92, 7819-7823]。Npw38 の WWドメインは、転写活性促進作用を有することが示されている [小室ら、第 20 回日本分子生物学会年会講演要旨集、p. 369]。したがって、この WWドメインに結合する蛋白質が、転写活性化に関与していると考えられる。

10

【0003】

転写活性に関与する因子は、発生・分化などの生命現象のみならず、癌等の疾患とも密接に関係している [村松正寛編、NEW メディカルサイエンス、「転写のしくみと疾患」]。従って、これらの蛋白質は特定遺伝子の転写・翻訳を調節する低分子医薬品を開発するためのターゲット蛋白質としての可能性を秘めており、できるだけ多くの転写関連蛋白質を得ることが望まれている。

20

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、医薬品などの開発に有用なヒト蛋白質、特に、ヒト核蛋白質 Npw38 と結合する新規な転写関連蛋白質を提供することを課題としている。

またこの出願の発明は、この蛋白質をコードするヒト遺伝子、この遺伝子の cDNA および蛋白質に対する抗体などの遺伝子操作材料を提供することを課題としている。

【0005】

【課題を解決するための手段】

この出願は、上記の課題を解決する発明として、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むヒト転写関連蛋白質を提供する。

30

また、この出願は、配列番号 1 のアミノ酸配列における 1 もしくは複数のアミノ酸が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むヒト転写関連蛋白質を提供する。

【0006】

さらに、この出願は、上記のヒト転写関連蛋白質をコードするヒト遺伝子、この遺伝子の cDNA であって、配列番号 2 の塩基配列を含む cDNA、および配列番号 2 の一部配列からなる DNA 断片を提供する。

さらにまた、この出願は、上記 cDNA を保有する組換えベクター、および上記のヒト転写関連蛋白質に対する抗体を提供する。

【0007】

40

以下、この発明の実施の形態について詳しく説明する。

【0008】

【発明の実施の形態】

この発明のヒト転写関連蛋白質は、公知の方法、すなわちヒトの臓器、細胞株などから単離する方法、この発明によって提供されるのアミノ酸配列に基づき化学合成によってペプチドを調製する方法、あるいはこの発明によって提供される cDNA 断片を用いて組換え DNA 技術で生産する方法などにより取得することができる。例えば、組換え DNA 技術によって蛋白質を取得する場合には、この発明の cDNA 断片を有するベクターからインビトロ転写によって RNA を調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで発現できる。また翻訳領域を公知の方法により適当な発現ベクターに組換え

50

てやれば、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞等で、コードしている蛋白質を大量に発現させることができる。

【0009】

この発明の蛋白質をインビトロ翻訳でDNAを発現させて生産させる場合には、このcDNAの翻訳領域をRNAポリメラーゼプロモーターを有するベクターに組換え、プロモーターに対応するRNAポリメラーゼを含む、ウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加してやれば、この発明の蛋白質をインビトロで生産することができる。RNAポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6などが例示できる。これらのRNAポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7

18、pT7/3 19、pBluescript IIなどが例示できる。

【0010】

この発明の蛋白質を大腸菌などの微生物でDNAを発現させて生産させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、cDNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、この発明のcDNAの翻訳領域を組換えた発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養してやれば、このcDNAがコードしている蛋白質を微生物内で大量生産することができる。この際、任意の翻訳領域の前後に開始コドンと停止コドンを付加して発現させてやれば、任意の領域を含む蛋白質断片を得ることができる。あるいは、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。この融合蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによってこのcDNAがコードする蛋白質部分のみを取得することもできる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript II、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。

【0011】

この発明の蛋白質を真核細胞でDNAを発現させて生産させる場合には、このcDNAの翻訳領域を、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに組換え、真核細胞内に導入してやれば、この発明の蛋白質を動物細胞内で生産することができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pYES2などが例示できる。真核細胞としては、サル腎臓細胞COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHOなどの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、この蛋白質を発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。発現ベクターを真核細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法を用いることができる。

【0012】

この発明の蛋白質を原核細胞や真核細胞で発現させたのち、培養物から目的蛋白質を単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせる行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0013】

この発明の蛋白質には、配列番号1で表されるアミノ酸配列のいかなる部分アミノ酸配列を含むペプチド断片(5アミノ酸残基以上)も含まれる。これらのペプチド断片は抗体を作製するための抗原として用いることができる。この発明の蛋白質には、他の任意の蛋白質との融合蛋白質も含まれる。例えば、実施例に挙げたグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合蛋白質などである。

【0014】

この発明の遺伝子は、上記蛋白質をコードするヒトの遺伝子であって、例えば、この発明

10

20

30

40

50

の c D N A またはその一部配列をプローブとして、既存のゲノムライブラリーから単離することができる。

この発明の c D N A は、例えばヒト細胞由来 c D N A ライブラリーからクローン化することができる。c D N A はヒト細胞から抽出したポリ (A) + R N A を鋳型として合成する。ヒト細胞としては、人体から手術などによって摘出されたものでも培養細胞でも良い。

c D N A は、岡山－Berg 法 [Okayama, H and Berg, P., Mol. Cell. Biol. 2:161-170 (1982)]、Gubler－Hoffman 法 [Gubler, U. and Hoffman, J. Gene 25:263-269 (1983)] 等、いかなる方法を用いて合成してもよいが、完全長クローンを効率的に得るためには、実施例にあげたようなキャッピング法 [Kato, S. et al. Gene 150:243-250 (1994)] を用いることが望ましい。また市販のヒト c D N A ライブラリーを用いることもできる。c D N A ライブラリーからこの発明の c D N A をクローン化するには、この発明の c D N A の任意の部分の塩基配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとして用いて、公知の方法によりコロニーあるいはプラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行えばよい。また、目的とする c D N A 断片の両末端にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして用いて、ヒト細胞から単離した m R N A から R T－P C R 法により、この発明の c D N A 断片を調製することもできる。

【0015】

この発明の c D N A は、配列番号 2 で表される塩基配列を含むことを特徴とするものであり、1926bp のオープンリーディングフレームを有している。このオープンリーディングフレームは、641 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしている。

この発明の蛋白質は、いかなる組織でも発現しているので、配列番号 2 に記載の c D N A の塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、ヒト細胞から作製したヒト c D N A ライブラリーをスクリーニングすることにより、この発明の c D N A と同一のクローンを容易に得ることができる。あるいは、これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 法を用いて、目的 c D N A を合成することもできる。

【0016】

この発明の蛋白質は、転写活性化能を有するヒト核蛋白質 N p w 38 と結合するものであり、また、ポリリボ G や一本鎖 D N A とも結合する。従って、この発明の蛋白質は、転写調節において重要な役割を有していると考えられる。

一般にヒト遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号 2 において、1 または複数個のヌクレオチドの付加、欠失および／または他のヌクレオチドによる置換がなされている c D N A もこの発明の c D N A に含まれる。

【0017】

同様に、これらの変更によって生じる、1 または複数個のアミノ酸の付加、欠失および／または他のアミノ酸による置換がなされている蛋白質も、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質の活性を有する限り、この発明の蛋白質に含まれる。

この発明の D N A 断片には、配列番号 2 で表される塩基配列のいかなる部分塩基配列を含む c D N A 断片 (10bp 以上) も含まれる。また、センス鎖およびアンチセンス鎖からなる D N A 断片もこの範疇に入る。これらの D N A 断片は遺伝子診断用のプローブとして用いることができる。

【0018】

この発明の蛋白質に対する抗体は、蛋白質それ自体、またはその部分ペプチドを抗原として、公知の方法によりポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。

【0019】

【実施例】

次に実施例を示しこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明はこれらの例に限定されるものではない。なお、D N A の組換えに関する基本的な操作および酵素反応は、文献 ["Molecular Cloning. Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory,

10

20

30

40

50

1989”]に従った。制限酵素および各種修飾酵素は特に記載の無い場合は宝酒造社製のものを用いた。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書に従った。cDNA合成は文献[Kato, S. et al., Gene 150:243-250, (1994)]に従った。

実施例1：ヒトNpw38 cDNAのクローニング

ヒト胃癌細胞cDNAライブラリー(WO97/03190記載)から選択したcDNAクローンの大規模塩基配列決定の結果、クローンHP10345を得た。このクローンは、170bpの5'非翻訳領域、798bpのオープンリーディングフレーム、52bpの3'非翻訳領域からなる構造を有していた(配列番号3)。オープンリーディングフレームは265アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしていた。

【0020】

モチーフ配列検索を行ったところ、46番目から78番目までの領域が、WWドメインと類似性を有していた。52番目と75番目のトリプトファン、78番目のプロリンが、これまで知られている全てのWWドメインに保存されているアミノ酸残基である。この蛋白質のアミノ酸配列における他の特徴として、21番目から41番目までの酸性アミノ酸残基(アスパラギン酸とグルタミン酸)に富む領域、104番目から176番目までの酸性アミノ酸残基と塩基性アミノ酸残基が交互に並ぶ領域があることなどが挙げられる。

実施例2：大腸菌によるGST融合蛋白質の発現

EcoRI 認識部位を付加した翻訳開始コドンから始まる25 merのセンスプライマー(5'-CCGAATTCATGCCGCTGCCCGTTGC-3')とEcoRI 認識部位を付加した停止コドンまでを含む25 merのアンチセンスプライマー(5'-CCGAATTCTCAATCCTGCTGCTTGG-3')を用い、pHP10345を鋳型としてPCRにより翻訳領域を増幅した。PCR産物をEcoRIで消化し、pGEX-5X-1(Pharmacia社製)のEcoRI部位に挿入した。塩基配列を確認した後、宿主大腸菌BL21の形質転換を行った。LB培地中で37℃で5時間培養し、IPTGを最終濃度が0.4 mMになるように加え、さらに37℃で2.5時間培養した。菌体を遠心により分離し、溶解溶液(50 mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA-1 % Triton X-100, 0.2% SDS, 0.2 mM PMSF)に溶かし、一度-80℃で凍結させ融解させた後、超音波破碎を行った。1000 x gで30分遠心し、上清にグルタチオンセファロース4Bを加え、4℃で1時間インキュベートした。ビーズを十分洗浄した後、溶出溶液(10 mM Tris-50 mMグルタチオン)で融合蛋白質を溶出した。その結果、分子量約60 kDaのGST-HP10345融合蛋白質を得た。

(3) Npw38結合蛋白質の精製

HeLa-S3細胞(1 x 10¹⁰個)に低張バッファー(20 mM Hepes (pH7.4), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂)を加え、4℃で10分間放置し、ダウンス型ホモジェナイザーにより均一化した。1000 x g, 15分の遠心により核画分を得た。核画分を0.5 % NP-40を含む低張バッファーで2回洗浄した後、高張バッファー(20 mM Hepes (pH7.4), 250 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% NP-40)により4℃、30分間抽出し、核抽出液とした。

【0021】

上記の核抽出物40 mlにGST-Npw38融合蛋白質25 mgを加え、4℃、ローターにて2時間攪拌した。グルタチオンセファロース4Bを加え、さらに、4℃、2時間インキュベートし、ビーズを十分洗浄した後、10 mM Tris、50 mMグルタチオンで溶出した。溶出液をSDS-PAGEにかけたところ、約100kDaの蛋白質が含まれていた。この蛋白質をNpw38BP1と命名した。SDS-PAGEゲル上のバンドをPVDF膜に転写後、100 kDaのバンドをプロテインシーケンサーG1000A (HEWLETT PACKARD社)にのせ、N末端アミノ酸配列を決定した。その結果、配列番号4で表されるアミノ酸配列が得られた。

実施例4：Npw38BP1をコードするcDNAのクローニング

決定したアミノ酸配列25残基を用いてデータベースをサーチしたところ、この配列はESTクローン(GenBankTM登録番号AA206624)がコードする蛋白質のアミノ酸配列と一致した。このESTクローンの塩基配列をもとにして、6アミノ酸残基をコードする領域に対するアンチセンスプライマー(5'-TGTAGATCTCCGTCCTCCAT-3')を合成した。ヒトフィブ्रोサルコーマ細胞株HT-1080 cDNAライブラリー(WO98/11217に記載)を鋳型とし、アンチセンスプライマーとT7プライマーを用い、Npw38BP1 cDNAの5'上流領域をP

10

20

30

40

50

C Rにより増幅したところ約200bp の c D N A断片を得た。この c D N A断片をプローブとしてヒトフィブロサルコーマ細胞株 H T-1080 c D N Aライブラリー (W O 98/11217記載) をスクリーニングした結果、クローン H P 00169 を得た。このクローンは、配列番号 2 に示したとおり、1,926 bp のオープンリーディングフレームを有していた。また、オープンリーディングフレームは配列番号 1 に示した 6 4 1 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしていた。

実施例 5 : インビトロ翻訳による蛋白質合成

Npw38B P 1 c D N A を有するプラスミドベクターを用いて、T_NT ウサギ網状赤血球溶解物キット (プロメガ社製) によるインビトロ転写/翻訳を行なった。その際に [³⁵S]メチオニンを添加し、発現産物をラジオアイソトープでラベルした。いずれの反応もキットに付属のプロトコールに従って行なった。プラスミド 2 μg を、T_NT ウサギ網状赤血球溶解物 12.5 μl、緩衝液 (キットに付属) 0.5 μl、アミノ酸混合液 (メチオニンを含まない) 2 μl、[³⁵S]メチオニン (アマーシャム社) 2 μl (0.3 MBq/μl)、T7 R N A ポリメラーゼ 0.5 μl、R N a s i n 20 U を含む総量 25 μl の反応液中で 30℃ で 90 分間反応させた。反応液 3 μl に S D S サンプリングバッファー (125mM トリス塩酸緩衝液、pH 6.8、120mM 2-メルカプトエタノール、2% S D S 溶液、0.025% ブロモフェノールブルー、20% グリセロール) 2 μl を加え、95℃ 3 分間加熱処理した後、S D S-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。オートラジオグラフィーを行なったところ、約 100kDa の翻訳産物のバンドが得られた。オープンリーディングフレームから予想される Npw38B P 1 の分子量は、約 70kDa である。翻訳産物の分子量はそれよりも大きい値を示すが、細胞から単離した Npw38B P 1 の分子量も約 100kDa であることから、この蛋白質の見かけの分子量は約 100kDa であることが判明した。

実施例 6 : Npw38B P 1 の大腸菌による発現

EcoRI 認識部位を付加した翻訳開始コドンから始まる 26mer のセンスプライマー (5'-CCG AATTCATGGGACGGAGATCTACA-3') と SalI 認識配列を付加した停止コドンまでを含む 26mer のアンチセンスプライマー (5'-CCGTCGACTCACAGTAGCCCTTCCAT-3') を用い、クローン HP00169 を鋳型として P C R により翻訳領域を増幅した。P C R 産物を EcoRI と SalI で消化し、p G E X-5 X-1 (Pharmacia 社製) の EcoRI と SalI 部位に挿入した。塩基配列を確認した後、宿主大腸菌 J M 109 の形質転換を行った。L B 培地中で 37℃ で 5 時間培養し、IPTG を最終濃度が 0.4 mM になるように加え、さらに 37℃ で 4 時間培養した。菌体を遠心により分離し、溶解溶液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 0.2 mM PMSF) に溶かし、一度 -80℃ で凍結させ融解させた後、超音波破碎を行った。10,000 x g で 30 分遠心し、上清にグルタチオンセファロース 4 B を加え、4℃ で 1 時間インキュベートした。ビーズを十分洗浄した後、溶出溶液 (10 mM Tris-HCl, 50 mM グルタチオン) で融合蛋白質を溶出した。

実施例 7 : 抗体作製

上記の融合蛋白質を抗原として家兔に常法により免疫を行い抗血清を得た。抗血清はまず、40% 飽和硫酸沈殿画分を GST アフィニティークラムにより GST 抗体を除いた。素通り画分をさらに GST-HP00169 の抗原カラムにより精製した。

実施例 8 : ウェスタンブロット

HeLa-S3 細胞ライセートを SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜ブロットした後、5% スキムミルクを含む 0.05% Tween20-PBS (TPBS) で 1 時間室温でブロッキングし、抗体を TPBS で 10,000 倍希釈したものと 1 時間インキュベートした。TPBS で 3 回洗浄し、さらに TPBS で 10,000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG と 1 時間インキュベートした。TPBS で 4 回洗浄し、ECL 試薬 (Amersham 社製) により発光させて検出したところ、約 100kDa の位置にシグナルが得られた。

実施例 9 : Npw38B P 1 の核酸結合能

Npw38B P 1 c D N A を鋳型とした、ウサギ網状赤血球インビトロ翻訳産物と種々の核酸との結合能を検討した。ポリリボ A アガロース、ポリリボ G アガロース、ポリリボ U アガロース、ポリリボ C アガロース、二本鎖 D N A セルロース、一本鎖 D N A セルロース (いずれもファルマシア社製) とインビトロ翻訳産物を HKN 緩衝液 [Hepes (pH 7.4), 150 mM N

10

20

30

40

50

aCl, 0.01% NP40] 中で室温、20分間インキュベートした。HKN 緩衝液で5回洗浄し、担体に結合した蛋白質をSDS-PAGEにより分析したところ、Npw38BP1はポリリボGならびに一本鎖DNAに特異的に結合することがわかった。

【0022】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、癌などの病態の診断および治療等に有用な新規なヒト転写関連蛋白質とその抗体が提供される。また、この発明のcDNA等の遺伝子操作材料を用いることによって、このヒト蛋白質を大量に製造することができる。そして、この蛋白質と結合する低分子化合物をスクリーニングすることによる、新しい型の抗腫瘍剤などの医薬を探索することが可能となる。

10

【0023】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：641

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

ハイポセティカル：No

起源：

10

生物名：ホモ=サピエンス

細胞の種類：フィプロサルコーマ

セルライン：HT-1080

クローン名：HP00169

配列

Met Gly Arg Arg Ser Thr Ser Ser Thr Lys Ser Gly Lys Phe Met Asn

1 5 10 15

20

Pro Thr Asp Gln Ala Arg Lys Glu Ala Arg Lys Arg Glu Leu Lys Lys

20 25 30

Asn Lys Lys Gln Arg Met Met Val Arg Ala Ala Val Leu Lys Met Lys

35 40 45

Asp Pro Lys Gln Ile Ile Arg Asp Met Glu Lys Leu Asp Glu Met Glu

50 55 60

Phe Asn Pro Val Gln Gln Pro Gln Leu Asn Glu Lys Val Leu Lys Asp

65 70 75 80

30

Lys Arg Lys Lys Leu Arg Glu Thr Phe Glu Arg Ile Leu Arg Leu Tyr

85 90 95

Glu Lys Glu Asn Pro Asp Ile Tyr Lys Glu Leu Arg Lys Leu Glu Val

100 105 110

Glu Tyr Glu Gln Lys Arg Ala Gln Leu Ser Gln Tyr Phe Asp Ala Val

115 120 125

40

Lys Asn Ala Gln His Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Leu Pro Asp Met

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

10

20

30

40

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

10

20

30

40

595 600 605
Ala Lys Ala Ala Pro Lys Ser Gly Pro Ser Val Pro Val Ser Val Gln
610 615 620
Thr Lys Asp Asp Val Tyr Glu Ala Phe Met Lys Glu Met Glu Gly Leu
625 630 635 640
Leu
641

10

配列番号：2

配列の長さ：1926

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

20

生物名：ホモ＝サピエンス

細胞の種類：フィプロサルコーマ

セルライン：HT-1080

クローン名：HP00169

配列

ATGGGACGGA GATCTACATC ATCCACCAAG AGTGGAAAAT TTATGAACCC CACAGACCAA 60
GCCCCGAAAGG AAGCCCGGAA GAGAGAATTA AAGAAGAACA AAAACAGCG CATGATGGTT 120
CGAGCTGCAG TTTTAAAGAT GAAGGATCCA AAACAGATAA TCCGAGACAT GGAGAAATTG 180
GATGAAATGG AGTTTAACCC AGTGCAACAG CCACAATTAA ATGAGAAAGT ACTGAAAGAC 240
AAGCGTAAAA AGCTGCGTGA AACCTTTGAA CGTATTCTAC GACTCTATGA AAAAGAGAAT 300
CCAGATATTT ACAAAGAATT GAGAAAGCTA GAAGTAGAAT ATGAACAGAA GAGGGCTCAA 360
CTTAGCCAAT ATTTTGATGC TGTCAAGAAT GCTCAGCATG TGGAAGTGA GAGTATTCCT 420
TTGCCAGATA TGCCACATGC TCCTTCCAAC ATTTTGATCC AGGACATTCC ACTTCCTGGT 480
GCCCAGCCAC CCTCTATCCT AAAGAAAACC TCAGCCTATG GACCTCCAAC TCGGGCAGTT 540
TCTATCCTTC CTCTTCTTGG ACATGGTGTT CCACGTTTGC CCCCTGGCAG AAAACCTCCT 600

30

40

```

GGCCCTCCCC CTGGTCCACC TCCTCCTCAA GTCGTGCAGA TGTATGGCCG TAAAGTGGGT 660
TTTGCCCTAG ATCTTCCCCC TCGTAGGCGA GATGAAGACA TGTTATATAG TCCTGAACTT 720
GCCCAGCGAG GTCATGATGA TGATGTTTCT AGCACCAGTG AAGATGATGG CTATCCTGAG 780
GACATGGATC AAGATAAGCA TGATGACAGT ACTGATGACA GTGACACCGA CAAATCAGAT 840
GGAGAAAGTG ACGGGGATGA ATTTGTGCAC CGTGATAATG GTGAGAGAGA CAACAATGAA 900
GAAAAGAAGT CAGGTCTGAG TGTACGGTTT GCAGATATGC CTGGAAAATC AAGGAAGAAA 960
AAGAAGAACA TGAAGGAACT GACTCCTCTT CAAGCCATGA TGCTTCGTAT GGCAGGTCAA 1020
GAAATCCCTG AGGAGGGACG GGAAGTAGAG GAATTTTCAG AGGACGATGA TGAAGATGAT 1080
TCTGATGACT CTGAAGCAGA AAAGCAATCA CAAAAGCAGC ATAAAGAGGA ATCCCATTCT 1140
GATGGCACAT CCACTGCTTC TTCACAGCAG CAGGCTCCGC CGCAGTCTGT TCCTCCTTCT 1200
CAGATACAAG CACCTCCCAT GCCAGGACCA CCACCTCTTG GACCACCACC TGCTCCACCA 1260
TTACGGCCTC CTGGGCCACC TACAGGCCTT CCTCCTGGTC CACCTCCAGG AGCTCCTCCA 1320
TTCCTGAGAC CACCTGGAAT GCCAGGACTC CGAGGGCCCT TACCCCGACT TTTACCTCCA 1380
GGACCACCAC CAGGCCGACC CCCTGGCCCT CCCCAGGTC CACCTCCAGG TCTGCCTCCT 1440
GGTCCCCCTC CTCGTGGACC CCCACCAAGG CTACCTCCCC CTGCACCTCC AGGTATTCTT 1500
CCACCTCGTC CTGGCATGAT GCGCCACCT TTGGTGCCTC CCCTTGGACC TGCCCCCCTT 1560
GGGCTGTTCC CACCAGCTCC CTTGCCAAAC CCTGGGGTTT TAAGTGCCCC ACCCAACTTG 1620
ATTCAGCGAC CCAAGGCGGA TGATACAAGT GCAGCCACCA TTGAGAAGAA AGCCACAGCA 1680
ACCATCAGTG CCAAGCCACA GATCACTAAT CCCAAGGCAG AGATTACTCG ATTTGTGCCC 1740
ACTGCACTGA GAGTACGTCG GGAGAATAAA GGGGCTACTG CTGCTCCCCA AAGAAAGTCA 1800
GAGGATGATT CTGCTGTGCC TCTTGCCAAA GCAGCACCCA AATCTGGTCC TTCTGTTCTT 1860
GTCTCAGTAC AAATAAGGA TGATGTCTAT GAGGCTTTCA TGAAAGAGAT GGAAGGGCTA 1920
CTGTGA 1926

```

配列番号 : 3

配列の長さ : 1 0 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

10

20

30

40

起源：

生物名：ホモ＝サピエンス

細胞の種類：胃癌

クローン名：HP 1 0 3 4 5

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：171. . 968

特徴を決定した方法：E

10

配列

AGTTACTTTC AGGCTCGGGG AGTGAAGGCC TCGTTGAGAG AAGGTCTCAT TCGGTGTTTT 60
 GGGAAGAGAG TCGTGTGGGC CCAGGTATCG TAGCGGCGAC ACGAGAGAGA CGGGCGGTGT 120
 GACAGCCTTC CACTACCTGC ACGAGTGTAT TGGTCTGTCT GCTATCAGCT ATG CCG CTG 179

Met Pro Leu

1

20

CCC GTT GCG CTG CAG ACC CGC TTG GCC AAG AGA GGC ATC CTC AAA CAT 227
 Pro Val Ala Leu Gln Thr Arg Leu Ala Lys Arg Gly Ile Leu Lys His

5

10

15

CTG GAG CCT GAA CCA GAG GAA GAG ATC ATT GCC GAG GAC TAT GAC GAT 275
 Leu Glu Pro Glu Pro Glu Glu Glu Ile Ile Ala Glu Asp Tyr Asp Asp

20

25

30

35

GAT CCT GTG GAC TAC GAG GCC ACC AGG TTG GAG GGC CTA CCA CCA AGC 323
 Asp Pro Val Asp Tyr Glu Ala Thr Arg Leu Glu Gly Leu Pro Pro Ser

30

40

45

50

TGG TAC AAG GTG TTC GAC CCT TCC TGC GGG CTC CCT TAC TAC TGG AAT 371
 Trp Tyr Lys Val Phe Asp Pro Ser Cys Gly Leu Pro Tyr Tyr Trp Asn

55

60

65

GCA GAC ACA GAC CTT GTA TCC TGG CTC TCC CCA CAT GAC CCC AAC TCC 419
 Ala Asp Thr Asp Leu Val Ser Trp Leu Ser Pro His Asp Pro Asn Ser

40

70

75

80

GTG GTT ACC AAA TCG GCC AAG AAG CTC AGA AGC AGT AAT GCA GAT GCT	467	
Val Val Thr Lys Ser Ala Lys Lys Leu Arg Ser Ser Asn Ala Asp Ala		
85 90 95		
GAA GAA AAG TTG GAC CGG AGC CAT GAC AAG TCG GAC AGG GGC CAT GAC	515	
Glu Glu Lys Leu Asp Arg Ser His Asp Lys Ser Asp Arg Gly His Asp		
100 105 110 115		
AAG TCG GAC CGC AGC CAT GAG AAA CTA GAC AGG GGC CAC GAC AAG TCA	563	10
Lys Ser Asp Arg Ser His Glu Lys Leu Asp Arg Gly His Asp Lys Ser		
120 125 130		
GAC CGG GGC CAC GAC AAG TCT GAC AGG GAT CGA GAG CGT GGC TAT GAC	611	
Asp Arg Gly His Asp Lys Ser Asp Arg Asp Arg Glu Arg Gly Tyr Asp		
135 140 145		
AAG GTA GAC AGA GAG AGA GAG CGA GAC AGG GAA CGG GAT CGG GAC CGC	659	20
Lys Val Asp Arg Glu Arg Glu Arg Asp Arg Glu Arg Asp Arg Asp Arg		
150 155 160		
GGG TAT GAC AAG GCA GAC CGG GAA GAG GGC AAA GAA CGG CGC CAC CAT	707	
Gly Tyr Asp Lys Ala Asp Arg Glu Glu Gly Lys Glu Arg Arg His His		
165 170 175		
CGC CGG GAG GAG CTG GCT CCC TAT CCC AAG AGC AAG AAG GCA GTA AGC	755	
Arg Arg Glu Glu Leu Ala Pro Tyr Pro Lys Ser Lys Lys Ala Val Ser		
180 185 190 195		30
CGA AAG GAT GAA GAG TTA GAC CCC ATG GAC CCT AGC TCA TAC TCA GAC	803	
Arg Lys Asp Glu Glu Leu Asp Pro Met Asp Pro Ser Ser Tyr Ser Asp		
200 205 210		
GCC CCC CGG GGC ACG TGG TCA ACA GGA CTC CCC AAG CGG AAT GAG GCC	851	
Ala Pro Arg Gly Thr Trp Ser Thr Gly Leu Pro Lys Arg Asn Glu Ala		
215 220 225		
AAG ACT GGC GCT GAC ACC ACA GCA GCT GGG CCC CTC TTC CAG CAG CGG	899	40
Lys Thr Gly Ala Asp Thr Thr Ala Ala Gly Pro Leu Phe Gln Gln Arg		

230 235 240
CCG TAT CCA TCC CCA GGG GCT GTG CTC CGG GCC AAT GCA GAG GCC TCC 947
Pro Tyr Pro Ser Pro Gly Ala Val Leu Arg Ala Asn Ala Glu Ala Ser

245 250 255
CGA ACC AAG CAG CAG GAT TGAAGCTTCG GCCTCCCTGG CCCTGGGTTA 995
Arg Thr Lys Gln Gln Asp

260 265 10
AAATAAAAGC TTTCTGGTGA TCCTG 1020

配列番号：4

配列の長さ：24

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント 20

起源：

生物名：ホモ＝サピエンス

細胞の種類：子宮頸癌上皮様細胞

セルライン：HeLa-S3

配列

Gly Xaa Arg Ser Thr Ser Ser Thr Lys Ser Gly Lys Phe Met Asn Pro
1 5 10 15 30
Thr Asp Gln Ala Arg Lys Glu Ala
20

フロントページの続き

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 第20回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, 1997年, p.369 2-EH-P-058
竹縄忠臣他編, 験医学別冊バイオマニュアルupシリーズ タンパク質の分子間相互作用実験法
, 株式会社羊土社, 1996年, p.12-14

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/09