

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4302877号
(P4302877)

(45) 発行日 平成21年7月29日(2009.7.29)

(24) 登録日 平成21年5月1日(2009.5.1)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/00
C O 7 K	14/47	(2006.01)	C O 7 K 14/47

請求項の数 40 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-505304 (P2000-505304)
(86) (22) 出願日	平成10年7月29日 (1998.7.29)
(65) 公表番号	特表2001-512019 (P2001-512019A)
(43) 公表日	平成13年8月21日 (2001.8.21)
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/015814
(87) 国際公開番号	W01999/006563
(87) 国際公開日	平成11年2月11日 (1999.2.11)
審査請求日	平成16年9月27日 (2004.9.27)
(31) 優先権主張番号	60/054, 219
(32) 優先日	平成9年7月30日 (1997.7.30)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	60/080, 407
(32) 優先日	平成10年4月2日 (1998.4.2)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	501178433 エモリー・ユニバーシテイ アメリカ合衆国、ジョージア・30322 、アトランタ、サウス・オックスフォード ・ロード・1380
(74) 代理人	100067817 弁理士 倉内 基弘
(74) 代理人	100085774 弁理士 風間 弘志
(72) 発明者	グレッグ ヘアー アメリカ合衆国 30345 ジョージア 、アトランタ、ノースイースト、クライス ラー ドライブ 1887

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な骨鉱化蛋白質、DNA、ベクター及び発現系

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

骨鉱化促進機能を示すヒト蛋白質（以下「ヒトLMP蛋白質」という。）をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子であり、配列番号22又は33を含む単離された核酸分子。

【請求項2】

配列番号34のアミノ酸配列を含むヒトLMP蛋白質（以下「HLMP-1s」という。）をコードする、配列番号33を含む請求項1に記載の核酸分子。

【請求項3】

配列番号10のアミノ酸配列を含むヒトLMP蛋白質（以下「HLMP-1」という。）をコードする、配列番号22を含む請求項1に記載の核酸分子。

【請求項4】

配列番号22又は33を含む単離された核酸分子にコードされるヒトLMP蛋白質。

【請求項5】

配列番号34のアミノ酸配列を含む、請求項4に記載の蛋白質。

【請求項6】

配列番号2を含む単離された核酸分子であり、ラットLMP蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

【請求項7】

配列番号2を含む単離された核酸分子にコードされるラットLMP蛋白質。

10

20

【請求項 8】

請求項 1、2、3 及び 6 のいずれかに記載の単離された核酸分子を包含するベクター。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のベクターを包含する宿主細胞であり、原核細胞、酵母菌及び哺乳類細胞からなる群より選ばれる宿主細胞。

【請求項 10】

更に検出用の標識を包含する、請求項 1、2、3 及び 6 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 11】

骨鉱化を促進するヒト蛋白質（以下「LIM 鉱化蛋白質」という。）であり、配列番号 10 及び配列番号 34 の群より選ばれるアミノ酸配列を含む蛋白質。

10

【請求項 12】

配列番号 1 のアミノ酸配列を含むラット LIM 鉱化蛋白質。

【請求項 13】

配列番号 34 のアミノ酸配列を含むヒト LIM 鉱化蛋白質に特異的に反応するモノクローナル抗体。

【請求項 14】

ヒト LIM 鉱化蛋白質が HLM P - 1（配列番号 10）である、請求項 13 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 15】

ヒト LIM 鉱化蛋白質が HLM P - 1 s（配列番号 34）である、請求項 13 に記載のモノクローナル抗体。

20

【請求項 16】

配列番号 34 のアミノ酸配列を含むヒト LIM 鉱化蛋白質に特異的に反応するポリクローナル抗体。

【請求項 17】

ヒト LIM 鉱化蛋白質が HLM P - 1（配列番号 10）である、請求項 16 に記載のポリクローナル抗体。

【請求項 18】

ヒト LIM 鉱化蛋白質が HLM P - 1 s（配列番号 34）である、請求項 16 に記載のポリクローナル抗体。

30

【請求項 19】

ラット LIM 鉱化蛋白質（配列番号 1）に特異的に反応するモノクローナル抗体。

【請求項 20】

ラット LIM 鉱化蛋白質（配列番号 1）に特異的に反応するポリクローナル抗体。

【請求項 21】

請求項 1、2、3 及び 6 のいずれかに記載の LIM 鉱化蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含む単離した核酸分子でトランスフェクトされた骨形成前駆細胞を含有する骨形成誘発用組成物。

【請求項 22】

単離した核酸分子がベクター内にある、請求項 21 に記載の組成物。

40

【請求項 23】

ベクターが発現ベクターである、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

ベクターがプラスミドである、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 25】

ベクターがウイルスである、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 26】

ウイルスがアデノウイルスである、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

ウイルスがレトロウイルスである、請求項 25 に記載の組成物。

50

【請求項 28】

骨形成前駆細胞がエクスピボでトランスフェクトされる、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 29】

L I M 鈣化蛋白質が H L M P - 1 (配列番号 10) である、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 30】

L I M 鈣化蛋白質が H L M P - 1 s (配列番号 34) である、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 31】

L I M 鈣化蛋白質が骨鈣化促進機能を有し、配列番号 1 を含む蛋白質 (以下「R L M P」という。) である、請求項 21 に記載の組成物。 10

【請求項 32】

請求項 1、2、3 及び 6 のいずれかに記載の L I M 鈣化蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子でトランスフェクトされた骨形成前駆細胞と混合される、脊椎との接触用基質を含有する脊椎固定用組成物であって、L I M 鈣化蛋白質をコードするヌクレオチド配列の発現によって基質中の鈣化骨形成が誘発される組成物。

【請求項 33】

L I M 鈣化蛋白質が、H L M P - 1 (配列番号 10)、H L M P - 1 s (配列番号 34) 及び R L M P (配列番号 1) で表される蛋白質からなる群より選択される、請求項 32 に記載の組成物。 20

【請求項 34】

全身性骨形成が必要な哺乳類宿主中で全身性骨形成を誘発する組成物であり、(a) L I M 鈣化蛋白質をコードするヌクレオチド配列の発現を誘発するのに有効な外因性の制御物質、並びに

(b) 骨形成前駆細胞中で安定的に維持される、請求項 8 記載のベクターでトランスフェクトされた骨形成前駆細胞であり、該ベクターは L I M 鈣化蛋白質をコードするヌクレオチド配列及び、調節可能なプロモーターを含有し、該調節可能なプロモーターは外因性の制御化合物に応答し、L I M 鈣化蛋白質をコードするヌクレオチド配列の発現を制御する細胞、

を含有する組成物。 30

【請求項 35】

L I M 鈣化蛋白質が、H L M P - 1 (配列番号 10)、H L M P - 1 s (配列番号 34) 及び R L M P (配列番号 1) で表される蛋白質からなる群より選択される、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 36】

生理学的条件下で L I M 鈣化蛋白質をコードする mRNA と結合する能力を示すアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有し、L I M 鈣化蛋白質の発現を阻害する組成物であり、上記アンチセンスヌクレオチドが配列番号 35 のヌクレオチド配列を含む組成物。

【請求項 37】

配列番号 22 又は 33 を含む単離された核酸分子であり、ヒト L M P 蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。 40

【請求項 38】

配列番号 22 又は 33 である単離された核酸分子であり、ヒト L M P 蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

【請求項 39】

単離された核酸分子が、プラスミド及びウイルスからなる群より選ばれるベクター内にある、請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 40】

ベクターが、筋肉組織に直接投与されるためのプラスミドである、請求項 39 に記載の 50

組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

1. 発明の分野

本発明は、一般に哺乳類の骨形成原細胞並びに骨及び骨組織の形成に関する。特に本発明は、生体外及び生体内で骨鉱化の効力を促進する新規な蛋白質群及びこれらの蛋白質をコードする核酸に関する。本発明は更に、骨及び骨組織に関する様々な病理状態を処理する方法（例えば脊椎固定術、骨折修復及び骨粗鬆症の処理）を提供する。

2. 背景技術

骨芽細胞は多能性間充織幹細胞から分化すると考えられている。骨芽細胞が成熟すると、骨を鉱化形成する細胞外基質が分泌される。この複雑な過程がどのように制御されているのかはよく理解されていないが、骨形態形成蛋白質（BMP）として知られる信号糖蛋白質群が関与していると考えられている。これらの蛋白質は、胎芽の背側-腹側パターン形成、肢芽発達及び成体動物の骨折修復に関与することが示されている [B. L. Hogan, Genes & Develop. 10:1580 (1996)]。この超科型トランスフォーミング増殖因子分泌性蛋白質群は、分化の異なる段階にある様々な種類の細胞において様々な活性を有するが、これら密接に関連する分子間における生理活性の違いは明らかにされていない [D. M. Kingsley, Trends Genet. 10:16 (1994)]。

【0002】

異なるBMP信号蛋白質それぞれに特異な生理学的役割をよりよく理解するために、ラット頭蓋冠骨芽細胞分化の誘発について、BMP-6の効能と、BMP-2及びBMP-4の効能とを比較した [Boden他, Endocrinology 137:3401 (1996) 参照]。この研究には、分化の開始にBMP又はグルココルチコイドを必要とするラット胎児頭蓋冠の第一継代の培養（二次培養）を用いた。この膜性骨形成のモデルにおいて、グルココルチコイド（GC）又はBMPによって、骨芽細胞特異的蛋白質であるオステオカルシンの分泌が可能な鉱化骨小結節の分化が開始される。この二次培養系は、自然分化を経た一次ラット骨芽細胞培養とは性質が異なる。この二次培養系においては、グルココルチコイドによって、10倍量のBMP-6 mRNA及び蛋白質発現が誘発され、骨芽細胞分化が促進された [Boden他, Endocrinology 138:2920 (1997)]。

【0003】

BMP等の細胞外信号に加えて、細胞内信号又は調節分子が、新しい骨形成を導く一連の事象において役割を担っているようである。細胞内調節分子の主なものにLIM蛋白質があり、LIM領域として知られる特徴的な構造パターンを有するためにそのような呼び名がある。LIM領域は、2-アミノ酸スペーサーによって連結している2個の特異なジンクフィンガーによって構成される、システインに富んだ構造パターンである。LIM領域のみを有する蛋白質もあるが、様々な機能領域を更に有する蛋白質もある。LIM蛋白質は多種存在し、それには転写因子及び細胞骨格蛋白質が含まれる。LIM領域の主要な役割は、LIM領域と同一な又は異なる二量体の形成を通じた、又は特異な蛋白質との結合による、蛋白質-蛋白質間相互作用の媒介であると思われる。

【0004】

LIM同型領域（homeodomain）蛋白質、すなわちLIM領域と同型領域配列を有する蛋白質において、LIM領域は負の調節因子として作用する。LIM同型領域蛋白質は、細胞系統決定の制御や分化の調節に関与しているが、LIMのみの蛋白質も同様の機能を有する。LIMのみの蛋白質は、そのような蛋白質をコードする遺伝子の幾つかが腫瘍染色体転座に関与しているので、細胞増殖の制御にも影響を与えている。

【0005】

ヒト及び他の哺乳類は、骨回復及び/又は再生の過程を必要とする疾患又は負傷をする可

10

20

30

40

50

能性のある動物である。例えば、自然の骨修復機能を刺激することのできる新しい治療法が有れば、骨折の治療は改善され、これによって骨折の治療にかかる時間が短縮される。他には例えば、骨粗鬆症などの全身性の骨疾患にかかった者は、全身にわたって新しい骨を形成する治療法が有れば恩恵を受けることができる。このような治療法によって、この種の疾患に特徴的な多量の骨成分損失に由来する骨折事故を避けることができる。

【 0 0 0 6 】

少なくともこれらの理由から、生体内での新しい骨形成の刺激に用いる目的で、BMP等の細胞外因子が研究されてきた。BMP及び他の細胞外信号分子について研究初期には大きな成果が得られたにもかかわらず、それらの使用には数多くの欠点が存在する。例えば、新しい骨形成には精製BMPの比較的大量な投与が必要であり、従ってそのような治療法には経費がかかる。更に、細胞外蛋白質は、宿主動物に導入されると分解されやすい。加えて、そうした蛋白質はたいていは免疫原となるので、投与した蛋白質に対する免疫応答を刺激する可能性がある。

10

【 0 0 0 7 】

このような事情から、細胞内信号分子を使用して新しい骨形成を誘発する治療法の実現が望まれる。遺伝子治療分野における進歩によって、骨形成過程の一部を構成する細胞内信号をコードする核酸断片を、骨形成前駆細胞（すなわち骨形成に関与する細胞）内に導入することが可能になった。骨形成に遺伝子治療を用いることによって、（１）費用が削減できる；（２）細胞内信号を長期間発現することができるので、細胞外因子を用いた治療法と比較して、より大きな効果が得られる；（３）細胞外信号による治療では信号の受容体数が限られていることで治療が制限されるがそれを回避できる；（４）局所的な骨形成が必要な部位に、トランスフェクトした潜在的骨形成細胞を直接投与することが可能になる；そして（５）全身性の骨形成が可能になり、骨粗鬆症や他の代謝骨疾患に対する治療法を提供することが可能になる、などの数多くの利点が提供される可能性がある。

20

【 0 0 0 8 】

（発明の概要）

本発明は、骨形成にいたる一連の事象の初期に関与する細胞内信号分子を用いた骨形成を誘導する新規な構成と方法を提供することによって、先行技術の欠点を克服することを目的とする。本出願者らは、刺激を加えたラット頭蓋冠骨芽細胞培養から単離したものを元にした配列を有する新規なLIM遺伝子である、10-4/RLMP（配列番号1、配列番号2）を発見した。遺伝子をクローンし、配列決定し、生体外で骨鉱化効果を促進する能力についてアッセイを行った。蛋白質RLMPは骨基質の鉱化に影響を与えただけでなく、細胞の骨芽系統への分化にも影響を与えた。例えば公知の他のサイトカインとは違って、BMPやRLMPは分泌性蛋白質ではないが、細胞内信号分子である。この特徴によって、細胞内信号増幅が提供されるという利点があるだけでなく、トランスフェクトした細胞の評価が容易に行えるという利点もある。これら蛋白質の使用は、より効果的で特異な生体内の用途にも適している。好ましい臨床用途としては、骨折、骨欠損、骨移植回復の促進及び骨粗鬆症の患者における正常な恒常性の促進が挙げられる。

30

【 0 0 0 9 】

本出願者らは更に、ヒト蛋白質（ヒトLMP-1）に相当するアミノ酸配列の遺伝子をクローンし、配列決定し、アミノ酸配列を推定した。ヒト蛋白質によって、生体外及び生体内での骨鉱化効果が促進されることが実証される。

40

【 0 0 1 0 】

加えて、本出願者らは、LMP-1を切断した（短縮した）もの（HLMP-1sと称する）についても特徴付けを行った。この短縮版はcDNAクローン源のひとつにおける点突然変異（蛋白質を短縮する停止コドンを提供する）から得られたものである。短縮版（LMP-1s）は細胞培養内及び生体内で発現された場合十分に機能する。

【 0 0 1 1 】

本発明の更なる特徴及び利点は、下記に説明するが、これらの説明から明らかになるところもあるし、あるいは本発明の実施によって理解されるであろうところもある。本発明の

50

目的及び他の利点は、ここに記載の説明及び請求項で特に指摘する方法及び構成によって実現及び達成される。

【 0 0 1 2 】

一つの特徴にあっては、本発明はあらゆる L I M 鉱化蛋白質をコードする核酸配列を包含する単離核酸分子にして、配列番号 2 5 の全長に相補的な核酸分子に標準条件下でハイブリダイズし、そして配列番号 2 6 の全長に相補的な核酸分子に強度の緊縮条件下でハイブリダイズする核酸分子に関する。特異な特徴にあっては、単離核酸分子は H L M P - 1、H L M P - 1 s 又は R L M P をコードする。加えて、本発明はこれらの核酸分子を包含するベクター、及びベクターを包含する宿主細胞も企図している。他の特異的な特徴にあっては、本発明は蛋白質自体に関する。

10

【 0 0 1 3 】

第二の特徴にあっては、本発明は H L M P - 1、H L M P - 1 s 及び R L M P 等の L I M 鉱化蛋白質に特異的な抗体に関する。一つの特異な特徴にあっては、抗体はポリクローナル抗体である。他の特異な特徴にあっては、抗体はモノクローナル抗体である。

【 0 0 1 4 】

第三の特徴にあっては、本発明は、L I M 鉱化蛋白質をコードするヌクレオチド配列を包含する単離核酸分子によって骨形成前駆細胞のトランスフェクトが行われる、骨形成誘発の方法に関する。一つの特異な特徴にあっては、単離核酸分子はベクター（プラスミド又はアデノウイルスやレトロウイルスなどのウイルス）内にある。トランスフェクションはエクスピボ（ex vivo）又は生体内で単離核酸分子を直接投与することで行われる。トランスフェクトした単離核酸分子は H L M P - 1、H L M P - 1 s 又は R L M P をコードする。

20

【 0 0 1 5 】

更なる特徴にあっては、本発明は、L I M 鉱化蛋白質をコードするヌクレオチド配列を有する単離核酸分子で骨形成前駆細胞をトランスフェクトし、トランスフェクトした骨形成前駆細胞を基質と混合し、そしてその基質を脊椎に接触させることを含む脊椎固定の方法に関する。

【 0 0 1 6 】

更に他の特徴にあっては、本発明は、本発明のベクターで宿主細胞を安定的にトランスフェクトすることによって全身骨形成を誘発する方法に関する。

30

【 0 0 1 7 】

以下の一般的な記述及び詳細な記述は例証及び説明のためのものであり、請求項に記載の発明を更に説明することを企図していることが理解されよう。

【 0 0 1 8 】

略号及び定義

B M P	骨形態形成蛋白質	
H L M P - 1	ヒト L M P - 1。ヒト L I M 蛋白質又は H L M P とも称する。	
H L M P - 1 s	ヒト L M P - 1 短縮（切断）蛋白質	
H L M P U	ヒト L I M 蛋白質ユニーク領域	
L M P	L I M 鉱化蛋白質	40
M E M	最小必要培地	
T r m	トリアムシノロン	
- G l y P	- グリセリンリン酸	
R A C E	c D N A 末端の急速増幅	
R L M P	ラット L I M 鉱化蛋白質。R L M P - 1 とも称する。	
R L M P U	ラット L I M 蛋白質ユニーク領域	
R N A s i n	R N アーゼ阻害剤	
R O B	ラット骨芽細胞	
1 0 - 4	R L M P の c D N A 配列（配列番号 2）を含有するクローン	
U T R	非翻訳領域	50

【 0 0 1 9 】

(発明の詳細な説明)

本発明は、新規な哺乳類 L I M 蛋白質 (以下、L I M 鉱化蛋白質又は L M P と称する) に関する。本発明は特に、H L M P 又は H L M P - 1 として知られるヒト L M P に関する。本出願者らは、これらの蛋白質が生体外で育成される哺乳類細胞内の骨鉱化を促進することを発見した。哺乳類内で産生される場合には、L M P は生体内での骨形成も誘発する。

【 0 0 2 0 】

骨髄細胞、骨形成前駆細胞又は間充織幹細胞を L M P 又は H L M P をコードする核酸でエクスピトランスフェクションし、次いでこのトランスフェクトされた細胞をドナーに移植することは、様々な骨関連疾患又は損傷の治療に適している。例えばこの方法を、長骨骨折修復の増強；体節欠陥部分における骨の形成；骨折治療用の代用骨移植片の提供；腫瘍再建術又は脊椎固定術の促進；及び臀部、椎骨又は手関節の骨粗鬆症などにおける、脆弱化骨又は骨粗鬆症骨の (注射による) 局所的治療の提供に用いることができる。L M P 又は H L M P をコードする核酸を用いたトランスフェクションは、長骨の骨折修復を促進することを目的とする、トランスフェクトした骨髄細胞の経皮注射；長骨骨折における癒合の遅延又は非癒合の治療、あるいは脊椎固定における偽関節の治療；及び臀部又は膝関節の無血管壊死における新しい骨形成の誘発、においても有用である。

【 0 0 2 1 】

遺伝子治療のエクスピボに基づく方法に加えて、L M P 又は H L M P をコードする核酸配列を包含する組替え D N A ベクターによるトランスフェクトを、生体内で行うことができる。L M P 又は H L M P をコードする D N A 断片を適当なウイルスベクター (例えばアデノウイルスベクター) に挿入し、得られるウイルス構造体を軟骨内性骨形成が望まれる体の部位に直接に注射することができる。L M P 又は H L M P 配列を導入する直接的な経皮注射を用いることによって、(エクスピボでトランスフェクトするための) 骨髄細胞の入手や新しい骨形成が必要とされる患者の部位へのそれらの移植を目的とした外科的な処理を行う必要なく、骨形成を刺激することが可能になる。A l d e n 他、Neurosurgical Focus (1 9 9 8) は、アデノウイルスベクター内にクローンした B M P - 2 をコードする c D N A を用いた遺伝子治療における、直接注射法の有用性を実証している。

【 0 0 2 2 】

H L M P をコードする核酸配列を包含する、裸のすなわちカプセル封入されていない組替えプラスミドを、適当な体部位に直接注射する生体内遺伝子治療を実施することが可能である。本発明のこの態様においては、上記したように、裸のプラスミド D N A が適当な標的細胞によって取りこまれる又は内在化させられるとトランスフェクションが起こる。ウイルス構造体を用いた生体内遺伝子治療の場合のように、裸プラスミド D N A を直接注射することによって、外科的処理が殆ど又は全く必要なくなるという利点を得られる。内皮細胞有糸分裂促進剤 V E G F (血管内皮発育因子) をコードする裸プラスミド D N A を用いた直接遺伝子治療は、ヒト患者における効果が実証されている [B a u m g a r t n e r 他、Circulation 9 7 (1 2) : 1 1 1 4 - 2 3 (1 9 9 8)]。

【 0 0 2 3 】

L M P を骨形成原細胞内に導入するのにアデノウイルスベクターを用いることによって、L M P の一時的な発現が可能になる。トランスフェクトされる標的細胞のゲノム内にアデノウイルスが組み込まれないためにこのようなことが起こる。L M P の一時的発現、すなわちトランスフェクトされた標的細胞の寿命間に起こる発現は、本発明の目的を達成するのに十分である。しかし L M P の安定した発現は、標的細胞のゲノムに組み込まれるベクターが導入媒体として用いられた時に可能となる。例えばレトロウイルスに基づくベクターが、この目的に適している。

【 0 0 2 4 】

L M P の安定した発現は、骨粗鬆症や骨形成不全症などの様々な全身性骨関連疾患の治療に特に有用である。本発明のこの態様にあつては、L M P をコードするヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

を標的細胞内に導入するために、標的細胞のゲノム内に組み込まれるベクターを用いることに加え、LMP発現を調節性プロモーターの制御下におく。例えばテトラサイクリン等の外因性誘発剤と接触することによって起動するプロモーターが好ましい。この方法を利用して有効量の外因性誘発剤を投与することによって、全身性の新しい骨形成を刺激することができる。十分量の骨塊が形成されたのち、外因性誘発剤の投与を中止する。この工程は、例えば骨粗鬆症の治療後の経過など、骨塊の損失を補う必要に応じて、繰り返してもよい。

【0025】

HLMPTに特異な抗体は、患者細胞における骨誘発性すなわち骨形成の潜在能力をアッセイする方法に用いるのに特に適している。この方法を用いて、骨回復の進行が遅くなる又は治癒の程度が低くなる可能性のある患者を同定することができる。更に、HLMPT特異的抗体は、骨粗鬆症などの骨変性疾患における危険因子を同定するマーカーアッセイに用いるのに適している。

10

【0026】

公知の及び従来の方法に従い、LMPをコードする核酸断片をクローン及び/又は発現ベクターなどの他の核酸配列に連結することによって、本発明の遺伝子を調製する。これらの組替えベクターを作成し分析するのに必要な方法、例えば制限エンドヌクレアーゼによる消化、クローニングプロトコル、突然変異誘発、オリゴヌクレオチドの有機合成及びDNA配列決定は、公知のものを用いることができる。DNA配列決定には、デオキシターミネーター法を用いるのが好ましい。

20

【0027】

組替えDNA法については多くの論文がある[Sambrook他、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、第2版(1988)、Davis他、Basic Methods in Molecular Biology、Elsevier(1986)、及びAusubel他、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley Interscience(1988)]。これらの参考文献は、ここに参照して説明に代える。

【0028】

DNA又はcDNAのプライマー依存性増幅は、本発明における遺伝子の発現においてよく用いられる工程である。これは一般的にはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって行われる。PCRについては米国特許第4,800,159号(Mullis他)や他の文献に記載がある。PCRの基本原理は、プライマー伸長のサイクルを繰り返すことによるDNA配列の指数関数的複製である。1個のプライマーの伸長産物が、別のプライマーとハイブリダイズすると、他の核酸分子合成用の鋳型となる。プライマー-鋳型複合体はDNAポリメラーゼの基質として作用し、複製を行う際に、プライマーを伸長する。PCRに従来用いられている酵素は、サームス・アクアティクス(Thermusaquaticus)から単離した耐熱性DNAポリメラーゼ、又はTaqDNAポリメラーゼである。

30

【0029】

このPCR法を基本とする様々な改変法が存在するが、本発明の組替えベクターを作成するのに必要な段階は、どのような方法を選択したとしても、当業者によって容易に行うことができる。例えば、10-4/RLMPの細胞発現を測定するために、RNAを抽出して標準的で公知の方法によって逆転写する。得られるcDNAを適当なmRNA配列についてPCRで分析する。

40

【0030】

LIM鉱化蛋白質をコードする遺伝子は、組替え発現系における発現ベクター内で発現される。もちろん、作成される配列は元の配列又はその相補的配列と同じである必要はなく、DNAコードが縮退していても骨形成活性を有するLMPを発現するものであれば、どのような配列であってもよい。保存的アミノ酸置換や、アミノ末端におけるメチオニン残

50

基の出現などの他の改変を、用いることもできる。

【0031】

宿主の発現系において活性を有するリボソーム結合部位を、キメラLMPコード配列の5'末端に連結し、合成遺伝子を作成する。合成遺伝子は、適当に線型化されたプラスミドに連結することによって、様々な発現ベクターのいずれか一つに導入することができる。調節性プロモーター、例えば大腸菌(*E. coli*) lacプロモーターも、キメラコード配列の発現に適している。他に好ましい調節性プロモーターの例としては、trp、tac、recA、T7及びプロモーターが挙げられる。

【0032】

LMPをコードするDNAは、文献にある標準的な手順の一つ、例えばリン酸カルシウム沈殿法、DEAE-デキストラン法、電気穿孔法、又は原形質体融合法によってレシピエント細胞にトランスフェクトされ、安定した形質転換体を形成する。特に下記の態様で実施されるリン酸カルシウム沈殿法が好ましい。

【0033】

細胞内に移転させる前に、Graham及びVan Der、*Virology* 52:456 (1973)の方法に従ってDNAをリン酸カルシウムと共に共沈させる。40~50 µgのDNAの等画分の一つに、担体としてサケ精子又は子牛胸腺DNAを加えたものを、100mmディッシュに植えた 0.5×10^6 細胞に用いる。DNAを0.5mlの2×ヘベス溶液(280mM NaCl、50mMヘベス及び1.5mM Na_2HPO_4 、pH7.0)に混合し、等体積の2× CaCl_2 (250mM CaCl_2 及び10mMヘベス、pH7.0)を添加する。30~40分後に現れた白い顆粒沈殿を、細胞上に均等に滴下し、37°Cで4~16時間保温する。培地を除去し15%グリセロールを含むPBSで3分間、細胞にショックを与える。グリセロールを除去したのち、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコの最小必要培地(DMEM)に細胞を入れる。

【0034】

DEAE-デキストラン法[Kimura他、*Virology* 49:394 (1972)]及びSompayrac他、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7575 (1981)参照];電気穿孔法[Potter、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7161 (1984)参照];及び原形質体融合法[Sandri-Goddin他、*Molec. Cell. Biol.* 1:743 (1981)参照]を用いても、DNAをトランスフェクトすることができる。

【0035】

固相におけるホスホルアミダイト化学法は、オリゴデオキシヌクレオチド及びポリデオキシヌクレオチドを有機合成する方法として好ましい。加えて、他の多くの有機合成法を用いることも可能である。当業者は、本発明の特定の配列についてこれらの方法を容易に適用することが可能である。

【0036】

本発明は更に、標準的な条件下で、本発明のLIM鉱化蛋白質をコードする核酸配列のいずれかにハイブリダイズする核酸分子を含む。「標準的ハイブリダイゼーション条件」はプローブの大きさ、核酸試薬のバックグラウンド及び濃度、並びにハイブリダイゼーションの種類(例えばインサイチュアザンプロット法又はDNA-RNAハイブリッドのハイブリダイゼーション(ノーザンプロット法))に伴って異なる。「標準的ハイブリダイゼーション条件」は当分野の技術レベルの範疇にある。例えばFremeau他の米国特許第5,580,775号、Southern、E.M.、*J. Mol. Biol.* 98:503 (1975)、Alwine他、*Meth. Enzymol.* 68:220 (1979)、及びSambrook他、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 第2版、pp7.19-7.50、Cold Spring Harbor Press (1989)を参照されたい(ここに参照して説明に代える)。

【0037】

10

20

30

40

50

好ましい標準的なハイブリダイゼーション条件のひとつは、50%ホルムアミド、5×SSPE(150nM NaCl、10mM NaH₂PO₄[pH7.4]、1mM EDTA[pH8.0])、5×デンハート溶液(水100g中20mgのフィコール、20mgのポリビニルピロリドン及び20mgのBSAを含む)、10%硫酸デキストラン、1%SDS及び100µg/mlサケ精子DNA中に、42℃で2時間プレハイブリダイズするプロットに関する。³²P標識化cDNAプローブを添加し、ハイブリダイゼーションを14時間続けた。次いで、プロットを2×SSPE、0.1%SDSを用いて22℃で20分にわたる洗浄を2回行い、次いで0.1×SSPE、0.1%SDSを用いて65℃で1時間洗浄した。プロットを乾燥し、増感スクリーンの存在下でX線フィルムに5日間露出した。

10

【0038】

プローブとその標的配列が実質的に同一である場合、「強度の緊縮条件」下で、これらはハイブリダイズする。標準的ハイブリダイズ条件の場合のように、当業者は実質的に同一の配列のみがハイブリダイズする条件を設定することができる。

【0039】

本発明の他の特徴は、核酸配列によってコードされる蛋白質を含有する。更に他の態様においては、本発明は抗LMP抗体を用いたそのような蛋白質の同定に関する。この態様においては、細胞を溶解し蛋白質をSDS-PAGEで分離することによってウエスタンブロット用の蛋白質試料が調製される。蛋白質は電気ブロットによってニトロセルロースに転写される[Ausubel他、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley and Sons(1987)参照]。フィルターを即席脱脂粉乳(100mlPBS中1gm)でブロックしたのち、抗LMP抗体をフィルターに添加して室温で1時間保温する。フィルターをリン酸緩衝食塩水(PBS)で完全に洗浄し、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP) - 抗体複合体と共に室温で1時間保温する。フィルターを再度PBSで完全に洗浄したのち、ジアミノベンジジン(DAB)を添加して抗体バンドを同定する。

20

【0040】

単一特異的抗体を本発明の試薬として用いることができ、特に、LMPの発現に関連した特異的な特徴について患者の細胞を分析するのに用いられる。ここでいう「単一特異的抗体」とは、LMPに対する単一結合特性を有する単抗体種又は複数抗体種のことを言う。ここで言う「単一結合」とは、(例えば上記したようにLMPに関連する)特異な抗原又はエピトープに結合する抗体種の能力のことを言う。LMPに対する単一特異的抗体は、LMPに対して反応性を有する抗体を含む哺乳類抗血清から精製されるか、又はLMPに対して反応性を有するモノクローナル抗体からKohler及びMilstein[Nature256:495-97(1975)]の方法を用いて調製される。LMP特異性抗体は例えばネズミ、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ又はウマなどの動物を、適当な濃度のLMP(及び免疫アジュバント)で免疫化することによって調製することができる。

30

【0041】

この方法においては、前免疫血清を第一の免疫化に先だって採取する。各動物は約0.1~1000mgのLMP(及び望ましい場合には許容される免疫アジュバント)を投与される。このような許容される免疫アジュバントの例としては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、明礬沈殿、コリネバクテリウム・パルバム(Corynebacterium parvum)を含有する油乳濁液の水、及びtRNAアジュバントが挙げられるが、これらに限定されるものではない。初期免疫は、好ましくは、フロイント完全アジュバントに含まれるLMPを、複数部位に皮下注射(SC)、腹腔内注射(IP)のいずれか又はその両方によって導入することを含む。各動物から一定間隔で、好ましくは1週間ごとに採血し、抗体価を測定する。動物は初期免疫化に続いて追加注射を受けてもよいし受けなくてもよい。追加注射を受ける動物は一般に、フロイント不完全アジュバントに含まれる抗体を等量、同じ経路で投与される。追加注射は最大抗体価

40

50

が得られるまで約3週間の間隔で投与される。各追加免疫化から約7日後に、又は1回の免疫化から約1週間ごとに、動物から採血して血清を回収し、画分を約 - 20 で貯蔵する。

【0042】

LMPに対して反応性を有するモノクローナル抗体(mAb)を、近交系マウス、好ましくはBalb/cマウスをLMPで免疫化することによって調製する。マウスは、約0.1~10mg、好ましくは約1mgのLMPを含む約0.5mlの緩衝液又は食塩水と等量の許容されるアジュバントとを混合したものをIP又はSC経路で投与することによって免疫化される(上記参照)。アジュバントとしてはフロイント完全アジュバントが好ましい。ネズミは第0日に初期免疫を受け、約3~30週間静養させる。免疫化ネズミは、約0.1~10mgのLMPを含む緩衝溶液(例えばリン酸緩衝食塩水)を静脈注射(IV)経路で1回以上投与する追加免疫化を受ける。抗体陽性ネズミから得たリンパ球、好ましくは脾臓リンパ球を、当分野で公知の標準法を用いて免疫化ネズミから脾臓を除去することによって得る。脾臓リンパ球と適当な融合相手、好ましくは骨髓腫細胞とを、安定的なハイブリドーマが得られる条件下で混合することによってハイブリドーマ細胞を作成する。融合相手の例としては、マウス骨髓腫P3/NS1/Ag4-1; MPC-11; S-194; 及びSp2/0が挙げられるが、これらに限定されるものではない。このうちSp2/0が好ましい。抗体産生細胞と骨髓腫細胞とは、約30~50%の濃度の、約1000分子量のポリエチレングリコール中で融合される。融合ハイブリドーマ細胞は、公知の方法で補助ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中でヒポキサンチン、チミジン及びアミノプテリンで育成することによって選択する。第14、18及び21日あたりで上澄液を成長が陽性のウェルから回収し、LMPを抗体として用いる固相イムノラジオアッセイ(SPIRA)等のイムノアッセイによって、抗体産生についてのスクリーニングを行う。培養液をオクタロニー沈降アッセイで試験して、mAbのアイソタイプを決定する。抗体陽性ウェルから得たハイブリドーマ細胞は、軟寒天法などによってクローンする[MacPherson, "Soft Agar Techniques", Tissue Culture Methods and Applications, Kruse and Paterson(編)、Academic Press(1973); Harlow他、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory(1988)参照]。

【0043】

モノクローナル抗体は、プリスタン-プライム化Balb/cマウスに、一匹につきプライム化約4日後の約 $2 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ ハイブリドーマ細胞を約0.5ml注射することによって、生体内で産生することもできる。細胞移転の後約8~12日で腹水を回収し、モノクローナル抗体を公知の技術で精製する。

【0044】

約2%のウシ胎児血清を含有するDMEM内でハイブリドーマ細胞系を育成することによって抗LMPmAbの生体外産生を行い、十分量の特異的mAbを得る。mAbを公知の技術で精製する。

【0045】

腹水又はハイブリドーマ培養液の抗体価は、様々な血清学的又は免疫学的アッセイによって決定する。それらの例として沈降法、受動的凝集、固相酵素免疫測定法(ELISA)及びラジオイムノアッセイ(RIA)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。体液又は組織、及び細胞抽出物中のLMPの存在を調べるのに、同様のアッセイが用いられる。

【0046】

上記した単一特異的抗体を産生する方法を、LMPのポリペプチド断片、全長の新生LMPポリペプチド、又はその改変体、あるいはその対立形質に特異な抗体を産生するのに利用できることは、当業者には自明のことであろう。

【0047】

pCMV2/R LMPと称されるベクターに含まれる10-4/R LMP試料(すなわち10-4クローン/R LMPを挿入したpRc/CMV2ベクター)が、1997年7月22日にATCC(American Type Culture Collection、20852メリーランド州ロックビル、パークロンドライブ12301)に寄託されている。培養番号は209153が割り当てられている。HLPM-1sを挿入したpHis-Aベクター試料が1998年3月19日にATCCに寄託されている。培養番号は209698が割り当てられている。ブダベスト条約の取り決め下に扱われるこれらの寄託物は、少なくとも30年間ATCCに保持され、それらを開示する特許の権利賦与のもとに誰もが入手することができる。寄託物が入手しやすいといっても、政府の決定による特許権を軽んじて本発明を実施するライセンスが賦与されたとみなすべきでないことは理解されるべきである。

10

【0048】

本発明の核酸、蛋白質又は抗体の評価において、酵素アッセイ、蛋白質精製及び従来の他の生物化学的方法が用いられる。DNA及びRNAはそれぞれサザンブロット法及びノーザンブロット法によって分析される。通常、分析される試料はゲル電気泳動によって寸法を分別される。ゲル中のDNA又はRNAは、次いでニトロセルロース又はナイロン膜に転写される。ゲル中の試料パターンの複製であるブロットは、プローブとハイブリダイズされる。一般に、プローブは放射性同位元素、好ましくは³²Pで標識付けされるが、当分野で公知の信号発生分子でプローブを標識付けすることもできる。次いで対象とする特異的なバンドを、オートラジオグラフィー等の検出系によって可視化することができる。

20

【0049】

本発明の好ましい態様を例証する目的で、以下に実施例を述べるが、本発明を限定するものではない。これらの結果は本発明のLIM鉱化蛋白質、及びこれらの蛋白質をコードする単離核酸に、骨形成の誘発能又は促進能があることを立証している。

【0050】

実施例1：頭蓋冠細胞培養

ラット骨芽細胞(ROB)としても知られるラット頭蓋冠細胞を、分娩20日前のラットから得た[Boden他、Endocrinology 137(8):3401-07(1996)参照]。一次培養を密集するまで(7日間)培養し、トリプシン処理し、第一継代培養細胞として6ウェルプレート(1×10⁵細胞/35mmウェル)に植えた。第0日に密集状態の継代培養細胞を、更に7日間培養した。第0日に始まって3~4日ごとに層流フードの下で培養基を交換して処理(Trm及び/又はBMP)を行った。標準的な培養プロトコルは以下の通りである。第1~7日、MEM、10%FBS、50µg/mlアスコルビン酸、±刺激；第8~14日、BGJb培養基、10%FBS、(鉱化を可能にする無機磷酸塩源としての)5mM-GlyP。骨小結節形成及びオステオカルシン分泌の終点分析を第14日に行った。研究した全てのBMPについて得た投与応答曲線において範囲中央効果を示した系の試行実験に基づいて、BMP投与量を50ng/mlとした。

30

【0051】

実施例2：アンチセンス処理及び細胞培養

膜性骨形成の間の、LMP-1の潜在的な機能的役割を調べるために、アンチセンスオリゴヌクレオチドを合成してLMP-1mRNA翻訳をブロックし、グルココルチコイドにより誘発され分化しつつある二次骨芽細胞培養を処理した。R LMP発現の阻害を、推定翻訳開始領域に渡る25塩基対に相当する高度に特異的な(公知のラット配列に対して有意な相同性を有さない)アンチセンスオリゴヌクレオチド(配列番号35)を用いて行った。対照培養としてオリゴヌクレオチドを加えないものとセンスオリゴヌクレオチドを加えたものを作成した。リポフェクタミン(Lipofectamine)の存在下(前保温)又は非存在下で実験を行った。以下簡単に述べると、22µgのセンス又はアンチセンスR LMPオリゴヌクレオチドをMEMに室温で45分間保温した。保温に続いて、更にMEMか前保温したリポフェクタミン/MEM(7%v/v；室温で45分保温)のい

40

50

ずれかを添加してオリゴヌクレオチド濃度を $0.2 \mu\text{M}$ とした。得られた混合物を室温で 15 分間保温した。次いでオリゴヌクレオチド混合物を適当な培養基（すなわち MEM / アスコルビン酸塩 / \pm T r m）に混合し、最終オリゴヌクレオチド濃度を $0.1 \mu\text{M}$ とした。

【0052】

細胞を適当なオリゴヌクレオチドの存在下又は非存在下に適当な培地（ \pm 刺激）で保温した。まずリポフェクタミンで保温した培養にリポフェクタミン及びオリゴヌクレオチドのいずれも含まない培養基で 4 時間保温（ 37°C ; $5\% \text{CO}_2$ ）したのち、培地補充した。全ての培養、特にオリゴヌクレオチドを加えた培養について、オリゴヌクレオチドレベルを保持するために 24 時間ごとに培地補充した。

10

【0053】

LMP - 1 アンチセンスオリゴヌクレオチドは、BMP - 6 オリゴヌクレオチドの効果と同様に、投与量に依存する形で、鉱化小結節形成及びオステオカルシン分泌を阻害した。骨芽細胞分化における LMP - 1 アンチセンスブロックは、外因性 BMP - 6 の添加により回復できなかったが、一方 BMP - 6 アンチセンスオリゴヌクレオチド阻害は BMP - 6 の添加により取り消された。この実験では骨芽細胞分化経路において BMP - 6 より LMP - 1 が上流に位置することも確認された。LMP - 1 アンチセンスオリゴヌクレオチドは更に一次ラット骨芽細胞培養において自然な骨芽細胞の分化を阻害した。

【0054】

実施例 3：鉱化骨小結節形成の定量化

実施例 1 及び 2 で調製した ROB の培養を、70% エタノールで一晩定着し、フォンコッサ銀染色で染色した。半自動コンピューター化ビデオイメージ分析システムを用いて、各ウェルの小結節数及び小結節面積の定量化を行った [Endocrinology 137 (8) : 3401 - 07 (1996) 参照]。小結節値あたりの面積を計算するためにこれらの値を割った。この自動化工程の手動測定法に対する有効性は確認されており、0.92 の相関係数 ($p < 0.000001$) が実証されている。全てのデータは、各条件下のウェル 5 ~ 6 個から計算した平均値 \pm 平均値の標準誤差 (S.E.M.) として表現される。各実験は異なる頭蓋冠調製物からの細胞を用いて少なくとも 2 度行われた。

20

【0055】

実施例 4：オステオカルシン分泌の定量化

本発明者らは実験室でラットオステオカルシンの C 末端ノナペプチドに対する単一特異的ポリクローナル抗体 (Pab) を作成した。培養基中のオステオカルシンのレベルを、この抗体を利用した競合ラジオイムノアッセイを用いて測定した [Nanes 他、Endocrinology 127 : 588 (1990) 参照]。以下簡単に述べると、 $1 \mu\text{g}$ のノナペプチドをラクトベルオキシダーゼ法によって $1 \text{mCi } ^{125}\text{I} - \text{Na}$ でヨウ素処理した。200 μl のアッセイ緩衝液 (0.02 M リン酸ナトリウム、1 mM EDTA、0.001% チメロサル、0.025% BSA) を含む試験管に、細胞培養から又はオステオカルシン基準 (0 ~ 12000 fmole) から取った培養基を、アッセイ緩衝液中 100 μl / 試験管の割合で加えた。次いで Pab (1 : 40000 ; 100 μl) を加え、ヨウ素処理したペプチド (12000 cpm ; 100 μl) を加えた。非特異的結合

30

40

【0056】

結合及び遊離 PAb を、700 μl ヤギ抗ウサギ IgG を添加して 4 で 18 時間保温することによって分離した。試料を 1200 rpm で 45 分間遠心分離したのち、上澄を静かに別容器に移して沈殿物を 線計数器で測定した。オステオカルシンの値は fmole / 100 μl の単位で測定し、次いで 100 で割ることによって pmole / ml 培養基 (第三日) の単位に変換した。数値は各条件下のウェル 5 ~ 6 個から 3 回計算した値の平均値 \pm S.E.M. として表現された。各実験は異なる頭蓋冠調製物からの細胞を用いて少なくとも 2 度行われた。

【0057】

50

実施例 5 : T m 及び R L M P が生体外での鉱化に与える効果

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドが、非刺激細胞培養系において骨小結節の形成全般に与える効果は、はっきりしていない。しかし R O B が T m で刺激された場合には、R L M P に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは小結節の鉱化を > 95 % の割合で阻害する。外因性の B M P - 6 をオリゴヌクレオチド処理した培養に添加したところ、R L M P アンチセンス処理した小結節の鉱化は起こらなかった。

【 0 0 5 8 】

今まで長いことオステオカルシンといえば骨鉱化のことを意味し、オステオカルシンのレベルは小結節形成及び鉱化と関連があった。R L M P アンチセンスオリゴヌクレオチドはオステオカルシン産生を有意に減少させるが、アンチセンス処理した培養における小結節の数は有意に変化しない。この場合、外因性の B M P - 6 を添加しても R L M P アンチセンス処理した培養におけるオステオカルシンの産生は 10 ~ 15 % しか回復しなかった。これは R L M P の作用が B M P - 6 の下流で起こり、B M P - 6 よりも特異的であることを示唆している。

【 0 0 5 9 】

実施例 6 : R N A の採取及び精製

2 対の R O B ウェルからの細胞 R N A (実施例 1 及び 2 に従って 6 ウェル培養ディッシュ中に調製) を、4 M グアニジンイソチオシアネート (G I T) 溶液を用いて採取し、統計的に同じものを 3 つ作成した。以下簡単に述べると、培養上澄をウェルから吸引し、2 対ウェルからの採取あたり 0 . 6 m l の G I T 溶液で覆った。G I T 溶液を添加したのち、プレートを 5 ~ 10 秒回転させた (できるだけ均等に覆うようにした) 。さらなる工程を行う前に、試料を - 70 で最大 7 日間まで保存した。

【 0 0 6 0 】

S a m b r o o k 他 [M o l e c u l a r C l o n i n g : a L a b o r a t o r y M a n u a l、第 2 版、7 . 19 章、C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s (1989)] の標準的方法を僅かに改変した方法を用いて R N A を精製した。以下簡単に述べると、解凍した試料に 60 μ l の 2 . 0 M 酢酸ナトリウム (p H 4 . 0)、550 μ l のフェノール (水飽和) 及び 150 μ l のクロロホルム : イソアミルアルコール (49 : 1) を添加した。渦巻攪拌ののち、試料を遠心分離 (10000 \times g ; 20 分 ; 4) にかけて、水性相を別の試験管に移し、600 μ l のイソプロパノールを添加して R N A を - 20 で一晩沈殿させた。

【 0 0 6 1 】

一晩の保温に次いで、試料を遠心分離 (10000 \times g ; 20 分) にかけて、上澄を静かに吸引した。得られたペレットを 400 μ l の D E P C 処理水に再懸濁し、フェノール : クロロホルム (1 : 1) で抽出し、クロロホルム : イソアミルアルコール (24 : 1) で抽出し、40 μ l の酢酸ナトリウム (3 . 0 M ; p H 5 . 2) 及び 1 . 0 m l の無水エタノールを添加したのち - 20 で一晩沈殿させた。細胞 R N A を採取するために、試料を遠心分離 (10000 \times g ; 20 分) にかけて、70 % エタノールで洗浄し、5 ~ 10 分間空気乾燥し、20 μ l の D E P C 処理水に再懸濁した。R N A 濃度は分光光度計を用いて測定した光学濃度から計算した。

【 0 0 6 2 】

実施例 7 : 逆転写 - P C R

加熱した総 R N A (5 μ g を総量 10 . 5 μ l の D E P C - H₂O 中に 65 で 5 分間) を、4 μ l の 5 \times M M L V - R T 緩衝液、2 μ l の d N T P、2 μ l の d T 17 プライマー (10 p m o l / m l)、0 . 5 μ l の R N A s i n (40 U / m l) 及び 1 μ l の M M L V - R T (200 ユニット / μ l) を含む試験管に添加した。試料を 37 で 1 時間保温し、次いで 95 で 5 分保温して M M L V - R T を不活化した。試料に 80 μ l の水を加えて希釈した。

【 0 0 6 3 】

逆転写試料 (5 μ l) を標準法を用いた P C R にかけた (総量 50 μ l) 。以下簡単に述

べると、水、適量のPCR緩衝液(25mM MgCl₂、dNTP、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAP、ハウスキーピング遺伝子)の正方向及び逆方向プライマー及び/又はBMP-6)、³²P-dCTP及びTaqポリメラーゼを含む試験管に試料を添加した。プライマーを22サイクル(94 で30秒; 58 で30秒、72 で20秒)にかけたが、特に注釈しない限りはサイクルを一定して行った。

【0064】

実施例8：ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)及び隣光イメージ分析によるRT-PCR産物の定量

RT-PCR産物に5µl/試験管の量のローディング染料(loading dye)を添加し、混合し、65 で10分加熱し、遠心分離にかけた。10µlの各反応物を標準条件下でPAGE(12%ポリアクリルアミド; 15V/ウェル; 定電流)にかけた。ゲルをゲル保存緩衝液(10%v/vグリセロール、7%v/v酢酸、40%v/vメタノール、43%脱イオン水)内に30分保温し、真空内で80 で1~2時間乾燥し、電子的に画質を向上させた隣光イメージシステムで6~24時間発色させた。可視化されたバンドを分析した。バンドあたりの数をグラフにプロットした。

【0065】

実施例9：ディファレンシャル(differential)ディスプレイPCR

RNAをグルココルチコイド(Trm、1nM)で刺激した細胞から抽出した。加熱してDNアーゼで処理した総RNA(5µgを総量10.5µlのDEPC-H₂O中に65 で5分間)を実施例7で述べたように逆転写した[ただしH-T₁₁M(配列番号4)をMMLV RTプライマーとして用いた]。得られたcDNAを上記したようにPCRで増幅した[ただしH-T₁₁G(配列番号4)、H-AP-10(配列番号5)(GenHunter社、テネシー州ナッシュビル)などの市販の様々なプライマーセットを用いた]。放射性同位元素標識化PCR産物をDNA配列決定ゲル上でゲル電気泳動にかけて分別した。電気泳動の後、得られたゲルを真空下で乾燥し、オートラジオグラフィーで一晩さらした。区別をつけて発現されたcDNAのバンドをゲルから切り出し、Conner他[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:278(1983)]の方法を用いてPCRで再増幅した。PCR再増幅の産物をベクターPCR-II(TAクローニングキット; Invitrogen社、カリフォルニア州カールズバッド)内にクローンした。

【0066】

実施例10：UMR106ラット骨肉腫細胞cDNAライブラリーのスクリーニング

UMR106ライブラリー(2.5×10¹⁰ pfu/ml)を5×10⁴ pfu/mlで寒天平板(LB底寒天)に植え、37 で一晩保温した。濾過膜を平板上に2分間載せた。濾過膜を取り除いて変性させ、洗浄し、乾燥してUV架橋した。次いで濾過膜を前ハイブリダイゼーション緩衝液[2×PIPES(pH6.5)、5%ホルムアミド、1%SDS及び100µg/ml変性サケ精子DNA]内に42 で2時間保温した。260塩基対の放射性同位元素標識化プローブ(配列番号3; ランダムプライミングによる³²P標識化)をハイブリダイゼーション混合物/濾過膜全体に添加し、42 で18時間ハイブリダイズした。膜を室温で1回(10分、1×SSC、0.1%SDS)、55 で3回(15分、0.1×SSC、0.1%SDS)洗浄した。

【0067】

洗浄したのち、膜を上記したようにオートラジオグラフィーで分析した。正のクローンをブランクで精製した。この工程を第二の濾過膜についても4分間行い、見せかけの正のクローンを最小化した。ブランク精製したクローンをSK(-)ファージミド(phagemid)として回収した。クローンcDNAは下記のように配列決定した。

【0068】

実施例11：クローンの配列決定

クローンしたcDNA挿入物を標準法によって配列決定した[Ausubel他、Current Protocols in Molecular Biology、Wile

10

20

30

40

50

y Interscience (1988) 参照]。以下簡単に述べると、適当な濃度の終止混合物、鋳型及び反応混合物を適当なサイクルプロトコル(95、30秒; 68、30秒; 72、60秒; 25回)にかける。配列決定反応を終わらせるために停止混合物を添加する。92で3分間加熱したのち、試料を変性6%ポリアクリルアミド配列決定ゲル(29:1 アクリルアミド:ビスアクリルアミド)に載せる。試料を60ボルト定電流で約4時間電気泳動にかける。電気泳動の後、ゲルを真空下で乾燥してオートラジオグラフィーを行う。

【0069】

オートラジオグラフを手動で分析した。得られた配列を国立バイオテクノロジー情報センター(NIH、メリーランド州ベセスダ、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)で保持されているデータベースについて、デフォルト値でBLASTnプログラムを用いてスクリーンした。配列データに基づいて、新しい配列決定プライマーを調製し、遺伝子全体を配列決定するまで工程を繰り返した。全ての配列を両方向について最低3回確認した。

10

【0070】

ヌクレオチド及びアミノ酸配列もPCGENEソフトウェア(ver.16.0)を用いて分析した。ヌクレオチド配列について相同性のパーセントをNALIGNプログラムによって計算した。計算にはパラメーターとして、非調和(non-matching)ヌクレオチドのウェイト=10; 非調和ギャップのウェイト=10; 考察の対象となるヌクレオチドの最大数=50; 及び考察の対象となるヌクレオチドの最小数=50、を用いた。

20

【0071】

アミノ酸配列については、PALIGNを用いて相同性パーセントを計算した。オープンギャップコスト(open gap cost)及びユニットギャップコスト(unit gap cost)の両方について、値を10とした。

【0072】

実施例12:RLMPcDNAのクローニング

実施例9で述べたディファレンシャルディスプレイPCR増幅産物は、約260塩基対の主要バンドを含んでいた。この配列をラット骨肉腫(UMR106)cDNAライブラリーのスクリーニングに用いた。正のクローンをネスト状プライマー分析にかけ、全長cDNAを増幅するのに必要なプライマー配列を得た(配列番号11、12、29、30及び31)。後の研究のために選んだ正のクローンの一つをクローン10-4と称した。

30

【0073】

クローン10-4の全長cDNAの配列分析は、ネスト状プライマー分析で決定した。その結果、クローン10-4はディファレンシャルディスプレイPCRで同定された元の260塩基対断片を含んでいた。クローン10-4(1696塩基対、配列番号2)は457アミノ酸(配列番号1)を有する蛋白質をコードする1371塩基対の開いた読み枠を含んでいる。終止コドンTGAはヌクレオチド1444~1446に見られる。ヌクレオチド1675~1680のポリアデニレーション信号及びそれに隣接するポリ(A)⁺末端は3'非コード領域に存在する。配列番号1のアミノ酸位置113~116及び257~259にそれぞれAsn-Lys-Thr及びAsn-Arg-Thrという2個の潜在的N-グリコシレーション部位が存在する。2個の潜在的cAMP依存及びcGMP依存蛋白質キナーゼリン酸化部位Ser及びThrがそれぞれアミノ酸位置191及び349に見られた。5個の蛋白質キナーゼCリン酸化部位Ser又はThrがアミノ酸位置3、115、166、219、442に見られた。1個の潜在的ATP/GTP結合部位モチーフA(P-ループ)Gly-Gly-Ser-Asn-Asn-Gly-Lys-Thrがアミノ酸位置272~279に見られた。

40

【0074】

加えて、2個の高度に保存された推定LIM領域がアミノ酸位置341~391及び400~451に見られた。この新たに同定されたラットcDNA中の推定LIM領域は、他

50

に公知のLIM蛋白質のLIM領域とかなりの相同性を示した。しかし、他のラットLIM蛋白質との全体的相同性は25%未満であった。RLMP(10-4とも称する)はヒトエニグマ(enigma)蛋白質(米国特許第5,504,192号参照)と78.5%のアミノ酸相同性を有しているが、最も近いラット同族体CLP-36及びRIT-18に対してそれぞれ僅か24.5%及び22.7%のアミノ酸相同性しか有していない。

【0075】

実施例13：RLMP発現のノーザンブロット分析

実施例1及び2で調製したROBからの30 μ gの総RNAを1%アガロース平面ゲル上のホルムアルデヒドゲル電気泳動にかけて寸法を分別し、ナイロン膜に浸透によりブロット転写した。ブロットに対して、ランダムプライミングで³²P-dCTP標識化した全長10-4cDNAの600塩基対EcoR1断片をプローブとして用いた。

10

【0076】

ノーザンブロット分析の結果、RLMPプローブとハイブリダイズした1.7kbのmRNA種が得られた。RLMPmRNAはBMP-6に24時間さらしたROB中で約3.7倍に増加した。24時間BMP-2又はBMP-4で刺激したROB中ではRLMP発現の増加はみられなかった。

【0077】

実施例14：統計的方法

実験で得られた小結節/オステオカルシンの各結果について、5~6ウェルから得られたデータを用いて平均値 \pm S.E.M.を計算した。各パラメーターの最大値に正規化されたデータでグラフを作成し、小結節の個数、鉱化された領域及びオステオカルシンについて同時にグラフにすることが可能になる。

20

【0078】

RT-PCR、RNアーゼ蛋白質アッセイ又はウエスタンブロット分析の各結果について、代表的な実験の3組用意した試料から得たデータを用いて、平均値 \pm S.E.M.を決定した。グラフを作成することによって、第0日又は負の対照に正規化されたデータが示され、上記対照値を数倍に増加したものとして表現される。

【0079】

統計的有意性はボンフェロニ(Bonferroni)の事後多重比較修正を用いた分散の一方分析を用いて評価した[D.V.Huntsberger "The Analysis of Variance" Elements of Statistical Variance, P.Bilingsley編、pp.298~330、Allyn & Bacon社、マサチューセッツ州ボストン(1977)及びSigmastat、Jandel Scientific社、カリフォルニア州コルテマデラ]。有意性のレベルは $p < 0.05$ として定義した。

30

【0080】

実施例15：ウエスタンブロット分析によるラットLIM鉱化蛋白質の検出

England他、Biochim. Biophys. Acta 623:171(1980)及びTimmer他、J. Biol. Chem. 268:24863(1993)の方法に従って、ポリクローナル抗体を調製した。

40

ヒーラ細胞をpCMV2/RLMPでトランスフェクトした。Hair他、Leukemia Research 20:1(1996)の方法に従って蛋白質をトランスフェクトした細胞から採取した。天然RLMPのウエスタンブロット分析をTowbin他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350(1979)に記載のされているように行った。

【0081】

実施例16：ラットLMPユニーク体(RLMPU)由来ヒトPCR産物の合成 ラットLMP-1cDNAの配列に基づいて、正方向及び逆方向PCRプライマー(配列番号15及び16)を合成し、ユニーク223塩基対の配列をラットLMP-1cDNAからPCR増幅した。同様なPCR産物をヒトMG63骨肉腫細胞cDNAから同じPCRプラ

50

イマーを用いて単離した。

【0082】

T-75 フラスコで培養したMG63 骨肉腫細胞からRNAを採取した。培養上澄を吸引によって除去し、フラスコに対あたり3.0 mlのGITを添加して覆い、5~10秒回転させ、得られた溶液を1.5 ml エッペンドルフ試験管に移した(5本の試験管、0.6 ml/試験管)。Sambrook他[Molecular Cloning: a Laboratory Manual、第7章19ページ、Cold Spring Harbor Press (1989)及びBoden他、Endocrinology 138: 2820-28 (1997)参照]の標準的方法を僅かに改変した方法を用いてRNAを精製した。以下簡単に述べると、0.6 mlの試料に60 µlの2.0 M酢酸ナトリウム(pH 4.0)、550 µlの水飽和フェノール及び150 µlのクロロホルム:イソアミルアルコール(49:1)を添加した。これら試薬を添加したのち、試料を渦巻攪拌し、遠心分離(10000 x g; 20分; 4)にかけ、水性相を別の試験管に移した。600 µlのイソプロパノールを添加してRNAを-20 で一晩沈殿させた。試料を遠心分離(10000 x g; 20分)にかけ、上澄を静かに吸引した。得られたペレットを400 µlのDEPC処理水に再懸濁し、フェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し、クロロホルム:イソアミルアルコール(24:1)で抽出し、40 µlの酢酸ナトリウム(3.0 M; pH 5.2)及び1.0 mlの無水エタノール中、-20 で一晩沈殿させた。試料を遠心分離(10000 x g; 20分)にかけ、70%エタノールで洗浄し、5~10分間空気乾燥し、20 µlのDEPC処理水に再懸濁した。RNA濃度は光学濃度から計算した。

10

20

【0083】

総RNA(総量10.5 µlのDEPC-H₂O中5 µg)を65 で5分間加熱し、4 µlの5 x MMLV-RT緩衝液、2 µlのdNTP、2 µlのdT17プライマー(10 pmol/ml)、0.5 µlのRNAsin(40 U/ml)及び1 µlのMMLV-RT(200ユニット/µl)を含む試験管に添加した。反応物を37 で1時間保温し、次いで95 で5分保温してMMLV-RTを不活化した。試料に80 µlの水を加えて希釈した。

【0084】

転写試料(5 µl)を標準法を用いたPCRにかけた(総量50 µl)[Boden他、Endocrinology 138: 2820-28 (1997); Ausubel他、"Quantitation of rare DNAs by the polymerase chain reaction" Current Protocols in Molecular Biology、第15.31-1章、Wiley and Sons、ニュージャージー州トレントン(1990)参照]。以下簡単に述べると、水、適量のPCR緩衝液[25 mM MgCl₂、dNTP、正方向及び逆方向プライマー(RLMPU用; 配列番号15及び16)]、³²P-dCTP及びDNAポリメラーゼを含む試験管に試料を添加した。プライマーは放射性バンド検出のため一定のサイクルに22回かけ、スクリーニングプローブとして用いるPCR産物を増幅するためにサイクルに33回かけた(94、30秒; 58、30秒; 72、20秒)。

30

40

【0085】

アガロースゲル精製したMG63 骨肉腫由来PCR産物を配列決定した結果、RLMPUのPCR産物と95%以上の相同性があることが判明した。この配列をHLMPユニーク領域(HLMPU; 配列番号6)と称した。

【0086】

実施例17: 逆転写酵素由来MG63 cDNAのスクリーニング

特異的プライマー(配列番号16及び17)を用いたPCRを行って実施例7と同様にスクリーニングを行った。717塩基対のMG63 PCR産物をアガロースゲルで精製して所与のプライマー(配列番号12、15、16、17、18、27及び28)で配列決定した。配列は両方向について最低二回確認した。MG63配列を整列させ全長ラットLM

50

P c D N A 配列に対向させ、ヒト L M P c D N A 部分配列 (配列番号 7) を得た。

【 0 0 8 7 】

実施例 1 8 : ヒト心臓 c D N A ライブラリーのスクリーニング

ノーザンブロット実験の結果に基づいて、L M P - 1 が幾つかの異なる組織 (例えばヒト心筋) において異なるレベルで発現することが判明した。従ってヒト心臓 c D N A ライブラリーを研究した。ライブラリーを 5×10^4 p f u / m l で寒天平板 (L B 底寒天) に植え、37 で一晩保温した。濾過膜を平板上に2分間載せた。濾過膜を取り除いて変性させ、洗浄し、乾燥してUV架橋した。次いで濾過膜を前ハイブリダイゼーション緩衝液 [$2 \times$ P I P E S (p H 6 . 5) 、 5 % ホルムアミド、 1 % S D S 及び $100 \mu g / m l$ 変性サケ精子DNA] 内に42 で2時間保温した。223塩基対のL M Pに特異な放射性同位元素標識化プローブ (配列番号6 ; ランダムプライミングによる³²P標識化) を添加し、42 で18時間ハイブリダイズした。膜を室温で1回 (10分、 $1 \times$ S S C、0 . 1 % S D S) 、55 で3回 (15分、 $0 . 1 \times$ S S C、0 . 1 % S D S) 洗浄した。正のプラーク精製を2回行った心臓ライブラリークローンをオートラジオグラフィーで同定し、市販製品のプロトコルに従ってファージミドとして回収した (S t r a t a g e n e 社、カリフォルニア州ラ・ホーヤ) 。

10

【 0 0 8 8 】

正のクローンを制限酵素消化して様々な寸法のc D N A 挿入配列を得た。600塩基対より長い挿入配列を配列決定により一次スクリーニングについて選択した。これらの挿入配列は、実施例11に述べた標準的方法によって配列決定した。

20

【 0 0 8 9 】

一つのクローン (番号7) を、配列番号11 ~ 14、16及び27に相当するプライマーを用いる自動配列決定分析にかけた。これらの方法によって得た配列は通常97 ~ 100 % の相同性を示した。クローン7 (心臓ライブラリーから得たヒトL M P - 1 部分c D N A ; 配列番号8) は、転写領域においてラットL M P c D N A 配列と87 % 以上の相同性を示した。

【 0 0 9 0 】

実施例 1 9 : 全長 L M P - 1 c D N A の決定

M G 6 3 ヒト骨肉腫細胞c D N A 配列とヒト心臓c D N A クローン7配列のオーバーラップ領域を用いて、これら2つの配列を整列させ、1644塩基対の完全ヒトc D N A 配列を得た。N A L I G N (P C G E N E ソフトウェア中のプログラム) を用いてこれら2つの配列を整列させた。2つの配列のオーバーラップ領域は、M G 6 3 c D N A (配列番号7) のヌクレオチド672における1個のヌクレオチド置換を除いてはクローン番号7 (配列番号8 ; 対応するヌクレオチド516においてGの代わりにAを有する。) と完全な相同性を示す約360塩基対から成り立っていた。

30

【 0 0 9 1 】

「G」置換のM G 6 3 骨肉腫c D N A クローンを使い、S E Q I N (P C G E N E の別のサブプログラム) によって、整列させた2つの配列を連結した。結果として得られる配列を配列番号9に示す。新規なヒト由来配列とラットL M P - 1 c D N A との整列は、N A L I G N によって行った。全長ヒトL M P - 1 c D N A 配列 (配列番号9) はラットL M P - 1 c D N A 配列の翻訳領域と87 . 3 % の相同性を示した。

40

【 0 0 9 2 】

実施例 2 0 : ヒト L M P - 1 のアミノ酸配列の決定

ヒトL M P - 1 推定アミノ酸配列をP C G E N E サブプログラムT R A N S L を用いて決定した。配列番号9の開いた読み枠は457アミノ酸 (配列番号10) を包含する蛋白質をコードする。P C G E N E サブプログラムP a l i g n を用いたところ、ヒトL M P - 1 アミノ酸配列はラットL M P - 1 アミノ酸配列と94 . 1 % の相同性を示すことが判明した。

【 0 0 9 3 】

実施例 2 1 : ヒト L M P c D N A の 5 ' 末端非翻訳領域の決定

50

MG63 5' cDNAを、cDNA末端5'急速増幅(5' RACE)プロトコルに従って、MG63総RNAのネスト状RT-PCRにより増幅した。この方法ではまず3'末端の2個所に変性ヌクレオチドを有するロック-ドッキングオリゴ(dT)プライマーを用いた第一のcDNA鎖合成を行う[Chenchik他、CLONTECHniques X:5(1995); Borson他、PCR Methods Applic. 2:144(1993)]。第二の鎖合成は、Gubler他、Gene 25:263(1983)の方法に従って、大腸菌(*Escherichia coli*)DNAポリメラーゼI、RNAアーゼH、及び大腸菌DNAリガーゼの混合物を用いて行う。プラントエンドをT4DNAポリメラーゼで作成したのち、2重鎖cDNAを断片(5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3') (配列番号19)に連結させた。RACEに先だって、アダプター連結cDNAをマラソンRACE反応に好適な濃度(1:50)に希釈した。アダプター連結2重鎖cDNAについてこれで特異的クローニングを行う準備ができた。

10

【0094】

第1回目のPCRはセンスプライマーとしてのアダプター特異的オリゴヌクレオチド5'-CCATCCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'(AP1)(配列番号20)及び実施例16で述べたユニーク領域(HLMFU)からの遺伝子特異的プライマー(GSP)を用いて行った。第2回目のPCRはネスト状プライマーGSP1-HLMFU(アンチセンス/逆方向プライマー)(配列番号23)及びGSP2-HLMFU(配列番号24)(センス/正方向プライマー、実施例16参照)を用いて行った。PCRは抗体媒介の、しかしそれ以外は標準のホットスタートプロトコルを利用する市販のキット(アドバンテージcDNA PCRコアキット; CloneTech Laboratories社、カリフォルニア州パロアルト)を用いて行った。MG63cDNA用のPCRは、初期加熱開始変性(94、60秒)を行い、次いで94で30秒; 60で30秒; 68で4分; このサイクルを30回繰り返した。第1回のPCR産物は約750塩基対であり、ネスト状PCR産物は約230塩基対であった。第1回PCR産物を線型化したpCR2.1ベクター(3.9Kb)内にクローンした。挿入配列をM13正方向及び逆方向プライマー(配列番号11及び12)の両方を用いて配列決定した。

20

【0095】

実施例22: 5'末端UTRを有する全長ヒトLMP-1cDNAの決定

30

MG63ヒト骨肉腫細胞cDNA5'-UTR配列(配列番号21)、MG63 717塩基対配列(実施例17; 配列番号8)、及びヒト心臓cDNAクローン7配列(実施例18)のオーバーラップ領域を整列させ、1704塩基対の新規なヒトcDNA配列(配列番号22)を得た。整列はNALIGN(PCGENE及びOmiga1.0; Intelligenetics社)を用いて行った。オーバーラップ配列は全717塩基対領域(実施例17)とほぼ100%の相同性を示した。整列配列の結合はSEQINを用いて行った。

【0096】

実施例23: LIM蛋白質発現ベクターの作成

pHIS-5ATG LMP-1s発現ベクターを、実施例17及び18に記した配列を用いて作成した。717塩基対クローン(実施例17; 配列番号7)をClaI及びEcoRVで消化した。小さな断片(~250塩基対)をゲル精製した。クローン7(実施例18; 配列番号8)をClaI及びXbaIで消化し、1400塩基対の断片をゲル精製した。単離した250塩基対及び1400塩基対の制限断片を連結して~1650塩基対の断片を作成した。

40

【0097】

クローン7における1個のヌクレオチド置換(717塩基対PCR配列及び元のラット配列と比較)によって、翻訳塩基対672における停止コドンができた。この停止コドンのため、切断(短縮)蛋白質がコードされることになった(従ってLMP-1sの呼び名がある)。この構造体を発現ベクター(配列番号32)に用いた。5'末端にUTRを有す

50

る全長cDNA(配列番号33)を、配列番号32と5'RACE配列(配列番号21)とを整列させて作成した。LMP-1sのアミノ酸配列(配列番号34)を223アミノ酸蛋白質として推定し、予想される分子量~23.7kDにてウエスタンブロットを(実施例15と同様に)行って確認した。

【0098】

pHis-ATGベクター(InVitrogen社、カリフォルニア州カールズバッド)をEcoRV及びXbaIで消化した。線型化pHis-ATGベクターを取りだし、1650塩基対の制限断片を連結させた。連結産物をクローニングして増幅した。pHis-ATG-LMP-1s発現ベクター(HLMP-1sを挿入したpHIS-Aとも称する)を標準法によって精製した。

10

【0099】

実施例24: LMP発現ベクターを用いた生体外での骨小結節形成及び鉱化の誘発

ラット頭蓋冠細胞を実施例1による2次培養から単離して増殖させた。培養は実施例1で述べたように刺激を加えないか又はグルココルチコイド(GC)で刺激を加えた。Superfect試薬(Qiagen社、カリフォルニア州バレンシア)のトランスフェクションプロトコルを改変したものをを用いて、3µg/ウェルの各ベクターを実施例25の2次ラット頭蓋冠骨芽細胞培養にトランスフェクトした。

【0100】

鉱化した小結節を実施例3に記したようにフォンコッサ染色で可視化した。ヒトLMP-1s遺伝子産物の過剰発現のみが生体外の骨小結節形成(~203小結節/ウェル)を誘発した。小結節のレベルはGCの正の対照によって誘発されるレベル(~412小結節/ウェル)の約50%であった。他の正の対照はpHisA-LMP-Rat発現ベクター(~152小結節/ウェル)及びpCMV2/LMP-Rat-Fwd発現ベクター(~206小結節/ウェル)という結果であった一方、負の対照はpCMV2/LMP-Rat-Rev発現ベクター(~2小結節/ウェル)及び非処理(NT)プレート(~4小結節/ウェル)という結果であった。これらのデータはヒトcDNAが少なくともラットcDNA程度には骨形成刺激を与えることを実証している。効果はGC刺激を行った場合よりも少なかったが、これは発現ベクターの量が最適以下であったためと考えられる。

20

【0101】

実施例25: 生体外及び生体内でLMPにより誘発される細胞分化

クローン10-4中のラットLMPcDNA(実施例12参照)を、NotI及びApaIを用いて37℃で一晩2重消化してベクターから切り出した。ベクターpCMV2MCS(InVitrogen社、カリフォルニア州カールズバッド)を同じ制限酵素で消化した。クローン10-4からの線型cDNA断片及びpCMV2の両方をゲル精製し、抽出し、そしてT4リガーゼで連結した。連結したDNAをゲル精製し、抽出し、大腸菌JM109細胞を形質転換して増幅した。正の寒天コロニーを選択し、NotI及びApaIで消化し、制限消化物をゲル電気泳動で分析した。ストック培養は正のクローンで調製した。

30

【0102】

制限酵素としてXbaI及びHindIIIを用いたことを除いては同様の方法で逆方向ベクターを調製した。これらの制限酵素を用いたことによって、クローン10-4からのLMPcDNA断片がpRc/CMV2内に逆方向(すなわち非翻訳の方向)に挿入された。得られた組替えベクターをpCMV2/RLMPと称した。

40

【0103】

適量のpCMV10-4[60nM(3µg)の最終濃度が最適;この実験では0~600nM/ウェル(0~30µg/ウェル)の最終濃度が好ましい]を最小イーグル培地(MEM)中に再懸濁して450µlの最終体積として10秒間渦巻攪拌した。Superfectを添加(7.5µl/ml最終溶液)して、溶液を10秒間渦巻攪拌し、室温で10分保温した。保温の後、10%FBS(1ml/ウェル;6ml/プレート)を追加したMEMを添加してピペットで混合した。

50

【 0 1 0 4 】

得られた溶液を次いで洗浄されたROB培養にピペットで移した(1ml/ウェル)。培養を5%CO₂を含む加湿雰囲気中、37℃で2時間保温した。それから後、細胞を殺菌PBSで静かに一回洗浄し、適当な正常保温培養基を添加した。

【 0 1 0 5 】

得られた結果は、有意な骨小結節形成がpCMV10-4で誘発したラット細胞培養全てで起こったことを実証している。例えば、pCMV10-4トランスフェクト細胞は429小結節/ウェルを産生した。T_{rm}にさらした正の対照培養は460小結節/ウェルを産生した。これに対し、未処理の負の対照は、1小結節/ウェルを産生した。同様に、培養をpCMV10-4(逆方向)でトランスフェクトした場合、小結節は産生されなかった。

10

【 0 1 0 6 】

生体内での新たな骨形成を実証するために、生後4~5週の正常なラット(mu/+;劣性無胸腺状態に関して異型接合)の後肢から骨髓を吸引した。吸引した骨髓細胞をMEM中で洗浄し、遠心分離にかけ、0.83%NH₄Clを含む10mMトリス(pH7.4)中にペレットを再懸濁してRBCを溶解した。残った骨髓細胞をMEMで3回洗浄し、3×10⁶細胞あたり9μgのpCMV-LMP-1s(正方向又は逆方向)で2時間トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞をMEMで2回洗浄し、3×10⁷細胞/mlの濃度で再懸濁した。

【 0 1 0 7 】

無菌ピペットを用いて細胞懸濁液(100μl)を無菌2×5mmI型ウシコラーゲンディスク(Sulzer Orthopaedics社、コロラド州ホイートリッジ)上に載せた。ディスクは外科手術で生後4~5週の無胸腺症ラット(mu/mu)の頭蓋、胸、胴体又は脊柱に皮下移植した。3~4週目に動物からディスク又は外科処理部位を切りだし、70%エタノールで固定した。固定された試験片はラジオグラフィーによって分析し、ゴールドナトリクロームで染色された5μm厚の部分について非脱石灰処理による組織学的研究を行った。コラーゲンディスクの代わりに失活(グアニジン抽出)鉍物質除去骨基質(Osteotech社、ニュージャージー州シュローズベリー)を用いた実験も行った。

20

【 0 1 0 8 】

ラジオグラフィーによって、LMP-1sでトランスフェクトされた骨髓細胞を含む元のコラーゲンディスクと同じ形態の、高レベルの鉍化骨形成が得られたことが判明した。負の対照(翻訳された蛋白質をコードしない、LMP-1s cDNAが逆方向をむいたものでトランスフェクトした細胞)では鉍化骨形成は観察されず、担体の吸着は進行中のようであった。

30

【 0 1 0 9 】

組織学的研究によって、LMP-1sでトランスフェクトした移植片中で新しい骨柱が骨芽細胞と整列していることが判明した。負の対照中で、担体の部分的再吸収にともなった骨は見られなかった。

【 0 1 1 0 】

18セット(9個の負の対照pCMV-LMP-REV及び9個の実験用pCMV-LMP-1s)の移植片について、無胸腺症のラット複数における腰部脊椎と胸部脊椎との相互移植を更に行った。この実験で得たラジオグラフィーは、脊椎動物間で0/9個の負の対照移植片が骨形成(脊椎固定)を示すことを実証している。pCMV-LMP-1sで処理した移植片は9個ともに、脊椎動物間での固形骨固定を示した。

40

【 0 1 1 1 】

実施例 26 : 実施例 2 及び 3 で説明された配列からの、pHIS-5'ATG LMP-1s 発現ベクターの合成

717塩基対クローン(実施例17)をClaI及びEcoRV(New England Biologicals社、マサチューセッツ州シティー)で消化した。小断片(~

50

250塩基対)をゲル精製した。クローン7(実施例18)をC1aI及びXbaIで消化した。1400塩基対断片をその消化物からゲル精製した。単離した250塩基対及び1400塩基対のcDNA断片を、標準法によって連結し、~1650塩基対の断片を作成した。pHis-Aベクター(InVitrogen社)をEcoRV及びXbaIで消化した。線型化したベクターを回収して1650塩基対のキメラcDNA断片に連結した。連結した産物を標準法によってクローンし増幅した。pHisA-5'ATGLMP-1s発現ベクター(HLMP-1sを挿入したベクターpHis-Aとも称する)を上記したようにATCCに寄託した。

【0112】

実施例27: pHis-5'ATGLMP-1s発現ベクターを用いた、生体外での骨小結節形成及び鉱化の誘発

ラット頭蓋冠細胞を実施例1による2次培養から単離して増殖させた。培養は実施例1で述べたように刺激を加えないか又はグルココルチコイド(GC)で刺激を加えた。組替えpHis-AベクターDNAを3µg/ウェルの量で用いて、実施例25と同様に培養をトランスフェクトした。鉱化した小結節を実施例3に記したようにフォンコッサ染色で可視化した。

【0113】

ヒトLMP-1s遺伝子産物の過剰発現のみ(すなわちGC刺激なし)が生体外の骨小結節形成(~203小結節/ウェル)を誘発した。小結節のレベルはGCの正の対照によって誘発されるレベル(~412小結節/ウェル)の約50%であった。pHisA-LMP-Rat発現ベクターでトランスフェクトした培養(~152小結節/ウェル)及びpCMV2/LMP-Rat-Fwd発現ベクターでトランスフェクトした培養(~206小結節/ウェル)について、同様な結果が得られた。一方、負の対照はpCMV2/LMP-Rat-Rev発現ベクター(~2小結節/ウェル)及び非処理(NT)プレート(~4小結節/ウェル)という結果であった。これらのデータはヒトLMP-1cDNAが少なくともこのモデル系におけるラットLMP-1cDNA程度には骨形成刺激を与えることを実証している。効果はGC刺激を行った場合よりも少なかったが、しかしある場合においては効果が比較可能であった。

【0114】

実施例28: LMPによる可溶性骨形成刺激因子の分泌誘発

実施例24に記したようにラット頭蓋冠骨芽細胞培養におけるRLMP-1又はHLMP-1sの過剰発現は、負の対照において観察された小結節形成より有意に大きな形成を引き起こした。LIM鉱化蛋白質の作用メカニズムを研究するために、調節された培養基を異なる時点で回収し、10倍に濃縮し、無菌濾過し、新鮮な血清を含む培養基中で元の濃度に希釈し、トランスフェクトされていない細胞に4日間適用した。

【0115】

第4日目にRLMP-1又はHLMP-1sでトランスフェクトされた細胞から回収した調節培養基は、トランスフェクトされた細胞中でRLMP-1が直接過剰発現されるのとはほぼ同じくらい、小結節形成の誘発に効果的であった。逆方向のRLMP-1又はHLMP-1でトランスフェクトされた細胞から回収した調節培養基は、小結節形成についてはっきりとした効果を示さなかった。又、第4日以前にLMP-1でトランスフェクトされた培養から得た調節培養基も、小結節形成を誘発しなかった。これらのデータは、LMP-1の発現が可溶性因子の合成及び/又は分泌を引き起こしており、トランスフェクションから4日目までは培養基中に有効量が産生されていなかったことを示唆している。

【0116】

rLMP-1の過剰発現の結果、培養基中へ骨形成刺激因子が分泌されたので、ウエスタンブロット分析を用いてLMP-1蛋白質が培養基中に存在するかどうかを調べた。rLMP-1蛋白質の存在を、LMP-1に特異な抗体(QDPDEE)を用いて評価し、従来法によって検出した。LMP-1蛋白質は培養の細胞層中のみに見られ、培養基中からは検出されなかった。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 7 】

骨形成誘発性可溶因子の部分精製を、25%及び100%硫酸アンモニウムによる標準的希釈と、DE-52陰イオン交換バッチクロマトグラフィー(100mM又は500mM NaCl)によって行った。全ての活性が高濃度の硫酸アンモニウムと高濃度のNaClを用いた画分に観察された。このように偏った結果は、1個の要因が培養基の調節を担っているという可能性に一致する。

【 0 1 1 8 】

ここに引用した全ての文献は、参照して説明に代える。

【 0 1 1 9 】

上記の明細書は、例証を目的とした実施例とともに本発明の原理を教示しているが、本開示を読んだ当業者にとっては、本発明の範囲から離れることなく形態及び詳細において様々な改変が可能であることを理解されるはずである。

【 配列表 】

SEQUENCE LISTING

<110> Hair, Gregory A.
Boden, Scott D.

<120> Novel Bone Mineralization Proteins, DNA, Vectors,
Expression Systems

<130> 06148.0115

<140>

<141>

<150> 60/054,219

<151> 1997-07-30

<150> 60/080,407

<151> 1998-04-02

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 457

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

Met Asp Ser Phe Lys Val Val Leu Glu Gly Pro Ala Pro Trp Gly Phe
1 5 10 15

Arg Leu Gln Gly Gly Lys Asp Phe Asn Val Pro Leu Ser Ile Ser Arg
20 25 30

Leu Thr Pro Gly Gly Lys Ala Ala Gln Ala Gly Val Ala Val Gly Asp
35 40 45

Trp Val Leu Ser Ile Asp Gly Glu Asn Ala Gly Ser Leu Thr His Ile
50 55 60

Glu Ala Gln Asn Lys Ile Arg Ala Cys Gly Glu Arg Leu Ser Leu Gly
65 70 75 80

Leu Ser Arg Ala Gln Pro Ala Gln Ser Lys Pro Gln Lys Ala Leu Thr
85 90 95

Pro Pro Ala Asp Pro Pro Arg Tyr Thr Phe Ala Pro Ser Ala Ser Leu

10

20

30

40

100 105 110

Asn Lys Thr Ala Arg Pro Phe Gly Ala Pro Pro Pro Thr Asp Ser Ala
115 120 125

Leu Ser Gln Asn Gly Gln Leu Leu Arg Gln Leu Val Pro Asp Ala Ser
130 135 140

Lys Gln Arg Leu Met Glu Asn Thr Glu Asp Trp Arg Pro Arg Pro Gly
145 150 155 160

Thr Gly Gln Ser Arg Ser Phe Arg Ile Leu Ala His Leu Thr Gly Thr
165 170 175

Glu Phe Met Gln Asp Pro Asp Glu Glu Phe Met Lys Lys Ser Ser Gln
180 185 190

Val Pro Arg Thr Glu Ala Pro Ala Pro Ala Ser Thr Ile Pro Gln Glu
195 200 205

Ser Trp Pro Gly Pro Thr Thr Pro Ser Pro Thr Ser Arg Pro Pro Trp
210 215 220

Ala Val Asp Pro Ala Phe Ala Glu Arg Tyr Ala Pro Asp Lys Thr Ser
225 230 235 240

Thr Val Leu Thr Arg His Ser Gln Pro Ala Thr Pro Thr Pro Leu Gln
245 250 255

Asn Arg Thr Ser Ile Val Gln Ala Ala Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Asn Asn Gly Lys Thr Pro Val Cys His Gln Cys His Lys Ile
275 280 285

Ile Arg Gly Arg Tyr Leu Val Ala Leu Gly His Ala Tyr His Pro Glu
290 295 300

Glu Phe Val Cys Ser Gln Cys Gly Lys Val Leu Glu Glu Gly Gly Phe
305 310 315 320

Phe Glu Glu Lys Gly Ala Ile Phe Cys Pro Ser Cys Tyr Asp Val Arg
325 330 335

Tyr Ala Pro Ser Cys Ala Lys Cys Lys Lys Lys Ile Thr Gly Glu Ile
340 345 350

Met His Ala Leu Lys Met Thr Trp His Val Pro Cys Phe Thr Cys Ala

10

20

30

355 360 365
Ala Cys Lys Thr Pro Ile Arg Asn Arg Ala Phe Tyr Met Glu Glu Gly
370 375 380
Ala Pro Tyr Cys Glu Arg Asp Tyr Glu Lys Met Phe Gly Thr Lys Cys
385 390 395 400
Arg Gly Cys Asp Phe Lys Ile Asp Ala Gly Asp Arg Phe Leu Glu Ala
405 410 415
Leu Gly Phe Ser Trp His Asp Thr Cys Phe Val Cys Ala Ile Cys Gln
420 425 430
Ile Asn Leu Glu Gly Lys Thr Phe Tyr Ser Lys Lys Asp Lys Pro Leu
435 440 445
Cys Lys Ser His Ala Phe Ser His Val
450 455

10

<210> 2
<211> 1696
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

20

<400> 2
gcacgaggat cccagcgagg ctccctggagg ccgcccaggca gccgcccagc cgggcattca 60
ggagcaggta ccatggattc cttcaaggta gtgctggagg gacctgcccc ttggggcttc 120
cgtctgcaag ggggcaagga cttcaacgtg ccctctcca tctctcggt cactcctgga 180
ggcaaggccg cacaggccgg tgtggccgtg ggagactggg tactgagtat cgacggtgag 240
aacgcccggaa gcctcacaca cattgaagcc cagaacaaga tccgtgcctg tggggagcgc 300
ctcagcctgg gtcttagcag agcccagcct gctcagagca aaccacagaa ggccctgacc 360
cctcccgcgg acccccagag gtacactttt gcaccaagcg cctccctcaa caagacggcc 420
cggcccttcg gggcaccocc acctactgac agcgccctgt cgcagaatgg acagctgctc 480
agacagctgg tccctgatgc cagcaagcag cggctgatgg agaatactga agactggcgc 540
ccgcgccag ggacaggcca gtcccgttcc tcccgcatcc ttgctcacct cacgggcaca 600
gagttcatgc aagaccgga tgaggaatc atgaagaagt caagccaggt gccccaggaca 660
gaagccccag cccagcctc aaccataccc caggaatcct ggccctggccc caccaccccc 720
agccccacca gcgcgccacc ctgggcocta gatcctgcat ttgctgagcg ctatgcccc 780
gacaaaacca gcacagtgt gaccgcacac agccagccag ccacacctac gcctctgcag 840
aaccgcacct ccatagttca ggctgcagct ggagggggca caggaggagg cagcaacaat 900
ggcaagacgc ctgtatgcca ccagtgccac aagatcatcc gcggccgata cctggtagca 960
ctgggcccag cgtaccatcc tgaggaattt gtgtgcagcc agtgtgggaa ggtcctggaa 1020
gagggtggt tcttcgagga gaagggagct atcttttgcc cctcctgcta tgatgtgcgc 1080
tatgcaccca gctgtgocaa atgcaagaag aagatcactg gagagatcat gcatgcgctg 1140
aagatgacct ggcattgtcc ctgcttcacc tgtgcagcct gcaaaacccc tatccgcaac 1200
agggctttct acatggagga gggggctccc tactgcgagc gagattacga gaagatgttt 1260

30

ggcacaaaagt gtcgcggtg tgacttcaag atcgatgccg gggaccgttt cctggaagcc 1320
 ctgggtttca gctggcatga tacgtgtttt gtttgcgcaa tatgtcaaat caacttggaa 1380
 ggaaagacct tctactccaa gaaggacaag cccctgtgca agagccatgc cttttccac 1440
 gtatgagcac ctctcacac tactgccacc ctactctgcc agaagggtga taaaatgaga 1500
 gagctctctc tcctcgacc tttctgggtg gggctggcag ccattgtcct agccttggct 1560
 cctggccaga tcctggggct cctctctcac agtccccctt cccacacttc ctccaccacc 1620
 accaccgtca ctacaggtg ctagctcct agccccagt cactctggtg tcacaataaa 1680
 cctgtatgta gctgtg 1696

<210> 3

<211> 260

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

10

<400> 3

ttctacatgg aggagggggc tcctactgc gagcgagatt acgagaagat gtttggcaca 60
 aagtgtcggg gctgtgactt caagatcgat gccggggacc gtttcctgga agccctgggt 120
 ttcagctggc atgatacgtg ttttgtttgc gcaatatgtc aatcaactt ggaaggaaag 180
 accttctact ccaagaagga caagccccctg tgcaagagcc atgccttttc ccacgtatga 240
 gcacctcttc acactactgc 260

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Differential Display PCR Primer

<400> 4

aagctttttt tttttg 16

<210> 5

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Differential Display PCR Primer

30

<400> 5

aagcttggct atg 13

<210> 6

<211> 223

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 6
 atccttgctc acctcaeggg caccgagttc atgcaagacc cggatgagga gcacctgaag 60
 aaatcaagcc aggtgcccag gacagaagcc ccagcccag cotcatctac accccaggag 120
 ccctggcctg gcctaccgc ccccagccct accagccgc cgcctgggc tgtggacct 180
 gcgtttgccg agcgctatgc ccagacaaa accagcacag tgc 223

<210> 7
 <211> 717
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 atggattcct tcaaggtagt gctggagggg ccagcacctt ggggcttccg gctgcaaggg 60
 gcaaggact tcaatgtgcc cctctccatt tcccggctca ctctggggg caaagcggcg 120
 caggccggag tggccgtggg tgactgggtg ctgagcatcg atggcgagaa tgcgggtagc 180
 ctcacacaca tcaagctca gaacaagatc cgggcctgcg gggagcgcct cagcctgggc 240
 ctcagcaggg ccagccgggt tcagagcaaa ccgcagaag cctccgccc cgccgcggac 300
 cctccgccgt acacotttgc acccagcgtc tccctcaaca agaccggccc gcccttggg 360
 gcgccccgc ccgctgacag cgcgccgcaa cagaatggac agccgctccg accgctggtc 420
 ccagatgcca gcaagcagcg gctgatggag aacacagagg actggcggcc gggccgggg 480
 acagggcagt cgcgttccct ccgcatecct gccacctca caggcaccga gttcatgcaa 540
 gaccgggatg aggagcacct gaagaaatca agccaggtgc ccaggacaga agccccagcc 600
 ccagcctcat ctacaccca ggagccctgg cctggcccta ccgccccag ccctaccagc 660
 cgcgccccct gggctgtgga ccctgcgttt gccgagcgt atgccccgga caaaacg 717

10

<210> 8
 <211> 1488
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<400> 8
 atcgatggcg agaatgcggg tagcctcaca cacatcgaag ctcaagaaca gatccgggccc 60
 tgcggggagc gcctcagcct gggcctcagc agggcccagc cggttcagag caaaccgcag 120
 aaggcctccg cccccccgc ggaccctccg cggtagacct ttgcacccag cgtctccctc 180
 aacaagacgg cccggccctt tggggcgccc ccgcccgcctg acagcgcgcc gcaacagaat 240
 ggacagccgc tccgaccgct ggtcccagat gccagcaagc agcggctgat ggagaacaca 300
 gaggactggc ggccgcggcc ggggacaggg cagtgcggtt ccttccgcat ccttgcccac 360
 ctcacaggca ccgagttcat gcaagcccc gatgaggagc acctgaagaa atcaagccag 420
 gtgcccagga cagaagcccc agccccagcc tcatctacac ccaggagcc ctggcctggc 480
 cctaccgccc ccagccctac cagccgccc ccctgagctg tggaccctgc gtttgccgag 540
 cgctatgccc cggacaaaac gacacagtg ctgaccggc acagccagcc ggccacgccc 600
 acgcccctgc agggccgac ctccattgtg caggcagctg ccggaggggt gccaggagg 660
 ggcagcaaca acggcaagac tcccgtgtgt caccagtgc acaaggtcat ccggggccgc 720
 tacctggtgg cgttgggcca cgcgtaccac ccggaggagt ttgtgtgtag ccagtgtgg 780
 aaggctcctg aagagggtgg cttctttgag gagaagggcg ccattctctg cccaccatgc 840
 tatgacgtgc gctatgcacc cagctgtgcc aagtgcaga agaagattac aggcgagatc 900
 atgcacgccc tgaagatgac ctggcacgtg cactgcttta cctgtgctgc ctgcaagacg 960
 cccatccgga acagggcctt ctacatggag gagggcgtgc cctattgca gcgagactat 1020

30

```

gagaagatgt ttggcacgaa atgccatggc tgtgacttca agatcgacgc tggggaccgc 1080
ttcctggagg ccctgggctt cagctggcat gacacctgct tcgtctgtgc gatatgtcag 1140
atcaacctgg aaggaaagac cttctactcc aagaaggaca ggctctctg caagagccat 1200
gccttctctc atgtgtgagc ccttctgccc cacagctgcc ggggtggccc ctagecctgag 1260
gggcctggag tcgtggccct gcatttctgg gttagggctgg caatggttgc cttaacctg 1320
gtcctctggc cgagcctggg ctcccgggccc cctgcccacc caccttatcc tcccaccca 1380
ctccctccac caccacagca caccgggtgt ggccacacca gccccttcc acctccagt 1440
ccacaataaa cctgtaccca gctgaattcc aaaaaatcca aaaaaaaa 1488

```

```

<210> 9
<211> 1644
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

10

```

<400> 9
atggattcct tcaaggtagt gctggagggg ccagcacctt ggggcttccg gctgcaaggg 60
ggcaaggact tcaatgtgcc cctctccatt tcccggctca ctctgggggg caaagcggcg 120
caggccggag tggccgtggg tgactgggtg ctgagcatcg atggcgagaa tgcgggttagc 180
ctcacacaca tcgaagctca gaacaagatc cgggcctgct gggagcgcct cagcctgggc 240
ctcagcaggg ccagaccggt tcagagcaaa ccgcagaagg cctccgcccc cgccgcggac 300
cctccgcggg acacctttgc acccagcgtc tccctcaaca agaocggccc gcectttggg 360
gcgccccccg ccgctgacag cgcccgcgaa cagaatggac agccgctccg accgctggtc 420
ccagatgcca gcaagcagcg gctgatggag aacacagagg actggcggcc gcggccgggg 480
acaggccagt cgcgttccct ccgcatcctt gccacacctc caggcaaccg gttcatgcaa 540
gaccocgatg aggagcacct gaagaaatca agccaggtgc ccaggacaga agccccagcc 600
ccagcctcat ctacacccca ggagccctgg cctggcccta ccgccccag ccctaccagc 660
cgcccgcctt gggctgtgga ccctgcgttt gccgagcgcct atgccccgga caaaaacgagc 720
acagtgtctg cccggcacag ccagccggcc acgcccacgc cgctgcagag ccgcacctcc 780
atttgtcagg cagctgcccg aggggtgcca ggagggggca gcaacaacgg caagactccc 840
gtgtgtcacc agtgccacaa ggtcatccgg ggccgctacc tggtagcgtt gggccacgcg 900
taccacccgg aggagtttgt gtgtagccag tgtgggaagg tctggaaga gggtagcttc 960
tttgaggaga agggcgccat cttctgccc aatgctatg acgtgcgcta tgcaccagc 1020
tgtgccaaat gcaagaagaa gattacaggc gagatcatgc acgcccctgaa gatgacctgg 1080
cacgtgcact gctttacctg tgctgcctgc aagacgcccc tccggaacag ggccttctac 1140
atggaggagg gcgtgcccta ttgcgagcga gactatgaga agatgtttgg cacgaaatgc 1200
catggctgtg acttcaagat cgacgctggg gaccgcttcc tggagccctt gggcttcagc 1260
tggcatgaca cctgcttctg ctgtgcgata tgtcagatca acctggaagg aaagaccttc 1320
tactccaaga aggacaggcc tctctgcaag agccatgcct tctctcatgt gtgagccct 1380
tctgcccaca gctgcccggg tggcccctag cctgaggggc ctggagtcgt ggccctgcat 1440
ttctgggtag gctggaat gggtgacctt accctggctc ctggcccag cctgggctcc 1500
cgggccctg cccaccacc ttatcctccc acccactcc ctccaccacc acagcacacc 1560
ggtgctggcc acaccagccc ccttccact ccagtgcac aataaacctg taccagctg 1620
aattccaaaa aatccaaaa aaaa 1644

```

20

30

```

<210> 10
<211> 457
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

<400> 10

Met Asp Ser Phe Lys Val Val Leu Glu Gly Pro Ala Pro Trp Gly Phe
1 5 10 15

Arg Leu Gln Gly Gly Lys Asp Phe Asn Val Pro Leu Ser Ile Ser Arg
20 25 30

Leu Thr Pro Gly Gly Lys Ala Ala Gln Ala Gly Val Ala Val Gly Asp
35 40 45

Trp Val Leu Ser Ile Asp Gly Glu Asn Ala Gly Ser Leu Thr His Ile
50 55 60

Glu Ala Gln Asn Lys Ile Arg Ala Cys Gly Glu Arg Leu Ser Leu Gly
65 70 75 80

Leu Ser Arg Ala Gln Pro Val Gln Ser Lys Pro Gln Lys Ala Ser Ala
85 90 95

Pro Ala Ala Asp Pro Pro Arg Tyr Thr Phe Ala Pro Ser Val Ser Leu
100 105 110

Asn Lys Thr Ala Arg Pro Phe Gly Ala Pro Pro Pro Ala Asp Ser Ala
115 120 125

Pro Gln Gln Asn Gly Gln Pro Leu Arg Pro Leu Val Pro Asp Ala Ser
130 135 140

Lys Gln Arg Leu Met Glu Asn Thr Glu Asp Trp Arg Pro Arg Pro Gly
145 150 155 160

Thr Gly Gln Ser Arg Ser Phe Arg Ile Leu Ala His Leu Thr Gly Thr
165 170 175

Glu Phe Met Gln Asp Pro Asp Glu Glu His Leu Lys Lys Ser Ser Gln
180 185 190

Val Pro Arg Thr Glu Ala Pro Ala Pro Ala Ser Ser Thr Pro Gln Glu
195 200 205

Pro Trp Pro Gly Pro Thr Ala Pro Ser Pro Thr Ser Arg Pro Pro Trp
210 215 220

Ala Val Asp Pro Ala Phe Ala Glu Arg Tyr Ala Pro Asp Lys Thr Ser
225 230 235 240

Thr Val Leu Thr Arg His Ser Gln Pro Ala Thr Pro Thr Pro Leu Gln

10

20

30

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

10

20

30

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequencing Primer

<400> 11

gccagggttt tcccagtcac ga

22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequencing Primer

10

<400> 12

gccagggttt tcccagtcac ga

22

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

tcttagcaga gccagcctg ct

22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<400> 14

gcatgaactc tgtgccctg ag

22

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 15

atccttgctc acctcacggg

20

30

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 16

gcactgtgct ggttttgtct gg

22

<210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 catggattcc ttcaaggtag tgc 23

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 10

<400> 18
 gttttgtctg gggcagagcg 20

<210> 19
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sequencing Primer

<400> 19
 ctaatacgcac tcactatagg gctcgcgagcg ccgcccgggc aggt 44 20

<210> 20
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sequencing Primer

<400> 20
 ccatacctaatacgcacgcact atagggc 27

<210> 21
 <211> 765
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 30

<400> 21
 ccgttggttg taaaacgcagc cagagcagcg ccctggcccg gccaaagcagg agccggcacc 60
 atggattcct tcaaggtagt gctggagggg ccagcacctt ggggcttccg gctgcaaggg 120
 ggcaaggact tcaatgtgcc ctctccatt tcccggctca cctctggggg caaggccgtg 180
 caggccggag tggccgtaag tgactgggtg ctgagcatcg atggcgagaa tgcgggtagc 240

```

ctcacacaca tcgaagctca gaacaagatc cgggcctgcg gggagcgcct cagcctgggc 300
ctcaacaggg ccagccgggt tcagaacaaa ccgcaaaaagg cctccgcccc cgcgcgggac 360
cctccgcggt acacctttgc accaagcgtc tcctcaaca agacggcccc gcccttgggg 420
gcgccccccg ccgctgacag cgcgccgag cagaatggac agccgctccg accgctggtc 480
ccagatgcca gcaagcagcg gctgatggag aacacagagg actggcggcc gcggccgggg 540
acaggccagt gcggttcctt tcgcatcctt gctcacctta caggcaccga gttcatgcaa 600
gaccgggatg aggagcacct gaagaaatca agccaggtgc ccaggacaga agccccagcc 660
ccagcctcat ctacacccca ggagccctgg cctggcccta cgcccccag ccctaccagc 720
cgccccccct gggctgtgga ccctgcgttt gccgagcgt atgcc 765

```

```

<210> 22
<211> 1689
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

10

```

<400> 22
cgagcgagag cagcgccctg gccgggcca gacggagccg gcatcatgga ttccttcaag 60
gtagtgtctg agggggccagc accttggggc ttccggctgc aagggggcaa ggacttcaat 120
gtgcccctct ccatttcccg gctcaactct gggggcaaaag cggcgccaggc cggagtggcc 180
gtgggtgact ggggtgctgag catcgatggc gagaatgcmg gtagcctcac acacatcgaa 240
gctcagaaca agatccgggc ctgcmggggag cgcctcagcc tgggcctcag cagggccccag 300
ccggttcaga gcaaaccgca gaaggcctcc gcccccgcg cggaccctcc ggggtacacc 360
tttgacccca gcgtctccct caacaagacg gccccggcct ttggggcgcc cccgcccgct 420
gacagcgccc cgcaacagaa tggacagccg ctccgaccgc tgggtcccaga tgccagcaag 480
cagcggtgta tggagaacac agaggactgg cggcgccggc cggggacagc ccagtccgct 540
tccttccgca tccttgccca cctcacaggc accgagttca tgcaagaccc ggatgaggag 600
cacctgaaga aatcaagcca ggtgcccagg acagaagccc cagccccagc ctcatctaca 660
ccccaggagc cctggcctgg ccctaccgcc ccagcccta ccagccgcc gccctgggct 720
gtggaccctg cgtttgccga gcgctatgcc ccggacaaaa cgagcacagt gctgaccggg 780
cacagccagc cggccaagcc cacgcogctg cagagccgca cctccattgt gcaggcagct 840
gcccgagggg tgccaaggag gggcgcaac aacggcaaga ctcccgtgtg tcaccagtgc 900
cacaaggcca tcccgggccc ctacctggtg gcgttgggcc acgcgtacca cccggaggag 960
tttgtgtgta gccagtggtg gaaggtcctg gaagagggtg gcttctttga ggagaagggc 1020
gccatcttct gccaccatg ctatgacgtg cgctatgcac ccagctgtgc caagtgcag 1080
aagaagatta caggcgagat catgcacgcc ctgaagatga cctggcacgt gcactgcttt 1140
acctgtgctg cctgcaagac gcccatccgg aacagggcct tctacatgga ggagggcgtg 1200
ccctattgcy agcgagacta tgagaagatg tttggcacga aatgcoatgg ctgtgacttc 1260
aagatcgacg ctggggaccg ctctcctggag gccctgggct tcagctggca tgacacctgc 1320
ttcgtctgtg cgatatgtca gatcaacctg gaaggaaaaga ccttctactc caagaaggac 1380
aggcctctct gcaagagcca tgccctctct catgtgtgag ccccttctgc ccacagctgc 1440
cgcgggtggc ctagcctga ggggcctgga gtcgtggccc tgcatttctg ggtagggctg 1500
gcaatggttg ccttaaccct ggctcctggc ccgagcctgg gctcccgggc ccctgcccac 1560
ccaccttacc ctcccccccc actccctcca coaccacagc acaccggtgc tggccacacc 1620
agcccccttt caoctccagt gccacaataa acctgtacco agctgaattc caaaaaatcc 1680
aaaaaaaaa 1689

```

20

30

```

<210> 23
<211> 22

```

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 gcactgtgct cgttttgtcc gg 22

<210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 tcottgctca cctcacgggc a 21 10

<210> 25
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 tcctcatccg ggttttgcac gaactcgggtg 30

<210> 26
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 20

<220>
 <223> Sequencing primer

<400> 26
 gcccccgccc gctgacagcg cccccgaa 28

<210> 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 tcottgctca cctcacgggc accg 24 30

<210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sequencing Primer

<400> 28
gtaatacgcac tcactatagg gc 22

<210> 29
<211> 23
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 29
gcggctgatg gagaatactg aag 23

<210> 30
<211> 23 10
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 30
atcttgtggc actggtggca tac 23

<210> 31
<211> 22
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 31
tgtgtcgggt cagcactgtg ct 22 20

<210> 32
<211> 1620
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 32
atggattcct tcaaggtagt gctggagggg ccagcacctt ggggcttccg gctgcaaggg 60
ggcaaggact tcaatgtgcc cctctccatt tcccggctca ctectggggg caaagcggcg 120
caggccggag tggccgtggg tgactgggtg ctgagcatcg atggcgagaa tgcgggtagc 180
ctcacacaca tcgaagctca gaacaagatc cgggcctgcg gggagcgcct cagcctgggc 240
ctcagcaggg cccagccggt tcagagcaaa ccgcagaagg cctccgcccc cgcgcgggac 300
cctccgcggt acacctttgc acccagcgtc tccctcaaca agaaggcccc gccctttggg 360
gccccccgc ccgctgacag cgcgccgcaa cagaatggac agccgctccg accgctggtc 420 30
ccagatgcc acaagcagcg gctgatggag aacacagagg actggcggcc gcggccgggg 480
acagccagat cgcgttcctt ccgcatcctt gccacctca caggcacca gttcatgcaa 540
gacccggatg aggagcacct gaagaaatca agccaggtgc ccaggacaga agccccagcc 600
ccagcctcat ctacacccca ggagcctggy cctggcccta ccgccccag cctaccagc 660
cgccccctt gagctgtgga ccctgcgttt gccgagcgtc atgccccga caaacgagc 720
acagtgtga cccggcacag ccagccggcc acgcccacgc cgctgcagag ccgcacctc 780
attgtgcagg cagctgccg aggggtgcca ggagggggca gcaacaacgg caagactccc 840

```

gtgtgtcacc agtgccacaa ggcatccgg ggcgctacc tggggcgtt gggccacgcg 900
taccaccocgg aggagtttgt gtgtagccaag tgtgggaagg tccctggaaga gggtaggcttc 960
tttgaggaga agggcgccat cttctgcca ccattgctatg acgtgctgta tgcaccacgc 1020
tgtgccaagt gcaagaagaa gattacaggc gagatcatgc acgccctgaa gatgacctgg 1080
cacgtgcaact gctttacctg tctgctctgc aagacgcca tccggaacag ggccttctac 1140
atggaggagg gcctgccccta ttgcgagcga gactatgaga agatgtttgg cacgaaatgc 1200
catggctgtg acttcaagat cgacgctggg gaccgcttc tggaggccct ggccttcagc 1260
tggcatgaca cctgcttcgt ctgtgcgata tgtcagatca acctggaagg aaagaccttc 1320
tactccaaga aggacagggc tctctgcaag agccatgcct tctctcatgt gtgagccctc 1380
tctgcccaca gctgccgggg tggcccctag cctgaggggc ctggagtcgt ggcctgcat 1440
ttctgggtag ggtggcaat ggttgcctta accctggctc ctggcccag cctgggcttc 1500
cgggccctg cccaccacc ttatcctcc accccactcc ctccaccacc acagcacacc 1560
ggtgctggcc acaccagccc cctttcacct ccagtgccac aataaacctg taccagctg 1620

```

10

```

<210> 33
<211> 1665
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 33
cgacgcagag cagcgcctct gccgggcca gcaggagcgg gcacatgga ttccttcaag 60
gtagtgtctg aggggccaag accttggggc ttccggctgc aagggggcaa ggacttcaat 120
gtgcccctct ccatttccc gctcactcct gggggcaaag cggcgcaggc cggagtggcc 180
gtgggtgact ggggtgtgag catcgatggc gagaatgctg gtagcctcac acacatcga 240
gctcagaaca agatccgggc ctgctggggg cgcctcagcc tgggctcag cagggccccag 300
ccggttcaga gcaaacggca gaaggcctcc gcccccggcg cggaccctcc gcggtacacc 360
tttgacccca gcgtctccct caacaagacg gccccggcct ttggggcgcc cccgcccgtc 420
gacagcggcc cgcaacagaa tggacagcgg ctccgaccgc tgggtcccaga tggcagcaag 480
cagcggctga tggagaacac agaggactgg cggcgcgggc cggggacagg ccagtgcgtc 540
tcctccgca tccttgcca cctcacaggc accgagttca tgcaagacc ggatgaggag 600
cacctgaaga aatcaagcca ggtgcccagg acagaagccc cagcccagc ctcatctaca 660
ccccaggagc cctggcctgg ccctaccgcc cccagcccta ccagccgccc gccctgagct 720
gtggaccctg cgtttgcca gcgctatgcc ccggacaaaa cgagcacagt gctgaccggg 780
cacagccagc cggccaagcc cagcggctg cagagccgca cctccattgt gcaggcagct 840
gccggagggg tgccaggagg gggcagcaac aacggcaaga ctcccgtgtg tcaccagctg 900
cacaaggtea tccggggccc ctacctggtg gcgttggggc acgcttacca cccggaggag 960
tttgtgtgta gccagtgtgg gaaggtcctg gaagaggggt gcttctttga ggagaagggc 1020
gccatcttct gccaccatg ctatgacgtg cgctatgcac ccagctgtgc caagtgcaag 1080
aagaagatta caggcgagat catgcacgcc ctgaagatga cctggcacgt gcactgcttt 1140
acctgtgctg cctgcaagac gcccatccgg aacagggcct tctacatgga ggagggcgtg 1200
ccctattgag agcgagacta tgagaagatg ttggcacga aatgccatgg ctgtgacttc 1260
aagatcgacg ctggggaccg cttcctggag gccctgggct tcagctggca tgacacctgc 1320
ttcgtctgtg cgatatgtca gatcaacctg gaaggaaaga ccttctactc caagaaggac 1380
aggcctctct gcaagagcca tgccctctct catgtgtgag ccccttctgc ccacagctgc 1440
cgcggtggcc cctagcctga ggggctgga gtcgtggccc tgcattctg ggtagggtg 1500
gcaatggttg ccttaacct ggctcctggc ccgagcctgg gctcccgggc cctgcccac 1560
ccaccttacc ctccacccc actcctcca ccaccacagc acaccggtgc tggccacacc 1620
agccccctt cacctccagt gccacaataa acctgtaccc agctg 1665

```

20

30

<210> 34
<211> 223
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Met Asp Ser Phe Lys Val Val Leu Glu Gly Pro Ala Pro Trp Gly Phe
1 5 10 15
Arg Leu Gln Gly Gly Lys Asp Phe Asn Val Pro Leu Ser Ile Ser Arg
20 25 30
Leu Thr Pro Gly Gly Lys Ala Ala Gln Ala Gly Val Ala Val Gly Asp
35 40 45 10
Trp Val Leu Ser Ile Asp Gly Glu Asn Ala Gly Ser Leu Thr His Ile
50 55 60
Glu Ala Gln Asn Lys Ile Arg Ala Cys Gly Glu Arg Leu Ser Leu Gly
65 70 75 80
Leu Ser Arg Ala Gln Pro Val Gln Ser Lys Pro Gln Lys Ala Ser Ala
85 90 95
Pro Ala Ala Asp Pro Pro Arg Tyr Thr Phe Ala Pro Ser Val Ser Leu
100 105 110 20
Asn Lys Thr Ala Arg Pro Phe Gly Ala Pro Pro Pro Ala Asp Ser Ala
115 120 125
Pro Gln Gln Asn Gly Gln Pro Leu Arg Pro Leu Val Pro Asp Ala Ser
130 135 140
Lys Gln Arg Leu Met Glu Asn Thr Glu Asp Trp Arg Pro Arg Pro Gly
145 150 155 160
Thr Gly Gln Ser Arg Ser Phe Arg Ile Leu Ala His Leu Thr Gly Thr
165 170 175
Glu Phe Met Gln Asp Pro Asp Glu Glu His Leu Lys Lys Ser Ser Gln
180 185 190 30
Val Pro Arg Thr Glu Ala Pro Ala Pro Ala Ser Ser Thr Pro Gln Glu
195 200 205
Pro Trp Pro Gly Pro Thr Ala Pro Ser Pro Thr Ser Arg Pro Pro
210 215 220

<210> 35
<211> 25
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 35
gcactacctt gaaggaatcc atggt

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
<i>C 0 7 K</i>	<i>16/18</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 16/18	
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/19</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 1/19	
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 1/21	
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 5/00	B
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i> 21/08	

(72)発明者 スコット ボーデン
 アメリカ合衆国 3 0 3 4 5 ジョージア、アトランタ、ノースイースト、クレイビー ドライブ
 2 8 4 2

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 J.Biol.Chem. , 1 9 9 4 年 , Vol .269, No.40 , p.25085-25090

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)
 C12N 15/00
 PubMed
 BIOSIS/WPIDS(STN)
 SwissProt/PIR/GeneSeq