

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 10 月 27 日 (27.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/100563 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, A61K 38/00, A61P 3/04, 3/10, 21/00, 21/04, 37/02, 43/00, C07K 14/475, 14/51, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/007662
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2005 年 4 月 15 日 (15.04.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-120023 2004 年 4 月 15 日 (15.04.2004) JP
特願2004-355293 2004 年 12 月 8 日 (08.12.2004) JP
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社テクノネットワーク四国 (TECHNO NETWORK SHIKOKU CO., LTD.) [JP/JP]; 〒7600033 香川県高松市丸の内 2 番 5 号 Kagawa (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 土田 邦博 (TSUCHIDA, Kunihiro) [JP/JP]; 〒4580829 愛知県名古屋市長区緑区鎌倉台 2-607 ビアン鎌倉台 302 Aichi (JP). 村上 達也 (MURAKAMI, Tatsuya) [JP/JP]; 〒1350063 東京都江東区有明 3-10-6 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FOLLISTATIN MUTANT POLYPEPTIDE

(54) 発明の名称: フォリスタチン変異体ポリペプチド

(57) Abstract: A follistatin mutant which can specifically inhibit the activity of GDF-8 without inhibiting the activity of activin. The follistatin mutant polypeptide is characterized by (a) containing follistatin domain I, (b) having an amino acid sequence represented by the formula (I): Cys-(X¹)_a-Cys-(X²)_b-Cys-(X³)_c-Cys-(X⁴)_d-Cys-(X⁵)_e-Cys-(X⁶)_f-Cys-(X⁷)_g-Cys-(X⁸)_h-Cys-(X⁹)_i-Cys (wherein X¹, X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷, X⁸, and X⁹ are the same or different and each independently represents a residue of an amino acid present in the nature, other than cysteine; a is an integer of 2-6; b is an integer of 3-7; c is an integer of 7-11; d is an integer of 0-4; e is an integer of 1-6; f and g each is an integer of 8-12; h is an integer of 4-8; and i is an integer of 11-15) and containing no amino acid sequence having 50% or higher homology to the amino acid sequence of sequence number 2 or 29, and (c) inhibiting the activity of GDF-8 more selectively than the activity of activin.

(57) 要約: 本発明の目的は、アクチビンの活性は阻害せずに、GDF-8の活性を特異的に阻害することができるフォリスタチンの変異体を提供することである。本発明によれば、(a) フォリスタチンドメインIを含み (b) 式 (I): Cys-(X¹)_a-Cys-(X²)_b-Cys-(X³)_c-Cys-(X⁴)_d-Cys-(X⁵)_e-Cys-(X⁶)_f-Cys-(X⁷)_g-Cys-(X⁸)_h-Cys-(X⁹)_i-Cys (式中、X¹, X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷, X⁸ および X⁹ は、それぞれ独立して同一または異なる、システイン以外の天然に存在するアミノ酸残基を表し、a は 2~6、b は 3~7、c は 7~11、d は 0~4、e は 1~6、f および g は 8~12、h は 4~8、i は 11~15 の整数をそれぞれ表す。) で表されるアミノ酸配列であって、かつ配列番号 2 または配列番号 29 のアミノ酸配列と 50% 以上の相同性を有する配列を含まず、かつ (c) アクチビンの活性の阻害と比較して、GDF-8 の活性を選択的に阻害する、ことを特徴とするフォリスタチン変異体ポリペプチドが提供される。

WO 2005/100563 A1

明細書

フォリスタチン変異体ポリペプチド

技術分野

本発明は、アクチビンの活性の阻害と比較して、増殖／分化因子－8 (growth/differentiation factor-8、GDF-8) の活性を選択的に阻害するフォリスタチン変異体ポリペプチドに関する。

背景技術

アクチビンは、トランスフォーミング増殖因子 β (transforming growth factor- β 、TGF- β) スーパーファミリーに属し、赤芽球系細胞分化誘導、下垂体からの卵胞刺激ホルモン (FSH) 分泌およびFSHによる黄体形成の促進、神経細胞生存維持作用、インスリン産生促進作用など多機能性の成長・分化因子である。

増殖／分化因子－8 (growth/differentiation factor-8、GDF-8) は、発生中および成体の骨格筋に特異的に発現している、アクチビンサブファミリーに属するTGF- β スーパーファミリーの一員として発見され (ネイチャー (Nature) , (イギリス) , 1997年, 第387巻, 第6628号, p. 83-90) 、ミオスタチン (myostatin) とも呼ばれる。GDF-8は筋体積を負に制御する機能を持ち、GDF-8欠損マウスでは筋体積が野生型マウスの2～3倍に増加する (ネイチャー (Nature) , (イギリス) , 1997年, 第387巻, 第6628号, p. 83-90) 。

フォリスタチンはアクチビン (サイエンス (Science) , (米国) , 1990年, 第247巻, 第4944号, p. 836-838) およびGDF-8 (プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) , (米国) , 200

1 年, 第 9 8 卷, 第 1 6 号, p. 9 3 0 6 – 9 3 1 1) と強く結合 (アクチビンに対する解離定数 $K_d = 540\text{--}680 \text{ pmol/L}$) し、それらの活性を中和する。また、フォリスタチンがインビボにおいてアクチビンおよびGDF-8の様々な生理活性の制御に直接的および間接的に関わっていることを示唆するデータが蓄積されている。フォリスタチンをオスモティックミニポンプによりマウスに連続投与すると、骨髄や脾臓の赤芽球前駆細胞の数が有意に減少し (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), (米国), 1992 年, 第 8 9 卷, 第 5 号, p. 1 5 5 3 – 1 5 5 6)、骨格筋特異的なプロモーター支配下でフォリスタチンを発現するトランスジェニックマウスでは骨格筋量が顕著に増加する (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), (米国), 2001 年, 第 9 8 卷, 第 1 6 号, p. 9 3 0 6 – 9 3 1 1)。

フォリスタチンのアミノ酸配列解析から、N末端側よりN末端ドメイン、フォリスタチンドメインI、フォリスタチンドメインII、フォリスタチンドメインIII という 4 つのドメインからなることが明らかとされている (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), (米国), 1988 年, 第 8 5 卷, 第 1 2 号, p. 4 2 1 8 – 4 2 2 2)。フォリスタチンドメインは、アクチビンやその他の増殖因子との結合に関与すると考えられている。

近年、GDF-8 が様々な疾患に関与することを示唆する報告がなされている。Zimmers らはヌードマウス大腿部に GDF-8 安定発現細胞を移植すると、骨格筋および脂肪の減少という悪液質の症状が誘導されることを示した (Science), (米国), 2002 年, 第 2 9 6 卷, 第 5 5 7 2 号, p. 1 4 8

6-1488)。体重減少を伴う HIV 感染者の筋肉中には、抗 GDF-8 抗体陽性のタンパク質が増加していることも報告されている（プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），（米国），1998年，第95巻，第25号，p. 14938-14943）。デュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデルマウスである mdx マウスと GDF-8 欠損マウスを交配して得られるマウスは、mdx マウスと比較して筋量・筋機能ともに改善していることなども報告されている（アナルズ・オブ・ニューロロジー（Annals of Neurology），（米国），2002年，第52巻，第6号，p. 832-836）。また、GDF-8 欠損マウスでは、骨格筋の増加と共に脂肪量の減少が見られることや、糖尿病モデルマウスにおいて GDF-8 遺伝子を欠損させることにより、脂肪蓄積およびグルコース代謝異常が抑制されることから、肥満や II 型糖尿病の発症や病態悪化への関与も示唆されている（ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション（The Journal of Clinical Investigation），（米国），2002年，第109巻，第5号，p. 595-601）。

以上から、GDF-8の活性を阻害することにより、これらのGDF-8が発症または病態の進行に寄与する疾患の治療を行うことができると考えられ、しかも、副作用軽減のためには、アクチビンの活性を阻害せず、GDF-8の活性を選択的に阻害することが好ましい。GDF-8の活性を阻害する物質としては、フォリスタチン（米国特許出願公開第2002/0157126号明細書、及び特表2002-506044号公報）、抗GDF-8抗体（米国特許第6096506号明細書）、GDF-8プロペプチド（国際公開第02/09641号パンフレット）、ドミナントネガティブGDF-8変異体（国際公開第01/53350号パンフレット、及び国際公開第00/43781号パンフレット）、GDF-8抗原（米国特許第6369201号明細書、国際公開第01/05820号パンフレット、及び国際公開第99/42573号パンフレット）、GDF-8レセプターおよび抗GDF-8レセプター抗体

(国際公開第02/10214号パンフレット)、およびSmad2およびSmad3リン酸化阻害剤(国際公開第02/055077号パンフレット)などが知られている。

発明の開示

本発明は、下垂体FSH分泌、黄体成熟、赤芽球系分化誘導、インスリン分泌などの重要な機能を担っているアクチビンの活性は阻害せずに、悪液質、筋ジストロフィー、肥満およびII型糖尿病の発症およびあるいは病態悪化に寄与していることが示唆されているGDF-8の活性をアクチビンの活性の阻害と比較して選択的に阻害することができるフォリスタチンの変異体を提供することを解決すべき課題とした。

本発明は以下の(1)から(28)に関する。

(1) (a) フォリスタチンドメインIを含み、

(b) 式(I): $Cys - (X^1)_a - Cys - (X^2)_b - Cys - (X^3)_c - Cys - (X^4)_d - Cys - (X^5)_e - Cys - (X^6)_f - Cys - (X^7)_g - Cys - (X^8)_h - Cys - (X^9)_i - Cys$ (式中、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 X^5 、 X^6 、 X^7 、 X^8 および X^9 は、それぞれ独立して同一または異なった、システイン以外の天然に存在するアミノ酸残基を表し、aは2~6、bは3~7、cは7~11、dは0~4、eは1~6、fおよびgは8~12、hは4~8、iは11~15の整数をそれぞれ表す。) で表されるアミノ酸配列であって、かつ配列番号2または配列番号29のアミノ酸配列と50%以上の相同性を有する配列を含まず、かつ

(c) アクチビンの活性の阻害と比較して、GDF-8の活性を選択的に阻害する、ことを特徴とするフォリスタチン変異体ポリペプチド。

(2) フォリスタチンドメインIを含み、フォリスタチンドメインIIを欠失した(1)に記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。

(3) さらにフォリスタチンドメインIIIを含まない、(1)または(2)に

記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。

(4) 2つ以上のフォリスタチンドメインIを含む、(1)から(3)のいずれかに記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。

(5) さらにN末端ドメインを含む、(1)から(4)のいずれかに記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。

(6) FSI、FSI-FSI、FSI-FSI-FSIII、FSN-FSI、FSN-FSI-FSI、又はFSN-FSI-FSI-FSIII (ここでFSIはフォリスタチンドメインIを示し、FSIIIはフォリスタチンドメインIIIを示し、FSNはN末端ドメインを示し、各ドメイン間は直接またはリンカーポリペプチドで連結している) から選択されるいずれかのドメイン構造を含む(1)または(2)に記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。

(7) フォリスタチンドメインIが配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチドである(1)から(6)のいずれかに記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。

(8) 配列番号4の30~166番目のアミノ酸配列を含む、(7)に記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。

(9) フォリスタチンのドメインのアミノ酸配列のN末端またはC末端に他のポリペプチドが融合している、(1)から(8)の何れかに記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。

(10) 配列番号6、8または10のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(11) (1)から(10)のいずれかに記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

(12) 配列番号5、7または9の塩基配列を含む(11)に記載のポリヌクレオチド。

(13) (11)または(12)に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

(14) (13)に記載のベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞。

(15) (14)に記載の形質転換細胞を培地中で培養し、該細胞で発現した(1)から(10)のいずれかに記載のポリペプチドを培地または該細胞中に蓄積させ、培地または該細胞から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

(16) (1)から(10)のいずれかに記載のポリペプチド、(11)または(12)に記載のポリヌクレオチドまたは(13)に記載のベクターを含有するアクチビン阻害剤は阻害しないGDF-8選択的な阻害剤。

(17) (1)から(10)のいずれかに記載のポリペプチド、(11)または(12)に記載のポリヌクレオチドまたは(13)に記載のベクターを含有する医薬組成物。

(18) (1)から(10)のいずれかに記載のポリペプチド、(11)または(12)に記載のポリヌクレオチドまたは(13)に記載のベクターを有効成分として含有する、骨格筋増加剤。

(19) (1)から(10)のいずれかに記載のポリペプチド、(11)または(12)に記載のポリヌクレオチドまたは(13)に記載のベクターを有効成分として含有する、脂肪減少剤。

(20) (1)から(10)のいずれかに記載のポリペプチド、(11)または(12)に記載のポリヌクレオチドまたは(13)に記載のベクターを有効成分として含有する、筋萎縮症状の治療剤または予防剤。

(21) (1)から(10)のいずれかに記載のポリペプチド、(11)または(12)に記載のポリヌクレオチドまたは(13)に記載のベクターを有効成分として含有する、悪液質、筋萎縮を伴う疾患、II型糖尿病、肥満または後天性免疫不全症候群の治療剤または予防剤。

(22) 筋萎縮を伴う疾患が、遺伝性の筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症またはパーキンソン病である(21)に記載の治療剤または予防剤。

(23) (11)または(12)に記載のポリヌクレオチドを含む外来遺伝子

を導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

(24) 非ヒト動物に(1)から(10)のいずれかに記載のポリペプチド、(11)または(12)に記載のポリヌクレオチドまたは(13)に記載のベクターを投与して、該非ヒト動物の筋肉を増加させる方法。

(25) 非ヒト動物に(1)から(10)のいずれかに記載のポリペプチド、(11)または(12)に記載のポリヌクレオチドまたは(13)に記載のベクターを投与して、該非ヒト動物の脂肪を減少させる方法。

(26) レポータープラスミドを有する細胞をアクチビン、GDF-8、アクチビンと被験物質、又はGDF-8と被験物質の存在下で培養し、レポーターアッセイを行うことを含む、被験物質のアクチビンおよびGDF-8機能阻害活性を検定する方法。

(27) レポーターとしてルシフェラーゼを使用する、(26)に記載の方法。

(28) 被験物質として、(a) フォリスタチンドメインIを含み、(b) 式(I): $Cys - (X^1)_a - Cys - (X^2)_b - Cys - (X^3)_c - Cys - (X^4)_d - Cys - (X^5)_e - Cys - (X^6)_f - Cys - (X^7)_g - Cys - (X^8)_h - Cys - (X^9)_i - Cys$ (式中、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 X^5 、 X^6 、 X^7 、 X^8 および X^9 は、それぞれ独立して同一または異なった、システイン以外の天然に存在するアミノ酸残基を表し、aは2~6、bは3~7、cは7~11、dは0~4、eは1~6、fおよびgは8~12、hは4~8、iは11~15の整数をそれぞれ表す。) で表されるアミノ酸配列であって、かつ配列番号2または配列番号29のアミノ酸配列と50%以上の相同性を有する配列を含まないフォリスタチン変異体ポリペプチドを使用する、(26)又は(27)に記載の方法。

図面の簡単な説明

図1はヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ニワトリの各フォ

リスタチンのアミノ酸配列の比較、およびFSIとFSIIのコンセンサス配列を示す。FSN、FSI、FSIIおよびFSIIIの各ドメインに相当する領域を上で、各フォリスタチンドメインで保存されているシステイン残基を点で示した。

図2はプラスミドpGEM-T Easy (A)の造成工程を示す。

図3はプラスミドpGEM-T Easy (B)の造成工程を示す。

図4はプラスミドpBluescript SK (-) (B)の造成工程を示す。

図5はプラスミドpBluescript SK (-) (A+B)の造成工程を示す。

図6はプラスミドpcDNA3 (A+B)の造成工程を示す。

図7はプラスミドpcDNA3 (B)の造成工程を示す。

図8はプラスミドpBluescript SK(-)/FSの造成工程を示す。

図9はプラスミドpBluescript SK(-) (A+B+C)の造成工程を示す。

図10はプラスミドpcDNA3 (A+B+C)の造成工程を示す。

図11はプラスミドpBluescript SK (-) (D)の造成工程を示す。

図12はプラスミドpcDNA3 (A+B+D)の造成工程を示す。

図13はプラスミドpcDNA3 (A+B+D)の造成工程を示す。

図14はマウスフォリスタチンのFSIIとマウスFLRGのFSII様ドメインのアミノ酸配列の比較を示す。一致するアミノ酸は | を示した。

図15はFS1-1のウエスタンブロッティングによる検出を示す。

図16はFS1-1のアクチビンおよびGDF-8の活性の阻害を測定するレポーターアッセイの結果を示す。

図17は各種フォリスタチン変異体のアクチビンの活性の阻害を測定するレポーターアッセイの結果を示す。+で示したポリペプチドをそれぞれ添加した。

図18は各種フォリスタチン変異体のGDF-8の活性の阻害を測定するレポーターアッセイの結果を示す。+で示したポリペプチドをそれぞれ添加した。

図19はFS1-1遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの各種骨格筋の量の増大を示す。

図20はFS1-1遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの、体重に対する

皮下脂肪および腎臓の内臓脂肪それぞれの重量の割合の減少を示す。

図 2 1 はFS1-FcのアクチビンおよびGDF-8の活性の阻害を測定するレポーターアッセイの結果を示す。

図 2 2 はFS1-1-FcのアクチビンおよびGDF-8の活性の阻害を測定するレポーターアッセイの結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

1. 本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチド

本発明における変異体を作製する場合の、元になるフォリスタチンはどの動物種のものでよいが、哺乳類または鳥類のフォリスタチン、例えばヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ニワトリ等のフォリスタチンが好ましく、特にヒトフォリスタチンが好ましい。また、mRNAのスプライシングの違いあるいは翻訳後のプロセッシングにより、C末端のアミノ酸配列が異なる分子があるが、どれでもよい。具体的には、配列番号 4 の30～344番目のアミノ酸配列からなるヒトフォリスタチン、NCBIの蛋白質データベース登録番号P47931のアミノ酸配列の30～344番目の配列からなるマウスフォリスタチン、NCBIの蛋白質データベース登録番号NP_032072のアミノ酸配列の30～343番目の配列からなるマウスフォリスタチン、NCBIの蛋白質データベース登録番号P21674のアミノ酸配列の30～344番目の配列からなるラットフォリスタチン、NCBIの蛋白質データベース登録番号P50291のアミノ酸配列の30～344番目の配列からなるウシフォリスタチン、NCBIの蛋白質データベース登録番号P10669のアミノ酸配列の30～344番目の配列からなるブタフォリスタチン、NCBIの蛋白質データベース登録番号P31514のアミノ酸配列の30～344番目の配列からなるヒツジフォリスタチン、NCBIの蛋白質データベース登録番号062650のアミノ酸配列の30～344番目の配列からなるウマフォリスタチン、NCBIの蛋白質データベース登録番号NP_990531のアミノ酸配列の29～343番目の配列からなるニワトリフォリスタチン、これらのフォリスタチンのC末端の27アミノ酸または12アミノ酸が欠失した配列からなるポリペプチド、

また、天然に存在する、これらのポリペプチドの遺伝子のアレル変異や1塩基多型の遺伝子がコードするポリペプチドがあげられる。

本発明において、フォリスタチンドメインは、フォリスタチン内に3回繰り返される、保存された10個のシステインを含む、 $\text{Cys}-(\text{Xaa})_4-\text{Cys}-(\text{Xaa})_5-\text{Cys}-(\text{Xaa})_{9-10}-\text{Cys}-(\text{Xaa})_{1-2}-\text{Cys}-(\text{Xaa})_3-\text{Cys}-(\text{Xaa})_{9-10}-\text{Cys}-(\text{Xaa})_{10}-\text{Cys}-(\text{Xaa})_6-\text{Cys}-(\text{Xaa})_{13}-\text{Cys}$ で示される約70アミノ酸の配列（Xaaは任意のアミノ酸配列を表す）からなる領域をいい、N末端側から、それぞれ、フォリスタチンドメインI（以下、FSIと略す）、フォリスタチンドメインII（以下、FSIIと略す）およびフォリスタチンドメインIII（以下、FSIIIと略す）という。例えば、配列番号4で表されるヒトフォリスタチン前駆体のアミノ酸配列（当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号3に示す）において、95～164番目の領域がFSI、168～239番目の領域がFSII、245～316番目の領域がFSIIIとなる。また、N末端ドメイン（以下、FSNと略す）は、フォリスタチンのN末端からFSIまでの領域をいい、例えば、配列番号4で表されるヒトフォリスタチン前駆体のアミノ酸配列において、30～94番目の領域をいう。図1にヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ニワトリの各フォリスタチンのアミノ酸配列とFSN、FSI、FSII、FSIIIの各ドメインの位置、FSIおよびFSIIのコンセンサス配列を示した。

本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドは、アクチビンの活性の阻害と比較してGDF-8の活性を選択的に阻害するフォリスタチン変異体ポリペプチドであり、FSIを含み、式（I）： $\text{Cys}-(\text{X}^1)_a-\text{Cys}-(\text{X}^2)_b-\text{Cys}-(\text{X}^3)_c-\text{Cys}-(\text{X}^4)_d-\text{Cys}-(\text{X}^5)_e-\text{Cys}-(\text{X}^6)_f-\text{Cys}-(\text{X}^7)_g-\text{Cys}-(\text{X}^8)_h-\text{Cys}-(\text{X}^9)_i-\text{Cys}$ （式中、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 X^5 、 X^6 、 X^7 、 X^8 および X^9 は、それぞれ独立して同一または異なった、システイン以外の天然に存在するアミノ酸残基を表し、aは2～6、bは3～7、cは7～11、dは0～4、eは1～6、fおよびgは8～12、hは4～8、iは11～15の整数をそれぞれ表す。）で表されるアミノ酸配列であって、かつ配列番号2または配列番号29のアミノ酸配列と50%以上、好ま

しくは60%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有する配列（以下、FSII相同配列とよぶ）を含まない配列であることを特徴とする。ここで、「システイン以外の天然に存在するアミノ酸残基」とは、アスパラギン、アスパラギン酸、アラニン、アルギニン、イソロイシン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、バリン、フェニルアラニン、プロリン、メチオニン、リジンおよびロイシンのいずれかのアミノ酸残基を意味する。配列番号2のアミノ酸配列は、各哺乳類およびニワトリのフォリスタチンのFSIIのコンセンサスなアミノ酸配列である。配列番号29のアミノ酸配列は、マウスのフォリスタチン関連遺伝子（follistatin related gene、FLRG）がコードするFLRGタンパク質の、2つあるフォリスタチンドメイン様の配列の2番目のフォリスタチンドメイン様の配列であり、配列番号2の配列と61%の相同性を有する。FSII相同配列には配列番号2のアミノ酸配列、配列番号29のアミノ酸配列も含まれる。FSII相同配列としては、例えば、上記式（I）で表されるアミノ酸配列において、 $(X^1)_a$ が配列番号2の2～5位のアミノ酸配列または配列番号29の2～5位のアミノ酸配列、 $(X^2)_b$ が配列番号2の7～11位のアミノ酸配列または配列番号29の7～11位のアミノ酸配列、 $(X^3)_c$ が配列番号2の13～21位のアミノ酸配列または配列番号29の13～21位のアミノ酸配列、 $(X^4)_d$ が配列番号2の23～24位のアミノ酸配列または配列番号29の23～24位のアミノ酸配列、 $(X^5)_e$ が配列番号2の26～28位のアミノ酸配列または配列番号29の26～29位のアミノ酸配列、 $(X^6)_f$ が配列番号2の30～39位のアミノ酸配列または配列番号29の31～40位のアミノ酸配列、 $(X^7)_g$ が配列番号2の41～50位のアミノ酸配列または配列番号29の42～51位のアミノ酸配列、 $(X^8)_h$ が配列番号2の52～57位のアミノ酸配列または配列番号29の53～58位のアミノ酸配列、 $(X^9)_i$ が配列番号2の59～71位のアミノ酸配列または配列番号29の60～72位のアミノ酸配列である配列があげられる。

FSII相同配列を含まない配列であるフォリスタチン変異体としては、例えば、FSII全体を欠失させた変異体、FSIIの1つ以上のシステイン残基を含む一部の領域を欠失させた変異体、FSIIの1つ以上のシステイン残基を欠失または他のアミノ酸に置換した変異体、FSIIの内部に、FSII相同配列を含まない10アミノ酸以上のアミノ酸配列を挿入した変異体などがあげられる。FSIを含み、FSII相同配列を含まない配列であれば、FSIおよびFSII以外の領域のアミノ酸配列については、アミノ酸の欠失、付加、置換の位置、数は限定されない。アミノ酸の変異（即ち、アミノ酸の欠失、付加または置換）の数は好ましくは1～50個であり、より好ましくは1～30個であり、さらに好ましくは1～20個であり、さらに好ましくは1～10個であり、特に好ましくは1～5個である。また、フォリスタチン変異体ポリペプチドが、アクチビンの活性の阻害と比較して、GDF-8の活性を選択的に阻害することができる限りは、FSIのアミノ酸配列においても、アミノ酸の欠失、付加または置換が存在してもよい。このようなFSIのアミノ酸配列におけるアミノ酸の変異の数は好ましくは1～10個であり、より好ましくは1～8個であり、さらに好ましくは1～5個である。本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドとしては、さらにFSIIIも欠失していることが好ましい。また、FSIの数は1つでもよいが、2つ以上含むことが好ましい。また、FSNを含んでもよい。

本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドとしては、FSI、FSI-FSI、FSI-FSI-FSIII、FSN-FSI、FSN-FSI-FSI、FSN-FSI-FSI-FSIII等のドメイン構造のポリペプチド、これらのポリペプチドのN末端またはC末端に他のポリペプチドを融合させたポリペプチドがあげられる。各ドメイン間は直接または1～50個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個のアミノ酸からなるリンカーポリペプチドでつながれる。リンカーポリペプチドのアミノ酸配列は、システインを含まなければいかなる配列でもよい。N末端またはC末端に融合させるポリペプチドの配列は、上記のFSII相同配列を含まなければ、いかなる配列でもよく、1アミノ酸でもよい。N末端またはC末端に融合させるポリペプチドとして

は、イムノグロブリンの定常領域、プロテインA、プロテインG、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、マルトース結合蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、チオレドキシン、ポリヒスチジン、Sペプチド、FLAGペプチド、HAエピトープペプチド、mycエピトープペプチドなどをあげることができる。

FSIの配列としては、配列番号4の95～164番目のアミノ酸配列、および各哺乳類およびニワトリのフォリスタチンのFSIのコンセンサス配列である配列番号1のアミノ酸配列をあげることができる。FSIIの配列としては、配列番号4の168～239番目のアミノ酸配列、および各哺乳類およびニワトリのフォリスタチンのFSIIのコンセンサス配列である配列番号2のアミノ酸配列をあげることができる。FSNの配列としては、例えば配列番号4の1～94番目のアミノ酸配列をあげることができる。FSIIIの配列としては、例えば配列番号4の245～316番目のアミノ酸配列をあげることができる。

本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドの具体例としては、配列番号6、8または10のアミノ酸配列からなるポリペプチドをあげることができる。

本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドは、修飾されたポリペプチドでもよい。本発明で言う「修飾」という用語は、化学的修飾及び生物学的修飾を含めて最も広義に解釈しなければならない。修飾の例としては、例えば、アルキル化、エステル化、ハロゲン化、又はアミノ化などの官能基導入、酸化、還元、付加、又は脱離などによる官能基変換、糖化合物（単糖、二糖、オリゴ糖、若しくは多糖）又は脂質化合物などの導入、リン酸化、ビオチン化、又はポリエチレングリコールでの修飾などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。

上記した本発明のポリペプチドは遊離形態であってもよいが、酸付加塩又は塩基付加塩として提供されてもよい。酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩などの鉱酸塩；又は、p-トルエンスルホン酸塩、メタンスルホン酸塩、クエン酸塩、蔞酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩などの有機酸塩を挙げることができる。塩基付加塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カル

シウム塩、マグネシウム塩などの金属塩；アンモニウム塩；メチルアンモニウム塩、トリエチルアンモニウム塩などの有機アンモニウム塩を挙げることができる。グリシンなどのアミノ酸と塩を形成する場合もあり、また、分子内で対イオンを形成することもある。

さらに、これらのポリペプチド又はその塩は、水和物又は溶媒和物として存在する場合がある。本発明のポリペプチドは複数の不斉炭素を有しているが、各不斉炭素の立体は特に限定されないが、アミノ酸残基は L-アミノ酸であることが望ましい。これらの不斉炭素に基づく光学活性体、ジアステレオ異性体などの立体異性体、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などはいずれも本発明の範囲に包含される。

以下に、本発明のフォリスタチン変異体の作製方法、活性評価方法およびその使用方法について説明する。

2. フォリスタチン変異体ポリペプチドの製造方法

(1) フォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAの構築

1. に記載した条件に基づき、アクチビンの活性の阻害と比較して、GDF-8を選択的に阻害するフォリスタチン変異体ポリペプチドの構造を設計し、該ポリペプチドをコードするDNAを以下のようにして構築する。

まず、フォリスタチン全体または設計したフォリスタチン変異体ポリペプチドの構成に必要なフォリスタチンの領域を含む部分断片をコードするDNAを取得する。各種哺乳類およびニワトリのフォリスタチンcDNAまたはゲノムDNAの塩基配列は公知であるので、これらの配列の情報をもとにしたプライマーを用い、各種哺乳類またはニワトリの精巢から単離したcDNAを鋳型としたPCRを行うことにより、該哺乳類またはニワトリのフォリスタチンcDNAの任意の部分断片を取得できる。また、精巢cDNAライブラリーのスクリーニングによりフォリスタチンcDNAをクローニングし、該cDNAを鋳型としてもよい。各種哺乳類およびニワトリのフォリスタチンcDNAまたはゲノムDNAの塩基配列としては、NCBIのヌクレオチドデー

データベース登録番号NM_013409（ヒトフォリスタチンcDNA）、NM_008046（マウスフォリスタチンcDNA）、NM_012561（ラットフォリスタチンcDNA）、NM_175801（ウシフォリスタチンcDNA）、M63123（ヒツジフォリスタチンcDNA）、AB010829（ウシフォリスタチンcDNA）、M19529（ブタフォリスタチンゲノムDNA）、NM_205200（ニワトリフォリスタチンcDNA）等に記載された塩基配列をあげることができる。取得したい領域の5' 端の15～30塩基の配列、および3' 端の15～30塩基の配列と相補的な配列を含むDNAを合成し、プライマーとする。PCRの両プライマーの5' 端には、部分断片の連結やベクターへの挿入に用いるため、適当な制限酵素の認識配列を付加しておくのが好ましい。cDNAの調製やPCRは、Sambrook, J. and Russel, D. W., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)等の実験書の記載にしたがって、行うことができる。必要に応じて、得られたDNAを鋳型として同様の操作を行い、設計したフォリスタチン変異体ポリペプチドの構成に必要な領域をコードする該DNAの部分断片を取得する。

設計したフォリスタチン変異体ポリペプチドの構造に基づいて、得られた部分断片をフレームが合うように連結させ、必要に応じて、他のポリペプチドをコードするDNAと連結させたり、終止コドンコード領域の3' 端に付加したり、変異を導入することにより、該フォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAを構築することができる。

(3) で記述するように、形質転換細胞の培養時に、フォリスタチン変異体ポリペプチドを細胞外に分泌させる場合は、分泌蛋白質の前駆体のN末端に存在するシグナルペプチドを、設計したフォリスタチン変異体ポリペプチドのN末端に付加したポリペプチドをコードするDNAを構築する。シグナルペプチドとしては、例えば、フォリスタチンのシグナルペプチドを用いることができる。フォリスタチンのシグナルペプチドをコードするDNAは、上記のフォリスタチン変異体ポリペプチドの構成に必要なFSIを含むフォリスタチン断片をコードするDNAを取得する際に、フォリスタチンのシグナルペプチドを含むような断片を増幅するこ

とにより、取得することができる。

分泌させない場合は、設計したフォリスタチン変異体ポリペプチドのN末端がメチオニンでない場合には、フォリスタチン変異体ポリペプチドをコードする領域の前に開始コドン (atg) を付加する。

例えば、FSN-FSI-FSIというドメイン構造を有するフォリスタチン変異体ポリペプチドを分泌させる場合は、まずPCRで、シグナルペプチド-FSN-FSIを含む領域をコードするフォリスタチンcDNAの部分断片AおよびFSIを含む領域をコードするフォリスタチンcDNAの部分断片Bをそれぞれ取得する。得られたcDNA断片Aの下流にcDNA断片Bを連結させることにより、シグナルペプチド-FSN-FSI-FSIというドメイン構造を有するフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAを作製することができる。

また、FSN-FSI-FSI-FSIIIというドメイン構造を有するフォリスタチン変異体ポリペプチドを分泌させる場合は、PCRで、FSIIIを含む領域をコードするフォリスタチンcDNAの部分断片Cを取得し、上記のcDNA断片Aの下流にcDNA断片Bを連結させ、その下流にさらにcDNA断片Cを連結させることにより、シグナルペプチド-FSN-FSI-FSI-FSIIIというドメイン構造を有するフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAを作製することができる。

(2) フォリスタチン変異体発現ベクターの作製と宿主細胞への導入

(1) で作製したフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAを宿主細胞に応じた適当な発現用ベクターに挿入して、フォリスタチン変異体発現ベクターを作製する。

宿主細胞としては、細菌等の原核生物、酵母等の真核微生物、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、フォリスタチン変異体ポリペプチドを発現できるものであればいずれも用いることができるが、フォリスタチン変異体発現ベクターを導入した細胞（以下、形質転換細胞ともいう）が発現するフォリスタチン変異体ポリペプチドが正しい高次構造を保ち、GDF-8特異的な阻害活性を保持するためには、動物細胞や昆虫細胞などで発現させるのが好ましい。

フォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAを挿入する発現用ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、宿主細胞中で機能するプロモーターを含有しているものを用いることができる。また、大腸菌 (*Escherichia coli*) を用いたベクターの調製のために、大腸菌用の内在性プロモーターを含む薬剤耐性遺伝子、大腸菌中での複製に必要な複製開始点を含むことが好ましい。大腸菌用の薬剤耐性遺伝子としては、大腸菌由来のアンピシリン耐性遺伝子 (β -ラクタマーゼ遺伝子)、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子等があげられる。大腸菌での複製に必要な複製開始点としては、pBR322の複製開始点、colE1の複製開始点等があげられる。

宿主細胞が、動物細胞の場合、フォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAを挿入する発現用ベクターとしては、動物細胞中で機能するプロモーターおよびポリアデニル化シグナルを有するプラスミドがあげられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、モロニー Maus 白血病ウイルスのロング・ターミナル・リピート (LTR)、ラウス肉腫ウイルスのLTR、単純ヘルペスウイルス (HSV) のチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター、メタロチオネインのプロモーター等をあげることができる。上記プロモーターと共に、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサー等も用いることができる。プロモーターは、その下流にフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAを挿入できる、適当な制限酵素サイトを有することが好ましい。

ポリアデニル化シグナルとしては、いかなるポリアデニル化シグナルも利用できるが、例えば、SV40初期遺伝子のポリアデニル化シグナル、ウサギ β グロビン遺伝子のポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン遺伝子のポリアデニル化シグナル等を用いることができる。

さらに動物細胞用の薬剤耐性遺伝子の発現ユニット (プロモーターの下流に薬

剤耐性遺伝子とポリアデニル化シグナルを順に連結した構造)を有していてもよい。動物細胞用の薬剤耐性遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子等があげられる。プロモーターとポリアデニル化シグナルは上記のものを用いることができる。薬剤耐性遺伝子の発現ユニットを有する発現ベクターを用いた場合、薬剤存在下で形質転換細胞を培養することにより、一過的でなく安定発現する形質転換細胞を得ることができる。

ジヒドロ葉酸レダクターゼ (dhfr) 遺伝子の発現ユニットを含む発現用ベクターを用い、dhfr遺伝子を欠失している動物細胞を宿主細胞とし、メトトレキセート存在下で形質転換細胞を培養し、メトトレキセートの濃度を段階的に上昇させることにより、dhfr遺伝子と共に導入したフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAのコピー数を増幅させ、フォリスタチン変異体ポリペプチドの発現量の高い形質転換細胞を得ることができる。

また、動物細胞での複製に必要な複製開始点を有していてもよい。複製開始点としては、SV40の複製開始点やエプスタイン・バー・ウイルスの複製開始点oriPを用いることができる。SV40の複製開始点を有するプラスミドベクターは、SV40のラージT抗原を発現する宿主細胞中ではコピー数が増加するため、目的の遺伝子を高発現させる上で好適である。oriPを含むベクターは、エプスタイン・バー・ウイルスのEBNA-1 (Epstein-Barr virus nuclear antigen-1) を発現する宿主中では宿主の染色体に組み込まれず、染色体外に維持される。

以上のような、動物細胞の発現用ベクターとしては、pcDNA3 [インビトロジェン (Invitrogen) 社製]、pcDNA3.1(+) (インビトロジェン社製)、pSI [キアゲン (QIAGEN) 社製]、pCI-neo (キアゲン社製)、pAGE107、pAGE103、pAMo

[J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)] 等をあげることができる。

(1) で作製したフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAを、上記の動物細胞の発現用ベクターのプロモーターの下流に挿入して、フォリスタチン変異体ポリペプチド発現ベクターを作製する。

宿主細胞としては、サル腎臓細胞株COS-1 (ATCC番号：CRL-1650) およびCOS-7 (ATCC番号：CRL-1651)、チャイニーズハムスタ卵巣細胞株CHO-K1 (ATCC番号：CCL-61) およびCHO/dhFr- (ATCC番号：CRL-9096)、ヒトBリンパ球細胞株Namalwa (ATCC番号：CRL-1432)、ヒト腎臓細胞株HEK293 (ATCC番号：CRL-1573)、ヒト子宮頸部上皮細胞株HeLa (ATCC番号：CCL-2)、マウス胎児細胞株NIH/3T3 (ATCC番号：CRL-1658) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973) に記載の方法等をあげることができる。また、市販のDNA導入試薬を用いることもできる。該DNA導入試薬として、トランスファスト (TransFast; プロメガ社製)、リポフェクトアミン2000 (Lipofectamine 2000; インビトロジェン社製)、スーパーフェクト (SuperFect; キアゲン社製)、ポリフェクト (PolyFect; キアゲン社製) 等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、フォリスタチン変異体ポリペプチドを発現する昆虫細胞を得ることができる。

すなわち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現する昆虫細胞を得ることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392およびpVL1393 (ともにファーミンジェン社製)、pBlueBac4.5 (インビトロジェン社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、ヤガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*由来のSf9およびSf21 (インビトロジェン社製)、*Trichoplusia ni*由来のHigh 5 (インビトロジェン社製)、カイコ (*Bombyx mori*) 由来のBm5 (インビトロジェン社製) およびN4等の細胞株をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、トランスファーベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、発現ベクターは宿主原核生物中で自律複製可能であり、プロモーターおよびその下流にリボソーム結合配列およびフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAを挿入するクローニングサイトを有するものを用いる。必ずしも必要ではないが、該クローニングサイトの直後に転写終結配列を配置する方が好ましい。また、形質転換体の選択のため、薬剤耐性遺伝子等のマーカーとなる遺伝子を発現する配列を含むようにする。リボソーム結合配列の下流のクローニングサイトにフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAを挿入する。リボソーム結合配列と開始コドンとの間は適当な距離 (例えば、大腸菌宿主のベクターの場合 6 ~ 18塩基) に調節されていることが好ましい。

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば大腸菌を宿主とした場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、T7プロモーター、PRプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター等をあげることができる。またtrpプロモーターを2つ直列させたプロモーター、tacプロモーター、T7lacプロモーター、let Iプロ

モーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。枯草菌を宿主とした場合は、枯草菌のファージであるSP01やSP02のプロモーター、PenPプロモーター等をあげることができる。

発現ベクターとしては、例えば、pGEMEX-1（プロメガ社製）、pQE-30（キアゲン社製）、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pTrs30 [大腸菌JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pGEX-5X-3（アマシャム・バイオサイエンシズ社製）、pET14（ノバジェン社製）、pPROTet.E（クロンテック社製）pRSET A（インビトロジェン社製）等を例示することができる。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972); Gene, 17, 107 (1982)]、プロトプラスト法〔特開昭63-248394; Mol. Gen. Genet., 168, 111 (1979)]等をあげることができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合の発現ベクターとしては、宿主酵母で転写を行なうプロモーター、転写の終止配列および酵母での形質転換マーカーとなる遺伝子、たとえば薬剤耐性遺伝子やTRP1、HIS3、LEU2等のアミノ酸合成系の遺伝子を発現できる配列を含有しているものが用いられる。また、発現ベクターの作製や維持を容易にするため、大腸菌内でも自律複製と遺伝子導入マーカーとなる薬剤耐性遺伝子を発現できるものが好ましい。

プロモーターとしては、酵母中で転写を行なえるものであればいずれのものを用いてもよく、例えばSaccharomyces cerevisiaeのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子ADH1、ガラクトース代謝系遺伝子GAL1やGAL10等のプロモーター、酸性フォスファターゼ遺伝子PHO5プロモーター、フォスフォグリセレートキナーゼ遺伝子PGKプロモーター、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子GAPプロモーター、ヒートショック蛋白質遺伝子プロモーター、 α 接合因子遺伝子MF α 1プロモーター、銅メタロチオネイン遺伝子CUP1プロモーター、Pichia pastorisのアルコールオキシダーゼ遺伝子AOX1のプロモーター等が用いられる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、ピヒア属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Pichia pastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Methods Enzymol., 194, 182 (1991)]、スフェロプラスト法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法〔J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]等をあげることができる。

(3) 形質転換細胞の培養とフォリスタチン変異体ポリペプチドの精製

(2) で作製した形質転換細胞が大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物である場合、該細胞を培養する培地は、該細胞が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。無機塩としては、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養期間は、通常16～96時間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。必要に応じて、培養期間中にアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

(2) で作製した形質転換細胞が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地

は、一般に使用されているRPMI 1640培地〔J. Am. Med. Assoc., 199, 519 (1967)〕、イーグル (Eagle) のMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、ダルベッコ改変イーグル培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)〕、MEM培地、EX-CELL 301培地 (JRHバイオサイエンシズ社製) またはこれら培地にウシ胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。培養は、通常pH 6～8、30～40℃、5 %CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

(2) で作製した形質転換細胞が昆虫細胞である場合、該細胞を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 (ファーミンジェン社製)、Sf-900 II SFM培地 (インビトロジェン社製)、EX-CELL 400、EX-CELL 405 (JRHバイオサイエンシズ社製)、グレースの昆虫培地〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。培養条件はpH 6～7、培養温度は25～30℃、培養時間は通常1～5日間が好ましい。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

フォリスタチン変異体ポリペプチドは、細胞外に分泌させても、分泌させずに細胞内に発現させてもよいが、細胞外に分泌させる方が好ましい。細胞外へ分泌させる場合は、(2) でフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAとして、設計したフォリスタチン変異体ポリペプチドのN末端にシグナルペプチドを付加したポリペプチドをコードするDNAを用いて発現ベクターを作製し、形質転換細胞を取得する。分泌時には、シグナルペプチドは切断されるため、培地中にはシグナルペプチドが除かれたフォリスタチン変異体ポリペプチドが蓄積する。

以上のように培養することにより、形質転換細胞を培養した培地または形質転換細胞中に、発現したフォリスタチン変異体ポリペプチドが蓄積する。該培地または該形質転換細胞から、以下のようにして、フォリスタチン変異体ポリペプチドを単離・精製することができる。

細胞外にフォリスタチン変異体ポリペプチドが分泌される場合には、培地を回

収する。形質転換細胞が浮遊性の場合は、遠心分離やろ過により、培地と細胞を分離して培地を回収する。回収した培地から、硫酸化セルロファインカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、効率的に精製することができる。また、その他に通常のタンパク質の精製に用いられる精製方法、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。また、フォリスタチンのFSIを特異的に認識する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーによっても精製することができる。

また、フォリスタチン変異体ポリペプチドが、他のポリペプチドとの融合蛋白質である場合、融合させた他のポリペプチドと特異的に結合する物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、IgGの定常領域との融合蛋白質にした場合はプロテインAや抗IgG抗体を固定化したカラム、プロテインAとの融合蛋白質にした場合はIgGを固定化したカラム、FLAGペプチド、Sペプチド、HAエピトープペプチド、mycエピトープペプチドとの融合蛋白質にした場合は、それらのペプチドに対する抗体を固定化したカラム、ポリヒスチジンとの融合蛋白質にした場合は、ニッケルイオンを固定化したカラム、グルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合蛋白質にした場合は、グルタチオンを固定化したカラムをそれぞれ利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

フォリスタチン変異体ポリペプチドが細胞内に発現した場合は、形質転換細胞を回収する。回収した細胞をプロテアーゼ阻害剤を含む適当な緩衝液中でホモジナイザーや超音波処理等により破碎した後、遠心分離により上清を回収し、細胞溶解液を得る。得られた細胞溶解液から、培地からの単離・精製法と同様の手法により、フォリスタチン変異体ポリペプチドを単離・精製することができる。

また、公知の方法 [J. Biomolecular NMR, 6, 129, Science, 242, 1162 (1988)、J. Biochem., 110, 166 (1991)] に準じて、in vitro転写・翻訳系を用いてフォリスタチン変異体ポリペプチドを生産することもできる。

精製したフォリスタチン変異体の分子量は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動〔SDS-PAGE; Nature, 227, 680 (1970)〕やウエスタンブロッティング法 (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)) などで測定することができる。

3. 本発明のフォリスタチン変異体のGDF-8選択的阻害の確認

本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドが「GDF-8の活性を選択的に阻害する」とは、「アクチビンの活性の阻害と比較して、GDF-8の活性を選択的に阻害する」ことを意味する。「アクチビンの活性の阻害と比較して、GDF-8の活性を選択的に阻害する」とは、請求項3に記載の方法で、同じ濃度のフォリスタチン変異体ポリペプチドについて、アクチビンの活性の阻害とGDF-8の活性の阻害を測定したときに、GDF-8の活性は50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上阻害するのに対し、アクチビンの活性の阻害は50%未満、好ましくは30%以下、より好ましくは10%以下であるか、さらに好ましくは阻害せず、アクチビンの活性の阻害と比較して、GDF-8の活性をより強く阻害することを意味する。

本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドは、アクチビンの活性の阻害と比較して、GDF-8の活性を選択的に阻害するフォリスタチン変異体ポリペプチドであり、アクチビンの活性は阻害せず、GDF-8の活性を選択的に阻害するものが好ましい。以下のように、本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドの活性（アクチビンの活性の阻害と比較してGDF-8の活性を選択的に阻害する活性）は、例えば、アクチビンおよびGDF-8が有する転写促進活性をレポーターアッセイにより測定することにより確認できる。

レポータープラスミド(CAGA)₁₂-MLP-Luc〔EMBO J., 17, 3091 (1998)〕を導入した動物細胞を作製する。(CAGA)₁₂-MLP-Lucは、CAGAボックスと呼ばれるアクチビンおよびGDF-8に対する応答配列(AGCCAGACA)を上流に12個挿入したアデノウ

イルスの主要後期プロモーターを有し、該プロモーターの下流にレポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結した構造を有する。レポータープラスミドの導入は、2に記載の方法で行うことができる。得られた形質転換細胞に、(a) GDF-8、(b) アクチビン、(c) フォリスタチン変異体ポリペプチド、(d) GDF-8およびフォリスタチン変異体ポリペプチド、(e) アクチビンおよびフォリスタチン変異体ポリペプチドをそれぞれ添加した場合、(f) 何も添加しない場合について、ルシフェラーゼ活性を測定する。形質転換細胞は、

(f) の何も添加しない場合と比較して、(a) GDF-8および(b) アクチビンをそれぞれ添加した場合には、転写の活性化を受け、ルシフェラーゼ活性が上昇する。また、(c) フォリスタチン変異体ポリペプチドを添加した場合にはルシフェラーゼ活性の上昇はみられない。本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドがGDF-8の活性を選択的に阻害することは、(I) (a) GDF-8を添加した場合と比較して、(d) GDF-8およびフォリスタチン変異体ポリペプチドを添加した場合には、ルシフェラーゼ活性が低下し、(c) フォリスタチン変異体ポリペプチドだけを添加した場合あるいは(e) 何も添加しない場合のルシフェラーゼ活性に近くなるのに対し、(II) (a) アクチビンを添加した場合と比較して、

(d) アクチビンおよびフォリスタチン変異体ポリペプチドを添加した場合には、ルシフェラーゼ活性の低下が見られないか、ルシフェラーゼ活性の低下が、GDF-8の場合の活性の低下よりも、明らかに弱いことにより確認できる。

4. 本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドを含む医薬組成物

本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチド、該ポリペプチドを投与した生体内で発現するための該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドを含むベクターは、アクチビンの活性の阻害と比較して、GDF-8の活性を選択的に阻害するので、GDF-8が発症あるいは進行に関与する症状や疾患の治療や予防に用いることができ、しかも、アクチビンの阻害による副作用が少ないことが期待される。このような症状や疾患としては、例えば、疾患や老化、

寝たきり等に伴う骨格筋の減少や萎縮、皮下脂肪や内臓脂肪等の脂肪の増加、悪液質、筋萎縮を伴う疾患、II型糖尿病、肥満および後天性免疫不全症候群などをあげることができる。筋萎縮を伴う疾患としては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー等の遺伝性の筋ジストロフィー、および筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症およびパーキンソン病等の神経の変性により二次的に筋萎縮を呈する疾患等をあげることができる。

本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチド、該ポリペプチドを投与した生体内で発現するための該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドを含むベクターは、GDF-8の選択的阻害剤、骨格筋増加剤、脂肪低下剤、筋萎縮症状の治療剤又は予防剤、ならびに悪液質、筋萎縮を伴う疾患、II型糖尿病、肥満または後天性免疫不全症候群の治療剤又は予防剤として単独で用いることも可能ではあるが、通常は各種の医薬製剤として提供するのが望ましい。また、それら医薬製剤は、動物または人に使用されるものである。

本発明に係わる医薬製剤は、上記の活性成分またはその薬理学的に許容される塩を単独で、あるいは任意の他の治療のための有効成分との混合物として含有することができる。また、それら医薬製剤は、活性成分を薬理学的に許容される一種またはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られている任意の方法により製造される。

投与経路としては、予防または治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口または、例えば静脈内などの非経口をあげることができるが、非経口が好ましい。

投与形態としては、例えば錠剤、注射剤などがあげられる。

経口投与に適当な例えば錠剤などは、乳糖、マンニットなどの賦形剤、澱粉などの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、ヒドロキシプロピルセルロースなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤は好ましくは受容者の血液と等張である活性化合物を

含む滅菌水性剤からなる。例えば、注射剤の場合は、塩溶液、ブドウ糖溶液または塩水とブドウ糖溶液の混合物からなる担体などを用いて注射用の溶液を調製する。また、これらの非経口剤においても経口剤で例示した賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤および希釈剤、防腐剤、フレーバー類などから選択される1種もしくはそれ以上の補助成分を添加することもできる。

さらに、脂質、ヒアルロン酸、温度感受性ポリマー、難水溶性高分子、又は界面活性剤などを適宜選択して添加することにより、ペプチド吸収の持続化を図ることもできる。

上記の活性成分またはその薬理学的に許容される塩は、上記の目的で用いる場合、通常、全身的または局所的に、経口または非経口の形で投与される。投与量および投与回数は、投与形態、患者の年齢、体重、治療すべき症状の性質もしくは重篤度などにより異なるが、通常経口の場合、成人1人あたり、1回につき0.01~1000 mg、好ましくは0.05~500 mgの範囲で、1日1回ないし数回投与する。静脈内投与などの非経口投与の場合、通常成人一人当たり0.001~1000 mg、好ましくは0.01~300 mgを一日一回ないし数回投与するか、または1日1~24時間の範囲で静脈内に持続投与する。しかしながら、これら投与量および投与回数に関しては、前述の種々の条件により変動する。

また、GDF-8の選択的阻害剤、骨格筋増加剤、脂肪低下剤、筋萎縮症状の治療剤又は予防剤、悪液質、筋萎縮を伴う疾患、II型糖尿病、肥満または後天性免疫不全症候群の治療剤又は予防剤の有効成分としてDNAやRNAなどの核酸を利用する遺伝子治療剤の場合には、該DNAまたはRNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、上記に記載した常法に従って製剤化、処方および投与する方法、あるいは非ウイルス遺伝子移入法により投与する方法を使用することができる。

組換えウイルスベクターは、以下に記載の方法に従い作製することができる。

有効成分として使用するDNA（以下、対象DNAとも称する）の断片を調製する。該DNA断片をウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、

組換えウイルスベクターを造成する。

RNAウイルスベクターの場合には、対象DNAに相同なRNA断片を調製し、それらをウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスを造成する。RNA断片は、2本鎖のほか、ウイルスベクターの種類に応じて、センス鎖もしくはアンチセンス鎖のどちらか一方の鎖を選択する。例えば、レトロウイルスベクターの場合は、センス鎖に相同なRNAを、センスウイルスベクターの場合には、アンチセンス鎖に相同なRNAを選択する。

該組換えウイルスベクターを、該ベクターに適合したパッケージング細胞に導入する。パッケージング細胞としては、ウイルスのパッケージングに必要な蛋白質をコードする遺伝子の少なくとも1つを欠損している組換えウイルスベクターの該欠損する蛋白質を補給できる細胞であればいかなるものでもよい。例えば、ヒト腎臓由来のHEK293細胞、マウス繊維芽細胞NIH3T3などを用いることができる。パッケージング細胞で補給する蛋白質としては、レトロウイルスベクターの場合はマウスレトロウイルス由来のgag、pol、envなど、レンチウイルスベクターの場合はHIV由来のgag、pol、env、vpr、vpu、vif、tat、rev、nefなど、アデノウイルスベクターの場合はアデノウイルス由来のE1A、E1Bなど、アデノ随伴ウイルスの場合はRep (p5、p19、p40)、Vp (Cap)などの蛋白質があげられる。

ウイルスベクターとしては、上記パッケージング細胞において組換えウイルスが生産でき、標的細胞で対象DNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。プラスミドベクターとしてはMFG [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733 (1995)]、pBabePuro [Nucleic Acids Res., 18, 3587 (1990)]、LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG [J. Virol., 72, 8150 (1998)]、pAdex1 [Nucleic Acids Res., 23, 3816 (1995)]などが用いられる。プロモーターとしては、ヒト組織中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SR α プロモーターなどをあげることが

できる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

パッケージング細胞への組換えウイルスベクターの導入法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕などをあげることができる。

また、上記組換えウイルスベクターの投与方法としては、上記の方法に加え、リポソームデリバリーを用いる直接的イン・ビボ(*in vivo*)遺伝子移入と組み合わせることにより、患者の癌組織にウイルスベクターを指向させるようにすることもできる。すなわち、適当なサイズの対象DNAを、アデノウイルス・ヘキソン蛋白質に特異的なポリリジン-コンジュゲート抗体と組み合わせてコンプレックスを作製し、得られたコンプレックスをアデノウイルスベクターに結合させることにより、ウイルスベクターを調製することができる。該ウイルスベクターは安定に標的細胞に到達し、エンドソームにより細胞内に取り込まれ、細胞内で分解され効率的に遺伝子を発現させることができる。

本発明においては、対象DNAを発現するベクターは非ウイルス遺伝子移入法によっても病巣に輸送することができる。

当該分野で公知の非ウイルス遺伝子移入法には、リン酸カルシウム共沈法〔Virology, 52, 456 (1973); Science, 209, 1414 (1980)〕、マイクロインジェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5399 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7380 (1980); Cell, 27, 223 (1981); Nature, 294, 92 (1981)〕、リポソームを介した膜融合-介在移入法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987); Biochemistry, 28, 9508 (1989); J. Biol. Chem., 264, 12126 (1989); Hum. Gene Ther., 3, 267 (1992); Science, 249, 1285 (1990); Circulation, 83, 2007 (1992)〕あるいは直接DNA取り込みおよび受容体を介したDNA移入法〔Science, 247, 1465 (1990); J. Biol. Chem., 266, 14338 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3655 (1991); J. Biol. Chem., 264, 16985 (1989); BioTechniques, 11, 474 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

87, 3410 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4255 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4033 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8850 (1991); Hum. Gene Ther., 3, 147 (1991)]などをあげることができる。

リポソームを介した膜融合一介在移入法ではリポソーム調製物を標的とする組織に直接投与することにより、当該組織の局所的な遺伝子の取り込みおよび発現が可能である。DNAを患者の癌組織に直接標的化するには、直接DNA取り込み技術が好ましい。受容体を介したDNA移入は、例えば、ポリリジンを通して、蛋白質リガンドにDNA(通常、共有的に閉環したスーパーコイル化プラスミドの形態をとる)をコンジュゲートすることによって行う。リガンドは、標的細胞または組織の細胞表面上の対応するリガンド受容体の存在に基づいて選択する。当該リガンド-DNAコンジュゲートは、所望により、血管に直接注射することができ、受容体結合およびDNA-蛋白質コンプレックスの内在化が起こる標的組織に指向し得る。DNAの細胞内破壊を防止するために、アデノウイルスを同時感染させて、エンドソーム機能を崩壊させることもできる。

5. 本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む外来遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物

本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む外来遺伝子を非ヒト哺乳動物に導入することにより、トランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製することができる。上記トランスジェニック非ヒト哺乳動物においては、本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドが過剰発現しており、好ましくは骨格筋量が増大していることを特徴とする。当該トランスジェニック非ヒト哺乳動物は、骨格筋の形成機構の研究や、骨格筋の異常を伴う疾患の研究の際に使用するモデル動物として有用である。

本明細書で言う「非ヒト哺乳動物」の具体例としては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはサルなどが挙げられ、好ましくは、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウ

サギなどのげっ歯類動物であり、最も好ましくは、マウスである。

以下、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作出方法について説明する。

(1) 導入遺伝子の調製

本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAを対象動物に導入する際には、導入の対象動物の細胞内で当該DNAを発現させるプロモーターの下流に当該DNAを連結した遺伝子構築物を用いるのが一般に有利である。導入させる遺伝子は、常法により、例えば、下記の通り調製することができる。

導入させる遺伝子の全長相補DNAをもとにして、必要に応じて、該ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製し、次いで該DNA断片、または全長相補DNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

動物へ導入させる遺伝子の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。これらの中でも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく、大腸菌由来のプラスミドが特に好ましい。

本発明で用いるプロモーターの具体例は本明細書中上記した通りである。本発明で用いる発現ベクターは、トランスジェニック哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来、各種哺乳動物および鳥類由来の各遺伝子に含まれる同機能を有する配列を用いて遺伝子発現を操作することができる。好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどがよく用いられる。その他、目的遺伝子をさらに高発現させる目的で、各遺伝子のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核生物遺伝子のイントロンの一部をプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の

3' 下流 に連結することも目的により可能である。

(2) トランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、フォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAを対象動物に導入することによって作製できる。具体的には、該遺伝子を対象となる非ヒト哺乳動物の受精卵、胚性幹細胞、体細胞、精子、未受精卵へ導入することによって、目的とするフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAが胚芽細胞を含むすべての細胞の染色体上に組み込まれたトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることによって作出できる。受精卵、胚性幹細胞、体細胞、精子、未受精卵における該遺伝子の導入は、対象非ヒト哺乳動物の胚芽細胞および体細胞を含む全ての細胞の染色体上に存在するように確保されることが好ましい。遺伝子導入後の作出動物の胚芽細胞において該導入遺伝子が存在することは、作出動物の子孫がその胚芽細胞および体細胞の全てに該導入遺伝子を有することを意味する。

個体の選択は、導入遺伝子産物の発現を蛋白質あるいはmRNAレベルで確認することによって行うことができる。選択された個体の遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫は、該導入遺伝子産物を有する。導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該遺伝子を安定に保持し、また、該遺伝子を有することを確認して、通常の飼育環境で繁殖継代することができる。

受精卵あるいは胚性幹細胞への遺伝子導入によるトランスジェニック動物の作製は、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲッティング、ES細胞を用いた変異マウスの作製、羊土社 (1995)、発生工学実験マニュアル、トランスジェニック・マウスの作り方、講談社 (1987)等に記載された方法を用い、哺乳類動物細胞への遺伝子導入と核移植によるトランスジェニック動物の作製は、Cibelliら (Science, 280, 1256, 1998)、Schniekeら (Science, 278, 2130, 1997)、Baguisiら

(Nature Biotechnology, 17, 456, 1999) 等によって報告された方法を用い、精子への遺伝子導入によるトランスジェニック動物の作製は、Perryら (Science, 284, 1180, 1999) やWakayamaら (Nature Biotechnology, 16, 639, 1998) によって報告された方法を用い、未受精卵への遺伝子導入と体外受精によるトランスジェニック動物の作製は、Chanら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 14028, 1998) によって報告された方法を用いて行うことができる。

6. 家畜の改良への応用

本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチド、該ポリペプチドを投与した生体内で発現するための該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドを含むベクターをウシ、ブタ、ヒツジ、ニワトリ等の非ヒト動物に投与することにより、該非ヒト動物の骨格筋を増加させ、脂肪を低下させることができる。また、5に記載した方法と同様にして、本発明のフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を作製することにより、該非ヒト動物の骨格筋を増加させ、脂肪を低下させることができる。特に非ヒト動物が家畜である場合、以上のようにして肉の量が多く、脂肪の少ない家畜を作製することができるので、肉の生産量を増加でき、また脂肪の少ない良質肉の生産をすることができる。また骨格筋の増加から、家畜の労働力を改良することができる。

以下、本発明の実施例を示すが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

実施例

実施例1：フォリスタチン変異体ポリペプチド発現ベクターの作製

ヒト精巢cDNAライブラリー〔クロンテック (Clontech) 社製〕から、ブタフォリスタチン前駆体cDNAをプローブとしたハイブリダイゼーションによりクローン化された、ヒトフォリスタチン前駆体cDNA〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85,

4218, (1988)] を、プラスミドpUC19 (宝酒造社製) 中のEcoRI部位とXbaI部位の間に挿入し、フォリスタチン変異体用の鋳型pUC19/FSを作製した。

0.2 mmol/l dNTPs、1 mmol/l塩化マグネシウムを含む反応液に、フォリスタチン変異体用の鋳型を100 ng、そしてプライマーとして、配列番号11および配列番号12に示した塩基配列を有する合成DNA [ジェンセット (Genset) 社製] をそれぞれ10 pmolずつ加え、さらに2.5単位のTaqポリメラーゼ (TaKaRa Ex Taq; 宝酒造社製) を添加して、合計25 μ lとし、PCRを行った。反応条件は、94°C 30秒間、74°C 15秒間、72°C 30秒間のサイクルを3サイクル、94°C 30秒間、70°C 15秒間、72°C 30秒間のサイクルを3サイクル、94°C 30秒間、66°C 15秒間、72°C 30秒間のサイクルを3サイクル、94°C 30秒間、62°C 15秒間、72°C 30秒間のサイクルを3サイクル、94°C 30秒間、58°C 15秒間、72°C 30秒間のサイクルを3サイクル、94°C 30秒間、54°C 15秒間、72°C 30秒間のサイクルを12サイクル、その後、72°C 10分間を1サイクルで行った。該反応液を1%アガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.25kbの遺伝子増幅断片Aを回収した (図2)。遺伝子増幅断片Aがコードするアミノ酸配列には、配列番号4の95~168番目の配列が含まれ、ヒトフォリスタチンのFSIを含む。

プライマーとして、配列番号13および配列番号14に示した塩基配列を有する合成DNA (ジェンセット社製) をそれぞれ10 pmolずつ用いて、上記の遺伝子増幅断片Aと同様の条件でPCRを行い、反応液を1%アガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.6kbの遺伝子増幅断片Bを回収した (図3)。遺伝子増幅断片Bがコードするアミノ酸配列には、配列番号4の1~166番目の配列が含まれ、ヒトフォリスタチンのFSNおよびFSIを含む。

得られた遺伝子増幅断片AおよびBをそれぞれ、pGEM-T Easy TAクローニングキット [プロメガ (Promega) 社製] を用いて添付の説明書に従って、pGEM-T Easyベクターに連結し、図2および図3に示すプラスミドpGEM-T Easy (A) およびpGEM-T Easy (B) を得た。

次にプラスミドpGEM-T Easy (B) を制限酵素EcoRI (宝酒造社製) および

HindIII（宝酒造社製）で切断して得られる増幅断片Bを含む約0.59kbのEcoRI-HindIII断片(B)およびプラスミドpBluescript SK (-)〔ストラタジーン

(Stratagene) 社製〕をEcoRIおよびHindIIIで切断して得られる約2.95kbのEcoRI-HindIII断片を連結し、図4に示すプラスミドpBluescript SK (-) (B)を調製した。

次に、プラスミドpGEM-T Easy (A)を制限酵素HindIIIおよびSalI（宝酒造社製）で切断して得られる増幅断片Aを含む約0.27kbのHindIII-SalI断片(A)、およびプラスミドpBluescript SK (-) (B)をHindIIIおよびSalIで切断して得られる約3.54kbのHind III-Sal I断片(B)を連結し、図5に示すプラスミドpBluescript SK (-) (A+B)を調製した。

次に、プラスミドpBluescript SK (-) (A+B)を制限酵素EcoRIおよびSpeI（宝酒造社製）で切断して得られる増幅断片AおよびBを含む約0.84kbのEco RI-Spe I断片(A+B)、および動物細胞発現用プラスミドpcDNA3（インビトロジェン社製）をEcoRIおよびXbaI（宝酒造社製）で切断して得られる約5.4kbのEcoRI-XbaI断片を連結し、図6に示したフォリスタチン変異体ポリペプチド発現ベクターpcDNA3 (A+B)を得た。pcDNA3 (A+B)に含まれるフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードする領域の塩基配列を配列番号15に、該ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号16に示す。配列番号16の1から29番目のアミノ酸配列はシグナルペプチドであり、ポリペプチドの分泌時には切断される。したがって、pcDNA3 (A+B)を導入した動物細胞は配列番号6のアミノ酸配列からなるフォリスタチン変異体ポリペプチド（以下、FS1-1とよぶ）を分泌する。FS1-1はヒトフォリスタチンのFSNおよび2つのFSIを含むが、FSIIおよびFSIIIは欠失しているフォリスタチン変異体ポリペプチドである。

また、pBluescript SK (-) (B)をEcoRIおよびXhoIで切断して得られる、増幅断片Bを含む約0.6 kbのEcoRI-XhoI断片および、動物細胞発現用プラスミドpcDNA3をEcoRIおよびXhoIで切断して得られる約5.4kbのEcoRI-XhoI断片を連結し、図7に示すフォリスタチン変異体ポリペプチド発現ベクターpcDNA3 (B)を得

た。pcDNA3 (B)に含まれるフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードする領域の塩基配列を配列番号17に、該ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号18に示す。配列番号18の1から29番目のアミノ酸配列はシグナルペプチドであり、ポリペプチドの分泌時には切断される。したがって、pcDNA3 (B)を導入した動物細胞は配列番号8のアミノ酸配列からなるフォリスタチン変異体ポリペプチド（以下、FS1とよぶ）を分泌する。FS1はヒトフォリスタチンのFSNおよび1つのFSIを含むが、FSIIおよびFSIIIは欠失しているフォリスタチン変異体ポリペプチドである。

また、フォリスタチン変異体用の鋳型をEcoRIで切断して得られるヒトフォリスタチン前駆体cDNAを含む約1.1 kbのEcoRI断片をプラスミドpBluescript SK (-)のEcoRI部位に挿入し、図8に示すpBluescript SK (-) /FSを得た。得られたプラスミドpBluescript SK (-) /FSを、EcoRVおよびXhoIで切断して得られる約0.4 kbのEcoRV-XhoI断片Cおよび、プラスミドpBluescript SK (-) (A+B)をEcoRVおよびXhoIで切断して得られる約3.8 kbのEcoRV-XhoI断片を連結し、図9に示すプラスミドpBluescript SK (-) (A+B+C)を調製した。

次に、pBluescript SK (-) (A+B+C)をEcoRIおよびXhoIで切断して得られる、約1.2 kbのEcoRI-XhoI断片および、動物細胞発現用プラスミドpcDNA3をEcoRIおよびXhoIで切断して得られる約5.4kbのEcoRI-XhoI断片を連結し、図10に示すフォリスタチン変異体ポリペプチド発現ベクターpcDNA3 (A+B+C)を得た。pcDNA3 (A+B+C)に含まれるフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードする領域の塩基配列を配列番号19に、該ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号20に示す。配列番号20の1から29番目のアミノ酸配列はシグナルペプチドであり、ポリペプチドの分泌時には切断される。したがって、pcDNA3 (A+B+C)を導入した動物細胞は配列番号10のアミノ酸配列からなるフォリスタチン変異体ポリペプチド（以下、FS1-1-3とよぶ）を分泌する。FS1-1-3はヒトフォリスタチンのFSNおよび2つのFSIおよびFS3のほぼ全体を含むが、FSIIは欠失しているフォリスタチン変異体ポリペプチドである。

また、マウスFLRG cDNA [J. Biol. Chem., 275, 40788 (2000)] を鋳型とし、プライマーとして、配列番号21および配列番号22に示した塩基配列を有する合成DNA (ジェンセット社製) をそれぞれ10 pmolずつ用いて、上記の遺伝子増幅断片Aと同様の条件でPCRを行い、反応液を1%アガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.3kbの遺伝子増幅断片Dを回収した (図11)。該遺伝子増幅断片がコードするアミノ酸配列には、マウスFLRGの (NCBI蛋白質データベース: 登録番号BAB32663) の165~256番目のアミノ酸配列を含み、マウスFLRGのFSII様ドメイン (NCBI蛋白質データベース: 登録番号BAB32663の169~241番目の領域) が含まれる。図14に示すように、マウスFLRGのFSII様ドメインはマウスフォリスタチンのFSIIとアミノ酸配列で56% (41/73) の相同性を、配列番号2のアミノ酸配列とは61.6% (45/73) の相同性を有する。

得られた遺伝子増幅断片DをEcoRIで切断し、pBluescript SK (-)のEcoRI部位に挿入し、図11に示すpBluescript SK (-) (D)を得た。得られたプラスミドpBluescript SK (-) (D)をEcoRVおよびXhoIで切断して得られる約0.3 kbのEcoRV-XhoI断片、およびプラスミドpBluescript SK (-) (A+B)をEcoRVおよびXhoIで切断して得られる約3.8 kbのEcoRV-XhoI断片を連結し、図12に示すプラスミドpBluescript SK (-) (A+B+D)を調製した。

次に、pBluescript SK (-) (A+B+D)をEcoRIおよびXhoIで切断して得られる、約1.1 kbのEcoRI-XhoI断片および、動物細胞発現用プラスミドpcDNA3をEcoRIおよびXhoIで切断して得られる約5.4kbのEcoRI-XhoI断片を連結し、図13に示すフォリスタチン変異体ポリペプチド発現ベクターpcDNA3 (A+B+D)を得た。pcDNA3 (A+B+D)に含まれるフォリスタチン変異体ポリペプチドをコードする領域の塩基配列を配列番号23に、該ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号24に示す。配列番号24の1から29番目のアミノ酸配列はシグナルペプチドであり、ポリペプチドの分泌時には切断される。したがって、pcDNA3 (A+B+D)を導入した動物細胞は配列番号25のアミノ酸配列からなるフォリスタチン変異体ポリペプチド (以下、FS1-1-2' とよぶ) を分泌する。FS1-1-2' はヒトフォリスタチンのFSNおよび2つ

のFSIを含み、FSIIの代わりにマウスFLRGのFSII様ドメインを含むフォリスタチン変異体ポリペプチドである。

実施例2：フォリスタチン変異体ポリペプチドの動物細胞を用いた発現と精製

(1) COS-7細胞への発現ベクターの導入と培養

実施例1で得られたフォリスタチン変異体ポリペプチド発現ベクターpcDNA3 (A+B)、pcDNA3 (B)、pcDNA3 (A+B+C)、pcDNA3 (A+B+D)を用いてフォリスタチン変異体ポリペプチドの動物細胞での発現を以下のようにして行った。

1×10⁶細胞のCOS-7 (ATCC CRL-1651) 細胞あたり20 μgのプラスミドpcDNA3 (A+B)をエレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133 (1990)) により導入した後、ウシ胎児血清 (FCS) を10%添加したダルベッコ改変イーグル培地 [DMEM; シグマ-アルドリッチ (Sigma-Aldrich) 社製] 10 mlに懸濁し、10 cm 径細胞培養ディッシュ [コーニング (Corning) 社製] に播種した。5% CO₂インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、10 mlのDMEMへ培地交換し、3日間培養した。細胞培養ディッシュ6枚で上記の培養を行い、培養上清約60 mlを回収した。pcDNA3 (B)、pcDNA3 (A+B+C)およびpcDNA3 (A+B+D)についても同様にCOS-7細胞に導入して培養を行い、それぞれ培養上清約60mlを回収した。

(2) フォリスタチン変異体ポリペプチドの精製と検出

(1) で得られた4種類のフォリスタチン変異体ポリペプチドそれぞれを発現するCOS-7細胞の約60 mlの培養上清を20 mmol/L Tris-HCl (pH7.2), 0.3 mol/L NaCl, 0.03% 3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート (CHAPS) で平衡化した2 mlの硫酸化セルロファインカラム (生化学工業社製) に通塔した。その後、計20 mlの20 mmol/L Tris-HCl (pH7.2), 0.3 mol/L NaCl, 0.03% CHAPS、続いて計6 mlの20 mmol/L Tris-HCl (pH7.2), 0.5 mol/L NaCl, 0.03% CHAPSでカラムを洗浄した。その後、計10mlの20mmol/L Tris-HCl (pH7.2), 1.0mol/L NaCl, 0.03% CHAPSを用いて吸着タンパク質をカラムから溶出させた。この溶出液をウルトラフリー-15 (Ultrafree-15) 遠心式

フィルターユニット（バイオマックス-10メンブレン装着ユニット；ミリポア社製）を用いて添付の説明書に従って濃縮し、200 μ l のフォリスタチン変異体ポリペプチド溶液を得た。

ヒトフォリスタチンのFSIの部分配列である、配列番号26のアミノ酸配列からなるペプチドを化学合成し、このペプチドを抗原として、常法 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] に従ってウサギを免役し、抗体価の上昇したウサギから血清を採取し、ウサギ抗フォリスタチンポリクローナル抗体とした。該抗体のクラスはIgGであった。

得られた各フォリスタチン変異体ポリペプチドを公知の方法 [Nature, 227, 680 (1970)] に従ってSDS-PAGEに供した。泳動タンパク質を膜 (Immobilon P; Millipore社製) に転写し、5%スキムミルク（ナカライテスク社製）で膜をブロッキングした後、ウサギ抗フォリスタチンポリクローナル抗体と反応させた。検出は、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ラット抗ウサギIgG抗体 [ケミコン (Chemicon) 社製] および化学発光試薬 (ECL検出試薬; アマシャム・バイオサイエンス社製) を用いて行った。各フォリスタチン変異体ポリペプチドとも、ウサギ抗フォリスタチンポリクローナル抗体により検出された。

図15にFS1-1のウェスタンブロット解析を示した。FS1-1は254個のアミノ酸からなり、推定分子量は約27kDである。一方、ウェスタンブロット解析で得られた分子量は31kD、33kD、37kDである。FS1-1には糖鎖付加サイトがあることから、糖鎖の付加によって分子量が大きくなったものと考えられる。

実施例3：レポーターアッセイによるフォリスタチン変異体ポリペプチドのアクチビンおよびGDF-8機能阻害活性の検定

HEK293細胞（ATCC番号：CRL-1573）を24ウェルプレートに 5×10^4 細胞/ウェルで播種し、10%FCS、ペニシリン（100単位/ml）およびストレプトマイシン（100 μ g/ml）を添加した高グルコース含有DMEM培地（シグマアルドリッチ社製）

（以下、血清含有DMEM培地とする）1 ml中で24時間培養した。リン酸緩衝生理食

塩水 (PBS) で洗浄し、レポータープラスミド (CAGA)₁₂-MLP-Luc [EMBO J., 17, 3091 (1998)] (3 μ g/ウェル) および内部標準プラスミド CMV- β -gal (1 μ g/ウェル) をトランスフェクションした。トランスフェクションはプラスミドとカチオン性リポソーム (Transfast; プロメガ社製) の混合液を添加した血清不含 DMEM 培地 (200 μ l) 中で、細胞を2時間37°Cで培養することにより行った。さらに血清含有 DMEM 培地 (1 ml) を添加し、37°Cで24時間培養した。

細胞をPBSで洗浄した後、(a) アクチビン (10 ng/ml)、(b) GDF-8 (15 ng/ml)、(c) アクチビン (10 ng/ml) とフォリスタチン (100 ng/ml)、(d) GDF-8 (15 ng/ml) とフォリスタチン (100 ng/ml)、(e) アクチビン (10 ng/ml) とフォリスタチン変異体ポリペプチドFS1-1溶液5 μ l、もしくは(f) GDF-8 (15 ng/ml) とフォリスタチン変異体ポリペプチドFS1-1溶液5 μ lをそれぞれ含む血清不含 DMEM 培地200 μ l/ウェルを添加し、37°Cで24時間培養した。PBSで洗浄した後、細胞溶解用緩衝液 [1% (v/v) トリトンX-100、15 mmol/l MgSO₄、4 mmol/l エチレングリコール-ビス (2-アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-4 酢酸、1 mmol/l DL-ジチオスレイトール、25 mmol/l グリシルグリシン、pH 7.0] を100 μ l/ウェル添加し、0°Cで15分間放置し、細胞溶解液を調製した。細胞溶解液50 μ lをルシフェラーゼアッセイ用緩衝液 [0.24 mmol/l ルシフェリン、1.4 mmol/l ATP、4.8 mmol/l KH₂PO₄、4.8 mmol/l MgCl₂、pH 7.4] 105 μ lと混合し、発光量をルミノメータ [マイクロルーマツト

(MicroLumat) LP98P; ベルトールド (BERTHOLD) 社製] を用いて測定した。反応開始から20秒間の相対光度 (RLU) 値を積算し、ルシフェラーゼ活性とした。続いて細胞溶解液35 μ lを β -ガラクトシダーゼアッセイ用緩衝液 [1.6 mg/ml o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド、60 mmol/l Na₂HPO₄、40 mmol/l NaH₂PO₄、10 mmol/l KCl、1 mmol/l MgCl₂、50 mmol/l β -メルカプトエタノール] 235 μ lと混合し、吸光度 (OD) を吸光度計 [マイクロプレートリーダー・ベンチマーク (Microplate Reader Benchmark); バイオラッド (BIO-RAD) 社製] を用いて測定した。以下の式によって与えられる値を標準化ルシフェラーゼ活性

とし、転写促進活性の指標とした。

標準化ルシフェラーゼ活性 = RLU/OD

測定結果を図16に示す。フォリスタチンは、アクチビンおよびGDF-8による標準化ルシフェラーゼ活性の上昇をいずれも100%阻害した。一方、フォリスタチン変異体ポリペプチドは、GDF-8による標準化ルシフェラーゼ活性の上昇を86%阻害したのに対して、アクチビンによる標準化ルシフェラーゼ活性の上昇を17%しか阻害しなかった。

フォリスタチン変異体ポリペプチドFS1、FS1-1-3およびFS1-1-2'についても、上記のFS1-1と同様なアッセイを行った。その結果、図17および図18に示すように、FS1、FS1-1-3はFS1-1と同様に、GDF-8による標準化ルシフェラーゼ活性の上昇をほぼ完全に阻害したのに対して、アクチビンによる標準化ルシフェラーゼ活性の上昇はほとんど阻害しなかった。ただし、FS1はFS1-1よりも、またFS1-1-3はFS1よりも、アクチビンによる標準化ルシフェラーゼ活性の上昇を阻害する程度がやや強く、3種類の中ではFS1-1が最も選択的にGDF-8の活性を阻害することがわかった。したがって、選択的にGDF-8の活性を阻害するためには、フォリスタチン変異体ポリペプチドにおいて、FSIの数は2個以上ある方がよく、FSIIだけでなくFSIIIも欠失している方が好ましいことがわかった。また、FS1-1-2'はGDF-8による標準化ルシフェラーゼ活性の上昇だけでなく、アクチビンによる標準化ルシフェラーゼ活性の上昇も阻害した。したがって、選択的にGDF-8の活性を阻害するためには、フォリスタチン変異体ポリペプチドにおいて、FSIIおよびFSII様ドメインを有しないことが好ましいことがわかった。

実施例4：フォリスタチン変異体ポリペプチドを過剰発現させたマウスの骨格筋量の増大および脂肪量の減少

実施例1で作製したpcDNA3 (A+B)をEcoRIおよびSacIで切断して得られる、フォリスタチン変異体ポリペプチドFS1-1をコードするDNAを含むEcoRI-SacI断片を、ベクターpSP72 (プロメガ社製)のEcoRI部位およびSacI部位の間に挿入し

た。得られたプラスミドをEcoRIおよびSmaIで切断して得られる、フォリスタチン変異体ポリペプチドFS1-1をコードするDNAを含むEcoRI-SacI断片を、MDAF2ベクター〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 9306 (2001)〕のミオシン軽鎖のプロモーターの下流に存在するEcoRI部位およびSacI部位の間に挿入し、プラスミドMDAF2-FS1-1を得た。

MDAF2-FS1-1の約3.7 kbpのClaI断片を単離し、BDF1マウスの受精卵221個に顕微注入した。状態の良好な受精卵をレシピエントマウスに移植し、自然出産させ、33匹の産仔を得た。ゲノムDNA中にMDAF2-FS1-1由来のDNAが導入されていることが確認されたトランスジェニックマウスの系統を維持した。該トランスジェニックマウスは、ミオシン軽鎖のプロモーターによりフォリスタチン変異体ポリペプチドFS1-1を骨格筋特異的に過剰発現する。このようにして得られたトランスジェニックマウスでは、骨格筋の明らかな増加が観察された。例として、14週齢のオスのトランスジェニックマウスと野生型マウスの大胸筋、大殿筋、上腕二頭筋を採取し、重量を測定した結果を図19に示す。野生型マウスと比較してトランスジェニックマウスでは、測定した全ての骨格筋の重量が増加していた。

さらに、このようにして得られたトランスジェニックマウスの、皮下脂肪および内臓脂肪の量を測定し、フォリスタチン変異体ポリペプチドがこれらの脂肪量に与える影響を調べた。皮下脂肪としては鼠径部の皮下脂肪、内臓脂肪としては腎臓周囲の脂肪、それぞれの重量を測定し、体重に対する割合(%)を量の指標とした。その結果、トランスジェニックマウスでは、皮下脂肪量および内臓脂肪量ともに、野生型マウスと比較して著しく減少していることがわかった。例として、図20に12週齢のメスのトランスジェニックマウスおよび12週齢のメスの野生型マウスそれぞれの、体重に対する皮下脂肪量(%)および内臓脂肪量(%)を示した。野生型マウスは3匹の平均値を示した。また、オスのトランスジェニックマウスでも同様に、皮下脂肪量および内臓脂肪量の著しい減少が見られた。なお、トランスジェニックマウスでは、骨格筋の増加と脂肪の減少以外の異常は観察されなかった。

実施例5：フォリスタチン変異体ポリペプチドとイムノグロブリン定常領域との融合蛋白質によるGDF-8特異的な機能阻害

(1) フォリスタチン変異体ポリペプチドとイムノグロブリン定常領域との融合蛋白質の発現ベクターの作製

フォリスタチン変異体ポリペプチドFS1およびFS1-1それぞれとイムノグロブリンの定常領域との融合蛋白質の発現ベクターを以下のようにして作製した。

実施例1で作製したpGEM-T Easy (B)を鋳型にして、プライマーとして配列番号27および28に示した塩基配列を有する合成DNA (ジェンセット社製) をそれぞれ10 pmolずつ用いて、実施例1の遺伝子増幅断片Aと同様の条件でPCRを行い、反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、5' 端にKpnIサイト、3' 端にBamHIサイトがそれぞれ付加されたFS1をコードする増幅断片を回収した。得られた増幅断片をKpnIおよびBamHIで切断し、CD5-IgG1ベクター [Cell, 61, 1303 (1990)] を制限酵素KpnIおよびBamHIで切断して得られるヒトIgG1定常領域をコードするゲノム配列を含むKpnI-BamHI断片と連結し、FS1のC末端にヒトIgG1の定常領域が融合した融合蛋白質 (以下、FS1-Fcとよぶ) 発現プラスミドpcDNA3 FS1-Fcを作製した。CD5-IgG1ベクターでは、ベクターpcDNA3のプロモーターの下流のXhoIサイト-XbaIサイト間にヒトIgG1定常領域をコードする配列が挿入されているので、pcDNA3 FS1-Fcは、pcDNA3のプロモーターの下流に、FS1-Fcをコードする配列が挿入された構造を有する。

実施例1で作製したpBluscript (A+B)をEcoRIおよびEcoRVで切断して得られるFS1-1をコードする配列を含む断片を、ベクターpSP72 (プロメガ社製) のEcoRIサイト-SmaIサイトに挿入した。得られたプラスミドをEcoRIおよびBamHIで切断して得られるFS1-1をコードする配列を含む断片を、pBluscript SK(-)のEcoRIサイト-bamHIサイトに挿入した。得られたプラスミドをKpnIKpnIおよびBamHIで切断して得られるFS1-1をコードする配列を含む断片を、CD5-IgG1ベクターを制限酵素KpnIおよびBamHIで切断して得られるヒトIgG1定常領域をコードす

るゲノム配列を含むKpnI-BamHI断片と連結し、FS1-1のC末端にヒトIgG1の定常領域が融合した融合蛋白質（以下、FS1-1-Fcとよぶ）発現プラスミドpcDNA3 FS1-1-Fcを作製した。pcDNA3 FS1-1-Fcは、pcDNA3のプロモーターの下流に、FS1-1-Fcをコードする配列が挿入された構造を有する。

（２）CHO-K1細胞への発現ベクターの導入と培養

CHO-K1（ATCC番号：CCL-61）細胞にpcDNA3 FS1-FcまたはpcDNA3 FS1-1-Fcそれぞれをリポソーム試薬Transfast（プロメガ社製）を用いて導入した後、安定に導入した遺伝子が組み込まれたシングルクローンを得た。それぞれのシングルクローンをFCSを10%添加した α MEM培地10 mlに懸濁し、10 cm径細胞培養ディッシュに播種した。5% CO₂インキュベーター内で37℃、コンフルエントになるまで培養した後、EX-CELL 301培地（JRHバイオサイエンス社製）へ培地交換して、細胞培養ディッシュ6枚で1週間培養し、培養上清約60 mlを回収した。

（３）FS1-FcおよびFS1-1-Fcの精製

（２）で得られたFS1-Fc、FS1-1-Fcそれぞれを発現するCHO-K1細胞の培養上清に1/10量のヘパリンセルロファイン（生化学工業社製）を加えて、室温で2時間混合し、蛋白質を吸着させた。ヘパリンセルロファインを洗浄バッファー〔20 mmol/L Tris-HCl (pH7.4), 0.15 mol/L NaCl〕で洗浄後、溶出バッファー〔20 mmol/L Tris-HCl (pH7.4), 1.5 mol/L NaCl〕を用いて吸着蛋白質を溶出させた。得られた溶出液から、イムノグロブリンの定常領域と特異的に結合するプロテインA固定化レジンを用いて、常法に従って、FS1-Fc溶液およびFS1-1-Fc溶液それぞれを得た。

（４）FS1-FcおよびFS1-1-FcのアクチビンおよびGDF-8機能阻害活性の検定

（a）緩衝液のみ、（b）FS1-Fc（20 μ g/ml）（c）アクチビン（15 ng/ml）、（d）アクチビン（15 ng/ml）とFS1-Fc（20 μ g/ml）、（e）GDF-8（15 ng/ml）、（f）GDF-8（15 ng/ml）とFS1-Fc（10 μ g/ml）および（g）GDF-8（15 ng/ml）とFS1-Fc（20 μ g/ml）それぞれの条件で、実施例3と同様にしてレポーターアッセイにより、FS1-FcのアクチビンおよびGDF-8機能阻害活性

の検定を行った。図 2 1 に示すように、FS1-FcはGDF-8による標準化ルシフェラーゼ活性の上昇をほぼ完全に阻害したのに対して、アクチビンによる標準化ルシフェラーゼ活性の上昇はほとんど阻害しなかった。

同様にして、(a) 緩衝液のみ、(b) FS1-1-Fc (20 μ g/ml) (c) アクチビン (15 ng/ml)、(d) アクチビン (15 ng/ml) とFS1-1-Fc (20 μ g/ml)、(e) GDF-8 (15 ng/ml)、および(f) GDF-8 (15 ng/ml) とFS1-Fc (20 μ g/ml) それぞれの条件で、FS1-1-FcのアクチビンおよびGDF-8機能阻害活性の検定を行った。図 2 2 に示すように、FS1-1-FcはGDF-8による標準化ルシフェラーゼ活性の上昇をほぼ完全に阻害したのに対して、アクチビンによる標準化ルシフェラーゼ活性の上昇はほとんど阻害しなかった。

以上から、フォリスタチン変異体ポリペプチドとイムノグロブリンの定常領域の融合蛋白質であるFS1-FcおよびFS1-1-Fcは、FS1およびFS1-1と同様に、選択的にGDF-8の活性を阻害できることが確認された。

産業上の利用可能性

本発明により、アクチビンの活性の阻害と比較して、GDF-8の活性を選択的に阻害するフォリスタチン変異体ポリペプチドが提供される。該フォリスタチン変異体ポリペプチドは、骨格筋の増加および脂肪の減少に用いることができる。また、筋萎縮症状の治療、悪液質、筋萎縮を伴う疾患、II型糖尿病、肥満および後天性免疫不全症候群の治療に用いることができる。

請求の範囲

1. (a) フォリスタチンドメインIを含み、
 (b) 式(I) : $Cys - (X^1)_a - Cys - (X^2)_b - Cys - (X^3)_c - Cys - (X^4)_d - Cys - (X^5)_e - Cys - (X^6)_f - Cys - (X^7)_g - Cys - (X^8)_h - Cys - (X^9)_i - Cys$ (式中、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 X^5 、 X^6 、 X^7 、 X^8 および X^9 は、それぞれ独立して同一または異なった、システイン以外の天然に存在するアミノ酸残基を表し、 a は2～6、 b は3～7、 c は7～11、 d は0～4、 e は1～6、 f および g は8～12、 h は4～8、 i は11～15の整数をそれぞれ表す。) で表されるアミノ酸配列であって、かつ配列番号2または配列番号29のアミノ酸配列と50%以上の相同性を有する配列を含まず、かつ
 (c) アクチビンの活性の阻害と比較して、GDF-8の活性を選択的に阻害する、ことを特徴とするフォリスタチン変異体ポリペプチド。
2. フォリスタチンドメインIを含み、フォリスタチンドメインIIを欠失した請求項1に記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。
3. さらにフォリスタチンドメインIIIを含まない、請求項1または2に記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。
4. 2つ以上のフォリスタチンドメインIを含む、請求項1から3のいずれか1項に記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。
5. さらにN末端ドメインを含む、請求項1から4のいずれか1項に記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。
6. FSI、FSI-FSI、FSI-FSI-FSIII、FSN-FSI、FSN-FSI-FSI、又はFSN-FSI-FSI-FSIII (ここでFSIはフォリスタチンドメインIを示し、FSIIIはフォリスタチンドメインIIIを示し、FSNはN末端ドメインを示し、各ドメイン間は直接またはリンカーポリペプチドで連結している) から選択されるいずれかのドメイン構造を含む請求項1または2に記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。

7. フォリスタチンドメインIが配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチドである請求項1から6のいずれか1項に記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。

8. 配列番号4の30～166番目のアミノ酸配列を含む、請求項7に記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。

9. フォリスタチンのドメインのアミノ酸配列のN末端またはC末端に他のポリペプチドが融合している、請求項1から8の何れか1項に記載のフォリスタチン変異体ポリペプチド。

10. 配列番号6、8または10のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

11. 請求項1から10のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

12. 配列番号5、7または9の塩基配列を含む請求項11に記載のポリヌクレオチド。

13. 請求項11または12に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

14. 請求項13に記載のベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞。

15. 請求項14に記載の形質転換細胞を培地中で培養し、該細胞で発現した請求項1から10のいずれか1項に記載のポリペプチドを培地または該細胞中に蓄積させ、培地または該細胞から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

16. 請求項1から10のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項11または12に記載のポリヌクレオチドまたは請求項13に記載のベクターを含有するアクチピンは阻害しないGDF-8選択的な阻害剤。

17. 請求項1から10のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項11または12に記載のポリヌクレオチドまたは請求項13に記載のベクターを含有する医薬組成物。

18. 請求項1から10のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項11

または12に記載のポリヌクレオチドまたは請求項13に記載のベクターを有効成分として含有する、骨格筋増加剤。

19. 請求項1から10のいずれか1項に記載のペプチド、請求項11または12に記載のポリヌクレオチドまたは請求項13に記載のベクターを有効成分として含有する、脂肪減少剤。

20. 請求項1から10のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項11または12に記載のポリヌクレオチドまたは請求項13に記載のベクターを有効成分として含有する、筋萎縮症状の治療剤または予防剤。

21. 請求項1から10のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項11または12に記載のポリヌクレオチドまたは請求項13に記載のベクターを有効成分として含有する、悪液質、筋萎縮を伴う疾患、II型糖尿病、肥満または後天性免疫不全症候群の治療剤または予防剤。

22. 筋萎縮を伴う疾患が、遺伝性の筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症またはパーキンソン病である請求項21に記載の治療剤または予防剤。

23. 請求項11または12に記載のポリヌクレオチドを含む外来遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

24. 非ヒト動物に請求項1から10のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項11または12に記載のポリヌクレオチドまたは請求項13に記載のベクターを投与して、該非ヒト動物の筋肉を増加させる方法。

25. 非ヒト動物に請求項1から10のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項11または12に記載のポリヌクレオチドまたは請求項13に記載のベクターを投与して、該非ヒト動物の脂肪を減少させる方法。

26. レポータープラスミドを有する細胞をアクチビン、GDF-8、アクチビンと被験物質、又はGDF-8と被験物質の存在下で培養し、レポーターアッセイを行うことを含む、被験物質のアクチビンおよびGDF-8機能阻害活性を検定する方法。

27. レポーターとしてルシフェラーゼを使用する、請求項26に記載の方法。

28. 被験物質として、(a) フォリスタチンドメインIを含み、(b) 式(I): $Cys - (X^1)_a - Cys - (X^2)_b - Cys - (X^3)_c - Cys - (X^4)_d - Cys - (X^5)_e - Cys - (X^6)_f - Cys - (X^7)_g - Cys - (X^8)_h - Cys - (X^9)_i - Cys$ (式中、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 X^5 、 X^6 、 X^7 、 X^8 および X^9 は、それぞれ独立して同一または異なった、システイン以外の天然に存在するアミノ酸残基を表し、aは2～6、bは3～7、cは7～11、dは0～4、eは1～6、fおよびgは8～12、hは4～8、iは11～15の整数をそれぞれ表す。) で表されるアミノ酸配列であって、かつ配列番号2または配列番号29のアミノ酸配列と50%以上の相同性を有する配列を含まないフォリスタチン変異体ポリペプチドを使用する、請求項26又は27に記載の方法。

図 2

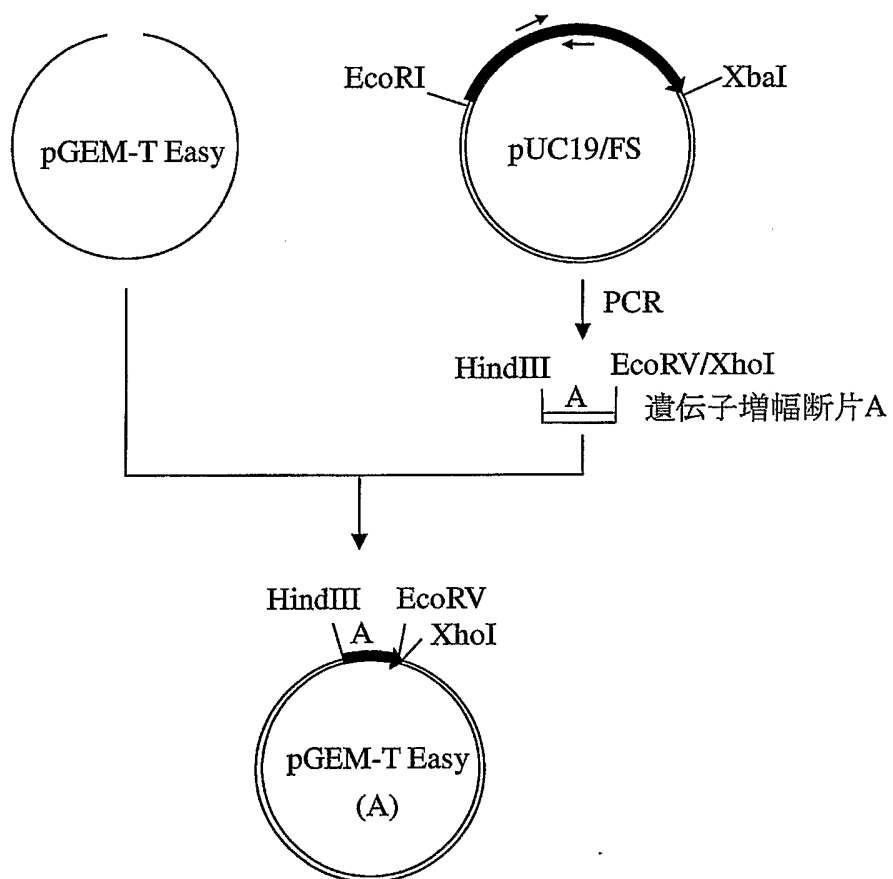


図 3

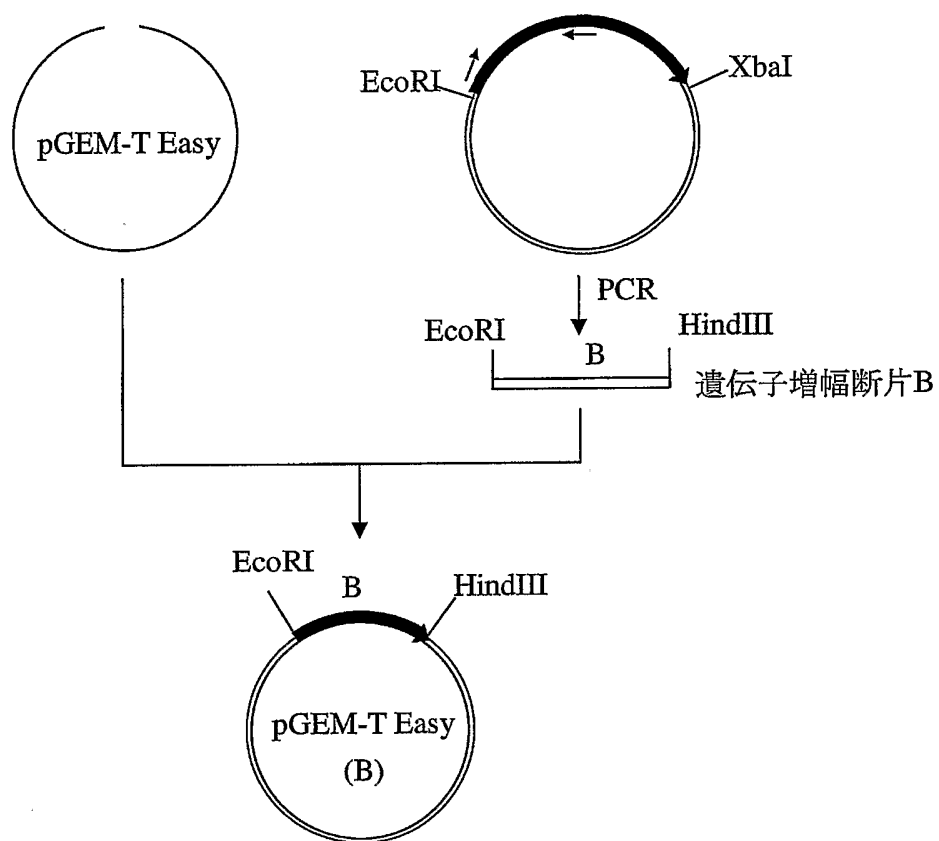


図 4

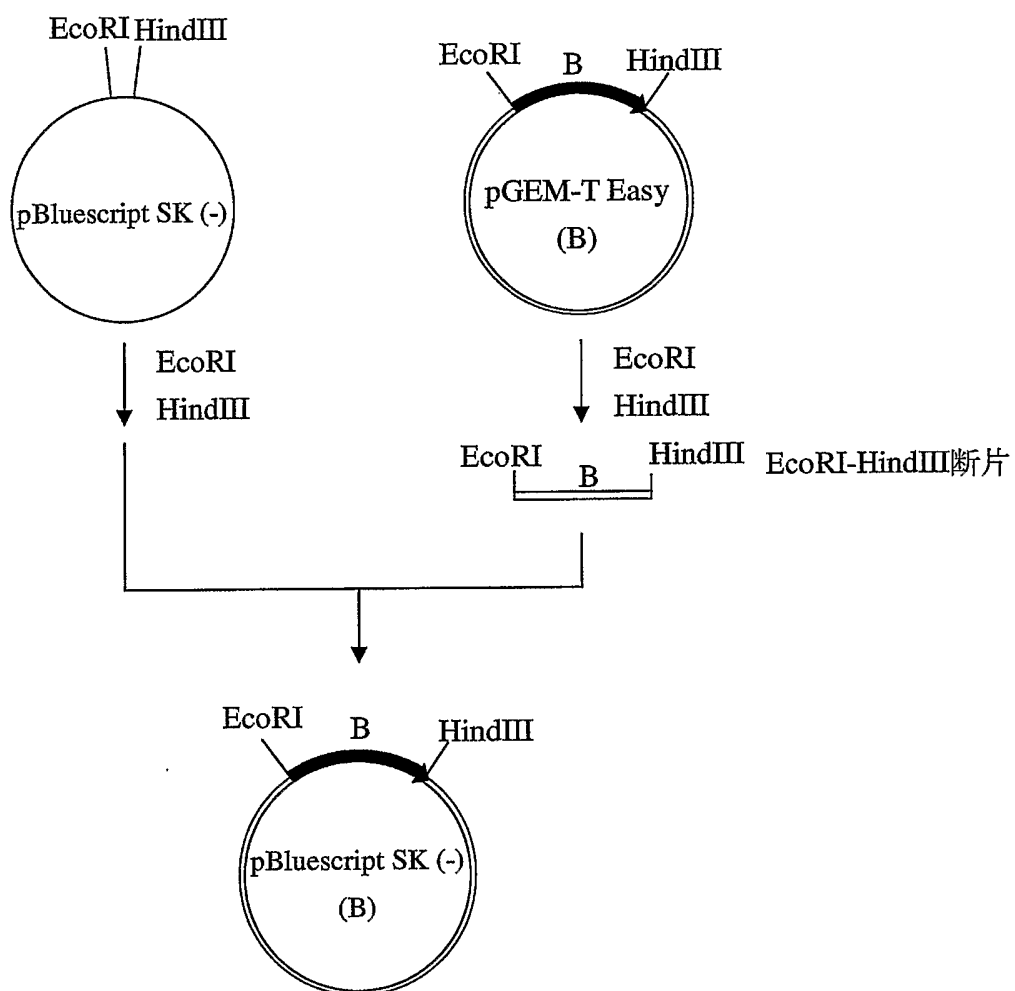


図 5

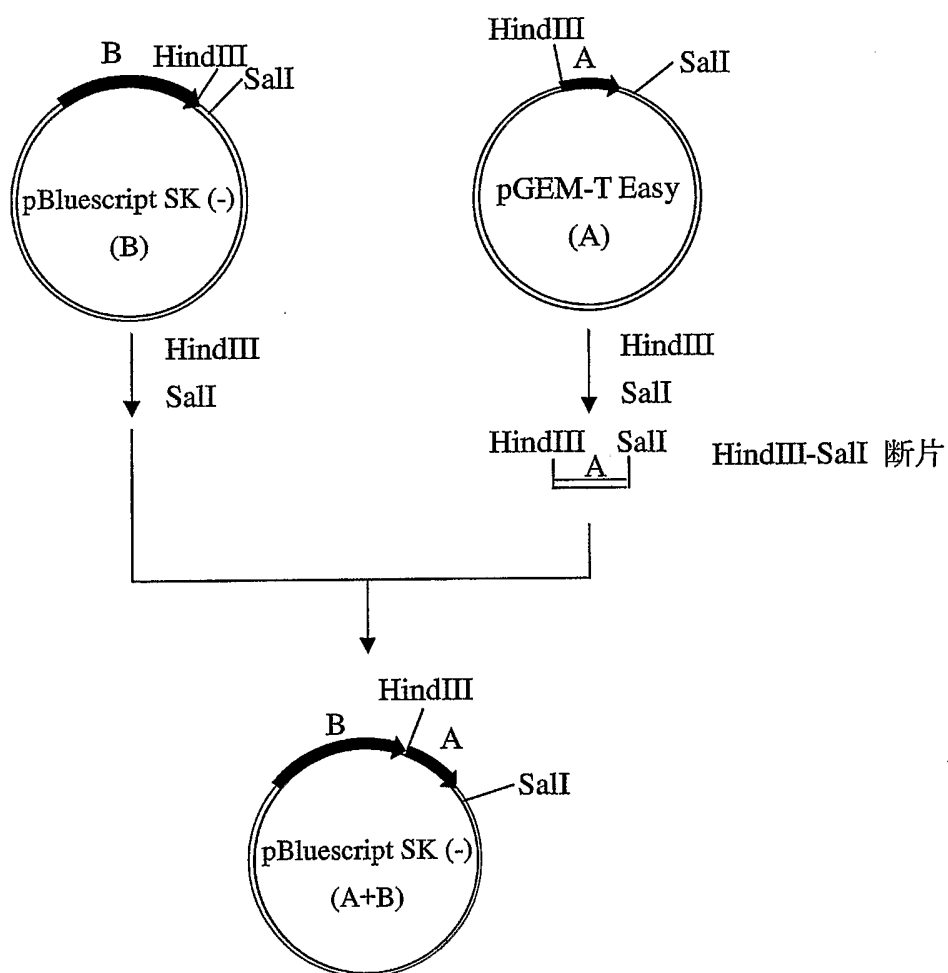


図 6

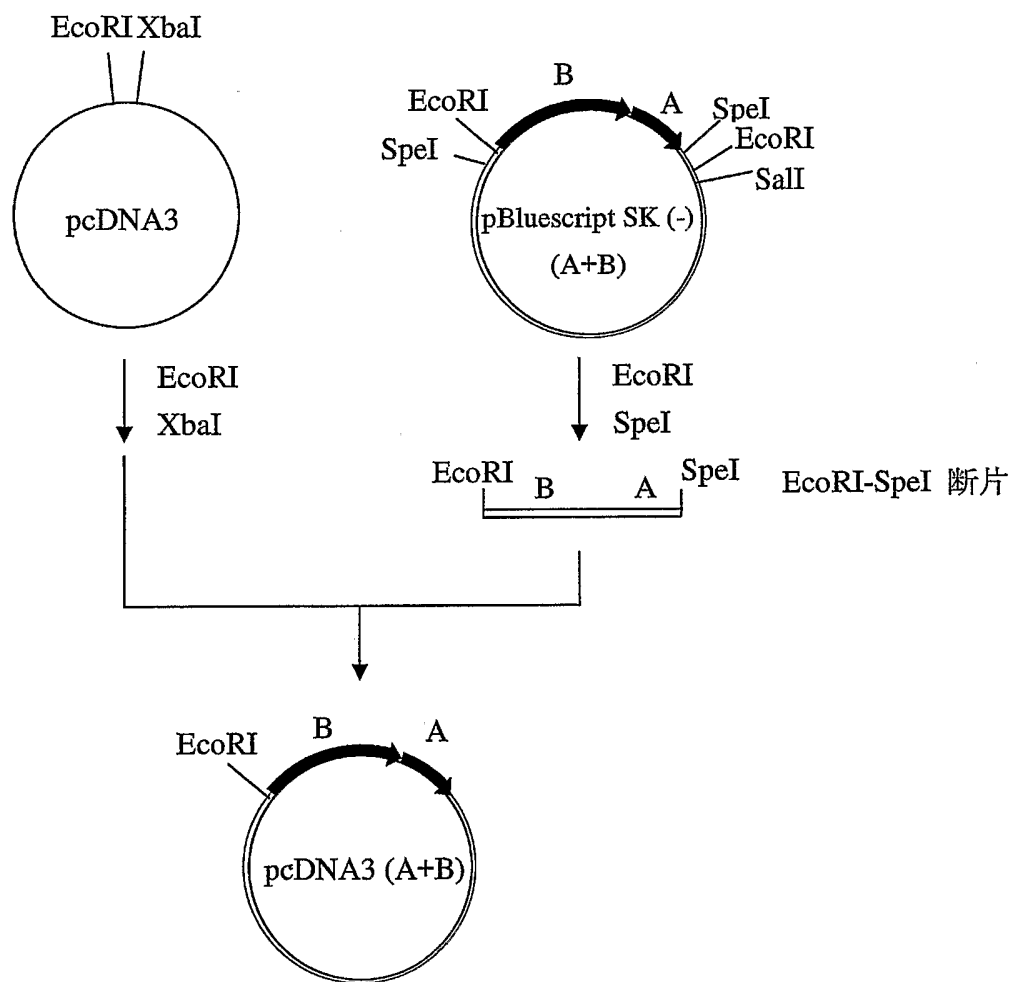


図 7

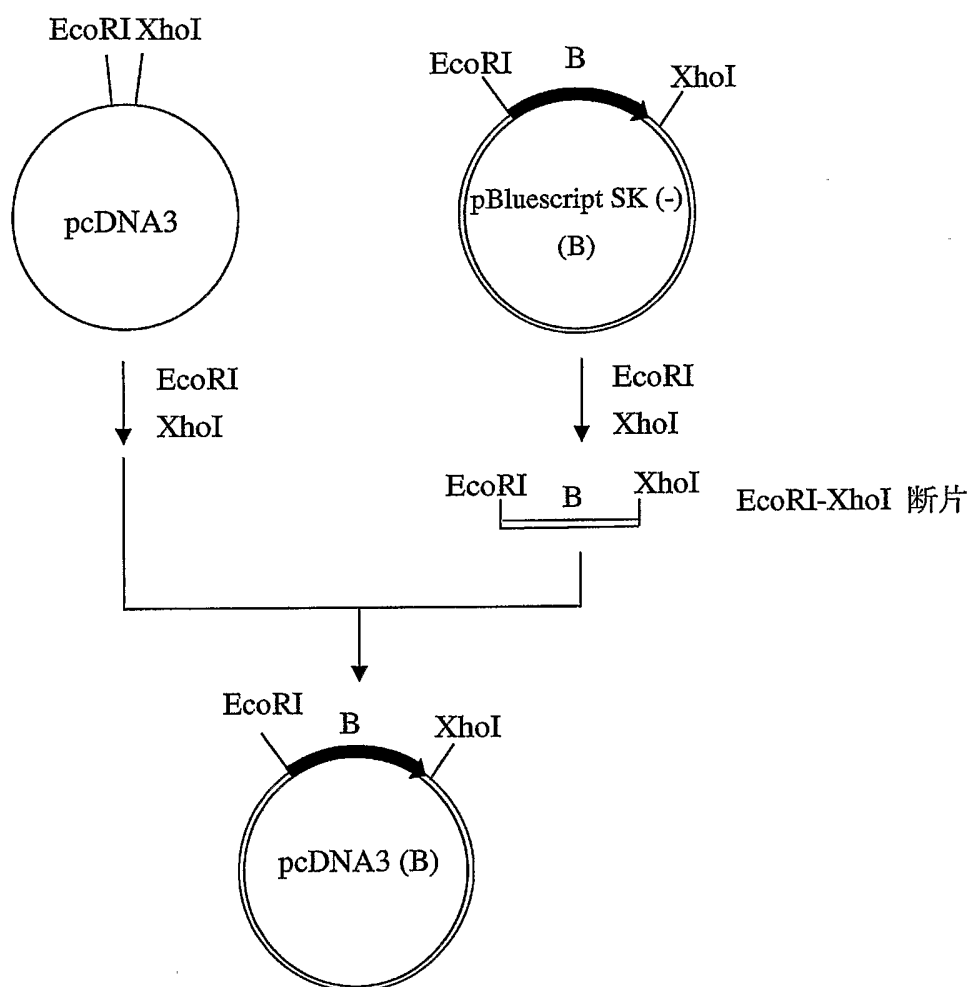


図 8

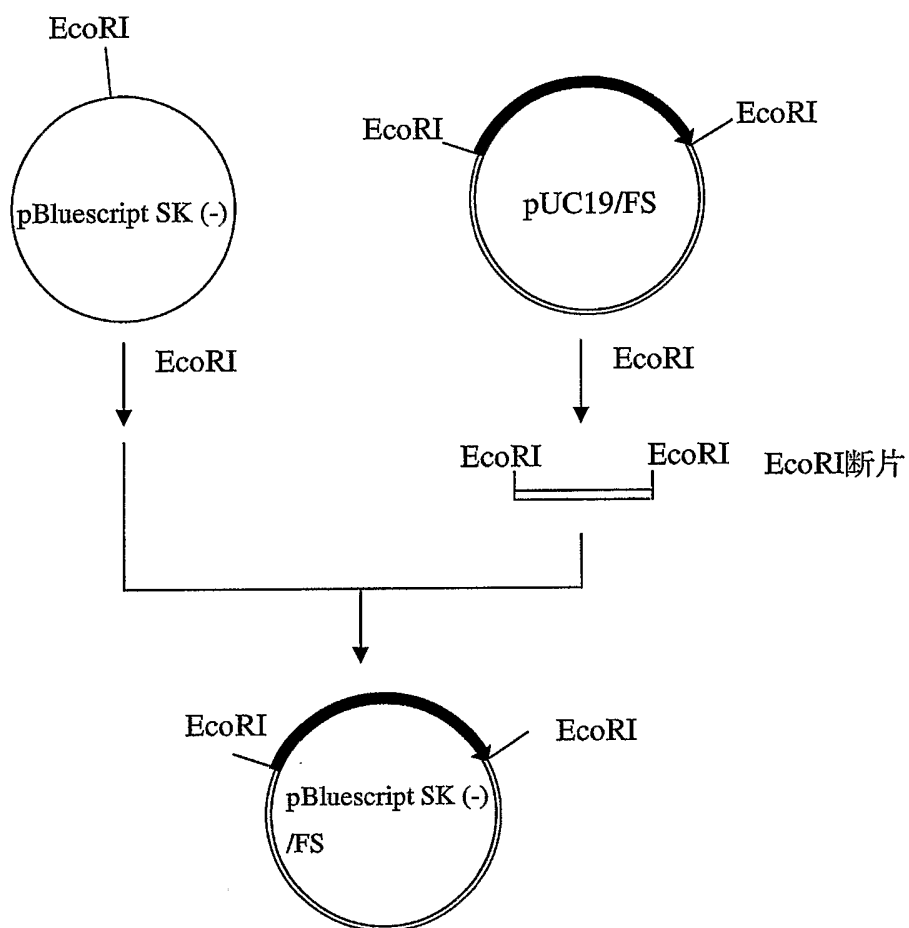


図 9

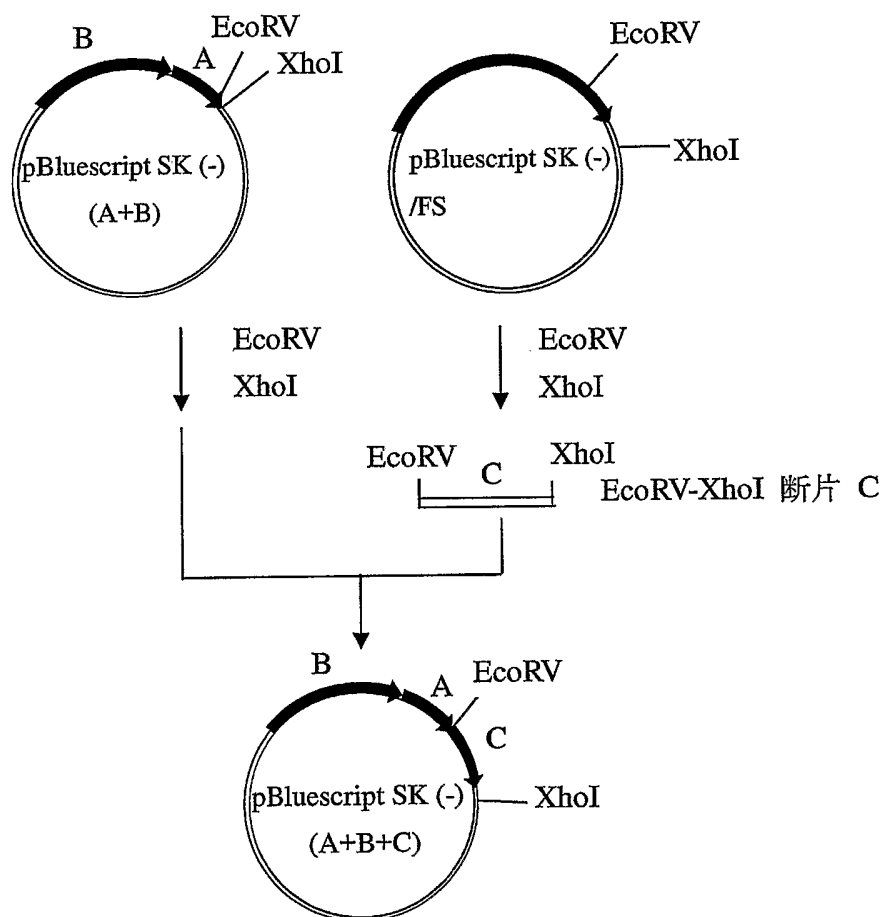


図 10

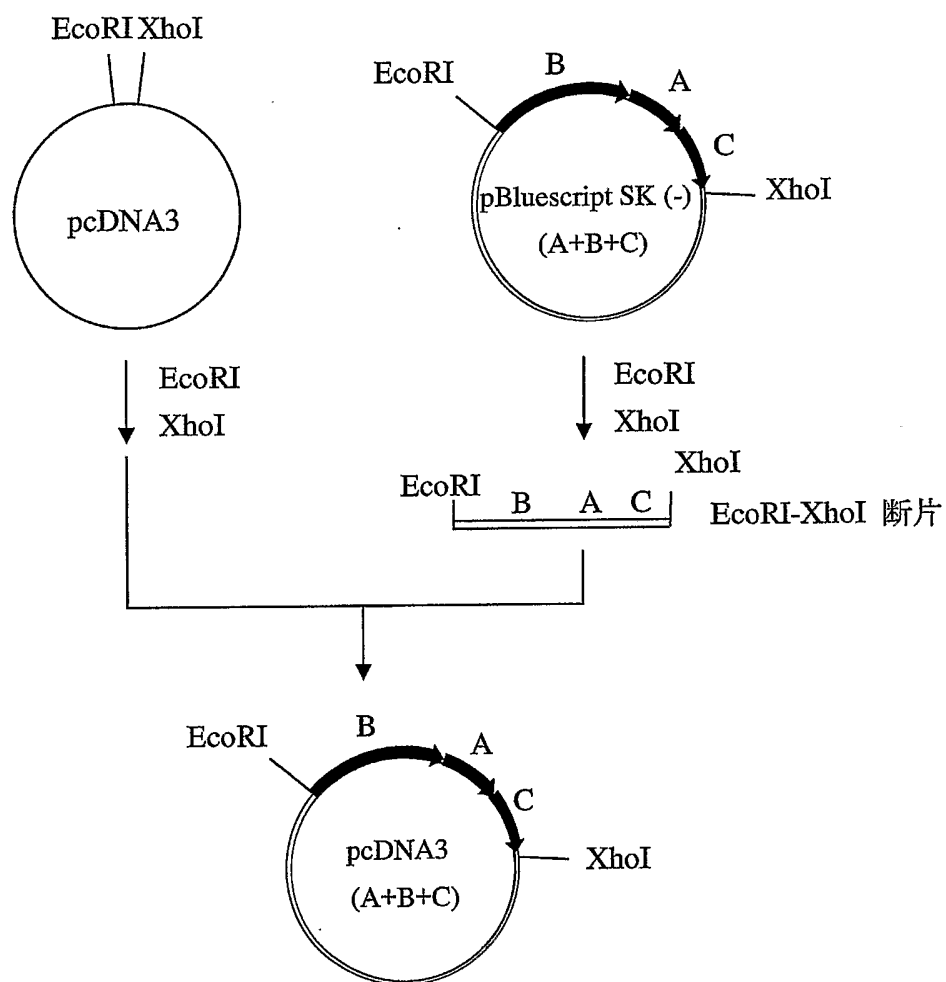


図 11

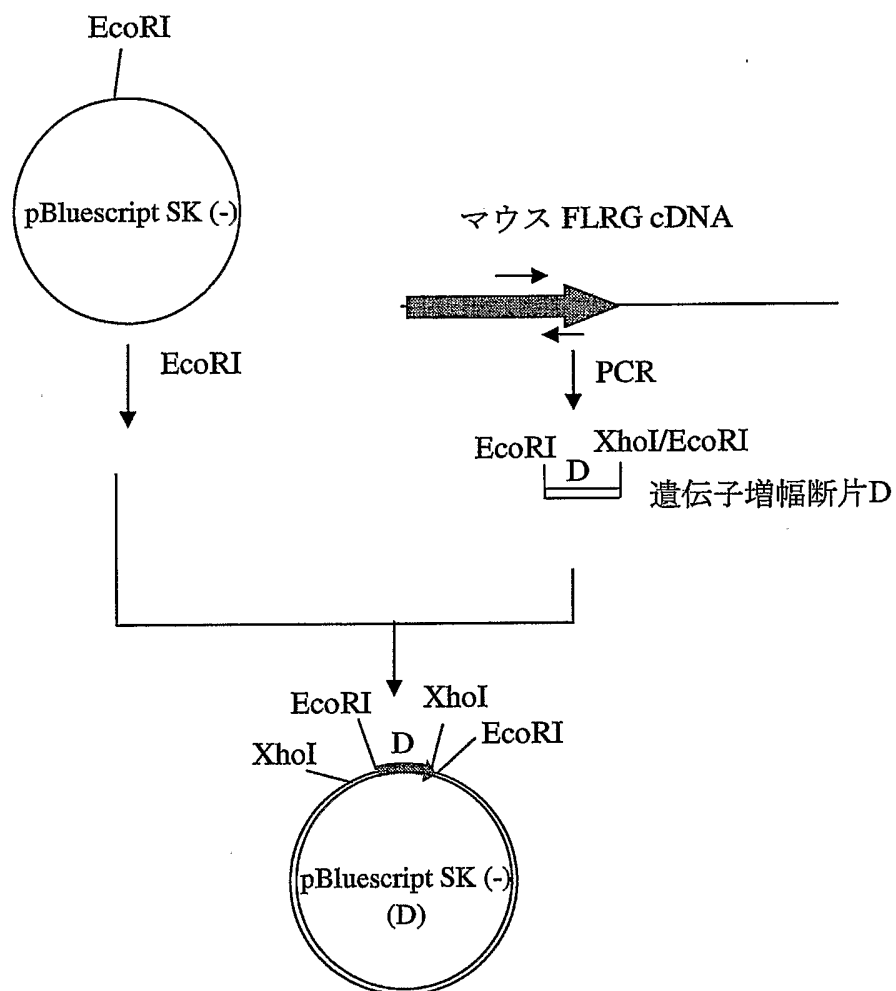


図 12

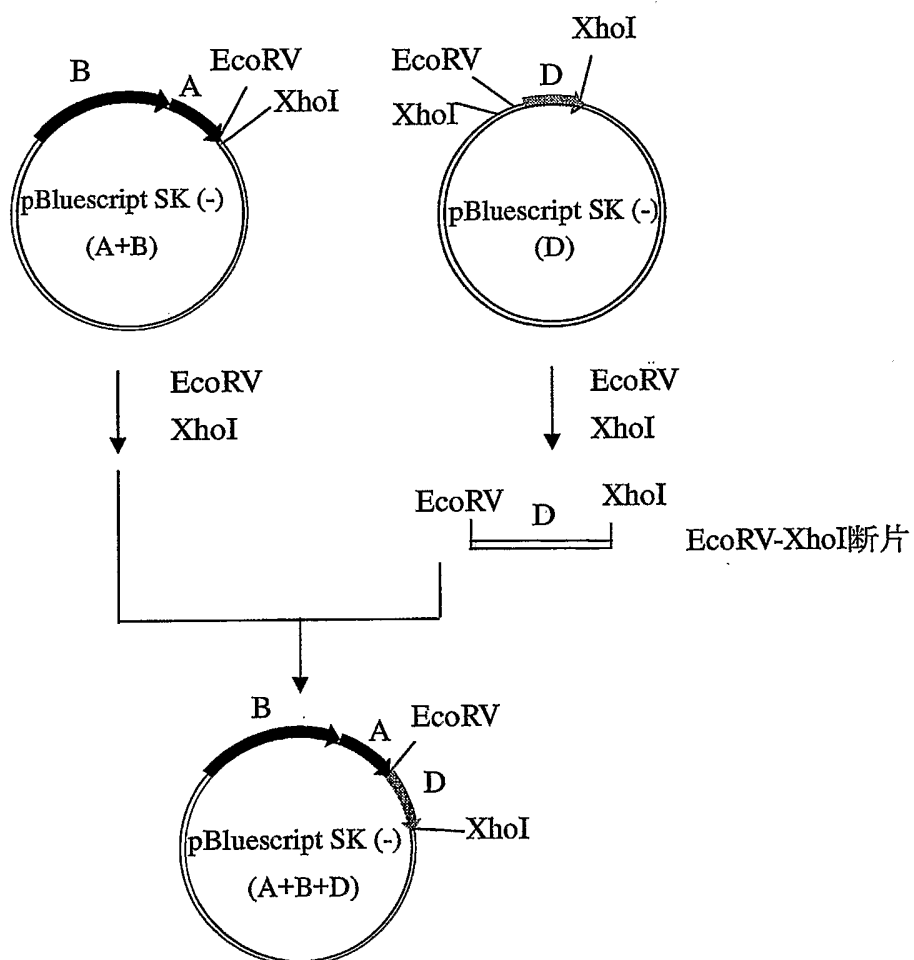


図 13

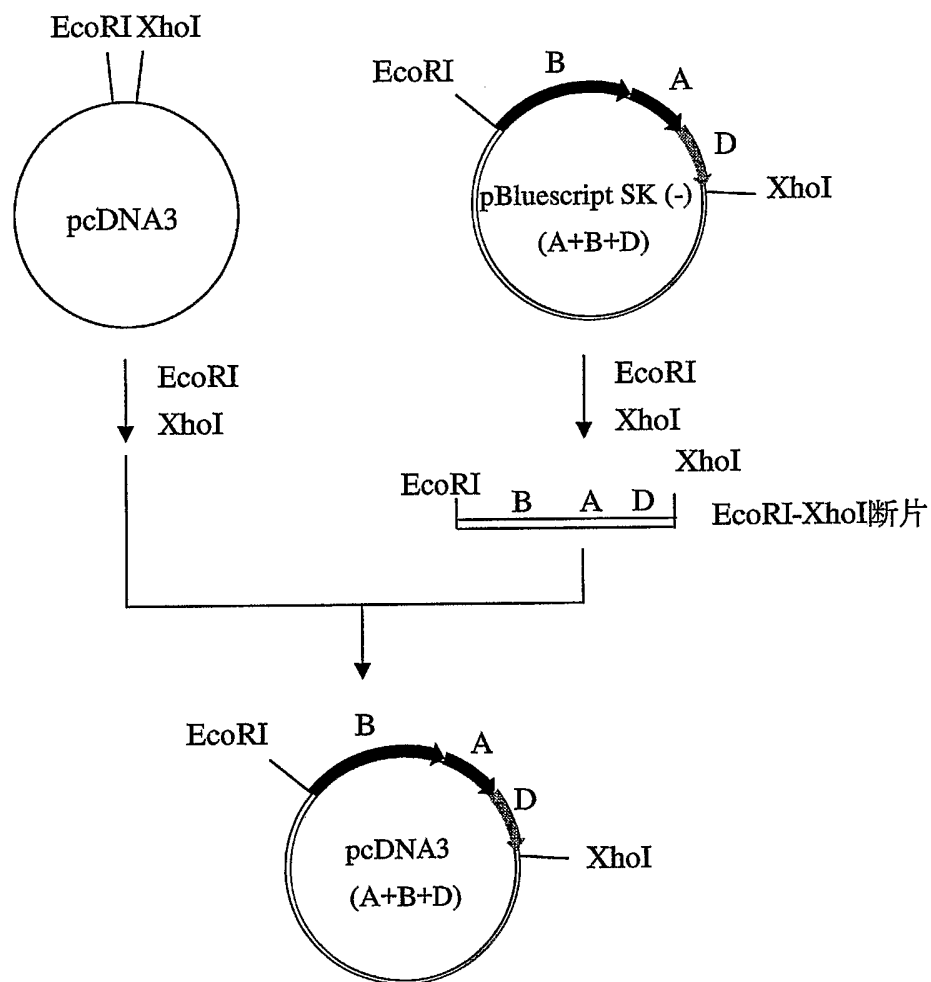


図 14

ファリスタチンFSII : CRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI-CPEPSSSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCCLLGRSIGLAYEGKC
FLRG FSII様ドメイン: CAQVVCPRPQSCLYDQTGSAHCVVCRAAPCPVPSNPGQELCGNNNVITYISSCHLRQATCFLGRSIGVRHPGIC
配列番号2 : CRDVXCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI-CPEPXSSEQYLCGNDGXTYXSACHLRKATCCLLGRSIGLAYEGKC

図 15

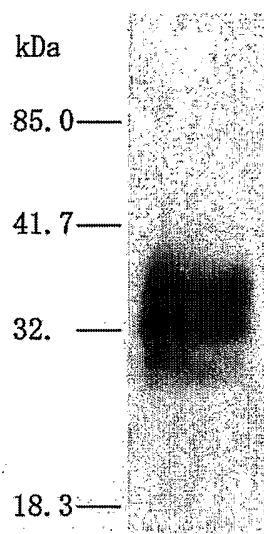


図 16

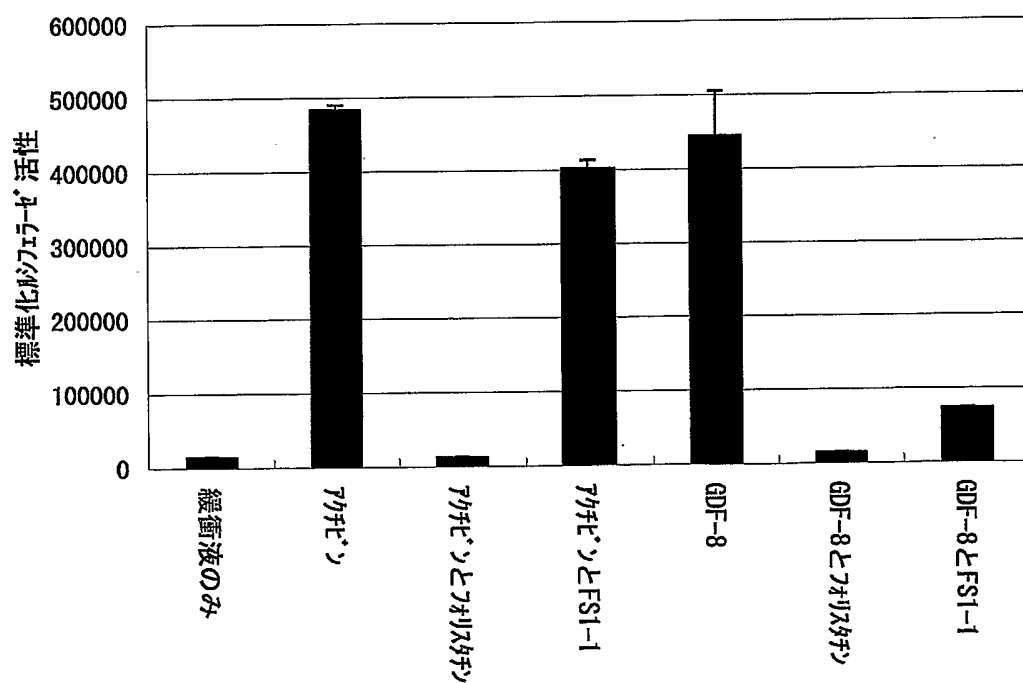


図 17

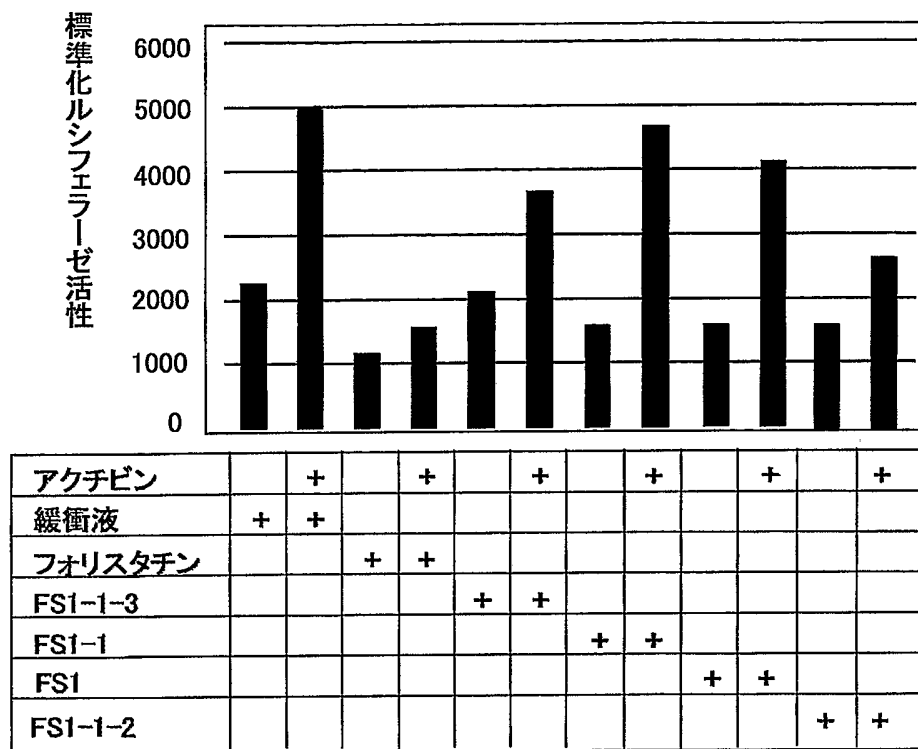


図 18

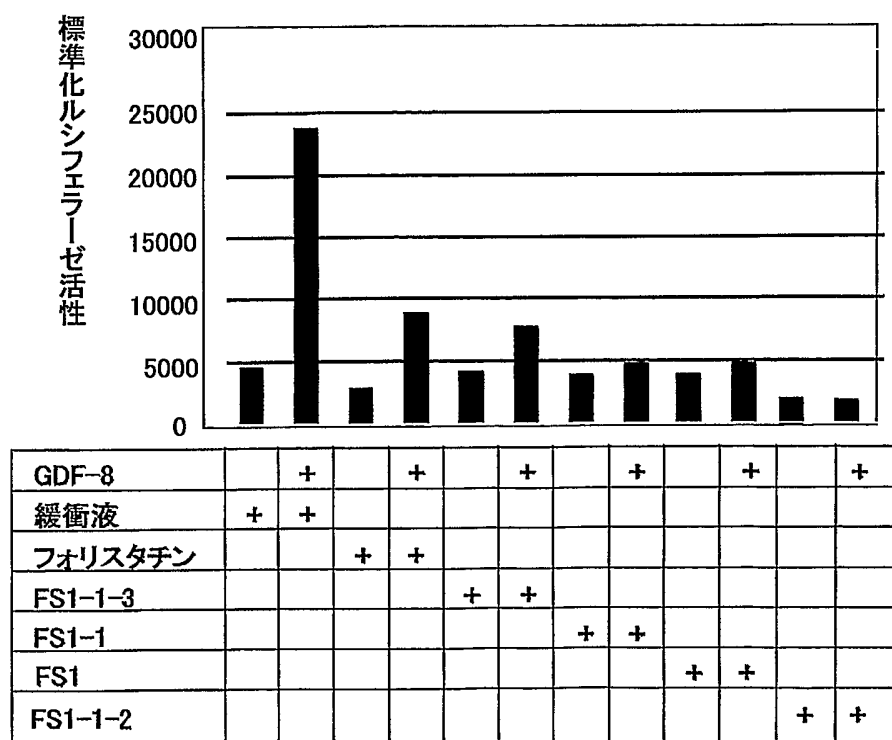


図 19

骨格筋肉量 (g)

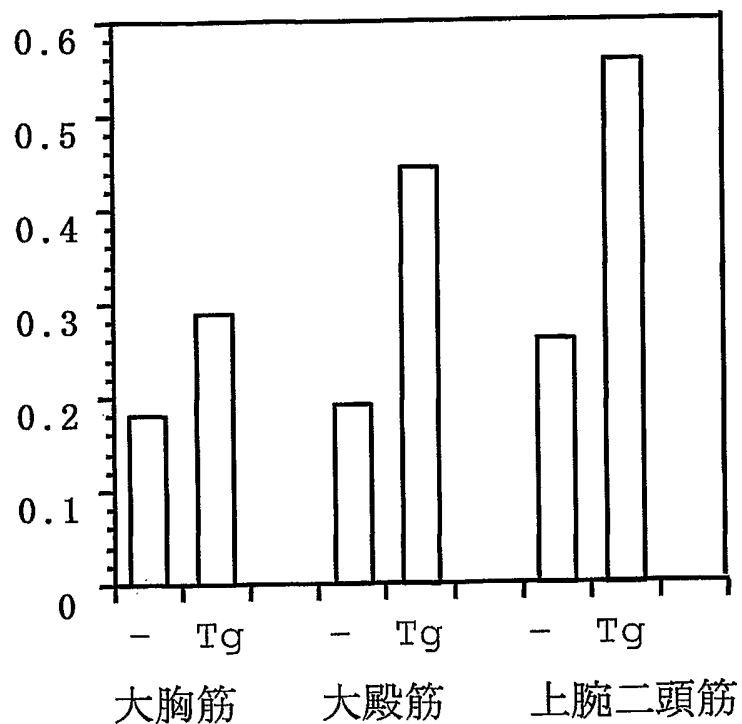


図 20

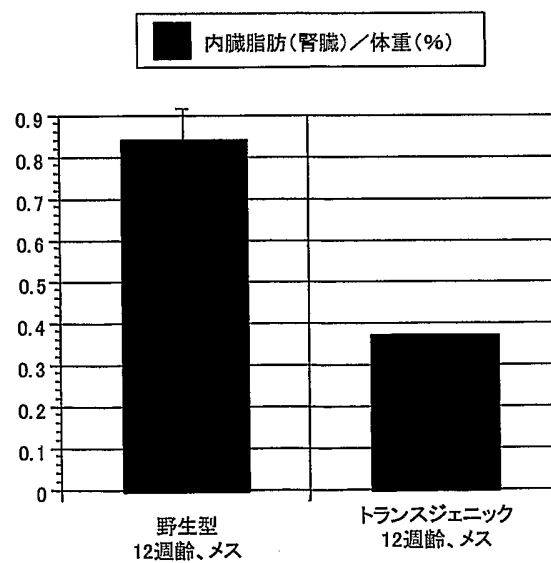
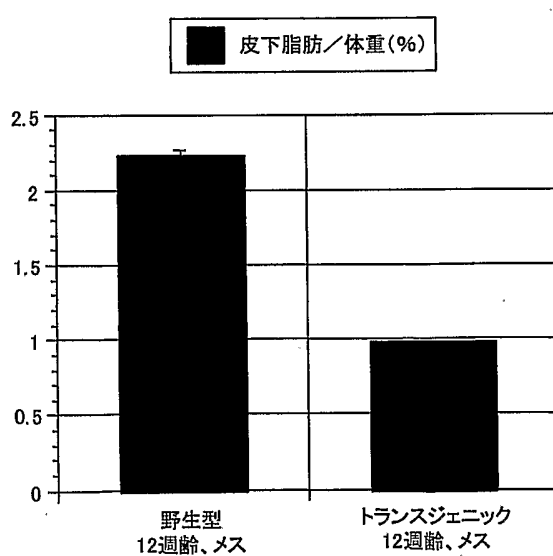


図 21

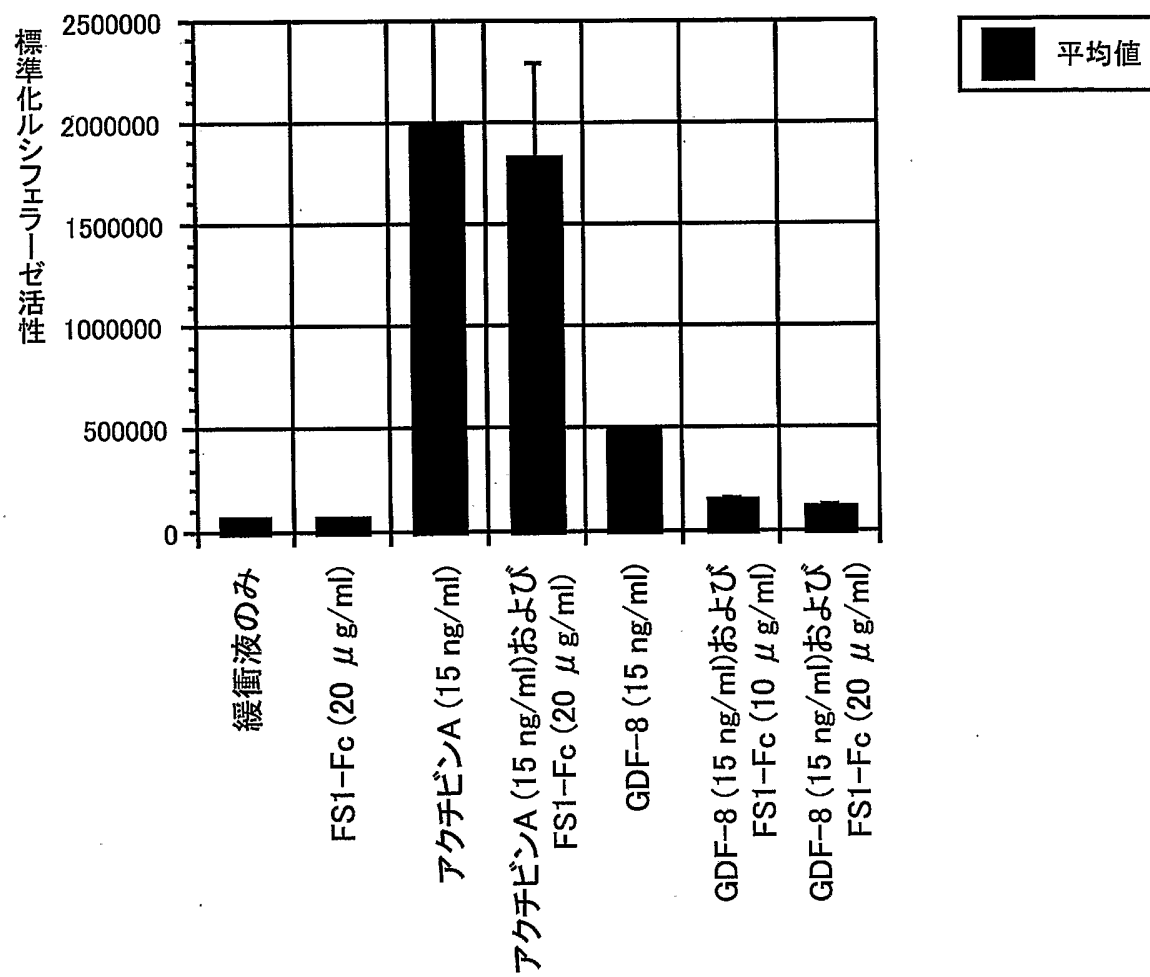
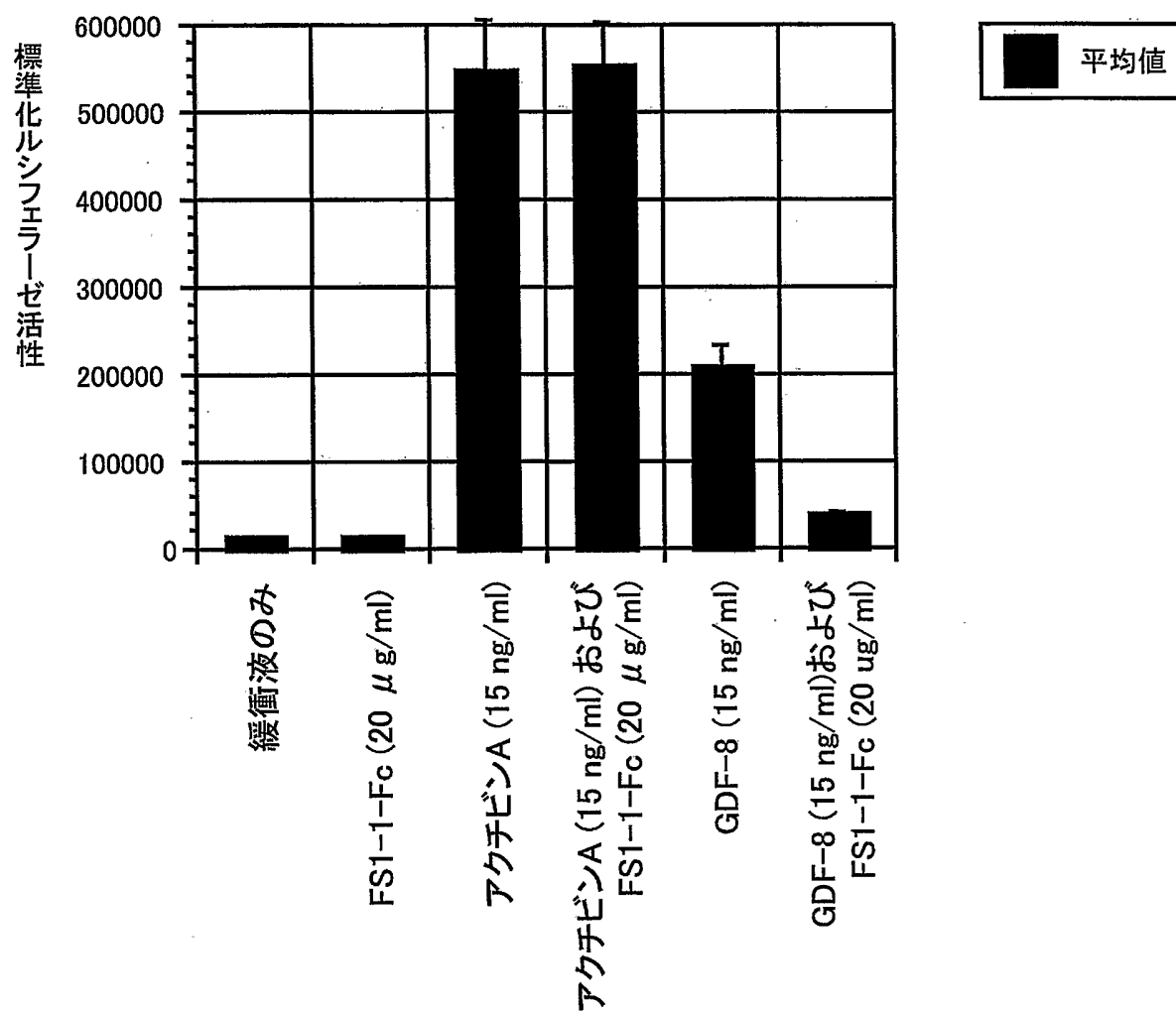


図 22



SEQUENCE LISTING

<110> Techno Network Shikoku Co., Ltd.
<110> Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.
<120> follistatin mutant polypeptide
<130> A51236A
<150> JP 2004-120023
<151> 2004-04-15
<150> JP 2004-355293
<151> 2004-12-08
<160> 29
<170> PatentIn version 3.2
<210> 1
<211> 70
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> follistatin domain I consensus sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is Glu or Asp
<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Xaa is Arg or Lys
<220>
<221> misc_feature

<222> (69).. (69)

<223> Xaa is Lys or Arg

<220>

<223> Inventor: Tsuchida, Kunihiro; Murakami, Tatsuya

<400> 1

Cys Xaa Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Xaa Met Asn Lys

1 5 10 15

Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr

20 25 30

Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu

35 40 45

Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val

50 55 60

Gln Tyr Gln Gly Xaa Cys

65 70

<210> 2

<211> 72

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> follistatin domain II consensus sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (5).. (5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid except cysteine

<220>

<221> misc_feature

<222> (33).. (33)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid except cysteine

<220>

<221> misc_feature

<222> (35).. (35)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid except cysteine

<220>

<221> misc_feature

<222> (38).. (38)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid except cysteine

<220>

<221> misc_feature

<222> (45).. (45)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid except cysteine

<220>

<221> misc_feature

<222> (48).. (48)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid except cysteine

<400> 2

Cys Arg Asp Val Xaa Cys Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln

1 5 10 15

Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro

20 25 30

Xaa Ser Xaa Glu Gln Xaa Leu Cys Gly Asn Asp Gly Xaa Thr Tyr Xaa

35 40 45

Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile

50 55 60

Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys

65

70

<210> 3

<211> 1035

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1035)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(87)

<400> 3

atg gtc cgc gcg agg cac cag ccg ggt ggg ctt tgc ctc ctg ctg ctg 48

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu

1

5

10

15

ctg ctc tgc cag ttc atg gag gac cgc agt gcc cag gct ggg aac tgc 96

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys

20

25

30

tgg ctc cgt caa gcg aag aac ggc cgc tgc cag gtc ctg tac aag acc 144

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr

35

40

45

gaa ctg agc aag gag gag tgc tgc agc acc ggc cgg ctg agc acc tcg 192

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser

50

55

60

tgg acc gag gag gac gtg aat gac aac aca ctc ttc aag tgg atg att 240

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile

65	70	75	80	
ttc aac ggg ggc gcc ccc aac tgc atc ccc tgt aaa gaa acg tgt gag				288
Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu				
	85	90	95	
aac gtg gac tgt gga cct ggg aaa aaa tgc cga atg aac aag aag aac				336
Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn				
	100	105	110	
aaa ccc cgc tgc gtc tgc gcc ccg gat tgt tcc aac atc acc tgg aag				384
Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys				
	115	120	125	
ggt cca gtc tgc ggg ctg gat ggg aaa acc tac cgc aat gaa tgt gca				432
Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala				
	130	135	140	
ctc cta aag gca aga tgt aaa gag cag cca gaa ctg gaa gtc cag tac				480
Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr				
	145	150	155	160
caa ggc aga tgt aaa aag act tgt cgg gat gtt ttc tgt cca ggc agc				528
Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser				
	165	170	175	
tcc aca tgt gtg gtg gac cag acc aat aat gcc tac tgt gtg acc tgt				576
Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys				
	180	185	190	
aat cgg att tgc cca gag cct gct tcc tct gag caa tat ctc tgt ggg				624
Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly				
	195	200	205	
aat gat gga gtc acc tac tcc agt gcc tgc cac ctg aga aag gct acc				672
Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr				

210	215	220	
tgc ctg ctg ggc aga tct att gga tta gcc tat gag gga aag tgt atc			720
Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile			
225	230	235	240
aaa gca aag tcc tgt gaa gat atc cag tgc act ggt ggg aaa aaa tgt			768
Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys			
	245	250	255
tta tgg gat ttc aag gtt ggg aga ggc cgg tgt tcc ctc tgt gat gag			816
Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu			
	260	265	270
ctg tgc cct gac agt aag tcg gat gag cct gtc tgt gcc agt gac aat			864
Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn			
	275	280	285
gcc act tat gcc agc gag tgt gcc atg aag gaa gct gcc tgc tcc tca			912
Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser			
	290	295	300
ggt gtg cta ctg gaa gta aag cac tcc gga tct tgc aac tcc att tcg			960
Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser			
305	310	315	320
gaa gac acc gag gaa gag gag gaa gat gaa gac cag gac tac agc ttt			1008
Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser Phe			
	325	330	335
cct ata tct tct att cta gag tgg taa			1035
Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp			
	340		
<210> 4			
<211> 344			

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1).. (29)

<400> 4

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys

20 25 30

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr

35 40 45

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser

50 55 60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile

65 70 75 80

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu

85 90 95

Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn

100 105 110

Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys

115 120 125

Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala

130 135 140

Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr

145 150 155 160

Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser

165 170 175
 Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys
 180 185 190
 Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly
 195 200 205
 Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr
 210 215 220
 Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile
 225 230 235 240
 Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys
 245 250 255
 Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu
 260 265 270
 Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn
 275 280 285
 Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser
 290 295 300
 Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser
 305 310 315 320
 Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser Phe
 325 330 335
 Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp
 340

<210> 5

<211> 678

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> FS-1-1

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (678)

<400> 5

ggg aac tgc tgg ctc cgt caa gcg aag aac ggc cgc tgc cag gtc ctg 48

Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu

1 5 10 15

tac aag acc gaa ctg agc aag gag gag tgc tgc agc acc ggc cgg ctg 96

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu

20 25 30

agc acc tcg tgg acc gag gag gac gtg aat gac aac aca ctc ttc aag 144

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys

35 40 45

tgg atg att ttc aac ggg ggc gcc ccc aac tgc atc ccc tgt aaa gaa 192

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu

50 55 60

acg tgt gag aac gtg gac tgt gga cct ggg aaa aaa tgc cga atg aac 240

Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn

65 70 75 80

aag aag aac aaa ccc cgc tgc gtc tgc gcc ccg gat tgt tcc aac atc 288

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile

85 90 95

acc tgg aag ggt cca gtc tgc ggg ctg gat ggg aaa acc tac cgc aat 336

Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn

100 105 110

gaa tgt gca ctc cta aag gca aga tgt aaa gag cag cca gaa ctg gaa 384
 Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu
 115 120 125
 gtc cag tac caa ggc aga tgt aaa aag ctt tgt gag aac gtg gac tgt 432
 Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Leu Cys Glu Asn Val Asp Cys
 130 135 140
 gga cct ggg aaa aaa tgc cga atg aac aag aag aac aaa ccc cgc tgc 480
 Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys
 145 150 155 160
 gtc tgc gcc ccg gat tgt tcc aac atc acc tgg aag ggt cca gtc tgc 528
 Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys
 165 170 175
 ggg ctg gat ggg aaa acc tac cgc aat gaa tgt gca ctc cta aag gca 576
 Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala
 180 185 190
 aga tgt aaa gag cag cca gaa ctg gaa gtc cag tac caa ggc aga tgt 624
 Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys
 195 200 205
 aaa aag act tgt gaa gat atc tcg agg caa tca cta gag ggc cct att 672
 Lys Lys Thr Cys Glu Asp Ile Ser Arg Gln Ser Leu Glu Gly Pro Ile
 210 215 220
 cta tag 678
 Leu
 225
 <210> 6
 <211> 225
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> FS-1-1

<400> 6

Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
1 5 10 15
Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30
Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
35 40 45
Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
50 55 60
Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
65 70 75 80
Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
85 90 95
Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
100 105 110
Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu
115 120 125
Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Leu Cys Glu Asn Val Asp Cys
130 135 140
Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys
145 150 155 160
Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys
165 170 175
Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala

180 185 190
 Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys
 195 200 205
 Lys Lys Thr Cys Glu Asp Ile Ser Arg Gln Ser Leu Glu Gly Pro Ile
 210 215 220
 Leu
 225
 <210> 7
 <211> 480
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> FS-1
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (480)
 <400> 7
 ggg aac tgc tgg ctc cgt caa gcg aag aac ggc cgc tgc cag gtc ctg 48
 Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
 1 5 10 15
 tac aag acc gaa ctg agc aag gag gag tgc tgc agc acc ggc cgg ctg 96
 Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
 20 25 30
 agc acc tcg tgg acc gag gag gac gtg aat gac aac aca ctc ttc aag 144
 Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
 35 40 45
 tgg atg att ttc aac ggg ggc gcc ccc aac tgc atc ccc tgt aaa gaa 192

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
 50 55 60
 acg tgt gag aac gtg gac tgt gga cct ggg aaa aaa tgc cga atg aac 240
 Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
 65 70 75 80
 aag aag aac aaa ccc cgc tgc gtc tgc gcc ccg gat tgt tcc aac atc 288
 Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
 85 90 95
 acc tgg aag ggt cca gtc tgc ggg ctg gat ggg aaa acc tac cgc aat 336
 Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
 100 105 110
 gaa tgt gca ctc cta aag gca aga tgt aaa gag cag cca gaa ctg gaa 384
 Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu
 115 120 125
 gtc cag tac caa ggc aga tgt aaa aag ctt atc gat acc gtc gac ctc 432
 Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr Val Asp Leu
 130 135 140
 gag cat gca tct aga ggg ccc tat tct ata gtg tca cct aaa tgc tag 480
 Glu His Ala Ser Arg Gly Pro Tyr Ser Ile Val Ser Pro Lys Cys
 145 150 155

<210> 8

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> FS-1

<400> 8

Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
1 5 10 15
Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30
Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
35 40 45
Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
50 55 60
Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
65 70 75 80
Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
85 90 95
Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
100 105 110
Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu
115 120 125
Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr Val Asp Leu
130 135 140
Glu His Ala Ser Arg Gly Pro Tyr Ser Ile Val Ser Pro Lys Cys
145 150 155

<210> 9

<211> 936

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> FS-1-1-3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(936)

<400> 9

ggg aac tgc tgg ctc cgt caa gcg aag aac ggc cgc tgc cag gtc ctg 48

Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu

1 5 10 15

tac aag acc gaa ctg agc aag gag gag tgc tgc agc acc ggc cgg ctg 96

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu

20 25 30

agc acc tcg tgg acc gag gag gac gtg aat gac aac aca ctc ttc aag 144

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys

35 40 45

tgg atg att ttc aac ggg ggc gcc ccc aac tgc atc ccc tgt aaa gaa 192

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu

50 55 60

acg tgt gag aac gtg gac tgt gga cct ggg aaa aaa tgc cga atg aac 240

Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn

65 70 75 80

aag aag aac aaa ccc cgc tgc gtc tgc gcc ccg gat tgt tcc aac atc 288

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile

85 90 95

acc tgg aag ggt cca gtc tgc ggg ctg gat ggg aaa acc tac cgc aat 336

Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn

100 105 110

gaa tgt gca ctc cta aag gca aga tgt aaa gag cag cca gaa ctg gaa 384

Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu

115 120 125

gtc cag tac caa ggc aga tgt aaa aag ctt tgt gag aac gtg gac tgt	432
Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Leu Cys Glu Asn Val Asp Cys	
130 135 140	
gga cct ggg aaa aaa tgc cga atg aac aag aag aac aaa ccc cgc tgc	480
Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys	
145 150 155 160	
gtc tgc gcc ccg gat tgt tcc aac atc acc tgg aag ggt cca gtc tgc	528
Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys	
165 170 175	
ggg ctg gat ggg aaa acc tac cgc aat gaa tgt gca ctc cta aag gca	576
Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala	
180 185 190	
aga tgt aaa gag cag cca gaa ctg gaa gtc cag tac caa ggc aga tgt	624
Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys	
195 200 205	
aaa aag act tgt gaa gat atc cag tgc act ggt ggg aaa aaa tgt tta	672
Lys Lys Thr Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys Leu	
210 215 220	
tgg gat ttc aag gtt ggg aga ggc cgg tgt tcc ctc tgt gat gag ctg	720
Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu Leu	
225 230 235 240	
tgc cct gac agt aag tcg gat gag cct gtc tgt gcc agt gac aat gcc	768
Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn Ala	
245 250 255	
act tat gcc agc gag tgt gcc atg aag gaa gct gcc tgc tcc tca ggt	816
Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser Gly	
260 265 270	

gtg cta ctg gaa gta aag cac tcc gga tct tgc aac tcc att tcg gaa 864
 Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser Glu

275

280

285

gac acc gag gaa gag gag gaa gat gaa gac cag gac tac agc ttt cct 912
 Asp Thr Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser Phe Pro

290

295

300

ata tct tct att cta gag tgg taa 936
 Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp

305

310

<210> 10

<211> 311

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> FS-1-1-3

<400> 10

Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu

1

5

10

15

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu

20

25

30

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys

35

40

45

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu

50

55

60

Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn

65

70

75

80

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile

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

Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp

305

310

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for fragment A

<400> 11

gcaagctttg tgagaacgtg gactgtg

27

<210> 12

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for fragment A

<400> 12

gcctcgagat atcttcacaa gtcttttttac atctgcc

37

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for fragment B

<400> 13

cggaattcat ggtccgcgcg aggcaccag

29

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for fragment B

<400> 14

cgaagctttt tacatctgcc ttgg

24

<210> 15

<211> 765

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> FS-1-1 with signal peptide

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(765)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(87)

<400> 15

atg gtc cgc gcg agg cac cag ccg ggt ggg ctt tgc ctc ctg ctg ctg

48

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu

1

5

10

15

ctg ctc tgc cag ttc atg gag gac cgc agt gcc cag gct ggg aac tgc

96

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys

20

25

30

tgg ctc cgt caa gcg aag aac ggc cgc tgc cag gtc ctg tac aag acc

144

Trp	Leu	Arg	Gln	Ala	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Gln	Val	Leu	Tyr	Lys	Thr		
	35						40					45					
gaa ctg agc aag gag gag tgc tgc agc acc ggc cgg ctg agc acc tcg																192	
Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Glu	Cys	Cys	Ser	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Thr	Ser		
	50						55					60					
tgg acc gag gag gac gtg aat gac aac aca ctc ttc aag tgg atg att																240	
Trp	Thr	Glu	Glu	Asp	Val	Asn	Asp	Asn	Thr	Leu	Phe	Lys	Trp	Met	Ile		
65						70						75			80		
ttc aac ggg ggc gcc ccc aac tgc atc ccc tgt aaa gaa acg tgt gag																288	
Phe	Asn	Gly	Gly	Ala	Pro	Asn	Cys	Ile	Pro	Cys	Lys	Glu	Thr	Cys	Glu		
						85						90			95		
aac gtg gac tgt gga cct ggg aaa aaa tgc cga atg aac aag aag aac																336	
Asn	Val	Asp	Cys	Gly	Pro	Gly	Lys	Lys	Cys	Arg	Met	Asn	Lys	Lys	Asn		
					100							105			110		
aaa ccc cgc tgc gtc tgc gcc ccg gat tgt tcc aac atc acc tgg aag																384	
Lys	Pro	Arg	Cys	Val	Cys	Ala	Pro	Asp	Cys	Ser	Asn	Ile	Thr	Trp	Lys		
					115							120			125		
ggt cca gtc tgc ggg ctg gat ggg aaa acc tac cgc aat gaa tgt gca																432	
Gly	Pro	Val	Cys	Gly	Leu	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Arg	Asn	Glu	Cys	Ala		
					130							135			140		
ctc cta aag gca aga tgt aaa gag cag cca gaa ctg gaa gtc cag tac																480	
Leu	Leu	Lys	Ala	Arg	Cys	Lys	Glu	Gln	Pro	Glu	Leu	Glu	Val	Gln	Tyr		
145						150						155			160		
caa ggc aga tgt aaa aag ctt tgt gag aac gtg gac tgt gga cct ggg																528	
Gln	Gly	Arg	Cys	Lys	Lys	Leu	Cys	Glu	Asn	Val	Asp	Cys	Gly	Pro	Gly		
						165						170			175		
aaa aaa tgc cga atg aac aag aag aac aaa ccc cgc tgc gtc tgc gcc																576	

Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala
 180 185 190
 ccg gat tgt tcc aac atc acc tgg aag ggt cca gtc tgc ggg ctg gat 624
 Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp
 195 200 205
 ggg aaa acc tac cgc aat gaa tgt gca ctc cta aag gca aga tgt aaa 672
 Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys
 210 215 220
 gag cag cca gaa ctg gaa gtc cag tac caa ggc aga tgt aaa aag act 720
 Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr
 225 230 235 240
 tgt gaa gat atc tcg agg caa tca cta gag ggc cct att cta tag 765
 Cys Glu Asp Ile Ser Arg Gln Ser Leu Glu Gly Pro Ile Leu
 245 250

<210> 16

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> FS-1-1 with signal peptide

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1).. (29)

<400> 16

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys

23/40

Cys Glu Asp Ile Ser Arg Gln Ser Leu Glu Gly Pro Ile Leu

245

250

<210> 17

<211> 567

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> FS-1 with signal peptide

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(567)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(87)

<400> 17

atg gtc cgc gcg agg cac cag ccg ggt ggg ctt tgc ctc ctg ctg ctg 48

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

ctg ctc tgc cag ttc atg gag gac cgc agt gcc cag gct ggg aac tgc 96

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys

20 25 30

tgg ctc cgt caa gcg aag aac ggc cgc tgc cag gtc ctg tac aag acc 144

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr

35 40 45

gaa ctg agc aag gag gag tgc tgc agc acc ggc cgg ctg agc acc tcg 192

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser

50 55 60

tgg acc gag gag gac gtg aat gac aac aca ctc ttc aag tgg atg att 240
 Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile
 65 70 75 80
 ttc aac ggg ggc gcc ccc aac tgc atc ccc tgt aaa gaa acg tgt gag 288
 Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu
 85 90 95
 aac gtg gac tgt gga cct ggg aaa aaa tgc cga atg aac aag aag aac 336
 Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn
 100 105 110
 aaa ccc cgc tgc gtc tgc gcc ccg gat tgt tcc aac atc acc tgg aag 384
 Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys
 115 120 125
 ggt cca gtc tgc ggg ctg gat ggg aaa acc tac cgc aat gaa tgt gca 432
 Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala
 130 135 140
 ctc cta aag gca aga tgt aaa gag cag cca gaa ctg gaa gtc cag tac 480
 Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr
 145 150 155 160
 caa ggc aga tgt aaa aag ctt atc gat acc gtc gac ctc gag cat gca 528
 Gln Gly Arg Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr Val Asp Leu Glu His Ala
 165 170 175
 tct aga ggg ccc tat tct ata gtg tca cct aaa tgc tag 567
 Ser Arg Gly Pro Tyr Ser Ile Val Ser Pro Lys Cys
 180 185

<210> 18

<211> 188

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> FS-1 with signal peptide

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1).. (29)

<400> 18

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys

20 25 30

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr

35 40 45

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser

50 55 60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile

65 70 75 80

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu

85 90 95

Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn

100 105 110

Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys

115 120 125

Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala

130 135 140

Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr

145 150 155 160

Gln Gly Arg Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr Val Asp Leu Glu His Ala

165

170

175

Ser Arg Gly Pro Tyr Ser Ile Val Ser Pro Lys Cys

180

185

<210> 19

<211> 1023

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> FS-1-1-3 with signal peptide

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1023)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(87)

<400> 19

atg gtc cgc gcg agg cac cag ccg ggt ggg ctt tgc ctc ctg ctg ctg 48

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu

1

5

10

15

ctg ctc tgc cag ttc atg gag gac cgc agt gcc cag gct ggg aac tgc 96

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys

20

25

30

tgg ctc cgt caa gcg aag aac ggc cgc tgc cag gtc ctg tac aag acc 144

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr

35

40

45

gaa ctg agc aag gag gag tgc tgc agc acc ggc cgg ctg agc acc tcg 192

Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Glu	Cys	Cys	Ser	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Thr	Ser		
50						55						60					
tgg	acc	gag	gag	gac	gtg	aat	gac	aac	aca	ctc	ttc	aag	tgg	atg	att	240	
Trp	Thr	Glu	Glu	Asp	Val	Asn	Asp	Asn	Thr	Leu	Phe	Lys	Trp	Met	Ile		
65					70					75					80		
ttc	aac	ggg	ggc	gcc	ccc	aac	tgc	atc	ccc	tgt	aaa	gaa	acg	tgt	gag	288	
Phe	Asn	Gly	Gly	Ala	Pro	Asn	Cys	Ile	Pro	Cys	Lys	Glu	Thr	Cys	Glu		
				85					90					95			
aac	gtg	gac	tgt	gga	cct	ggg	aaa	aaa	tgc	cga	atg	aac	aag	aag	aac	336	
Asn	Val	Asp	Cys	Gly	Pro	Gly	Lys	Lys	Cys	Arg	Met	Asn	Lys	Lys	Asn		
				100					105					110			
aaa	ccc	cgc	tgc	gtc	tgc	gcc	ccg	gat	tgt	tcc	aac	atc	acc	tgg	aag	384	
Lys	Pro	Arg	Cys	Val	Cys	Ala	Pro	Asp	Cys	Ser	Asn	Ile	Thr	Trp	Lys		
				115					120					125			
ggt	cca	gtc	tgc	ggg	ctg	gat	ggg	aaa	acc	tac	cgc	aat	gaa	tgt	gca	432	
Gly	Pro	Val	Cys	Gly	Leu	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Arg	Asn	Glu	Cys	Ala		
				130					135					140			
ctc	cta	aag	gca	aga	tgt	aaa	gag	cag	cca	gaa	ctg	gaa	gtc	cag	tac	480	
Leu	Leu	Lys	Ala	Arg	Cys	Lys	Glu	Gln	Pro	Glu	Leu	Glu	Val	Gln	Tyr		
145					150					155				160			
caa	ggc	aga	tgt	aaa	aag	ctt	tgt	gag	aac	gtg	gac	tgt	gga	cct	ggg	528	
Gln	Gly	Arg	Cys	Lys	Lys	Leu	Cys	Glu	Asn	Val	Asp	Cys	Gly	Pro	Gly		
				165					170					175			
aaa	aaa	tgc	cga	atg	aac	aag	aag	aac	aaa	ccc	cgc	tgc	gtc	tgc	gcc	576	
Lys	Lys	Cys	Arg	Met	Asn	Lys	Lys	Asn	Lys	Pro	Arg	Cys	Val	Cys	Ala		
				180					185					190			
ccg	gat	tgt	tcc	aac	atc	acc	tgg	aag	ggt	cca	gtc	tgc	ggg	ctg	gat	624	

Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp
 195 200 205
 ggg aaa acc tac cgc aat gaa tgt gca ctc cta aag gca aga tgt aaa 672
 Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys
 210 215 220
 gag cag cca gaa ctg gaa gtc cag tac caa ggc aga tgt aaa aag act 720
 Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr
 225 230 235 240
 tgt gaa gat atc cag tgc act ggt ggg aaa aaa tgt tta tgg gat ttc 768
 Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys Leu Trp Asp Phe
 245 250 255
 aag gtt ggg aga ggc cgg tgt tcc ctc tgt gat gag ctg tgc cct gac 816
 Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp
 260 265 270
 agt aag tcg gat gag cct gtc tgt gcc agt gac aat gcc act tat gcc 864
 Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala
 275 280 285
 agc gag tgt gcc atg aag gaa gct gcc tgc tcc tca ggt gtg cta ctg 912
 Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu
 290 295 300
 gaa gta aag cac tcc gga tct tgc aac tcc att tcg gaa gac acc gag 960
 Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser Glu Asp Thr Glu
 305 310 315 320
 gaa gag gag gaa gat gaa gac cag gac tac agc ttt cct ata tct tct 1008
 Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser Phe Pro Ile Ser Ser
 325 330 335
 att cta gag tgg taa 1023

Ile Leu Glu Trp

340

<210> 20

<211> 340

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> FS-1-1-3 with signal peptide

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1).. (29)

<400> 20

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys

20 25 30

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr

35 40 45

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser

50 55 60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile

65 70 75 80

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu

85 90 95

Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn

100 105 110

Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys

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

Ile Leu Glu Trp

340

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for fragment D

<400> 21

ccggaattct gtcaaaagtc ttgc

24

<210> 22

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for fragment D

<400> 22

ccggaattcc tcgagtcaca cgaagttctc ttctctctc

39

<210> 23

<211> 1017

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> FS-1-1-2' with signal peptide

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1017)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1).. (87)

<400> 23

atg gtc cgc gcg agg cac cag ccg ggt ggg ctt tgc ctc ctg ctg ctg 48

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

ctg ctc tgc cag ttc atg gag gac cgc agt gcc cag gct ggg aac tgc 96

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys

20 25 30

tgg ctc cgt caa gcg aag aac ggc cgc tgc cag gtc ctg tac aag acc 144

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr

35 40 45

gaa ctg agc aag gag gag tgc tgc agc acc ggc cgg ctg agc acc tcg 192

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser

50 55 60

tgg acc gag gag gac gtg aat gac aac aca ctc ttc aag tgg atg att 240

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile

65 70 75 80

ttc aac ggg ggc gcc ccc aac tgc atc ccc tgt aaa gaa acg tgt gag 288

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu

85 90 95

aac gtg gac tgt gga cct ggg aaa aaa tgc cga atg aac aag aag aac 336

Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn

100 105 110

aaa ccc cgc tgc gtc tgc gcc ccg gat tgt tcc aac atc acc tgg aag 384

Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys

115	120	125	
ggt cca gtc tgc ggg ctg gat ggg aaa acc tac cgc aat gaa tgt gca			432
Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala			
130	135	140	
ctc cta aag gca aga tgt aaa gag cag cca gaa ctg gaa gtc cag tac			480
Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr			
145	150	155	160
caa ggc aga tgt aaa aag ctt tgt gag aac gtg gac tgt gga cct ggg			528
Gln Gly Arg Cys Lys Lys Leu Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly			
165	170	175	
aaa aaa tgc cga atg aac aag aag aac aaa ccc cgc tgc gtc tgc gcc			576
Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala			
180	185	190	
ccg gat tgt tcc aac atc acc tgg aag ggt cca gtc tgc ggg ctg gat			624
Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp			
195	200	205	
ggg aaa acc tac cgc aat gaa tgt gca ctc cta aag gca aga tgt aaa			672
Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys			
210	215	220	
gag cag cca gaa ctg gaa gtc cag tac caa ggc aga tgt aaa aag act			720
Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr			
225	230	235	240
tgt gaa gat atc gaa ttc tgt caa aag tct tgc gct cag gta gtg tgc			768
Cys Glu Asp Ile Glu Phe Cys Gln Lys Ser Cys Ala Gln Val Val Cys			
245	250	255	
ccg cgt ccc cag tcg tgc ctt gtg gat cag acc ggc agc gca cac tgc			816
Pro Arg Pro Gln Ser Cys Leu Val Asp Gln Thr Gly Ser Ala His Cys			

260	265	270	
gtg gtg tgt cgc gct gcg ccc tgc cca gta cct tcc aac ccc ggc caa			864
Val Val Cys Arg Ala Ala Pro Cys Pro Val Pro Ser Asn Pro Gly Gln			
275	280	285	
gaa ctc tgt ggc aac aac aac gtt acc tac atc tcg tcg tgt cac ctg			912
Glu Leu Cys Gly Asn Asn Asn Val Thr Tyr Ile Ser Ser Cys His Leu			
290	295	300	
cgc cag gcc act tgc ttc ctg ggc cgc tcc att ggg gtt cgg cac cca			960
Arg Gln Ala Thr Cys Phe Leu Gly Arg Ser Ile Gly Val Arg His Pro			
305	310	315	320
ggc atc tgc aca ggt ggc ccc aaa gta cca gca gag gag gaa gag aac			1008
Gly Ile Cys Thr Gly Gly Pro Lys Val Pro Ala Glu Glu Glu Glu Asn			
325	330	335	
ttc gtg tga			1017
Phe Val			

<210> 24

<211> 338

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> FS-1-1-2' with signal peptide

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1).. (29)

<400> 24

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu

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

Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr
 225 230 235 240
 Cys Glu Asp Ile Glu Phe Cys Gln Lys Ser Cys Ala Gln Val Val Cys
 245 250 255
 Pro Arg Pro Gln Ser Cys Leu Val Asp Gln Thr Gly Ser Ala His Cys
 260 265 270
 Val Val Cys Arg Ala Ala Pro Cys Pro Val Pro Ser Asn Pro Gly Gln
 275 280 285
 Glu Leu Cys Gly Asn Asn Asn Val Thr Tyr Ile Ser Ser Cys His Leu
 290 295 300
 Arg Gln Ala Thr Cys Phe Leu Gly Arg Ser Ile Gly Val Arg His Pro
 305 310 315 320
 Gly Ile Cys Thr Gly Gly Pro Lys Val Pro Ala Glu Glu Glu Glu Asn
 325 330 335
 Phe Val

<210> 25

<211> 309

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> FS-1-1-2'

<400> 25

Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
 1 5 10 15
 Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
 20 25 30

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

245 250 255
 Pro Gly Gln Glu Leu Cys Gly Asn Asn Asn Val Thr Tyr Ile Ser Ser
 260 265 270
 Cys His Leu Arg Gln Ala Thr Cys Phe Leu Gly Arg Ser Ile Gly Val
 275 280 285
 Arg His Pro Gly Ile Cys Thr Gly Gly Pro Lys Val Pro Ala Glu Glu
 290 295 300
 Glu Glu Asn Phe Val

305

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr Gln Gly Arg

1

5

10

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for FS1-Fc

<400> 27

aagggtacca tgggtccgcgc gaggcaccag

30

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for FS1-Fc

<400> 28

tcgggatcca cgcagcgggg tttgtt

26

<210> 29

<211> 73

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Cys Ala Gln Val Val Cys Pro Arg Pro Gln Ser Cys Leu Val Asp Gln

1 5 10 15

Thr Gly Ser Ala His Cys Val Val Cys Arg Ala Ala Pro Cys Pro Val

20 25 30

Pro Ser Asn Pro Gly Gln Glu Leu Cys Gly Asn Asn Asn Val Thr Tyr

35 40 45

Ile Ser Ser Cys His Leu Arg Gln Ala Thr Cys Phe Leu Gly Arg Ser

50 55 60

Ile Gly Val Arg His Pro Gly Ile Cys

65 70

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007662

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K38/00, A61P3/04, 3/10, 21/00, 21/04, 37/02,
43/00, C07K14/475, 14/51, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K38/00, A61P3/04, 3/10, 21/00, 21/04, 37/02,
43/00, C07K14/475, 14/51, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAPLUS/REGISTRY (STN), JSTplus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	UCHIDA Tohru et al., A Novel Epidermal Growth Factor-like Molecule Containing Two Follistatin Modules Stimulates Tyrosine Phosphorylation of erbB-4 in MKN28 Gastric Cancer Cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 266, pages 593 to 602 (1999)	1-6, 11, 13-15 16-28
X Y	LIANG Gangning et al., The Gene for a Novel Transmembrane Protein Containing Epidermal Growth Factor and Follistatin Domain Is Frequently Hypermethylated in Human Tumor Cells, CANCER RESEARCH, 60, pages 4907 to 4912 (2000)	1-6, 11, 13-15 16-28

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 June, 2005 (21.06.05)

Date of mailing of the international search report
05 July, 2005 (05.07.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007662

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/45949 A2 (Genetics Institute, Inc.), 16 September, 1999 (16.09.99), Full text & JP 2002-506044 A & US 6004937 A & EP 1061940 A2	16-25
Y	US 5545616 A (Genentech, Inc.), 13 August, 1996 (13.08.96), (Family: none)	26-28
A	US 2003/0162714 A1 (WYETH), 28 August, 2003 (28.08.03), & WO 2003/072715 A2	1-6, 11, 13-15
A	WO 2001/032871 A2 (ZymoGenetics, Inc.), 10 May, 2001 (10.05.01), Claim 14, b) & JP 2003-527099 A & EP 1226249 A2	1-6, 11, 13-15
A	Hiroshi SUGINO, "Ser/Thr Kinase-Gata Juyotai o Kaisuru Apoptosis no Bunshi Kiko", Gan Kenkyu ni Kakawaru Tokutei Ryoiki Kenkyu Kenkyu Hokokusho Shu, Heisei 15 Nendo, pages 146, 147 (2003)	1-15
A	SHIMASAKI Shun'ichi et al., Primary structure of the human follistatin precursor and its genomic organization, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 85, pages 4218 to 4222 (1988)	1-28
A	ROBERTSON D.M. et al., THE ISOLATION OF POLYPEPTIDES WITH FSH SUPPRESSING ACTIVITY FROM BOVINE FOLLICULAR FLUID WHICH ARE STRUCTURALLY DIFFERENT TO INHIBIN, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 149(2) 744-749 (1987)	1-28
A	UENO Naoto et al., Isolation and partial characterization of follistatin: A single- chain Mr35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84, pages 8282 to 8286 (1987)	1-28

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K38/00, A61P3/04, 3/10, 21/00, 21/04, 37/02, 43/00, C07K14/475, 14/51, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K38/00, A61P3/04, 3/10, 21/00, 21/04, 37/02, 43/00, C07K14/475, 14/51, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAPLUS/REGISTRY (STN), JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	UCHIDA Tohru et al., A Novel Epidermal Growth Factor-like Molecule Containing Two Follistatin Modules Stimulates Tyrosine	1-6, 11, 13-15
Y	Phosphorylation of erbB-4 in MKN28 Gastric Cancer Cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 266, p. 593-602 (1999)	16-28
X	LIANG Gangning et al., The Gene for a Novel Transmembrane Protein Containing Epidermal Growth Factor and Follistatin Domain Is	1-6, 11, 13-15
Y	Frequently Hypermethylated in Human Tumor Cells, CANCER	16-28

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.06.2005

国際調査報告の発送日

05.7.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

植原 克典

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B

9840

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	RESEARCH, 60, p. 4907-4912 (2000)	
Y	WO 99/45949 A2 (Genetics Institute, Inc.) 1999.09.16、全文 & JP 2002-506044 A & US 6004937 A & EP 1061940 A2	16-25
Y	US 5545616 A (Genentech, Inc.) 1996.08.13 (ファミリーなし)	26-28
A	US 2003/0162714 A1 (WYETH) 2003.08.28 & WO 2003/072715 A2	1-6, 11, 13-15
A	WO 2001/032871 A2 (ZymoGenetics, Inc.) 2001.05.10、請求項14 のb) & JP 2003-527099 A & EP 1226249 A2	1-6, 11, 13-15
A	杉野弘、Ser/Thr キナーゼ型受容体を介するアポトーシスの分子機 構、がん研究に係わる特定領域研究研究報告書集 平成15年度 、P.146,147(2003)	1-15
A	SHIMASAKI Shunichi et al., Primary structure of the human follistatin precursor and its genomic organization, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, p. 4218-4222 (1988)	1-28
A	ROBERTSON D.M. et al., THE ISOLATION OF POLYPEPTIDES WITH FSH SUPPRESSING ACTIVITY FROM BOVINE FOLLICULAR FLUID WHICH ARE STRUCTURALLY DIFFERENT TO INHIBIN, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 149 (2) 744-749 (1987)	1-28
A	UENO Naoto et al., Isolation and partial characterization of follistatin: A single-chain Mr35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, p. 8282-8286 (1987)	1-28