

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成16年12月24日(2004.12.24)

【公表番号】特表2003-529317(P2003-529317A)

【公表日】平成15年10月7日(2003.10.7)

【出願番号】特願2000-589692(P2000-589692)

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09
 A 6 1 K 38/00
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02
 C 0 7 K 14/47
 C 0 7 K 16/18
 C 0 7 K 19/00
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/02
 // C 1 2 P 21/08
 (C 1 2 P 21/02
 C 1 2 R 1:91)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02
 C 0 7 K 14/47
 C 0 7 K 16/18
 C 0 7 K 19/00
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 P 21/02 C
 C 1 2 N 5/00 B
 A 6 1 K 37/02
 C 1 2 P 21/08
 C 1 2 P 21/02 C
 C 1 2 R 1:91

【手続補正書】

【提出日】平成13年7月24日(2001.7.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 7 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 7 4】

実施例14: PRO866をコードするcDNAの単離

上記実施例1に記載したようにphrapを使用して、DNAコンセンサス配列を他のEST配列に対して構築した。このコンセンサス配列は、ここにDNA 44708と命名される。DNA 44708コンセンサス配列に基づいて、1) PCRにより対象とする配列

を含む cDNA ライブライアリを同定するため、及び 2) PRO866 の全長コード化配列のクローナンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

PCR プライマー (正及び逆) は合成された :

正方向 PCR プライマー 1 :

5' - C A G C A C T G C C A G G G G A A G A G G G - 3' (配列番号 : 63)

正方向 PCR プライマー 2 :

5' - C A G G A C T C G C T A C G T C C G - 3' (配列番号 : 64)

正方向 PCR プライマー 3 :

5' - C A G C C C C T T C T C C T C C T T C T C C C - 3' (配列番号 : 65)

逆方向 PCR プライマー 1 :

5' - G C A G T T A T C A G G G A C G C A C T C A G C C - 3' (配列番号 : 66)

逆方向 PCR プライマー 2 :

5' - C C A G C G A G A G G C A G A T A G - 3' (配列番号 : 67)

逆方向 PCR プライマー 3 :

5' - C G G T C A C C G T G T C C T G C G G G A T G - 3' (配列番号 : 68)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブは、次のヌクレオチド配列を有する DNA 44708 から構築された :

ハイブリダイゼーション プローブ :

5' - C A G C C C C T T C T C C T C C T T C T C C C A C G T C C T A T C T G C C T C T C - 3' (配列番号 : 69)

全長クローナンの供給源として幾つかのライブライアリをスクリーニングするために、ライブライアリからの DNA を、上記で同定した PCR プライマー対による PCR 増幅によって選別した。次いで、ポジティブプライマーを、プローブオリゴヌクレオチド及び PCR プライマー対の一方を用いて PRO866 遺伝子をコードするクローナンを単離するのに使用した。 cDNA ライブライアリ作成のための RNA は、ヒト胎児腎臓組織 (LIB228) から単離した。

上記に示したようにして単離したクローナンの DNA 配列の決定により、 DNA 53971 - 1359 の全長配列 [Fig 25 、配列番号 : 61] と PRO866 の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA 53971 - 1359 の全核酸配列を Fig 25 (配列番号 : 61) に示す。クローナン DNA 53971 - 1359 は、単一のオープンリードィングフレームを含み、ヌクレオチド位置 275 - 277 に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置 1268 - 1270 に見かけの停止コドンを含む。予測されるポリペプチド前駆体は 331 アミノ酸長である。 Fig 26 (配列番号 : 62) に示された全長 PRO866 配列の分析により様々な重要なポリペプチドドメインの存在が証明されたが、それらの重要なポリペプチドドメインに対して与えられる位置は上記のように概略である。 Fig 26 に示された全長 PRO866 配列の分析により次のことが証明された : シグナルペプチドはおおよそアミノ酸 1 - 26 にある。グリコサミノグリカン接着部位はおおよそアミノ酸 131 - 135 にある。 cAMP - と cGMP - 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位はおおよそアミノ酸 144 - 148 にある。 N - ミリストイル化部位はおおよそアミノ酸 26 - 32 、おおよそ 74 - 80 、おおよそ 132 - 138 、おおよそ 134 - 140 、おおよそ 190 - 196 、おおよそ 287 - 293 、及びおおよそ 290 - 296 にある。クローナン DNA 53971 - 1359 は、 1998 年 4 月 7 日に ATCC に寄託され、 ATCC 寄託番号 20975 が付与された。 Fig 26 に示されている全長 PRO866 タンパク質は、見積もり分子量がおおよそ 35,844 ダルトン、 pI が 5.45 を有する。

Fig 26 (配列番号 : 62) に示されている全長 PRO866 ポリペプチドのアミノ酸配列の分析は、それがミンジン (mindin) / スポンジン (spondin) ファミリーと有意な配列類似性を有することを示唆し、それにより PRO866 が新規なミンジン相同体となりうることが示されている。より詳細には、 Dayhoff データベース (version 35.45 SwissProt 35) は、 PRO866 アミノ酸配列

と以下の Dayhoff 配列、 A B 0 0 6 0 8 5 _ 1 , A B 0 0 6 0 8 4 _ 1 , A B 0 0 6 0 8 6 _ 1 , A F 0 1 7 2 6 7 _ 1 , C W U 4 2 2 1 3 _ 1 , A C 0 0 4 1 6 0 _ 1 , C P M I C R P _ 1 , S 4 9 1 0 8 , A 4 8 5 6 9 及び I 4 6 6 8 7 との間の有意な相同性を実証した。