(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3585180号
(P3585180)
(45)発行日　平成16年11月4日(2004.11.4)　(24)登録日　平成16年8月13日(2004.8.13)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C07K 14/47	C07K	14/47	ZNA
C12N 5/10	C12P	21/02	C
C12N 15/09	C12N	15/00	A
C12P 21/02	C12N	5/00	B

請求項の数 7　(全 41 頁)

(21)出願番号　特願平5-318298
(22)出願日　平成5年12月17日(1993.12.17)
(65)公開番号　特開平7-138295
(43)公開日　平成7年5月30日(1995.5.30)
審査請求日　平成12年12月15日(2000.12.15)
(31)優先権主張番号　特願平5-109620
(32)優先日　平成5年5月11日(1993.5.11)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

前置審査

(73)特許権者　000005968
三菱化学株式会社
東京都港区芝五丁目３３番８号
(74)代理人　100082511
弁理士　高柳　昌生
(72)発明者　鈴木　不二男
大阪府豊中市中桜塚２丁目１３番１１号
(72)発明者　開　祐司
大阪府高槻市日吉台一番町１０－３６
(72)発明者　高橋　和展
神奈川県横浜市緑区鴨志田町１０００番地
三菱化成株式会社総合研究所内
(72)発明者　鈴木　淳子
神奈川県横浜市緑区鴨志田町１０００番地
三菱化成株式会社総合研究所内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規なヒトタンパク質およびそれをコードする遺伝子

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列表の配列番号２、３または４に記載のアミノ酸配列で表されるヒトコンドロモジュリン－Ｉタンパク質。
【請求項２】
請求項１に記載のタンパク質をコードする遺伝子。
【請求項３】
配列表の配列番号２、３、４、５、６または７に記載の塩基配列で表されるＤＮＡからなる請求項２記載の遺伝子。
【請求項４】
請求項２または３に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。
【請求項５】
請求項４に記載の組換え発現ベクターで、宿主細胞を形質転換させて得られた形質転換体。
【請求項６】
請求項５に記載の形質転換体を培養してヒトコンドロモジュリン－Ｉタンパク質を産生させる方法。
【請求項７】
配列表の配列番号２、３または４に記載のアミノ酸配列で表される組換えヒトコンドロモジュリン－Ｉタンパク質。

【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は、軟骨細胞増殖活性を有する新規なヒトタンパク質（以下、「ｈＣｈＭ－Ｉ」または「ヒトコンドロモジュリン－Ｉタンパク質」と略記することがある）およびそれをコードする遺伝子（以下、「ｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子」と略記することがある）に関する。詳しくは、軟骨細胞の増殖及び分化機能を促進する新規なｈＣｈＭ－ＩおよびｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子、少なくともｈＣｈＭ－Ｉを遺伝子組換え技術により発現させるために必要なプロモーター配列、ｈＣｈＭ－ＩをコードするＤＮＡ配列およびターミネーター配列を有する発現ベクターにより形質転換された形質転換体、さらにその形質転換体を培養することにより当該タンパク質を産生させる方法、ならびに該形質転換体を培養して得られる培養液、分離された形質転換体、形質転換体処理物、組換えｈＣｈＭ－Ｉ、またはこれらの固定化物を有効成分として各種軟骨疾患に対する治療効果を有する薬剤、ｈＣｈＭ－Ｉの血管浸潤抑制活性を用いて癌等の腫瘍に対する治療効果を有する薬剤としてのｈＣｈＭ－Ｉの用途に関する。
【０００２】
【従来の技術および発明が解決しようとする課題】
哺乳類の大部分の骨（頭蓋骨等の平板な骨は除く）は、胎児期にまず軟骨原基が出現した後、軟骨細胞の増殖と分化、プロテオグリカンや２型、９型、１０型コラーゲン等の軟骨原基の産生を経て、毛細血管の侵入と共に軟骨原基が分解して、基質小胞を中心とする石灰化が始まり、最後は骨に置換する、いわゆる「内軟骨性骨化」という仕組みによって作られる。従って軟骨代謝は骨の形成、特に長軸方向への伸長において非常に重要な役割を演じている。
【０００３】
この一連の過程において種々のホルモンや成長因子が関与している。この中にはインスリン様増殖因子（ＩＧＦ１，ＩＧＦ２）、繊維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、癌細胞増殖因子（ＴＧＦ）、成長ホルモンなどが含まれる。これらの他に軟骨細胞の増殖、分化機能の促進作用を有する因子（コンドロモジュリン）が軟骨中に存在する事が知られていた。しかし、これまでこの因子の単一バンドまでの精製はなされておらず、その生理活性を明確に示すことはなされていなかった。
【０００４】
また骨折の治癒、各種軟骨疾患の治癒過程においては軟骨細胞の増殖、分化機能の発現が重要である。骨折治癒過程においては、骨折部位における炎症反応、骨膜由来細胞の増殖に続き、軟骨細胞が出現、増殖し、軟骨細胞外基質を合成した後に、石灰化し、骨組織に置換されて骨折治癒が完成する。すなわち軟骨破壊、損傷を伴う軟骨疾患からの回復過程においては軟骨細胞の増殖が重要である事は明白である。
【０００５】
さらには癌組織の増殖、転移においては、エネルギー獲得のために組織内への血管侵入が必須である。この増殖、転移の抑制には血管浸潤を抑制する事が重要である。しかしながらこれらの疾患に対する軟骨細胞増殖、血管浸潤抑制を有する有効な薬剤は現在まで存在しない。
Ｐｅｔｅｒ　Ｊ．Ｎｅａｍｅら（Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２６５，９６２８－９６３３（１９９０））は、牛軟骨より軟骨中に存在する構成タンパク質を同定する目的でコンドロモジュリンと極めて類似したアミノ酸配列を持つ糖タンパク質を分離した。しかし彼らはこのタンパク質の生物学的機能の解明には至っていない。
【０００６】
開らは、牛軟骨より作成したｃＤＮＡライブラリーより牛コンドロモジュリン－Ｉ遺伝子をクローニングし、動物細胞で発現させた。発現された組換え牛コンドロモジュリン－Ｉタンパク質は、精製された牛コンドロモジュリン－Ｉタンパク質と同等の活性がある事が

報告されている（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　ａｎｄＢｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，１７５，９７１－９７７（１９９１），欧州公開特許第４７３０８０号公報）。

【０００７】

しかしながら、牛コンドロモジュリン－Ｉタンパク質を人体に対して安全に適用させる為には、まずヒト型のコンドロモジュリン－Ｉ遺伝子（ｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子）の構造解析を行い、抗原性の有無を予想するために牛コンドロモジュリン－Ｉタンパク質との差異を明らかにしなければならない。またそこで差異が明らかになった場合は、遺伝子工学の技術を用い牛型からヒト型へコンドロモジュリン－Ｉ遺伝子の改良を行い、組換えコンドロモジュリンタンパク質をより抗原性の低いものに作り換え、適用したほうが望ましい。一方ヒト型のコンドロモジュリン－Ｉタンパク質をヒト軟骨細胞から抽出し精製する事は、コスト的にも材料的にも不可能であるのが現状であった。

【０００８】

【課題を解決するための手段】

そこで本発明者らは、ｈＣｈＭ－Ｉを組換えＤＮＡ技術により大量に生産させるべく鋭意検討を重ねた結果、かかる目的に有用な新規なｈＣｈＭ－Ｉをコードするヒト遺伝子を初めて分離取得し、さらにこの遺伝子を発現ベクターに組み込み形質転換体を得て、その形質転換体により組換えｈＣｈＭ－Ｉを大量かつ安価に生産させることに成功し、本発明を完成するに至った。

【０００９】

すなわち本発明の要旨は、下記の理化学的性質を有することを特徴とする新規なタンパク質およびそれをコードする遺伝子ならびに該遺伝子を含有する形質転換体によるヒトコンドロモジュリンタンパク質－Ｉの製造方法に存する。

▲１▼　１つのポリペプチドから構成される水溶性タンパク質であって、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量が約２６Ｋダルトンである。

【００１０】

▲２▼　軟骨細胞を単独でまたは繊維芽細胞増殖因子共存下において増殖させる活性を有する。

▲３▼　軟骨細胞に対し分化機能を促進させる活性を有する。

▲４▼　血管内皮細胞の増殖を抑制する活性を有する。

以下本発明をさらに詳細に説明するに、本発明のｈＣｈＭ－Ｉは、例えばヒト軟骨等の組織を破砕し、それを遠心分離した上清を限外ろ過膜により分画、濃縮したものを、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ　Ｓ２００カラム等による分子ふるいクロマトグラフィーによりさらに分画した後、ＹＭＣ　ｐａｃｋ　Ｃ４カラムクロマトグラフィー等により溶出条件を変えて繰り返し精製することによって得ることができる。しかしヒト組織を多量に安定して得ることは困難であることから、後述の実施例に記述するように、ｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子を導入した形質転換体の培養液をブルーセファロースカラム等にかけアルブミンと共に他のタンパク質より分離した後、ＹＭＣ　ｐａｃｋ　Ｃ４カラムクロマトグラフィー等により溶出条件を変えて繰り返し精製する事によって得ることもできる。精製された本発明のタンパク質は、ＳＤＳ－ポリアクリルアミド電気泳動による分子量が約２６，０００ダルトンであり、軟骨細胞を単独でまたは繊維芽細胞増殖因子共存下で増殖させる活性および軟骨細胞の分化機能を促進する活性さらに内皮細胞の増殖を抑制する活性を有する。

【００１１】

また、本発明のｈＣｈＭ－Ｉは、配列表の配列番号２～４に示すようなアミノ酸配列を有するタンパク質であり、軟骨細胞を増殖させる活性および軟骨細胞の分化機能を促進する活性さらに内皮細胞の増殖を抑制する活性を損なわない範囲で一部のアミノ酸を除去、置換、修飾または追加するなどの改変を行ったものも、本発明のｈＣｈＭ－Ｉに含まれる。

【００１２】

上記のｈＣｈＭ－Ｉをコードする遺伝子としては、例えば配列表の配列番号２～７に示すような塩基配列を有するものが挙げられる。この中で配列表の配列番号２～４に記載され

ている配列は、以下で述べるＰＣＲ用プライマーが牛コンドロモジュリン遺伝子に由来する配列であったため、その一部に牛遺伝子の塩基配列を有するが、遺伝子組換え技術により種々の形質転換体を作成し該遺伝子を発現させる場合において得られる組換えタンパク質のアミノ酸配列にｈＣｈＭ－Ｉと何ら変化が認められない為、ｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子と同等の効果を持つものと考えられる。

【００１３】

本発明のｈＣｈＭ－Ｉをコードする遺伝子のＤＮＡ断片は、例えば次のような方法によって得ることができる。

本発明のタンパク質をコードする遺伝子を含有するＤＮＡライブラリーとしては、正常ヒト軟骨またはヒトコンドロザルコーマなどの組織から調製してきたＲＮＡを用いて公知の常法により作成したプラスミドｃＤＮＡライブラリー、ファージｃＤＮＡライブラリー、ファージゲノミックライブラリー等が利用できる。

【００１４】

例えばファージｃＤＮＡライブラリーの場合、まず正常ヒト軟骨またはヒトコンドロザルコーマなどの組織を液体窒素中で粉砕し、グアニジウムイソチオシアネート水溶液等中でホモジナイズし、Ｃｈｉｒｇｗｉｎらの方法（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１８，５２９４－５２９９（１９７９））に従って塩化セシウム平衡密度勾配遠心法によって全ＲＮＡを沈澱として分離する。分離後、フェノール抽出、エタノール沈澱により全ＲＮＡを精製し、これをオリゴ（ｄＴ）セルロースカラムクロマトグラフィーにかけて精製して、目的のｈＣｈＭ－ＩのｍＲＮＡを含むポリ（Ａ）含有ｍＲＮＡ（ｐｏｌｙＡ$^{+}$　ｍＲＮＡ）を単離し、ｍＲＮＡ群を得ることができる。

【００１５】

次に、上記で調製したｍＲＮＡ群と、例えばＮａｔｕｒｅ，３２９，８３６－８３８（１９８７）に記載されているような、具体的には配列表の配列番号１１および１２で表されるＤＮＡにより構成されるプライマーＤＮＡ、あるいはデオキシチミジンが１２個から１８個つながったいわゆるＯｌｉｇｏ（ｄＴ）とをハイブリダイズさせ、逆転写酵素により１本鎖ｃＤＮＡを合成する。次に大腸菌のＤＮＡポリメラーゼＩ、大腸菌のＤＮＡリガーゼ、ＲＮａｓｅＨ等を用い、常法に従い２本鎖ｃＤＮＡを合成する。次いで、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼによりｃＤＮＡの末端を平滑化した後、いわゆるＥｃｏＲＩアダプター等の、制限酵素により切断された形をなすＤＮＡの小断片をＴ４ＤＮＡリガーゼによりｃＤＮＡ鎖の両末端に付加する。

【００１６】

この際、例えばＥｃｏＲＩメチレース等のメチレースでｃＤＮＡ中のＥｃｏＲＩ切断点をメチル化し、制限酵素ＥｃｏＲＩの切断からｃＤＮＡを保護しておき、末端にいわゆるＥｃｏＲＩリンカー等をＴ４ＤＮＡリガーゼにより付加した後、制限酵素ＥｃｏＲＩでリンカーＤＮＡ部分のみを切断しても同様な結果が得られる。ベクターのクローニングサイトとして、例えばＢａｍＨＩなどの他の制限酵素の切断点を選択する場合は、前述の一連の末端処理の操作を例えばＢａｍＨＩアダプター、もしくはＢａｍＨＩメチレース，ＢａｍＨＩリンカー，ＢａｍＨＩ等の組み合わせにする事により同様な結果を得ることができる。

上記の様に末端処理されたｃＤＮＡ鎖を、市販のλファージベクター、例えばλＺＡＰ（プロメガ・バイオテック社）等のλファージベクターまたはｐＧＥＭ２（プロメガ・バイオテック社）等のプラスミドベクターのＥｃｏＲＩ切断部位に常法に従い挿入して、組換えλファージＤＮＡ群または組換えプラスミドＤＮＡ群を得る。

【００１７】

このようにして得られた組換えλファージＤＮＡ群を材料とし、市販の例えばギガパック・ゴールド（プロメガ・バイオテック社）などのイン・ビトロ・パッケージング・キットを説明書に従い使用しいわゆるイン・ビトロ・パッケージングを行い、組換えλファージＤＮＡを有するλファージ粒子を得ることが出来る。

得られたλファージ粒子を常法、例えばＴ．Ｍａｎｉａｔｉｓらの方法（「モレキュラー

クローニング」，コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，８５（１９８２））に従い、宿主、例えば大腸菌に形質導入し、増殖させる。また、組換えプラスミドＤＮＡ群では常法に従い、宿主、例えば大腸菌を形質転換し、増殖させる。次にこれらファージを、例えばジーンスクリーニングプラスなどのナイロン膜あるいはニトロセルロース膜上に移し取り、アルカリ存在下で蛋白を除き、ｃＤＮＡを含むλファージＤＮＡあるいはプラスミドＤＮＡにしたものに対して、すでにクローニングされている牛コンドロモジュリン遺伝子の断片から常法に従い、あるいは市販のキット等により作製した^{32}Ｐ標識プローブとこれらｃＤＮＡクローンのＤＮＡ群とをハイブリダイズさせ、プラークハイブリダイゼーション法（「モレキュラー　クローニング」，コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，３２０～３２８（１９８２））によって選択し、目的とするｈＣｈＭ－ＩをコードするｃＤＮＡクローンの全部または一部を得ることができる。

【００１８】

牛コンドロモジュリンの配列を基にＰＣＲプライマーを設計し、いわゆるＰＣＲ法にてｈＣｈＭ－Ｉをコードする遺伝子の一部を取得することもできる。その場合ＰＣＲ法に用いる鋳型には、ヒトコンドロザルコーマもしくはヒト正常軟骨細胞より抽出したＲＮＡを基に常法に従い合成したｃＤＮＡを用いると良い。またＰＣＲ法を繰り返し行うことにより、またはＰＣＲ法の鋳型として用いるｃＤＮＡを合成する際に用いるプライマーに対するＰＣＲ用プライマーを設計し、これを用いてＰＣＲ法を行ったり、または３’末端側に適当なアンカー配列を付加しそれに対応するＰＣＲ用プライマーを用いてＰＣＲ法を行うことにより、ｈＣｈＭ－Ｉの全長をコードする遺伝子を取得することもできる。

【００１９】

さらに、前述のライブラリーのスクリーニングで陽性のプラークからＴ．Ｍａｎｉａｔｉｓらの方法（「モレキュラー　クローニング」，コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，８５（１９８２））によりＤＮＡを調製し、適当な制限酵素、例えばＥｃｏＲＩ等で切断後，ｐＵＣ１８等のプラスミドにクローニングし、Ｓａｎｇｅｒらのジデオキシ法（プロシーディングス　オブ　ナショナル　アカデミー　サイエンス　ユー　エス　エー［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ］，７４，５４６３（１９７７））によって目的とするＤＮＡ断片の塩基配列が決定できる。

【００２０】

このようにして決定されるＤＮＡ断片は、全長８９２または１００６ヌクレオチド長からなる断片であり、その塩基配列（例えば、配列表の配列番号２～７）は、成熟型タンパク質のアミノ酸配列を含む２９６個または３３４個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしている。また配列番号２～４に示す塩基配列はその一部に牛コンドロモジュリン遺伝子の配列を有するが、それがコードするアミノ酸配列はｈＣｈＭ－Ｉと一致する。また本発明によるＤＮＡ断片は、配列表の配列番号２～４に示すアミノ酸配列をコードするものに限らず、軟骨細胞を増殖させる活性および軟骨細胞の分化機能を促進する活性さらに内皮細胞の増殖を抑制する活性を持つ限りは、そのアミノ酸配列を改変したものも含まれる。

【００２１】

上記のようにして得られるＤＮＡ断片は、その５’末端を修飾して公知の発現ベクターにそれ自体公知の方法でプロモーターの下流に挿入され、次いで上記のＤＮＡが挿入された発現ベクターは、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞宿主等、公知の細胞中にそれ自体公知の方法により導入される。

本発明のｈＣｈＭ－Ｉの産生方法につき詳細に説明すると、発現ベクターとしては上記のようにして得られたｈＣｈＭ－Ｉをコードする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使用される。

ｈＣｈＭ－Ｉの工業生産のためには、安定した宿主－ベクター系を構築すること、さらに生物学的に活性を有するｈＣｈＭ－Ｉを発現しうる系を用いる必要がある。特に天然のｈＣｈＭ－Ｉが糖蛋白質であること、ｈＣｈＭ－Ｉ分子が多くのシステインを含み、そのリフォールディングが生理活性の獲得に重要であること、また細胞（生体）内で成熟型ｈＣｈＭ－Ｉにプロセスされること等を考慮すると、宿主としては動物細胞を用いることが望

ましい。
【００２２】
しかし形質転換に用いる宿主としては、例えば後述の実施例で使用される動物細胞が挙げられるが、とくに動物細胞に限定されるものではなく、他の微生物、昆虫細胞などの宿主生物を用いることができる。
動物細胞としては、例えばＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、マウスＬ細胞、マウスＣ１２７細胞、マウスＦＭ３Ａ細胞等が挙げられる。またこれらの細胞を宿主とするとする場合は、前駆体タンパク質の形でｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子を導入することにより、成熟型になったｈＣｈＭ－Ｉが分泌生産されるという利点が期待される。これらの細胞を宿主とした発現用プラスミドは、プロモーターとしてはＳＶ４０プロモーターまたはメタロチオネイン遺伝子のプロモーターを有していることが好ましい。このプロモーターの下流に、シグナル配列を含むｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子を５’側から挿入する。またｈＣｈＭ－Ｉの生産量を上げるため、ｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子を５’側から２－３個つなげたものを挿入してもよいし、各ｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子の５’側にＳＶ４０などのプロモーターを挿入したものを２－３個つなげてもよい。このｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子の下流にはポリアデニル化部位が含まれる。ポリアデニル化部位としては、例えばＳＶ４０ＤＮＡ、β－グロビン遺伝子またはメタルチオネイン遺伝子由来のもの等が挙げられる。
【００２３】
この発現ベクターには、動物細胞、例えばＣＨＯ細胞に形質転換した際の選択マーカーを有している場合とそうでない場合の両者があげられる。選択マーカーとしては、メトトレキセート耐性を与えるＤＨＦＲ遺伝子、３’－デオキシストレプタミン抗生物質Ｇ－４１８遺伝子などが挙げられ、各耐性遺伝子の５’側には例えばＳＶ４０由来のプロモーターが挿入されており、各耐性遺伝子の３’側には、ポリアデニル化部位が含まれる。ｈＣｈＭ－Ｉの発現ベクターにこれらの耐性遺伝子を挿入する場合、ｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子のポリアデニル化部位の下流に挿入すればよい。またかかる発現ベクターは、形質転換体の選択マーカーを有していなくてもよい。この場合、ｈＣｈＭ－Ｉの発現ベクターと共に形質転換体の選択のマーカーを有するベクター、例えばｐＳＶ２ｎｅｏ，ｐＳＶ２ｇｐｔ，ｐＭＴＶｄｈｆｒなどを二重形質転換してやればよい。
【００２４】
この二重形質転換法によってｈＣｈＭ－Ｉ発現ベクターで形質転換した動物細胞を選択するためには、選択マーカーの発現による上記した表現形質により、ｈＣｈＭ－Ｉ形質転換細胞を選択することが可能である。さらにｈＣｈＭ－Ｉの発現量の上昇を目的として、二重形質転換法にてｈＣｈＭ－Ｉの発現が確認された細胞に対し選択マーカーを変更し、二重形質転換を繰り返してもよい。
発現ベクターに使用されるプラスミドベクターの具体例としては、ＳＶ４０初期プロモーター、ウサギのβ－グロビン遺伝子に由来するスプライス配列ＤＮＡ、ウサギのβ－グロビン遺伝子からのポリアデニル化部位、ＳＶ４０初期領域からのポリアデニル化部位、並びにｐＢＲ３２２由来の複製開始点およびアンピシリン耐性遺伝子を含有するｐＫＣＲ（プロシーディングス　オブ　ナショナル　アカデミー　オブ　サイエンス　ユー　エスエー［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ］，７８，１５２８（１９８１））などが挙げられる。
【００２５】
発現ベクターの動物細胞への移入は、リン酸カルシウムによるトランスフェクション法が一般的である。形質転換された動物細胞の培養は、常法により浮遊培養または付着培養で行うことができる。培地としては、ＭＥＭ、ＲＰＭＩ１６４０などを用い、５－１０％血清存在下もしくは適当量のインシュリン、デキサメサゾン、トランスフェリンの存在下、もしくは無血清下にて培養する。ｈＣｈＭ－Ｉを発現している動物細胞はその培養上清中にｈＣｈＭ－Ｉを分泌するものと考えられ、かかる組換え体の培養上清を用いｈＣｈＭ－Ｉの分離精製を行うことが可能である。生産されたｈＣｈＭ－Ｉを含む培養上清は、各種クロマトグラフィー、例えばヘパリンセファロースもしくはブルーセファロース等を用い

たクロマトグラフィー等により精製可能である。

【００２６】

また大腸菌、枯草菌等の微生物を宿主とするときには、発現ベクターはプロモーター、リボゾーム結合（ＳＤ）配列、ｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子、転写終結配列、およびプロモーターを制御する遺伝子より成ることが好ましい。

プロモーターとしては、大腸菌、ファージ等由来のもの、例えばトリプトファン合成酵素（ｔｒｐ）、ラクトースオペロン（ｌａｃ）、ラムダファージP_L、P_R、T_5ファージの初期遺伝子のプロモーターであるP_{25}、P_{26}プロモーター等が挙げられる。また、これらは例えばｐａｃプロモーター（アグリカルチュラル アンド バイオロジカル ケミストリー［Ａｇｒｉｃ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．］５２、９８３－９８８（１９８８））のように独自に改変、設計された配列でも良い。

【００２７】

リボゾーム結合配列としては、大腸菌、ファージ等由来のものでも良いが、ＤＮＡ合成により作成した１６ＳリボゾームＲＮＡの３’末端領域に相補的な配列を４塩基以上連続してもつコンセンサス配列を持ったものでも良い。転写終結配列は必ずしも必要ではないが、ρ非依存性のもの、例えばリポプロテインターミネーター、ｔｒｐオペロンターミネーター等を有している方が好ましい。

更にこれらの発現に必要な因子の発現プラスミド上での配列順序は、５’上流から、プロモーター、ＳＤ配列、ｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子、転写終結因子の順に並ぶ事が望ましい。また発現ベクター上のＳＤ配列とｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子とのユニットを複数個同方向に挿入することにより、ベクター上の転写単位のコピー数を増加させる方法（特開平１－９５７９８号公報）を用いることもできる。

【００２８】

発現ベクターとして使用できるものとしては、ｐＵＡＩ２（特開平１－９５７９８号公報）や市販のｐＫＫ２３３－２（ファルマシア社製）等がある。また、融合蛋白として発現させる発現ベクターｐＧＥＸシリーズ（ファルマシア社製）等も同様にして使用できる。

宿主の形質転換法としては、常法に従い行うことができる。

形質転換体の培養は、モレキュラー クローニング（コールド スプリング ハーバー ラボラトリー，（１９８２））に記載の方法を参考にして行うことができる。培養温度としては、２８～４２℃が適当である。

【００２９】

昆虫細胞としては、例えばインビトロジェン社のバキュロウイルス発現マニュアルであるマックスバック（ＭＡＸＢＡＣ™，ＢＡＣＵＬＯＶＩＲＵＳ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＳＹＳＴＥＭ ＭＡＮＵＡＬ ＶＥＲＳＩＯＮ １．４）に従い、このキットを使用する。この時、発現量を上げるためにポリヘドリンのプロモーターから開始コドンまでの距離を変えることが好ましい。

上記形質転換体を培養して得られるｈＣｈＭ－Ｉは、公知の方法で宿主から単離・精製される。

大腸菌等の微生物、昆虫細胞、および動物細胞で発現させて得られる該組換えポリペプチドは、例えばｈＣｈＭ－Ｉの一部配列を含む合成ペプチドに対するウサギ抗血清との免疫学的反応性により、ｈＣｈＭ－Ｉであることが確認される。かかる方法としては、常法であるウェスタンブロッティング法が利用できる。

【００３０】

本発明のｈＣｈＭ－Ｉは、軟骨細胞の増殖、軟骨細胞の分化機能の促進、さらに内皮細胞の増殖の抑制等の作用により、骨折、各種軟骨疾患の予防または治療薬として、さらには癌の治療薬として有効である。

ｈＣｈＭ－Ｉの生理活性は、例えば次のようにして測定される。軟骨細胞増殖活性の評価のための細胞取得、培養および評価方法は、鈴木らの方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１４６，３１３－３２０（１９８７））に従って行う。すなわちウサギより成長肋軟骨を分離し、初代軟骨細胞を９６穴プレートを用いて培養する。細胞がコ

ンフルエントに達した後、約０．６から約２００ｎｇ／ｍｌのｈＣｈＭ－Ｉおよび０．４ｎｇ／ｍｌ程度の繊維芽細胞増殖因子を加え、〔 ^{3}H〕チミジンの取り込みを測定する。その結果、０．４ｎｇ／ｍｌの繊維芽細胞増殖因子のみ添加時に比べｈＣｈＭ－Ｉを同時に加えた時の方が多量の放射性チミジンの取り込みがみられ、ｈＣｈＭ－Ｉが強力な軟骨細胞の増殖促進効果を有することを示された。

【００３１】

血管浸潤抑制の指標となる血管内皮細胞の増殖抑制は、大動脈内皮細胞の〔 ^{3}H〕チミジンの取り込みの抑制として測定される。牛大動脈内皮細胞の培地中にｈＣｈＭ－Ｉを添加して、細胞内に取り込まれる〔 ^{3}H〕チミジンの量を測定したところ、ｈＣｈＭ－Ｉが内皮細胞への放射能の取り込みを抑制し、血管内皮細胞の増殖を押さえる活性を有することを示した。

かかるｈＣｈＭ－Ｉを臨床に応用するに際し、ｈＣｈＭ－Ｉを単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬組成物として用いることもできる。このときの有効成分ｈＣｈＭ－Ｉの担体成分に対する割合は、１重量％から９０重量％の間で変動され得る。例えば本発明のｈＣｈＭ－Ｉは、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸、ポリエチレングリコール、ポリ乳酸、骨セメント、ハイドロキシアパタイト、セラミックス、炭素繊維、フィブリン糊等の生体適合性担体に混合、含浸、塗布することによって、骨折部位、軟骨疾患部位等に外用剤として投与することができる。また、顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、液剤等の剤形にして経口投与してもよいし、注射剤として静脈内投与、筋肉内投与、局所内投与、皮下投与してもよいし、坐剤として用いることもできる。経口、経腸、非経口の組成物を調製する場合は、有機または無機の、固体または液体の担体もしくは希釈剤が用いられる。固形製剤を製造する際に用いられる賦形剤としては、例えば乳糖、ショ糖、デンプン、タルク、セルロース、デキストリン、カオリン、炭酸カルシウム等が用いられる。経口投与のための液体製剤、すなわち乳剤、シロップ剤、懸濁剤、液剤等は、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば水、植物油等を含む。この製剤は、不活性な希釈剤以外に補助剤、例えば湿潤剤、懸濁補助剤、甘味剤、芳香剤、着色剤、保存剤等を含むことができる。液体製剤にしてゼラチンのような吸収され得る物質のカプセル中に含ませてもよい。非経口投与の製剤、すなわち注射剤、坐剤等の製造に用いられる溶剤または懸濁化剤としては、例えば水、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ベンジルアルコール、オレイン酸エチル、レシチン等が挙げられる。坐剤に用いられる基剤としては、例えばカカオ脂、乳化カカオ脂、ラウリン脂、ウィテップゾール等が挙げられる。これらの調製方法は、適宜常法に従って行うことができる。

【００３２】

本発明のｈＣｈＭ－Ｉの臨床投与量は、その投与形態、患者の年齢、体重、症状等によって適宜設定されるが、一般に経口剤または外用剤として使用する場合、成人に対し１日量１ｎｇ～５０ｍｇ（注射剤の場合は、その１０分の１以下）であることが望ましい。これは、１日に１回、または適当な間隔をおいて１日に２～数回に分けて投与してもよいし、間欠投与してもよい。注射剤として用いる場合は、前記量を連続投与または間欠投与することが望ましい。

なお、医薬用途を目的として使用されるｈＣｈＭ－Ｉは、精製されたｈＣｈＭ－Ｉ、組換えｈＣｈＭ－Ｉ、さらには形質転換体の培養液、分離形質転換体、形質転換体処理物、固定化形質転換体、粗酵素液、酵素処理物等のいずれであっても構わない。

【００３３】

【実施例】

以下の実施例により、本発明を更に詳細に説明するが、本発明はその要旨を越えない限り以下の実施例によって限定されるものではない。

実施例１　牛コンドロモジュリン遺伝子からのプローブＤＮＡ断片の調製

既に開らによりクローニングされている（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　ａｎｄ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，１７５，９７１－９

７７（１９９１）；欧州公開特許第４７３０８０号公報）牛コンドロモジュリン遺伝子の全タンパク質をコードする約１．４ｋｂの遺伝子配列を、ｐＵＣ１９ベクターのＥｃｏＲＩサイトに持つ組換え体の大腸菌からＭａｎｉａｔｉｓらの方法（「モレキュラー　クローニング」，コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，８６～９６頁（１９８２））に従いプラスミドＤＮＡを回収、精製し、牛コンドロモジュリン遺伝子を持つプラスミドＤＮＡを大量に得た。

【００３４】

得られたプラスミドＤＮＡ２０μｇを、制限酵素ＥｃｏＲＩおよびＰｓｔＩ各々約２００Ｕを用いて３７℃で２時間切断し、常法に従いアガロース電気泳動を行うことにより、ベクターＤＮＡと牛コンドロモジュリン遺伝子とを分離した。ゲルを常法に従いエチジュウムブロマイドで染色し、牛コンドロモジュリン遺伝子に対応するＤＮＡ断片の部分をＵＶ下で切り出した。次にこの牛コンドロモジュリン遺伝子を含むアガロースゲルを、Ｍａｎｉａｔｉｓらの方法（「モレキュラー　クローニング」，コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，１６４～１７０頁（１９８２））に従いゲルからＤＮＡ断片を回収、精製した。この操作により、約２μｇのプローブ用ＤＮＡ断片を得た。このようにして得られたＤＮＡ断片１００ｎｇを、Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製ＲＴＧ　ＤＮＡ　Ｌａｂｅｌｌｉｎｇ　Ｋｉｔを用いて、添付の説明書に従い^{32}Ｐ標識した。

【００３５】

実施例２　ｈＣｈＭ－Ｉの一部をコードするゲノミックＤＮＡクローンのスクリーニングヒト由来のゲノミックライブラリー（クローンテック社）のスクリーニングを説明書に従って行った。２４．５ｃｍ×２４．５ｃｍのシャーレ内の１．５％ＮＺＹ寒天培地に重層されたＮＺＹ軟寒天培地（［ＮＺＹ培地；１％ＮＺ－アミン、０．５％イーストイクストラクト、０．５％塩化ナトリウム溶液をｐＨ７．５に調整し、０．２５％硫酸マグネシウムを加えたもの］、［１．５％ＮＺＹ寒天培地；ＮＺＹ培地に１．５％になるように寒天沫を加えオートクレイブしたもの］、［ＮＺＹ軟寒天培地；ＮＺＹ培地に０．７％になるように寒天沫を加えオートクレイブしたもの］）中で、約１００万クローンのファージをシャーレ一枚あたり２０万クローンの割合で大腸菌Ｐ２－３９２株に感染させ、３７℃で一晩培養した。次に市販のニトロセルロース膜であるＢＡ８５（Ｓ＆Ｓ社）を軟寒天培地上にかぶせて静かにはがすことにより培地中のλファージクローンをニトロセルロース膜上に移し取り、以下に説明するプラークハイブリダイゼーションを行った。

【００３６】

即ち、一枚のシャーレあたりニトロセルロース膜２枚の割合で前述の軟寒天培地上にかぶせてファージ粒子を移し取り、培地との間に印をつけておく。この印は２枚のニトロセルロース膜で等しくつけておく。その様にしてできたニトロセルロース膜を０．２Ｍ水酸化ナトリウム－１．５Ｍ塩化ナトリウムが染み込んだろ紙上に２分間静置し、別に用意した乾いたろ紙上で水分を除いた後、次に同様に２×ＳＳＣＰ（２倍の濃度のＳＳＣＰ溶液のこと、以下同様の表記方法をとる。１０×ＳＳＣＰは１．２Ｍ塩化ナトリウム、１５０ｍＭクエン酸ナトリウム、１３０ｍＭ燐酸二水素カリウム、１ｍＭＥＤＴＡ　ｐＨ７．２）－０．２Ｍトリス－塩酸（ｐＨ７．４）を染み込ませたろ紙上でこのニトロセルロース膜を静置し、乾いたろ紙上で風乾した後、同じ操作を再び繰り返した。

【００３７】

このようにして処理したニトロセルロース膜を、８０℃で２時間加熱することにより膜上に核酸を固定した。次に膜を３×ＳＳＣ（２０×ＳＳＣは２０倍の濃度のＳＳＣ溶液；３Ｍ塩化ナトリウム、０．３Ｍクエン酸ナトリウム）－０．１％ＳＤＳで６０℃１５分間２回洗浄し、次にニトロセルロース膜１枚当り５ｍｌのハイブリダイゼーションヨン液（３×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、１０×Ｄｅｎｈａｒｄｔ［５０×Ｄｅｎｈａｒｄｔは５０倍の濃度のＤｅｎｈａｒｄｔ溶液；１％牛血清アルブミン、１％ポリビニルピロリドンおよび１％フィコール４００］、２０μｇ／ｍｌ鮭精子ＤＮＡ、１０％硫酸デキストラン）に６５℃で３時間保温した。

【００３８】

次に実施例１で作製した^{32}Ｐ標識ＤＮＡ断片を、鋳型ＤＮＡ換算で５ｎｇ／ｍｌの濃度になるようハイブリダイゼーション液に加えた後、５５℃で１８時間保温した。その後、ニトロセルロース膜を取り出し、３×ＳＳＣ－０．１％ＳＤＳ溶液中、室温で３０分間洗い、これを２回繰り返した。次に、０．２×ＳＳＣ－０．１％ＳＤＳ溶液で５５℃で１５分間洗い、これを２回繰り返した後に膜を乾かし、オートラジオグラフィーをとった。このようにして２枚１組のニトロセルロース膜のオートラジオグラフィー上のシグナルが一致したものは１個あった。得られたシグナルに相当するクローンを単離するために、これらシグナルと一致する軟寒天培地上のプラークをガラス管で打ち抜き、５０μｌのクロロフォルム存在下１ｍｌのＴＭＧ緩衝液［５０ｍＭトリス－塩酸　ｐＨ７．５、１００ｍＭ塩化ナトリウム、１０ｍＭ塩化マグネシウムおよび０・０１％ゼラチン］中でファージ粒子を一晩抽出し、常法に従い大腸菌Ｐ２－３９２株に感染させて９ｃｍシャーレ中で適当量培養し、前述の方法の様にプラークハイブリダイゼーションを行った。この一連の操作を繰り返すことにより、シグナルに相当するクローンを純化することができた。その結果独立した１個のクローンλ４１１を得た。

【００３９】

実施例３　ファージＤＮＡからコード領域を含むＤＮＡ断片のサブクローニングおよび塩基配列の決定

前述の実施例２で得られたファージクローンλ４１１から以下のようにＤＮＡを抽出し、プラスミドベクターｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９にサブクローニングを行った。即ち、５００ｍｌ三角フラスコ中の２００ｍｌのＮＺＹ培地中において、２００μｌのＴＭＧ溶液に懸濁してあるλファージクローン2×10^{7}　ｐ．ｆ．ｕ．（ｐ．ｆ．ｕ．；プラーク形成単位）と４０μｌの大腸菌Ｐ２－３９２株2×10^{8}　を３７℃１５分置くことにより感染させた。１５分後さらに１ｍｌの１Ｍ塩化カルシウムを加え、一晩、概ね１４時間ほど培養した。次に、２ｍｌのクロロフォルムを加え１０分ほど置き、１５．８ｇの塩化ナトリウムを加え溶かし、それらを４℃において日立冷却遠心機ＳＣＲ２０ＢＢ（ローターＲＰＲ９－２）を用いて６０００回転２０分間遠心した上清に２０ｇのポリエチレングリコール６０００を加えて十分に溶解した後に、氷中で１時間静置した。

【００４０】

これを日立冷却遠心機ＳＣＲ２０ＢＢ（ローターＲＰＲ９－２）で６０００回転２０分間遠心し、沈澱を６ｍｌのＡ緩衝液［０．５％ＮＰ４０、３６ｍＭ塩化カルシウム、３０ｍＭトリス－塩酸　ｐＨ７．５、５０ｍＭ塩化マグネシウム、１２５ｍＭ塩化カリウム、０．５ｍＭＥＤＴＡ、０．２５％ＤＯＣ、０．６ｍＭメルカプトエタノール］に懸濁し、ここに１００μｌの１０ｍｇ／ｍｌのデオキシリボヌクレアーゼＩと１０μｌの１０ｍｇ／ｍｌのリボヌクレアーゼＡを加え、３０℃で３０分間保温することにより大腸菌由来の核酸を分解した。その後上記反応液に等量のクロロフォルムを加え、良く攪はんした後にトミー遠心機ＬＣ－０６（ローターＴＳ－７）で３０００回転１０分間遠心し、上清を分取した。

【００４１】

一方、予め日立超遠心機ローターＲＰＳ４０Ｔ用遠心管に４０％グリセロール溶液［０．５％ＮＰ４０、３０ｍＭトリス－塩酸　ｐＨ７．５、１２５ｍＭ塩化カリウム、０．５ｍＭＥＤＴＡ、０．６ｍＭメルカプトエタノール、４０％グリセロール］を１ｍｌ入れておき、その上に３ｍｌの１０％グリセロール溶液［０．５％ＮＰ４０、３０ｍＭトリス－塩酸　ｐＨ７．５、１２５ｍＭ塩化カリウム、０．５ｍＭＥＤＴＡ、０．６ｍＭメルカプトエタノール、１０％グリセロール］を重層して準備しておいた上に先ほどのヌクレアーゼ処理をしたファージ懸濁液を重層し、日立超遠心機７０Ｐ７２（ローターＲＰＳ４０Ｔ）で３５０００回転１時間遠心した。遠心後沈澱として落ちてきたファージ粒子を０．４ｍｌの４０ｍＭトリス－塩酸　ｐＨ７．５、１０ｍＭＥＤＴＡ、２％ＳＤＳに懸濁し、４μｌの１０ｍｇ／ｍｌのプロテナーゼＫを加えて５５℃１時間保温を行った。その後溶液をエッペンドルフチューブに移し、等量のフェノール／クロロフォルムにてファージＤＮＡを抽出し、エタノール沈澱を行うことにより目的とするファージＤＮＡを２００μｇ得る

ことが出来た。
【００４２】
このファージＤＮＡ１０μｇ（１０μｌ）を、宝酒造社製の制限酵素ＢａｍＨＩおよびＳａｌＩを各々２０ユニットを用い、指定された制限酵素緩衝液中で３７℃で３時間反応させた後、常法に従いアガロース電気泳動法を行った。次に前記実施例１のプローブを用いてモレキュラー　クローニング（コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，３８２～３８９頁（１９８２））に記載の方法に従いサザンハイブリダイゼーションを行った結果、約５．６Ｋｂの位置にプローブと強くハイブリダイズするＤＮＡ断片が存在することが明らかになった。
そこでファージＤＮＡ１００μｇを制限酵素ＢａｍＨＩとＳａｌＩによって切断し、アガロースゲルから該ＤＮＡ断片を常法に従い回収することにより、目的とするＤＮＡ断片を分離精製することが出来た。このＤＮＡ断片約１００ｎｇを、予め常法に従い制限酵素ＢａｍＨＩおよびＳａｌＩによって切断しておいたｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９プラスミドベクター２００ｎｇと１０μｌの反応液［６６ｍＭトリス－塩酸　ｐＨ７．６、６．６ｍＭ塩化マグネシウム、１０ｍＭジチオスレイトール、６６μＭＡＴＰ、基質ＤＮＡ］中で３５０ユニットのＴ４ＤＮＡリガーゼにより結合し、その反応液１μｌを用いて、東洋紡績社製の大腸菌ＤＨ５αのコンピテントセル（ＣＯＭＰＥＴＥＮＴ　ＨＩＧＨ）のトランスフォーメーションを行い、直径１５ｃｍのシャーレ中のアンピシリン含有（５０μｇ／ｍｌ）ＬＢ寒天培地（１％酵母抽出物、０．５％バクトトリプトン、０．５％塩化ナトリウム）に菌液を塗布した。シャーレに出現した耐性菌のコロニーを各々５ｍｌずつ培養し、Ｍａｎｉａｔｉｓらの方法（「モレキュラー　クローニング」，コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，３６５～３７０頁（１９８２））に従いプラスミドＤＮＡを回収し、制限酵素ＢａｍＨＩとＳａｌＩで切断し、アガロースゲル電気泳動で解析することにより目的の５．６ｋｂのＤＮＡ断片を含むプラスミドＤＮＡを持つ組換え体ｐ４１１ＢＳを得た。
【００４３】
純化したポジティブクローンのうちの一つからプラスミドＤＮＡを常法（「モレキュラー　クローニング」，コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，８６～９６頁（１９８２））に従い調製し、必要なＤＮＡ領域を適宜制限酵素で小断片化した後に、プラスミドベクターｐＵＣ１９にサブクローニングを行った。得られたサブクローンからプラスミドＤＮＡを常法により調製し、デュポン社製蛍光シークエンサーＧＥＮＥＳＩＳ　２，０００システムを用いて、配列を決定した。シークエンスプライマーとして次の２種の合成プライマー５’－ｄ（ＧＴＡＡＡＡＣＧＡＣＧＧＣＣＡＧＴ）３’（配列表の配列番号９）、５’－ｄ（ＣＡＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣ）３’（配列表の配列番号１０）を使用し、該ＤＮＡ断片の＋鎖、－鎖の塩基配列を決定した（配列表の配列番号１）。この結果、独立した１個のクローンλ４１１由来のｐ４１１ＢＳは、５’上流配列、ｈＣｈＭ－Ｉのアミノ酸配列でＮ末端側の１番目のアミノ酸目から７２番目のアミノ酸までに相当するコーディング領域（エクソン）の一部とイントロン配列を有していた。
【００４４】
実施例４　ｃＤＮＡの作製
配列表の配列番号１１に示すような、ＮｏｔＩ切断部位およびその５’末にＸｈｏＩ切断部位等を含んだ合成ＤＮＡで、一方の鎖のＮｏｔＩ切断部位の３’側に４０個のＴの配列を含むＤＮＡ、即ち、５’－ｄ（ＣＴＣＧＡＧＧＣＣＡＴＧＧＣＧＧＣＣＧＣＴＴＴ

ＲＮＡの調製は以下のように行った。まずヒトコンドロザルコーマの組織１０ｇを液体窒素中で粉砕し，グアニジウムチオシアネート水溶液等中でホモジナイズし、Ｃｈｉｒｇｗｉｎらの方法（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１８，５２９４－５２９９（１９７９））に従って塩化セシウム平衡密度勾配遠心法により、約１ｍｇのＴｏｔａｌＲＮＡを得た。このＴｏｔａｌＲＮＡを常法（「モレキュラー　クローニング」，コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，１９７～１９８頁（１９８２））に従い、ファルマシア社ｏｌｉｇｏ（ｄＴ）セルロースｔｙｐｅ７を用いてｐｏｌｙＡ$^{+}$　ＲＮＡに精製した。

このようにして得られたｐｏｌｙＡ$^{+}$　ＲＮＡ約１μｇに対し、前述のようにアニールさせたプライマー８０ｐｍｏｌｅを用いて、５０μｌの反応液［５０ｍＭトリス－塩酸（ｐＨ８．３）、５０ｍＭ塩化カリウム、８ｍＭ塩化マグネシウム、１ｍＭｄＮＴＰ（ｄＡＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＣＴＰ，ｄＴＴＰ）、１０ｍＭジチオスレイトールおよび４０μＣｉα－^{32}Ｐ－ｄＣＴＰ］中で１００ユニットのＡＭＶ逆転写酵素を加えて、３７℃で反応させた。その結果、第一鎖ｃＤＮＡが鋳型ＲＮＡとハイブリッドを形成した状態で合成された。

【００４６】

実施例５　ＰＣＲ法およびそれにより増幅されたＤＮＡ断片の解析

ＰＣＲはパーキン・エルマー・シータス・ＤＮＡ・サーマル・サイクラー（Ｐｅｒｋｉｎ・Ｅｌｍｅｒ・Ｃｅｔｕｓ・ＤＮＡ・Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｃｙｃｌｅｒ）を使用して、使用説明書に基づき、ジーンアンプキット（Ｇｅｎｅ　Ａｍｐ　ＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｋｉｔ；宝酒造製）を使って行った。すなわち鋳型ＤＮＡとしては実施例４で記載のｃＤＮＡ合成の反応液より１μｌを鋳型として用い、これに１０倍濃度の反応緩衝液［５００ｍＭＫＣｌ、１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．３）、１５ｍＭ　ＭｇＣｌ２　、０．１％（ｗ／ｖ）ゼラチン］１０μｌ、１．２５ｍＭ　４ｄＮＴＰ　１６μｌ、２０μＭのプライマー＃１および２０μＭのプライマー＃２を各５μｌ、ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ０．５μｌを加えて１００μｌの系とした。反応は９４℃、１０分間の前処理後、９４℃１分間（変性ステップ）、５５℃１．５分間（アニーリングステップ）、７２℃２分間（伸長ステップ）のインキュベーションを３５サイクル行った。最後に７２℃で７分間のインキュベーションを行い反応を終了した。

【００４７】

プライマー＃１としては配列表の配列番号１３の配列のＤＮＡプライマーで、実施例３で得られたヒト遺伝子から設計した遺伝子の上流部配列である、すなわち５’－ｄ（ＡＧＴＣＴＣＣＡＡＧＴＧＣＣＴＣＡＣＴ）３’（１９ヌクレオチド）、またプライマー＃２としては配列表の配列番号１４に記載のＤＮＡプライマーで、ｃＤＮＡ合成の際のプライマーとして用いた配列表の配列番号１２の配列の一部に相補的な５’－ｄ（ＣＧＡＧＧＣＣＡＴＧＧＣＧＧＣＣ）３’（１６ヌクレオチド）を用いた。

【００４８】

次に得られた反応液を２ｎｄＰＣＲへと進めた。すなわち基質ＤＮＡは前述のＰＣＲの反応系より２μｌを抜き取り、鋳型として用いた。プライマー＃３としては実施例３で得られたヒト遺伝子から設計したｈＣｈＭ－Ｉをコードしている領域の開始の部分に対応する配列、すなわち配列表の配列番号１５のＤＮＡプライマーで５’－ｄ（ＣＡＴＧＡＣＡＧＡＡＧＡＡＣＴＣＣＧＡ）３’（１８ヌクレオチド）、またプライマー＃４としてはウシＣｈＭ－Ｉ由来の配列で、ＣｈＭ－Ｉタンパク質の終止の部分に対応する配列で、配列表の配列番号１６のＤＮＡプライマー５’－ｄ（ＡＣＡＣＣＡＴＧＣＣＣＡＧＧＡＴＧＣ）３’（１８ヌクレオチド）を用いた。その他の緩衝液、ｄＮＴＰ、酵素の各処理は１ｓｔＰＣＲと同様に行い、蒸留水で反応系を１００μｌにした。反応は９４℃、１０分間の前処理後、９４℃１分間（変性ステップ）、５５℃１．５分間（アニーリングステップ）、７２℃２分間（伸長ステップ）のインキュベーションを３５サイクル行った。最後に７２℃で７分間のインキュベーションを行い、反応を終了した。

【００４９】

反応混合液１００μｌ中の１０μｌを１％アガロースゲル電気泳動で解析し、約１ｋｂの

バンドを常法に従って切り出しＤＮＡフラグメントを回収し、フェノール：クロロホルム＝１：１で抽出し、エタノール沈澱を行った。ＤＮＡ沈澱を２０μｌの滅菌脱イオン水に溶解し、このＤＮＡ断片の溶液５μｌと市販のｐＣＲ２ベクター（インビトロジェン社）０．２５μｇを１０μｌの反応液［６６ｍＭトリス－塩酸　ｐＨ７．６、６．６ｍＭ塩化マグネシウム、１０ｍＭジチオスレイトール、６６μＭＡＴＰ、基質ＤＮＡ］中で３５０ユニットのＴ４ＤＮＡリガーゼにより１６℃で１２時間反応させることにより、ｐＣＲ２ベクターのクローニングサイトに挿入し結合した。

【００５０】

この反応液３μｌを用いて、東洋紡績社製の大腸菌ＪＭ１０９のコンピテントセル（ＣＯＭＰＥＴＥＮＴ　ＨＩＧＨ）のトランスフォーメーションを行い、直径１５ｃｍのシャーレ中のアンピシリン含有（５０μｇ／ｍｌ）Ｘ－Ｇａｌ－ＩＰＴＧ－ＬＢ寒天培地（１％酵母抽出物、０．５％バクトトリプトン、０．５％塩化ナトリウム、０．００４％Ｘ－Ｇａｌ、１ｍＭＩＰＴＧ）に菌液を塗布した。シャーレに出現した耐性菌でかつＸ－Ｇａｌにより発色していないコロニーを１２個選び、各々５ｍｌずつ培養し、Ｍａｎｉａｔｉｓらの方法（「モレキュラー　クローニング」，コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，３６５～３７０頁（１９８２））に従いプラスミドＤＮＡを回収し、制限酵素ＥｃｏＲＩで切断しアガロースゲル電気泳動で解析した。その結果、制限酵素ＥｃｏＲＩで切断された際認められる断片の大きさが異なる、３種類のＤＮＡ断片を含むプラスミドＤＮＡを持つ組換え体ｐｈＣＨＭ－Ｉ３－６、ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－３、ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－５、を得た。

【００５１】

純化したポジティブクローンｐｈＣＨＭ－Ｉ３－６、ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－３、ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－５のそれぞれからプラスミドＤＮＡを常法（「モレキュラークローニング」，コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，８６～９６頁（１９８２））に従い調製し、デュポン社製蛍光シークエンサーＧＥＮＥＳＩＳ　２，０００システムを用いて、配列を決定した。シークエンスプライマーとして次の２種の合成プライマー５’－ｄ（ＧＴＡＡＡＡＣＧＡＣＧＧＣＣＡＧＴ）３’（配列表の配列番号９）、５’－ｄ（ＣＡＧＧＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣ）３’（配列表の配列番号１０）を使用し、該ＤＮＡ断片の＋鎖、一鎖の塩基配列を決定した。この結果から得られた配列を基に、さらに数カ所の配列に相補的な合成ＤＮＡを作成して同様に配列を決定し、配列表の配列番号２から４に示すような塩基配列が得られた。なお、かかる塩基配列から推定されるアミノ酸配列も、配列表の配列番号２から４に併せて表記した。

【００５２】

実施例６　ヒトコンドロモジュリン遺伝子の３’下流配列のクローニング

実施例５で得られたクローンｐｈＣＨＭ－Ｉ３－６、ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－３、ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－５の配列は２ｎｄＰＣＲに用いた３’下流コーディング領域の配列すなわち、配列表の配列番号１６のＤＮＡプライマー５’－ｄ（ＡＣＡＣＣＡＴＧＣＣＣＡＧＧＡＴＧＣ）３’（１８ヌクレオチド）に相当する配列は合成ＤＮＡの配列であり、牛コンドロモジュリン遺伝子に由来する配列であった。そこでこの配列表の配列番号１６のＤＮＡプライマーに相当する領域およびこれより下流の領域のヒト塩基配列を取得するため、新たにＰＣＲ法を用いてクローニングを行った。

【００５３】

ＲＮＡの調製は以下のように行った。まずヒト正常肋軟骨組織約２０ｇを液体窒素中で粉砕し、グアニジウムチオシアネート水溶液等中でホモジナイズし、Ｃｈｉｒｇｗｉｎらの方法（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１８，５２９４－５２９９（１９７９））に従って、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法により約２ｍｇのＴｏｔａｌＲＮＡを得た。このＴｏｔａｌＲＮＡ２０μｇに対し、実施例４のｃＤＮＡ合成に用いたプライマーのようにアニールさせたプライマー８０ｐｍｏｌｅを用いて５０μｌの反応液［５０ｍＭトリス－塩酸（ｐＨ８．３）、５０ｍＭ塩化カリウム、８ｍＭ塩化マグネシウム、１ｍＭｄＮＴＰ（ｄＡＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＣＴＰ，ｄＴＴＰ），１０ｍＭジチオスレイトールおよび４０μＣｉ

α－^{32}Ｐ－ｄＣＴＰ］中で１００ユニットのＡＭＶ逆転写酵素を加えて、３７℃で反応させた。その結果、第一鎖ｃＤＮＡが鋳型ＲＮＡとハイブリッドを形成した状態で合成され、以後のＰＣＲ反応の鋳型として反応液の一部を用いた。

【００５４】

ＰＣＲはパーキン・エルマー・シータス・ＤＮＡ・サーマル・サイクラー（Ｐｅｒｋｉｎ・Ｅｌｍｅｒ・Ｃｅｔｕｓ・ＤＮＡ・Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｃｙｃｌｅｒ）を使用して、使用説明書に基づき、ジーンアンプキット（Ｇｅｎｅ　Ａｍｐ　ＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｋｉｔ；宝酒造製）を使って行った。すなわち鋳型ＤＮＡとしては前述のＴｏｔａｌＲＮＡから合成したｃＤＮＡ合成反応液より１μｌを用い、これに１０培濃度の反応緩衝液［５００ｍＭ　ＫＣｌ、１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．３）、１５ｍＭ　ＭｇＣｌ２　、０．１％（ｗ／ｖ）ゼラチン］１０μｌ、１．２５ｍＭ　４ｄＮＴＰ１６μｌ、２０μＭのプライマー＃５および２０μＭのプライマー＃２を各５μｌ、ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ０．５μｌを加えて１００μｌの系とした。反応は９４℃、１０分間の前処理後、９４℃１分間（変性ステップ）、５５℃１．５分間（アニーリングステップ）、７２℃２分間（伸長ステップ）のインキュベーションを３５サイクル行った。最後に７２℃で７分間のインキュベーションを行い、反応を終了した。

【００５５】

プライマー＃５としては、配列表の配列番号１７に示すＤＮＡプライマーで、実施例５で得られたヒト遺伝子から設計した遺伝子のコーディング領域の配列である、すなわち５’－ｄ（ＣＣＣＴＡＧＡＣＴＧＧＡＴＣＡＣ）３’（１６ヌクレオチド）、またプライマー＃２としては、ｃＤＮＡ合成の際のプライマーとして用いた配列表の配列番号１２の配列の一部に相補的な配列表の配列番号１４に記載の５’－ｄ（ＣＧＡＧＧＣＣＡＴＧＧＣＧＧＣＣ）３’（１６ヌクレオチド）を用いた。

【００５６】

ＰＣＲ反応混合液１００μｌ中の１０μｌを１％アガロースゲル電気泳動で解析し、約０．６ｋｂのバンドを常法に従って切り出してＤＮＡフラグメントを回収し、フェノール：クロロホルム＝１：１で抽出し、エタノール沈澱を行った。ＤＮＡ沈澱を２０μｌの滅菌脱イオン水に溶解し、このＤＮＡ断片の溶液５μｌと市販のｐＣＲ２ベクター（インビトロジェン社）０．２５μｇを１０μｌの反応液［６６ｍＭトリス－塩酸　ｐＨ７．６、６．６ｍＭ塩化マグネシウム、１０ｍＭジチオスレイトール、６６μＭＡＴＰ、基質ＤＮＡ］中で３５０ユニットのＴ４ＤＮＡリガーゼにより１６℃で１２時間反応させることにより、ｐＣＲ２ベクターのクローニングサイトに挿入し結合した。

【００５７】

この反応液３μｌを用いて、東洋紡績社製の大腸菌ＪＭ１０９のコンピテントセル（ＣＯＭＰＥＴＥＮＴ　ＨＩＧＨ）のトランスフォーメーションを行い、直径１５ｃｍのシャーレ中のアンピシリン含有（５０μｇ／ｍｌ）Ｘ－Ｇａｌ－ＩＰＴＧ－ＬＢ寒天培地（１％酵母抽出物、０．５％バクトトリプトン、０．５％塩化ナトリウム、０．００４％Ｘ－Ｇａｌ、１ｍＭＩＰＴＧ）に菌液を塗布した。シャーレに出現した耐性菌で、かつＸ－Ｇａｌにより発色していないコロニーを１２個選び、各々５ｍｌずつ培養し、Ｍａｎｉａｔｉｓらの方法（「モレキュラー　クローニング」，コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，３６５～３７０頁（１９８２））に従いプラスミドＤＮＡを回収し、制限酵素ＥｃｏＲＩで切断してアガロースゲル電気泳動で解析した。その結果、制限酵素ＥｃｏＲＩで切断された際のベクターＤＮＡ断片とは別に、約０．６ｋｂの大きさのＤＮＡ断片が認められるプラスミドＤＮＡを持つ組換え体、ｐｈＣＨＭ－ＩＬＡＳＴ８、ｐｈＣＨＭ－ＩＬＡＳＴ１２を得た。

【００５８】

純化したクローンｐｈＣＨＭ－ＩＬＡＳＴ８、ｐｈＣＨＭ－ＩＬＡＳＴ１２のそれぞれからプラスミドＤＮＡを常法（「モレキュラー　クローニング」，コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，８６～９６頁（１９８２））に従い調製し、デュポン社製蛍光シークエンサーＧＥＮＥＳＩＳ　２，０００システムを用いて、配列を決定した。シーク

エンスプライマーとして次の２種の合成プライマー５’－ｄ（ＧＴＡＡＡＡＣＧＡＣＧＧＣＣＡＧＴ）３’（配列表の配列番号９）、５’－ｄ（ＣＡＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣ）３’（配列表の配列番号１０）を使用し、該ＤＮＡ断片の＋鎖、一鎖の塩基配列を決定した。この結果から得られた配列を基に、さらに数カ所の配列に相補的な合成ＤＮＡを作成し、同様に配列を決定した。ｐｈＣＨＭ－ＩＬＡＳＴ８、ｐｈＣＨＭ－ＩＬＡＳＴ１２は共に配列が一致した。その結果、配列表の配列番号８に示すような塩基配列を含む３’下流配列が得られた。

【００５９】

実施例７　ｈＣｈＭ－Ｉ発現プラスミドの調製

実施例６で得られたクローンｐｈＣＨＭ－ＩＬＡＳＴ８、ｐｈＣＨＭ－ＩＬＡＳＴ１２のｈＣｈＭ－Ｉの塩基配列と、実施例５で得られたｃＤＮＡクローン、ｐｈＣＨＭ－Ｉ３－６、ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－３、ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－５とを比較した。ｐｈＣＨＭ－ＩＬＡＳＴ８、ｐｈＣＨＭ－ＩＬＡＳＴ１２のどちらのクローンにおいても、実施例５の２ｎｄＰＣＲに用いた３’下流コーディング領域の配列、すなわち配列表の配列番号１６のＤＮＡプライマー　５’－ｄ（ＡＣＡＣＣＡＴＧＣＣＣＡＧＧＡＴＧＣ）３’（１８ヌクレオチド）に相当する配列が、実施例５で得られたコンドロモジュリンの塩基配列と比較して２塩基の変異が確認された。しかしアミノ酸配列では変異が無いことが判明した。このことはまた、実施例５で得られたｐｈＣＨＭ－Ｉ３－６、ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－３、ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－５の各クローンを形質転換体で発現させた場合、それらクローンの塩基配列の一部がウシコンドロモジュリン遺伝子の塩基配列であったとしても、アミノ酸配列上は完全なｈＣｈＭ－Ｉを発現し得ることを示している。

【００６０】

そこで実施例５で得られたｃＤＮＡクローン、ｐｈＣＨＭ－Ｉ３－６、ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－３、ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－５よりＭａｎｉａｔｉｓらの方法（「モレキュラー　クローニング」（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｃｌｏｎｉｎｇ），コールドスプリング　ハーバー　ラボラトリー（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ），８６～９６頁（１９８２））に従いプラスミドＤＮＡを取得した。得られたプラスミドＤＮＡｐｈＣＨＭ－Ｉ３－６、ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－３、ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－５それぞれから制限酵素ＮｏｔＩとＮｓｉＩで切断し、一部ベクター部分の配列を含む約１ｋｂのＤＮＡ断片を各々のクローンから得た。これらのＤＮＡ断片は、ｈＣｈＭ－Ｉをコードする全ての領域、すなわち蛋白翻訳開始点ＡＴＧから終止コドンＴＡＡまでの領域を含む領域をカバーしていた。一方、市販の発現ベクターｐｃＤＮＡ１ｎｅｏ（インビトロジェン社）を、予め常法に従い制限酵素ＮｏｔＩとＮｓｉＩで切断しておいた。これと先ほどのＣｈＭ－Ｉ３－６、ＣｈＭ－Ｉ６－３、ＣｈＭ－Ｉ６－５の各ｃＤＮＡ断片を、常法に従いＴ４ＤＮＡリガーゼにより１０μｌの反応系で結合反応を行った。

【００６１】

次にこの発現ベクターとｈＣｈＭ－Ｉ遺伝子との結合反応の反応液を、それぞれ東洋紡績社製の大腸菌ＤＨ５αのコンピテントセル（ＣＯＭＰＥＴＥＮＴ　ＨＩＧＨ）を用いてトランスフォーメーションを行い、直径１５ｃｍのシャーレ中のアンピシリン含有（５０μｇ／ｍｌ）ＬＢ寒天培地（１％酵母抽出物、０．５％バクトトリプトン、０．５％塩化ナトリウム）に菌液を塗布した。シャーレに出現した耐性菌のコロニーを各々５ｍｌずつ培養し、Ｍａｎｉａｔｉｓらの方法（「モレキュラー　クローニング」，コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，３６５～３７０頁（１９８２））に従いプラスミドＤＮＡを回収し、制限酵素ＮｏｔＩとＮｓｉＩで切断してアガロースゲル電気泳動で解析した。その結果、目的の各ｈＣｈＭ－ＩｃＤＮＡ断片を発現ベクターｐｃＤＮＡ１ｎｅｏの制限酵素ＮｏｔＩとＮｓｉＩ切断部位に持つプラスミドＤＮＡ、ｐｃＤＮＡｈＣｈＭ－Ｉ３－６、ｐｃＤＮＡｈＣｈＭ－Ｉ６－３とｐｃＤＮＡｈＣｈＭ－Ｉ６－５により形質転換された組換え体を得た。

【００６２】

得られた組換え体の大腸菌から、Ｍａｎｉａｔｉｓらの方法（「モレキュラークローニン

グ」，コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー，８６～９６頁（１９８２））に従いプラスミドＤＮＡを回収、精製し、ｈＣｈＭ－Ｉ発現プラスミドＤＮＡを大量に得た。

実施例８　ｈＣｈＭ－Ｉの動物細胞での発現

実施例６により得られたｐｃＤＮＡｈＣｈＭ－Ｉ３－６、ｐｃＤＮＡｈＣｈＭ－Ｉ６－３とｐｃＤＮＡｈＣｈＭ－Ｉ６－５を、市販のリポフェクチン試薬（ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ^{TM}　Ｒｅａｇｅｎｔ　ギブコ（ＧＩＢＣＯ）社製）を用いて説明書に従いＣＯＳ細胞にトランスフェクションして、ＣＯＳ細胞を形質転換した。

【００６３】

すなわち、まず直径９ｃｍのシャーレ中のＤＭＥＭ培地でＣＯＳ細胞を培養した。次にシャーレから培地を除き、ＰＢＳ（－）［０．８％塩化ナトリウム、０．０２％塩化カリウム、０．１４４％燐酸水素二ナトリウム、０．０２４％燐酸二水素カリウム、ｐＨ７．４］で二回洗った。ＰＢＳ（－）を除き、Ｓｅｒｕｍ－ｆｒｅｅＤＭＥＭ培地を８ｍｌ加えた。一方、細胞にトランスフェクションするＤＮＡ溶液は、次のように予め調製をしておいた。まず、２０μｇのｐｃＤＮＡｈＣｈＭ－Ｉ３－６、ｐｃＤＮＡｈＣｈＭ－Ｉ６－３またはｐｃＤＮＡｈＣｈＭ－Ｉ６－５の各ＤＮＡを、アマシャム社製Ｎｏ．５５，４２６，０１３チューブ中で１００μｌのＳｅｒｕｍ－ｆｒｅｅＤＭＥＭ培地に溶解しておく。次に、ギブコ社製リポフェクチン試薬５０μｌとＳｅｒｕｍ－ｆｒｅｅＤＭＥＭ培地５０μｌを混和した溶液をＤＮＡ溶液に加え、１５分間室温で静置しておく。このようにして調製したリポフェクチン－ＤＮＡ懸濁液２００μｌを前述のＰＢＳ（－）で洗浄した細胞に加え、３７℃で５％ＣＯ２　存在下で一晩培養した。その後、リポフェクチンを含んだ培地を除き、１０％ＦＣＳの入ったＥＲＤＦ培地（極東製薬社製）を１０ｍｌシャーレに入れて、３７℃、５％CO_2　存在下で約５６時間培養を続けた。その後細胞の培地を集め、ｈＣｈＭ－Ｉの生理活性を鈴木らの方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１４６，３１３－３２０（１９８７））により測定し活性の存在を確認すると共に、常法に従いウエスタンブロット法を行いｈＣｈＭ－Ｉの発現を確認した。

【００６４】

実施例９　ｈＣｈＭ－Ｉの活性の評価

評価のための細胞の取得、培養および評価方法は、鈴木らの方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１４６，３１３－３２０（１９８７））に従って行った。すなわち４００～６００ｇの若いニュージーランドウサギより成長肋軟骨を分離し、分離した細胞をＨａｍ’ｓ　Ｆ－１２培地とダルベッコ修飾培地の１：１混合培養液（以下［ＦＡＤ培養液」と称す）に、１０％牛胎児血清を加えた物に対し、10^5　細胞／ｍｌとなるよう懸濁した。この細胞懸濁物０．１ｍｌを、タイプＩコラーゲン溶液（５０μｇ／ｍｌ）で一夜コートし、ＦＡＤ培養液で一度洗浄した９６穴培養プレートに蒔き、５％CO_2　を含む空気存在下で３７℃で培養した。培地は１日おきに交換した。

【００６５】

ＤＮＡ合成のアッセイは以下のごとく行った。すなわち上記細胞が９６穴培養プレート中でコンフルエントに達した後、細胞を０．３％牛胎児血清を含むＦＡＤ培養液で２４時間培養した。次に培養液に約０．０６～約２０ｎｇのｈＣｈＭ－Ｉを含む形質転換体の培養液、０．０４ｎｇＦＧＦ（線維芽細胞増殖因子）、０．３％牛胎児血清を含むＦＡＤ培養液０．１ｍｌを加え、２２時間培養した。さらに１０μｌの〔^{3}Ｈ〕チミジン（１３０μＣｉ／ｍｌ）を加え、４時間培養した後、細胞を氷冷した燐酸緩衝食塩水（２０ｍＭ燐酸緩衝液　ｐＨ７．０、０．１５Ｍ塩化ナトリウム）で３回洗った。これを５％トリクロロ酢酸で抽出し、さらにエタノール：エーテル＝３：１（体積比）で抽出した。抽出後の沈澱を０．３Ｍ水酸化ナトリウムに溶解し、これを１／２０容の６Ｍ塩酸で中和した物をシンチレーションカウンターで放射活性を測定した。その結果、ＦＧＦのみ添加した場合に比べ、ｈＣｈＭ－Ｉを同時に加えた時の方が多量の放射性チミジンの取り込みが見られ、ｈＣｈＭ－Ｉが強力な軟骨細胞の増殖促進効果を有することが示された。

【００６６】

ｈＣｈＭ－Ｉの血管内皮細胞に対する効果はウシ大動脈内皮細胞を用いて以下のように行った。ウシ大動脈内皮細胞２×１０^{3}　／ウェルになるように９６穴培養プレートに０．１ｍｌの２０％ウシ新生児血清を含むαＭＥＭ培地と共に播種した。CO_2　インキュベーター中で３７℃で４８時間培養した後、培地を新しい物に換えると同時に終濃度が０から３μｇ／ｍｌになるようにｈＣｈＭ－Ｉを含む形質転換体の培養液を加えた。さらに３７℃で１２時間培養した後、〔　^{3}Ｈ〕チミジンを１μＣｉ／ウェルになるように加え、３７℃で４時間、放射能の取り込みを行わせた。その後セルハーベスターで細胞を回収し、ＬＫＢβプレートを用いて放射能を測定した。その結果、ｈＣｈＭ－Ｉを加えた場合放射性チミジンの取り込みが抑制され、ｈＣｈＭ－Ｉが血管内皮細胞の増殖を抑制する活性を有することが示された。

【００６７】

【発明の効果】

本発明のｈＣｈＭ－Ｉは、ヒト由来の新規なタンパク質であり、それをコードする遺伝子を用いることにより、組み換えｈＣｈＭ－Ｉを安定に供給することができる。またｈＣｈＭ－Ｉは、軟骨細胞を増殖させる活性、軟骨細胞の分化機能を促進する活性さらに内皮細胞の増殖を抑制する活性等を有することから、医薬品としての利用が期待される。かかるｈＣｈＭ－Ｉは、既知の牛由来のものとはそのアミノ酸配列、遺伝子配列等において区別されるものであり、実際の臨床の場でヒトに適用する際は、より抗原性が低く、より効果的であると考えられる。

【００６８】

【配列表】

配列番号：１
配列の長さ：１０００
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
起源
　生物名：ヒト（Ｈｏｍｏ　Ｓａｐｉｅｎｃｅ）
直接の起源
　クローン名：λ４１１
　サブクローン名：ｐ４１１ＢＳ
配列の特徴
　特徴を表す記号：ｅｘｏｎ
　存在位置：１６１．．．２３２
　特徴を表す記号：ｅｘｏｎ
　存在位置：６９１．．．８３４
　特徴を決定した方法：Ｅ
配列

```
AGGTGAGGCG CTAGAAGGGG TGGGGACCGC TGGGCTGGCC CAGGCGGGAC CGTGCACCGT    60
GTGTGCGCGC GGCGTTGAAA TGCCCTGCAC GTCGGGGCAG CGGGACAGAT CCCAGGGTGC   120
CCAGGGAGTC TCCAAGTGCC TCACTCCTCC CGCCGCAAAC ATG ACA GAG AAC TCC     175
                                            Met Thr Glu Asn Ser
                                              1               5
GAC AAA GTT CCC ATT GCC CTG GTG GGA CCT GAT GAC GTG GAA TTC TGC     223
Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp Asp Val Glu Phe Cys
                 10                  15                  20
AGC CCC CCG GTGAGTAC CGCCAGGGAT TCCACACGCA GGGCCTGGGT TGTGTGAGTA    280
Ser Pro Pro
TCAGGTTCCA CAGTTCGGAC TCAGGGGTGC GTGCCACCGA ATGGGTGTGT TGGCGGGGGA   340
ATAAATTTGG GTCCCAAATG TGTGGGTGGG ATGTCGCCCC ACGCGTATGA GTGTGCAGGG   400
```

```
GTCACGGCAT CCACAGGCGG GTGCGGAGGG ACGTCCCGTG GCCGGTAGAG GGTGCAGGTC   460
CTGGGGCGAA GGCCCTGTGC TGCGGGGTTT GCTCATCCCA CTTCCACGCC CGACTGCAAA   520
GGACCCTCGG GAGGGAGCGC GGCGAAAGGG GCACCCGTAG GAGCCCGGGC GAGCTGTTTC   580
CCGCCCGACT CCCCACTCCC TGGGGGCTAC CGCGTGGGGC CCGGGTGCGC TGGGGGCCGC   640
AGGTGCTGGC GGCACAAACG CGACGGTCCC TCTCCCGCCC CGGCCCGCAG GCG TAC      696
                                                        Ala Tyr
                                                         25

GCT ACG CTG ACG GTG AAG CCC TCC AGC CCC GCG CGG CTG CTC AAG GTG     744
Ala Thr Leu Thr Val Lys Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val
             30                  35                  40

GGA GCC GTG GTC CTC ATT TCG GGA GCT GTG CTG CTG CTC TTT GGG GCC     792
Gly Ala Val Val Leu Ile Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala
         45                  50                  55

ATC GGG GCC TTC TAC TTC TGG AAG GGG AGC GAC AGT CAC ATT AGTCCA      840
Ile Gly Ala Phe Tyr Phe Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile
     60                  65                  70

GAGGGCGGCG CGCGGGGACC CCCGTGTCGC CCATGGTGCC CCTAGGGGGG GCCCGAGCGC   900
GGGCCGGCGA GGGGCGCGCG GCTGCCCGGC GGCCCCTCGG GCCCAGCGTG AGCTCCCCTC   960
TCCCATCCCA CTCTGGCACG CGGCTTTCCG CCTTAGGTCA                        1000
```

【００６９】

配列番号：２

配列の長さ：１００６

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：ヒト（Ｈｏｍｏ　Ｓａｐｉｅｎｃｅ）

直接の起源

クローン名：ｐｈＣＨＭ－Ｉ３－６

配列の特徴

特徴を表す記号：Ｐ　ＣＤＳ

存在位置：２．．１００３

特徴を決定した方法：Ｅ

配列

```
C ATG ACA GAG AAC TCC GAC AAA GTT CCC ATT GCC CTG GTG GGA CCT GAT  49
  Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp
   1               5                  10                  15
GAC GTG GAA TTC TGC AGC CCC CCG GCG TAC GCT ACG CTG ACG GTG AAG   97
Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Thr Leu Thr Val Lys
            20                  25                  30
CCC TCC AGC CCC GCG CGG CTG CTC AAG GTG GGA GCC GTG GTC CTC ATT  145
Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu Ile
        35                  40                  45
TCG GGA GCT GTG CTG CTG CTC TTT GGG GCC ATC GGG GCC TTC TAC TTC  193
Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr Phe
    50                  55                  60
TGG AAG GGG AGC GAC AGT CAC ATT TAC AAT GTC CAT TAC ACC ATG AGT  241
Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met Ser
65                  70                  75                  80
```

```
ATC AAT GGG AAA CTA CAA GAT GGG TCA ATG GAA ATA GAC GCT GGG AAC   289
Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Gly Asn
                85                  90                  95
AAC TTG GAG ACC TTT AAA ATG GGA AGT GGA GCT GAA GAA GCA ATT GCA   337
Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile Ala
            100                 105                 110
GTT AAT GAT TTC CAG AAT GGC ATC ACA GGA ATT CGT TTT GCT GGA GGA   385
Val Asn Asp Phe Gln Asn Gly Ile Thr Gly Ile Arg Phe Ala Gly Gly
        115                 120                 125
GAG AAG TGC TAC ATT AAA GCG CAA GTG AAG GCT CGT ATT CCT GAG GTG   433
Glu Lys Cys Tyr Ile Lys Ala Gln Val Lys Ala Arg Ile Pro Glu Val
    130                 135                 140
GGC GCC GTG ACC AAA CAG AGC ATC TCC TCC AAA CTG GAA GGC AAG ATC   481
Gly Ala Val Thr Lys Gln Ser Ile Ser Ser Lys Leu Glu Gly Lys Ile
145                 150                 155                 160
ATG CCA GTC AAA TAT GAA GAA AAT TCT CTT ATC TGG GTG GCT GTA GAT   529
Met Pro Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp
                165                 170                 175
CAG CCT GTG AAG GAC AAC AGC TTC TTG AGT TCT AAG GTG TTA GAA CTC   577
Gln Pro Val Lys Asp Asn Ser Phe Leu Ser Ser Lys Val Leu Glu Leu
            180                 185                 190
TGC GGT GAC CTT CCT ATT TTC TGG CTT AAA CCA ACC TAT CCA AAA GAA   625
Cys Gly Asp Leu Pro Ile Phe Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu
        195                 200                 205
ATC CAG AGG GAA AGA AGA GAA GTG GTA AGA AAA ATT GTT CCA ACT ACC   673
Ile Gln Arg Glu Arg Arg Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr
    210                 215                 220
ACA AAA AGA CCA CAC AGT GGA CCA CGG AGC AAC CCA GGC GCT GGA AGA   721
Thr Lys Arg Pro His Ser Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg
```

```
225                 230                 235                 240
CTG AAT AAT GAA ACC AGA CCC AGT GTT CAA GAG GAC TCA CAA GCC TTC   769
Leu Asn Asn Glu Thr Arg Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe
                245                 250                 255
AAT CCT GAT AAT CCT TAT CAT CAG CAG GAA GGG GAA AGC ATG ACA TTC   817
Asn Pro Asp Asn Pro Tyr His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe
            260                 265                 270
GAC CCT AGA CTG GAT CAC GAA GGA ATC TGT TGT ATA GAA TGT AGG CGG   865
Asp Pro Arg Leu Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg
        275                 280                 285
AGC TAC ACC CAC TGC CAG AAG ATC TGT GAA CCC CTG GGG GGC TAT TAC   913
Ser Tyr Thr His Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr
    290                 295                 300
CCA TGG CCT TAT AAT TAT CAA GGC TGC CGT TCG GCC TGC AGA GTC ATC   961
Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile
305                 310                 315                 320
ATG CCA TGT AGC TGG TGG GTG GCC CGC ATC CTG GGC ATG GTG TAA      1006
Met Pro Cys Ser Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Stop
                325                 330                 335
```

【００７０】

配列番号：３

配列の長さ：１００６

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：ヒト（Ｈｏｍｏ　Ｓａｐｉｅｎｃｅ）

直接の起源

クローン名：ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－３

配列の特徴

特徴を表す記号：Ｐ　ＣＤＳ

存在位置：２．．１００３

特徴を決定した方法：Ｅ

配列

```
C ATG ACA GAG AAC TCC GAC AAA GTT CCC ATT GCC CTG GTG GGA CCT GAT  49
  Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp
   1               5                  10                  15
GAC GTG GAA TTC TGC AGC CCC CCG GCG TAC GCT ACG CTG ACG GTG AAG   97
Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Thr Leu Thr Val Lys
            20                  25                  30
CCC TCC AGC CCC GCG CGG CTG CTC AAG GTG GGA GCC GTG GTC CTC ATT  145
Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu Ile
        35                  40                  45
TCG GGA GCT GTG CTG CTG CTC TTT GGG GCC ATC GGG GCC TTC TAC TTC  193
Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr Phe
    50                  55                  60
TGG AAG GGG AGC GAC AGT CAC ATT TAC AAT GTC CAT TAC ACC ATG AGT  241
Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met Ser
65                  70                  75                  80
```

```
ATC AAT GGG AAA CTA CAA GAT GGG TCA ATG GAA ATA GAC GCT GGG AAC   289
Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Gly Asn
                85                  90                  95
AAC TTG GAG ACC TTT AAA ATG GGA AGT GGA GCT GAA GAA GCA ATT GCA   337
Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile Ala
            100                 105                 110
GTT AAT GAT TTC CAG AAT GGC ATC ACA GGA ATT CGT TTT GCT GGA GGA   385
Val Asn Asp Phe Gln Asn Gly Ile Thr Gly Ile Arg Phe Ala Gly Gly
        115                 120                 125
GAG AAG TGC TAC ATT AAA GCG CAA GTG AAG GCT CGT ATT CCT GAG GTG   433
Glu Lys Cys Tyr Ile Lys Ala Gln Val Lys Ala Arg Ile Pro Glu Val
    130                 135                 140
GGC GCC GTG ACC AAA CAG AGC ATC TCC TCC AAA CTG GAA GGC AAG ATC   481
Gly Ala Val Thr Lys Gln Ser Ile Ser Ser Lys Leu Glu Gly Lys Ile
145                 150                 155                 160
ATG CCA GTC AAA TAT GAA GAA AAT TCT CTT ATC TGG GTG GCT GTA GAT   529
Met Pro Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp
                165                 170                 175
CAG CCT GTG AAG GAC AAC AGC TTC TTG AAT TCT AAG GTG TTA GAA CTC   577
Gln Pro Val Lys Asp Asn Ser Phe Leu Asn Ser Lys Val Leu Glu Leu
            180                 185                 190
TGC GGT GAC CTT CCT ATT TTC TGG CTT AAA CCA ACC TAT CCA AAA GAA   625
Cys Gly Asp Leu Pro Ile Phe Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu
        195                 200                 205
ATC CAG AGG GAA AGA AGA GAA GTG GTA AGA AAA ATT GTT CCA ACT ACC   673
Ile Gln Arg Glu Arg Arg Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr
    210                 215                 220
ACA AAA AGA CCA CAC AGT GGA CCA CGG AGC AAC CCA GGC GCT GGA AGA   721
Thr Lys Arg Pro His Ser Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg
```

```
225                 230                 235                 240
CTG AAT AAT GAA ACC AGA CCC AGT GTT CAA GAG GAC TCA CAA GCC TTC   769
Leu Asn Asn Glu Thr Arg Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe
                245                 250                 255
AAT CCT GAT AAT CCT TAT CAT CAG CAG GAA GGG GAA AGC ATG ACA TTC   817
Asn Pro Asp Asn Pro Tyr His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe
            260                 265                 270
GAC CCT AGA CTG GAT CAC GAA GGA ATC TGT TGT ATA GAA TGT AGG CGG   865
Asp Pro Arg Leu Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg
        275                 280                 285
AGC TAC ACC CAC TGC CAG AAG ATC TGT GAA CCC CTG GGG GGC TAT TAC   913
Ser Tyr Thr His Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr
    290                 295                 300
CCA TGG CCT TAT AAT TAT CAA GGC TGC CGT TCG GCC TGC AGA GTC ATC   961
Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile
305                 310                 315                 320
ATG CCA TGT AGC TGG TGG GTG GCC CGC ATC CTG GGC ATG GTG TAA      1006
Met Pro Cys Ser Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Stop
                325                 330                 335
```

【００７１】

配列番号：４

配列の長さ：８９２

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：ヒト（Ｈｏｍｏ　Ｓａｐｉｅｎｃｅ）

直接の起源

クローン名：ｐｈＣＨＭ－Ｉ６－５

配列の特徴

特徴を表す記号：Ｐ　ＣＤＳ

存在位置：２．．８８９

特徴を決定した方法：Ｅ

配列

```
C ATG ACA GAG AAC TCC GAC AAA GTT CCC ATT GCC CTG GTG GGA CCT GAT  49
  Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp
   1               5                  10                  15
GAC GTG GAA TTC TGC AGC CCC CCG GCG TAC GCT ACG CTG ACG GTG AAG   97
Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Thr Leu Thr Val Lys
            20                  25                  30
CCC TCC AGC CCC GCG CGG CTG CTC AAG GTG GGA GCC GTG GTC CTC ATT  145
Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu Ile
        35                  40                  45
TCG GGA GCT GTG CTG CTG CTC TTT GGG GCC ATC GGG GCC TTC TAC TTC  193
Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr Phe
    50                  55                  60
TGG AAG GGG AGC GAC AGT CAC ATT TAC AAT GTC CAT TAC ACC ATG AGT  241
Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met Ser
65                  70                  75                  80
```

```
ATC AAT GGG AAA TTA CAA GAT GGG TCA ATG GAA ATA GAC GCT GGG AAC   289
Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Gly Asn
                85                  90                  95
AAC TTG GAG ACC TTT AAA ATG GGA AGT GGA GCT GAA GAA GCA ATT GCA   337
Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile Ala
            100                 105                 110
GTT AAT GAT TTC CAG AAT GAA GGC AAG ATC ATG CCA GTC AAA TAT GAA   385
Val Asn Asp Phe Gln Asn Glu Gly Lys Ile Met Pro Val Lys Tyr Glu
        115                 120                 125
GAA AAT TCT CTT ATC TGG GTG GCT GTA GAT CAG CCT GTG AAG GAC AAC   433
Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp Gln Pro Val Lys Asp Asn
    130                 135                 140
AGC TTC TTG AGT TCT AAG GTG TTA GAA CTC TGC GGT GAC CTT CCT ATT   481
Ser Phe Leu Ser Ser Lys Val Leu Glu Leu Cys Gly Asp Leu Pro Ile
145                 150                 155                 160
TCC TGG CTT AAA CCA ACC TAT CCA AAA GAA ATC CAG AGG GAA AGA AGA   529
Ser Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu Ile Gln Arg Glu Arg Arg
                165                 170                 175
GAA GTG GTA AGA AAA ATT GTT CCA ACT ACC ACA AAA AGA CCA CAC AAT   577
Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr Thr Lys Arg Pro His Asn
            180                 185                 190
GGA CCA CGG AGC AAC CCA GGC GCT GGA AGA CTG AAT AAT GAA ACC AGA   625
Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg Leu Asn Asn Glu Thr Arg
        195                 200                 205
CCC AGT GTT CAA GAG GAC TCA CAA GCC TTC AAT CCT GAT AAT CCT TAT   673
Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe Asn Pro Asp Asn Pro Tyr
    210                 215                 220
CAT CAG CAG GAA GGG GAA AGC ATG ACA TTC GAC CCT AGA CTG GAT CAC   721
His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe Asp Pro Arg Leu Asp His
```

```
225                 230                 235                 240
GAA GGA ATC TGT TGT ATA GAA TGT AGG CGG AGC TAC ACC CAC TGC CAG   769
Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg Ser Tyr Thr His Cys Gln
                245                 250                 255
AAG ATC TGT GAA CCC CTG GGG GGC TAT TAC CCA TGG CCT TAT AAT TAT   817
Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr
            260                 265                 270
CAA GGC TGC CGT TCG GCC TGC AGA GTC ATC ATG CCA TGT AGC TGG TGG   865
Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile Met Pro Cys Ser Trp Trp
        275                 280                 285
GTG GCC CGC ATC CTG GGC ATG GTG TAA                              892
Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Stop
    290                 295
```

【００７２】

配列番号：５

配列の長さ：１００６

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：ヒト（Ｈｏｍｏ　Ｓａｐｉｅｎｃｅ）

配列の特徴

特徴を表す記号：Ｐ　ＣＤＳ

存在位置：２．．１００３

特徴を決定した方法：Ｅ

配列

```
C ATG ACA GAG AAC TCC GAC AAA GTT CCC ATT GCC CTG GTG GGA CCT GAT  49
  Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp
    1               5                  10                  15
GAC GTG GAA TTC TGC AGC CCC CCG GCG TAC GCT ACG CTG ACG GTG AAG   97
Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Thr Leu Thr Val Lys
            20                  25                  30
CCC TCC AGC CCC GCG CGG CTG CTC AAG GTG GGA GCC GTG GTC CTC ATT  145
Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu Ile
        35                  40                  45
TCG GGA GCT GTG CTG CTG CTC TTT GGG GCC ATC GGG GCC TTC TAC TTC  193
Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr Phe
    50                  55                  60
TGG AAG GGG AGC GAC AGT CAC ATT TAC AAT GTC CAT TAC ACC ATG AGT  241
Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met Ser
65                  70                  75                  80
ATC AAT GGG AAA CTA CAA GAT GGG TCA ATG GAA ATA GAC GCT GGG AAC  289
Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Gly Asn
```

```
                  85                  90                  95
AAC TTG GAG ACC TTT AAA ATG GGA AGT GGA GCT GAA GAA GCA ATT GCA   337
Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile Ala
            100                 105                 110
GTT AAT GAT TTC CAG AAT GGC ATC ACA GGA ATT CGT TTT GCT GGA GGA   385
Val Asn Asp Phe Gln Asn Gly Ile Thr Gly Ile Arg Phe Ala Gly Gly
        115                 120                 125
GAG AAG TGC TAC ATT AAA GCG CAA GTG AAG GCT CGT ATT CCT GAG GTG   433
Glu Lys Cys Tyr Ile Lys Ala Gln Val Lys Ala Arg Ile Pro Glu Val
    130                 135                 140
GGC GCC GTG ACC AAA CAG AGC ATC TCC TCC AAA CTG GAA GGC AAG ATC   481
Gly Ala Val Thr Lys Gln Ser Ile Ser Ser Lys Leu Glu Gly Lys Ile
145                 150                 155                 160
ATG CCA GTC AAA TAT GAA GAA AAT TCT CTT ATC TGG GTG GCT GTA GAT   529
Met Pro Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp
                165                 170                 175
CAG CCT GTG AAG GAC AAC AGC TTC TTG AGT TCT AAG GTG TTA GAA CTC   577
Gln Pro Val Lys Asp Asn Ser Phe Leu Ser Ser Lys Val Leu Glu Leu
            180                 185                 190
TGC GGT GAC CTT CCT ATT TTC TGG CTT AAA CCA ACC TAT CCA AAA GAA   625
Cys Gly Asp Leu Pro Ile Phe Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu
        195                 200                 205
ATC CAG AGG GAA AGA AGA GAA GTG GTA AGA AAA ATT GTT CCA ACT ACC   673
Ile Gln Arg Glu Arg Arg Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr
    210                 215                 220
ACA AAA AGA CCA CAC AGT GGA CCA CGG AGC AAC CCA GGC GCT GGA AGA   721
Thr Lys Arg Pro His Ser Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg
225                 230                 235                 240
CTG AAT AAT GAA ACC AGA CCC AGT GTT CAA GAG GAC TCA CAA GCC TTC   769
```

```
Leu Asn Asn Glu Thr Arg Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe
                245                 250                 255
AAT CCT GAT AAT CCT TAT CAT CAG CAG GAA GGG GAA AGC ATG ACA TTC   817
Asn Pro Asp Asn Pro Tyr His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe
            260                 265                 270
GAC CCT AGA CTG GAT CAC GAA GGA ATC TGT TGT ATA GAA TGT AGG CGG   865
Asp Pro Arg Leu Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg
        275                 280                 285
AGC TAC ACC CAC TGC CAG AAG ATC TGT GAA CCC CTG GGG GGC TAT TAC   913
Ser Tyr Thr His Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr
    290                 295                 300
CCA TGG CCT TAT AAT TAT CAA GGC TGC CGT TCG GCC TGC AGA GTC ATC   961
Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile
305                 310                 315                 320
ATG CCA TGT AGC TGG TGG GTG GCC CGT ATC TTG GGC ATG GTG TGA      1006
Met Pro Cys Ser Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Stop
                325                 330                 335
```

【００７３】

配列番号：６

配列の長さ：１００６

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：ヒト（Ｈｏｍｏ　Ｓａｐｉｅｎｃｅ）

配列の特徴

特徴を表す記号：Ｐ　ＣＤＳ

存在位置：２．．１００３

特徴を決定した方法：Ｅ

配列

```
C ATG ACA GAG AAC TCC GAC AAA GTT CCC ATT GCC CTG GTG GGA CCT GAT  49
  Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp
    1               5                  10                  15
GAC GTG GAA TTC TGC AGC CCC CCG GCG TAC GCT ACG CTG ACG GTG AAG   97
Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Thr Leu Thr Val Lys
            20                  25                  30
CCC TCC AGC CCC GCG CGG CTG CTC AAG GTG GGA GCC GTG GTC CTC ATT  145
Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu Ile
        35                  40                  45
TCG GGA GCT GTG CTG CTG CTC TTT GGG GCC ATC GGG GCC TTC TAC TTC  193
Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr Phe
    50                  55                  60
TGG AAG GGG AGC GAC AGT CAC ATT TAC AAT GTC CAT TAC ACC ATG AGT  241
Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met Ser
65                  70                  75                  80
ATC AAT GGG AAA CTA CAA GAT GGG TCA ATG GAA ATA GAC GCT GGG AAC  289
Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Gly Asn
```

```
                  85                  90                  95
AAC TTG GAG ACC TTT AAA ATG GGA AGT GGA GCT GAA GAA GCA ATT GCA   337
Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile Ala
            100                 105                 110
GTT AAT GAT TTC CAG AAT GGC ATC ACA GGA ATT CGT TTT GCT GGA GGA   385
Val Asn Asp Phe Gln Asn Gly Ile Thr Gly Ile Arg Phe Ala Gly Gly
        115                 120                 125
GAG AAG TGC TAC ATT AAA GCG CAA GTG AAG GCT CGT ATT CCT GAG GTG   433
Glu Lys Cys Tyr Ile Lys Ala Gln Val Lys Ala Arg Ile Pro Glu Val
    130                 135                 140
GGC GCC GTG ACC AAA CAG AGC ATC TCC TCC AAA CTG GAA GGC AAG ATC   481
Gly Ala Val Thr Lys Gln Ser Ile Ser Ser Lys Leu Glu Gly Lys Ile
145                 150                 155                 160
ATG CCA GTC AAA TAT GAA GAA AAT TCT CTT ATC TGG GTG GCT GTA GAT   529
Met Pro Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp
                165                 170                 175
CAG CCT GTG AAG GAC AAC AGC TTC TTG AAT TCT AAG GTG TTA GAA CTC   577
Gln Pro Val Lys Asp Asn Ser Phe Leu Asn Ser Lys Val Leu Glu Leu
            180                 185                 190
TGC GGT GAC CTT CCT ATT TTC TGG CTT AAA CCA ACC TAT CCA AAA GAA   625
Cys Gly Asp Leu Pro Ile Phe Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu
        195                 200                 205
ATC CAG AGG GAA AGA AGA GAA GTG GTA AGA AAA ATT GTT CCA ACT ACC   673
Ile Gln Arg Glu Arg Arg Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr
    210                 215                 220
ACA AAA AGA CCA CAC AGT GGA CCA CGG AGC AAC CCA GGC GCT GGA AGA   721
Thr Lys Arg Pro His Ser Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg
225                 230                 235                 240
CTG AAT AAT GAA ACC AGA CCC AGT GTT CAA GAG GAC TCA CAA GCC TTC   769
```

```
Leu Asn Asn Glu Thr Arg Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe
                245                 250                 255
AAT CCT GAT AAT CCT TAT CAT CAG CAG GAA GGG GAA AGC ATG ACA TTC   817
Asn Pro Asp Asn Pro Tyr His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe
            260                 265                 270
GAC CCT AGA CTG GAT CAC GAA GGA ATC TGT TGT ATA GAA TGT AGG CGG   865
Asp Pro Arg Leu Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg
        275                 280                 285
AGC TAC ACC CAC TGC CAG AAG ATC TGT GAA CCC CTG GGG GGC TAT TAC   913
Ser Tyr Thr His Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr
    290                 295                 300
CCA TGG CCT TAT AAT TAT CAA GGC TGC CGT TCG GCC TGC AGA GTC ATC   961
Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile
305                 310                 315                 320
ATG CCA TGT AGC TGG TGG GTG GCC CGT ATC TTG GGC ATG GTG TGA      1006
Met Pro Cys Ser Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Stop
                325                 330                 335
```

【００７４】

配列番号：７

配列の長さ：８９２

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：ヒト（Ｈｏｍｏ　Ｓａｐｉｅｎｃｅ）

配列の特徴

特徴を表す記号：Ｐ　ＣＤＳ

存在位置：２．．８８９

特徴を決定した方法：Ｅ

配列

```
C ATG ACA GAG AAC TCC GAC AAA GTT CCC ATT GCC CTG GTG GGA CCT GAT  49
  Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp
    1               5                  10                  15
GAC GTG GAA TTC TGC AGC CCC CCG GCG TAC GCT ACG CTG ACG GTG AAG   97
Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Thr Leu Thr Val Lys
            20                  25                  30
CCC TCC AGC CCC GCG CGG CTG CTC AAG GTG GGA GCC GTG GTC CTC ATT  145
Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu Ile
        35                  40                  45
TCG GGA GCT GTG CTG CTG CTC TTT GGG GCC ATC GGG GCC TTC TAC TTC  193
Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr Phe
    50                  55                  60
TGG AAG GGG AGC GAC AGT CAC ATT TAC AAT GTC CAT TAC ACC ATG AGT  241
Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met Ser
65                  70                  75                  80
ATC AAT GGG AAA TTA CAA GAT GGG TCA ATG GAA ATA GAC GCT GGG AAC  289
Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Gly Asn
```

```
                85                  90                  95
AAC TTG GAG ACC TTT AAA ATG GGA AGT GGA GCT GAA GAA GCA ATT GCA   337
Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile Ala
            100                 105                 110
GTT AAT GAT TTC CAG AAT GAA GGC AAG ATC ATG CCA GTC AAA TAT GAA   385
Val Asn Asp Phe Gln Asn Glu Gly Lys Ile Met Pro Val Lys Tyr Glu
        115                 120                 125
GAA AAT TCT CTT ATC TGG GTG GCT GTA GAT CAG CCT GTG AAG GAC AAC   433
Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp Gln Pro Val Lys Asp Asn
    130                 135                 140
AGC TTC TTG AGT TCT AAG GTG TTA GAA CTC TGC GGT GAC CTT CCT ATT   481
Ser Phe Leu Ser Ser Lys Val Leu Glu Leu Cys Gly Asp Leu Pro Ile
145                 150                 155                 160
TCC TGG CTT AAA CCA ACC TAT CCA AAA GAA ATC CAG AGG GAA AGA AGA   529
Ser Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu Ile Gln Arg Glu Arg Arg
                165                 170                 175
GAA GTG GTA AGA AAA ATT GTT CCA ACT ACC ACA AAA AGA CCA CAC AAT   577
Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr Thr Lys Arg Pro His Asn
            180                 185                 190
GGA CCA CGG AGC AAC CCA GGC GCT GGA AGA CTG AAT AAT GAA ACC AGA   625
Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg Leu Asn Asn Glu Thr Arg
        195                 200                 205
CCC AGT GTT CAA GAG GAC TCA CAA GCC TTC AAT CCT GAT AAT CCT TAT   673
Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe Asn Pro Asp Asn Pro Tyr
    210                 215                 220
CAT CAG CAG GAA GGG GAA AGC ATG ACA TTC GAC CCT AGA CTG GAT CAC   721
His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe Asp Pro Arg Leu Asp His
225                 230                 235                 240
GAA GGA ATC TGT TGT ATA GAA TGT AGG CGG AGC TAC ACC CAC TGC CAG   769
```

```
Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg Ser Tyr Thr His Cys Gln
                245                 250                 255
AAG ATC TGT GAA CCC CTG GGG GGC TAT TAC CCA TGG CCT TAT AAT TAT   817
Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr
            260                 265                 270
CAA GGC TGC CGT TCG GCC TGC AGA GTC ATC ATG CCA TGT AGC TGG TGG   865
Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile Met Pro Cys Ser Trp Trp
        275                 280                 285
GTG GCC CGT ATC TTG GGC ATG GTG TGA                               892
Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Stop
    290                 295
```

【００７５】

配列番号：８

配列の長さ：２７

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：ヒト（Ｈｏｍｏ　Ｓａｐｉｅｎｃｅ）

直接の起源

クローン名：ｐｈＣＨＭ－ＩＬＡＳＴ８

配列の特徴

特徴を表す記号：Ｐ　ＣＤＳ

存在位置：１．．２７

特徴を決定した方法：Ｅ

配列

```
GTG GCC CGT ATC TTG GGC ATG GTG TGA                               27
Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Stop
  1               5
```

【００７６】

配列番号：９
配列の長さ：１７
配列の型：核酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成ＤＮＡ
配列
GTAAAACGAC GGCCAGT 17

【００７７】
配列番号：１０
配列の長さ：１７
配列の型：核酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成ＤＮＡ
配列
CAGGAAACAG CTATGAC 17

【００７８】
配列番号：１１
配列の長さ：６０
配列の型：核酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成ＤＮＡ
配列
CTCGAGGCCA TGGCGGCCGC TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT 60

【００７９】
配列番号：１２
配列の長さ：２０
配列の型：核酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成ＤＮＡ
配列
GCGGCCGCCA TGGCCTCGAG 20

【００８０】

配列番号：１３
配列の長さ：１９
配列の型：核酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成ＤＮＡ
配列
AGTCTCCAAG TGCCTCACT 19

【００８１】
配列番号：１４
配列の長さ：１６
配列の型：核酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成ＤＮＡ
配列
CGAGGCCATG GCGGCC 16

【００８２】
配列番号：１５
配列の長さ：１８
配列の型：核酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成ＤＮＡ
配列
CATGACAGAG AACTCCGA 18

【００８３】
配列番号：１６
配列の長さ：１８
配列の型：核酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成ＤＮＡ
配列
ACACCATGCC CAGGATGC 18

【００８４】

配列番号：１７
配列の長さ：１６
配列の型：核酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成ＤＮＡ
配列
CCCTAGACTG GATCAC 16

【００８５】
配列番号：１８
配列の長さ：２７
配列の型：核酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成ＤＮＡ
配列
TCACACCATG CCCAAGATAC GGGCCAC 27

フロントページの続き

(72)発明者　近藤　淳
神奈川県横浜市緑区鴨志田町１０００番地　三菱化成株式会社総合研究所内
(72)発明者　小原　淳子
神奈川県横浜市緑区鴨志田町１０００番地　三菱化成株式会社総合研究所内
(72)発明者　森　哲子
神奈川県横浜市緑区鴨志田町１０００番地　三菱化成株式会社総合研究所内
(72)発明者　山田　英
神奈川県横浜市緑区鴨志田町１０００番地　三菱化成株式会社総合研究所内

審査官　高堀　栄二

(56)参考文献　Biochem.Biophys.Res.Commun.,Vol.175,No.3(1991)p.971-977

(58)調査した分野(Int.Cl.^{7}, ＤＢ名)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/WPI(DIALOG)