

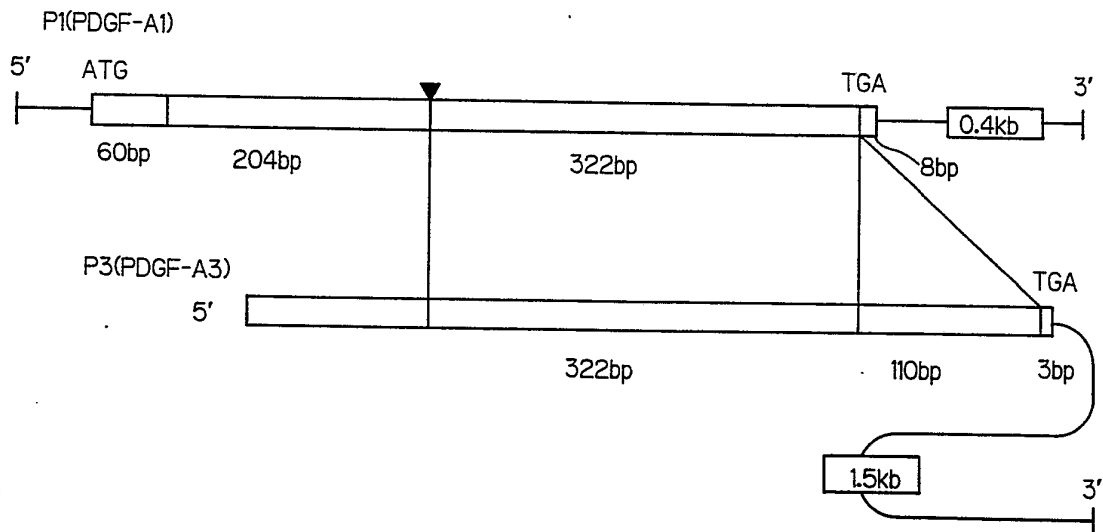


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 5 C12N 15/16, C12P 21/02 C07K 13/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 91/14777</p> <p>(43) 国際公開日 1991年10月3日 (03. 10. 1991)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP91/00381 (22) 国際出願日 1991年3月25日 (25. 03. 91)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平2/76314 1990年3月26日 (26. 03. 90) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ヤマサ醤油株式会社 (YAMASA SHOYU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP] 〒288 千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1 Chiba, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 永井良三 (NAGAI, Ryozo) [JP/JP] 〒113 東京都文京区湯島4丁目8-3-609 Tokyo, (JP) 中原賢一 (NAKAHARA, Kenichi) [JP/JP] 〒174 東京都板橋区前野町4丁目49-6 コーポアジマ202号 Tokyo, (JP) 黒尾 誠 (KUROO, Makoto) [JP/JP] 〒110 東京都台東区池之端1丁目4-22-903 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 浅村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.) 〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title : ISOFORM OF PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR A CHAIN

(54) 発明の名称 血小板由来増殖因子A鎖アイソフォーム



(57) Abstract

A cDNA which codes for PDGF-A3, a novel isoform of the platelet-driven growth factor A chain, has now been cloned from the rabbit fetus aorta. The PDGF-A3 has an amino acid sequence different from that of the known platelet-derived growth factor A chain at the C-terminus thereof and is thought to have a specific growth factor activity against mesenchyme cells.

(57) 要約

ウサギ胎児大動脈より、血小板由来増殖因子A鎖の新規なアイソフォーム(PDGF-A3)をコードするcDNAがクローニングされた。このPDGF-A3はそのカルボキシル末端に従来公知の血小板由来増殖因子A鎖のカルボキシル末端とは相違するアミノ酸配列を有しており、間葉系細胞に対する特異な増殖因子活性を有すると考えられる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	ML	マリ
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
BB	バルバドス	FR	フランス	MR	モーリタニア
BE	ベルギー	GA	ガボン	MW	マラウイ
BF	ブルキナ・ファソ	GI	ギニア	NL	オランダ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SN	セネガル
CH	スイス	KR	大韓民国	SU	ソビエト連邦
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	TD	チャド
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TG	トーゴ
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	US	米国
DE	ドイツ	MC	モナコ		
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		

明 細 書

血小板由来増殖因子A鎖アイソフォーム

5 技術分野

本発明は、血小板由来増殖因子A鎖 (Platelet
-derived growth factor A Chain, 以下、「PDGF-A」と略称することもある) の新規なアイソフォーム
(Isoform) 及びそれをコードするDNAに関するもの
10 である。

背景技術

血小板由来増殖因子 (PDGF) は血小板から放出される平滑筋や線維芽細胞に対する増殖因子として血小板浮遊液から精製されたタンパク質であり、A鎖、B鎖と
15 呼ばれる2本のポリペプチド鎖がS-S結合で結合した構造を有している。

PDGFの構成成分であるPDGF-Aは間葉系細胞に対して強力な増殖因子活性を有し、動脈硬化の発症に重要な役割を演じていると考えられている。

20 従来、ヒトグリオーマ細胞 (human glioma cell)、ヒト内皮細胞およびカエル卵細胞からPDGF-AのcDNAがクローニングされ、PDGF-AをコードするcDNAの塩基配列およびPDGF-Aのアミノ酸配列が明らかにされている (Nature, 320, 695~6
25 99 (1986)、Nature, 328, 619~621

(1987)、Science, 241, 1223~1225
(1988)など参照)。

これら明らかにされたPDGF-Aのアミノ酸配列を
比較した結果、ヒトグリオーマ細胞からクローニングさ
5 れたPDGF-Aとヒト内皮細胞からクローニングされ
たPDGF-Aはアミノ末端から数えて107番目のア
ミノ酸までのアミノ酸配列は同一であり、108番目以
降のC末端部付近のアミノ酸配列が異なることが明らか
にされた。このため、PDGF-Aには2つのアイソフ
10 ォームが存在すると考えられている。短いカルボキシ末
端を持つ内皮細胞由来のPDGF-AはPDGF-A1
と、長いカルボキシ末端を持つグリオーマ細胞由来の
PDGF-AはPDGF-A2とそれぞれ略称されてい
る。

15 また、カエルの卵細胞からクローニングされた
PDGF-Aはそのアミノ酸配列においてヒトグリオー
マ由来のPDGF-A2と高い相同性を示し、PDGF
-A2のグループに含まれるものであった。

PDGF-Aの持つ間葉系細胞に対する増殖因子活性
20 はカルボキシル末端部の構造に依存し、この部分(10
8番目以降の部分)が短いPDGF-A1はこの部分が
長いPDGF-A2に比して著しく低活性であることが
知られている(Nature, 328, 621~624(19
87))。

25 発明の開示

したがって、本発明の目的は従来報告されている PDGF-A とは異なる構造を有し、強力な増殖因子活性を有する PDGF-A の新規なアイソフォームを提供することを目的とするものである。

5 本発明の他の目的は、PDGF-A の新規なアイソフォームをコードする DNA を提供することを目的とするものである。

すなわち、本発明は、新規な PDGF-A アイソフォーム (PDGF-A 3) および該 PDGF-A アイソフォームの前駆体蛋白質 (プロ体およびプレプロ体) に関するものである。また、本発明は上記の本発明の PDGF-A アイソフォームおよび該 PDGF-A アイソフォームの前駆体蛋白質 (プロ体およびプレプロ体) をコードする DNA 配列を含有する DNA に関するものである。

図面の簡単な説明

第 1 図はウサギ胎児大動脈よりクローニングされた P1 (PDGF-A 1) cDNA, P3 (PDGF-A 3) cDNA の概要を示したものである。

20 322 bp の cDNA は PDGF-A をコードする P1 と P3 における同一の DNA 配列部分を示し、3' 末端側の P1 の 8 bp 及び P3 の 110 bp の cDNA は非共通部分の DNA 配列を示す。P1 の 5' 末端側の 60 bp 及び 204 bp は、それぞれシグナルペプチドをコードする
25 DNA 配列及びプロペプチドをコードする DNA 配列を

示す。

第2図はP1cDNAによりコードされているPDGF-Aアイソフォーム(PDGF-A1)前駆体蛋白質のアミノ酸配列と塩基配列を示したものである。

- 5 白い三角はシグナルペプチドとプロペプチドとの連結部位を示し、黒い三角はプロペプチドとPDGF-A1との連結部位を示す。一重の下線部分は従来報告されているプロペプチドのアミノ酸配列と相違する部分を示す。二重の下線部分はPDGF-A3と相違するカルボキシ
- 10 末端を示す。

第3図はP3cDNAによりコードされているPDGF-Aアイソフォーム(PDGF-A3)前駆体蛋白質のアミノ酸配列と塩基配列を示したものである。

- 15 白い三角はシグナルペプチドとプロペプチドとの連結部位を示し、黒い三角はプロペプチドとPDGF-A3との連結部位を示す。一重の下線部分は従来報告されているプロペプチドのアミノ酸配列と相違する部分を示す。二重の下線部分はPDGF-A1と相違するカルボキシ
- 20 末端を示す。

- 第4図は生体内で同一のPDGF-A遺伝子からPDGF-A1とPDGF-A3がそれぞれ選択的スプライシングにより調製される過程を模式的に示したものである。

- 第5図は本発明のPDGF-A3、ヒトグリオーマ
- 25 PDGF-Aおよびカエル卵細胞PDGF-AのC末端

部付近のアミノ酸配列を比較したものである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

なお、本明細書においては、アミノ酸は3文字記号に
 5 より、またDNAの塩基は1文字記号〔Nucleic Acid
 Research, 13, 3021-3030 (1985) ; 及
 び The Biochemical Journal, 219, No2, 345 -
 373 (1984) 〕により表示する。

1. 本発明のPDGF-Aアイソフォームおよびその前
 10 駆体蛋白質

本発明のPDGF-Aアイソフォームはそのカルボキ
 シル末端に下記式〔I〕のアミノ酸配列を有するもの、
 または該アミノ酸配列の一部と同じ配列を有し、かつ下
 記式〔I〕のアミノ酸配列の保有する機能と実質的に同
 15 一の機能を有するペプチドをカルボシキル末端に有する
 ものである。

	G l y	T h r	L e u	L e u	P r o	A l a
	P r o	G l y	G l y	V a l	H i s	P r o
	G l n	G l y	C y s	L e u	A r g	A l a
20	H i s	A s p	G l y	C y s	G l n	S e r
	S e r	A r g	A s n	H i s	M e t	G l n
	A l a	L e u	G l y	T r p	L y s	L y s
	L y s	M e t				〔 I 〕

特に、上記式〔I〕のアミノ酸配列で表わされるポリ
 25 ペプチドがアミノ末端から数えて108番目以降に結合

されているものが好ましい。尚、カルボキシ末端以外のアミノ酸配列は、公知のヒト内皮細胞、ヒトグリオーマ細胞あるいはカエル卵細胞由来のPDGF-Aのアミノ配列〔Nature, 320, 695-699 (1986),
 5 Nature, 328, 619-621 (1987);
 Science, 241, 1223-1225 (1988)〕
 と同じものでもよく、また本発明によってクローニングされたウサギ胎児大動脈由来のアミノ酸配列でもよい。

そのようなアイソフォームを具体的に例示すれば、下
 10 記式〔II〕で表わされるものを例示することができる。

	T h r	I l e	G l u	G l u	A l a	I l e
	P r o	A l a	I l e	C y s	L y s	T h r
	A r g	T h r	V a l	I l e	T y r	G l u
	I l e	P r o	A r g	S e r	G l n	V a l
15	A s p	P r o	T h r	S e r	A l a	A s n
	P h e	L e u	I l e	T r p	P r o	P r o
	C y s	V a l	G l u	V a l	L y s	A r g
	C y s	T h r	G l y	C y s	C y s	A s n
	T h r	S e r	S e r	V a l	L y s	C y s
20	G l n	P r o	S e r	A r g	V a l	H i s
	H i s	A r g	S e r	V a l	L y s	V a l
	A l a	L y s	V a l	G l u	T y r	V a l
	A r g	L y s	L y s	P r o	L y s	L e u
	L y s	G l u	V a l	G l n	V a l	A r g
25	L e u	G l u	G l u	H i s	L e u	G l u

〔Ⅲ〕で表わされる68個のアミノ酸からなるポリペプチドが例示されるが、特にこのポリペプチドに限定されず、同様の機能を有するものであれば、特にアミノ末端部位付近の1個または複数個の独立または連続したアミノ酸が欠失、挿入または置換されているものであってもよい。

	G l u	G l u	P r o	G l y	I l e	P r o
	A r g	G l u	V a l	L e u	A s p	A r g
	L e u	A l a	A r g	S e r	G l n	I l e
10	H i s	S e r	I l e	A r g	A s p	L e u
	G l n	A r g	L e u	L e u	G l u	I l e
	A s p	S e r	V a l	G l y	A l a	G l u
	A s p	A l a	P r o	G l u	P r o	S e r
	L e u	A r g	A l a	P r o	G l y	V a l
15	H i s	T h r	A l a	A r g	H i s	V a l
	A l a	G l u	L y s	P r o	P r o	A l a
	P r o	V a l	P r o	V a l	A r g	A r g
	L y s	A r g				

〔Ⅲ〕

また、本発明のPDGF-Aアイソフォームの前駆体蛋白質中のシグナルペプチドはPDGF-Aアイソフォームの宿主細胞内外への分泌を促す機能を有するものであれば特に制限されない。

具体的に、このようなシグナルペプチドとしては下記式〔Ⅳ〕で表わされる20個のアミノ酸からなるポリペプチドが例示されるが、該ポリペプチドも同様の機能を

有するものであれば、1個または複数個の独立または連続したアミノ酸が欠失、挿入または置換されているものであってもよい。

Met Arg Thr Leu Ala Cys
 5 Arg Leu Leu Leu Gly Cys
 Gly Tyr Leu Ala His Val
 Leu Ala (IV)

これらのプロペプチドおよびシグナルペプチドは PDGF-Aアイソフォームのアミノ酸末端に結合することにより PDGF-Aアイソフォームの前駆体蛋白質を構成する。すなわち、PDGF-Aアイソフォームとプロペプチドが結合してプロPDGF-Aアイソフォームを構成し、プロPDGF-Aアイソフォームとシグナルペプチドが結合してプレプロPDGF-Aアイソフォームを構成する。

II. 本発明のPDGF-Aアイソフォームおよびその前駆体蛋白質をコードするDNA配列を含有するDNA

上記本発明のPDGF-AアイソフォームをコードするDNA配列を含有するDNAは、カルボキシ末端に上記式〔I〕のアミノ酸配列を有するPDGF-AアイソフォームをコードするDNA配列を含有するDNA、または該アミノ酸配列の一部と同じ配列を有し、かつ上記式〔I〕のアミノ酸配列の保有する機能と実質的に同一の機能を有するペプチドをカルボキシ末端に有する PDGF-AアイソフォームをコードするDNA配列を

含有するDNAである。このDNAは本発明のPDGF-Aアイソフォームをコードし、適当な宿主細胞中に導入した時に本発明のPDGF-Aアイソフォームを発現し得るものであればいずれのDNAでもよい。

- 5 このようなDNA中の本発明のPDGF-Aアイソフォームをコードする部分のDNA配列の具体的一例としては下記式〔V〕で表わされるものを挙げる事ができる。

5' - A C G A T C G A G G A A G C C A T T C
10 C T G C C A T C T G C A A G A C C A G G A C
G G T C A T T T A C G A G A T A C C T C G G
A G T C A G G T G G A C C C C A C G T C G G
C C A A C T T C C T G A T C T G G C C G C C
G T G C G T G G A G G T C A A G C G C T G C
15 A C C G G C T G T T G C A A C A C C A G C A
G C G T C A A G T G C C A G C C C T C G C G
G G T G C A C C A C C G C A G C G T C A A G
G T G G C C A A G G T G G A G T A T G T C A
G A A A G A A G C C C A A G T T G A A A G A
20 A G T G C A G G T G C G G C T G G A G G A G
C A C C T G G A G T G C G C G T G C G C G G
C C T C G A G C G C G G G C C C G G A G C A
C C G C G A G G A G G A G G C A G G G A C C
C T C C T G C C C G C G C C T G G T G G C G
25 T C C A T C C T C A G G G T T G C C T C A G

A G C C C A C G A T G G C T G C C A G A G C
 T C C A G A A A T C A C A T G C A A G C C C
 T G G G C T G G A A G A A G A A G A T G - 3'
 [V]

5 また、本発明の P D G F - A アイソフォームのカルボ
 キシ末端に相当する上記式〔I〕のアミノ酸配列または
 該アミノ酸配列の一部と同一のアミノ酸配列をコードす
 る D N A 配列は、本発明の P D G F - A アイソフォーム
 を遺伝子工学的的方法により製造する場合に利用すること
 10 ができる。このような D N A 配列は上記式〔I〕のアミ
 ノ酸配列または該アミノ酸配列の一部と同一のアミノ酸
 配列をコードし、本発明の P D G F - A アイソフォーム
 を発現し得るものであればいずれの D N A 配列であって
 もよい。

15 このような D N A 配列の具体的一例としては下記式
 〔VI〕で表されるものを挙げることができる。

5' - G G G A C C C T C C T G C C C G C G C C T G
 G T G G C G T C C A T C C T C A G G G T T G C C T
 C A G A G C C C A C G A T G G G C T G C C A C A G
 20 C T C C A G A A A T C A C A T G C A A G C C C T G
 G G C T G G A A G A A G A A G A T G - 3' [VI]

本発明の P D G F - A アイソフォームの前駆体蛋白質
 のプロペプチドの具体例として挙げた前述の 68 個のア
 ミノ酸からなる式〔III〕のポリペプチドをコードする
 25 D N A 配列を含有する D N A としては、該ポリペプチド

をコードし、本発明のPDGF-Aアイソフォームの前駆体蛋白質を発現し得るものであればいずれのDNAであってもよい。

このようなDNA中のプロペプチドをコードする部分
5 のDNA配列としては下記式〔VI〕で表わされるものが例示される。

```

5' - G A G G A A C C C G G G A T C C C C C
G C G A G G T G C T G G A C A G G C T C G C
C C G C A G C C A G A T C C A C A G C A T C
10 C G G G A C C T G C A G C G G C T C C T G G
A G A T T G A C T C C G T A G G G G C T G A
G G A C G C T C C G G A G C C G A G C C T G
A G A G C C C C G G C G T C C A C A C G G
C C A G G C A T G T G G C C G A G A A G C C
15 G C C A G C G C C G G T G C C C G T G C G G
A G G A A G C G T - 3'           〔VII〕

```

本発明のPDGF-Aアイソフォームの前駆体蛋白質中のシグナルペプチドの具体例として挙げた前述の20個のアミノ酸からなる式〔IV〕のポリペプチドをコード
20 するDNA配列を含有するDNAとしては、該ポリペプチドをコードし本発明のPDGF-Aアイソフォームの前駆体蛋白質を発現し得るものであればいずれのDNAであってもよい。

このようなDNA中のシグナルペプチドをコードする
25 部分のDNA配列としては下記式〔VIII〕で表わされるも

のが例示される。

5' - A T G A G G A C C T T G G C T T G C C
 G G C T G C T C C T C G G C T G C G G A T A
 C C T C G C C C A T G T T C T G G C C - 3'

5

〔Ⅷ〕

III. 本発明のPDGF-Aアイソフォームおよびその
 前駆体蛋白質、並びにそれらをコードするDNA配列
 を含有するDNAの調製

上記したようなPDGF-Aアイソフォームをコード
 10 するDNA配列を含有するDNAは、cDNAから調製
 する方法、トリエステル法、フォスファイト法などの方
 法を用いて化学的に合成する方法などの通常の方法を用
 いて調製することができる。

たとえば、cDNAから調製する方法を例に挙げて本
 15 発明のPDGF-AアイソフォームをコードするDNA
 配列を含有するDNAの調製を説明すれば、①cDNA
 ライブラリーの調製、②目的とするPDGF-Aアイソ
 フォームをコードするDNA配列を含有するcDNAク
 ローンの選出等の常法を適宜組み合わせることより実施
 20 することができる。

① cDNAライブラリーの調製

cDNAライブラリーの調製は常法に従って行うこと
 ができる。たとえば、動物胎児の血管より常法に従い全
 RNAを抽出し、これをオリゴ(dT)セルロースカラ
 25 ムに通液し、ポリ(A)RNAを精製する。得られたm

R N A を鋳型として、2 本鎖 c D N A を、たとえば
Gubler -Hoffman 法 (Gubler, U. and Hoffman, J.,
Gene, 2 5, 2 6 3 (1 9 8 3))、Okayama-Berg法
(Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell Biol., 2, 1
5 6 1 (1 9 8 2)) などの通常の方法を用いて合成する。
合成した c D N A から c D N A ライブラリーの調製は、
λ Z a p などのファージベクターを用いるインビトロパ
ッケージング (in vitro packaging) 法 (Short, J. M
et al, Nucleic acids Res., 1 6, 7 5 8 3 ~ 7 6 0
10 0 (1 9 8 8))、プラスミドベクターを用いる
Okayama-Berg法 (前記) などの通常の方法を用いて行う
ことができる。

② c D N A ライブラリーからのクローンの選出および
塩基配列の決定

15 c D N A ライブラリーから P D G F - A アイソフォーム
をコードする D N A 配列を含有する c D N A クロンの
選出は、ファージベクターを用いるプラークハイブリ
ダイゼーション法 (Maniatis et al., Molecular
cloning, Cold Spring Harbor Laboratory,
20 Cold Spring Harbor, New York (1 9 8 2))、ま
たはプラスミドベクターを用いるコロニーハイブリダイ
ゼーション法 (Perbal, B., A Practical Guide to
Molecular cloning, John Wiley & Sons, New York (1
9 8 4)) を用いて行うことができる。スクリーニング
25 の際に使用するプローブとしては、既知の P D G F - A

アイソフォームの塩基配列を参考にして作製した40～60merの合成オリゴヌクレオチドなどを使用することができる。該プローブを用いてハイブリダイズするクローンを選出し、その組換え体ファージDNA（または、
5 組換え体プラスミドDNA）を常法に従って調製し、挿入されたcDNA断片の塩基配列をジデオキシチエインターミネーター法（Sager, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 74, 5463（1977）またはマクサムーギルバート法（Methods in Enzymology,
10 65, 497（1980））により決定する。

決定されたDNA塩基配列に対応したcDNAのコードする蛋白質のアミノ酸配列と従来報告されているPDGF-Aアイソフォームのアミノ酸配列とを比較して、cDNAのコードする蛋白質がPDGF-Aアイソ
15 フォームまたはその前駆体蛋白質であることを確認する。

このようにして得られたcDNAからPDGF-AアイソフォームまたはPDGF-Aアイソフォームの前駆体蛋白質のオープンリーディングフレームをコードするDNAを調製し、このDNAを適当な発現ベクターに導
20 入後、得られた組換えプラスミドを用いて宿主細胞（大腸菌、酵母、枯草菌など）を形質転換する。この形質転換体を培養し、本発明のPDGF-Aアイソフォームまたはその前駆体蛋白質を発現させる。得られた本発明のPDGF-Aアイソフォームまたはその前駆体蛋白質は、
25 通常の生理活性物質の単離精製法により単離精製するこ

とができる。

実施例

以下、実施例を示し、本発明をより具体的に説明する。

- (1) 血管由来PDGF-AアイソフォームをコードするDNA配列を含有するcDNAクローンの単離

(1-a) cDNAライブラリーの調製

-70°Cに保冷しておいた妊娠4週間のウサギ胎児より摘出した大動脈から熱フェノール法に従ってRNAを抽出した。抽出したRNAは、Maniatisらの方法 (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982)) に従って、オリゴ(dT)セルロースクロマトグラフィーを行い、ポリ(A)RNAを精製した。精製したポリ(A)RNAを用いて、Gubler-Hoffman法 (Gene, 25, 263 (1983)) に従って、2本鎖cDNAを調製した。第1鎖は、プライマーとしてオリゴ(dT)12-18 (ファルマシア社製) を用い、Avian myeloblastosis virusの逆転写酵素(ベーリンガーマンハイム社製)を使用して作製した。第2鎖は、RNase H (ベーリンガーマンハイム社製) およびDNAポリメラーゼI (ベーリンガーマンハイム社製) を使用して合成した。作製した2本鎖cDNA 2μgを50μlの反応液〔100mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)、2mMジチオスレイトール(DTT)、10mM EDTA、80μM S-アデノシルメチオニン、10unitのEcoRIメチラーゼ

(ベーリンガーマンハイム社製) } 中 37 °C、1 時間処理し、エタノール沈澱により DNA を回収した。回収した DNA は 50 μ l の反応液 [67 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、6.7 mM 塩化マグネシウム、1 mM

5 2-メルカプトエタノール、33 μ M dNTP、2 unit のクレノーフラグメント (ベーリンガーマンハイム社製) } 中、37 °C で 1 時間反応させ、cDNA 断片を平滑末端化した。平滑末端化した cDNA 断片を 50

10 μ l の反応液 [66 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6)、6.6 mM 塩化マグネシウム、10 mM DTT、0.1 mM ATP、100 unit の T4 DNA リガーゼ (ベーリンガーマンハイム社製)、10 ng/ μ l の p E c o R I リンカー (ベーリンガーマンハイム社製) } 中 12 °C、1 2 時間処理し、エタノールで沈澱させて DNA を回収後、

15 50 μ l の反応液 [100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、7 mM 塩化マグネシウム、50 mM 塩化ナトリウム、7 mM 2-メルカプトエタノール、0.01% ウシ血清アルブミン、20 unit の E c o R I (ベーリンガーマンハイム社製) } 中、37 °C で 2 時間処理し、

20 cDNA 断片を E c o R I 末端化した。

反応液中の過剰の E c o R I リンカーは、セファデックス (Sephadex) G-100 を充填したカラムクロマトグラフィーにより除去した。

λ Zap (Short, J. M. et al, Nucleic acids Res.,

25 16, 7583~7600 (1988)) DNA 1 μ g

を反応液 20 μ l [100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、7 mM 塩化マグネシウム、50 mM 塩化ナトリウム、7 mM 2-メルカプトエタノール、0.01% ウシ血清アルブミン、20 unit の EcoRI] 中、37°C、
5 2時間処理し、エタノールで沈澱させてDNAを回収後、
反応液 20 μ l [1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0)、
1 unit の大腸菌アルカリフォスファターゼ (ベーリンガー
マンハイム社製)] 中、37°C、2時間処理し、フェ
ノール-クロホルム抽出およびエタノール沈澱を行っ
10 て、DNAを回収した。

EcoRI 末端化した cDNA 断片と EcoRI およ
びアルカリフォスファターゼ処理した λ Zap DNA
を混合し、反応液 50 μ l [66 mM トリス-塩酸緩衝液
(pH 7.6)、6.6 mM 塩化マグネシウム、10 mM
15 DTT、0.1 mM ATP、100 unit の T4 DNA リ
ガーゼ] 中、16°C で12時間反応させた。この反応液
を、Williamsらの方法 (Genetic Engineering, 2, Pl
enum Press (1980)) に準じて、 λ DNA インビト
ロパッケージングキット (in vitro Packaging kit (ア
20 マシャム社製)) を使用して、インビトロパッケージ
グを行い、大腸菌 Y1088 (ATCC No. 3719
5) を形質導入し、 5×10^5 以上の cDNA ライブラ
リーを作製した。

(1-b) cDNA ライブラリーからのクローンの選出お
25 よび塩基配列の決定

この cDNA ライブラリーの中から、PDGF-A アイソフォームをコードする DNA 配列を含有する cDNA を選出するため、ヒトグリオーマ由来の PDGF-A (Nature, 320, 695-699 (1986)) をもとに合成した 50mer のオリゴヌクレオチドをプローブとしたプライクハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning, 前述) を用いてスクリーニングした。その結果、 2×10^5 プラークの中で 2 プラークがプローブとハイブリダイズした。プローブとハイブリダイズしたクローンより plate lysate 法 (Molecular cloning, 前述) に従って組換え体ファージ DNA を調製した。挿入された EcoRI 断片は、プラスミドベクター-pBluescript SK (-) (Nucleic Acide Res., 12, 7035~7056 (1984) : Stratagene 社製) にサブクローニングを行い、各種制限酵素切断により構造解析を行った。解析の結果、制限酵素切断地図の異なる 2 つのクローン、P1 および P3 の挿入された cDNA 断片の塩基配列をジデオキシチェーンターミネーター法 (Sanger, F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 74, 5463 (1977)) に従って決定した。得られた DNA 塩基配列よりタンパク質の一次構造を推定し、ヒトグリオーマ由来の PDGF-A と比較し、P1 と P3 がいずれも PDGF-A をコードする DNA 配列を含有する cDNA であることを確認した。2 種類の cDNA クローンのうち、P1 は全長が 1

Kbで、5' 非翻訳部と20個のアミノ酸からなるシグナルペプチドおよびそれにひきつづき68個のアミノ酸からなるプロペプチドとPDGF-AアイソフォームとからなるPDGF-Aアイソフォームの前駆体蛋白質をコードしていた(第1図参照)。

このPDGF-Aの前駆体蛋白質は68番目のアミノ酸であるアルギニンと次のスレオニンの間でペプチターゼにより切断され、最終的には110個のアミノ酸よりなるPDGF-Aとして分泌されたと考えられた(第2
10 図参照)。このPDGF-Aアイソフォームはヒト内皮細胞由来のPDGF-Aアイソフォーム(Tong B. D et al, Nature, 328, 619-621, (1987))と90%の相同性を示し、両者のカルボキシル末端は一致していた。このため、このPDGF-Aアイソフォーム
15 ムはPDGF-A1のグループに属すると考えられる。

一方、P3は、全長が2Kbで、第1図のP3(PDGF-A3)に示されているように、5'端はPDGF-A前駆体蛋白質の途中からコードが開始されていた。尚、その後の本発明者らのクローニングにより、
20 P3もP1と同一のシグナルペプチド及びプロペプチドをコードする60bp及び204bpのDNA配列を5'末端側に有することが明らかにされている。P3はその5'端より第386番目の塩基までの間、すなわち、最終的な成熟型PDGF-AのN末端から数えて107番
25 目のアミノ酸までの間は塩基配列およびアミノ酸配列の

両者で P 1 のそれらと完全に一致した。しかしながら、
P 3 の第 3 8 7 番目の塩基から第 4 9 7 番目の塩基の間
のアミノ酸配列は P 1 には存在しない特異的な配列であ
り、第 4 9 8 番目の塩基以後 P 1 と P 3 の両者のアミノ
5 酸配列は一致した。この結果、P 1 のコードする P D G
F - A は第 1 0 8 番目のアミノ酸以後、アスパラギン酸
- パリン - アルギニンの配列をもってカルボキシル末端
となるのに対し、P 3 のコードする P D G F - A は P 1
との共通部分から分岐後、3 8 個のアミノ酸配列をもつ
10 てカルボキシル末端となる（第 3 図参照）。このことは、
P 1 と P 3 は同一の P D G F - A 遺伝子から選択的スプ
ライシングによって生ずることを意味し、P 3 に特異的
な塩基配列は、P D G F - A 遺伝子の中で独立したエク
ソンによってコードされていると考えられる（第 4 図参
15 照）。この P 3 によってコードされる P D G F - A 3 が
本発明の P D G F - A アイソフォームである。

P D G F - A は現在までにヒトグリオーマ（Nature,
3 2 0, 6 9 5 - 6 9 9 (1 9 8 6) ）、内皮細胞
（Nature, 3 2 8, 6 1 9 - 6 2 1 (1 9 8 7) ）およ
20 びカエル卵細胞（Science, 2 4 1, 1 2 2 3 - 1 2 2
5 (1 9 8 8) ）より c D N A がクローニングされてい
る。P 1 のコードする P D G F - A の塩基配列は、ヒト
内皮細胞由来 P D G F - A の塩基配列とほぼ一致した。
しかし、P 3 によってコードされる P D G F - A
25 (P D G F - A 3) は、従来報告されている P D G F -

Aアイソフォーム（A 1またはA 2）とはカルボキシル末端の構造において全く異なっていた。PDGF-A 2はカエル卵細胞でも発現し、ヒトグリオーマPDGF-A 2と高い相同性を示す（第5図参照）。このことは今回のウサギ血管由来PDGF-A 3のカルボキシル末端の特異な構造は、種差による相違ではなく、その由来が血管であることによると考えられる。

産業上の利用可能性

PDGF-Aは間葉系細胞に対する強力な増殖因子活性を有し、動脈硬化の発症に重要な役割を演じていると考えられている。PDGF-Aの増殖因子活性は、カルボキシル末端の構造に依存し、この部分が短いPDGF-A 1は、この部分が長いPDGF-A 2に比し、はるかに低活性であることが知られている（Nature, 328, 621-624 (1987)）。従って、本発明のPDGF-A 3も特異な増殖因子活性と発現様式を示し、動脈硬化の発症を研究するための試薬として有用である。

また、第2図および第3図に示される本発明のPDGF-Aアイソフォームの前駆体蛋白質中のプロペプチドは従来報告されているヒトPDGF-Aの前駆体蛋白質のプロペプチドとはアミノ酸配列が異なり、アラニン-プロリンという2ケのアミノ酸が挿入されている。このため、本発明の血管由来のPDGF-Aアイソフォームの前駆体蛋白質は、該前駆体蛋白質に対する特異抗体を調製するのに有用であり、かつ、該前駆体蛋白質を

コードするDNAは遺伝子工学的手法で本発明のPDGF-Aアイソフォームおよび前駆体蛋白質を調製するのに欠くことのできないものである。

前駆体蛋白質。

6. プロペプチドが下記式〔Ⅲ〕で表わされポリペプチドである請求項5記載の血小板由来増殖因子A鎖アイソフォームの前駆体蛋白質。

5	G l u	G l u	P r o	G l y	I l e	P r o
	A r g	G l u	V a l	L e u	A s p	A r g
	L e u	A l a	A r g	S e r	G l n	I l e
	H i s	S e r	I l e	A r g	A s p	L e u
	G l n	A r g	L e u	L e u	G l u	I l e
10	A s p	S e r	V a l	G l y	A l a	G l u
	A s p	A l a	P r o	G l u	P r o	S e r
	L e u	A r g	A l a	P r o	G l y	V a l
	H i s	T h r	A l a	A r g	H i s	V a l
	A l a	G l u	L y s	P r o	P r o	A l a
15	P r o	V a l	P r o	V a l	A r g	A r g
	L y s	A r g				

〔Ⅲ〕

7. 請求項5記載の血小板由来増殖因子A鎖アイソフォームの前駆体蛋白質のアミノ末端にさらにシグナルペプチドが結合されている請求項4記載の血小板由来増殖因子A鎖アイソフォームの前駆体蛋白質。

8. シグナルペプチドが下記式〔Ⅳ〕で表わされるペプチドである請求項7記載の血小板由来増殖因子A鎖アイソフォームの前駆体蛋白質。

M e t A r g T h r L e u A l a C y s
 A r g L e u L e u L e u G l y C y s
 G l y T y r L e u A l a H i s V a l
 L e u A l a (IV)

5 9. 請求項 1 記載の血小板由来増殖因子 A 鎖アイソ
 フォームをコードする DNA 配列を含有する DNA。

10. 請求項 3 記載の血小板由来増殖因子 A 鎖アイソ
 フォームをコードする DNA 配列を含有する請求項 9 記
 載の DNA。

10 11. 請求項 3 記載の血小板由来増殖因子 A 鎖アイソ
 フォームをコードする DNA 配列が下記式〔V〕で表わ
 される DNA 配列である請求項 10 記載の DNA。

5' - A C G A T C G A G G A A G C C A T T C
 C T G C C A T C T G C A A G A C C A G G A C
 15 G G T C A T T T A C G A G A T A C C T C G G
 A G T C A G G T G G A C C C C A C G T C G G
 C C A A C T T C C T G A T C T G G C C G C C
 G T G C G T G G A G G T C A A G C G C T G C
 A C C G G C T G T T G C A A C A C C A G C A
 20 G C G T C A A G T G C C A G C C C T C G C G
 G G T G C A C C A C C G C A G C G T C A A G
 G T G G C C A A G G T G G A G T A T G T C A
 G A A A G A A G C C C A A G T T G A A A G A
 A G T G C A G G T G C G G C T G G A G G A G
 25 C A C C T G G A G T G C G C G T G C G C G G

C C T C G A G C G C G G G C C C G G A G C A
 C C G C G A G G A G G A G G C A G G G A C C
 C T C C T G C C C G C G C C T G G T G G C G
 T C C A T C C T C A G G G T T G C C T C A G
 5 A G C C C A C G A T G G C T G C C A G A G C
 T C C A G A A A T C A C A T G C A A G C C C
 T G G G C T G G A A G A A G A A G A T G - 3'

〔V〕

12. 請求項 10 記載の血小板由来増殖因子 A 鎖アイソ
 10 フォームをコードする DNA 配列の 5' 末端にさらに請
 求項 6 記載のプロペプチドをコードする DNA 配列が結
 合されている DNA 配列を含有する請求項 9 記載の
 DNA。

13. プロペプチドをコードする DNA 配列が下記式
 15 〔VII〕で表わされる DNA 配列である請求項 12 記載の
 DNA。

5' - G A G G A A C C C G G G A T C C C C C
 G C G A G G T G C T G G A C A G G C T C G C
 C C G C A G C C A G A T C C A C A G C A T C
 20 C G G G A C C T G C A G C G G C T C C T G G
 A G A T T G A C T C C G T A G G G G C T G A
 G G A C G C T C C G G A G C C G A G C C T G
 A G A G C C C C G G C G T C C A C A C G G
 C C A G G C A T G T G G C C G A G A A G C C
 25 G C C A G C G C C G G T G C C C G T G C G G

A G G A A G C G T - 3' (VII)

14. 請求項 12 記載のプロペプチドをコードする DNA 配列の 5' 末端にさらに請求項 8 記載のシグナルペプチドをコードする DNA 配列が結合されている DNA 5' A 配列を含有する請求項 9 記載の DNA。

15. シグナルペプチドをコードする DNA 配列が下記式 (VII) で表わされる DNA 配列である請求項 14 記載の DNA。

5' - A T G A G G A C C T T G G C T T G C C
 10 G G C T G C T C C T C G G C T G C G G A T A
 C C T C G C C C A T G T T C T G G C C - 3'
 (VII)

16. 下記式 (I) で表されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列の一部と同一のアミノ酸配列をコードする DNA 配列。

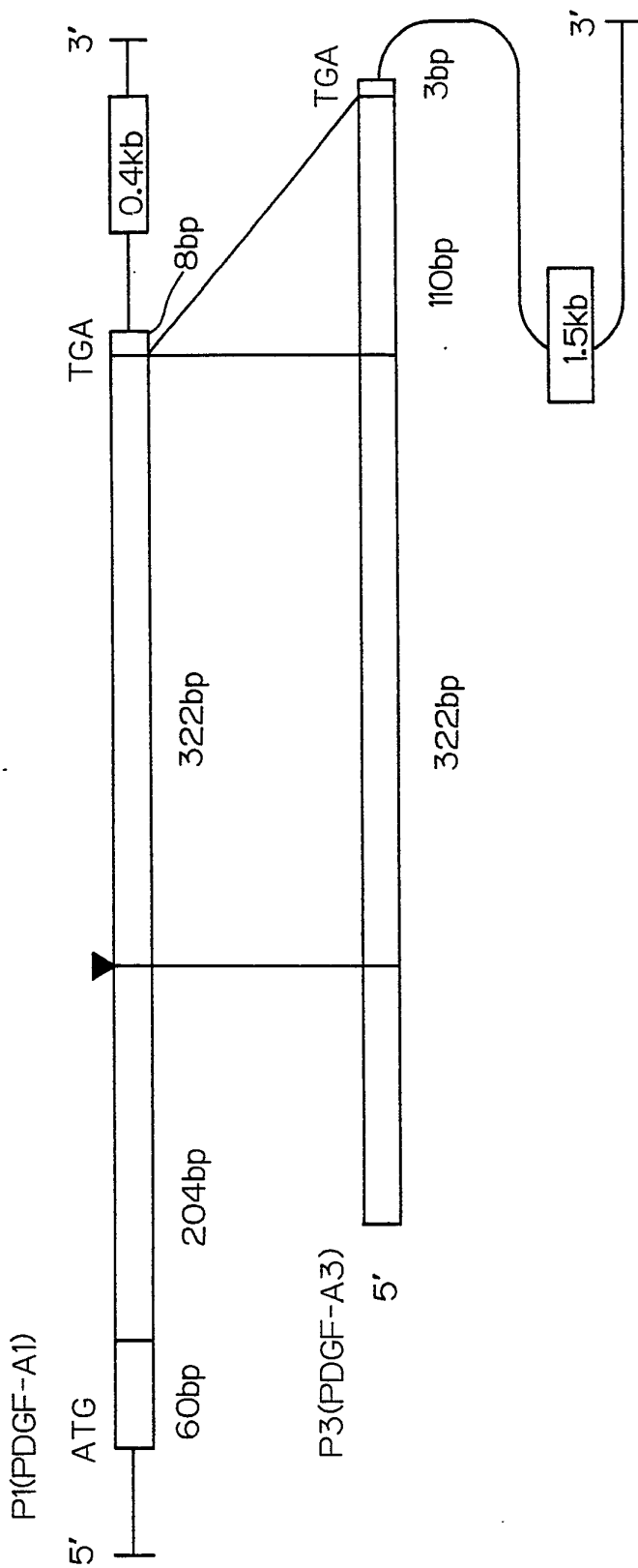
G l y T h r L e u L e u P r o A l a
 P r o G l y G l y V a l H i s P r o
 G l n G l y G y s L e u A r g A l a
 H i s A s p G l y C y s G l n S e r
 20 S e r A r g A s n H i s M e t G l n
 A l a L e u G l y T r p L y s L y s
 L y s M e t (I)

17. 下記式 (VI) で表される DNA 配列である請求項 16 記載の DNA 配列。

5' - G G G A C C C T C C T G C C C G C G C C T G
G T G G C G T C C A T C C T C A G G G T T G C C T
C A G A G C C C A C G A T G G C T G C C A G A G C
T C C A G A A A T C A C A T G C A A G C C C T G G
5 G C T G G A A G A A G A A G A T G - 3'

{ VI }

第1図



第 2 区

(P D G F - A 1)

ATG AGG ACC TTG GCT TGC CGG CTG CTC CTG GGC TGC GGA TAC CTC GCC CAT GTC CTG GCC	60
Met Arg Thr Leu Ala Cys Arg Leu Leu Leu Leu Leu Cys Gly Tyr Leu Ala His Val Leu Ala	20
GAG GAA CCC GGG ATC CCC CGC GAG GTG CTG GAC AGG CTC GCC CGC AGC CAG ATC CAC AGC	120
Glu Glu Pro Gly Ile Pro Arg Glu Val Leu Asp Arg Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser	40
△ ATC CGG GAC CTG CAG CGG CTC CTG GAG ATT GAC TCC GTA GGG GCT GAG GAC GCT CCG GAG	180
Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu Leu Glu Ile Asp Ser Val Gly Ala Glu Asp Ala Pro Glu	
CCG AGC CTG AGA GCC CCC CGC GTC CAC ACG GCC AGG CAT GTG GCC GAG AAG CCG CCA GCG	240
Pro Ser Leu Arg Ala Pro Gly Val His Thr Ala Arg His Val Ala Glu Lys Pro Pro Ala	80
CCG GTG CCC GTG CCG AGG AAG CGT ACG ATC GAG GAA GCC ATT CCT GCC ATC TGC AAG ACC	300
Pro Val Pro Val Arg Arg Lys Arg Thr Ile Glu Glu Ala Ile Pro Ala Ile Cys Lys Thr	100
AGG ACG GTC ATT TAC GAG ATA CCT CGG AGT CAG GTG GAC CCC ACG TCG GCC AAC TTC CTG	360
Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr Ser Ala Asn Phe Leu	120
ATC TGG CCG CCG TGC GTG GAG GTC AAG CGC TGC ACC GGC TGT TGC AAC ACC AGC AGC GTC	420
Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys Asn Thr Ser Ser Val	140
AAG TGC CAG CCC TCG CCG GTG CAC CGC AGC GTC AAG GTG GCC AAG GTG GAG TAT GTC	480
Lys Cys Gln Pro Ser Arg Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val	160
AGA AAG AAG CCC AAG TTG AAA GAA GTG CAG GTG CCG CTG GAG GAG CAC CTG GAG TGC GCG	540
Arg Lys Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Cys Ala	180
TGC GCG GCC TCG AGC GCG GGC CCG GAG CAC CGC GAG GAG GCA GAT GTG AGG TGA	600
Cys Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Glu His Arg Glu Glu Ala <u>ASP Val Arg</u> *	200

2/5

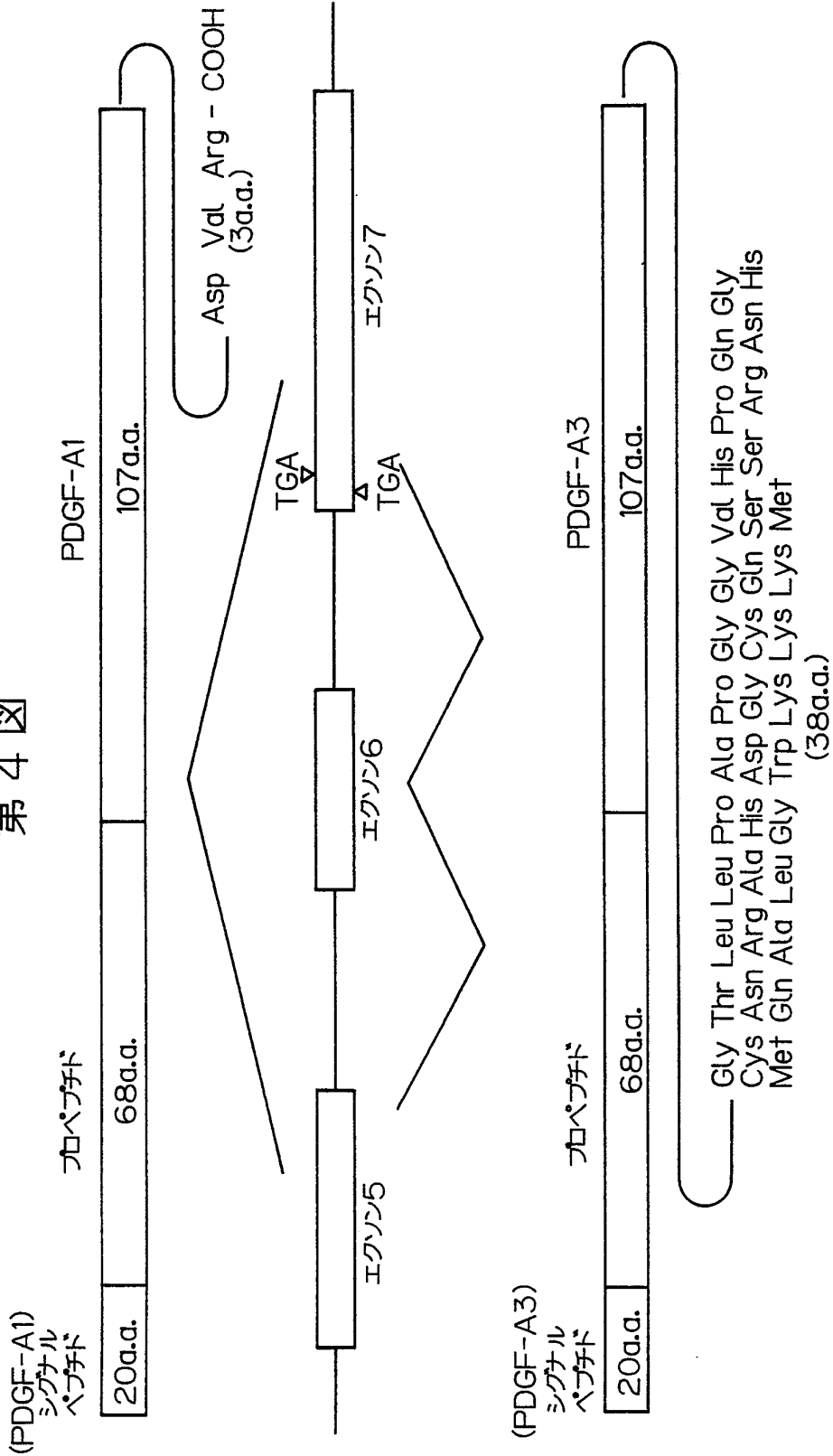
第3 ☒

(P D G F - 3)

ATG AGG ACC TTG GCT TGC CGG CTG CTC CTC GGC TGC GGA TAC CTC GCC CAT GTC CTG GCC	60
Met Arg Thr Leu Ala Cys Arg Leu Leu Leu Leu Cys Gly Tyr Tyr Leu Ala His Val Leu Ala	20
GAG GAA CCC GGG ATC CCC CGC GAG GTG CTG GAC AGG CTC GCC CGC AGC CAG ATC CAC AGC	120
Glu Glu Pro Gly Ile Pro Arg Glu Val Leu Leu Asp Arg Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser	40
ATC CGG GAC CTG CAG CGG CTC CTG GAG ATT GAC TCC GTA GGG GCT GAG GAC GCT CCG GAG	180
Ile Arg Asp Leu Leu Gln Arg Leu Leu Glu Ile Asp Ser Val Gly Ala Glu Asp Ala Pro Glu	60
CCG AGC CTG AGA GCC CCC GGC GTC CAC ACG GGC AGG CAT GTG GCC GAG AAG CCG CCA GCG	240
Pro Ser Leu Arg Ala Pro Gly Val His Thr Ala Arg His Val Ala Glu Lys Pro Pro Ala	80
CCG GTG CCC GTG CGG AGG AAG CGT ACG ATC GAG GAA GCC ATT CCT GCC ATC TGC AAG ACC	300
Pro Val Pro Val Arg Arg Lys Arg Thr Ile Glu Glu Ala Ile Pro Ala Ile Cys Lys Thr	100
AGG ACG GTC ATT TAC GAG ATA CCT CGG AGT CAG GTG GAC CCC ACG TCG GCC AAC TTC CTG	360
Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr Ser Ala Asn Phe Leu	120
ATC TGG CCG CCG TGC GTG GAG GTC AAG CGC TGC ACC GGC TGT TGC AAC ACC AGC AGC GTC	420
Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val	140
AAG TGC CAG CCC TCG CGG GTG CAC CAC CGC AGC GTC AAG GTG GCC AAG GTG GAG TAT GTC	480
Lys Cys Gln Pro Ser Arg Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val	160
AGA AAG AAG CCC AAG TTG AAA GAA GTG CAG GTG CCG CTG GAG GAG CAC CTG GAG TGC GCG	540
Arg Lys Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu His Leu Glu Cys Ala	180
TGC GCG GCC TCG AGC GCG GGC CCG GAG CAC CGC GAG GAG GCA GGG ACC CTC CTG CCC	600
Cys Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Glu His Arg Glu Glu Ala Gly Thr Leu Leu Pro	200
GCG CCT GGT GGC GTC CAT CCT CAG GGT TGC CTC AGA GCC CAC GAT GGC TGC CAG AGC TCC	660
Ala Pro Gly Gly Val His Pro Gln Gly Cys Leu Arg Ala His Asp Gly Cys Gln Ser Ser	220
AGA AAT CAC ATG CAA GCC CTG GGC TGG AAG AAG AAG ATG TGA	720
Arg Asn His Met Gln Ala Leu Gly Trp Lys Lys Lys Met *	240

ω / σ

第 4 図



第 5 図

ウサギ大動脈

Arg Glu Glu Glu Ala	Gly Thr Leu Leu Pro Ala Pro Gly Gly Val His Pro Gln Gly Cys Leu Arg Ala His Asp Gly Cys Gln Ser Arg Asn His Met Gln Ala Leu Gly Trp Lys Lys Met-COOH
---------------------	--

ヒトオリオーマ細胞

Arg Glu Glu Asp Thr	Gly Arg Pro Arg Glu Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu Lys Pro Thr -COOH
---------------------	-------	---

カエル卵細胞

Arg Glu Glu Glu Thr	Gly Phe Phe Thr Ser Pro Ala Leu Val Leu Thr Gly Arg Thr Arg Glu Thr Gly Lys Lys Gln Lys Arg Lys Lys Leu Lys Pro Thr -COOH
---------------------	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/00381

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶				
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC				
Int. Cl ⁵ C12N15/16, C12P21/02, C07K13/00				
II. FIELDS SEARCHED				
Minimum Documentation Searched ⁷				
Classification System	Classification Symbols			
IPC	C12N15/00-15/90, C12P21/00-21/06, C07K13/00			
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸				
BIOSIS DATA BASE				
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹				
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³		
X,P	JPN Circ. J., Vol.54, 1990, Nakahara K. et al. "Characterization of Two Types of Vascular PDGF-A Chain Isoform Complementary DNA clones" p.713-714	1-17		
A	Nature, Vol.320, 1986, Betsholcz C. et al. "cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet - derived growth factor A - chain and its expression in tumor cell lines" p.695-699	1-17		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> [*] Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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 </td> <td style="width: 50%; border: none;"> "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 "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 "Z" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			[*] Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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 "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 "Z" document member of the same patent family
[*] Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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 "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 "Z" document member of the same patent family			
IV. CERTIFICATION				
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report			
June 13, 1991 (13. 06. 91)	June 24, 1991 (24. 06. 91)			
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer			
Japanese Patent Office				

国際調査報告

国際出願番号PCT/JP 91 / 00381

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. CL⁵ C12N15/16, C12P21/02, C07K13/00		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C12N15/00-15/90, C12P21/00-21/06, C07K13/00	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
BIOSIS DATA BASE		
III. 関連する技術に関する文献		
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	請求の範囲の番号
X,P	JPN Circ. J. , 第54巻, 1990 , Nakahara K et al. 「 Characterization of Two Types of Vascular PDGF-A Chain Isoform Complementary DNA clones 」 p. 713-714	1-17
A	Nature , 第320巻, 1986 , Betsholez C et al. 「 cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet - derived growth factor A - chain and its expression in tumor cell lines 」 p. 695-699	1-17
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「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」 先行文献ではあるが、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日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の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の文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
13.06.91	24.06.91	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 8 7 1 7
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	清水初志