(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4381476号
(P4381476)

(45)発行日　平成21年12月9日(2009.12.9)　(24)登録日　平成21年10月2日(2009.10.2)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA
C07H 21/04	(2006.01)	C07H	21/04	B
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A

請求項の数 3　(全 41 頁)

(21)出願番号	特願平5-517759
(86)(22)出願日	平成5年4月7日(1993.4.7)
(65)公表番号	特表平7-505294
(43)公表日	平成7年6月15日(1995.6.15)
(86)国際出願番号	PCT/US1993/003199
(87)国際公開番号	WO1993/020238
(87)国際公開日	平成5年10月14日(1993.10.14)
審査請求日	平成12年3月22日(2000.3.22)
審判番号	不服2006-3059(P2006-3059/J1)
審判請求日	平成18年2月20日(2006.2.20)
(31)優先権主張番号	867,840
(32)優先日	平成4年4月7日(1992.4.7)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	903,103
(32)優先日	平成4年6月23日(1992.6.23)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　500121816
ザ・ジョーンズ・ホプキンス・ユニバーシティ
アメリカ合衆国メリーランド州２１２０２，ボルティモア，マーケット・プレイス　１１１，スイート　９０６
(74)代理人　100089705
弁理士　社本　一夫
(74)代理人　100076691
弁理士　増井　忠弐
(74)代理人　100075236
弁理士　栗田　忠彦
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト腫瘍内のヒトＭＤＭ２遺伝子の増幅

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ヒトp53へのヒトMDM-2（SEQ ID NO: 3）の結合を妨げる化合物の同定方法であって、

検出可能なように標識し、且つあらかじめ定めた量のヒトの第一タンパク質をヒトの第二タンパク質に結合させ；

該第一タンパク質と第二タンパク質のお互いの結合を阻害する能力について試験される化合物を加え；

ヒトの第二タンパク質との結合から置き換えられるまたは妨げられるヒトの第一タンパク質の量を測定する；ことからなり、

ヒト第一タンパク質がMDM-2であり且つヒトの第二タンパク質がp53であるか、または、ヒト第一タンパク質がp53であり且つヒトの第二タンパク質がMDM-2である：

前記ヒトp53へのヒトMDM-2の結合を妨げる化合物の同定方法。

【請求項２】

該ヒトタンパク質の２つのうちの一つが固体支持体に固定されている、請求項1記載の方法。

【請求項３】

該ヒト第二タンパク質と特異的に免疫反応する抗体を用いて非結合のヒト第一タンパク質から結合したヒト第一タンパク質を分離する、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

関連する出願

本出願は、米国特許第０７／８６７，８４０号（１９９２年４月７日に出願したが、現在出願を放棄した）の一部継続出願である米国特許第０７／９０３，１０３号（１９９２年６月２３日出願）の一部継続出願である。

本発明は、ＮＩＨ認可ＣＡ－５７３４５，ＣＡ－４３４６０，ＣＡ－０２２４３及びＣＡ－３５４９４を含む米国政府からの援助を受けて行われた。従って、政府は本発明のいくらかの権利を保有する。

発明の分野

本発明は、癌の診断及び治療の領域に関する。より詳細には、本発明は、あるヒト腫瘍内で増幅された遺伝子の検出に関する。

発明の背景

Ｋｎｕｄｓｏｎの腫瘍形成モデル（Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，第４５巻、１４８２頁、１９８５年）に従うと、すべての正常細胞内に腫瘍サプレッサー遺伝子群があり、それらの遺伝子群が突然変異によって機能しなくなると、新生物発生の原因となる。このモデルの証拠は、網膜芽腫及び結腸直腸腫瘍で見つかっている。これらの腫瘍内に包含されたサプレッサー遺伝子、それぞれＲＢ及びｐ５３、は多くの腫瘍に関する研究に於いて欠失または変化していることが見つかった。

それ故、ｐ５３遺伝子生成物は、正常細胞の増殖および細胞の癌化抑制を制御するタンパク質群の一員であると思われる。ｐ５３遺伝子の変異は腫瘍形成と結び付いており、ｐ５３タンパク質機能の変化は細胞の癌化にかかわる事を示唆している。ｐ５３遺伝子の不活性化は、ヒト結腸直腸癌（Ｂａｋｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４４，２１７－２２１，１９８９）、ヒト肺癌（Ｔａｋａｈａｓｈｉら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４６，４９１－４９４，１９８９；Ｉｇｇｏら、Ｌａｎｃｅｔ，３３５，６７５－６７９、１９９０）、慢性骨髄性白血病（Ｋｅｌｍａｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８６，６７８３－６７８７、１９８９）および骨原性肉腫（Ｍａｓｕｄａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８４，７７１６－７７１９、１９８７）を含む、広範囲の種類の癌腫（Ｎｉｇｒｏら、Ｎａｔｕｒｅ，３４２，７０５－７０８、１９８９）の発生または進行にかかわり合っている。

ｐ５３遺伝子の変異がヒトの腫瘍形成に結びついていることの証拠は非常に多いが（Ｈｏｌｌｓｔｅｉｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５３，４９－５３、１９９１）、ｐ５３機能の細胞内での調節物および媒介物についてはほとんど知られていない。

Ｈｉｎｄｓら（Ｃｅｌｌ　Ｇｒｏｗｔｈ　＆　Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ，１，５７１－５８０，１９９０）は、アミノ酸残基１４３、１７５、２７３、または２８１でのポイントミューテーションを含むｐ５３ｃＤＮＡクローンが、培養中のラットの始原胚繊維芽細胞を癌化する活性化されたｒａｓ腫瘍遺伝子と協力しあうことを明らかにした。これらのｐ５３遺伝子変異体はヒトの癌内に見出だされる大多数の変異を代表している。（Ｈｏｌｌｓｔｅｉｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５３，４９－５３，１９９１。）癌化（形質転換）した繊維芽細胞は、正常（野生型）ｐ５３タンパク質の半減期（２０－３０分）と比較すると長い半減期（１．５－７時間）を持つ高レベルのヒトｐ５３タンパク質を生成することが見出だされた。

アミノ酸残基１４３または１７５の変異したｐ５３タンパク質変異体は、細胞の熱ショックタンパク質ｈｓｃ７０とオリゴマータンパク質複合体を形成する。残基２７３または２８１の変異体はｈｓｃ７０との結合が検出されず、残基１７５の変異体より癌化した病巣の生成が少ないが、ｐ５３変異体とｈｓｃ７０の間の複合体形成はｐ５３が媒介する形質転換には必要でない。しかしながら、複合体の形成はこの機能を促進すると思われる。ｐ５３遺伝子変異体で形質転換された全ての細胞系は、胸腺（ヌード）マウス内で腫瘍を形成する。これに対して、野生型のヒトｐ５３遺伝子はｒａｓと協力して癌化（形質転換）するような活性は持っていない。（ＴｕｃｋおよびＣｒａｗｆｏｒｄ、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　Ｒｅｓ．，４，８１－９６，１９８９．）

また、Ｈｉｎｄｓら（上記）は、形質転換したラットの細胞内にヒトｐ５３タンパク質を発現させた。発現したヒトｐ５３を、ｐ５３の別々の抗原決定基を基に作られた２種のｐ

５３に特異的な抗体と免疫沈降させたとき、未同定のＭｒ９０，０００タンパク質が共に免疫沈降した。このことはラットのＭｒ９０，０００タンパク質が形質転換したラットの細胞系内でヒトｐ５３タンパク質と複合体をつくっていることを示唆した。

上述のように、ｐ５３タンパク質のレベルは正常細胞内より癌化した細胞内の方がしばしば高い。これはｐ５３タンパク質の代謝安定性を増加させる変異によるものである（Ｏｖｅｎら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１，１０１－１１０，１９８１；Ｒｅｉｃｈら、Ｍｏｌ，Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，３，２１４３－２１５０，１９８３）。ｐ５３の安定化はｐ５３とウイルスまたは細胞のタンパク質の間での複合体形成と関連していた（ＬｉｎｚｅｒおよびＬｅｖｉｎｅ，Ｃｅｌｌ，１７，４３－５２，１９７９；Ｃｒａｗｆｏｒｄら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，７８，４１－４５，１９８１；Ｄｉｐｐｏｌｄら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，７８，１６９５－１６９９，１９８１；ＬａｎｅおよびＣｒａｗｆｏｒｄ，Ｎａｔｕｒｅ（Ｌｏｎｄ．），２７８，２６１－２６３，１９７９；Ｈｉｎｄｓら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，７，２８６３－２８６９，１９８７；Ｆｉｎｌａｙら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，８，５３１－５３９，１９８８；Ｓａｒｎｏｗら、Ｃｅｌｌ，２８，３８７－３９４．１９８２；Ｇｒｏｎｏｓｔａｊｓｋｉら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，４，４４２－４４８，１９８４；Ｐｉｎｈａｓｉ－Ｋｉｍｈｉら、Ｎａｔｕｒｅ（Ｌｏｎｄ．），３２０，１８２－１８５，１９８６；ＲｕｓｃｅｔｔｉおよびＳｃｏｌｎｉｃｋ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，４６，１０２２－１０２６，１９８３；ＰｉｎｈａｓｉおよびＯｒｅｎ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ，Ｂｉｏｌ．，４，２１８０－２１８６、１９８４；ならびにＳｔｕｒｚｂｅｃｈｅｒら、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，１，２０１－２１１，１９８７）。例えば、ｐ５３タンパク質はＳＶ４０のラージＴ抗原、アデノウイルス５型ＥＩＢ－Ｍｒ５５，０００タンパク質およびヒト乳頭腫ウイルス１６または１８型のＥ６生成物とオリゴマータンパク質複合体を形成することが認められている。（ＬｉｎｚｅｒおよびＬｅｖｉｎｅ，Ｃｅｌｌ，１７，４３－５２，１９７９；ＬａｎｅおよびＣｒａｗｆｏｒｄ，Ｎａｔｕｒｅ，２７８，２６１－２６３，１９７９；Ｓａｒｎｏｗら、Ｃｅｌｌ，２８，３８７－３９４，１９８２；Ｗｅｒｎｅｓｓら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４８，７６－７９，１９９０．）同様に、複合体はＴ抗原（ＤｅＣａｐｒｉｏら、Ｃｅｌｌ，５４，２７５－２８３，１９８８）、アデノウイルスＥＩＡタンパク質（Ｗｈｙｔｅら、Ｎａｔｕｒｅ，３３４，１２４－１２９，１９８８）およびヒト乳頭腫ウイルス１６又は１８型のＥ７タンパク質（Ｍｕｎｇｅｒら、ＥＭＢＯ Ｊ．，８，４０９９－４１０５，１９８９）とｐ１０５^{RB}（網膜芽細胞腫感受性遺伝子の生成物）の間にも認められらた。これらのウイルスタンパク質とｐ１０５^{RB}との間の相互作用は、ｐ１０５^{RB}の増殖抑制機能を不活性化することが示唆され、これによく似た欠失および変異は腫瘍細胞のＲＢ遺伝子内で共通して見出だされた。同様に、これらのウイルスタンパク質とｐ５３との間のオリゴマータンパク質の複合体形成はｐ５３の機能を除去または変化させるかもしれない。（Ｆｉｎｌａｙら、Ｃｅｌｌ，５７，１０８３－１０９３，１９８９）．

Ｆａｋｈａｒｚａｄｅｈら（ＥＭＢＯ Ｊ．，１０，１５６５－１５６９，１９９１）は、腫瘍形成性のマウスの細胞系（即ち、３Ｔ３ＤＭ、マウスＢａｌｂ／ｃ細胞の自発的に癌化した誘導体）内に存在する増幅ＤＮＡ配列について分析した。研究は、癌化していない宿主細胞（例えば、マウスＮＩＨ３Ｔ３またはＲａｔ２細胞）内に増幅遺伝子を導入し、次いで任意の増幅遺伝子が腫瘍形成を誘導するか否かを決定することによって行われた。得られた細胞系は、ヌードマウスを用いてその腫瘍形成能について試験した。ＭＤＭ２と名づけた遺伝子は、３Ｔ３ＤＭ細胞内で５０倍より多く増幅されており、ＮＩＨ３Ｔ３およびＲａｔ２細胞内で過剰に発現した時に腫瘍形成能を誘導した。マウスＭＤＭ２（ｍＭＤＭ２）のヌクレオチド配列およびそれより予想されるアミノ酸配列から、Ｆａｋｈａｒｚａｄｅｈは、この遺伝子は他の遺伝子の発現を調整する機能を持ち、且つ過剰に発現すると細胞増殖の正常な抑制を妨げる潜在性のＤＮＡ結合タンパク質をコードしていると推測した。

発明の概要

本発明の目的は、肉腫のような新生物組織をヒト内で診断する方法を提供することである。
本発明の他の目的は、ヒトのＭＤＭ２配列をコードするｃＤＮＡ分子を提供することである。
本発明の他の目的は、他のヒト細胞タンパク質を実質的に含まないヒトのＭＤＭ２タンパク質の調製物を提供することである。
本発明の他の目的は、ヒトＭＤＭ２遺伝子またはｍＲＮＡ分子とハイブリッド形成する能力を持つＤＮＡプローブを提供することである。
本発明の他の目的は、ヒトＭＤＭ２タンパク質と免疫反応する抗体を提供することである。
本発明の他の目的は、ヒトＭＤＭ２の増幅又は高い発現を検出するためのキットを提供することである。
本発明の他の目的は、ヒトｐ５３へのヒトＭＤＭ２の結合を阻害する化合物を同定するための方法を提供することである。
本発明の他の目的は、ヒトの新生物細胞を治療するための方法を提供することである。
本発明の他の目的は、ヒトＭＤＭ２遺伝子の増幅を含む腫瘍細胞の増殖を阻害するための方法を提供することである。
本発明の他の目的は、ヒトｐ５３へのヒトＭＤＭ２の結合を妨げるポリペプチドを提供することである。
本発明の他の目的は、ｐ５３発現ベクターを含む宿主細胞が増殖するための方法を提供することである。
これまで知られていなかったヒト遺伝子、ｈＭＤＭ２は、ヒトの癌の内で一つの役割を演じていることが明らかになった。ｈＭＤＭ２遺伝子はクローン化され、その組換え体はインビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）でヒトｐ５３に結合するｈＭＤＭ２タンパク質を誘導した。ｈＭＤＭ２はある種の新生物細胞内で増幅していることが明らかにされ、ｈＭＤＭ２がコードする生成物の発現はこの遺伝子の増幅と相応じて腫瘍内で高くなっていることが発見された。高レベルのＭＤＭ２はｐ５３を隔離し、細胞がｐ５３による増殖制御を受けないようにすると考えられる。

【図面の簡単な説明】

第１図Ａ－Ｃは、ヒトＭＤＭ２のｃＤＮＡ配列を示している。この図では、ヒトおよびマウスのヌクレオチドならびにアミノ酸配列を比較しており、マウスの配列は関連するヒトの配列と異なる所のみを示している。
第２図は、ｈＭＤＭ２がｐ５３と結合することを示している。
第３図は、肉腫内でのｈＭＤＭ２遺伝子の増幅を説明している。
第４図Ａ－Ｃは、ｈＭＤＭ２の発現を説明している。
第５図は、ｐ５３の仲介する転写活性化がＭＤＭ２によって阻害されることを示している。酵母は、示されているように、ｐ５３、ｌｅｘ－ＶＰ１６、ＭＤＭ２または適切なベクターのみの対照、をコードする発現プラスミドで安定してトランスフェクションされた。ｐ－５３応答（棒グラフａ－ｃ）またはｌｅｘＡ－応答（棒グラフｄ－ｆ）のβ－ガラクトシダーゼレポータープラスミドが応答を評価するために用いられた。挿入図：代表的な酵母株内でのＭＤＭ２（９０ｋＤ）およびｐ５３（５３ｋＤ）の発現を示すウェスタンブロット分析。＋で示された株は全長のＭＤＭ２およびｐ５３をコードする発現ベクターでトランスフェクションされ、－で示した株はｐ５３発現ベクターのみでトランスフェクションされた。
第６図は、ＭＤＭ２およびｐ５３のドメインの相互作用を示している。第６図Ａおよび第６図Ｂ：ＭＤＭ２のランダムフラグメントをｌｅｘＡ　ＤＮＡ結合ドメインをコードする配列に融合させ、得られたクローンを、ｐＲＳ３１４ＳＮ（ｐ５３発現ベクター）及びｐＪＫ１０３（ｌｅｘＡ－応答β－ガラクトシダーゼリポーター）を持つ酵母にトランスフェクションした。β－ガラクトシダーゼを発現している酵母クローンを青色発色によって同定し、ｌｅｘＡ融合ベクター内のＭＤＭ２の配列を決定した。Ａに於いてβ－ガラクト

シダーゼ活性はｐ５３の発現に依存せず認められたが、Ｂに於いてはｐ５３の発現に依存していた。Ｂの下部、６クローンは遺伝子工学によって作られた。第６図Ｃ：ｐ５３のランダムフラグメントをＢ４２酸性活性化ドメインおよび赤血球凝集素エピトープ標識をコードする配列と融合させた；得られたクローンはｌｅｘＡ－ＭＤＭ２（全長のＭＤＭ２に融合させたｌｅｘＡ　ＤＮＡ結合ドメイン）およびｐＪＫ１０３を持つ酵母内にトランスフェクションした。上述の方法で酵母クローンを同定し、そのすべてがＭＤＭ２依存性であることが分かった。下の３クローンは遺伝子工学によって作られた。

第７図は、第６図に記載した酵母株からのタンパク質の発現を示している。上述の方法（Ｏｌｉｎｅｒ，Ｊ．Ｄ．ら、Ｎａｔｕｒｅ，３５８，８０－８３，１９９２）に従って、一列あたり２０μｇのタンパク質を用いて、ウェスタンブロット分析を行った。融合ベクター内に含まれるＭＤＭ２およびｐ５３のコドンはそれぞれＡおよびＢの最も上に見えている。第７図Ａ：上のパネルはｐ５３を検出するｐ５３Ａｂ２をプローブとした；下のパネルは３０－５０ＫｄのＭＤＭ２融合タンパク質を検出する抗ｌｅｘＡポリクローナル抗体（ｌｅｘＡｂ）をプローブとした。第７図Ｂ：上のパネルは１１２ｋＤのｌｅｘＡ－全長ＭＤＭ２融合タンパク質を検出するｌｅｘＡｂをプローブとした；下のパネルはおおよそ２５－３０ｋＤのｐ５３融合タンパク質を検出するＨＡ　Ａｂ（赤血球凝集素エピトープ片（ｔａｇ）を型にして作られたモノクローナル抗体、バークレー（Ｂｅｒｋｅｌｅｙ）抗体）をプローブとした。

第８図は、ＭＤＭ２によるｐ５３活性化ドメインの阻害を示している。酵母はｌｅｘＡ－ｐ５３（ｐ５３コドン１－７３）融合（棒グラフａおよびｂ）またはｌｅｘＡのみ（棒グラフｃ）をコードする発現ベクターでトランスフェクションされた。また、ｂ株は全長のＭＤＭ２を発現しており、すべての株はｌｅｘＡ－応答β－ガラクトシダーゼリポータープラスミドを含んでいた。挿入図：上のパネルは全長のＭＤＭ２（９０ｋＤ）を検出するＭＤＭ２ポリクローナル抗体をプローブとした；下のパネルは４０ｋＤのｌｅｘ－ｐ５３融合タンパク質を検出するｌｅｘＡｂをプローブとした。

第９図は、ＭＤＭ２またはｐ５３に対するモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット分析を示している。ＯｓＡ－ＣＬまたはＳＷ４８０細胞から得られた全細胞タンパク質５０μｇをウェスタンブロット分析に用いた。分子量マーカーの位置をｋｄで右に示した。

第１０図は、インビトロで増殖させたＯｓＡ－ＣＬおよびＳＷ４８０細胞の免疫細胞化学分析を示している。ＭＤＭ２に特異的なモノクローナル抗体ＩＦ－２、およびｐ５３に特異的なｍＡｂ１８０１を用いた。ＭＤＭ２タンパク質はＳＷ４８０細胞よりＯｓＡ－ＣＬ細胞でより高く発現し、ｐ５３では逆のパターンが観察されたことから、両タンパク質は核内にのみ位置していることが明らかである。

第１１図は原発性柔部組織肉腫内でのＭＤＭ２の発現を示している。ヒト肉腫のクリオスタット切片をＭＤＭ２に特異的なＩＦ－２抗体と共にインキュベーションした。腫瘍＃３および＃１０では、ＭＤＭ２は核内で発現していたが、腫瘍＃２では染色されなかった。

発明の詳細な説明

本発明では、ある種のヒトの腫瘍内に増幅された遺伝子が存在することが発見された。それ故、ＭＤＭ２と名付けたこの遺伝子の増幅は、新生物形成または潜在の症候である。また、ヒトＭＤＭ２のコードする生成物の高い発現を検出することは、新生物形成または新生物形成へと形質転換する潜在性の症候でもある。最も一般的な骨および柔組織型を含む調査した肉腫の１／３以上が、増幅したｈＭＤＭ２配列を持っていることが認められた。ｈＭＤＭ２の発現は、遺伝子の増幅と相応じて腫瘍内で高くなっていることが認められた。

また、高いｈＭＤＭ２の発現を導くその他の遺伝子の変化、例えば遺伝子の調節領域内の突然変異も腫瘍形成に関与すると思われる。また、高いｈＭＤＭ２の発現は、肉腫瘍以外の腫瘍にも関与すると思われ、そのような腫瘍としては、これらに限られるわけではないが、ｐ５３の不活性化が関与することが示唆される腫瘍が含まれる。これらの腫瘍には、結腸直腸癌、肺癌、および慢性骨髄性白血病が含まれる。

本発明の一つの実施態様に従って、ヒトの新生物組織を診断する方法が提供される。組織または体液をヒトから分離し、ヒトＭＤＭ２のコピー数を定量する。別の方法として、ヒトＭＤＭ２遺伝子生成物の発現レベルを定量することができる。これらの生成物にはタンパク質およびｍＲＮＡが含まれる。

試験されてよい体液には、尿、血清、血液、糞便、唾液、およびその類似物などが含まれる。新生物である疑いのある組織は、分析のため、正常と思われる組織から分離した。この分離は、この技術分野で知られているパラフィンもしくはクリオスタット切片化またはフローサイトメトリーによって行うことができる。非新生物細胞からの新生物細胞の分離を怠ると、分析が混乱することもある。隣接する非新生物組織または任意の正常組織は、発現またはコピー数の基準レベルを決定するために用いることができ、この基準レベルを対照としてｈＭＤＭ２遺伝子または遺伝子生成物の量を比較することができる。

細胞がヒトＭＤＭ２遺伝子を染色体当たりの正常なコピー数（２）より多く含んでいれば、この遺伝子は増幅されていると考えられる。遺伝子の増幅を検出するための様々な技術はこの技術分野で熟知されている。遺伝子の増幅は、例えば実施例４に記載したようなサザンブロット分析によって定量することができる。実施例４ではヒトの組織から得た細胞ＤＮＡを消化し、分離し、▲濾▼紙に移して相補的核酸を含むプローブとハイブリッドを形成させる。別の方法として、プライマーを用いた定量的ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）が、遺伝子増幅を定量するために用いられることもできる。適切なプライマーはヒトのＭＤＭ２をコードする配列を含む配列と結合するであろう。この技術分野で知られているような遺伝子のコピー数を決定するための他の技術は、制限なしに用いることができる。

測定される遺伝子生成物はｍＲＮＡまたはタンパク質のどちらかであってよい。高い発現と言う言葉は、ｍＲＮＡ生成物またはタンパク質生成物が非癌性細胞によって正常に生産される以上に増加することを意味する。増幅はヒト肉腫内で認めらたが、ＭＤＭ２の高い発現を導く他の遺伝子変化は、これらまたはその他の腫瘍内に存在すると思われる。その他の腫瘍には、肺、乳房、脳、結腸直腸、膀胱、前立腺、肝臓、皮膚、および胃の腫瘍が含まれる。これらの腫瘍もまた、本発明によって予測される。発現レベルの基準線を決めるために用いる非癌性細胞は、腫瘍周辺の細胞から、他人から、またはヒトの細胞系から得ることができる。どの様な増加で診断基準となりうるが、一般的に、ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現は非癌性細胞で見られるより少なくとも３倍、５倍、ある場合には最大で１００倍まで高くなるであろう。ｍＲＮＡまたはタンパク質を検出するために用いられる具体的な方法は、本発明の実施に重要ではない。例えば、増加したｍＲＮＡまたはタンパク質生成物は、それぞれ実施例４に記載したようなノーザンブロット分析もしくはウェスタンブロット分析、またはＥＬＩＳＡ，免疫沈降、ＲＩＡおよびそれに類似した他の既知技術を用いて検出されてよい。これらの技術もまた当業者に熟知されている。

本発明の実施態様に従って、ヒトＭＤＭ２の遺伝子増幅またはｍＲＮＡの高い発現を定量するための核酸プローブまたはプライマーが提供される。プローブはリボ核酸またはデオキシリボ核酸からなってよく、ヒトのＭＤＭ２をコードする全配列、それに相補的な配列、またはそのフラグメントを含んでよい。例えば、プローブは、第１図に示すようなヌクレオチド１－９４９または１－２３７２を含んでよい。一般的に、プローブまたはプライマーは、ヒトの配列の少なくとも約１４の隣接するヌクレオチドを含むであろうが、望ましくはおおよそ４０、５０または１００のヌクレオチドを含んでよい。典型的には、プローブはそれらの検出を容易にするために蛍光、ラジオアイソトープ、またはその類似物で標識される。好適には、プローブは厳密なハイブリッド形成条件下でハイブリッド形成されるであろう。その様な条件下では、プローブはマウスのＭＤＭ２とはハイブリッド形成しないであろう。本発明で用いたプローブは、ヒトＭＤＭ２遺伝子に相補的である。このことは、本発明で用いたプローブがヒトのＭＤＭ２配列と１００％の同一性を持つことを意味している。

ｈＭＤＭ２タンパク質は、本発明にしたがって、実質上ヒトの他のタンパク質を含まない遊離した状態で作ることができる。ＤＮＡ配列が提供されると、当業者はヒト以外の細胞内にｃＤＮＡを発現させることができる。その様な細胞の溶解液は、ヒトの他のタンパク

質を実質上含まないタンパク質を提供する。溶解液は、例えば、免疫沈降、ｐ５３との共沈、またはアフィニティークロマトグラフィーによってさらに精製することができる。
本発明の抗体はｈＭＤＭ２タンパク質と特異的に反応する。望ましくは、これらの抗体は他の種のＭＤＭ２と交差反応しない。これらの抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであることができ、自然発生のｈＭＤＭ２またはｈＭＤＭ２融合タンパク質または合成ペプチドを抗原として作ることができる。抗体はヒトの他のタンパク質上には存在しないｈＭＤＭ２エピトープと特異的に免疫反応する。ある種の抗体は、ヒトＭＤＭ２に独特で且つマウスのＭＤＭには存在しないエピトープと反応する。抗体は、ウェスタンブロット分析、ＥＬＩＳＡ、免疫組織化学、および他の免疫学的アッセイのような、タンパク質を検出するための普通の分析に有効である。ポリクローナル抗体を高め精製するための技術は、モノクローナル抗体を調整する技術と同様に、この技術分野で熟知されている。抗体の結合は、酵素標識した二次抗体、ブドウ球菌プロテインＡ、およびその類似物のような、この技術分野で知られた方法によって定量することができる。本発明のいくらかのモノクローナル抗体は、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ｔｈｅ　Ａｍｅｒｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）、１２３０１，Ｐａｒｋｌａｗｎ　Ｄｒｉｖｅ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ”２０８５２、に寄託した。これらは、それぞれＨＢ１１２９０およびＨＢ１１２９１として受け入れを許されたＩＦ２、およびＥＤ９を含む。
本発明の他の実施態様に従うと、ＭＤＭ２の発現を干渉することによって、治療方法が提供される。この方法は、インビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）、インビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）、またはエクスビボ（ｅｘ　ｖｉｖｏ）で適用することができる。例えば、発現は三本鎖形成物、またはそれぞれｈＭＤＭ２遺伝子もしくはｍＲＮＡと結合して転写もしくは翻訳を妨げるアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与することによってダウン制御されてよい。また、オリゴヌクレオチドはプロセッシングされていないｍＲＮＡ前駆体またはプロセッシングされたｍＲＮＡと反応させてもよい。ＭＤＭ２の発現を特異的に阻害する小分子およびペプチドを用いることもできる。同様に、ＭＤＭ２のｐ５３への結合を阻害するような分子は、ｐ５３の隔離を緩和することによって治療効果を示すであろう。
その様な阻害分子はｈＭＤＭ２／ｐ５３の相互作用を干渉する分子をスクリーニングすることによって同定することができ、その場合、一方の結合相手を固体支持体に結合させ他方の相手を標識する方法が用いられる。結合相互作用に含まれるｈＭＤＭ２またはｐ５３のエピトープに特異的な抗体は、その様な結合を干渉するであろう。用いられてよい固体支持体には、タンパク質を結合する既知の任意のポリマーが含まれる。支持体はフィルター、カラム充填マトリックス、ビーズ、およびその類似物の形態であってよい。タンパク質は、この技術分野で既知の任意の技術に従って標識化することができる。放射能標識、酵素標識、および蛍光標識を都合良く用いることができる。別の方法として、ｈＭＤＭ２およびｐ５３の両方を溶液状態にし、その後、結合分子を非結合分子から分離させてもよい。標識されていない結合相手に特異的な抗体との免疫沈降または免疫親和性による分離を含む、この技術分野で既知の任意の分離技術が用いられてよい。
ｐ５３のアミノ酸残基１３－４１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を参照されたい）が、ＭＤＭ２およびｐ５３の相互作用に必要であることが明らかになった。しかしながら、ペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端側のどちらかの残基もさらに必要であると思われる。ｐ５３のアミノ酸残基をさらに９－１３を加えると、ＭＤＭ２と十分に結合するが、必須残基はこれより少ないかもしれない。ＭＤＭ２を過剰に発現する細胞は肉腫内でｐ５３が制御する増殖調整を受けないので、過剰のＭＤＭ２に結合させるためにｐ５３から誘導されたペプチドを用いることはｐ５３制御の増殖調整を再び確立する。
投与に適切なｐ５３誘導ペプチドは、例えば、環状、直線状、または細胞膜の浸透性を良くするように誘導したペプチドである。また、本発明のペプチドと同じ三次元構造をとるように設計された有機化合物も用いることができる。
ＭＤＭ２に結合性、ｐ５３誘導ペプチド、またはその多くのコピーをコードするＤＮＡもまた、ペプチドを投与する様式の一つとして腫瘍細胞に投与されてよい。典型的には、Ｄ

ＮＡは、ＭＤＭ２結合ペプチドが発現するように適切に配置された発現に必要なＤＮＡエレメントを持つ、レトロウイルス、ＤＮＡウイルス、またはプラスミドベクターのような発現構築物内に存在するであろう。ＤＮＡは、とりわけリポソーム、または細胞に能率的に取り込まれるためのこの技術分野で既知の任意の他の形態で、カプセル化して投与することができる。ペプチドの直接投与の目的は、ＭＤＭ２によるｐ５３の隔離を緩和することである。

ｈＭＤＭ２をコードする配列を含むｃＤＮＡ分子は、プローブおよびプライマーを作るために用いることができる。さらに、そのｃＤＮＡ分子は、大腸菌のような培養細胞内で発現し、他のヒトタンパク質を実質的に含まないｈＭＤＭ２タンパク質調製物を得ることができる。生成されたタンパク質は、例えば、上述の抗体を用いた免疫親和性の技術で精製することができる。

ｈＭＤＭ２遺伝子に特異的なプローブまたはプライマー並びにその指示書といったような、遺伝子のコピー数を定量するために必要な試薬を含むキットが提供される。指示書によって、定量値と比較するための検定曲線が提供される。また、キットはｍＲＮＡ（即ち、プローブを含む）またはｈＭＤＭ２タンパク質（即ち、抗体を含む）の高い発現を定量するためにも提供される。指示書に従って試験すると、発現レベルが高いか否かを決定することができる。また、反応容器、および色素源、緩衝液、酵素などのような補助剤も、キットに含まれてよい。

本発明によって、ヒトのＭＤＭ２遺伝子が同定されクローン化された。組換えｈＭＤＭ２誘導体はヒトのｐ５３と結合することが示された。さらに、ｈＭＤＭ２はある肉腫内で増幅されていることが明らかになった。増幅はｈＭＤＭ２遺伝子生成物を相応して増加させる。その様な増幅は腫瘍の形成過程と関連する。この発見によって、個々の組織の新形成または新形成の潜在状態を評価するための特別なアッセイを遂行することができる。

以下の実施例は本発明の様々な態様を例示するために提供されるものであって、本発明の範囲を制限するものではない。

実施例

実施例１

ヒトのｃＤＮＡクローンを得るために、ｃＤＮＡライブラリーはマウスのＭＤＭ２（ｍＭＤＭ２）ｃＤＮＡをプローブとしてスクリーニングした。ｃＤＮＡライブラリーは、ランダムヘキサマープライム二本鎖ｃＤＮＡを生産するための鋳型としてヒトの結腸癌細胞系ＣａＣｏ－２から分離したポリアデニル化ＲＮＡを用いることによって調製した。ＧｕｂｌｅｒおよびＨｏｆｆｍａｎｎ，Ｇｅｎｅ，２５，２６３－２６８，１９８３。ｃＤＮＡは、Ｅｌｌｅｄｇｅらの方法（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，８８，１７３１－１７３５，１９９１）に従って、アダプターへ結合させ、次いでラムダＹＥＳファージベクターと結合させ、パッケージングし、平板培養した。ライブラリーは、最初に、Ｐで標識した（Ｋｉｎｚｌｅｒ，Ｋ．Ｗ．，ら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１７，３６４５－３６５３，１９８９；ＦｅｉｎｂｅｒｇおよびＶｏｇｅｌｓｔｅｉｎ，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１３２，６－１３，１９８３）ｍＭＤＭ２ｃＤＮＡプローブ（ヌクレオチド２５９－１５０８（Ｆａｋｈａｒｚａｄｅｈら、ＥＭＢＯ Ｊ．，１０，１５６５－１５６９，１９９１）でスクリーニングし、次いで、ヌクレオチド４０－７２を含むｈＭＤＭ２ｃＤＮＡクローンで再スクリーニングした。

１２のクローンが得られ、さらにそのクローンの内の一つを用いて同ライブラリーを再スクリーニングすることによってさらに１３のクローンを得た。全部で２５のクローンが得られ、部分的または全体の配列を決定し、マッピングした。２５のクローンの配列分析によって、スプライシング位置が交互に変わる（オルタナティブスプライシング）幾つかのｃＤＮＡの形態が明らかになった。第１図に示した配列は、最も多く見られたスプライシングの形態を示しており、ｃ１４－２（ヌクレトチド１－９４９），ｃ８９（ヌクレトチド４６７－１７３７），およびｃ３３（ヌクレオチド３９０－２３７２）の３つのクローンから組み立てられた。３′末端の翻訳されない領域は、マウスにおいても、またヒトにおいても、未だクローン化されていない。５′末端は、ヌクレオチド１、またはそれに近

い位置にあると思われる。ヒトｃＤＮＡ配列の５′末端からヌクレオチド１７８４までにわたってオープンリーディングフレームがあった。翻訳開始信号の位置は明確には決定できなかったが、ヌクレオチド３１２のＡＴＧがいろいろな理由から最も適当な位置であると考えられた。第一に、ｈＭＤＭ２とｍＭＤＭ２の間での配列類似性がヌクレオチド３１２上流では著しく減少した。タンパク質間での類似性が高く保持されているにもかかわらず、このように類似性が保持されていないのは、ヌクレオチド３１２の上流の配列がタンパク質をコードしていなくてもよいことを示唆している。第二に、固定化したポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）法を用いてさらに上流のｃＤＮＡ配列を得るために努力した。Ｏｃｈｍａｎら、１９８５、ＰＣＲ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：“ＤＮＡ増幅の原理および応用（Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ＤＮＡ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）（Ｅｒｌｉｃｈ編）１０５－１１１（Ｓｔｏｃｋｔｏｎ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）。ＰＣＲ法で誘導したクローンの５′末端は、ｃＤＮＡライブラリーから得られたクローンの５′末端と（３塩基対以内で）非常によく似ており、この事は、第１図に示したｈＭＤＭ２配列の５′末端が転写の５′末端である事を示唆している。第三に、第１図に示した配列をインビトロ（ｉｎ ｖｉｔｒｏ）で翻訳したところ、ヌクレオチド３１２のＡＴＧでコードされるメチオニンで始まり、ヒトの細胞内で観察されるのと同じ大きさのタンパク質が作られた。

第１図では、ｈＭＤＭ２ｃＤＮＡ配列、ｈＭＤＭ２およびｍＭＤＭ２のヌクレオチド、並びにアミノ酸配列を比較している。マウスの配列は、関連するヒトの配列と異なる所のみ示している。以前発表したｍＭＤＭ２ｃＤＮＡの５′および３′の境界を星印（＊）で示す（Ｆａｋｈａｒｚａｄｅｈら、ＥＭＢＯ Ｊ.，１０，１５６５－１５６９，１９９１）。ダッシュ（－）は挿入を示す。ヌクレオチド３１２の推定される翻訳開始部位からヌクレオチド１７８４の終止コドンまでのマウスとヒトのアミノ酸配列を比較する。

ヒトおよびマウスのＭＤＭ２コード領域を比較すると、ヌクレオチド（８０．３％）、およびアミノ酸（８０．４％）レベルで高い相同性の保持を示した。ｈＭＤＭ２およびｍＭＤＭ２は、現行のデータベースに記録されている他の遺伝子とほとんど類似性を持たないが、二つのタンパク質は幾つかのモチーフを共有している。これらの共有モチーフは、コドン１８１－１８５に塩基性核局在化シグナル（Ｔａｎａｋａ，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒ，２７１，４１－４６，１９９０）を、コドン１６６－１６９、１９２－１９５、２６９－２７２、および２９０－２９３に様々なカゼインキナーゼＩＩセリンリン酸化サイト（Ｐｉｎｎａ，Ｂｉｏｃｈｅｍ. ｅｔ. Ｂｉｏｐｈｙｓ. Ａｃｔａ.，１０５４，２６７－２８４，１９９０）を、コドン２２３－２７４に酸性活性化ドメイン（Ｐｔａｓｈｎｅ，Ｎａｔｕｒｅ，３５５，６８３－６８９，１９８８）を、コドン３０５－３２２および４６１－４７８に二つの金属結合サイト（Ｈａｒｒｉｓｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ，３５３，７１５，１９９１）を含んでいたが、どのドメインも既知のＤＮＡ結合ドメインと深い関係はなかった。ｍＭＤＭ２に認められたプロテインキナーゼＡドメイン（Ｆａｋｈａｒｚａｄｅｈら、ＥＭＢＯ Ｊ.，１０，１５６５－１５６９，１９９１）はｈＭＤＭ２には保持されていなかった。

実施例２

ｈＭＤＭ２タンパク質がインビトロでヒトのｐ５３タンパク質と結合するか否かを決定するために、ｈＭＤＭ２発現ベクターをｃＤＮＡクローンから構築した。ｈＭＤＭ２発現ベクターはオーバーラップするｃＤＮＡクローンからｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫ＋（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）に構築した。構築物は第１図に示すヌクレオチド３１２－２１７６の配列を含んでいた。ｈＭＤＭ２の高いレベルの発現を得るために、４２塩基対のゴキブリウイルスのリボソーム侵入配列（Ｄａｓｍａｈａｐａｔｒａら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１５，３９３３，１９８７）をこのｈＭＤＭ２の直ぐ上流に配置した。この構築物、並びにｐ５３（Ｅｌ－Ｄｅｒｉｙら、Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，印刷中、１９９２）およびＭＣＣ（Ｋｉｎｚｌｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５１，１３６６－１３７０，１９９１）をｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫ＋内に構築し、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼで転写し、ウサギの網状赤血球溶解液（Ｐｒｏｍｅｇａ）内で製造者の

指示にしたがって翻訳した。
構築物より生成されるタンパク質の予想される大きさはわずか５５．２ｋｄ（ヌクレオチド３１２のメチオニンからヌクレオチド１７８４にわたる）にすぎなかったが、インビトロで翻訳されたタンパク質はおおよそ９５キロダルトンであった。
３つのタンパク質（ｈＭＤＭ２，ｐ５３およびＭＭＣ）を単独または対に混合して含む溶菌液１０μｌを３７℃で１５分間インキュベーションした。１μｇ（１０μｌ）のｐ５３Ａｂ１（ｐ５３のＣ末端に特異的なモノクローナル抗体）もしくはＡｂ２（ｐ５３のＮ末端に特異的なモノクローナル抗体）（Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）、または５μｌのＭＤＭ２Ａｂ（ウサギの抗ｈＭＤＭ２ポリクローナル抗体）を含むウサギの血清もしくは免疫化前のウサギの血清（ｈＭＤＭ２　Ａｂを生産したウサギより得た）を、示された通り加えた。ウサギのポリクローナル抗体は、ｈＭＤＭ２ｃＤＮＡのヌクレオチド３９０－８１６を含む大腸菌生産ｈＭＤＭ２－グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ融合タンパク質を用いて、生産した。次いで、９０μｌのＲＩＰＡ緩衝液（１０ｍＭトリス、ｐＨ７．５、１％デオキシコール酸ナトリウム、１％　ＮＰ４０、１５０ｍＭ塩化ナトリウム、０．１％　ＳＤＳ）、ＳＮＮＴＥ緩衝液、また結合用緩衝液（Ｅｌ－Ｄｅｒｉｙら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，印刷中、１９９２）を加え、混合液を４℃で２時間インキュベーションした。
２ｍｇのプロテインＡセファロースをそれぞれのチューブに加え、チューブを４℃で１時間、上下に回転させた。ペレット状にして洗浄した後、免疫沈降物をＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、乾燥させたゲルをＥｎｈａｎｃｅ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｎｕｃｌｅａｒ）存在下で１０－６０分間オートラジオグラフした。
第２図に、ｈＭＤＭ２とｐ５３の共沈降を示す。３種類の緩衝液からは同様の結果が得られたが、共沈降は、０．１Ｍ－ＮａＣｌを含む結合緩衝液中（第２図、第６および９列）より０．５Ｍ　ＮａＣｌを含むＳＮＮＴＥ緩衝液中（第２図、第５および８列）のほうが明らかに少なかった。
インビトロで翻訳したｈＭＤＭ２、ｐ５３およびＭＭＣタンパク質を上記のように混合し、ｐ５３Ａｂ１、ｐ５３Ａｂ２、ｈＭＤＭ２Ａｂまたは免疫化前血清と共に、インキュベーションした。第２図、第１、４、７、１０および１４列は、免疫沈降のために用いたタンパク質混合物のアリコートを含む。ｐ５３よりわずかに早く泳動する帯は内部の翻訳開始部位から生成したポリペプチドである。
ｈＭＤＭ２タンパク質は、ｐ５３のＣ末端あるいはＮ末端領域のいずれかに特異的なモノクローナル抗体（第２図、第２および３列）とも免疫沈降しなかった。しかしながら、インビトロで翻訳したヒトｐ５３をｈＭＤＭ２翻訳生成物と混合したところ、抗ｐ５３抗体はｐ５３と共にｈＭＤＭ２タンパク質を沈降させ（第２図、第５および６列）、インビトロでの結合を示した。対照として、類似した電気泳動の移動度を示す他の遺伝子からの蛋白質ＭＭＣ（Ｋｉｎｚｌｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５１，１３６６－１３７０，１９９１）をｐ５３と混合した。ＭＭＣタンパク質の共沈降は認められなかった（第２図、第８および９列）。インビトロで翻訳したｐ５３の変異体型（１７５^{his}）をｈＭＤＭ２タンパク質と混合したところ、ｈＭＤＭ２およびｐ５３のタンパク質と同様の共沈降が認められた。
上記の実験の逆で、抗ｈＭＤＭ２抗体は、ｈＭＤＭ２タンパク質を混合した場合にはｐ５３を免疫沈降した（第２図、第１５列）が、単独ではｐ５３を沈降させなかった（第２図、第１３列）。免疫化前のウサギの血清はｈＭＤＭ２またはｐ５３のどちらをも沈殿させなかった（第２図、第１６列）。
実施例３
ｈＭＤＭ２の染色体での位置を確かめるために、体細胞ハイブリッドをｈＭＤＭ２ｃＤＮＡプローブでスクリーニングした。ヒトの染色体１２のみを含むヒト－ハムスターハイブリッドがプローブとハイブリッド形成することが分かった。同プローブで染色体１２の部分を含むハイブリッドをスクリーニングする（Ｔｕｒｃ－Ｃａｒｅｌら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｅｔ．Ｃｙｔｏｇｅｎｅｔ．，２３，２９１－２９９、１９８６）ことによって、

染色体上の位置を１２ｑ１２－１４に限定した。

実施例４

以前の研究で、染色体１２のこの領域はヒト肉腫で時折異常型になっている事が示されている。Ｍａｎｄａｈｌら、Ｇｅｎｅ Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ ＆ Ｃａｎｃｅｒ，１，９－１４，１９８７；Ｔｕｒｃ－Ｃａｒｅｌら、Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅｔ．Ｃｙｔｏｇｅｎｅｔ．，２３，２９１－２９９、１９８６；Ｍｅｌｔｚｅｒら、Ｃｅｌｌ Ｇｒｏｗｔｈ ＆ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ，２，４９５－５０１，１９９１．ｈＭＤＭ２がその様な癌で遺伝的に変化する可能性を評価するために、サザンブロット分析を行った。

第３図に肉腫内でのｈＭＤＭ２遺伝子の増幅例を示す。細胞ＤＮＡ（５μｇ）は、ＲｅｅｄおよびＭａｎｎ，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．，１３，７２０７－７２１５，１９８５に記載されている方法にしたがって、ＥｃｏＲＩで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離し、ナイロンに移した。細胞ＤＮＡは、５つの原発性肉腫（第３図、第１－４および６列）並びに一つの肉腫細胞系（ＯｓＡ－Ｃｌ、第３図、第５列）から誘導した。次いで、フィルターはヌクレオチト１－９４９のｈＭＤＭ２　ｃＤＮＡフラグメントプローブ（第１図を参照されたい）、または類似したサイズのフラグメントを同定する対照プローブ（ＤＣＣ遺伝子、１．６５ｃＤＮＡフラグメント）でハイブリッドを形成させた。Ｆｅａｒｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４７，４９－５６，１９８９．ハイブリッド形成は、Ｖｏｇｅｌｓｔｅｉｎら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，４７，４８０６－４８１３，１９８７に記載の方法に従って行った。ｈＭＤＭ２配列の著しい増幅がこれらの腫瘍の幾つかに認められた（第３図、第２、３、および５列を参照されたい）。４７例の肉腫を分析したところ、１７例が５－５０倍の範囲でｈＭＤＭ２の増幅を示した。これらの腫瘍は、脂肪肉腫では１３例中７例に、悪性線維性組織球腫（ＭＦＨ）では２２例中７例に、骨原性肉腫では１１例中３例に、および横紋筋肉腫では１例中０例に認められた。また、５例の良性柔組織腫瘍（脂肪腫）および２７例の癌（結腸直腸または胃）をサザンブロット分析によって試験したが、増幅は認められなかった。

実施例５

実施例５では遺伝子の増幅が発現の増加と関連していることを具体的に説明する。

第４図Ａは、ノーザンブロット分析で証明されるｈＭＤＭ２の発現を具体的に説明している。原発性肉腫内ではＲＮＡが分解されているために、ライン化した細胞系のみをノーザンブロットで生産的に分析することができる。ＲＮＡはＭＯＰＳホルムアルデヒドゲル電気泳動で分離し、電気泳動でナイロンフィルターに移した。フィルターへの移送およびハイブリッド形成はＫｉｎｚｌｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ，３３２，３７１－３７２，１９８８に記載の方法に従って行った。ＲＮＡは第３図に記載のｈＭＤＭ２フラグメントとハイブリッドを形成させた。２種類の肉腫細胞系（第１列にＯｓＡ－ＣＬおよび第２列にＲＣ１３）および結腸直腸癌細胞系（ＣａＣｏ－２）よりそれぞれ誘導した全ＲＮＡ１０μｇを用いてｃＤＮＡライブラリー（第３列）を作った。第４列は１０μｇのポリアデニル化ＣａＣｏ－２　ＲＮＡを含む。ＲＮＡサイズをｋｂで示す。ｈＭＤＭ２の増幅が認められた一種類の肉腫細胞系では、おおよそ５．５ｋｂの単一な転写物が認められた（第４図Ａ，第１列）。この転写物の量は増幅されていない肉腫細胞系内（第４図Ａ、第２列）または癌細胞系（第４図Ａ、第３列）内により非常に多い。癌細胞系より精製した（全ＲＮＡよりむしろ）ｍＲＮＡを用いて分析を行ったところ、５．５ｂｐのｈＭＤＭ２転写物が再び認められた（第４図Ａ，第４列）。

第４図Ｂは、肉腫細胞系ＲＣ１３（第１列）、ＯｓＡ－Ｃｌ（第３列）、ＨＯＳ（第４列）、および癌細胞系ＣａＣｏ－２（第２列）のウェスタンブロット分析によって示される、ｈＭＤＭ２の発現を具体的に説明している。

第４図Ｃは、原発性肉腫のウェスタンブロット分析によって示される、ｈＭＤＭ２の発現を具体的に説明している。第１列から第３列はｈＭＤＭ２が増幅された肉腫のタンパク質であり、第四列および第五列はｈＭＤＭ２の増幅されていない肉腫のタンパク質である。アフィニティーで精製したＭＤＭ２Ａｂを用いたウェスタンブロットは、Ｋｉｎｚｌｅｒ

ら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１０，６３４－６４２，１９９０に記載の方法に従って、一列あたり５０μｇのタンパク質を用いて行ったが、脚は１０％脱脂粉乳および１０％ヤギ血清内でブロックし、二次抗体は西洋ワサビのペルオキシダーゼに結合させ、化学発光による検出を可能にした（Ａｍｅｒｓｈａｍ　ＥＣＬ）。ＭＤＭ２　ＡｂはＫｉｎｚｌｅｒら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１０，６３４－６４２，１９９０、に記載の方法を用いて、ｐＡＴＨ－ｈＭＤＭ２融合タンパク質でアフィニティー精製した。約７５－８５、１０５－１２０および１７０－２００ｋｄの非特異的に反応するタンパク質はすべての列に認められ、ｈＭＤＭ２の増幅状態とは関係ない。約９０－９７ｋｂのｈＭＤＭ２タンパク質はｈＭＤＭ２の増幅された腫瘍内にのみ認められた。タンパク質マーカーのサイズをｋｄで示す。

ｈＭＤＭ２の増幅された肉腫細胞系内ではおおよそ９７キロダルトンのタンパク質が高いレベルで発現していた（第４図Ｂ、第３列）が、ｈＭＤＭ２が増幅されていない二例の肉腫細胞系内または癌細胞系内では発現が認められなかった（第４図Ｂ、第１、２および４列）。さらに、別の五例の原発性肉腫をウェスタンブロット分析で試験した。増幅の認められる三例の原発性肉腫は肉腫細胞系で認められるのと同じ大きさのタンパク質を発現していた（第４図Ｃ、第１－３列）が、増幅されていない二例の肉腫にはタンパク質は認められなかった（第４図Ｃ、第４および５列）。

増幅された肉腫瘍内のｈＭＤＭ２ＲＮＡの発現は試験した他の細胞系より少なくとも３０倍高いと概算された。このことは、ウェスタンブロット分析の結果と一致する。

上記の実施例では、ｈＭＤＭ２がインビトロでｐ５３に結合すること、並びにｈＭＤＭ２はＭＦＨ、脂肪肉腫、および骨肉腫を多く含む肉腫で遺伝的に変化（即ち増幅）していることが証明された。これらの肉腫は柔組織および骨の最も一般的な肉腫である。ＷｅｉｓｓおよびＥｎｚｉｎｇｅｒ、Ｃａｎｃｅｒ，４１，２２５０－２２６６，１９７８；Ｍａｌａｗｅｒら、１９８５、Ｃａｎｃｅｒ，「腫瘍学の原理および実践」（Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ），ＤｅＶｉｔａら編、１２９３－１３４２（Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ）．

ヒトＭＤＭ２の増幅は、これらの時として致命的な癌の病因を理解する上で有効である。ＭＤＭ２は、ＳＶ４０　Ｔ－抗原、アデノウイルスＥ１Ｂ、およびＨＰＶ　Ｅ６のようなウイルスにコードされた癌タンパク質が用いる方法と類似した方法でｐ５３を機能的に不活性化すると思われる。ＬａｎｅおよびＢｅｃｈｉｍｏｌ，Ｇｅｎｅｓ　ａｎｄ　ＤｅｖｅｌｏＰｍｅｎｔ，４，１－８，１９９０；Ｗｅｒｎｅｓｓら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４８，７６，１９９０．この仮説と矛盾なく、ｈＭＤＭ２の増幅された肉腫はすべて、他の腫瘍に共通して起こるｐ５３遺伝子の変異を全く持たなかった。ｈＭＤＭ２の増幅は、ウイルス性の発癌にも自然発生の遺伝的変化が根源となる散発性のヒトの癌にも同じように起こる。ｈＭＤＭ２の発現が遺伝子の増幅を伴う腫瘍内で相応じて高いという事実は、ＭＤＭ２がｐ５３と結合するという事実、および、肉腫内でＭＤＭ２が過剰に発現するとｐ５３が制御する増殖調節が利かなくなるという仮説と矛盾しない。この様な腫瘍形成の機構は、ウイルス性癌遺伝子生成物がｐ５３と結合し、かつｐ５３を機能的に不活性化するという、ウイルス誘導腫瘍にすでに認められている機構（ＬａｎｅおよびＢｅｃｈｉｍｏｌ，Ｇｅｎｅｓ　ａｎｄ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，４，１－８，１９９０；Ｗｅｒｎｅｓｓら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４８，７６，１９９０）と著しく相似している。

実施例６

実施例６では、ＭＤＭ２の発現がｐ５３の仲介するトランス活性化を阻害することを示す。

ＭＤＭ２がｐ５３の転写活性化能力に影響を及ぼすことができるか否かを決定するために、２つのタンパク質をコードする発現ベクターをｐ５３応答リポーター構築物と共に酵母内に安定的にトランスフェクションした。リポーターは最小プロモーターの転写調節下にあるβガラクトシダーゼ遺伝子、およびインビトロでｐ５３と強く結合するマルチマのヒトのＤＮＡ配列からなる（Ｋｅｒｎ，Ｓ．Ｅ．，ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５６，８２７－８３０，１９９２）。リポーターの発現は、本実施例のアッセイでは、完全にｐ５３に依

存していた（第５図、棒グラフａおよびｃを比較されたい）。ＭＤＭ２の発現は、ＭＤＭ２が発現していない同質遺伝子の酵母に比較して、本リポーターのｐ５３仲介トランス活性を１／１６に阻害することが分かった（第５図、棒グラフａおよびｂを比較されたい）。ウェスタンブロット分析によって、ｐ５３（５３ｋＤ）は株内にＭＤＭ２を持っている場合も持っていない場合も等しく発現していることが確かめられた（第５図、挿入図）。

方法：ＭＤＭ２発現プラスミド、ｐＰＧＫ－ＭＤＭ２は、ホスホグリセリン酸キナーゼの直ぐ下流にプロモーターを持つｐＰＧＫ（Ｐｏｏｎ，Ｄ．ら、Ｍｏｌ．ａｎｄ Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１１，４８０９－４８２１，１９９１）に、全長のＭＤＭ２ ｃＤＮＡ（Ｏｌｉｎｅｒ，Ｊ．Ｄ．ら、Ｎａｔｕｒｅ，３５８，８０－８３，１９９２）を挿入することによって構築した。ガラクトースで誘導されるｐ５３（ｐＲＳ３１４ＳＮ，Ｎｉｇｒｏ，Ｊ．Ｍ．ら、Ｍｏｌ．ａｎｄ Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１２，１３５７－１３６５，１９９２）、ｌｅｘＡ－ＶＰ１６（ＹＶＬｅｘＡ、Ｄａｌｔｏｎ，Ｓ．ら、Ｃｅｌｌ，６８，５９７－６１２，１９９２）、およびｌｅｘＡ（ＹＶＬｅｘＡマイナスＶＰ１６）のプラスミドを示す通り用いた。リポーターには、ＰＧ１６－ｌａｃＺ（Ｋｅｒｎ，Ｓ．Ｅ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５６，８２７－８３０，１９９２）（ｐ５３応答）およびｐＪＫ１０３（Ｋａｍｅｎｓ，Ｊ．ら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１０，２８４０－２８４７，１９９０）（ｌｅｘＡ－応答）を用いた。Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ株ｐＥＧＹ４８は、Ｋｉｎｚｌｅｒ，Ｋ．Ｗ．ら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１７，３６４５－３６５３，１９８９に記載の方法に従って形質転換した。棒グラフａ－ｃで示す酵母株は、Ｋｅｒｎ，Ｓ．Ｅ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５６，８２７－８３０，１９９２に記載の方法に従って、３０℃、炭素源２％ラフィノースを含む選択液体培地内で、対数増殖中期（ｍｉｄ－ｌｏｇ ｐｈａｓｅ）に成長させ、２％ガラクトースを加えて３０分間誘導し、集菌し、溶菌した。棒グラフｄ－ｆで示した株は、測定可能な程度のβ－ガラクトースを得るために細胞をガラクトシダーゼで４時間誘導したことを除いて、同様に処理した。第５図に示したβ－ガラクトシダーゼ活性は、３－５回の実験値の平均を示している［誤差を示す細い棒グラフは標準誤差（ｓ．ｅ．ｍ．）を示している）。タンパク質濃度は、クーマシーブルー（ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いたアッセイで定量した。β－ガラクトシダーゼのアッセイは、製造者の指示にしたがってＡＭＰＧＤ化学発光基質およびエメラルドエンハンサー（Ｔｒｏｐｉｘ）を用いて行った。棒グラフｂおよびｃのβ－ガラクトシダーゼ活性は、棒グラフａの活性との比較で示しており；棒グラフｅおよびｆのβ－ガラクトシダーゼ活性は、棒グラフｄとの比較で示している。ウェスタンブロットは、Ｏｌｉｎｅｒ，Ｊ．Ｄ．ら、Ｎａｔｕｒｅ，３５８，８０－８３，１９９２に記載の方法に従って、ｐ５３Ａｂ１８０１（パネル下側、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ）またはＭＤＭ２ポリクローナル抗体（Ｏｌｉｎｅｒ，Ｊ．Ｄ．ら、Ｎａｔｕｒｅ，３５８，８０－８３，１９９２）（パネル上側）を用いて行った。

この阻害は外来ＭＤＭ２遺伝子の発現によって仲介される一般的な転写の単なるダウンレギュレーションでないことを証明するために、異なる転写活性化因子（ｌｅｘＡ－ＶＰ１６、ＶＰ１６の酸性活性化ドメインに融合させたｌｅｘＡ ＤＮＡ結合ドメインからなる）、類似したリポーター（β－ガラクトシダーセ遺伝子の上流にｌｅｘＡ応答部位をもつ）、および同じＭＤＭ２発現ベクターを含む酵母株を作った。第５図（棒グラフｄおよびｅ）に示す結果は、ｌｅｘＡ－ＶＰ１６の転写活性化がＭＤＭ２の存在に影響されないことを説明している。さらに、ＭＤＭ２の発現は細胞の増殖速度に明白な影響を与えなかった。

実施例７

実施例７では、互いに作用しあうｐ５３およびＭＤＭ２のドメインを示す。

ＭＤＭ２の仲介するｐ５３阻害の機構を洞察するために、お互いの結合の原因となるＭＤＭ２およびｐ５３のドメインをマッピングした。タンパク質－タンパク質結合を検出するための酵母システムには、転写因子ドメインのモジュール的性質を利用した（Ｋｅｅｇａｎ，Ｌ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３１，６９９－７０４，１９８６）；Ｃｈｉｅｎ，Ｃ．－Ｔ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，Ｕ．Ｓ．Ａ．，８８，９５７８－９

５８２，１９９１；Ｂｒｅｎｔ，Ｒ．ら、Ｃｅｌｌ，４３，７２９－７３１，１９８５；Ｍａ，Ｊ．ら、Ｃｅｌｌ，５５，４４３－４４６，１９８８）。一般的には、（配列特異的ＤＮＡ結合ドメインと融合した）タンパク質１が（転写活性化ドメインと融合した）タンパク質２と結合する能力を持つならば、次いで両融合タンパク質が共発現し、結果として適当なリポーターの転写が活性化されるであろう。本実験では、ｌｅｘＡ ＤＮＡ 結合ドメイン（アミノ酸２－２０２）およびＢ４２酸性活性化ドメイン（ＡＡＤ）を融合構築物として用いた。リポーター（Ｋａｍｅｎｓ，Ｊ．ら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１０，２８４０－２８４７，１９９０）は、β－ガラクトシダーゼ遺伝子の上流にｌｅｘＡ応答部位を含む。最初に、対照実験として、全長のＭＤＭ２をｌｅｘＡ融合ベクター内に挿入し、固有の活性化ドメインを持つ全長のｐ５３は、非融合ベクター内に挿入した。組み合わせの結果、ｌｅｘ応答リポーターが活性化されたが、ＭＤＭ２またはｐ５３ｃＤＮＡのどちらか一方が挿入されていない同じ発現構築物はβ－ガラクトシダーゼを活性化しなかった（第１表、第１、２、および３株）。この様に、活性化はＭＤＭ２－ｐ５３の結合に依存する。

次いで、本アッセイを適用して、それぞれのタンパク質の相互作用ドメインをマッピングした。ＭＤＭ２またはｐ５３をコードする全長のｃＤＮＡフラグメントを音波処理によってランダムに切断し、ポリメラーゼ鎖反応によって増幅し、大きさで分画し、適切な融合ベクター内にクローン化し、さらに、リポーターおよび他のタンパク質の全長の翻訳物と共に酵母内にトランスフェクションした。

方法：ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫ＋（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）内の全長のＭＤＭ２ｃＤＮＡは、完全な挿入物（全ＭＤＭ２）を切り出すために、ＸｈｏＩおよびＢａｍＨＩで消化した。アガロースゲルで精製した後、挿入物は音波処理でランダムフラグメントに剪断し、ＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウフラグメントで末端を整え、キャッチリンカーと結合させ、さらにポリメラーゼ鎖反応で増幅させた（Ｋｉｎｚｌｅｒ，Ｋ．Ｗ．ら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１７，３６４５－３６５３，１９８９に記載）。フラグメントはアクリルアミドゲルで１００－ ００ｂｐまたは４００－１０００の大きさの範囲に分画し、ｌｅＸＡ（１－２０２）＋ＰＬ（Ｒｕｄｅｎ，Ｄ．Ｍ．ら、Ｎａｔｕｒｅ，３５０，２５０－２５２，１９９１）にクローン化し、細菌（ＸＬ－１ Ｂｌｕｅ，Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）にトランスフェクションした。少なくとも１０，０００個の細菌コロニーを寒天平板からこすり取り、プラスミドＤＮＡはｐＲＳ３１４Ｎ（ｐ５３発現ベクター）およびｐＪＫ１０３（ｌｅｘＡ－応答β－ガラクトシダーゼリポーター）を含むｐＥＧＹ４８株にトランスフェクションした。おおよそ５，０００個の酵母クローンを２％デキストロースを含む選択培地に塗布し、さらにガラクトース－およびＸ－ｇａｌを含む選択培地上にレプリカ塗布した。青色コロニー（１７）は大きなＭＤＭ２フラグメントを含む平板上にのみ現れた。分離した１７コロニーは、ガラクトース（ｐ５３誘導物）の存在下または非存在下の両方で本アッセイの青色発色について試験した；ガラクトースの存在下では、全てのクローンが陽性であったが、非存在下では１７クローンのうち２個だけが陽性を示した。１７個の酵母クローンから抽出したＭＤＭ２含有プラスミドＤＮＡは細菌のＫＣ８株に選択的に伝達し、ｌｅｘＡ－ＭＤＭ２接合部位から配列を決定した。２個のｐ５３－非依存性クローンのＭＤＭ２配列を第６図Ａに示す。残り１５個のｐ５３－依存性クローンのＭＤＭ２配列は長さ１３５－２６５のアミノ酸からなるペプチドをコードしており、すべてイニシエーターのメチオニンから始まっていた。得られたＭＤＭ２配列のうちの３例を第６図Ｂの上部に示す。下方の６つの配列は、（ポリメラーゼ鎖反応および適切なプライマーを用いて）ｌｅｘＡ（１－２０２）＋ＰＬにクローン化することによって遺伝子工学で得られた配列で、より狭い結合領域について試験した。

また、ｐ５３のフラグメントは、Ｃ末端にＢ４２酸性活性化ドメインを融合したタンパク質を作り、赤血球凝集素のエピトープを合体させ、ｐＪＧ４－５にクローン化した。得られたクローンは、すでにｌｅｘ－ＭＤＭ２（全長のＭＤＭ２を含むｐｌｅｘ－２０２＋ＰＬ）およびｐＪＫ１０３を含んでいるｐＥＧＹ４８株にトランスフェクションした。第６図Ｃに示した上から３つまでのｐ５３配列がコロニースクリーニングによって得られた酵

母より誘導されたが、下から３つは遺伝子工学によって得られたもので、示されているフラグメントを含む。
得られた酵母クローンは生体内原位置（ｉｎ　ｓｉｔｕ）でのβ－ガラクトシダーゼ活性について試験した。ｌｅｘＡ　ＤＮＡ結合ドメインに融合させたＭＤＭ２フラグメントを持つおおよそ５０００のクローンのうち、１７クローンが本アッセイで陽性であった。クローンは２つのクラスに分けることができた。第一のクラス（２クローン）は低レベル（他の１５クローンの約１／５より少ない）のβ－ガラクトシダーゼを発現し、β－ガラクトシダーゼの発現はｐ５３の発現に依存しなかった（第６図Ａ）。この様な２つのクローンはそれぞれＭＤＭ２のアミノ酸１９０－３４０および２６９－３７９をコードしていた。この様な２つのクローンが共有する領域はＭＤＭ２の唯一の酸性ドメイン（アミノ酸２３０－３０１）とオーバーラップした。このドメインは３７．５％はアスパラギン酸およびグルタミン酸残基からなり、塩基性アミノ酸は含まれていなかった。ｌｅｘＡと融合した完全なＭＤＭ２タンパク質は同じアッセイを行っても測定できるようなβ－ガラクトシダーゼ活性を示さなかった（第１表、第３株）ことから、この酸性ドメインはＭＤＭ２配列の残りの部分から分離した場合にのみ転写を活性化すると思われる。他のクラス（１５クローン）はそれぞれＭＤＭ２のアミノ末端領域を含んでいた（第６図Ｂ）。この様なクローンのβ－ガラクトシダーゼ活性はｐ５３の共発現に依存していた。相互作用する領域を局限するために、さらに６クローンを遺伝子工学により作った。試験した中で全長のｐ５３と機能的に相互作用することので来た最も小さいＭＤＭ２領域はＭＤＭ２コドン１－１１８を含んでいた。相互作用に比較的大きなサイズのドメインが必要であるということは、ＭＤＭ２を小さく音波処理したフラグメント（６００ｂｐの平均サイズの代わりに２００ｂｐ）をスクリーニングアッセイに用いた場合に陽性を示すクローンが得られなかった事実と一致する。
逆に、Ｂ４２　ＡＡＤに融合させたｐ５３のフラグメントを含む酵母のクローンを、ｌｅｘＡ－ＭＤＭ２融合タンパク質存在下、ｌｅｘＡ応答リポーターの発現についてスクリーニングした。スクリーニングで得られた１４クローンを配列決定した結果、それらを３つのサブセットに分けうることが明らかになった。第一のサブセットは１－４１のアミノ酸を含み、第２のサブセットは１３－５７のアミノ酸を含み、第３のサブセットは１－５０のアミノ酸を含む（第６図Ｃ）。これらの３フラグメント間でオーバーラップする最小領域はコドン１３－４１を含んでいた。この最小ドメインはＭＤＭ２との相互作用に必要であることが明らかであるが、これだけでは不十分であり、活性を示すために、フラグメントはコドン１３－４１のどちらかの側に９－１２のアミノ酸を必要とした（第６図Ｃ）。ｐ５３のアミノ末端領域がＭＤＭ２の結合に必要とされるという考えをさらに試験するために、さらに、ｐ５３のコドン７４－３９３に融合させたｌｅｘＡ－ＤＮＡ結合ドメインおよび全長のＭＤＭ２に融合させたＢ４２酸性活性化ドメインを発現する酵母株を作った。これらの株は同じｌｅｘＡ応答リポーターを活性化しなかった（第１表、第８株）ので、ｐ５３のＮ末端は相互作用に必要であると予想される。
配列決定分析によって、第６図に示した全てのｐ５３およびＭＤＭ２フラグメントはフレームシフトせず、それぞれＢ４２およびｌｅｘＡドメインに関して正しい方向で結合されていることが示された。さらに、第６図で比較した全てのクローンは、第７図のウェスタンブトットに示すように、同程度の適切なタンパク質を発現していた。

第1表

株番号	ｐ５３構築物	ＭＤＭ２構築物	活性化
1	ｐ５３[a]	ベクター[b]	－
2	ｐ５３[a]	lexA-MDM2[b]	＋
3	ベクター[a]	lexA-MDM2[b]	－
4	ｐ５３[a]	lexA-MDM2(1-118)[b]	＋
5	ベクター[a]	lexA-MDM2(1-118)[b]	－
6	B42-p53(1-41)[c]	lexA-MDM2[b]	＋
7	B42-p53(1-41)[c]	ベクター[b]	－
8	lexA-p53(74-393)[b]	B42-MDM2[c]	－
9	p53(1-137)[a]	lexA-MDM2[b]	－

適切なリポーターと共に、それぞれの株に発現したＭＤＭ２およびｐ５３タンパク質を示した。括弧内の数字はコードするＭＤＭ２またはｐ５３のアミノ酸を示している。（括弧の付いていないものは全長のタンパク質、すなわち、ＭＤＭ２アミノ酸１－４９１またはｐ５３アミノ酸１－３９３を示している。）ｌｅｘＡ－応答β－ガラクトシダーゼリポータープラスミド（ｐＪＫ１０３、Ｋａｍｅｎｓ，Ｊ．ら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１０，２８４０－２８４７，１９９０）がすべての株に存在していた。

[a]ｐＳＲ３１４ベクター（Ｎｉｇｒｏ，Ｊ．Ｍ．ら、Ｍｏｌ．ａｎｄ Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１２，１３５７－１３６５，１９９２）

[b]ｐｌｅｘ（１－２０２）＋ＰＬベクター、挿入物に融合したｌｅｘＡ ＤＮＡ結合ドメインを含む（Ｒｕｄｅｎ，Ｄ．Ｍ．ら、Ｎａｔｕｒｅ，３５０，２５０－２５２，１９９１）

[c]ｐＪＧ４－５ベクター、挿入物に融合したＢ４２活性化ドメインを含む

[d]（＋）、はＸ－ｇａｌ含有選択培地上で２４時間インキュベーションした後にコロニーが青色に変化することを示し、（－）は７２時間インキュベーションしてもコロニーが白色のままであることを示している。

これらのマッピング実験で得られた最も顕著な結果は、ＭＤＭ２の結合に必要とされるｐ５３の領域はすでに同定されているｐ５３の酸性活性化ドメイン（アミノ酸２０－４２）（Ｕｎｇｅｒ，Ｔ．ら、ＥＭＢＯ Ｊ．，１１，１３８３－１３９０，１９９２；Ｍｉｌｌｅｒ，Ｃ．Ｗ．ら、Ｐｒｏｃ．Ａｍ．Ａｓｓｏｃ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，３３，３８６，１９９２）にほぼ一致することである。この事は、ＭＤＭ２は、転写機構からｐ５３の活性化ドメインを隠す“ｃｏｎｃｅａｌｉｎｇ”することによって、ｐ５３の仲介する転写活性化を阻害することを示唆した。もしこのことが事実であれば、ｐ５３タンパク質の残りから分離した状態にあるｐ５３活性化ドメインは、全長のＭＤＭ２によって阻害されるはずである。この仮説を試験するために、ｌｅｘＡ－ＤＮＡ結合ドメインに融合させたｐ５３活性化ドメイン（コドン１－７３）を含むハイブリッドタンパク質を作った。この構築物は、ｐ５３活性化ドメインを他のＤＮＡ結合ドメインに融合させた前の実験結果（Ｆｉｅｌｄｓ，Ｓ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４９，１０４６－１０４９，１９９０；Ｒａｙｃｒｏｆｔ，Ｌ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４９，１０４９－１０５１，１９９０）から予想されるように、ｌｅｘＡ応答リポーターの転写活性化を強く阻害した。ｌｅｘＡ－ｐ５３ＤＮＡ構築物は、全長のＭＤＭ２発現ベクター（またはベクターのみ）と共に酵

母内で安定に発現した。ＭＤＭ２の発現の結果、リポーターの活性は１／５に減少した。このことは、ＭＤＭ２は、ＤＮＡにｐ５３を繋ぎ止めるための隣接したタンパク質の配列に関係なく、ｐ５３活性化ドメインの機能を特異的に阻害できる（第８図）ことを証明している。

方法：株は２％デキストロースで対数増殖中期まで成長させた後、２％ガラクトースを加えて２時間ｐ５３の発現を誘導した。ｌｅｘＡ－ｐ５３構築物は、ｌｅｘ－ＶＰ１６（ＹＶｌｅｘＡ，Ｄａｌｔｏｎ，Ｓ．ら、Ｃｅｌｌ，６８，５９７－６１２，１９９２）のＶＰ１６配列を、アミノ酸１－７３をコードするｐ５３配列に置き換えたものと同じである。

得られた実験結果より興味あるパラドクスが浮かび上がった。ＭＤＭ２が、ｐ５３活性化ドメインに結合し（第６図）、そして転写機構からｐ５３活性化ドメインを隠す（第８図）のであれば、どの様にしてｌｅｘＡ－ＭＤＭ２－ｐ５３複合体はｌｅｘＡ応答リポーターの転写を活性化できるのであろうか（第１表、第２株）。その理由は、株２のｌｅｘＡ－ＭＤＭ２－ｐ５３複合体のうちの機能的活性化ドメインはｐ５３のみによって与えられていると予想されることから、その機能的活性化ドメインのみがＭＤＭ２の結合によって隠され、その結果活性化されなくなると予想して良い。このパラドクスはｐ５３がホモテトラマーとして存在する（Ｓｔｅｎｇｅｒ，Ｊ．Ｅ．ら、Ｍｏｌ．Ｃａｒｃｉｎｏｇｅｎｅｓｉｓ，５，１０２－１０６，１９９２；Ｓｔｕｒｚｂｅｃｈｅｒ，Ｈ．Ｗ．ら、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，７，１５１３－１５２３，１９９２）という知識によって解決することができる。つまり、ｌｅｘＡ－ＭＤＭ２－ｐ５３複合体の活性化は、ｐ５３がテトラマーであることによって４つの別々の活性化ドメインが存在し、その全てがＭＤＭ２によって隠される訳ではない、ことにより可能であろう。この論点を直接試験するために、ホモオリゴマー化に必要なｐ５３ドメイン（Ｓｔｅｎｇｅｒ，Ｊ．Ｅ．ら、Ｍｏｌ．Ｃａｒｃｉｎｏｇｅｎｅｓｉｓ，５，１０２－１０６，１９９２；Ｓｔｕｒｚｂｅｃｈｅｒ，Ｈ．Ｗ．ら、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，７，１５１３－１５２３，１９９２）（Ｃ末端）をｐ５３発現構築物から除去した。得られた構築物はコドン１－１３７のみからなる。この切り縮めたｐ５３ポリヌクレオチドは完全な活性化ドメイン（第８図、棒グラフａ）およびＭＤＭ２との相互作用に必要とされるドメイン全体（第１表、第６株）を保持していた。しかしながら、ｌｅｘＡ－ＭＤＭ２と相互作用させたところ、ｌｅｘＡ応答リポーターの転写活性化は認められなかった（第１表、第９株）。ｐ５３はｌｅｘＡリポーターに結合するｌｅｘＡ－ＭＤＭ２を阻害しないため（第１表、第２株）、第９株の結果は分離されたｐ５３活性化ドメインがＭＤＭ２によって直接阻害されたことによると考えられる。

実施例８

本実施例では、ＭＤＭ２のエピトープに特異的な抗体の生成および特徴について具体的に説明する。

雌の（ＢＡＬＢ／ｃ　Ｘ　Ｃ５７ＢＬ７６）Ｆ１　マウスを腹こう内で免疫化するために用いた抗原調製物は、細菌で発現させ、グルタチオンカラムで精製したグラタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ－ＭＤＭ２（ＧＳＴ－ＭＤＭ２）融合タンパク質からなる。（一つの調製物はポリアクリルアミドゲルでさらに精製し、電気溶出した。）融合タンパク質はヒトＭＤＭ２タンパク質のアミノ末端部分１．６ｋＤ（アミノ酸２７－１６８）を含んでいる。免疫処置のために、融合タンパク質はＲｉｂｉアジュバンド（Ｒｉｂｉ　Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｉｎｃ．）と混合した。

２匹のマウスを殺し、そのひ臓細胞をＳＰ２／０ｓ骨髄腫細胞に融合させた（ＭｃＫｅｎｚｉｅ，ら、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，４，５４３－５４８，１９８９）。得られたハイブリドーマはｔｒｐＥ－ＭＤＭ２融合タンパク質をコーティングした微量滴定用の穴でＥＬＩＳＡによってスクリーニングした。ｔｒｐＥ－ＭＤＭ２融合タンパク質は、ＧＳＴ－ＭＤＭ２融合タンパク質と同じＭＤＭ２部分を含んでいる。抗原は１μｇ／ｍｌの濃度でコーティングした。

第二の融合物は、ハイブリドーマを電気溶離し、グルタチオンで精製したＧＳＴ－ＭＤＭ２によって、スクリーニングすることを除いて、同じ方法で作成した。両融合物から陽性

のハイブリドーマが得られ、単一細胞をサブクローン化した。サブクローンは、ウェスタンブロットを行い、５５ｋＤのｔｒｐＥ－ＭＤＭ２および４３ｋＤのＧＳＴ－ＭＤＭ２融合タンパク質に対する特異性について試験した。
ウェスタンブロットで陽性を示した２個のサブクローン（１Ｆ２およびＪＧ３）は腹水を発生させるためにマウス内にいれた。得られた腹水はプロテインＡで精製した。精製した両モノクローナル抗体は、ウェスタンブロットおよび免疫沈降で試験した結果、ＭＤＭ２を過剰に発現するヒトの骨肉腫細胞系（ＯｓＡ－ＣＬ）に存在する９０ｋＤに泳動するＭＤＭ２タンパク質を陽性に検出したが、ＭＤＭ２を過剰に発現していないＨＯＳ骨肉腫では陰性であった。
ＥＤ９は腹水からプロテインＧで精製され、クリオスタットを用いた免疫組織化学で、ＩＦ２と同じ様に、骨肉腫細胞内のＭＤＭ２に対して特異的であることが分かった。

実施例９

本実施例は、細胞レベルでのＭＤＭ２の発現および検出について説明する。
細胞レベルでのＭＤＭ２の発現を高めるために、細菌に生産させたＭＤＭ２のアミノ酸残基２７－１６８を含む融合タンパク質に対するモノクローナル抗体を作った（実施例８を参照されたい）。試験した幾つかの抗体のうちで、ｍＡｂＩＦ－２が、いろいろなアッセイ方法でＭＤＭ２を検出すると言う点で最も有効であった。まず最初の試験では、ＯｓＡ－ＣＬ［ＭＤＭ２は増幅されているがｐ５３の変異は伴わない肉腫細胞系（第ＩＩ表）］より誘導されたタンパク質、およびＳＷ４８０［ｐ５３は変異している（Ｂａｒａｋら、ＥＭＢＯ，１２，４６１－４６８，１９９３）がＭＤＭ２は増幅されていない（データは示していない）結腸直腸癌の細胞系］より誘導されたタンパク質を比較した。第９図に示すように、ｍＡｂ　ＩＦ－２によって、ＯｓＡ－ＣＬ抽出物中には濃い９０ｋｄの帯に加えてこれより低分子量の他の帯が幾つか検出され、ＳＷ４８０抽出物には非常に淡い９０ｋｄの帯が検出された。ＯｓＡ－ＣＬ抽出物にみられる低分子量の帯がタンパク質の分解によるものか、ＭＤＭ２転写の交互プロセシングによるものかを区別することはできなかった。ＯｓＡ－ＣＬおよびＳＷ４８０に認められるシグナルの間の強度の差が２０倍より大きいことは、これら２種の細胞系でのＭＤＭ２遺伝子のコピー数の差が２０倍より大きいことと一致する。逆に、ｐ５３に特異的なｍＡｂ１８０１で検出される５３ｋｄのシグナルは、ＯｓＡ－ＣＬよりＳＷ４８０で非常に強く、このことはＳＷ４８０に変異したｐ５３が存在することと一致する（第９図）。
次いで、カバーガラス上で増殖させた細胞を用いて、ＭＤＭ２タンパク質の細胞内での位置を査定した。ＩＦ－２ｍＡｂを持つＯｓＡ－ＣＬ細胞では、もっぱら核内にのみ強いシグナルが認められたが、ＳＷ４８０でも、厳密な意味で核に対してのみ弱いシグナルが認められた（第１０図）。ＭＤＭ２の核局在は、マウス細胞で先に得られた研究結果（Ｂａｒａｋら、ＥＭＢＯ，１２，４６１－４６８，１９９３）、およびヒトのＭＤＭ２はアミノ酸残基１７９－１８６に核局在化シグナルを含んでいると言う事実と一致する。ｐ５３特異的抗体との反応も、また、これら２種の細胞系の核内に限定され（第１０図）、その強度比はウェスタンブロットの結果（第９図）と一致する。
次いで、ＩＦ－２ｍＡｂを用いて上記の７例の原発性肉腫を染色した。７例のうち２例（腫瘍＃３および＃１０）の核は強く染色された（第１１図）。これらの両腫瘍はＭＤＭ２遺伝子の増幅を含んでいた（第ＩＩ表）。増幅されていない５例の腫瘍において、ＭＤＭ２反応はほとんど又は全く認められなかった（第１１図）。

第ＩＩ表

腫瘍 #	腫瘍 ＩＤ	型[a]	ＭＤＭ２増幅[b]	ｐ５３変化[c]	過剰発現[d]
1	Ｍ－２	ＭＦＨ	－	欠失／再配置	－
2	Ｍ－５	ＭＦＨ	－	CGC-CUC 変異；Arg(158)-His	ｐ５３
3	Ｍ－７	ＭＦＨ	＋	－	ＭＤＭ２
4	Ｍ－８	ＭＦＨ	－	欠失	－
5	Ｍ－１４	ＭＦＨ	－	－	Ｎ．Ｔ
6	Ｍ－１５	ＭＦＨ	－	欠失	Ｎ．Ｔ
7	Ｍ－１６	ＭＦＨ	－	－	－
8	Ｍ－１７	ＭＦＨ	－	－	Ｎ．Ｔ
9	Ｍ－１８	ＭＦＨ	－	過剰発現	ｐ５３
１０	Ｍ－２０	ＭＦＨ	＋	－	ＭＤＭ２
１１	Ｌ－５	脂肪肉腫	－	－	Ｎ．Ｔ
１２	Ｌ－７	脂肪肉腫	－	AAC-AGC 変異；Asn(239)-Ser	Ｎ．Ｔ
１３	Ｌ－９	脂肪肉腫	＋	－	Ｎ．Ｔ
１４	Ｌ－１１	脂肪肉腫	－	－	Ｎ．Ｔ
１５	ＫＬ５Ｂ	脂肪肉腫	－	CAG-UAG 変異；Gln(144)-Stop	Ｎ．Ｔ
１６	ＫＬ７	脂肪肉腫	＋	－	Ｎ．Ｔ
１７	ＫＬ１０	脂肪肉腫	－	－	Ｎ．Ｔ
１８	ＫＬ１１	脂肪肉腫	－	GGT-GAT 変異；エキソン５スプライシングドナーサイト	Ｎ．Ｔ
１９	ＫＬ１２	脂肪肉腫	－	－	Ｎ．Ｔ
２０	ＫＬ２８	脂肪肉腫	＋	－	Ｎ．Ｔ

第ＩＩ表(続)

腫瘍#	腫瘍ID	型[a]	MDM2増幅[b]	ｐ５３変化[c]	過剰発現[d]
21	KL30	脂肪肉腫	＋	－	N．T
22	S189	脂肪肉腫	＋	－	N．T
23	S131B	脂肪肉腫	－	－	N．T
24	OSA-CL	MFH	＋	－	MDM2

[a] ＭＦＨ＝悪性線維性組織球腫(malignant fibrous histiocytoma)

[b] サザンブロットにより評価

[c] サザンブロット、エキソン５－８の配列決定、または免疫組織化学分析により評価

[d] 免疫組織化学分析により評価；Ｎ．Ｔ＝試験せず(not tested)

配列表

(2) 配列情報SEQ ID NO:1:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ:64アミノ酸

(B) 型:アミノ酸

(C) 鎖の数:一本鎖

(D) トポロジー:直線状

(ii) 配列の種類:タンパク質

(iii) ハイポセティカル:NO

(iv) アンチセンス:NO

(v) フラグメント型:N-末端

(vi) 起源:

(A) 生物名:ヒト

(viii) ゲノム内での位置:

(A) クロモゾーム／セグメント名:17q

(xi) 配列:SEQ ID NO:1:

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
1 5 10 15
Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
20 25 30
Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
35 40 45
Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
50 55 60

(2) 配列情報SEQ ID NO:2:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:2372塩基対
(B) 型:核酸
(C) 鎖の数:二本鎖
(D) トポロジー:直線状
(ii) 配列の種類:cDNA
(iii)ハイポセティカル:NO
(iv) アンチセンス:NO
(vi) 起源:
(A) 生物名:ヒト
(H) セルライン:CaCo-2
(viii) ゲノム内での位置:
(B) 染色体上の位置:12q12-14
(ix) 特徴:
(A) NAME/KEY:CDS
(B) 存在位置:312..1784
(xi) 配列：SEQ ID NO:2:

GCACCGCGCG AGCTTGGCTG CTTCTGGGGC CTGTGTGGCC CTGTGTGTCG GAAAGATGGA 60

GCAAGAAGCC GAGCCCGAGG GGCGGCCGCG ACCCCTCTGA CCGAGATCCT GCTGCTTTCG 120

CAGCCAGGAG CACCGTCCCT CCCCGGATTA GTGCGTACGA GCGCCCAGTG CCCTGGCCCG 180

GAGAGTGGAA TGATCCCCGA GGCCCAGGGC GTCGTGCTTC CGCAGTAGTC AGTCCCCGTG 240

AAGGAAACTG GGGAGTCTTG AGGGACCCCC GACTCCAAGC GCGAAAACCC CGGATGGTGA 300

GGAGCAGGCA A ATG TGC AAT ACC AAC ATG TCT GTA CCT ACT GAT GGT GCT 350

Met Cys Asn Thr Asn Met Ser Val Pro Thr Asp Gly Ala

1 5 10

GTA ACC ACC TCA CAG ATT CCA GCT TCG GAA CAA GAG ACC CTG GTT AGA 398

Val Thr Thr Ser Gln Ile Pro Ala Ser Glu Gln Glu Thr Leu Val Arg

15 20 25

CCA AAG CCA TTG CTT TTG AAG TTA TTA AAG TCT GTT GGT GCA CAA AAA 446

Pro Lys Pro Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Ser Val Gly Ala Gln Lys

30 35 40 45

GAC ACT TAT ACT ATG AAA GAG GTT CTT TTT TAT CTT GGC CAG TAT ATT 494

Asp Thr Tyr Thr Met Lys Glu Val Leu Phe Tyr Leu Gly Gln Tyr Ile

```
                    50                  55                  60
ATG ACT AAA CGA TTA TAT GAT GAG AAG CAA CAA CAT ATT GTA TAT TGT    542
Met Thr Lys Arg Leu Tyr Asp Glu Lys Gln Gln His Ile Val Tyr Cys
                65                  70                  75
TCA AAT GAT CTT CTA GGA GAT TTG TTT GGC GTG CCA AGC TTC TCT GTG    590
Ser Asn Asp Leu Leu Gly Asp Leu Phe Gly Val Pro Ser Phe Ser Val
            80                  85                  90
AAA GAG CAC AGG AAA ATA TAT ACC ATG ATC TAC AGG AAC TTG GTA GTA    638
Lys Glu His Arg Lys Ile Tyr Thr Met Ile Tyr Arg Asn Leu Val Val
        95                  100                 105
GTC AAT CAG CAG GAA TCA TCG GAC TCA GGT ACA TCT GTG AGT GAG AAC    686
Val Asn Gln Gln Glu Ser Ser Asp Ser Gly Thr Ser Val Ser Glu Asn
    110                 115                 120                 125
AGG TGT CAC CTT GAA GGT GGG AGT GAT CAA AAG GAC CTT GTA CAA GAG    734
Arg Cys His Leu Glu Gly Gly Ser Asp Gln Lys Asp Leu Val Gln Glu
                130                 135                 140
CTT CAG GAA GAG AAA CCT TCA TCT TCA CAT TTG GTT TCT AGA CCA TCT    782
Leu Gln Glu Glu Lys Pro Ser Ser Ser His Leu Val Ser Arg Pro Ser
            145                 150                 155
ACC TCA TCT AGA AGG AGA GCA ATT AGT GAG ACA GAA GAA AAT TCA GAT    830
Thr Ser Ser Arg Arg Arg Ala Ile Ser Glu Thr Glu Glu Asn Ser Asp
        160                 165                 170
GAA TTA TCT GGT GAA CGA CAA AGA AAA CGC CAC AAA TCT GAT AGT ATT    878
Glu Leu Ser Gly Glu Arg Gln Arg Lys Arg His Lys Ser Asp Ser Ile
    175                 180                 185
TCC CTT TCC TTT GAT GAA AGC CTG GCT CTG TGT GTA ATA AGG GAG ATA    926
Ser Leu Ser Phe Asp Glu Ser Leu Ala Leu Cys Val Ile Arg Glu Ile
190                 195                 200                 205
TGT TGT GAA AGA AGC AGT AGC AGT GAA TCT ACA GGG ACG CCA TCG AAT    974
```

```
Cys Cys Glu Arg Ser Ser Ser Ser Glu Ser Thr Gly Thr Pro Ser Asn
                210                 215                 220
CCG GAT CTT GAT GCT GGT GTA AGT GAA CAT TCA GGT GAT TGG TTG GAT   1022
Pro Asp Leu Asp Ala Gly Val Ser Glu His Ser Gly Asp Trp Leu Asp
            225                 230                 235
CAG GAT TCA GTT TCA GAT CAG TTT AGT GTA GAA TTT GAA GTT GAA TCT   1070
Gln Asp Ser Val Ser Asp Gln Phe Ser Val Glu Phe Glu Val Glu Ser
        240                 245                 250
CTC GAC TCA GAA GAT TAT AGC CTT AGT GAA GAA GGA CAA GAA CTC TCA   1118
Leu Asp Ser Glu Asp Tyr Ser Leu Ser Glu Glu Gly Gln Glu Leu Ser
    255                 260                 265
GAT GAA GAT GAT GAG GTA TAT CAA GTT ACT GTG TAT CAG GCA GGG GAG   1166
Asp Glu Asp Asp Glu Val Tyr Gln Val Thr Val Tyr Gln Ala Gly Glu
270                 275                 280                 285
AGT GAT ACA GAT TCA TTT GAA GAA GAT CCT GAA ATT TCC TTA GCT GAC   1214
Ser Asp Thr Asp Ser Phe Glu Glu Asp Pro Glu Ile Ser Leu Ala Asp
                290                 295                 300
TAT TGG AAA TGC ACT TCA TGC AAT GAA ATG AAT CCC CCC CTT CCA TCA   1262
Tyr Trp Lys Cys Thr Ser Cys Asn Glu Met Asn Pro Pro Leu Pro Ser
            305                 310                 315
CAT TGC AAC AGA TGT TGG GCC CTT CGT GAG AAT TGG CTT CCT GAA GAT   1310
His Cys Asn Arg Cys Trp Ala Leu Arg Glu Asn Trp Leu Pro Glu Asp
        320                 325                 330
AAA GGG AAA GAT AAA GGG GAA ATC TCT GAG AAA GCC AAA CTG GAA AAC   1358
Lys Gly Lys Asp Lys Gly Glu Ile Ser Glu Lys Ala Lys Leu Glu Asn
    335                 340                 345
TCA ACA CAA GCT GAA GAG GGC TTT GAT GTT CCT GAT TGT AAA AAA ACT   1406
Ser Thr Gln Ala Glu Glu Gly Phe Asp Val Pro Asp Cys Lys Lys Thr
350                 355                 360                 365
```

ATA GTG AAT GAT TCC AGA GAG TCA TGT GTT GAG GAA AAT GAT GAT AAA 1454
Ile Val Asn Asp Ser Arg Glu Ser Cys Val Glu Glu Asn Asp Asp Lys
370 375 380
ATT ACA CAA GCT TCA CAA TCA CAA GAA AGT GAA GAC TAT TCT CAG CCA 1502
Ile Thr Gln Ala Ser Gln Ser Gln Glu Ser Glu Asp Tyr Ser Gln Pro
385 390 395
TCA ACT TCT AGT AGC ATT ATT TAT AGC AGC CAA GAA GAT GTG AAA GAG 1550
Ser Thr Ser Ser Ser Ile Ile Tyr Ser Ser Gln Glu Asp Val Lys Glu
400 405 410
TTT GAA AGG GAA GAA ACC CAA GAC AAA GAA GAG AGT GTG GAA TCT AGT 1598
Phe Glu Arg Glu Glu Thr Gln Asp Lys Glu Glu Ser Val Glu Ser Ser
415 420 425
TTG CCC CTT AAT GCC ATT GAA CCT TGT GTG ATT TGT CAA GGT CGA CCT 1646
Leu Pro Leu Asn Ala Ile Glu Pro Cys Val Ile Cys Gln Gly Arg Pro
430 435 440 445
AAA AAT GGT TGC ATT GTC CAT GGC AAA ACA GGA CAT CTT ATG GCC TGC 1694
Lys Asn Gly Cys Ile Val His Gly Lys Thr Gly His Leu Met Ala Cys
450 455 460
TTT ACA TGT GCA AAG AAG CTA AAG AAA AGG AAT AAG CCC TGC CCA GTA 1742
Phe Thr Cys Ala Lys Lys Leu Lys Lys Arg Asn Lys Pro Cys Pro Val
465 470 475
TGT AGA CAA CCA ATT CAA ATG ATT GTG CTA ACT TAT TTC CCC 1784
Cys Arg Gln Pro Ile Gln Met Ile Val Leu Thr Tyr Phe Pro
480 485 490
TAGTTGACCT GTCTATAAGA GAATTATATA TTTCTAACTA TATAACCCTA GGAATTTAGA 1844
CAACCTGAAA TTTATTCACA TATATCAAAG TGAGAAAATG CCTCAATTCA CATAGATTTC 1904
TTCTCTTTAG TATAATTGAC CTACTTTGGT AGTGGAATAG TGAATACTTA CTATAATTTG 1964
ACTTGAATAT GTAGCTCATC CTTTACACCA ACTCCTAATT TTAAATAATT TCTACTCTGT 2024
CTTAAATGAG AAGTACTTGG TTTTTTTTTT CTTAAATATG TATATGACAT TTAAATGTAA 2084

CTTATTATTT TTTTTGAGAC CGAGTCTTGC TCTGTTACCC AGGCTGGAGT GCAGTGGGTG 2144

ATCTTGGCTC ACTGCAAGCT CTGCCCTCCC CGGGTTCGCA CCATTCTCCT GCCTCAGCCT 2204

CCCAATTAGC TTGGCCTACA GTCATCTGCC ACCACACCTG GCTAATTTTT TGTACTTTTA 2264

GTAGAGACAG GGTTTCACCG TGTTAGCCAG GATGGTCTCG ATCTCCTGAC CTCGTGATCC 2324

GCCCACCTCG GCCTCCCAAA GTGCTGGGAT TACAGGCATG AGCCACCG 2372

(2) 配列情報SEQ ID NO:3:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ:491アミノ酸

(B) 型:アミノ酸

(D) トポロジー:直線状

(ii) 配列の種類:タンパク質

(xi) 配列:SEQ ID NO:3:

Met Cys Asn Thr Asn Met Ser Val Pro Thr Asp Gly Ala Val Thr Thr
1 5 10 15

Ser Gln Ile Pro Ala Ser Glu Gln Glu Thr Leu Val Arg Pro Lys Pro
20 25 30

Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Ser Val Gly Ala Gln Lys Asp Thr Tyr
35 40 45

Thr Met Lys Glu Val Leu Phe Tyr Leu Gly Gln Tyr Ile Met Thr Lys
50 55 60

Arg Leu Tyr Asp Glu Lys Gln Gln His Ile Val Tyr Cys Ser Asn Asp
65 70 75 80

Leu Leu Gly Asp Leu Phe Gly Val Pro Ser Phe Ser Val Lys Glu His
85 90 95

Arg Lys Ile Tyr Thr Met Ile Tyr Arg Asn Leu Val Val Val Asn Gln
100 105 110

Gln Glu Ser Ser Asp Ser Gly Thr Ser Val Ser Glu Asn Arg Cys His
115 120 125

Leu Glu Gly Gly Ser Asp Gln Lys Asp Leu Val Gln Glu Leu Gln Glu

130 135 140

Glu Lys Pro Ser Ser Ser His Leu Val Ser Arg Pro Ser Thr Ser Ser
145 150 155 160

Arg Arg Arg Ala Ile Ser Glu Thr Glu Glu Asn Ser Asp Glu Leu Ser
165 170 175

Gly Glu Arg Gln Arg Lys Arg His Lys Ser Asp Ser Ile Ser Leu Ser
180 185 190

Phe Asp Glu Ser Leu Ala Leu Cys Val Ile Arg Glu Ile Cys Cys Glu
195 200 205

Arg Ser Ser Ser Ser Glu Ser Thr Gly Thr Pro Ser Asn Pro Asp Leu
210 215 220

Asp Ala Gly Val Ser Glu His Ser Gly Asp Trp Leu Asp Gln Asp Ser
225 230 235 240

Val Ser Asp Gln Phe Ser Val Glu Phe Glu Val Glu Ser Leu Asp Ser
245 250 255

Glu Asp Tyr Ser Leu Ser Glu Glu Gly Gln Glu Leu Ser Asp Glu Asp
260 265 270

Asp Glu Val Tyr Gln Val Thr Val Tyr Gln Ala Gly Glu Ser Asp Thr
275 280 285

Asp Ser Phe Glu Glu Asp Pro Glu Ile Ser Leu Ala Asp Tyr Trp Lys
290 295 300

Cys Thr Ser Cys Asn Glu Met Asn Pro Pro Leu Pro Ser His Cys Asn
305 310 315 320

Arg Cys Trp Ala Leu Arg Glu Asn Trp Leu Pro Glu Asp Lys Gly Lys
325 330 335

Asp Lys Gly Glu Ile Ser Glu Lys Ala Lys Leu Glu Asn Ser Thr Gln
340 345 350

Ala Glu Glu Gly Phe Asp Val Pro Asp Cys Lys Lys Thr Ile Val Asn
355 360 365

Asp Ser Arg Glu Ser Cys Val Glu Glu Asn Asp Asp Lys Ile Thr Gln
370 375 380
Ala Ser Gln Ser Gln Glu Ser Glu Asp Tyr Ser Gln Pro Ser Thr Ser
385 390 395 400
Ser Ser Ile Ile Tyr Ser Ser Gln Glu Asp Val Lys Glu Phe Glu Arg
405 410 415
Glu Glu Thr Gln Asp Lys Glu Glu Ser Val Glu Ser Ser Leu Pro Leu
420 425 430
Asn Ala Ile Glu Pro Cys Val Ile Cys Gln Gly Arg Pro Lys Asn Gly
435 440 445
Cys Ile Val His Gly Lys Thr Gly His Leu Met Ala Cys Phe Thr Cys
450 455 460
Ala Lys Lys Leu Lys Lys Arg Asn Lys Pro Cys Pro Val Cys Arg Gln
465 470 475 480
Pro Ile Gln Met Ile Val Leu Thr Tyr Phe Pro
485 490

(2) 配列情報SEQ ID NO:4:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:1710塩基対
(B) 型:核酸
(C) 鎖の数:二本鎖
(D) トポロジー:直線状
(ii) 配列の種類:cDNA
(iii) ハイポセティカル:NO
(iv) アンチセンス:NO
(vi) 起源:
(A) 生物名：Mus musculus
(ix) 特徴:
(A) NAME/KEY:CDS
(B) 存在位置:202..1668
(xi) 配列:SEQ ID NO:4:

GAGGAGCCGC CGCCTTCTCG TCGCTCGAGC TCTGGACGAC CATGGTCGCT CAGGCCCCGT 60

CCGCGGGGCC TCCGCGCTCC CCGTGAAGGG TCGGAAGATG CGCGGGAAGT AGCAGCCGTC 120

TGCTGGGCGA GCGGGAGACC GACCGGACAC CCCTGGGGGA CCCTCTCGGA TCACCGCGCT 180

TCTCCTGCGG CCTCCAGGCC A ATG TGC AAT ACC AAC ATG TCT GTG TCT ACC

231

Met Cys Asn Thr Asn Met Ser Val Ser Thr

1 5 10

GAG GGT GCT GCA AGC ACC TCA CAG ATT CCA GCT TCG GAA CAA GAG ACT 279

Glu Gly Ala Ala Ser Thr Ser Gln Ile Pro Ala Ser Glu Gln Glu Thr

15 20 25

CTG GTT AGA CCA AAA CCA TTG CTT TTG AAG TTG TTA AAG TCC GTT GGA 327

Leu Val Arg Pro Lys Pro Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Ser Val Gly

30 35 40

GCG CAA AAC GAC ACT TAC ACT ATG AAA GAG ATT ATA TTT TAT ATT GGC 375

Ala Gln Asn Asp Thr Tyr Thr Met Lys Glu Ile Ile Phe Tyr Ile Gly

45 50 55

CAG TAT ATT ATG ACT AAG AGG TTA TAT GAC GAG AAG CAG CAG CAC ATT 423

Gln Tyr Ile Met Thr Lys Arg Leu Tyr Asp Glu Lys Gln Gln His Ile

60 65 70

GTG TAT TGT TCA AAT GAT CTC CTA GGA GAT GTG TTT GGA GTC CCG AGT 471

Val Tyr Cys Ser Asn Asp Leu Leu Gly Asp Val Phe Gly Val Pro Ser

75 80 85 90

TTC TCT GTG AAG GAG CAC AGG AAA ATA TAT GCA ATG ATC TAC AGA AAT 519

Phe Ser Val Lys Glu His Arg Lys Ile Tyr Ala Met Ile Tyr Arg Asn
95 100 105

TTA GTG GCT GTA AGT CAG CAA GAC TCT GGC ACA TCG CTG AGT GAG AGC 567

Leu Val Ala Val Ser Gln Gln Asp Ser Gly Thr Ser Leu Ser Glu Ser
110 115 120

AGA CGT CAG CCT GAA GGT GGG AGT GAT CTG AAG GAT CCT TTG CAA GCG 615

Arg Arg Gln Pro Glu Gly Gly Ser Asp Leu Lys Asp Pro Leu Gln Ala
125 130 135

CCA CCA GAA GAG AAA CCT TCA TCT TCT GAT TTA ATT TCT AGA CTG TCT 663

Pro Pro Glu Glu Lys Pro Ser Ser Ser Asp Leu Ile Ser Arg Leu Ser
140 145 150

ACC TCA TCT AGA AGG AGA TCC ATT AGT GAG ACA GAA GAG AAC ACA GAT 711

Thr Ser Ser Arg Arg Arg Ser Ile Ser Glu Thr Glu Glu Asn Thr Asp
155 160 165 170

GAG CTA CCT GGG GAG CGG CAC CGG AAG CGC CGC AGG TCC CTG TCC TTT 759

Glu Leu Pro Gly Glu Arg His Arg Lys Arg Arg Arg Ser Leu Ser Phe
175 180 185

GAT CCG AGC CTG GGT CTG TGT GAG CTG AGG GAG ATG TGC AGC GGC GGC 807

Asp Pro Ser Leu Gly Leu Cys Glu Leu Arg Glu Met Cys Ser Gly Gly
190 195 200

ACG AGC AGC AGT AGC AGC AGC AGC AGC GAG TCC ACA GAG ACG CCC TCG 855

```
Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Ser Thr Glu Thr Pro Ser
        205                 210                 215
CAT CAG GAT CTT GAC GAT GGC GTA AGT GAG CAT TCT GGT GAT TGC CTG   903

His Gln Asp Leu Asp Asp Gly Val Ser Glu His Ser Gly Asp Cys Leu
    220                 225                 230
GAT CAG GAT TCA GTT TCT GAT CAG TTT AGC GTG GAA TTT GAA GTT GAG   951

Asp Gln Asp Ser Val Ser Asp Gln Phe Ser Val Glu Phe Glu Val Glu
235                 240                 245                 250
TCT CTG GAC TCG GAA GAT TAC AGC CTG AGT GAC GAA GGG CAC GAG CTC   999

Ser Leu Asp Ser Glu Asp Tyr Ser Leu Ser Asp Glu Gly His Glu Leu
                255                 260                 265
TCA GAT GAG GAT GAT GAG GTC TAT CGG GTC ACA GTC TAT CAG ACA GGA  1047

Ser Asp Glu Asp Asp Glu Val Tyr Arg Val Thr Val Tyr Gln Thr Gly
            270                 275                 280
GAA AGC GAT ACA GAC TCT TTT GAA GGA GAT CCT GAG ATT TCC TTA GCT  1095

Glu Ser Asp Thr Asp Ser Phe Glu Gly Asp Pro Glu Ile Ser Leu Ala
        285                 290                 295
GAC TAT TGG AAG TGT ACC TCA TGC AAT GAA ATG AAT CCT CCC CTT CCA  1143

Asp Tyr Trp Lys Cys Thr Ser Cys Asn Glu Met Asn Pro Pro Leu Pro
    300                 305                 310
TCA CAC TGC AAA AGA TGC TGG ACC CTT CGT GAG AAC TGG CTT CCA GAC  1191
```

Ser His Cys Lys Arg Cys Trp Thr Leu Arg Glu Asn Trp Leu Pro Asp
315 320 325 330
GAT AAG GGG AAA GAT AAA GTG GAA ATC TCT GAA AAA GCC AAA CTG GAA 1239

Asp Lys Gly Lys Asp Lys Val Glu Ile Ser Glu Lys Ala Lys Leu Glu
335 340 345
AAC TCA GCT CAG GCA GAA GAA GGC TTG GAT GTG CCT GAT GGC AAA AAG 1287

Asn Ser Ala Gln Ala Glu Glu Gly Leu Asp Val Pro Asp Gly Lys Lys
350 355 360
CTG ACA GAG AAT GAT GCT AAA GAG CCA TGT GCT GAG GAG GAC AGC GAG 1335

Leu Thr Glu Asn Asp Ala Lys Glu Pro Cys Ala Glu Glu Asp Ser Glu
365 370 375
GAG AAG GCC GAA CAG ACG CCC CTG TCC CAG GAG AGT GAC GAC TAT TCC 1383

Glu Lys Ala Glu Gln Thr Pro Leu Ser Gln Glu Ser Asp Asp Tyr Ser
380 385 390
CAA CCA TCG ACT TCC AGC AGC ATT GTT TAT AGC AGC CAA GAA AGC GTG 1431

Gln Pro Ser Thr Ser Ser Ser Ile Val Tyr Ser Ser Gln Glu Ser Val
395 400 405 410
AAA GAG TTG AAG GAG GAA ACG CAG CAC AAA GAC GAG AGT GTG GAA TCT 1479

Lys Glu Leu Lys Glu Glu Thr Gln His Lys Asp Glu Ser Val Glu Ser
415 420 425
AGC TTC TCC CTG AAT GCC ATC GAA CCA TGT GTG ATC TGC CAG GGG CGG 1527

Ser Phe Ser Leu Asn Ala Ile Glu Pro Cys Val Ile Cys Gln Gly Arg

430 435 440

CCT AAA AAT GGC TGC ATT GTT CAC GGC AAG ACT GGA CAC CTC ATG TCA 1575

Pro Lys Asn Gly Cys Ile Val His Gly Lys Thr Gly His Leu Met Ser

445 450 455

TGT TTC ACG TGT GCA AAG AAG CTA AAA AAA AGA AAC AAG CCC TGC CCA 1623

Cys Phe Thr Cys Ala Lys Lys Leu Lys Lys Arg Asn Lys Pro Cys Pro

460 465 470

GTG TGC AGA CAG CCA ATC CAA ATG ATT GTG CTA AGT TAC TTC AAC 1668

Val Cys Arg Gln Pro Ile Gln Met Ile Val Leu Ser Tyr Phe Asn

475 480 485

TAGCTGACCT GCTCACAAAA ATAGAATTTT ATATTTCTAA CT 1710

(2) 配列情報SEQ ID NO:5:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ:489アミノ酸

(B) 型:アミノ酸

(D) トポロジー:直線状

(ii) 配列の種類:タンパク質

(xi) 配列:SEQ ID NO:5:

Met Cys Asn Thr Asn Met Ser Val Ser Thr Glu Gly Ala Ala Ser Thr

1 5 10 15

Ser Gln Ile Pro Ala Ser Glu Gln Glu Thr Leu Val Arg Pro Lys Pro

20 25 30

Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Ser Val Gly Ala Gln Asn Asp Thr Tyr

35 40 45

Thr Met Lys Glu Ile Ile Phe Tyr Ile Gly Gln Tyr Ile Met Thr Lys

50 55 60

Arg Leu Tyr Asp Glu Lys Gln Gln His Ile Val Tyr Cys Ser Asn Asp
65 70 75 80

Leu Leu Gly Asp Val Phe Gly Val Pro Ser Phe Ser Val Lys Glu His
85 90 95

Arg Lys Ile Tyr Ala Met Ile Tyr Arg Asn Leu Val Ala Val Ser Gln
100 105 110

Gln Asp Ser Gly Thr Ser Leu Ser Glu Ser Arg Arg Gln Pro Glu Gly
115 120 125

Gly Ser Asp Leu Lys Asp Pro Leu Gln Ala Pro Pro Glu Glu Lys Pro
130 135 140

Ser Ser Ser Asp Leu Ile Ser Arg Leu Ser Thr Ser Ser Arg Arg Arg
145 150 155 160

Ser Ile Ser Glu Thr Glu Glu Asn Thr Asp Glu Leu Pro Gly Glu Arg
165 170 175

His Arg Lys Arg Arg Arg Ser Leu Ser Phe Asp Pro Ser Leu Gly Leu
180 185 190

Cys Glu Leu Arg Glu Met Cys Ser Gly Gly Thr Ser Ser Ser Ser Ser
195 200 205

Ser Ser Ser Glu Ser Thr Glu Thr Pro Ser His Gln Asp Leu Asp Asp
210 215 220

Gly Val Ser Glu His Ser Gly Asp Cys Leu Asp Gln Asp Ser Val Ser
225 230 235 240

Asp Gln Phe Ser Val Glu Phe Glu Val Glu Ser Leu Asp Ser Glu Asp
245 250 255

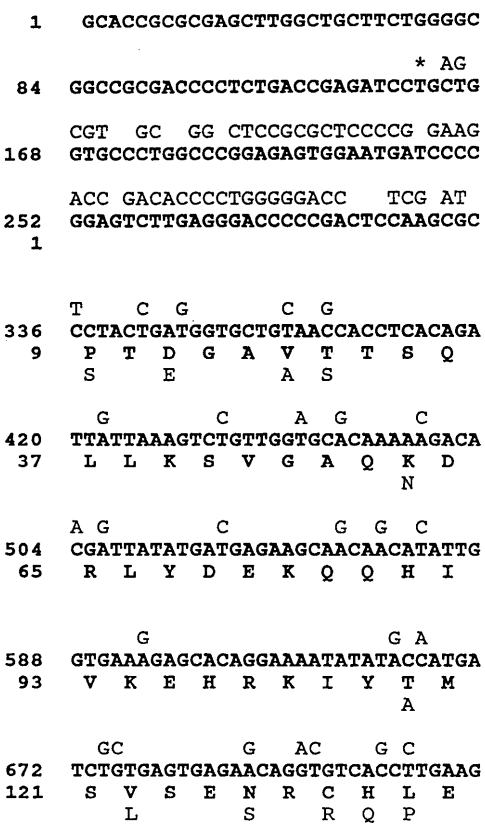
Tyr Ser Leu Ser Asp Glu Gly His Glu Leu Ser Asp Glu Asp Asp Glu
260 265 270

Val Tyr Arg Val Thr Val Tyr Gln Thr Gly Glu Ser Asp Thr Asp Ser
275 280 285

Phe Glu Gly Asp Pro Glu Ile Ser Leu Ala Asp Tyr Trp Lys Cys Thr
290 295 300
Ser Cys Asn Glu Met Asn Pro Pro Leu Pro Ser His Cys Lys Arg Cys
305 310 315 320
Trp Thr Leu Arg Glu Asn Trp Leu Pro Asp Asp Lys Gly Lys Asp Lys
325 330 335
Val Glu Ile Ser Glu Lys Ala Lys Leu Glu Asn Ser Ala Gln Ala Glu
340 345 350

【図１Ａ（１）】

FIG. IA(1)



【図１Ａ（２）】

FIG. IA(2)



【図１Ａ（３）】

FIG. 1A(3)

```
AGCCGAGCCCGAGGGGC        83    ヒ ト  nt

CATG  CGCTCA G  C              マウス  nt
GTGCGTACGAGCGCCCA       167    ヒ ト  nt

GGGCGAGC  GAGACC               マウス  nt
CCCGTGAAGGAAACTGG       251    ヒ ト  nt

                G              マウス  nt
ATACCAACATGTCTGTA       335    ヒ ト  nt
N  T  N  M  S  V          8    ヒ ト  a.a.
                               マウス  a.a.

 A                             マウス  nt
AGCCATTGCTTTTGAAG       419    ヒ ト  nt
K  P  L  L  L  K         36    ヒ ト  a.a.
                               マウス  a.a.

                G              マウス  nt
AGTATATTATGACTAAA       503    ヒ ト  nt
Q  Y  I  M  T  K         64    ヒ ト  a.a.
                               マウス  a.a.

 A  C  G  T                    マウス  nt
GCGTGCCAAGCTTCTCT       587    ヒ ト  nt
G  V  P  S  F  S         92    ヒ ト  a.a.
                               マウス  a.a.

-----     T  C                マウス  nt
CATCGGACTCAGGTACA       671    ヒ ト  nt
S  S  D  S  G  T         120    ヒ ト  a.a.
-  -                           マウス  a.a.

CA                             マウス  nt
AGGAAGAGAAACCTTCA       755    ヒ ト  nt
Q  E  E  K  P  S         148    ヒ ト  a.a.
P                              マウス  a.a.
```

【図１Ｂ（１）】

FIG. 1B(1)

```
          TG    AA          TG
756  TCTTCACATTTGGTTTCTAGACCATCT
149   S  S  H  L  V  S  R  P  S
         D     I     L

       G  G  G  CC G  G     G  GG
840  GGTGAACGACAAAGAAAACGCCACAAA
177   G  E  R  Q  R  K  R  H  K
            H           R  R

       G  CAGCGGCGGCACGAGCA CAGT
924  ATATGT---------------TGTGAA
205   I  C  -  -  -  -  -  C  E
      M     S  G  G  T  S  S  S

            G     T        CC
993  GTAAGTGAACATTCAGGTGATTGGTTG
228   V  S  E  H  S  G  D  W  L
                           C

       G        C     G     C
1077 TCAGAAGATTATAGCCTTAGTGAAGAA
256   S  E  D  Y  S  L  S  E  E
                           D

       A  A  C        C  T
1161 GGGGAGAGTGATACAGATTCATTTGAA
284   G  E  S  D  T  D  S  F  E


         T                 C     A
1245 AATCCCCCCCTTCCATCACATTGCAAC
312   N  P  P  L  P  S  H  C  N
                              K

            A
1329 GAAATCTCTGAGAAAGCCAAACTGGAA
340   E  I  S  E  K  A  K  L  E
```

【図１Ｂ（２）】

FIG. 1B(2)

```
                  T C                 G
ACCTCATCTAGAAGGAGAGCAATTAGTGAGACAGAAGAA
 T  S  S  R  R  R  A  I  S  E  T  E  E
                  S

------------      G        CCG       G
TCTGATAGTATTTCCCTTTCCTTTGATGAAAGCCTGGCT
 S  D  S  I  S  L  S  F  D  E  S  L  A
 -  -  -  -                 P        G

  C     C     C  G  C    A      C   C
AGAAGCAGTAGCAGTGAATCTACAGGGACGCCATCGAAT
 R  S  S  S  S  E  S  T  G  T  P  S  N
 S                    E           H

                  T           C  G
GATCAGGATTCAGTTTCAGATCAGTTTAGTGTAGAATTT
 D  Q  D  S  V  S  D  Q  F  S  V  E  F

  G  C  G           G           C    GG
GGACAAGAACTCTCAGATGAAGATGATGAGGTATATCAA
 G  Q  E  L  S  D  E  D  D  E  V  Y  Q
    H                                R

 G        G                        G  T
GAAGATCCTGAAATTTCCTTAGCTGACTATTGGAAATGC
 E  D  P  E  I  S  L  A  D  Y  W  K  C
 G

    C  A           C        A  C
AGATGTTGGGCCCTTCGTGAGAATTGGCTTCCTGAAGAT
 R  C  W  A  L  R  E  N  W  L  P  E  D
       T                       D

     G  T  G  A     A     G     G
AACTCAACACAAGCTGAAGAGGGCTTTGATGTTCCTGAT
 N  S  T  Q  A  E  E  G  F  D  V  P  D
       A              L
```

【図１Ｂ（３）】

FIG. 1B(3)

```
  CA       GC  C                 マウス  nt
AATTCAGATGAATTATCT       839    ヒ ト  nt
 N  S  D  E  L  S        176    ヒ ト  a.a.
    T        P                  マウス  a.a.

       AGC G                   マウス  nt
CTGTGTGTAATAAGGGAG       923    ヒ ト  nt
 L  C  V  I  R  E        204    ヒ ト  a.a.
       E  L                     マウス  a.a.

 A        C A  C                マウス  nt
CCGGATCTTGATGCTGGT       992    ヒ ト  nt
 P  D  L  D  A  G        227    ヒ ト  a.a.
 Q        D                     マウス  a.a.

       G     G                 マウス  nt
GAAGTTGAATCTCTCGAC      1076    ヒ ト  nt
 E  V  E  S  L  D        255    ヒ ト  a.a.
                                マウス  a.a.

  C  A  C      A                マウス  nt
GTTACTGTGTATCAGGCA      1160    ヒ ト  nt
 V  T  V  Y  Q  A        283    ヒ ト  a.a.
             T                  マウス  a.a.

 C                              マウス  nt
ACTTCATGCAATGAAATG      1244    ヒ ト  nt
 T  S  C  N  E  M        311    ヒ ト  a.a.
                                マウス  a.a.

 G           T                  マウス  nt
AAAGGGAAAGATAAAGGG      1228    ヒ ト  nt
 K  G  K  D  K  G        339    ヒ ト  a.a.
             V                  マウス  a.a.

G C     GCTG C  A              マウス  nt
TGTAAAAAAAACTATAGTG     1412    ヒ ト  nt
 C  K  K  T  I  V        367    ヒ ト  a.a.
 G        L  T  E               マウス  a.a.
```

【図１Ｃ（１）】

FIG. IC(1)

```
          G T A    C       C       G
1413  AATGATTCCAGAGAGTCATGTGTTGAGGAA
 368   N  D  S  R  E  S  C  V  E  E
          A  K     P     A

        C  A     G     C  C       G
1494  TCTCAGCCATCAACTTCTAGTAGCATTATT
 395   S  Q  P  S  T  S  S  S  I  I
                                   V

        C                    C  CT    G
1578  GAAGAGAGTGTGGAATCTAGTTTGCCCCTT
 423   E  E  S  V  E  S  S  L  P  L
       D                       F  S

        T  C     G  T     C  C   T A
1662  GTCCATGGCAAAACAGGACATCTTATGGCC
 451   V  H  G  K  T  G  H  L  M  A
                                   S

           G     C                   G
1746  AGACAACCAATTCAAATGATTGTGCTAACT
 479   R  Q  P  I  Q  M  I  V  L  T
                                   S

1830  TAACCCTAGGAATTTAGACAACCTGAAATT
1914  TTAGTATAATTGACCTACTTTGGTAGTGGA
1998  ACTCCTAATTTTAAATAATTTCTACTCTGT
2082  ATGTAACTTATTATTTTTTTTGAGACCGAG
2166  CTCTGCCCTCCCCGGGTTCGCACCATTCTC
2250  TAATTTTTTGTACTTTTAGTAGAGACAGGG
2334  CTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGG
```

【図１Ｃ（２）】

FIG. IC(2)

```
G CAGC  G  G  GGCCGA   GA GC C TG  C
AAT---GATGATAAAATTACACAAGCTTCACAATCAC
 N  -  D  D  K  I  T  Q  A  S  Q  S
 D  S  E  E     A  E     T  P  L

                  AGC            G--- A
TATAGCAGCCAAGAAGATGTGAAAGAGTTTGAAAGGG
 Y  S  S  Q  E  D  V  K  E  F  E  R
                  S           L  -  K

          C     A         C  C  G  G  G
AATGCCATTGAACCTTGTGTGATTTGTCAAGGTCGAC
 N  A  I  E  P  C  V  I  C  Q  G  R

  T  C  G                    A     A  C
TGCTTTACATGTGCAAAGAAGCTAAAGAAAAGGAATA
 C  F  T  C  A  K  K  L  K  K  R  N

  C   AA    C        CTCA A A  T
TATTTCCCCTAGTTGACCTG---TCTATAAGAGAATT
 Y  F  P
       N

TATTCACATATATCAAAGTGAGAAAATGCCTCAATTC
ATAGTGAATACTTACTATAATTTGACTTGAATATGTA
CTTAAATGAGAAGTACTTGGTTTTTTTTTTCTTAAAT
TCTTGCTCTGTTACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGGTGA
CTGCCTCAGCCTCCCAATTAGCTTGGCCTACAGTCAT
TTTCACCGTGTTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGA
CATGAGCCACCG
```

【図１Ｃ（３）】

FIG. IC(3)

```
 G  G     C                        マウス  nt
AAGAAAGTGAAGACTAT     1493        ヒ ト  nt
Q  E  S  E  D  Y      394         ヒ ト  a.a.
         D                        マウス  a.a.

 G     G  GC                      マウス  nt
AAGAAACCCAAGACAAA     1577        ヒ ト  nt
E  E  T  Q  D  K      422         ヒ ト  a.a.
            H                     マウス  a.a.

            C                     マウス  nt
CTAAAAATGGTTGCATT     1661        ヒ ト  nt
P  K  N  G  C  I      450         ヒ ト  a.a.
                                  マウス  a.a.

               G  C               マウス  nt
AGCCCTGCCCAGTATGT     1745        ヒ ト  nt
K  P  C  P  V  C      478         ヒ ト  a.a.
                                  マウス  a.a.

T              *                  マウス  nt
ATATATTTCTAACTATA     1829        ヒ ト  nt
                      491         ヒ ト  a.a.
                                  マウス  a.a.

ACATAGATTTCTTCTCT     1913        ヒ ト  nt
GCTCATCCTTTACACCA     1997        ヒ ト  nt
ATGTATATGACATTTAA     2081        ヒ ト  nt
TCTTGGCTCACTGCAAG     2165        ヒ ト  nt
CTGCCACCACACCTGGC     2249        ヒ ト  nt
CCTCGTGATCCGCCCAC     2333        ヒ ト  nt
                      2372        ヒ ト  nt
```

【図２】



【図３】

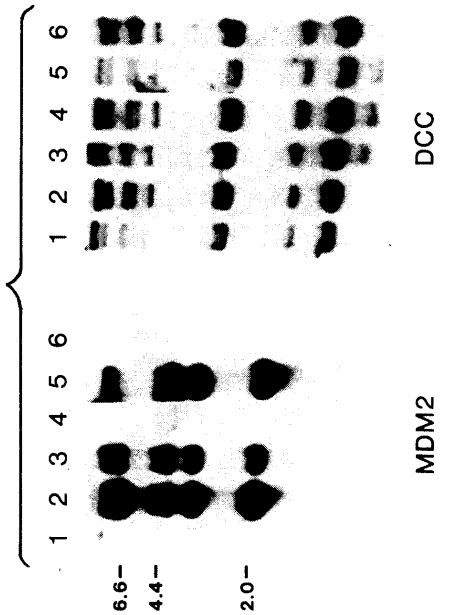


FIG. 3

【図４Ａ】

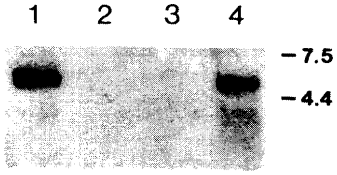


FIG. 4A

【図４Ｂ】

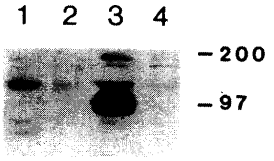


FIG. 4B

【図４Ｃ】

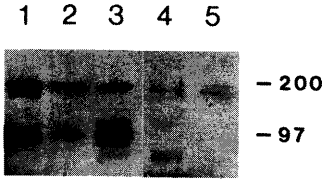


FIG. 4C

【図５】

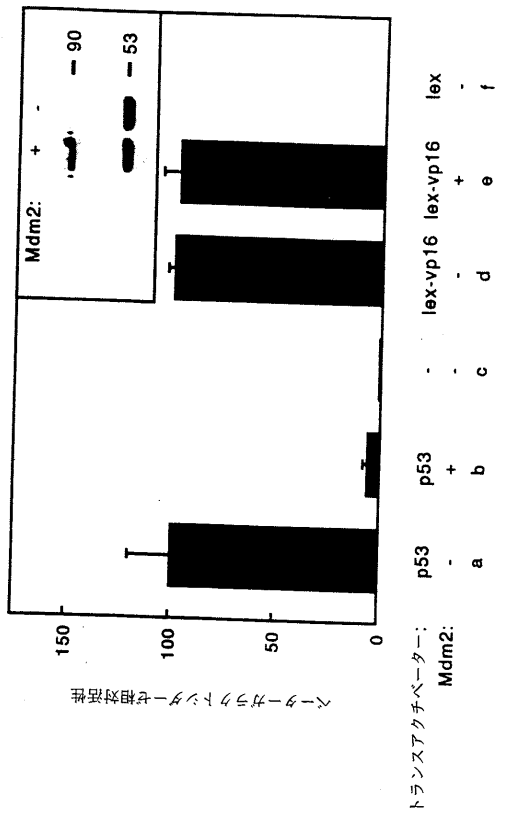


FIG. 5

【図６】

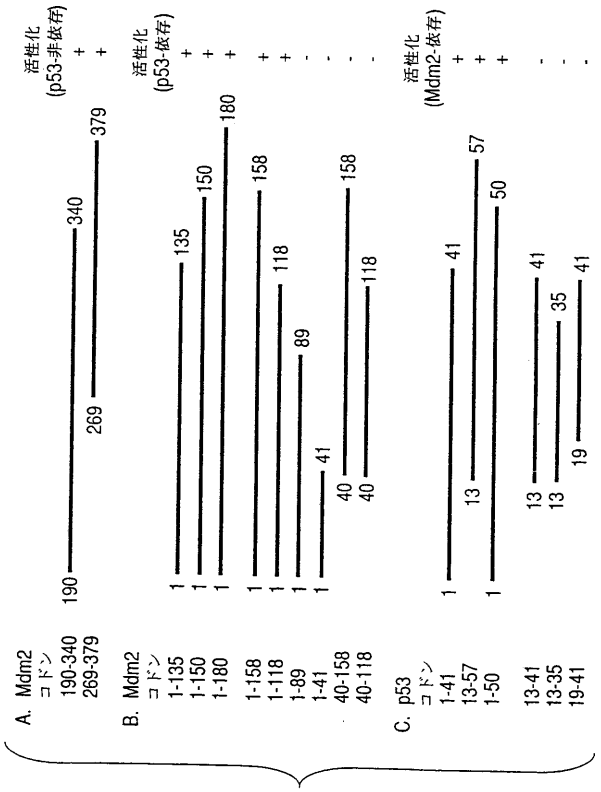


FIG. 6

【図７Ａ】

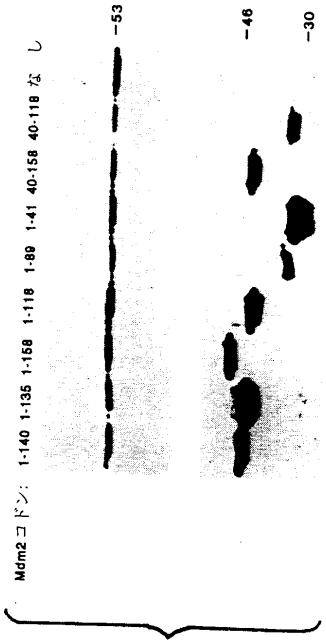


FIG. 7A

【図７Ｂ】

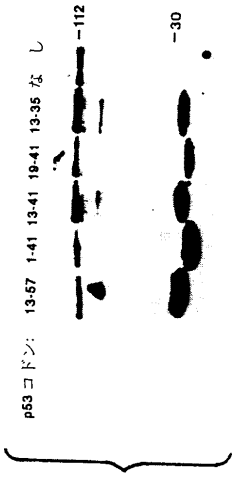
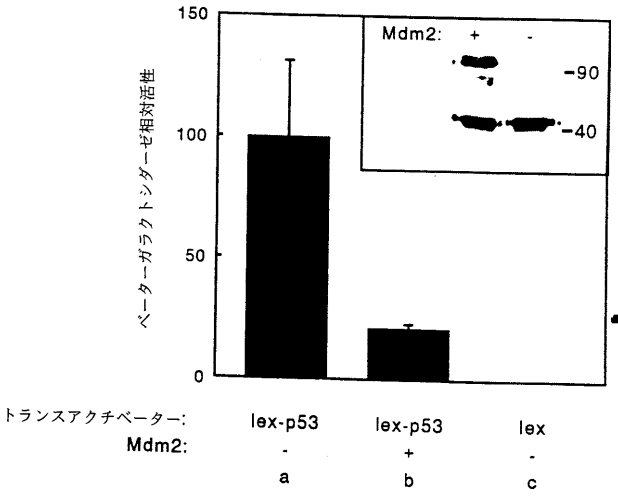


FIG. 7B

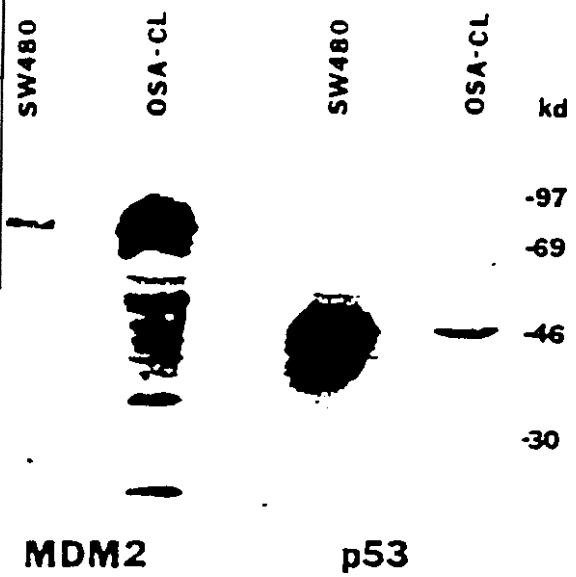
【図８】

FIG. 8

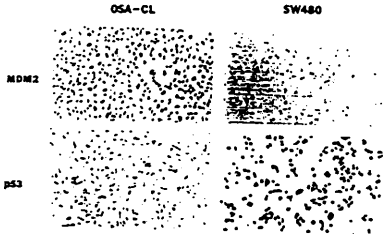


【図９】

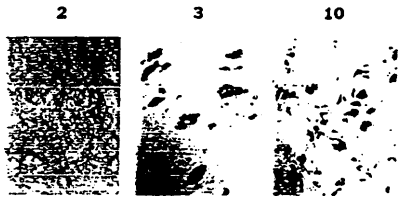
FIGURE 9



【図１０】
FIGURE 10



【図１１】
FIGURE 11



フロントページの続き

(72)発明者 バレル，マリリー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９，ケンブリッジ，ハンプシャー・ストリート １９８
(72)発明者 ヒル，デヴィッド・イー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１７４，アーリントン，リッジ・ストリート８５
(72)発明者 キンズラー，ケネス・ダブリュー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州２１２３４，バルティモア，ハルスティード・ロード １３４８
(72)発明者 ヴォーゲルシュタイン，バート
アメリカ合衆国マサチューセッツ州２１２０８，バルティモア，ブレトン・ウェイ ３７００

合議体
審判長 鵜飼 健
審判官 吉田 佳代子
審判官 鈴木 恵理子

(56)参考文献 EMBO. J. , １９９１, VOL. １０, NO. ６, P. １５６５－１５６９
NATURE, １９９２, JULY, VOL. ３５８, P. ８０－８３
MOL. CELL. BIOL. , １９８５, VOL. ５, NO. ７, P. １６０１－１６１０

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12Q1/18
C12N15/00
SCISEARCH/CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/ESBIOBASE/LIFESCI/WPIDS(STN)