

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4672092号
(P4672092)

(45) 発行日 平成23年4月20日 (2011.4.20)

(24) 登録日 平成23年1月28日 (2011.1.28)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 1

請求項の数 59 (全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-524007
 (86) (22) 出願日 平成9年11月20日 (1997.11.20)
 (65) 公表番号 特表2002-514060 (P2002-514060A)
 (43) 公表日 平成14年5月14日 (2002.5.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1997/021880
 (87) 国際公開番号 W01998/022589
 (87) 国際公開日 平成10年5月28日 (1998.5.28)
 審査請求日 平成16年11月19日 (2004.11.19)
 (31) 優先権主張番号 60/031,435
 (32) 優先日 平成8年11月20日 (1996.11.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 08/975,080
 (32) 優先日 平成9年11月20日 (1997.11.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者

イェール ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 コネティカット O 6 5
 1 O, ニュー ヘブン, カレッジ ストリ
 ート 4 5 1

(74) 代理人

弁理士 山本 秀策

(72) 発明者

アルティエリ, ダリオ シー,
 アメリカ合衆国 コネティカット O 6 5
 1 7, ハムデン, レザーボア ストリート
 1 O O

審査官 戸来 幸男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞アポトーシスを阻害するタンパク質であるサービビン (Survivin)、およびその調節

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞のアポトーシスを阻害する哺乳動物のサービビンタンパク質をコードする単離された核酸分子であって、該サービビンタンパク質は、一つの B I R および C O O H コイルドコイルを含み、そして、該核酸分子は、ストリンジェントな条件下で、配列番号 3 5 のヌクレオチド 2811 ~ 2921、3174 ~ 3283、5108 ~ 5225、および、11955 ~ 12041 からなる核酸分子の相補物にハイブリダイズする、核酸分子。

【請求項 2】

配列番号 3 4 に示されるアミノ酸配列をコードする、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 3】

配列番号 3 5 のヌクレオチド 2811 ~ 2921、3174 ~ 3283、5108 ~ 5225、および、11955 ~ 12041 を直接連結した連続する配列を含む、請求項 2 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 4】

配列番号 3 5 のヌクレオチド 2811 ~ 2921、3174 ~ 3283、5108 ~ 5225、および、11955 ~ 12044 を直接連結した連続する配列を含む、請求項 2 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 5】

配列番号 3 5 のヌクレオチド 2811 ~ 2921、3174 ~ 3283、5108 ~ 5225、および、11955 ~ 12041 を直接連結した連続する配列からなる、請求項 2 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 6】

配列番号 3 5 のヌクレオチド 2811 ~ 2921、3174 ~ 3283、5108 ~ 5225、および、11955 ~ 12044 を直接連結した連続する配列からなる、請求項 2 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 7】

配列番号 3 5 のサービピンオープンリーディングフレームを含む、請求項 2 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 8】

配列番号 3 5 のサービピンオープンリーディングフレームからなる、請求項 2 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 9】

前記核酸が、DNA または cDNA である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離された核酸分子。

10

【請求項 10】

少なくとも 1 つの発現制御エレメントに作動可能に連結された、請求項 9 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 11】

融合パートナーの核酸配列に同一フレームで融合された、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の単離された核酸分子。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の単離された核酸分子を含むベクター。

20

【請求項 13】

請求項 12 に記載のベクターを含むようにトランスフェクションされた、宿主細胞。

【請求項 14】

原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞からなる群より選択される、請求項 13 に記載の宿主細胞。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の宿主細胞を、サービピンタンパク質が発現する条件下で培養する工程を包含する、哺乳動物サービピンタンパク質を生産する方法。

【請求項 16】

前記単離された核酸分子が、ヒトサービピンタンパク質をコードする、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

30

【請求項 17】

請求項 1 または 2 に記載の核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 18】

請求項 1 または 2 に記載の核酸分子によってコードされるアミノ酸配列からなる、請求項 17 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 19】

哺乳動物ポリペプチドである、請求項 17 または請求項 18 に記載の単離されたポリペプチド。

40

【請求項 20】

ヒトポリペプチドである、請求項 19 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 21】

配列 EGWEPDDDP IEEHKKHSSGC からなるポリペプチドまたはその保存的に置換されたホモログである、請求項 18 に記載のポリペプチドのフラグメント。

【請求項 22】

請求項 17 または請求項 18 に記載のポリペプチドを含む、融合タンパク質。

【請求項 23】

IAP タンパク質の C 末端 RING フィンガーをさらに含む、請求項 22 に記載の融合タンパク質。

【請求項 24】

50

配列番号 34 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸残基の少なくとも 1 残基がPro²⁶、Leu⁶⁴、Trp⁶⁷、Pro⁷³、および、Cys⁸⁴からなる群から選択されるアミノ酸で置換されているアミノ酸配列を含む、低下したアポトーシス阻害活性を示すサービピンの変異体である、変異ポリペプチド。

【請求項 25】

前記少なくとも 1 残基が Ala で置換される、請求項 24 に記載の変異ポリペプチド。

【請求項 26】

請求項 17 ~ 25 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたはタンパク質を含む、組成物。

【請求項 27】

薬学的組成物であり、さらに、キャリアを含む、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

免疫原性組成物である、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 29】

請求項 17 ~ 25 のいずれか一項に記載のポリペプチドに結合する、単離された抗体または抗体フラグメント。

【請求項 30】

ポリクローナル抗体である、請求項 29 に記載の単離された抗体。

【請求項 31】

モノクローナル抗体である、請求項 29 に記載の単離された抗体。

【請求項 32】

ヒト化モノクローナル抗体である、請求項 31 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 33】

配列 APTLPPAWQPFLKDHRI からなるポリペプチドに結合する、請求項 29 に記載の単離された抗体。

【請求項 34】

配列 APTLPPAWQPFLKDHRI からなるポリペプチドを用いて動物を免疫することによって産生される、ヒトサービピンに結合する、単離された抗体。

【請求項 35】

配列 APTLPPAWQPFLKDHRI からなるポリペプチドを用いて動物を免疫することによって産生される、単離された抗体。

【請求項 36】

Fab、Fab'、および、F(ab')₂ からなる群から選択される、請求項 29 に記載の抗体のフラグメント。

【請求項 37】

請求項 29 および 33 ~ 35 のいずれか一項に記載の抗体を含む組成物。

【請求項 38】

請求項 29 および 33 ~ 35 のいずれか一項に記載の抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞。

【請求項 39】

細胞のアポトーシスを阻害するための医薬の製造のための、請求項 17 に記載のポリペプチド、または、請求項 17 に記載のポリペプチドをコードするトランスジーンの使用であって、ここで、該トランスジーンは、サービピンポリペプチドの発現を生じるのに有効である、使用。

【請求項 40】

前記トランスジーンがウイルスベクターを介して送達されることが意図される、請求項 39 に記載の使用。

【請求項 41】

前記ベクターが複製欠損である、請求項 40 に記載の使用。

【請求項 42】

10

20

30

40

50

前記トランスジーンが、裸の核酸として送達されることが意図される、請求項 39 に記載の使用。

【請求項 43】

サンプルにおける、請求項 1 に記載の核酸分子または請求項 17 もしくは請求項 18 に記載のポリペプチドの存在をアッセイする方法であって、該ポリペプチドまたは核酸分子が該サンプル中に存在するか否かを決定する工程を包含する、方法。

【請求項 44】

前記サンプルが、組織バイオプシー、便、血液、尿、および唾液からなる群より選択される、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

請求項 43 に記載の方法であって、さらに、以下の工程：

- a) 前記サンプル内の細胞の抽出物を調製する工程、および、
- b) 該細胞抽出物のタンパク質を試験して、前記ポリペプチドの存在を決定する工程、を包含する、方法。

【請求項 46】

請求項 43 に記載の方法であって、さらに、以下の工程：

- a) 前記サンプル内の細胞の抽出物を調製する工程、および、
- b) 該細胞抽出物の mRNA を試験して、前記核酸分子の存在を決定する工程、を包含する、方法。

【請求項 47】

請求項 43 に記載の方法であって、前記ポリペプチドの発現レベルをコントロールサンプルと相関させて腫瘍増殖潜在性を示すことによって、腫瘍細胞の増殖潜在性を決定するために使用される、方法。

【請求項 48】

請求項 43 に記載の方法であって、前記サンプルを前記ポリペプチドに結合する抗体と接触させ、それによって、前記サンプル中のサービピンの存在を決定する工程を包含する、方法。

【請求項 49】

請求項 43 に記載の方法であって、前記サンプルを請求項 1 に記載の核酸分子に特異的にハイブリダイズする少なくとも一つの核酸と接触させ、それによって、前記サンプル中のサービピンの存在を決定する工程を包含する、方法。

【請求項 50】

請求項 49 に記載の方法であって、請求項 1 に記載の核酸分子に特異的に結合する少なくとも一つのプライマーを用いて前記核酸分子を増殖させ、それによって、前記サンプル中のサービピンを検出する工程を包含する、方法。

【請求項 51】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 52】

サービピンタンパク質をコードする核酸の存在を検出するための、請求項 1 に記載のサービピン核酸分子の相補物を含むキット。

【請求項 53】

請求項 29 に記載の抗体を包含する、サンプル中のサービピンタンパク質の存在を検出するためのキット。

【請求項 54】

ガンをモニターまたは検出するための方法であって、被験体の生物学的液体サンプルを、請求項 1 に記載のサービピン核酸分子の相補物と接触させて、該サンプル中のサービピンをコードする核酸の存在を決定する工程であって、ここで、該サンプル内の該サービピンをコードする核酸の存在がガンの存在を予測する、工程、を包含する方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 5】

ガンをモニターまたは検出するための方法であって、
被験体の生物学的液体サンプルを、請求項 2 9 に記載の抗体と接触させて、該抗体が、該サンプル中における請求項 1 に記載の核酸分子によってコードされるサービピンを認識して結合するか否かを決定し、これによって、サービピンの存在がガンの存在を予測する、工程、
を包含する方法。

【請求項 5 6】

請求項 1 に記載の核酸分子によってコードされるサービピンの存在が、後期の新生物疾患を予測する、請求項 5 5 に記載の方法。

10

【請求項 5 7】

培養における細胞の増殖を保つための方法であって、アポトーシスを減少するのに有効である請求項 1 に記載の核酸分子によってコードされるサービピンの量と、該細胞とを接触させる工程を包含する、方法。

【請求項 5 8】

前記サンプルが生物学的液体を含む、請求項 4 8 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記生物学的液体が尿である、請求項 5 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

関連出願の記載

20

本出願は、1996年11月20日に出願された、米国仮出願第60/031,435号に基づき、その開示は、本明細書中に参考として援用される。

発明の分野

本発明は、細胞アポトーシスを調節する分野、特にアポトーシスを阻害するために有用な薬剤の分野に関し、ならびにアポトーシスのインヒビターの発現によって媒介される状態に関与する診断学的および予防的なアッセイに関する。本発明は特に、仮にサービピン (Survivin) と命名された、新規なヒト遺伝子の同定に関する。サービピンは、特にガン細胞および胚細胞において、細胞アポトーシスを阻害するタンパク質である、サービピンをコードする。

発明の背景

30

プログラム細胞死 (アポトーシス) による細胞増殖の調節は、発生および分化の間の組織ホメオスタシスを維持する (Raff, M.D., Nature (1992) 356:397-400; Vaux, D.L. ら、Cell (1994) 76:777-779)。このプロセスは、進化的に保存された多段階のカスケードを含み (Oltvai, Z. ら、Cell (1994) 79:189-192)、そしてアポトーシス性細胞死を促進するか、または中和するタンパク質によって制御される。アポトーシスはまた、細胞表面レセプター (Smith, A ら、Cell (1994) 76, 959-962)、および関連のシグナル伝達物質 (Tartaglia, L.A. ら、Immunol Today (1992) 13:151-153)、プロテアーゼ遺伝子ファミリー (Martin, S.J. ら、Cell (1995) 82:349-352)、細胞内第2メッセンジャー (Kroemer, G. ら、FASEB J (1995) 9:1277-1287)、腫瘍抑制遺伝子 (Haffner, R. ら、Curr Op Gen Dev (1995) 5:84-90)、およびアポトーシス性の細胞死を中和するネガティブな調節タンパク質 (Hockenbery, D. ら、Nature (1990) 348:334-336) を含む。異常に増加したアポトーシスまたは異常に延長した細胞生存 (Oltvai, Z.N. ら、Cell (1994) 79:189-192) は、ヒト疾患 (自己免疫異常、神経退行性のプロセス、およびガンを含む) の病因論に貢献し得る (Steller, H., Science (1995) 267:1445-1449); Thompson, C.B., Science (1995) 267:1456-1462)。

40

具体的には、例えば、アポトーシスのインヒビター、最も特に、bcl-2ファミリー (Reed, J., J Cell Biol (1994) 124:1-6、およびYang, E. ら、Blood (1996) 88:386-401) は、成体 (Hockenbery, D. ら、Proc Natl Acad Sci USA (1991) 88:6961-6965) および胎児 (LeBrun, D. ら (1993) 142:743-753) の組織におけるリンパ球のホメオスタシスおよび形態発生を維持する。bcl-2の脱調節された発現はまた、細胞生存を異常に延長し、およ

50

びトランスフォーミング変異の反乱を容易にすることによって、ガンに關与している。
bcl-2に加えて、パキユロウイルスIAP遺伝子 (Birnbaum, M.J.ら、J Virology (1994) 68 :2521-2528 ; Clem, R.J.ら、Mol Cell Biol (1994) 14:5212-5222) に關連するアポトーシスのインヒビター新規な遺伝子ファミリーのいくつかのメンバーが、ショウジョウバエおよび哺乳動物の細胞において同定されてきた (Duckett, C.S.ら、EMBO J (1996) 15:2685-2694 ; Hay, B.A.ら、Cell (1995) 83:1253-1262 ; Liston, P.ら、Nature (1996) 379:349-353 ; Rothe, M.ら、Cell (1995) 83:1243-1252 ; Roy, N.ら、Cell (1995) 80:167-178)。これらの分子は、進化的に高度に保存され；これらは、2つまたは3つの約70アミノ酸のアミノ末端のCys/HisパキユロウイルスIAP反復 (BIR) において、およびRINGフィンガーと称される、カルボキシ末端の亜鉛結合ドメインによって、組織される類似の構造を共有する (Duckett, C.S.ら、EMBO J (1996) 15:2685-2694 ; Hay, B.A.ら、Cell (1995) 83:1253-1262 ; Liston, P.ら、Nature (1996) 379:349-353 ; Rothe, M.ら、Cell (1995) 83:1243-1252 ; Roy, N.ら、Cell (1995) 80:167-178)。IAPタンパク質の組換え発現は、インビトロで、種々の刺激によって誘導されるアポトーシスをブロックし、(Duckett, C.S.ら、EMBO J (1996) 15:2685-2694 ; Liston, P.ら、Nature (1996) 379:349-353)、およびインビボで、ショウジョウバエの目の発生的に調節されるモデルにおいて、異常に延長した細胞生存を促進する (Hay, B.A.ら、Cell (1995) 83:1253-1262)。最後に、アポトーシスのIAPニューロンインヒビターであるNAIPにおける欠失が、脊髄の筋肉萎縮を伴う患者の75%において報告されており、従って、ヒト疾患におけるこの遺伝子ファミリーの潜在的な役割を示唆する (Roy, N.ら、Cell (1995) 80:167-178)。

IAPファミリーのメンバーに關連する、アポトーシスの種々のインヒビターをコードする核酸の治療学的なおよび診断学的な使用は、特許文献において記載されている。例えば、国際特許出願第W097/06255号、同第W097/26331号、および同第W097/32601号を参照のこと。特に、このような遺伝子および遺伝子産物の使用は、以下に考察される新規なタンパク質およびそれをコードする核酸について意図される。

近年、構造的に独特なIAPアポトーシスインヒビターをコードする、サービピンと称される、新規な遺伝子が同定された。サービピンは、単一のBIR、およびRINGフィンガーの代わりに高度に荷電されたカルボキシ末端のコイルド-コイル領域を含む、約16.5kDの細胞質タンパク質であり、これは、B細胞前駆体に移された場合、増殖因子 (IL-3) の投与中止によって誘導されるアポトーシスを阻害する (Ambrosini, G.ら、Nature Med. (1997) 3:917-921)。bcl-2または他のIAPタンパク質とは異なり、サービピンは成体組織において検出可能ではないが、インビボで、肺、結腸、胸、脾臓、および前立腺の最も一般的なヒトガンの全てにおいて、ならびに高い悪性度分類の非ホジキンリンパ腫の約50%において、優勢に発現されるようになる。興味深いことに、サービピン遺伝子のコード鎖は、エフェクター細胞プロテアーゼレセプター-1 (EPR-1) の配列 (Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860-865) に高度に相同であったが、反対の方向に配向され、従って頭-頭配座において重複される2つの別々の遺伝子の存在を示唆する。

本発明は、EPR-1にほぼ同一であるが、反対の方向に配向される、新規なヒト遺伝子の同定に基づく。サービピンと称される、アンチセンスEPR-1遺伝子産物は、アポトーシスのインヒビターのIAPファミリーのメンバー (Duckett, C.S.ら、EMBO J (1996) 15:2685 - 2694 ; Hay, B.A.ら、Cell (1995) 83:1253-1262 ; Liston, P.ら、Nature (1996) 379:349 - 353 ; Rothe, M.ら、Cell (1995) 83:1243 - 1252 ; Roy, N.ら、Cell (1995) 80:167 - 178) に關係が遠いメンバーであり、そして活発に増殖する形質転換された細胞において、およびインビボで一般的なヒトガンにおいて、優勢に発現されるが、近傍の正常な細胞においては発現されない。機能的に、その天然のアンチセンスEPR-1転写物をアップレギュレートすることによるサービピン発現の阻害は、広範囲に及ぶアポトーシスを生じ、細胞増殖を減少した。

発明の要旨

本発明は、ほとんどのガン細胞において発現され、および細胞アポトーシスを阻害するタンパク質 (本明細書中以後、サービピンまたはサービピンタンパク質) の単離および同定

10

20

30

40

50

に、一部、基づく。この観察に基づいて、本発明は、精製されたサービピンタンパク質を提供する。

本発明はさらに、サービピンタンパク質をコードする核酸分子を提供する。このような核酸分子は、単離された形態においてであり得るか、または発現制御エレメントもしくはベクター配列に作動可能に連結され得る。

本発明はさらに、サービピンファミリーのタンパク質の他のメンバーを同定する方法を提供する。具体的には、サービピンの核酸配列は、プローブとして、またはPCRプライマーを作製するために、サービピンファミリーのタンパク質の他のメンバーをコードする核酸分子を同定するための方法において、使用され得る。

本発明はさらに、サービピンに結合する抗体を提供する。このような抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれかであり得る。抗サービピン抗体は、多様な診断学的形式において、および種々の治療学的方法のために、使用され得る。

本発明はさらに、サービピン結合パートナーを単離するための方法を提供する。サービピン結合パートナーは、捕獲プローブとしてサービピンタンパク質を用いて、単離される。あるいは、サービピンは、発現ライブラリーをスクリーニングし、そしてサービピンタンパク質に結合するタンパク質をコードする遺伝子を同定するために、酵母ツーハイブリッド系において餌 (bait) として使用され得る。これらの方法によって単離された結合パートナーは、抗体を調製するにおいて有用であり、および薬剤開発についての標的としてもまた作用する。

本発明はさらに、サービピンと結合パートナーとの会合をブロックまたは調節し得る薬剤を同定するための方法を提供する。具体的には、サービピン、またはそのフラグメント、および結合パートナーと、試験薬剤とを接触し、そして試験薬剤が、結合パートナーへのサービピンタンパク質の結合をブロックまたは減少するか否かを測定することによって、サービピンと結合パートナーとの会合を、ブロック、減少、またはそうでなければ調節する能力について、薬剤が試験され得る。

本発明はさらに、サービピンとその結合パートナーの1つ以上との会合を、減少またはブロックするための方法を提供する。具体的には、サービピンと結合パートナーとの会合は、サービピン、または結合パートナーと、結合パートナーへのサービピンの結合をブロックする薬剤とを接触することによって、ブロックまたは減少され得る。方法は、サービピンに、または結合パートナーに結合する薬剤を利用し得る。

本発明はさらに、細胞内のサービピンの発現を調節する方法を提供する。細胞内のサービピンの発現は、サービピンの産生を生成または阻害するように調節され得る。

サービピン/結合パートナーの会合、またはサービピンの発現を阻害することは、サービピンを必要とする生物学的または病理学的プロセスを調節するために使用され得る。例えば、サービピン産生を減少する方法は、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する。サービピン産生の刺激は、細胞または組織の培養能力を拡張する手段として使用され得る。

サービピンまたはサービピン/結合パートナー相互作用を必要とする生物学的および病理学的プロセスはさらに、遺伝子治療方法を用いて調節され得る。生物内のさらなる遺伝子操作は、動物モデルにおけるサービピン遺伝子の発現またはサービピンタンパク質の産生を改変するために使用され得る。例えば、サービピン遺伝子は、遺伝子欠損を矯正するために改変され得；サービピン活性のペプチド調節因子は、標的細胞へ調節因子をコードする核酸分子を導入するための遺伝子形質転換法を用いて、標的細胞内に産生され得る、など。アンチセンスおよび三重らせんの治療および介入についての核酸の使用は、特に意図される。

本発明はさらに、サービピンを必要とする病理学的プロセスの重篤度を低減する方法を提供する。サービピンの発現または結合パートナーとのサービピンの会合は、サービピン媒介性の生物学的プロセスのために必要とされるので、サービピンの発現、サービピン活性、またはサービピンと結合パートナーとの会合をブロックする薬剤は、治療学的方法において使用され得る。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

図 1 は、相補的なEPR-1遺伝子の同定を示す。A、B . 染色体の位置。EPR-1 cDNAとのハイブリダイゼーションによって選択された、ジゴキシゲニン標識化ヒトP1ゲノムクローンは、50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸、および 2 × SSC中のフィトヘマグルチニン刺激化PBMCから単離された中期の染色体とインキュベートした。EPR-1ハイブリダイズ遺伝子は、単色標識において、E 群染色体の長いアームにマップされ (A、緑色染色)、そしてプローブD17Z1 (第17染色体のセントロメアに特異的) との 2 色の染色において (B、赤染色)、第17染色体の長いアームに (B、緑色染色)、バンド17q25にマップされた。C . アンチセンスEPR-1遺伝子のマップにマップされた。14796bpにわたるコンティグは、pBSKS⁺にサブクローン化された 2 つのEPR-1ハイブリダイズP1クローンに由来し、そして両方の鎖に対して完全に配列決定された。マップの配向は、イントロン - エクソン境界の位置に関して 5' - 3' である (以下を参照のこと)。エクソンは、黒塗りの四角であり、エクソン 1 の上流の推定のCpG島は、白抜きの四角である。翻訳開始コドン (ATG) が示される。制限部位は: B、BamHI、H、HindIII; P、PstI; S、SmaI; X、XbaIである。D . アンチセンスEPR-1遺伝子のイントロン - エクソン境界。塩基対におけるイントロン - エクソン境界の位置は、括弧内に示される。

図 2 は、EPR-1関連配列の複雑性および進化的な保存を示す。A . ヒトゲノムDNAのサザンブロット。サンプルは、示される制限酵素で消化され、GeneScreenナイロンメンブレンに移され、そして 5 × SSC、0.5% SDS、5 × デンハルト、および0.1%ピロリン酸ナトリウム中で、65 °Cにて、EPR-1 cDNAとハイブリダイズされた。矢印によって示される放射能バンド (7.6kb BamHIフラグメント、7.5kb XbaIフラグメント、ならびに15、7.5、6.4、および3.7kbのHindIIIフラグメント) は、図 1 CにおけるアンチセンスEPR-1遺伝子に由来しない。B . パルス化フールドゲル電気泳動のサザンブロット。高分子量のヒトゲノムDNAは、示される制限酵素で消化され、75秒間のパルス時間を伴う、20時間、200Vでのパルス化フィールドゲル電気泳動によって分離され、ナイロンメンブレンに移され、そしてAにおいて記載されるように、EPR-1 cDNAとハイブリダイズされた。C . 複数の種のサザンブロット。示された種からの、EcoRI消化されたゲノムDNAは、Aに記載されるように、EPR-1 cDNAの 3' 548bpフラグメントとハイブリダイズされた。全てのパネルについて、kbでの分子量マーカーが、左側に示される。

図 3 は、センス / アンチセンスEPR-1転写物の一致しない組織分布を示す。ノーザンハイブリダイゼーションが、60 °Cで14時間、5 × SSPE、10 × デンハルト溶液 2% SDS、100mg/ml変性サケ精子DNAにおいて 1 本鎖の特異的プローブを用いて、複数の組織の成体または胎児のmRNAブロットに対して行われた。2 × SSCにおいて60 °Cでの、および0.2 × SSCにおいて22 °Cでの、洗浄後、放射能バンドは、オートラジオグラフィーによって可視化された。A . EPR-1特異的 1 本鎖プローブ。B . アンチセンスEPR-1特異的 1 本鎖プローブ。C . コントロールアクチンプローブ。kbでの分子量マーカーが、左側に示される。

図 4 は、サービピンの配列分析および細胞株における発現を示す。A . アンチセンスEPR-1遺伝子産物の予測される翻訳 (サービピン) (配列番号34)。B . Clustal法による、サービピンにおける (配列番号 8 および21)、ならびに他のIAPタンパク質における、BIRの配列アラインメント。IAPタンパク質は、アクセス番号、L49433 (配列番号 9 および22)、TNFR2-TRAFシグナリング複合体結合IAP; L49441 (配列番号10および23)、アポトーシス 2 インヒビター (ショウジョウバエ); P41436 (配列番号11および24) および、Cydia pomonella顆粒症ウイルスからのIAP遺伝子; P41437 (配列番号12および25)、Orgyia pseudotsugata核多角体病ウイルスからのIAP遺伝子; U19251 (配列番号13および26)、NAIP、アポトーシスのニューロンインヒビター; U32373 (配列番号14および27)、ショウジョウバエメラノガスター (melanogaster) からのIAP様タンパク質ILP; U32974 (配列番号15および28)、ヒトIAP様タンパク質ILP; U36842 (配列番号16および29)、アポトーシスのマウスインヒビター; U45878 (配列番号17および30)、アポトーシス 1 のヒトインヒビター; U45879 (配列番号18および31)、アポトーシス 2 のヒトインヒビター; U45880 (配列番号19および32)、アポトーシスのX 連結インヒビター; U45881 (配列番号20および33)、アポトーシスのショウジョウバエインヒビターによって同定される。保存される残基は、

10

20

30

40

50

四角で囲まれ、サービピンとNAIP (U19251) (配列番号13および26) との間の同一性は、四角で囲まれおよび編み掛けされる。C. 抗サービピン抗体JC700とのイムノプロットティング。細胞株HEL (赤白血病) DaudiおよびJY (Bリンパ腫)、THP-1 (単球)、JurkatおよびMOLT13 (T白血病)、または非形質転換ヒト肺Lu18線維芽細胞、HUVECもしくはPBMCの、SDS抽出物のタンパク質基準化アリコートは、5~20%のSDS勾配ゲル上で電気泳動により分離され、Immobilonに移され、そしてコントロール非免疫ウサギIgG (RbIgG)、または抗サービピン抗体JC700 (サービピン) でイムノプロットされた。タンパク質バンドは、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギIgGおよびテトラゾリウム塩によって可視化された。kDaでの分子量マーカーが、左側に示される。

図5は、細胞の増殖/分化によるサービピン発現の調節を示す。HL-60細胞は、0.1mMビタミンD₃ + 17.8mg/ml インドメタシンとの、72時間の培養によって、成熟単球表現型に、末端的に分化した。ビタミンD₃分化の前のまたは後のサービピン発現は、JC700抗体とのイムノプロットティングによって、またはサービピン特異的1本鎖プローブとのノーザンハイブリダイゼーションによって、検出された。RbIgG、コントロール非免疫ウサギIgG。kDaでのタンパク質分子量マーカー、およびリボソームバンドの位置が、各プロットの左側に示される。

図6は、インビボでのヒトガンにおけるサービピンの過剰発現を示す。A. アフィニティー精製された抗サービピン抗体JC700 (20 µg/ml) での、ヒト肺腺ガン腫の免疫組織化学的染色。B. 免疫化サービピン3-19ペプチドでの予備吸収による、肺腺ガン腫のJC700染色の阻害。C. 鱗状肺細胞ガン腫におけるサービピンの免疫組織化学的発現 (しかし、隣接する肺の正常な腺上皮においては発現しない) (C、矢印)。D. 鱗状肺細胞ガン腫における、サービピン特異的リボプローブとの、サービピンmRNAのインサイチュハイブリダイゼーション。E. JC700との免疫組織化学による、膵臓腺ガン腫におけるサービピンの発現。F. 免疫組織化学による、サービピン発現についてネガティブな、正常な膵臓。G. 結腸腺ガン腫におけるサービピンmRNA発現のインサイチュハイブリダイゼーション (しかし、H、隣接する非新生物結腸腺上皮においては発現しない (H、矢印))。倍率は、×200である (ただし、Gは×400)。

図7は、アポトーシス/増殖に対するサービピンの効果を示す。A. サービピン発現のEPR-1調節。HeLa細胞は、エレクトロポレーションによって、コントロールベクターpML1またはEPR-1 cDNA (これは、サービピンに対してアンチセンスである) でトランスフェクトされ、そしてハイグロマイシン (0.4mg/ml) において選択された。ベクターコントロールHeLa細胞 (Vector) またはサービピンアンチセンストランスフェクト体 (Antisense) のアリコートは、200mM ZnSO₄で誘導されて界面活性剤で可溶化され、そして抗サービピンJC700抗体でイムノプロットされた。分子量マーカーが、左側に示される。B. アポトーシスに対するサービピンの効果。サービピンアンチセンストランスフェクト体 (1、2)、またはベクターコントロールHeLa細胞 (3、4) を、24時間、0% FBS中のZn²⁺イオンで誘導し、そして3' OH DNA末端のTdT触媒化dUTP標識およびイムノペルオキシダーゼ (1、3) を用いるAptoTag法によって、またはヘマトキシリン - エオシン (HE) (2、4) によって、染色された。1. 血清涸渇されたサービピンアンチセンストランスフェクト体におけるApto Tag染色によって検出された顕著な核DNAフラグメント化; 2. アンチセンストランスフェクト体のHE染色は、多数のアポトーシス体の存在を示す (矢印); 3. ベクターコントロールHeLa細胞のApto Tag染色は、いくつかのまばらなアポトーシス細胞を検出する (矢印); 4. ベクターコントロールHeLa細胞のHE染色。矢印は、単一のアポトーシス体を示す。倍率、×400。C. 細胞増殖に対するサービピンの効果。2万個のベクターコントロールのHeLa細胞 (Vector) またはサービピンアンチセンストランスフェクト体 (Antisense) が、24ウェルプレートに播種され、ZnSO₄で誘導され、示される時点で採集され、そして細胞集団は、直接的な細胞計数によって、顕微鏡によって測定された。データは、7回の独立した測定のうちの代表的な実験の反復の平均 ± SEMである。

図8は、HL-60細胞におけるサービピンの発現を示す。HL-60細胞は、サービピン発現についてのウェスタンブロットおよびノーザンブロットを介して試験された。

10

20

30

40

50

図9は、サービピンの構造分析を表す。サービピンタンパク質は、Chou-Fasman、Garnier-Robson、Kyle-Doolittle、Eisenberg、Karplus-Schultz、Jameson-Wolf、およびEminiの分析法を用いて、分析された。

図11は、ELISAおよびイムノブロットングによる、サービピンの発現、および抗サービピンmAb 8E2の生成および特徴づけを示す。

図12は、サービピンの部位特異的変異誘発、およびアポトーシス阻害に關与する重要な機能的残基の同定を示す。

図13は、内皮細胞アポトーシスに対する、サービピン添加の細胞防御的な効果を示す。

図14は、サービピンの存在が、神経芽腫において、ネガティブな推定の予後因子であることを示す。

図15は、サービピンの存在が、高い悪性度分類の非ホジキンリンパ腫において、ネガティブな推定の予後因子であることを示す。

図16は、炎症性および細胞増殖抑制性のサイトカインによって誘導されるサービピンのダウンレギュレーションを示す。

図17は、過酸化水素によって、NIH3T3細胞において誘導されるアポトーシスに対する、サービピン構築物またはXIAPの効果を示す。

好ましい実施態様の詳細な説明

I. 一般的な記載

本発明は、腫瘍細胞において発現され、および細胞アポトーシスを阻害する新規なタンパク質（本明細書中以後、サービピンタンパク質またはサービピン）の同定に、一部、基づく。サービピンはまた、胚組織において発現されることが、見出される。

サービピンタンパク質は、薬剤として使用され得るか、または薬剤についての標識として作用し得、薬剤は、細胞アポトーシスのサービピン媒介性の阻害を阻害もしくは刺激するために、例えば、異常な細胞増殖をブロックするために、または培養における細胞増殖を延長するために、使用され得る。

本明細書中で使用されるように、アポトーシスの調節は、所定の細胞集団において、そうでなければアポトーシスを受ける細胞の数を増加または減少することを意味する。これは、細胞に存在するサービピンの量を増加もしくは減少することによって、またはサービピンの活性を増加もしくは減少することによって、達成され得る。好ましくは、アポトーシスが調節されるべき所定の細胞集団は、有益な効果がその調節から生じる腫瘍もしくは他の組織、または細胞の群において見出される。また、好ましくは、所定の細胞集団における、そうでなければアポトーシスを受ける細胞の数の増加または減少は、この集団における細胞のうちの、少なくとも約10%、20%、40%、またはより好ましくは少なくとも約50%である。

本発明はさらに、サービピンに結合するタンパク質を単離するための方法の開発に基づく。以下に考察されるようなサービピンタンパク質またはサービピンのフラグメントに基づくプローブは、サービピン結合タンパク質を単離するための捕獲プローブとして使用される。ドミナントネガティブタンパク質、これらのタンパク質をコードするDNA、これらの結合タンパク質に対する抗体、これらのタンパク質のペプチドフラグメント、またはこれらのタンパク質の模倣物は、サービピン機能を影響するために細胞へ導入され得る。さらに、これらのタンパク質は、サービピン機能を調節するための新規な治療学を発見するための、合成小分子および組み合わせ化合物のライブラリー、または天然の化合物ライブラリーのスクリーニングについての新規な標的を提供する。

II. サービピンの同定、一般的な特徴づけ、および組織分布

本発明は、サービピンと称される、アポトーシスのインヒビターのIAPファミリーの新規なメンバーの、染色体17q25における同定に基づき、これはガン細胞増殖に対して選択的な利点を付与し得る。サービピン遺伝子の関連の特徴は、その発生的および分化的に調節された発現、第Xa因子レセプターEPR-1とのそのほとんど同一のおよび相補的なDNA配列、ならびに一般的なヒト悪性腫瘍におけるその豊富なインビボ発現（しかし、隣接の非生物集団においては発現しない）を含む。以下に記載されるように、EPR-1 mRNAのメタロチ

10

20

30

40

50

オネイン誘導による標的化サービピン発現は、アポトーシス、およびHeLa細胞トランスフェクト体の増殖の阻害を生じる。

ホメオスタシスへのそれらの貢献に加えて、血液プロテアーゼについての細胞レセプターは、胚発生学的な発生 (Connolly, A.J.ら、Nature (1996) 381:516-519) および脈管形成 (Carmeliet, P.ら、Nature (1996) 383:73-75) において非常に重要な役割を果たす、多面発現性のシグナル伝達分子として、近年明らかになった。この状況において、サービピン遺伝子は、EPR-1 (凝血促進性の活性 (Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860-865)、およびT細胞活性化 (Duchosal, M.A.ら、Nature (1996) 380:352-356) に貢献する第Xa因子についてのレセプター) であるEPR-1のcDNAとのハイブリダイゼーションによって単離された。サービピンコード配列は、EPR-1 cDNAとほとんど同一であることが見出されたが、その配向は、イントロン-エクソン境界でのコンセンサスプライス部位の位置 (Padgett, R.A.ら、Ann Rev Biochem (1986) 55:1119-1150) について、アンチセンスEPR-1鎖に対して明白に指定された。他方、EPR-1「センス」鎖の真正物は、哺乳動物細胞が、EPR-1 cDNAでまたはキメラEPR-1構築物でトランスフェクトされた場合 (Ambrosini, G.ら、J Biol Chem (1996) 271:1243-1248、およびAltieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860-865)、抗EPR-1 mAbによって認識され、そして特定のおよび飽和可能な反応において第Xa因子に結合したことが、以前の研究において実証された。

これらの知見は、反対の方向に配向される、複数の、高度に相同な、EPR-1転写物の存在によって、一致され得た。EPR-1 mRNAの不均一性、およびサザンハイブリダイゼーションの複雑なパターンは、この仮説を支持する。以前に、2本鎖EPR-1プローブは、EPR-1⁺細胞のmRNAにおいて、1.9、3.4、および約1.5kbの、3つの強力にハイブリダイズするバンドを検出した (Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860-865)。ここで、1本鎖の特異的プローブは、複数の成熟なおよびポリアデニル化されたEPR-1関連メッセージの存在を確認し、そして1.9および3.4kbバンドは、2つの非常に調節された、アンチセンスEPR-1転写物に対応し、一方1.5kbバンドは、1.2kbとしてより正確に規定される、真性のEPR-1コードメッセージと一致したことを示した。1.9kbアンチセンス転写物は、本明細書中に記載されるサービピン遺伝子から明らかに生じたが、1.2kbの「センス」EPR-1メッセージをコードする遺伝子は未だ同定されていない。

しかし、(i) サービピン遺伝子に関連しない、いくつかのゲノムEPR-1ハイブリダイズバンドの存在、(ii) 種々の種におけるEPR-1配列の異なる制限パターン、および (iii) ポジティブ (アクセス番号W46267)、またはネガティブ (アクセス番号W34764、W83810、T29149) EPR-1鎖をマッチングする ($P=0.018 \sim 7 \times 10^{-11}$) 多数の発現される配列タグデータベース登録は、全体で、ここで記載される遺伝子に対して反対の方向に配向され、および以前に特徴付けられた第Xa因子レセプター (Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860-865) をコードする、少なくとも第2の、高度に関連する、EPR-1遺伝子の存在を示唆する。

類似の状況は、EPR-1配列を含む遺伝子複製事象から生じ得る。興味深いことに、染色体17q25上に検出される単一のハイブリダイゼーションシグナル、および高分子量のゲノムDNAのサザンプロットにおいて同定された単一のハイブリダイズバンドは、反対の方向に潜在的に配向されるEPR-1関連配列が、75~130kbの物理的間隔内で、密接に接近して隣接し得ることを示唆する。

反対の方向で配向される複数のEPR-1転写物の存在は、天然のアンチセンスによる相互調節機構を意味する。これは、インビボでの発生中の組織または成体組織における、およびHL-60細胞の末端分化の間の、センスおよびアンチセンスEPR-1メッセージの優勢な不一致および相互に排他的な分布に一致する。アンチセンス調節は、原核生物において共通であるが (Green, P.J.ら、Annu Rev Biochem (1986) 55:569-597)、益々多くの真核生物遺伝子産物が、遺伝子調節に潜在的に関与する機能的なアンチセンス転写物の出現について近年特徴付けられており、塩基性線維芽細胞増殖因子 (Kimmelman, D.ら、Cell (1989) 59:687-696; Murphy, P.R.ら、Molecular Endocrinology (1994) 8:852-859) a1 (I) コラーゲン (Farrell, C.M.ら、J Biol Chem (1995) 270:3400-3408およびLukens, 1995)、n

10

20

30

40

50

-myc (Krystal, G.W. ら、Mol Cell Biol (1990) 10:4180-4191)、c-myc (Celano, P. ら、J Biol Chem (1992) 267:15092-15096)、p53 (Khochbin, S. ら、EMBO J (1989) 8:4107-4114)、c-erbAa (Lazar, M.A. ら、Mol Cell Biol (1989) 9:1128-1136)、およびCD3 / / 遺伝子座 (Lerner, A. ら、J Immunol (1993) 151:3152-3162) を含む。

以下に記載されるように、機能的なアンチセンスによって調節されるEPR-1/サービピン遺伝子のバランスの存在は、HeLa細胞トランスフェクト体において、EPR-1「センス」鎖のメタロチオネイン誘導性の転写が、サービピンの発現を抑制し、そしてアポトーシス/細胞増殖を十分に影響した場合、実証された(以下を参照のこと)。これらの実験について使用されたEPR-1が翻訳開始コドンを欠損したので、この調節機構は、EPR-1とサービピンとの間の潜在的なタンパク質会合に起因しなかった。さらなる実験は、細胞増殖を阻害するサービピンアンチセンスの能力を評価した。これは、lacZレポーター化プラスミドとサービピンアンチセンスとを一過性に同時トランスフェクトし、そして -ガラクトシダーゼ発現細胞における、トランスフェクションの48時間後の細胞生存性を測定することによって行われた。結果は、サービピンアンチセンストランスフェクト体の生存性が、空のベクターでトランスフェクトされたコントロール細胞の20%未満であったことを示した。HeLa細胞において同様に同時トランスフェクトされた、ICAM-1(細胞内接着分子-1)のコントロールアンチセンスは、効果的でなかった。

サービピンは、EPR-1にアミノ酸配列相同性を有しない、142アミノ酸(約16.5kDa)の小タンパク質であることが見出され、アポトーシスのIAPインヒビター(Duckett, C.S. ら、EMBO J (1996) 15:2685-2694; Hay, B.A. ら、Cell (1995) 83:1253-1262; Liston, P. ら、Nature (1996) 379:349-353; Rothe, M. ら、Cell (1995) 83:1243-1252; Roy, N. ら、Cell (1995) 80:167-178)において見出される、BIR相同ドメイン(Birnbaum, M.J. ら、J Virology (1994) 68:2521-2528; Clem, R.J. ら、Mol Cell Biol (1994) 14:5212-5222)の存在のためにサービピンと称された。全体の配列保存、カルボキシ末端RINGフィンガーの不在、および単一の、部分的に保存された、BIRドメインの存在に基づいて、サービピンは、IAPファミリーの最も離れて関連するメンバーであり、NAIPと最も高い程度の類似性を共有する(Roy, N. ら、Cell (1995) 80:167-178)。従って、bcl-2または他のIAPタンパク質とは異なり、サービピンは、成体組織において検出可能ではないが、肺、結腸、胸、脾臓、および前立腺の最も一般的なヒトガンの全てにおいて、ならびに高い悪性度分類の非ホジキンリンパ腫の約50%において、インビボで顕著に発現されるようになる。さらに他のIAPタンパク質とは異なり(Deveraux, Q. ら、Nature (1997) 388:300-304)、サービピンは、無細胞系においてカスパーゼ(caspase)に結合しない(Roy, N. ら、Blood (1997) 595:2645)。

インビトロでの(Duckett, C.S. ら、EMBO J (1996) 15:2685-2694; Liston, P. ら、Nature (1996) 379:349-353)およびインビボでの(Hay, B.A. ら、Cell (1995) 83:1253-1262) IAPタンパク質の抗アポトーシスタンパク質と一致して、EPR-1転写物(これは、当然ながらサービピンに対するアンチセンスである)によるサービピン発現の阻害は、HeLa細胞トランスフェクト体におけるインサイチュでのヌクレオソーム間のDNAフラグメント化により測定されるように、増加されたアポトーシスを生じた。RINGフィンガーがないIAPタンパク質が、アポトーシスを中和する能力は、NAIPによって媒介されるアポトーシスの抑制によって(Liston, P. ら、Nature (1996) 379:349-353)、およびRINGフィンガーの欠失後の、ショウジョウバエIAPタンパク質のインビボ機能獲得によって(Hay, B.A. ら、Cell (1995) 83:1253-1262)実証されるように、先例がないわけではない。抗アポトーシス遺伝子は、異常に長期間生存する細胞におけるガン遺伝子変異の蓄積を有利にすることによって、細胞増殖において間接的な役割を果たすと考えられるが(Reed, J.C.、J Cell Biol (1994) 124:1-6)、サービピンのダウンレギュレーションは、HeLa細胞増殖の十分な阻害を生じた。これは、アポトーシスによって高レベルのアンチセンス転写物を発現するHeLa細胞の消失に由来し得るが、腫瘍細胞増殖の類似の減少が、bcl-2のアンチセンス阻害後にインビボで報告されている(Reed, J.C. ら、Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87:3660-3664)。

10

20

30

40

50

IAPタンパク質が、細胞増殖においてより一般的な役割を果たし得るが、アポトーシス阻害に排他的に制限されない可能性が、以前に提唱されている。Rotheらは、2つのIAPタンパク質(cIAP)におけるアミノ末端BIRが、アポトーシスシグナル伝達(Tartaglia, L.A.ら、Immunol Today (1992) 13:151-153)ではなく、細胞増殖および生存に主に影響を与える分子である、75kDaのTNFレセプターに会合されるシグナル伝達因子(Rothe, M.ら、Cell (1995) 83:1243-1252)と物理的に相互作用することを、近年、実証した。サーベピンがシグナル伝達分子(Rothe, M.ら、Cell (1995) 83:1243-1252)に物理的に結合されるか否かは知られていないが、他のIAPタンパク質と比較されるように、そのBIRの構造的多様性(Duckett, C.S.ら、EMBO J (1996) 15:2685-2694; Hay, B.A.ら、Cell (1995) 83:1253-1262; Liston, P.ら、Nature (1996) 379:349-353; Rothe, M.ら、Cell (1995) 83:1243-1252; Roy, N.ら、Cell (1995) 80:167-178)は、アポトーシス阻害/細胞増殖のその特定の機構に潜在的に関連する、超分子相互作用に特性を付与し得る。

プログラム細胞死(アポトーシス)の脱調節(dysregulation)は、ガンを含む種々のヒト疾患の病理学に貢献する主な機構として、近年、明らかになってきた(Steller, H.、Science (1995) 267:1445-1449; Thompson, C.B.、Science (1995) 267:1456-1462)。新形成における抗アポトーシス遺伝子の影響は、濾胞性リンパ腫におけるbcl-2の役割(Korsmeyer, S.J.、Blood (1992) 80:879-886)によって強調されるが、ガンにおけるIAPタンパク質の潜在的な分布は、以前には調査されていなかった。この状況において、サーベピンの最も目立つ特徴の1つは、活発に増殖する形質転換された細胞株における、およびインビボで肺、結腸、脾臓、および胸の最も一般的なヒト悪性腫瘍の全てにおける(しかし、隣接の非新生物集団においては発現しない)、その豊富な発現である。複数のヒトガンにおけるこの分布は、新生物におけるアポトーシス/細胞増殖機構における、この分子の基本的な役割を、表示し得る。bcl-2の範例との類似によって、ガンにおけるサーベピンの過剰発現は、異常なプログラム細胞生存(Veis, D.J.ら、Cell (1993) 75:229-240)、化学療法誘導性のアポトーシスに対する増加された耐性(Miyashita, T.ら、Blood (1993) 81:151-157)を導き得、および上述に報告されるインビトロ研究によって示唆されるように、形質転換された細胞の増殖について直接的な利点を指揮(lead in)し得る。

他方、インビボでの正常なPBMCおよび良性の乳腺ガンにおけるその存在について(未発表の観察)、サーベピン発現は、悪性の形質転換のマーカーとして、それ自身解釈され得ないが、ある刺激に対するより一般的な、発生または細胞型特異的応答を反映し得る。このことは、インビボでの、正常な胚発生(本発明者らの未発表の観察)および胎児発生の中のサーベピンの存在、ならびに増殖が阻止された細胞型(すなわち、ビタミンD₃で処理されたHL-60)、および末端的に分化された組織における迅速なその消失と一致する。成体の成熟組織において構成的に見出される他のIAPタンパク質(Duckett, C.S.ら、EMBO J (1996) 15:2685-2694; Liston, P.ら、Nature (1996) 379:349-353; Rothe, M.ら、Cell (1995) 83:1243-1252)とは異なり、その発現のパターンは、胎児組織におけるbcl-2の分布(LeBrun, D.P.ら、Am J Pathol (1993) 142:743-753)、およびアポトーシスに対する感受性と相関する、分化された細胞におけるその制限された存在(Hockenbery, D.M.ら、Proc Natl Acad Sci USA (1991) 88:6961-6965)を暗示する。

まとめると、これらの知見は、インビボでの、IAPタンパク質とガン細胞との間の新規な関連物として、サーベピンを同定する。以下に示されるデータの重要な意味は、EPR-1の発現に集中される(Altieri, D.C. FASEB J (1995) 9:860-865)、正常な細胞調節機構を操作することにより、この強力な抗アポトーシス遺伝子の効果を平衡する可能性である。次いで、サーベピンを標的化することは、形質転換された細胞の増殖についての選択的な利点を除去し得、および化学療法誘導性のアポトーシスに対するガン細胞の感受性を増加するために、治療学的に有益である。同じ方針に沿って、多型マーカーの同定およびEPR-1/サーベピン遺伝子座内またはその周辺の伸長されたアプロタイプ(aplotype)の構築は、化学療法に対する感受性の集団遺伝学に対する、新しい洞察を提供し得る。

III. 特定の実施態様

A. サーベピンタンパク質

本発明は、単離されたサービピンタンパク質、ならびにサービピンタンパク質の対立遺伝子改変体、およびサービピンタンパク質の保存的なアミノ酸置換物を提供する。本明細書中で使用されるように、サービピンタンパク質（またはサービピン）は、図4に示されるヒトサービピンのアミノ酸配列を有するタンパク質をいう。用語「サービピンタンパク質」はまた、サービピンの天然に存在する対立遺伝子変異体、上述で具体的に引用されるアミノ酸配列よりもわずかに異なるアミノ酸配列を有する、天然に存在するタンパク質を含む。対立遺伝子改変体は、上述で引用されるアミノ酸配列よりもわずかに異なるアミノ酸配列を保有するが、細胞アポトーシスを阻害するために必要な能力をなお有する。

本明細書中で使用されるように、サービピンファミリーのタンパク質は、ヒトに加えて、生物から単離されているサービピンタンパク質をいう。サービピンファミリーの他のメン

10

バーを同定および単離するために使用される方法は、以下に記載される。サービピンは、IAP（阻害性アポトーシスタンパク質）ファミリーのタンパク質のメンバーである。しかし、サービピンは、有意な方法において、他のIAPタンパク質から異なる独特なサブファミリーのIAPタンパク質の第1のメンバーである。サービピンとこの遺伝子ファミリーの他のメンバーとの間の、BIRモジュールにおける相同性および配列保存性にも関わらず、サービピンファミリーのタンパク質のメンバーに対して独特な、重要な構造的差異がある。第一に、任意の他のIAPタンパク質とは異なり、サービピンはわずか1つのBIRモジュールを有する（他の分子のほとんどは、2～3個有する）。さらに、サービピンは、カルボキシ末端のRINGフィンガーを含まないが、その代わりに予測されるコイルドコイルを有する。IAPファミリーにおけるニューロンアポトーシス阻害性タンパク質（NAIP）は、RINGフィンガーを欠損するが、カルボキシ末端のコイルドコイルを含まない。最後に、サービピンと他のIAPタンパク質との間にDNA配列類似性は存在しない（サービピンに対して設計されたPCRプライマーは、他のIAPタンパク質を検出しないようであり、その逆も当てはまる）。

20

本発明のサービピンタンパク質は、好ましくは単離された形態においてである。本明細書中で使用されるように、物理的な、機械的な、または化学的な方法が用いられて、サービピンと通常関連される細胞成分から、サービピンタンパク質を回収する場合、タンパク質は単離されるといわれる。当業者は、単離されたサービピンタンパク質を得るために標準的な生成方法を、容易に用い得る。

本発明のサービピンタンパク質はさらに、本明細書中に記載されるサービピンタンパク質の保存的改変体を含む。本明細書中で使用されるように、保存的改変体は、サービピン結合パートナーに結合する、および/または細胞アポトーシスを阻害するサービピンタンパク質の能力を、不都合に阻害しない、アミノ酸配列の変化をいう。変化した配列が、サービピン結合パートナーを会合することからサービピンタンパク質を妨げる、および/または細胞アポトーシスを阻害することからサービピンタンパク質を妨げる場合、置換、挿入、または欠失はサービピンタンパク質に不利に影響するといわれる。例えば、サービピンの全体の電荷、構造、または疎水性/親水性特性は、サービピンの活性に不利に影響することなく変化され得る。従って、サービピンのアミノ酸配列は、サービピンの活性を不都合に影響することなく、例えば、より多くの疎水性または親水性を、ペプチドに付与するために、変化され得る。

30

40

対立遺伝子改変体、保存的置換改変体、およびサービピンファミリーのタンパク質のメンバーは、細胞アポトーシスを阻害する能力を有する。このようなタンパク質は、通常、ヒトサービピン配列と少なくとも約75%の、より好ましくは少なくとも約80%の、さらにより好ましくは少なくとも約90%の、および最も好ましくは少なくとも約95%の、アミノ酸配列同一性を有しする。このような配列に関する同一性または相同性は、配列を整列させ、そしてギャップを導入し（必要であれば）、最大の相同パーセントを達成し、そして相同であるとして任意の保存的置換を含ませた後の、公知のペプチドと同一である、候補配列におけるアミノ酸残基のパーセントとして、本明細書中に規定される。ペプチド配列への、N末端の、C末端の、または内部の伸長、欠失、または挿入は、相同性を影響すると解釈されない。

50

従って、本発明のサービピンタンパク質は、図1に開示されるアミノ酸配列を有する分子；サービピンタンパク質の少なくとも約3、5、10、または15アミノ酸残基の連続的な配列を有するそれらのフラグメント；このような配列のアミノ酸配列改変体（ここでは、アミノ酸残基が、開示されるサービピン配列のNまたはC末端に挿入されるか、または開示されるサービピン配列の中に挿入される）；開示されるサービピン配列のアミノ酸配列改変体、または上述で規定されるようなそれらのフラグメント（これらは、別の残基によって置換されている）を含む。意図される改変体はさらに、例えば、相同組換え、部位特異的またはPCR変異誘発によって予め決定された変異を含む改変体、および他の動物種（ウサギ、ラット、マウス、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、および非ヒト霊長類種を含むがこれらに制限されない）の対応のサービピンタンパク質、ならびにサービピンファミリーのタンパク質の対立遺伝子改変体または他の天然の改変体；ならびに誘導體（ここでは、サービピンタンパク質は、天然に存在するアミノ酸以外の部分（例えば、酵素または放射性同位体のような検出可能な部分）を用いる、置換、化学的、酵素学的、または他の適切な手段によって、共有結合的に改変されている）を含む。組換えサービピンタンパク質はまた、2D-NMR、円二色性、およびX線結晶学により、サービピンの分子構造を解明するために使用され得、従って、部位特異的変異誘発アプローチおよび特異的な小分子インヒビターの合理的な設計を統合し得る。

以下に記載されるように、サービピンファミリーのタンパク質のメンバーは：1）細胞アポトーシスのサービピン媒介性阻害をブロックするための標的として、2）サービピンを結合する結合パートナーを同定および単離するために、3）サービピンとサービピン結合パートナーとの会合をブロックする薬剤を同定するための方法において、4）細胞アポトーシスのサービピン媒介性の阻害をアッセイするための標的として、5）単独で、または組合せ療法の一部として投与される、細胞アポトーシスをブロックする薬剤として、6）抗サービピン抗体の循環レベルを定量するためのアッセイにおける結合パートナーとして、7）次いでサービピンの循環レベルを定量するためのアッセイにおいて使用され得る、および/または免疫組織学的目的のために使用され得る抗サービピン抗体の産生を誘発するための、抗原として、ならびに8）治療学的な抗ガンワクチン、または多価のワクチンの成分として、使用され得る。

B. 抗サービピン抗体

本発明はさらに、サービピンタンパク質に選択的に結合する抗体を提供する。特に意図される抗サービピン抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびに抗原結合ドメインおよび/または1つ以上の完全な決定領域を含むフラグメントを含む。

抗体は、一般に、サービピンタンパク質、またはフラグメントを用いて、適切な哺乳動物宿主を免疫することによって、単離された免疫結合された形態で調製される（Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)）。図9は、サービピンの種々の領域の抗原指標のJameson-Wolfプロットを提供する。このような領域は、図9に提供される他の構造解析と組合わせて、サービピン特異的抗体を作製するに使用するための適切なフラグメントを提供する。タンパク質とキャリア（例えば、BSA、KLH、または他のキャリアタンパク質）との免疫原性結合体を調製するための方法は、当該分野において周知である。いくつかの状況において、例えば、カルボジイミド試薬を使用する直接的な結合が、使用され得；他の例において、連結試薬（例えば、Pierce Chemical Co., Rockford, ILによって供給される連結試薬）が、効果的であり得る。

サービピン免疫原の投与は、当該分野において一般的に理解されるように、適切な期間にわたって、および適切なアジュバントとともに注入することによって、一般に行われる。免疫スケジュールの間、抗体形成の十分性を決定するために、抗体の力価が使用され得る。

この方法において産生されるポリクローナル抗血清は、いくつかの適用について満足なものであり得るが、薬学的組成物についてはモノクローナル抗体調製物が好ましい。所望の抗体を分泌する不死化細胞株は、KohlerおよびMilsteinの標準的な方法、または一般的に知られるような、リンパ球または脾臓細胞の不死化を達成する改変を使用して、調製され

10

20

30

40

50

得る。所望の抗体を分泌する不死化細胞株は、抗体がサービピンペプチドであるイムノアッセイによって、スクリーニングされる。所望のモノクローナル抗体を分泌する適切な不死化細胞培養物が同定される場合、細胞は、インビトロで、または腹水液における産生のいずれかによって、培養され得る。

次いで、所望されるモノクローナル抗体は、培養上清から、または腹水上清から、回収される。免疫学的に有意な部分を含む、モノクローナルのフラグメントまたはポリクローナル抗血清は、アンタゴニストとして、ならびに無傷の抗体として、使用され得る。免疫学的に反応性のフラグメント（例えば、Fab、Fab'、または $f(ab')_2$ フラグメント）の使用は、これらのフラグメントは一般に、完全な免疫グロブリンよりも免疫原性が低いので、特に、治療学的情況において、しばしば好ましい。

10

抗体またはフラグメントはまた、組換え手段によって、現在の技術を用いて、生成され得る。レセプターの所望の領域に特異的に結合する領域はまた、複数の種起源のキメラまたはCDR移植された抗体の状況において、生成され得る。

このようにして生成された抗体は、サービピンとサービピン結合パートナーとの会合の調節因子としてのみでなく、サービピン発現/活性を検出するための、ならびにサービピンおよび会合される結合パートナーの精製のための、イムノアッセイにおいてもまた有用である。

C. サービピンをコードする核酸分子

本発明はさらに、サービピン、および本明細書中に記載される関連のサービピンタンパク質をコードする核酸分子を、好ましくは単離された形態で、提供する。簡便のために、全てのサービピンをコードする核酸分子は、サービピンをコードする核酸分子、サービピン遺伝子、またはサービピンと呼ばれる。本明細書中で使用されるように、「核酸」は、上述で規定されるようなペプチドをコードする、またはこのようなペプチドをコードする核酸配列に相補的である、またはこのような核酸配列にハイブリダイズし、およびストリンジентな条件下でその核酸配列に結合したままである、またはこのペプチド配列と、少なくとも75%の、好ましくは少なくとも80%の、およびより好ましくは少なくとも85%の配列同一性を共有するポリペプチドをコードする、RNAまたはDNAとして規定される。具体的に意図されるものは、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、およびアンチセンス分子、ならびに代替の骨格に基づくか、または天然の供給源に由来するかもしくは合成されるかのいずれかの代替の塩基を含む核酸分子である。しかし、このようなハイブリダイズするまたは相補的な核酸はさらに、任意の先行技術の核酸配列に対して、新規でありおよび自明でないとして規定され、本発明のサービピンタンパク質をコードする核酸分子をコードするか、またはこれにストリンジエンシー条件下でハイブリダイズするか、またはこれに相補的である核酸を含む。

20

30

本明細書中で使用されるように、核酸分子は、この核酸分子が、核酸分子の供給源からの他のポリペプチドをコードする混入する核酸から、実質的に分離される場合、「単離」されているといわれる。

本発明はさらに、サービピンをコードする核酸分子のフラグメントを提供する。本明細書中で使用されるように、サービピンをコードする核酸分子のフラグメントは、完全なタンパク質をコードする配列の小部分をいう。フラグメントのサイズは、意図される使用によって決定される。例えば、フラグメントはサービピンタンパク質の活性な部分（例えば、C末端の コイル、またはIAPモチーフ）をコードするように選択される場合、フラグメントは、サービピンタンパク質の機能的な領域をコードするのに十分に大きくある必要がある。フラグメントが核酸プローブまたはPCRプライマーとして使用される場合、フラグメントの長さは、プローブ化/プライマー化の間、比較的小さな数の偽ポジティブを得るように選択される。図1は、選択的なハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプライマーとして、特に有用であるサービピン遺伝子のフラグメントを示す。

40

プローブとして、もしくはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）についての特異的なプライマーとして、またはサービピンタンパク質をコードする遺伝子配列を合成するために使用される、本発明のサービピンをコードする核酸分子のフラグメント（すなわち、合成オリゴヌ

50

クレオチド)は、化学的な技術(例えば、Matteucciら、J Am Chem Soc (1981) 103:3185-3191のホストトリエステル法)によって、または自動化合成法を用いて、容易に合成され得る。さらに、より大きなDNAフラグメントは、周知の方法(例えば、サービピン遺伝子の種々のモジュラーセグメントを規定するオリゴヌクレオチドの群の合成後、オリゴヌクレオチドを連結して、完全に改変されたサービピン遺伝子を組み立てる)によって、容易に調製され得る。

本発明のサービピンをコードする核酸分子はさらに、診断のおよびプローブの目的のために検出可能な標識を含むように、改変され得る。上記のように、このようなプローブは、サービピンファミリーのタンパク質の他のメンバーを同定するために使用され得、ならびに以下に記載されるように、このようなプローブは、サービピン発現および腫瘍増殖潜在性を検出するために、使用され得る。多様なこのような標識は、当該分野において公知であり、および本明細書中に記載されるサービピンをコードする分子とともに、容易に用いられ得る。適切な標識としては、ビオチン、放射標識されたヌクレオチドなどが挙げられるが、これらに制限されない。当業者は、標識された、サービピンをコードする核酸分子を得るために、当該分野で公知の任意の標識を用い得る。

サービピン遺伝子は、EPR-1遺伝子のアンチセンスすなわち逆の方向にあるので、特に好ましいのは、診断の目的において使用するための1本鎖のプローブである。具体的には、1本鎖の診断プローブは、サービピンをコードするmRNAに選択的にハイブリダイズするように使用され得る。1本鎖のプローブは、2本鎖化プローブのうちの1本鎖を単離するか、または1本鎖化RNAプローブが作製される公知の方法を用いて作製され得る。

翻訳の間、タンパク質配列に取り込まれるアミノ酸配列の欠失、付加、または変更による、一次構造自身に対する改変は、タンパク質の活性を破壊することなく、なされ得る。このような置換または他の変更は、本発明の意図される範囲内にあるDNAによってコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質を生じる。

D. 他のサービピンをコードする核酸分子の単離

上記のように、ヒトサービピンをコードする核酸分子の同定は、当業者が、本明細書中に記載されるヒト配列に加えて、サービピンファミリーのタンパク質の他のメンバーをコードする核酸分子を単離することを可能にする。

本質的に、当業者は容易に、細胞から調製された発現ライブラリーをスクリーニングするための抗体プローブを作製するために、サービピンのアミノ酸配列を使用し得る。代表的に、精製サービピンタンパク質(以下に記載される)で免疫された、ウサギのような哺乳動物からのポリクローナル抗血清、またはモノクローナル抗体は、哺乳動物のcDNAまたはゲノム発現ライブラリー(例えば、gt11ライブラリー)をプローブして、サービピンまたはサービピンファミリーのタンパク質の他のメンバーの、適切なコード配列を得るために使用され得る。クローン化されたcDNA配列は、融合タンパク質として発現され得るか、その自分自身の制御配列を使用して直接的に発現され得るか、または酵素の発現のために使用される特定の宿主に対して適切である、制御配列を使用する構築物によって発現され得る。図1は、サービピンタンパク質配列において見出される、重要な抗原性ドメインおよび/または推定の作動性ドメインを同定する。このような領域は、プローブ、診断学的抗体、および治療学的抗体の生成のための、サービピンタンパク質の抗原性部分の好ましい供給源である。

あるいは、本明細書中に記載される配列をコードするサービピンの部分は、このようなタンパク質を含む任意の哺乳動物生物から、サービピンファミリーのタンパク質のメンバーをコードするDNAを回収するためのプローブとして合成され、そして使用され得る。約18~20ヌクレオチドを含む(約6~7アミノ酸範囲をコードする)オリゴマーが調製され、そしてゲノムDNAライブラリーまたはcDNAライブラリーをスクリーニングして、ストリンジেন্টな条件下のハイブリダイゼーションを得るために使用される。

さらに、オリゴヌクレオチドプライマーの対は、サービピンをコードする核酸分子を選択的にクローン化するためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)において使用するために、調製され得る。このようなPCRプライマーを使用するための、PCR変性/アニール/伸長のサイ

10

20

30

40

50

クルは、当該分野において周知であり、および他のサービピンをコードする核酸分子を単離するにおける使用のために、容易に適合され得る。図1は、プローブとしてまたはプライマーとして使用するために特に十分適切である、ヒトサービピン遺伝子の領域を同定する。

E. サービピンをコードする核酸分子を含むrDNA分子

本発明はさらに、サービピンをコードする配列を含む組換えDNA分子(rDNA)を提供する。本明細書中で使用されるように、rDNA分子は、インビトロでの分子操作に供されたDNA分子である。rDNA分子を作製するための方法は、当該分野において周知であり、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning(1989)を参照のこと。好ましいrDNA分子において、サービピンをコードするDNA配列は、発現制御配列および/またはベクター配列に作動可能に連結される。

10

本発明のサービピンをコードする配列のうちの1つが作動可能に連結される、ベクターおよび/または発現制御配列の選択は、当該分野において周知であるように、所望される機能特性(例えば、タンパク質発現)、および形質転換される宿主細胞に、直接的に依存する。本発明によって意図されるベクターは、rDNA分子に含まれるサービピン遺伝子の、複製、または宿主染色体への挿入を少なくとも指向し得、そして好ましくは発現もまた指向し得る。

作動可能に連結された、タンパク質をコードする配列の発現を調節するために使用される発現制御エレメントは、当該分野において公知であり、そしてエレメントとしては、誘導性プロモーター、構成的なプロモーター、分泌シグナル、および他の調節エレメントが挙げられるが、これらに制限されない。好ましくは、誘導性プロモーターは、容易に制御される(例えば、宿主細胞の培養液中の栄養素に反応する)。

20

1つの実施態様において、サービピンをコードする核酸分子を含むベクターは、原核生物レプリコン(すなわち、形質転換された原核生物宿主細胞(例えば、細菌宿主細胞)において、自律性の複製および組換えDNA分子の維持を、染色体外で指向する能力を有する、DNA配列)を含む。このようなレプリコンは、当該分野において周知である。さらに、原核生物レプリコンを含むベクターは、その発現が検出可能なマーカー(例えば、薬剤耐性)もまた付与する遺伝子を含み得る。代表的な細菌の薬剤耐性遺伝子は、アンピシリンまたはテトラサイクリンに対する耐性を付与する遺伝子である。

原核生物レプリコンを含むベクターはさらに、細菌宿主細胞(例えば、E.coli)においてサービピンをコードする遺伝子配列の発現(転写および翻訳)を指向し得る、原核生物プロモーターまたはウイルスプロモーターを含み得る。プロモーターは、RNAポリメラーゼの結合および転写が生じることを可能にするDNA配列によって形成される発現制御エレメントである。細菌宿主と適合性のプロモーター配列は、代表的に、本発明のDNAセグメントを挿入するために都合の良い制限部位を含有するプラスミドベクター中に提供される。代表的なこのようなベクタープラスミドは、Biorad Laboratories(Richmond, CA)から利用可能なpUC8、pUC9、pBR322、およびpBR329、Pharmacia、Piscataway, NJから利用可能なpPLおよびpKK223である。

30

真核生物細胞と適合性な発現ベクター、好ましくは脊椎動物細胞と適合性な発現ベクターはまた、サービピンをコードする配列を含むrDNA分子を形成するために使用され得る。真核生物細胞発現ベクターは、当該分野において周知であり、そして種々の市販の供給源から利用可能である。代表的に、このようなベクターは、所望のDNAセグメントの挿入のために都合の良い制限部位を含んで提供される。このようなベクターの代表例は、PSVLおよびpKSV-10(Pharmacia)、pBPV-1/pML2d(International Biotechnologies, Inc.)、pTD T1(ATCC、番号31255)、本明細書中に記載されるベクターpCDM8、および類似の真核生物発現ベクターである。

40

本発明のrDNA分子を構築するために使用される、真核生物細胞発現ベクターはさらに、真核生物細胞において効果的である選択マーカー、好ましくは薬剤耐性選択マーカーを含み得る。好ましい薬剤耐性マーカーは、その発現がネオマイシン耐性を生じる遺伝子、すなわち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子である。Southernら、J Mol

50

Anal Genet (1982) 1:327-341。あるいは、選択マーカーは、別々のプラスミドに存在し得、そして2つのベクターは、宿主細胞の同時トランスフェクションによって導入され、選択マーカーについての適切な薬剤中で培養することによって選択される。

F. 外因的に供給されたサービピンをコードする核酸分子を含む宿主細胞

本発明はさらに、本発明のサービピタンパク質をコードする核酸分子で形質転換された宿主細胞を提供する。宿主細胞は、原核生物または真核生物のいずれかであり得る。サービピタンパク質の発現に有用である真核生物細胞は、細胞株が細胞培養法に適合性であり、ならびに発現ベクターの増殖およびサービピン遺伝子産物の発現に適合性である限り、制限されない。好ましい真核生物宿主細胞としては、酵母、昆虫、および哺乳動物の細胞、好ましくは脊椎動物の細胞（例えば、マウス、ラット、サル、またはヒト線維芽細胞株からの細胞）が挙げられるが、これらに制限されず、最も好ましくは、天然でサービピタンパク質を発現しない細胞である。好ましい真核生物宿主細胞としては、マウスIL-3依存性の細胞株BaF3、および類似の真核生物組織培養細胞株が挙げられる。

任意の真核生物宿主は、サービピンをコードするrDNA分子を発現するために使用され得る。好ましい原核生物宿主は、E.coliである。

本発明のrDNA分子での、適切な細胞宿主の形質転換は、使用されるベクター型および用いられる宿主系に代表的に依存する、周知の方法によって達成される。原核生物宿主細胞の形質転換に関して、エレクトロポレーションおよび塩処理法が、代表的に用いられ得、例えば、Cohenら、Proc Natl Acad Sci USA (1972) 69:2110；およびManiatisら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982)を参照のこと。rDNAを含有するベクターでの、脊椎動物細胞の形質転換に関して、エレクトロポレーション、カチオン性脂質処理法、または塩処理法が、代表的に用いられ、例えば、Grahamら、Virol (1973) 52:456；Wiglerら、Proc Natl Acad Sci USA (1979) 76:1373-76を参照のこと。

首尾良く形質転換された細胞（すなわち、本発明のrDNA分子を含有する細胞）は、周知の技術によって同定され得る。例えば、本発明のrDNAの導入から生じる細胞は、クローン化されて、単一のコロニーを生成し得る。これらのコロニーからの細胞は、採集され得、溶解され得、そしてそのDNA成分は、Southern、J Mol Biol (1975) 98:503、もしくはBrentら、Biotech (1985) 3:208に記載されるような方法を用いて、rDNAの存在について試験され得るか、またはタンパク質が免疫学的方法を介してアッセイされた細胞から産生され得る。

G. サービピタンパク質をコードするrDNA分子を使用するサービピンの生成

本発明はさらに、本明細書中に記載されるサービピンをコードする核酸分子のうちの1つを使用する、サービピタンパク質を生成するための方法を提供する。一般的な用語において、サービピタンパク質の組換え形態の生成は、代表的に、以下の工程を包含する。まず、図1に記載される核酸分子のような、サービピタンパク質をコードする核酸分子が得られる。サービピンをコードする配列がイントロンによって中断されない場合、これは任意の宿主における発現について、直接的に適切である。次いで、そうでない場合、サービピンをコードする核酸分子のスプライスされた形態が、生成され得、そして使用され得るか、またはイントロン含有核酸分子は、適合性の真核生物発現系において使用され得る。

次いで、サービピンをコードする核酸分子は、上記のように、好ましくは、適切な発現制御配列との作動可能な連結において配置され、サービピンをコードする配列を含む発現単位を形成する。発現単位は、適切な宿主を形質転換するために使用され、そして形質転換された宿主は、サービピタンパク質の産生を可能にする条件下で培養される。必要に応じて、サービピタンパク質は、培地からまたは細胞から単離され；タンパク質の回収および精製は、いくらかの不純物が可能にされ得るいくつかの例において、必要とされなくてもよい。

上述の工程のそれぞれは、多様な方法においてなされ得る。例えば、所望されるコード配列は、ゲノムフラグメントから得られ得、そして適切な宿主において直接的に使用され得

10

20

30

40

50

る。多様な宿主において作動可能である、発現ベクターの構築は、上記のように、適切なレプリコンおよび制御配列を用いて達成される。制御配列、発現ベクター、および形質転換法は、遺伝子を発現するために使用される宿主細胞の型に依存し、ならびに以前に詳細に記載された。適切な制限部位が、通常利用可能でない場合、これらのベクターへ挿入するための切り出し可能な遺伝子を提供するように、コード配列の末端に付加され得る。当業者は、サービピンタンパク質を生成するために、サービピンコード配列とともに使用するための、当該分野において公知の、任意の宿主/発現系を、容易に適合し得る。

H. サービピンを使用する細胞死の阻害

上述で提供されるように、サービピンが、細胞アポトーシスを阻害することが示されている。従って、サービピンは、細胞の寿命を延ばすための方法において使用され得る。一般

10

に、細胞アポトーシスは、細胞とサービピンとを接触することによって阻害され得る。細胞アポトーシスを阻害することが所望される多くの状況がある。例えば、輸送および移植のために調製される組織または器官における細胞死は、サービピンタンパク質を用いて阻害され得る。あるいは、細胞株は、細胞株において発現される、サービピンをコードする核酸分子を用いる長期間の培養のために樹立され得る。

これゆえ、サービピンタンパク質またはサービピン遺伝子発現は、細胞アポトーシスを阻害するための手段として使用され得る。細胞培養系において、サービピンタンパク質は、アポトーシスを阻害するために、例えば、リポソームの、Penetrin-1送達を介して、細胞に導入され得るか、または細胞増殖培地中の封入物であり得る。あるいは、サービピン遺伝子は、培養における細胞の寿命を増加するために細胞に導入され得、そして発現され得る。これらは、培養された細胞が、所望される化合物を産生する能力を増加するための手段および方法を提供し、ならびに細胞および組織の初代外殖片の長期の培養を樹立する方法を提供する。

20

組織移植片において、代表的に、組織および器官は、移植の前に、保存および輸送される。アポトーシスに類似の機構による、細胞死は、組織または器官の生存性の損失を導き得る。この設定において、サービピンタンパク質での注入は、このような組織および器官における細胞死を阻害するための方法として使用され得る。

早発のおよび非所望の細胞アポトーシスによって特徴付けられる病理学的状態が、例えば、加速された老化異常において、存在する。IAPタンパク質における不活性化変異が、ヒト疾患を引き起こし得ることは、既に知られている。この例は、NAIPについてである（上述を参照のこと）。SMA（脊髄の筋肉萎縮、異常に増加されたアポトーシスによって引き起こされると考えられる、神経退行性疾患）を伴う患者の研究によって、NAIP遺伝子が不活性化され、そしてこれらの患者の75%において欠失されることが実証された（Royら、1995、Cell 80:167）。拡張して、サービピンにおける変異を不活性化することは、異常に増加される細胞死によって特徴付けられる退行性疾患を生じ得る。染色体17q25上のサービピン遺伝子座内、またはその周辺のハプロタイプなマーカーは、その遺伝子座が、増加されたアポトーシスを伴う疾患に既に関係しているか否かを決定するための、集団遺伝学の研究において使用され得る。このような場合において、サービピン遺伝子またはサービピンタンパク質は、その状態を処置するために使用され得る。従って、サービピンタンパク質、またはサービピンをコードする核酸分子は、異常なアポトーシスを処置する手段として、個体に投与される。

30

40

I. サービピン結合パートナーを同定するための方法

本発明の別の実施態様は、サービピンの結合パートナーを単離および同定するにおいて使用するための方法を提供する。具体的には、サービピンタンパク質は、サービピン結合パートナーを同定するための捕獲プローブとして使用され得る。本明細書中で使用されるように、サービピン結合パートナーは、サービピンに結合し、そして細胞アポトーシスのサービピン阻害を媒介する、生体分子（例えば、タンパク質、DNA、または他の補因子）である。

詳細には、サービピンタンパク質は、結合パートナーとサービピンとの会合を可能にする条件下で、サービピンを発現する細胞の抽出物または画分と混合される。混合後、サービ

50

ピンと会合するようになったペプチドは、混合物から分離される。次いで、サービピンを結合する結合パートナーは、回収され得、そしてさらに分析され得る。

結合パートナーを同定および単離するために、完全なサービピタンパク質が使用され得る。あるいは、サービピタンパク質のフラグメントが使用され得る。

本明細書中で使用されるように、細胞抽出物は、溶解されたまたは破壊された細胞から作製される、調製物または画分をいう。細胞抽出物の好ましい供給源は、サービピンを天然で発現する細胞である。このような細胞の例としては、腫瘍細胞および胚組織が挙げられるが、これらに制限されない。

細胞の抽出物を得るために、多様な方法が使用され得る。細胞は、物理的または化学的な破壊法のいずれかを用いて、破壊され得る。物理的破壊法の例としては、超音波処理および機械的剪断が挙げられるが、これらに限定されない。化学的溶解法の例としては、界面活性剤溶解および酵素溶解が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、細胞抽出物は、被験体から新鮮に単離された細胞から、または培養されている細胞もしくは細胞株から、調製され得る。当業者は、本発明の方法において使用するための抽出物を得るために、細胞抽出物を調製するための方法を、容易に適合し得る。

いったん細胞の抽出物が調製されると、抽出物は、サービピンと結合パートナーとの会合が生じ得る条件下で、サービピタンパク質とともに混合される。多様な条件が使用され得、最も好ましいのは、サービピンを発現する細胞の細胞質において見出される条件に密接に類似する条件である。浸透圧、pH、温度、および使用される細胞抽出物の濃度のような特徴は、サービピンと結合パートナーとの会合を至適化するために変化され得る。

適切な条件下での混合後、サービピンは混合物から分離される。混合物を分離するために、多様な技術が利用され得る。例えば、サービピンに特異的な抗体が、サービピンおよび会合された結合パートナーを免疫沈降するために使用され得る。あるいは、標準的な化学分離技術（例えば、クロマトグラフィーおよび密度 / 沈殿物遠心分離）が使用され得る。抽出物において見出される非会合の細胞成分の除去後、結合パートナーは、従来の方法を用いて、サービピタンパク質から解離され得る。例えば、解離は、混合物の塩濃度またはpHを変化することによって、達成され得る。

混合された抽出物から、会合されたサービピン / 結合パートナー対を分離するのに補助するために、サービピタンパク質は、固相支持体上で固定化され得る。例えば、サービピンは、ニトロセルロースマトリクスまたはアクリル性ビーズに付着され得る。固相支持体へのサービピンの付着はさらに、抽出物において見出される他の成分から、ペプチド / 結合パートナー対を分離するのに補助する。

あるいは、サービピンをコードする核酸分子は、酵母ツーハイブリッド系において使用され得る。酵母ツーハイブリッド系は、他のタンパク質パートナー対を同定するために使用されており、および本明細書中に記載されるサービピンをコードする分子を用いるために、容易に適合され得る。

J. サービピン結合パートナーの使用

いったん単離されたら、上記の方法を用いて得られたサービピン結合パートナーは、多様な目的のために使用され得る。結合パートナーは、当該分野において公知の技術を用いて、サービピン結合パートナーに結合する抗体を作製するために使用され得る。サービピンに結合するパートナーを結合する抗体は、サービピン活性をアッセイするために、サービピンによって媒介される生物学的もしくは病理学的プロセスを調節するための、または結合パートナーを精製するための治療学的薬剤として、使用され得る。これらの使用は、以下に詳細に記載される。

K. サービピン / 結合パートナー相互作用をブロックする薬剤を同定するための方法

本発明の別の実施態様は、サービピンとサービピン結合パートナーとの会合を減少またはブロックする薬剤を同定するための方法を提供する。具体的には、サービピンは、試験される薬剤の存在下または非存在下で、サービピン結合パートナーとともに混合される。サービピンとサービピン結合パートナーとの会合を許容する条件下での混合後、2つの混合物は、薬剤が、サービピンとサービピン結合パートナーとの会合を減少またはブロックし

10

20

30

40

50

たか否かを決定するために、分析および比較される。サービピンとサービピン結合パートナーとの会合を減少またはブロックする薬剤は、試験される薬剤を含むサンプルに存在する会合の量を減少するとして、同定される。

本明細書中で使用されるように、薬剤の存在が、サービピン結合パートナーがサービピンと会合されるようになる程度を減少するか、またはこれを妨げる場合、薬剤は、サービピン/サービピン結合パートナー会合を減少またはブロックするといわれる。一方のクラスの薬剤は、サービピン結合パートナーに結合することによって、会合を減少またはブロックするのに対し、他方のクラスの薬剤は、サービピンに結合することによって会合を減少またはブロックする。

上述のアッセイにおいて使用されるサービピン結合パートナーは、単離および十分に特徴付けられたタンパク質であり得るか、またはサービピン、もしくは細胞抽出物に存在するとして同定されているサービピン結合パートナーに結合する部分的に特徴付けられたタンパク質であり得るかのいずれかである。サービピン結合パートナーが、同定可能な特性（例えば、分子量）によって特徴付けられている限り、本アッセイが使用され得ることは、当業者に明らかである。

上述の方法においてアッセイされる薬剤は、ランダムに選択され得るか、または合理的に選択もしくは設計され得る。本明細書中に記載されるように、薬剤が、サービピンとサービピン結合パートナーとの会合に関与する特定の配列を考慮しないで、ランダムに選択される場合、薬剤は、ランダムに選択されるといわれる。ランダムに選択された薬剤の例は、化学ライブラリーもしくはペプチドコンビナトリアルライブラリー、または生物の増殖

プロスの使用である。

本明細書中で使用されるように、薬剤が、薬剤の作用と関連する、標的部位の配列および/またはその配座を考慮するランダムでない基準に基づいて選択される場合、薬剤は、合理的に選択または設計されるといわれる。上記のように、サービピン/サービピン結合パートナー相互作用をブロックする薬剤について、作用の2つの部位が存在する：サービピンにおける結合パートナー接触部位、およびサービピン結合パートナーにおけるサービピン接触部位。薬剤は、サービピン/サービピン結合パートナー対の接触部位を構成するペプチド配列を利用することによって、合理的に選択されるか、または合理的に設計され得る。例えば、合理的に選択されるペプチド薬剤は、そのアミノ酸配列が、サービピン結合パートナーにおけるサービピン接触部位に同一であるペプチドであり得る。このような薬剤は、サービピン結合パートナーに結合することによって、サービピンと結合パートナーとの会合を減少またはブロックする。

本発明の薬剤は、例示されるように、ペプチド、小分子、ビタミン誘導体、ならびに炭水化物であり得る。当業者は、本発明の薬剤の構造的性質に関して制限はないことを、容易に認識し得る。本発明のあるクラスの薬剤は、そのアミノ酸配列がサービピンタンパク質のアミノ酸配列に基づいて選択される、ペプチド薬剤である。

本発明のペプチド薬剤は、当該分野において知られるように、標準的な固相（または液相）ペプチド合成法を使用して、調製され得る。さらに、これらのペプチドをコードするDNAは、市販のオリゴヌクレオチド合成装置を使用して合成され得、および標準的な組換え産生系を使用して、組換え的に産生され得る。固相ペプチド合成法を使用する生成は、遺伝子コードされないアミノ酸が含まれる場合、必要とされる。

本発明の別のクラスの薬剤は、サービピンまたはサービピン結合パートナーの重要な位置と免疫応答性の抗体である。上記のように、抗体は、抗原性領域として、抗体によって標的されることが意図される、サービピンまたは結合パートナーのそれらの部分を含むペプチドでの、適切な哺乳動物被験体の免疫によって得られる。重要な領域は、サービピンとサービピン結合パートナーとの会合に関与する接触部位を含む。

以下に考察されるように、サービピン活性に関与する残基の重要な最小の配列は、潜在的なサービピン会合分子のツーハイブリッドスクリーニングおよび同定についてのベイト（bait）として効果的に使用され得る、機能的な線状のドメインを規定する。このようなサービピンフラグメントの使用は、完全長の分子または完全なBIRドメインの使用とは対照

10

20

30

40

50

的に、スクリーニングの特異性を有意に増加し、それゆえ好ましい。同様に、この線状の配列はまた、生化学的アフィニティー精製戦略を用いてサービピン結合タンパク質を単離するためのアフィニティマトリクスとしてもまた、使用され得る。

L. サービピンとサービピン結合パートナーとの会合をブロックする薬剤についての使用背景の節において提供されるように、サービピンは、細胞アポトーシスを阻害する。サービピンとサービピン結合パートナーとの相互作用を減少またはブロックする薬剤は、サービピンの機能および活性と関連する生物学的および病理学的プロセスを調節するために使用され得る。

詳細には、サービピンによって媒介される生物学的または病理学的プロセスは、サービピンとサービピン結合パートナーとの相互作用をブロックする薬剤を、被験体に投与することによって調節され得る。

10

本明細書中で使用されるように、被験体は、哺乳動物が、サービピンによって媒介される生物学的または病理学的プロセスの調節を必要とする限り、任意の哺乳動物であり得る。用語「哺乳動物」は、哺乳類に属する個体を意味する。本発明は、ヒト被験体の処置において特に有用である。

本明細書中で使用されるように、サービピン、またはサービピン結合パートナーへのサービピン結合によって媒介される生物学的または病理学的プロセスは、サービピンによって媒介される広範に多様な細胞事象をいう。病理学的プロセスは、有害な影響を生じる生物学的プロセスのカテゴリーをいう。例えば、サービピンによって媒介される病理学的プロセスは、腫瘍細胞における細胞アポトーシスの阻害である。この病理学的プロセスは、サービピン/サービピン結合パートナー会合を減少もしくはブロックする、またはサービピン発現をブロックする薬剤を用いて、調節され得る。

20

本明細書中で使用されるように、薬剤は、薬剤が病理学的プロセスの程度または重篤度を減少する場合、この病理学的プロセスを調節するといわれる。例えば、薬剤が細胞分裂の速度または程度を減少する場合、薬剤は、腫瘍細胞増殖を調節するといわれる。

M. サービピン、またはサービピン活性に影響する薬剤の投与

本発明の薬剤は、サービピン/結合パートナー会合またはサービピンタンパク質をブロックする薬剤であり、非経口経路、皮下経路、静脈内経路、筋肉内経路、腹腔内経路、経皮経路、または頬内経路を介して投与され得る。あるいは、または同時に、投与は経口経路によってであり得る。投与される投薬量は、レシピエントの年齢、健康度、および体重、同時処置される種類（もしあれば）、処置の頻度、ならびに所望される効果の性質に依存する。例えば、アポトーシスのサービピン阻害をブロックする手段として、腫瘍細胞を処置するために、サービピン発現またはサービピンと結合パートナーとの相互作用をブロックする薬剤が、処置される個体に全身的にまたは局所的に投与される。以下に記載されるように、このような薬剤を投与するために容易に適合され得る多くの方法がある。

30

本発明はさらに、サービピン、またはサービピン/結合パートナー会合をブロックする1つ以上の薬剤を含有する、組成物を提供する。個体の必要性は変化するが、各成分の有効な量の至適な範囲の決定は、当業者の範囲内である。典型的な投薬量は、 $0.1 \sim 100 \mu\text{g/kg}$ 体重を含む。好ましい投薬量は、 $0.1 \sim 10 \mu\text{g/kg}$ 体重を含む。最も好ましい投薬量は、 $0.1 \sim 1 \mu\text{g/kg}$ 体重を含む。

40

薬理学的に活性な薬剤に加えて、本発明の組成物は、薬学的に受容可能な適切なキャリアを含み得、これは、作用の部位に送達するために薬学的に使用され得る調製物への活性な化合物のプロセッシングを容易にする、賦形剤および補助剤を含む。非経口投与のために適切な処方物は、水溶性形態の活性化合物（例えば、水溶性の塩）の水溶液を含む。さらに、適切な油性の注入懸濁液としての活性化合物の懸濁液が、投与され得る。適切な親油性溶媒またはベヒクルは、脂肪油（例えば、ゴマ油）または合成の脂肪酸エステル（例えば、エチルオレイン酸またはトリグリセリド）を含む。水性注入懸濁液は、懸濁液の粘度を増加する物質（例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、および/またはデキストランを含む）を含み得る。必要に応じて、懸濁液はまた、安定剤を含み得る。リボソームはまた、細胞への送達のために、薬剤をカプセル化するために使用され

50

得る。

本発明に従う全身性投与についての薬学的組成物は、腸投与、非経口投与、または局所投与について処方され得る。実際、処方物の全ての3つのタイプは、有効成分の全身性投与を達成するために、同時に使用され得る。

経口投与のための適切な処方物は、堅質または軟質ゼラチンカプセル、丸剤、錠剤（コートされた錠剤を含む）、エリキシル、懸濁液、シロップ、または吸入薬、およびそれらの制御された放出形態を含む。

本発明の方法を実施するために、本発明の化合物は、単独でもしくは組合わせて、または他の治療剤または診断剤と組合わせて、使用され得る。特定の好ましい実施態様において、本発明の化合物は、一般的に受容されている医療の実施に従って、これらの状態について典型的に処方される他の化合物（例えば、化学療法剤）とともに同時投与され得る。

N．組合せ療法

サービピン、ならびにサービピン活性を調節する本発明の薬剤は、単独で、または特定の生物学的または病理学的プロセスを調節する別の薬剤と組合わせて、提供され得る。例えば、サービピンで阻害されるアポトーシスを減少する本発明の薬剤は、ガン細胞増殖を制御するための方法において、他の抗ガン剤と組合わせて投与され得る。あるいは、サービピンは、細胞アポトーシスを減少するための手段として、他の防御的な薬剤とともに投与され得る。本明細書中で使用されるように、2つの薬剤が、同時に投与される場合、または薬剤が同時に作用するような様式で独立して投与される場合、2つの薬剤は、組合わせて投与されるといわれる。

サービピン活性／発現の阻害は、従来の化学療法と組合わせて使用され得る。サービピン活性／発現の阻害と組合わせて化学療法剤を使用するためのタイミングは、使用される化学療法剤および処置される腫瘍細胞型に依存する。サービピン活性／発現を達成する薬剤と組合わせて使用され得る化学療法剤の例としては、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド（CTX；シトキサン）、クロラムブシル（CHL；ロイケラン）、シスプラチン（CisP；プラチノール）、ブスルファン（ミレラン）、メルファラン、カルムスチン（BCNU）、ストレプトゾトシン、トリエチレンメルアミン（TEM）、マイトマイシンC、および類似のアルキル化剤）；抗代謝剤（例えば、メトトレキセート（MTX）、エトポシド（VP16；ベベシド（vepesid））、6-メルカプトプリン（6MP）、6-チオグアニン（6-thioguanine）（6TG）、シタラビン（Ara-C）、5-フルオロウラシル（5FU）、ダカルバジン（DTIC）、および類似の抗代謝剤）；抗生物質（例えば、アクチノマイシンD、ドキソルビシン（DXR；アドリアマイシン）、ダウノルビシン（ダウノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、および類似の抗生物質）；アルカロイド（例えば、ビンカアルカロイド（例えば、ビンクリスチン（VCR）、ビンブラスチンなど）；ならびに他の抗腫瘍剤（例えば、タキソールおよびタキソール誘導体）、細胞増殖抑制性の薬剤の糖質コルチコイド（例えば、デキサメタゾン（DEX；デカドロン）およびコルチコステロイド（例えば、プレドニゾン）、ヌクレオシド酵素インヒビター（例えば、ヒドロキシ尿素）、アミノ酸欠失化酵素（例えば、アスパラギナーゼ）および類似の多様な抗腫瘍剤を含むが、これらに限定されない。

化学療法レジメンにおける上記の細胞傷害性薬剤の使用は、一般に、ガン治療の分野において十分に特徴付けられており、およびそれらの本明細書中での使用は、いくつかの調整を伴って、耐性および有効性をモニターすることについて、および投与経路および投薬量を制御することについて、同じ考慮下にある。例えば、細胞傷害性薬剤の実際の投薬量は、本発明の組織培養法を用いることによって決定される、患者の培養された細胞の応答に依存して、変化し得る。一般に、投薬量は、サービピン活性／発現を達成する薬剤の非存在下で使用される量に比べて、減少される。

有効な細胞傷害性薬剤の典型的な投薬量は、製造業者によって推奨される範囲内であり得、そしてインビトロ応答、または動物モデルにおける応答によって示される場合、約一桁の等級まで、濃度または量を減少され得る。従って、実際の投薬量は、臨床医の判断、患者の状態、および初代培養された悪性細胞もしくは組織培養された組織サンプルのインビ

トロ応答、または適切な動物モデルにおいて観察される応答に基づく治療方法の有効性に依存する。

O. サービピン発現およびアポトーシスのサービピン媒介性の阻害を同定するための方法
本発明はさらに、アポトーシスのサービピン媒介性の阻害に関与する細胞を同定するための方法、ならびにサービピン活性と関連する生物学的および病理学的プロセス、このような状態の進行、処置に対するこのような状態の感受性、およびこのような状態についての処置の有効性を診断するために適用され得る技術を提供する。具体的には、アポトーシスのサービピン媒介性の阻害は、サービピンタンパク質が細胞において発現されるか否かを決定することによって同定され得る。サービピンを発現する細胞は、天然の細胞アポトーシスから阻害されると考えられる。

10

多様な免疫学的技術および核酸技術が、サービピンタンパク質、またはサービピンをコードするmRNAが、特定の細胞において産生されるか否かを決定するために使用され得る。1つの例において、細胞の抽出物が調製される。次いで、調製物は、サービピンが細胞において発現されるか否かを決定するために、アッセイされる。発現の程度は、アポトーシスの阻害の程度の測定を提供する。発現の増加は、アポトーシスの増加された阻害の測定である。

サービピン発現の測定は、多様な目的についてのマーカーとして使用され得る。腫瘍において、サービピン発現の存在は、腫瘍の増殖可能性と相関する。実施例において、リンパ腫が、サービピン発現の種々のレベルを示すことが示され；サービピン発現をほとんど〜全く示さないリンパ腫は、効果的に処置され得る低い悪性度分類のリンパ腫であるが、サービピン発現の高いレベルを示すリンパ腫は、典型的に効果的に処置され得ない高い悪性度分類の攻撃的なリンパ腫である。従って、リンパ腫または他の腫瘍におけるサービピン発現のレベルは、腫瘍の攻撃性および処置可能性の予測的な測定として使用され得；サービピン発現のレベルが高いほど、腫瘍の攻撃性がより高くなり、そして処置がより困難になる。

20

例えば、腫瘍の増殖可能性または処置の容易性/予後を決定するために、抽出物が、腫瘍細胞から作製され、次いで抽出物は、例えば、ゲル電気泳動によって分析されて、サービピンタンパク質が存在するか否かを決定する。サービピンの存在およびレベルは、ガンの増殖可能性および処置の容易性と相関する。あるいは、上記のように、一本鎖プローブが、細胞抽出物におけるサービピンをコードするmRNAを同定するために使用され得る。

30

腫瘍攻撃性および処置可能性のマーカーであることに加えて、サービピン発現は、抗腫瘍治療の有効性の測定として使用され得る。実施例において、HL-60（前骨髄球細胞株）は、高レベルのサービピン発現を有したことが示される。レチノール酸（retenoic acid）、および腫瘍細胞の分化を引き起こすことにより作用する抗ガン剤でのHL-60細胞の処置は、サービピン発現の減少および排除を生じた。発現の減少は、分化の程度と相関し、分化が進むほど、サービピンの発現のレベルは低くなった。従って、サービピン発現は、抗腫瘍処置の有効性を測定するために使用され；処置の間にサービピン発現が減少する場合、処置プロトコルは有効であり、そして継続され得、一方サービピン発現が変化しないままである場合、異なる治療レジメン（regime）またはプロトコルが、行われることが必要とされる。

40

P. サービピン発現を制御するための他の方法

本発明はさらに、細胞におけるサービピン発現を制御するために使用され得る、さらなる方法を提供する。上述および以下に考察されるように、サービピンプロモーターは、そのプロモーターから上流のCPG島を有する。CPG島は、DNAメチル化の公知の標的である。CPG島におけるDNAメチル化部位は、サービピン発現を調節するための手段として作用し；CPG島のメチル化は、プロモーターから下流に見出される遺伝子の転写の抑制を生じる。従って、DNAをメチル化する薬剤（例えば、DNAメチラーゼ）、および内因性メチラーゼの産生を刺激する薬剤は、サービピン発現を制御するために使用され得る。具体的には、細胞におけるサービピン発現は、細胞に、DNAメチル化のレベルを、特にサービピン遺伝子から上流において見出されるCPG島で、増加させることによって、減少または排除され得る。

50

別の方法において、サービピン発現は、EPR-1発現のレベルを増加することによって減少され得る。実施例において示されるように、サービピン発現およびEPR-1発現は、一般的に相互に排他的であり、EPR-1の発現は、サービピン発現の減少または排除を生じ、そしてその逆も当てはまる。従って、サービピン発現は、細胞に、EPR-1発現を増加させることによって、減少され得る。

Q．動物モデル

本発明者らは、マウスサービピン遺伝子のほとんど完全な構造を単離した。遺伝子は、そのヒト対応物に関して非常に保存されている（イントロン、エクソンの大きさ、およびイントロン-エクソン境界を含む）。マウスサービピン遺伝子のコード領域は、88%であり、配列決定された限り、ヒトタンパク質と同一であり、それによって、強力な進化的保存が実証される。本発明者らはまた、ヒトおよびマウスの両方の発生の間の、サービピンの分化、および発生的に調節される分布を決定した。マウスサービピン遺伝子およびタンパク質の完全の構造の利用可能性は、遺伝子ノックアウト実験についての標的化ベクターの調製、および組織特異的プロモーターの制御下でサービピンを発現するトランスジェニックマウスの作製についてのより合理的なアプローチを許容する。

サービピン遺伝子およびサービピンタンパク質は、多様な状況における遺伝子治療の標的として作用し得る。例えば、1つの適用において、サービピン欠損非ヒト動物が、サービピン遺伝子を入活性化するための標準的なノックアウト手順を使用して作製され得るか、またはこのような動物が生存可能でない場合、誘導性のサービピンアンチセンス分子が、サービピン活性/発現を調節するために使用され得る。あるいは、動物は、組織特異的な様式において、サービピンまたはアンチセンス分子の発現を指向する、サービピンまたはアンチセンスサービピンの発現単位を含むように変化され得る。このような使用において、サービピン遺伝子の発現が、不活性化または活性化によって変化される、非ヒト哺乳動物（例えば、マウスまたはラット）が作製される。これは、当該分野で公知の多様な手順（例えば、標的化組換え）を用いて、達成され得る。いったん作製されたら、サービピン欠損動物、組織特異的な様式においてサービピンを発現する動物、またはアンチセンス分子を発現する動物は、1)サービピンによって媒介される生物学および病理学的プロセスを同定するために、2)サービピンと相互作用するタンパク質および他の遺伝子を同定するために、3)サービピン欠損を克服するために外因的に供給され得る薬剤を同定するために、ならびに4)活性を増加または減少するサービピン内の変異を同定するための適切なスクリーニングとして作用するために、使用され得る。

例えば、組織特異的な様式においてサービピンのヒトミニ遺伝子が発現するトランスジェニックマウスを作製し、そして通常はサービピンを含まない区域における、このタンパク質の過剰発現の効果を試験することが可能である。この戦略は、別のファミリーのアポトーシスインヒビター、すなわちbcl-2について、首尾良く使用されている（Veisら、Cell（1993）75:229）。このようなアプローチは、サービピンタンパク質に容易に適合され得、そして、アポトーシスから細胞を防御するために、特定の組織領域（移植片）においてサービピンの潜在的な有益な効果の問題に取り組むために使用され得る。

R．サービピン遺伝子治療

別の実施態様において、遺伝子治療は、サービピン媒介性の生物学または病理学的プロセスを調節するための手段として使用され得る。例えば、腫瘍治療において、サービピン発現の調節因子をコードする遺伝子発現単位（例えば、アンチセンスをコードする核酸分子）を、処置される被験体に、導入することが所望され得る。このような調節因子は、細胞もしくは特定の標的細胞内で、構成的に産生され得るか、または誘導性であるかのいずれかであり得る。これは、被験体内でのサービピン発現の調節因子の、継続的なまたは誘導性の供給を許容する。サービピン発現をブロックすることは、腫瘍細胞増殖の制御を許容する。同様に、細胞は、例えば、移植のために同種移植片臓器細胞において、サービピンを発現するように、遺伝子操作され得る。

サービピン遺伝子の発現のレベルは、アポトーシスに対する耐性のレベルと相関し得る。従って、サービピン遺伝子はまた、抗アポトーシス遺伝子治療における使用を見出す。特

10

20

30

40

50

に、機能的なサービピン遺伝子は、神経退行性疾患の過程においてアポトーシスを受けるニューロン細胞、リンパ球（すなわち、T細胞およびB細胞）、または虚血によって傷害されている細胞を維持するために使用され得る。

レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、またはアポトーシスに関与する傾向がある細胞（例えば、上皮細胞）についての適切な向性を有する他のウイルスベクターは、治療学的なサービピン遺伝子構築物についての遺伝子移入送達系として使用され得る。この目的のために有用な多数のベクターが、一般的に公知である（Miller、Human Gene Therapy 15:14、1990；Friedman、Science 244:1275-1281、1989；EglitisおよびAnderson、Bio Techniques 6:608-614、1988；TolstoshevおよびAnderson、current opinion in biotechnology 1:55-61、1990；Sharp、The Lancet 337:1 277-1278、1991；Cornettaら、Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-3 22、1987；Anderson、Science 226:401-409、1984；Moen、blood Cells 17:407-416、199 1；Millerら、Biotechniques 7:980-990、1989；Le Gal La Salleら、Science 259:988-9 90、1993；およびJohnson、Chest 107:77S-83S、1995）。レトロウイルスベクターは、特 に十分に開発され、そして臨床的設定において使用されている（Rosenbergら、N.Engl.J. Med 323:370、1990；Andersonら、米国特許第5,399,346号）。

非ウイルスアプローチはまた、そうでなければアポトーシスを受けることが予測される細胞へ、治療学的DNAを導入するために用いられ得る。例えば、サービピンは、リポフェク ション（Feignerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413、1987；Onoら、Neurosci. Le tt. 117:259、190；Brighamら、Meth. Enz. 101:512、1983）、アシアロロソヌコイド（a sialorosonucoid）-ポリリジン結合（Wuら、J. Biol. Chem. 263:14621、1988；Wuら、J. Biol. Chem. 264:16985、1989）；またはあまり好ましくないが、外科的条件下でのマイ クロインジェクション（Wolffら、Science 247:1465、1990）によって、ニューロンまた はT細胞に導入され得る。

上記の適用の任意の方法について、治療学的サービピン核酸構築物は、好ましくは、予測 されるアポトーシス事象の部位に（例えば、注入によって）適用される。しかし、構築物 はまた、予測されるアポトーシス事象の近傍における組織に、またはアポトーシスを受け ることが予測される細胞を供給する血管に、適用され得る。

記載される構築物において、サービピンcDNA発現は、任意の適切なプロモーター（例えば 、ヒトサイメトガロウィルス（CMV）、シミアンウイルス40（SV40）、またはメタロチオ ネインのプロモーター）から指向され得、そして任意の適切な哺乳動物調節エレメントに よって調節され得る。例えば、所望される場合、神経細胞、T細胞、B細胞における遺伝 子発現を優先的に指向することが知られるエンハンサーが、サービピン発現を指向するた めに使用され得る。使用されるエンハンサーとしては、それらの発現において組織または 細胞に特異的であるとして特徴付けられるエンハンサーが挙げられるが、これらに制限さ れない。あるいは、サービピンゲノムクローンが、治療学的構築物として（例えば、上記 のサービピンcDNAとのハイブリダイゼーションによる単離後に）使用される場合、調節は 、同起源の調節配列によって、または、所望される場合、異種供給源に由来する調節配列 （上記の任意のプロモーターまたは調節エレメントを含む）によって、媒介され得る。

S. 遺伝子発現を指向するためのサービピンプロモーターの使用

本発明はさらに、発現ベクターの作製に使用され得る形態のサービピン遺伝子のプロモー ターを提供する。具体的には、サービピンプロモーターは、サービピンのATG開始コドン から5'であるとして同定され、作動可能に連結された、タンパク質をコードするDNA配 列の発現を指向するために使用され得る。サービピンプロモーターは、TATAボックスを有 しないので、当業者は、5'フラグメント（例えば、ヌクレオチド2560～2920（エキソン 1を含む））を使用する。サービピンプロモーターは、胎児組織において発現され、それ ゆえ、発生の特定の段階の間、特異的な細胞型における、タンパク質発現を標的するため に使用され得る。以下に考察されるように、c-mycガン遺伝子での、3T3細胞のトランスフ ェクションは、ノザンプロットによって検出されるように、サービピンmRNAのアップレギ ュレーションを生じる。従って、サービピンプロモーターの制御下で抗腫瘍ポリペプチド

をコードするDNAは、それらが発現される腫瘍細胞をトランスフェクトするために使用され得る。当業者は、当該分野において公知の方法を用いて、発現ベクターにおいてサービピンプロモーターを容易に使用し得る。

T. 予防的な抗アポトーシス療法

サービピン変異についてヘテロ接合性であること、もしくはサービピン変異に感受性であること（これらの変異がサービピン生物学的活性の変化もしくは欠損を未だ生じていない場合であっても）が診断される患者において、または退行性疾患（例えば、運動ニューロン退行性疾患（例えば、SMA疾患もしくはALS疾患）を伴うことが診断された患者、またはHIVポジティブとして診断された患者において、疾患の表現型の出現の前に、任意の開示される治療薬が投与され得る。例えば、この治療は、HIVポジティブであるが、減少されたT細胞数またはAIDSの他の明白な徴候を未だ示さない患者に提供され得る。特に、サービピン発現またはサービピンの生物学的な活性を増加することが示される化合物は、任意の標準的な投薬量および投与の経路によって、投与され得る。あるいは、サービピン発現構築物を使用する遺伝子治療は、退行性疾患の発症の前に、細胞欠損を逆転または防止するために、着手され得る。

本発明の方法は、任意の哺乳動物（例えば、ヒト、家庭のペット、または家畜）において、本明細書中に記載される異常を低減または診断するために使用され得る。非ヒト哺乳動物が、処置または診断される場合、用いられるサービピンポリペプチド、核酸、または抗体は、好ましくはその種について特異的である。

U. さらなるアポトーシスアッセイの例

上述の考察に加えて、アポトーシスアッセイの特定の例がまた、以下の参考文献において提供される。リンパ球におけるアポトーシスについてのアッセイは：Liら、「HIV-1 Tatタンパク質による、未感染のリンパ球におけるアポトーシスの誘導」、*Science* 268:429-431、1995；Gibelliniら、「Tat発現Jurkat細胞は、異なるアポトーシス刺激（急性ヒト免疫不全ウイルスI型（HIV-1）感染を含む）に対する増加された抵抗性を示す」、*Br. J. Haematol.* 89:24-33、1995；Martinら、「インビトロでのヒトCD4⁺T細胞のHIV-1感染。これらの細胞におけるアポトーシスの示差的な誘導」*J. Immunol.* 152:330-42、1994；Teraiら、「HIV-1で急性感染された、培養Tリンパ芽球における細胞死の機構としてのアポトーシス」、*J. Clin Invest.* 87:1710-5、1991；Dheinら、「APO-1/（Fas/CD95）11によって媒介されるオートクラインT細胞自殺」、*Nature* 373:438-441、1995；Katsikisら、「Fas抗原刺激は、ヒト免疫不全ウイルスで感染された個体においてTリンパ球の顕著なアポトーシスを誘導する」、*J. Exp. Med.* 1815:2029-2036、1995；Westendorpら、「HIV-1 Tatおよびgp120による、CD95媒介性のアポトーシスに対するT細胞の感作」、*Nature* 375:497、1995；DeRossiら、*Virology* 198:234-44、1994によって開示される。

線維芽細胞におけるアポトーシスについてのアッセイは：Vossbeckら、「ラット線維芽細胞における、TGF- β の直接的なトランスフォーミング活性」、*Int. J. Cancer* 61:92-97、1995；Goruppiら、「HIH3T3線維芽細胞のS期誘導に關与するc-mycドメインの切除」、*Oncogene* 9:1537-44、1994；Fernandezら、「正常なおよびHa-rasで形質転換されたC3Hマウス胚線維芽細胞腫瘍壊死因子の示差的な感受性；耐性細胞におけるbcl-2、c-myc、およびマンガンスーパーオキシドジスムターゼの誘導」、*Oncogene* 9:2009-17、1994；Harringtonら、「線維芽細胞におけるc-Myc誘導性のアポトーシスは、特定のサイトカインによって阻害される」、*EMBO J.* 13:3286-3295、1994；Itohら、「アポトーシスについて必要とされる新規なタンパク質ドメイン。ヒトFas抗原の変異分析」、*J. Biol. Chem.* 268:10932-7、1993）によって開示される。

ニューロン細胞におけるアポトーシスについてのアッセイは：Melinoら、「組織トランスグルタミナーゼおよびアポトーシス：ヒト神経芽腫細胞を用いるセンスおよびアンチセンストランスフェクション研究」、*Mol. Cell Biol.* 14:6584-6596、1994；Rosenblumら、「培養されたニューロンの低酸素誘導性の、プログラム細胞死についての証明」、*Ann. Neurol.* 36:864-870、1994；Satoら、「bcl-2による細胞死の防止の結果としての、PC12細胞のニューロン分化」、*J. Neurobiol.* 25:1227-1234、1994；Ferrariら、「N-アセチル

10

20

30

40

50

システインD-およびL-立体異性体は、ニューロン細胞のアポトーシス死を防止する」、J. Neurosci. 1516:2857-2866、1995 ; Talleyら、「ヒトニューロン細胞における腫瘍壊死因子 誘導性のアポトーシス：酸化防止剤のN-アセチルシステイン、ならびにbcl-2およびcrma遺伝子による防御」、Mol. Cell Biol. 15:2359-2366、1995 ; Talleyら、「ヒトニューロン細胞における腫瘍壊死因子 誘導性のアポトーシス：酸化防止剤のN-アセチルシステイン、ならびにbcl-2およびcrma遺伝子による防御」、Mol. Cell Biol. 15:2359-2366、1995 ; Walkinshawら、「L-DOPAによる、カテコールアミン放出PC12細胞におけるアポトーシスの誘導。パーキンソン病の処置のための含意」、J. Clin. Invest. 95:2458-2464、1995によって開示される。

昆虫細胞におけるアポトーシスについてのアッセイは：Clemら、「昆虫細胞に対する感染の間の、バキュロウイルス遺伝子によるアポトーシスの防止」、Science 254:1388-90、1991 ; Crookら、「亜鉛フィンガー様モチーフを有する、アポトーシスを阻害するバキュロウイルス遺伝子」、J. Virol. 67:2168-74、1993 ; Rabizadehら、「バキュロウイルスp35遺伝子の発現は、哺乳動物神経細胞死を阻害する」、J. Neurochem. 61:2318-21、1993 ; Birnbaumら、「Cys/His配列モチーフを有するポリペプチドをコードする、核多角体病ウイルスからの、アポトーシス阻害遺伝子」、J. Virol. 68:2521-8、1994 ; Clemら、Mol. Cell Biol. 14:5212-5222、1994によって開示される。

V. 組織および器官の移植におけるサービピンの使用

本発明は、被験体における組織または器官の移植片拒絶を阻害または防止する方法を含み、サービピンポリペプチド、サービピンポリペプチドフラグメント、アポトーシスを阻害するそれらのペプチド模倣物、サービピンポリペプチドをコードする導入遺伝子、またはサービピンポリペプチドフラグメントをコードする導入遺伝子を、組織、器官への、または移植片に近位の部位への、局所投与を包含する。組織、器官への、または移植片に近位の部位への、ポリペプチド、ペプチド模倣物の局所送達は、一般的に利用可能な任意の手段によって達成され、これらとしては、直接的な局所灌流、注入、マイクロスポンジ (microsponge)、マイクロカプセル、リポソーム、または時間放出送達ベヒクルが挙げられるが、これらに制限されない。

組織、器官への、またはまたは移植片に近位の部位への、サービピンポリペプチドをコードする導入遺伝子、またはサービピンポリペプチドフラグメントをコードする導入遺伝子の局所送達は、任意の利用可能なベクターを用いて、リポフェクションを介して、または直接的なプラスミドDNA注入を介して、達成され得る。Qinら (1995) Transplantation 59 (6) :809-816 ; Le Coultreら (1997) Eur. J. Pediatr. Surg. 7 (4) :221-226 ; Wangら (1992) Transplantation 53 (3) :703-705 ; Wangら (1996) Transplantation 61 (12) :1726-1729 ; Schmidら (1997) Eur. J. Cardiothorac. Surg. 11 (6) :1023-28 ; および Bosasquevisque, C.ら (1997) Ann. Thorac. Surg. 63 (6) :1556-1561を参照のこと。導入遺伝子をコードするベクターは、複製可能なベクターおよび複製欠陥ベクターの両方 (例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、またはアポトーシスに関与する傾向がある細胞もしくはアポトーシスの部位に近位の細胞についての適切な向性を有する、他のベクター) を含む。導入遺伝子構築物について、発現は、任意の適切なプロモーター (ヒトインスリンプロモーターのような、特定の細胞型における遺伝子発現を指向する組織特異的プロモーターを含む) から指向され得る。組織、器官への、または移植片に近位の部位への、導入遺伝子の局所送達は、一般に利用可能な任意の手段によって達成され、これらとしては、直接的な局所灌流、注入、マイクロスポンジ、マイクロカプセル、リポソーム、または時間放出送達ベヒクルが挙げられるが、これらに制限されない。

さらなる記載を伴うことなく、当業者は、上述の記載および以下の説明的な実施例を用いて、本発明の化合物を作製および利用し得、そして本発明の方法を実施し得ることが考えられる。それゆえ、以下の実用的な実施例は、本発明の好ましい実施態様を具体的に指摘し、そして開示の残余をいかなるようにも制限するとして解釈されない。他の一般的な構成は、当業者に明らかである。全ての雑誌文献および他の刊行された書類 (例えば、特許および特許出願) は、その全体が参考として本明細書中に援用される。

実施例

実施例 1 実験手順およびクローニング

細胞および細胞株。以下の細胞株を、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC、Rockville, MD) から得た。赤白血病HEL、Bリンパ腫DaudiおよびJY、単球THP-1、T白血病Jurkat、上皮ガン腫HeLa、前骨髄球HL-60、および非形質転換ヒト肺線維芽細胞Lu18。

T白血病細胞株MOLT13は、以前に特徴付けられた (Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860-865)。細胞を、10%熱不活化胎児ウシ血清 (FBS, Whittaker)、2 mM L-グルタミン、および10mM HEPESを補充した、完全培地RPMI 1640またはDMEM (HeLa, Lu18) (Bio Whittaker, Walkersville, MD) 中で培養において維持した。ヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) は、コラゲナーゼ処理によって単離され、そして20% FBS、2 mM L-グルタミン、および内皮細胞増殖因子 (Biomedical Technologies, Stoughton, MA) を補充されたDMEM培地中の培養において維持された。

末梢血単核細胞 (PBMC) は、正常な同意を得たボランティアから、400gで22 でのFicoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ) における示差的な遠心分離によって回収し、そしてリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS)、pH7.4中で洗浄した。いくつかの実験において、HL-60細胞を、0.1 μ M 1,25-ジヒドロキシ-ビタミンD₃および17.8 μ g/mlインドメタシン (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) の存在下での、72時間の培養によって、成熟な単球表現型に末端的に分化した。ビタミンD₃処理したHL-60細胞上での分化依存的マーカー (CD11b/CD18インテグリン (Hickstein, D.D.ら, J Immunol (1987) 138:513-519を含む) の新規誘導を、抗CD11b mAb LM2/1を用いるフローサイトメトリーによって測定した。

ゲノムおよびcDNAのクローニング、染色体局在性、およびサザンブロット。

ヒトP1ゲノムライブラリー (Genome Systems, St. Louis, MO) を、完全なヒトEPR-1 cDNA (Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860-865) を含む、1.6kbフラグメントでハイブリダイズすることによって、スクリーニングした。3つの重複するクローンを単離し、精製し、そしてEPR-1 cDNAとのサザンハイブリダイゼーションによって確認した。BamHI、HindIII、およびXbaI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) での制限消化によって作製される、ハイブリダイズするフラグメントを、さらなる分析のために、pBluescript (pBS KS⁺, Stratagene, San Diego, CA) にクローン化した。2つのEPR-1ハイブリダイズP1クローンからの、14796bpに及ぶ重複するコンティグを配列し、制限分析によって特徴付けし、そしてApplied BioSystem Prism 377自動化シーケンサー (Foster City, CA) を用いて、Taq FSポリメラーゼベースの自動化配列決定によって、両方の鎖に対して完全に配列決定した。いくつかの実験において、グアニジニウムイソチオシアネート法によってHeLa細胞から抽出された10mgの全RNAを、EPR-1正方向「センス」オリゴヌクレオチドC3/27 (bp80~102) でプライムし、200UのSuperscript II (Life Science, Grand Island, NY) の存在下、50分間、42 にて逆転写した。

得られたcDNAを、50mlの全容量中の0.5mgのEPR-1由来のプライマーT5/27 (bp161-184) およびG11/16 (1124-1098, EPR-1コード配列からの番号付)、200mM dNTP (New England Biolabs, Beverly, MA)、ならびに2UベントDNAポリメラーゼ (New England Biolabs) の存在下で、PCRによって増幅した。58 で1分間のアニーリング、94 で1分間の変性、および72 で1分間の伸長での35サイクルの増幅後、産物をアガロースゲル電気泳動によって分析し、pCRII (Invitrogen Corp., San Diego, CA) にサブクローン化し、そして両方の鎖に対して完全に配列決定した。コンティグアセンブリ、ならびにDNAおよびタンパク質の配列解析を、Lasergene (DNASTAR, Madison, WI) およびMac Vector (Eastman Kodack, Rochester, NY) ソフトウェアパッケージを使用して行った。EPR-1をハイブリダイズする遺伝子の染色体の位置を、蛍光インサイチュハイブリダイゼーションによって行った。EPR-1をハイブリダイズするP1クローンからの精製DNAを、ニック翻訳によって、ジゴキシゲニンdUTP (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) で標識した。

標識化プローブを、剪断されたヒトDNAと合わせ、そして50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸、および2 \times SSCを含有する溶液中で、フィトヘマグルチニンで刺激されたPBM Cに由来する正常な中期染色体にハイブリダイズした。2色染色のために、ビオチン結合

10

20

30

40

50

化プローブD17Z1(第17染色体のセントロメアに特異的)を、ジゴキシゲニン標識化P1クローンと同時ハイブリダイズした。特異的な染色が、ハイブリダイズされた切片を、フルオレセイン化された抗ディグオキシゲニン抗体およびテキサスレッドアビジンとともにインキュベートすることによって検出した。切片を、単色標識化について、プロピジウムヨウ化物で、または2色標識化について、DAPIで、対比染色した。総計80個の中期細胞を分析し、69個の細胞が特異的な標識化を示した。サザンハイブリダイゼーションについて、ヒトゲノムDNAを、刊行されたプロトコルに従ってHaLa細胞から抽出し、EcoRI、BamHI、XbaI、またはHindIIIで消化し、0.8%アガロースゲル上で分離し、そしてGeneScreenナイロンメンブレン(New England Nuclear、Boston、MA)に移した。

UV架橋後(Stratalinker、Stratagene、San Diego、CA)、回転式ハイブリダイゼーションオープン(Hoefer Scientific San Francisco、CA)において、65℃にて、5×SSC、0.5% SDS、5×デンハルト溶液、および0.1%リン酸ナトリウム中の100mg/mlの変性サケ精子DNA(Promega Corp. Madison、WI)で、メンブレンをプレハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションを、ゲル精製された(GeneClean Bio101、Vista、CA)、³²P-dCTP(Amersham)ランダムプライム化標識された(Boehringer-Mannheim、Indianapolis、IN)1.6kb EPR-1 cDNAを用いて、16時間、65℃にて行った。

30分間、65℃で、2×SSC、1% SDSにおいて、および22℃で0.2×SSCにおいての2回の洗浄後、放射能バンドを、Kodack X-Omat AR X線フィルムを用いて、オートラジオグラフィによって可視化し、そしてスクリーンを増強した(DuPont de Nemours、Wilmington、DE)。他の実験において、培養されたリンパ芽腫細胞を、2×10⁶/220μlブロックの濃度で、LMPアガロース(Bio Rad、Richmond、CA)に包埋し、そしてDNAを標準的な手順によって抽出した。MluIまたはNotIでのブロック消化後、サンプルを、Bio-Rad CHEF DR11装置(Hercules、CA)を用いて、75秒間のパルス時間を伴う、20分間、200Vでの、1%アガロースゲルにおけるパルス化フィールドゲル電気泳動によって分離した。ナイロンメンブレンに移し、そしてUV架橋した後、EPR-1 cDNAでのハイブリダイゼーション、および洗浄を、上記のように行った。

別の一連の実験において、いくつかの種から単離されたゲノムDNA(Clontech、San Francisco、CA)のアリコートを含むプロットを、上記のように、EPR-1 cDNAの3'548bpフラグメントでハイブリダイズした。

ノザンプロット。 センスまたはアンチセンスEPR-1配列に特異的な1本鎖プローブを、EPR-1 cDNAの301bpフラグメントの非対称なPCR増幅によって、作製した。第1の5'226bpのEPR-1コード領域+75bpの保持された調節イントロン(Altieri、D.C.、FASEB J(1995)9:860-865)を含む鋳型を、EcoRI(クローニング部位)およびSacIIでのEPR-1 cDNAの制限消化によって作製し、ゲル精製し、そして20mM Tris HCl、50mM KCl、pH8.4、1.5mM MgCl₂、および2.5UのTag DNAポリメラーゼ(Life Science)の存在下、15pmol dNTP(New England Biolabs)、7.5pmol dCTP、および25mCi³²P-dCTP(Amercham)とともに、10mlの全容量で混合した。

EPR-1特異的アンチセンスプローブの作製を、0.2mg/mlの「SacII」逆方向オリゴヌクレオチド5'TGCTGGCCGCTCCTCCCTC3'の付加によって行い、一方EPR-1ポジティブ鎖の伸長およびサービピン特異的プローブの作製を、0.2mg/mlの正方向F11オリゴヌクレオチド5'ATGACCTCCAGAGGTTTC3'を用いて行った。94℃で1分間の変性、52℃で1分間のアニーリング、および72℃で1分間の伸長を伴う、25サイクルの増幅を行った。EPR-1センスまたはアンチセンスプローブを、Sephadex G-50スピンカラム(Worthington Biochemical Corp.、Freehold、NJ)を介して、14,000gで、5分間、遠心分離し、組込まれた放射能から分離し、100℃で、2分間、加熱し、そしてハイブリダイゼーション反応物に迅速に添加した。

同一の鎖特異的プローブを、60℃にて、14時間の、5×SSPE、10×デンハルト溶液、2% SDS、100mg/ml変性サケ精子DNA中での、成体または胎児ヒトmRNAの複数の組織プロット(Clontech)のハイブリダイゼーションのために使用し、そして洗浄を、60℃にて、上記のように行った。未分化のHL-60細胞、またはビタミンD₃で末端的に分化されたHL-60細胞が

10

20

30

40

50

ら抽出された、全RNAのアリコートをし、上記のように、サービピン特異的な1本鎖プローブを用いるノーザンハイブリダイゼーションについて、プロセスした。

実施例2 抗サービピン抗体の生成

JC700と呼ばれる、サービピン配列特異的抗体を、以下のように生成および特徴付けした。サービピン配列に対応する17マーのペプチドA³PTLPPAWQPFLKDHR¹⁹を合成し、そして質量分析によって特徴付けした。100mgのサービピンペプチドを、キーホールリンペットヘモシアニンに対して1:1の比率で結合させ、そして完全Freundアジュバント中で、ウサギに皮下注射した。4週間の後、動物を、不完全Freundアジュバント中の100mgのペプチドの皮下注射で、追加免疫し、そして1週間毎に、連続的に追加免疫および採血した。

抗サービピン抗体の精製を、ペプチドSepharoseマトリクスに対するアフィニティークロマトグラフィー(5mg/mlのペプチド)によって、1mMグリシン、pH2.5における特定のIgG画分の溶出を伴って、行った。アフィニティー精製された抗サービピン抗体(JC700と呼ばれる)の特異性を、OD₄₀₅での吸光度により、固定化されたサービピンペプチドまたはコントロールEPR-1ペプチドに対するELISAによって、測定した。

実施例3 サービピン融合タンパク質に対するモノクローナル抗体の生成

サービピンcDNAを、E.Coli BL21株においてGST-融合タンパク質として発現させ、そして、GSTフレームが除去された同質物まで精製した。精製タンパク質をマウスに注射するために使用し、そして標準的なハイブリドーマ技術を使用して、モノクローナル抗体を作製した。3つの別々のmAbを単離し、限界希釈によって二回クローン化し、そしてさらに特徴付けした。新規な抗サービピンのmAbのうちの1つ(8E2と称される)は、固定化された精製組換えサービピンを、ELISAによって認識し、そして、図11に示されるように、イムノプロットにおいてサービピンに結合した。

実施例4 イムノプロットングおよびインサイチュハイブリダイゼーション

イムノプロットングのために、種々の形質転換された細胞株、非形質転換HUVEC、PBMC、もしくはLu18、または未分化のもしくはビタミンD₃で分化されたHL60細胞のSDS可溶化抽出物のアリコートを、OD₂₈₀での吸光度によってタンパク質含量について正規化し、非還元条件下での5~20% SDSポリアクリルアミド勾配ゲルにおける電気泳動によって分離し、そして1.1Aで、30分間、22℃にて、Immobilonメンブレン(Millipore Corp., New Bedford, MA)にエレクトロプロットした。メンブレンを、TBS、pH7.4+5%ミルク中でブロックし、そして、20mg/mlのコントロール非免疫ウサギIgGまたは抗サービピン抗体JC700とともに、1時間、22℃にてインキュベートし、次いでTBS、pH7.4中で洗浄し、そして1:7500希釈のアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギIgG(Promega)を、30分間、22℃で添加した。一次抗体の結合を、70%ジエチルホルムアミド中の75mg/mlニトロブルーテトラゾリウム(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)および100%ジメチルホルムアミド中の50mg/ml 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルリン酸(Sigma)の添加によって明らかにした。

組織サンプル、免疫組織化学、およびインサイチュハイブリダイゼーション。結腸腺がん腫(6症例)、肺鱗状細胞がん腫(6症例)、肺腺がん腫(9症例)、膵臓腺がん腫(2症例)、侵襲性の乳腺がん腫(7症例)からの組織サンプルを、Yale-New Haven Hospitalの保管所から得、そして本研究に使用した。44個の高い悪性度分類のリンパ腫組織のサンプル、および7個の低い悪性度分類のリンパ腫組織のサンプルもまた入手した。組織サンプルを、ホルマリン中に固定化し、パラフィン中に包埋し、5μmの切片に切断し、キシレン中でパラフィン除去し、そして特級アルコール中で再水和し、次いで内因性ペルオキシダーゼ活性を、メタノール中の2% H₂O₂での処理によって、クエンチングした。

免疫染色について、切片を、標準的な圧力調理器中で、5分間煮沸し、10%の通常ヤギ血清中でブロックし、そしてアフィニティー精製された抗サービピン抗体JC700(20μg/ml)とともに、14時間、4℃にて、インキュベートした。PBS、pH7.4中での洗浄後、切片をさらに、ビオチン結合ヤギ抗ウサギIgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA)とともに、30分間、22℃にてインキュベートし、そしてPBS、pH7.4中で洗浄した。ストレプトアビジン-ビオチン結合ペルオキシダーゼ(Boehringer Mannheim)の、30分間、22℃での

添加後、切片を洗浄し、そして一次mAbの結合を、3'-3'-ジアミノベンジジン (DAB) の添加、およびヘマトキシリンでの対比染色によって明らかにした。

ネガティブコントロールを、一次抗体を通常のヤギ血清に置換えることによって、同じ実験条件下で、行った。いくつかの実験において、組織染色の前に、JC700抗体のアリコート、25mg/mlのサービピン3-19ペプチドで予め吸収した。インサイチュハイブリダイゼーションについて、pcDNA3 (Invitrogen) において完全なコード配列 + 271bpの3'非翻訳領域を含有する1 µgのサービピンcDNAを、EcoRIで完全に消化し、そしてジゴキシゲニン11-ウリジン-5'三リン酸 (Boehringer Mannheim) の存在下で、T7 RNAポリメラーゼを用いて、アンチセンスの方向に転写した。組織切片を、1%ゼラチン、0.1%クロムアルミニウムでコートし、120 °で、2時間、ベーキングし、そして22 °で無屑的に保存した。切片を、パラフィン除去し、そして特級アルコールにより再水和し、プロテイナーゼK (100mM Tris HCl pH8.7、50mM EDTA中の1 µg/ml) で、30分間、37 °で消化し、そして0.25%無水酢酸および100mMトリエタノールアミンpH8.0中で、10分間、22 °でアセチル化した。

10

ヒト組織におけるサービピンmRNAの検出を、4 × SSC、1 × デンハルト溶液、50%脱イオン化ホルムアミド、250 µg/ml酵母tRNA、500 µg/mlサケ精子DNA、および5%デキストランを含有する緩衝液中での、16時間、50 °にての、サービピンアンチセンスリボプローブのインサイチュハイブリダイゼーションによって、行った。2 × SSC中で、90分間、48 °での洗浄後、固定化したジゴキシゲニンを、1:3000希釈の抗ジゴキシゲニンmAb (Boehringer Mannheim) を用いて検出し、そしてNBT/BCIP細胞化学染色でのアルカリホスファターゼ染色によって明らかにした。

20

実施例 5 ヒトガンにおけるサービピンの発現

サービピンは、ヒトガン細胞において顕著に発現される。形質転換された細胞型におけるその豊富な分布について、新形成におけるサービピンの潜在的な発現を、インビボで調査した。アフィニティー精製された抗サービピンJC700抗体を用いる、ホルマリン固定され、パラフィンに包埋された組織切片の免疫組織化学的分析は、ヒト肺ガンの試験された全ての症例 (腺ガン腫 (図6A)、および鱗状細胞ガン腫 (図6C) を含む) において、サービピンの豊富な発現を実証した。他のIAPタンパク質の形態学 (Duckett, C.S.ら、EMBO J (1996) 15:2685-2694) と一致して、タンパク質の発現は腫瘍細胞の細胞質に排他的に局在したが、隣接の正常な肺の腺上皮は、サービピンを発現しなかった (図6C、矢印) 。抗サービピン抗体を、コントロールヤギ血清で置換えた場合 (示さず)、または免疫したサービピン3-19ペプチドで予め吸収した後 (図6B) は、染色は何も観察されず、従って観察された認識の特異性を確認した。

30

鱗状肺細胞におけるサービピンmRNAの顕著な蓄積は、サービピン特異的1本鎖リボプローブでのインサイチュハイブリダイゼーションによって、独立して実証された (図6D) 。サービピンはまた、免疫組織化学によって脾臓 (図6E)、および胸 (示さず) の、ならびにインサイチュハイブリダイゼーションによって結腸 (図6G) の、腺ガン腫の試験された全ての症例において、豊富に検出された。しかし、非形質転換細胞型のHUVECおよびLu18において (図4C)、成熟組織 (図3)、および末端的に分化されたHL-60細胞 (図5) におけるその不在と一致して、抗サービピンJC700抗体の反応性は、免疫組織化学によって、正常な外分泌腺脾臓上皮細胞で観察何もされず (図6F)、そしてサービピンmRNAは、インサイチュハイブリダイゼーションによって、隣接の非新生物結腸腺上皮において何も見出されなかった (図6H) 。

40

リンパ腫組織におけるサービピンの発現。 組織サンプルを、攻撃性の、高い悪性度分類のリンパ腫を伴う44人の患者から得、そして7個のサンプルを、非攻撃性の、低い悪性度分類のリンパ腫を伴う7人の患者から得た。サンプルを、上記のように処理し、そしてサービピン発現について試験した。低い悪性度分類のリンパ腫サンプルのいずれも、サービピン発現を示さなかったが、高い悪性度分類のリンパ腫を伴う患者からの27サンプル (61%) は、サービピンを発現した。

実施例 6 他のガンにおけるサービピンの発現

50

上述で考察した悪性形態に加えて、他のタイプのガンにおけるサービピンの発現を、本発明者らの実験室において、または他の大学の発明者との共同研究で、調査した。サービピンは、ほとんどの攻撃的なおよび転移の形態の悪性胸腺種（試験した100症例）において、頭部および頸部鱗状細胞ガン腫（140症例）において、および前立腺ガンの全ての形態（15症例）において（良性前立腺過形成の遷移病変を含む）、顕著に発現されることが見出された。神経芽腫の最も前進的な形態はまた、以下に考察されるように、サービピンについてポジティブである。

実施例 7 サービピンの組織特異的発現

サービピンは、近年、最も一般的なヒトガンの全てにおいて見出されたが、正常な、最終的に分化した成体組織においては見出されなかった。胚発生および胎児発生におけるサービピンの発現を、調査した。免疫組織化学およびインサイシュハイブリダイゼーション研究は、いくつかのアポトーシスが調製された胎児組織（層化された上皮、外分泌腺臓器、および胸腺骨髄の幹細胞層を含む）における、別のアポトーシスインヒビター（すなわち、bcl-2）のパターンとは重複しないパターンを伴って、サービピンの強力な発現を実証した。サービピンに対する配列特異的抗体は、ヒト胎児の肺、肝臓、心臓、腎臓、および胃腸管において、単一の約16.5kDのサービピンバンドをイムノプロットした。マウス胚において、サービピンの顕著なおよびほぼ偏在的な分布が、胚日数（E）11.5で見出されたが、E15-20で、サービピン発現は、肺および神経堤由来細胞の遠位の細気管支上皮（背根神経節ニューロン、下垂体、および脈絡叢を含む）に制限された。これらのデータは、肺および胎児の発生におけるサービピンの発現が、bcl-2に独立して、組織ホメオスタシスおよび分化に貢献し得ることを示唆する。

実施例 8 サービピントランスフェクト体の調製

誘導性サービピンアンチセンストランスフェクト体およびアポトーシス/増殖実験。 EP R-1 cDNAのヌクレオチド379~1087を含む、708bpのSmaI-EcoRIフラグメントを、哺乳動物細胞発現ベクターpML1（R.Pytela博士、Cardiovascular Research Institute, University of California, San Franciscoによって好意的に提供された）に、センス方向に、指向的にクローン化した。このベクターは、サイトメガロウイルスプロモーターカセットを、mMT1プロモーター（哺乳動物細胞において、組換えタンパク質のZn²⁺依存性の発現を指向する（Lukashev, M.E.ら、J Biol Chem（1994）269:18311-18314））で置換えることによって、外分泌の哺乳動物細胞発現ベクターpCEP4に由来した。

1000万個のHeLa細胞を、サービピンアンチセンス構築物を含有する10mgのpML1 DNA + 50mgのサケ精子DNAとともに、15分間氷上でインキュベートし、次いで、Gene Pulser機器（Bio-Rad）によって、350Vで、960 μFにて送達される、単一の電気パルスを行った。トランスフェクションの48時間後、細胞を、15倍希釈して、100mm直径の組織培養ディッシュ上にプレートし、そして0.4mg/mlハイグロマイシンを含有する完全増殖培地中で、4週間選択した。コントロール培養物またはサービピンアンチセンスHeLa細胞形質転換体におけるアポトーシスを、血清涸渇条件下でのEPR-1転写のZn²⁺依存性の誘導後、核染色体内のDNA分解のインサイシュ検出によって、評価した。

簡潔には、コントロールまたはアンチセンスサービピン形質転換体を、0% FBS中の200mM ZnSO₄で、24時間、37 °Cで処理した。細胞を採集し、800gで、10分間、4 °Cにて遠心分離し、そしてペレットを10%ホルマリン中で、一晚固定し、脱水し、パラフィンブロック内に包埋し、そして3~5 mmの切片を、接着性の高いスライド上においた。サンプルを、20 mg/ml プロテイナーゼKで、15分間、22 °Cで処理し、蒸留水中で洗浄し、PBS中の2% H₂O₂において、内因性ペルオキシダーゼをクエンチングし、そして続いて、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（TdT）の存在下でジゴキシゲニン標識化dUTPと混合し、次いでペルオキシダーゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体と混合した。

アポトーシス細胞における核染色を、製造業者の指示（AptoTag, Oncor, Gaithersburg, MD）に従って、DABによって検出した。コントロール実験を、酵素インキュベーション工程を省略することによって行った。試験した種々の条件下でのアポトーシス細胞の形態学的特徴（アポトーシス体）を、同じ切片のヘマトキシリン/エオシン染色によって検出し

た。

増殖実験について、ベクターコントロールHeLa細胞またはサービピンアンチセンストランスフェクト体を、 20×10^4 /ウェルで、24ウェル組織培養プレート (Costar) 上にプレートし、200mM ZnSO_4 とともに、16時間、37℃でインキュベートし、24時間の間隔で採集し、そして試験した種々の条件下での細胞増殖を、直接的な細胞計数によって、顕微鏡で測定した。これらの実験条件下でのサービピン発現のダウンレギュレーションを、JC700抗体でのイムノプロットングによって評価した。

実施例 9 EPR-1相補遺伝子の同定

3つの重複するクローンを、EPR-1 cDNAを用いる、ヒトP1プラスミドゲノムライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングによって単離し、そしてサザンプロットによって確認した。この遺伝子は、第17染色体の長腕に位置づけられ、蛍光インサイチュハイブリダイゼーションによってバンド17q25に位置づけられた (図1A、B)。

14796bpに及びP1フラグメントのコンティグを、pBSKS⁺中にクローン化し、そして両方の鎖に対して完全に配列決定した (図1C)。3つの推定スプライス部位は、真核生物のイントロン-エキソン境界についてのコンセンサス配列 (Padgett, P.A.ら、Ann Rev Biochem (1986) 55:1119-1150) と完全にマッチし、第2922位、3284位、および5276位 (ドナー)、ならびに3173、5157、および11954 (アクセプター) で同定され、従って4つのエキソン、ならびにそれぞれ、252、1874、および6678bpの3つのイントロンに、遺伝子構成を規定した (図1D)。

推定のコード領域の配列分析は、5ヌクレオチドの変化および6ヌクレオチドの挿入以外は、EPR-1 cDNA (Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860-865) とのほぼ完全な同一性を実証した。しかし、3つのスプライス部位が、EPR-1コード配列の相補的な、アンチセンス鎖に見出された。この予期されない配向と一致して、EPR-1相補的遺伝子は、5' GCリッチ領域を明らかにし、これはヌクレオチド2560-2920を含み、そしてエキソン1 (以下を参照のこと) を含み、これは、CpG島の塩基組成基準 (Gardiner-Garde, M.ら、J Mol Biol (1987) 196:261-282およびFrommer, 1987) を満たした。CpG島の2.5kb上流の配列決定は、多数のSp1部位を有するTATA欠損プロモーターを明らかにした (示さず)。

複合体のハイブリダイゼーションパターンおよびEPR-1配列の進化的保存。 EPR-1 cDNAでのヒトゲノムDNAのプローブ化は、いくつかのハイブリダイズするフラグメントを明らかにした (図2A)。これらのうち、約7.5kb XbaI、7.6kb BamHI、ならびに約15、7.5、6.4、および3.7kbの4つのHindIIIフラグメント (図2A、矢印) は、それぞれ、アンチセンスEPR-1遺伝子の制限マップによって再現され得なかった (図1C)。対照的に、比較可能な強度の他のバンド (5.15kb XbaIフラグメントおよび7.1kb BamHIフラグメントを含む) は、アンチセンスEPR-1遺伝子から真正に由来し、そして初めの2または3つのエキソンを、それぞれ含んだ (図2A)。

この複雑なハイブリダイゼーションパターンとは異なり、MluIまたはNotIで消化され、そしてパルス化フィールドゲル電気泳動によって分離された高分子量のヒトゲノムDNAのサザンプロットは、それぞれ、約75kbおよび130kbの、単一のEPR-1にハイブリダイズするバンドを明らかにした (図2B)。最後に、高いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下で、哺乳動物種における多数の強力なハイブリダイズバンド、ならびにウサギまたはニワトリのゲノムDNAにおける弱いシグナルを伴って、複数の種のゲノムDNAのサザンプロットは、EPR-1関連配列の、有意に進化的保存を明らかにした (図2C)。

センス/アンチセンスEPR-1転写物の一致しない組織分布。 異なるセンスまたはアンチセンスEPR-1転写物の潜在的な発現を、1本鎖特異的プローブでのノザンプロットにおいて調査した。スプライスされたEPR-1メッセージの大きさ (Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860-865) と一致して、EPR-1鎖特異的プローブは、試験した全ての成体および末端的に分化したヒト組織から抽出されたmRNAにおいて、顕著な約1.2kbのバンドを検出した (図3A)。対照的に、同じ実験条件下、成体組織において、EPR-1アンチセンス特異的1本鎖プローブと、特異的バンドはハイブリダイズされなかった (図3B)。類似の約1.2kbバンドが、胎児腎臓において1本鎖のEPR-1特異的プローブによって検出され、そしてよ

10

20

30

40

50

り少ない程度で、胎児の肺、肝臓および脳において検出された（図3A）。成体組織におけるハイブリダイゼーションの不在とは異なり、EPR-1アンチセンス特異的プローブは、胎児肝臓において、顕著な約1.9kbのバンド、およびより大きな3.2kb種（不完全にプロセスされた転写物の大きさに対応する）を認識したが、胎児腎臓、肺、および脳においてより弱いハイブリダイゼーションバンドがまた検出された（図3B）。アクチンプローブでのコントロールハイブリダイゼーションは、成体または胎児のサンプルにおけるmRNAの比較可能なローディングを確認した（図3C）。

アンチセンスEPR-1遺伝子産物の特徴づけ。アンチセンスEPR-1遺伝子における5' CpG島の調査は、第2811位での推定のATG開始コドン进行明らかにし、これは真核生物翻訳開始のコンセンサスに十分適合される配列（CGGCATGG）（Kozak, M., *Nucleic Acids Res* (1984) 12:857-872）によって囲まれた。イントロン - エキソン境界の位置によって指図される5' → 3' 方向におけるアンチセンスEPR-1配列の分析は、426bpのオープンリーディングフレームを明らかにし、これは全ての4つのエキソンに及び、そしてエキソン4における12042位にてTGAコドンで終結する。模範的なポリアデニル化シグナル（AATAAA）が、13166位で見られた。EPR-1「センス」オリゴヌクレオチドでプライムされた、逆転写されたHeLa細胞RNAから増幅されたPCR産物は、ゲノム配列に完全にマッチし、そしてオープンリーディングフレームおよび推定イントロン - エキソン境界を確認した（示さず）。

EPR-1 cDNAを用いる、HELライブラリーのハイブリダイゼーションによって単離された、2つの gt11 cDNAクローンはまた、コンセンサスゲノム配列とマッチし、13186位にてアンチセンスEPR-1鎖上でのホモ多型Aテイルを明らかにし、これはポリアデニル化シグナルの14bp下流であり、1144bpの3' 非翻訳領域を生成した。これらのクローンにおいて、開始ATGから上流の5' 非翻訳領域は、49bpであり、ゲノム配列の2762位で始まり、そしてインフレーム終結コドンを含んだ。アンチセンスEPR-1オープンリーディングフレームの翻訳は、142アミノ酸の新規なタンパク質を予測し、これは、16.389の見積り分子量および5.74の酸性pIを有し、アミノ末端シグナルペプチドまたは膜挿入のためのカルボキシ末端の疎水性ストレッチを欠損した（図4A）。

最後の40カルボキシ末端残基について、コイルドコイルが予測された（Lupas, A.ら、*Science* (1991) 252:1162-1164）。BLASTデータベース検索は、アンチセンスEPR-1遺伝子産物の残基18~88と、アポトーシスのインヒビターのIAPファミリーにおけるBIR分子との間の、有意な程度の類似性を明らかにした（Bimbaum, M.J.ら、*J Virology* (1994) 68:2521-2528; Clem, R.J.ら、*Mol Cell Biol* (1994) 14:5212-5222）。この類似性について、アンチセンスEPR-1遺伝子産物は、サービピンと称された。他のIAPタンパク質とは異なり、サービピンは、わずかに1つのBIRを含み、遺伝子の最初の3つのエキソンによってコードされ、そしてカルボキシ末端RINGフィンガーを欠損し、このドメインを潜在的にコードする付加的/代替的エキソンを有さなかった（図1C）。

Clustal法による、サービピンBIRと、他の公知のIAPタンパク質のBIRとの間のアラインメントを、図4Bに示す。コンセンサスおよびいくつかの保存的な置換の全体的なマッチにも関わらず、統計学的分析は、サービピンがIAPファミリーとわずかに関連したメンバーである（ここで、NAIP（これはまた、RINGフィンガー（図4B、影を付した四角）を欠損する）に最も密接に関連した）ことを示した（Roy, Nら、*Cell* (1995) 80:167-178）。JC700と称されるウサギポリクローナル抗血清を、サービピンの残基A³PTLPPAWQPFLKDHR¹⁹（配列番号13）に対して惹起し、ペプチド - Sepharoseカラムにおけるアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、そしてウエスタンブロットにおいて使用した。サービピンの推定分子量と一致して、JC700抗体は、試験した全ての形質転換された細胞株（Bリンパ腫DaudiおよびJY、T白血病JurkatおよびMOLT13、単球THP-1、ならびに赤白血病HELを含む）の界面活性剤可溶抽出物からの約16.5kDaの単一のバンドをイムノブロットした（図4C）。

サービピンはまた、単離された抹消血単核細胞（PBMC）において見出された。対照的に、非形質転換Lu 18ヒト肺線維芽細胞またはヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）において、サービピンの発現は検出されなかった（図4C）。同じ実験条件下で、コントロール非免疫ウサ

10

20

30

40

50

ギIgGによって、非特異的バンドは何もイムノプロットされなかった（図4C）。

EPR-1遺伝子の転写を調節する薬剤の同定。EPR-1遺伝子の転写を増加する薬剤は、EPR-1の従来の技術によって同定され得る。好ましくは、候補薬剤を、EPR-1遺伝子産物を発現する細胞と接触させ、そしてこの産物の発現のレベルまたは転写のレベルを測定し、そしてEPR-1遺伝子転写物を増加または減少する薬剤が、容易に同定され得る。あるいは、EPR-1転写調節エレメントは、CATまたは β -ガラクトシダーゼのようなレポーター遺伝子の上流に配置され得る。

実施例10 細胞増殖/分化によるサービピン発現の調節

形質転換された細胞株（図4C）におけるサービピンの発現と一致して、未分化で活発に増殖する前骨髄球HL-60細胞は、JC700抗体での単一の約16.5kDaバンドのイムノプロット

10

イング、および一本鎖特異的プローブでの約1.9kb転写物のノザンハイブリダイゼーションによって実証されるように、高レベルのサービピンを構成的に発現した（図5）。対照的に、同じ実験条件下で、コントロール非免疫ウサギIgGによって、特異的バンドは何も認識されなかった（図5）。

成熟単球表現型への、HL-60細胞のビタミンD₃誘導性の末端分化は、これらの細胞の増殖

20

停止、および分化特異的マーカーのデノボ誘導（フローサイトメトリーによって検出される、白血球CD11b/CD18インテグリンの約200倍増加した発現（示さず）を含む）を生じ、そして以前の観察（Hickstein, D.D.ら、J Immunol（1987）138:513-519）との一致を生じた。これらの実験条件下で、抗サービピンJC700抗体は、ビタミンD₃処置されたHL60抽出物からの特異的バンドをイムノプロットできず、そして一本鎖特異的プローブとのノザンハイブリダイゼーションによって、サービピン転写物は何も検出されなかった（図5）。

対照的に、抗EPR-1ポリクローナル抗体は、同じ実験条件下で、ビタミンD₃で分化されたHL60抽出物において、EPR-1に対応する単一の約62kDaのバンドをイムノプロットした（示さず）。さらに、ビタミンD₃で分化されたHL60細胞におけるサービピンのダウンレギュレーションは、抗EPR-1モノクローナル抗体B6または12H1でのフローサイトメトリーによって検出されるように、これらの細胞における5～10倍増加したEPR-1の表面発現によって達成された（図8）。

図16において示されるように、サービピンは、サイトカイン インターフェロンと腫瘍壊

30

死因子 との組み合わせによってダウンレギュレートされるが、いずれのサイトカイン単

独によってもダウンレギュレートされない。同様に、c-mycガン遺伝子での3T3細胞のトラ

ンスフェクションは、ノザンプロットによって検出されるように、サービピンmRNAのアップ

レギュレーションを生じる。

実施例11 サービピンで促進されるアポトーシス

サービピンを標的化することは、アポトーシスを促進し、および細胞増殖を阻害する。

マウスまたはハムスターの細胞株（NIH 3T3、CHO）におけるサービピンcDNAのトランスフェクションは、これらの細胞における、免疫化学的に区別できない内因性ホモログの存在のために、適切ではなかった（示さず）。同様に、安定なアンチセンストランスフェクト体におけるサービピン遺伝子を標的するための最初の試みは、遅い細胞増殖および生存性の迅速な喪失のために、失敗した（示さず）。それゆえ、サービピン⁺HeLa細胞を、メタ

40

ロチオネイン誘導性プロモータ（Lukashev, M.E.ら、J Biol Chem（1994）269:18311-18314）の制御下、EPR-1 cDNAの3'末端（サービピンアンチセンス）でトランスフェクトし、ハイグロマイシンにおいて選択し、そして転写のZn²⁺依存性活性化後に、アポトーシスおよび細胞増殖について分析した。

形質転換された細胞株（図4C）におけるサービピンの発現と一致して、JC700抗体は、ベクター単独でトランスフェクトされたコントロールHeLa細胞の抽出物において、約16.5

50

kDaの単一の分子種をイムノプロットした（図7A）。対照的に、EPR-1 cDNA（サービピンアンチセンス）でトランスフェクトされた、メタロチオネイン誘導性のHeLa細胞において、JC700抗体によって、特異的なバンドは何も認識されなかった（図7A）。これらの実験条件下、AptoTag染色による、ヌクレオソーム間のDNAフラグメント化のインサイチュ

分析は、血清涸渇された、 Zn^{2+} 誘導性の、ベクターコントロールHaLa細胞において、わずかに数個のアポトーシス細胞を明らかにした（図7B）。

対照的に、上述で考察したように、 Zn^{2+} 誘導性のアンチセンスHaLa細胞トランスフェクト体において試験した細胞のかなりの大多数において、顕著な核染色に関連した（図7B）。ジゴキシゲニン標識化dUTPのTdTタギングの非存在下で、核染色は何も検出されなかった（示さず）。アポトーシスの代表的な形態学的特徴（多数のアポトーシス体を含む）はまた、ヘマトキシリン/エオシン染色によって、誘導されたアンチセンスHaLa細胞トランスフェクト体において実証されたのに対し、同じ実験条件下で、ベクターコントロールHeLa培養物において、わずかに時折、アポトーシス体が観察されたのみであった（図7B）。

10

細胞増殖に対するサービピンの潜在的な効果をまた、調査した。これらの実験において、メタロチオネイン制御されたEPR-1依存性の、サービピン発現の阻害は、血清依存性のHaLa細胞増殖の十分な減少を引き起こした（図7C）。 Zn^{2+} 誘導の3日後、ベクターコントロールHeLa培養物における細胞数は、288%増加し、対照的に、同じ実験条件下で、サービピンアンチセンストランスフェクト体は、わずかに20%の増加であった（図7C）。

実施例12 サービピンの構造 - 機能の関係

アポトーシスのサービピン媒介性の阻害に関与する最低限の構造要件を、単一のサービピンBIR（バキュロウイルスIAP反復）モジュールにおいて最も進化的に保存されている残基のAla置換の変異誘発戦略を通して同定した。これらの残基は、サービピンBIRのアミノ末端側の半分に含まれた：Arg¹⁸、Phe²²、Trp²⁵、Pro²⁶、Pro³⁵、Ala³⁹、Ala⁴¹、Gly⁴²、およびCys⁴⁶。サービピンBIRのカルボキシル末端側の半分にあって、Ala変異体は、Cys⁵⁷X₂Cys⁶⁰X₁₆His⁷⁷X₆Cys⁸⁴の推定の亜鉛結合モチーフで、先ず標的化された。変異誘発によって標的化されるさらなる保存残基は、Asp⁵³、Leu⁶⁴、Trp⁶⁷、Pro⁶⁹、Asp⁷¹、Asp⁷²、およびPro⁷³を含む。

20

サービピン変異体を、安定におよび一過性にトランスフェクトされた細胞（それぞれ、IL-3依存性BaF3細胞およびNIH3T3）において、特徴づけした。これらの点変異体に加えて、カルボキシル末端のRINGフィンガーを含むサービピンキメラ分子をまた作製し、そしてアポトーシス阻害についてスクリーニングした（RINGフィンガーは、ほとんどの他のIAPタンパク質において見出されるが、サービピンにおいては見出されないドメインである）。第2に、サービピンの短縮形態をまた、作製し、ここでは予測されるコイルドコイル構造を含む、最後の40個のカルボキシル末端残基を欠失させた。図12において示されるように、サービピンにおいて重要な保存された残基Trp⁶⁷-Pro⁷³-Cys⁸⁴のAla変異誘発は、IL-3の投与中止によって誘導されるアポトーシスからBaF3細胞を防御する能力を欠く組換え分子を生成した。

30

実施例13 サービピンの細胞防御効果

アポトーシスによって媒介される安定な細胞集団に対する細胞障害の伝統的な例は、リンパ球を浸潤することによる同種移植片拒絶、アルツハイマー病、および、心筋梗塞後の再灌流傷害を含む。ガンにおいて発現され、それによってガン細胞に対する増殖有利な因子として機能することに加えて、サービピンの標的化発現は、安定な細胞集団を、アポトーシスおよび他の細胞性傷害から防御するために有用である。サービピンのこの適用を、漸増濃度の精製組換えサービピンを、古典的なアポトーシス誘導刺激物質である過酸化水素（ H_2O_2 ）で傷害したヒト内皮細胞の単層に添加することによって試験した。結果を、図13にまとめる。添加された漸増濃度のサービピンは、コントロールタンパク質ミオグロビンで処置されたコントロール培養物とは異なり、処置された細胞の有意に増加された生存性を生じた。同様に、アポトーシスからサービピン防御されたNIH3T3細胞は、図17に示されるように、LacZレポーター遺伝子との一過性の同時トランスフェクション後、過酸化水素によって誘導された。

40

実施例14 予測的予後因子としてのサービピン

サービピンの存在は、神経芽腫および非ホジキンリンパ腫において、ならびに他のガンにおいて、予測的な予後のネガティブな因子として利用され得る。

50

神経芽腫。多くの一連の神経芽腫の症例(72)を、多中心の研究においてサービピン発現についてスクリーニングした。図14に示されるように、サービピン発現は、患者が、攻撃的なおよび迅速に進行する疾患についての少なくとも1つのネガティブな予後因子を含む場合、劇的に増加した。第2に、サービピンの発現は、より攻撃的な疾患および好ましくない組織学と、強く相関した。重要なことに、サービピンの発現は、単純な組織学よりも感受性の予後指標であった。好ましい組織学の早期診断を伴うサービピンポジティブな症例は、疾患進行および転移についての少なくとも1つのネガティブな予後因子を含むことが見出された。

ホジキンリンパ腫。類似の多中心の研究を、近年、高い悪性度分類の非ホジキンリンパ腫(n=48)におけるサービピン発現の分析において完了した。結果は、神経芽腫について観察される結果に類似する。図15に示されるように、サービピンの発現は、第IV期に優勢なより広範に及ぶ疾患と強く相関した。臨床学的に、サービピンを発現する患者は、サービピンネガティブな患者に比べて、完全な緩解のより少ないエピソード、および不完全な緩解、緩解なし、または再発のより多くのエピソードを有した。

潜在的な関与。これらの2つの発生学的に異なるタイプのガンにおけるネガティブな予測的予後因子としての、サービピンの実証された役割は、疾患進行および治療に対する応答をモニターするための診断的(dinnostic)道具としてこの分子の潜在的な使用を反復する。これはまた、病気分類の目的のために、および多剤耐性に潜在的に感受性の患者の集団(緩解なしまたは不完全な緩解を伴う群)を同定するために、使用され得る。また、サービピン遺伝子の完全な配列から容易に設計された、サービピン由来のプライマーは、サービピン遺伝子が欠失または変異されているガンの潜在的な症例を同定するためのスクリーニング道具として使用され得る。サービピン遺伝子の標的化不活性化が、ガン患者に対する好ましい予後因子を付与し、潜在的な薬物耐性遺伝子を除去するので、これらの症例は、同定するために非常に重要である。サービピン遺伝子における変異を不活性化することは、Alaベースの変異誘発の本発明者らの最初のスクリーニングにおいて同定された同じ重要な残基を標的し得るか、または翻訳の未熟な終結のために不全型または短縮型のタンパク質を生じ得る。

実施例15 サービピンガンワクチン

サービピンに対して指向されるワクチンは、ガンの種々のタイプにおいて見出されるように、他の疾患関連性の細胞内タンパク質標的とともに開発され得る。これらの技術は、一般的に利用可能であり、そして代表的なアプローチは、以下に引用される参考文献によって記載される。ワクチンはまた、サービピンのペプチドフラグメントの全身性投与を含み得、そしてサービピンペプチドをコードするミニ遺伝子を、腫瘍細胞標的に送達するためのベクターの使用が意図される。上記のように、サービピンは正常な細胞において、さらに骨髄における増殖幹細胞において発現されない。これは、サービピンに対してマウントされる免疫応答が、非常に選択的および特異的であり、そして正常な細胞を含まないことを確実にする。

ポリペプチドベースのワクチンの開発および投与

一価または多価のガン免疫療法ワクチン産物におけるペプチド成分の使用の方法は、Nardi, N.ら、Mol. Med. (1995) 1(5):563-567によって記載される。現在使用される異なるガンワクチンおよびガン免疫療法を考察するさらなる参考文献としては、以下が挙げられる:N.P. RestifoおよびM. Sznol 「Cancer Vaccines」、De Vita's Cancerにおいて: Principles & Practice of Oncology 3023-3043 (Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997) ; J. Galea-Lauri ら、Cancer Gene Ther. (1996) 3(3):202-214 ; D.C. Linehan ら、Ann. Surg. Oncol. (1996) 3(2):219-228; および J. Vieweg ら、Cancer Invest. (1995) 13(2):193-201。

上述のアプローチと一致して、サービピンポリペプチドまたは完全長サービピンは、公知の技術によって化学的に、または原核生物もしくは真核生物の細胞において適切なcDNAを発現することによって組換え的にのいずれかで、合成される。次いで、このように生成されたサービピンタンパク質は、混入するタンパク質(例えば、血清または細菌タンパク質

）を除去するために必要とされる場合、精製される。サービピンはさらに、サービピンを結合する抗体（例えば、サービピンを認識し、これに結合するモノクローナル抗体JC700または抗体8E2（両方ともに先に記載された））を含むカラムを用いて、精製され得る。抗体ベースのワクチンを精製するにおいて、組換え的に生成されたサービピンは、抗体に結合するが、他のタンパク質および細胞残渣は、洗浄して取り除かれる。次いで、サービピンポリペプチドは、単離され、そして所望の強度に濃縮される。

あるいは、サービピンタンパク質は、1つ以上のプロテアーゼ（例えば、トリプシン）を用いてネイティブなサービピンを切断することによって作製される。次いで、タンパク質溶解性フラグメントは、SDS-PAGE、高分離 / 高压分離技術、または逆相HPLCを使用して、分離および回収される。R.J. Beynon and J.S. Bond、Proteolytic Enzymes : A Practical Approach (Oxford University Press, New York 1989) を参照のこと。次いで、単離されたこれらのペプチドは、所望の最終濃度に濃縮される。

いったん精製されたら、次いで、サービピンポリペプチドまたは完全長サービピン分子は、アジュバント含有乳濁液中に置かれ得る。サービピンとともに使用するために意図されるアジュバントとしては、アルミニウムアジュバント、Freundアジュバント、結核菌およびインターロイキン-2 (IL-2) を含有する水中油乳濁液が挙げられる。さらなる調製物は、サービピンポリペプチドと他の適切な腫瘍関連抗原との、および必要に応じて、他の免疫調節因子（例えば、サイトカイン）との組合せを包含する。他の適切なキャリアまたは賦形剤が使用され得、ウシ血清アルブミンを含み、ハプテン、キーホールリンベットヘモシアニン、オボアルブミン、およびツベルクリンの精製タンパク質誘導体で、サービピンポリペプチドを結合する。Ed HarlowおよびDavid Lane、Antibodies : A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) に記載される技術のような技術を用いて、ペプチドは、キャリアに結合され得る。

ヒト被験体におけるワクチンは、皮下、皮膚内、または筋肉内 (IM) 注入される乳濁液の形態で投与され得；適切に処方されたワクチンは、経口的に用いられ得る。アジュバント含有ワクチンを用いて、ワクチンは、一般に好ましくは、IM（例えば、三角筋）に与えられる。

患者に投与される、サービピンワクチンまたはサービピンペプチドワクチンの量は、他のガンワクチンについて使用される代表的な量に相当する。投薬濃度は、1日あたり約0.25 g ~ 約1000gの範囲である。より好ましい範囲は、1日当たり約10 μ g ~ 約500 μ gである。

実施例16 抗サービピン抗体の診断学的使用

頻繁に、腫瘍関連抗原 (TAA) は、腫瘍細胞から、周辺の血漿中に、または血液中に流れる。その結果、TAAは、しばしば、血液に見出され、そして患者から得られた血液サンプルは、ガンの存在を検出するにおいて使用され得、ならびにガンを病気分類（例えば、第I、II、III、またはIV期）する因子であるとして使用され得る。サービピンはTAAのようなものであり、そして健常な、正常な個体はサービピンを発現しない。いくつかのガンの研究からの結果は、サービピン（またはサービピンフラグメント）の存在がこれと相関すること、および疾患が攻撃性であり得るか、または転移されてい得るかを予測することを示した。サービピンまたはサービピンフラグメントのレベルの検出および定量の同様な戦略は、ガン処置のために化学療法または放射線療法を受ける患者における残余の腫瘍荷重を測定するために使用され得る。サービピンの上昇されるまたは増加するレベルは、後期の段階の新生物疾患を反映し得る。

診断の使用について、血液が、公知のガン負荷を有する患者から、またはガンを有することが疑われる患者から、周知の技術によって、採取される。血液サンプルは、公知の技術によって調製され、そして上述のように調製され、そして必要に応じて標識される、サービピンに対する抗体との結合について試験される。このような一般的な抗体検出プロトコル、および関連の試薬は、当該分野において十分に確立されている。他の生物学的液体サンプル（例えば、精液、尿、または唾液）はまた、サービピンの存在についてモニターされ得る。この診断学的技術はまた、疾患進行、および個別的な治療に対する応答をモニターするために使用され得る。この方法は、ガン進行または緩解を追跡する、比較的非侵襲

10

20

30

40

50

性の手段を提供する。

実施例17 イムノバイオアッセイによるサービピンの検出

患者の血液中のサービピンの存在について試験するためのイムノバイオアッセイの説明的な例は、サービピンを結合し、検出可能なサービピンを、免疫沈降によって、溶液から回収する、サービピンに対するモノクローナル抗体の能力に依存する。このようなイムノバイオアッセイは、推測されるガン患者において、および分画化カラムから溶出された画分において、サービピンを検出するために使用される。各患者サンプルのアリコートは、上記の、サービピンを特異的に認識して、そしてこれに結合するモノクローナル抗体（例えば、上記のMab 8E2）とともに、2時間、4℃でインキュベートされる。モノクローナル抗体は、抗マウスIgGアガロースビーズ（これは、Sigma Chemical Co., St. Louis, MOから獲得され得る）に対して不溶化される。

アガロースビーズ抗マウス（IgG（H+L））-サービピン複合体は、0.01Mリン酸緩衝液（pH7.2）、および0.25M NaClを含有する結合緩衝液で、アガロースビーズを先ず洗浄し、次いでビーズをサービピンモノクローナル抗体とともに、18時間、4℃で、同じ緩衝液中でインキュベートすることによって、調製される。次いで、アガロースビーズは、マイクロ遠心管における、30秒間、16,000×gでの遠心分離によって沈殿され得、そして非特異的部分は、0.5M NaCl-TMK中の2%脱脂粉乳とともに、30分間、4℃で、インキュベートすることによってブロックされ得る。ブロッキング後、ビーズは、3回、0.5M NaCl-TMKで洗浄され得、そして等容量の同じ緩衝液中に再懸濁され得る。次いで、20:1のアガロースビーズ-モノクローナル抗体の複合体は、各250:1の患者試験サンプルとともに、2時間、4℃で、インキュベートされ得る。患者の試験サンプルに存在する任意のサービピンが、ビーズ上のサービピンモノクローナル抗体によって見出される。ここでサービピン結合されている、ビーズ複合体は、30秒間、16,000×gでの遠心分離によって回収され得る。次いで、上清は、以下に記載されるようなバイオアッセイにおいてサービピン活性についてアッセイされる。コントロールサンプルは、サービピンモノクローナル抗体を欠損したブロックされたビーズとともに処理され、そしてバイオアッセイにおいてサービピン活性について試験される。

実施例16 直接的なELISA試験を使用するサービピンの検出

正常な血漿（コントロール）およびガン患者血漿のサンプルを、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）で1:1に希釈する。各混合液の1容量を、10kD分子量制限を有するセトリコン-10フィルターに添加し、そして5000×g（7000rpm）で、1時間、遠心分離する。1容量のPBSを、保持物（retentate）に添加し、そして30分間遠心分離する。最終希釈は、約1:3である。次いで、ELISAプレートウェルを、1:6、1:12、1:24、1:48、および1:96の最終希釈にて、ジカルボン酸コーティング緩衝液（pH9.6を有する）中、一晚、4℃にて、保持物でコートする。次いで、リン酸緩衝化生理食塩水中の5% Tween 20を含有する洗浄緩衝液で、プレートを2回洗浄する。残余の結合部位を、4%ウシ血清アルブミン（BSA）、300μl/ウェルで、2時間、ブロックする。次いで、プレートを洗浄緩衝液で2回洗浄する。次いで、サービピンを特異的に認識して、これに結合する100μlのモノクローナル抗体（例えば、Mab 8E2）を1%BSA中の1:200希釈で使用し、ウェルに添加し、そして1時間、振盪しながらインキュベートする。プレートを、洗浄緩衝液で、5回洗浄する。次いで、100μl西洋ワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体を、代表的に1:2,000希釈で、各ウェルに添加し、そして1時間インキュベートする。プレートを再度、洗浄液で5回洗浄する。次いで、5μgのサービピンおよび5μl H₂O₂/10mlクエン酸-リン酸緩衝液を含有する基質の、100μl/ウェルを、各ウェルに添加し、そして5分間インキュベートする。酵素反応を、50μl/ウェル 2M H₂SO₄を添加することによって、停止する。光の吸光度を、EIA読み取り器において、492nmで測定する。サービピンを含む患者サンプルは、ポジティブな読み取り値を生じ、一方、サービピンを含まない患者のサンプルは、ネガティブである。

実施例18 サービピンフラグメント、ペプチドおよび小分子アンタゴニスト

上記のように、アポトーシスに必要とされる重要な機能残基が、サービピンにおいて同定

10

20

30

40

50

された。これらのデータは、合成ペプチド、および小分子アンタゴニスト、ならびにサービピン機能の拮抗性インヒビターを作製する際の鋳型を提供する。好ましくは、ペプチドは、ネイティブなサービピンから作製されるか、または機能的に等価な残基Trp⁶⁷ - Pro⁷³ - Cys⁸⁴を含むネイティブなサービピンペプチド骨格からの置換を含む。ネイティブなサービピンのペプチドフラグメントは、標準的な技術（タンパク質消化を含む）によって作製され得る。どのフラグメントがサービピンと競合するかの決定は、上記のアポトーシス測定系およびアポトーシスアッセイ系を使用することによって、容易になされ得る。これらの結果は、アポトーシスの阻害に必須である、サービピンにおける別個の線状配列を同定するための独特な機会を提供する。

アポトーシスのIAPタンパク質依存性阻害の一般的な範例と一致して、抗アポトーシス機能について必要とされる分子の構造領域は、他の分子（例えば、結合パートナー）との相互作用の部位であることについての重要な候補であることがまた、予測された。サービピンにおける機能的に関連するペプチド配列は、変異誘発データに基づいて：EGWEPDDDDPIEE HKKHSSGC（配列番号4）である。下線を付した残基のAla置換は、トランスフェクトされた細胞においてサービピンの完全な機能の消失を生じる。この線状配列は合成され得、そしてアフィニティークロマトグラフィーの標準的な生化学的手順を用いて関連分子を単離するための、非常によりストリンジェントなおよび特異的な試薬として、または酵母ツーハイブリッド系についてのベイトとして、使用され得る。

また、好ましくは、サービピンの COOHコイルドコイル領域が、サービピンフラグメントおよびペプチドに含まれる。近年のデータは、このサービピンドメインが、サービピンの抗アポトーシス機能に重要であることを示す。本発明者らは、コイルドコイルドメインを含む最後の40 COOH末端アミノ酸を欠損するサービピンの組換え短縮形態を作製した。この短縮形態を、NIT3T3細胞において、野生型サービピンおよびXIAP（IAP遺伝子ファミリーの別のメンバー）と同様に、LacZとともに同時トランスフェクトした。結果は、図17に示され、過酸化水素によって誘導される、トランスフェクトされた細胞におけるアポトーシスを防ぐにおいて、短縮されたサービピンは、殆ど（約80%）の細胞防御的效果を欠損したことを示す。明らかに、この系において、サービピンは、アポトーシスを防ぐにおいて、NAIPよりも強力であった。

サービピンのアゴニストまたはアンタゴニストはまた、従来の技術を介して容易に同定され得る。ネイティブな線状配列に基づく、設計された、合成ペプチドはまた、未だ同定されていないパートナー分子とのサービピンの相互作用の、拮抗的なインヒビターとして機能する。しかし、この阻害は、サービピンの抗アポトーシス機能をブロックするのに十分であるべきである。

同様のペプチドベースの戦略は、カスパーゼ（caspase）活性化をインビトロおよびインビボで、首尾良くブロックしており、アポトーシスから細胞を防御する。例えば、Milligan, C.E.ら（1995）Neuron 15:385-393を参照のこと。

実施例19 アンチセンスサービピンDNAの治療学的使用

上記のように、サービピンアンチセンス配列の転写は、EPR-1/サービピン遺伝子均衡を変化した。これは、HeLa細胞トランスフェクト体において実証され、ここでは、EPR-1「センス」鎖のメタロチオネイン誘導性の転写は、サービピンの発現を抑制し、そしてアポトーシス/細胞増殖に十分に影響を及ぼした。さらに、サービピンアンチセンス構築物と、lacZレポート化プラスミドとを一過性に同時トランスフェクトすることは、ガラクトシダーゼ発現細胞において、トランスフェクションの48時間後、サービピンアンチセンストランスフェクト体の生存性を減少した。従って、サービピンを発現する細胞または組織（例えば、腫瘍）におけるサービピンの発現のレベルは、EPR-1センス鎖のDNAで細胞または組織をトランスフェクトすることによって、減少される。あるいは、サービピンアンチセンスをコードするDNAは、標的細胞または組織をトランスフェクトするために、使用される。このような治療は、サービピンをコードするmRNAのサービピンタンパク質への翻訳を、効率よく減少する。

実施例20 アポトーシスに対する防御剤としてのサービピンの使用

サービピンは、過酸化水素または典型的にアポトーシスを誘導する他の薬剤に曝露されている細胞に投与される場合、アポトーシスから細胞を防御することが示されている。アポトーシスを減少するのに有効なサービピンまたはそのフラグメントの送達を容易にするために、好ましくは、一過性の様式で、細胞浸透性が、増加することが必要とされ得ることが、意図される。一過性の代謝阻害または一過性の低酸素症を包含するある状態は、さらなる、外因的な薬剤を必要としないで、細胞の透過性を増加するようである。適切であり得る薬剤は、2-デオキシグルコースおよびアジ化ナトリウムのような代謝インヒビターを包含する。しかし、細胞透過性の一過性の増加の間に細胞防御を媒介するサービピンの能力は、心筋梗塞および発作の間の再灌流傷害および細胞障害を減少するための、組換えサービピンの治療学的注入を用いる可能性を提供する。このようなプロセスは、アポトーシスに起因する増加した組織の障害によって媒介されることが意図される。サービピンでの処置は、傷害される組織の程度および大きさを減少し得る。

10

細胞死に関連するアポトーシスを調節または防止するための、被験体におけるサービピンまたはサービピンの対立遺伝子改変体の使用は、多様なアポトーシス関連性の徴候の影響を処置または改善するにおいて有益である。これらの徴候としては、老化の皮膚科学的影响（例えば、頭部濾胞細胞の細胞のアポトーシスによって引き起こされる禿頭）、免疫抑制のような異常または疾患、胃腸管損傷（例えば、消化管の内層の障害、潰瘍、および放射線または化学療法誘導性の障害）、心血管異常、再灌流障害に関連するアポトーシス（例えば、冠動脈閉塞、脳梗塞、脊髄/頭部外傷および付随する重篤な麻痺、凍傷または火傷のような傷害に起因する障害、ならびにスーパーオキシドジスムターゼによって処置可能であると以前に考えられている任意の徴候）、組織移植の拒絶（例えば、対宿主性移植片病）、ならびにアルツハイマー病が挙げられるが、これらに制限されない。サービピンの投与はまた、化学療法または放射線誘導性のアポトーシスに対して細胞防御的であり得る。

20

投与のためのサービピンタンパク質は、例えば、本明細書中に記載されるcDNAを用いて、上記のように生成され得る。タンパク質は、薬学的投与の目的のための精製を必要とし得、このような精製工程は、好ましくは、また上記のような、モノクローナル抗体分離および精製技術を利用する。

臨床学的設定において、サービピンは、薬学的に有効な投薬量において、例えば、そうでなければ存在するアポトーシスのレベルまたは程度を減少するのに有効な投薬量において、いくつかの経路を介して、投与される。例えば、アポトーシスを包含する皮膚科学的病気を処置するために、サービピンは、膏薬、クリーム、軟膏、または粉末の形態において投与され得る。局所的な処方物は、さらなる薬学的または化粧用の組成物（例えば、保湿剤、湿潤剤、芳香緩和剤、緩衝液、顔料、保存剤、ビタミン（例えば、A、C、またはE）、乳化剤、分散化剤、湿潤剤、安定化剤、推進剤、抗微生物剤、日焼け止め剤、酵素など）を含み得る。患者に投与され得るサービピンの典型的な投薬量は、0.01重量%~1.0重量%である。さらなる局所的な薬学的組成物は、S. Nakaiら、米国特許第5,672,603号に記載される。

30

サービピンはまた、処置される条件に適切であり得る場合、丸剤、溶液、懸濁液、乳濁液、顆粒、またはカプセルの形態で、投与され得る。サービピンは、経口的に投与され得；単独でまたは非経口注入のための従来の液体（例えば、グルコース、アミノ酸などを含む液体）と混合して静脈内投与される溶液において注入され得；筋肉内、皮膚内、皮下、または腹腔内注入され得；坐薬を用いて；ならびに点眼薬のような眼用溶液の形態であり得る。サービピンはまた、遅延された放出のキャリア（例えば、リポソーム、マイクロスポンジ、ミクロスフェア、またはマイクロカプセル）を用いて投与され得、これらはアポトーシス関連性の細胞死の防止のために処置される組織にほぼ近接して配置される。

40

局所投与以外の経路を介して投与される、サービピンまたはサービピンの機能的対立遺伝子改変体の濃度は、代表的に、1日あたり約10 µg~1日あたり25mgの範囲であり、投与の経路に依存する。もちろん、特定の患者に必要とされる場合ように医師のような当業者が、一件ごとの基準に対してこれらの値を変化し得ることが予測される。

50

配列表

- (1) 一般的情報：
- (i) 出願人：
- (A) 名前：エール大学
- (B) 番地：451 カレッジ ストリート
- (C) 市：ニュー ヘブン
- (D) 州：コネチカット州
- (E) 国：アメリカ合衆国
- (F) 郵便番号：06510
- (ii) 発明の名称：細胞アポトーシスを阻害するタンパク質であるサービビン (Survivin 10)
- (iii) 配列数：35
- (iv) コンピューター読み出し形態：
- (A) 媒体型：フロッピー ディスク
- (B) コンピューター：IBM PC互換用
- (C) OS：PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア：パテントイン リリース#1.0, バージョン#1.30
- (v) 現在の出願データ：
- (A) 出願番号：PCT/US97/21880
- (B) 出願日：1997年11月20日 20
- (vi) 先願データ
- (A) 出願番号：US 60/031,435
- (B) 出願日：1996年11月20日
- (2) 配列番号1の情報：
- (i) 配列の特徴：
- (A) 長さ：19塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：他の核酸 30
- (A) 記載：/desc=「オリゴヌクレオチド」
- (xi) 配列：配列番号1：
- TGCTGGCCGC TCCTCCCTC**
- 19
- (2) 配列番号2の情報：
- (i) 配列の特徴：
- (A) 長さ：18塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状 40
- (ii) 配列の種類：他の核酸
- (A) 記載：/desc=「オリゴヌクレオチド」
- (xi) 配列：配列番号2：
- ATGACCTCCA GAGGTTTC**
- 18
- (2) 配列番号3の情報：
- (i) 配列の特徴：
- (A) 長さ：17アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸 50

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号 3 :

Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg
1 5 10 15

Ile

(2) 配列番号 4 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 20 アミノ酸

10

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号 4 :

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
1 5 10 15

Ser Ser Gly Cys
20

(2) 配列番号 5 の情報 :

20

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 27 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ゲノム DNA

(xi) 配列 : 配列番号 5 :

GCGGGTGAGC TGTCCCTTGC AGATGGC

27

(2) 配列番号 6 の情報 :

30

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 27 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ゲノム DNA

(xi) 配列 : 配列番号 6 :

CCATGTAAGT TGATTTTCT AGAGAGG

27

(2) 配列番号 7 の情報 :

40

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 27 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ゲノム DNA

(xi) 配列 : 配列番号 7 :

AATTGTATGT CTTTATTTC AGGCAAA

27

(2) 配列番号 8 の情報 :

50

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：45アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号8：

Glu Glu Ala Arg Leu Val Thr Phe Gln Asn Trp Pro Asp Ala Phe Leu
1 5 10 15
Thr Pro Gln Glu Leu Ala Lys Ala Gly Phe Tyr Tyr Leu Gly Arg Gly
20 25 30
Asp Gln Val Gln Cys Phe Ala Cys Gly Gly Lys Leu Ala
35 40 45

10

(2) 配列番号9の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：45アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号9：

Glu Glu Ala Arg Phe Leu Thr Tyr Ser Met Trp Pro Leu Ser Phe Leu
1 5 10 15
Ser Pro Ala Glu Leu Ala Arg Ala Gly Phe Tyr Tyr Ile Gly Pro Gly
20 25 30
Asp Arg Val Ala Cys Phe Ala Cys Gly Gly Lys Leu Ser
35 40 45

20

(2) 配列番号10の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：45アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号10：

Glu Ala Asn Arg Leu Val Thr Phe Lys Asp Trp Pro Asn Pro Asn Ile
1 5 10 15
Thr Pro Gln Ala Leu Ala Lys Ala Gly Phe Tyr Tyr Leu Asn Arg Leu
20 25 30
Asp His Val Lys Cys Val Trp Cys Asn Gly Val Ile Ala
35 40 45

30

40

(2) 配列番号11の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：45アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

50

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号11：

Glu Glu Val Arg Leu Asn Thr Phe Glu Lys Trp Pro Val Ser Phe Leu
1 5 10 15

Ser Pro Glu Thr Met Ala Lys Asn Gly Phe Tyr Tyr Leu Gly Arg Ser
20 25 30

Asp Glu Val Arg Cys Ala Phe Cys Lys Val Glu Ile Met
35 40 45

(2) 配列番号12の情報：

10

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：45アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号12：

Lys Ala Ala Arg Leu Gly Thr Tyr Thr Asn Trp Pro Val Gln Phe Leu
1 5 10 15

Glu Pro Ser Arg Met Ala Ala Ser Gly Phe Tyr Tyr Leu Gly Arg Gly
20 25 30

20

Asp Glu Val Arg Cys Ala Phe Cys Lys Val Glu Ile Thr
35 40 45

(2) 配列番号13の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：47アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

30

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号13：

Glu Glu Ala Arg Leu Ala Ser Phe Arg Asn Trp Pro Phe Tyr Val Gln
1 5 10 15

Gly Ile Ser Pro Cys Val Leu Ser Glu Ala Gly Phe Val Phe Thr Gly
20 25 30

Lys Gln Asp Thr Val Gln Cys Phe Ser Cys Gly Gly Cys Leu Gly
35 40 45

(2) 配列番号14の情報：

40

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：45アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号14：

Glu Ala Asn Arg Leu Val Thr Phe Lys Asp Trp Pro Asn Pro Asn Ile
1 5 10 15

Thr Pro Gln Ala Leu Ala Lys Ala Gly Phe Tyr Tyr Leu Asn Arg Leu
20 25 30

Asp His Val Lys Cys Val Trp Cys Asn Gly Val Ile Ala
35 40 45

(2) 配列番号15の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 46アミノ酸

10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号15:

Glu Glu Ala Arg Leu Lys Ser Phe Gln Asn Trp Pro Asp Tyr Ala His
1 5 10 15

Leu Thr Pro Arg Glu Leu Ala Ser Ala Gly Leu Tyr Tyr Thr Gly Ile
20 25 30

20

Gly Asp Gln Val Gln Cys Phe Cys Cys Gly Gly Lys Leu Lys
35 40 45

(2) 配列番号16の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 46アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号16:

30

Glu Glu Ala Arg Leu Lys Ser Phe Gln Asn Trp Pro Asp Tyr Ala His
1 5 10 15

Leu Thr Pro Arg Glu Leu Ala Ser Ala Gly Leu Tyr Tyr Thr Gly Ala
20 25 30

Asp Asp Gln Val Gln Cys Phe Cys Cys Gly Gly Lys Leu Glu
35 40 45

(2) 配列番号17の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 45アミノ酸

40

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号17:

Glu Asn Ala Arg Leu Leu Thr Phe Gln Thr Trp Pro Leu Thr Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Pro Thr Asp Leu Ala Arg Ala Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Pro Gly
 20 25 30
 Asp Arg Val Ala Cys Phe Ala Cys Gly Gly Lys Leu Ser
 35 40 45

(2) 配列番号18の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 45アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号18:

Glu Glu Ala Arg Phe Leu Thr Tyr His Met Trp Pro Leu Thr Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Pro Ser Glu Leu Ala Arg Ala Gly Phe Tyr Tyr Ile Gly Pro Gly
 20 25 30
 Asp Arg Val Ala Cys Phe Ala Cys Gly Gly Lys Leu Ser
 35 40 45

(2) 配列番号19の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 46アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号19:

Glu Glu Ala Arg Leu Lys Ser Phe Gln Asn Trp Pro Asp Tyr Ala His
 1 5 10 15
 Leu Thr Pro Arg Glu Leu Ala Ser Ala Gly Leu Tyr Tyr Thr Gly Ile
 20 25 30
 Gly Asp Gln Val Gln Cys Phe Cys Cys Gly Gly Lys Leu Lys
 35 40 45

(2) 配列番号20の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 45アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号20:

10

20

30

40

Glu Ala Asn Arg Leu Val Thr Phe Lys Asp Trp Pro Asn Pro Asn Ile
 1 5 10 15
 Thr Pro Gln Ala Leu Ala Lys Ala Gly Phe Tyr Tyr Leu Asn Arg Leu
 20 25 30
 Asp His Val Lys Cys Val Trp Cys Asn Gly Val Ile Ala
 35 40 45

(2) 配列番号21の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 50アミノ酸

10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号21:

Tyr Val Gly Ile Gly Asp Lys Val Lys Cys Phe His Cys Asp Gly Gly
 1 5 10 15
 Leu Arg Asp Trp Glu Pro Gly Asp Asp Pro Trp Glu Glu His Ala Lys
 20 25 30
 Trp Phe Pro Arg Cys Glu Phe Leu Leu Leu Ala Lys Gly Gln Glu Tyr
 35 40 45
 Val Ser
 50

20

(2) 配列番号22の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 50アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

30

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号22:

Tyr Val Asp Arg Asn Asp Asp Val Lys Cys Phe Cys Cys Asp Gly Gly
 1 5 10 15
 Leu Arg Cys Trp Glu Pro Gly Asp Asp Pro Trp Ile Glu His Ala Lys
 20 25 30
 Trp Phe Pro Arg Cys Glu Phe Leu Ile Arg Met Lys Gly Gln Glu Phe
 35 40 45
 Val Asp
 50

40

(2) 配列番号23の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 50アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号23:

Tyr Gln Lys Ile Gly Asp Gln Val Arg Cys Phe His Cys Asn Ile Gly
 1 5 10 15
 Leu Arg Ser Trp Gln Lys Glu Asp Glu Pro Trp Phe Glu His Ala Lys
 20 25 30
 Trp Ser Pro Lys Cys Gln Phe Val Leu Leu Ala Lys Gly Pro Ala Tyr
 35 40 45
 Val Ser
 50

(2) 配列番号24の情報

10

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 49アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号24

Tyr Thr Gly Tyr Gly Asp Asn Thr Lys Cys Phe Tyr Cys Asp Gly Gly
 1 5 10 15
 Leu Lys Asp Trp Glu Pro Glu Asp Val Pro Trp Glu Gln His Val Arg
 20 25 30
 Trp Phe Asp Arg Cys Ala Tyr Val Gln Leu Val Lys Gly Arg Asp Tyr
 35 40 45

20

Val

(2) 配列番号25の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 49アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 核の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号25:

Tyr Thr Gly Gln Gly Asp Lys Thr Arg Cys Phe Cys Cys Asp Gly Gly
 1 5 10 15
 Leu Lys Asp Trp Glu Pro Asp Asp Ala Pro Trp Gln Gln His Ala Arg
 20 25 30
 Trp Tyr Asp Arg Cys Glu Tyr Val Leu Leu Val Lys Gly Arg Asp Phe
 35 40 45

30

Val

(2) 配列番号26の情報

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 50アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号26:

40

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

(2) 配列番号27の情報 :

10

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 50アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列 : 配列番号27 :

Tyr Gln Lys Ile Gly Asp Gln Val Arg Cys Phe His Cys Asn Ile Gly
 1 5 10 15
 Leu Arg Ser Trp Gln Lys Glu Asp Glu Pro Trp Phe Glu His Ala Lys
 20 25 30
 Trp Ser Pro Lys Cys Gln Phe Val Leu Leu Ala Lys Gly Pro Ser Tyr
 35 40 45
 Val Ser
 50

20

(2) 配列番号28の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 50アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列 : 配列番号28 :

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

30

40

(2) 配列番号29の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 50アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

50

(xi) 配列：配列番号29：

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

10

(2) 配列番号30の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：50アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号30：

Tyr Val Gly Asn Ser Asp Asp Val Lys Cys Phe Cys Cys Asp Gly Gly
1 5 10 15
Leu Arg Cys Trp Glu Ser Gly Asp Asp Pro Trp Val Gln His Ala Lys
20 25 30
Trp Phe Pro Arg Cys Glu Tyr Leu Ile Arg Ile Lys Gly Gln Glu Phe
35 40 45
Ile Arg
50

20

(2) 配列番号31の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：50アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号31：

Tyr Val Gly Arg Asn Asp Asp Val Lys Cys Phe Gly Cys Asp Gly Gly
1 5 10 15
Leu Arg Cys Trp Glu Ser Gly Asp Asp Pro Trp Val Glu His Ala Lys
20 25 30
Trp Phe Pro Arg Cys Glu Phe Leu Ile Arg Met Lys Gly Gln Glu Phe
35 40 45
Val Asp
50

30

40

(2) 配列番号32の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：50アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

50

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号32：

Ala Leu Gly Glu Gly Asp Lys Val Lys Cys Phe His Cys Gly Gly Gly
1 5 10 15

Leu Thr Asp Trp Lys Pro Ser Glu Asp Pro Trp Glu Gln His Ala Lys
20 25 30

Trp Tyr Pro Gly Cys Lys Tyr Leu Leu Glu Gln Lys Gly Gln Glu Tyr
35 40 45

Ile Asn
50

10

(2) 配列番号33の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：50アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号33：

Tyr Gln Lys Ile Gly Asp Gln Val Arg Cys Phe His Cys Asn Ile Gly
1 5 10 15

20

Leu Arg Ser Trp Gln Lys Glu Asp Glu Pro Trp Phe Glu His Ala Lys
20 25 30

Trp Ser Pro Lys Cys Gln Phe Val Leu Leu Ala Lys Gly Pro Ala Tyr
35 40 45

Val Ser
50

(2) 配列番号34の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：142アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号34：

30

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

10

20

(2) 配列番号35の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 14796塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ゲノムDNA

(xi) 配列: 配列番号35:

TCTAGACATG CGGATATATT CAAGCTGGGC ACAGCACAGC AGCCCCACCC CAGGCAGCTT	60	30
GAAATCAGAG CTGGGGTCCA AAGGGACCAC ACCCCGAGGG ACTGTGTGGG GGTCTGGGGCA	120	
CACAGGCCAC TGCTTCCCCC CGTCTTTCTC AGCCATTCTT GAAGTCAGCC TCACTCTGCT	180	
TCTCAGGGAT TTCAAATGTG CAGAGACTCT GGCACCTTTG TAGAAGCCCC TTCTGGTCTT	240	
AACTTACACC TGGATGCTGT GGGGCTGCAG CTGCTGCTCG GGCTCGGGAG GATGCTGGGG	300	
GCCCGGTGCC CATGAGCTTT TGAAGCTCCT GGAAGTCGGT TTTGAGGGTG TTCAGGTCCA	360	
GGTGGACACC TGGGCTGTCC TTGTCCATGC ATTTGATGAC ATTGTGTGCA GAAGTAAAAA	420	
GGAGTTAGGC CGGGCATGCT GGCTTATGCC TGTAATCCCA GCACTTTGGG AGGCTGAGGC	480	40
GGGTGGATCA CGAGGTCAGG AGTTCAATAC CAGCCTGGCC AAGATGGTGA AACCCCGTCT	540	
CTACTAAAAA TACAAAAAAA TTAGCCGGGC ATGGTGGCGG GCGCATGTAA TCCCAGCTAC	600	
TGGGGGGGCT GAGGCAGAGA ATTGCTGGAA CCCAGGAGAT GGAGGTTGCA GTGAGCCAAG	660	
ATTGTGCCAC TGCACTGCAC TCCAGCCTGG CGACAGAGCA AGACTCTGTC TCAAAAAAAA	720	

AAAAAAAAAG TGAAAAGGAG TTGTTCTTT CCTCCCTCCT GAGGGCAGGC AACTGCTGCG	780	
GTTGCCAGTG GAGGTGGTGC GTCCTTGGTC TGTGCCTGGG GGCCACCCCA GCAGAGGCCA	840	
TGGTGGTGCC AGGGCCCGGT TAGCGAGCCA ATCAGCAGGA CCCAGGGGCG ACCTGCCAAA	900	
GTCAACTGGA TTTGATAACT GCAGCGAAGT TAAGTTTCCT GATTTTGATG ATTGTGTTGT	960	
GGTTGTGTAA GAGAATGAAG TATTTTCGGG TAGTATGGTA ATGCCTTCAA CTTACAAACG	1020	
GTTCAGGTAA ACCACCCATA TACATACATA TACATGCATG TGATATATAC ACATACAGGG	1080	
ATGTGTGTGT GTTCACATAT ATGAGGGGAG AGAGACTAGG GGAGAGAAAAG TAGGTTGGGG	1140	10
AGAGGGAGAG AGAAAGGAAA ACAGGAGACA GAGAGAGAGC GGGGAGTAGA GAGAGGGAAG	1200	
GGGTAAGAGA GGGAGAGGAG GAGAGAAAGG GAGGAAGAAG CAGAGAGTGA ATGTTAAAGG	1260	
AAACAGGCAA AACATAAACA GAAAATCTGG GTGAAGGGTA TATGAGTATT CTTTGTACTA	1320	
TTCTTGCAAT TATCTTTTAT TTAAATTGAC ATCGGGCCGG GCGCAGTGGC TCACATCTGT	1380	
AATCCCAGCA CTTTGGGAGG CCGAGGCAGG CAGATCACTT GAGGTCAGGA GTTTGAGACC	1440	
AGCCTGGCAA ACATGGTGAA ACCCATCTC TACTAAAAAT ACAAATAA GCCTGGTGTG	1500	20
GTGGTGCATG CCTTTAATCT CAGCTACTCG GGAGGCTGAG GCAGGAGAAT CGCTTGAACC	1560	
CGTGGCGGGG AGGAGGTTGC AGTGAGCTGA GATCATGCCA CTGCACTCCA GCCTGGGCGA	1620	
TAGAGCGAGA CTCAGTTTCA AATAAATAAA TAAACATCAA AATAAAAAGT TACTGTATTA	1680	
AAGAATGGGG GCGGGGTGGG AGGGGTGGGG AGAGGTTGCA AAAATAAATA AATAAATAAA	1740	
TAAACCCCAA AATGAAAAAG ACAGTGGAGG CACCAGGCCT GCGTGGGGCT GGAGGGCTAA	1800	
TAAGGCCAGG CCTCTTATCT CTGGCCATAG AACCAGAGAA GTGAGTGGAT GTGATGCCCA	1860	
GCTCCAGAAG TGA CTCCAGA ACACCCTGTT CCAAAGCAGA GGACACACTG ATTTTTTTTT	1920	30
TAATAGGCTG CAGGACTTAC TGTTGGTGGG ACGCCCTGCT TTGCGAAGGG AAAGGAGGAG	1980	
TTTGCCCTGA GCACAGGCCC CCACCCTCCA CTGGGCTTTC CCCAGCTCCC TTGTCTTCTT	2040	
ATCACGGTAG TGGCCCAGTC CCTGGCCCTT GACTCCAGAA GGTGGCCCTC CTGGAAACCC	2100	
AGGTCGTGCA GTCAACGATG TACTCGCCGG GACAGCGATG TCTGCTGCAC TCCATCCCTC	2160	
CCCTGTTTAT TTGTCCTTCA TGCCCGTCTG GAGTAGATGC TTTTTCGAGA GGTGGCACCC	2220	
TGTAAAGCTC TCCTGTCTGA CTTTTTTTTT TTTTTCAGAC TGAGTTTTCG TCTTGTGACC	2280	
TAGGCTGGAG TGCAATGGCA CAATCTCAGC TCACTGCACC CTCTGCCTCC CGGGTTCAAG	2340	40
CGATTCTCCT GCCTCAGCCT CCCGAGTAGT TGGGATTACA GGCATGCACC ACCACGCCCA	2400	
GCTAATTTTT GTATTTTTCAG TAGAGACAAG GTTTCACCGT GATGGCCAGG CTGGTCTTGA	2460	
ACTCCAGGAC TCAAGTGATG CTCCTGCCTA GGCCTCTCAA AGTGTGGGA TTACAGGCGT	2520	
GAGCCACTGC ACCCGGCCTG CACGCGTTCT TTGAAAGCAG TCGAGGGGGC GCTAGGTGTG	2580	

GGCAGGGACG AGCTGGCGCG GCGTCGCTGG GTGCACCGCG ACCACGGGCA GAGCCACGCG	2640	
GCGGGAGGAC TACAACTCCC GGCACACCCC GCGCCGCCCC GCCTCTACTC CCAGAAGGCC	2700	
GCGGGGGGTG GACCGCCTAA GAGGGCGTGC GCTCCCGACA TGCCCCGCGG CGCGCCATTA	2760	
ACCGCCAGAT TTGAATCGCG GGACCCGTTG GCAGAGGTGG CGGCGGCGGC ATGGGTGCCC	2820	
CGACGTTGCC CCCTGCCTGG CAGCCCTTTC TCAAGGACCA CCGCATCTCT ACATTCAAGA	2880	
ACTGGCCCTT CTTGGAGGGC TGCGCCTGCA CCCCAGGAGCG GGTGAGACTG CCCGGCCTCC	2940	10
TGGGGTCCCC CACGCCCCGC TTGCCCTGTC CCTAGCGAGG CCACTGTGAC TGGGCCTCGG	3000	
GGGTACAAGC CGCCCTCCCC TCCCCGTCCT GTCCCCAGCG AGGCCACTGT GGCTGGGCCC	3060	
CTTGGGTCCA GGCCGGCCTC CCCTCCCTGC TTTGTCCCCA TCGAGGCCTT TGTGGCTGGG	3120	
CCTCGGGGTT CCGGGCTGCC ACGTCCACTC ACGAGCTGTG CTGTCCCTTG CAGATGGCCG	3180	
AGGCTGGCTT CATCCACTGC CCCACTGAGA ACGAGCCAGA CTTGGCCCAG TGTTTCTTCT	3240	
GCTTCAAGGA GCTGGAAGGC TGGGAGCCAG ATGACGACCC CATGTAAGTC TTCTCTGGCC	3300	
AGCCTCGATG GGCTTTGTTT TGAAGTGAAGT TGTCAAAAGA TTTGAGTTGC AAAGACACTT	3360	20
AGTATGGGAG GGTGCTTTC CACCTCATT GCTTCTTAAA CAGCTGTTGT GAACGGATAC	3420	
CTCTCTATAT GCTGGTGCCT TGGTGATGCT TACAACCTAA TTAAATCTCA TTTGACCAAA	3480	
ATGCCTTGGG GTGGACGTAA GATGCCTGAT GCCTTTCATG TTCAACAGAA TACATCAGCA	3540	
GACCCTGTTG TTGTGAACTC CCAGGAATGT CCAAGTGCTT TTTTGAGAT TTTTAAAAA	3600	
ACAGTTTAAT TGAAATATAA CCTACACAGC AAAAAATTA CCCTTTGAAA GTGTGCACTT	3660	
CACACTTTCG GAGGCTGAGG CGGGCGGATC ACCTGAGGTC AGGAGTTCAA GACCTGCCTG	3720	
GCCAACTTGG CGAAACCCCG TCTCTACTAA AAATACAAAA ATTAGCCGGG CATGGTAGCG	3780	30
CACGCCCCTA ATCCCAGCTA CTCGGGAGGC TAAGGCAGGA GAATCGCTG AACCTGGGAG	3840	
GCGGAGGTTG CAGTGAGCCG AGATTGTGCC AATGCACTCC AGCCTCGGCG ACAGAGCGAG	3900	
ACTCCGTCAT AAAAATAAAA AATTGAAAAA AAAAAAGAA AGAAAGCATA TACTTCAGTG	3960	
TTGTTCTGGA TTTTTTCTT CAAGATGCCT AGTTAATGAC AATGAAATTC TGTACTCGGA	4020	
TGGTATCTGT CTTTCCACAC TGTAATGCCA TATTCTTTTC TCACCTTTTT TTCTGTGCGA	4080	
TTCAGTTGCT TCCACAGCTT TAATTTTTTT CCCCTGGAGA ATCACCCCAG TTGTTTTTCT	4140	40
TTTTGGCCAG AAGAGAGTAG CTGTTTTTTT TCTTAGTATG TTTGCTATGG TGGTTATACT	4200	
GCATCCCCGT AATCACTGGG AAAAGATCAG TGGTATTCTT CTTGAAAATG AATAAGTGTT	4260	
ATGATATTTT CAGATTAGAG TTACAACTGG CTGTCTTTTT GGACTTTGTG TGGCCATGTT	4320	
TTCATTGTAA TGCAGTTCTG GTAACGGTGA TAGTCAGTTA TACAGGGAGA CTCCCCTAGC	4380	
AGAAAATGAG AGTGTGAGCT AGGGGGTCCC TTGGGGAACC CGGGGCAATA ATGCCCTTCT	4440	
CTGCCCTTAA TCCTTACAGT GGGCCGGGCA CGGTGGCTTA CGCCTGTAAT ACCAGCACTT	4500	

TGGGAGGCCG AGGCGGGCGG ATCACGAGGT CAGGAGATCG AGACCATCTT GGCTAATACG	4560	
GTGAAACCCC GTCTCCACTA AAAATACAAA AAATTAGCCG GGCCTGGTGG TGGGCGCCTG	4620	
TAGTCCCAGC TACTCGGGAG GCTGAGGCAG GAGAATGGCG TGAACCCAGG AGGCGGAGCT	4680	
TGCAGTGAGC CGAGATTGCA CCACTGCACT CCAGCCTGGG CGACAGAATG AGACTCCGTC	4740	
TCAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAATCTT TACAGTGGAT TACATAACAA TTCCAGTGAA	4800	
ATGAAATTAC TTCAAACAGT TCCTTGAGAA TGTGGAGGG ATTTGACATG TAATTCCTTT	4860	10
GGACATATAC CATGTAACAC TTTTCCAAC TATTGCTAAG GAAGTCCAGA TAAAATAGAT	4920	
ACATTAGCCA CACAGATGTG GGGGGAGATG TCCACAGGGA GAGAGAAGGT GCTAAGAGGT	4980	
GCCATATGGG AATGTGGCTT GGGCAAAGCA CTGATGCCAT CAACTTCAGA CTTGACGTCT	5040	
TACTCCTGAG GCAGAGCAGG GTGTGCCTGT GGAGGGCGTG GGGAGGTGGC CCGTGGGGAG	5100	
TGGACTGCCG CTTTAATCCC TTCAGCTGCC TTTCCGCTGT TGTTTTGATT TTTCTAGAGA	5160	
GGAACATAAA AAGCATTCGT CCGGTTGCGC TTTCTTTCT GTCAAGAAGC AGTTTGAAGA	5220	
ATTAACCCCTT GGTGAATTTT TGAAACTGGA CAGAGAAAGA GCCAAGAACA AAATTGTATG	5280	20
TATTGGGAAT AAGAACTGCT CAAACCCTGT TCAATGTCTT TAGCACTAAA CTACCTAGTC	5340	
CCTCAAAGGG ACTCTGTGT TTCCTCAGGA AGCATTTTTT TTTTTTTCT GAGATAGAGT	5400	
TTCACCTTG TTGCCCAGGC TGGAGTGCAA TGGTGCAATC TTGGCTCACT GCAACCTCTG	5460	
CCTCTCGGGT TCAAGTGATT CTCCTGCCTC AGCCTCCCAA GTAAGTGGGA TTACAGGGAA	5520	
GTGCCACCAC ACCCAGCTAA TTTTGTATT TTTAGTAGAG ATGGGGTTTC ACCACATTGC	5580	
CCAGGCTGGT CTTGAACTCC TGACCTCGTG ATTCGCCAC CTTGGCCTCC CAAAGTGCTG	5640	
GGATTACAGG CGTGAACCAC CAGGCCTGGC TTTTTTTTTT TTGTTCTGAG ACACAGTTTC	5700	30
ACTCTGTTAC CCAGGCTGGA GTAGGGTGGC CTGATCTCGG ATCACTGCAA CCTCCGCCTC	5760	
CTGGGCTCAA GTGATTTGCC TGCTTCAGCC TCCCAAGTAG CCGAGATTAC AGGCATGTGC	5820	
CACCACACCC AGGTAATTTT TGTATTTTG GTAGAGACGA GGTTTCACCA TGTGGCCAG	5880	
GCTGGTTTTG AACTCCTGAC CTCAGGTGAT CCACCCGCCT CAGCCTCCCA AAGTGCTGAG	5940	
ATTATAGGTG TGAGCCACCA CACCTGGCCT CAGGAAGTAT TTTTATTTT AAATTTATTT	6000	
ATTTATTTGA GATGGAGTCT TGCTCTGTCG CCCAGGCTAG AGTGCAGCGA CGGGATCTCG	6060	40
GCTCACTGCA AGCTCCGCCC CCCAGGTTCA AGCCATTCTC CTGCCTCAGC CTCCCAGTA	6120	
GCTGGGACTA CAGGCGCCCG CCACCACACC CGGCTAATTT TTTTGTATTT TTAGTAGAGA	6180	
CGGGTTTTCA CCGTGTTAGC CAGGAGGGTC TTGATCTCCT GACCTCGTGA TCTGCCTGCC	6240	
TCGGCCTCCC AAAGTGCTGG GATTACAGGT GTGAGCCACC ACACCCGGCT ATTTTATTTT	6300	
TTTTGAGACA GGGACTCACT CTGTCACCTG GGCTGCAGTG CAGTGGTACA CCATAGCTCA	6360	

CTGCAGCCTC	GAACCTCTGA	GCTCAAGTGA	TCCTCCCACC	TCATCCTCAC	AAGTAATTGG	6420
GACTACAGGT	GCACCCACAC	ATGCCACCT	AATTTATTTA	TTTATTTATT	TATTTATTTT	6480
CATAGAGATG	AGGGTTCCCT	GTGTTGTCCA	GGCTGGTCTT	GAACCTCTGA	GCTCACGGGA	6540
TCCTTTTGCC	TGGGCCTCCC	AAAGTGCTGA	GATTACAGGC	ATGAGCCACC	GTGCCAGCT	6600
AGGAATCATT	TTTAAAGCCC	CTAGGATGTC	TGTGTGATTT	TAAAGCTCCT	GGAGTGTGGC	6660
CGGTATAAGT	ATATACCGGT	ATAAGTAAAT	CCCACATTTT	GTGTCAGTAT	TTACTAGAAA	6720
CTTAGTCATT	TATCTGAAGT	TGAAATGTAA	CTGGGCTTTA	TTTATTTATT	TATTTATTTA	6780
TTTATTTTTA	ATTTTTTTTT	TTGAGACGAG	TCTCACTTTG	TCACCCAGGC	TGGAGTGCAG	6840
TGGCACGATC	TCGGCTCACT	GCAACCTCTG	CCTCCCGGGG	TCAAGCGATT	CTCCTGCCTT	6900
AGCCTCCCGA	GTAGCTGGGA	CTACAGGCAC	GCACCACCAT	GCCTGGCTAA	TTTTTGTATT	6960
TTTAGTAGAC	GGGGTTTCAC	CATGCTGGCC	AAGCTGGTCT	CAAACCTCTG	ACCTTGTGAT	7020
CTGCCGCTT	TAGCCTCCCA	GAGTGCTGGG	ATTACAGGCA	TGAGCCACCA	TGCGTGGTCT	7080
TTTTAAATTT	TTTTGATTTT	TTTTTTTTTT	GAGACAGAGC	CTTGCTCTGT	CGCCAGGCT	7140
GGAGTGCAGT	GGCAGCATCT	CAGCTCACTA	CAAGCTCCGC	CTCCCGGGTT	CACGCCATTC	7200
TTCTGCCTCA	GCCTCCTGAG	TAGCTGGGAC	TACAGGTGCC	CACCACCACG	CCTGGCTAAT	7260
TTTTTTTGGT	ATTTTTATTA	GAGACAAGGT	TTCATCATGT	TGGCCAGGCT	GGTCTCAAAC	7320
TCCTGACCTC	AAGTGATCTG	CCTGCCTCGG	CCTCCCAAAG	CGCTGAGATT	ACAGGTGTGA	7380
TCTACTGCGC	CAGGCCTGGG	CGTCATATAT	TCTTATTTGC	TAAGTCTGGC	AGCCCCACAC	7440
AGAATAAGTA	CTGGGGGATT	CCATATCCTT	GTAGCAAAGC	CCTGGGTGGA	GAGTCAGGAG	7500
ATGTTGTAGT	TCTGTCTCTG	CCACTTGCAG	ACTTTGAGTT	TAAGCCAGTC	GTGCTCATGC	7560
TTTCCTTGCT	AAATAGAGGT	TAGACCCCT	ATCCCATGGT	TTCTCAGGTT	GCTTTTCAGC	7620
TTGAAAATTG	TATTCCTTTG	TAGAGATCAG	CGTAAATAA	TTCTGTCCTT	ATATGTGGCT	7680
TTATTTTAAT	TTGAGACAGA	GTGTCACTCA	GTCGCCCAGG	CTGGAGTGTG	GTGGTGCGAT	7740
CTTGCTCAC	TGCGACCTCC	ACCTCCAGG	TTCAAGCGAT	TCTCGTGCCT	CAGGCTCCCA	7800
AGTAGCTGAG	ATTATAGGTG	TGTGCCACCA	GGCCAGCTA	ACTTTTGTAT	TTTAGTAGA	7860
GACAGGGTTT	TGCCATGTTG	GCTAAGCTGG	TCTCGAACTC	CTGGCCTCAA	GTGATCTGCC	7920
CGCCTTGGCA	TCCCAAAGTG	CTGGGATTAC	AGGTGTGAAC	CACCACACCT	GGCCTCAATA	7980
TAGTGGCTTT	TAAGTGCTAA	GGAAGTGGAT	TGTGTTTTGT	CAGGAAGAGG	CCAGTTGTGG	8040
GTGAAGCATG	CTGTGAGAGA	GCTTGTCAAC	TGGTTGAGGT	TGTGGGAGCT	GCAGCGTGGG	8100
AACTGGAAAG	TGGGCTGGGG	ATCATCTTTT	TCCAGGTCAG	GGGTCAGCCA	GCTTTTCTGC	8160
AGCGTGCCAT	AGACCATCTC	TTAGCCCTCG	TGGGTCAGAG	TCTCTGTTGC	ATATTGTCTT	8220
TTGTTGTTTT	TCACAACCTT	TTAGAAACAT	AAAAAGCATT	CTTAGCCCGT	GGGCTGGACA	8280
AAAAAAGGCC	ATGACGGGCT	GTATGGATTT	GGCCAGCAG	GCCCTTGCTT	GCCAAGCCCT	8340

10

20

30

40

GTTTTAGACA AGGAGCAGCT TGTGTGCCTG GAACCATCAT GGGCACAGGG GAGGAGCAGA	8400	
GTGGATGTGG AGGTGTGAGC TGGAAACCAG GTCCCAGAGC GCTGAGAAAG ACAGAGGGTT	8460	
TTTGCCCTTG CAAGTAGAGC AACTGAAATC TGACACCATC CAGTTCAGAA AAGCCCTGAA	8520	
GTGCTGGTGG ACGCTGCGGG GTGCTCCGCT CTAGGGTTAC AGGGATGAAG ATGCAGTCTG	8580	
GTAGGGGGAG TCCACTCACC TGTGGAAGA TGTGATTAAAG AAAAGTAGAC TTTCAGGGCC	8640	
GGGCATGGTG GCTCACGCCT GTAATCCCAG CACTTTGGGA GGCCGAGGCG GGTGGATCAC	8700	
GAGGTCAGGA GATCGAGACC ATCCTGGCTA ACATGGTGAA ACCCCGTCTT TACTAAAAAT	8760	10
ACAAAAAATT AGCTGGGCGT GGTGGCGGGC GCCTGTAGTC CCAGCTACTC GGGAGGCTGA	8820	
GGCAGGAGAA TGGCGTGAAC CTGGGAGGTG GAGCTTGCTG TGAGCCGAGA TCGCGCCACT	8880	
GCACTCCAGC CTGGGCGACA GAGCGAGACT CCGTCTCAA AAAAAAAAAA AAAGTAGGCT	8940	
TTCATGATGT GTGAGCTGAA GGCGCAGTAG GCAGAAGTAG AGGCCTCAGT CCCTGCAGGA	9000	
GACCCCTCGG TCTCTATCTC CTGATAGTCA GACCCAGCCA CACTGGAAAG AGGGGAGACA	9060	
TTACAGCCTG CGAGAAAAGT AGGGAGATTT AAAAACTGCT TGGCTTTTAT TTTGAACTGT	9120	20
TTTTTTTGTT TGTTTGT TTTT CCCCATTCA GAATACAGAA TACTTTTATG GATTGT TTTT	9180	
TATTACTTTA ATTTTGAAAC AATATAATCT TTTTTTTGTT GTTTTTTTGA GACAGGGTCT	9240	
TACTCTGTCA CCCAGGCTGA GTGCAGTGGT GTGATCTTGG CTCACCTCAG CCTCGACCCC	9300	
CTGGGCTCAA ATGATTCTCC CACCTCAGCT TCCCAAGTAG CTGGGACCAC AGGTGCGTGT	9360	
GTTGCGCTAT ACAAATCCTG AAGACAAGGA TGCTGTTGCT GGTGATGCTG GGGATTCCCA	9420	
AGATCCCAGA TTTGATGGCA GGATGCCCT GTCTGCTGCC TTGCCAGGGT GCCAGGAGGG	9480	
CGCTGCTGTG GAAGCTGAGG CCCGGCCATC CAGGGCGATG CATTGGGCGC TGATTCTTGT	9540	30
TCCTGCTGCT GCCTCGGTGC TTAGCTTTTG AAACAATGAA ATAAATTAGA ACCAGTGTGA	9600	
AAATCGATCA GGAATAAAT TTAATGTGGA AATAAATGAA ACAACTTAGT TCTTCATAAG	9660	
AGTTTACTTG GTAAATACTT GTGATGAGGA CAAAACGAAG CACTAGAAGG AGAGGCGAGT	9720	
TGTAGACCTG GGTGGCAGGA GTGTTTTGTT TGTTTTCTTT GGCAGGGTCT TGCTCTGTTG	9780	
CTCAGGCTGG AGTACAGTGG CACAATCACA GCTCACTATA GCCTCGACCT CCTGGACTCA	9840	
AGCAATCCTC CTGCCTCAGC CTCCCAGTAG CTGGGACTAC AGGCGCATGC CACCATGCCT	9900	
GGCTAATTTT AAATTTTTTT TTTTCTCTTT TTTGAGATGG AATCTCACTC TGTCGCCCAG	9960	40
GCTGGAGTGC AGTGGCGTGA TCTCGGCTGA CGGCAAGCTC CGCCTCCCAG GTTCACTCCA	10020	
TTGCGCTGCC TCAGCCTCCC AAGTAGCTGG GACTACAGGC GCTGGGATTA CAAACCCAAA	10080	
CCCAAAGTGC TGGGATTACA GCGTGAGCC ACTGCACCCG GCCTGTTTTG TCTTTCAATA	10140	
GCAAGAGTTG TGTTTGCTTC GCCCCTACCT TTAGTGAAA AATGTATAAA ATGGAGATAT	10200	

TGACCTCCAC ATTGGGGTGG TTAAATTATA GCATGTATGC AAAGGAGCTT CGCTAATTTA	10260	
AGGCTTTTTT GAAAGAGAAG AAAGTGAATA ATCCATGTGT GTATATATAT TTTAAAAGCC	10320	
ATGGTCATCT TTCCATATCA GTAAAGCTGA GGCTCCCTGG GACTGCAGAG TTGTCCATCA	10380	
CAGTCCATTA TAAGTGCCT GCTGGGCCAG GTGCAGTGGC TTGTGCCTGA ATCCCAGCAC	10440	
TTTGGGAGGC CAAGGCAGGA GGATTCATTG AGCCCAGGAG TTTTGAGGCG AGCCTGGGCA	10500	
ATGTGGCCAG ACCTCATCTC TTCAAAAAAT ACACAAAAAA TTAGCCAGGC ATGGTGGCAC	10560	
GTGCCTGTAG TCTCAGCTAC TCAGGAGGCT GAGGTGGGAG GATCACTTTG AGCCTTGCAG	10620	10
GTCAAAGCTG CAGTAAGCCA TGATCTTGCC ACTGCATTCC AGCCTGGATG ACAGAGCGAG	10680	
ACCCTGTCTC TAAAAAATAA AAAAACCAAA CGGTGCACTG TTTTCTTTTT TCTTATCAAT	10740	
TTATTATTTT TAAATTAAAT TTTCTTTTAA TAATTTATAA ATTATAAATT TATATTAAAA	10800	
AATGACAAAT TTTTATTACT TATACATGAG GTAAACTTA GGATATATAA AGTACATATT	10860	
GAAAAGTAAT TTTTGGCTG GCACAGTGGC TCACACCTGT AATCCCAGCA CTTTGGGAGG	10920	
CCGTGGCGGG CAGATCACAT GAGATCATGA GTTCGAGACC AACCTGACCA ACATGGAGAG	10980	20
ACCCCATCTC TACTAAAAAT ACAAATTAG CCGGGGTGGT GCGCATGCC TGTAATCCCA	11040	
GCTACTCGGG AGGCTGAGGC AGGAGAATCT CTTGAACCCG GGAGGCAGAG GTTGCAGTGA	11100	
GCCAAGATCG TGCCTTTGCA CACCAGCCTA GGCAACAAGA GCGAAAGTCC GTCTCAAAAA	11160	
AAAAGTAATT TTTTTTAAGT TAACCTCTGT CAGCAAACAA ATTTAACCCA ATAAAGGTCT	11220	
TTGTTTTTTA ATGTAGTAGA GGAGTTAGGG TTTATAAAAA ATATGGTAGG GAAGGGGGTC	11280	
CCTGGATTTG CTAATGTGAT TGTCATTTGC CCCTTAGGAG AGAGCTCTGT TAGCAGAATG	11340	
AAAAAATTGG AAGCCAGATT CAGGGAGGGA CTGGAAGCAA AAGAATTTCT GTTCGAGGAA	11400	30
GAGCCTGATG TTTGCCAGGG TCTGTTTAAC TGGACATGAA GAGGAAGGCT CTGGACTTTC	11460	
CTCCAGGAGT TTCAGGAGAA AGGTAGGGCA GTGGTTAAGA GCAGAGCTCT GCCTAGACTA	11520	
GCTGGGGTGC CTAGACTAGC TGGGGTGCCC AGACTAGCTG GGGTGCCTAG ACTAGCTGGG	11580	
TACTTTGAGT GGCTCCTTCA GCCTGGACCT CGGTTTCCTC ACCTGTATAG TAGAGATATG	11640	
GGAGCACCCA GCGCAGGATC ACTGTGAACA TAAATCAGTT AATGGAGGAA GCAGGTAGAG	11700	
TGGTGCTGGG TGCATACCAA GCACTCCGTC AGTGTTTCCT GTTATTCGAT GATTAGGAGG	11760	
CAGCTTAAAC TAGAGGGAGT TGAGCTGAAT CAGGATGTTT GTCCCAGGTA GCTGGGAATC	11820	40
TGCCTAGCCC AGTGCCAGT TTATTTAGGT GCTCTCTCAG TGTTCCCTGA TTGTTTTTTC	11880	
CTTTGTCATC TTATCTACAG GATGTGACTG GGAAGCTCTG GTTTCAGTGT CATGTGTCTA	11940	
TTCTTTATTT CCAGGCAAAG GAAACCAACA ATAAGAAGAA AGAATTTGAG GAAACTGCGA	12000	

AGAAAGTGCG	CCGTGCCATC	GAGCAGCTGG	CTGCCATGGA	TTGAGGCCTC	TGGCCGGAGC	12060
TGCCTGGTCC	CAGAGTGGCT	GCACCACTTC	CAGGGTTTAT	TCCCTGGTGC	CACCAGCCTT	12120
CCTGTGGGCC	CCTTAGCAAT	GTCTTAGGAA	AGGAGATCAA	CATTTTCAAA	TTAGATGTTT	12180
CAACTGTGCT	CCTGTTTTGT	CTTGAAAGTG	GCACCAGAGG	TGCTTCTGCC	TGTGCAGCGG	12240
GTGCTGCTGG	TAACAGTGGC	TGCTTCTCTC	TCTCTCTCTC	TTTTTTGGGG	GCTCATTTTT	12300
GCTGTTTTGA	TTCCCGGGCT	TACCAGGTGA	GAAGTGAGGG	AGGAAGAAGG	CAGTGTCCCT	12360
TTTGCTAGAG	CTGACAGCTT	TGTTTCGCGTG	GGCAGAGCCT	TCCACAGTGA	ATGTGTCTGG	12420
ACCTCATGTT	GTTGAGGCTG	TCACAGTCCT	GAGTGTGGAC	TTGGCAGGTG	CCTGTTGAAT	12480
CTGAGCTGCA	GGTTCCTTAT	CTGTCACACC	TGTGCCTCCT	CAGAGGACAG	TTTTTTTGTT	12540
GTTGTGTTTT	TTTGTTTTTT	TTTTTTGGTA	GATGCATGAC	TTGTGTGTGA	TGAGAGAATG	12600
GAGACAGAGT	CCCTGGCTCC	TCTACTGTTT	AACAACATGG	CTTTCTTATT	TTGTTTGAAT	12660
TGTTAATTCA	CAGAATAGCA	CAAACATAAA	TTAAACTAA	GCACAAAGCC	ATTCTAAGTC	12720
ATTGGGGAAA	CGGGGTGAAC	TTCAGGTGGA	TGAGGAGACA	GAATAGAGTG	ATAGGAAGCG	12780
TCTGGCAGAT	ACTCCTTTTG	CCACTGCTGT	GTGATTAGAC	AGGCCCAGTG	AGCCGCGGGG	12840
CACATGCTGG	CCGCTCCTCC	CTCAGAAAAA	GGCAGTGGCC	TAAATCCTTT	TTAAATGACT	12900
TGGCTCGATG	CTGTGGGGGA	CTGGCTGGGC	TGCTGCAGGC	CGTGTGTCTG	TCAGCCCAAC	12960
CTTCACATCT	GTCACGTTCT	CCACACGGGG	GAGAGACGCA	GTCCGCCCAG	GTCCCCGCTT	13020
TCTTTGGAGG	CAGCAGCTCC	CGCAGGGCTG	AAGTCTGGCG	TAAGATGATG	GATTTGATTC	13080
GCCCTCCTCC	CTGTCATAGA	GCTGCAGGGT	GGATTGTTAC	AGCTTCGCTG	GAAACCTCTG	13140
GAGGTCATCT	CGGCTGTTCC	TGAGAAATAA	AAAGCCTGTC	ATTTCAAACA	CTGCTGTGGA	13200
CCCTACTGGG	TTTTTAAAT	ATTGTCAGTT	TTTCATCGTC	GTCCCTAGCC	TGCCAACAGC	13260
CATCTGCCCA	GACAGCCGCA	GTGAGGATGA	GCGTCCTGGC	AGAGACGCAG	TTGTCTCTGG	13320
GCGCTTGCCA	GAGCCACGAA	CCCCAGACCT	GTTTGTATCA	TCCGGGCTCC	TTCCGGGCAG	13380
AAACAACCTGA	AAATGCACTT	CAGACCCACT	TATTTATGCC	ACATCTGAGT	CGGCCTGAGA	13440
TAGACTTTTC	CCTCTAAACT	GGGAGAATAT	CACAGTGGTT	TTTGTTAGCA	GAAATGCAC	13500
TCCAGCCTCT	GTACTIONCT	AAGCTGCTTA	TTTTTGATAT	TTGTGTCAGT	CTGTAAATGG	13560
ATACTTCACT	TTAATAACTG	TTGCTTAGTA	ATTGGCTTTG	TAGAGAAGCT	GGAAAAAAT	13620
GGTTTTGTCT	TCAACTCCTT	TGCATGCCAG	GCGGTGATGT	GGATCTCGGC	TTCTGTGAGC	13680
CTGTGCTGTG	GGCAGGGCTG	AGCTGGAGCC	GCCCCCTCTCA	GCCCCGCTGC	CACGGCCTTT	13740
CCTTAAAGGC	CATCCTTAAA	ACCAGACCCT	CATGGCTGCC	AGCACCTGAA	AGCTTCCTCG	13800
ACATCTGTTA	ATAAGCCGT	AGGCCCTTGT	CTAAGCGCAA	CCGCCTAGAC	TTCTTTTCAG	13860

10

20

30

40

ATACATGTCC ACATGTCCAT TTTTCAGGTT CTCTAAGTTG GAGTGGAGTC TGGGAAGGGT 13920
 TGTGAATGAG GCTTCTGGGC TATGGGTGAG GTTCCAATGG CAGGTTAGAG CCCCTCGGGC 13980
 CAACTGCCAT CCTGGAAAGT AGAGACAGCA GTGCCCGCTG CCCAGAAGAG ACCAGCAAGC 14040
 CAACTGGAG CCCCCATTGC AGGCTGTCGC CATGTGGAAA GAGTAACTCA CAATTGCCAA 14100
 TAAAGTCTCA TGTGGTTTTA TCTACTTTTT TTTTCTTTTT CTTTTTTTTT GAGACAAGGC 14160
 CTTGCCCTCC CAGGCTGGAG TGCAGTGGAA TGACCACAGC TCACCGCAAC CTCAAATTCT 14220
 TCGGTTCAAG TGAACCTCCC ACTTTAGCCT CCCAAGTAGC TGGGACTACA GGCGCACGCC 14280
 ATCACACCCG GCTAATTGAA AAATTTTTTT TTTTGTTTAG ATGGAATCTC ACTTTGTTGC 14340
 CCAGGCTGGT CTCAAATCC TGGGCTCAAG TGATCATCCT GCTTCAGCGT CCGACTTGTT 14400
 GGTATTATAG GCGTGAGCCA CTGGGCCTGA CCTAGCTACC ATTTTTTAAT GCAGAAATGA 14460
 AGACTTGTAG AAATGAAATA ACTTGTCAG GATAGTCGAA TAAGTAACTT TTAGAGCTGG 14520
 GATTGAACC CAGGCAATCT GGCTCCAGAG CTGGGCCCTC ACTGCTGAAG GACACTGTCA 14580
 GCTTGGGAGG GTGGCTATGG TCGGCTGTCT GATTCTAGGG AGTGAGGGCT GTCTTTAAAG 14640
 CACCCCATTC CATTTTCAGA CAGCTTTGTC AGAAAGGCTG TCATATGGAG CTGACACCTG 14700
 CCTCCCAAG GCTTCCATAG ATCCTCTCTG TACATTGTAA CCTTTTATTT TGAAATGAAA 14760
 ATTCACAGGA AGTTGTAAGG CTAGTACAGG GGATCC 14796

10

20

【図 1 A】

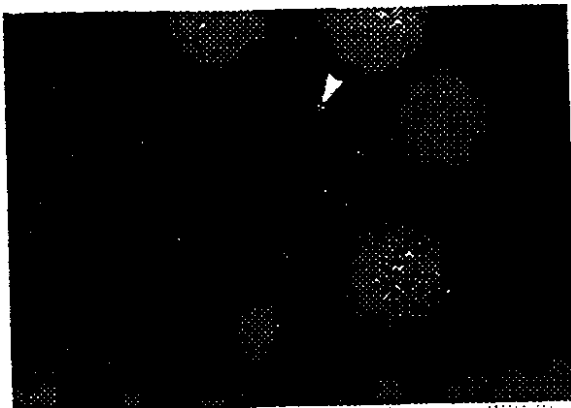


FIG. 1A

【図 1 B】

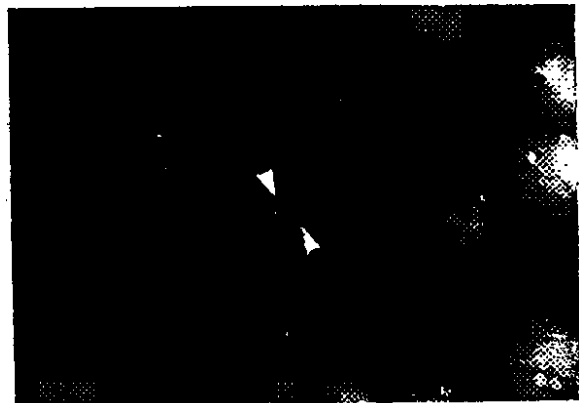


FIG. 1B

【図 1 C】

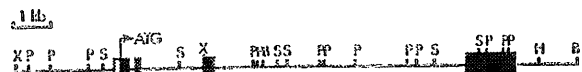


FIG. 1C

【図 1 D】

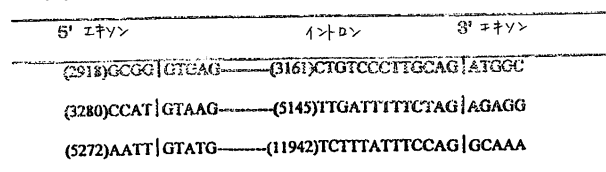
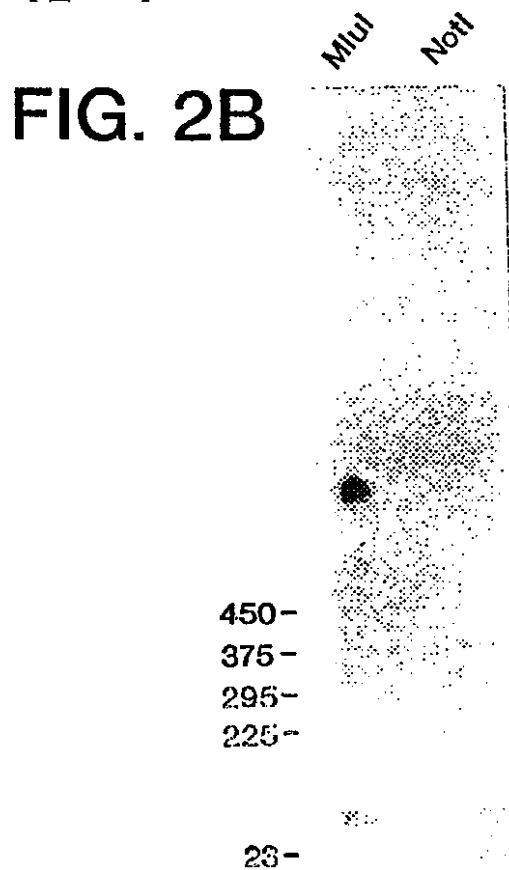
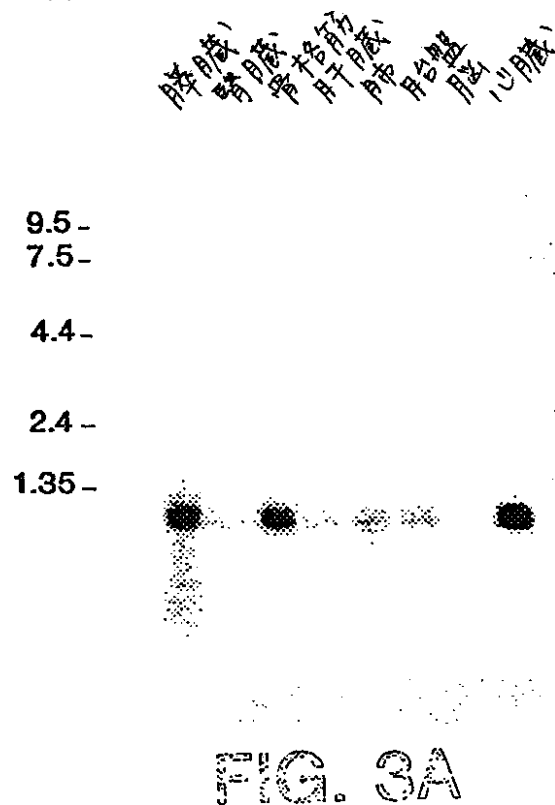


FIG. 1D

【 図 2 B 】



【 図 3 A 】



【図 3 B】

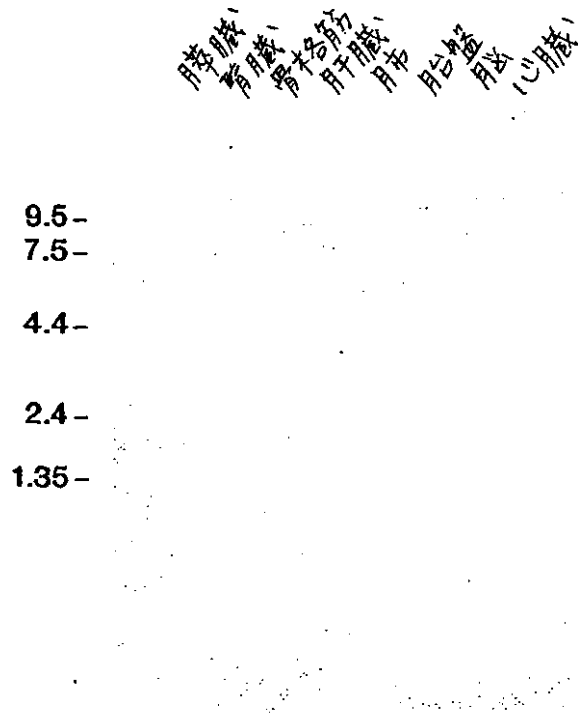


FIG. 3B

【図 3 C】

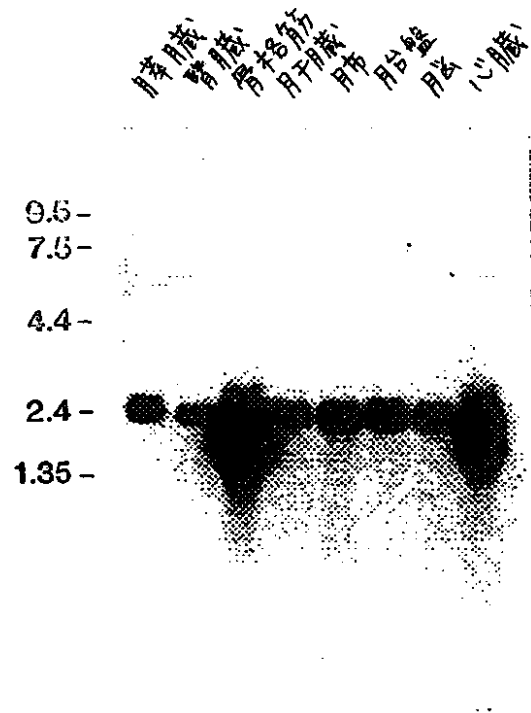


FIG. 3C

【図 3 D】



FIG. 3D

【図 3 E】

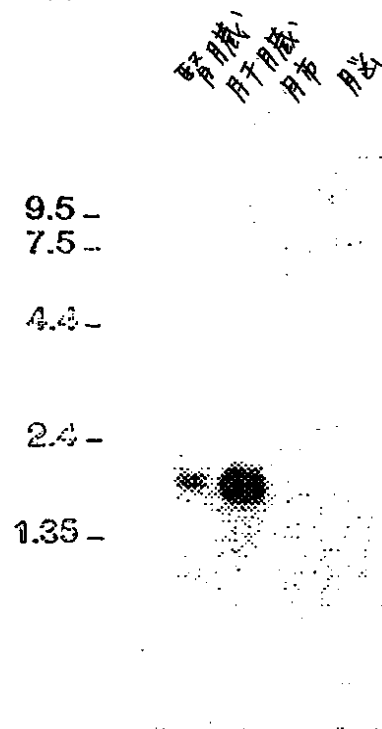


FIG. 3E

【図 4 C - 1】

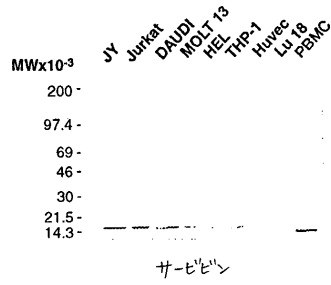


FIG. 4C-1

【図 4 C - 2】

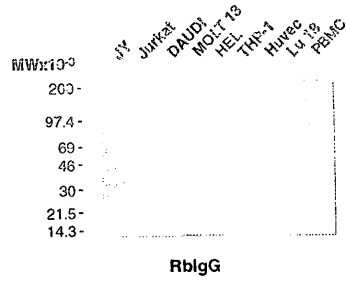


FIG. 4C-2

【図 5 A】

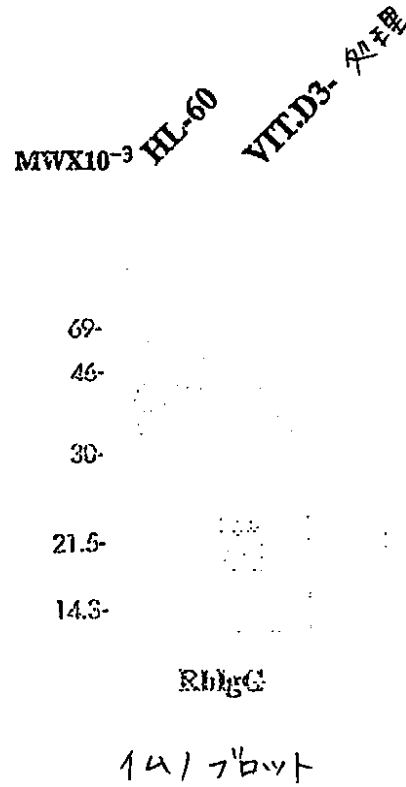


FIG. 5A

【図 5 B】

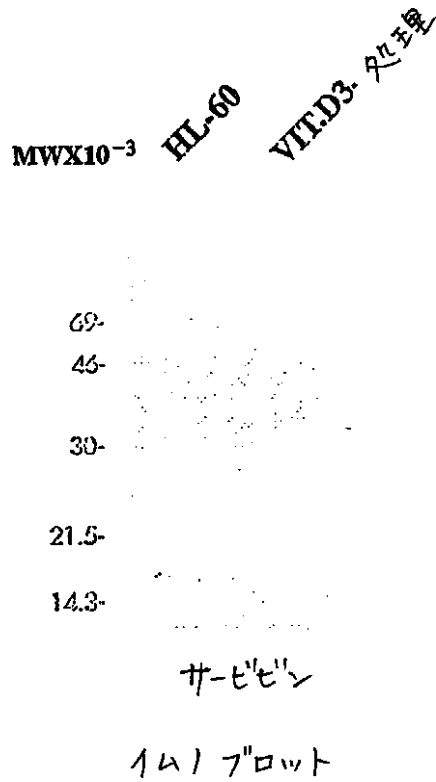


FIG. 5B

【図 5 C】

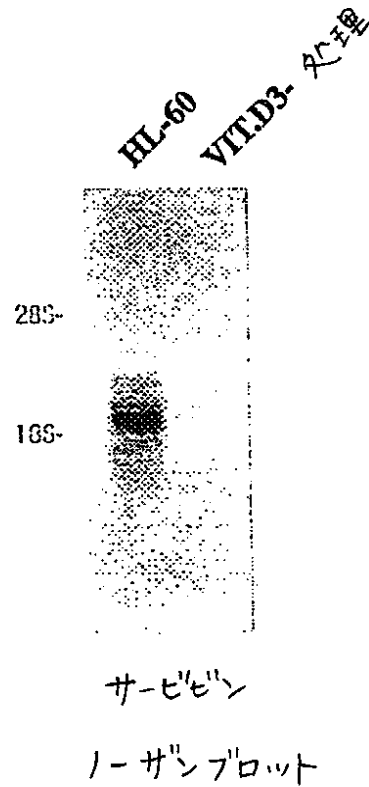


FIG. 5C

【図 6 A】



FIG. 6A

【図 6 B】

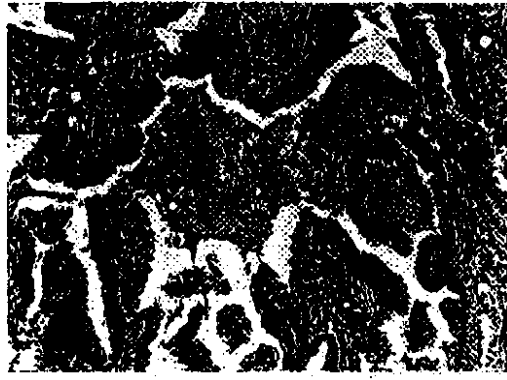


FIG. 6B

【図 6 C】

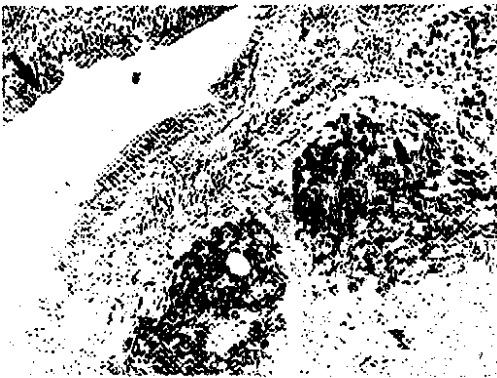


FIG. 6C

【図 6 D】

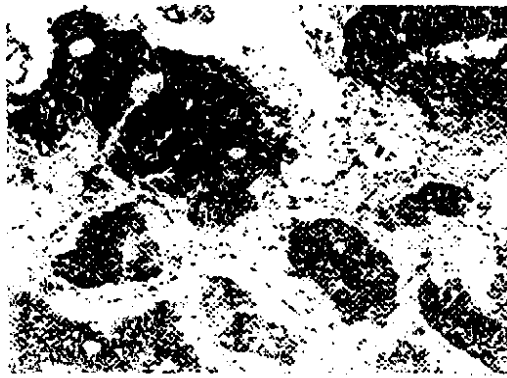


FIG. 6D

【図 6 E】



FIG. 6E

【図 6 F】



FIG. 6F

【図 6 G】



FIG. 6G

【図 6 H】



FIG. 6H

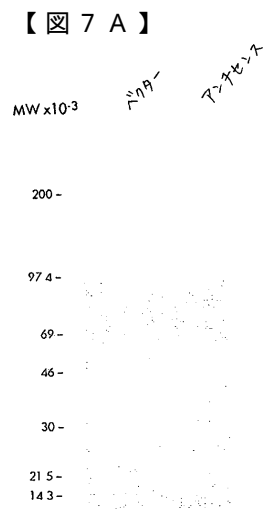


FIG. 7A

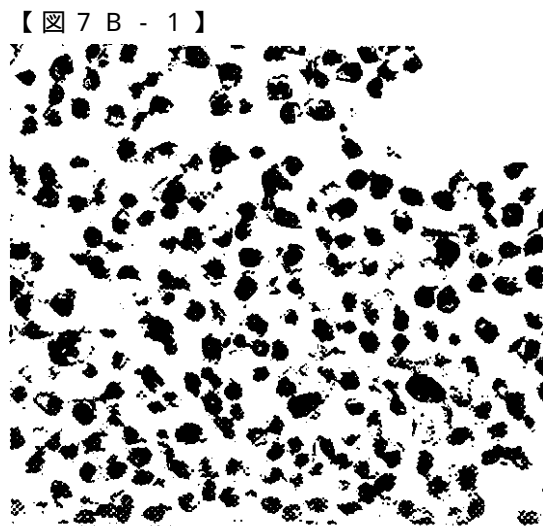
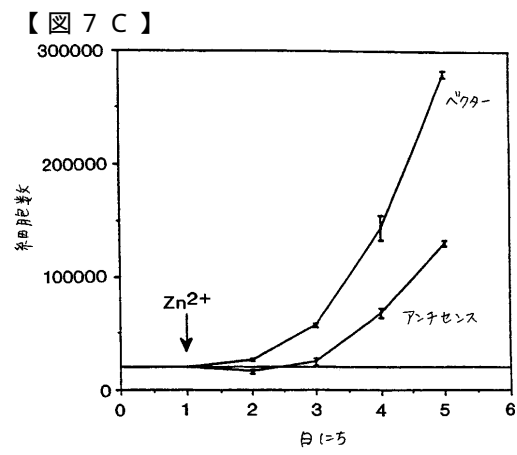


FIG. 7B-1

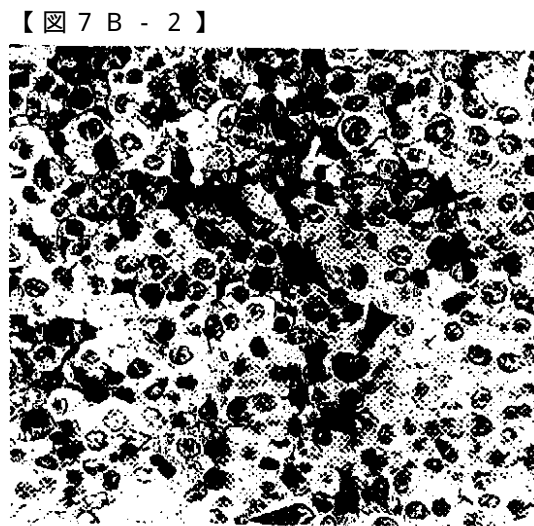


FIG. 7B-2

【図 7 B - 3】

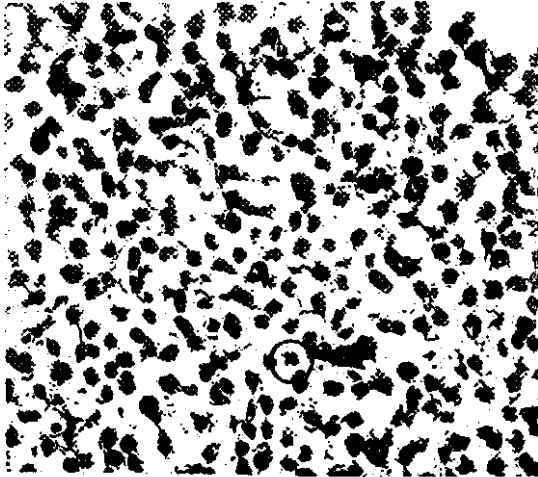


FIG. 7B-3

【図 7 B - 4】

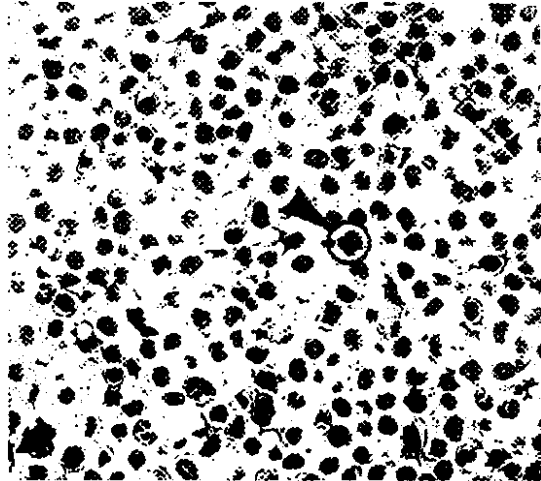
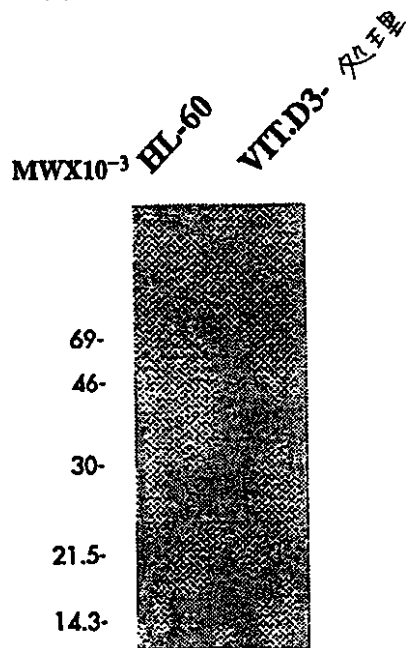


FIG. 7B-4

【図 8 A】

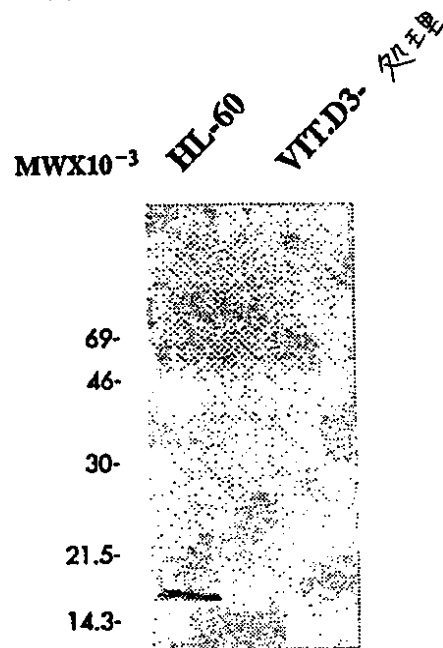


RbIgG

イムノブロット

FIG. 8A

【図 8 B】



サ-β"ビ"ン

イムノブロット

FIG. 8B

【図 10 B】

2201 TTTTTCGAGA GGTGGCACCC TGTAAGGCTC TCCTGTCTGA CTTTTTTTTT
 2251 TTTTTCAGAC TGAGTTTGGC TCTGTGTGCC TAGGCTGGAG TGCAATGGCA
 2301 CAATCTCAGC TCACCTGACC CTCGTGCTCC CGGGTTCACG CGATTCTCCT
 2351 GCCTCAGCCT CCCGAGTAGT TGGGATACAC GGCACTGACAC ACCACGCCCA
 2401 GCTAATTTTT GTATTTTATG TAGAGACAAG GTTTCACCGT GATGGCCAGG
 2451 CTGGTCTTGA ACTCCGAGAC TCAAGTGATG CTCCTGCCTA GGCCTCTCAA
 2501 AGTGTCTGGG TACACGCGCT GAGCCACTGC ACCCGGCTCG CACGCGTTCT
 2551 TTGAAGACAG TCGAGGGGGC GCTAGGTGTG GGCAGGGAGC AGCTGGCGCG
 2601 GCGTCTGTGG TCGTACGCGC ACCACGGGCA GAGCCACGCG GCGGGAGGAC
 2651 TACAACCTCC GGCACACCCC GCGCGGCCCC GCCTCTACTC CCAGAAGGCC
 2701 CGCGGGGGTG GACCGCTTAA GAGGCGGTGC GCTCCGACA TGCCCGCGGG
 2751 GCGGCCATTA ACCGCCAGAT TTGAATCGCG GGACCCGTTG GCAGAGGTGG
 |----->Start
 2801 CGCGGGCGCG ATGGGTGCCC CGACGTTGCC CCCTGCCTGG CAGCCCTTTC
 2851 TCAAGGACCA CCGCATCTCT ACATTCAAGA ACTGGCCCTT CTGGAGGGGC
 2901 TGGCGCTGCA CCCCGGAGCG GTGATGACGT CCCGCGCTCC TGGGGTCCCC
 2951 CAGCGCCGCG TTGCGCTCTG CTAAGGAGGG CCACCTGTGAC TGGGCTCGGG
 3001 GGGTCAACAG CGCCCTCCCC TTCCGCTCCT GTCCCGAGCG AGGCCACTGT
 3051 GGCTGGGCCC CTGGGTGCTA GCGCGGCTCC CCCTCCCTGC TTTGTCCCCA
 3101 TCGAGGCGCT TGTGCTGGGG CAGATGGCGG AGGCTGCGCT CATCCACTGC
 3151 ACAGAGCTGT CTGTCCTCTG CAGATGGCGG AGGCTGCGCT CATCCACTGC
 3201 CCCACTGAGA ACAGAGCCAG CTGCGGCCAG TGTTCCTTCT GCTTCAAGGA
 3251 GCTGGGAAGC TGGGAGCCAG GTTGTCTTTC GCTTCAAGGA TGTGATGTGC
 3301 AGCCTCGATG GGCCTTGTGT TGAAGTGAAT TGTCAAAAGA TTTGATGTGC
 3351 AAAGACACTT AGATATGGAG GGTGTCTTTC CACCCCTATT GCTTCTAA
 3401 CAGCTGTGTT GAACGGATAC CTCTCTATAT GCTGTGCTCT TGTGATGTGC
 3451 TACAACTTAA TTAACTCTCA TTGACCAAAA ATGCGTTGGG GTGGAGGTAA
 3501 GAGTGCCTGAT GCCTTTCTATG TTCAACAGAA TACATCAGCA GACCTCTGTT
 3551 TGTGTAGAGT CCAGGAATGT CCAAGTGCTT TTTTGTGATG TTTTAAAGAA
 3601 ACAGTTAATG TGAATATAAA CCTACACAGC ACAAATAATTA CCGTTTGA
 3651 GTGTGCTACT CACACTTTGG GAGGCTGAGG GCGGCGGATC TCTCTACTAA
 3701 AGGAGTCTCA GACCTGCTCG GCAACTTTGG GAAACCCCGT TCTCTACTAA
 3751 AAATACAAAA ATTAGCCGCG CATGCTGAGG GAATCGCTTG AACCTGGGAG GCGGAGGTG
 3801 CTCGGGAGGC TAAGGAGGAG TGAATGCTTG AACCTGGGAG GCGGAGGTG
 3851 CAGTGGAGCG AGATTGTGCG AATGCACTCC AGGCTGGGAG GCGGAGGTG
 3901 ACTCGCTCAT AAAAATAAAA AATTGAAAAA CAAGATGCCT AGTTAATGAC
 3951 TACTTCAGTG TGTGTCTGGA TTTTCTTCTT CCAAGTGCCT AGTTAATGAC
 4001 AATGAATCTT TGTATCTGGA TGTATCTGTT CTCTCCACAG TGTATGSCCA
 4051 TAATCTTTTC TCACCTTTTT TCTGTGCGGA TCCAGTTGCT TCCACAGCTT
 4101 TAAATTTTTT CCGCTGGAGA TCTTAGTAGT TTTGCTATGT TGTATTAAT
 4151 GCATCCCCGT AATCAGTGGG AAGAGATCAG TGGTATCTCT CTTGAAATG
 4201 AATAAGATTT ATGATATTTT CAGATTAGAG TTACAACTGG CTGCTTTTTT
 4251 GGAATTTTGT TGGCCTATGT TCCATTGTAA TGCAGTTCTG GTAAACGTTG
 4301 TAGTCAGTTA TACAGGGAGA CCGGGCAATA ATGCCCTTAA GTCGCCCTAA
 4351 AGGGGGTCCC TGGGGGAACC CCGGGCAATA ATGCCCTTAA GTCGCCCTAA
 4401 TCCTTACAGT GGGCGGGGCA CGGTGGCTTA CGCCTGTGAT ACAGCACTT
 4451 TGGGAGGCGG AGGCGGGGCG ATCAGGAGGT CAGGAGATCG AGACCATCTT
 4501 GGCTAATACG GTGAACACCC GTCTCCACTA AAAATACAAA AAATAGCCCG

FIG. 10B

【図 10 D】

6951 ATTACAGGCA TGAGCCACCA TGGCGTGTCT TTTTAAATTT TTTTGATTTT
 7001 TTTTTTTTTT GAGACAGACT CTTGCTCTGT CGCCGAGGCT GGGATGCAAT
 7051 GGCAGGATCT GAGCTCACTA CAAGCTCCGC CTCGCGGTTT CAGCGCATTC
 7101 TTTCTGCTCA GCCTCCTGAT TAGCTGGGAC TACAGGTGCC CACCACCAAG
 7151 CTTGCTTAAT TTTTCTTGTG TATTTTATTA GAGACAAGGT TTATCATGTG
 7201 TGGCCAGGCT GGTCTCAAAAC TCCTGACCTC AAGTGATCTG CCTGCTCGGG
 7251 CCTCCAAAGC CGCTGAGATT ACAGGTGTGA TCTACTGCGC CAGCGCTGGG
 7301 CGTCAATATAT TCTTATTTGC TAAGTCTGGC AGCCCCACAC AGAATAAGTA
 7351 CTGGGGGATT CCAATCTCCTT GTAGCAAAAG CCTGGGTGGA GAGTCAGGAG
 7401 ATGTTGTAGT TCTGTCTGCT CCACCTGCGC ACTTGTAGTT TAACCCAGTC
 7451 GTGCTCATGC TTTCTCTGCT AAATAGAGGT TAGACCCCTG ATCCCATGGT
 7501 TTTCTCAGGT TTTCTCTGCT TTAGTCTGTT TATTCCTTTG TAGAGATCAG
 7551 CGTAAATATA TTTCTGCTCT ATATGTGCTT TATTTTAAAT TTGAGACAGA
 7601 GTGTCACTCA GTGTGAGGCT CAGAGTGTG GTGTGCGAT CTGGCTCAC
 7651 TGGACCTGAC ACCTCCAGC TTCAAGGAGT TCTGCTGCT CAGGCTCCCA
 7701 AGTAGCTGAG ATATAGAGTG TGTGACACCA GGCACAGCTA ACTTTGTAT
 7751 TTTTAGTACA GACAGGGTTT TGCCATTTTG GCTAAGCTGG TCTGGAATTC
 7801 CTGGCTCCAA GTGATCTGCG CGCCTGGACA TCCCAAAGTG CTGGGATATC
 7851 AGGTGTGAAC CACCCACCTT GGCTCAATA TAGTGSCTTT TAAGTGCTAA
 7901 GGCATGAGAT TGTGTGTGCT TCGTGTAGGT TGTGGAGCT GCGAGCTGGG
 7951 CTGTGAGAGA GCTTGTACCC TCGTGTAGGT TGTGGAGCT GCGAGCTGGG
 8001 AACTGGAAAG TGGGCTGGGG ATCATCTTTT TCGAGCTCAG GGTTCAGGCA
 8051 GCTTTTCTCG AGCGTGCCAT AGACCATCTC TTAGCCCTCG TGGTTCAGAG
 8101 TCTCTGTGTC ATATTGCTCT TGTGTGTTT TCACAACTT TTAGAAACAT
 8151 AAAAAGCAAT CTTAGGCGCTT GGCCTGGACA AAAAAGGCC ATGACGGGCT
 8201 GTATGGAATT GGCACAGCAG GCCCTTGCTT GCCAAGCCCT GTTTTAGACA
 8251 AGGAGCAGCT TGTGTGCTGT GAACCATCAT GGGCAGAGGG GAGGAGCAGA
 8301 GTGGATGTGG AGGTGTGAGC TGGAAACAGG GTCCAGAGGC GCTGAGAAAG
 8351 ACAGAGGGTT TTTGCCCTTG CAAGTAGAGC AACTGAAATC TGACACCATC
 8401 CAGTTCAGAA AGCCCTGAA GTGCTGGTGG ACCTGCGGGG GTGCTCGCTG
 8451 CTAGGCTTAC AGGATGAGAG ATGCACTCTG GTAGGGGGAG TCCACTCACC
 8501 TGTGTGAAGA TGTGATTAAG AAAAGTAGAC TTTGAGGCC GGGCATGGT
 8551 GCTCAGCGCT GTAATCGGCG CACTTTGGGA GCGCGAGGCG GGTGATCTAC
 8601 GAGGTGAGGA GATCGAGACC ATCTCGGCTA ACATGTGTA ACCCTGTCTT
 8651 TACTAAAAAT ACAAAAAAT AGCTGGGCGT GGTGGCGGCG GCTGTAGTCT
 8701 CCAGCTTACT GGGAGGCTGA GAGGAGAGAA TGGCGTGAAC TCGGAGAGTG
 8751 GAGCTTGTCT TGAGCCGAGA TCGCGCCACT GCACCTCAGC CTGGGCGACA
 8801 GAGCAGACTC CCGTCTCAAA AAAAATAAAA AAGTAGGCTT TTAGATGATG
 8851 GTGAGCTGAA GGGCAGTAGT CAGCAAGTAG AGGCTCAGT CCGTCAAGGA
 8901 GACCCCTCGG TCTCTATCTC CTGATAGTCA GACCCAGCCA CAGTCAAGAG
 8951 AGGGGAGGCA TTACAGCCTG CGAGAAAGAT AGGAGATTTT AAAAATGCT
 9001 TGGCTTTTAT TGTGACACTT TTTTGTGTT TGTGTGTTT CCGCAATTTA
 9051 GAATACAGAA TACTTTTATG GATTGTGTT TATTACTTTA ATTTTGAAC
 9101 AATATAATCT TTTTGTGTT GTTTTGTGA GACAGCTCTG TACTCTGTCA
 9151 CCGAGGCTGA GTGAGTGGT GTGATCTGCG CTCACCTGAG CCGTCAAGCC
 9201 CTGGGCTCAG ATGATCTCC CACTCAGCT TCCCAAGTGA TGCTGTGCT
 9251 AGGTGGGTGT TGTGGCTCAT CAAATCCCTG AAGCAAGAGA TGCTGTGCT
 9301 GGTGATGCTG GGGATTCACA AGATCCCGA TTTGATGGCA GGTGCGGCT

FIG. 10D

【図 10 C】

4551 GGCCTGGTGG TGGGCGCCTG TAGTCCCAGC TACTCGGGAG GCTGAGGCAG
 4601 GAGAATGGCG TGAACCCAGG AGGCGGAGCT TCCAGTGGCA CGAGATGGCA
 4651 CCACCTGCACT CCAGCCTGGG CGACAGAAAG AGACTCCCTC TCAAAAAAAA
 4701 AAAAAAAGA AAAAAATCTT TACAGTGGAT TACATAACAA TTCCAGTGAA
 4751 ATGAAATTTT TCAACACAGT TCCTTGAGAA GTTGGAGAGG ATTTGACATG
 4801 TAATTCCTTT GGACATATAC CATGTAAACAT TTTTCCAAT AATTGCTAAG
 4851 GAAGTCCAGA TAAATAGAT ACATTAGCCA CACAGATGTG GGGGAGATG
 4901 TCCACAGGGA GAGAGAAGGT GCTAAGAGGT GCCATATGGG AATGCGGCT
 4951 GGGCAAGCA CTGATGCCAT CAATCTCAGA CTTGACGTCT TACTCTGAG
 5001 GCAGAGCAGG GTGTGCTGTG GGAGGGCGTG GGGAGGTGGC CCGTGGGAG
 5051 TGGACTCGCG CTTTAAATCC TTCAGCTGCC TTTGCTGCTG TGTTTGAT
 5101 TTTCTAGAGA GGAACATAAA AAGCATCTGT CCGTGTGGCG TTTCTTCT
 5151 CTCAAGAAGC AGTTTGAAGA ATTAACCTCT AGTGAATTTT TGAACCTGGA
 5201 CAGAGAAAGA GCCAAGAAAC AAATTTATAT TATTGGGAT TGAACCTGCT
 5251 CAAACCTGCT TCAATGTCTT TAGCACTAAA CTACCTAGCT CCTCAAAGGG
 5301 ACTCTGTGTT TCTCTCAGGA AGCAITTTTT TTTTCTTCTT GAGATAGAT
 5351 TTTCACTCTG TTGCGCCAGG TGGAGTGCAA TGGTGCAATC TTGGCTCACT
 5401 GCAACCTCTG CTTCTCGGCT TCAAGTGATG TCTCGGCTC TCGGCTCCAA
 5451 GTAACTGGGA TTACAGGGAA GTGCCACAC ACCCAGCTAA TTTTGTAT
 5501 TTTAGTAGAG ATGGGGTTTC ACCACATGCT TTTGCTGAG ACACAGTTTC
 5551 TGACCTCGTG ATTGCGCCAC CTTGGCTGCC CAAAGTGCTG GGATACAGC
 5601 CGTGAACCA CACGCGTGGC TTTTCTTCTT GCTTCAAGGA TGTGATGTGC
 5651 ACTCTGTATC CAGGCTGGA GTAGGGTGGC TGATCTCGG ATCACTGAA
 5701 CTTCCGCTCT CTGGGCTCAA GTGATTTGCG TGTCTGAGT TCCCAAGTAG
 5751 CCGAGATTAC AGGATGTGCG CACCACACC AGGTAAITTT TGTATTTTTG
 5801 GTAGAGACGA GGTTCACCA TGTGTGGCCAG GCTGGTTTTC AACTCTGAC
 5851 CTGAGTGTAT CCACCCGCTT CAGCTCCCA AGTGTCTGAG ATTTATAGTG
 5901 TGAGCCACCA CACCTGGGCT CAGGAAGTAT TTTTATTTT AAATTTATTT
 5951 ATTTATTTGA GATGGAGTCT TGCTCTGTAG CCGAGCTAG TGGGAGCA
 6001 CCGGATCTCG GCTCACTGCA AGCTCCGCC CCAGGTTCT AGCCATCTTC
 6051 CCGCTCAGC CTTCCGAGTA GCTGGAGCTA ACCTGAGCTA CCGGCTGAG
 6101 CCGCTAATTT TTTTGTATTT TTAGTAGAGA CCGGTTTCA CCGTGTAGC
 6151 CAGGAGGGTC TGTGCTCTCT GACCTCGTGA TGGTCTGCT CCGGCTGCTC
 6201 AAGTGTCTG GATTACAGGT GTGAGCCACC ACACCCGCT ATTTTATTT
 6251 TTTTGAGAGA GGGACTCACT CTGCTACCTG GCTGAGTGT CAGTGTGACA
 6301 CCAATAGCTA CTGAGCTCTG GACTCTGTA GCTCAAGTGA TCCCTCCACC
 6351 TCACTCTCA AGTAATTTG GACTACAGT GACCCCACT AGTCCACTG
 6401 AATTTATTTA TTTATTTATT TATTTATTTT CATAGAGATG AGGTTCCCT
 6451 GTGTTGCCA GGTGCTCTT GAACTCTGTA GCTCAGGGA TCCCTTTGCC
 6501 TGGGCTCTCC AAGTGTCTGA GATTACAGGC ATGAGCCACC CTGGGCTGCT
 6551 AGGAATCAT TTTAAGGCC CTAGGATGTG TGTGTGATTT TAAAGCTCT
 6601 GAGTGTGGC CGGTATAAGT ATATACCGGT ATAGTAATAT CCGCACTTT
 6651 CTGGGCTTTA TTTATTTATT TATTTATTTA TTTATTTT ATTTTGTG
 6701 TGGAGACGAG TCTCACTTTG TCACCCAGGC TGGAGTGCA TGGCAGATC
 6751 TCGGCTCAGT GCAACCTCTG CTTCCGCGGG TCAAGCTAT CTTCTGCTCT
 6801 AGCCTCCACA GTAGCTGGGA CTACGGGAGT CAGACCATC AGCTGCTGTA
 6851 TTTTGTGATT TTAGTAGAGC GGGGTTTCA CATGCTGGC AAGCTGTGCT
 6901 CAACTCTCT ACCTTGTGAT CTGCGCGCTT TAGCTCCCA GAGTGTGGG

FIG. 10C

【図 10 E】

9351 GTCTGCTGCC TTGCCAGGCT GCCAGGAGGG CGTCTGTG GAAGCTGAGG
 9401 CCGCGCCATC CAGGCGGATG CATTGGGCGC TGATTTCTGT TCTGCTGCT
 9451 GCTCTGGTGC TTAGCTTTTG AACAATGAA ATAAATAGA ACCAGTGTGA
 9501 AAATCGATCA GGAATAAAT TTAATGTGGA AATAACTGTA ACACCTAGT
 9551 TCTTCAATAG AGTTTACTTG GTAATAGCTA GTGATGAGGA CAAACAGAG
 9601 CACTAGAAGG AGAGGCGAGT TGTAGACCTG GGTGCGAGGA GTGTTTGT
 9651 TGTTTCTTCT GGCAGGGTCT TGTCTCTGTG TCTGCTGCT CAGGCTGCT
 9701 CACAATCACA GCTCACTATA GCTCTGCTG GCTCTGCTG CAGGCTGCT
 9751 CTGCTCAGC CTCCAGTAG CTGGAGTAG AGGCGCATC CAGGCTGCT
 9801 GGTCAATTTT AAATTTTTTT TTTTCTTCT TTTGAGATG AATCTCCTC
 9851 TGTGCGCAG GCTGGAGTGT AGTGGCTGTA TCTGCTGCTA CCGCAGCTG
 9901 CGCCTCCAG GTTCACTCCA TCGCCTGCTA TCTGCTGCTA CCGCAGCTG
 9951 GACTACAGC GCTGGATTA CAAACCCAAA CCAAGAGTGC TGGAGTACA
 10001 GCGGCGAGC ACTGCAACCG CCGCTGTTG TCTTCAATA CCAAGAGTGT
 10051 TGTGTGCTT CCGCTTACT TTAGTGAAA AATGTATAA ATGAGATAT
 10101 TGACCTCCAC ATTTGGGGTG TTAATAATA GCATGTATG AAGGAGCTT
 10151 CGCTAATTTA AGCCTTTTTT GAAAGAGGCA AACTGAATA ATCCATGTT
 10201 GTATATATAT TTTAAAGCC GACTGAGAG TTGTCCATCA CAGTCCATTA
 10251 GGCTCCCTGG GACTGAGAG TTGTCCATCA CAGTCCATTA TGGTGGCT
 10301 GCTGGGCGAG GTGAGTGGC TTGTGCTGTA ATCCACAGC TTTTGGAGG
 10351 CAAAGCAGGA GATTTCAATT AGCCAGAGG TTTTGGAGG AGCTGCTG
 10401 ATGTGGCAG ACCTCATCTC TTTAAATAA ACACAAAAA TTAGCCAGC
 10451 ATGTGGGAC GTGCTGTAG TCTCAGCTG TCAAGAGCT TCAAGAGCT
 10501 GATCACTTTG AGCCTGAGG GTCAAGCTG CAGTGAAGCA ACCCTGTCT
 10551 ACTGCACTCC AGCCTGGATG ACAGAGCGAG ACCCTGTCT TCAAGAGCT
 10601 AAAAACAAA CCGTGCAGT TTTTCTTTT TCTTCAAT TATTTATTT
 10651 TAAATTAAT TTTCTTTTAA TAATTTATA ATTTATAA TATATATAA
 10701 AATGACAAAT TTTTATTAAT TATACATATG TAAACTTA GATATATAA
 10751 AGTACATATT GAAAGTAAT TTTTGGCTG GACAGTGGC TCAACCTGT
 10801 AATCCAGCA CTTTGGGAG CCGTGGCGG CAGATCAAT GAGATCATG
 10851 GTTCCAGACC AACCTGACCA ACATGGAGG ACCCTCATC TACTATAAT
 10901 GTTCCAGACC AACCTGACCA ACATGGAGG ACCCTCATC TACTATAAT
 10951 ACAAATTAG CCGGGTGTG GCGCGAGCT GGTGATCTG TACTATAAT
 11001 AGGCTGAGC AGGAGATCT TTTGAGAGG GTTGAAGCT GGTGATCTG
 11051 GCGAGAGCTG TGGCTTTGCA CACAGCTCT GCGAGAGCT GGTGATCTG
 11101 GTCTCAAAA AAAAGTAAT TTTTATTAAT TAACTCTGT CAGCAACAA
 11151 ATTTAATCCA ATAAAGTCT TTTTATTAAT ATGATGAGA GAGTATGAG
 11201 TTTTAAAAA GTTGTGAGG GAGGAGGCT CCGTGGCTG CTAATGTAT
 11251 TGTCAATG CCGTGGAGG AGAGCTCTG TACAGATGT AAAAAATG
 11301 AAGCCAGATT CAGGAGGGA CTGAGAGCA AAGATTTCT GTTCAAGGA
 11351 GAGCTGATG TTTTCCAGG TCTGTGAGG TACTGTGG TGGGAGGCT
 11401 CTGAGCTTTC CTTCCAGAGT TCCAGAGAA AGTATGGCA GTTGTGAG
 11451 GCAGAGCTCT GCTGAGTAT GCTGGGCTG TACTGTGG TGGGAGGCT
 11501 AGACTAGCTG GGTGCGCTAG CAGAGTGG TACTGTGG TGGGAGGCT
 11551 GCTGAGACT CCGTCTCTC ACTGTATAG TAGAGATAG GAGGAGGCT
 11601 GCGCAGGATC ACTGTGACA TAAATCAGT TAAATCAGT GAGGAGGCT
 11651 TGGTGTGGG TGCAATCCA GCACTCGCT AGTGTGCT GTTATTCAT
 11701 GATTAGGAG CAGCTTAAAC TAGAGGAGT TGAAGTGAAT CAGATGTG
 11751 GTCCAGGTA GCTGGGAATC TGCTAGGCC AGTGGCAGT TTTATTAGG

FIG. 10E

【図 10 F】

```

9351 GTCTGCTGCC TTGCCAGGGT GCCAGGAGGG CGCTGCTGTG GAAGCTGAGG
9401 CCCGCCCATC CAGGCGCATG CATTTGGGCG TGATTCCTGT TCCTGCTGCT
9451 GCTTCGGTGC TTAGCTTTTG AAACAATGAA ATAAATTAGA ACCAGTGTGA
9501 AAATCGATCA GGGAAATAAT TTAATGTGGA AATAAACTGA ACACTTAGT
9551 TCTTCATAAG AGTTTACTTG GTAAATACTT GTGATGAGGA CAAAACGAG
9601 CACTAGAAAG AGAGCGGAGT TGTGACCTG GGTGGCAGGA GTGTTTTGTT
9651 TGTTTTTCTT GGCAGGGTCT TGCTCTGTG CTCAGGCTGG AGTACAGTGG
9701 CACAATCACA GCTCACTATA GCCTCGACCT CCTGGAATCA AGCAATCCTC
9751 CTGCCTCAGC CTCCAGTAG CTGGGACTAC AGGCGCATGC CACCATGCCT
9801 GGCATAATTT AAATTTTTTT TTTTCTCTTT TTTGAGATGG AATCTCACTC
9851 TGTGCGCCAG GCTGGAGTGC AGTGGCGTGA TCTCGGCTGA CGGCAAGCTC
9901 CGCTCCCCAG GTTCACTCCA TTGCGCTGCC TCAGCCTCCC AAGTAGCTGG
9951 GACTACAGGC GCTGGGATTA CAAACCCAAA CCAAAGTGC TGGGATTACA
10001 GCGGTGAGCC ACTGCACCCC GCCTGTTTTG TCTTTCATA GCAAGAGTTG
10151 TGTTTGCTTC GCCCTACCT TTAGTGGAAA AATGTATAAA ATGGAGATAT
10201 TGACCTCCAC ATTTGGGGTG TAAATTTATA GCATGTATGC AAAGGAGCTT
10251 CGCTAATTTA AGGCTTTTTT GAAAGAGAG AAACCTGAATA ATCCATGTGT
10301 GTATATATAT TTTAAAGACC TTGCTCATCT TCCATATGCA GTAAAGCTGA
10351 GGCCTCCCTG GACTGCGAGG TTGTCCATCA CAGTCCATTA TAACTGCGCT
10401 GCTGGGCGAG GCTGCGATGG TTGTGCTGTA ATCCAGCATC TTGGGAGGC
10451 CAAGGCGAGA GGATTCATTG AGCCACAGAG TTTTGGAGCG AGCCTGGGCA
10501 ATGTGGCGAG CCGCTGCTAG TCTCAGTAC TCAGGAGGCT GAGGTGGGAG
10551 ACTGCACTTC AGCCTGATG ACAGAGCGAG ACCCTGTCTC TAAAAAATA
10601 ACTGCACTTC AGCCTGATG ACAGAGCGAG ACCCTGTCTC TAAAAAATA
10651 AAAAACCATA CGGTGACATG TTTTCTTTTT TCTTATCAAT TATATTATTT
10701 TAAATTAAT TTTCTTTTAA TAATTTATAA ATTTATATAA TATATTAAAA
10751 AATGACAAAT TTTTATTTAC TATACATGAG GTAAAACTTA GGATATATGA
10801 AGTACATATT GAAAGATGAT TTTTGGCTG GCACAGTGGC TCACACCTGT
10851 AATCCACAGA CTTTGGGAGG CCGTGGCGGG CAGATCACAT GAGATCATGA
10901 GTTCGAGACC AACTGAGCCA ACATGAGAG ACCCCTCTC TACTAAAAAT
10951 ACAAAATTAG CCGGGTGGT GGCATATGCC TGTATCCCA GCTACTCGGG
11001 AGGCTGAGGC AGGAGATCT CTTGAACCCG GAGGCGAGAG GTTGCCTGTA
11051 GCCAAGATCG TGCCCTTGCA CACCAGCCTA GGCAACAAGA GCGAAAGTCC
11101 GTCTCAAAAA AAAAGTAAAT TTTTAAAGT TAACCTCTGT CAGCAAAACA
11151 ATTTAAACCA ATAAAGTCT TGTGTTTTTA ATGTAGTAGA GGAGTTAGGG
11201 TTTATAAAAA ATATGCTAGG GAAGGGGTC CTTGATTTG CTAATGTGAT
11251 TGTCACTTTC CCGTTAGGAG AGAGCTCTGT TAGCAGATG AAAAAATTGG
11301 AAGCCAGATT CAGGGAGGGA CTGGAAGCAA AAGAATTTCT GTTCGAGGAA
11351 GAGCCTGATG TTTGCCAGGG TCTGTTTAA TGGACATGAA GAGGAGGGCT
11401 CTGACTTTTC CTCCAGGAGT TTCAGGAGAA AGGTAGGGCA GTGGTTAAGA
11451 GCAGAGCTCT GCCTAGACTA GCTGGGGTGC CTAGACTAGC TGGGGTGCCT
11501 AGACTAGCTG GGGTGCCTAG ACTAGCTGGG TACTTTGAGT GGCTCCTTCA
11551 GCCTGGACCT CGGTTTCTTC ACCTGTATAG TAGAGATATG GGAGCACCAC
11601 GCGCAGGATC ACTGTGAACA TAAATCAGTT AATGGAGGAA GCGAGTAGAG
11651 TGTGTGCTGG TGCTATACAA GCACTCCGTC AGTGTTCCT GTTATTGAT
11701 GATTAGGAGG CAGCTTAAAC TAGAGGGAGT TGAGCTGAAT CAGGATGTTT
11751 GTCCAGGTA GCTGGGAATC TGCCTAGCCC AGTGCCAGT TATTTAGGT
11801

```

FIG. 10F

【図 10 H】

```

14251 CCCAAGTAGC TGGGACTACA GGCAGCAGCC ATCACACCCG GCTAATTGAA
14301 AAATTTTTTT TTTTGTTTAG ATGGAATCTC ACTTTGTGTC CCAGGCTGGT
14351 CTCAAACTCC TGGGCTCAAG TGATCATCCT GCTTCAGCGT CCGACTTGT
14401 GGTATTATAG CGGTGAGCCA CTGGGCTGTA CCTAGCTACC ATTTTTTAAT
14451 GCAGAAATGA AGACTTGTAG AAATGAAATA ACTTGTCCAG GATAGTCGAA
14501 TAAGTAATCT TTAGAGCTGG GATTGGAACC CAGGCAATCT GGCTCCAGAG
14551 CTGGGCGCTC ACTGCTGAAG GACACTGTCA GCTTGGGAGG GTGGCTATGG
14601 TCGGCTGTCT GATTCTAGGG AGTGAGGGCT GTCTTTAAGC CACCCATTC
14651 CATTTTCAGA CAGCTTTGTC AGAAAGGCTG TCATATGGAG CTGACACCTG
14701 CCTCCCAAG GCTTCCATAG ATCCTCTCTG TACATGTGAA CCTTTTATTT
14751 TGAATGAAA ATTCACAGGA AGTTGTAAAG CTAGTACAGG GGATCC

```

FIG. 10H

【図 10 G】

```

11851 GCTCTCTCAG TGTTCCTGA TGTTTTTTC CTTTGTATC TTATCTACAG
11901 GATGTGACTG GGAAGCTCTG GTTTCAGTGT CATGTGTCTA TTCTTTATTT
11951 CCAGGCAAGG GAAACCAACA ATAAGAGAA AGAATTTGAG GAAACTGCGA
12001 AGAAAGTGGC CGGTGCCATC GAGCAGCTGG CTGCCATGGA TTGAGGCTCT
12051 TGGCCGGAGC TGCTTGGTCC CAGAGTGGCT GCACCACTTC CAGGGTTTAT
12101 TCCTGGTGGC CACAGCCTT CCTGTGGGCC CCTTAGCAAT GTCTTAGGAA
12151 AGGAGATCAA CATTTTCAAA TTAGATGTTT CAACGTGCTG GTCTCTGTGG
12201 CTTGAAAGTG GCACAGAGG TGCTTCTGCT TCTCTCTCTC TTTTGGGGG
12251 TAACAGTGGC TGCTTCTGCT TACAGGTGGA GAAGTAGAGG AGGAAGAAGG
12301 GCTGTTTTGA TCCCGGGCTC TACAGGTGGA GAAGTAGAGG AGGAAGAAGG
12351 CAGTGTCCCT TTTGCTAGAG CTGACAGCTT GTTGAGGGCTG TCACAGTCTT
12401 TCCACAGTGA ATGTGTCTGG ACCTCATGTT GTTGAGGGCTG TCACAGTCTT
12451 GAGTGTGGAG TTGGCAGGTG CCTGTGTAAT CTGAGGTGGA GTTCTTTTGT
12501 CTGTCAACCC TGTGCTCCTC CAGAGGACAG TTTTGTGTTG GTTGTGTTT
12551 TTTGTTTTTT TTTTGTGTTA GATGATGATG TTTTGTGTTG GTTGTGTTT
12601 GAGACAGAGT CCGTGGCTCC TCTACTGTTT AACACATGAG CTTTCTTAT
12651 TTTGTTGTAAT TGTAAATTA CAGATAGTGA CAACTACAAA TTAATACTAA
12701 GCACAAAGCC ATCTAAGTC ATTTGGGAAA CCGGGTGAAC TTAGGTTGTA
12751 TGAGGAGACA GAATAGAGTG ATAGGAGGCG TCTGGCAGAT ACTCCTTTTG
12801 CCACTGCTGT GTGATTAGAC AGGCGGAGT AGGCGTGGG TAAATCTTTT
12851 CCGCTCCTCC CTCAGAAAAA GCGAGTGGC TAAATCTTTT TTAATGACT
12901 TGCTGCTGAT CTGTGGGGGA CTGCTGGGC TACTGCTGCT GAGAGACGCA
12951 TCAGCCCAAC CTTACATCTC GTACGTCTCT CCACAGGGG GAGAGACGCA
13001 GTCCGCCAG GTCCCGCTT TCTTTGAGAG GCCTCTCTCC CTGCTATAGA
13051 AAGTCTGGCG TAAGATGATG GATTGATGAT GAAACCTCTG GAGGCTATCT
13101 GCTGAGGGT GGATTTGTTA AGCTTCGCTG GAAACCTCTG GAGGCTATCT
13151 CCGCTGTGTC TGAGAAATAA AAGAGCTGTT TTTTCTGTTA GTTGTGTTG
13201 CCACTAGTGG TTTTAAATTA ATTTGCTGTT TTTTCTGTTA GTTGTGTTG
13251 TGCCAAAGCC CATCTGCTCA CAGAGGAGG GTGAGGAGG CCGGCTGCTG
13301 AGAGACGAG TGTGCTCTGG GCGCTTGCCA GAGGACGAG CCGGCTGCTG
13351 TTTGTTATCA TCCGGGCTCC TCCGGGCGAG AAGGCTGTTA GTTGTGTTG
13401 CAGACCCACT TATTTATGCT ACATCTGATG CCGGCTGAGA TAGACTTTTC
13451 CCTCTAAACT GGGAGAAATAT CACAGTGGTT TTTGTTAGTA GTTGTGTTG
13501 TCCAGGCTCT GTACTCATCT AAGCTGCTTA TTTTGTATAT TTTGTTAGTA
13551 CTGTAATAGG ATACTTCACT TTAATTAAGT TTTGTTAGTA GTTGTGTTG
13601 TAGAGAAGCT GGAATAAATA GTTTTGTCT TCACTCTCTT TGCATGCCAG
13651 GCGGTGATGT GGATCTCGGC TTCTGTGAGC CTGTGCTGTG GGCAGGGCTG
13701 AGCTGGAGGC GCGCTCTCA GCGGCTCTCA CAGGCTCTTT CTTTAAAGGC
13751 CATCTTAAAC ACCAGACCTC CATGGCTGCC AGACCTGAA AGCTTCTGCG
13801 ACATCTGTTA ATAAAGCGT AGGCGCTTGT TTTTCAAGTT CTTCTAAGTT
13851 TTTCTTTTCA ATACATGTC ACATGTCCAT TTTTCAAGTT CTTCTAAGTT
13901 GAGTGGAGTC TGGGAAGGTT TGTGAATGAG GCTTCTGGGC GTTCTGGAG
13951 GTTCCAAATG CAGGTAGTAG CCGCTCGGCG CCACTGCCAT CCACTGGAG
14001 AGAGACAGCA GTGCCGCTG CCAAGAGAGC ACCAGCAAGC CAACTGGAG
14051 CCCCCATGCG AGGCTGTGCG CATGTGGAAG GAGTACTCA CAACTGCCAA
14101 TAAAGTCTCA TGTGTTTTTA TCTACTTTT TTTTCTTTT CTTTCTTTT
14151 GAGACAAGGC CTTGCCCTCC CAGGCTGGAG TGCACTGGA TGACACAGC
14201 TCACCGCAC CTCAATTTCT TGGCTTCAAG TGAACCTCCC ACTTTAGCT

```

FIG. 10G

【図 11 A】

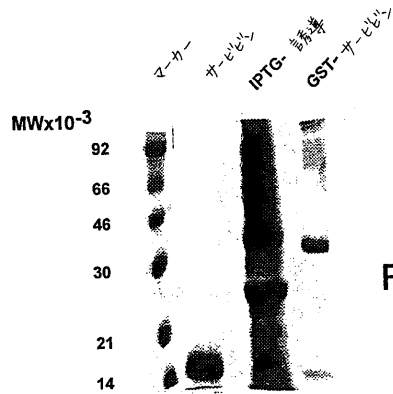


FIG. 11A

【図 11 B】

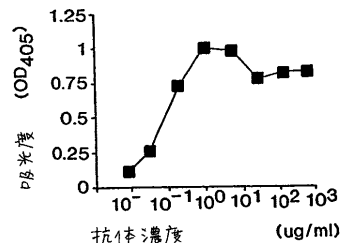
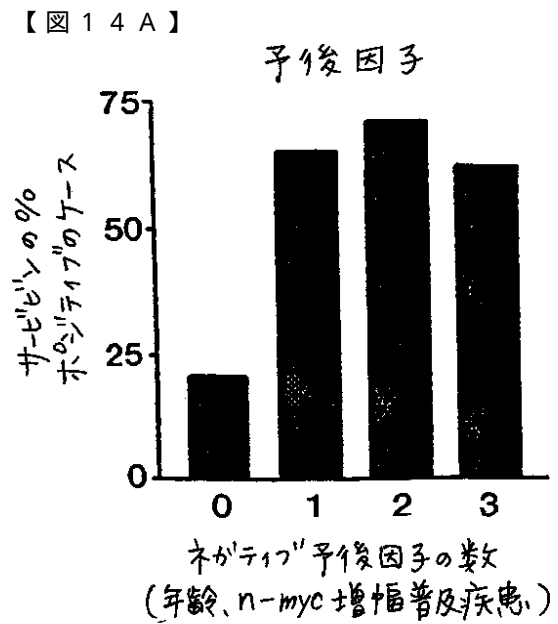
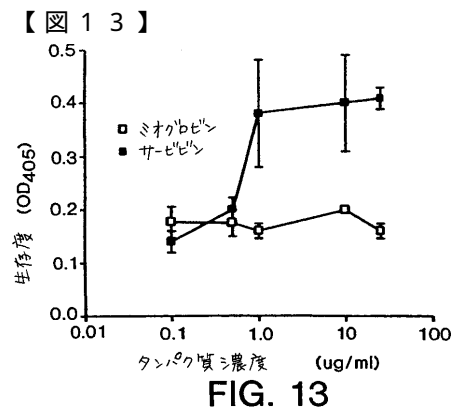
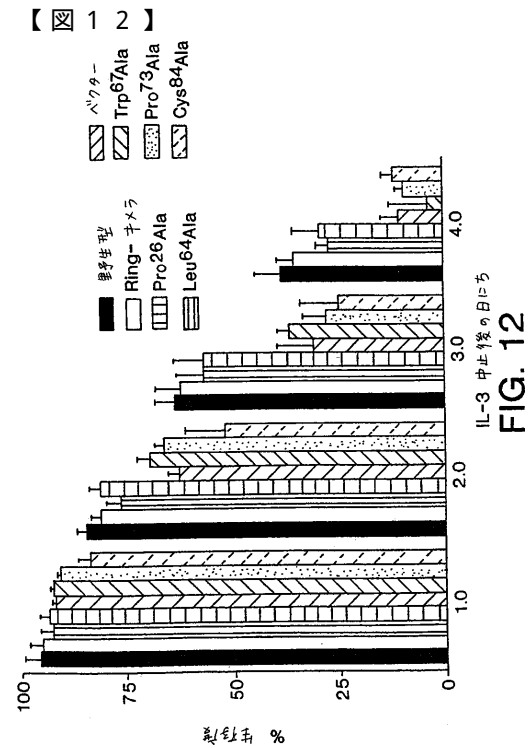


FIG. 11B



【図 14 B】

組織学 (Shimada class.)

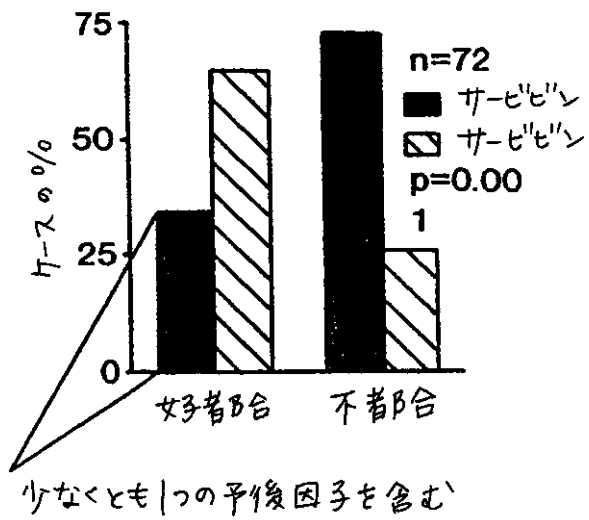
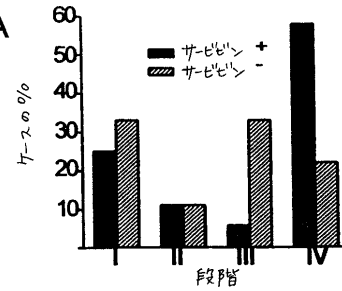


FIG. 14B

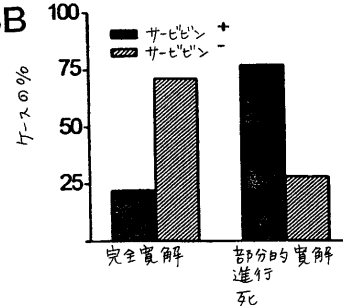
【図 15 A】

FIG. 15A



【図 15 B】

FIG. 15B



【図 16 A】

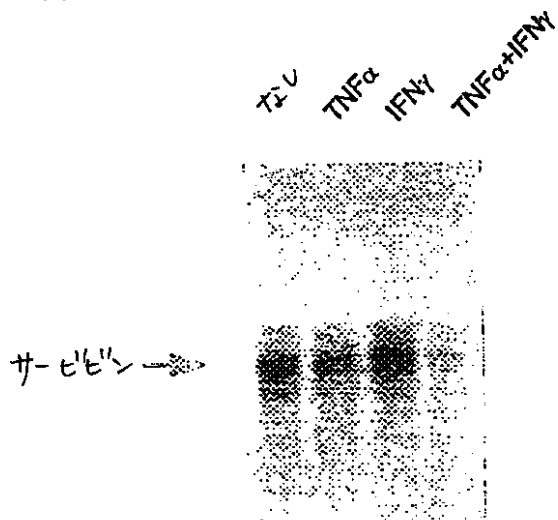


FIG. 16A

【図 16 B】

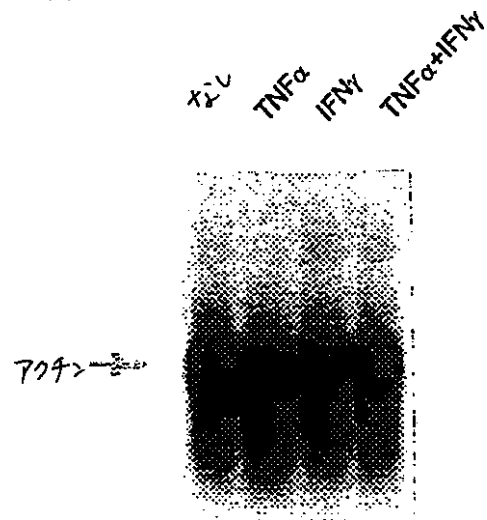
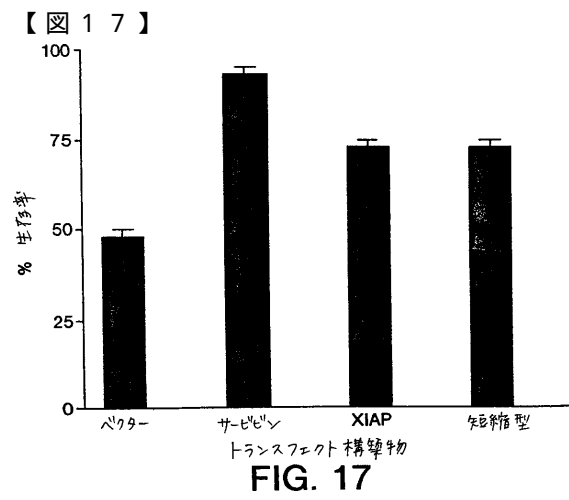


FIG. 16B



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>
<i>C 0 7 K</i>	<i>14/47</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>14/47</i>
<i>C 0 7 K</i>	<i>7/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>7/08</i>
<i>C 0 7 K</i>	<i>19/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>19/00</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>38/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>37/02</i>
<i>C 0 7 K</i>	<i>16/18</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>16/18</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/00</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>48/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>35/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>48/00</i>
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/68</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>35/00</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>
			<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/68</i>
			<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>

(56)参考文献 国際公開第 9 5 / 0 2 0 6 5 5 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00 - 15/90
C07K 14/47
UniProt/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed