

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4127567号
(P4127567)

(45) 発行日 平成20年7月30日(2008.7.30)

(24) 登録日 平成20年5月23日(2008.5.23)

(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 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C
C O 7 K 14/52 (2006.01)	C O 7 K 14/52
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D
請求項の数 9 (全 178 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願平6-502655
 (86) (22) 出願日 平成5年6月29日(1993.6.29)
 (65) 公表番号 特表平8-509357
 (43) 公表日 平成8年10月8日(1996.10.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1993/006228
 (87) 国際公開番号 W01994/000140
 (87) 国際公開日 平成6年1月6日(1994.1.6)
 審査請求日 平成12年6月29日(2000.6.29)
 (31) 優先権主張番号 07/907, 138
 (32) 優先日 平成4年6月30日(1992.6.30)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 07/940, 389
 (32) 優先日 平成4年9月3日(1992.9.3)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 503216719
 セネス・ファーマスーティカルズ・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02062 ノーウッド プロヴィデンス・ハイウェイ 333
 (74) 代理人 100107308
 弁理士 北村 修一郎
 (72) 発明者 グッドアール, アンドリュウ
 イギリス国 ハートフォードシャー ダブリュディ3 5ピーワイ コーリーウッド
 ブラケッツ・ウッド・ドライブ 45

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリア細胞分裂誘発因子とその調製及び使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

GGF/p185^{erbB2}リガンド遺伝子によってコードされるポリペプチドであって、
 p185^{erbB2}レセプターと相互作用し、かつ配列認識番号170のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項2】

前記ポリペプチドが、グリア細胞の細胞分裂誘発を誘発する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】

請求項1に記載のポリペプチドをコードする単離核酸分子。

【請求項4】

前記単離核酸分子が、配列認識番号21の塩基配列を含む請求項3に記載の単離核酸分子。

【請求項5】

プロモーターに作動連結された請求項3に記載の単離核酸分子を含む組換えベクター。

【請求項6】

請求項3に記載の単離核酸分子でトランスフォーム、またはトランスフェクトされた細胞ライン。

【請求項7】

請求項1に記載のポリペプチドを生体外で産生する方法であって、

請求項 6 に記載の細胞ラインを提供する工程、前記細胞ラインを前記核酸分子の発現を許容する条件下で培養する工程、そして前記ポリペプチドを単離する工程、を有する方法。

【請求項 8】

サンプル中における請求項 1 に記載のポリペプチドに対するレセプターの存在を同定する方法であって、

前記サンプルを前記ポリペプチドに接触させる工程、及びそれらの間の結合を測定する工程を有し、前記結合が前記レセプターの存在の指標である、方法。

【請求項 9】

許容可能な希釈剤、担体または賦形剤、および/または単位製剤での、医薬または獣医薬用に調製された請求項 1 に記載のポリペプチドを有する医薬または獣医薬用製剤。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、1992年10月23日出願の出願番号第07/965,173号と、1992年9月3日出願の出願番号第07/940,389号と、1992年6月30日出願の出願番号第07/907,138号と、1992年4月3日出願の出願番号第07/863,703号との一部継続出願である。

【0002】

発明の背景

本発明は、脊椎類に見られ、シュワン細胞を含むグリア細胞の細胞分裂誘発成長因子であるポリペプチドに関する。本発明は、更に、そのような因子を生成可能な方法と、そのような因子の治療的利用とにも関する。

20

【0003】

脊椎類のグリア細胞は、中枢及び末梢神経システムの特化した結合組織を構成している。重要なグリア細胞としてシュワン細胞があるが、これは、ニューロンの為の代謝支持を提供するとともに、特定の末梢神経の神経軸索の周囲に髄鞘（ミエリン鞘）を提供することによって、個別の神経繊維を形成する。シュワン細胞は、ニューロンを支持し、近接する神経軸索の周囲において近接同心の膜層を形成し、その成長につれて前記軸索の周囲において捻れながら形成されることによってミエリン鞘効果を提供するものである。これらのミエリン鞘は、多くの神経線維の弱い部分であり、これらシュワン細胞の損傷、発育及び成長の不全が、数多くの末梢神経システムの疾患と障害を特徴付ける大幅な脱髄や神経退化に関連している可能性がある。神経システムの発達において、その細胞がその分裂と成長を制御するのに様々な因子を必要とすることが明らかになった。そして、近年、このような種々の因子が同定され、これらの内のいくつかはシュワン細胞の分裂と発達に影響することが判っている。

30

【0004】

従って、ブロックス (Brookes) 他, *International Journal of Neuroscience*, 4 (1984) 75-83 は、ウシの脳と下垂体組織とからの抽出物質に存在するタンパク質成長因子について記載しており、これはグリア細胞成長因子 (GGF) と命名された。この因子は、ウシ胎仔血清を 10% 含有するバックグラウンド培地において、培養ラットのシュワン細胞を刺激してこれを分裂させた。又、この因子は分子量が 31,000 ダルトンであり、容易にダイマー化することも記載されている。In *Methods in Enzymology*, 147 (1987), 217-225 において、ブロックス (Brookes) は、GGF の、シュワン細胞に基づく分析について記載している。

40

【0005】

ブロックス (Brookes) 他, 上記、は、更に、GGF の外見上の均質状態への精製方法についても記載している。要約すると、ここに記載された一つの大規模精製方法は、凍結乾燥したウシの前頭葉の抽出と、それによって得られた物質を CM セルロースからの NaCl グラジエント溶出を使用したクロマトグラフィーに関するものである。次に、ゲル濾過を、先ずウルトロゲル (Ultrogel) カラムで、次に、ホスホセルロースカ

50

ラムで、そして最後に、小規模 SDS ゲル電気泳動法で行う。あるいは、前記 CM セルロース物質を、ホスホセルロースカラムに直接に適用し、該カラムからのフラクションをプールして、調製天然ゲル電気泳動によって精製し、その後、最終的な SDS ゲル電気泳動にかける。

【0006】

ブックス (Brookes) 他は、以前に報告されたゲル濾過実験 (ブックス (Brookes) 他, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 8374 - 8377) において、成長因子活性の大きなピークが、分子量 56,000 ダルトンで移動 (migrate) することが観察され、これに対して、上述の手法の最初のものにおいては、分子量 31,000 においておもに活性が観察された、と述べている。GGF ダイマーは、この実験において、主として、CM セルロースからのグラジエント溶出の生成物として除去されることが報告されている。

10

【0007】

ベンヴェニスト (Benveniste) 他 (PNAS, 82 (1985), 3930 - 3934) は、Tリンパ球由来のグリア細胞発育誘発因子について記載している。この因子は、還元状態において、SDS ゲルの見かけ上の分子量の変化を示す。

【0008】

キムラ (Kimura) 他 (*Nature*, 348 (1990), 257 - 260) は、自ら神経線維腫由来成長因子 (SDGF) と呼称する座骨神経鞘腫瘍から得られる因子について記載している。これらの著者は、反対に部分的に精製された下垂体フラクション含有の GGF が活性な状態においては、SDGF は、トリチウム標識化 TdR のシュワン細胞への結合を刺激しないと述べている。SDGF の見かけ上の分子量は 31,000 ないし 35,000 である。

20

【0009】

デイヴィス (Davis) とストローバント (Stroobant) (*J. Cell. Biol.*, 110 (1990), 1353 ~ 1360) とは、多数の候補細胞分裂誘発物質について記載している。ラットのシュワン細胞を使用し、選択された候補物質が、FCS (ウシ胎仔血清) が 10% 存在して、フォルスコリン (forskolin) が存在する場合と、存在しない場合とにおいて、シュワン細胞への DNA 合成を刺激する能力をテストした。テストした因子の一つは、GGF - カルボキシメチルセルロースフラクション (GGF - CM) であり、これは FCS が存在する場合、フォルスコリン (forskolin) が存在及び不在の両方の場合において細胞分裂誘発作用を有していた。この研究に依り、フォルスコリンの存在下において、特に血小板由来成長因子 (PDGF) が、シュワン細胞に対する潜在的細胞分裂誘発物質であることが判った。PDGF は、以前には、シュワン細胞に影響しないと考えられていたものである。

30

【0010】

ホルムズ (Holmes) 他, *Science* (1992) 256: 1205 及び ウェン (Wen) 他, *Cell* (1992) 69: 559 は、レセプター (p185^{erbB2}) に結合するタンパク質をコード化する DNA 配列がいくつかのヒトの腫瘍に関連していることを示している。

40

【0011】

前記 p185^{erbB2} タンパク質は、チロシンキナーゼ活性を備えた 185 キロダルトン膜長のタンパク質である。そしてこのタンパク質は、erbB2 プロト - がん遺伝子によってコード化される (ヤーデン (Yarden) 及び ユルリッチ (Ullrich) *Ann. Rev. Biochem.* 57: 433 (1988))。前記 erbB2 遺伝子は、HER-2 (ヒト細胞)、あるいは neu (ラット細胞) とも呼称されるが、上皮細胞成長因子 (EGF) のレセプターに密接に関連している。最近の証拠に依れば、p185^{erbB2} と作用する (そしてそのキナーゼを活性化する) タンパク質は、p185^{erbB2} を有する細胞の増殖を誘発することが示されている (ホルムズ (Holmes) 他, *Science* 256: 1205 (1992)); ドバシ他, *Proc. Natl. Acad. Sci*

50

. 88 : 8582 (1991) ; ルプ (Lupu) 他 , Proc . Natl . Acad . Sci . 89 : 2287 (1992)) 。 更に、p185^{erbB2}結合タンパク質をコード化する前記遺伝子が、それぞれ長さが異なり、かつ、いくつかの共通のペプチド配列とユニークなペプチド配列とを含む一連のタンパク質を生成する多くの、大きさとスプライシングとが異なったRNA転写体を生成することが明らかである。これは、ヒトの乳ガン (MDA - MB - 231) から得られるスプライシングが異なったRNA転写体によって証明されている (ホルムズ (Holmes) 他 , Science 256 : 1205 (1992)) 。 更に、これは (ここに記載されているように) p185^{erbB2}レセプターのためのリガンドとして作用する広範囲のタンパク質によっても証明されている (下記参照) 。

10

【0012】

発明の要旨

一般に、本発明は、グリア細胞 (特に、シュワン細胞と中枢神経システムのグリア) の分裂を刺激する方法と、更に、そのようなグリア細胞の分裂誘発活性を示す新規なタンパク質とに関する。更に、これらのタンパク質とこれらタンパク質と、関連タンパク質とに結合する抗体をコード化するDNAも提供される。

【0013】

本発明の新規なタンパク質は、公知のポリペプチドをコード化する配列の別のスプライス生成物を含む。一般に、これらの公知タンパク質は、前記GGF / p185^{erbB2}族タンパク質のメンバーである。

20

【0014】

より詳しくは、本発明は、所定の式のポリペプチドと、これらのポリペプチドをコード化するDNA配列とを提供する。即ち、これらポリペプチドは、以下の式を有する。

【0015】

WYBAZCX

ここで、WYBAZCXは、図31に示されるアミノ酸配列から成り (配列認識番号136 ~ 139、141 ~ 147、160、161)、Wは、ポリペプチドセグメントFを有するかあるいは有さず、Yは、ポリペプチドセグメントEを有するかあるいは有さず、Zは、ポリペプチドセグメントGを有するかあるいは有さず、そして、ここにXはポリペプチドセグメントC / D HKL, C / D H, C / D HL, C / D D, C / D' HL, C / D' HKL, C / D' H, C / D' D, C / D C / D' HKL, C / D C / D' H, C / D C / D' HL, C / D C / D' D, C / D D' H, C / D D' HL, C / D D' HKL, C / D' D' H, C / D' D' HL, C / D' D' HKL, C / D C / D' D' H, C / D C / D' D' HL, またはC / D C / D' D' HKLを含み、以下のいずれかの条件を満たす、

30

a) F、Y、B、A、Z、C又はXの少なくとも一つは、ウシ由来である、

b) YはポリペプチドセグメントEであるか、又は、

c) XはポリペプチドセグメントC / D HKL, C / D D, C / D' HKL, C / D C / D' HKL, C / D C / D' D, C / D D' H, C / D D' HL, C / D D' HKL, C / D' D' H, C / D' D' HKL, C / D C / D' D' H, C / D C / D' D' HL, C / D C / D' HKL, C / D' H, C / D C / D' H, またはC / D C / D' HLを含む。

40

【0016】

更に、本発明は、コード化セグメント5' FBA³' と、図31に示されるアミノ酸配列 (配列認識番号136、138、139) を有する対応のポリペプチドセグメントを備えたDNA配列も含む。

【0017】

前記DNA配列は、コード化セグメント5' FBA³' と、図31に示されるアミノ酸配列 (配列認識番号136、138、140) を有する対応のポリペプチドセグメントを含む。

50

【0018】

前記DNA配列は、コード化セグメント^{5'}F E B A^{3'}と、図31に示されるアミノ酸配列(配列認識番号136~139)を有する対応のポリペプチドセグメントを含む。

【0019】

前記DNA配列は、コード化セグメント^{5'}F E B A^{3'}と、図31に示されるアミノ酸配列(配列認識番号136~138、140)を有する対応のポリペプチドセグメントを含む。そして、前記DNA配列は、CGF2HBS5 cDNAクローンのポリペプチドコード化セグメントを含む(ATCC Deposit No. 75298, deposited 1992年9月2日)。

【0020】

本発明は、更に、式FBA, FEBA, FBA', FEBA'のペプチドと、これらペプチドをコード化するDNA配列とを含み、前記ポリペプチドセグメントは、図31において、それぞれ、配列認識番号(136, 138及び139)、(136~139)と(136, 138及び140)、及び(136~138及び140)とで示されるアミノ酸配列に対応する。精製GGF-IIポリペプチド(配列認識番号170)である前記ポリペプチドも本発明の一部に含まれる。

【0021】

更に、本発明の一態様は、中枢神経システムのグリア、特に乏突起膠細胞、小グリア細胞及び星状膠細胞、の治療に有用なペプチドと、これらのペプチドをコード化するDNAと、更にこれらのペプチドの投与方法を含む。

【0022】

本発明は、更に、前記定義のアミノ酸配列をコード化するDNA配列を含むベクターを含む。又、前述のアミノ酸配列をコード化する単離DNAを含有する宿主細胞も含まれる。本発明は、更に、前記p185^{erbB2}レセプターを結合し、生体内及び/又は生体外でグリア細胞分裂を刺激する化合物を含む。

【0023】

また、前述の新規なペプチドに対する抗体も本発明の一部として含まれる。更に、ここに記載のすべてのペプチドに対する抗体は、ここに記載のポリペプチドの精製に利用可能である。又、これらのポリペプチドに対する抗体は、グリア細胞の細胞分裂治療用インヒビターとしても利用可能である。

【0024】

本発明は、更に、グリア細胞の細胞分裂を刺激する方法も提供し、該方法は、グリア細胞を以下の式で定義されるポリペプチドに接触させる工程を有する、即ち、
WYBAZCX

ここで、WYBAZCXは、図31に示されるアミノ酸配列から成り(配列認識番号136~139, 141~147, 160, 161)、Wは、ポリペプチドセグメントFを有するかあるいは有さず、Yは、ポリペプチドセグメントEを有するかあるいは有さず、Zは、ポリペプチドセグメントGを有するかあるいは有さず、そして、ここにXはポリペプチドセグメントC/DHKL, C/DH, C/DHL, C/DD, C/D'HL, C/D'HKL, C/D'H, C/D'D, C/D C/D'HKL, C/D C/D'H, C/D C/D'HL, C/D C/D'D, C/D D'H, C/D D'HL, C/D D'HKL, C/D D'H, C/D D'HL, C/D D'HKL, C/D C/D'D'H, C/D C/D'D'HL, またはC/D C/D'D'HKLを含む。

【0025】

本発明は、更に、グリア細胞分裂誘発因子を合成する方法に関し、この方法は、上記定義の変成宿主細胞を、本発明のDNA配列の発現を許容する条件下において培養することから構成される。

【0026】

本発明のペプチドは、薬用又は獣医用としての薬用調合物質又は獣医療調合物質の製造に利用可能である。オプションとして、前記調合物質は、許容可能な希釈液、キャリア又は

10

20

30

40

50

賦形薬との併用で、及び/又は単位投与薬の形態として使用可能である。

【 0 0 2 7 】

グリア細胞を生体内又は生体外においてグリア細胞分裂誘発物質としての上述のポリペプチドと接触させることによってグリア細胞の細胞分裂を刺激する方法も本発明の一態様を構成するものである。有効量の前述のポリペプチドを投与することによって脊椎類（好ましくは哺乳類、更に好ましくはヒト）においてグリア細胞細胞分裂効果を作り出す方法も本発明の一部である。

【 0 0 2 8 】

前述のポリペプチドを使用して様々な疾病及び障害を治療する方法も本発明の一部である。例えば、前述のポリペプチドによって、神経疾病又は障害の治療又は予防方法を行うことができる。更に、前記ポリペプチドに対して敏感であるか又は反応する種類の細胞における神経系の病態生理学的症状を予防又は治療する方法も、本発明の一部を構成する。

10

【 0 0 2 9 】

更に、本発明は、末梢神経の損傷、中枢神経系における神経損傷、神経性障害、末梢又は中枢神経系における脱髄、シュワン細胞の損傷又は消失、乏突起膠細胞、小グリア細胞、星状膠細胞に関連する病状の治療方法にも関する。例えば、知覚神経繊維又は運動神経繊維の神経障害や、神経変成性障害の治療が含まれる。これらのいずれの場合においても、その治療方法は、有効量の前記ポリペプチドを投与する工程から成る。

【 0 0 3 0 】

本発明は、更に、有効量の前記ポリペプチドを投与することによって、神経の再生及び/又は修復する方法にも関する。そのような薬品は、前記ポリペプチドを薬剂的に有効なキャリアと共に投与することによって得られる。

20

【 0 0 3 1 】

本発明は、薬品の製造における前記ポリペプチドの使用にも関する。

【 0 0 3 2 】

本発明は、更に、前記定義のポリペプチドの以下に記載するような使用を含む。

- ・選択的に治療又は診断目的に利用可能な抗体を生成するために哺乳動物を免疫化するのに利用すること。
- ・前記ポリペプチドのレセプター結合特性に対応するレセプター結合特性を有する分子を同定したり定量化したりする競合アッセイに利用すること、及び/または、
- ・前記ポリペプチドに特異的に結合可能なレセプターとともにこのポリペプチドにサンプルを接触させて、該ポリペプチドに対する結合の競合阻害を検出する目的に利用すること、
- ・例えば、アフィニティークロマトグラフィ等のアフィニティー分離プロセスに使用して対応のレセプターを分離するのに利用すること。

30

【 0 0 3 3 】

本発明は、更に、グリア細胞腫瘍の予防又は治療方法にも関する。この方法は、前記ペプチドによって定義される因子の結合を抑制する物質の有効量を投与することから成る。

【 0 0 3 4 】

更に、本発明は、以下に記載するものをグリア細胞に適用することによってグリア細胞細胞分裂誘発活性を刺激する方法にも関する、即ち、

40

- ・ M D A - M B 2 3 1 ヒト胸細胞ラインから分離された 3 0 k D のポリペプチド因子、又は、
- ・ ラット I - E J 形質転換線維芽細胞系からグリア細胞に分離された 3 5 k D のポリペプチド因子、又は、
- ・ S K B R - 3 ヒト胸細胞系から分離された 7 5 k D のポリペプチド因子、又は、
- ・ ラット I - E J 形質転換線維芽細胞系から分離された 4 4 k D のポリペプチド因子、又は、
- ・ 活性化マウス腹膜マクロファージから分離された 2 5 k D のポリペプチド因子、又は、
- ・ M D A - M B 2 3 1 ヒト胸細胞から分離された 4 5 k D のポリペプチド因子、又は、

50

- ・ A T L - 2 ヒト T - 細胞ラインからグリア細胞に分離された 7 ないし 1 4 k D のポリペプチド因子、又は
- ・ ウシ腎臓細胞から分離された 2 5 k D のポリペプチド因子、又は、
- ・ 脳から分離された 4 2 k D のポリペプチド因子 (A R I A) 。

【 0 0 3 5 】

本発明は、更に、生体内及び生体外でのグリア細胞の細胞分裂誘発の刺激用の、それぞれ図 3 8 ないし 4 3 において配列認識番号 1 5 4 ~ 1 5 9 によって示され E G F L 1、E G F L 2、E G F L 3、E G F L 4、E G F L 5、E G F L 6 ポリペプチドの利用方法にも関する。

【 0 0 3 6 】

本発明には、更に、グリア細胞の細胞分裂誘発を刺激する図 4 5 のその配列を示す G C F - I I ポリペプチドの投与も含まれる。

【 0 0 3 7 】

本発明の他の一態様は、上記のペプチドを、シュワン細胞を刺激して科学的用途又は治療用途に採取可能な成長因子を生成させる使用にも関する。

【 0 0 3 8 】

更に、ここに記載のペプチドは、再髄鞘形成が必要な、例えば M S 等の疾患の治療のための、中枢グリア細胞の増殖及び再髄鞘形成誘発に利用することも可能である。

【 0 0 3 9 】

本発明の更に別の態様において、ここに記載の新規なポリペプチドは、アセチルコリンレセプターの合成を刺激するのに利用できる。

【 0 0 4 0 】

上述のように、本発明は、公知の因子とは異なった、ウシやヒトを含むほ乳類源から得られる新規なグリア成長因子を提供するものである。これらの因子は、ウシ胎仔血漿 (F C P) をバックグラウンドとして、シュワン細胞に対して細胞分裂誘発活性を有する。本発明は、更に、これらの因子の調合方法と、これら及びその他の因子の活性を定義する改良方法も提供するものである。これら因子の治療への適用も本発明の重要な一態様である。

【 0 0 4 1 】

従って、本発明の重要な特徴は以下の通りである。

(a) ウシ胎仔血漿 の存在下においてグリア細胞分裂誘発活性、特に、シュワン細胞分裂誘発活性を有し、分子量が約 3 0 k D ないし約 3 6 k D の範囲で、そのアミノ酸配列内に、以下に記載のペプチド配列の一つ又は複数を有する基礎 (ベーシック) ポリペプチド因子、

FKGDAHTE

ASLADEY E Y M X K

TETSSSGLX L K

ASLADEY E Y M R K

AGYFAEXAR

TTEMASEQGA

AKEAL A A L K

FVLQAKK

ETQPDPGQ I L K K V P M V I G A Y T

EYKCLKFKWFKKATVM

EXKFYVP

KLEFLXAK、

及び、

(b) ウシ胎仔血漿 の存在下において、グリア細胞の細胞分裂誘発、特に、シュワン細胞の分裂誘発を刺激する基礎ポリペプチド因子であって、分子量が約 5 5 k D ないし約 6 3 k D の範囲であり、そのアミノ酸配列内において以下のペプチド配列のうちの一つ又は複数のものを含む、

10

20

30

40

50

VHQVWAAK
 YIFFMEPEAXSSG
 LGAWGPPAFPVXY
 WFVVIIEGK
 ASPVSVGSVQELQR
 VCLLTVAALPPT
 KVHQVWAAK
 KASLADSGEYMXK
 DLLLXV
 EGKVHPQRRGALDRK
 PSCGRLKEDSRYIFFME
 ELNRKNKPQNIKIQQK

10

【0042】

分子量が小さなポリペプチド因子と、分子量が大きなポリペプチド因子とから得られる上記の新規なペプチド配列も、それ自身本発明の権利の一部を構成するものである。これらの配列は、本発明のポリペプチド因子について、広範囲の様々な種からこのような因子（又は対応の遺伝子配列）を調査し、分離し、あるいは合成し、又は、このような因子を遺伝子組替え技術によって合成するためのプロンプ源として有用であり、更には、対応する抗体、好ましくはモノクローナル抗体、であってそれ自身が有用な研究手段であり、また治療物質としての可能性も有する抗体の、従来技術による合成にも有用である。本発明は、更に、本発明の新規なペプチド配列のための前記の方法によって得られる、遺伝子配列又はそのフラグメントをコード化する分離グリア細胞細胞分裂誘発活性にも関する。

20

【0043】

本発明における高度に精製された因子から得られる短いペプチドの使用により、更に別の配列も特定することが可能になった（下記の例参照）。

【0044】

従って、本発明は、更に、グリア細胞細胞分裂誘発活性を有し、以下に記載するDNA配列によってコード化されるアミノ酸配列を備えたポリペプチド因子も含む。即ち、

(a) 図28A、28B又は28Cのいずれかにおいてそれぞれ配列識別番号133~135で示されるDNA配列、

30

(b) 図22において、配列識別番号89によって示されるDNA配列、

(c) 図28Aにおいて配列識別番号133によって示される配列のヌクレオチド281~557によって表されるDNA配列、

(d) 前記(a)、(b)又は(c)によって、いずれかのDNAとハイブリダイゼーション可能なDNA配列。

【0045】

本発明は、更に、上述の配列に対して60%以上、好ましくは80%以上の相同同一性を有する配列を含む。

【0046】

本発明は、特定のハイブリダイゼーション条件に限定されるものではないが、以下の実験記録は、便宜的に従われるガイダンスを提供するものである。

40

【0047】

DNAプローブは、ショワルター(Schwalter)及びゾマー(Sommer)(Anal. Biochem., 177:90-94, 1989)に従い、ニックトランスレーションあるいはPCR反応によって、高比活性(約 10^8 ないし 10^9 ^{32}P dmp / μg に標識化して、G-150セファードックス(Sephadex)カラムでの脱塩によって精製できる。プローブは、変性し(沸騰水中で10分間、その後、冷水に漬ける)、次に、 10^6 dpm ^{32}P / mlにて10%の硫酸デキストランを含有する80%のバッファB(ポリビニルピロリジン2g、Ficoll-400 2g, ウシ血清アルブミ

50

ン 2 g , I M T r i s H C L (p h 7 . 5) 5 0 m l , N a C l 5 8 g , ピロ燐酸塩ナトリウム 1 g、ドデシル硫酸ナトリウム 10 g、H₂O 950 ml) のハイブリダイゼーション溶液に加え、60 で一晩(約16時間)培養することができる。次に、前記フィルターを、60 にて、先ず、バッファ B 中で15分間、次に、2 X S S C、0.1% S D S 中で20分間洗浄を3回、I X S S C、0.1% S D S 中での20分間の洗浄を1回行うことによって洗浄することができる。

【0048】

その他の態様において、本発明は、以下記載のものを提供する、

(a) ウシ下垂体物質から得られた場合には、還元状態であるか否かに関わらず、下記の分子量標準を使用した S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、約 30 k D ないし約 36 k D の分子量が観察される基礎ポリペプチド因子：

リゾチーム(鶏卵白) 14,400

大豆トリプシンインヒビター 21,500

カルボニックアンヒドラーゼ(ウシ) 31,000

卵白アルブミン(鶏卵白) 45,000

ウシ血清アルブミン 66,200

フォスホリラーゼ B (ラビット筋肉) 97,400

そして、当該因子は、ウシ胎仔血漿の存在下において、ラットシュワン細胞の分裂を含むグリア細胞分裂誘発活性を有し、逆相 H P L C を使用して分離した場合、4 で 0.1% のトリフルオロ酢酸中での10週間の培養後においてその活性の少なくとも50%を保持する。そして、

(b) ウシ下垂体物質から得られた場合に、非還元状態において、下記の分子量標準を使用した S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、約 55 k D ないし約 63 k D の分子量が観察される基礎ポリペプチド因子：

リゾチーム(鶏卵白) 14,400

大豆トリプシンインヒビター 21,500

カルボニックアンヒドラーゼ(ウシ) 31,000

卵白アルブミン(鶏卵白) 45,000

ウシ血清アルブミン 66,200

フォスホリラーゼ B (ラビット筋肉) 97,400

【0049】

そして、当該因子のヒトの等価物質は、ここに記載の D N A クローン G G F 2 H B S 5 によってコード化され、また該因子は、ウシ胎仔血漿の存在下において、ラットシュワン細胞の分裂を含むグリア細胞分裂誘発活性を有し、逆相 H P L C を使用して分離した場合、4 で 0.1% のトリフルオロ酢酸中での10週間の培養後においてその活性の少なくとも50%を保持する。

【0050】

尚、便宜上、本発明の低い分子量の因子と高い分子量の因子とを、それぞれ、" G G F - I "、" G G F - I I " と称する。前記 G G F - I I という表示は、G G F - I I タンパク質由来のペプチド配列データで分離されたすべてのクローン(即ち、G G F 2 H B S 5、G G F 2 B P P 3)に使用される。

【0051】

尚、前述の分子量範囲は、正確なものではなく、特定のポリペプチド因子のソースによって僅かに変化するものである。たとえば、別のソースからの物質において約10%の変化は不可能であろう。

【0052】

本発明の別の重要な特徴は、グリア細胞細胞分裂誘発活性を有するポリペプチドをコード化する D N A 配列であって、以下の D N A 配列である、

(a) 図 28 A、28 B 又は 28 C のいずれかにおいてそれぞれ配列識別番号 133 ~ 135 で示される D N A 配列、

10

20

30

40

50

(b) 図 2 2 において、配列識別番号 8 9 によって示される DNA 配列、
 (c) 図 2 8 A において配列識別番号 1 3 3 によって示される配列のヌクレオチド 2 8 1 ~ 5 5 7 によって表される DNA 配列、
 (d) 前記 (a) , (b) 又は (c) により、他の DNA と ハイブリダイズ 可能な DNA 配列。

【 0 0 5 3 】

本発明の別の態様は、グリア細胞因子と p 1 8 5^{erbB2} リガンドタンパク質とが前記同じ遺伝子によってコード化されるという事実を利用するものである。この遺伝子から様々なメッセンジャー RNA スプライシング変異体が由来し、これらの生成物質の多くが、p 1 8 5^{erbB2} 結合及び活性を示す。前記 (G G F - I I) 遺伝子生成物のいくつかを使用して、シュワン細胞細胞分裂誘発活性が示された。本発明は、前記 G G F / p 1 8 5^{erbB2} リガンド遺伝子のすべて公知の生成物 (前記参考文献に記載されている) のシュワン細胞細胞分裂誘発物質としての利用を提供するものである。

10

【 0 0 5 4 】

本発明は、更に、その他のこれまで自然には分離されていないグリア成長因子遺伝子のスプライシング変異体にも関する。図 3 0 は、ポリメラーゼ連鎖反応実験 (逆転写 RNA における) と cDNA クローン (ここに記載) の分析、更に、p 1 8 5^{erbB2} リガンドをコード化する配列として公開されているもの (ペレス (P e l e s) 他, C e l l 6 9 : 2 0 5 (1 9 9 2) 及びウエン (W e n n) 他, C e l l 6 9 : 5 5 9 (1 9 9 2)) からのスプライシングの公知のパターンを示している。これらのパターンは、ここに記載のその他のパターンとともに、存在する可能なスプライシング変異体を表すものである。従って、本発明の別の態様は、この遺伝子から由来の新規なタンパク質因子をコード化するヌクレオチド配列に関する。本発明は、更に、これらの因子の合成方法にも関する。これらの新規な因子の治療への適用も本発明の更に別の態様を構成するものである。

20

【 0 0 5 5 】

従って、本発明の他の重要な特徴は以下の通りである、

(a) シュワン細胞の分裂の刺激を含むグリア細胞細胞分裂誘発活性を有する一連のヒト及びウシポリペプチド因子。これらのポリペプチド配列は、図 3 1 , 3 2 , 3 3 及び 3 4 において、それぞれ配列識別番号 1 3 6 ~ 1 3 7 として示されている。

(b) シュワン細胞の分裂の刺激を含むグリア細胞細胞分裂誘発活性を有する一連のポリペプチド因子であって、以下の記載概要に基づいて精製され、特徴付けられるもの、即ち、ルプ (L u p u) 他, S c i e n c e 2 4 9 : 1 5 5 2 (1 9 9 0) ; ルプ (L u p u) 他, P r o c . N a t l . A c a d . S c i U S A 8 9 : 2 2 8 7 (1 9 9 2) ; ホルムズ (H o l m e s) 他, S c i e n c e 2 5 6 : 1 2 0 5 (1 9 9 2) ; ペレス (P e l e s) 他, 6 9 : 2 0 5 (1 9 9 2) ; ヤーデン (Y a r d e n) およびペレス (P e l e s) , B i o c h e m i s t r y 3 0 : 3 5 4 3 (1 9 9 1) ; ドバシ (D o b a s h i) 他, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 8 8 : 8 5 8 2 (1 9 9 1) ; デイヴィス (D a v i s) 他, B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 1 7 9 : 1 5 3 6 (1 9 9 1) ; ビューモント (B e a u m o n t) 他, 特許出願 P C T / U S 9 1 / 0 3 4 4 3 (1 9 9 0) ; グリーン (G r e e n) 他, 特許出願 P C T / U S 9 1 / 0 2 3 3 1 (1 9 9 0) 、アスディン (U s d i n) およびフィッシュバック (F i s c h b a c h) , J . C e l l . B i o l . 1 0 3 : 4 9 3 - 5 0 7 (1 9 8 6) ; フォールズ (F a l l s) 他, C o l d S p r i n g H a r b o r S y m p . Q u a n t . B i o l . 5 5 : 3 9 7 - 4 0 6 (1 9 9 0) ; ハリス (H a r r i s) 他, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 8 : 7 6 6 4 - 7 6 6 8 (1 9 9 1) ; 及びフォールズ (F a l l s) 他, C e l l 7 2 : 8 0 1 - 8 1 5 (1 9 9 3) 。

30

40

(c) シュワン細胞の分裂の刺激を含むグリア細胞細胞分裂誘発活性を有するポリペプチド因子 (G G F B P P 5) 。そのアミノ酸配列は、図 3 2 において配列認識番号 1 4 8 によって示され、図 3 2 において配列認識番号 1 4 8 によって示されるウシ DNA 配列によ

50

ってコード化される。

【0056】

上述の新規なヒトペプチド配列は、図31、32、33、34において、それぞれ配列認識番号136～150として示され、これらは、天然ソース（適当な繊維組織から得られるcDNAライブラリー）からの完全長の相補性DNA（cDNA）として分離可能であり、あるいは、当業者によって、個々のエクソン（例えば、分離エクソンとして得られる）とのDNA構造物として組立可能である。

【0057】

p185^{erbB2}レセプターに特異的に結合する他の化合物、特に、ペプチドも、本発明においては、グリア細胞細胞分裂誘発物質として利用可能である。候補化合物は、p185^{erbB2}結合によりルーチン的にスクリーニングすることが出来、もしも結合する場合には、ここに記載の方法を使用してグリア細胞細胞分裂誘発活性のスクリーニングを行うことができる。

10

【0058】

本発明は、活性が大幅に減少したものでない、上記ポリペプチド因子のすべての変成物質及び等価物質も含む。例えば、その活性に大きな悪影響を与えずにアミノ酸内容又は配列を変化させた改変物質が含まれる。例として、天然タンパク質のEP-A109748に於ける突然変異が開示され、ここでは、生物学的反応には必要の無い該天然の配列中のシステインを中性アミノ酸に置換することによって、不要な二硫化物結合の可能性を避けている。従ってここに含まれる効果及び使用方法の記載は、このような改変物質及び

20

【0059】

本発明の新規な配列は、組替え技術の利点を新たに開くものである。従って、本発明は、以下の態様を含む。

(a) 前記構築物による形質転換後の選択された宿主細胞のベクター（前記配列の発現を許容すべく制御配列に対して位置決めされている）内の作動読み取り枠に於ける前述のDNA配列からなるDNA構築物（好ましくは、前記制御配列は、例えばTrp等の調節可能プロモーターを有している）。尚、プロモーターと調節配列（あるとすれば）の選択は当業者に於ける選択事項である。

(b) 前記DNA配列が前記宿主細胞において発現できるように上記(a)に定義された構築物を組み込むことによって変成された宿主細胞 - ホストの選択は重要でなく、選択される細胞は、原核生物あるいは真核生物のいずれであってもよく、公知の方法によって遺伝子的に変形して前記構築物を組み込むことが可能である。そして

30

(c) DNA配列の発現を許容する条件下において、変成された宿主細胞を培養することからなる上記因子の合成方法。前記条件は、DNA組替え技術の当業者によって実施態様に応じて容易に決定することが可能である。本発明は、この手段によって合成されたグリア細胞細胞分裂誘発物質を含む。

【0060】

該技術において記載されているいずれの因子も、本発明の新規なポリペプチド因子が有する組合せの特性を有していない。

40

【0061】

前述したように、本発明の因子を特徴付けるシュワン細胞分析は、バックグラウンドとしてウシ胎仔血漿を使用する。その他すべての点においては、この分析は、ブロックス(Brockes)他, in Meth. Enz., supraと同じであってよいが、但し、10%のFCSを10%のFCPで置き換える。この分析技術の違いは重要である。というのは、ウシ胎仔血漿において血清由来の因子が不在であることによって（血清に対抗するように）、その他のいくつかの因子からの疑似効果を除去することにより、シュワン細胞に於ける活性を厳密に定義することが可能になるからである。

【0062】

本発明は、更に、上述のポリペプチドを調製する方法を含み、該方法は、タンパク質を得

50

るために脊椎類の脳物質を抽出し、この抽出物をハイドロキシアパタイトHPLCによってクロマトグラフィ精製し、次に、これらのフラクションをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけることよりなる。約30kDの分子量が観察されたフラクション及び/又は約55kDないし63kDの分子量が観察されたフラクションを採取する。いずれの場合においても、このフラクションを、下記の分子量標準を使用してSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかける。

【0063】

リゾチーム(鶏卵白) 14,400
大豆トリプシンインヒビター 21,500
カルボニックアンヒドラーゼ(ウシ) 31,000
卵アルブミン(鶏卵白) 45,000
ウシ血清アルブミン 66,200
フォスホリラーゼB(ラビット筋肉) 97,400

10

【0064】

分子量の小さなフラクションの場合には、前記SDS-ポリアクリルアミドゲルを、非還元条件下、あるいは還元条件下のいずれかでランさせ、分子量の大きなフラクションの場合には、該ゲルを非還元条件下でランさせる。次に、これらのフラクションの、ウシ胎仔血漿のバックグラウンド下でラットシュワン細胞の分裂を刺激する活性についてテストする。

【0065】

好ましくは、上記方法は、例えば、ウシ下垂体物質からのカルボキシルメチルセルロースクロマトグラフィによって得られた関連フラクションを分離することによって始める。又、好ましくは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の前に、ハイドロキシアパタイトHPLC、陽イオン交換クロマトグラフィ、ゲル濾過、及び/または逆相HPLCを使用する。この方法の各段階において、ブロックス(Brockes) in Meth. Enz., supraに一般的手段として記載されている分析、但し、10%FCPを10%FCFに代えた分析、により、放射性ヨウ化デオキシウリジンを標準として組み入れシュワン細胞を使用することによって活性を測定することができる。

20

【0066】

従って、本発明は、更に、分析対象の物質によって刺激された(もしあれば)グリア細胞におけるDNA合成を評価することに対して、バックグラウンドとしてウシ胎仔血漿を使用するグリア細胞細胞分裂誘発活性の分析方法を含む。

30

【0067】

本発明の更に別の態様は、オプションとして、許容可能な希釈液、キャリア又は補形薬との併用で、及び/又は単位投与として使用される、薬用又は獣医用として調合された前述のすべての因子からなる薬用又は獣医療用調合物質に関する。本発明の因子の使用においては、適当な調合又は組成を提供するべく従来の薬学的又は獣医学的慣用手段を利用することが出来る。

【0068】

従って、本発明は、例えば、静脈内、皮下内、筋肉内、眼窩内、眼用、心室内、頭蓋内、嚢内、髄腔内、大槽内、腹膜内、鼻腔内、煙霧、乱刺の各投与そして又、経口、口内、直腸、又は腔への投与等の非経口投与法に適用可能である。

40

【0069】

本発明の調合物は、更に、本発明のDNAを発現するホスト細胞の患者への移植、あるいはこれら調合物を放出する外科移植によって投与することも可能である。

【0070】

非経口調合物の形態は、溶液や懸濁液であってよく、又、経口投与調合物の形態は、錠剤、カプセル等であり、鼻腔内投与調合物の形態は、粉末、鼻腔点滴薬、エアロゾル等とすることができる。

【0071】

50

公知の調合方法は、例えば、"Remington's Pharmaceutical Sciences"に記載されている。非経口投与用調合物は、補形薬として、例えば、滅菌した水または塩水、ポリエチレングリコール等のポリアルキレングリコール、植物性オイル、水素化ナフタレン、生物学的適合性、生物分解性ラクチドポリマ、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー等を使用して本発明の因子の放出を調節することが可能である。他のこれら因子の非経口投与システムとして可能なものとしては、エチレン-ビニルアセテートコポリマー粒子、浸透ポンプ、移植可能注入システムやリボソーム等がある。吸引用の調合物は、補形薬として、例えば、ラクトースを含有することが可能であり、又は、例えば、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、グリココール酸塩やデオキシコール酸塩等を含有する水溶液にしたり、鼻腔点滴液投与用としては油性溶液としたり、あるいは、ゲル状にしたりすることができる。非経口投与用調合物としては、更に、口内投与用にはグリココール酸塩、直腸投与にはメトキシサリチル酸塩、または膣投与用にはクエン酸等がある。

10

【0072】

本発明の因子は、単独の活性薬剤として使用したり、あるいは他の活性成分、例えば、神経疾患における神経生存を容易にする他の成長因子や、ペプチダーゼ又はプロテアーゼインヒビター等と組み合わせて使用することができる。

【0073】

本発明の調合物における本発明の因子の濃度は、投与される量な投与経路等の多くの要因に応じて変化する。

20

【0074】

一般に、本発明の因子は、非経口投与用としては水性生理バッファ溶液中に約0.1ないし10%w/v化合物を入れて提供することができる。一般的な投与量は、体重当り、一日につき、約1mg/kgないし約1g/kgの範囲である。好ましい投与量範囲は、体重当り、一日につき、約0.01mg/kgないし100mg/kgである。この好ましい投与量は、治療対象の病理状態の種類と程度、患者の全体的健康状態、調合物の形態及び投与経路によって異なったものになる。

【0075】

前述のように、シュワン細胞（末梢神経系のグリア細胞）は、本発明の因子が存在することによって刺激され分裂する。末梢神経のシュワン細胞は、ニューロンの支持と、個々の神経線維の周りの髄鞘（ミエリン鞘）の形成に関連している。この鞘は、筋肉への電気パルスと知覚レセプターからの電気パルスの適当な伝達にとって重要である。

30

【0076】

一次的又は二次的にシュワン細胞と神経線維が損傷を受ける数多くの種類の末梢神経障害が存在する。又、知覚神経と運動神経の双方の神経障害も数多くのものがある（アダムズ（Adams）およびヴィクター（Victor）, Principles of Neurology）。これらの神経障害のなかで最も重要なものは、恐らく、糖尿病、多発性硬化症、Landry-Guillian-Barr症候群、腫瘍によって発生する神経障害、及び毒物によって生じる神経障害（これらの内のいくつかは腫瘍の治療に利用される）である。

40

【0077】

しかしながら、本発明は、神経システムの損傷が、例えば、感染又は怪我等いかなる原因によって生じた場合においても使用できる治療方法と予防方法とを提供するものである。従って、脱髄又はシュワン細胞の損失が存在する神経システムの障害又疾患の治療において本発明の因子を使用することに加えて、これらのグリア細胞成長因子は、末梢神経に対する損傷によって生じた神経系の障害の治療においても有効である。末梢神経に対する損傷の後、シュワン細胞の成長又は再形成によって再生プロセスが誘発され、その後、神経線維がその目標に向かって再成長する。シュワン細胞の分裂を加速することによって、損傷後の再生プロセスを促進することができる。

【0078】

50

中枢神経系（脳及び脊髄）の損傷又は神経退化疾患の治療にも類似の方法を使用することができる。

【0079】

更に、様々なグリア細胞の腫瘍があるが、それらの中で最も一般的なものは、恐らく、神経線維腫であり、これはグリア細胞の過剰成長によって生じる斑状小腫瘍である。又、いくつかのシュワン細胞腫瘍においてG G Fに非常に類似した活性物質が見られることも知られており、従って、それらのレセプターに対する本発明のインヒビター活性によってグリア腫瘍を治療することが出来、これは前述のように、因子のレセプターへの結合を阻害するのに有効量の物質を投与することからなる。

【0080】

一般に、本発明は、因子 - 感受性又は因子 - 反応性細胞が関連する神経系の病態生理学的症状の予防又は治療に本発明のポリペプチド因子を使用することを含む。

【0081】

本発明のポリペプチド因子は、更に、標準的技術に従って、モノクローナル抗体等の抗体を作る免疫源としても利用可能である。このような抗体も本発明の範囲に含まれる。又、これらの抗体を、治療や診断の目的の為に利用することも可能である。従って、恐らく因子が異常なレベルであることに関連する状態を、このような抗体を利用して追求することができる。標準的方法により単離されたサンプルの分析を利用し、生体外技術が使用できる。又、腫瘍画像化技術を利用して抗体を、例えば、放射性アイソトープで標識化し、体外から画像化できる画像化方法も、使用可能である。

【0082】

本発明は、更に、前記因子を生体内 (in vivo) 又は生体外 (in vitro) でグリア細胞細胞分裂誘発物質として使用することと、そのような用途としての因子とを含む。従って一つの具体的実施例は、有効量の本発明の因子を投与することによって、脊椎類においてグリア細胞細胞分裂誘発効果を生成する方法に関する。そのような方法の好適な実施例は、神経システム疾患又は障害の治療方法又は予防方法である。

【0083】

本発明の更に別の態様は、本発明の因子を、薬品の製造、好ましくは、神経疾患又は障害、あるいは神経再生又は修復のための薬品の製造に使用することである。

【0084】

更に、本発明は、本発明の因子の、前記ポリペプチドに対応のレセプター結合特性を有する分子を同定、あるいは定量する競合アッセイへの利用も含む。これらのポリペプチドは、ラジアイソトープによって標識化してもよい。競合アッセイは、関連するレセプターの拮抗薬と作用薬の両方を同定することができる。

【0085】

別の態様において、本発明は、それぞれの対応レセプターを分離するために、例えばアフィニティークロマトグラフィ等のアフィニティー分離プロセスにおける本発明の因子の使用を提供する。このような特定のタンパク質に対応するレセプターの分離のためのプロセスは、当該技術において公知であり、本発明の因子においても数多くの技術が適用可能である。例えば、IL - 6とIFNとに関して、ノヴィック、ディ (Novick, D.) 他, J. Chromatogr. (1990) 510: 331 - 7が挙げられる。ゴナドトロピン放出ホルモンに関しては文献は以下のものである: ハザム, イー (Hazum, E.), J. Chromatogr. (1990) 510: 233 - 8。またG - CSFに関しては、フクナガ, アール (Fukunaga, R.) 他, J. Biol. Chem., 265: 13386 - 90がある。IL - 2に関しては、スマート, ジェイ, イー (Smart, J. E.) 他, (1990) J. Invest. Dermatol., 94: 158S - 163Sがあり、ヒトIFN - ガンマに関しては、ステファノス, エス (Stefanos, S.) 他, (1989) J. Interferon Res., 9: 719 - 30がある。

【0086】

図面の簡単な説明

先ず、図面について説明する。

図面

図 1 ないし 8 は、例 1 に関し、これらについて簡単に説明する。

図 1 は、カルボキシルメチルセルロースクロマトグラフィからの生成物のプロフィール、

図 2 は、ハイドロキシアパタイト H P L C からの生成物のプロフィール、

図 3 は、モノ S F P L C からの生成物のプロフィール、

図 4 は、ゲル濾過処理 F P L C の生成物のプロフィール、

図 5 及び 6 は、逆相 H P L C からの二つの部分的に精製されたポリペプチド生成物のプロフィールを示す、

10

図 7 及び 8 は、ウシ胎仔血清又はウシ胎仔血漿のバックグランドを使用した逆相 H P L C からの G C F - I I 及び G C F - I I の投与量 - 反応曲線を示す、

図 9 ないし 1 2 は、G C F - I と G C F - I I , 配列認識番号 1 ~ 2 0、2 2 ~ 2 9、3 2 ~ 5 3 及び 1 6 9 から由来のペプチド配列を示し（後記の例 2 参照）、図 1 0 及び 1 2 は、特に、新規な配列を示す、

図 1 0 において、パネル A は、縮重オリゴヌクレオチドプローブと縮重 P C R プライマーとを構成するのに使用する G C F - I ペプチドの配列がリストされている（配列認識番号 2 0 , 1 , 2 2 ~ 2 9 及び 1 7）。パネル A のこれらの配列の内のいくつかは、合成ペプチドの構成にも使用された。パネル B は、縮重プローブと縮重 P C R プライマーの構成には短すぎた（6 アミノ酸以下）新規なペプチドの配列のリストである（配列認識番号 1 7 及び 5 2）、

20

図 1 2 において、パネル A は、縮重オリゴヌクレオチドプローブと縮重 P C R プライマーとを構成するのに使用する G C F - I I ペプチドの配列がリストされている（配列認識番号 4 5 ~ 5 2）。パネル A のこれらの配列の内のいくつかは、合成ペプチドの構成に使用された。パネル B は、縮重プローブと縮重 P C R プライマーの構成には短すぎた（6 アミノ酸以下）新規なペプチドの配列のリストである（配列認識番号 5 3）、

図 1 3 ないし 2 0 は、後記の例 3 に関し、本発明の因子の細胞分裂誘発活性を示し、

図 2 1 ないし 2 8 (a , b 及び c) は、後記の例 4 に関し、これらについて以下簡単に説明する、

図 2 1 は、図 1 0 のパネル A 及び図 1 2 のパネル A に示された新規なペプチド配列から構成された縮重オリゴヌクレオチド（配列認識番号 5 4 - 8 8）のリストである、

30

図 2 2（配列認識番号 8 9）は、縮重オリゴヌクレオチドプローブ 6 0 9 , 6 5 0（それぞれ図 2 1 , 配列認識番号 6 9 及び 7 2 参照）の結合サイトを含有する組替えウシゲノムファーゼ G C F 2 B G 1 からの推定ゲノムファーゼ G G F 2 B G 1 のストレッチを示す。同図は、DNA 配列のコード化ストランドと第 3 読み取り枠の推定されたアミノ酸配列である。因子 2（太字）からのペプチド 1 2 の配列は、6 6 アミノ酸転写読み取り枠（ヌクレオチド 7 5 2 7 2）の一部である、

図 2 3 は、後部下垂体からの RNA に存在するウシ G G F - I I コード下配列のセグメントを分離する実験に使用された縮重 P C R プライマー（パネル A , 配列認識番号 9 0 ~ 1 0 8）とユニークな P C R プライマー（パネル B , 配列認識番号 1 0 9 ~ 1 1 9）である、

40

図 2 4 は、図 7 のパネル A , B のプライマーのリストを使用した P C R 増幅実験において得られた 9 つの別々の隣接したウシ G G F - I I c D N A 構造体と配列、及び後部下垂体からの RNA を示す。同図の最上ラインは、特徴付けられた c D N A 構造体に寄与するコード化配列の略図である、

図 2 5 は、G G F 2 B G 1 のウシ組替えファーゼの物理的地図である。前記ウシフラグメントは、長さが約 2 0 k b であり、ウシ G G F - I I 遺伝子の二つのエクソン（太字）を有している。酵素 X b a 1 , S p e I , N d e 1 , E c o R I , K p n 1 , S s t I の制限サイトがこの物理的地図上に示されている。斜線部分は、配列のためにサブクローンされたフラグメントに対応する、

50

図26は、前記推定ウシGGF-II遺伝子の三つの別の遺伝子生成物の構造の略図である。エクソンはその発見の順番にAないしEとしてリストされている。別のスプライシングパターン1, 2及び3は、三つのオーバーラップする推定タンパク質構造体(GGF2BPP1, 2, 3)を生成し、これらはそれぞれ別の図28A, B, C(下記)に示されている、

図27(配列認識番号120~132)は、図28A, 28B, 28C(下記)に示された推定タンパク質配列において同定されたGGF-I及びGGF-IIと、図10及び12にリストされた新規なペプチド配列との比較である。同図は、9つの新規なGGF-IIペプチド配列の内の6つが、これらの推定タンパク質配列に見られることを示している。GGF-I配列に類似の二つのペプチド配列も見られる、

10

図28A(配列認識番号133)は、図26のスプライシングパターンNo.1から得られるコード化トスランドDNAと推定アミノ酸配列のリストである。前記推定ウシGGF-II遺伝子のこの部分cDNAは、206アミノ酸のタンパク質をコード化する。太字のペプチドは、図10及び12に示したリストから同定されたペプチドである。潜在的グリコシル化サイトがアンダーラインされている(ポリアデニル化信号AATAAAとともに)。

図28B(配列認識番号134)は、図26のスプライシングパターンNo.2から得られるコード化トスランドDNAと推定アミノ酸配列のリストである。前記推定ウシGGF-II遺伝子のこの部分cDNAは、281アミノ酸のタンパク質をコード化する。太字のペプチドは、図10及び12に示したリストから同定されたペプチドである。潜在的グリコシル化サイトがアンダーラインされている(ポリアデニル化信号AATAAAとともに)。

20

図28C(配列認識番号135)は、図26のスプライシングパターンNo.3から得られるコード化トスランドDNAと推定アミノ酸配列のリストである。前記推定ウシGGF-II遺伝子のこの部分cDNAは、257アミノ酸のタンパク質をコード化する。太字のペプチドは、図10及び12に示したリストから同定されたペプチドである。潜在的グリコシル化サイトがアンダーラインされている(ポリアデニル化信号AATAAAとともに)。

図29は、下記の例6に関し、サザンブロット上の様々なほ乳類DNAに対する推定ウシGGF-II遺伝子配列のクロスハイブリダイゼーション分析のオートラジオグラムである。前記フィルターは、同図にリストされた種からのEcoRI-消化DNA(各レーンにつき5µg)を含有する。前記プローブは、図25の物理的地図によって予測されるウシDNAの4キロベースのフラグメントを含んで、各DNAサンプルにおける単一の強力なバンドを検出する。より力の小さいバンドも観察され、これらは関連DNA配列を示す。他のほ乳類DNAサンプルからの強いハイブリダイゼーションバンドは、これらの種のGGF-II相同体を示すものと考えられる。

30

図30は、さまざまなスプライシング変異体を示す図である。コード化セグメントは、F, E, B, A, G, C, C/D, C/D', D, D', H, K及びLによって示されている。精製タンパク質からのペプチド配列の位置は、"0"によって示されている。

図31(配列認識番号136~147, 160, 161)はGGFのコード化セグメントのDNA配列と予想ペプチド配列のリストである。ライン1は、ウシGGFの予想アミノ酸配列のリストであり、ライン2は、ウシGGFのヌクレオチド配列のリストであり、ライン3は、ヒトGGF(ヘレグリン)のヌクレオチド配列のリストであり(ヌクレオチドベースのマッチングは縦線にて示してある)、ライン4は、前記予想ウシ配列とは異なる場合におけるヒトGGF/hereregulinの予想アミノ酸配列のリストである。コード化セグメントE, A'及びKは、ウシ配列のみを表す。コード化セグメントD'は、ヒト(ヘレグリン)配列のみを表す。

40

図32(配列認識番号148)は、BPP5の予想GGF2アミノ酸配列とヌクレオチド配列である。上方ラインは、ヌクレオチド配列であり、下方ラインは、予想アミノ酸配列である。

50

図 3 3 (配列認識番号 1 4 9) は、G G F 2 B P P 2 の予想アミノ酸配列とヌクレオチド配列である。上方ラインは、ヌクレオチド配列であり、下方ラインは、予想アミノ酸配列である。

図 3 4 (配列認識番号 1 5 0) は、G G F 2 B P P 4 の予想アミノ酸配列とヌクレオチド配列である。上方ラインは、ヌクレオチド配列であり、下方ラインは、予想アミノ酸配列である。

図 3 5 (配列認識番号 1 5 1 ~ 1 5 2) は、二つの G G F ペプチド配列 (G G F 2 p p 4 と G G F 2 p p 5) のヒト E G F (h E G F) との整合を示す。星印は、保存されたシステインを示す。

図 3 6 は、G G F の増加に対する、約 2 0 0 k D (抗燐酸化ポリクローナル抗体とともに現像したウエスタンブロット上における 2 0 0 k D バンドの強度) のタンパク質の G G F 活性のレベル (シュワン細胞細胞分裂誘発分析) と、チロシン燐酸化を示す。

図 3 7 は、図 3 1 の配列からのスプライシング変異体のリスト、

図 3 8 は、E G F L 1 (配列認識番号 1 5 4) の、予想アミノ酸配列を下部に、核酸配列を上部に示す、

図 3 9 は、E G F L 2 (配列認識番号 1 5 5) の、予想アミノ酸配列を下部に、核酸配列を上部に示す、

図 4 0 は、E G F L 3 (配列認識番号 1 5 6) の、予想アミノ酸配列を下部に、核酸配列を上部に示す、

図 4 1 は、E G F L 4 (配列認識番号 1 5 7) の、予想アミノ酸配列を下部に、核酸配列を上部に示す、

図 4 2 は、E G F L 5 (配列認識番号 1 5 8) の、予想アミノ酸配列を下部に、核酸配列を上部に示す、

図 4 3 は、E G F L 6 (配列認識番号 1 5 9) の、予想アミノ酸配列を下部に、核酸配列を上部に示す、

図 4 4 は、クローンのスケールコード化セグメントマップである。T 3 は、前記クローンから mRNA を生成するのに使用するバクテリオファージプロモーターを示す。R = 隣接の E c o R I 制限酵素サイト。5 ' U T は、5 ' 非翻訳領域を示す。E , B , A , C , C / D ' 及び D は、コード化セグメントを示す。0 = 翻訳開始サイト。 = ウシ E セグメントに対して相同の領域の 5 ' 限界 (例 6 参照)、そして、3 ' U T は 3 ' 非翻訳領域を示す。

図 4 5 は、G G F 2 H B S 5 の予想アミノ酸配列 (中間部: 配列認識番号 1 7 0) と、核酸配列 (上部: 配列認識番号 2 1) とを示す。下部 (中間) 配列は、G G F - I I 調製物 (図 1 1 及び 1 2 参照) からのペプチド配列を示す。

図 4 6 は、組替えヒト及びウシグリア成長因子のシュワン細胞細胞分裂誘発活性を示すグラフ。

図 4 7 は、C H O 細胞のならし培地の大きさの異なる部分標本 (a l i q u o t s) の投与から生じたシュワン細胞増殖活性物質の投与量 - 反応曲線である。

図 4 8 は、G G F 2 H B S 5 c D N A クローンを含有するバキュロウィルスによって感染した S F 9 昆虫細胞によって細胞外培地中に分泌されたシュワン細胞細胞分裂誘発活性物質の投与量 - 反応曲線、

図 4 9 は、G G F ペプチド抗体を使用した組替え C H O 細胞のならし培地のウエスタンブロット、

図 5 0 A は、陽イオン交換カラムから溶出した組替え (C O S 細胞が生成) ヒト G G F - I I (r h G G F - I I) ピークのシュワン細胞増殖活性のグラフであり、

図 5 0 B は、r h G G F I I の特定のペプチドに対して生成されたポリクローナル抗体を使用した組替え G G F I I ピークに対する免疫プロットである、

図 5 1 A は、フラクションごとの陽イオン交換カラムでの r h G G F - I I (C H O 細胞が生成) の精製を示すグラフ、

図 5 1 B は、図 5 1 A に示されたフラクションと r h G G F - I I 特異抗体を使用したウ

10

20

30

40

50

エスタンプロットの写真である、

図52は、組替えグリア成長因子で処理したシュワン細胞におけるチロシン燐酸化を示すゲルの写真、

図53は、GGFHS5, GGFHB1及びGGFBPP5ポリペプチド(配列認識番号170, 171, 172)の配列、

図54は、前記CHO細胞-発現ベクターpcDHF RpolyAのマップである。

【0087】

詳細な説明

本発明は、新規なグリア成長因子の分離と精製、及び、これら因子をコード化するDNA配列のクローニングとに関する。本発明の他の組成物は、一連のグリア成長因子を潜在的にコード化できるいくつかの遺伝子スプライシング変異体、特に、GGF2HS5、特にウシGGF-IIのヒト等価物をコード化する変異体である。GGF's及びp185^{erbB2}結合タンパク質をコード化する遺伝子が、長さが異なりいくつかの共通のペプチド配列といくつかのユニークなペプチド配列とを有する一連のタンパク質を生み出すRNA転写体であって、様々な大きさとスプライス状態の異なったRNA転写体を生成することは明らかである。これは、ウシ後方下垂体RNA(ここに開示される)、ヒトの乳ガン(MDA-MB-231)(ホルムズ(Holmes)他, Science 256:1205(1992))や鶏の脳のRNA(フォールズ(Falls)他, Cell 72:1-20(1993))から回収可能なスプライシングの異なる諸配列によって証拠付けられている。又、シュワン細胞に対する細胞分裂誘発物質(ここに開示)として、また、前記p185^{erbB2}レセプター(下記参照)のためのリガンドの両方として作用する広範囲のタンパク質によっても証拠付けられている。

【0088】

前記GGFとp185^{erbB2}をコード化する遺伝子が相同であるという事実の更なる証拠は、ヌクレオチド配列の比較から得られる。Science, 256(1992), (1205~1210)ホルムズ(Holmes)他, は、前記レセプタータンパク質p185^{erbB2}に特異的に反応し、いくつかのヒトの悪性腫瘍に関連する45-キロダルトンのヒトタンパク質(ヘレグリン-)の精製について記載している。ヘレグリン-をコード化するいくつかの相補性DNAクローンが分離された。ペレス(Peles)他(Cell 69:205(1992))及びウェン(Wen)他(Cell 69:559(1992))は、「neu分化因子」(NDF)と称するタンパク質をコード化するラット細胞から分離された相補性DNAについて記載している。前記NDF cDNAのトランスレーション生成物は、p185^{erbB2}結合活性を有する。アスディン(Usdin)及びフィッシュバック, ジェイ(Fischbach, J.) Cell. Biol. 103:493-507(1986); フォールズ(Falls)他, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 55:397-406(1990); ハリス(Harris)他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7664-7668(1991); 及びフォールズ(Falls)他, Cell 72:801-815(1993)は、レセプタータンパク質p185^{erbB2}と作用する42Kdのグリコプロテインの精製されたこと、また、いくつかの相補性cDNAが分離されたこと(フォールズ(Falls)他Cell 72:801:815(1993))を示している。その他のグループとしては、ルプ(Lupu)他(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2287; ヤーデン(Yarden)とペレス(Peles)(1991) Biochemistry 30:3543; ルプ(Lupu)他(1990) Science 249:1552; ドバシ(Dobashi)他(1991) Biochem. Biophys. Res. Comm. 179:1536; そしてフアング(Huang)他(1992) J. Biol. Chem. 257:11508-11512等が含まれる。

【0089】

他の実施例

10

20

30

40

50

本発明は、図31のコード化セグメント(配列認識番号136~147, 160及び161)にほぼ相同のすべてのタンパク質と、自然発生GGFポリペプチドとを含む。更に、対立遺伝子変異体、自然突然変異体、誘発突然変異体、自然発生の核酸に対する高ストリンジエント条件又は低ストリンジエント条件下においてハイブリダイズしたDNAによってコード化されたタンパク質(高ストリンジエント条件及び低ストリンジエント条件の定義に関しては、ここに参照文献として添付するCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989, 6.3.1-6.3.6を参照)、そして、抗血清によってGGFポリペプチドに特異的に結合したポリペプチド又はタンパク質も含まれる。又、この用語は、図31からの配列を有するGGFポリペプチドを含むキメラポリペプチドも含む。

10

【0090】

以下の例は、本発明を限定するものではなく、本発明を有用に例示する目的で提供されるものであり、有効な調製技術に関するガイダンスを提供するものである。

【0091】

下記の例3から理解されるように、本発明の因子は、ある範囲のタイプの細胞に細胞分裂誘発活性を示す。線維芽細胞に関する活性は、傷修復能力があることを示し、本発明は、この利用方法も含むものである。上述の調合物及び/又は薬品、及びその製造方法に関連の本発明の一般的記載は、適当な製造物とその使用方法を含むものであると理解されるべきである。これは、線維芽成長因子(FGFs)に対する類似の活性に関する報告に鑑みて、本発明に対し合理的に期待されるものである。例えば、Sporn et al., 「ペプチド成長因子とそのレセプターI」396頁(Baird and Bohlen)の「傷の治癒と繊維組織の修復におけるFGFs」というタイトルを付けられた章を参照。

20

【0092】

例1

ウシ下垂体からのGGF-IとGGF-IIとの精製

I. 因子-CMフラクションの調製

4,000の冷凍全ウシ下垂体(約12kg)を一晩解凍し、先ず水で簡単に洗浄し、次に、Waring Blenderによって各々同量の0.15M硫酸アンモニウムでバッチ処理によりホモジナイズした。このホモジナイズ化物を1.0MのHClでpH4.5に調節し、4,900gで80分間遠心分離機にかけた。上澄液中のすべての脂肪分を、グラスウールを通過させることによって除去した。前記上澄液のpHを1.0MのNaOHを使用して6.5に調整した後、固体の硫酸アンモニウムを添加して36%の飽和溶液となるようにした。数時間の攪拌後、その懸濁液を4,900gで80分間遠心分離機にかけ、沈澱物を取り除いた。グラスウールでのフィルター処理後、更に前記上澄液に固体硫酸アンモニウムを追加し、75%の飽和溶液となるようにし、数時間の攪拌後、これを再び4,900gで80分間遠心分離機にかけた。そのペレットを、約2リットルのpH6.0の0.1M磷酸ナトリウム中にて再懸濁し、3ラ40Lの同じバッファで透析した。透析物の導電性が20.0µジーメンス以下であることを確認した後、毎分2mlの流量で、カルボキシルセルロース(CM-52, Whatman)でパックしたバイオプロセスカラム(120ラ113mm, Pharcia)に負荷した。このカラムを、先ず、2倍量のpH6.0の0.1M磷酸ナトリウムで、次に、2倍量の50mM NaClで、そして最後に2倍量の0.2M NaClで、同じバッファ中にて洗浄した。最終工程において、10ml(5分間)のフラクションが収集された。フラクション73~118までをプールし、10倍量のpH6.0の10mM磷酸ナトリウムで2度、透析し、100,000gで60分間の遠心分離によって浄化した。

30

40

【0093】

II. ハイドロキシアパタイトHPLC

ハイドロキシアパタイトHPLCは、グリア成長因子の分離において従来使用された技術

50

ではないが、本発明において特に有効であることが判った。

【0094】

前記CM-セルロースクロマトグラフィによって得られた物質を、0.02 μmのフィルター(Nalgene)によって濾過し、室温にて、ガードカラム(15×25mm, Biorad)を備えた高性能ハイドロキシアパタイトカラム(50×50mm, Biorad)に負荷し、pH6.0の10mMの燐酸カリウムで平衡させた。室温での抽出を、下記のプログラムされたリニアグラジエントを使用して毎分2mlの流量で行った。

【0095】

時間(分)	%B	溶剤A:10mM 燐酸カリウム pH 6.0	溶剤B:1.0M 燐酸カリウム pH 6.0	
0.0	0			10
5.0	0			
7.0	20			
70.0	20			
150.0	100			
180.0	100			
185.5	0			

【0096】

6.0mL(3分間)フラクションを、前記グラジエント溶出中に採取した。フラクション39~45をプールし、10分量の50mM燐酸ナトリウムpH6.0で透析した。 20

【0097】

III.モノSFLC

モノSFLCにより、後のゲル濾過のためにより高濃度の物質を作ることが可能となった。

【0098】

前記ハイドロキシアパタイトカラムからのプールされた物質のすべての粒状成分を、調製HR10/10モノS陽イオン交換カラム(100×10mm, Pharmacia)にかける前に、10,000gでの浄化スピンによって、60分間で除去し、次に、これを室温下で、毎分1.0mlの流量でpH6.0の50mM燐酸ナトリウムに再平衡させた。これらの条件下において、結合したタンパク質を、下記のプログラムされた一次グラジエントを使用して溶出した。 30

【0099】

時間(分)	%B	溶剤A:10mM 燐酸カリウム pH 6.0	溶剤B:1.2M 塩化ナトリウム 50mm 燐酸ナトリウム pH 6.0	
0.0	0			40
70.0	30			
240.0	100			
250.0	100			
260.0	0			

【0100】

1.0mL(1分間)フラクションを、このグラジエントプログラム中に採取した。フラクション99~115までをプールした。

【0101】

IV.ゲル濾過FPLC

この工程は、最終精製処理の前に、本発明の二つの因子の分離より始め、濃縮フラクションを作った。

【0102】

この実験の目的のため、調製スペローズ(Superose)12FPLCカラム(510×20mm, Pharmacia)を、その製造会社の指示に従って充填した。このカラムを標準化するために、製造会社の指示に従って、理論段数測定を行い、9,700 50

理論段数という値を得た。

【0103】

モノ S 溶出物質のプールを、室温において、2.5 mL の部分標本ごとに、予め C18 逆相カラム (Sep-pak Millipore) に通過させた 50 mM 燐酸ナトリウム、0.75 NaCl pH 6.0 中で毎分 1.0 mL の流量でこのカラムに適用した。各サンプルが該カラムに適用された後、35 分後から 1 mL (0.5 分間) のフラクションが採取された。各実行 (ラン) からフラクション 27 ないし 41 (GGF-II) 及び 42 ~ 57 (GGF-I) までがプールされた。

【0104】

V. 逆相 HPLC

上記スベローズの 12 回のランから得られた GGF-1 と GGF-II とを、それぞれ、三つの等しい部分標本に分割した。各部分を、ガードカートリッジ (RP-8, 15 x 3.2 mm, Applied Biosystems) によって保護され、40 に平衡させた、C8 逆相カラム (Aquapore RP-300 7µ C8 220 x 4.6 mm, Applied Biosystems) にて、毎分 0.5 mL の流量で通過させた。これらの条件下において、下記のプログラムによるリニアグラジエントを使用してタンパク質を溶出した。

【0105】

時間 (分)	% B	溶剤 A : 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA)	溶剤 B : 90% アセトニトリル、0.1% TFA
0.0	0		
60	66.6		
62.0	100		
72.0	100		
75.0	0		

【0106】

200 µL (0.4 分間) のフラクションを前記プログラムグラジエントの開始後からの 15.2 分間でシリコン化チューブ (Multilube チューブ、Bioquote) 内に採取した。

【0107】

VI. SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動

この工程においては、Bio-Rad Laboratories Limited, Watford, England のタンパク質分子量標準、低レンジ、カタログ No. 161-0304 を使用した。実際に使用されたタンパク質とその分子量標準は、前述の通りであった。

【0108】

前記逆相プログラムのランから得たフラクション 47 ~ 53 (GGF-I) とフラクション 61 ~ 67 (GGF-II) を、個別にプールした。このプールした物質の 7 µL を、0.0125 M Tris-Cl, 4% SDS, 20% グリセロール、及び GGF-I に対しては 10% の β-メルカプトエタノールの等量混合液中で、5 分間沸騰させ、4% の濃縮用ゲルを有する 11% ポリアクリルアミド Laemmli ゲル中に充填し、50 V の定電圧を 16 時間かけた。このゲルを、次に、固定し、銀染色キット (Amersham) を使用して染色した。これらの条件下において、前記因子は、分子量マーカーを基準として、相対分子量が 30,000 ないし 36,000 ダルトン (GGF-I) と 55,000 ないし 63,000 ダルトン (GGF-II) の、幾分拡散したバンドとして観察される。前記ゲル染色から、前記逆相プログラム実行からプールされた物質において前記 GGF-I (5 GGF-II と同等のレベルで、他のタンパク質が存在することが明らかである。

【0109】

VII. トリフルオロ酢酸中における安定性

トリフルオロ酢酸存在下における、本発明の因子の安定性に関して得られたデータは以下の通りである。

【0110】

GGF-I : 0.1% TFAとアセトニトリルの存在下において、前記逆相HPLCから得た物質を、カラムランの完了後12時間以内と、その40 での10週間の培養後とにおいて分析した。培養後、GGF-Iは、カラム流出後、直接にとって分析した物質の活性の少なくとも50%を保持していた。

GGF-II : 0.1% TFAとアセトニトリルの存在下において、前記逆相HPLCから得て、-20 で保存しておいて物質を、解凍後と、40 で4日間の培養後とにおいて分析した。培養後、GGF-IIは、解凍直後の物質の活性の少なくとも50%を保持していた。

10

【0111】

尚、上記研究において使用されたトリフルオロ酢酸濃度は、逆相クロマトグラフィにおいて最も一般的に使用されるものである。

【0112】

VIII. 活性分析条件

特に明記の無い限り、すべての作業は37 で行った。そして図1ないし6に示されるように、各工程での活性は、下記の変更以外には、ブロックス(Brockes)(Meth. Enz., supra)の技術を使用して測定された。従って、シュワン細胞の調製において、5 μMのフォルスコリン(forskolin)を、DMEM(ダルベッコ変法イーグル培地)、FCS及びGGF以外に添加した。分析に使用した細胞は、継代数が10以内の無線維芽細胞シュワン細胞であり、これらの細胞は、トリプシンとともにフラスコから除去され、1マイクロ・ウェル当り3.3千細胞の割合で平底96-ウェル・プレートにプレート化した。

20

【0113】

[¹²⁵I]IUdRを、テスト溶液の添加後の最後の24時間後に添加した。バックグラウンド(非刺激)の各分析に対する関与は、100 cpm以下であり、最大の組込みは、シュワン細胞のバッチと継代数とに応じて、20ないし200倍(fold)であった。

【0114】

上述の逆相HPLCから得られるGGF-I及びGGF-IIフラクションの場合、各因子に対する一本の曲線について、全く同じ前述の方法を使用して、二本の投与量-反応曲線が得られた。そして、この分析実験において上記方法は、各因子についての他の曲線を得るために、ウシ胎仔血漿をウシ胎仔血清に代えた点のみ変更された。その結果は、図7及び8に示されている。

30

【0115】

例2

精製GGF-IとGGF-IIのアミノ酸配列

高度に精製したウシ下垂体GGF-I及びGGF-IIを使用してアミノ酸配列分析研究を行った。これらの配列の記載には従来式の単一文字コードを使用した。ペプチドは、還元されそしてカルボキシメチル化されたサンプルについて、リシルエンドペプチダーゼとプロテアーゼV8による消化物として得られた。特に前記GGF-IIのリシルエンドペプチダーゼの消化は、11% SDS-PAGE(前記マーカーに対するMW)の55~65 RD領域において行った。

40

【0116】

GGF-Iに関して全部で21のペプチド配列(図9、配列認識番号1~20, 169参照)が得られ、その内の12のペプチド(図10、配列認識番号1, 22~29, 17, 19及び32)は現在のタンパク質データベースには存在しないものであり、従って、新規な配列である。GGF-IIに関して全部で12のペプチド配列(図11)配列認識番号33~44参照)が得られ、その内の10のペプチド(図12、配列認識番号45~53)は現在のタンパク質データベースには存在しないものであり、従って、新規な配列で

50

ある（例外は、ペプチド G G F - I I 06 であり、これは多くのタンパク質においても同じ配列を示しているが、これらはその残基の数が小さいことから恐らく重要ではない）。これらの新規な配列が、G G F - I と I I の真のアミノ酸配列の部分に対応するものである可能性は極めて高い。

【 0 1 1 7 】

特に注目されるのは G G F - I 07 と G G F - I I 12 とであって、これらは明らかに互いに密接に関連している。その類似性は、これらのペプチドの配列がほぼ確実に指定された G G F 類のそれであることと、汚染タンパク質由来である可能性が非常に低いことを示すものである。

【 0 1 1 8 】

更に、ペプチド G G F - I I 02 において、配列 X S S は、X によって示す位置におけるアスパラギンの N - 結合の炭水化物部分 (m o i e t y) の存在と一致している。

【 0 1 1 9 】

一般に、図 9 及び 11 において、X は、サイクル中に同じ大きさの信号が一つ以上存在したか、あるいは、全く信号が無かったことによって一つの位置も確実に呼び出すことができなかつたシーケンスサイクルを表す未知の残基を示している。星印は、最後に呼び出したアミノ酸が、そのペプチドに存在する最後のアミノ酸に対応するペプチドを示す。その他のタンパク質において、最後に呼び出したアミノ酸の後の信号強度では、そのペプチドの末端まで呼び出しを継続するのには不十分であった。右側のカラムは、N B R F と E M B L 配列データベースを分析するために G C G パッケージ F A S T A 及び T F A S T A プログラムを使用して行ったコンピュータデータベースサーチの結果を示している。このカラムのタンパク質の名称は、その配列の一部の一致を示し、呼び出されたペプチドアミノ酸配列は最大 2 つのミスマッチを許容するものであった。疑問符 (?) は、許容された 3 つのミスマッチを示している。使用された略記は以下の通りである。

【 0 1 2 0 】

H M G - 1 高移動性グループタンパク質 - 1
 H M G - 2 高移動性グループタンパク質 - 2
 L H - アルファ 黄体形成ホルモンアルファサブユニット
 L H - ベータ 黄体形成ホルモンベータサブユニット

【 0 1 2 1 】

例 3

精製 G C F - I と G C F - I I の細胞分裂誘発活性

G C F - I と G C F - I I との両方を含有する高度に精製したサンプルの細胞分裂誘発活性の研究を、定量方法により行った。この方法は、単一のマクロ培養による、DNA 合成、細胞組織形態、細胞数、細胞アンチゲンの発現の評価を可能にするものである。この技術は、以前にミュール (M u i r) 他, *Analytical Biochemistry* 185, 377 - 382, 1990 によって報告された方法を変更したものである。主な変更点は、1) 非被覆マイクロタイター (m i c r o t i t e r) プレートの使用、2) 一ウェル当りの細胞数、3) 10% ウシ胎仔血清 (F C S) に代えての 5% の胎児ウシ血漿 (F B P) の使用、そして 4) 培養と同時に添加された細胞分裂誘発物質と臭化デオキシウリジン (B r d U) の存在下における培養時間、である。更に、細胞の損失を避けるために、前記細胞の単層は、固定前において洗浄しなかった。そして、モノクローナル・マウス抗 - B r d U 抗体と ペルオキシダーゼ接合ヤギ抗 - マウス免疫グロブリン (I g G) 抗体とを、分析の感度を高めるために、2 倍にした。ラットの座骨神経シュワン細胞ように最適化した分析も、前記細胞培養条件に対して適当な変更を施した後に、いくつかの細胞系に使用した。

【 0 1 2 2 】

I . 細胞分裂誘発テスト

第 1 日目に、精製したシュワン細胞を、5% E B P / ダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M) (5 , 0 0 0 細胞 / ウェル) 中で、非被覆の 9 6 ウェルのプレートにプレート化し

10

20

30

40

50

た。第2日目に、GGF又はその他のテスト因子を、 $10\ \mu\text{m}$ の最終濃度のBrdUとともに、前記培養物に添加した。48時間後(第4日目)、BrdU組み込みを、前記培地を吸引することによって終わらせ、室温で20分間、70%エタノールを $200\ \mu\text{l}$ /ウェル添加し、細胞を固定した。次に、これらの細胞を、水及び37で10分間、 $100\ \mu\text{l}$ の2N HClでの培養によって変質させたDNAで洗浄した。吸引後、残りの酸を、前記ウェルを0.1Mホウ酸塩バッファpH9.0で満たすことによって中和し、細胞を燐酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄した。次に、細胞を、 $50\ \mu\text{l}$ のブロッキングバッファ(0.1%のトリトンX100と2%の正常ヤギ血清とを含有するPBS)で37にて15分間処理した。吸引後、モノクローナル・マウス抗-BrdU抗体(ダコ・コーポレーション(Dako Corp.)), カリフォルニア州, サンタ・バーバラ)($50\ \mu\text{l}$ /ウェル, ブロッキングバッファ中で $1.4\ \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈)を添加し、37で2時間培養した。非結合抗体を、0.1%トリトンX-100を含有のPBS中において3回洗浄して除去し、ペルオキシダーゼ-結合ヤギ-抗マウスIgG抗体(ダコ・コーポレーション(Dako Corp.)), カリフォルニア州, サンタ・バーバラ)($50\ \mu\text{l}$ /ウェル, ブロッキングバッファ中で $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈)を添加し、37で1時間培養した。PBS/トリトンでの3回の洗浄と、PBS中での最終すすぎ後、ウェルは、0.05%の溶解性クロモゲンO-フェニレンジアミン(OPD)と、0.02%の H_2O_2 とを含有する $100\ \mu\text{l}$ /ウェルの50mMのpH5.0燐酸/クエン酸塩バッファを受けた。室温で5~20分後、各ウェルから $80\ \mu\text{l}$ を、2N硫酸を $40\ \mu\text{l}$ /ウェル含有するクリーンなプレートにピペットで移すことによって、前記反応をに終結させた。490nmにおける吸光はプレートリーダー(Dynatech Labs)を使用して記録した。前記細胞単層を含有する分析プレートを、PBSで2回洗浄し、 $100\ \mu\text{l}$ /ウェルの基質ジアミノベンジジン(DAB)を加えてBrdU-DNAについて免疫細胞化学的に染色し、0.02%の H_2O_2 とを添加することによって不溶性生成物とした。10~20分後、前記染色反応を、水で洗浄することによって終結させ、倒立顕微鏡(inverted microscope)を使用してBrdU-ポジティブ細胞核を観察計数した。場合により、ネガティブ核を0.001%のトルイジンブルーで対比染色し、上述と同じように計数した。

【0123】

II. 細胞分裂誘発分析に使用した細胞系

Swiss 3T3線維芽細胞: Flow Labsからの細胞を、10% CO_2 の空气中で、加湿雰囲気下、37で、10%のFCS、ペニシリン、ストレプトマイシンを補足したDMEM中に保持した。細胞を、2日毎に供給又は二次培養した。細胞分裂誘発分析のために、細胞を、完全培地にて5,000細胞/ウェルの濃度でプレート化し、細胞が融合性を得て、静止状態になるまで1週間培養した。血清を含有する培地を除去し、細胞単層を、無血清培地で2回洗浄した。細胞分裂誘発物質を含有する $100\ \mu\text{l}$ の無血清培地と、 $10\ \mu\text{M}$ のBrdUとを各ウェルに添加し、48時間培養した。GGFと血清又はPDGF(ホジティブコントロールとして)に対する投与量反応を行った。

【0124】

BHK(ベビーハムスター腎臓)21 C13線維芽細胞: 動物細胞培養ヨーロッパ保存機関(ECCC)からの細胞を、5% CO_2 空气中、加湿雰囲気下、37で、5%のFCS、ペニシリン、ストレプトマイシンを補足したグラスゴー変法イーグル培地(GMEM)中で保持した。細胞を、2ないし3日毎に供給又は二次培養した。細胞分裂誘発分析のために、細胞を、完全培地にて、2,000細胞/ウェルの濃度で、24時間プレート化した。血清を含有する培地を除去し、無血清培地で2回洗浄した後、 $100\ \mu\text{l}$ の、0.1%のFCSを含有するGMEMあるいはGMEMのみで、置換した。ホジティブコントロールとしてGGFとFCS又はbFGFとを、 $10\ \mu\text{M}$ のBrdUとともに、添加し、48時間培養した。次に、細胞培養のシュワン細胞を、前述の方法で処理した。

【0125】

C6ラットグリオマ細胞系: 継代39から得た細胞を、10% CO_2 空气中、加湿雰囲気

10

20

30

40

50

下、37 で、5%のFCS、ウマ血清(HS)、ペニシリン、ストレプトマイシンを含有したDMEM中で保持した。細胞を、3日毎に供給又は二次培養した。細胞分裂誘発分析のために、細胞を、完全培地にて2,000細胞/ウェルの濃度でプレート化し、24時間培養した。次に、培地を、無血清培地中にて洗浄した後、DMEMと0.1%のFCSを含有するF12の1:1の混合物にて置換した。次に、GGF、FCS及びFGFに対する投与量反応を行い、細胞を、他のタイプの細胞に関して前述した方法でELISAを通じて処理した。

【0126】

PC12(Rat Adrenal Pheo-chromocytoma細胞): ECCACCからの細胞を、5%CO₂空气中、加湿雰囲気下で、37 でコラーゲン被覆フラスコ内にて、10%のFCS、ペニシリン、ストレプトマイシンを補足したRPMI1640中で維持した。細胞を、3日毎に培地の80%を置換することによって、供給した。細胞分裂誘発分析のために、細胞を、完全培地にて3,000細胞/ウェルの濃度でコラーゲン被覆プレート(50µl/ウェルコラーゲン、ヴィトロゲン・コラーゲン・コーポレーション(Vitrogen Collagen Corp.))、1:50に希釈、37 で30分間にプレート化し、24時間培養した。次に、前記培地を、新たなRPMIのみか、あるいは、1mMのインシュリンを含有したもの、あるいは、1%のFCSによって置換した。ポジティブコントロールとしてのFCS/HS(1:2)及びGGFとに対する投与量反応を前述のように行った。48時間後、細胞を固定して、ELISAを前述したように行った。

【0127】

III. 細胞分裂誘発分析の結果:

この例におけるすべての実験は、セファロース12クロマトグラフィー精製工程(例1のセクションD参照)からの、GGF-1とGGF-II(GGFs)との混合物を含有する高度に精製したサンプルを使用して行った。

【0128】

まず、BrdU組み込み分析によって得られた結果を、J. P. Brockes (Methods Enzymol. 147: 217, 1987)に記載の、分裂細胞のDNAへの[125]I-UdR組み込みに基づくシュワン細胞の古典的な細胞分裂誘発分析と比較した。

【0129】

図13は、同じ細胞培養条件(5,000細胞/ウェル5%FBP/DMEM中、GGFs又の存在下で48時間培養)で行われた二つの分析によって得られた結果を比較して示したものである。同図に明らかに示されているように、これらの結果は比較可能であるが、BrdU組み込み分析の方が、グラフにおいて曲線が左側、即ち、GGFsの低い濃度の方へシフトしていることに示されるように、僅かに感度が高い。

【0130】

「細胞分裂誘発テスト方法」と題された章に記載されているように、免疫反応性BrdU-DNAを、前記OPDペルオキシダーゼ反応の溶解生成物強度を読み取ることによって定量化した後、細胞単層を含有する元の分析プレートを、第2の反応をさせて、非溶解性DAB生成物を得ることができ、これはBrdUポジティブ細胞核を染色する。前記マイクロ培養を、次に倒立顕微鏡で調べ、細胞の形態と、BrdU-ポジティブ及びネガティブ細胞核の数を観察することができる。

【0131】

図14a及び図14bにおいて、490nmでの吸収の読み取りによって評価されたBrdU-DNAの免疫活性が、同じ培養内における、BrdU-ポジティブ細胞核の数と、ウェル当りのBrdU-ポジティブ細胞核の百分率と比較されている。標準偏差は、10%以内であった。二つの評価方法は、GGFsの最大投与量における値の間の非常に良好な相関関係と不一致とが、BrdU-ポジティブとして検出された細胞におけるDNA合成の程度の違いによって説明可能であることを示している。

【 0 1 3 2 】

従って、BrdU組み込み分析は、前記(125)I-UdR組み込み分析との比較した場合、シュワン細胞に対するポリペプチドの生物学的活性についての別の有用な情報を提供するものである。例えば、図15に報告されるデータは、GGFsがシュワン細胞に作用して、DNA合成を誘発することができるが、より少ない投与量においては、48時間後においてマイクロ培養中に存在するネガティブ細胞の数を増やすことを示している。

【 0 1 3 3 】

次に、前記分析を、起源の異なるいくつかの細胞系に使用した。図16において、GGFsに対する、シュワン細胞とSwiss線維芽細胞との細胞分裂誘発反応が比較されており、3T3線維芽細胞においては弱い反応しか得られなかったにもかかわらず、これらの培養中においていくつかのはっきりとしたBrdU-ポジティブ細胞核が検出された。コントロール培養を、FCS又はヒト組替えPDGFの複数の投与量の存在下において平行に実行したところ、これら細胞が適当な刺激に対して反応可能であることが判った(図示せず)。

10

【 0 1 3 4 】

線維芽細胞のGGFsに対する反応性を、更に、BHK 21 C13細胞系を使用して調べた。これらの腎臓から得た線維芽細胞は、接触阻止反応を示さず、あるいは、融合性状態の場合に静止状態には到らない。従って、細胞の生存力を損なわない範囲で、バックグラウンドの増殖が非常に低くなるように実験条件を調節した。GGFsは、図17及び18に示すように、BHK 21 C13細胞において非常に顕著な細胞分裂誘発活性を有する。図17は、0.1%のFCSの存在下においてGGFsによって刺激されたBHK 21 C13細胞による、BrdUのDNAへの組み込みを示している。FCSに対する良好な応答は、細胞培養条件が限定的でなかったことを示している。図18において、GGFsの細胞分裂誘発効果が、1ウェル当りに計測されたBrdU-ポジティブ及びBrdU-ネガティブ細胞の数として表されている。データは、全く同一条件で実行された2つの実験を示すものであり、少なくとも一つのウェル毎に3つのフィールドが数えられた。シュワン細胞の観察において、低投与量における増殖性効果に加えて、GGFsは、非反応性細胞の生存数も増加させる。BrdU-ポジティブ細胞の率は、前記培養に添加されたGGFsの増加量に比例する。高投与量のGGFsの存在下における48時間後の細胞の総数は、少なくとも2倍に増加し、これはGGFsがBHK 21 C13細胞におけるDNA合成と増殖とを誘発することを確証するものである。同じ条件下において、2%のFCSの存在下において48時間維持した細胞は、約6倍の増加を示した(図示せず)。

20

30

【 0 1 3 5 】

C6グリオマ細胞は、グリア細胞の特性の研究のための有用なモデルを提供した。発現した表現型は、細胞継代に依存し、細胞は、初期段階においては星状膠細胞表現型に類似し、後期段階(継代数70以降)においては乏突起膠細胞表現型に類似するようである。これらの実験において使用されたC6細胞は、継代数39から継代数52からのものであった。C6細胞はきわめて増殖性の高い個体群であるので、BrdU組み込みのバックグラウンドを非常に低くするように実験条件を最適化した。FCSに対する投与量反応に示されるように、細胞分裂誘発反応に大きく影響することなく細胞の生存力を維持するのに、0.1%の血清の存在が必要であった(図19)。

40

【 0 1 3 6 】

図20において、aFGF(酸性線維芽細胞成長因子)とGGFsとに対する細胞分裂誘発反応が、FCS(8%)の存在下において得られた最大のBrdU組み込みの百分率として表されている。値は、全く同一の条件で実行された二つの実験の平均値である。GGFの効果は、aFGFの純粋調合物の効果と等価である。C6細胞の独特の成長因子としてaFGFが既に記載されており(Lim R et al., 1:741-746, 1990)、その理由で、これはポジティブコントロールとして使用された。BrdUポジティブ及びネガティブ細胞を直接に数えることは、マイクロ培養の細胞濃度が高かった

50

めに不可能であった。これまでに報告された細胞系とは対照的に、PC12細胞は、このPC12が血清に対して反応可能な培養条件下（細胞の維持において通常に使用されるFCSとHSとの混合物）において処理された場合GGF2に対してははっきりとした反応を示さない。しかしながら、各ウェル毎のプレート化された細胞の数は、PC12細胞の挙動に影響するようである。従って、更に実験が必要である。

【0137】

例4. GGF-I及びGGF-IIペプチドを含有するタンパク質をコード化するヌクレオチド配列の分離とクローン化

GGF-IIヌクレオチド配列の分離とクローン化とを、ペプチド配列情報とライブラリースクリーニングとを使用した結果を外観し、そして以下に記載の方法によって実際に行った。尚、図4及び5のペプチドは、下記の技術に従ってGGF-I配列を分離及びクローン化する出発点として利用することができることは評価されるであろう。即ち、図21（配列認識番号54～88）は、この目的のために利用可能な縮重オリゴヌクレオチドプローブを示し、図23（配列認識番号90～119）は、利用可能なPCRプライマーをリストアップしている。DNA配列とポリペプチド配列とは、GGF-IIと同様にこの手段によって入手されるべきであり、更に、このようなDNA配列を組み込んだDNA構築体と発現ベクター、このような構築体/ベクターを組み込むことによって遺伝子的に変成された宿主細胞、また、このような宿主細胞を培養することによって得られるタンパク質も同じである。本発明は、更に、これらの物質をも含む。

【0138】

I. オリゴヌクレオチドプローブ及びプライマーの構成と分析

前記アミノ酸配列（精製GGFタンパク質からのペプチド由来のもの）をヌクレオチド配列に逆転写（back translate）することによって縮重DNAオリゴマープローブを構成した。オリゴマーは、前記DNA配列のコード化ストランド又は非コード化ストランドを表した。オリゴマー構成にセリン、アルギニン又はロイシンが含まれていた場合には、曖昧さをなくすために二つの別の合成物を作った。例えば、セリンは、537及び538又は609及び610のTCN又はAGYのいずれかによってコード化された。アルギニン又はロイシン（例えば、544, 545）について類似のコドン分割を行った。DNAオリゴマーを、0.2マイクロモルスケールでのシアンエチル化学反応を使用してBiosearch 87504-カラムDNAシンセサイザーで合成した。オリゴマーを、前記カラム（500オングストロームCpG樹脂）から切り離し、濃い水酸化アンモニウム中において55～60分で6～24時間保護解除（de-protected）した。これら保護解除オリゴマーを真空下で乾燥させ（Speedvac）、7Mの尿素を含有する、15%アクリルアミド（20モノ：1ビス）50mM Tris-ホウ酸-EDTAバッファのゲル中での電気泳動によって精製した。UVシャドウイング（shadowing）によって、前記ゲル中に全長オリゴマーが検出され、次に、前記バンドを摘出し、DNAオリゴマーを4～16時間のシェイクングによって、1.5ml 5M H₂Oに溶出した。この溶出液を乾燥し、0.1ml H₂O中に再溶解し、光吸収測定を260nmで行った。

【0139】

濃度は次の式に基づいて測定した。

$$(A_{260} \times \text{単位} / \text{ml}) (60.6 / \text{長さ}) = x \quad \mu\text{M}$$

【0140】

すべてのオリゴマーを、H₂Oの添加によって、50μMの濃度に調節した。

【0141】

上記構成の縮重プローブが、図21、配列認識番号54～88に示されている。

【0142】

下記の変更を加えたうえでプローブに対して使用したものと実質的に同じ手順によってPCRプライマーを作った。13のヌクレオチド含有制限サイトのリンカーが、ベクターへのクローン化用の前記縮重オリゴマーの5'末端に含まれていた。DNA合成を、1, 0

00 オングストローム CpG 樹脂を使用した 1 マイクロモルスケールで行い、すべての 4 つのヌクレオチドが縮重プローブに正常に取り込まれた位置においてはイノシンを使用した。PCR プライマーの精製には、前記ゲル電気泳動精製後にエタノール沈澱することを含んでいた。

【0143】

II. ライブラリー構築及びスクリーニング

ウシゲノム DNA ライブラリーを、Stragagene (カタログ番号: 945701) から購入した。このライブラリーは、ベクターラムダダッシュ II にクローン化された、 2×10^6 の 15 ~ 20 kb Sau3AI 部分ウシ DNA 2 フラグメントを含有していた。ウシの全脳 cDNA ライブラリーを、Clonetech (Catalogue Number: BL10139) から購入した。全脳と、ウシ下垂体と、ウシ後部下垂体とから、調製した mRNA から相補性 DNA ライブラリーを構成した (In Vitro gen; Stragene)。Vitrogen は 2 つの cDNA ライブラリーからなる: 一つのライブラリーは、ベクターラムダ g10 であり、他方はベクター-pcDNA I である (プラシミドライブラリー)。前記 Stratagen ライブラリーは、ベクターラムダユニザップ (unizap) よりなる。全体として、前記 cDNA ライブラリーは、1,400 万の一次組替えファージを含有していた。

【0144】

前記ウシゲノムライブラリーを、各プレートにつき、150,000 ないし 200,000 のファージブレイクで、E. coli K12 ホスト株 LE392 で 23×23 cm のプレート (Nunc) にプレート化した。各プレートは、約一つのウシゲノム等価物を表した。37 °C での一晩の培養後、前記プレートを冷却して、マニアティス (Maniatiss) 他 (1:60-81) の手法に従って、複製フィルターを作った。4 つのプレートリフトを、各プレートから非荷電ナイロン膜に作った (Pall Biodyne A 又は MSI Nitropure)。前記 DNA を、紫外線下で 5 分間のクロスリンクングによって、又は、80 °C の真空下において 2 時間のベーキングで、前記膜上に固定した。DNA プローブを、製造会社の指示に従って、ガンマ³²P ATP (New England Nuclear; 6500 Ci/mmol) とともに T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (New England Biolabs) を使用して標識化した。簡単に説明すると、50 pmol の縮重 DNA オリゴマーを、37 °C で 30 分間、600 µCi ガンマ³²P-ATP と 5 単位の T4 ポリヌクレオチドキナーゼの存在下において培養した。反応を終結させ、ゲル電気泳動負荷バッファを添加し、次に、放射能標識化プローブを、電気泳動によって精製した。

【0145】

³²P 標識化プローブを、ゲルスライスから抽出し、水に溶出した。別の方法として、DNA プローブを、ショウォルター (Schowalter) 及びソマー (Sommer), Anal. Biochem 177:90-94 (1989) の実験記録に従って、³²P-dATP 又は ³²P-dCTP を組み込むことにより、PCR 増幅で標識化した。PCR 反応において標識化したプローブを、セファードックス G-150 カラムでの脱塩によって精製した。

【0146】

プレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーションを、GMC バッファ (0.52 M NaPi, 7% SDS, 1% BSA, 1.5 mM EDTA, 0.1 N NaCl 10 mg/ml tRNA) 中に行った。洗浄は、オリゴウォッシュ (160 ml 1 M Na₂HPO₄, 200 ml 20% SDS, 8.0 ml 0.5 M EDTA, 100 ml 5 M NaCl, 3632 ml H₂O)。通常は、10 のウシゲノム等価物の複写コピーを表す 20 のフィルター (それぞれ 400 平方センチ) を、100 pmol の縮重オリゴヌクレオチドプローブ (128 - 512 倍の縮重) とともに 200 ml のハイブリダイゼーション溶液中において培養した。ハイブリダイゼーションは、前記縮重プローブに対し算出された最低融解温度以下の 5 °C で、一晩、進行させるようにした。尚、最

10

20

30

40

50

低融解温度の計算においては、A Tペアに対して2、G Cペアに対して4と仮定した。

【0147】

フィルターを、そのハイブリダイゼーション温度において、オリゴウォッシュを繰り返し交換して、4ないし5時間にわたり洗浄し、最後に、DNAプローブの長さに依存した温度において30分間、3.2 Mテトラメチルアンモニウムクロライド、1% SDSで2度洗浄した。20mersの場合、最終洗浄温度は60であった。フィルターを取り付け、次に、強化スクリーン(デュボン社、Cronex Lightning Plus)を使用してX線フィルム(コダック社XAR5)に露光した。通常は、-80において3ないし5日間の露光で、これらのライブラリースクリーン中の複製信号を検出するのに十分であった。その結果の分析後、フィルターを取り外して、再プローブすることができた。フィルターの取り外しは、10 mMのEDTA pH 8を含有する1% SDSの溶液中で、フルパワー状態のマイクロウェーブオーブンで15分間のサイクルを2回行って培養することによって行われた。フィルターは、最低3ないし4回のサイクルを通じて取られ、様々なプローブで再プローブした。

10

【0148】

III. 組替えファージの分離、成長及びDNA調製

これらの手法は、組替えDNA(マニアティス(Maniatis)他2:60-2:81)に記載の標準実験記録に基づいて行われた。

【0149】

IV. DNA消化とサザンブロットとを使用した分離クローンの分析

組替えファージDNAサンプル(2マイクログラム)を、制限エンドヌクレアーゼ製造会社(New England Biolabs)によって推奨された条件に従って消化した。37に於ける4時間の培養後、反応生成物を、0.1 M酢酸ナトリウムと3倍量のエタノールとの存在下において沈澱させた。沈澱DNAを、遠心分離によって採取し、75%のエタノールですすぎ、乾燥させた。すべての再懸濁サンプルを、アガロースゲル(通常、TAEバッファにおいて1% 0.04 M Trisアセテート、0.002 M EDTA)にかけた。ゲルのランは、1センチメートル当たり1ボルトで4ないし20時間行った。マーカーには、ラムダHind III DNAフラグメント及び/又はX174 Hae III DNAフラグメント(New England Biolabs)が含まれていた。前記ゲルを、0.5マイクログラム/mlの臭化エチジウムによって染色し、撮影した。サザンブロットイングのために、DNAを、先ず0.125 N HClでの処理によって、前記ゲル中にて脱プリンし、0.5 N NaOHで変成し、そして20 x SSC(3 M 塩化ナトリウム、0.03 M クエン酸塩ナトリウム)で非荷電ナイロン膜に移した。ブロットイングを、6時間から24時間かけて行い、次に、フィルターを、0.5 Tris HCl pH 7.5, 0.15 M塩化ナトリウム中で中和し、次に、50 mMのTris-ホウ酸 EDTA中で簡単にすすいだ。

20

30

【0150】

架橋するために、前記フィルターを、先ず、透明プラスチックラップに包み、次に、DNA側を紫外線に5分間露光した。ハイブリダイゼーションと洗浄を、ライブラリースクリーニングに関して説明したように行った(この実施例の第2節参照)。類似の遺伝子が他の種に存在するか否かを調べるためのハイブリダイゼーション分析において、僅かな変更を行った。前記DNAフィルターは、Clonetech(Catalogue Number 7753-1)から購入したもので、各レーン当たり様々な種に関しての5マイクログラムのEcoRI消化DNAを含有している。前記プローブを、前記セクション2に記載の方法で、PCR増幅反応によって標識化し、ハイブリダイゼーションを、硫酸デキストランを10%を含有する80%バッファB(2gのポリビニルピロリジン、2gのFicoII-400、2gのウシ血清アルブミン、50ml 1 M Tris-HCl(pH 7.5) 58g NaCl, 1gピロリン酸ナトリウム、10gのドデシル硫酸ナトリウム、950mlの水)中で行った。前記プローブを、10分間の沸騰で変成させ、次に

40

50

、氷水中にて急冷させた。このプローブを、ミリリットル当り 10^6 d p m³² P で前記ハイブリダイゼーションバッファに添加し、60 で一晚培養した。前記フィルターを60にて、先ずバッファB中で、次に2XSSC、0.1%SDSで、その後、1XSSC、0.1%SDSで洗浄した。ストリンジエンシーを高くするために、実験、最終洗浄は、0.1XSSC、1%SDSで、温度を65 に上げて行った。

【0151】

前記ゲノムクローンの制限マップを作り、どのサブフラグメントが前記GGFプローブ(サブクロニングの候補)にハイブリダイゼーションしたかを示すためにサザンプロットを使用した。

【0152】

V. DNA相同体のセグメントのハイブリダイゼーションプローブへのサブクロニング
DNA消化物(例えば、5マイクログラム)を、1%のアガロースゲルに投入し、次に、適当なフラグメントを染色後、ゲルから摘出した。前記DNAを、ガラスビーズへの吸着によって精製し、その後、製造会社(Bio 101)によって記載された実験記録を使用して溶出した。回収したDNAフラグメント(00~200ng)を、T4リガーゼ(New England Biolabs)を使用して、例えば、pUC18の派生物であるpT3T7(Ambion)等のリニア化された脱リン酸化ベクター中に結合した。このベクターは、E. coli ラクタマーゼ遺伝子を有しているので、形質転換物質を、アンピシリンを含むプレート上で選別することが可能である。前記ベクターは、更に、宿主細胞へ - グラクトシダーゼ相補性を与えるので、非-組替え(ブルー)を、イソプロピルチオガラクトシドとブルオーグ(Bluog)他(Bethesda Research Labs)とを使用して検出することができる。前記結合(ligation)反応物の一部を、使用して、E. coli K12 XL1ブル競合細胞(Stratagene Catalogue Number 200236)を形質転換し、次に、これらの形質転換物質をアンピシリン1ml当り50マイクログラムを含有するLBプレート上にて選別した。ホワイトコロニーを選別し、プラスミドミニプレップをDNA消化及びDNA配列分析のために調製した。選別したクローンを、それらの挿入DNAが前記GGFプローブとハイブリダイズしたか否かを確認するために再テストした。

【0153】

VI. DNA配列決定
2重ストランドプラスミドDNAテンプレートを、標準実験記録に従って、5mlの培養から調製した。製造業者の実験記録に従い、シーケナーゼ2.0とジデオキシヌクレオチド配列キット(US Biochemical)とを使用したジデオキシチエン終結法によって、配列決定を行った(サンガー(Sanger)他PNAS; USA 74: 5463(1977)の変形)。あるいは、配列決定を、サイクルシーケンシングキット(New England Biolabs; Bethesda Research Laboratories)を使用したサーマルサイクラー(Perkin Elmer, model 4800)中において行い、5'-末端標識化プライマーを使用した製造業者の指示に従って行った。配列プライマーは、前記配列決定キットで供給されたものか、あるいは、前記クローンから決められた配列によって合成されたものであった。配列決定用反応物を、6%ポリアクリルアミドの0.4mm厚さ配列決定用ゲル上に負荷(load)し、溶解した。ゲルを乾燥し、X線フィルムに露光した。通常、標準配列決定キットが使用された時は³⁵Sが組み込まれ、³²P末端標識化プライマーをサイクルシーケンシング配列決定反応に使用した。配列は、ゲルの底部から頂部の方向(5'より3'の方向に向かって)にDNA配列エディタに読み込まれ、データを、ジェネティクス・コンピューター・グループ(Genetics Computer Group)(GCG, ウィスコンシン大学)によって供給されているプログラムを使用して解析した。

【0154】

VII. RNAの調製とPCRの増幅
ゲノムDNA中に検出され、GGFペプチドをコード化する配列を含む転写読み取り枠を

10

20

30

40

50

、下垂体RNAのPCR増幅によって拡張した。RNAは、グアニジン中性 - CsCl手法（チャグウィン（Chirgwin）他Biochemistry 18:5294（1979））に従って冷凍ウシ繊維組織（Pel-freeze）から調製した。ポリアデニル化RNAは、オリゴ-dTセルロースカラムクロマトグラフィによって選別した（Aviv and Leder PNAS (USA) 69:1408（1972））。

【0155】

特定のDNA目標配列を、全RNA、もしくは、Perkin Elmer PCR/RNAキットNo. N8-8-0017を使用してcDNAから変換しておいたポリアデニル化RNAサンプルから始めて増幅した。第1ストランド逆転写反応は、1μgのテンプレートRNA及び、制限酵素認識サイトリンカーを結合したオリゴdTのプライマー、又は、制限サイトを結合したクローン化配列から決められた特定のアンチセンスプライマーのいずれかを使用した。第2ストランドを作るために、前記プライマーは、3' RACE反応（フローマン（Frohman）他PNAS (USA) 85:8998（1988））において使用されるプラスストランド特徴配列か、あるいは、第2目標サイトが、予め、dATPを備えた第1ストランド反応生成物の後の終端トランスフェラーゼによって添加された場合（例えば、5'のレース反応、フローマン（Frohman）他ibid）には制限サイトを取り付けたオリゴdTプライマーのいずれかであった。あるいは、固定されたPCR反応物と同様に、前記第2ストランドプライマーは分解物であって、従って特定のペプチド配列を示すものであった。

【0156】

増幅プロフィールは、次の一般的な手法に従った。

1) 95 で5分間の浸漬ファイル；2) 95 、1分間の熱サイクルファイル、1分間で45 、50 又は55 のアニーリング温度にまで下げ、このアニーリング温度を1分間維持；1分間以上で72 にまで温度を上げる；72 で伸長するか、あるいは、1分10秒で自動伸長、3) 72 での5分間の伸長サイクル、及び4) 4 で不定時間の浸漬ファイル。熱サイクルファイル（#2）は、通常、30サイクルだけ実行した。各100μlの増幅反応の16μlサンプルを3時間、1センチメートル当たり4ボルトの条件で、TAEバッファ中において2% Nusieve、1%アガロースゲルでの電気泳動実行によって分析した。これらゲルを染色し、次に、前記プライマーの内部の標識化DNAプローブでプローブした非荷電ナイロン膜にプロットした。

【0157】

このプロットング実験において、特定のセットのDNA増幅生成物を同定することができた。そして、その位置を、精製と再増幅のためのガイドとして使用した。適当な場合、選別されたサンプルの残りの部分を、調製ゲルに負荷し、次に、電気泳動を行い、前記ゲルから0.5mm厚さの4ないし5のスライス（特定生成物の予想位置をブラケット化する）を取り出した。前記アガロースを粉碎し、次に、40 で2~16時間、0.5mlの電気泳動バッファ中に浸漬した。粉碎したアガロースを2分間遠心分離し、水相を新しい試験管に移した。

【0158】

最初の反応と同じセットのプライマーと反応プロフィールとを使用し、5μl（生成物の約1%）の溶出物質に対して再増幅を行った。再増幅反応が完了したとき、サンプルを、クロロフォルムで抽出し、新しい試験管に移した。リンカー中に存在する制限サイトで切り離すために、濃縮制限酵素バッファと酵素とを、反応物に添加した。消化PCR生成物を、ゲル電気泳動によって精製し、次に、前述のサブクローン化の章に記載のようにベクターにサブクローン化した。DNA配列決定は、前述のように行った。

【0159】

VII. DNA配列分析

フラグメントアセンブリプログラムを使用してDNA配列をアSEMBルし、アミノ酸配列を、GCGプログラムGel Assemble, Map and Translateによって推定した。これらの推定タンパク質配列を、質問配列（query seque

n c e)として使用して、ワード・サーチ (Word Search) を使用してタンパク質配列データベースを検索した。分析は、VMS 5 . 1 で作動するVAXステーション 3 1 0 0 ワークステーションにて行った。前記データベース検索は、GCGバージョン 7 . 0 を使用した Swiss Prot release No . 2 1 にて行った。

【 0 1 6 0 】

I X . G G F - I 及び G G F - I I をコード化する遺伝子のクローン化と配列決定の結果前述のように、ウシ G G F - I I をコード化する DNA 配列を同定するために、分解オリゴヌクレオチドプローブを、G G F - I I ペプチド配列から構成した。リシルエンドペプチダーゼによって消化された、精製 G G F - I I 調合物のペプチドである G G F - I I 1 2 (配列認識番号 4 4) (図 1 1 及び 1 2 参照) は、精製 G G F - I 調製物から調製されたトリプシンペプチドである G G F - I 0 7 (配列認識番号 3 9) と強いアミノ酸配列相同性を示した。従って、10 個の縮重オリゴヌクレオチドプローブを作るために G G F - 1 1 1 2 を使用した (図 2 1 の配列認識番号 6 9 , 7 0 , 7 1 , 7 9 としてそれぞれ示されているオリゴ 6 0 9 , 6 1 0 , 6 4 9 ~ 6 5 6 参照)。フィルターの複製セットを、G G F - I I 1 2 の二つのオーバーラップする部分をコード化する 2 セットのプローブ (セット 1 = 6 0 9 , セット 2 = 6 4 9 ~ 5 6 5 6) でプローブした。ハイブリダイゼーション 信号が観察されたが、両方のプローブセットに ハイブリダイズ したクローンは一つだけであった。このクローン (G G F 2 B G 1 として指定) を精製した。

【 0 1 6 1 】

前記ファージクローン G G F 2 B G 1 からの DNA の サザンブロット 分析によって、両方のプローブセットが前記ウシ DNA 配列と ハイブリダイズ したことが確認されるとともに、更に、両方のプローブが、該クローン中において、同じセットの DNA フラグメントと反応していることが判った。これらの実験に基づき、元のクローンの 4 k b Eco R I サブ - フラグメントが同定され、サブクローン化され、部分的に配列決定された。図 2 2 は、前記ヌクレオチド配列認識番号 8 9 とプローブ 6 0 9 及び 6 5 0 のハイブリダイゼーションサイトを含む初期 DNA 配列解読の推定アミノ酸配列を示し、更に、このウシゲノム DNA の部分がペプチド 1 2 (K A S L A D S G E Y M) をコード化したことを立証している。

【 0 1 6 2 】

更に配列分析をしたところ、前記 G G F - I I 1 2 が、ウシ G G F - I I 遺伝子と c D N A とを表すオーバーラップ配列の分離の開始点になった 6 6 アミノ酸転写読み取り枠 (下記参照) に位置することが判った。

【 0 1 6 3 】

いくつかの P C R 手法を使用して、推定ウシ G G F - I I 遺伝子の、更に別のコード化配列を得た。全部の RNA 及びオリゴ d T - 選択 (ポリ A 含有) RNA サンプルを、ウシの全下垂体、前方下垂体、後方下垂体、及び視床下部から調製した。図 2 3、配列認識番号 1 0 9 ~ 1 1 9 に示すリストからのプライマーを使用して、片側 (one - sided) P C R 反応によって、3 ' と 5 ' との両方の方向において c D N A 末端を増幅し、固定 P C R 反応を、別の G G F - I I ペプチドを表す縮重オリゴヌクレオチドプライマーにて行った。図 2 4 は、これらの実験において得られた隣接する DNA 構造体と、配列とをまとめて示している。3 ' レース (R A C E) 反応から、三つの交互にスプライスされた c D N A 配列が生成され、これらをクローン化し配列決定した。5 ' レース反応によって、少なくとも 5 2 のアミノ酸のコード化配列を含む別のエクソンが発見された。この推定アミノ酸配列の分析によって、ペプチド G G F - I I - 6 と、G G F - I - 1 8 に類似した配列とが明らかになった (下記参照)。固定化 P C R 反応によって、3 0 0 b p の別の c D N A セグメント中に含有されるペプチド G G F - I I - 1 , 2 , 3 及び 1 0 の (c D N A) コード化配列が同定された。このセグメントの 5 ' 境界 (即ち、図 3 1 のセグメント E) は、ペプチド G G F - I I - 1 をコード化するとともに、前記 P C R 反応において使用されたオリゴヌクレオチドによって規定されている (例 6 のヒトクローンに関して記載されているように別の 5 ' 配列データが存在する)。従って、このクローンは、既存の全部

で9つの新規なGGF-IIペプチド配列の内の6つをコード化するヌクレオチド配列を有する。

【0164】

前記クローン化遺伝子は、先ず、前記コード化配列を、それらが見出された状態(図25参照)において位置決めすることを可能にするGCF2BG1の物理的地図を構成することによって特徴付けられる。上述のコード化配列からのDNAプローブを使用して、このファージクローンにおいて前記エクソンを含有する更に別のDNAフラグメントを同定するとともに、両方の方向においてオーバーラップするクローンを同定した。前記推定ウシGGF-II遺伝子は、少なくとも5つのコード化セグメントに分割される。コード化セグメントは、ユニバーサルな遺伝子コードを使用してポリペプチド配列に翻訳可能な、個々の長さのDNA配列であると定義される。図31に示し、本出願において言及されるこれらのコード化セグメントは以下の通りである。1)GGF遺伝子内に存在する特定のエクソン(例えば、コード化セグメントa)、あるいは、2)各セットが図示の遺伝子生成物と同様に特定のポリペプチドセグメントに翻訳可能な場合において、mRNAsの特定のサブグループ中に現れる2つ又はそれ以上のエクソンのセットから派生するもの。クレームにおいて言及されているポリペプチドセグメントは、前記相同DNAコード化セグメントの翻訳生成物である。これまで、コード化セグメントA及びBのみが、エクソンとして定義され、配列決定されマップ化された。図26は、同定された隣接コード化配列をまとめて示している。エクソンは、その発見の順序(アルファベット順)でリストされている。そのイントロン/エクソン境界から、エクソンBを、コード化セグメントEとコード化セグメントAとを接続するcDNAsに含めることが出来ることが明らかである。即ち、エクソンBは、その読み取り枠を損なうことなく、スプライスすることは出来ない。従って、我々は、三つのスプライシングパターンが、推定ウシGGF-II cDNA配列1, 2及び3を生成することが出来ると示唆する。それぞれ、GGF2BPP1.CDS、GGF2BPP2.CDS及びGGF2BPP3.CDSとされるこれらのコード化配列は、図28A(配列認識番号133)、28B(配列認識番号134)及び28C(配列認識番号135)にそれぞれ示されている。これら三つのcDNAの推定アミノ酸配列も、図28A(配列認識番号133)、28B(配列認識番号134)及び28C(配列認識番号135)にそれぞれ示されている。

【0165】

これら三つの推定構造体は、アミノ酸長さが206, 281, 257であるタンパク質をコード化する。推定されたタンパク質配列の最初の183残基は3つの遺伝子生成物において同一である。位置184において、前記クローンは大幅に異なっている。GGF2BPP1におけるグリシンGGT用に対するコドンは、又、GGF2BPP2とGGF2BPP3に対するスプライスドナーとしても作用し、これらは、それぞれ交互に、エクソンC, C/D, C/D'及びD又はC, C/D及びDに加わるものであり、図33において、配列認識番号149として示されている。GGFII BPP1は、前記コード化セグメントAスプライス接合部を越えて次の介在配列(イントロン)への読み取りによって生成される裁頭遺伝子生成物である。これは、図31におけるコード化セグメントA'を示す(配列認識番号140)。前記転写体は、標準型AATAAポリアデニール化配列の隣で終端し、我々は、この裁頭遺伝子生成物が、真性成熟転写体を表すものであると提案する。他の二つのより長い遺伝子生成物は、同じ3'非翻訳配列とポリアデニリン化配列を共有する。

【0166】

これらの三つの分子は、すべて、9つの新規なGGF-IIペプチド配列の内の6つを有し(図12参照)、もう一つのペプチドがGGF-I-18に対してきわめて高い相同性を有している(図27参照)。この発見は、この組替え分子が、ウシGGF-IIの少なくとも一部分をコード化している可能性がきわめて高いことを示している。更に、三つのペプチドの計算上の等電点は、GGF-IとIIの物理的特性と一致している。GGF-IIの分子の大きさはおよそ60kDであるので、これら三つのcDNAの最も長いもの

10

20

30

40

50

が、予想数のアミノ酸の1/2近くをコード化しているはずである。

【0167】

B及びAエクソンを含むプローブを、PCR増幅によって標識化し、ウシ後部下垂体から分離されたRNAから作られたcDNAライブラリーのスクリーニングに使用した。一つのクローン(GGF2BPP5)は、図30に示すパターンを示し、コード化セグメントAとCとの間にもう一つのDNAコード化セグメント(G)を有していた。核酸配列の全体が図32に示されている(配列認識番号148)。最長転写読み取り枠からの予想翻訳生成物は、241のアミノ酸である。第2のcDNAの一部(GGF2BPP4)も、上述のプローブを使用してウシ後部下垂体ライブラリーから分離された。このクローンは、図30に示すパターンを示した。このクローンは、5'の部分において不完全であるが、コード化セグメントG及びDを欠いているという意味においてこれはスプライシング変異体である。BPP4も、領域C/D以降において領域H、K及びLを備えた新規な3'末端を示す。BPP4の配列は、図34に示されている(配列認識番号150)。

10

【0168】

例5

様々な種に於けるGGF配列

データベース検索によっては、予想GGF翻訳生成物と公知のタンパク質配列との間になんら有義な類似性は見つからなかった。これは、GGF-IIが、タンパク質の新規なファミリー又はスーパーファミリーの最初のメンバであることを示唆している。これまでに我々が示した、他のほ乳類DNAとの高ストリンジェンシーのクロスハイブリダイゼーション研究(DNAプロットング実験)においては、はっきりと、このウシ組替え分子からのDNAプローブによって、テストされた様々なサンプルにおいて特定の配列が容易に検出される。相同性の高い配列は、ヒトゲノムDNAにも検出された。そのオートラジオグラムを図29に示す。ラットとヒトのDNAを含むレーンの信号は、GGF遺伝子のラット及びヒト同等物を表し、この遺伝子によってコード化された複数のcDNAの配列が、最近、ホルムズ(Holmes)他(Science 256:1205(1992))とウェン(Wen)他(Cell 69:559(1992))とによって報告されている。

20

【0169】

例6

ヒト配列コード化ヒトGGF2の分離

ウシGGFIIコード化セグメントEをからの配列を含む複数のヒトクローンを、脳幹から調製されたヒトcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって分離した(Stratagene catalog #935206)。このストラテジーを、大半のGGF2ペプチド(GGF2に特有)と、前記ウシEセグメントを含むクローンからの予想ペプチド配列との間の強い関連性に基づき、追求した。このライブラリーは、次にリストするオリゴヌクレオチドプローブ914-919を使用した前述の例4、第11章で記載したものと同様にスクリーニングした。

30

【0170】

914 TCGGGCTCCATGAAGAAGATGTA
 915 TCCATGAAGAAGATGTACCTGCT
 916 ATGTACCTGCTGTCCCTCCTTGA
 917 TTGAAGAAGGACTCGCTGCTCA
 918 AAAGCCGGGGGCTTGAAGAA
 919 ATGARGTGTGGGCGGCGAAA

40

【0171】

これらのプローブで検出されたクローンを、ハイブリダイゼーションによって更に分析した。セグメントAからのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)生成物を標識化することによって生成された、コード化セグメントAからのプローブ(図21参照)は、一次ライブラリーをスクリーニングするのにも利用した。A及びE由来のプローブとハイブリダイズした

50

複数のクローンを選別し、一つの特定のクローン、GGF2HBS5、を選別して更に分析した。このクローンは、コード化セグメントのパターン（図31に示すEBACC/D'D）によって表されている。このクローン中のEセグメントは、図37に示されるEの裁頭化ウシ・バージョンのヒト等価物である。GGF2HBS5は、前述のすべての「推定」GGF-II候補の中で最も可能性の高い候補である。コード化配列セグメントEの長さは、786のヌクレオチドと264の非翻訳配列のベースとである。GGF2HBS5によってコード化されるタンパク質の予想サイズは、約423アミノ酸であり（約45キロダルトン、図45、配列認識番号170参照）、これはデグリコシル化状態のGGF-II（例16参照）のサイズに類似している。更に、図27にリストしたGGF-IIペプチドのうちの7つは、領域Eから予想されるタンパク質配列内に属する同等配列を有している。ペプチドII-6とII-12は例外であって、それぞれコード化セグメントB及びコード化セグメントAに属する。GGF2HBS5タンパク質をコード化するRNAを、GGF2HBS5挿入部を有するベクター（Blue script SK [Stratagene Inc.] 図44参照）にあるバクテリオファージT7プロモーターによってドライブされた生体外転写システム中において生成した。このRNAは、無細胞（ラビット網状赤血球）翻訳システムに翻訳され、そのタンパク質生成物のサイズは45kdであった。

10

【0172】

更に、前記無細胞生成物を、シュワン細胞細胞分裂誘発分析において分離し、生物学的活性を確認した。調整培地によって処理されたシュワン細胞は、¹²⁵I-ウリジンの組み込みによって測定した増殖度の増加と、185キロダイン領域のタンパク質のチロシンの燐酸化との両方を示した。従って、GGF2HBS5によってコード化された生成物のサイズと、図12に示したウシペプチドに対する相同性の高いヒトペプチドをコード化するDNA配列の存在とは、GGF2HBS5が、ウシGGF2のヒト等価物をコード化することを裏付けるものである。このクローンと形質変換した細胞から作られた調整培地が、シュワン細胞細胞分裂誘発活性を顕在化させるという事実から、GGFIIHBS5遺伝子生成物（前記BPP5遺伝子生成物とは違って）が分泌されるということが確かめられた。更に、GGFIIIBPP5遺伝子生成物は、p185^{erbB2}等のレセプターチロシンキナーゼや、あるいは、密接に関連したレセプター（図14参照）を介してシュワン細胞増殖反応を仲介すると考えられる。

20

30

【0173】

例7

ほ乳類及び昆虫細胞におけるヒト組替えGGF2の発現

ヒトGGF2をコード化する前記GGF2HBS5 cDNA（例6において記載され、ここでHBS5と称される）を、ベクターpcDL-SR 296にクローン化し（Takebe (Takebe) 他 Mol. Cell. Biol. 8: 466-472 (1988)、COS-7細胞を、DEAE-デクストラ法（サムブルック (Sambrook) 他 Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. CSH Laboratory NY (1989)）によって、100mmディッシュにおいて移入させた。細胞溶解物又は一過的発現COS細胞からの調整培地を、移入の3又は4日後に収穫した。溶解物を調製するために、細胞単層を、PBSによって洗浄し、150µlの0.25M Tris-HCl, pH 8中での三回の冷凍/解凍サイクルによって溶解したディッシュから掻き取った。細胞堆積物をペレットで取り、上澄を回収した。調整培地サンプル（7ml）を収集し、次に、濃縮し、製造業者（アミコン (Amicon)、マサチューセッツ州、ビヴァリー）によって記載されたようにCentriprep-10とCentricon-10ユニットを使用して、10mM Tris, pH 7.4とバッファ交換した。前述したように（例3参照）、ラットの神経シュワン細胞のDNA合成先駆体の組み込みを分析した。調整培地又は細胞溶解物サンプルを、例3において記載した方法で、シュワン細胞増殖分析においてテストした。その細胞分裂誘発活性データは、図46に示されている。GGF2をコード化する、cDNA、GGF2H

40

50

BS5は、タンパク質生成物の分泌を前記培地に振り向けた。全活性の極く一部分が、細胞分解物を使用した分析によって、細胞内に検出可能であった。GGF2HFB1とGGFBPP5 cDNAでは、生成物の分泌を細胞外培地に振り向けることが出来なかった。これらのクローンからのGGF活性物質は、細胞分解物においてのみ検出可能であった(図46)。

【0174】

組替えGGF2も、CHO細胞に発現された。GGF2をコード化するGGF2HBS5 cDNAを、ベクター-pcdhfrpolyAのEcoRIサイトにクローン化し(図54)、磷酸カルシウム共沈法(Graham and Van Der Eb, *Virology* 52:456-467(1973))によってDHF RネガティブCHO細胞に移入した。クローンを、96-ウェルプレート中のヌクレオチド及び無ヌクレオチド培地(Gibco)内で選別した。3週間後、個々のクローンの調整培地を、例3で記載したシュワン細胞増殖分析によって、GGF発現のためにスクリーニングした。前記培地へかなり高いレベルのGGF活性物質を分泌した安定したクローンが同定された。CHO細胞調整培地の異なった分量の部分標本から得られたシュワン細胞増殖活性データを使用して、図47に示す投与量反応曲線を得た(Graham and Van Der Eb, *Virology* 52:456, 1973)。この物質を、GGF2特定ペプチドに対して生成したポリクローナル抗血清によってプローブしたウェスタンブロッティングにて分析した。約69~90kd(下垂体及び高分子量グリコフォームから抽出されたGGF2の予想サイズ)の広い範囲のバンドが特異的に標識化されている(図49, レーン12)。

10

20

【0175】

組替えGGF2は、バキュロウイルス発現を使用して昆虫細胞にも発現した。Sf昆虫細胞を、GGF2HBS5 cDNAクローンを含有するバキュロウイルスに、3~5の多重度(10^6 細胞/ml)で感染させ、そしてSf900-II培地(Gibco)中で培養した。シュワン細胞細胞分裂誘発活性物質を、前記細胞外に培地中に分泌させた(図48)。異なった分量の昆虫細胞調整培地を、フォルスコリン不存在の状態、シュワン細胞増殖分析でテストし、そのデータを使用して図48に示す投与量反応曲線を得た。

【0176】

この物質は、更に、前述のGGF II特異性抗体でプローブしたウェスタンブロッティング(図47)でも分析した。45kdのバンド、デグリコシル化GGF-II(例16)のサイズが示されている。

30

【0177】

この例で使用された方法は、次の通りである。

【0178】

組替えヒト及びウシ・グリア成長因子のシュワン細胞細胞分裂誘発活性を以下のように測定した。培養シュワン細胞の細胞分裂誘発反応を、短命ほ乳類発現実験から得た粗組替えGGF生成物を使用して、5・1のフォルスコリンの存在下において測定した。[125 I]-ウリジンの組み込みを、前述の方法に記載の移入した、あるいは疑似移入したCOS細胞から得た物質に対して18~24時間さらした後に行った。4セットのデータの平均及び標準偏差が図示されている。部分的に精製された天然ウシ下垂体GGF(カルボキシルメチルセルロースフラクション:グッドアール(Good earl)他、提出)に対する細胞分裂誘発反応が、100パーセントの活性の標準として図示(GGF)されている。

40

【0179】

cDNA(図53)を、pCDL-SR疫Q96にクローン化し(タケベ(Takebe)他, *Mol. Cell Biol.* 8:466~472(1988))、COS-7細胞を、DEAE-デキストラン法(サムブルック(Sambrook)他, *In Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd. ed.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989))によって100mmディッシュ

50

中で移入した。細胞溶解物又は調整培地を転写の3又は4日後に収穫した。溶解物を調製するために、細胞単層をPBSによって洗浄し、ディッシュから掻き取り、150 μ lの0.25M Tris-HCl, pH8中での3回の冷凍/解凍サイクルによって溶解した。細胞堆積物をペレットとし、上澄を回収した。調整培地サンプル(7ml)を採取し、次に、濃縮し、製造業者(アミコン(Amicon), マサチューセッツ州, ビヴァリー)によって記載されたようにCentiprep-10とCentricon-10ユニットを使用して、10mM Tris, pH7.4とバッファ交換した。前述したように(デイヴィス(Davis)およびストローバント(Stroobant), J. Cell Biol. 110:1353-1360(1990); ブロックス(Brockes)他, Brain Res. 165:105~118(1979))、ラットの座骨神経シュワン細胞はDNA合成先駆体の組み込みについて分析した。

10

【0180】

組替えCHO細胞調整培地のウェスタンブロッティングは、以下のように行った。一つのCHOクローンを、7mlのMCDB302無タンパク質培地中で3日間、培養した。2mlの調整培地を濃縮し、10mMのTris-HCl pH7.4に対してバッファ交換し、凍結乾燥させた。そのペレットをSDS-PAGEサンプルバッファ中で再懸濁し、還元性SDSゲル電気泳動にかけ、GGFペプチド抗体でのウェスタンブロッティングによって分析した。CHOコントロールを、非移入CHO-DG44ホストからの調整培地を使用して行い、CHO HBS5レベルを、組替えクローンからの調整培地を使用して分析した。

20

【0181】

例8

ウシGGFに関連する他のヒト配列の分離

例5及び6の結果は、ヒトのソースからのGGF関連配列が、ウシGGF配列由来のDNAプローブを使用することによっても容易に分離可能であることを示している。これに代えて、ホルムズ(Holmes)他(Science 256:1205(1992))によって記載された方法も利用可能である。この例において、前記p185^{erbB2}レセプターに結合し、これを活性化する(そしてGGFに関係する)ヒトタンパク質(ヘレグリン β)が、腫瘍細胞系から精製され、派生したペプチド配列を使用して、cDNAコード化ヘレグリンをクローン化するのに使用されたオリゴヌクレオチドプローブを生成する。p185^{erbB2}レセプター活性の生化学的分析は、シュワン細胞の増幅とは異なる。これは、下垂体cDNAからGGF配列をクローン化するために例1~4において使用した方法に類似している。ヘレグリンタンパク質と相補性DNAとは、次の手法に従って腫瘍細胞系から分離した。

30

【0182】

ヘレグリンは、Per cell Biolytica マイクロキャリアビーズ(Hyclone Labs)上で成長したMDA-MB-231乳ガン細胞(ATCC #HTB26)によって調整した培地から精製した。前記培地(10リットル)は、膜(10-kDカットオフ)(Millipore)によるフィルター処理によって~25倍に濃縮し、遠心分離処理と、フィルター(0.22 μ m)を通す濾過処理とによって清浄化した。濾過物を、ヘパリンセファロースカラム(Pharmacia)にかけ、そのタンパク質を、磷酸-緩衝食塩水中にて0.3、0.6及び0.9MのNaClステップで溶出した。種々のクロマトグラフィック・フラクション中の活性を、MCF-7乳ガン細胞(ATCC #HTB22)中におけるp185^{erbB2}のチロシン磷酸化の増加を定量化することによって測定した。MCF-7細胞を、血清(10%)を含有した(ウェル当り10⁵の細胞)、F12(50%)のダルベッコの最小必須培地(50%)中にて24-ウェルCostarプレートにプレート化し、少なくとも24時間付着させた。分析の前に、細胞を、少なくとも1時間、血清を含まない培地中に移した。カラムフラクション(10ないし100 μ l)を、37 $^{\circ}$ Cで30分間、培養した。次に上澄を吸引して、SPD-PAGEサンプルバッファ(100 μ l)を添加することによって反応を終わらせた。サンプル

40

50

を100で5分間加熱し、一部分(10ないし15 μ l)を、tris-グリシンゲル(4ないし20%)(Novex)にかけた。電気泳動後、タンパク質を、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜上にエレクトロブロッティングし、次に、ツイーン(Tween)-20を含有する(0.05%)tris-緩衝食塩水(TBST)中にてウシ血清アルブミン(5%)でブロックした。プロットを、ホスホチロシン(Upstate Biotechnology)に対するモノクローナル抗体(1:1000希釈)で、室温で最低1時間、プローブした。プロットをTBSTで洗浄し、室温で最低30分間、アルカリフォスファターゼと結合したマウスの免疫グロブリンGに対する抗体(Promega)(1:7500に希釈)でプローブした。反応性バンドは、5-プロモ-4-クロロ-3-インドイル-1-フォスフェートとニトロ-ブルーテトラゾリウムによって可視化した。免疫プロットを、Scan Jet Plus(ヒューレットパーカード)濃度計によって走査した。非刺激MCF-7細胞の信号強度は、20ないし30ユニットであった。完全に刺激したp185^{erbB2}は、180ないし200ユニットであった。活性のほとんどを有する0.6M NaClプールを、エタノール(30%)を含有する17mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)中で平衡されたポリアスパルテン酸(PolyLC)カラムに適用した。前記平衡バッファ中で、0.3から0.6M NaClまでのリニアグラジエント使用して、結合タンパク質を溶出した。活性のピーク(0.45M NaClに於ける)を、TFA(0.1%)とアセトニトリル(15%)とを含有するバッファで平衡させたC4逆相カラム(SynChroPack RP-4)にて更にフラクション化した。このカラムから、25から40%のアセトニトリル・グラジエント範囲にて、60分間にわたり、タンパク質が溶出した。フラクション(1ml)を採取し、その活性を分析し、tris-グリシンゲル(4~20%, Novex)上でSDS-PAGEによって分析した。HPLC-精製したHRG- を、SDS(0.1%)、10mMジチオトレイトール、0.1M NH₄HCO₃(pH8.0)中で、リシンCにて、37で20時間に渡って消化させ、その結果得られたフラメントを、Synchrom C4カラム(4000, 0.2 by 10 cm)上で溶解させた。このカラムを、0.1%のTFA中で平衡させ、次いで0.1%TFA中で1-プロパノール使用グラジエントで溶出した(ダブリュ・ジェイ・ヘンゼル(W. J. Henzel), ジェイ・ティ・スタルツ(J. T. Stults), シー・スー(C. Hsu), ディ・ダブリュ・アシュワド(D. W. Aswad), J. Biol. Chem. 264, 15905 (1989))。クロマトグラフ・ランのピークを真空下において乾燥し、配列決定した。これらのペプチドの一つ(~24%1-プロパノールで溶出)の配列は、[A]AEKEKTF[C]VNGGEXFMVKDLXNP(配列認識番号162)であった。括弧内の残基は、不確定であり、Xは、アミノ酸の同定が不可能であったサイクルを示している。最初の収量は、8.5 pmolであり、その配列はいずれの公知のタンパク質にも対応していなかった。残基1, 9, 15及び22は、後に、cDNA配列中においてシステインとして同定された。これまで過負荷され(over-loaded)、そしてPVDFにプロットされたゲルから得られた~45 kDバンドの直接的配列決定は、初期収量が極めて低い(0.2 pmol)、低量(low abundance)の配列、XEXKE[G][R]GK[G]K[G]KKKEXGXG[K](配列認識番号163)を示した。これは、ヘレグリン-(図31)のアミノ酸残基2ないし22に対応し、セリン2がproHRG-のNH₂末端であることを示唆している。NH₂末端はブロックされているが、時として少量の自然にブロックされたタンパク質は、翻訳後に変成されないこともあることが観察された。前記NH₂末端指定は、臭化シアンとの消化後のタンパク質のマススペクトル分析によって確かめられた。前記分離タンパク質のCOOH-末端は、はっきりとは同定されていなかったが、タンパク質分解消化物の混合配列決定によって、成熟した配列は、残基241を越えて拡張しないようである。アミノ酸残基の略称は以下の通りである。A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; そしてY, Tyr。

10

20

30

40

50

【0183】

cDNAクローンの源として、オリゴ(dT) - 開始 gt10 (ティ・ヴィ・ハイン(T. V. Huynn), アール・エイ・ヤング(R. A. Young), アール・ダブリュ・デイヴィス(R. W. Davis), gt10及びgt11 DNAクローン化技術: A Practical Approach, D. Glover, Ed. (IRC Press, Oxford, (1984)) cDNAライブラリーを、MDA-MB-231細胞からの、mRNA精製(ジェイ・エム・クルウィン(J. M. Chirwin), エイ・イー・プルズピラ(A. E. Przbyla), アール・ジェイ・マクドランド(R. J. MacDoland), ダブリュ・ジェイ・ラッター(W. J. Rutter), Biochemistry 18, 5294 (1979))によって構成した(ユー・ガブラー(U. Gubler)およびビー・ジェイ・ホフマン(B. J. Hoffman), Gene 25, 263 (1983))。13-アミノ酸配列AEKEKTF CVNGGE(配列識別番号164)(13)をコード化する下記の8重の縮重アンチセンスデオキシオリゴヌクレオチドを、ヒトコドン周波数最適値(frequency optima)(アール・ラテ(R. Lathe), J. Mol. Biol. 183, 1 (1985))のベースに構成し、化学的に合成した。即ち、5'-CTCGCC(G OR T)CC(A OR G)TTAC(A OR G)CAGAAGGTCTTCTCCTTCTCAGC-3'(配列識別番号165)。プローブ構成の目的のため、システインを前記アミノ酸配列中の未知の残基に指定した。このプローブを燐酸化により標識化し、低-ストリンジェンシー条件下におけるcDNAライブラリーへのハイブリダイズした。前記

proHRG-タンパク質を、このライブラリー中において同定した。HRB-B1 cDNAは、proHRG-の5'と3'との両方の末端からの配列とともに、MDA-MB-231細胞mRNAから作られた第2オリゴ(dT) - 開始 gt10ライブラリーのプローブ化によって同定された。クローン13(図2A)は、プライム化(5'-CCTCGCTCCTTCTTCTTGCCCTTC-3'プライマー(配列識別番号166); proHRG-アンチセンスヌクレオチド33ないし56)MDA-MB-231 gt10ライブラリーを5'HRG-配列によってスクリーニングすることによって得られた生成物であった。前記プローブとしてのクローン13の5'末端に対応する配列を使用してMDA-MB-231細胞mRNAからの第3のオリゴ(dT) - 開始 gt10ライブラリー中におけるproHRG 2とproHRG 3とを

同定した。4つのHRGのそれぞれをコード化する二つのcDNAクローンを配列決定した(エフ・サンガー(F. Sanger), エス・ミルケン(S. Milken), エイ・アール・カルソン(A. R. Coulson), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463 (1977))。別のcDNA指定クローン84は、アミノ酸数420を通じてproHRG 2と同一のアミノ酸配列を有している。位置421の終止コドンの後には、異なった3'-非翻訳配列が続く。

【0184】

例9

別のスプライシング変異体の分離

例6の方法によって、スプライシング変異の結果として4つの密接に関連した配列(ヘレグリン, 1, 2, 3)が作り出された。ペレス(Peles)他(Cell 69, 205 (1992))及びウェン(Wenn)他(Cell 69, 559 (1992))は、p185^{erbB}に結合するタンパク質に関する例1~4及び6に記載の方法に類似の精製方法とクローン化方法を使用して別のスプライシング変異体を分離した(ラットから)。cDNAクローンは次のようにして得られた(形質転換ラット線維芽細胞系からのp185^{erbB2}結合タンパク質の精製と配列決定による)。

【0185】

p185^{erbB}結合タンパク質は、以下のようにして調整培地から精製された。500のローボトル(全部で120リットル)の3回の収穫からのプールされた調整培地を、0.2µmフィルターによる濾過によって浄化し、20kd分子径カットオフの膜によるPe

10

20

30

40

50

licon 限外濾過システムによって31倍に濃縮した。すべての精製工程は、Pharmacacia fast タンパク質液体クロマトグラフィシステムを使用して行われた。前記濃縮物を、直接、ヘパリン-セファローズ(150ml, 燐酸緩衝食塩水(PBS))によって予め平衡化しておいたものに負荷した。カラムを、280nmの波長において全く吸収が検出されなくなるまで、0.2M NaClを含有のPBSで洗浄した。結合タンパク質を、次に、NaCl(250ml)の連続グラジエント(0.2Mから1.0M)で溶出し、5mlのフラクションを採取した。サンプル(前記採取フラクションの0.01ml)を使用して、キナーゼ刺激活性の定量分析を行った。三つのカラム・ラン(全容量=360ml)からの活性フラクションを、プールし、YM10限外濾過膜(アミコン(Amicon), マサチューセッツ州, ダンヴァース)を使用して25mlに濃縮し、1.7Mの濃度となるように硫酸アンモニウムを添加した。遠心分離処理(10,000xg, 15分間)による浄化後、プールされた物質をフェニール・スペローズカラム(HR10/10, Pharmacacia)上に負荷した。前記カラムを、0.1MのNa₂PO₄(pH7.4)中で(NH₄)₂SO₄の45mlグラジエント(1.7Mから無塩状態まで)で展開し、2mlのフラクションを採取してそのキナーゼ刺激を分析(一サンプルにつき0.002ml)した(例6に記載のように)。活性の主なピークをプールし、50mMの燐酸ナトリウムバッファ(pH7.3)に対して透析した。一つのモノ-S陽イオン交換カラム(HR5/5, Pharmacacia)を、50mMの燐酸ナトリウムで予め平衡させた。活性物質(タンパク質の0.884mg; 35ml)の負荷後、前記カラムを、開始バッファで洗浄し、次に、NaClのグラジエントで1ml/分の速度で展開した。キナーゼ刺激活性は、0.45~0.55M塩で回復され、それぞれ2mlずつの4つのフラクションに渡っていた。

【0186】

これらをプールし、Cu⁺²キレート化カラムに直接負荷した(1.6ml, HR2/5キレート化スペローズ, Pharmacacia)。大半のタンパク質は樹脂に吸着されたが、これらは徐々に塩化アンモニウムの30mlのリニアグラジエント(0~1M)によって溶出した。前記活性物質は、0.05ないし0.2M NH₄Clの範囲の一つのタンパク質ピークで溶出した。様々な精製工程から得られたサンプルを、ゲル電気泳動によって分離し、ICN(カリフォルニア州, コスタ・メサ)のキットを使用した銀染色後、それらのタンパク質内容を、Bio-Red(カリフォルニア州, リッチモンド)のキットを使用したコマースブルー染色結合分析によって調べた。

【0187】

前記p44タンパク質(10µg)を、0.1Mアンモニウム重炭酸塩バッファ(pH7.8)200µl中で再構築した。L-1-トシル-アミド2-フェニールエチルクロロメチルケトン処理トリプシン(Serva)による消化を、1:10の酵素対基質比で、37で18時間かけて行った。その結果得られたペプチド混合物を、Vydac C4マイクロカラム(2.1mm i.d. x 15cm, 300)と、ダイオードアレイ検出器とワークステーションとを備えたHP1090液体クロマトグラフィシステムとを使用し、215nmでモニタしつつ、逆相HPLCで分離した。前記カラムを、0.1%トリフルオロ酢酸(移動相A)で平衡させ、0%から55%の移動相B(0.1%のトリフルオロ酢酸中に90%のアセトニトリル)のリニアグラジエントで70分間にわたり溶出を行った。その流量は0.2ml/分で、カラム温度は、25に制御された。前記HPLCシステムから手作業によって採取されたペプチドのピークの1/3部分は、Edman分解によるN-末端配列分析によって特徴付けられた。27.7分後(T27.7)に溶出されたフラクションは、混合アミノ酸配列を有し、還元後、つぎのようにして更に、再クロマトグラフされた。前記ペプチドフラクションの70%の部分を真空中で乾燥し、100µlの0.2M重炭酸塩アンモニウムバッファ(pH7.8)中で再構築した。前記溶液にDTT(最終濃度2mM)を添加し、これを次に37で30分間培養した。次に還元したペプチド混合物を、Vydacカラム(2.1mm i.d. x 15cm)を使用して逆相HPLCによって分離した。溶出条件と流量は、前述したものと同一であった

10

20

30

40

50

。前記ペプチドのアミノ酸配列の分析を、オンライン・フェニルチオヒダントイン (PTH) アミノ酸分析器を備えたモデル 477 タンパク質シーケンサ (アプライド・バイオシステムズ・インコーポレイテッド (Applied Biosystems, Inc.) , カリフォルニア州, フォスター・シティ) と、モデル 900 データ分析システム (フンカピラー (Hunkapiller) 他 (1986) In Methods of Protein Microcharacterization, J. e. Shively, ed. (ニュージャージー州, クリフトン: Humana Press p. 223 - 247)) によって行った。前記タンパク質を、ポリブレンと NaCl とでプレサイクルしたトリフルオロ酢酸 - 処理ガラスファイバーディスクに負荷した。PTH - アミノ酸分析を、デュアルシュリンジポンプと逆相 (C - 18) 小口径カラムを使用したマイクロ液体クロマトグラフィシステム (モデル 120) で行った (アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) , 2.1mm x 250mm)。

10

【0188】

RNA を、標準手順 (マニアティス (Maniatis) 他, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, New York (1982)) によってラット 1 - E J 細胞から分離し、ポリ (A) + を rRNA 分離キット (クロンテック・ラボ・インコーポレイテッド, カリフォルニア州, パロ・アルト) を使用して選別した。cDNA を Superscript キット (ビー・アール・エル・ライフ・テクノロジーズ・インコーポレイテッド (BRL Life Technologies, Inc.) , メリーランド州, ベテスダ) で合成した。カラム - 細分化 - 二重ストランド cDNA を Sal I 及び Not I - 消化 pJT - 2 プラスミドベクター、pCD - X ベクターの派生物に結合し (オカヤマ (Okayama) およびベルク (Berg) , Mol. Cell Biol. 3: 280 (1983))、電気泳動によって DH10B E. coli 細胞に形質転換した (ダウアー (Dower) 他, Nucl. Acids Res. 16: 6127 (1988))。約 5×10^5 の一次形質転換物が、N - 末端の NDF (残基 5 ~ 24) と T40.4 トリプシンペプチド (残基 7 - 12) のタンパク質配列から由来の二つのオリゴヌクレオチドプローブによってスクリーニングされた。これらのそれぞれの配列は以下の通りである (N はすべての 4 nt 示す) :

20

(1) 5' -ATA GGG AAG GGC GGG GGA AGG GTC NCC CTC NGC
A T
AGG GCC GGG CTT GCC TCT GGA GCC TCT- 3'

30

(2) 5' -TTT ACA CAT ATA TTC NCC- 3
C G G C

(1 : 配列認識番号 167 ; 2 : 配列認識番号 168)

【0189】

前記合成オリゴヌクレオチドを、T4ヌクレオチドキナーゼにより、[- ^{32}P] ATP によって末端標識化し、これらを使用してニトロセルロースフィルターの複製セットをスクリーニングした。そのハイブリダイゼーション溶液は、6 x SSC, 50 mM の燐酸ナトリウム (pH 6.8) と、0.1% のピロ燐酸ナトリウム、2 x デンハルト溶液、50 μ g/ml 鮭精子 DNA と、20% のフォルムアミドを含有 (プローブ 1 について) 又はフォルムアミド 0% (プローブ 2 について) を含んでいた。フィルターを、50 で 0.5 x SSC, 0.2% ASA, 2 mM EDTA によって (プローブ 1 について)、又は 37 で 2 x SSC, 0.2% SDS, 2 mM EDTA によって (プローブ 2 について)、洗浄した。これらフィルターのオートラジオグラフィは、両方のプローブとハイブリダイズした 10 のクローンを示した。これらのクローンを、前述のような再プレート化とプローブハイブリダイゼーションによって精製した。アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 373A 自動 DNA シーケンサと Applied Biosystems Taq Dye Doxy (登録商標) ターミネータサイクル配

40

50

列決定キットとを、該製造業者の指示に従って使用して、前記 cDNA クローンの配列決定をした。いくつかの場合においては、配列は、[³⁵S] dATP (Amersham) 及び U.S. Biochemicas の Sequenase (登録商標) キットを使用することによって得られた。cDNA クローン 44 の両方のストランドは、合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして使用することによって配列決定された。ほぼ 5' 350 nt の配列が、7 つの独立した cDNA クローンにおいて決定された。その結果得られたクローンは、図 30 示すパターンを示した (NDF)。

【0190】

例 10

他の可能なスプライシング変異体の検出戦略

ウシの cDNA クローンと PCR 生成物の推定アミノ酸配列、及び公表されているヒト (図 31) とラット配列との整合性は、高いレベルの類似性を示して、これはこれらの配列が三つの種の中の相同遺伝子由来のものであることを示している。cDNA / PCR 生成物レベルにおいて検出可能なメッセンジャー RNA 転写体の数が変化するのは、恐らく、広範囲な組織 - 特異スプライシングに依るものと思われる。得られた、そして図 30 に示すパターンは、その他のスプライシング変異体が存在することを示唆している。可能なスプライシング変異体のリストが図 37 に示されている。これらの変異体の多くは、様々な組織から由来の cDNA ライブラリーのコード化セグメント特異なプローブ化と、特定のコード化セグメントに特異的なプライマー対を使用した PCR 実験とによって得ることが出来る。あるいはこれに代えて、これら変異体は、当業者の公知の切断及びスプライス技術により、特異な cDNA クローン、PCR 生成物又はゲノム DNA 領域から組み立てることも可能である。例えば、共通のコード化セグメント (例えば、A) 中の稀な制限酵素切断サイトを使用して、GGF2BPP5 の FBA アミノ末端を、GGF2BPP1、GGFBPP2、GGFP3、又は GGFPP4 のカルボキシ末端配列に接続することができる。コード化セグメント E 及び / 又は G の存在又は不在が、目的とし、又既述の用途のために有利である場合には、これらのコード化セグメントを、発現構築体に含ませることができる。これらの変異体配列は、組替えシステム中に発現させることができ、その組替え生成物を分析して、そのシュワン細胞細胞分裂誘発活性のレベルと、その p185^{erbB} レセプターに結合しこれを活性化する能力とを測定することができる。

【0191】

例 11

GGF の機能要素の同定

GGF 配列のファミリの推定構造は、その最長の形状 (GGF2BPP4 によって表される) が、細胞外部分が上皮細胞成長因子に類似するドメインを含む場合に、経膜タンパク質をコード化することを示している Carpenter and Wahl in Peptide Growth Factors and Their Receptors I pp. 69 - 133, Springer-Verlag, NY 1991 参照)。コード化セグメント C 及び C/D 又は C/D' ペプチド配列におけるシスチン残基の位置は、上皮細胞成長因子 (EGF) ペプチド配列に於ける相同残基に対して保存されている (図 35、配列識別番号 151 - 153 参照)。これは、前記細胞外ドメインが、レセプター認識及び生物学的活性サイトとして機能することを示唆している。変異体形状の内のいくつかは、H、K 及び L コード化セグメントを欠如しており、従って、分泌、拡散可能生物学的活性タンパク質として発現可能である。EGF 状ドメイン (EGFL) を含むポリペプチドをコード化する GGF DNA 配列は、グリア細胞細胞分裂誘発活性を刺激するための十分な生物学的活性を有している可能性がある。

【0192】

このタンパク質の膜結合バージョンは、胚形成中又は、神経再生中 (ニューロンの表面が増殖シュワン細胞の表面に密接に関連している場合) にニューロンの表面に発現された場合、シュワン細胞の増殖を誘発する可能性がある。

【0193】

10

20

30

40

50

分泌（非膜結合）GGFは、シュワン細胞とその分泌位置からいくらか離れた位置において作用することが可能な分類上拡散可能な因子として作用する可能性がある。他の形態も、細胞の損傷や細胞の破壊を通じた源から細胞内から放出される可能性がある。分泌GGFの一例は、GGF2HBS5によってコード化されるタンパク質であり（例6参照）、これは細胞の外部に向けられることが判った唯一のGGFである（例7）。分泌は、恐らく、GGF2HBS5によってコード化される組替えGGF-II中に含まれるN-末端ドメインであって、領域Eにおいてのみ見られるN-末端疎水性配列によって仲介される。

【0194】

他のGGFは、分泌されるものではないように思える（例6参照）。これらのGGFは、組織の損傷の結果として放出される損傷反応形態であるのかもしれない。

10

【0195】

GGF-II（GGF2HBS5によってコード化される）の予想タンパク質構造の他の領域と、領域B及びAを含む他のタンパク質とは、ヒト基底膜ヘパラン硫酸プロテオグリカン核タンパク質（ref.）に対する類似性を示す。これらのGGFにおけるC2免疫グロブリンフォールドの第2システインの隣に位置するペプチドADSGEYは、基底薄膜タンパク質に見られる22のC-2反復の内の9つに発生する。この証拠は、これらのタンパク質が、ニューロンやグリア等に関連するマトリックスタンパク質に関連していることを強く示唆するものであり、その目標サイトとしてのグリア成長因子の隔離の方法を示唆している可能性がある。

20

【0196】

例12

組替え細胞からのGGFの精製

その生物学的活性を分析するべく完全長GGFあるいはGGFの部分を得るために、タンパク質を、クローン化DNAを使用して過剰生産することができる。いくつかの方法が使用可能である。前述の配列を有する組替えE.coli細胞を構築することができる。pNH8aやpHH16a（ストラトジェン・インコーポレイテッド（Stratagene, Inc.））等の発現システムをその製造業者の指示に従ってこの目的のために使用することができる。あるいはこの代わりに、これらの配列を、ほ乳類発現ベクターに挿入して、過剰生産細胞系を構築することができる。例えば、この目的のために、GGFをコード化するDNA、クローンGGF2BPP5を、COS細胞と、チャイニーズハムスタの卵巣細胞との両方に発現させた（例7参照）（J. Biol. Chem. 263, 3521~3527 (1981)）。このGGF DNAを有するベクターを、公知の手法を使用して宿主細胞に移入することができる。

30

【0197】

一過的発現を調べるか、もしくは、G418耐性クローンを、メトトレキサートの存在下において成育させることにより、dhfr遺伝子（pMSXNDベクター上に含まれる）を増幅し、その過程において、隣接のGGFタンパク質コード化配列を共増幅する細胞を選別することができる。全く血清やタンパク質を含まない培地（ハミルトン（Hamilton）およびハム（Ham）, In Vitro 13, 537~547 (1977)）中に、CHO細胞維持することができるので、所望のタンパク質は、その培地から精製することが可能である。例9において作られた抗血清を使用したウェスタン分析を使用して、前記過剰生産細胞の調整培地中における所望のタンパク質の存在を検出することができる。

40

【0198】

所望のタンパク質（rGGF-II）を、次のようにして、COS細胞を一過的に発現させることによって調整した培地から精製した。rGGF-IIを、調整培地から収穫し、陽イオン交換クロマトグラフィ（POROS-HS）を使用して部分精製した。前記カラムを、33.3mM MES pH6.0で平衡化した。調整培地を、10ml/分の流量で負荷した。シュワン細胞増殖活性と免疫反応性（ポリクローナル抗血清を上述のように

50

G G F I I ペプチドに対して使用した)とを有するピークを、50 mM Tris, 1 M NaCl pH 8.0 で溶出した(それぞれ、図 50 A 及び 50 B)。

【0199】

r G G F - I I も、安定したチャイニーズハムスタの卵巣細胞系を使用して発現される。収穫された調整培地からの r G G F - I I を、陽イオン交換クロマトグラフィ (P O R O S - H S) を使用して部分精製した。前記カラムを、P B S pH 7.4 によって平衡化した。調整培地を、10 ml / 分で負荷した。シュワン細胞増幅活性と免疫反応性 (G G F - I I ポリクローナル抗血清を使用) とを有するピークを、50 mM Hepes, 500 mM NaCl pH 8.0 で抽出した。増殖性と免疫反応性の両方を備えた別のピークが、50 mM Hepes, 1 M NaCl pH 8.0 で観察された。

10

【0200】

r G G F - I I は、高分解能工程として疎水性反応クロマトグラフィ (陽イオン交換 / リザーブフェーズクロマトグラフィ (必要な場合には第 2 高分解能工程として)、陰イオン交換クロマトグラフィのようなウィルス不活性化工程及び D N A 除去工程、を使用することによって更に精製することができる。

【0201】

使用した手法の詳細な記述は以下の通りである。

【0202】

前記陽イオン交換カラムから抽出した組替え G G F - I I ピークのシュワン細胞増幅活性は、以下のようにして測定した。培養シュワン細胞の細胞分裂誘発反応を、50 mM Tris 1 M NaCl pH 8.0 によって抽出したピークを使用して 5 M フォルスコリンの存在下において測定した。前記ピークは、20 μ l, 10 μ l (1 : 10) 10 μ l 及び (1 : 100) 10 μ l で添加した。¹²⁵I - ウリジンの組み込みを測定し、18 ~ 24 時間の露光後に (C P M) として表現した。

20

【0203】

G G F - I I のペプチドに対して発育させたポリクローナル抗体を使用した免疫プロットを、次のようにして行った。10 μ l の異なったフラクションを、4 - 12 % のグラジエントゲルでランさせた。これらのゲルを、ニトロセルロース紙に移し、このニトロセルロースプロットを 5 % の B S A でブロックし、G G F - I I - 特異抗体 (1 : 250 希釈) でプローブした。¹²⁵I タンパク質 A (1 : 500 希釈、特異的活性 = 9.0 / C i / g) を、二次抗体として使用した。前記免疫プロットを、コダック社 X 線フィルムに 6 時間露光した。1 M NaCl で溶出したピークフラクションは、65 ~ 90 K d において、G G F - I I と高分子量グリコフォームの予想サイズ範囲である、広い免疫反応性バンドを示した。

30

【0204】

陽イオン交換カラムでの G G F - I I 精製は以下のように行った。r G G F I I を発現する C H O 細胞調整培地を、10 ml / 分で前記陽イオン交換カラムに負荷した。このカラムを、P B S pH 7.4 で平衡化した。溶出は、それぞれ、50 mM Hepes 500 mM NaCl pH 8.0 と 50 mM Hepes 1 M NaCl pH 8.0 とで行った。すべてのフラクションを、ここに記載のシュワン細胞増殖分析 (C P M) を使用して分析した。タンパク質濃度 (m g / m l) は、B S A を標準として使用した B r a d f o r d 分析によって測定した。

40

【0205】

10 μ l の各フラクションを使用したウェスタンプロットを行った。図 51 A 及び 51 B に示すように、免疫反応性とシュワン細胞活性とは相互移動する。

【0206】

前述のシュワン細胞細胞分裂誘発分析を使用して、完全長クローン又はその全ての物学的活性部分からの発現生成物の分析を行った。完全長クローン G G F 2 B P P 5 が、C O S 細胞に一過的に発現された。移入された C O S 細胞の細胞内抽出物は、例 1 に記載したシュワン細胞増殖分析により分析した時に生物学的活性を示す。更に、G G F 2 H B S 5 を

50

発現する完全長に近いものが、CHOと昆虫(例7)細胞とに一過的に発現された。この場合、細胞抽出物と調整培地との両方が、例1に記載したシュワン細胞増殖分析において生物学的活性を示す。当業者によって、GGF(ヘレグリンを含む)からのスプライシング変異体相補性DNAのファミリーのすべてのメンバを、このようにして発現させ、シュワン細胞増殖分析において分析することができる。

【0207】

あるいは、組替え物質を、COS-7細胞においてスプライシング変異体Neu分化因子(NDF)を発現させたウェン(Wen)他(Cell 69, 559(1992))に従って、他の変異体から分離することができる。pJT-2真核生物プラスミドベクターに挿入したcDNAクローンは、SV40初期プロモーターのコントロール下にあり、SV40終結及びポリアデニール化信号に3'で挟まれている。COS-7細胞は、以下のようにして、電気ポレーションによって、pJT-2プラスミドDNAで移入された。即ち、 6×10^6 の細胞を(0.8mlのDMEMと10%のFBSにおいて)、0.4cmのキュベットに移し、10 μ LのTE溶液中(10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA)にて20 μ gのプラスミドDNAと混合した。エレクトロポレーションは、パルスコントローラユニットを200オームに設定したBio-Rad Pulsar装置を使用して、室温で、1600V、24 μ Fで行った。次に、細胞を、20mlのDMEM, 10%FBS中に希釈し、T75フラスコ(Falcon)中に移した。37°Cにおける14時間の培養後、培地を、DMEM, 1%FBSと置換し、培養を更に48時間継続した。細胞から収穫した組替えタンパク質を含む調整培地は、このタンパク質のレセプターを発現する細胞系において生物学的活性を示した。この細胞系(ヒト乳ガン細胞ラインAU565)を、組替え物質で処理した。処理された細胞は、erbB2レセプターの活性化に特徴的な形態変化を示した。このタイプの調整培地も、シュワン細胞増殖分析においてテストすることが出来る。

【0208】

例13

p185レセプターに結合する他のタンパク質の精製と分析

I. gp30とp70との精製

ここに参考文献として添付するルプ(Lupu)他(Science 249, 1552(1992))及びリップマン(Lippman)およびルプ(Lupu)(特許出願番号PCT/US91/03443(1990))は、以下のようにして、ヒト乳ガン細胞ラインMDA-MB-231の調整培地からタンパク質を精製した。

【0209】

調製培地採取を、周知の方法を使用して行った。培地を、Amicon限外濾過フィルターセル(YM5膜)(Amicon, Danvers, MA)中にて100倍に濃縮した。浄化し濃縮した後、培地を、-20°Cで保存し、一方、連続採取を以後数日の間に行った。濃縮培地を、4°Cで2日間に渡り、100容量の0.1Mの酢酸に対して、Spectra/Por3チュービング(スペクトラム・メディカル・インダストリーズ(Spectrum Medical Industries), カリフォルニア州, ロス・アンジェルス)を使用して透析した。透析中に沈澱した物質を、4°Cで30分間、4000rpmでの遠心分離処理によって除去し、プロテアーゼインヒビターを添加した。次に、浄化したサンプルを凍結乾燥した。

【0210】

凍結乾燥した調整培地を、全タンパク質が約25mg/mlの最終濃度となるように、1Mの酢酸中に、溶解させた。不溶性物質は、10,000rpmで15分間の遠心分離処理によって除去した。次に、このサンプルをセファードックスG-100カラム(XK16, Pharmacia, Piscataway, NJ)に負荷し、平衡化し、更に、これに、4°Cで1Mの酢酸を30ml/時間の流量で上方に流すことによる溶出を行った。4mlの100倍濃縮培地から、100ngのタンパク質が処理された。3mlの溶出物を含むフラクションを、凍結乾燥させ、分析用に300 μ lのPBS中で再懸濁させ、更

なる精製のための原料として利用した。

【0211】

セファデックスG-100精製物を、逆相高圧液体クロマトグラフィ(HPLC)でランした。第1の工程には、急勾配のアセトニトリルグラジエントを使用した。急勾配アセトニトリルグラジエントと他のすべてのHPLC工程とは、C3-逆相カラムを、水中(HPLC-グレード)0で0.05%のTFA(トリフルオロ酢酸)によって平衡化した後に、室温で行った。これらのサンプルを負荷し、フラクションは、1ml/分の流量で30分間に渡って、リニアグラジエント(0.05%のTFA中で0~45%のアセトニトリル)で溶出した。280nmで吸収が観察された。1mlのフラクションを採取し、EGFレセプター競合活性の分析の前に凍結乾燥させた。

10

【0212】

第2のHPLC工程には、緩勾配アセトニトリルグラジエントを使用した。前のHPLC工程からの活性フラクションのプールを、同じカラムに関して再びクロマトグラフィ分析した。0.05%のTFA中で5分間の0-18%アセトニトリルグラジエント後に、0.05%のTFA中で30分間のリニア18~45%アセトニトリルグラジエントにて、溶出を行った。流量は1.0ml/分で、1mlのフラクションが採取された。ヒトTGF β 1状因子が、30~32%のアセトニトリル濃度で、RRAによる検出可能な一つのピークとして溶出した。

【0213】

ルプ(Lupu)他(Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 2287 (1992))は、p185^{erbB2}レセプターに結合する別のタンパク質を精製した。この特定のタンパク質、p75は、10%の胎児ウシ血清(GIBCO)を補足した改良イーグル培地(IMEM: GIBCO)中で繁殖させたSKBr-3(ヒト乳ガン細胞系)の成長に使用される調整培地から精製されたものである。タンパク質p75は、p185^{erbB2}アフィニティークラムを使用した濃縮(100倍)調整培地から精製された。p185^{erbB2}の94キロダルトン細胞外ドメイン(p75に結合)を、組替え発現によって生成し、ポリアクリルアミドヒドラジド-セファローズアフィニティークロマトグラフィマトリックスに結合させた。結合後、前記マトリックスを、氷冷した1.0M HCl中で十分に洗浄し、そのビーズを0.5M NaNO₂で活性化させた。温度は20分間、0に維持し、その後、濾過と、氷冷した0.1M HClでの洗浄を行った。500mlの濃縮調整培地を、重力によって前記ビーズに流した。カラムを洗浄し、1.0Mのクエン酸で、4.0から2.0のpH値で(erbB2とp75を分離させるため)ステップ的に溶出させた。すべてのフラクションを、Pharmacia PD10カラム上で脱塩させた。精製によって、3.0-3.5溶出pHで75kDaの均一なポリペプチドが得られた(銀染色によるSDS/PAGEでの分析によって確認)。

20

30

【0214】

II. gp30のp185^{erbB2}B2への結合

精製gp30タンパク質を、それがp185^{erbB2}に結合したか否かを調べる分析においてテストした。p185^{erbB2}に対するモノクローナル抗体を備えた競合アッセイ。gp30タンパク質は、SK-BR-3及びMDA-MB-453細胞(p185^{erbB2}レセプターを発現するヒト乳ガン細胞系)中でp185^{erbB2}に結合する抗体を置換した。gp30のシュワン細胞増殖活性は、更に、シュワン細胞培養物を、例1~3に記載の分析手法を使用して、精製gp30によって処理することによっても示すことができる。

40

【0215】

III. p75のp185^{erbB2}への結合

SKBr-3調整培地から得た75kDaのポリペプチド(p75)が実際に、SKBr-3細胞中のerbB2ガン・タンパク質のためのリガンドであるのか否かを分析するために、gp30のための前述の競合アッセイを使用した。p75が結合活性を示すことが判ったが、これに対して、他のクロマトグラフィフラクションからの物質はそのような活性を示さなかった(データは図示せず)。通過物質は、いくらかの結合活性を示した。こ

50

れは、抜け出た *erbB2* ECD の存在によるものであろう。

【0216】

IV. 他の *p185^{erbB2}* リガンド

ペレス (Peles) 他 (Cell 69, 205 (1992)) は、更に、ラット細胞 (NDF, その方法については例8参照) からの *p185^{erbB2}* 刺激リガンドをも精製した。ホルムズ (Holmes) 他 (Science 256, 1205 (1992)) は、*p185^{erbB2}* に結合し、これを刺激する、ヒト細胞からのヘレグリン を精製した (例6参照)。ここに参考として添付する、タラコフスキー (Tarakovsky) 他 Oncogene 6: 218 (1991) は、活性化マクロファージから分離された 25 kD のポリペプチドの、*p185^{erbB2}* 相同体である、Neu レセプターへの結合を示した。

10

【0217】

VI. NDF の分離

ヤードン (Yarden) およびペレス (Peles) (Biochemistry 30, 3543 (1991)) は、*p185^{erbB2}* レセプターを刺激するであろう 35 キロダルトンのグリコタンパク質を同定した。このタンパク質は、次の手法に従って調整された培地中において同定された。ラット I-EJ 細胞を、175 - cm² フラスコ (Falcon) 中で集合成長させた。単層を、PBS で洗浄し、無血清培地中にて 10 ~ 16 時間放置した。前記培地を廃棄し、新たな無血清培地によって置換し、3 日間の培養後に採取した。調整培地を、低速遠心分離によって浄化し、YM2 膜 (分子量 2000 でカットオフ) を備えた Amicon 限外濾過セル中で 100 倍に濃縮した。調整培地における neu 刺激活性の生化学的分析は、前記リガンドが、熱に対しては安定しているが還元に対しては敏感な 35 - kD グリコタンパク質であることを示している。該因子は、高い塩濃度か、酸性アルコールのいずれかによって沈澱させることができる。選択的沈澱、ヘパリン-アガロースクロマトグラフィ、及び希釈酸中でのゲル濾過によって前記分子を部分精製することにより活性リガンドが得られ、これはがん原遺伝子のレセプターを刺激することが出来るが、構造的に活性ながん遺伝子 neu タンパク質に対しては無効果であった。しかしながら、この精製されたフラクションは、EGF のための関連レセプターをも刺激する能力を保持しており、これはこれらの二つのレセプターが、双方向メカニズムを介して機能的に結合していることを示唆するものである。あるいは、前記推定リガンドは、同時に二つのレセプターと反応する。該因子の、提示された生化学的特徴を利用して、これらの可能性が探求される完全に精製された因子を達成することができる。

20

30

【0218】

他の出版物において、デイヴィス (Davis) 他 (Biochem, Biophys. Res. Commun. 179, 1536 (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 8582 (1991)) およびグリーン (Green) 他, PCT 特許出願 PCT/US91/02331 (1990) は、ヒト T-細胞 (ATL-2) 系の調整培地からのタンパク質の精製について記載している。

【0219】

ATL-2 細胞系は、IL-2 独立 HTLV-1 (+) T 細胞系である。無マイコプラズマ ATL-2 細胞を、5% の CO₂ を含む加湿雰囲気中において 37 °C で、培養培地として 10% の FCB を含有する RPMI 1640 (10% FCS - RPMI 1640) 培地中に保持した。

40

【0220】

タンパク質物質の精製のために、ATL-2 細胞を、1 x PBS で 2 回洗浄し、72 時間、無血清 RPMI 1640 培地 / 2 mM L-グルタミン中で 3 x 10⁵ ml で培養し、その後、前記細胞をペレット化した。このように生成した培養上澄を、「調整培地」(C.M.) と称する。

【0221】

C.M. を 1000 d カットオフの YM-2 Diaflo 膜 (Amicon) を通して

50

、マサチューセッツ州、ボストン)を使用して、1リットルから10mlへと濃縮した。いくつかの分析用に、1000MW以上の成分を含有する濃縮C.M.を、RPMI培地によって、もとの容量に再希釈した。ポリアクリルアミドグラジエントゲル(インテグレイテッド・セパレーション・システムズ(Integrated Separation Systems)、メリーランド州、ハイド・パーク又はフォアキャスト・システム・バイ・アマーシャム(Phorecast System by Amersham)、イリノイ州、アーリントン・ハイツ)を使用してゲル電気泳動にかけ、その後、前記1リットルの調合物からのこの2つのカラム精製物資の幾らかを銀染色したところ、少なくとも4ないし5のバンドが現れ、これらの内、10kDと20kDとのバンドがこの物質に特有のものであった。通過した、1000NW以下のC.M.含有成分は希釈せず使用した。

10

【0222】

濃縮調整培地を、.45µ ユニフロフィルター(Schleicher and Schuell, Keene, NH)でフィルター殺菌し、次に、予め10mM Tris-Cl, pH 8.1で平衡化させておいたDEAE-SW陰イオン交換カラム(ウォーターズ・インコーポレイテッド(Waters, Inc.))、マサチューセッツ州、ミルフォード)への適用によって更に精製した。ーランのHPLC当り1リットルの元のATL-2調整培地を表す濃縮C.M.タンパク質を、前記カラムに吸着させ、次に、4ml/分の流量で、0mMから40mMのNaClのリニアグラジエントで溶出した。フラクションを、10%の適当なDEAEフラクション(1カラム精製物)又は1%の適当なC18フラクション(2カラム精製物)に対する生体外免疫複合体キナーゼ分析を使用して、分析した。この生体外免疫複合体キナーゼ分析を使用して投与量-依存的にp185c-neuのチロシンキナーゼ活性を増加させた活性物質は、220ないし240mMのNaClの近辺での4ないし5のフラクション(36-40)に渡って一つの主要ピークとして溶出した。HPLC-DEAE精製後、前記活性フラクション中のタンパク質を、濃縮、プールして、更に濃縮し、その後、C18(百万マトリクス)逆相クロマトグラフィ分析した(ウォーターズ・インコーポレイテッド(Waters, Inc.))、マサチューセッツ州、ミルフォード)(C18+1工程または2カラム精製物と称する)。溶出は、0.1%のTFAに対する2-プロパノールのリニアグラジエントで行った。すべてのフラクションを、RPMI1640培地に対して透析して2-プロパノールを除去し、下記のように、前記生体外免疫複合体キナーゼ分析と、適当なフラクションの1%濃縮物を使用して分析した。p185c-neuのチロシンキナーゼ活性を増加させる活性物質は、二つのピークで抽出された。一つはフラクション11~13において溶出し、第2番目の僅かに低い活性の活性物質ピークは、フラクション20~23において溶出した。これらの二つのピークは、それぞれ、約5ないし7%のイソプロパノールと約11ないし14%のイソプロパノールとに対応している。C18#1発生フラクション11~13を、特徴付け研究に使用した。第2クロマトグラフィ工程から得られた活性フラクションをプールし、タンパク質物質サンプルに指定した。

20

30

【0223】

20リットルの調合も同じ精製戦略を使用した。前記DEAE活性フラクション35~41をプールし、前述のようにしてc18クロマトグラフィ分析にかけた。C18#1フラクション11~13と21~24との両方が、投与量-依存活性を有していた。フラクション11~13のプールを、更にC18クロマトグラフィ分析工程にかけた(C18#2又は3カラム精製物と称する)。ここでも再び、フラクション11~13と21~24とが活性を有していた。例8で記載の生体外免疫複合体キナーゼ分析において測定されたフラクション23の投与量反応は、フラクション23を容量で0.005%、フラクション23を容量で0.05%添加することによって得られる。これは達成された最も高い純度である。

40

【0224】

分子量の範囲を、ゲル濾過クロマトグラフィ分析と限外濾過膜分析とに基づいて測定した

50

。ほぼ同じ量のチロシンキナーゼ活性を、保持し、10,000分子量カットオフフィルターにより通過した。ほとんどすべての活性物質が、30,000分子量カットオフフィルターを通過した。活性物質クロマトグラフフラクションの分子量範囲を、投与量 - 依存 *neu* - 活性化活性物質を含むフラクションを、同じ実行条件を使用して発生された一組のタンパク質分子量標準 (シグマ・ケミカル・カンパニー (Sigma Chemical Co., ミズーリ州, セント・ルイス) の溶出プロフィールと比較することによって決定した。活性物質の低分子量の領域が、7,000と14,000ダルトンの間に見つかった。活性物質の第2の範囲は、約14,000から約24,000ダルトンの間であった。

【0225】

ポリアクリルアミドグラジエントゲル (インテグレイテッド・セパレーション・システムズ (Integrated Separation Systems, メリーランド州, ハイド・パーク又はフォアキャスト・システム・バイ・アマーシャム (Phorecast System by Amersham), イリノイ州, アーリントン・ハイツ) を使用した電気泳動後、3 - カラム精製物質 (c18#2) の銀染色を、市販の銀染色キット (BioRad, Rockville Centre, NY) を使用して行った。20リットルの調合物のc18#2精製から得られたフラクション21, 22, 23及び24を、マーカーとともにランさせた。フラクション22と23とが、 185^{erbB2} (*neu*) キナーゼ分析 (下記参照) において最も強力な投与量反応を示した。選択された分子量フラクションが $p185^{erbB2}$ と作用するという事実が、免疫複合体キナーゼ分析によって示された。

【0226】

ここに参考文献として添付するフアング (Huang) 他 (1992, J. Biol. Chem. 257: 11508 ~ 11512) は、ウシの腎臓から別の *neu/erbB2* リガンド成長因子を分離した。25 kD のポリペプチド因子が、カラム分別の手法によって分離され、次いで、DEAE / セルロース (DE52)、Sulfadex (硫酸エステル化されたセファードックス G - 50)、ヘパリン - セファロース 4B、そして Superdex 75 (高速タンパク質液体クロマトグラフィ) で連続カラムクロマトグラフィ分析された。前記因子、NEF - GF、は、*neu/erbB2* 遺伝子生成物のチロシン - 特異性自己燐酸化を刺激する。

【0227】

VII. $p185^{erbB2}$ B2 に結合するリガンドに対する免疫複合体分析 NDF

この分析は、ATL - 2 調整培地 (C. M.) 又はタンパク質物質を変量させながら PN - NR6 細胞溶解物の予備培養によって推進した、免疫沈降した $p185$ の自己燐酸化活性物質における相違を示すものであって、これをここで *neu* - 活性化活性物質と称する。

【0228】

免疫複合体キナーゼ分析において使用した細胞系は、ここにその全部を参考文献として添付する、コカイ (Kokai) 他, Cell 55, 287 ~ 292 (July 28, 1989) と、これもその全部を参考文献として添付する、マーク・アイ・グリーン (Mark I. Green) の名のもとに「抗 - レセプター抗体によってがん細胞を治療する方法」という名称で1989年7月27に出願された米国出願第386, 820号とに記載の方法によって、入手、調合、培養したものである。

【0229】

細胞ラインは、すべて、5%のCO₂を有する加湿雰囲気中において、培養培地として5%のFCSを含有するDMEM培地 (5% FCS - DMEM) 中に維持した。

【0230】

150 mm ディッシュ中の細胞の濃縮培養物を、冷たいPBSで2回洗浄し、10 ml の冷凍 - 解凍バッファ (150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Hepes, pH 7.2, 10% グリセロール, 1 mM EDTA, 1% アプロチニン) 中に掻き入

10

20

30

40

50

れ、遠心分離 (600 × 6, 10 分間) した。細胞ペレットを、1 ml の溶出 (Lysis) バッファ (50 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 3% Brij 35, 1 mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 1% アプロチニン, 1 mM EGTA, 20 μl M Na₃VO₄, 10% グリセロール) 中で再懸濁させ、4 で 30 分間回転させた。

【0231】

すべての化学物質は、特に明記の無い限り、シグマ・ケミカル・カンパニー (Sigma Chemical Co.)、ミズーリ州、セント・ルイスからのものであった。非溶解物質を、40,000 × g で 30 分間の遠心分離によって除去した。次に使用するクリアな上澄を、細胞溶出物と指定する。

10

【0232】

前記細胞溶出物を、50 μl の 50% (容量/容量) s プロテイン A - セファローズ (シグマ・ケミカル・カンパニー (Sigma Chemical Co.)、ミズーリ州、セント・ルイス) と、15 分間培養し、2 分間の遠心分離で、溶出物を予備浄化した。この予備浄化細胞溶出物の 50 μl 部分を、調整培地、タンパク質物質、又は特定の他の因子とともに、溶出バッファと 1 ml の最終容量で、氷上で 15 分間培養した。次に、サンプルを、p185 neu 及び p185 c - neu を認識する 5 μg の 7.16.4 モノクローナル抗体又は他の適当な抗体と共に、氷上で 20 分間培養し、その後 4 で回転させながら、50 μl の 50% (容量/容量) タンパク質 A - セファローズ で培養した。免疫複合体を、遠心分離によって収集し、500 μl の洗浄バッファ (50 mM Hepes, pH 7.5, 0.1%, Brij 35, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% アプロチニン, 30 μm Na₃VO₄) で 4 回洗浄し、更に、反応バッファ (20 mM Hepes (pH 7.4), 3 mM MnCl₂, 及び 0.1% Brij 35, 30 μm Na₃VO₄) で 2 回洗浄した。ペレットを、50 μl の反応バッファ中で再懸濁させ、(ガンマ - ³²P) - ATP (アマーシャム (Amersham)、イリノイ州、アーリントン・ハイツ) を添加して 0.2 μm の最終濃度を得た。これらのサンプルを、27 で 20 分間、又は純粋サンプルとともに 4 で 25 分間培養した。2 mM ATP と 2 mM EDTA とを含有する 3 × SDS サンプルバッファを添加することによって反応を終結させ、次に、これらを 100 で 5 分間培養した。これらのサンプルを、次に、10% のアクリルアミドゲル上で SDS - PAGE 分析にかけた。ゲルを染色、乾燥し、強化スクリーンを備えた Kodak XAR または XRP フィルムに露光した。

20

30

【0233】

VIII. 活性を有するアセチルコリンレセプター (ARIA) の精製

ARIA、即ち、アセチルコリンレセプターの合成を刺激する 42 kD のタンパク質が、Gerald Fischbach (フォールズ (Falls) 他 Cell 72: 801 - 815 (1993)) の実験室にて分離された。ARIA は、p185^{erbB2} に類似の 185 kDa 筋肉経膜タンパク質のチロシン磷酸化を誘発し、培養胚筋管内のアセチルコリンレセプター合成を刺激する。ARIA をコード化する cDNA クローンの配列分析は、ARIA が、タンパク質の GGF / erbB2 リガンドグループのメンバであることを示しており、これは、グリア細胞細胞分裂誘発を刺激や、ここに記載の例えば GGF 2 の適用に潜在的に有効である可能性を有している。

40

【0234】

例 14

シュワン細胞中の GGF によって仲介されたタンパク質チロシン磷酸化

増殖を誘発するための十分なレベルのグリア成長因子での処理の後、ラットシュワン細胞は、タンパク質チロシンの磷酸化の刺激を示す (図 36)。様々な量の部分精製 GGF を、例 3 に概述した手法に従ってラットシュワン細胞の一次培養に適用した。シュワン細胞を、ポリ D - リジン被覆した 24 のウェルプレート内の、1 mL の GGF - CM につき (1 ウェル当り 0.5 mL) DMEM / 10% ウシ胎仔血清 / 5 μM フォルスコリン / 0.5 μg 中で発育させた。集合状態において、前記細胞に、ウェル当り 0.5 mL で DME

50

M / 10% のウシ胎仔血清を供給し、培養器内に一晩放置して鎮静化させた。次の日、前記細胞に、0.2 mL の DMEM / 10% ウシ胎仔血清を供給し、培養器内で1時間放置した。次に、テストサンプルを、必要に応じて、様々な濃度と長さで、前記培地に直接添加した。次に、細胞を、沸騰している溶解バッファ（リン酸ナトリウム、5 mM、pH 6.8；SDS、2%、β-メルカプトエタノール、5%；ジチオトレイトール、0.1 M；グリセロール、10%；プロモフェノールブルー、0.4%；バナジウム酸ナトリウム、10 mM）中で溶解し、沸騰水浴中で10分間培養し、次に、直接に分析するか、あるいは、-70℃で凍結した。サンプルは、7.5% SDS-PAGEゲル上でのランによって分析し、トウビン（Towbin）他（1979）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354に記載の標準手法を使用してニトロセルロース上にエレクトロブロットした。ブロットされたニトロセルロースを、Kamps and Seilton（1988）Oncogene 2: 305-315に記載されている標準手法を使用して、抗ホスホチロシン抗体でブローブした。ブローブされたブロットを、一晩オートラジオグラフィに露光し、標準実験室手法を使用して現像した。濃度測定を、ウルトラスキャンXL強化レーザ濃度計（LKB）を使用して行った。分子量指定は、予備染色高分子量標準（Sigma）に対して行われた。タンパク質リン酸化とシュワン細胞増殖の投与量反応は非常に類似している（図36）。リン酸化バンドの分子量は、p185^{erbB2}の分子量に非常に近い。シュワン細胞を、GGF2HBS5クローンによってCOS細胞翻訳物から調整した培地によって処理した場合にも類似の結果が得られた。これらの結果は、予想されていた、GGFsとの相互作用およびp185^{erbB2}の活性化とよく相関している。

10

20

【0235】

この実験を組替えGGF-IIで繰り返した。GGF-IIクローンで安定的に形質転換したCHO細胞系（GGF2HBS5）からの調整培地は、上述の分析を使用して、タンパク質チロシンリン酸化を刺激する。疑似移入されたCHO細胞系ではこの活性を刺激することは出来なかった（図52）。

【0236】

例15

MDA-MB-231細胞系からのタンパク質因子によるシュワン細胞増殖の分析

シュワン細胞の増殖は、ヒト乳ガン細胞ラインMDA-MB-231由来の調整培地によって媒介される。分析の第1日目、 10^4 個の一次ラットシュワン細胞を、96ウェル・マイクロタイター（microtiter）プレート中に、ウェル当り5%のウシ胎仔血漿を補足した100 μ lのダルベッコ変法イーグル培地内にプレート化した。分析の第2日目、10 μ lの調整培地（例6に記載のように培養された、ヒト乳ガン細胞ラインMDA-MB-231からのもの）を、前記マイクロタイタープレートの各ウェルに添加した。第6日目、各プレート当りのシュワン細胞の数を、酸ホスファターゼ分析（コノリー（Conolly）他Anal. Biochem. 152: 136（1986）の手法に従って）によって測定した。前記プレートを、100 μ lのリン酸緩衝食塩水（PBS）と100 μ lのno反応バッファ（0.1 M 酢酸ナトリウム、（pH 5.5））と0.1%のトリトン（Triton）X-100で洗浄し、各ウェル毎に、10 mMのリン酸p-ニトロフェニルを添加した。プレートを37℃で2時間培養し、10 μ lの1N NaOHを添加することによって反応を終結させた。各サンプルの光濃度を、分光光度計で410 nmで読み取った。コントロール細胞系（HS-294T、erbB-2リガンドの非プロデュース）からの調整培地によって処理したシュワン細胞において細胞数の38%の刺激が観察された。この結果は、MDA-MB-231細胞ライン（p185^{erbB2}結合活性を刺激する）によって分泌されたタンパク質が、シュワン細胞の増殖を刺激することを示すものである。

30

40

【0237】

例16

GGFのN-グリコシル化

50

G G F - I I 候補クローン G G F 2 B P P 1 , 2 及び 3 の c D N A 配列から予測されるタンパク質配列は、多数のコンセンサス N - グリコシル化モチーフを有している。G G F I I 0 2 ペプチド配列におけるギャップは、これらのモチーフの一つにおけるアスパラギン残基に一致し、これは、このサイトにおいて恐らく炭水化物が結合していることを示している。

【 0 2 3 8 】

G G F の N - グリコシル化を、タンパク質中において炭水化物とアスパラギン残基との間の共有結合を切断する酵素である N - グリカナーゼとの培養後において S D S - P A G E 上の移動度の変化を観察することによって調べた。

【 0 2 3 9 】

G G F - I I の N - グリカナーゼ処理によって、M W 4 0 ~ 4 2 k D a の主要なバンドと、4 5 ~ 4 8 k D a の副バンドとが得られた。非還元条件下における活性物質溶出実験は、約 4 5 ~ 5 0 k D a における一つの活性脱グリコシル化種を示した。

【 0 2 4 0 】

G G F - I の活性物質溶出実験も、N - グリカナーゼによって処理された場合に、M W 2 6 ~ 2 8 k D a の活性種を生ずることにより、電気泳動的移動度の増加を示している。銀染色によって、移動度のシフトがあることが確認されたが、使用されたサンプルのバックグラウンドの染色によって N - 脱グリコシル化バンドを指定することが出来なかった。

【 0 2 4 1 】

寄託

T 7 プロモーターのコントロール下における プラスミド p ブルースクリプト 5 k 中の核酸コード化 G G F - I I (c D N A , G G F 2 H B S 5) タンパク質 (例 6) を、アメリカ培養細胞系統保存機関、メリーランド州ロックビルに寄託し、A T T C 番号 7 5 2 9 8 を与えられた。本出願人は、もしもこのプラスミドが、本件が特許となった時にこの特許の権利期間が終結するまでに生存不能となった場合には、これを取り替える義務と、更に、そのような特許が発行されたことを A T T C に通知し、その発行時にこの寄託物を公衆に利用可能とする義務があることを認識するものである。それ以前においては、該寄託物は、3 7 C F R 1 . 1 4 及び 3 5 U S C 1 1 2 の規定に従って特許庁長官に利用可能とされる。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 例 1 に関し、カルボキシルメチルセルロースクロマトグラフィからの生成物のプロフィール。

【 図 2 】 例 1 に関し、ハイドロキシアパタイト H P L C からの生成物のプロフィール。

【 図 3 】 例 1 に関し、モノ S F P L C からの生成物のプロフィール。

【 図 4 】 例 1 に関し、ゲル濾過処理 F P L C の生成物のプロフィール、

【 図 5 】 例 1 に関し、逆相 H P L C からの二つの部分的に精製されたポリペプチド生成物のプロフィール。

【 図 6 】 例 1 に関し、逆相 H P L C からの二つの部分的に精製されたポリペプチド生成物のプロフィール。

【 図 7 】 例 1 に関し、ウシ胎仔血清又はウシ胎仔血漿のバックグラウンドを使用した逆相 H P L C からの G C F - I I 及び G C F - I I の投与量 - 反応曲線。

【 図 8 】 例 1 に関し、ウシ胎仔血清又はウシ胎仔血漿のバックグラウンドを使用した逆相 H P L C からの G C F - I I 及び G C F - I I の投与量 - 反応曲線。

【 図 9 】 G C F - I と G C F - I I , 配列認識番号 1 ~ 2 0 , 2 2 ~ 2 9 , 3 2 ~ 5 3 及び 1 6 9 から由来のペプチド配列のリスト (例 2 参照) 。

【 図 1 0 】 G C F - I と G C F - I I , 配列認識番号 1 ~ 2 0 , 2 2 ~ 2 9 , 3 2 ~ 5 3 及び 1 6 9 から由来のペプチド配列 (後記の例 2 参照) を示し、特に新規な配列を示し、パネル A は、縮重オリゴヌクレオチドプローブと縮重 P C R プライマーとを構成するのに使用する G C F - I ペプチドの配列がリストされ (配列認識番号 2 0 , 1 , 2 2 ~ 2 9 及び 1 7) 、パネル A のこれらの配列の内のいくつかは、合成ペプチドの構成にも使用され

10

20

30

40

50

、パネルBは、縮重プローブと縮重PCRプライマーの構成には短すぎた（6アミノ酸以下）新規なペプチドの配列のリスト（配列認識番号17及び52）。

【図11】GCF-IとGCF-II，配列認識番号1～20、22～29、32～53及び169から由来のペプチド配列（例2参照）を示し、特に新規な配列のリスト。

【図12】GCF-IとGCF-II，配列認識番号1～20、22～29、32～53及び169から由来のペプチド配列（後記の例2参照）を示し、特に新規な配列を示し、パネルAは、縮重オリゴヌクレオチドプローブと縮重PCRプライマーとを構成するのに使用するGCF-IIペプチドの配列がリストされ（配列認識番号45～52）、パネルAのこれらの配列の内のいくつかは、合成ペプチドの構成に使用され、パネルBは、縮重プローブと縮重PCRプライマーの構成には短すぎた（6アミノ酸以下）新規なペプチドの配列のリスト（配列認識番号53）。

10

【図13】例3に関し、本発明の因子の細胞分裂誘発活性を示すグラフ。

【図14】例3に関し、本発明の因子の細胞分裂誘発活性を示すグラフ。

【図15】例3に関し、本発明の因子の細胞分裂誘発活性を示すグラフ。

【図16】例3に関し、本発明の因子の細胞分裂誘発活性を示すグラフ。

【図17】例3に関し、本発明の因子の細胞分裂誘発活性を示すグラフ。

【図18】例3に関し、本発明の因子の細胞分裂誘発活性を示すグラフ。

【図19】例3に関し、本発明の因子の細胞分裂誘発活性を示すグラフ。

【図20】例3に関し、本発明の因子の細胞分裂誘発活性を示すグラフ。

【図21】例4に関し、図10のパネルA及び図12のパネルAに示された新規なペプチド配列から構成された縮重オリゴヌクレオチドのリスト（配列認識番号54～88）。

20

【図22】例4に関し、縮重オリゴヌクレオチドプローブ609，650（それぞれ図21，配列認識番号69及び72参照）の結合サイトを含有する組替えウシゲノムファーゼGGF2BG1からの推定ゲノムファーゼGGF2BG1のストレッチを示すリストであって、同図は、DNA配列のコード化ストランドと第3読み取り枠の推定されたアミノ酸配列であり、因子2（太字）からのペプチド12の配列は、66アミノ酸転写読み取り枠（ヌクレオチド75272）の一部である。

【図23】例4に関し、後部下垂体からのRNAに存在するウシGGF-IIコード下配列のセグメントを分離する実験に使用された縮重PCRプライマー（パネルA，配列認識番号90～108）とユニークなPCRプライマー（パネルB，配列認識番号109～119）のリスト。

30

【図24】例4に関し、図7のパネルA，Bのプライマーのリストを使用したPCR増幅実験において得られた9つの別々の隣接したウシGGF-II cDNA構造体と配列、及び後部下垂体からのRNAを示し、同図の最上ラインは、特徴付けられたcDNA構造体に寄与するコード化配列の略図。

【図25】例4に関し、GGF2BG1のウシ組替えファーゼの物理的地図であり、前記ウシフラグメントは、長さが約20kbであり、ウシGGF-II遺伝子の二つのエクソン（太字）を有している。酵素XbaI，SpeI，NdeI，EcoRI，KpnI，SstIの制限サイトがこの物理的地図上に示され、斜線部分は、配列のためにサブクローンされたフラグメントに対応する。

40

【図26】例4に関し、前記推定ウシGGF-II遺伝子の三つの別の遺伝子生成物の構造の略図であり、エクソンはその発見の順番にAないしEとしてリストされている。別のスプライシングパターン1，2及び3は、三つのオーバーラップする推定タンパク質構造体（GGF2BPP1，2，3）を生成し、これらはそれぞれ別の図28A，B，C（下記）に示されている。

【図27】配列認識番号120～132を示し、図28A，28B，28C（下記）に示された推定タンパク質配列において同定されたGGF-I及びGGF-IIと、図10及び12にリストされた新規なペプチド配列との比較を示すリストであり、同図は、9つの新規なGGF-IIペプチド配列の内の6つが、これらの推定タンパク質配列に見られることを示しており、GGF-I配列に類似の二つのペプチド配列も見られる。

50

【図28A】、配列認識番号133を示し、図26のスプライシングパターンNo. 1から得られるコード化トランドDNAと推定アミノ酸配列のリスト（配列認識番号133）であり、前記推定ウシGGF-II遺伝子のこの部分cDNAは、206アミノ酸のタンパク質をコード化し、太字のペプチドは、図10及び12に示したリストから同定されたペプチドである。潜在的グリコシル化サイトがアンダーラインされている（ポリアデニル化信号AATAAAとともに）。

【図28B】配列認識番号134を示し、図26のスプライシングパターンNo. 2から得られるコード化トランドDNAと推定アミノ酸配列のリストであり、前記推定ウシGGF-II遺伝子のこの部分cDNAは、281アミノ酸のタンパク質をコード化し、太字のペプチドは、図10及び12に示したリストから同定されたペプチドである。潜在的グリコシル化サイトがアンダーラインされている（ポリアデニル化信号AATAAAとともに）。

10

【図28C】配列認識番号135を示し、図26のスプライシングパターンNo. 3から得られるコード化トランドDNAと推定アミノ酸配列のリストであり、前記推定ウシGGF-II遺伝子のこの部分cDNAは、257アミノ酸のタンパク質をコード化し、太字のペプチドは、図10及び12に示したリストから同定されたペプチドである。潜在的グリコシル化サイトがアンダーラインされている（ポリアデニル化信号AATAAAとともに）。

【図29】例6に関し、サザンプロット上の様々なほ乳類DNAに対する推定ウシGGF-II遺伝子配列のクロスハイブリダイゼーション分析のオートラジオグラムであり、前記フィルターは、同図にリストされた種からのEcoRI-消化DNA（各レーンにつき5µg）を含有する。前記プローブは、図25の物理的地図によって予測されるウシDNAの4キロベースのフラグメントを含んで、各DNAサンプルにおける単一の強力なバンドを検出し、より力の小さいバンドも観察され、これらは関連DNA配列を示す。他のほ乳類DNAサンプルからの強いハイブリダイゼーションバンドは、これらの種のGGF-II相同体を示すものと考えられる。

20

【図30】さまざまなスプライシング変異体を示す図であり、コード化セグメントは、F, E, B, A, G, C, C/D, C/D', D, D', H, K及びLによって示され、精製タンパク質からのペプチド配列の位置は、"0"によって示されている。

【図31】配列認識番号136~147、160、161を示し、GGFのコード化セグメントのDNA配列と予想ペプチド配列のリストであり、ライン1は、ウシGGFの予想アミノ酸配列のリストであり、ライン2は、ウシGGFのヌクレオチド配列のリストであり、ライン3は、ヒトGGF（ヘレグリン）のヌクレオチド配列のリストであり（ヌクレオチドベースのマッチングは縦線にて示してある）、ライン4は、前記予想ウシ配列とは異なる場合におけるヒトGGF/herегulinの予想アミノ酸配列のリストであり、コード化セグメントE、A'及びKは、ウシ配列のみを表し、コード化セグメントD'は、ヒト（ヘレグリン）配列のみを表す。

30

【図32】配列認識番号148を示し、BPP5の予想GGF2アミノ酸配列とヌクレオチド配列のリストであり、上方ラインは、ヌクレオチド配列であり、下方ラインは、予想アミノ酸配列である。

40

【図33】配列認識番号149を示し、GGF2BPP2の予想アミノ酸配列とヌクレオチド配列のリストであり、上方ラインは、ヌクレオチド配列であり、下方ラインは、予想アミノ酸配列である。

【図34】配列認識番号150を示し、GGF2BPP4の予想アミノ酸配列とヌクレオチド配列のリストであり、上方ラインは、ヌクレオチド配列であり、下方ラインは、予想アミノ酸配列である。

【図35】配列認識番号151~152を示し、二つのGGFペプチド配列（GGF2pp4とGGF2pp5）のヒトEGF（hEGF）との整合を示す配列のリストであり、星印は、保存されたシステインを示す。

【図36】GGFの増加に対する、約200kD（抗リン酸化ポリクローナル抗体とともに

50

現像したウエスタンブロット上における200kDバンドの強度)のタンパク質のGGF活性のレベル(シュワン細胞細胞分裂誘発分析)と、チロシン燐酸化を示すグラフ。

【図37】図31の配列からのスプライシング変異体の配列のリスト。

【図38】EGFL1(配列認識番号154)の、予想アミノ酸配列を下部に、核酸配列を上部に示す配列のリスト。

【図39】EGFL2(配列認識番号155)の、予想アミノ酸配列を下部に、核酸配列を上部に示す配列のリスト。

【図40】EGFL3(配列認識番号156)の、予想アミノ酸配列を下部に、核酸配列を上部に示す配列のリスト。

【図41】EGFL4(配列認識番号157)の、予想アミノ酸配列を下部に、核酸配列を上部に示す配列のリスト。

10

【図42】EGFL5(配列認識番号158)の、予想アミノ酸配列を下部に、核酸配列を上部に示す配列のリスト。

【図43】EGFL6(配列認識番号159)の、予想アミノ酸配列を下部に、核酸配列を上部に示す配列のリスト。

【図44】クローンのスケールコード化セグメントマップであり、T3は、前記クローンからmRNAを生成するのに使用するバクテリオファージプロモーターを示し、R=隣接のEcoRI制限酵素サイトを、5'UTは、5'非翻訳領域を示し、E, B, A, C, C/D'及びDは、コード化セグメントを示し、0=翻訳開始サイト。ヒ=ウシEセグメントに対して相同の領域の5'限界(例6参照)、そして、3'UTは3'非翻訳領域を示す。

20

【図45】GGF2HBS5の予想アミノ酸配列(中間部:配列認識番号170)と、核酸配列(上部:配列認識番号21)とを示す。下部(中間)配列は、GGF-II調製物(図11及び12参照)からのペプチド配列を示す配列のリスト。

【図46】組替えヒト及びウシグリア成長因子のシュワン細胞細胞分裂誘発活性を示すグラフ。

【図47】CHO細胞のならし培地の大きさの異なる部分標本(aliquots)の投与から生じたシュワン細胞増殖活性物質の投与量-反応曲線。

【図48】GGF2HBS5cDNAクローンを含有するバキュロウィルスによって感染したSF9昆虫細胞によって細胞外培地中に分泌されたシュワン細胞細胞分裂誘発活性物質の投与量-反応曲線、

30

【図49】GGFペプチド抗体を使用した組替えCHO細胞のならし培地のウエスタンブロットを示す図。

【図50A】陽イオン交換カラムから溶出した組替え(COS細胞が生成)ヒトGGF-II(rhGGF-II)ピークのシュワン細胞増殖活性のグラフ。

【図50B】rhGGF-IIの特定のペプチドに対して生成されたポリクローナル抗体を使用した組替えGGF-IIピークに対する免疫プロット

【図51A】フラクションごとの陽イオン交換カラムでのrhGGF-II(CHO細胞が生成)の精製を示すグラフ。

【図51B】図51Aに示されたフラクションとrhGGF-II特異抗体を使用したウエスタンブロットの写真。

40

【図52】組替えグリア成長因子で処理したシュワン細胞におけるチロシン燐酸化を示すゲルの写真。

【図53】GGFHBS5, GGFHFB1及びGGFBPP5ポリペプチド(配列認識番号170, 171, 172)の配列のリスト。

【図54】前記CHO細胞-発現ベクターpcDHFRpolyAのマップ。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

- <110> LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEACH
Goodearl, Andrew; Stroobant, Paul; Minghetti, Luisa; Waterfield, Michael;
Marchioni, Mark; Chen, Maio Su; Hiles, Ian
- <120> Glial Mitogenic Factors, Their preparation and use
- <130> LUD 250.4-PCT

<140> PCT/US93/06228
<141> 1993- 6-29

<150> US08/036,555
<151> 1993-03-24

<150> US07/07/965,173
<151> 1992-10-23

<150> US07/940,389
<151> 1992-09-03

10

<150> US07/907,138
<151> 1992-06-30

<150> US07/863,703
<151> 1992-04-03

<150> UK91 07566.3
<151> 1991-04-10

20

<160> 189

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213>

30

<220>
<221>
<223> TOPOLOGY: linear

<400> 1

Phe Lys Gly Asp Ala His Thr Glu
1 5

40

<210> 2
<211> 13
<212> PRT
<213>

<220>
<221>
<223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa in position 12 is unknown.

10

<400> 2

Xaa Ala Ser Leu Ala Asp Glu Tyr Glu Tyr Met Xaa Lys
 1 5 10

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213>

20

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa in position 10 is unknown

<400> 3

Xaa Thr Glu Thr Ser Ser Ser Gly Leu Xaa Leu Lys
 1 5 10

40

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

<400> 4

10

Xaa Lys Leu Gly Glu Met Trp Ala Glu
1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213>

20

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

<400> 5

30

Xaa Leu Gly Glu Lys Arg Ala
1 5

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213>

40

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

<212> PRT
<213>

<220>
<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

10

<223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa in position 12 is unknown.

<400> 9

20

Xaa Met Ser Glu Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Xaa Arg
1 5 10

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213>

<220>

30

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

<400> 10

40

Xaa Ser Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys
1 5 10

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

<220> 10
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa in position 8 is unknown

<400> 11

Xaa Ala Gly Tyr Phe Ala Glu Xaa Ala Arg
 1 5 10

20

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220> 30
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa in position 7 is unknown

<400> 12

40

Xaa Lys Leu Glu Phe Leu Xaa Ala Lys
 1 5

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT

<213>

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

10

<400> 13

Xaa	Thr	Thr	Glu	Met	Ala	Ser	Glu	Gln	Gly	Ala
1				5					10	

.

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213>

20

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

30

<400> 14

Xaa	Ala	Lys	Glu	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu	Lys
1				5					10

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213>

40

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

<400> 15

Xaa Phe Val Leu Gln Ala Lys Lys

1

5

10

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213>

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

20

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

<400> 16

Xaa Leu Gly Glu Met Trp

1

5

30

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213>

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

40

<400> 17

Glu Tyr Lys Cys Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Lys Ala Thr Val Met

1

5

10

15

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213>

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa in position 8 is unknown

10

<400> 18

Glu	Ala	Lys	Tyr	Phe	Ser	Lys	Xaa	Asp	Ala
1				5					10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213>

20

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa in position 2 is unknown

30

<400> 19

Glu	Xaa	Lys	Phe	Tyr	Val	Pro
1			5			

<210> 20

<211> 26

<212> PRT

<213>

40

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 20

Glu Leu Ser Phe Ala Ser Val Arg Leu Pro Gly Cys Pro Pro Gly Val
 1 5 10 15

Asp Pro Met Val Ser Phe Pro Val Ala Leu
 20 25

<210> 21
 <211> 2003
 <212> DNA 10
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220> 20
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(32)
 <223> N in positions 31 and 32 could be either A or G

<400> 21

GGAATTCCTT TTTTTTTTTT TTTTTTCTT NNTTTTTTTT TGCCCTTATA CCTCTTCGCC 60
 TTTCTGTGGT TCCATCCACT TCTTCCCCCT CCTCCTCCCA TAAACAACCT TCCTACCCCT 120
 GCACCCCAA TAAATAAATA AAAGGAGGAG GGCAAGGGGG GAGGAGGAGG AGTGGTGCTG 180
 CGAGGGGAAG GAAAAGGGAG GCAGCGCGAG AAGAGCCGGG CAGAGTCCGA ACCGACAGCC 240
 AGAAGCCCGC ACGCACCTCG CACC ATG AGA TGG CGA CGC GCC CCG CGC CGC 291

Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg
 1 5

TCC GGG CGT CCC GGC CCC CGG GCC CAG CGC CCC GGC TCC GCC GCC CGC 339
 Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg
 10 15 20 25

TCG TCG CCG CCG CTG CCG CTG CTG CCA CTA CTG CTG CTG CTG GGG ACC 387
 Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr 40
 30 35 40

GCG GCC CTG GCG CCG GGG GCG GCG GCC GGC AAC GAG GCG GCT CCC GCG 435
 Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala
 45 50 55

GGG GCC TCG GTG TGC TAC TCG TCC CCG CCC AGC GTG GGA TCG GTG CAG 483
 Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln

60	65	70		
GAG CTA GCT CAG CGC GCC GCG GTG GTG ATC GAG GGA AAG GTG CAC CCG Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro 75 80 85			531	
CAG CGG CGG CAG CAG GGG GCA CTC GAC AGG AAG GCG GCG GCG GCG GCG Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala 90 95 100 105			579	
GGC GAG GCA GGG GCG TGG GGC GGC GAT CGC GAG CCG CCA GCC GCG GGC Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly 110 115 120			627	10
CCA CGG GCG CTG GGG CCG CCC GCC GAG GAG CCG CTG CTC GCC GCC AAC Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn 125 130 135			675	
GGG ACC GTG CCC TCT TGG CCC ACC GCC CCG GTG CCC AGC GCC GGC GAG Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu 140 145 150			723	20
CCC GGG GAG GAG GCG CCC TAT CTG GTG AAG GTG CAC CAG GTG TGG GCG Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala 155 160 165			771	
GTG AAA GCC GGG GGC TTG AAG AAG GAC TCG CTG CTC ACC GTG CGC CTG Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu 170 175 180 185			819	
GGG ACC TGG GGC CAC CCC GCC TTC CCC TCC TGC GGG AGG CTC AAG GAG Gly Thr Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu 190 195 200			867	30
GAC AGC AGG TAC ATC TTC TTC ATG GAG CCC GAC GCC AAC AGC ACC AGC Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser 205 210 215			915	
CGC GCG CCG GCC GCC TTC CGA GCC TCT TTC CCC CCT CTG GAG ACG GGC Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly 220 225 230			963	40
CGG AAC CTC AAG AAG GAG GTC AGC CGG GTG CTG TGC AAG CGG TGC GCC Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala 235 240 245			1011	
TTG CCT CCC CAA TTG AAA GAG ATG AAA AGC CAG GAA TCG GCT GCA GGT Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly 250 255 260 265			1059	

TCC AAA CTA GTC CTT CGG TGT GAA ACC AGT TCT GAA TAC TCC TCT CTC	1107	
Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu		
270 275 280		
AGA TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AAT GAA TTG AAT CGA AAA AAC AAA	1155	
Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys		
285 290 295		
CCA CAA AAT ATC AAG ATA CAA AAA AAG CCA GGG AAG TCA GAA CTT CGC	1203	10
Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg		
300 305 310		
ATT AAC AAA GCA TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAG TAT ATG TGC AAA GTG	1251	
Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val		
315 320 325		
ATC AGC AAA TTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAT ATC ACC ATC GTG	1299	
Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val		
330 335 340 345		20
GAA TCA AAC GCT ACA TCT ACA TCC ACC ACT GGG ACA AGC CAT CTT GTA	1347	
Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val		
350 355 360		
AAA TGT GCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT GGA GGG GAG TGC	1395	
Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys		
365 370 375		
TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAC CCC TCG AGA TAC TTG TGC AAG TGC	1443	30
Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys		
380 385 390		
CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC	1491	
Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser		
395 400 405		
TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA	1530	
Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu		
410 415 420		40
TAGGAGCATG CTCAGTTGGT GCTGCTTTCT TGTTGCTGCA TCTCCCCTCA GATTCCACCT	1590	
AGAGCTAGAT GTGTCTTACC AGATCTAATA TTGACTGCCT CTGCCTGTCG CATGAGAACA	1650	
TTAACAAAAG CAATTGTATT ACTTCCTCTG TTCGCGACTA GTTGGCTCTG AGATACTAAT	1710	
AGGTGTGTGA GGCTCCGGAT GTTTCTGGAA TTGATATTGA ATGATGTGAT ACAAATTGAT	1770	
AGTCAATATC AAGCAGTGAA ATATGATAAT AAAGGCATTT CAAAGTCTCA CTTTTATTGA	1830	
TAAAATAAAA ATCATTCTAC TGAACAGTCC ATCTTCTTTA TACAATGACC ACATCCTGAA	1890	
AAGGGTGTG CTAAGCTGTA ACCGATATGC ACTTGAAATG ATGGTAAGTT AATTTTGATT	1950	
CAGAATGTGT TATTTGTCAC AAATAAACAT AATAAAAAGGA AAAAAAAAAAAA AAA	2003	

<210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220> 10
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa in position 11 is unknown

<400> 22

Ala Ser Leu Ala Asp Glu Tyr Glu Tyr Met Xaa Lys
 1 5 10

20

<210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220> 30
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa in position 9 is unknown

<400> 23

Thr Glu Thr Ser Ser Ser Gly Leu Xaa Leu Lys
 1 5 10

40

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 24

Ala Ser Leu Ala Asp Glu Tyr Glu Tyr Met Arg Lys
 1 5 10

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213>

10

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa in position 7 is unknown

20

<400> 25

Ala Gly Tyr Phe Ala Glu Xaa Ala Arg
 1 5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213>

30

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 26

Thr Thr Glu Met Ala Ser Glu Gln Gly Ala
 1 5 10

40

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213>

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 27

Ala Lys Glu Ala Leu Ala Ala Leu Lys

1

5

10

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213>

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

20

<400> 28

Phe Val Leu Gln Ala Lys Lys

1

5

<210> 29

<211> 21

<212> PRT

<213>

30

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 29

Glu Thr Gln Pro Asp Pro Gly Gln Ile Leu Lys Lys Val Pro Met Val

1

5

10

15

40

Ile Gly Ala Tyr Thr

20

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

<213>

<220>
<221>
<223> TOPOLOGY: linear

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa in position 1 is unknown

10

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa in position 3 is unknown

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> Xaa in position 17 is unknown

20

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> Xaa in position 19 is unknown

<400> 30

Xaa Glu Xaa Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys Glu
1 5 10 15

30

Xaa Gly Xaa Gly Lys
20

<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213>

40

<220>
<221>
<223> TOPOLOGY: linear

<400> 31

Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu
1 5 10

<210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220> 10
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa in position 6 is unknown

<400> 32

Lys Leu Glu Phe Leu Xaa Ala Lys
 1 5

20

<210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220> 30
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

<400> 33

Xaa Val His Gln Val Trp Ala Ala Lys
 1 5

40

<210> 34
 <211> 14
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa in position 11 is unknown

10

<400> 34

Xaa Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu Ala Xaa Ser Ser Gly
 1 5 10

<210> 35

<211> 14

<212> PRT

<213>

20

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa in position 13 is unknown

<400> 35

40

Xaa Leu Gly Ala Trp Gly Pro Pro Ala Phe Pro Val Xaa Tyr
 1 5 10

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

<400> 36

10

Xaa Trp Phe Val Val Ile Glu Gly Lys
 1 5

<210> 37
 <211> 16
 <212> PRT
 <213>

20

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

30

<400> 37

Xaa Ala Ser Pro Val Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Val Gln Arg
 1 5 10 15

<210> 38
 <211> 13
 <212> PRT
 <213>

40

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

<400> 38

Xaa Val Cys Leu Leu Thr Val Ala Ala Leu Pro Pro Thr
 1 5 10

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213>

10

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa in position 1 is Lysine or Arginine

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa in position 6 is unknown

<400> 39

Xaa Asp Leu Leu Leu Xaa Val
 1 5

30

<210> 40

<211> 39

<212> PRT

<213>

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

40

<400> 40

Cys Thr Cys Gly Cys Cys Lys Cys Cys Arg Thr Thr Cys Ala Cys Arg
 1 5 10 15

Cys Ala Gly Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Thr Cys Thr Cys Cys Thr

20

25

30

Thr Cys Thr Cys Ala Gly Cys
35

<210> 41

<211> 24

<212> PRT

<213>

10

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 41

Cys Cys Thr Cys Gly Cys Thr Cys Cys Thr Thr Cys Thr Thr Cys Thr
1 5 10 15

20

Thr Gly Cys Cys Cys Thr Thr Cys
20

<210> 42

<400> 42

000

<210> 43

<400> 43

000

30

<210> 44

<400> 44

000

40

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213>

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 45

Val His Gln Val Trp Ala Ala Lys
1 5

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213>

10

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa in position 10 is unknown

20

<400> 46

Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu Ala Xaa Ser Ser Gly
1 5 10

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213>

30

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa in position 12 is unknown

40

<400> 47

Leu Gly Ala Trp Gly Pro Pro Ala Phe Pro Val Xaa Tyr
1 5 10

<210> 48
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 48

Trp Phe Val Val Ile Glu Gly Lys
 1 5

10

<210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

20

<400> 49

Ala Ser Pro Val Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Val Gln Arg
 1 5 10 15

30

<210> 50
 <211> 12
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

40

<400> 50

Val Cys Leu Leu Thr Val Ala Ala Leu Pro Pro Thr
 1 5 10

<210> 51
 <211> 9

<212> PRT
<213>

<220>
<221>
<223> TOPOLOGY: linear

<400> 51
Lys Val His Gln Val Trp Ala Ala Lys 10
1 5

<210> 52
<211> 13
<212> PRT
<213>

<220>
<221>
<223> TOPOLOGY: linear 20

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Xaa in position 12 is unknown

<400> 52
Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Xaa Lys 30
1 5 10

<210> 53
<211> 6
<212> PRT
<213>

<220>
<221>
<223> TOPOLOGY: linear 40

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa in position 5 is unknown

<400> 53

Asp Leu Leu Leu Xaa Val
 1 5

<210> 54
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>

<220> 10
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 54
 TTYAARGGNG AYGCNCAYAC 20 20

<210> 55
 <211> 21
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single 30

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 55
 CATRTAYTCR TAYTCRTCNG C 21 40

<210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 56
 TGYTCNGANG CCATYTCNGT 20

<210> 57 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221> 20
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 57
 TGYTCRCCTNG CCATYTCNGT 20

<210> 58
 <211> 20
 <212> DNA 30
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear 40

<400> 58
 CCDATNACCA TNGGNACYTT 20

<210> 59
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 59
 GCNGCCCANACYTGRTGNAC 20 10

<210> 60
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single 20

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 60
 GCYTCNGGYTCCATRAARAA 20

<210> 61
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 30

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear 40

<400> 61
 CCYTCDATNACNACRAACCA 20

<210> 62

<211>	17		
<212>	DNA		
<213>			
<220>			
<221>			
<223>	STRANDEDNESS: single		
<220>			
<221>			10
<223>	TOPOLOGY: linear		
<400>	62		
TCNGCRAART ANCCNGC		17	
<210>	63		
<211>	20		
<212>	DNA		20
<213>			
<220>			
<221>			
<223>	STRANDEDNESS: single		
<220>			
<221>			
<223>	TOPOLOGY: linear		
			30
<400>	63		
GCNGCNAGNG CYTCYTTNGC		20	
<210>	64		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>			
<220>			40
<221>			
<223>	STRANDEDNESS: single		
<220>			
<221>			
<223>	TOPOLOGY: linear		
<400>	64		

GCNGCYAANG CYTCYTTNGC

20

<210> 65
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

10

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 65
 TTYTTNGCYT GNAGNACRAA

20

20

<210> 66
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

30

<400> 66
 TTYTTNGCYT GYAANACRAA

20

<210> 67
 <211> 17
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

40

<220>
 <221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 67
TGNACNAGYT CYTGNAC

17

<210> 68
<211> 17
<212> DNA
<213>

10

<220>
<221>
<223> STRANDEDNESS: single

<220>
<221>
<223> TOPOLOGY: linear

20

<400> 68
TGNACYAAYT CYTGNAC

17

<210> 69
<211> 21
<212> DNA
<213>

<220>
<221>
<223> STRANDEDNESS: single

30

<220>
<221>
<223> TOPOLOGY: linear

<400> 69
CATRTAYTCN CCNGARTCNG C

21

40

<210> 70
<211> 21
<212> DNA
<213>

<220>
<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 70

CATRTAYTCN CCRCTRTCNG C

21

10

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

20

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 71

NGARTCNGCY AANGANGCYT T

21

<210> 72

<211> 21

<212> DNA

<213>

30

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

40

<400> 72

NGARTCNGCN AGNGANGCYT T

21

<210> 73

<211> 21

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

10

<400> 73

RCTRTCNGCY AANGANGCYT T

21

<210> 74

<211> 21

<212> DNA

<213>

20

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 74

RCTRTCNGCN AGNGANGCYT T

21

30

<210> 75

<211> 21

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

40

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 75

NGARTCNGCY AARCTNGCYT T

21

<210>	76		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>			
<220>			
<221>			
<223>	STRANDEDNESS: single		
<220>			10
<221>			
<223>	TOPOLOGY: linear		
<400>	76		
	NGARTCNGCN AGRCTNGCYT T	21	
<210>	77		
<400>	77		20
	000		
<210>	78		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>			
<220>			
<221>			30
<223>	STRANDEDNESS: single		
<220>			
<221>			
<223>	TOPOLOGY: linear		
<400>	78		
	RCTRTCNGCY AARCTNGCYT T	21	
			40
<210>	79		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>			
<220>			
<221>			
<223>	STRANDEDNESS: single		

<220>		
<221>		
<223>	TOPOLOGY: linear	
<400>	79	
	RCTRCTNGCN AGRCTNGCYT T	21
<210>	80	10
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>		
<220>		
<221>		
<223>	STRANDEDNESS: single	
<220>		
<221>		20
<223>	TOPOLOGY: linear	
<400>	80	
	ACNACNGARA TGGCTCNGA	20
<210>	81	
<211>	20	
<212>	DNA	30
<213>		
<220>		
<221>		
<223>	STRANDEDNESS: single	
<220>		
<221>		
<223>	TOPOLOGY: linear	40
<400>	81	
	ACNACNGARA TGGCAGYNGA	20
<210>	82	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>		

<220>			
<221>			
<223>	STRANDEDNESS: single		
<220>			
<221>			
<223>	TOPOLOGY: linear		
<400>	82		10
	CAYCARGTNT GGCNGCNAA	20	
<210>	83		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>			
<220>			
<221>			20
<223>	STRANDEDNESS: single		
<220>			
<221>			
<223>	TOPOLOGY: linear		
<400>	83		
	TTYGTNGTNA THGARGGNAA	20	30
<210>	84		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>			
<220>			
<221>			
<223>	STRANDEDNESS: single		40
<220>			
<221>			
<223>	TOPOLOGY: linear		
<400>	84		
	AARGGNGAYG CNCAYACNGA	20	

<210>	85		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>			
<220>			
<221>			
<223>	STRANDEDNESS: single		
<220>			10
<221>			
<223>	TOPOLOGY: linear		
<400>	85		
	GARGCNYTNG CNGCNYTNAA		20
<210>	86		
<211>	20		20
<212>	DNA		
<213>			
<220>			
<221>			
<223>	STRANDEDNESS: single		
<220>			
<221>			
<223>	TOPOLOGY: linear		30
<400>	86		
	GTNGGNTCNG TNCARGARYT		20
<210>	87		
<211>	20		
<212>	DNA		40
<213>			
<220>			
<221>			
<223>	STRANDEDNESS: single		
<220>			
<221>			
<223>	TOPOLOGY: linear		

<400> 87
GTNGGNAGYG TNCARGARYT

20

<210> 88
<211> 21
<212> DNA
<213>

<220>
<221>
<223> STRANDEDNESS: single

10

<220>
<221>
<223> TOPOLOGY: linear

<400> 88
NACYTTYTTN ARDATYTGNC C

21

20

<210> 89
<211> 417
<212> DNA
<213>

<220>
<221>
<223> TOPOLOGY: linear

30

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> Xaa in position 14 is a stop codon

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> Xaa in position 23 is a stop codon

40

<220>
<221> misc_feature
<222> (90)..(90)
<223> Xaa in position 90 is a stop codon

<220>
<221> misc_feature
<222> (100)..(100)
<223> Xaa in position 100 is a stop codon

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (126)..(126)
 <223> Xaa in position 126 is a stop codon

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (135)..(135)
 <223> Xaa in position 135 is a stop codon

10

<400> 89

TCTAA AAC TAC AGA GAC TGT ATT TTC ATG ATC ATC ATA GTT CTG TGA AAT ATA 53
 Asn Tyr Arg Asp Cys Ile Phe Met Ile Ile Ile Val Leu Xaa Asn Ile
 1 5 10 15

CTT AAA CCG CTT TGG TCC TGA TCT TGT AGG AAG TCA GAA CTT CGC ATT 101
 Leu Lys Pro Leu Trp Ser Xaa Ser Cys Arg Lys Ser Glu Leu Arg Ile
 20 25 30

20

AGC AAA GCG TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA TAT ATG TGC AAA GTG ATC 149
 Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Ser Met Cys Lys Val Ile
 35 40 45

AGC AAA CTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAC ATC ACC ATT GTG GAG 197
 Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Arg Ile Val Glu
 50 55 60

TCA AAC GGT AAG AGA TGC CTA CTG CGT GCT ATT TCT CAG TCT CTA AGA 245
 Ser Asn Gly Lys Arg Cys Leu Leu Arg Ala Ile Ser Gln Ser Leu Arg
 65 70 75 80

30

GGA GTG ATC AAG GTA TGT GGT CAC ACT TGA ATC ACG CAG GTG TGT GAA 293
 Gly Val Ile Lys Val Cys Gly His Thr Xaa Ile Thr Gln Val Cys Glu
 85 90 95

ATC TCA TTG TGA ACA AAT AAA AAT CAT GAA AGG AAA ACT CTA TGT TTG 341
 Ile Ser Cys Xaa Thr Asn Lys Asn His Glu Arg Lys Thr Leu Cys Leu
 100 105 110

40

AAA TAT CTT ATG GGT CCT CCT GTA AAG CTC TTC ACT CCA TAA GGT GAA 389
 Lys Tyr Leu Met Gly Pro Pro Val Lys Leu Phe Thr Pro Xaa Gly Glu
 115 120 125

ATA GAC CTG AAA TAT ATA TAG ATT ATT T 417
 Ile Asp Leu Lys Tyr Ile Xaa Ile Ile
 130 135

<210> 90
 <211> 33
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220> 10
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> N in positions 19 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature 20
 <222> (25)..(25)
 <223> N in positions 25 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> N in positions 31 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature 30
 <222> (28)..(28)
 <223> Y in positions 28 can be cytidine or thymidine

<400> 90
 CCGAATTCTG CAGGARACNC ARCCNGAYCC NGG 33

<210> 91
 <211> 37 40
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> N in positions 14 is Inosine

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> N in positions 20 is Inosine

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> N in positions 23 is Inosine

<220>

<221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> N in positions 29 is Inosine

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> N in positions 35 is Inosine

<400> 91

AAGGATCCTG CAGNGTRTAN GCNCCDATNA CCATNGG

37

30

<210> 92

<211> 34

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

40

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> N in positions 16 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> N in positions 21 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> N in positions 24 is Inosine

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> Y in positions 19 can be cytidine or thymidine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> Y in positions 31 can be cytidine or thymidine

20

<400> 92
 CCGAATTCTG CAGGCNGAYT CNGGNGARTA YATG

34

<210> 93
 <211> 33
 <212> DNA
 <213>

30

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> N in positions 16 is Inosine

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> N in positions 21 is Inosine

<220>

<221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> Y in positions 19 can be cytidine or thymidine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> Y in positions 22 can be cytidine or thymidine

<220> 10
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> Y in positions 31 can be cytidine or thymidine

<400> 93
 CCGAATTCTG CAGGCNGAYA GYGGNGARTA YAT 33

<210> 94
 <211> 34
 <212> DNA 20
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> N in positions 14 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> N in positions 15 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> N in positions 16 is Inosine 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> N in positions 26 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> N in positions 29 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> Y in positions 23 can be cytidine or thymidine

10

<400> 94
 AAGGATCCTG CAGNNNCATR TAYTCNCCNG ARTC

34

<210> 95
 <211> 34
 <212> DNA
 <213>

20

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> N in positions 14 is Inosine

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> N in positions 15 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> N in positions 16 is Inosine

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> N in positions 15 is Inosine

<220>

<221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> Y in positions 23 can be cytidine or thymidine

<400> 95
 AAGGATCCTG CAGNNNCATR TAYTCNCCRC TRTC 34

<210> 96
 <211> 33 10
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear 20

220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> N in positions 21 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> N in positions 28 is Inosine 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> N in positions 31 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Y in positions 16 can be cytidine or thymidine 40

<400> 96
 CCGAATTCTG CAGCAYCARG TNTGGGCNGC NAA 33

<210> 97
 <211> 35
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

220>
 <221> misc_feature 10
 <222> (31)..(31)
 <223> N in positions 31 is Inosine

<221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> Y in positions 19 can be cytidine or thymidine

<221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> Y in positions 22 can be cytidine or thymidine 20

<400> 97
 CCGAATTCTG CAGATHITYT TYATGGARCC NGARG 35

<210> 98
 <211> 35
 <212> DNA
 <213>

<220> 30
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature 40
 <222> (18)..(18)
 <223> N in positions 18 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> N in positions 21 is Inosine

<220>

<221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> N in positions 24 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> N in positions 27 is Inosine

<220> 10
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> N in positions 33 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Y in positions 30 can be cytidine or thymidine

<400> 98 20
 CCGAATTCTG CAGGGGGNCC NCCNGCNTTY CCGGT 35

<210> 99
 <211> 33
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single 30

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> N in positions 21 is Inosine

<220> 40
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> N in positions 24 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> Y in positions 19 can be cytidine or thymidine

<400> 99
CCGAATTCTG CAGTGGTTYG TNGTNATHGA RGG 33

<210> 100
<211> 35
<212> DNA
<213>

<220> 10
<221>
<223> STRANDEDNESS: single

<220>
<221>
<223> TOPOLOGY: linear

<220>
<221> misc_feature 20
<222> (17)..(17)
<223> N in positions 18 is Inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> N in positions 20 is Inosine

<220>
<221> misc_feature 30
<222> (26)..(26)
<223> N in positions 26 is Inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> Y in positions 14 can be cytidine or thymidine

<220>
<221> misc_feature 40
<222> (30)..(30)
<223> Y in positions 30 can be cytidine or thymidine

<400> 100
AAGGATCCTG CAGYTTNGCU NGCCCANACY TGRTG 35

<210> 101

<211> 33
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221> 10
 <223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> N in positions 18 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16) 20
 <223> Y in positions 16 can be cytidine or thymidine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> Y in positions 22 can be cytidine or thymidine

<400> 101
 AAGGATCCTG CAGGCYTCNG GYTCCATRAA RAA 33 30

<210> 102
 <211> 33
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single 40

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> N in positions 16 is Inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> N in positions 22 is Inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> N in positions 25 is Inosine

10

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> N in positions 28 is Inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> N in positions 31 is Inosine

20

<400> 102
AAGGATCCTG CAGACNGGRA ANGCNCGNGG NCC

33

<210> 103
<211> 35
<212> DNA
<213>

<220>
<221>
<223> STRANDEDNESS: single

30

<220>
<221>
<223> TOPOLOGY: linear

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> N in positions 17 is Inosine

40

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> N in positions 26 is Inosine

<220>
<221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> N in positions 29 is Inosine

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Y in positions 20 can be cytidine or thymidine

<400> 103

AAGGATCCTG CAGYTTNCCY TCDATNACNA CRAAC

35

10

<210> 104

<211> 33

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

20

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> N in positions 18 is Inosine

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Y in positions 7 can be cytidine or thymidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Y in positions 13 can be cytidine or thymidine

40

<400> 104

CATRTAYTCR TAYTCTCNGC AAGGATCCTG CAG

33

<210> 105

<211> 33

<212> DNA

<213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature 10
 <222> (19)..(19)
 <223> N in positions 19 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> N in positions 25 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature 20
 <222> (31)..(31)
 <223> N in positions 31 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> Y in positions 22 can be cytidine or thymidine

<220>
 <221> misc_feature 30
 <222> (28)..(28)
 <223> Y in positions 28 can be cytidine or thymidine

<400> 105
 CCGAATTCTG CAGAARGGNG AYGNCAYAC NGA 33

<210> 106
 <211> 33 40
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> N in positions 3 is Inosine

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> N in positions 18 is Inosine

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Y in positions 6 can be cytidine or thymidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Y in positions 12 can be cytidine or thymidine

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> Y in positions 15 can be cytidine or thymidine

<400> 106

GCNGCYAANG CYTCYTNGC AAGGATCCTG CAG

33

30

<210> 107

<211> 33

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

40

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> N in positions 3 is Inosine

<220>

<221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> N in positions 6 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> N in positions 9 is Inosine

<220> 10
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> N in positions 18 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Y in positions 12 can be cytidine or thymidine

<220> 20
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Y in positions 15 can be cytidine or thymidine

<400> 107
 GCNCGNAGNG CYTCYTTNGC AAGGATCCTG CAG 33

<210> 108
 <211> 30 30
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> N in positions 3 is Inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)

<223> N in positions 12 is Inosine

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> N in positions 15 is Inosine

<400> 108

TCNGCRAART ANCCNGCAAG GATCCTGCAG

30

10

<210> 109

<211> 38

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

20

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 109

CATCGATCTG CAGGCTGATT CTGGAGAATA TATGTGCA

38

<210> 110

<211> 37

<212> DNA

<213>

30

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

40

<400> 110

AAGGATCCTG CAGCCACATC TCGAGTCGAC ATCGATT

37

<210> 111

<211> 37

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

10

<400> 111

CCGAATTCTG CAGTGATCAG CAAACTAGGA AATGACA

37

<210> 112

<211> 37

<212> DNA

<213>

20

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 112

CATCGATCTG CAGCCTAGTT TGCTGATCAC TTTGCAC

37

30

<210> 113

<211> 37

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

40

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 113

AAGGATCCTG CAGTATATTC TCCAGAATCA GCCAGTG

37

<210>	114	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>		
<220>		
<221>		
<223>	STRANDEDNESS: single	
<220>		10
<221>		
<223>	TOPOLOGY: linear	
<400>	114	
AAGGATCCTG CAGGCACGCA GTAGGCATCT CTTA		34
<210>	115	
<211>	35	20
<212>	DNA	
<213>		
<220>		
<221>		
<223>	STRANDEDNESS: single	
<220>		
<221>		
<223>	TOPOLOGY: linear	30
<400>	115	
CCGAATTCTG CAGCAGAACT TCGCATTAGC AAAGC		35
<210>	116	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>		40
<220>		
<221>		
<223>	STRANDEDNESS: single	
<220>		
<221>		
<223>	TOPOLOGY: linear	

<400> 116		
CATCCCGGGA TGAAGAGTCA GGAGTCTGTG GCA	33	
<210> 117		
<211> 39		
<212> DNA		
<213>		
<220>		10
<221>		
<223> STRANDEDNESS: single		
<220>		
<221>		
<223> TOPOLOGY: linear		
<400> 117		
ATACCCGGGC TGCAGACAAT GAGATTTAC ACACCTGCG	39	20
<210> 118		
<211> 36		
<212> DNA		
<213>		
<220>		
<221>		
<223> STRANDEDNESS: single		30
<220>		
<221>		
<223> TOPOLOGY: linear		
<400> 118		
AAGGATCCTG CAGTTTGAA CCTGCCACAG ACTCCT	36	40
<210> 119		
<211> 39		
<212> DNA		
<213>		
<220>		
<221>		
<223> STRANDEDNESS: single		

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 119

ATACCCGGGC TGCAGATGAG ATTTACACACA CCTGCGTGA

39

<210> 120

10

<211> 12

<212> PRT

<213>

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 120

20

His Gln Val Trp Ala Ala Lys Ala Ala Gly Leu Lys

1

5

10

<210> 121

<211> 16

<212> PRT

<213>

30

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 121

Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Asn

1

5

10

15

40

<210> 122

<211> 13

<212> PRT

<213>

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa in position 12 is unknown

<400> 122

Leu Gly Ala Trp Gly Pro Pro Ala Phe Pro Val Xaa Tyr
 1 5 10

10

<210> 123
 <211> 23
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

20

<400> 123

Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser
 1 5 10 15

Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp
 20

30

<210> 124
 <211> 13
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa in position 10 is unknown

<400> 124

Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu Ala Xaa Ser Ser Gly

1 5 10

<210> 125
 <211> 23
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear 10

<400> 125

Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu Ala Asn Ser
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu
 20 20

<210> 126
 <211> 14
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa in position 11 is unknown

<400> 126

Val Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser
 1 5 10 40

<210> 127
 <211> 16
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 127

Glu Tyr Lys Cys Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Lys Ala Thr Val Met
 1 5 10 15

<210> 128

10

<211> 26

<212> PRT

<213>

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 128

20

Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys
 1 5 10 15

Asn Gly Ser Glu Leu Ser Arg Lys Asn Lys
 20 25

<210> 129

<211> 13

<212> PRT

30

<213>

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa in position 12 is unknown

40

<400> 129

Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Xaa Lys
 1 5 10

<210> 130

<211> 23
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 130 10

Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met
 1 5 10 15

Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu
 20

<210> 131
 <211> 12 20
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 131 30

Ala Ser Leu Ala Asp Glu Tyr Glu Tyr Met Arg Lys
 1 5 10

<210> 132
 <211> 22
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221> 40
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 132

Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys
 1 5 10 15

Lys Val Ile Ser Lys Leu

20

<210> 133
 <211> 744
 <212> DNA
 <213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

10

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 133

CCTGCAG CAT CAA GTG TGG GCG GCG AAA GCC GGG GGC TTG AAG AAG GAC TCG CTG 55
 His Gln Val Trp Ala Ala Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu
 1 5 10 15

20

CTC ACC GTG CGC CTG GGC GCC TGG GGC CAC CCC GCC TTC CCC TCC TGC 103
 Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys
 20 25 30

GGG CGC CTC AAG GAG GAC AGC AGG TAC ATC TTC TTC ATG GAG CCC GAG 151
 Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu
 35 40 45

30

GCC AAC AGC AGC GGC GGG CCC GGC CGC CTT CCG AGC CTC CTT CCC CCC 199
 Ala Asn Ser Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu Pro Ser Leu Leu Pro Pro
 50 55 60

TCT CGA GAC GGG CCG GAA CCT CAA GAA GGA GGT CAG CCG GGT GCT GTG 247
 Ser Arg Asp Gly Pro Glu Pro Gln Glu Gly Gly Gln Pro Gly Ala Val
 65 70 75 80

CAA CGG TGC GCC TTG CCT CCC CGC TTG AAA GAG ATG AAG AGT CAG GAG 295
 Gln Arg Cys Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu
 85 90 95

40

TCT GTG GCA GGT TCC AAA CTA GTG CTT CGG TGC GAG ACC AGT TCT GAA 343
 Ser Val Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu
 100 105 110

TAC TCC TCT CTC AAG TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AGT GAA TTA AGC 391
 Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Ser Glu Leu Ser
 115 120 125

CGA AAG AAC AAA CCA GAA AAC ATC AAG ATA CAG AAA AGG CCG GGG AAG 439
 Arg Lys Asn Lys Pro Glu Asn Ile Lys Ile Gln Lys Arg Pro Gly Lys
 130 135 140

TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA GCG TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA TAT 487
 Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr
 145 150 155 160

ATG TGC AAA GTG ATC AGC AAA CTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAC 535
 Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn 10
 165 170 175

ATC ACC ATT GTG GAG TCA AAC GGT AAG AGA TGC CTA CTG CGT GCT ATT 583
 Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Gly Lys Arg Cys Leu Leu Arg Ala Ile
 180 185 190

TCT CAG TCT CTA AGA GGA GTG ATC AAG GTA TGT GGT CAC ACT 625
 Ser Gln Ser Leu Arg Gly Val Ile Lys Val Cys Gly His Thr
 195 200 205

TGAATCACGC AGGTGTGTGA AATCTCATTG TGAACAAATA AAAATCATGA AAGGAAAAAA 685
 AAAAAAAAAA AATCGATGTC GACTCGAGAT GTGGCTGCAG GTCGACTCTA GAGGATCCC 744 20

<210> 134
 <211> 1193
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221> 30
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 134
 CCTGCAG CAT CAA GTG TGG GCG GCG AAA GCC GGG GGC TTG AAG AAG GAC TCG CTG 55
 His Gln Val Trp Ala Ala Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu 40
 1 5 10 15

CTC ACC GTG CGC CTG GGC GCC TGG GGC CAC CCC GCC TTC CCC TCC TGC 103
 Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys
 20 25 30

GGG CGC CTC AAG GAG GAC AGC AGG TAC ATC TTC TTC ATG GAG CCC GAG 151
 Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu
 35 40 45

GCC AAC AGC AGC GGC GGG CCC GGC CGC CTT CCG AGC CTC CTT CCC CCC	199	
Ala Lys Ser Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu Pro Ser Leu Leu Pro Pro		
50 55 60		
TCT CGA GAC GGG CCG GAA CCT CAA GAA GGA GGT CAG CCG GGT GCT GTG	247	
Ser Arg Asp Gly Pro Glu Pro Gln Glu Gly Gly Gln Pro Gly Ala Val		
65 70 75 80		
CAA CGG TGC GCC TTG CCT CCC CGC TTG AAA GAG ATG AAG AGT CAG GAG	295	10
Gln Arg Cys Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu		
85 90 95		
TCT GTG GCA GGT TCC AAA CTA GTG CTT CGG TGC GAG ACC AGT TCT GAA	343	
Ser Val Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu		
100 105 110		
TAC TCC TCT CTC AAG TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AGT GAA TTA AGC	391	
Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Ser Glu Leu Ser		
115 120 125		20
CGA AAG AAC AAA CCA GAA AAC ATC AAG ATA CAG AAA AGG CCG GGG AAG	439	
Arg Lys Asn Lys Gly Gly Asn Ile Lys Ile Gln Lys Arg Pro Gly Lys		
130 135 140		
TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA GCG TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA TAT	487	
Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr		
145 150 155 160		
ATG TGC AAA GTG ATC AGC AAA CTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAC	535	30
Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn		
165 170 175		
ATC ACC ATT GTG GAG TCA AAC GCC ACA TCC ACA TCT ACA GCT GGG ACA	583	
Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Ala Gly Thr		
180 185 190		
AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT	631	
Ser His Leu Val Lys Ser Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn		
195 200 205		
GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC	679	40
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr		
210 215 220		
TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT	727	
Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn		
225 230 235 240		
GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA GAA AGT GCC CAA ATG AGT TTA CTG	775	

Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Ser Ala Gln Met Ser Leu Leu
245 250 255

GTG ATC GCT GCC AAA ACT ACG TAATGGCCAG CTTCTACAGT ACGTCCACTC 826
Val Ile Ala Ala Lys Thr Thr
260

CCTTTCTGTC TCTGCCTGAA TAGCGCATCT CAGTCGGTGC CGCTTTCTTG TTGCCGCATC 886
TCCCCTCAGA TTCCTCCTAG AGCTAGATGC GTTTTACCAG GTCTAACATT GACTGCCTCT 946
GCCTGTGCGA TGAGAACATT AACACAAGCG ATTGTATGAC TTCCTCTGTC CGTGACTAGT 1006
GGGCTCTGAG CTA CTCTG TAG GTGCGTAAGG CTCCAGTGT TCTGAAATTG ATCTTGAATT 1066
ACTGTGATAC GACATGATAG TCCCTCTCAC CCAGTGCAAT GACAATAAAG GCCTTGAAAA 1126
GTCAAAAAAA AAAAAAATAA AAAAAATCGA TGTCGACTCG AGATGTGGCT GCAGGTCGAC 1186
TCTAGAG 1193

10

<210> 135
<211> 1108
<212> DNA
<213>

20

<220>
<221>
<223> STRANDEDNESS: single

<220>
<221>
<223> TOPOLOGY: linear

<400> 135
CCTGCAG CAT CAA GTG TGG GCG GCG AAA GCC GGG GGC TTG AAG AAG GAC TCG CTG 55
His Gln Val Trp Ala Ala Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu
1 5 10 15

30

CTC ACC GTG CGC CTG GGC GCC TGG GGC CAC CCC GCC TTC CCC TCC TGC 103
Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys
20 25 30

GGG CGC CTC AAG GAG GAC AGC AGG TAC ATC TTC TTC ATG GAG CCC GAG 151
Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu
35 40 45

40

GCC AAC AGC AGC GGC GGG CCC GGC CGC CTT CCG AGC CTC CTT CCC CCC 199
Ala Asn Ser Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu Pro Ser Leu Leu Pro Pro
50 55 60

TCT CGA GAC GGG CCG GAA CCT CAA GAA GGA GGT CAG CCG GGT GCT GTG 247
Ser Arg Asp Gly Pro Glu Pro Gln Glu Gly Gly Gln Pro Gly Ala Val
65 70 75 80

CAA CGG TGC GCC TTG CCT CCC CGC TTG AAA GAG ATG AAG AGT CAG GAG	295	
Gln Arg Cys Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu		
85 90 95		
TCT GTG GCA GGT TCC AAA CTA GTG CTT CGG TGC GAG ACC AGT TCT GAA	343	
Ser Val Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu		
100 105 110		
TAC TCC TCT CTC AAG TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AGT GAA TTA AGC	391	
Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Ser Glu Leu Ser		10
115 120 125		
CGA AAG AAC AAA CCA GAA AAC ATC AAG ATA CAG AAA AGG CCG GGG AAG	439	
Arg Lys Asn Lys Pro Glu Asn Ile Lys Ile Gln Lys Arg Pro Pro Lys		
130 135 140		
TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA GCG TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA TAT	487	
Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr		
145 150 155 160		
ATG TGC AAA GTG ATC AGC AAA CTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAC	535	20
Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn		
165 170 175		
ATC ACC ATT GTG GAG TCA AAC GCC ACA TCC ACA TCT ACA GCT GGG ACA	583	
Ile Arg Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Ala Gly Thr		
180 185 190		
AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT	631	
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn		30
195 200 205		
GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC	679	
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr		
210 215 220		
TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC	727	
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr		
225 230 235 240		
GTA ATG GCC AGC TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT	775	40
Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro		
245 250 255		
GAA TAGCGCATCT CAGTCGGTGC CGCTTCTTG TTGCCGCATC TCCCCTCAGA TTCCGCCTAG	838	
Glu		
AGCTAGATGC GTTTTACCAG GTCTAACATT GACTGCCTCT GCCTGTCGCA TGAGAACATT	898	
AACACAAGCG ATTGTATGAC TTCCTCTGTC CGTGACTAGT GGGCTCTGAG CTA CTCTAG	958	

GTGCGTAAGG CTCCAGTGTT TCTGAAATTG ATCTTGAATT ACTGTGATAC GACATGATAG 1018
 TCCCTCTCAC CCAGTGCAAT GACAATAAAG GCCTTGAAAA GTCAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1078
 AAAAAATCGAT GTCGACTCGA GATGTGGCTG 1108

<210> 136
 <211> 559
 <212> DNA
 <213>

10

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (214)..(214)
 <223> N in positions 214 is unknown

20

<400> 136
 AGTTTCCCCC CCCAACTTGT CGGAACTCTG GGCTCGCGCG CAGGGCAGGA GCGGAGCGGC 60
 GCGGCTGCC CAGGCGATGC GAGCGCGGGC CGGACGGTAA TCGCCTCTCC CTCCTCGGGC 120
 TCGGAGCGCG CCGGACCGAG GCAGCGACAG GAGCGGACCG CGGCGGGAAC CGAGGACTCC 180
 CCAGCGGCGC GCCAGCAGGA GCCACCCCGC GAGNCGTGCG ACCGGGACGG AGCGCCCGCC 240
 AGTCCCAGGT GGCCCGGACC GCACGTTGCG TCCCGCGCT CCCC GCCGGC GACAGGAGAC 300
 GCTCCCCCCC ACGCCGCGCG CGCCTCGGCC CGGTGCTGG CCCGCTCCA CTCCGGGGAC 360
 AAACTTTTCC CGAAGCCGAT CCCAGCCCTC GGACCCAAAC TTGTGCGCGC TCGCCTTCGC 420
 CGGGAGCCGT CCGCGCAGAG CGTGCCTTC TCGGGCGAG ATG TCG GAG CGC AGA 474
 Met Ser Glu Arg Arg
 1 5

30

GAA GGC AAA GGC AAG GGG AAG GGC GGC AAG AAG GAC CGA GGC TCC GGC 522
 Glu Gly Lys Gly Lys Gly Lys Gly Gly Lys Lys Asp Arg Gly Ser Gly
 10 15 20

40

AAG AAG CCC GTG CCC GCG GCT GGC GGC CCG AGC CCA G 559
 Lys Lys Pro Val Pro Ala Ala Gly Gly Pro Ser Pro Ala
 25 30

<210> 137
 <211> 252
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

 <220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

 <220>
 <221> misc_feature 10
 <222> (8)..(8)
 <223> N in positions 8 could be either A or G

 <400> 137
 CC CAT CAN GTG TGG GCG GCG AAA GCC GGG GGC TTG AAG AAG GAC TCG 47
 His Gln Val Trp Ala Ala Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser
 1 5 10 15

 CTG CTC ACC GTG CGC CTG GGC GCC TGG GGC CAC CCC GCC TTC CCC TCC 95
 Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser 20
 20 25 30

 TGC GGG CGC CTC AAG GAG GAC AGC AGG TAC ATC TTC TTC ATG GAG CCC 143
 Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro
 35 40 45

 GAG GCC AAC AGC AGC GGC GGG CCC GGC CGC CTT CCG AGC CTC CTT CCC 191
 Glu Ala Asn Ser Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu Pro Ser Leu Leu Pro
 50 55 60

 CCC TCT CGA GAC GGG CCG GAA CCT CAA GAA GGA GGT CAG CCG GGT GCT 239
 Pro Ser Arg Asp Gly Pro Glu Pro Gln Glu Gly Gly Gln Pro Gly Ala
 65 70 75

 GTG CAA CGG TGC G 252
 Val Gln Arg Cys
 80

 <210> 138 40
 <211> 178
 <212> DNA
 <213>

 <220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

 <220>

<210> 140
 <211> 417
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220> 10
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 140
 TCTAAAATA CAGAGACTGT ATTTTCATGA TCATCATAGT TCTGTGAAAT ATACTTAAAC 60
 CGCTTTGGTC CTGATCTTGT AGG AAG TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA GCG 110
 Lys Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala
 1 5

TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA TAT ATG TGC AAA GTG ATC AGC AAA CTA 158 20
 Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu
 10 15 20 25

GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAC ATC ACC ATT GTG GAG TCA AAC GGT 206
 Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Gly
 30 35 40

AAG AGA TGC CTA CTG CGT GCT ATT TCT CAG TCT CTA AGA GGA GTG ATC 254
 Lys Arg Cys Leu Leu Arg Ala Ile Ser Gln Ser Leu Arg Gly Val Ile 30
 45 50 55

AAG GTA TGT GGT CAC ACT TGAATCACGC AGGTGTGTGA AATCTCATTG 302
 Lys Val Cys Gly His Thr
 60

TGAACAAATA AAAATCATGA AAGGAAAAT CTATGTTTGA AATATCTTAT GGGTCCTCCT 362
 GTAAAGCTCT TCACTCCATA AGGTGAAATA GACCTGAAAT ATATATAGAT TATTT 417

<210> 141 40
 <211> 102
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 141

AG ATC ACC ACT GGC ATG CCA GCC TCA ACT GAG ACA GCG TAT GTG TCT 47
 Glu Ile Thr Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu Thr Ala Tyr Val Ser
 1 5 10 15

TCA GAG TCT CCC ATT AGA ATA TCA GTA TCA ACA GAA GGA ACA AAT ACT 95 10
 Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr Glu Gly Thr Asn Thr
 20 25 30

TCT TCA T 102
 Ser Ser Ser
 35

<210> 142

<211> 69

<212> DNA

<213>

20

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

30

<400> 142

AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT GTG CCC 48
 Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn Val Pro
 1 5 10 15

ATG AAA GTC CAA ACC CAA GAA 69
 Met Lys Val Gln Thr Gln Glu
 20

40

<210> 143

<211> 60

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 143

AAG	TGC	CCA	AAT	GAG	TTT	ACT	GGT	GAT	CGC	TGC	CAA	AAC	TAC	GTA	ATG	48
Lys	Cys	Pro	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr	Val	Met	
1				5				10					15			

10

GCC	AGC	TTC	TAC													60
Ala	Ser	Phe	Tyr													
			20													

<210> 144

<211> 36

<212> DNA

<213>

20

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 144

AGT	ACG	TCC	ACT	CCC	TTT	CTG	TCT	CTG	CCT	GAA	TAG					36
Ser	Thr	Ser	Thr	Pro	Phe	Leu	Ser	Leu	Pro	Glu						
1				5				10								

30

<210> 145

<211> 27

<212> DNA

<213>

40

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 145
 AAG CAT CTT GGG ATT GAA TTT ATG GAG 27
 Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu
 1 5

<210> 146
 <211> 569
 <212> DNA
 <213> 10

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 146 20
 AAA GCG GAG GAG CTC TAC CAG AAG AGA GTG CTC ACC ATT ACC GGC ATT 48
 Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln Lys Arg Val Leu Thr Ile Thr Gly Ile
 1 5 10 15

TGC ATC GCG CTG CTC GTG GTT GGC ATC ATG TGT GTG GTG GTC TAC TGC 96
 Cys Ile Ala Leu Leu Val Val Gly Ile Met Cys Val Val Val Tyr Cys
 20 25 30

AAA ACC AAG AAA CAA CGG AAA AAG CTT CAT GAC CGG CTT CGG CAG AGC 144
 Lys Thr Lys Lys Gln Arg Lys Lys Leu His Asp Arg Leu Arg Gln Ser 30
 35 40 45

CTT CGG TCT GAA AGA AAC ACC ATG ATG AAC GTA GCC AAC GGG CCC CAC 192
 Leu Arg Ser Glu Arg Asn Thr Met Met Asn Val Ala Asn Gly Pro His
 50 55 60

CAC CCC AAT CCG CCC CCC GAG AAC GTG CAG CTG GTG AAT CAA TAC GTA 240
 His Pro Asn Pro Pro Pro Glu Asn Val Gln Leu Val Asn Gln Tyr Val
 65 70 75 80

TCT AAA AAT GTC ATC TCT AGC GAG CAT ATT GTT GAG AGA GAG GCG GAG 288
 Ser Lys Asn Val Ile Ser Ser Glu His Ile Val Glu Arg Glu Ala Glu 40
 85 90 95

AGC TCT TTT TCC ACC AGT CAC TAC ACT TCG ACA GCT CAT CAT TCC ACT 336
 Ser Ser Phe Ser Thr Ser His Tyr Thr Ser Thr Ala His His Ser Thr
 100 105 110

ACT GTC ACT CAG ACT CCC AGT CAC AGC TGG AGC AAT GGA CAC ACT GAA 384

Thr Val Thr Gln Thr Pro Ser His Ser Trp Ser Asn Gly His Thr Glu		
115	120	125
AGC ATC ATT TCG GAA AGC CAC TCT GTC ATC GTG ATG TCA TCC GTA GAA	432	
Ser Ile Ile Ser Glu Ser His Ser Val Ile Val Met Ser Ser Val Glu		
130	135	140
AAC AGT AGG CAC AGC AGC CCG ACT GGG GGC CCG AGA GGA CGT CTC AAT	480	
Asn Ser Arg His Ser Ser Pro Thr Gly Gly Pro Arg Gly Arg Leu Asn		
145	150	155
		160
		10
GGC TTG GGA GGC CCT CGT GAA TGT AAC AGC TTC CTC AGG CAT GCC AGA	528	
Gly Leu Gly Gly Pro Arg Glu Cys Asn Ser Phe Leu Arg His Ala Arg		
	165	170
		175
GAA ACC CCT GAC TCC TAC CGA GAC TCT CCT CAT AGT G AAAG	569	
Glu Thr Pro Asp Ser Tyr Arg Asp Ser Pro His Ser		
	180	185
<210> 147		20
<211> 730		
<212> DNA		
<213>		
<220>		
<221>		
<223> STRANDEDNESS: single		
<220>		
<221>		30
<223> TOPOLOGY: linear		
<400> 147		
G TAT GTA TCA GCA ATG ACC ACC CCG GCT CGT ATG TCA CCT GTA GAT	46	
Tyr Val Ser Ala Met Thr Thr Pro Ala Arg Met Ser Pro Val Asp		
1	5	10
		15
TTC CAC ACG CCA AGC TCC CCC AAG TCA CCC CCT TCG GAA ATG TCC CCG	94	
Phe His Thr Pro Ser Ser Pro Lys Ser Pro Pro Ser Glu Met Ser Pro		
	20	25
		30
		40
CCC GTG TCC AGC ACG ACG GTC TCC ATG CCC TCC ATG GCG GTC AGT CCC	142	
Pro Val Ser Ser Thr Thr Val Ser Met Pro Ser Met Ala Val Ser Pro		
	35	40
		45
TTC GTG GAA GAG GAG AGA CCC CTG CTC CTT GTG ACG CCA CCA CGG CTG	190	
Phe Val Glu Glu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Val Thr Pro Pro Arg Leu		
	50	55
		60

CGG GAG AAG TAT GAC CAC CAC GCC CAG CAA TTC AAC TCG TTC CAC TGC	238	
Arg Glu Lys Tyr Asp His His Ala Gln Gln Phe Asn Ser Phe His Cys		
65 70 75		
AAC CCC GCG CAT GAG AGC AAC AGC CTG CCC CCC AGC CCC TTG AGG ATA	286	
Asn Pro Ala His Glu Ser Asn Ser Leu Pro Pro Ser Pro Leu Arg Ile		
80 85 90 95		
GTG GAG GAT GAG GAA TAT GAA ACG ACC CAG GAG TAC GAA CCA GCT CAA	334	
Val Glu Asp Glu Glu Tyr Glu Thr Thr Gln Glu Tyr Glu Pro Ala Gln		10
100 105 110		
GAG CCG GTT AAG AAA CTC ACC AAC AGC AGC CGG CGG GCC AAA AGA ACC	382	
Glu Pro Val Lys Lys Leu Thr Asn Ser Ser Arg Arg Ala Lys Arg Thr		
115 120 125		
AAG CCC AAT GGT CAC ATT GCC CAC AGG TTG GAA ATG GAC AAC AAC ACA	430	
Lys Pro Asn Gly His Ile Ala His Arg Leu Glu Met Asp Asn Asn Thr		
130 135 140		
GGC GCT GAC AGC AGT AAC TCA GAG AGC GAA ACA GAG GAT GAA AGA GTA	478	
Gly Ala Asp Ser Ser Asn Ser Glu Ser Glu Thr Glu Asp Glu Arg Val		20
145 150 155		
GGA GAA GAT ACG CCT TTC CTG GCC ATA CAG AAC CCC CTG GCA GCC AGT	526	
Gly Glu Asp Thr Pro Phe Leu Ala Ile Gln Asn Pro Leu Ala Ala Ser		
160 165 170 175		
CTC GAG GCG GCC CCT GCC TTC CGC CTG GTC GAC AGC AGG ACT AAC CCA	574	
Leu Glu Ala Ala Pro Ala Phe Arg Leu Val Asp Ser Arg Thr Asn Pro		30
180 185 190		
ACA GGC GGC TTC TCT CCG CAG GAA GAA TTG CAG GCC AGG CTC TCC GGT	622	
Thr Gly Gly Phe Ser Pro Gln Glu Glu Leu Gln Ala Arg Leu Ser Gly		
195 200 205		
GTA ATC GCT AAC CAA GAC CCT ATC GCT GTC TAAAACCGAA ATACACCCAT	672	
Val Ile Ala Asn Gln Asp Pro Ile Ala Val		
210 215		
AGATTCACCT GTAAAACCTTT ATTTTATATA ATAAAGTATT CCACCTTAAA TTAAACAA	730	
		40

<210> 148
 <211> 1652
 <212> DNA
 <213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 148

AGTTTCCCC	CCCAACTTGT	CGGAACTCTG	GGCTCGCGCG	CAGGGCAGGA	GCGGAGCGGC	60	10
GGCGGCTGCC	CAGGCGATGC	GAGCGCGGGC	CGGACGGTAA	TCGCCTCTCC	CTCCTCGGGC	120	
TGCGAGCGCG	CCGGACCGAG	GCAGCGACAG	GAGCGGACCG	CGGCGGGAAC	CGAGGACTCC	180	
CCAGCGGCGC	GCCAGCAGGA	GCCACCCCGC	GAGCGTGCGA	CCGGGACGGA	GCGCCCGCCA	240	
GTCCAGGTG	GCCCGGACCG	CACGTTGCGT	CCCCGCGCTC	CCCGCCGGCG	ACAGGAGACG	300	
CTCCCCCCA	CGCCGCGCGC	GCCTCGGCC	GGTCGCTGGC	CCGCCTCCAC	TCCGGGGACA	360	
AACTTTTCCC	GAAGCCGATC	CCAGCCCTCG	GACCCAAACT	TGTCGCGCGT	CGCCTTCGCC	420	
GGGAGCCGTC	CGCGCAGAGC	GTGCACTTCT	CGGGCGAG	ATG TCG GAG CGC AGA		473	
				Met Ser Glu Arg Arg			
				1	5		
GAA GGC AAA GGC AAG GGG AAG GGC GGC AAG AAG GAC CGA GGC TCC GGG	521	20					
Glu Gly Lys Gly Lys Gly Lys Gly Gly Lys Lys Asp Arg Gly Ser Gly							
10 15 20							
AAG AAG CCC GTG CCC GCG GCT GGC GGC CCG AGC CCA GCC TTG CCT CCC	569						
Lys Lys Pro Val Pro Ala Ala Gly Gly Pro Ser Pro Ala Leu Pro Pro							
25 30 35							
CGC TTG AAA GAG ATG AAG ATG CAG GAG TCT GTG GCA GGT TCC AAA CTA	617	30					
Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Val Ala Gly Ser Lys Leu							
40 45 50							
GTG CTT CGG TGC GAG ACC AGT TCT GAA TAC TCC TCT CTC AAG TTC AAG	665						
Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys							
55 60 65							
TGG TTC AAG AAT GGG AGT GAA TTA AGC CGA AAG AAC AAA CCA CAA AAC	713						
Trp Phe Lys Asn Gly Ser Glu Leu Ser Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn							
70 75 80 85							
ATC AAG ATA CAG AAA AGG CCG GGG AAG TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA	761	40					
Ile Lys Ile Gln Lys Arg Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys							
90 95 100							
GCG TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA TAT ATG TGC AAA GTG ATC AGC AAA	809						
Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys							
105 110 115							
CTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAC ATC ACC ATT GTG GAG TCA AAC	857						
Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn							

120	125	130		
GAG ATC ACC ACT GGC ATG CCA GCC TCA ACT GAG ACA GCG TAT GTG TCT			905	
Glu Ile Thr Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu Thr Ala Tyr Val Ser				
135	140	145		
TCA GAG TCT CCC ATT AGA ATA TCA GTA TCA ACA GAA GGA ACA AAT ACT			953	
Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr Glu Gly Thr Asn Thr				
150	155	160		
TCT TCA TCC ACA TCC ACA TCT ACA GCT GGG ACA AGC CAT CTT GTC AAG			1001	10
Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Ala Gly Thr Ser His Leu Val Lys				
170	175	180		
TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT GGA GGC GAG TGC TTC			1049	
Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe				
185	190	195		
ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC TTG TGC AAG TGC CCA			1097	
Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro				20
200	205	210		
AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC			1145	
Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe				
215	220	225		
TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA TAGGCGCATG			1191	
Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu				
230	235	240		
CTCAGTCGGT GCCGCTTTCT TGTTGCCGCA TCTCCCCTCA GATTCAACCT AGAGCTAGAT			1251	30
GCGTTTTACC AGGTCTAACA TTGACTGCCT CTGCCTGTCTG CATGAGAACA TTAACACAAG			1311	
CGATTGTATG ACTTCCTCTG TCCGTGACTA GTGGGCTCTG AGCTACTCGT AGGTGCGTAA1			371	
GGCTCCAGTG TTTCTGAAAT TGATCTTGAA TTAAGTGTGAT ACGACATGAT AGTCCCTCTC			1431	
ACCCAGTGCA ATGACAATAA AGGCCTTGAA AAGTCTCACT TTTATTGAGA AAATAAAAAAT			1491	
CGTTCCACGG GACAGTCCCT CTTCTTTATA AAATGACCCT ATCCTTGAAA AGGAGGTGTG			1551	
TTAAGTTGTA ACCAGTACAC ACTTGAAATG ATGGTAAGTT CGCTTCGGTT CAGAATGTGT			1611	
TCTTTCTGAC AAATAAACAG AATAAAAAAA AAAAAAAAAA A			1652	
<210> 149				40
<211> 1140				
<212> DNA				
<213>				
<220>				
<221>				
<223> STRANDEDNESS: single				
<220>				

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 149

CAT CAN GTG TGG GCG GCG AAA GCC GGG GGC TTG AAG AAG GAC TCG CTG	48	
His Gln Val Trp Ala Ala Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu		
1 5 10 15		
CTC ACC GTG CGC CTG GGC GCC TGG GGC CAC CCC GCC TTC CCC TCC TGC	96	10
Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys		
20 25 30		
GGG CGC CTC AAG GAG GAC AGC AGG TAC ATC TTC TTC ATG GAG CCC GAG	144	
Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu		
35 40 45		
GCC AAC AGC AGC GGC GGG CCC GGC CGC CTT CCG AGC CTC CTT CCC CCC	192	
Ala Asn Ser Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu Pro Ser Leu Leu Pro Pro		
50 55 60		20
TCT CGA GAC GGG CCG GAA CCT CAA GAA GGA GGT CAG CCG GGT GCT GTG	240	
Ser Arg Asp Gly Pro Glu Pro Gln Glu Gly Gly Gln Pro Gly Ala Val		
65 70 75 80		
CAA CGG TGC GCC TTG CCT CCC CGC TTG AAA GAG ATG AAG AGT CAG GAG	288	
Gln Arg Cys Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu		
85 90 95		
TCT GTG GCA GGT TCC AAA CTA GTG CTT CGG TGC GAG ACC AGT TCT GAA	336	
Ser Val Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu		
100 105 110		30
TAC TCC TCT CTC AAG TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AGT GAA TTA AGC	384	
Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Ser Glu Leu Ser		
115 120 125		
CGA AAG AAC AAA CCA GAA AAC ATC AAG ATA CAG AAA AGG CCG GGG AAG	432	
Arg Lys Asn Lys Pro Glu Asn Ile Lys Ile Gln Lys Arg Pro Gly Lys		
130 135 140		
TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA GCG TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA TAT	480	
Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr		
145 150 155 160		40
ATG TGC AAA GTG ATC AGC AAA CTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAC	528	
Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn		
165 170 175		
ATC ACC ATT GTG GAG TCA AAC GCC ACA TCC ACA TCT ACA GCT GGG ACA	576	

Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Ala Gly Thr		
180	185	190
AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT	624	
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn		
195	200	205
GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC	672	
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr		
210	215	220
TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT	720	
Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn		
225	230	235
GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA GAA AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT	768	
Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr		
245	250	255
GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC TAC AGT ACG TCC	816	
Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser		
260	265	270
ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA TAGCGCATCT CAGTCGGTGC CGCTTTCTTG	870	
Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu		
275	280	
TTGCCGCATC TCCCCTCAGA TTCCNCCTAG AGCTAGATGC GTTTTACCAG GTCTAACATT	930	
GACTGCCTCT GCCTGTCGCA TGAGAACATT AACACAAGCG ATTGTATGAC TTCCTCTGTC	990	
CGTGACTAGT GGGCTCTGAG CTACTCGTAG GTGCGTAAGG CTCCAGTGTT TCTGAAATTG	1050	
ATCTTGAATT ACTGTGATAC GACATGATAG TCCCTCTCAC CCAGTGCAAT GACAATAAAG	1110	
GCCTTAAAA GTCAAAAAA AAAAAAAAAA	1140	

<210> 150

<211> 1764

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 150

G AAG TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA GCG TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA 49

CAC	TAC	ACT	TCG	ACA	GCT	CAT	CAT	TCC	ACT	ACT	GTC	ACT	CAG	ACT	CCC	673
His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	His	His	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	
	210					215					220					
AGT	CAC	AGC	TGG	AGC	AAT	GGA	CAC	ACT	GAA	AGC	ATC	ATT	TCG	GAA	AGC	721
Ser	His	Ser	Trp	Ser	Asn	Gly	His	Thr	Glu	Ser	Ile	Ile	Ser	Glu	Ser	
225					230					235					240	
CAC	TCT	GTC	ATC	GTG	ATG	TCA	TCC	GTA	GAA	AAC	AGT	AGG	CAC	AGC	AGC	769
His	Ser	Val	Ile	Val	Met	Ser	Ser	Val	Glu	Asn	Ser	Arg	His	Ser	Ser	10
				245					250					255		
CCG	ACT	GGG	GGC	CCG	AGA	GGA	CGT	CTC	AAT	GGC	TTG	GGA	GGC	CCT	CGT	817
Pro	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Gly	Gly	Pro	Arg	
		260						265						270		
GAA	TGT	AAC	AGC	TTC	CTC	AGG	CAT	GCC	AGA	GAA	ACC	CCT	GAC	TCC	TAC	865
Glu	Cys	Asn	Ser	Phe	Leu	Arg	His	Ala	Arg	Glu	Thr	Pro	Asp	Ser	Tyr	
		275					280					285				
CGA	GAC	TCT	CCT	CAT	AGT	GAA	AGA	CAT	AAC	CTT	ATA	GCT	GAG	CTA	AGG	913
Arg	Asp	Ser	Pro	His	Ser	Glu	Arg	His	Asn	Leu	Ile	Ala	Glu	Leu	Arg	20
	290					295					300					
AGA	AAC	AAG	GCC	CAC	AGA	TCC	AAA	TGC	ATG	CAG	ATC	CAG	CTT	TCC	GCA	961
Arg	Asn	Lys	Ala	His	Arg	Ser	Lys	Cys	Met	Gln	Ile	Gln	Leu	Ser	Ala	
305					310					315					320	
ACT	CAT	CTT	AGA	GCT	TCT	TCC	ATT	CCC	CAT	TGG	GCT	TCA	TTC	TCT	AAG	1009
Thr	His	Leu	Arg	Ala	Ser	Ser	Ile	Pro	His	Trp	Ala	Ser	Phe	Ser	Lys	30
				325					330					335		
ACC	CCT	TGG	CCT	TTA	GGA	AGG	TAT	GTA	TCA	GCA	ATG	ACC	ACC	CCG	GCT	1057
Thr	Pro	Trp	Pro	Leu	Gly	Arg	Tyr	Val	Ser	Ala	Met	Thr	Thr	Pro	Ala	
			340					345						350		
CGT	ATG	TCA	CCT	GTA	GAT	TTC	CAC	ACG	CCA	AGC	TCC	CCC	AAG	TCA	CCC	1105
Arg	Met	Ser	Pro	Val	Asp	Phe	His	Thr	Pro	Ser	Ser	Pro	Lys	Ser	Pro	
		355					360						365			
CCT	TCG	GAA	ATG	TCC	CCG	CCC	GTG	TCC	AGC	ACG	ACG	GTC	TCC	ATG	CCC	1153
Pro	Ser	Glu	Met	Ser	Pro	Pro	Val	Ser	Ser	Thr	Thr	Val	Ser	Met	Pro	40
		370				375						380				
TCC	ATG	GCG	GTC	AGT	CCC	TTC	GTG	GAA	GAG	GAG	AGA	CCC	CTG	CTC	CTT	1201
Ser	Met	Ala	Val	Ser	Pro	Phe	Val	Glu	Glu	Glu	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	
385					390					395					400	
GTG	ACG	CCA	CCA	CGG	CTG	CGG	GAG	AAG	TAT	GAC	CAC	CAC	GCC	CAG	CAA	1249

Val Thr Pro Pro Arg Leu Arg Glu Lys Tyr Asp His His Ala Gln Gln		
405	410	415
TTC AAC TCG TTC CAC TGC AAC CCC GCG CAT GAG AGC AAC AGC CTG CCC	1297	
Phe Asn Ser Phe His Cys Asn Pro Ala His Glu Ser Asn Ser Leu Pro		
420	425	430
CCC AGC CCC TTG AGG ATA GTG GAG GAT GAG GAA TAT GAA ACG ACC CAG	1345	
Pro Ser Pro Leu Arg Ile Val Glu Asp Glu Glu Tyr Glu Thr Thr Gln		
435	440	445
GAG TAC GAA CCA GCT CAA GAG CCG GTT AAG AAA CTC ACC AAC AGC AGC	1393	
Glu Tyr Glu Pro Ala Gln Glu Pro Val Lys Lys Leu Thr Asn Ser Ser		
450	455	460
CGG CGG GCC AAA AGA ACC AAG CCC AAT GGT CAC ATT GCC CAC AGG TTG	1441	
Arg Arg Ala Lys Arg Thr Lys Pro Asn Gly His Ile Ala His Arg Leu		
465	470	475
GAA ATG GAC AAC AAC ACA GGC GCT GAC AGC AGT AAC TCA GAG AGC GAA	1489	
Glu Met Asp Asn Asn Thr Gly Ala Asp Ser Ser Asn Ser Glu Ser Glu		
485	490	495
ACA GAG GAT GAA AGA GTA GGA GAA GAT ACG CCT TTC CTG GCC ATA CAG	1537	
Thr Glu Asp Glu Arg Val Gly Glu Asp Thr Pro Phe Leu Ala Ile Gln		
500	505	510
AAC CCC CTG GCA GCC AGT CTC GAG GCG GCC CCT GCC TTC CGC CTG GTC	1585	
Asn Pro Leu Ala Ala Ser Leu Glu Ala Ala Pro Ala Phe Arg Leu Val		
515	520	525
GAC AGC AGG ACT AAC CCA ACA GGC GGC TTC TCT CCG CAG GAA GAA TTG	1633	
Asp Ser Arg Thr Asn Pro Thr Gly Gly Phe Ser Pro Gln Glu Glu Leu		
530	535	540
CAG GCC AGG CTC TCC GGT GTA ATC GCT AAC CAA GAC CCT ATC GCT GTC	1681	
Gln Ala Arg Leu Ser Gly Val Ile Ala Asn Gln Asp Pro Ile Ala Val		
545	550	555
TAAAACCGAA ATACACCCAT AGATTCACCT GTAAAACCTTT ATTTTATATA ATAAAGTATT	1741	
CCACCTTAAA TTAAACAAAA AAA	1764	

<210> 151
 <211> 50
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 151

Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	Gly	Gly	Glu	Cys
1				5					10					15	

Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	Leu	Cys	Lys	Cys
			20					25					30		

10

Pro	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr	Val	Met	Ala	Ser
		35					40					45			

Phe	Tyr
	50

<210> 152

<211> 50

<212> PRT

<213>

20

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 152

Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	Gly	Gly	Glu	Cys
1				5					10					15	

30

Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	Leu	Cys	Lys	Cys
			20					25					30		

Gln	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Ala	Arg	Cys	Thr	Glu	Asn	Val	Pro	Met	Lys
		35					40					45			

Val	Gln
	50

40

<210> 153

<211> 46

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 153

Glu Cys Leu Arg Lys Tyr Lys Asp Phe Cys Ile His Gly Glu Cys Lys
1 5 10 15

Tyr Val Lys Glu Leu Arg Ala Pro Ser Cys Lys Cys Gln Gln Glu Tyr
20 25 30

10

Phe Gly Glu Arg Cys Gly Glu Lys Ser Asn Lys Thr His Ser
35 40 45

<210> 154

<211> 198

<212> DNA

<213>

20

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 154

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT 48
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
1 5 10 15

30

GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC 96
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
20 25 30

TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC 144
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
35 40 45

40

GTA ATG GCC AGC TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT 192
Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro
50 55 60

GAA TAG

Glu

65

198

<210> 155
 <211> 192
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220> 10
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 155
 AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT 48
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15

GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC 96 20
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30

TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT 144
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45

GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA GAA AAA GCG GAG GAG CTC TAC TAA 192
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr
 50 55 60 30

<210> 156
 <211> 183
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single 40

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 156
 AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT 48
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1	5	10	15		
GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC				96	
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr					
	20	25	30		
TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC				144	
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr					
	35	40	45		
GTA ATG GCC AGC TTC TAC AAA GCG GAG GAG CTC TAC TAA				183	10
Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr					
	50	55	60		
<210> 157					
<211> 210					
<212> DNA					
<213>					20
<220>					
<221>					
<223> STRANDEDNESS: single					
<220>					
<221>					
<223> TOPOLOGY: linear					
<400> 157					30
AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT				48	
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn					
1	5	10	15		
GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC				96	
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr					
	20	25	30		
TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC				144	
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr					40
	35	40	45		
GTA ATG GCC AGC TTC TAC AAG CAT CTT GGG ATT GAA TTT ATG GAG AAA				192	
Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Lys					
	50	55	60		
GCG GAG GAG CTC TAC TAA				210	
Ala Glu Glu Leu Tyr					
65					

<210> 158
 <211> 267
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220> 10
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 158
 AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT 48
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15

GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC 96 20
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30

TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT 144
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45

GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA GAA AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT 192
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr 30
 50 55 60

GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC TAC AGT ACG TCC 240
 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser
 65 70 75 80

ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA TAG 267
 Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 85

<210> 159
 <211> 252
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

40

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 159

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT 48
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15

GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC 96
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30

TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT 144
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45

GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA GAA AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT 192
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr
 50 55 60

GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC TAC AAA GCG GAG 240
 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu
 65 70 75 80

GAG CTC TAC TAA 252
 Glu Leu Tyr

<210> 160

<211> 128

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 160

CC ACA TCC ACA TCT ACA GCT GGG ACA AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA 47
 Thr Ser Thr Ser Thr Ala Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala
 1 5 10 15

GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG 95

10

20

30

40

Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val
 20 25 30

AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC TTG TGC 128
 Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu
 35 40

<210> 161

<211> 141

10

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

20

<400> 161

A CAT AAC CTT ATA GCT GAG CTA AGG AGA AAC AAG GCC CAC AGA TCC 46
 His Asn Leu Ile Ala Glu Leu Arg Arg Asn Lys Ala His Arg Ser
 1 5 10 15

AAA TGC ATG CAG ATC CAG CTT TCC GCA ACT CAT CTT AGA GCT TCT TCC 94
 Lys Cys Met Gln Ile Gln Leu Ser Ala Thr His Leu Arg Ala Ser Ser
 20 25 30

30

ATT CCC CAT TGG GCT TCA TTC TCT AAG ACC CCT TGG CCT TTA GGA AG 141
 Ile Pro His Trp Ala Ser Phe Ser Lys Thr Pro Trp Pro Leu Gly Arg
 35 40 45

<210> 162

<211> 24

<212> PRT

<213>

40

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> Xaa in position 15 is unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa in position 22 is unknown

<400> 162

Ala Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Xaa Phe
 1 5 10 15 10

Met Val Lys Asp Leu Xaa Asn Pro
 20

<210> 163
 <211> 745
 <212> DNA
 <213>

20

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 163 30

ATG AGA TGG CGA CGC GCC CCG CGC CGC TCC GGG CGT CCC GGC CCC CGG 48
 Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg
 1 5 10 15

GCC CAG CGC CCC GGC TCC GCC GCC CGC TCG TCG CCG CCG CTG CCG CTG 96
 Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu
 20 25 30

CTG CCA CTA CTG CTG CTG CTG GGG ACC GCG GCC CTG GCG CCG GGG GCG 144
 Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala 40
 35 40 45

GCG GCC GGC AAC GAG GCG GCT CCC GCG GGG GCC TCG GTG TGC TAC TCG 192
 Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser
 50 55 60

TCC CCG CCC AGC GTG GGA TCG GTG CAG GAG CTA GCT CAG CGC GCC GCG 240
 Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala
 65 70 75 80

GTG GTG ATC GAG GGA AAG GTG CAC CCG CAG CGG CGG CAG CAG GGG GCA	288	
Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala		
85 90 95		
CTC GAC AGG AAG GCG GCG GCG GCG GCG GGC GAG GCA GGG GCG TGG GGC	336	
Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly		
100 105 110		
GGC GAT CGC GAG CCG CCA GCC GCG GGC CCA CGG GCG CTG GGG CCG CCC	384	10
Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro		
115 120 125		
GCC GAG GAG CCG CTG CTC GCC GCC AAC GGG ACC GTG CCC TCT TGG CCC	432	
Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro		
130 135 140		
ACC GCC CCG GTG CCC AGC GCC GGC GAG CCC GGG GAG GAG GCG CCC TAT	480	
Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr		
145 150 155 160		20
CTG GTG AAG GTG CAC CAG GTG TGG GCG GTG AAA GCC GGG GGC TTG AAG	528	
Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys		
165 170 175		
AAG GAC TCG CTG CTC ACC GTG CGC CTG GGG ACC TGG GGC CAC CCC GCC	576	
Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Thr Trp Gly His Pro Ala		
180 185 190		
TTC CCC TCC TGC GGG AGG CTC AAG GAG GAC AGC AGG TAC ATC TTC TTC	624	30
Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe		
195 200 205		
ATG GAG CCC GAC GCC AAC AGC ACC AGC CGC GCG CCG GCC GCC TTC CGA	672	
Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg		
210 215 220		
GCC TCT TTC CCC CCT CTG GAG ACG GGC CGG AAC CTC AAG AAG GAG GTC	720	
Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val		
225 230 235 240		
AGC CGG GTG CTG TGC AAG CGG TGC G	745	40
Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys		
245		

<210> 164

<211> 12

<212> PRT

<213>

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa in position 1 is unknown

<400> 164:

Xaa	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asp	Val	Glu	Lys
1			5						10		

10

<210> 165

<211> 5

<212> PRT

<213>

20

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa in position 1 is unknown

<400> 165

Xaa	Leu	Val	Leu	Arg
1			5	

30

<210> 166

<211> 11

<212> PRT

<213>

40

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa in position 1 is unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa in position 2 is unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa in position 3 is unknown

10

<400> 166

Xaa Xaa Xaa Tyr Pro Gly Gln Ile Thr Ser Asn
 1 5 10

<210> 167
 <211> 60
 <212> DNA
 <213>

20

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> N in positions 25 is unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> N in positions 36 is unknown

40

<400> 167
 ATAGGGAAGG GCGGGGAAG GGTCNCCCTC NGCAGGGCCG GGCTTGCCTC TGGAGCCTCT 60

<210> 168
 <211> 18
 <212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> N in positions 16 is unknown

<400> 168

TTTACACATA TATTCNCC

18

<210> 169

<211> 21

<212> PRT

<213>

20

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 169

30

Glu	Thr	Gln	Pro	Asp	Pro	Gly	Gln	Ile	Leu	Lys	Lys	Val	Pro	Met	Val
1				5					10					15	

Ile	Gly	Ala	Tyr	Thr
				20

<210> 170

<211> 422

<212> PRT

<213>

40

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 170

Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg
 1 5 10 15
 Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu
 20 25 30
 Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala
 35 40 45
 Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser 10
 50 55 60
 Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala
 65 70 75 80
 Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala
 85 90 95
 Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly
 100 105 110 20
 Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro
 115 120 125
 Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro
 130 135 140
 Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr
 145 150 155 160
 Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys 30
 165 170 175
 Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Thr Trp Gly His Pro Ala
 180 185 190
 Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe
 195 200 205
 Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg 40
 210 215 220
 Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val
 225 230 235 240
 Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu
 245 250 255
 Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys

260	265	270	
Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn 275	280	285	
Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln 290	295	300	
Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala 305	310	315	10
Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp 325	330	335	
Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr 340	345	350	
Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys 355	360	365	
Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser 370	375	380	20
Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp 385	390	395	400
Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro 405	410	415	
Phe Leu Ser Leu Pro Glu 420			30
<210> 171			
<211> 69			
<212> PRT			
<213>			
<220>			
<221>			
<223> TOPOLOGY: linear			40
<400> 171			
Met Ser Glu Arg Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys 1	5	10	15
Glu Arg Gly Ser Gly Lys Lys Pro Glu Ser Ala Ala Gly Ser Gln Ser 20	25	30	

Pro Arg Glu Ile Ile Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu Gly Ala Tyr
 35 40 45

Val Ser Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr Glu Gly Ala
 50 55 60

Asn Thr Ser Ser Ser
 65

10

<210> 172
 <211> 19
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

20

<400> 172

Arg Lys Gly Asp Val Pro Gly Pro Arg Val Lys Ser Ser Arg Ser Thr
 1 5 10 15

Thr Thr Ala

30

<210> 173
 <211> 231
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

40

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 173
 CGCGAGCGCC TCAGCGCGGC CGCTCGCTCT CCCCCTCGAG GGACAAACTT TTCCCAAACC 60
 CGATCCGAGC CCTTGGACCA AACTCGCCTG CGCCGAGAGC CGTCCGCGTA GAGCGCTCCG 120
 TCTCCGGCGA GATGTCCGAG CGCAAAGAAG GCAGAGGCAA AGGGAAGGGC AAGAAGAAGG 180
 AGCGAGGCTC CGGCAAGAAG CCGGAGTCCG CGGCGGGCAG CCAGAGCCCA G 231

<210> 174
 <211> 178
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220> 10
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 174
 CCTTGCCTCC CCGATTGAAA GAGATGAAAA GCCAGGAATC GGCTGCAGGT TCCAAACTAG 60
 TCCTTCGGTG TGAAACCAGT TCTGAATACT CCTCTCTCAG ATTCAAGTGG TTCAAGAATG 120
 GGAATGAATT GAATCGAAAA AACAAACCAC AAAATATCAA GATACAAAAA AAGCCAGG 178

20

<210> 175
 <211> 122
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

<220> 30
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 175

GAAGTCAGAA CTTCGCATTA ACAAAGCATC ACTGGCTGAT TCTGGAGAGT ATATGTGCAA 60
 AGTGATCAGC AAATTAGGAA ATGACAGTGC CTCTGCCAAT ATCACCATCG TGGAATCAAA 120
 CG 122

40

<210> 176
 <211> 102
 <212> DNA
 <213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 176

AGATCATCAC TGGTATGCCA GCCTCAACTG AAGGAGCATA TGTGTCTTCA GAGTCTCCCA	60	
TTAGAATATC AGTATCCACA GAAGGAGCAA ATACTTCTTC AT	102	10

<210> 177

<211> 128

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

20

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 177

CTACATCTAC ATCCACCACT GGGACAAGCC ATCTTGTAAG ATGTGCGGAG AAGGAGAAAA	60	
CCTTCTGTGT GAATGGAGGG GAGTGCTTCA TGGTGAAAGA CCTTCAAAC CCCTCGAGAT	120	
ACTTGTGC	128	30

<210> 178

<211> 69

<212> DNA

<213>

<220>

<221>

<223> STRANDEDNESS: single

40

<220>

<221>

<223> TOPOLOGY: linear

<400> 178

AAGTGCCAAC CTGGATTCAC TGGAGCAAGA TGTACTGAGA ATGTGCCCAT GAAAGTCCAA	60	
AACCAAGAA	69	

<210> 179
 <211> 60
 <212> DNA
 <213>

 <220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

 <220> 10
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

 <400> 179
 AAGTGCCCAA ATGAGTTTAC TGGTGATCGC TGCCAAAAC TACGTAATGGC CAGCTTCTAC 60

 <210> 180
 <211> 36
 <212> DNA
 <213>

 <220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

 <220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear 30

 <400> 180
 AGTACGTCCA CTCCCTTTCT GTCTCTGCCT GAATAG 36

 <210> 181
 <211> 569
 <212> DNA
 <213> 40

 <220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

 <220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 181
 AAGGCGGAGG AGCTGTACCA GAAGAGAGTG CTGACCATAA CCGGCATCTG CATCGCCCTC 60
 CTTGTGGTTCG GCATCATGTG TGTGGTGGCC TACTGCAAAA CCAAGAAAACA GCGGAAAAAG 120
 CTGCATGACC GTCTTCGGCA GAGCCTTCGG TCTGAACGAA ACAATATGAT GAACATTGCC 180
 AATGGGCCTC ACCATCCTAA CCCACCCCCC GAGAATGTCC AGCTGGTGAA TCAATACGTA 240
 TCTAAAAACG TCATCTCCAG TGAGCATATT GTTGAGAGAG AAGCAGAGAC ATCCTTTTCC 300
 ACCAGTCACT ATACTTCCAC AGCCCATCAC TCCACTACTG TCACCCAGAC TCCTAGCCAC 360
 AGCTGGAGCA ACGGACACAC TGAAAGCATC CTTTCCGAAA GCCACTCTGT AATCGTGATG 420
 TCATCCGTAG AAAACAGTAG GCACAGCAGC CCAACTGGGG GCCCAAGAGG ACGTCTTAAT 480
 GGCACAGGAG GCCCTCGTGA ATGTAACAGC TTCCTCAGGC ATGCCAGAGA AACCCCTGAT 540
 TCCTACCGAG ACTCTCCTCA TAGTGAAAAG 569

10

<210> 182
 <211> 730
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221>
 <223> STRANDEDNESS: single

20

<220>
 <221>
 <223> TOPOLOGY: linear

<400> 182
 GTATGTGTCA GCCATGACCA CCCC GGCTCG TATGTCACCT GTAGATTTCC ACACGCCAAG 60
 CTCCCCAAA TCGCCCCCTT CGGAAATGTC TCCACCCGTG TCCAGCATGA CGGTGTCCAT 120
 GCCTTCCATG GCGGTCAGCC CCTTCATGGA AGAAGAGAGA CCTCTACTTC TCGTGACACC 180
 ACCAAGGCTG CGGGAGAAGA AGTTTGACCA TCACCCTCAG CAGTTCAGCT CCTTCCACCA 240
 CAACCCCGCG CATGACAGTA ACAGCCTCCC TGCTAGCCCC TTGAGGATAG TGGAGGATGA 300
 GGAGTATGAA ACGACCCAAG AGTACGAGCC AGCCCAAGAG CCTGTTAAGA AACTCGCCAA 360
 TAGCCGGCGG GCCAAAAGAA CCAAGCCCAA TGGCCACATT GCTAACAGAT TGGAAAGTGA 420
 CAGCAACACA AGCTCCCAGA GCAGTAACTC AGAGAGTGAA ACAGAAGATG AAAGAGTAGG 480
 TGAAGATACG CCTTTCCTGG GCATACAGAA CCCCTGGCA GCCAGTCTTG AGGCAACACC 540
 TGCCTTCCGC CTGGCTGACA GCAGGACTAA CCCAGCAGGC CGCTTCTCGA CACAGGAAGA 600
 AATCCAGGCC AGGCTGTCTA GTGTAATTGC TAACCAAGAC CCTATTGCTG TATAAACCT 660
 AAATAAACAC ATAGATTCAC CTGTAAAACCT TTATTTTATA TAATAAAGTA TTCCACCTTA 720
 AATTAACAAA 730

30

40

<210> 183
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 183

Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg
 1 5 10 15

Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu
 20 25 30

Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala
 35 40 45

10

Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser
 50 55 60

Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala
 65 70 75 80

Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala
 85 90 95

20

Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly
 100 105 110

Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro
 115 120 125

Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro
 130 135 140

Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr
 145 150 155 160

30

Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys
 165 170 175

Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Thr Trp Gly His Pro Ala
 180 185 190

Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe
 195 200 205

40

Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg
 210 215 220

Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val
 225 230 235 240

Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys
 245

<210> 184
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 184

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15 10

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro
 50 55 60

Glu
 65

<210> 185
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 185

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30

Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45

Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr
 50 55 60

<210> 186
 <211> 60
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 186

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
20 25 30

10

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr
50 55 60

<210> 187

<211> 69

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 187

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
20 25 30

30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Lys
50 55 60

Ala Glu Glu Leu Tyr
65

40

<210> 188

<211> 88

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 188

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30

Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45

Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr
 50 55 60

Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser
 65 70 75 80

Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 85

<210> 189

<211> 83

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 189

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30

Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45

Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr
 50 55 60

Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu
 65 70 75 80

Glu Leu Tyr

10

20

30

40

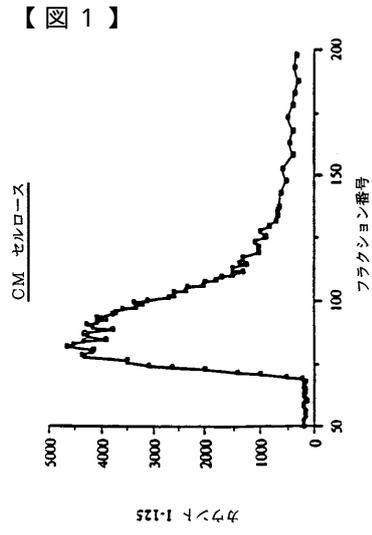


FIGURE 1

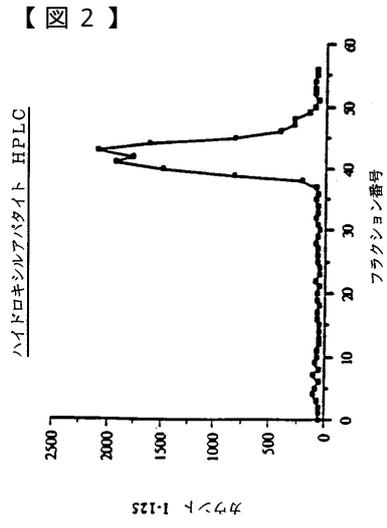


FIGURE 2

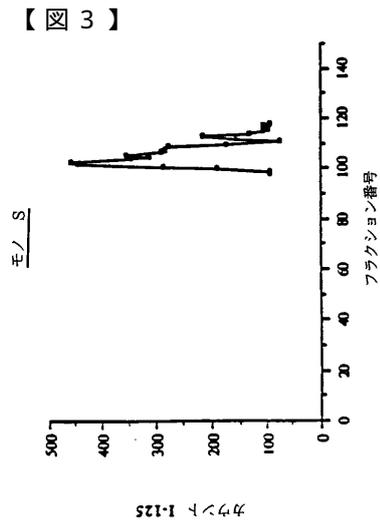


FIGURE 3

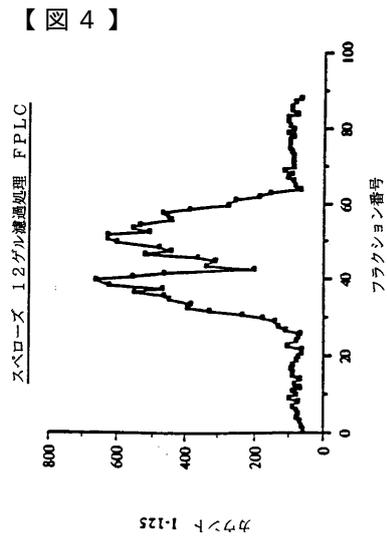


FIGURE 4

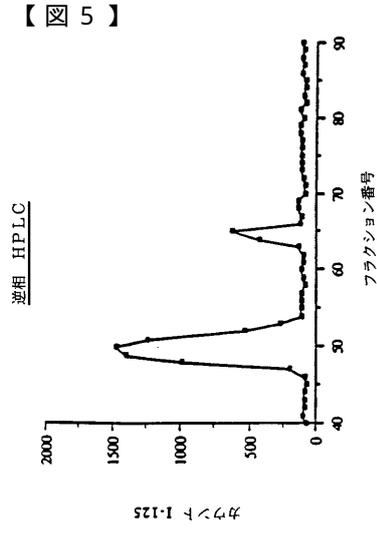


FIGURE 5

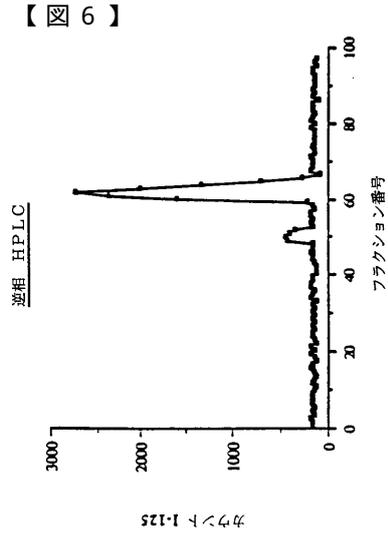


FIGURE 6

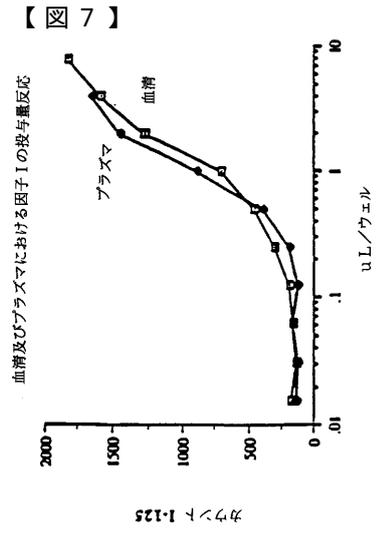


FIGURE 7

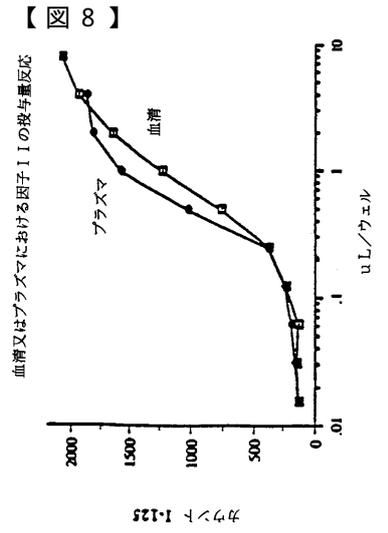


FIGURE 8

【 9 】

FIGURE 9

N-末端
F K G D A N T E (配列認識番号: 1)

トリプシンペプチド
K R A S L A D E Y E Y M X K* (配列認識番号: 2)
K R T E T S S S Q L K L K* (配列認識番号: 3)
K R L K G E R A (配列認識番号: 4)
K R I K S E H A Q L S I G D T A K* (配列認識番号: 6)
K R A S L A D E Y E Y M R R K* (配列認識番号: 7)
K R I K G E H P F L S I G D V A K* (配列認識番号: 8)
K R M S E Y A F F V Q T X R* (配列認識番号: 9)
K R S E H P G L S I G D T A K* (配列認識番号: 10)
K R A G Y F A E X A R* (配列認識番号: 11)
K R K L E F L X A K* (配列認識番号: 12)
K R T T E M A S E Q Q A (配列認識番号: 13)
K R A K E A L A A L K* (配列認識番号: 14)
K R F V L O A K K* (配列認識番号: 15)
K R L G E M M W (配列認識番号: 16)

プロテアーゼ V8 ペプチド
E T O P D P G Q I L K K V P M V I G A Y T (配列認識番号: 169)
E Y K C L K F K W F K K A T Y M (配列認識番号: 17)
E A K F Y V P (配列認識番号: 18)
E K F Y V P (配列認識番号: 19)
E L S F A S V R L P G C P P G V D P M V S F P V A L (配列認識番号: 20)

Ut-alpha
L I H beta (配列認識番号: 20)

GF-I 01
GF-I 02
GF-I 03
GF-I 04
GF-I 05
GF-I 06
GF-I 07
GF-I 08
GF-I 09
GF-I 10
GF-I 11
GF-I 12
GF-I 13
GF-I 14
GF-I 15
GF-I 16

【 10 】

Figure 10

A
GGF-I 01 F K G D A N T E (配列認識番号: 1)
GGF-I 02 A S L A D E Y E Y M X K (配列認識番号: 2)
GGF-I 03 T E T S S S Q L K L K (配列認識番号: 3)
GGF-I 04 A S L A D E Y E Y M R R K (配列認識番号: 4)
GGF-I 05 A G Y F A E X A R (配列認識番号: 5)
GGF-I 06 T T E M A S E Q Q A (配列認識番号: 6)
GGF-I 07 A K E A L A A L K (配列認識番号: 7)
GGF-I 08 F V L O A K K (配列認識番号: 8)
GGF-I 09 E T O P D P G Q I L K K V P M V I G A Y T (配列認識番号: 9)
GGF-I 10 E Y K C L K F K W F K K A T Y M (配列認識番号: 10)

B
GGF-I 20 E K K F Y V P (配列認識番号: 19)
GGF-I 12 K L E F L X A K (配列認識番号: 14)

【 11 】

Figure 11

GGF-II 01
GGF-II 02
GGF-II 03
GGF-II 04
GGF-II 05
GGF-II 06
GGF-II 07
GGF-II 08
GGF-II 09
GGF-II 10

トリプシンペプチド
K R V H Q V W A A K* (配列認識番号: 45)
K R Y I F F M E P E A X S S G (配列認識番号: 46)
K R L G A W G P P A F P V X Y (配列認識番号: 47)
K R W F V V I E G K* (配列認識番号: 48)
K R A L A A A G Y D V E K* (配列認識番号: 164)
K R L V L R* (配列認識番号: 165)
K R X X Y P G Q I T S N (配列認識番号: 166)
K R A S P V S V G S V O E L V Q R* (配列認識番号: 49)
K R V C L L T V A A L P P T (配列認識番号: 50)
K R D L L L X V (配列認識番号: 53)

ヒストン H1
トリプシン

リシルエンドペプチダーゼ-C ペプチド
K V H Q V W A A K* (配列認識番号: 51)
K A S L A D S G E Y M X K* (配列認識番号: 52)

【 12 】

Figure 12

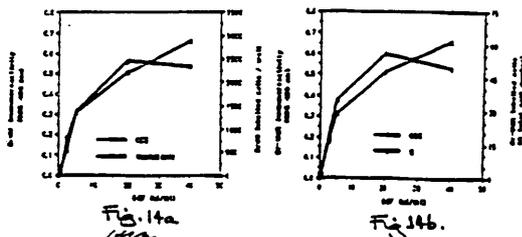
A

GGF-II 01 V H Q V W A A K (配列認識番号: 45)
GGF-II 02 Y I F F M E P E A X S S G (配列認識番号: 46)
GGF-II 03 L G A W G P P A F P V X Y (配列認識番号: 47)
GGF-II 04 W F V V I E G K* (配列認識番号: 48)
GGF-II 06 A S P V S V G S V O E L V Q R (配列認識番号: 49)
GGF-II 07 V C L L T V A A L P P T (配列認識番号: 50)
GGF-II 11 K V H Q V W A A K (配列認識番号: 51)
GGF-II 12 K A S L A D S G E Y M X K (配列認識番号: 52)

B 新規因子 II ペプチド等
GGF-II 10 D L L L X V (配列認識番号: 53)

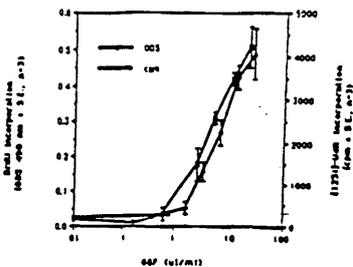
【 14 】

B r-U d R免疫反応とB r-U d R標識化細胞数との比較



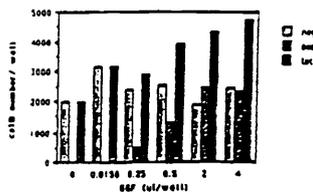
【 13 】

シュワン細胞培養中のDNA合成分析のためのBRdU ELISAと [125 I] U d R計数方法の比較



【 15 】

GGFに対するラット座骨神経シュワン細胞の細胞分裂誘発反応



【図16】

GGFの存在下におけるラット座骨神経シュワン細胞と3T3線維芽細胞でのDNA合成

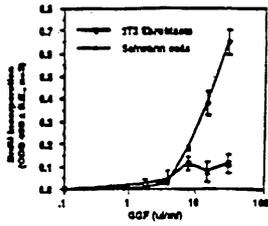


Fig. 16.

【図17】

BHK21 C13細胞のFCS及びGGFに対する細胞分裂誘発反応

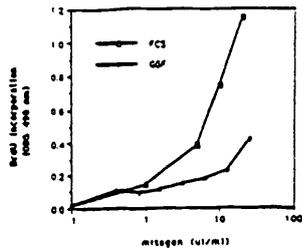


Fig. 17

【図20】

C6細胞のaFGFとGGFに対する細胞分裂誘発反応

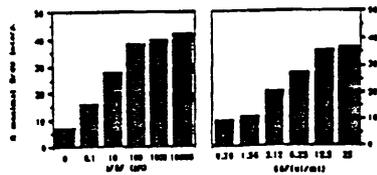


Fig. 20

【図18】

GGF存在下で48時間後のBHK21 C13細胞マイクロ培養の生存と増殖

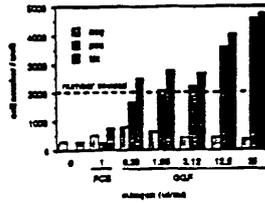


Fig. 18.

【図19】

C6細胞のFCSに対する細胞分裂誘発反応

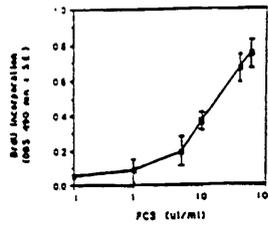


Fig. 19.

【図21】

FIGURE 21

因子Iと因子IIに対する退化オリゴヌクレオチドプローブ

オリゴ配列	ペプチド
535 TTYAARGGAYGCHAYAC!	GGFI-1 (配列認識番号: 54)
536 CATRTAYTCRTAYTCRTGCG!	GGFI-2 (配列認識番号: 55)
537 TGVTCRTGCGCATYTCGTT!	GGFI-13 (配列認識番号: 56)
538 TGVTCRTGCGCATYTCGTT!	GGFI-13 (配列認識番号: 57)
539 CCDAITACCAITGGACITTT!	GGFI-17 (配列認識番号: 58)
540 GCGGCCAUAICYTGTGAC!	GGFI-11 (配列認識番号: 59)
541 GCYTTCGCTTCATRAAUA!	GGFI-2 (配列認識番号: 60)
542 CCTTCDAITACCAITGGAC!	GGFI-4 (配列認識番号: 61)
543 TONGCAARTACGCG!	GGFI-11 (配列認識番号: 62)
544 GCGCAIAGGCTTCITTINGC!	GGFI-14 (配列認識番号: 63)
545 GCGCAIAGGCTTCITTINGC!	GGFI-14 (配列認識番号: 64)
546 TTTITGCTTCAGAACAA!	GGFI-14 (配列認識番号: 65)
551 TTTITGCTTCAGAACAA!	GGFI-15 (配列認識番号: 66)
558 TGNACUATYTCGAC!	GGFI-8 (配列認識番号: 67)
559 TGNACUATYTCGAC!	GGFI-8 (配列認識番号: 68)
609 CATRTAYTCRTAYTCRTGCG!	GGFI-13 (配列認識番号: 69)
610 CATRTAYTCRTAYTCRTGCG!	GGFI-13 (配列認識番号: 70)
612 NGARTGCGYANGANGCITTT!	GGFI-12 (配列認識番号: 71)
649 NGARTGCGYANGANGCITTT!	GGFI-12 (配列認識番号: 72)
650 NGARTGCGYANGANGCITTT!	GGFI-12 (配列認識番号: 73)
651 RCTRTGCGYANGANGCITTT!	GGFI-12 (配列認識番号: 74)
652 RCTRTGCGYANGANGCITTT!	GGFI-12 (配列認識番号: 75)
653 NGARTGCGYANGANGCITTT!	GGFI-12 (配列認識番号: 76)
654 NGARTGCGYANGANGCITTT!	GGFI-12 (配列認識番号: 77)
655 RCTRTGCGYANGANGCITTT!	GGFI-12 (配列認識番号: 78)
656 RCTRTGCGYANGANGCITTT!	GGFI-12 (配列認識番号: 79)
659 ACHACGAAATGCGTGGGA!	GGFI-13 (配列認識番号: 80)
660 ACHACGAAATGCGTGGGA!	GGFI-13 (配列認識番号: 81)
661 CAYCARGTTCGCGCGGAA!	GGFI-1 (配列認識番号: 82)
662 TTYGTHATGAGAGGAA!	GGFI-4 (配列認識番号: 83)
663 AARGGAYGCHAYACGAA!	GGFI-1 (配列認識番号: 84)
664 CARGTTCGCGCGGAA!	GGFI-1 (配列認識番号: 85)
665 GTTGGTTCGCGCGGAA!	GGFI-8 (配列認識番号: 86)
666 GTTGGTTCGCGCGGAA!	GGFI-8 (配列認識番号: 87)
684 NACTTTTAAATTTGCGC!	GGFI-17 (配列認識番号: 88)

【 図 2 2 】

推定ウシ因子 I I 遺伝子配列

```

TCTAAACTACAGACTGATTTTTCATGATCATGATTTCTGTAAATATCTTAAAGCACTTTCCTGATTTCTTETAGCAATTCAGACTTCCTT 148
* T T D C I F I I T T V L * S L L C P L V S * S C R C S L L T T
TACCAAGACTCACTGACTGATTTCTGCAATATATETGCAAAATGATGACCAAACTAGCAAAATGACACTGCTCTCCCAAGATCAAGATTTETGAATCA 208
* R A L L A D S D S G T T G C V I I S L L C S D S A S D S I T T V S
AACGTATAGGATTCCTACTGCTGCTATTTCCTGATCTTAAAGCACTTCTGAAAGTATCTCAAGATATCTTETGCACTTCAATCAAGCAATCTGAAATCTGAT 308
* S C C C L L S S I S D S L S S I L C S C S I * L I Q V C S I S L
TETGCAAAATGAAATTCATGAAAGCAAACTGCTATTTTGAATATCTTCTGATGCTCTTAAAGCTTTCAGCTGATAGCTGAAATGAAATGAAATGAA 408
* T T C D S D S T L C L C T L D S P P V S L T T P * S I S I S L
ATATATATATATATTTT
T I I I I I

```

(配列番号: 89)

FIGURE 22

【 図 2 3 】

因子 I と因子 I I の PCR プライマー

FIGURE 23

分解 PCR プライマー

オリゴ	配列	ペプチド	
657	CCGAAATTCGAGGARAONCARCNGAYCCGGI	GGFI-17	(配列番号: 80)
658	AAGGATCCTCGAGNGTRTANGCCCHATHACATNGGI	GGFI-17	(配列番号: 91)
667	CCGAAATTCGAGGCHGATTCNGGARGAYATGI	GGFI-12	(配列番号: 92)
668	CCGAAATTCGAGGCHGAYATTCNGGARTAYATGI	GGFI-12	(配列番号: 93)
669	AAGGATCCTCGAGNONCATRTATTCCHGARTCI	GGFI-12	(配列番号: 94)
670	AAGGATCCTCGAGNONCATRTATTCCHGARTCI	GGFI-12	(配列番号: 95)
671	CCGAAATTCGAGGAYCARGTTCGGCCNGCAA	GGFI-1	(配列番号: 96)
672	CCGAAATTCGAGGATTTTTTATGGARCCNGARGI	GGFI-2	(配列番号: 97)
673	CCGAAATTCGAGGGGGCCCGCCGATTTTCNGGI	GGFI-3	(配列番号: 98)
674	CCGAAATTCGAGGCTTTGTWTTATGARGGI	GGFI-4	(配列番号: 99)
677	AAGGATCCTCGAGTTTNGGCGGJUGCYTGRGI	GGFI-1	(配列番号: 100)
678	AAGGATCCTCGAGGCTTNGGCTCCATRAJAAA	GGFI-3	(配列番号: 101)
679	AAGGATCCTCGAGGCHGGRAJNGGGNGGGCC	GGFI-3	(配列番号: 102)
680	AAGGATCCTCGAGGCTTNCCTTCDATHACNCAJAC	GGFI-4	(配列番号: 103)
681	CATRTATTCRTATTTCTGCHGAAAGATCCTCGAGI	GGFI-2	(配列番号: 104)
682	CCGAAATTCGAGGARGGNGAYGCHAYGCHGAI	GGFI-1	(配列番号: 105)
683	CGCHGARGGCTTCTTNGCAAGGATCCTCGAGI	GGFI-14	(配列番号: 106)
684	CGCHGARGGCTTCTTNGCAAGGATCCTCGAGI	GGFI-14	(配列番号: 107)
685	TCHGRTAJRTANCNGCAJGGATCCTCGAGI	GGFI-1	(配列番号: 108)

因子 I I のユニークな PCR プライマー

オリゴ	配列	コメント
711	CATGGATCTCGAGGCTGATTCNGGAAATATATCTCGCAI	3' RACE (配列番号: 109)
712	AAGGATCCTCGAGGCACTTCGAGTCCGACATCGATT!	3' RACE (配列番号: 110)
713	CCGAAATTCGAGGATTCAGCACTAGCAATGCAI	3' RACE (配列番号: 111)
721	CATGGATCTCGAGGCTGATTCNGGATGATCTTTCGACI	5' RACE (配列番号: 112)
722	AAGGATCCTCGAGGATATATTCGAGAACTAGCCAGTG!	5' RACE; ANCHORED (配列番号: 11)
725	AAGGATCCTCGAGGCAAGGCTAGGCACTCTTTA!	EXONS A (配列番号: 114)
726	CCGAAATTCGAGGCAAGCTTCGATTAAGCAJAGG!	EXONS A (配列番号: 115)
771	CATGGGATTCAGGATTCAGGATTCCTGCGAI	EXONS B+A (配列番号: 116)
772	ATACCCGGCTCGAGCAATGAGATTCGACACCTCGG!	(配列番号: 117)
773	AAGGATCCTCGAGGATTCGAGGCTCGGCAAGACTCT!	ANCHORED (配列番号: 118)
776	ATACCCGGCTCGAGGATTCGAGGATTCGACACCTCGG!	EXONS B+A (配列番号: 119)

【 図 2 4 】

隣接 GGF-I I cDNA 構造体と配列のまとめ

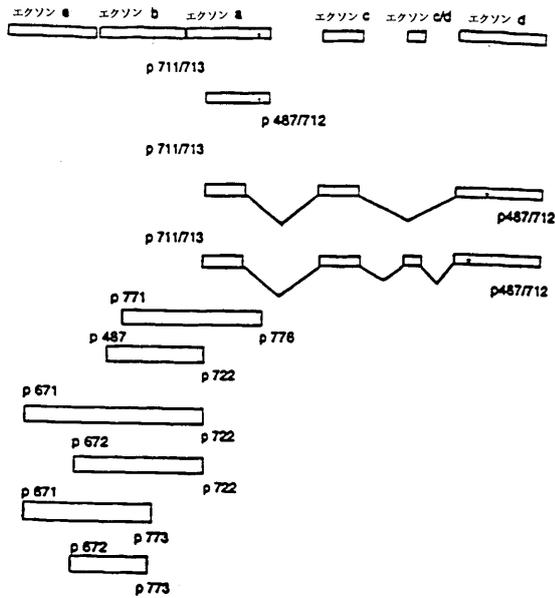


FIGURE 24

【 図 2 5 】

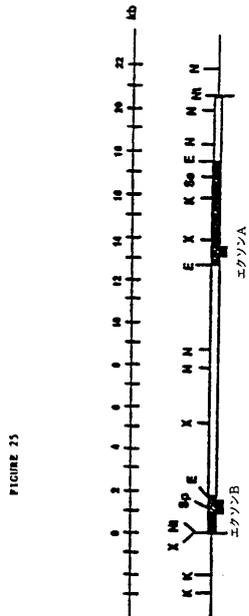


FIGURE 25

【 40 】

EGFL3

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAACCTTCTGTGTGAATGGAGGGGAGTGC
S H L V K C A E K E K T F C V N G G E C
TTTCATGGTGAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTGTGCAAGTCCCAAATGAGTTT
F M V K D L S N P S R Y L C K C P N E F
ACTGGTGAATGGTCCAAAACCTAAGTGGCCAGCTTCTACAAGCCGAGGAGCTTAC
T G D R C Q N Y V M A S F Y K A E E L Y
TAA

(塩基配列 : 配列認識番号: 156
アミノ酸配列: 配列認識番号: 186)

【 41 】

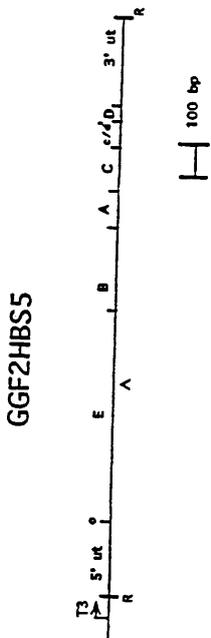
EGFL4

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAACCTTCTGTGTGAATGGAGGGGAGTGC
S H L V K C A E K E K T F C V N G G E C
TTTCATGGTGAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTGTGCAAGTCCCAAATGAGTTT
F M V K D L S N P S R Y L C K C P N E F
ACTGGTGAATGGTCCAAAACCTAAGTGGCCAGCTTCTACAAGCATCTTGGGATTGAA
T G D R C Q N Y V M A S F Y K H L G I E
TTTATGGAGAAGCCGAGGAGCTTCTACTAA
F H E K A E E L Y *

(塩基配列 : 配列認識番号: 157
アミノ酸配列: 配列認識番号: 187)

【 44 】

FIGURE 44



【 42 】

EGFL5

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAACCTTCTGTGTGAATGGAGGGGAGTGC
S H L V K C A E K E K T F C V N G G E C
TTTCATGGTGAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTGTGCAAGTCCCAAATGAGTTT
F M V K D L S N P S R Y L C K C P N E F
ACTGGAGCGAGATGTAAGATAATGTCGCCATCAAAGTCCAAACCCAGAAAAGTGCCTA
T G A R C T E N V P H K V Q T Q E K C P
AATGAGTTTACTGGTGTCCCTGCCAAAACCTAAGTGGCCAGCTTCTACAAGTACGTC
N E F T G D R C Q N Y V M A S F Y S T S
ACTCCCTTCTGTCTCTGCTGCTAATAG
T P F L S L P E *

(塩基配列 : 配列認識番号: 158
アミノ酸配列: 配列認識番号: 188)

【 43 】

EGFL6

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAACCTTCTGTGTGAATGGAGGGGAGTGC
S H L V K C A E K E K T F C V N G G E C
TTTCATGGTGAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTGTGCAAGTCCCAAATGAGTTT
F M V K D L S N P S R Y L C K C P N E F
ACTGGAGCGAGATGTAAGATAATGTCGCCATCAAAGTCCAAACCCAGAAAAGTGCCTA
T G A R C T E N V P H K V Q T Q E K C P
AATGAGTTTACTGGTGTCCCTGCCAAAACCTAAGTGGCCAGCTTCTACAAGCGGAG
N E F T G D R C Q N Y V M A S F Y K A E
GAGCTCTACTAA
E L Y *

(塩基配列 : 配列認識番号: 159
アミノ酸配列: 配列認識番号: 189)

【 45 】

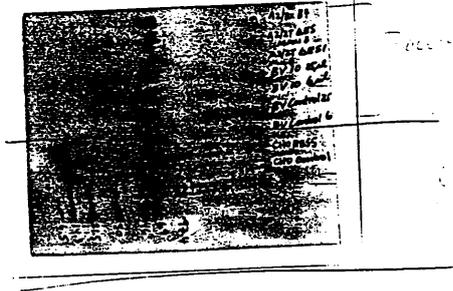
CGF2HBS5のヌクレオチド配列と推定アミノ酸配列

CGF2HBS5のヌクレオチド配列と推定アミノ酸配列
60 *
120 *
180 *
240 *
300 *
360 *
420 *
480 *
540 *
600 *
660 *
720 *

(塩基配列 : 配列認識番号: 21
アミノ酸配列: 配列認識番号: 170)

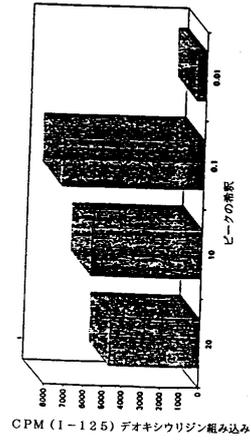
【 49 】

FIGURE 49



【 50 A 】

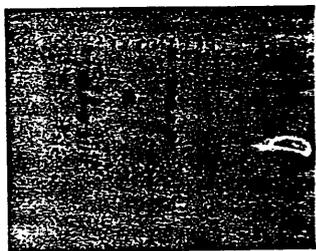
FIGURE 50A



CPM (1-125) デオキシウリジン組み込み

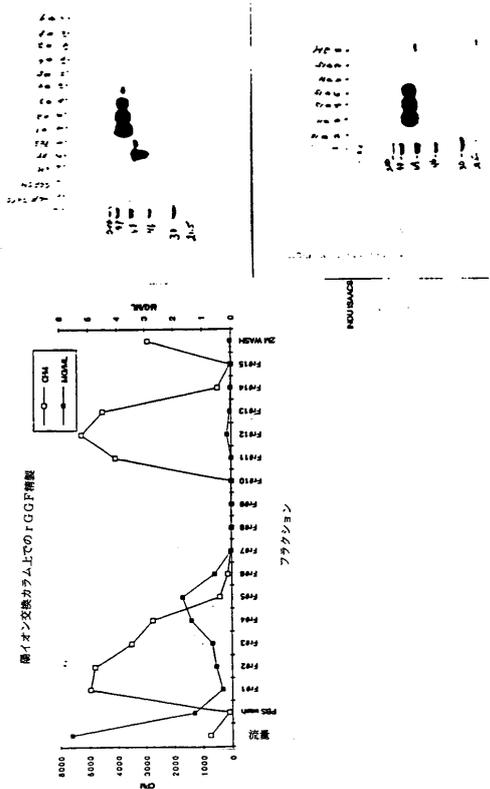
【 50 B 】

FIGURE 50B



【 51 】

FIGURE 51



陽イオン交換カラム上での rGGP 解離

フラクション

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/566	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)		A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)		A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 16/24 (2006.01)		C 0 7 K 16/24	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 P 21/00 (2006.01)		C 1 2 P 21/00	B
C 1 2 P 21/02 (2006.01)		C 1 2 P 21/02	H
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	Z
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	E

(31)優先権主張番号 07/965,173

(32)優先日 平成4年10月23日(1992.10.23)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 08/036,555

(32)優先日 平成5年3月24日(1993.3.24)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ストローバント, ポール

イギリス国 ロンドン エヌ8 9エイエス クラウチ・エンド セシル・パーク 52エイ

(72)発明者 ミンゲッティ, ルイザ

イタリア国 イ 48012 パナキャバット ヴィア・ストラデッロ 22

(72)発明者 ウォーターフィールド, マイケル

イギリス国 バークシャー アールジー13 1アールエヌ ニューベリー スピーン スピーン
・レーン シャンターマーク(無番地)

(72)発明者 マルキオニ, マーク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02174 アーリントン トゥイン・サークル・ドライブ
24

(72)発明者 チェン, メイオー, スー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02174 アーリントン デカッター・ストリート 65

(72)発明者 ハイルズ, イアン

イギリス国 ロンドン ダブリュ1ピー 8ピーティ ライディング・ハウス・ストリート 91

審査官 新留 豊

(56)参考文献 J. Biol. Chem., 1980年, Vol.255, pp.8374-8377

Science, 1992年 5月22日, Vol.256, pp.1205-1210

J. Neurosci., 1984年, Vol.4, No.1, pp.75-83

Cell, 1986年, Vol.45, pp.301-306

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/00 - 14/825

A61K 38/00 - 38/58