



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, 15/54, 15/63, C12Q 1/68, C07K 16/40, A61K 48/00, 38/43, 33/32</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/28459</p> <p>(43) 国際公開日 1999年6月10日(10.06.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05357</p> <p>(22) 国際出願日 1998年11月27日(27.11.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/344256 1997年11月27日(27.11.97) JP 特願平10/280357 1998年10月1日(01.10.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 中外分子医学研究所(CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) イエネ ディーター イー(JENNE, Dieter E.)[DE/DE] 82061 ノイリード市 クラマーストラッセ4 Neuried, (DE) 根津淳一(NEZU, Jun-ichi)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシ ア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: EXAMINATION METHOD, EXAMINATION REAGENT AND REMEDY FOR DISEASES CAUSED BY VARIATION IN LKB1 GENE</p> <p>(54)発明の名称 LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の検査方法、検査薬、および治療薬</p> <p>(57) Abstract With respect to a range of 1.5 Mbp and more in the chromosome 19p13.3 region containing Peutz-Jeghers gene, a continuous cosmid contig is constructed and a restriction map is prepared. Next, genes mapped within this region are searched by using EST database and the locations of these genes are accurately determined. Based on the evaluation of biological data, etc., several highly likely candidates for Peutz-Jeghers gene are specified from the genes thus found. After successively analyzing variations in these genes in DNAs of patients with Peutz-Jeghers syndrome, it is found that one of these genes, i.e., "LKB1" has been specifically varied in these patients. Thus, it is found out that the diseases caused by the variation in the LKB1 gene can be examined and treated by using the LKB1 gene, primers and probes based on its base sequence, LKB1 protein, an antibody binding to this protein, etc.</p>		

(57)要約

ポイツ・イエガー遺伝子が存在する染色体19p13.3領域の1.5Mbp以上の範囲につき、連続コスミドコンティグの構築、および制限酵素地図の作製を行った。次いで、ESTデータベースを利用してこの領域内にマップされる遺伝子を探索し、さらにそれら遺伝子の正確な位置を決定した。次いで、生物学的情報の評価などを通じて、見いだされた多くの遺伝子の中からポイツ・イエガー遺伝子の有力な候補をいくつか特定した。そして、ポイツ・イエガー症候群患者DNAにおけるこれら遺伝子の変異を順次解析した結果、この中の一つの遺伝子「LKB1」がポイツ・イエガー症候群患者に特異的に変異していることを見いだした。これによりLKB1遺伝子、その塩基配列に基づくプライマーやプローブ、LKB1タンパク質、およびLKB1タンパク質に結合する抗体などを利用して、LKB1遺伝子の変異に由来する疾患の検査および治療を行うことが可能であることを見いだした。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シェラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW キニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR キリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	ML マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MR モーリタニア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジェール	YU ユーゴスラヴィア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NO ノールウェー	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PL ポーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CZ チェッコ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DE ドイツ	KR 韓国	RU ロシア	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	SD スーダン	
EE エストニア	LC セントルシア	SE スウェーデン	

## 明細書

L K B 1 遺伝子の変異に起因する疾患の検査方法、検査薬、および治療薬

### 技術分野

本発明は、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の検査方法、並びに該疾患の検査薬および治療薬に関する。

### 背景技術

ポイツ・イエガー症候群[MIM 175200]は、唇、口周囲、および頬の黒褐色色素沈着、ならびに良性・過誤腫性・腺腫性の多発性胃腸ポリープを特徴とする、常染色体優性遺伝を示す症候群である。この症候群の患者は、さらに、胃腸管、膵臓、卵巣、精巣、乳房、および子宮に良性や悪性の腫瘍を高頻度で生じることが知られている。特に、卵巣には小型の良性腫瘍が高頻度に発生し、これらの小腫瘍は、環状管 (annular tubule) を有する多病巣性の左右相称の性索構造として発達する。そして、顆粒層癌へと進行し、少女に両性の早熟をもたらすことがある。少年における多病巣性性索癌は、頻度は低いが、過剰にエストロゲンが産生される結果として、女性化乳房および女性化を引き起こすことが見出されている。ポイツ・イエガー症候群の原因遺伝子 (ポイツ・イエガー遺伝子) が欠損することにより、広範囲の新生物疾患に対する素因が与えられると考えられており、実際に、欠損ポイツ・イエガー遺伝子に対立遺伝子の片方に持つキャリアーの50%が60才までに癌を発症することが知られている (Giardiello, F.M. et al. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. N. Engl. J. Med. 316, 1511-1514 (1987). 、Spigelman, A.D., Murday, V. & Phillips, R.K. Cancer and the Peutz-Jeghers syndrome. Gut 30, 1588-1590 (1989). [MIM 175200])。ポイツ・イエガー遺伝子産物が欠損するかまたは不活化されることにより、

潜在的に高増殖能を有する体細胞における基本的な増殖調節機構が損なわれ、良性の過誤腫ポリープの成長が開始され、やがてその中から、さらなる遺伝子変化を経て悪性の腫瘍細胞が生じてくるものと考えられている。

近年、ポイツ・イエガー症候群患者の12家系の連鎖解析により、ポイツ・イエガー遺伝子とマイクロサテライト遺伝子マーカーD19S886とのマルチポイントロッド値 (multipoint lod score) は7.00を示し、染色体DNA上の19p13.3領域にマップされることが報告された (Hemminki, A. et al. Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis. *Nature Genet.* 15, 87-90 (1997).)。さらに、別の5家族について調べられた第二の研究 (Amos, C.I. et al. Fine mapping of a genetic locus for Peutz-Jeghers syndrome on chromosome 19p. *Cancer Res.* 57, 3653-3656 (1997)) においても同様に、ポイツ・イエガー遺伝子と遺伝子マーカーD19S886との連鎖 (マルチポイントロッド値は 7.52) が報告された。元来、ポイツ・イエガー遺伝子と組み換えを示す最も近傍の遺伝子マーカーとしてD19S565が知られていたが、さらにその近傍に位置する遺伝子マーカーD19S878も報告され、これらのマーカーの位置がポイツ・イエガー遺伝子の候補領域の境界であると考えられた。いずれの連鎖解析においても、遺伝子マーカーD19S886とポイツ・イエガー遺伝子との間には組み換えが見られなかったことから、両者が近傍に存在していることが推測された。

### 発明の開示

本発明はポイツ・イエガー症候群の原因遺伝子を解明し、該遺伝子の変異に起因する疾患の検査方法、ならびに該疾患の検査薬および治療薬を提供する。

本発明者らは、ポイツ・イエガー症候群の原因遺伝子を解明すべく、まず、ポイツ・イエガー遺伝子が存在する染色体19p13.3領域の1.5Mbp以上の範囲につき、連続コスミドコンティグの構築、および制限酵素地図の作製を行った。次いで、

ESTデータベースを利用してこの領域内にマップされる遺伝子を探索し、さらにそれら遺伝子の正確な位置を決定した。次いで、生物学的情報の評価などを通じて、見いだされた多くの遺伝子の中からポイツ・イエガー遺伝子の有力な候補をいくつか特定した。そして、ポイツ・イエガー症候群患者DNAにおけるこれら遺伝子の変異を順次解析した結果、この中の一つの遺伝子「LKB1」がポイツ・イエガー症候群患者に特異的に変異していることを見いだした。即ち、本発明者等は、鋭意研究を行った結果、ポイツ・イエガー症候群の原因遺伝子を解明することに初めて成功するに至った。そして、これによりLKB1遺伝子、その塩基配列に基づくプライマーやプローブ、LKB1タンパク質、およびLKB1タンパク質に結合する抗体などを利用して、LKB1遺伝子の変異に由来する疾患の検査および治療を行うことが可能であることを見いだすに至った。

即ち、本発明は、ポイツ・イエガー症候群の原因遺伝子である「LKB1」遺伝子の変異に起因する疾患の検査方法、並びに該疾患の検査薬および治療薬に関し、より具体的には、

(1) 配列番号：1乃至4のいずれかに記載の塩基配列の少なくとも一部を含む塩基配列からなる、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の検査に用いるプライマーDNA、

(2) 配列番号：7乃至30のいずれかに記載の塩基配列からなる、(1)に記載のプライマーDNA、

(3) LKB1遺伝子の変異に起因する疾患がポイツ・イエガー症候群である、

(1)または(2)に記載のプライマーDNA、

(4) 配列番号：1乃至4のいずれかに記載の塩基配列の少なくとも一部を含む塩基配列からなる、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の検査に用いるプローブDNA、

(5) LKB1遺伝子の変異に起因する疾患がポイツ・イエガー症候群である、

(4)に記載のプローブDNA、

- (6) LKB1遺伝子を有効成分とする、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の治療薬、
- (7) LKB1タンパク質を有効成分とする、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の治療薬、
- (8) LKB1タンパク質の活性を促進する化合物を有効成分とする、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の治療薬、
- (9) LKB1遺伝子の変異に起因する疾患がポイツ・イエガー症候群である、
- (6)乃至(8)のいずれかに記載の治療薬、
- (10) LKB1タンパク質に結合する抗体を有効成分とする、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の検査薬、
- (11) LKB1遺伝子の変異に起因する疾患がポイツ・イエガー症候群である、
- (10)に記載の検査薬、
- (12) LKB1遺伝子の変異に起因する疾患を検査する方法であって、LKB1遺伝子の変異を検出することを特徴とする方法、
- (13) LKB1遺伝子の変異に起因する疾患を検査する方法であって、
  - (a) 患者からDNA試料を調製する工程、
  - (b) (1)に記載のプライマーDNAを用いて患者由来のDNAを増幅する工程、
  - (c) 増幅したDNAを切断する工程、
  - (d) DNA断片をその大きさに応じて分離する工程、
  - (e) 分離したDNA断片に対し、(4)に記載のプローブDNAをハイブリダイズさせる工程、
  - (f) 検出されたDNA断片の大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む方法、
- (14) LKB1遺伝子の変異に起因する疾患を検査する方法であって、
  - (a) 患者からRNA試料を調製する工程、
  - (b) 大きさに応じて調製したRNAを分離する工程、

(c) 分離したRNAに対し、(4)に記載のプローブDNAをハイブリダイズさせる工程、

(d) 検出されたRNAの大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む方法、

(15) LKB1遺伝子の変異に起因する疾患を検査する方法であって、

(a) 患者からDNA試料を調製する工程、

(b) (1)に記載のプライマーDNAを用いて患者由来のDNAを増幅する工程、

(c) 増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる工程、

(d) 解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程、

(e) 分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法、

(16) LKB1遺伝子の変異に起因する疾患を検査する方法であって、

(a) 患者からDNA試料を調製する工程、

(b) (1)に記載のプライマーDNAを用いて患者由来のDNAを増幅する工程、

(c) 増幅したDNAを、DNA変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程、

(d) 分離したDNAのゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、

を含む方法、

(17) LKB1遺伝子の変異に起因する疾患がポイツ・イエガー症候群である、

(12)乃至(16)のいずれかに記載の検査する方法、

に関する。

本発明は、ポイツ・イエガー症候群が「LKB1」と名付けられた遺伝子の変異に起因して発症するという本発明者等による知見に基づく。本発明は、第一に、LKB1をコードするゲノムDNA領域（エキソン領域の他、イントロン領域、プロモーター領域、エンハンサー領域を含む）の塩基配列の少なくとも一部を含むヌクレオチド、およびLKB1遺伝子の変異に起因する疾患の検査のための該ヌクレオチドの利用に関する。LKB1のゲノムDNA領域を配列番号：1から4に示す。配列番号：1

はLKB1遺伝子の5'側上流領域を含む遺伝子配列であり、配列番号：2はLKB1遺伝子のエクソン1およびイントロン1（一部）であり、配列番号：3はLKB1遺伝子のエクソン2乃至8およびイントロン1（一部）乃至8（一部）であり、配列番号：4はイントロン8（一部）およびエクソン9である。

これら領域の一部を含むヌクレオチドは、プライマーまたはプローブとしてLKB1遺伝子の変異に起因する疾患の検査に利用することができる。プライマーとして用いるヌクレオチドは、通常、15bp~100bpであり、好ましくは17bp~30bpである。プライマーは、LKB1遺伝子またはその発現を調節する領域の少なくとも一部を増幅しうるものであればいかなるものでもよい。このような領域としては、例えば、LKB1遺伝子のエクソン領域、イントロン領域、プロモーター領域、エンハンサー領域が含まれる。一方、プローブとしてのヌクレオチドは、合成オリゴヌクレオチドであれば、通常、少なくとも15bp以上の鎖長を有する。プラスミドDNAなどのベクターに組み込んだクローンから得た二本鎖DNAをプローブとして用いることも可能である。プローブとして利用する領域としては、LKB1遺伝子またはその発現を調節する領域の少なくとも一部であればいかなるものでもよい。このような領域としては、例えば、LKB1遺伝子のエクソン領域、イントロン領域、プロモーター領域、エンハンサー領域が含まれる。プローブとして用いる場合、オリゴヌクレオチドあるいは二本鎖DNAは適宜標識して用いられる。標識する方法としては、例えば、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いてオリゴヌクレオチドの5'端を<sup>32</sup>Pでリン酸化することにより標識する方法や、クレノウ酵素などのDNAポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドなどをプライマーとして、<sup>32</sup>Pなどのアイソトープ、蛍光色素、あるいはビオチンなどにより標識された基質塩基を取り込ませる方法（ランダムプライム法など）が挙げられる。

これらヌクレオチドを利用して検出するLKB1遺伝子の変異に起因する疾患としては、ポイツ・イエガー症候群に限られない。LKB1遺伝子の変異に起因するすべての疾患が含まれる。PTEN遺伝子やAPC遺伝子はそれぞれ遺伝性の癌であるCowde



n病(Cowden's disease)、及び家族性腺腫性ポリポーシス(Familial Adenomatous polyposis/FAP)の原因遺伝子として発見されたが、双方とも、遺伝性ではない一般の癌においても高頻度に変異が起こっていることが明らかになっている。PTEN遺伝子あるいはAPC遺伝子は、正常組織においては細胞の増殖を制御するために働いているが、それらに変異し機能を失うことにより、細胞がその制御から外れ、癌化への大きな一つのステップが進むものと考えられている。これらPTEN遺伝子やAPC遺伝子のように、LKB1遺伝子もそれが変異を起こすことにより一般の癌の発生に関与している可能性が考えられる。

本発明におけるLKB1遺伝子の変異に起因する疾患の検査は、LKB1遺伝子の変異を検出することを特徴とする。本発明において「LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の検査」とは、LKB1遺伝子の変異に起因して特定の症状を発現している患者の検査のみならず、被験者がLKB1遺伝子の変異に起因する特定の疾患にかかりやすいか否かを判断するために行う、LKB1遺伝子の変異の検査も含まれる。すなわち、LKB1対立遺伝子の片方に変異が生じることにより、表面上は未だ症状を発現していない場合においても、LKB1遺伝子の変異に起因する特定の疾患にかかる危険性が非常に増大しているものと考えられる。このような片方のLKB1対立遺伝子に変異を持つ患者(キャリアー)を特定するための検査も本発明に含まれる。また、本発明における「LKB1遺伝子の変異の検出」には、DNAにおける検出、RNAにおける検出の他、タンパク質における検出が含まれる。

本発明の検査方法の一つの態様は、患者のLKB1遺伝子の塩基配列を直接決定する方法である。例えば、上記ヌクレオチドをプライマーとして、LKB1の変異に起因する疾患の疑いのある患者から単離したDNAを鋳型として、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法などにより、患者のLKB1遺伝子の一部もしくは全部を増幅し、その塩基配列の決定を行う。これを健常者のLKB1遺伝子の塩基配列と比較することにより、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患を検査することができる。

本発明の検査方法としては、このように直接患者由来のDNAの塩基配列の決定を

行う方法以外にも種々の方法を用いることができる。その一つの態様は、(a) 患者からDNA試料を調製する工程、(b) 本発明のプライマーDNAを用いて患者由来のDNAを増幅する工程、(c) 増幅したDNAを一本鎖DNAに解離する工程、(d) 解離した一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程、(e) 分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む。

このような方法として、PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism、一本鎖高次構造多型) 法 (Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11. *Genomics*. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.、Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene*. 1991 Aug 1; 6(8): 1313-1318.、Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis with postlabeling.、*PCR Methods Appl.* 1995 Apr 1; 4(5): 275-282.) が挙げられる。この方法は操作が比較的簡便であり、また試料の量も少なくすむなどの利点を有するため、特に多数のDNAサンプルをスクリーニングするのに好適である。その原理は以下の如くである。二本鎖DNA断片を一本鎖に解離すると、各鎖はその塩基配列に依存した独自の高次構造を形成する。この解離したDNA鎖を変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル中で電気泳動すると、それぞれの高次構造の差に応じて、相補的な同じ鎖長の一本鎖DNAが異なる位置に移動する。一塩基の置換によってもこの一本鎖DNAの高次構造は変化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において異なる移動度を示す。従って、この移動度の変化を検出することにより検査対象のDNA断片に点突然変異や欠失、あるいは挿入などによる変異が存在するかどうかを検出することができる。

PCR-SSCP法においては、まず、LKB1遺伝子の一部あるいは全部をPCR法などによって増幅する。増幅される範囲としては、通常200-400bp程度の長さが好ましい。また、増幅される領域としては、LKB1遺伝子のエキソン、イントロン、LKB1遺伝

子のプロモーター、およびエンハンサーが含まれる。PCRは、通常の条件（例えば、実施例5に示したプライマーによる各エクソンを増幅する反応の条件）で行うことができる。PCRによる遺伝子断片増幅の際、<sup>32</sup>Pなどのアイソトープ、蛍光色素、あるいはビオチンなどによって標識したプライマーを用いるか、またはPCR反応液に<sup>32</sup>Pなどのアイソトープ、蛍光色素、あるいはビオチンなどによって標識した基質塩基を加えることによって、PCR反応により合成されるDNA断片を標識する。PCR反応後にクレノウ酵素などを用いて<sup>32</sup>Pなどのアイソトープ、蛍光色素、あるいはビオチンなどによって標識した基質塩基を合成されたDNA断片に付加することによって、該DNA断片の標識を行うこともできる。こうして得られた標識されたDNA断片を加熱などにより変性し、尿素などの変性剤を含まないポリアクリルアミドゲルによって電気泳動を行う。この際、ポリアクリルアミドゲルに適量（5から10%程度）のグリセロールを添加することにより、DNA断片の分離の条件を改善することができる。また、泳動条件は各DNA断片の性質により変動するが、通常、室温（20から25°C）で行い、好ましい分離が得られないときには4から30°Cまでの温度で最適の移動度を与える温度の検討を行うことが好ましい。電気泳動後、DNA断片の移動度をX線フィルムを用いたオートラジオグラフィーや、蛍光を検出するスキャナー等で検出し、解析する。移動度に差があるバンドが検出された場合、このバンドを直接ゲルから切り出し、PCRによって再度増幅し、それを直接シーケンシングすることにより、変異の存在を確認することができる。また、PCRにより合成されたDNA断片を標識しない場合においても、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドや銀染色法などによって染色することにより、該DNA断片のバンドを検出することができる。

本発明の検査方法の他の態様は、（a）患者からDNA試料を調製する工程、（b）本発明のプライマーDNAを用いて患者由来のDNAを増幅する工程、（c）増幅したDNAを切断する工程、（d）DNA断片をその大きさに応じて分離する工程、（e）分離したDNA断片に対し、本発明のプローブDNAをハイブリダイズさせる工

程、(f) 検出されたDNA断片の大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む。

このような方法としては、制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism/RFLP) を利用した方法、PCR-RFLP法などが挙げられる。これらの方法は、制限酵素の認識部位に変異が存在する場合、あるいは制限酵素処理によって生じるDNA断片内に塩基の挿入や塩基の欠失が存在する場合、制限酵素処理後に生じる断片の大きさが健常者と比較して変化するという原理を利用する。実際、ポイツ・イエガー症候群に関しては、実施例に示した4人のポイツ・イエガー症候群患者D、B、MA、FAのLKB1遺伝子において、それぞれScaIサイトの獲得、AhdIサイトの消失、RsaIサイトの消失、BsrBIサイトの消失が存在した(表3)。従って、これら変異を含む領域をPCRによって増幅し、上記制限酵素で処理し、これを電気泳動することによって、これらの変異を電気泳動後のバンドの移動度の差として検出することができる。あるいは、患者由来のDNAをこれらの制限酵素によって処理し、電気泳動した後、本発明のプローブDNAを用いてサザンブロットィングを行うことにより、変異の有無を検出することができる。用いられる制限酵素は上述したもの他、それぞれの変異に応じて適宜選択される。この方法では、患者から調製したゲノムDNAを制限酵素処理して変異を検出する他、患者から調製したRNAを逆転写酵素で処理することにより調製したcDNAをそのまま制限酵素処理して、サザンブロットィングにより検出することもできる。また、このcDNAを鋳型としてPCRを行い、その増幅産物(LKB1遺伝子の一部あるいは全部)を制限酵素で切断した後、電気泳動を行い、DNA断片の移動度の差として変異を検出することもできる。

また、患者から調製したDNAの代わりにRNAを用いても同様に検出することが可能である。このような方法は、(a) 患者からRNA試料を調製する工程、(b) 大きさに応じて調製したRNAを分離する工程、(c) 分離したRNAに対し、本発明のプローブDNAをハイブリダイズさせる工程、(d) 検出されたRNAの大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む。具体的な方法の一例としては、患者から調

製したRNAを電気泳動し、本発明のプロブを用いてノーザンブローディングを行い、移動度の差を検出する。

本発明の検査方法の他の態様は、(a)患者からDNA試料を調製する工程、(b)本発明のプライマーを用いて患者由来のDNAを増幅する工程、(c)増幅したDNAを、DNA変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程、(d)分離したDNAのゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法である。

このような方法としては、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(denaturant gradient gel electrophoresis: DGGE)が挙げられる。この方法においてはLKB1遺伝子の一部あるいは全部を本発明のプライマーなどを用いたPCRなどによって増幅し、これを尿素などの変性剤の濃度が移動するに従って徐々に高くなっているポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、健常者と比較する。変異が存在するDNA断片の場合、より低い変性剤濃度位置でDNA断片が一本鎖になり、顕著に移動速度が遅くなるため、この移動度の差を検出することにより変異の有無を検出することができる。

これら方法以外にも、特定位置の変異のみを検出する目的にはアレルトリニックオリゴヌクレオチド (Allele Specific Oligonucleotide/ASO) ハイブリダイゼーション法が利用できる。この方法においては、変異が存在すると考えられる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを作製し、これと試料DNAとでハイブリダイゼーションを行わせる。変異が存在する場合には、ハイブリッド形成の効率が低下するため、それをサザンブロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターカレーションすることにより消光する性質を利用した方法などにより検出する。

また、リボヌクレアーゼA mismatches切断法による検出も可能である。この方法においては、LKB1遺伝子の一部あるいは全部をPCRなどによって増幅し、これをプラスミドベクター等に組み込んだLKB1 cDNA等から調製した標識RNAとハイブリダイゼーションさせる。変異が存在する部分においてはハイブリッドが一本鎖構造

となるため、該部分をリボヌクレアーゼAによって切断し、オートラジオグラフィなどで検出する。これにより変異の存在を検出することができる。

本発明は、また、LKB1タンパク質に結合する抗体を有効成分とする、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の検査薬に関する。LKB1タンパク質に結合する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、LKB1タンパク質（天然のタンパク質の他、GSTとの融合タンパク質として大腸菌において発現させたLKB1タンパク質のような、適当な宿主細胞（大腸菌、酵母、哺乳類細胞）によって発現させたりコンビナントLKB1タンパク質を用いることもできる）若しくはその部分ペプチド（例えば、配列番号:31乃至配列番号:34に記載のアミノ酸配列からなるペプチド）をウサギなどの小動物に免疫し血清を得て、これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、LKB1タンパク質や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。また、モノクローナル抗体であれば、LKB1タンパク質若しくはその部分ペプチドをマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、LKB1タンパク質に結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、LKB1タンパク質や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。

抗体を検査薬として用いる場合、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、安定剤（BSAやゼラチンなど）、保存剤等を必要に応じて混合する。該抗体を用いた検査としては、例えば、患者から採取した組織、あるいは

単離した細胞を、酵素標識抗体法、蛍光標識抗体法などの方法で染色し、LKB1タンパク質の欠損、あるいは異常蓄積、または異常な細胞内分布の検査を行う。また、ポイツ・イエガー患者などから採取した組織あるいは単離した細胞から細胞抽出液を調製し、これをSDS-PAGEなどの方法により分離し、ニトロセルロース膜やPVDF膜等にタンパク質を転写した後、タンパク質を上記酵素抗体法等により染色する方法（ウエスタンブロットティング、イムノブロットティング）によっても検出を行うこともできる。

本発明者等による、第19番染色体p13.3領域における詳細な物理地図作製により、ポイツ・イエガー症候群の原因遺伝子LKB1とマイクロサテライトマーカーD19S886との染色体DNA上における距離は約190kbpで両者が非常に近接して存在することが明らかにされた。このため、LKB1遺伝子変異に基づく各種疾患の検査として、D19S886マーカーを用いたヘテロ接合体消失(Loss of Heterozygosity/LOH)を試験する方法も有効であると考えられる。

また、本発明は、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の治療薬に関する。その一つの態様は、LKB1遺伝子を有効成分とする。LKB1遺伝子を治療薬として用いる場合、LKB1ゲノムDNAの一部もしくは全長、またはLKB1 cDNA（配列番号：5）を適当なベクター、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、あるいはプラスミドDNAなどに組み込み、例えば、経口投与、静脈内投与、患部への局所投与等の方法により患者に投与する。投与方法としては、インビボ法その他、エクスピボ法を用いることも可能である。投与において、リン脂質などをミセル化して作製したりリポソームに遺伝子を封入することにより、組織移行性、組織吸収性を高めることもできる。またカチオン性の脂質を加え、遺伝子DNAと複合体を形成させることにより、組織移行性、組織吸収性を高めることも可能である。これにより患者体内における変異したLKB1遺伝子を正常な遺伝子に置換したり、また、正常な遺伝子を付加的に患者に投与することが可能であり、その結果LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の治療を行うことができ

る。

LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の治療薬に関する他の態様は、LKB1タンパク質を有効成分とする。LKB1タンパク質は、天然のタンパク質として、また遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することができる。LKB1タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：6に示す。天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば、実施例7に記載のLKB1タンパク質の部分ペプチドに対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、LKB1タンパク質発現の高い、例えば、精巣、胎児肝臓、あるいはK562細胞などの培養細胞から単離することが可能である。一方、組換えタンパク質は、例えば、LKB1タンパク質をコードするDNA（配列番号：5）で形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、NIH3T3細胞などの哺乳類細胞、Sf9細胞などの昆虫細胞、酵母細胞、大腸菌（*E.coli*）が挙げられる。また、細胞内で組換えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、哺乳類細胞のベクターとしてはpcDNA3（Invitrogen）やpEF-BOS（*Nucleic Acids.Res.* 1990,18(17),p5322）などが、昆虫細胞のベクターとしては「BAC-to-BAC baculovirus expression system」（GIBCO BRL）などが、酵母細胞のベクターとしては「Pichia Expression Kit」（Invitrogen）などが、大腸菌のベクターとしてはpGEX-5X-1（Pharmacia）、「QIAexpress system」（Qiagen）などが挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリポソームDOTAP（ベーリンガーマンハイム）やSuperFect（Qiagen）を用いた方法、エレクトロポレーション法、塩化カルシウム法など公知の方法を用いて行うことができる。得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、常法、例えば、文献「The Qiaexpressionist handbook, Qiagen, Hilden, Germany」記載の方法を用いて行うことが可能である。

得られたLKB1タンパク質をLKB1遺伝子の変異に起因する疾患の治療薬として用



いる場合には、LKB1タンパク質を直接投与することもできるが、公知の製剤学的製造法により製剤化して投与することもできる。例えば、薬剤として一般的に用いられる担体または媒体、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、安定剤、保存剤等と適宜組み合わせ投与する。投与量は、患者の体重、年齢、健康度、あるいは投与方法などの諸要因に応じて変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することができる。通常、0.01mg/kg~1000mg/kgの範囲内である。投与は、例えば、経口投与、静脈投与、筋肉内投与、皮下投与などの方法で行うことができる。

また、当業者であれば、公知の方法、例えば、例えば、PCRによる部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland)、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発法 (Kramer, W. and Fritz, HJ (1987) *Methods in Enzymol.*, 154:350-367)、Kunkel法 (*Methods Enzymol.* 85, 2763-2766 (1988)) などの方法を利用して、本発明の薬剤の活性や安定性などを高める等のため、LKB1タンパク質のアミノ酸配列におけるアミノ酸の置換、欠失、付加、および/または挿入を容易に行うことができる。このような改変LKB1タンパク質も本発明の薬剤に用いることが可能である。

LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の治療薬に関する他の態様は、LKB1タンパク質の活性を促進する化合物を有効成分とする。LKB1遺伝子は、アフリカツメガエルのセリンスレオニンキナーゼXEEK1とアミノ酸配列において82%の高い相同性を有するセリンスレオニンキナーゼである。LKB1遺伝子の変異による疾患の発症には、LKB1タンパク質におけるセリントレオニンキナーゼ活性の崩壊が密接に関与していると考えられる。従って、該セリントレオニンキナーゼ活性を促進することにより、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の治療を行うことも考えられる。

LKB1タンパク質の活性を促進する化合物をスクリーニングする方法としては、以下の方法が挙げられる。例えば、GSTとの融合タンパク質などとして大腸菌で発現させたLKB1タンパク質、あるいは哺乳細胞や昆虫細胞等で発現させたLKB1タン

パク質を用い、これらタンパク質のキナーゼ活性を被検化合物の存在下で測定し、LKB1タンパク質の活性を促進する化合物を選択する。

より具体的には、例えば、LKB1タンパク質の基質タンパク質をリン酸化する活性、またはLKB1タンパク質による自己リン酸化(オートホスフォリレーション)活性を、適当な反応液(例えば、50mM トリス-塩酸pH7.2、1mM ジチオスレイトール(DTT)、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM MnCl<sub>2</sub>など)中における[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATPからの<sup>32</sup>Pの基質への転移量として液体シンチレーションカウンター等で測定し、この転移量を増加させる化合物を選択することにより、LKB1タンパク質の活性を促進する化合物を単離することができる。単離した化合物を疾患の治療薬として用いる場合には、上記LKB1タンパク質を治療薬として用いる場合と同様に、公知の製剤学的製造法により製剤化して投与することができる。投与量は、通常、0.01mg/kg~1000mg/kgの範囲内である。

LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の治療には、これ以外にも、LKB1遺伝子の発現を制御する領域もしくはこれに結合する因子を利用する方法が考えられる。本発明により、LKB1遺伝子と、その5'上流領域(配列番号：1)の構造が明らかとなった。これらの領域内にLKB1遺伝子の発現を調節する領域(プロモーターやエンハンサー等)が含まれていると考えられるが、当業者にとっては、既存の方法を適宜組み合わせることにより、このLKB1遺伝子の発現を調節する遺伝子領域を特定することは容易である。遺伝子調節領域を特定する方法としては、例えば、  
(a) LKB1遺伝子の5'上流領域(配列番号：1に記載の塩基配列若しくはその一部からなるDNA)の下流にレポーター遺伝子が連結されたベクターを構築する工程、  
(b) 該ベクターを適当な細胞に導入する工程、(c) レポーター遺伝子の活性を検出する工程、を含む方法が挙げられる。具体的には、例えばLKB1遺伝子の上流領域を様々な制限酵素で切断することなどにより適当な大きさの断片とし、これをホタルルシフェラーゼ遺伝子や、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、あるいはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子などのリポ

一ター遺伝子上流に組み込んだ発現ベクター (PicaGene™ Vector 和光純薬工業株式会社 など) を作製する。次いで、これをCOS細胞、HEK293細胞、CHO細胞などの適当な宿主細胞に導入し、一定時間培養後、細胞内外のそれぞれのリポーター遺伝子産物の量を測定することにより、組み込まれた遺伝子断片のプロモーター活性を測定することができる。こうして、活性を有する遺伝子断片が同定されれば、これをさらに小さい断片にして同様な作業を繰り返すことにより、より狭い領域に活性部位を特定していくことができる。最終的には特定された領域の塩基配列を、部位特異的変異導入法等により変化させた後に活性を測定し、活性部位であることを確認することができる。LKB1遺伝子の発現を制御する領域は、例えば、上記の正常なLKB1遺伝子上流に結合させて、LKB1遺伝子に変異している患者に投与することにより、生体内における自然な発現制御下で、LKB1遺伝子を発現させることができるため上記の遺伝子治療において特に有用である。

また、LKB1遺伝子上流域からプロモーター部位が特定されれば、この部位を持つリポーター遺伝子発現ベクターを用い、様々な化合物を用いてリポーター遺伝子産物の産生に及ぼす影響を調べることにより、簡便にLKB1遺伝子発現量を調節する化合物をスクリーニングすることが可能である。このようなスクリーニング方法としては、(a) LKB1遺伝子プロモーター部位の下流にレポーター遺伝子が連結されたベクターを構築する工程、(b) 該ベクターを適当な細胞に導入する工程、(c) 該細胞に被検化合物を接触および/または導入してレポーター遺伝子の活性を検出する工程、を含む方法が挙げられる。被検化合物としては、例えば、タンパク質、ペプチド、合成化合物、天然化合物、遺伝子、遺伝子産物などが挙げられるが、これらに制限されない。

また、プロモーター部位に被検試料を接触させて、該プロモーター部位に結合する化合物 (タンパク質など) を選択することにより、LKB1遺伝子の発現を制御する化合物をスクリーニングすることも可能である。例えば、プロモーター部位の塩基配列を持つ合成オリゴDNAなどを作製し、これをセファロースなどの適当な

支持担体に結合させ、これに細胞抽出液などを接触させることにより、このプロモーター部位に結合し、LKB1遺伝子の発現を制御する転写調節因子を、アフィニティー精製などにより精製することもできる。

なお、本発明者等により、ポイツ・イエガー患者において、LKB1遺伝子が発現することが原因となり、ポリープなどの新生物が生じることが明らかにされた。このため、LKB1タンパクの量や活性を減少させることにより、正常な細胞に一時的な細胞増殖活性を賦与することが可能であるといえる。従って、LKB1遺伝子もしくはcDNAに対するアンチセンスDNA、またはLKB1タンパク質の活性を阻害する化合物などを利用して、LKB1タンパクの量や活性を人為的に減少させることにより創傷治癒、組織再生等の新たな細胞増殖を必要とする疾病の治療を行うことも考えられる。

#### 図面の簡単な説明

図1 aはLKB1染色体遺伝子、及びその近傍領域の構造と、制限酵素地図を示す。RはEcoRI、BはBamHI、SはSacI、KはKpnI、BssHはBssH IIのサイトをそれぞれ示す。LKB1遺伝子の9個のエキソンをボックスで示した。黒く塗られたボックスは翻訳領域を、白抜きのボックスは非翻訳領域をそれぞれ表す。図1 bはポイツ・イエガー患者Aに見られた遺伝子再編成を模式的に示した。上部が正常な遺伝子構造、下部がポイツ・イエガー患者Aの変異LKB1遺伝子の構造である。また、PCR解析に用いたプライマーの向きと位置関係を矢印で示した。

図2は、マイクロサテライトマーカーD19S886の近傍領域におけるコスミドクローン・コンティグと、EcoRIサイトのマップを示す。下部に、ヒト染色体19p13.3領域におけるマイクロサテライトマーカーD19S886と、LKB1遺伝子との位置関係を模式的に示した。telはテロメア、cenはセントロメアの存在する方向を示す。上部に、整列させた部分的に重複するコスミドクローンを示した。

図3 aはポイツ・イエガー患者Aの3世代に渡る家系図を表す。右半分が塗りつ

ぶされたシンボルは罹患しているメンバーを示す。bはDJ666プライマーとDJ660プライマーによる長距離PCR解析の結果を示す。罹患しているメンバーにのみ黒三角で示した2.5kbpの異常な増幅産物が見られる。cはDJ666プライマーとDJ684プライマーによるPCR解析の結果を示す。罹患しているメンバーにのみ増幅産物が見られ、逆位が存在することがわかる。

図4は、PCRによって増幅されたLKB1の各エキソンのアガロース電気泳動像を表す。上に増幅されているエキソンの番号を示した。MWは分子量マーカを表す。

図5は、PCR-RFLPによる解析の結果を示す電気泳動像である。AhdI、BsrBI、RsaI、ScaIは、それぞれの制限酵素で処理されたサンプルであることを表す。WTは健常人、Bはポイツ・イエガー患者B、FAはポイツ・イエガー患者FA、MAはポイツ・イエガー患者MA、Dはポイツ・イエガー患者Dからそれぞれ得たDNAサンプルであることを示す。MWは分子量マーカを表す。

図6は、免疫沈降したLKB1タンパク質の自己リン酸化能を各種二価カチオン存在下で調べた図である。LKB1の自己リン酸化能（キナーゼ活性）は $Mg^{2+}$ によってはあまり活性化されず、 $Mn^{2+}$ によって強く活性化されていることがわかる。

図7は、野生型LKB1タンパク質と各変異体の自己リン酸化能を調べた図である。上のパネルは自己リン酸化能を示すオートラジオグラフィ像、下のパネルは抗c-Myc抗体によって染色したウエスタンブロットティングの結果である。各タンパク質はほぼ同量産生されていることがわかる。

図8は、大腸菌によって発現させたGST融合LKB1-mycタンパクの、ウエスタンブロットティングによる解析結果を示す電気泳動像である。Mは分子量マーカ、1はIPTGによる誘導前の大腸菌ライゼート、2はIPTGによる誘導後の大腸菌ライゼート、3はグルタチオンセファロースにより精製したGST融合LKB1-mycタンパク質を示す。

「抗Myc抗体」と示したフィルターは抗myc抗体で染色した結果を、また「抗LKB1抗体」と示したフィルターは、アフィニティー精製した抗LKB1ペプチド抗体で染色した結果を表す。

図9は、各抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果である。レーン1はpcDNA3ベクターのみをトランスフェクトしたCOS7細胞のライゼート、レーン2はpcDNA3/LKB1mycをトランスフェクトしたCOS7細胞のライゼート、レーン3はHeLa S3細胞のライゼートをサンプルとしている。左に示した抗体、および、抗c-Myc抗体によって染色されている。上部にプレインキュベーションに用いたペプチドを示した。

図10は、抗LKB1 P3抗体を用い、ヒト胎児結腸の組織切片を染色した図である。上皮性細胞の細胞質が染色されている。また、一部内分泌細胞と思われる細胞が非常に強く染色されている。

図11は、抗LKB1 P3抗体を用い、ヒト成人膵臓の組織切片を染色した図である。島細胞群が染色されている。

図12は、抗LKB1 P3抗体を用い、ヒト胎児精巣の組織切片を染色した図である。未発達の生殖細胞が強く染色されている。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

#### [実施例1] ヒト染色体19p13.3領域におけるコスミドクローン・コンティグの構築

ヒト染色体の19p13.3領域について、領域内の全遺伝子の効率的な同定を目指し、コスミドクローンなどからなる連続クローン・コンティグ（整列クローン・コンティグ）の構築を行った。まず、FISHマッピングなどによってこの領域にマップされたコスミドクローン群から、短い異なる重複部分を有する適当なコスミドを選択し、これらのクローン間の空白を、コスミドライブラリー、フォスミドライブラリー、およびBACライブラリーをスクリーニングすることによりそれを埋めるクローンを順次得て行くこと（コスミドウォーキング、クロモゾームウォーキ

ング)により埋めていった。こうして、染色体19pter領域における、1.5Mbpからなる連続したクローン・コンティグを構築し、その高分解物理地図を作製した。

具体的には、クローン・コンティグの構築は以下のように行った。Lawrist5ベクターおよびLawrist16ベクターにクローニングされた2つの19番染色体特異的コスミドライブラリー、pBeloBac11ベクターにクローニングされた19番染色体特異的フォスミドライブラリー、全ヒトゲノムコスミドライブラリー (Stratagene)、および全ヒトゲノムBACライブラリー (Research Genetics) を用い、以前にFISH法によりマップされ、整列化されている染色体19p13.3由来の小さいコスミドクローン・コンティグを伸長した (Ashworth, L.K. et al. An integrated metric physical map of human chromosome 19. *Nature Genet.* 11, 422-427 (1995).)。まず、19p13.3領域上のPRNT3遺伝子座 (Zimmer, M. et al. Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 89, 8215-8219 (1992).) およびGZMM遺伝子座 (Pilat, D. et al. The human Metalloproteinase gene (GZMM): structure, sequence and close physical linkage to the serine protease gene cluster on 19p13.3. *Genomics* 24, 445-450 (1994).) をそれぞれ含む2つのコンティグの末端からコスミドウォーキングを開始した。すなわち、コンティグ末端のEcoRI断片をプローブとし、高密度コスミドフィルターおよびフォスミドフィルターを、Cot1 DNA (New England Biolabs) でバックグラウンドを低減した条件で、スクリーニングし、順次重複するクローンを得た。いくつかの場合においては、Lawristベクター特異的プライマーDJ180 (配列番号: 35/CGACTCACTATAGGGAGACCCA) およびDJ181 (配列番号: 36/CCTCGAGAATTACCCTCACTAA) を用いて直接コスミドインサートの末端を配列決定した。得られた配列は、(i)データベースを検索し、既知の遺伝子と有意な相同性を示す新規遺伝子を同定するため、および(ii)さらにクロモソームウォーキングを行うために使用するSTS(Sequence Tagged Site)を作製するため、に用いた。こうして19番染色体テロ

メア領域において1.5Mbpに渡って整列化されたコスミドクローン・コンティグを得た。これらコスミドクローンにつき、BamHI, BssHII, EcoRI, HindIII, KpnIそしてSacI制限酵素サイトをマッピングし、制限酵素地図を作製した。より具体的には、ラムダターミネラーゼおよび部分的酵素分解により線状化したコスミドDNAのcos部位を標識した後に制限酵素で処理し、得られた切断断片の大きさから決定した (cosサイト標識法。Rackwitz, H.R., et al. Analysis of cosmids using linearization by phage lambda terminase. Gene 40, 259-266 (1985))。

【実施例2】 19p3.3 領域コスミドクローン・コンティグ内にマップされる遺伝子の同定

19p3.3 領域において、遺伝子マーカーD19S216よりテロメア側に91個のEST(Expressed Sequence Tag)が、ラディエーションハイブリッドマッピング法により既にマッピングされていた。これらのEST間における重複を、UNIGENEプログラム(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/index.html>)を用いて解析することにより除き、最終的に60個の別々の遺伝子に由来すると考えられるESTを得た。それぞれのESTを増幅するためのプライマーセットをResearch Geneticsから購入し、先に構築した19p3.3 領域コスミドクローン・コンティグ中のコスミドクローンをそれぞれ重複しない4つのプールに分けたものをPCRによりスクリーニングすることにより、それぞれの遺伝子がこれらのコンティグ内に存在するかどうかを検定した。陽性シグナルを与えたESTについては、さらにデータベースを検索することにより、その配列を伸長することができる重複したESTを検索した。次に、それぞれの陽性ESTに対応するcDNAクローンをResearch Geneticsから購入し、そのインサートcDNAをプローブとし、EcoRI消化したコスミドクローンに対するサザンハイブリダイゼーションを行うことにより、それぞれの遺伝子のこのコンティグ内における正確な位置を決定した。

また、遺伝子マーカーD19S886 (Genbank登録番号: Z52881) についても同様に、このコスミドクローン・コンティグ内における正確な位置を決定した。すなわち、



このマーカの配列を持つDNA断片をセンスプライマー（配列番号:37/TGGATCTA CACTCCGGC）およびアンチセンスプライマー（配列番号:38/ATTTTACTGGCTGGCACT TG）を用いたPCRにより全ヒトDNAから増幅し、これをプローブとして、コスミドクローンR32184をEcoRI、SacI、BamHI、およびBssHIIで消化した後にサザンブロッティングを行い、このマーカのEcoRIマップ上の正確な位置を決定した。

また、マウス10番染色体上においてヒトの19p領域に相当すると考えられている領域に既にマップされている遺伝子についても、同様な手法により、このコンティグ内におけるマッピングを行った。さらに、コスミド末端の配列を用いてLLNLデータベース[<http://www-bio.llnl.gov>]などのデータベースを検索することにより、さらに新しい遺伝子をこのコンティグ内に同定した。

#### [実施例3] ポイツ・イエガー遺伝子の候補領域の決定

ポイツ・イエガー遺伝子が存在する候補領域としては、連鎖解析により、マーカーD19S878およびD19S565よりテロメア側であることが報告されていたが、テロメア側には全くマーカーが報告されていないため、これらのマーカーよりテロメア側に約2Mb以上もの領域が候補領域として考えられた。しかし、D19S886マーカーとポイツ・イエガー遺伝子座との強い連鎖を考慮すると、変異遺伝子はこのマーカーの極近傍に位置する可能性が考えられた。そこで、まずD19S886マーカーのコスミド・コンティグにおける正確な位置を上述したように決定し、この近傍に存在すると考えられる遺伝子を探索した。その結果、D19S886マーカー近傍400kb p内には21個の遺伝子が存在することが明らかとなった。これらの遺伝子の中から、他の生物種におけるカウンターパート遺伝子の解析の情報など様々な生物学的情報を考慮し、ポイツ・イエガー症候群の原因遺伝子となりうる可能性ある遺伝子を選抜した。それぞれについてポイツ・イエガー患者より調製したDNA試料を用いて患者の染色体DNA上の変異の有無を検索した。

#### [実施例4] LKB1遺伝子の同定およびゲノム構造の解析

19p3.3 領域コスミドクローン・コンティグに含まれるコスミドクローンR2911

4のテロメア側末端から得た配列でGenBankの配列相同性検索を行ったところ、新規なヒトセリンスレオニンプロテインキナーゼ (LKB1) をコードするcDNA (Genbank登録番号U63333) と32bpの短い範囲で一致することが判明した。LKB1 cDNA配列の5'末端および3'末端に対応する2つの配列決定用プライマーDJ649 (配列番号:24) およびDJ650 (配列番号:29) を作製し、直接コスミドクローンのシーケンシングを行うことにより、R29114クローン、およびこのクローンに隣接するR26552クローンにLKB1遺伝子が存在していることが判明し、この領域にLKB1遺伝子が存在することが確認された。さらに詳細な解析を行うため、LKB1遺伝子の全エクソン-イントロン構造の決定を目的に、LKB1cDNA配列 (1302bp) に基づき、PCRおよび配列決定用のプライマーを設計し (下記、表1, 表2) 解析を行った。個々の遺伝子セグメントは、コスミドDNAからPCRにより増幅し、PCR産物を直接シーケンシングすることにより配列を決定した。こうして得た配列をLKB1cDNA配列と比較することにより、エクソンの位置および全イントロンのスプライス部位を同定した。全エクソンの制限酵素地図上の位置は、ゲノム配列中に見られる制限酵素サイトを比較すること、及び長距離PCR(Long distance PCR)法により各遺伝子セグメント間の距離を比較することによって決定した (図1a)。特に長いイントロンであるイントロン1および8を除くほとんどの領域についての塩基配列は、両方向からシーケンシングすることにより決定した。

その結果、LKB1遺伝子は、23kb以上の範囲において、9個のコーディングエクソンと1個のノンコーディングエクソンに分割されてコードされていることが明らかとなった。またこの遺伝子は、テロメア側からセントロメア方向に向かって転写されることが推測された (図2)。興味深いことに、イントロン2のスプライス連結部は、通常のイントロン境界に見られるGT/ATルールに一致しないことが明らかとなった。イントロン2の5'末端は、「ATATCCCTT」で開始し、「CCCAC」で終結し、そして「TCCTTAAC」モチーフがエクソン3の15bp上流から開始する。これらの3つの配列因子は、最近報告された極めて稀な真核生物イントロンの特徴に一致す

る。このパターンを持つイントロンは、一般的でないU12 snRNA依存的なスプライシングを受ける。

[実施例5] ポイツ・イエガー患者における変異解析

ポイツ・イエガー患者における変異解析において利用したプライマーの配列を下記表1に示す。

表1

---

DJ705	5'-GGGAATTCGGAACACAAGGAAG-3'	(配列番号:23/エキソン1)
DJ649	5'-ATGGAGGTGGTGGACCCGC-3'	(配列番号:24/エキソン1)
DJ659	5'-GTTACGGCACAAAAATGTCATCCA-3'	(配列番号:25/エキソン2)
DJ666	5'-GGTGATGGAGTACTGCGTGTG-3'	(配列番号:26/エキソン3)
DJ684	5'-ACATCGGGAAGGGGAGCTACG-3'	(配列番号:27/エキソン6)
DJ660	5'-CCGGGCACCGTGAAGTCCTG-3'	(配列番号:28/エキソン8)
DJ650	5'-TCACTGCTGCTTGCAGGCC-3'	(配列番号:29/エキソン9)
DJ717	5'-GCAGGCGGCCAGCCTCA-3'	(配列番号:30/エキソン9)

---

5人の互いに無関係なポイツ・イエガー患者 (A、B、D、MA、FA、) 由来のDNA試料を用いて、変異解析を行った。まず、プライマーセットDJ659とDJ660、およびDJ666とDJ660を用いた長距離PCRにより、遺伝子の欠失および再構成についてスクリーニングを行った。

プライマーDJ666とDJ660を用いたPCRにより、全ての患者、及び対照である健常者から得られたDNA試料において、3.9kbpの増幅産物が生じた。しかし、一人のポイツ・イエガー患者Aにおいては、2.5kbpの産物も同時に観察されることが見いだされた (図3b)。このDNA断片をサブクローニングした後、塩基配列を決定して、

対応する正常な染色体DNA配列と比較すると、この患者のLKB1遺伝子においては複雑な染色体再構成が存在していることが明らかになった (図 1 b)。すなわち2.5 kbpのPCR産物は、それぞれイントロン3および5の間における1286bpの欠失と、イントロン7内における81bpの欠失の二つの変異を有していた。大きい方の欠失には、エクソン4および5が含まれる。さらに、エクソン6および7が含まれる中央部は逆位を起こしていた。この逆位が存在することを確認するため、エクソン3およびエクソン6に特異的なセンス鎖プライマーDJ666とDJ684を用いたPCR解析を行った。これらのプライマーは、両方ともがセンス鎖に対応するプライマーであるため、逆位が起こっている場合のみPCR産物が生じることになる。その結果、ポイツ・イエガー患者Aの2世代に渡る家系メンバーのうち、罹患している者全員にこの逆位が存在することが明らかとなった。一方、同家系のメンバーであっても罹患していない者、および対照の健常者にはこの変異は見られなかった (図 3 a、c)。

この複雑なLKB1遺伝子の変異を転写産物のレベルで解析するため、患者Aの末梢血液細胞から単離したRNAを用いてRT-PCR解析を行った。なお、RNAはBlood RNA Isolation Kit (Qiagen) を用いて単離し、Superscript (GIBCO-BRL, Life Technologies) を用いてcDNAへと逆転写した。プライマーセットDJ660とDJ666を用いたPCRにより730bpおよび270bpの2種類の産物が生じた。両者間の約460bpの長さの相違は、エクソン4から7によりコードされる転写産物が456bpであることとよく一致し、この複雑な変異によりエクソン4から7がスプライスアウトされている転写産物が生じているものと考えられた。エクソン3から8への異常なスプライシングはフレームシフトを引き起こさないが、こうして生じる転写産物は、触媒ドメインのC末側半分を欠失するわずか281アミノ酸残基からなる異常なタンパク質をコードしているものと考えられる。

患者B、D、MA、およびFAにおいては、異常な長さを持つPCR産物は観察されなかった。そこでLKB1遺伝子における点突然変異をスクリーニングするため、8種類の

プライマーセット (表2) を設計し、それぞれのエキソンを独立に増幅し、直接シーケンシングを行った (図4)。

表2

---

DJ698	5' -GGTCCCCGAGGACGAAGTTGA-3'	(配列番号:7/エキソン1 センス)
DJ673	5' -ACCATCAGCACCGTACTGG-3'	(配列番号:8/エキソン1 アンチセンス)
DJ703	5' -TCGCCGGCCGATGACAGA-3'	(配列番号:9/エキソン2 センス)
DJ674	5' -AAGGAGACGGGAAGAGGAGCAG-3'	(配列番号:10/エキソン2 アンチセンス)
DJ690	5' -GAGGAGGGGCAAGGTGGGT-3'	(配列番号:11/エキソン3 センス)
DJ680	5' -GTGTGGCCTCACGAAAGGAG-3'	(配列番号:12/エキソン3 アンチセンス)
DJ692	5' -AGCTGGGCCTGTGGTGTGTTG-3'	(配列番号:13/エキソン4-5 センス)
DJ694	5' -CAGAGCCCCCTCGGAGTGTG-3'	(配列番号:14/エキソン4-5アンチセンス)
DJ695	5' -GCCTCTGTCCCTGGGGTAGA-3'	(配列番号:15/エキソン6 センス)
DJ693	5' -TCAGTCCTCTCAATGCCTGCTG-3'	(配列番号:16/エキソン6 アンチセンス)
DJ696	5' -GCGGGGTCCCCCTTAGGAG-3'	(配列番号:17/エキソン7 センス)
DJ697	5' -CTAGCGCCCGCTCAACCAG-3'	(配列番号:18/エキソン7 アンチセンス)
DJ675	5' -GGAGCTGGGTTCGAAAACCTGGA-3'	(配列番号:19/エキソン8 センス)
DJ702	5' -TGCTCCCGTGGGACATCCTG-3'	(配列番号:20/エキソン8 アンチセンス)
DJ676	5' -GTAAGTGCGTCCCCGTGGTG-3'	(配列番号:21/エキソン9 センス)
DJ677	5' -GTGGCATCCAGGCGTTGTCC-3'	(配列番号:22/エキソン9 アンチセンス)

---

ただし、エキソン4及び5は、イントロンが短いため、一回のPCRで同時に増幅した。解析の結果、全ての患者においてLKB1対立遺伝子の片方において変異が存在することが明らかとなった。表3にその結果を示す。なお、表中のコドンは最後

の野生型コドンの番号を示す。また、制限酵素部位はポイツ・イエガー患者と健康者由来のPCR産物における変異の有無を証明するために用いた。制限酵素の+と-はそれぞれ変異による制限酵素部位の獲得および消失を示す。また、B、MA、FA患者のLKB1の塩基の番号はGenbank登録ナンバーU63333に登録されているLKB1 cDNAの塩基配列のナンバーに従った。D患者のLKB1の塩基の番号はGenbank登録ナンバーAF032985に登録されているLKB1遺伝子の塩基配列のナンバーに従った。

表 3

患者	変異	位置	コドン	部位解析	予想される影響
A	逆位/欠失	エキソン4-7	155		・コドン156-307欠失
D	G2412A	イントロン3	156	+ScaI	・スプライスアクセプターの欠失 ・エキソン4のスキップ; 読み枠シフト ・コドン242での終止
B	716欠失 GGTC	エキソン5	240	-AhdI	・コドン285で終止; 読み枠シフト
MA	C759A	エキソン6	252	-RsaI	・Tyr253(TAC)→終止(TAA)
FA	843欠失G	エキソン6	280	-BsrBI	・読み枠シフト; コドン286で終止

患者MAにおいては、759番目の塩基（エキソン6）のCがAへと置換されており、そのために253番目のアミノ酸であるチロシンをコードするコドンTACが終止コドンTAAへと変化していた。患者Bにおいては、717番目から720番目の塩基（エキソン5）の4塩基対が欠失しており、これにより239番目のアミノ酸であるトリプトファンをコードするコドンの135bp下流で終始コドンが生じていることが判明した。

患者Dにおいては、厳密に保存されているイントロン3の3'末端のスプライスアクセプター部位がAGからAAに変化していることが見いだされた。エキソン3がエキソン4をスキップしてエキソン5と連結された場合には、155番目のアミノ酸の後で読み枠がシフトし、241番目のアミノ酸の後でタンパク質のアミノ酸配列は終止してしまうと考えられる。患者FAは、843番目の塩基（エキソン6）であるGが欠失しており、これにより読み枠のシフトが起こり、857番目の塩基から終止コドンTGAが生じることが判明した。

これらの5人のポイツ・イエガー患者のLKB1遺伝子における変異は全て、キナーゼドメインの必須部分を消失する変異であり、LKB1の高次構造を崩壊させるものと考えられる。さらに、これらの患者のうち4人は、LKB1の調節ドメインであると考えられるC末端部が消失していた。LKB1遺伝子におけるこれらの変異により、その遺伝子産物である変異LKB1タンパク質はキナーゼ活性を失い、LKB1が関与するシグナル伝達経路が遮断されることが推測された。

また、ポイツ・イエガー患者であることが疑われた日本人のポリポーシス患者（SK1）についても、LKB1遺伝子の構造を調べた。この患者の末梢血からQIAamp Blood kit (Qiagen) を用いゲノムDNAを抽出し、これを鋳型として表2に記載したプライマーを用いたPCRによりLKB1遺伝子を増幅した。このPCR産物を直接シーケンシングし、解析したところ、エキソン5のコード領域に一塩基(C)の欠失（207番目のAspに対応する「GAC」の「C」の欠失）が存在することを見出した。この変異により207番目のAsp以降がフレームシフトを起こし、これにより不完全な長さの、おそらくキナーゼ活性を有しないタンパク質が生じると考えられた。

なお、DNA試料からのLKB1遺伝子のPCRによる増幅は、基本的に次の条件に従って行った。反応液としては、染色体DNA(鋳型DNA) 100ng、プライマー 50pmol、PCRバッファーJ (Invitrogen)、AmpliTaq (Perkin Elmer) 2.5Unit、およびDMSO 2.5 $\mu$ lを含む全量50 $\mu$ lの反応液を用いるか、あるいは染色体DNA(鋳型DNA) 100ng、プライマー 20pmol、10 x TaKaRa Taqバッファー (TaKaRa) 5 $\mu$ l、2.5mM dN



TPs (TaKaRa) 4 $\mu$ l、TaKaRa Taq. (TaKaRa) 0.4 $\mu$ l、TaqStart™ Antibody (CLONTECH) 0.4 $\mu$ lを含む全量50 $\mu$ lの反応液を用いた。反応は、94°Cで2から4分、次いで「94°Cで30秒から45秒、58°Cあるいは62°Cで30秒、及び72°Cで45秒」を35サイクル、次いで72°Cで3分を行った。PCR産物は、アガロース電気泳動後ゲルからQIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) を用いて精製するか、あるいはPCR反応液からQIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen) を用いて精製した後、これを鋳型として、直接、両方向からシーケンシングした。シーケンシングはDrhodamine terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いて行った。

また、各患者から調製したDNA試料から変異が存在する領域を上にした条件などのPCRで増幅した後、それぞれの変異に対応した制限酵素で切断し、切断断片の長さを調べることにより、これらの変異がPCRエラー、あるいはシーケンシングエラーでないことを確認した (PCR-RFLP解析)。すなわち、PCR増幅産物5 $\mu$ l、制限酵素 (Ahd I, BsrB I, RsaI, ScaI) 4Unit、制限酵素用バッファー2 $\mu$ lを含む全量20 $\mu$ lの反応液を37°Cで1.5時間保温し、アガロース電気泳動により各DNA断片の長さを調べた。

同様な解析を50人の健常人から得たDNA試料についても調べたところ、これらの変異は全く観察されず、このことから、これらの変異はポイツ・イエガー患者に特異的な変異であることが示された (図5)。

#### [実施例6] 大腸菌、哺乳動物細胞用発現プラスミドDNAの作製

LKB1 cDNAクローンを鋳型とし、LK E1プライマー (配列番号: 39/5'-gat gaa ttc ggg tcc agc atg gag gtg gtg gac-3') とLK E2プライマー (配列番号: 40/5'-gat gaa ttc tta gag gtc ttc ttc tga gat gag ctt ctg etc ctg ctg ctt gca ggc cga-3') を用いたPCRを行うことにより、C末端にc-Myc エピトープ配列 (配列番号: 41/Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu) が付加された全LKB1アミノ酸配列をコードするDNA断片を増幅し、これをプライマーに付加したEcoRIサイトで切断した後、哺乳動物細胞用発現ベクターであるpcDNA3ベクター

(Invitrogen)のEcoRIサイト、あるいは大腸菌用発現ベクターであるpGEX-5X-1ベクター(Pharmacia)のEcoRIサイトに組み込んだ。シーケンシングによりPCRエラーが無いことを確認したクローン(哺乳動物細胞用 - pcDNA3/LKB1myc、大腸菌用 - pGEX/LKB1myc)を選抜し、発現実験に用いた。

また、pcDNA3/LKB1mycを鋳型とし、GeneEditor™(Promega)を用いたin vitroミュータジェネシスにより、ポイツ・イエガー患者において発見されたアミノ酸置換変異を含む変異を導入した発現プラスミドDNAを作製した。すなわち、D176N変異(176番目のAspがAsnに置換する変異。以下同様に示す。)を持つ発現プラスミドDNA(pcDNA3/LKB1 D176Nmyc)にはLK D176Nプライマー(配列番号: 45/5'-at t g t g c a c a a g a a c a t c a a g c c g g g g -3')、W308C変異(pcDNA3/LKB1 W308Cmyc)にはLK W308Cプライマー(配列番号: 46/5'-c g g c a g c a c a g c t g c t t c c g g a a g a a a -3')、L67P変異(pcDNA3/LKB1 L67Pmyc)にはLK L67Pプライマー(配列番号: 47/5'-g t g a a g g a g g t g c c g g a c t c g g a g a c g -3')、そしてK78I変異(pcDNA3/LKB1 K78I myc)にはLK KI1プライマー(配列番号: 48/5'-a g g a g g g c c g t c a t c a t c c t c a a g a a g -3')を変異導入用プライマーとして用い変異導入を行った。変異導入用プライマーとキットに添付されている選択用プライマー(ボトムストランド用)を共に一本鎖にした鋳型プラスミドDNAとアニールさせ、新たなDNA鎖を合成した。これを大腸菌に導入し、変異を持つプラスミドを保持したクローンをGeneEditor™抗生物質耐性クローンとして選択した。シーケンシングにより変異が入っていることを確認し、発現実験に用いた。

LK E2プライマーの代わりにLK E4プライマー(配列番号: 42/5'-g a t g g g c c c t t a c a g g g a g g c a t a g t c a g g c a c a t c a t a t g g g t a c t g c t g c t t g c a g g c c g a -3')、あるいはLK E5プライマー(配列番号: 43/5'-g a t g a a t t c t t a g t g a t g g t g a t g g t g a t g c t g c t g c t t g c a g g c c g a -3')を用いてPCRを行い、得た断片を様々なベクターに組み込むことにより、それぞれ、抗HA抗体により認識されるエピトープ(配列番号: 44/NH<sub>2</sub>-YPYDVPDYASL-COOH)および、ヒスチジン(H)が

6個連続した配列（ヒスチジンヘキサマー）がC末に添加されるようになる。このことにより、抗HA抗体や抗ヒスチジンヘキサマー抗体を利用した方法により簡単にLKB1タンパクを検出したり、抗HA抗体やニッケルカラムなどを用いたアフィニティー精製によって精製することができる。

〔実施例7〕 哺乳動物細胞における発現とキナーゼアッセイ

LKB1発現用プラスミドDNA(pcDNA3/LKB1myc)などの約10 $\mu$ gを、SuperFect (Qia gen)を用いた方法により、COS7細胞に導入（トランスフェクション）した。すなわち、約10<sup>6</sup>個のCOS7細胞を10cmディッシュに蒔き、一晚培養した後、10 $\mu$ gのプラスミドDNAと60 $\mu$ lのSuperFectの混合物を添加し、約3時間培養を行った。その後培養液を新しいものに交換し、さらに1-2日間培養した後、細胞をトリプシン-EDTA液ではがして回収した。細胞をNP40 キナーゼライシスバッファー(10mM トリス塩酸pH7.8、1% NP40、0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA、50mM フッ化ナトリウム、5mM ピロリン酸ナトリウム、10 $\mu$ g/ml アプロチニン、1mM PMSF)に懸濁し、4°Cで30分混合することによりタンパク質を可溶化した。こうして得た細胞ライゼートにプロテインA/Gプラスアガロース(Santa Cruz)を加え30分混合することにより非特異的にビーズに吸着するタンパクを除いた。次に抗c-Myc抗体A14(Santa Cruz)を加え4°Cで1時間放置した後、プロテインA/Gプラスアガロースを加えてさらに1時間放置した。これを遠心する事により免疫複合体を沈殿させ、NP40 キナーゼライシスバッファー、1Mの塩化ナトリウムを含んだバッファー、および50mM トリス塩酸(pH7.8)によって何回か洗浄し、キナーゼアッセイに供した。

キナーゼアッセイは50mM トリス塩酸(pH 7.8)、1mM DTT、10mM 二価カチオン(Mnなど)および10 $\mu$ Ciの[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATPを含む全量50 $\mu$ lの反応系で行った。免疫沈降物をこのキナーゼアッセイ溶液中で37°C、30分保温して反応を行った後、SDS-PAGEサンプルバッファーを加え煮沸することにより反応を停止しSDS-PAGEを行った。ゲルをメタノール/酢酸溶液で固定した後、乾燥させ、BAS200イメージアナライザー (Fuji Film) によってイメージを解析した。LKB1のキナーゼ活性は自己リン

酸化能として判定した。また、発現させたタンパク質はSDS-PAGE後抗c-Myc抗体A14を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。

まず、LKB1タンパク質のキナーゼ活性に対する2価カチオン要求性を検討したところ、LKB1はMg<sup>2+</sup>によってはあまり活性化されず、Mn<sup>2+</sup>存在下に強い活性を示すことが明らかとなった(図6)。次にポイツ・イエガー患者に見つかったアミノ酸置換型変異を持つ変異体のキナーゼ活性を調べたところ、全ての変異体がほとんど活性を失っていることが明らかとなった(図7)。このことから、ポイツ・イエガー患者においてはLKB1キナーゼは活性を失っており、このことが原因となり発症する事が強く示唆された。

#### [実施例8] 大腸菌によるLKB1タンパクの発現

pGEX/LKB1mycを大腸菌DH5 $\alpha$ 株に導入し、シングルコロニーを得た。これを2xYT培地10ml中で37°C一晩培養した後、この一部を新たな2xYT培地で100倍に希釈し、600nmにおけるODが0.6になるまで37°Cで培養を続けた。その後IPTG(イソプロピル- $\beta$ -D(-)-チオガラクトピラノシド)を終濃度0.1mMになるように添加し、さらに培養を数時間続けた。大腸菌を遠心により集め、1% TritonX-100, 1% Tween 20, PBSに懸濁し、超音波処理を施すことにより、細胞を破壊し、タンパク質を可溶化させた。この可溶化サンプルよりグルタチオンセファロース4B(Pharmacia)を用いたアフィニティー精製によって、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパクとして発現されたLKB1タンパクを精製した。大腸菌で発現させたLKB1タンパク質も、抗c-Myc抗体A14を用いたウエスタンブロッティングにより検出された(図8)。

#### [実施例9] LKB1タンパクに対する抗体の作製とその利用

LKB1アミノ酸配列のN末側、およびC末側に対応する以下の2種類のペプチドを合成した(サワディテクノロジー)。

LKB1 P6ペプチド (27-45番に相当) NH<sub>2</sub>-CHRIDSTEVIIYQPRRKRAKL-COOH (配列番号: 34)

LKB1 P3ペプチド (400-417番に相当)  $\text{NH}_2\text{-CLSTKSRAEGRAPNPARKA-COOH}$  (配列番号: 31)

これらを、 $m$ -マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニミドエステル(MBS)を介した方法により、アミノ末端のシステインでキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に結合させた(サワディテクノロジー)。これを抗原としてウサギに数回免役し、抗血清を得た。この抗血清より、ペプチドに特異的に反応する抗体を、ペプチドをセルロファイン(生化学工業)に結合して作製したアフィニティカラムを用いてアフィニティ精製した。

これらの抗体(抗LKB1 P6抗体 - N末側を認識、抗LKB1 P3抗体 - C末側を認識)を用いウエスタンブロッティングを行った結果を図9に示す。いずれの抗体も、COS7細胞に発現させたLKB1mycタンパク質と考えられる約55kDaのバンド(矢印)を検出できることが示された。この反応はそれぞれ抗原としたペプチドの大過剰量と抗体をあらかじめプレインキュベートしておくことでブロッキングされることから、エピトープに特異的な反応であると考えられた。また、LKB1を発現していないことがわかっているHeLa S3細胞ライゼート中には全く交差反応は見られず、このことから、これらの抗体は非常に特異的にLKB1タンパク質を検出できることが明らかとなった。また、大腸菌によってGST融合タンパク質として発現させたLKB1タンパク質も抗LKB1 P3抗体によって検出されることが確認された(図8)。

これらの抗体を用いヒト組織切片を免疫染色した結果を図10、11、12に示す。図10はヒト胎児結腸の組織切片を染色した図である。上皮性細胞の細胞質が染色されている。また、一部内分泌細胞と思われる細胞が非常に強く染色されていることがわかる。図11はヒト成人膵臓の組織切片を染色した図である。島細胞群が染色されている。図12はヒト胎児精巣の組織切片を染色した図である。未発達の生殖細胞が強く染色されている。これらの染色は全て抗LKB1 P3抗体によって得られたものであるが、抗LKB1 P6抗体によっても同様の結果が得られた。

また、これらの反応はそれぞれの抗原ペプチドとのプレインキュベーションによって消失したことから、特異的な染色であると考えられる。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によりポイツ・イエガー症候群がLKB1遺伝子の変異により引き起こされることが解明された。これによりLKB1遺伝子、その配列に基づくプライマー若しくはプローブ、LKB1タンパク質、およびその抗体などを利用した、ポイツ・イエガー症候群をはじめとするLKB1遺伝子の変異に起因する疾患の検査や治療を行うことが可能となった。

## 請求の範囲

1. 配列番号：1乃至4のいずれかに記載の塩基配列の少なくとも一部を含む塩基配列からなる、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の検査に用いるプライマーDNA。
2. 配列番号：7乃至30のいずれかに記載の塩基配列からなる、請求項1に記載のプライマーDNA。
3. LKB1遺伝子の変異に起因する疾患がポイツ・イエガー症候群である、請求項1または2に記載のプライマーDNA。
4. 配列番号：1乃至4のいずれかに記載の塩基配列の少なくとも一部を含む塩基配列からなる、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の検査に用いるプローブDNA。
5. LKB1遺伝子の変異に起因する疾患がポイツ・イエガー症候群である、請求項4に記載のプローブDNA。
6. LKB1遺伝子を有効成分とする、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の治療薬。
7. LKB1タンパク質を有効成分とする、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の治療薬。
8. LKB1タンパク質の活性を促進する化合物を有効成分とする、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の治療薬。
9. LKB1遺伝子の変異に起因する疾患がポイツ・イエガー症候群である、請求項6乃至8のいずれかに記載の治療薬。
10. LKB1タンパク質に結合する抗体を有効成分とする、LKB1遺伝子の変異に起因する疾患の検査薬。
11. LKB1遺伝子の変異に起因する疾患がポイツ・イエガー症候群である、請求項10に記載の検査薬。
12. LKB1遺伝子の変異に起因する疾患を検査する方法であって、LKB1遺伝子

の変異を検出することを特徴とする方法。

13. LKB1遺伝子の変異に起因する疾患を検査する方法であって、

(a) 患者からDNA試料を調製する工程、

(b) 請求項1に記載のプライマーDNAを用いて患者由来のDNAを増幅する工程、

(c) 増幅したDNAを切断する工程、

(d) DNA断片をその大きさに応じて分離する工程、

(e) 分離したDNA断片に対し、請求項4に記載のプローブDNAをハイブリダイズさせる工程、

(f) 検出されたDNA断片の大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

14. LKB1遺伝子の変異に起因する疾患を検査する方法であって、

(a) 患者からRNA試料を調製する工程、

(b) 大きさに応じて調製したRNAを分離する工程、

(c) 分離したRNAに対し、請求項4に記載のプローブDNAをハイブリダイズさせる工程、

(d) 検出されたRNAの大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

15. LKB1遺伝子の変異に起因する疾患を検査する方法であって、

(a) 患者からDNA試料を調製する工程、

(b) 請求項1に記載のプライマーDNAを用いて患者由来のDNAを増幅する工程、

(c) 増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる工程、

(d) 解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程、

(e) 分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

16. LKB1遺伝子の変異に起因する疾患を検査する方法であって、

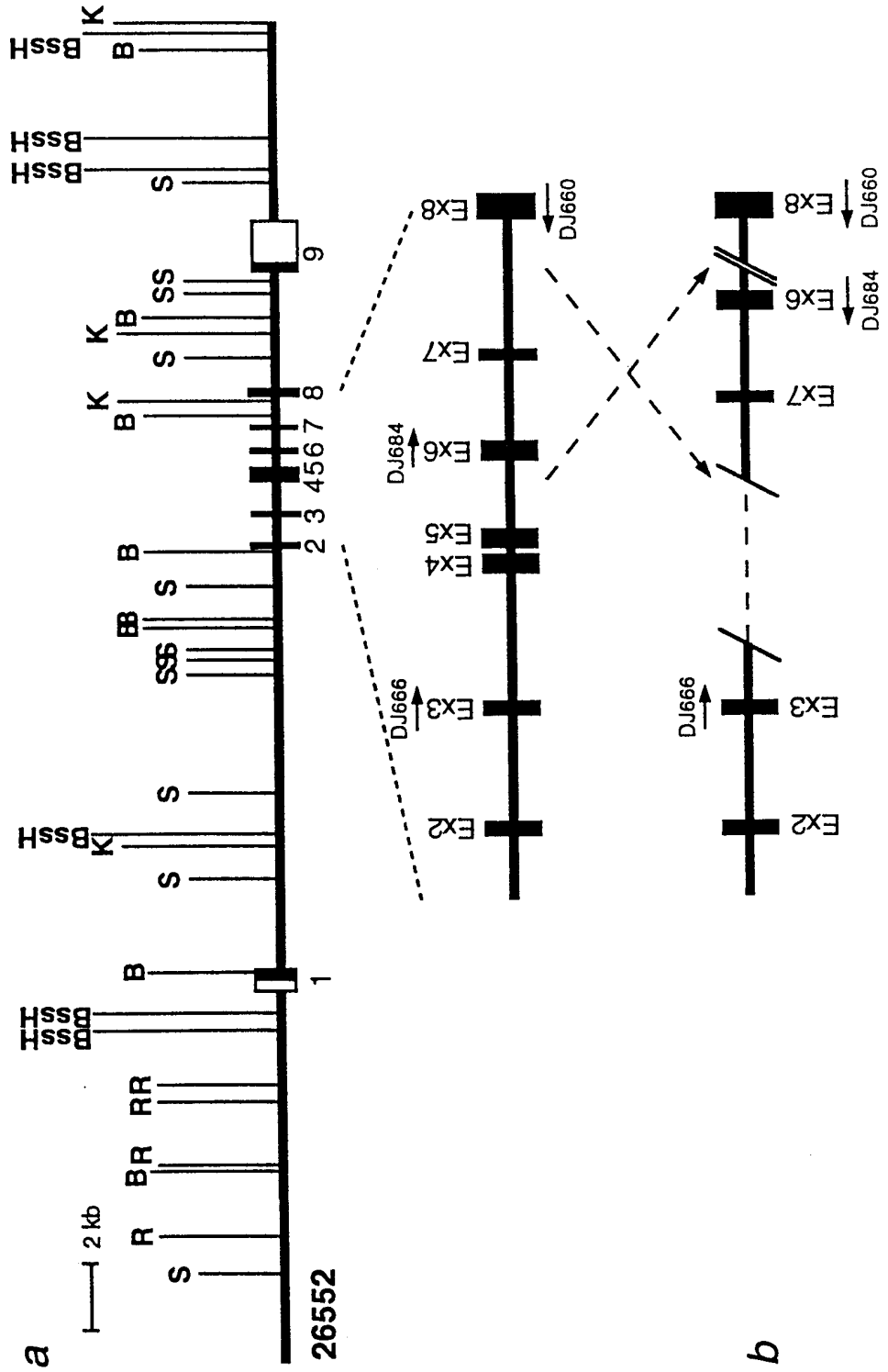
(a) 患者からDNA試料を調製する工程、



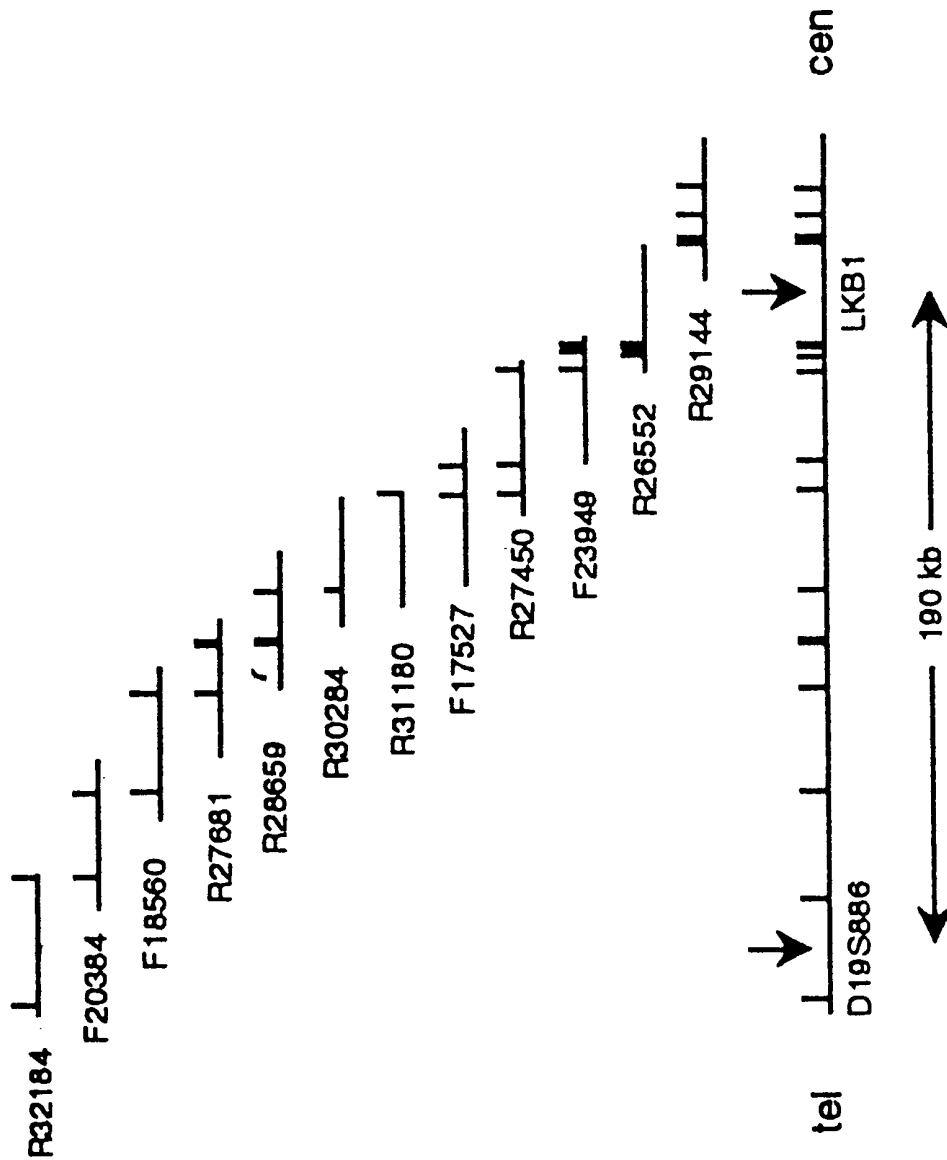
(b) 請求項 1 に記載のプライマーDNAを用いて患者由来のDNAを増幅する工程、  
(c) 増幅したDNAを、DNA変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程、  
(d) 分離したDNAのゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、  
を含む方法。

17. LKB1遺伝子の変異に起因する疾患がポイツ・イエガー症候群である、請求項 12乃至16のいずれかに記載の検査する方法。

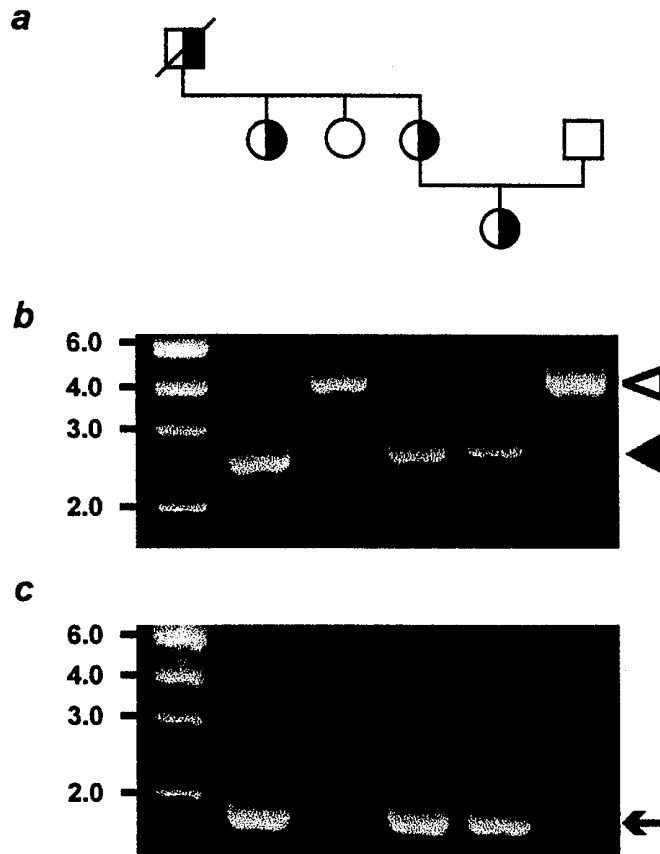
☒ 1



☒ 2

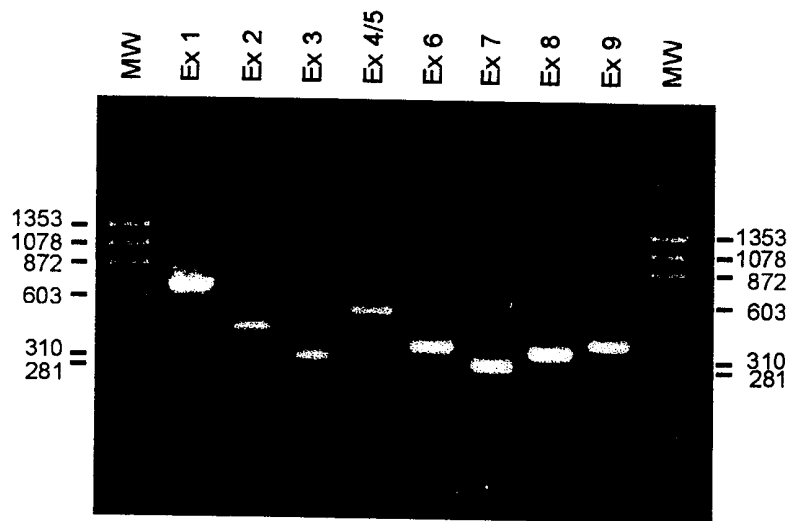


☒ 3



4 / 1 2

図 4



☒ 5

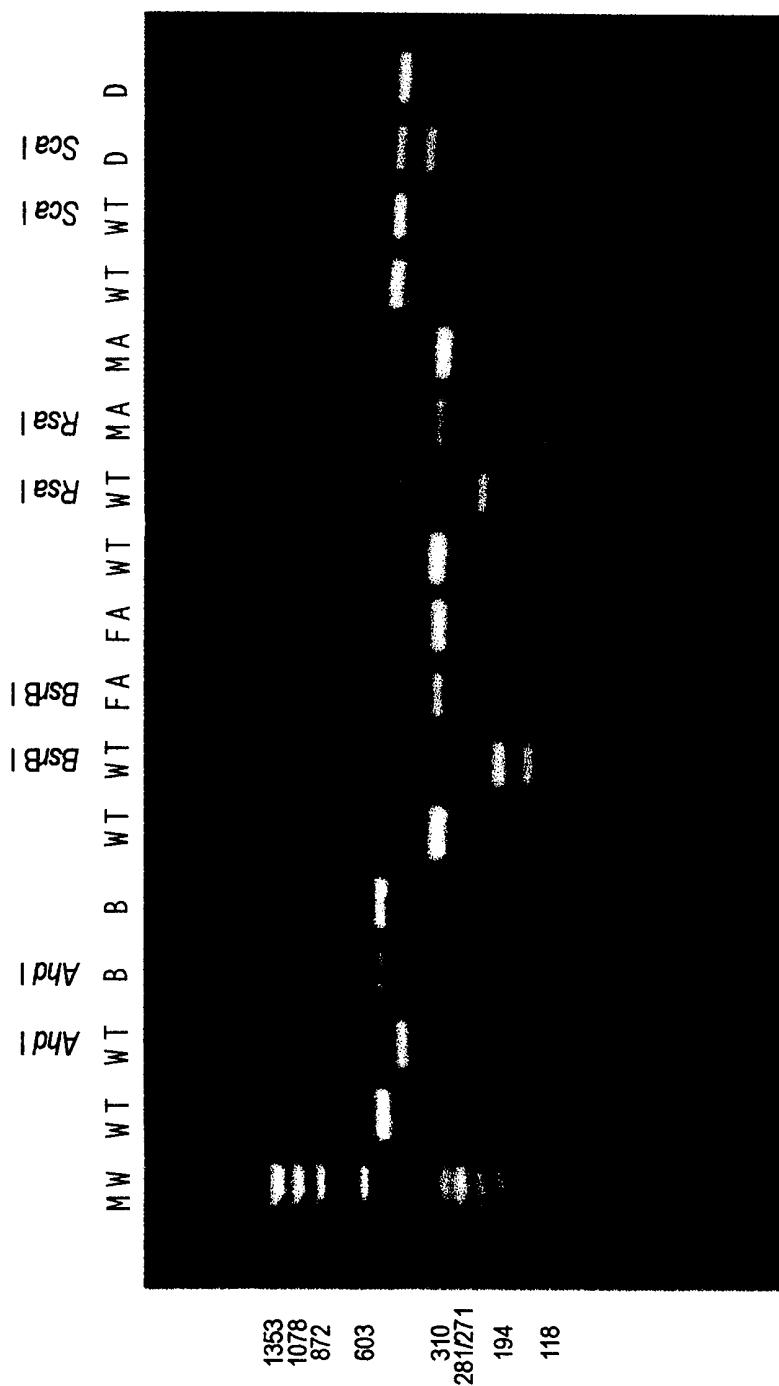


図 6

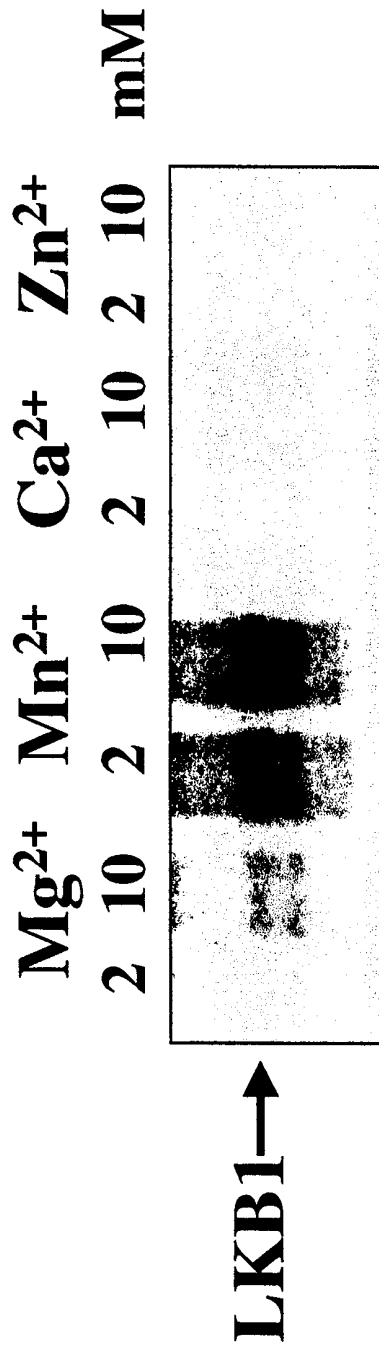
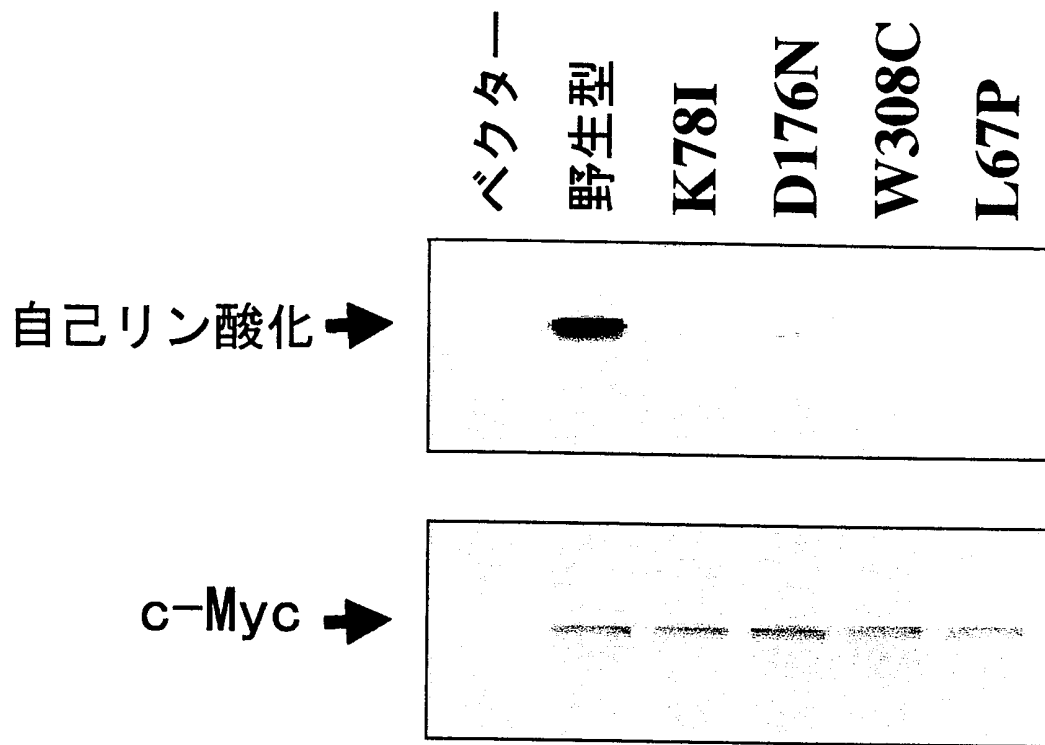


図7





☒ 8

抗Myc抗体

抗LKB1抗体

M 1 2 3

M 1 2 3

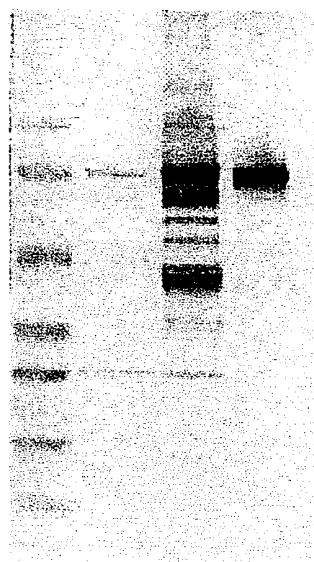
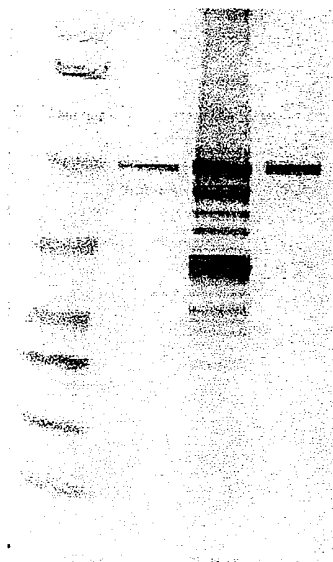


図 9

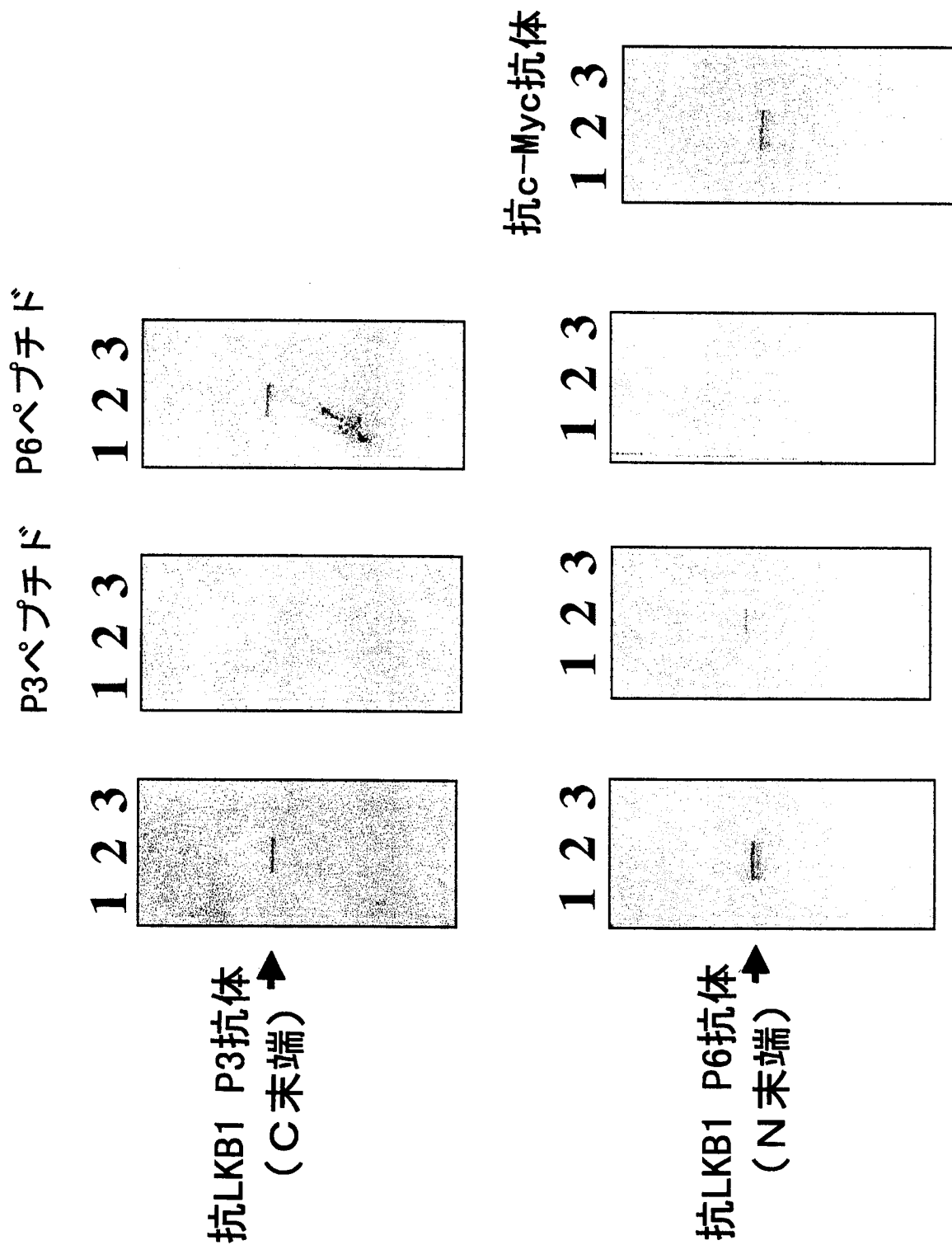


図 10

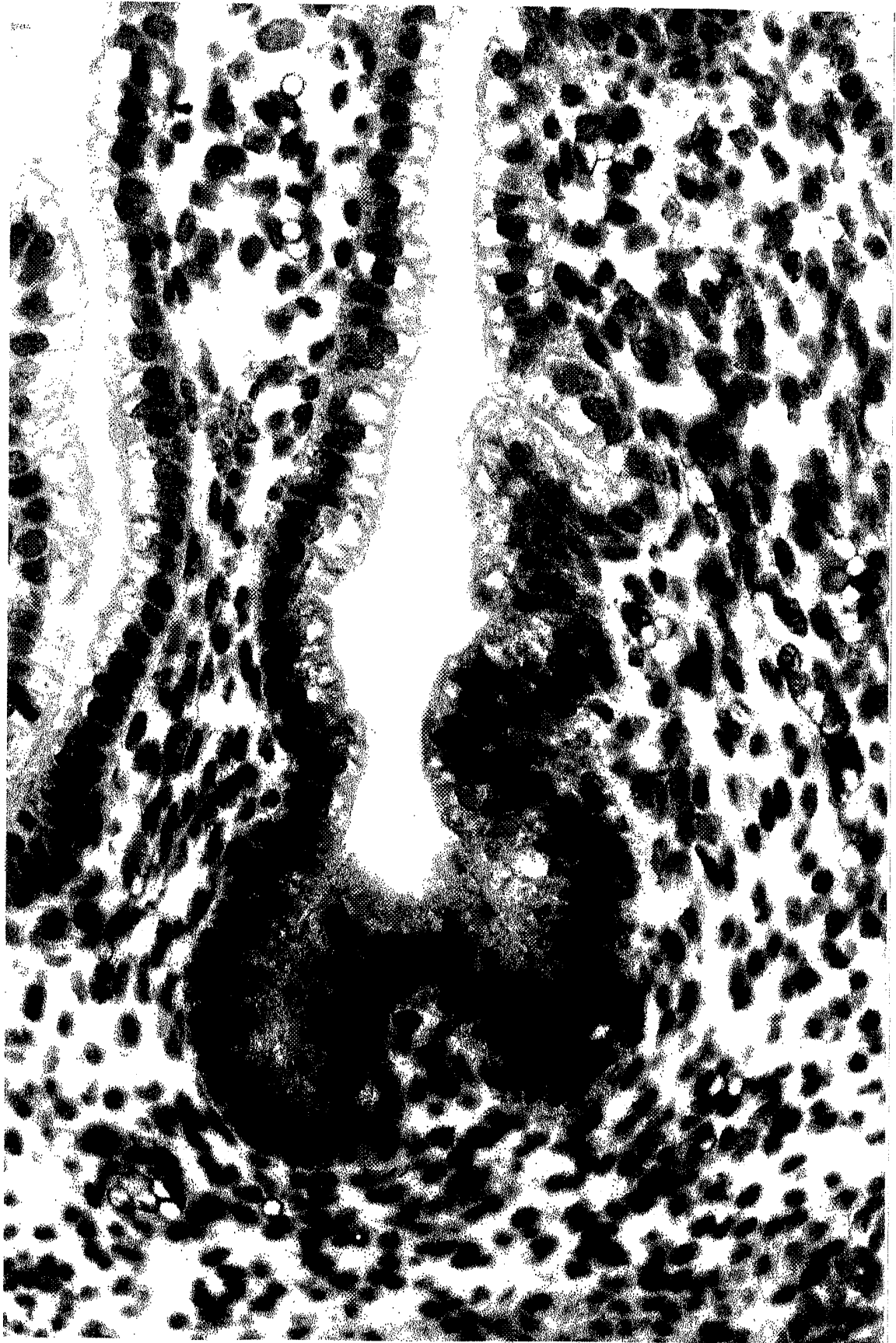


図 11

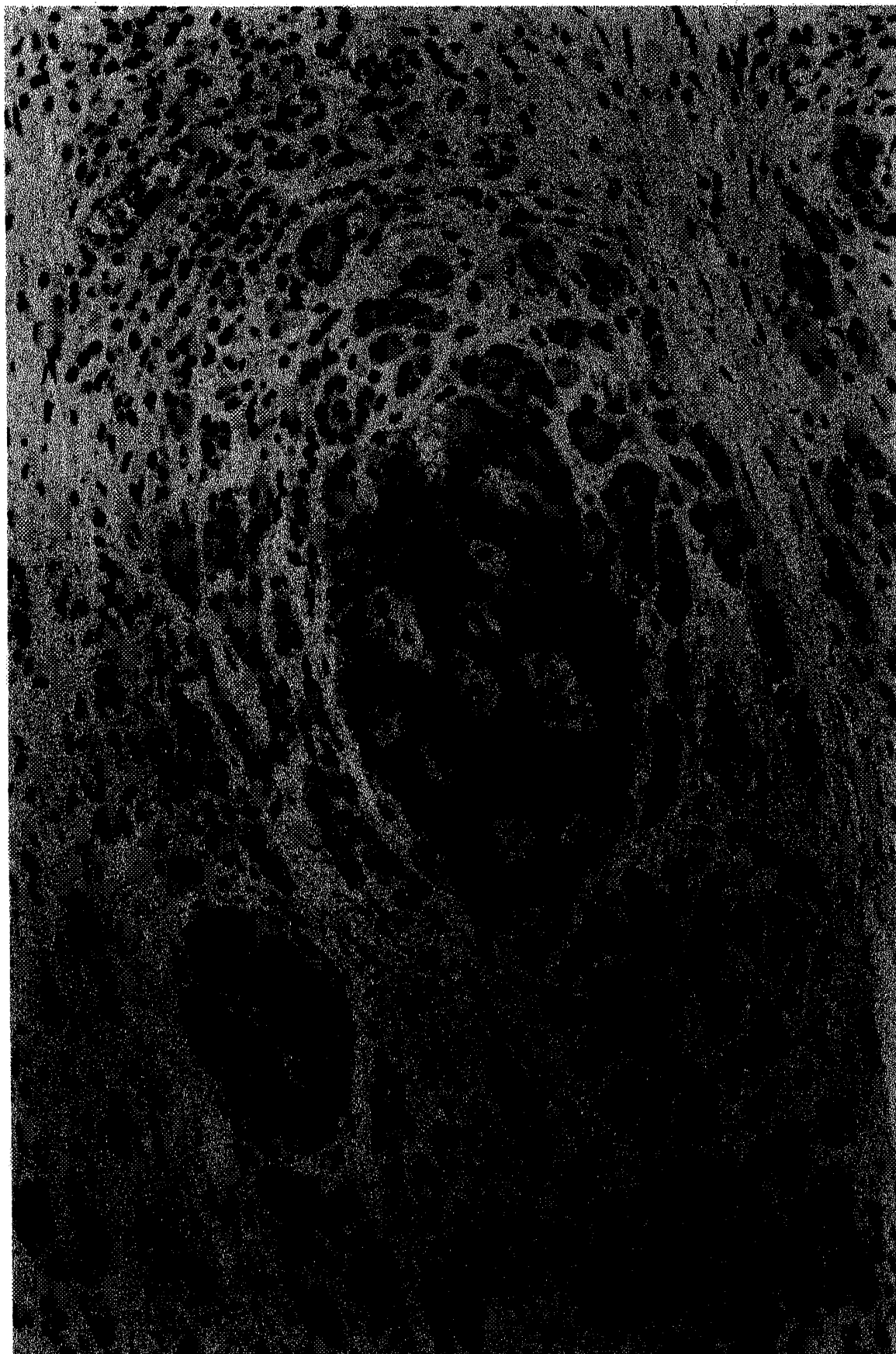


図 12



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

株式会社中外分子医学研究所

<120> Method for testing diseases caused by mutation of LKB1 gene, reagent therefor, and treating agent for said diseases

L K B 1 遺伝子の変異に起因する疾患の検査方法、検査薬、および治療薬

<130> C2-909PCT

<150> JP 1997-344256

JP 1998-280357

<151> 1997-11-27

1998-10-01

<160> 48

<210> 1

<211> 3765

<212> DNA

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

gcccactgct ttatgcggcc gtttcatttg atgtaatccg agcccgggtgc gaagccgaag 60

caggtggatc acctgaggtt aggagtccgg gaccagcctg aacaatatgg tgaaacctg 120

tctctattga aaatccaaaa attatccagc catggtggtg tatgcctgta gtcccagcta 180

ctccagagge tgagacagga gaattgcttg aatctgggaa gcagaggttg cagtgaacca 240

agatcatgcc attgcactcc agcccgggca acagagcgag actccgtctc aaaaaaaaaa 300

aaagagagtc agtgtggagg gaagtgtctc tgttgggtcc gggtgctctg tgggactctg 360

aggaaaagct cgcaccaggt agatgctgtt ctgtcccat gggtaaagga caccccaaca 420

aaccgaggag caaatgtcc tcgtatgcc tcttcgcgca gacctgccag gaagagcaca 480

agaagaaaca cccgactct tctgtcaatt tcgtggaatt ctccaagaag tgtttgaga 540

gatggaagac cacgtctgca aaggagaagt gaagtttgaa gagaaggcaa aaagtgacaa 600

agctcgctgt gacaggaga ttaaaaatta cattctccg aatgtaaga aaggtaaga 660

aaggaaagaa aaaggatcgc aatgctccta gaaggccacc atctgccttc ttctgtttt 720

gctctgaaca tcgccc aaag atcaaa agtg gacacc cagg cctatttgtc gtggaaactg 780

caaagaaact gggtgaaatg tggctctgggc agtcagccaa agataaacia ccatatgagc 840

agaaagcagt taagctacag gagagatatg aaaagggtat tgctgcatat cgtgctaagg 900

gcaaaagtga agcaggaaag aagggtctca agaagaacia accagaagat gaggaggagg 960

aggaggagaa agaagatgaa gatgaggagg aagagggtga agatgaagaa taaatggcta 1020

tcctttaatg atgcctgtgc agtgggcttg ttttgctaag aatgtgaatt ctagtacagc 1080

tcagtattag cttcagtata aaactgtaca aattttcgta tagctcataa gattctctgt 1140

acagaaaata cttttctttt cttttctttt ttttgagaca gagtttcgct cttgttgect 1200

aggctggagt gcaatggcgt gatctcgct caccgcaacc tccgectccc gggctctggt 1260

tcaagcagtt ctctgcctc agcctcctga gtagctggga ttacaggcac atgccaccac 1320

gctcagctaa tttttgtatt tttagtagag atggggtttc accatgttgg ccaggctgct 1380

ttcaaaactcc tgacctgtg atccgctgc ttggcctcc caaaatactg ggattacagg 1440

tgtgagccac cgcacctgc ctaatgtccc taaatattta atggttttta aaaaatttat 1500



tgtgtatggc agcacagcac acttgttagga attagtatca acagtacatc ttgcgttttt 1560

taagatgctg ctttttttaa ctttttgtaa taaaattatg cgtatcaaaa aaacaaagaa 1620

attccgtgtg tagttcacac tcacagcaca tctccgtcca ggcacttgag agaatgacta 1680

ggaggggttc ttggaggagg tggcttttga acggagaatc catcttcaag gattctgtct 1740

gtaatggtca ccaagtatit cctgagtcac ttccatgtgt cctgcagttc tctgaagggg 1800

cgtgggacct accgatgcca attatccagc attatctcca gattccaaga agttgggggtg 1860

tgagccagca atcagtacag aaaagagata ccaaaataag tttgagttgg ggagtgttcc 1920

ttcaacttca gttttctgga agagatcttt tttttttttt tgagacagag tttcgtcttt 1980

attgccaag ctggagtgca gtggcagcat ctcggctcac cgcaacctcc tctcccggg 2040

ttcaagcat tctctcct cagccttctg agtagctggg attacagaca tgcacctgta 2100

atttctacta aaaatacaaa aattagccgg gcgtggtggc gcacgcctgt aatctcagct 2160

actggggagg ctgaggcagg agaatcgctt gaaaccagga ggaggagatt gtaccaagat 2220

agtttgttcc agctaaacaa cctggcgcta gtgcaggaaa aggtggaagg cacggggcta 2280

gcacaggagg gttcaatatt ttcaacctta tcaagccata ttttggaac tcttgTTTT 2340

cacgagaagc ccccgctggg cttgtcccag cgctgtcctg aggcttcccc catgagttcc 2400

gatagggcag aggccgccct gagegtttct ctttcccctg gtccaagagt ggctcaaaag 2460

aaggatTTTT gactggaatt ggccactttg tgttactttt tgacccttga cctcgcceca 2520

aaggggatg cgggggaggg gctctggtag ggggtggcccc gctccttcca ggtccgcaag 2580

cccaggttcc cgcccaccgg gctcagccca cctgcggccc gttcaggag gccgttggca 2640

cccgtgacct acgaccccct tcccagcccc caccgaggtc acagccgtgg cctcgtctcc 2700

ccatgcctgc ttcccgccecc ctgcccgtga cgggcgtctc cgaggaccaa tgagcgcgct 2760

gtatccaccc ctcgggcggg gccaaagccc gaccaatcgc cgctcgggcg cccggccggg 2820

tccaaacgct ccaatcgtca gcggcggcgg ggcgggcaga gggccgggga tggcaggttc 2880

aaccaacggg tgggcacgtc gtctctcgca ggaggcgtgc cctgcggccc ggctgctggt 2940

gtccgcggcg gcgcaggag ggggagggag gtaaacaaga tgccggcggc gtgtcgggcg 3000

cggaaggggg aggcggcccc gggcgcccc gagtgaggcg cggggcgggc aaggagcgc 3060

gggtggcggc acttgctgcc gcggccttgg atgggctggg cccccctgc cgctccgct 3120

cctccacacg cgcggcggcc gcggcgaggg ggacgcgcgg cccggggccc ggcaccttcg 3180

ggaaccccc ggcccggagc ctgcggcctg cgccgcctcg gccgccggga gccccgtgga 3240

gcccccgccg ccgcgccgcc ccgcggaccg gacgctgagg gcactcgggg cggggcgcgc 3300

gctcgggcag acgtttgcgg ggaggggggc gcctgcgggg ccccggcgac caccttgggg 3360

gtcgcgggcc ggctcggggg gcgcccagtg cgggccctcg cgggcgccgg gcagcgacca 3420

gccctgagcg gagctgttgg ccgcggcggg aggcctcccg gacgccccca gcccccgaa 3480

cgctcggccg ggccggcggg agtcggcgcc ccccgggagg tccgctcggt cgcccgcgcc 3540

ggagcgtttg ctctgggac aggcggtggg accggggcgt cgccggagac gccccagcg 3600

aagtgggct ctccaggtgt gggggtcccg gggggtagcg acgtcggga cccggcctgt 3660

gggatggcg gcccgagaa gactgcgctc ggccgtgttc atactgtcc gtgggcctga 3720

ggtccccga ggatgacctg gcaactgaaa gccccggccg gcctc 3765

<210> 2

<211> 1006

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (1)..(628)

<220>

<221> intron

<222> (629)..(1006)

<400> 2

cccagggctcc ccgaggacga agttgaccct gaccgggccc tctcccagtt ctgaggcccc 60

ggccccactg gaactcgcgt ctgagccgcc gtcccggacc cccgggtgccc gccgggtccc 120

agaccctgca cgggcttgg actcgcagcc gggactgacg tgtagaacia tcgtttctgt 180

tggaagaagg gtttttcct tccttttggg gtttttggtg cttttttttt ttcttttttc 240

tttgtaaaat ttggagaag ggaagtcgga acacaaggaa ggaccgetca cccgaggact 300

cagggtggc ggcgggactc caggaccctg ggtccagc atg gag gtg gtg gac ccg 356

Met Glu Val Val Asp Pro

1

5

cag cag ctg ggc atg ttc acg gag ggc gag ctg atg tcg gtg ggt atg 404  
 Gln Gln Leu Gly Met Phe Thr Glu Gly Glu Leu Met Ser Val Gly Met  
                   10                                  15                                  20

gac acg ttc atc cac cgc atc gac tcc acc gag gtc atc tac cag ccg 452  
 Asp Thr Phe Ile His Arg Ile Asp Ser Thr Glu Val Ile Tyr Gln Pro  
                   25                                  30                                  35

cgc cgc aag cgg gcc aag ctc atc ggc aag tac ctg atg ggg gac ctg 500  
 Arg Arg Lys Arg Ala Lys Leu Ile Gly Lys Tyr Leu Met Gly Asp Leu  
                   40                                  45                                  50

ctg ggg gaa ggc tct tac ggc aag gtg aag gag gtg ctg gac tcg gag 548  
 Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Gly Lys Val Lys Glu Val Leu Asp Ser Glu  
 55                                  60                                  65                                  70

acg ctg tgc agg agg gcc gtc aag atc ctc aag aag aag aag ttg cga 596  
 Thr Leu Cys Arg Arg Ala Val Lys Ile Leu Lys Lys Lys Lys Leu Arg  
                                   75                                  80                                  85

agg atc ccc aac ggg gag gcc aac gtg aag aa gtaagtatggc ttgctggggt 649  
 Arg Ile Pro Asn Gly Glu Ala Asn Val Lys Lys  
                   90                                  95

cggggccggg ccgggccagt cacggtgctg atggttctgt cttccttct tctctcctcc 709

ctccctccct tacttctctet taacaccctg agctggacce gtctggegcc tgtgtectcc 769  
gtgccaggga gagcgtggtt gggggcctgc gttacggact ttcactcagg caaggccagt 829  
tgtcgcagcg gggcgtgcgt ttgcatgggc tcttggactc cagttaaaat gccctggtag 889  
cgaaaccctc ctgagaaggg agcgcccccc aatcccctaa gactagcccc ttggtcccc 949  
cagctgtcca aggagcagag gcgcccagtg gaatcagcct gtgtttgttt gggcccc 1006

<210> 3

<211> 5661

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> (1)..(456)

<220>

<221> exon

<222> (457)..(540)

<220>

<221> intron

<222> (541)..(1363)

<220>

<221> exon

<222> (1364)..(1453)

<220>

<221> intron

<222> (1454)..(2412)

<220>

<221> exon

<222> (2413)..(2545)

<220>

<221> intron

<222> (2546)..(2620)

<220>

<221> exon

<222> (2621)..(2757)

<220>

<221> intron

<222> (2758)..(3252)

<220>

<221> exon

<222> (3253)..(3380)

<220>

<221> intron

<222> (3381)..(3988)

<220>

<221> exon

<222> (3989)..(4046)

<220>

<221> intron

<222> (4047)..(5024)

<220>

<221> exon

<222> (5025)..(5212)

<220>

<221> intron

<222> (5213)..(5661)

<400> 3

ggtgaaacce tgtctgtact aaaatacaaa aaaattagcc ggctgtggtg acacgtgcct



gtagtcccag ctactcggga ggctgaggca gggaaatcac ttgaacctgg gaggcagagg 120

ttgcagtgag ctgagatcgg gccaccgtgc tccagcctag ggacagagca agactctgtc 180

tcagaaaaaa aaaaaagtgt cctaactgtg tectccaaag cctcgcceg ccatgacag 240

actagagggc gctgtgctcc caccacctac cgcctgagc ctggacgct ggccccgtca 300

ggcccccttc ccacagcact gtgaactcac agcttctctc tagggaagg aggaggtacg 360

ccacttccac agggagatgg ggaggccgac tccagggatc caggccatca tcctgacgtt 420

gggtcggctg atacaccct gtctctctg tcccag g gaa att caa cta ctg agg 475

Glu Ile Gln Leu Leu Arg

100

agg tta cgg cac aaa aat gtc atc cag ctg gtg gat gtg tta tac aac 523

Arg Leu Arg His Lys Asn Val Ile Gln Leu Val Asp Val Leu Tyr Asn

105

110

115

gaa gag aag cag aaa at atactcttcc ggtgttgga ccgcggggcc 571

Glu Glu Lys Gln Lys Met

120

125

tccgtgggag gggctggggc cctgggtcgg cctgectega ggctgtctcc tcttcccgtc 631

tccttgaagg agactggcac acgagggccg tggccttccc tggttccccg gaagtcagcc 691

attgtggcaa tggctgcgca gcttgctgaa aggggccttg agccctggcc cctgtgtctt 751

gggcccgtgg ggtgtcaagt cccttttttc tcagagtctc ctcccaggct aaccaggggt 811

gtagccacgg tctgcctgag acagggccac cgggctgacc gttgtgggcc attttggteg 871

tggctggggc tgtcctcgtg tcctctgtgg acacccccat ggttcttacg ggcacagcct 931

ccctacgggg actttgcttc ctaaggccct gtgccagag caagagccag aagtggctct 991

gaggctgggg ctgtgttccc tgagccacgc ggtcaggggc cctgggaccg tctgcatgg 1051

gcccagacct gcttgggggg gcgtccagga ggcaccatcc cccgccatg ggcaggggtg 1111

gggacgtgag ccccgcagga acgctgcccc aagagtcagc cctgtctctc ctttcccgt 1171

aggctcttc ctctgggac gctggggccc ctgggccttt tcagaggggt ggetgagggc 1231

agggtgggcc ctggtcccga ggaggggcaa ggtgggtgca gagggtccct ccagagcccc 1291

ttttctggcc cccgtgctcc ctgggcctgt gagtggggcc gcccctgag ctgtgtgtcc 1351

ttagcgcgcc ac g tat atg gtg atg gag tac tgc gtg tgt ggc atg cag 1400

Tyr Met Val Met Glu Tyr Cys Val Cys Gly Met Gln

14 /50

130

135

gaa atg ctg gac agc gtg ccg gag aag cgt ttc cca gtg tgc cag gcc 1448

Glu Met Leu Asp Ser Val Pro Glu Lys Arg Phe Pro Val Cys Gln Ala

140

145

150

cac gg gtgcgtgcgcg gggcaggggc caggggtgggg cgggggcccgg gggccaggca 1504

His Gly

155

ggcaggctc ctttccgtga ggccacactg cttgtcctga tattcattga catgaaggcc 1564

caagttttt tgtttttttg tttttttgtg ttttttttcg agatggagtc tcaactctgtc 1624

gcccaggctg gaggcaatg gtgcgatctc ggctcaactg aagctccgcc tccgaggttc 1684

acgccattct tctgcctcag cttcccagat agctgggatt acaggcgccc gccaccacgc 1744

ccggetaatt tttgtattt ttagtagaga cggggtttca ccgtgttagc caggatggtc 1804

tcaaactcct gacctcgtga tccgcctgcc tcagcctccc aaagtctgg gattacaggc 1864

atgagctacc acgcccggcc ttgtaaagge ccaagttttt aaaaacagtt ttggggctccc 1924

ccatgtgtgg catccacagg cagggtctgt gccaacctcc cgcctccatc tttgctgggc 1984

ctgctgcctg aggccagtgg cctgcttcca gcccategct ggcagccgcc tgccctgacc 2044

agatctcctg gatgcaggtc tgtggcctca gagtcagggc cccttgctgc tgcaggacca 2104

caggggcagg gaggggcctg ctgttccagc aagactttgg ggtgcagccg gcctgtggcc 2164

cacaggaaaa ttagacctgt ggacatccgg ggccctgcca gacgtggctc ggccggacga 2224

gggtggccac tgcaggcgca ggtgtggctc cctgctggac ctagecttcc ctctgtcctg 2284

tgtgcctgga cttctgtgac ttcccagctg ggccctgtgt gtttgggagg ctcccaggca 2344

gctgcaaagg ggaccctgt gaggggcagg gaggcctcgg ccccaggacg ggtgtgtgct 2404

gcccgcag g tac ttc tgt cag ctg att gac ggc ctg gag tac ctg cat 2452

Tyr Phe Cys Gln Leu Ile Asp Gly Leu Glu Tyr Leu His

160 165

agc cag ggc att gtg cac aag gac atc aag ccg ggg aac ctg ctg etc 2500

Ser Gln Gly Ile Val His Lys Asp Ile Lys Pro Gly Asn Leu Leu Leu

170 175 180

acc acc ggt ggc acc ctc aaa atc tcc gac ctg ggc gtg gcc gag 2545

Thr Thr Gly Gly Thr Leu Lys Ile Ser Asp Leu Gly Val Ala Glu

185 190 195

gtaggcacgt gctagggggg gccctggggc gccccctccc gggcactccc tgagggtgc 2605

acggcaccgc cacag gca ctg cac ccg ttc gcg gcg gac gac acc tgc cgg 2656  
 Ala Leu His Pro Phe Ala Ala Asp Asp Thr Cys Arg  
 200 205 210

acc agc cag ggc tcc ccg gct ttc cag ccg ccc gag att gcc aac ggc 2704  
 Thr Ser Gln Gly Ser Pro Ala Phe Gln Pro Pro Glu Ile Ala Asn Gly  
 215 220 225

ctg gac acc ttc tcc ggc ttc aag gtg gac atc tgg tgc gct ggg gtc 2752  
 Leu Asp Thr Phe Ser Gly Phe Lys Val Asp Ile Trp Ser Ala Gly Val  
 230 235 240

acc ct gtaagtcccc gcccccccg gcaactacca cacgcacact ccgaggggcc 2808  
 Thr Leu  
 245

tctgcttctt gggcagctgc cggcctgtgg gcgcagggcg tggccaccgg ccagaccct 2868

ctctggccac agccgctagg ggggtgcttac tttatggaaa tgtaactcat acggcagatg 2928

gtggttcacc cgtgtgaagt gcagcctggc ccgtcagga tcttcacaga gtggcacggc 2988

cgaccctcct ccagagccc cacaggaag ctgggcgggt gacagcagct ccaggcccct 3048

tccccgggtg ggtccagagg aactcccct cctaccccggt agcctccact agtgaaggt 3108

ggtgaagaca gaggtgtcct tgagtccaca ggcctctgg tccagcagcc acgggacgcc 3168

tctgtccctg gggtagagct ggggtccta gggcgtcaac caccttgact gaccacgcct 3228

ttcttcctc ccctcgaaat gaag c tac aac atc acc acg ggt ctg tac ccc 3280

Tyr Asn Ile Thr Thr Gly Leu Tyr Pro

250

ttc gaa ggg gac aac atc tac aag ttg ttt gag aac atc ggg aag ggg 3328

Phe Glu Gly Asp Asn Ile Tyr Lys Leu Phe Glu Asn Ile Gly Lys Gly

255 260 265 270

agc tac gcc atc ccg ggc gac tgt ggc ccc ccg etc tet gac ctg ctg 3376

Ser Tyr Ala Ile Pro Gly Asp Cys Gly Pro Pro Leu Ser Asp Leu Leu

275 280 285

aaa g gtgggagcctca tcctctgcc cgcagcccca gggaggcggg gcttttgtgc 3432

Lys

agaaatgtag ggttgggggt gtcaggtggg gggctattgg ccccgagacc ccagcagcca 3492

ttgagaggac tgagtggaga ggccgacctc cccgcagggc ctggtttgcc aggtccctca 3552

gctccaccct gcttctgggc cctgttcacc ctccgaactc ccaccccaga gggcagtgct 3612  
 gccctgcgcc tccccagcc ccacctcgg gggctccctg gcttgcaggg tctgtcaggg 3672  
 ttgtctgct gcacttccta cgcattggcag caggtggcac tggccgtccg tccatctgcc 3732  
 cagtggcctt gggagaacgg aaccgccctg gccgtccagc ccagccctgt ctccctgcca 3792  
 gccgcgcaca ggctgtcccc ggcatgtccc aggagtggag tggcctctgt caggagacc 3852  
 gcctgtgcgc ggggtccccc ttaggagcgt ccaggtatca ccagggcct gacaacagag 3912  
 gctgggcagg cggggacggt tgggtggggtc tcaggcctgt gccagctga caggctctc 3972  
 gccggcttct cctcag gg atg ctt gag tac gaa ccg gcc aag agg ttc tcc 4023  
 Gly Met Leu Glu Tyr Glu Pro Ala Lys Arg Phe Ser  
 290 295  
 atc cgg cag atc cgg cag cac ag gtgagcggccc ctgggggcag tggggccgag 4077  
 Ile Arg Gln Ile Arg Gln His Ser  
 300 305  
 gctgcaggga ggccggccat gtgggcagct ggttgagcgg gcgctagagc agggcgtggt 4137  
 gggggtgcca ggctgggctg gggccagacc ccgtgcagcg cccgcagttc tcggggcccg 4197

agtggggtct ctgggcagtg tcctgttacc ggccagaccc aggcgccttg tccgaactgg 4257

ggtctgagtg aggacatgcg tccgtccctg ccctaggcat ggagatgcgc caggaagggc 4317

acagctggtc ccaaacactg gcgagagcct ctctttttcc cctcctcctg gggctcccag 4377

cagcagggtg tggctgggat ccagcccagg gccccagct ccatgacagg gaagacagag 4437

cagcggacgg ggtcagcagg ccccacagtg ccgcctccct cacttcgtgg gctctgctcc 4497

tctgcaccag cccctggagg cccttgagcc gtctgtctga gcccctccga gccccgaggc 4557

caccactga gaccggctct gggagtggga gtgtccggac ccctgaggcg ctggtgctga 4617

ttgtgccttg ggggtctctg cacagctcgg gtcatctggg cgcttgccgg ggactggggc 4677

tgeccccga tagcctcctg ggctgggatg tgctcagggc ccccagacc cccttctggc 4737

ctttgctggc tttgcageca gcatccatct ggtgggtgct ggcttctgag tgccacctgg 4797

gacacaggcc tcagggtgga ggggacatct gtcaggcttg gagtcaggtc agcctgcctg 4857

ctcctagagg acatggctga gcttctgtgg tcacagecac cccttgcacg gcctggtecc 4917

agctcctgag tgtgtggcag gtaccctggg cccagaggag ctgggtcgga aaactggacc 4977



gccctggtgc cagcctgaca ggcgccactg cttctgggcg ttgcag c tgg ttc cgg 5034

Trp Phe Arg

310

aag aaa cat cct ccg gct gaa gca cca gtg ccc atc cca ccg agc cca 5082

Lys Lys His Pro Pro Ala Glu Ala Pro Val Pro Ile Pro Pro Ser Pro

315

320

325

gac acc aag gac cgg tgg cgc agc atg act gtg gtg ccg tac ttg gag 5130

Asp Thr Lys Asp Arg Trp Arg Ser Met Thr Val Val Pro Tyr Leu Glu

330

335

340

gac ctg cac ggc gcg gac gag gac gag gac ctc ttc gac atc gag gat 5178

Asp Leu His Gly Ala Asp Glu Asp Glu Asp Leu Phe Asp Ile Glu Asp

345

350

355

gac atc atc tac act cag gac ttc acg gtg ccc g gtgagtctggcg 5224

Asp Ile Ile Tyr Thr Gln Asp Phe Thr Val Pro

360

365

ggggcccctg cccggctctg ctgactcggc caggatgtcc cacgggagca ggtgcctgc 5284

ctgtctgcaa caaggacagc ttctgcctc tgggtgccaa tcccagctcc ccaaagctc 5344

cagcccacct gcaggctgcc tccgcctgc gggccgctgg gacatggctg aaaggtgtgg 5404

ggtcagcggg ggcaccagcc caggcctgtc tggccaggag ggttcctcag gcgtctctcc 5464

gggtgctgcc cagccaggca ccaccaccg gccttggcct gagtcccagc aggagcaggc 5524

gggggagccc cagggtcggg ggagggtagg tgagagtcag ggtgcagggt ggcccctcag 5584

acagctggca tgagagaggg tccagtggcc ctccctcccg tcgtccctga ggctgcccg 5644

ctggccctga tgccggc 5661

<210> 4

<211> 2095

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> (1)..(454)

<220>

<221> exon

<222> (455)..(2095)

<400> 4

tttcgcgtgc ctggcctgag cctggcccga gcttggcct cctgtgtcct cacagatgag 60

catgtggcgg ctectgggcc tctagaacca accatgggcc agggtgcccc aggggagcac 120  
 gggagggtcc tgccttgtea gcttgccctcc tactcgtgag gttcctgcag tcagtacctg 180  
 ggtgggggtcc cacctgcggc catggcaggt gcaacagacg tgggtggaggg gacactcctg 240  
 cccaggccat ctgcgggagg ctcagccccg ggggggtgect cccagagctg ctggggggca 300  
 gcatttcagg ctggatacac ctgggcctga cccggggggcg ggcattggcct gggcagcagc 360  
 tgtaagtgcg tccccgtggt gggggccagc caggtcctctg tggctctggg gttgcgcccc 420  
 tcagctcagg ccacacttgc cgtctcctcc ccag ga cag gtc cca gaa gag gag 474  
 Gly Gln Val Pro Glu Glu Glu  
 370 375  
 gcc agt cac aat gga cag cgc egg ggc ctc ccc aag gcc gtg tgt atg 522  
 Ala Ser His Asn Gly Gln Arg Arg Gly Leu Pro Lys Ala Val Cys Met  
 380 385 390  
 aac ggc aca gag gcg gcg cag ctg agc acc aaa tcc agg gcg gag ggc 570  
 Asn Gly Thr Glu Ala Ala Gln Leu Ser Thr Lys Ser Arg Ala Glu Gly  
 395 400 405  
 cgg gcc ccc aac cct gcc cgc aag gcc tgc tcc gcc agc agc aag atc 618

Arg Ala Pro Asn Pro Ala Arg Lys Ala Cys Ser Ala Ser Ser Lys Ile  
 410 415 420

cgc cgg ctg tgc gcc tgc aag cag cag tgaggctggc cgctgcagg 665  
 Arg Arg Leu Ser Ala Cys Lys Gln Gln  
 425 430

tggggcgcgg cggggcccgg gtggggcatg tggggacaac gcctggatgc cacagccagc 725

cgtgagcata gcccgcgcta gtcagtcagc gtgaccgtca cgtggctgcg cgtggttgcc 785

atgtggcctt tgggtggcct ggccacgtag cgatccccgt ggagggtgcc gtctcggggc 845

ctggtgtctg gccagcgtgc tggatcatgga ggcctacgtg tggeggggct ctgggggggc 905

gtgccgtcct cacagccacc tctcagagtg ggtgcattcc gaggaccctg ccctgggcct 965

ggcgccccct ccccatgccc gcgccccttc caggaaagc ttatgctggg ctgagcccag 1025

aggcttttga gcaccagtgg gtggtgggtg gtggggaggg gccgcggcct ccatggctct 1085

gccgggggtgc cgcaggctct gagccagctg ccaagtatgg ctgaggctga gtcgtgccgg 1145

acgtgcctt gtctctcct gtgtgcctgc ctctctccc agccccagcc ccagccccgg 1205

gtgggagacg gagtcccaga ggtgtcagag acccttaagt cacctgccga ggtatgcggg 1265

tggatggggg cccgaggctg aagccctgc cttgccacag ccctctccc aggttttggg 1325

ggccaccgcc tgagttacat gtctgtcccc caaatgggtg cccacagccc atccaccage 1385

gtcagagccc gccaggcccc actgcaaaag gccacacaat gtaccccggg agtgactcaa 1445

gggtggcett ccttggcctc ccttgtctgc ccccaggagt ccggtagccc catgactgta 1505

cctcagcttc tccatcctcc caggggcccc cgggaggcgg agaaccggtg cccaggctga 1565

cctcttccgt cttccttcca ccttgcagcc cgtgtccagg agccccgcca ggtgccccgc 1625

ccaggcctc agtcttctg ccggttccgc ccgcctccc ggagaggtgg ccgcatgct 1685

tctgtccga ccacgcccc ggacctccgg agcgcctgc agggccgggc agggggacag 1745

cagggaccgg ggcagccct cccccctgg ccgcccggca gtgcacgcgg cttgttgact 1805

tcgcagcccc gggcggagcc ttcccgggcg ggcgtgggag gagggaggcg gcctccatgc 1865

actttatgtg gagactactg gcccccccc tggcctcgtg ctccgcaggg cgcccagcgc 1925

cgtecgggcg ccccgcgca gaccagctgg cgggtgtgga gaccaggctc ctgacccgc 1985

catgcatgca gcgccacctg gaagccgcgc ggccgctttg gttttttgtt tggttggttc 2045

cattttcttt ttttcttttt tttttaaga aaaaataaaa ggtggatttg 2095

<210> 5

<211> 1302

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1302)

<400> 5

atg gag gtg gtg gac ccg cag cag ctg ggc atg ttc acg gag ggc gag 48

Met Glu Val Val Asp Pro Gln Gln Leu Gly Met Phe Thr Glu Gly Glu

1 5 10 15

ctg atg tcg gtg ggt atg gac acg ttc atc cac cgc atc gac tcc acc 96

Leu Met Ser Val Gly Met Asp Thr Phe Ile His Arg Ile Asp Ser Thr

20 25 30

gag gtc atc tac cag ccg cgc cgc aag cgg gcc aag ctc atc ggc aag 144

Glu Val Ile Tyr Gln Pro Arg Arg Lys Arg Ala Lys Leu Ile Gly Lys

35 40 45

tac ctg atg ggg gac ctg ctg ggg gaa ggc tct tac ggc aag gtg aag 192  
 Tyr Leu Met Gly Asp Leu Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Gly Lys Val Lys  
 50 55 60

gag gtg ctg gac tcg gag acg ctg tgc agg agg gcc gtc aag atc ctc 240  
 Glu Val Leu Asp Ser Glu Thr Leu Cys Arg Arg Ala Val Lys Ile Leu  
 65 70 75 80

aag aag aag aag ttg cga agg atc ccc aac ggg gag gcc aac gtg aag 288  
 Lys Lys Lys Lys Leu Arg Arg Ile Pro Asn Gly Glu Ala Asn Val Lys  
 85 90 95

aag gaa att caa cta ctg agg agg tta cgg cac aaa aat gtc atc cag 336  
 Lys Glu Ile Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg His Lys Asn Val Ile Gln  
 100 105 110

ctg gtg gat gtg tta tac aac gaa gag aag cag aaa atg tat atg gtg 384  
 Leu Val Asp Val Leu Tyr Asn Glu Glu Lys Gln Lys Met Tyr Met Val  
 115 120 125

atg gag tac tgc gtg tgt ggc atg cag gaa atg ctg gac agc gtg ccg 432  
 Met Glu Tyr Cys Val Cys Gly Met Gln Glu Met Leu Asp Ser Val Pro  
 130 135 140

gag aag cgt ttc cca gtg tgc cag gcc cac ggg tac ttc tgt cag ctg 480  
 Glu Lys Arg Phe Pro Val Cys Gln Ala His Gly Tyr Phe Cys Gln Leu

145	150	155	160	
att gac ggc ctg gag tac ctg cat agc cag ggc att gtg cac aag gac				528
Ile Asp Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Gln Gly Ile Val His Lys Asp				
	165	170	175	
atc aag ccg ggg aac ctg ctg ctc acc acc ggt ggc acc ctc aaa atc				576
Ile Lys Pro Gly Asn Leu Leu Leu Thr Thr Gly Gly Thr Leu Lys Ile				
	180	185	190	
tcc gac ctg ggc gtg gcc gag gca ctg cac ccg ttc gcg gcg gac gac				624
Ser Asp Leu Gly Val Ala Glu Ala Leu His Pro Phe Ala Ala Asp Asp				
	195	200	205	
acc tgc cgg acc agc cag ggc tcc ccg gct ttc cag ccg ccc gag att				672
Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ser Pro Ala Phe Gln Pro Pro Glu Ile				
	210	215	220	
gcc aac ggc ctg gac acc ttc tcc ggc ttc aag gtg gac atc tgg tcg				720
Ala Asn Gly Leu Asp Thr Phe Ser Gly Phe Lys Val Asp Ile Trp Ser				
225	230	235	240	
gct ggg gtc acc ctc tac aac atc acc acg ggt ctg tac ccc ttc gaa				768
Ala Gly Val Thr Leu Tyr Asn Ile Thr Thr Gly Leu Tyr Pro Phe Glu				
	245	250	255	



ggg gac aac atc tac aag ttg ttt gag aac atc ggg aag ggg agc tac 816  
 Gly Asp Asn Ile Tyr Lys Leu Phe Glu Asn Ile Gly Lys Gly Ser Tyr  
                   260                                  265                                  270

gcc atc ccg ggc gac tgt ggc ccc ccg ctc tct gac ctg ctg aaa ggg 864  
 Ala Ile Pro Gly Asp Cys Gly Pro Pro Leu Ser Asp Leu Leu Lys Gly  
                   275                                  280                                  285

atg ctt gag tac gaa ccg gcc aag agg ttc tcc atc cgg cag atc cgg 912  
 Met Leu Glu Tyr Glu Pro Ala Lys Arg Phe Ser Ile Arg Gln Ile Arg  
                   290                                  295                                  300

cag cac agc tgg ttc cgg aag aaa cat cct ccg gct gaa gca cca gtg 960  
 Gln His Ser Trp Phe Arg Lys Lys His Pro Pro Ala Glu Ala Pro Val  
 305                                  310                                  315                                  320

ccc atc cca ccg agc cca gac acc aag gac cgg tgg cgc agc atg act 1008  
 Pro Ile Pro Pro Ser Pro Asp Thr Lys Asp Arg Trp Arg Ser Met Thr  
                                   325                                  330                                  335

gtg gtg ccg tac ttg gag gac ctg cac ggc gcg gac gag gac gag gac 1056  
 Val Val Pro Tyr Leu Glu Asp Leu His Gly Ala Asp Glu Asp Glu Asp  
                   340                                  345                                  350

ctc ttc gac atc gag gat gac atc atc tac act cag gac ttc acg gtg 1104  
 Leu Phe Asp Ile Glu Asp Asp Ile Ile Tyr Thr Gln Asp Phe Thr Val

355	360	365	
ccc gga cag gtc cca gaa gag gag gcc agt cac aat gga cag cgc cgg			1152
Pro Gly Gln Val Pro Glu Glu Glu Ala Ser His Asn Gly Gln Arg Arg			
370	375	380	
ggc ctc ccc aag gcc gtg tgt atg aac ggc aca gag gcg gcg cag ctg			1200
Gly Leu Pro Lys Ala Val Cys Met Asn Gly Thr Glu Ala Ala Gln Leu			
385	390	395	400
agc acc aaa tcc agg gcg gag ggc cgg gcc ccc aac cct gcc cgc aag			1248
Ser Thr Lys Ser Arg Ala Glu Gly Arg Ala Pro Asn Pro Ala Arg Lys			
405	410	415	
gcc tgc tcc gcc agc agc aag atc cgc cgg ctg tcg gcc tgc aag cag			1296
Ala Cys Ser Ala Ser Ser Lys Ile Arg Arg Leu Ser Ala Cys Lys Gln			
420	425	430	
cag tga			1302
Gln			

<210> 6

<211> 433

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

Met Glu Val Val Asp Pro Gln Gln Leu Gly Met Phe Thr Glu Gly Glu  
1                    5                    10                    15

Leu Met Ser Val Gly Met Asp Thr Phe Ile His Arg Ile Asp Ser Thr  
                  20                    25                    30

Glu Val Ile Tyr Gln Pro Arg Arg Lys Arg Ala Lys Leu Ile Gly Lys  
                  35                    40                    45

Tyr Leu Met Gly Asp Leu Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Gly Lys Val Lys  
                  50                    55                    60

Glu Val Leu Asp Ser Glu Thr Leu Cys Arg Arg Ala Val Lys Ile Leu  
65                    70                    75                    80

Lys Lys Lys Lys Leu Arg Arg Ile Pro Asn Gly Glu Ala Asn Val Lys  
                  85                    90                    95

Lys Glu Ile Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg His Lys Asn Val Ile Gln  
                  100                    105                    110

Leu Val Asp Val Leu Tyr Asn Glu Glu Lys Gln Lys Met Tyr Met Val  
                  115                    120                    125

Met Glu Tyr Cys Val Cys Gly Met Gln Glu Met Leu Asp Ser Val Pro  
130 135 140

Glu Lys Arg Phe Pro Val Cys Gln Ala His Gly Tyr Phe Cys Gln Leu  
145 150 155 160

Ile Asp Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Gln Gly Ile Val His Lys Asp  
165 170 175

Ile Lys Pro Gly Asn Leu Leu Leu Thr Thr Gly Gly Thr Leu Lys Ile  
180 185 190

Ser Asp Leu Gly Val Ala Glu Ala Leu His Pro Phe Ala Ala Asp Asp  
195 200 205

Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ser Pro Ala Phe Gln Pro Pro Glu Ile  
210 215 220

Ala Asn Gly Leu Asp Thr Phe Ser Gly Phe Lys Val Asp Ile Trp Ser  
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Leu Tyr Asn Ile Thr Thr Gly Leu Tyr Pro Phe Glu  
245 250 255

Gly Asp Asn Ile Tyr Lys Leu Phe Glu Asn Ile Gly Lys Gly Ser Tyr  
260 265 270

Ala Ile Pro Gly Asp Cys Gly Pro Pro Leu Ser Asp Leu Leu Lys Gly

275

280

285

Met Leu Glu Tyr Glu Pro Ala Lys Arg Phe Ser Ile Arg Gln Ile Arg

290

295

300

Gln His Ser Trp Phe Arg Lys Lys His Pro Pro Ala Glu Ala Pro Val

305

310

315

320

Pro Ile Pro Pro Ser Pro Asp Thr Lys Asp Arg Trp Arg Ser Met Thr

325

330

335

Val Val Pro Tyr Leu Glu Asp Leu His Gly Ala Asp Glu Asp Glu Asp

340

345

350

Leu Phe Asp Ile Glu Asp Asp Ile Ile Tyr Thr Gln Asp Phe Thr Val

355

360

365

Pro Gly Gln Val Pro Glu Glu Glu Ala Ser His Asn Gly Gln Arg Arg

370

375

380

Gly Leu Pro Lys Ala Val Cys Met Asn Gly Thr Glu Ala Ala Gln Leu

385

390

395

400

Ser Thr Lys Ser Arg Ala Glu Gly Arg Ala Pro Asn Pro Ala Arg Lys

33 /50

405

410

415

Ala Cys Ser Ala Ser Ser Lys Ile Arg Arg Leu Ser Ala Cys Lys Gln

420

425

430

Gln

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ698", an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 7

ggtccccgag gacgaagttg a

21

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ673", an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

accatcagca ccgtgactgg

20

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ703", an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

tcgccggccg atgacaga

18

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ674", an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

aaggagacgg gaagaggagc ag

22

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ690", an artificially synthesized primer sequence

<400> 11

gaggaggggc aaggtgggt

19

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ680", an artificially synthesized primer sequence

<400> 12



gtgtggcctc acgaaagga g

21

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ692", an artificially synthesized primer sequence

<400> 13

agctgggcct gtggtgttg

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ694", an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

cagaggcccc tcggagtgtg

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ695", an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

gcctctgtcc ctgggtaga

20

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ693", an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

tcagtcctct caatgcctgc tg

22

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ696", an artificially synthesized primer sequence

<400> 17

gcgggggtccc ccttaggag

19

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ697", an artificially synthesized primer sequence

<400> 18

ctagcgcccg ctcaaccag

19

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ675", an artificially synthesized primer sequence

<400> 19

ggagctgggt cggaaaactg ga

22

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ702", an artificially synthesized primer sequence

<400> 20

tgctcccgtg ggacatcctg

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ676", an artificially synthesized primer sequence

<400> 21

gtaagtgcgt ccccggtgtg

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ677", an artificially synthesized primer sequence

<400> 22

gtggcatcca ggcgttgtcc

20

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ705", an artificially synthesized primer sequence

<400> 23

gggaattcgg aacacaagga ag

22

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ649", an artificially synthesized primer sequence

<400> 24

atggaggtgg tggaccgc

19

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ659", an artificially synthesized primer sequence

<400> 25

gttacggcac aaaaatgtca tcca

24

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ666", an artificially synthesized primer sequence

<400> 26

ggtgatggag tactgcgtg g

21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ684", an artificially synthesized primer sequence

<400> 27

acatcgggaa ggggagctac g

21

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ660", an artificially synthesized primer sequence

<400> 28

ccgggcaccg tgaagtcctg

20

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ650", an artificially synthesized primer sequence

<400> 29

tcaactgctgc ttgcaggcc

19

<210> 30

<211> 17



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ717", an artificially synthesized primer sequence

<400> 30

gcagggcgcc agcctca

17

<210> 31

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Cys Leu Ser Thr Lys Ser Arg Ala Glu Gly Arg Ala Pro Asn Pro Ala

1

5

10

15

Arg Lys Ala

<210> 32

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Cys Ile Arg Gln Ile Arg Gln His Ser Trp Phe Arg Lys Lys His Pro

1

5

10

15

Pro Ala Glu Ala

20

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Cys Phe Glu Gly Asp Asn Ile Tyr Lys Leu Phe Glu Asn Ile Gly Lys

1

5

10

15

Gly Ser Tyr Ala

20

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Cys His Arg Ile Asp Ser Thr Glu Val Ile Tyr Gln Pro Arg Arg Lys

1                    5                    10                    15

Arg Ala Lys Leu

20

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ180", an artificially synthesized primer sequence

<400> 35

cgactcacta tagggagacc ca

22

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "DJ181", an artificially synthesized primer sequence

<400> 36

cctcgagaat taccctcact aa

22

<210> 37

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 37

tggatctaca ctccggc

17

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 38

attttactgg ctggcacttg

20

<210> 39

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "LK E1", an artificially synthesized primer sequence

<400> 39

gatgaattcg ggtccagcat ggagtggtg gac

33

<210> 40

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "LK E2", an artificially synthesized primer sequence

<400> 40

gatgaattct tagaggtctt cttctgagat gagcttctgc tcctgctgct tgcaggccga

60

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized c-Myc partial sequence

<400> 41

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1

5

10

<210> 42

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "LK E4", an artificially synthesized primer sequence

<400> 42

gatgggcct tacagggagg catagtcagg cacatcatat ggtactgct gcttgcaggc 60

cga

63

<210> 43

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "LK E5", an artificially synthesized primer sequence

<400> 43

gatgaattct tagtgatggt gatggtgatg ctgctgcttg caggccga 48

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized HA partial sequence

<400> 44

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu

1

5

10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05357

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>5</sup> C12N15/12, 15/54, 15/63, C12Q1/68, C07K16/40, A61K48/00, 38/43, 33/32 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>5</sup> C12N15/09-15/90, C12Q1/68, C07K16/40, A61K48/00, 38/43, 33/32 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN), WPI/L (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X  A  P, X  P, X  P, X  P, A	JP, 8-308586, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 26 November, 1996 (26. 11. 96) & WO, 96/28554, A1 & AU, 9649552, A & EP, 816501, A1 & US, 5827726, A  Jenne, E.T., et al., "Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase", Nature Genetics, Vol. 18, No. 1 (01. 98), p.38-43  Bignell, G.R., et al., "Low Frequency of Somatic Mutations in the LKB1/Peutz-Jeghers Syndrome Gene in Sporadic Breast Cancer", Cancer Research, Vol. 58, No. 7 (01. 04. 98), p.1384-1386  Hemminki, A., et al., "A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome", Nature, Vol. 391, No. 6663 (08. 01. 98), p.184-187	1-2, 4, 6-8, 10, 12-16  3, 5, 9, 11, 17  1-17  1-17  6-12, 17  1-5, 13-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 9 February, 1999 (09. 02. 99)		Date of mailing of the international search report 23 February, 1999 (23. 02. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.




## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05357

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Walsh, J.H. "Peutz-Jeghers Culprit Is Revealed", Gastroenterology, Vol. 114, No. 3 (03. 98), p.429	6-12, 17
P, A		1-5, 13-16
P, X	Avizienyte, E., et al., "Somatic Mutations in LKB1 Are Rare in Sporadic Colorectal and Testicular Tumors", Cancer Research, Vol. 58, No. 10 (15. 03. 98), p.2087-2090	6-12, 17
P, A		1-5, 13-16
P, X	Wang, Z.J., et al., "Genetic Pathways of Colorectal Carcinogenes is Rarely Involve the PTEN and LKB1 Genes Outside the Inherited Hamartoma Syndromes", American Journal of Pathology, Vol. 153, No. 2 (08. 98), p.363-366	6-12, 17
P, A		1-5, 13-16
P, X	Stratakis, C.A., et al., "Carney Complex, Peutz- Jeghers Syndrome, Cowden Disease, and Bannayan- Zonana Syndrome Share Cutaneous and Endocrine Manifestations, But Not Genetic Loci", Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol. 83, No. 8 (08. 98), p.2972-2976	6-12, 17
P, A		1-5, 13-16
P, X	Nakagawa, H., et al., "Nine novel germline mutations of STK11 in ten families with Peutz-Jeghers syndrome", Hum. Genet., Vol. 103, No. 2 (08. 98), p.168-172	6-12, 17
P, A		1-5, 13-16
P, X	Dong, S.M., et al., "Frequent Somatic Mutations in Serine/Threonine Kinase 11/Peutz-Jeghers Syndrome Gene in Left-sided Colon Cancer", Cancer Research, Vol. 58, No. 17 (01. 09. 98), p.3787-3790	6-12, 17
P, A		1-5, 13-16

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))                  Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, 15/54, 15/63, C12Q1/68, C07K16/40,                  A61K48/00, 38/43, 33/32</p>														
<p>B. 調査を行った分野                  調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))                  Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/09-15/90, C12Q1/68, C07K16/40,                  A61K48/00, 38/43, 33/32</p>														
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>														
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)                  MEDLINE (STN), WPI/L (DIALOG)</p>														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X  A</td> <td>JP, 8-308586, A (中外製薬株式会社), 26.11 月. 1996 (26.11.96) &amp;WO, 96/28554, A 1 &amp;AU, 9649552, A&amp;EP, 816501, A1&amp;U S, 5827726, A</td> <td>1-2, 4, 6-8, 10, 12- 16 3, 5, 9, 11, 17</td> </tr> <tr> <td>P, X</td> <td>Jenne, E. T., et al. "Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase", Nature Genetics, Vol. 18, No. 1 (01.98), p. 38-43</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>P, X</td> <td>Bignell, G. R., et al. "Low Frequency of Somatic Mutations in</td> <td>1-17</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	X  A	JP, 8-308586, A (中外製薬株式会社), 26.11 月. 1996 (26.11.96) &WO, 96/28554, A 1 &AU, 9649552, A&EP, 816501, A1&U S, 5827726, A	1-2, 4, 6-8, 10, 12- 16 3, 5, 9, 11, 17	P, X	Jenne, E. T., et al. "Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase", Nature Genetics, Vol. 18, No. 1 (01.98), p. 38-43	1-17	P, X	Bignell, G. R., et al. "Low Frequency of Somatic Mutations in	1-17
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号												
X  A	JP, 8-308586, A (中外製薬株式会社), 26.11 月. 1996 (26.11.96) &WO, 96/28554, A 1 &AU, 9649552, A&EP, 816501, A1&U S, 5827726, A	1-2, 4, 6-8, 10, 12- 16 3, 5, 9, 11, 17												
P, X	Jenne, E. T., et al. "Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase", Nature Genetics, Vol. 18, No. 1 (01.98), p. 38-43	1-17												
P, X	Bignell, G. R., et al. "Low Frequency of Somatic Mutations in	1-17												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリー                  「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの                  「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                  「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)                  「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                  「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願                  の日の後に公表された文献                  「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの                  「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                  「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの                  「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>														
<p>国際調査を完了した日                  09.02.99</p>		<p>国際調査報告の発送日                  23.02.99</p>												
<p>国際調査機関の名称及びあて先                  日本国特許庁 (ISA/JP)                  郵便番号100-8915                  東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)                  村上 騎見高                   電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>												

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	the LKB1/Peutz-Jeghers Syndrome Gene in Sporadic Breast Cancer", Cancer Research, Vol. 58, No. 7 (01. 04. 98), p. 1384-1386	
P, X P, A	Hemminki, A., et al. "A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome", Nature, Vol. 391, No. 6663 (08. 01. 98), p. 184-187	6-12, 17 1-5, 13-16
P, X P, A	Walsh, J. H. "Peutz-Jeghers Culprit Is Revealed", Gastroenterology, Vol. 114, No. 3 (03. 98), p. 429	6-12, 17 1-5, 13-16
P, X P, A	Avizienyte, E., et al. "Somatic Mutations in LKB1 Are Rare in Sporadic Colorectal and Testicular Tumors", Cancer Research, Vol. 58, No. 10 (15. 03. 98), p. 2087-2090	6-12, 17 1-5, 13-16
P, X P, A	Wang, Z. J., et al. "Genetic Pathways of Colorectal Carcinogenesis Rarely Involve the PTEN and LKB1 Genes Outside the Inherited Hamartoma Syndromes", American Journal of Pathology, Vol. 153, No. 2 (08. 98), p. 363-366	6-12, 17 1-5, 13-16
P, X P, A	Stratakis, C. A., et al. "Carney Complex, Peutz-Jeghers Syndrome, Cowden Disease, and Bannayan-Zonana Syndrome Share Cutaneous and Endocrine Manifestations, But Not Genetic Loci", Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol. 83, No. 8 (08. 98), p. 2972-2976	6-12, 17 1-5, 13-16
P, X P, A	Nakagawa, H., et al. "Nine novel germline mutations of STK11 in ten families with Peutz-Jeghers syndrome", Hum. Genet., Vol. 103, No. 2 (08. 98), p. 168-172	6-12, 17 1-5, 13-16
P, X P, A	Dong, S. M., et al. "Frequent Somatic Mutations in Serine/Threonine Kinase 11/Peutz-Jeghers Syndrome Gene in Left-sided Colon Cancer", Cancer Research, Vol. 58, No. 17 (01. 09. 98), p. 3787-3790	6-12, 17 1-5, 13-16