

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4035159号  
(P4035159)

(45) 発行日 平成20年1月16日(2008.1.16)

(24) 登録日 平成19年11月2日(2007.11.2)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)  
A 6 1 K 38/00 (2006.01)  
A 6 1 K 38/22 (2006.01)  
A 6 1 P 43/00 (2006.01)  
C 0 7 K 14/475 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
A 6 1 K 37/02  
A 6 1 K 37/24  
A 6 1 P 43/00  
C 0 7 K 14/475

請求項の数 62 (全 129 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-525593  
(86) (22) 出願日 平成6年5月6日(1994.5.6)  
(65) 公表番号 特表平11-507201  
(43) 公表日 平成11年6月29日(1999.6.29)  
(86) 国際出願番号 PCT/US1994/005083  
(87) 国際公開番号 W01994/026298  
(87) 国際公開日 平成6年11月24日(1994.11.24)  
審査請求日 平成12年9月14日(2000.9.14)  
(31) 優先権主張番号 08/059,022  
(32) 優先日 平成5年5月6日(1993.5.6)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 08/209,204  
(32) 優先日 平成6年3月8日(1994.3.8)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者  
ケンブリッジ ニューロサイエンス  
アメリカ合衆国、02139 マサチュー  
セッツ州、ケンブリッジ、ワン ケンドー  
ル スクウェア、ビルディング 700  
(番地なし)  
(74) 代理人  
弁理士 朝日奈 宗太  
(74) 代理人  
弁理士 佐木 啓二  
(74) 代理人  
弁理士 日野 真美

微生物の受託番号 ATCC 75347

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 筋肉の疾患および障害の治療方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、1992年11月6日にA.T.C.C.に寄託されたpGGF2HBS5(A.T.C.C.寄託番号75347)によってコードされるポリペプチドを薬学的担体と混合することからなる方法。

【請求項2】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、式

Y B A Z C X

(式中、Y B A Z C Xはポリペプチドセグメント(配列番号133~135、137~143、146、156および159)から構成され、式中、YはポリペプチドセグメントE(配列番号133および159)からなるかまたは存在せず、式中、ZはポリペプチドセグメントG(配列番号137)からなるかまたは存在せず、そして式中、XはポリペプチドセグメントC/D H K L、C/D H、C/D H L、C/D D、C/D H L、C/D H K L、C/D H、C/D D、C/D C/D H K L、C/D C/D H、C/D C/D H L、C/D C/D D、C/D D H、C/D D H L、C/D D H K L、C/D D H、C/D D H L、C/D D H K L、C/D D H、C/D C/D D

H L、またはC / D C / D D H K Lからなる；ここで、前記ポリペプチドセグメントは、Aが配列番号135、Bが配列番号134、Cが配列番号156、C / Dが配列番号138、C / D が配列番号139、Dが配列番号140、D が配列番号141、Hが配列番号146、Kが配列番号142、Lが配列番号143で示される)によって定義されるポリペプチドを薬学的担体と混合することからなる方法。

【請求項3】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、式

W B A Z C X

(式中、W B A Z C Xはポリペプチドセグメント(配列番号132、134、135、137~143、146および156)から構成され、式中、WはポリペプチドセグメントF(配列番号132)からなるかまたは存在せず、式中、ZはポリペプチドセグメントG(配列番号137)からなるかまたは存在せず、そして式中、XはポリペプチドセグメントC / D H K L、C / D H、C / D H L、C / D D、C / D H L、C / D H K L、C / D H、C / D D、C / D C / D H K L、C / D C / D H、C / D C / D H L、C / D C / D D、C / D D H、C / D D H L、C / D D H K L、C / D D H、C / D D H L、C / D D H K L、C / D C / D D H、C / D C / D D H L、またはC / D C / D D H K Lからなる；ここで前記ポリペプチドセグメントは、Aが配列番号135、Bが配列番号134、Cが配列番号156、C / Dが配列番号138、C / D が配列番号139、Dが配列番号140、D が配列番号141、Hが配列番号146、Kが配列番号142、Lが配列番号143で示される)によって定義されるポリペプチドを薬学的担体と混合することからなる方法。

【請求項4】

50 N - 末端アミノ酸が、E配列(配列番号133および159)からなる前記ペプチドから開裂される請求の範囲第1項または第2項記載の方法。

【請求項5】

XがC / D H K Lである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

【請求項6】

XがC / D Hである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。 30

【請求項7】

XがC / D H Lである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

【請求項8】

XがC / D Dである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

【請求項9】

XがC / D H Lである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

【請求項10】

XがC / D H K Lである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

【請求項11】

XがC / D Hである請求の範囲第2項また第3項記載の方法。 40

【請求項12】

XがC / D Dである請求の範囲第2項また第3項記載の方法。

【請求項13】

XがC / D C / D H K Lである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

【請求項14】

XがC / D C / D Hである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

【請求項15】

XがC / D C / D H Lである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

【請求項16】

XがC / D C / D Dである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。 50

## 【請求項 17】

XがC/D D Hである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

## 【請求項 18】

XがC/D D H Lである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

## 【請求項 19】

XがC/D D H K Lである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

## 【請求項 20】

XがC/D D Hである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

## 【請求項 21】

XがC/D D H Lである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

10

## 【請求項 22】

XがC/D D H K Lである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

## 【請求項 23】

XがC/D C/D D Hである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

## 【請求項 24】

XがC/D C/D D H Lである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

## 【請求項 25】

XがC/D C/D D H K Lである請求の範囲第2項または第3項記載の方法。

## 【請求項 26】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、アミノ酸配列(配列番号132、134、135)を有するFBAポリペプチドセグメントからなるポリペプチドを薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

20

## 【請求項 27】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、アミノ酸配列(配列番号132、134、136)を有するFBAポリペプチドセグメントからなるポリペプチドを薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

## 【請求項 28】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、アミノ酸配列(配列番号132~135および159)を有するFEBAポリペプチドセグメントからなるポリペプチドを薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

30

## 【請求項 29】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、筋細胞に対するポリペプチドセグメントに対応するアミノ酸配列(配列番号132~134、136および159)を有するFEBAポリペプチドセグメントからなるポリペプチドを薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

## 【請求項 30】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、GGF2ポリペプチドを薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

40

## 【請求項 31】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、筋細胞のp185<sup>erbB2</sup>受容体と特異的に結合する化合物を薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

## 【請求項 32】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択

50

される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、アミノ酸配列、配列番号150、を有するEGFL1からなるポリペプチドを薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

【請求項33】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、アミノ酸配列、配列番号151、を有するEGFL2からなるポリペプチドを薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

【請求項34】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、アミノ酸配列、配列番号152、を有するEGFL3からなるポリペプチドを薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。 10

【請求項35】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、アミノ酸配列、配列番号153、を有するEGFL4からなるポリペプチドを薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

【請求項36】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、アミノ酸配列、配列番号154、を有するEGFL5からなるポリペプチドを薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。 20

【請求項37】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、アミノ酸配列、配列番号155、を有するEGFL6からなるポリペプチドを薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

【請求項38】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、該筋細胞に対するラットI-EJ形質転換された線維芽細胞系から単離された35kDポリペプチド因子を、薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。 30

【請求項39】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、該筋細胞に対するSKBR-3ヒト胸部細胞系から単離された75kDポリペプチド因子を、薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

【請求項40】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、該筋細胞に対するラットI-EJ形質転換された線維芽細胞系から単離された44kDポリペプチド因子を、薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。 40

【請求項41】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、該筋細胞に対するMDA-MB231ヒト胸部細胞系から単離された45kDポリペプチド因子を、薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

【請求項42】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択 50

される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、該筋細胞に対する A T L - 2 ヒト T 細胞系から単離された 7 ~ 1 4 k D ポリペプチド因子を、薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

【請求項 4 3】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、該筋細胞に対する活性化されたマウス腹腔マクロファージから単離された 2 5 k D ポリペプチド因子を、薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

【請求項 4 4】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、該筋細胞に対するウシ腎臓から単離された 2 5 k D ポリペプチド因子を、薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

10

【請求項 4 5】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、該筋細胞に対する A R I A ポリペプチドを、薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

【請求項 4 6】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、該筋細胞に対する 0 ~ 2 A 前グリア細胞を刺激する 4 6 ~ 4 7 k D ポリペプチド因子を薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

20

【請求項 4 7】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、該筋細胞に対する G G F - I I I を、薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

【請求項 4 8】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、発現可能な遺伝子構造にある、式

30

Y B A Z C X

(式中、Y B A Z C X はポリペプチドセグメント(配列番号 1 3 3 ~ 1 3 5、1 3 7 ~ 1 4 3、1 4 6、1 5 6 および 1 5 9)から構成され、式中、Y はポリペプチドセグメント E (配列番号 1 3 3 および 1 5 9)からなるかまたは存在せず、式中、Z はポリペプチドセグメント G (配列番号 1 3 7)からなるかまたは存在せず、そして式中、X はポリペプチドセグメント C / D H K L、C / D H、C / D H L、C / D D、C / D H L、C / D H K L、C / D H、C / D D、C / D C / D H K L、C / D C / D H、C / D C / D H L、C / D C / D D、C / D D H、C / D D H L、C / D D H K L、C / D D H、C / D D H L、C / D D H K L、C / D C / D D H、C / D C / D D H L、または C / D C / D D H K L からなる；ここで前記ポリペプチドセグメントは、A が配列番号 1 3 5、B が配列番号 1 3 4、C が配列番号 1 5 6、C / D が配列番号 1 3 8、C / D が配列番号 1 3 9、D が配列番号 1 4 0、D が配列番号 1 4 1、H が配列番号 1 4 6、K が配列番号 1 4 2、L が配列番号 1 4 3 で示される)を有するポリペプチドをコードする DNA 配列を、薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

40

【請求項 4 9】

ホ乳動物の筋細胞のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が、発現可能な遺伝子構築物にある、式

50

## W B A Z C X

(式中、W B A Z C Xはポリペプチドセグメント(配列番号132、134、135、137~143、146および156)から構成され、式中、WはポリペプチドセグメントF(配列番号132)からなるかまたは存在せず、式中、ZはポリペプチドセグメントG(配列番号137)からなるかまたは存在せず、そして式中、XはポリペプチドセグメントC/D H K L、C/D H、C/D H L、C/D D、C/D H L、C/D H K L、C/D H、C/D D、C/D C/D H K L、C/D C/D H、C/D C/D H L、C/D C/D D、C/D D H、C/D D H L、C/D D H K L、C/D D H、C/D D H L、C/D D H K L、C/D C/D D H、C/D C/D D H L、またはC/D C/D D H K Lからなる；ここで前記ポリペプチドセグメントは、Aが配列番号135、Bが配列番号134、Cが配列番号156、C/Dが配列番号138、C/Dが配列番号139、Dが配列番号140、Dが配列番号141、Hが配列番号146、Kが配列番号142、Lが配列番号143で示される)を有するポリペプチドをコードするDNA配列を、薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

10

## 【請求項50】

ホ乳動物のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患の筋組織の病理学的コンディションの予防または治療のための医薬品の製造方法であって、該コンディションが、請求の範囲第1、2、3および30項のいずれか1つに定義されたポリペプチドに対して感受性であるかまたは反応性である筋細胞タイプを含み、該方法が、有効量の該ポリペプチドを薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

20

## 【請求項51】

ホ乳動物のミオパシー、ジストロフィーおよび外傷性筋損傷よりなる群から選択される骨格筋疾患のコンディションの治療のための医薬品の製造方法であって、該方法が請求の範囲第1、2、3および30項のいずれか1つに定義された、有効量のポリペプチドを薬学的に許容しうる担体と混合することからなる方法。

## 【請求項52】

前記医薬品が、前記筋細胞の萎縮を減少させるためのものである、請求の範囲第1、2、3および30項のいずれか1つに記載の方法。

30

## 【請求項53】

前記医薬品が、前記ホ乳動物に存在する筋線維を増加させるためのものである、請求の範囲第1、2、3および30項のいずれか1つに記載の方法。

## 【請求項54】

前記医薬品が、前記ホ乳動物に生存する筋細胞を増加させるためのものである、請求の範囲第1、2、3および30項のいずれか1つに記載の方法。

## 【請求項55】

前記医薬品が、前記ホ乳動物での筋増殖を増進させるためのものである、請求の範囲第1、2、3および30項のいずれか1つに記載の方法。

## 【請求項56】

前記医薬品が、前記ホ乳動物での筋再生を増進させるためのものである、請求の範囲第1、2、3および30項のいずれか1つに記載の方法。

40

## 【請求項57】

前記医薬品が、筋細胞の分裂促進を刺激するためのものである、請求の範囲第1、2、3および30項のいずれか1つに記載の方法。

## 【請求項58】

前記医薬品が、アセチルコリン受容体の合成を増進させるためのものである、請求の範囲第1、2、3および30項のいずれか1つに記載の方法。

## 【請求項59】

前記医薬品が、筋芽細胞である筋細胞の治療用である、請求の範囲第1、2、3および3

50

0 項のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 6 0】

前記ジストロフィーが、デュシェーヌ型筋ジストロフィーまたはベッカー型ジストロフィーである請求の範囲第 1、2、3 および 3 0 項のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 6 1】

前記医薬品が、機能不全なアセチルコリン受容体を有する筋細胞の治療用である、請求の範囲第 1、2、3 および 3 0 項のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 6 2】

前記 G G F 2 がヒト組換え G G F 2 である請求の範囲第 3 0 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

本発明は、脊椎動物種において見出された、筋細胞のための成長、分化および生存因子であるポリペプチドを投与することによる、筋組織の疾患および障害の予防的または肯定的 (affirmative) 治療法に関する。

成長した (adult) 脊椎動物における筋組織は付随細胞 (satellite cells) と呼ばれる予備の筋芽細胞から再生するであろう。付随細胞は筋組織全体に分布しており、損傷または疾患がなければ有糸分裂的に静止している。筋肉損傷ののち、または疾患からの回復の間に、付随細胞は細胞周期に再び入り、増殖して 1) 既存の筋線維に入るか、2) 新しい筋線維を形成する多角性筋管に分化するであろう。筋芽細胞は最終的に既存の筋線維に置きかわる筋線維を生じるか既存の筋線維と融合し、これによって収縮装置成分の合成による線維帯径 (girth) が増す。この過程は、たとえば誘導された筋線維変性 (degradation) に続く哺乳動物において起こるほぼ完全な再生によって例証される；前筋細胞 (muscle progenitor cells) は増殖し再生する筋線維とともに融合する。

成長した (および未成長の (embryonic)) 筋芽細胞のインビトロの増殖および分化を制御するいくつかの成長因子が同定されている。線維芽細胞成長因子 (FGF) は筋細胞に対して分裂促進性 (mitogenic) であり、筋肉分化の阻害剤である。トランフォーミング成長因子 (TGF) は筋芽細胞の増殖には効果がないが、筋肉分化の阻害剤である。インスリン様成長因子類 (IGFs) は齧歯動物における筋芽細胞の増殖および分化の両方を刺激することが示されている。血小板由来成長因子 (PDGF) もまた筋芽細胞に対して分裂促進性であり、筋細胞の分化の有力な阻害剤である (参照: Florini および Magri, 1989:256:C701~C711)。

脊椎動物種において筋組織およびニューロンのいずれもが筋芽細胞の増殖および分化を刺激する因子の有力なソースである。起源が神経系 (すなわち、神経原性) である神経筋システムを冒す疾患において、冒された神経が分布する (innervate) 筋組織は麻痺し進行性で衰える。末梢神経の再生と神経学のおよびミオパシー性 (myopathic) の疾患からの回復の間に、ニューロンは前記の筋肉の再生を誘い出す成長因子のソースを提供するかもしれない、衰弱と萎縮からの筋肉の修復のメカニズムを提供しうる。

最近記載された成長因子のファミリー、ニューレグリン (neuregulin) 類は駆動ニューロン (motor neurons) (Marchionni ら、Nature 362:313, 1993) および炎症性細胞 (Tarakhovskiy ら、Oncogene 6:2187-2196 (1991)) によって合成される。ニューレグリン類および関連の p 1 8 5<sup>erbB2</sup> 結合因子は精製され、クローン化され、発現されている (Benveniste ら、PNAS 82:3930-3934, 1985; Kimura ら、Nature 348:257-260, 1990; Davis および Stroobant、J. Cell. Biol. 110: 1353-1360, 1990; Wen ら、Cell 69:559, 1992; Yarden および Ullrich、Ann. Rev. Biochem. 57:443, 1988; Holmes ら、Science 256:1205, 1992; Dobashi ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 88:8582, 1991; Lupu ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 89:2287, 1992)。組換えニューレグリン類は末梢グリアに対して分裂促進性であることが示され (Marchionni ら、Nature 362:313, 1993)、神経筋接合 (junction) の形成に影響を与えることが示されている (Falls ら、Cell 72:801, 1993)。したがって再生するニューロンと神経原性疾患および神経損傷からの修復に関係する炎症性細胞により駆動ニューロン (motor neurons) の再ミエリン化 (remyelination) およびそれらのターゲット

10

20

30

40

50

との適当な連結 (connection) を形成する能力を調整する因子のソースを提供する。筋肉が再度分布した (reinnervated) のち、駆動ニューロンは筋肉の成長および生存を刺激する、筋肉に対する因子を提供するかもしれない。

現在、筋肉の分化および生存を促進する有用な治療法はない。このような治療法は色々な神経性および筋肉の疾患および障害の治療に有用であろう。

#### 発明の要約

我々は筋細胞の増大された分裂促進分化および生存が、グリア成長因子、活性を誘導するアセチルコリン受容体 (A R I A)、ヘレグリン (heregulin) 類、ニュー分化因子 (neuro differentiation factor) およびより一般的なニューレグリン類などの前記したタンパク質を用いて達成されうることを発見した。我々はこれらの化合物が筋細胞の増殖および筋管の分化と生存の両方を誘導しうることを発見した。これらの現象は骨格筋組織に加えて心臓組織および平滑筋組織において起こりうる。したがって、先の化合物、これらの化合物の合成を誘導する制御化合物および筋肉上の受容体に結合することによってまたはリガンド - 受容体複合体によって活性化される第2のメッセンジャーシステムをほかの手段によって刺激することによりこれらの化合物をまねる小さな分子は、すべて筋肉疾患のための予防的または肯定的治療法として極めて有用である。

本発明の新規な観点は筋細胞の分裂促進、生存、成長および分化を誘導する成長因子として先に挙げたタンパク質の使用を包含する。これらの効果を達成するための筋細胞の治療はここに記載されたポリペプチドに筋細胞を接触させることによって達成されうる。治療は正味の筋肉の損失を遅らせるまたは停止する、ないしは脊椎動物中にプレウエント (prewent) な筋肉の量または質を増大するために提供されうる。

これらの因子は、脊椎動物に有効量のポリペプチドまたは関連化合物を投与することにより脊椎動物 (好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒト) において筋細胞の分裂促進、分化、および生存を生じるために用いられる。筋肉に対するニューレグリンの効果は、たとえばミオシンの重鎖の緩徐なおよび早いアイソフォームなどの収縮装置の特別のアイソフォームの合成を誘導することによって筋肉のパフォーマンスにおける増加を引き起こすことにより、これに限定されないがジストロフィン (dystrophin) などの保護分子の合成を誘導することによって筋線維の生存を促進することにより; および/またはたとえば神経筋接合でアセチルコリン受容体分子を増加することによって筋肉への神経の分布 (innervation) を増大することにより発生しうる。

ここで用いられる筋細胞という用語は筋組織に寄与するいかなる細胞をも意味する。筋細胞、付随細胞、筋管、および筋原線維組織はすべて「筋細胞」という用語に包含され、すべて本発明の方法を用いて治療されうる。筋細胞効果は骨格筋、心筋および平滑筋に誘導されうる。

分裂促進は骨格筋、平滑筋または心筋の、筋芽細胞または付随細胞を包含する筋細胞に誘導されうる。ここで用いられる分裂促進とは患者の新しい筋細胞の産生が結果として起こるいかなる細胞分裂をも意味する。さらに詳しくは、インピトロの分裂促進は2つの倍加時間と等しい時間、標識試薬に細胞がさらされるとき、処理されていない細胞の50%、より好ましくは100%、もっとも好ましくは300%と比較した分裂指数における増加として定義される。分裂指数はS期 (すなわち、BrdU) の間にのみ取込まれるトレーサーの存在において成長するとき、標識された核をもつ培養物中の細胞の分数 (fraction) であり倍加時間は培養物中の細胞数が2倍に増加するのに必要な平均時間として定義される。

インピボの分裂促進に対する効果は、S期 (すなわち、BrdU) の間にのみ取込まれるトレーサーにさらされた哺乳動物の筋組織における標識された付随細胞の外観により測定されるような付随細胞活性化における増加として定義される。有用な治療薬において、哺乳動物が15分間よりも長い期間標識試薬にさらされ、治療用量の分裂促進剤を投与したのち10時間から24時間の間に組織をアッセイするばあい、コントロールの哺乳動物と比較して少なくとも10%、より好ましくは少なくとも50%およびもっとも好ましくは200%よりも多く付随細胞の活性化を増大する化合物としてインピボで定義される。ま

10

20

30

40

50

たは、インビボの付随細胞活性化は免疫学的またはRNA分析方法によって中間体のフィラメントビメンチン (filament vimentin) の外観をモニターすることによって検出する。ビメンチンがアッセイされるとき、有用な分裂促進剤は治療上有用な搬薬用量が与えられたばあい筋組織におけるビメンチンの検出可能なレベルの発現を引き起こすものとして定義される。

ここで用いる筋発生は筋管を生じる筋芽細胞のいかなる融合をも意味する。もっとも好ましくは筋発生に対する効果は筋芽細胞の融合および筋肉の分化プログラムの実施可能性における増大として定義される。有用な筋原性治療薬はインビトロの融合指数におけるいずれかの増加を授与する化合物として定義される。さらに好ましくは、化合物はコントロールと比較して融合指数における少なくとも2.0倍の増加を授与し、もっとも好ましくは、化合物は3倍またはそれより大きい増加を授与する。融合指数は培養物中に存在する核の総数と比較した培養物中の多核化された細胞 (Multinucleated cells) に存在する核の分数として定義される。先によって与えられた割合は筋原性化合物に6日間さらされたのちにアッセイした細胞についてであり処理されていないコントロールと比較する。筋発生はまた筋管における面積あたりの核数をアッセイすることによりまたはウエスタン分析による筋肉に特異的なタンパク質のレベルを測定することによっても決定しうる。好ましくは、化合物はたとえばここで与えられたアッセイを用いて筋管の密度において少なくとも2.0倍の増加を授与し、もっとも好ましくは化合物は3倍またはそれより多くの増加を授与する。

10

筋肉の成長は線維サイズにおける増大および/または線維の数の増加によって生じうる。ここで用いる筋肉の成長とはA) 湿重量における増加、B) タンパク質含有量の増加、C) 筋線維数の増加、またはD) 筋線維の直径における増加によって測定しうる。筋線維の成長における増加は断面のエリプシス (elipsis) のマイナーな軸として定義されるとき直径における増加として定義することができる。有用な治療薬として同様に処理されたコントロール動物 (すなわち、筋肉成長化合物で処理されていない変性した筋組織を持つ動物) と比較して、筋肉がすでに少なくとも10%変性している動物の10%またはそれより多く、より好ましくは50%よりも多く、もっとも好ましくは100%よりも多く、湿重量、タンパク質含有量および/または直径を増大するものである。筋線維の数を増加することにより成長を増大する化合物は、少なくとも1%、より好ましくは少なくとも20%、およびもっとも好ましくは少なくとも50%病んだ組織における線維の数を増加するばあい治療薬として有用である。これらの百分率は化合物が投与され局所的に作用するときの比較しうる処理されておらず病んでいないホ乳動物におけるまたは対側性 (contralateral) の病んでいない筋肉におけるベーサルレベルと比較して決定される。

20

ここで用いられる筋線維の生存とは壊疽またはアポトーシス (apoptosis) によって証明されるような筋線維の損失の防止 (prevention) または筋線維の損失のほかのメカニズムの防止を意味する。ここで用いられる生存とは処理されていないコントロールと比較して少なくとも10%、より好ましくは少なくとも50%、およびもっとも好ましくは少なくとも300%の細胞死の割合 (rate) における減少を示す。生存の割合は、細胞が分化8日後 (すなわち培地を20%から0.5%血清のものに変えて8日後) に培養物中の死んだ細胞に特異的な染料 (たとえばプロピジウムイオダイドなど) で染色されうる細胞を

30

40

ここで用いられる筋肉の再生とはそれにより前筋細胞から新しい筋線維を形成する過程を意味する。再生に有用な治療薬は前記のように、少なくとも1%、より好ましくは少なくとも20%、およびもっとも好ましくは少なくとも50%の新しい線維の数における増加を意味する。

ここで用いられる筋細胞の分化とはたとえば収縮装置などの筋線維の成分 (筋原線維) を特定する筋の発達プログラムの誘導を意味する。分化に有用な治療薬は同様に処理されたコントロール動物における等価な組織と比較して少なくとも10%またはそれより多く、より好ましくは50%またはそれより多く、およびもっとも好ましくは100%よりも多く病んだ組織における筋線維のいずれかの成分の量を増加する。

50

ここで用いられる筋肉の萎縮とは筋線維帯径における重大な損失を意味する。重大な萎縮によって病んでいない、損傷されていないまたは正常に利用される組織と比較して少なくとも10%の病んだ損傷されているまたは用いられていない筋組織における筋線維の直径の減少が意味される。

ここに記載されたポリペプチドまたはほかの化合物を用いる疾患または障害の治療方法もまた本発明の一部である。治療されうる筋障害の例にはたとえばミオパシー、ジストロフィー、神経筋の伝導性疾患 (myoneural conductive diseases)、外傷性筋損傷、および神経損傷などの骨格筋疾患および障害が含まれる。たとえば心筋症、虚血性のダメージ、先天性疾患、および外傷性損傷などの心筋病理も、たとえば動脈硬化、血管病変、および先天性血管疾患などの平滑筋疾患および障害が治療されうるように、本発明の方法を用いて治療されうる。たとえば、デュシェーヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型ジストロフィー、および重症筋無力症はしかし本発明の方法を用いて治療されうる3種の疾患である。また本発明はたとえば横紋筋肉種などの筋細胞起源の腫瘍の予防または治療のための方法を包含する。これらの方法はここに記載された1つまたはそれより多くのポリペプチドの結合を阻害し、腫瘍に寄与する細胞の増殖を阻害する物質を有効量で投与することを包含する。

10

本発明の方法はまた神経親和性因子の欠除によって引き起こされる疾患にかかった患者を治療するためにも用いうる。神経親和性因子の欠除によって意味されることは神経筋接合および/または筋肉強度における検出しうる減少を生じるに足る影響を受けない個体と比較して神経親和性因子の減少した量である。神経親和因子は影響を受けない個体に認められるものよりも10%より低いレベルで存在しうる。より好ましくは、前記因子は影響を受けない個体にみとめられるものよりも20%低いレベルで存在し、もっとも好ましくは同様の状況下で影響を受けない個体と比較して80%レベルが下げられる。

20

本発明の方法はニューレグリンタンパク質が同じ遺伝子によってコードされるという事実を利用する。メッセンジャーRNAスプライシング変異体(およびそれらの結果として生じるタンパク質の変種)はこの遺伝子に由来しこれらの産物の多くはp185<sup>ergB2</sup>への結合およびその活性化を示す。この遺伝子の産物は筋細胞分裂促進活性(以下の実施例1および2参照)、分化(実施例3および6)、および生存(実施例4および5)を示すために用いられている。本発明は筋細胞分裂促進剤、分化因子、および生存因子のような記載された活性をもつニューレグリン遺伝子の既知の産物(ここおよび先に挙げた文献に記載された)のすべてに対する使用を提供する。もっとも好ましくは組換えヒトGGF2(rhGGF2)はこれらの方法に用いられる。

30

本発明はまたほかのまだ天然には単離されていない、ニューレグリン遺伝子のスプライシング変異体の使用に関する。図29はスプライシングの既知のパターンを示す。これらのパターンはポリメラーゼチェーン反応実験(polymerase chain reaction experiments)(逆転写されたRNAについて)、cDNAクローン(その中で表わされたような)の分析、およびニューレグリン類をコードする公開された配列の分析(Pelesら、Cell 69:205(1992)およびWenら、Cell 69:559(1992))に由来する。ここに開示された追加のパターンと同様に、これらのパターンは存在する考えられるスプライシング変異体を表わす。スプライシング変異体は、ここにリファレンスにより組込まれる1993年3月24日に

40

出願された、USSN 08/036,555、Goodearlらに十分に記載される。さらに詳しくは、筋細胞の細胞分裂、生存、分化および増殖は、式WBACX

(式中、WBACXは図30で示されるポリペプチドセグメント(配列番号132、134、135、137~139、156)から構成され、式中、WはポリペプチドセグメントFからなるかまたは存在せず、式中、ZはポリペプチドセグメントGからなるかまたは存在せず、そして式中、XはポリペプチドセグメントC/D H K L、C/D H、C/D H L、C/D D、C/D H L、C/D H K L、C/D H、C/D D、C/D C/D H K L、C/D C/D H、C/D C/D H L、C/D C/D D、C/D D H、C/D D H L、C/D D H K L、

50

C / D D H、C / D D H L、C / D D H K L、C / D C / D  
D H、C / D C / D D H L、またはC / D C / D D H K L  
からなる) によって定義されるポリペプチドと筋細胞とを接触させること、および(または)

Y B A Z C X

(式中、Y B A Z C Xは図30で示されるポリペプチドセグメント(配列番号133~135、156、159)から構成され、式中、YはポリペプチドセグメントEからなるかまたは存在せず、式中、ZはポリペプチドセグメントGからなるかまたは存在せず、そして式中、XはポリペプチドセグメントC / D H K L、C / D H、C / D H L、C / D D、C / D H L、C / D H K L、C / D H、C / D D、C / D C / D H K L、C / D C / D H、C / D C / D H L、C / D C / D D、C / D D H、C / D D H L、C / D D H K L、C / D D H、C / D D H L、C / D D H K L、C / D C / D D H、C / D C / D D H L、またはC / D C / D D H K Lからなる) によって定義されるポリペプチドと筋細胞とを接触させることによって達成される。

一般に、前記ポリペプチドのN-末端はFまたはEポリペプチドセグメントではじまる。Fポリペプチドが存在するときタンパク質の成熟(maturation)により開裂し成熟したポリペプチドを生じうる。E配列が存在するときN末端のシグナル配列を表わすはじめの50アミノ酸がポリペプチドからなくなりうる。

さらに、本発明は、リファレンスによりここに組込まれる、1992年8月17日に出願された米国特許出願S N 0 7 / 9 3 1 , 0 4 1の

- M D A - M B 2 3 1 ヒト胸部細胞系(human breast cell line)から単離された30kDのポリペプチド因子、または

- グリア細胞に対する形質転換されたラット、I - E J 線維芽細胞系から単離された35kDのポリペプチド因子、または

- S K B R - 3 ヒト胸部細胞系から単離された75kDのポリペプチド因子、または

- ラットI - E J 形質転換された線維芽細胞系から単離された44kDのポリペプチド因子、または

- 活性化されたマウス腹膜マクロファージから単離された25kDのポリペプチド因子、または

- M D A - M B 2 3 1 ヒト胸部細胞から単離された45kDのポリペプチド因子、または

- グリア細胞に対するA T L - 2 ヒトT細胞系から単離された7~14kDのポリペプチド因子、または

- ウシ腎臓細胞から単離された25kDのポリペプチド因子、または

- 脳から単離された42kD A R I Aポリペプチド因子; 0~2Aの前グリア細胞(glia progenitor cells)を刺激する46~47kDのポリペプチド因子; または

- 43~45kDのポリペプチド因子、G G F I I I、175の筋細胞への適用により筋細胞を治療する方法を包含する。

本発明はさらに、インビボおよびインビトロの筋細胞の治療に、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、およびE G F L 6ポリペプチド、図37から42および配列含号150から155をそれぞれ用いる方法を包含する。

また本発明には筋細胞の治療のための図44に示される配列のG G F 2ポリペプチドの投与が包含される。

本発明の追加の重要な観点は、

(a) 約30kDから約36kDの分子量で、および1つまたはそれより多くの以下のペプチド配列をそのアミノ酸配列中に含む、胎児ウシ血漿の存在下、グリア細胞分裂促進活性をもつことも知られているベーシックなポリペプチド因子:

F K G D A H T E (配列番号 : 1)  
 A S L A D E Y E Y M X K (配列番号 : 2)  
 T E T S S S G L X L K (配列番号 : 3)  
 A S L A D E Y E Y M R K (配列番号 : 7)  
 A G Y F A E X A R (配列番号 : 11)  
 T T E M A S E Q G A (配列番号 : 13)  
 A K E A L A A L K (配列番号 : 14) 10  
 F V L Q A K K (配列番号 : 15)  
 E T Q P D P G Q I L K K V P M V I G A Y T  
 (配列番号 : 165)  
 E Y K C L K F K W F K K A T V M  
 (配列番号 : 17)  
 E X K F Y V P (配列番号 : 19) 20  
 K L E F L X A K (配列番号 : 32)

; および

(b) 約55kDから約63kDの分子量をもち、1つまたはそれより多くの以下のペプチド配列をそのアミノ酸配列中に含む、胎児ウシ血漿の存在下グリア細胞分裂促進を刺激することも知られている筋細胞を治療するのに用いられるベーシックなポリペプチド因子:

V H Q V W A A K (配列番号 : 33)  
 Y I F F M E P E A X S S G (配列番号 : 34) 30  
 L G A W G P P A F P V X Y (配列番号 : 35)  
 W F V V I E G K (配列番号 : 36)  
 A S P V S V G S V Q E L Q R  
 (配列番号 : 37)  
 V C L L T V A A L P P T (配列番号 : 38)  
 K V H Q V W A A K (配列番号 : 48) 40  
 K A S L A D S G E Y M X K (配列番号 : 49)  
 D L L L X V (配列番号 : 39)

を用いる筋細胞の治療方法である。

より小さな分子量のポリペプチド因子に、およびより大きな分子量のポリペプチド因子に由来する、前記したペプチド配列の使用のための方法はまた本発明の観点である。前記ペプチドに対するモノクローナル抗体はそれ自体有用な研究道具および治療薬である。

したがって、本発明はさらに筋細胞を治療するのに有用な活性をもち、

(a) それぞれ図 27A、27B または 27C、配列番号 129 ~ 131 のいずれか 1 つに示される DNA 配列；

(b) 図 21、配列番号 85 に示される DNA 配列；

(c) 図 27A、配列番号 129 に示される配列のヌクレオチド 281 ~ 557 によって示される DNA 配列；または

(d) (a)、(b) または (c) による DNA 配列のいずれか 1 つとハイブリダイズしうる DNA 配列

によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド因子を用いる方法を含む。

筋細胞分裂促進剤としての以下の因子：

(a) ウシ脳下垂体材料からえられたばあい、還元コンディションであってもなくとも、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で約 30 kD から約 36 kD のみかけ上の (observed) 分子量をもち、筋細胞の分裂を刺激することを含む筋細胞分裂促進活性をもち、逆相 HPLC を用いて単離されたばあい 4 で 0.1% トリフルオロ酢酸における 10 週間のインキュベーションののち該活性の少なくとも 50% を保つベーシックなポリペプチド因子；および

(b) ウシ脳下垂体材料からえられたばあい、非還元コンディション下、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動上約 55 kD から約 63 kD のみかけ上の分子量をもち、そのヒトの等価物が DNA クローン GGF2HBS5 によってコードされ筋細胞分裂促進活性をもち逆相 HPLC を用いて単離されたときに 4 0.1% トリフルオロ酢酸において 4 日間インキュベーションしたのち活性の少なくとも 50% を保つベーシックなポリペプチド因子。

したがって本発明のほかの重要な観点は以下の使用である：

(a) 筋細胞の分裂を刺激することを含む細胞分裂促進活性をもつ一連のヒトおよびウシポリペプチド因子。これらのペプチド配列はそれぞれ図 30、31、32 および 33、配列番号 132 ~ 133 に示される。

(b) 筋細胞の分裂を刺激することを含む細胞分裂促進活性をもち、Lupuら、*Science* 249:1552 (1990)；Lupuら、*Proc.Nat1.Acad.Sci USA* 89:2287 (1992)；Holmesら、*Science* 256:1205 (1992)；Pelesら、69:205 (1992)；YardenおよびPeles *Biochemistry* 30:3543 (1991)；Dobashiら、*Proc.Natl.Acad.Sci* 88:8582 (1991)；Davisら、*Biochem.Biophys.Res.Commun.* 179:1536 (1991)；Beaumontら、特許出願 PCT / US 91 / 03443 (1990)；Bottenstein、1 / 4 / 94 に発行された、米国特許第 5,276,145 号；および Greeneら、特許出願 PCT / US 91 / 02331 (1990) に概説された手順にしたがい精製および特徴づけられた一連のポリペプチド因子。

(c) 筋細胞の分裂を刺激することを含むグリア細胞分裂促進活性をもつポリペプチド因子 (GGFBPP5)。アミノ酸配列は図 31、配列番号 144 に示される。

筋芽細胞をインビボまたはインビトロの筋細胞分裂促進剤として前記のポリペプチドに接触させることにより筋芽細胞の分裂促進を刺激する方法は本発明の特徴として包含される。

また筋細胞治療は、発現しうる遺伝子構築物における前記のポリペプチド化合物をコードする DNA を投与することによっても達成しうる。ポリペプチドをコードする DNA は細胞へ DNA を送達するための当該技術分野において知られている技術を用いて患者に投与されうる。たとえばレトロウイルスベクター、電気内孔法またはリポソームは DNA を送達するために用いうる。

本発明は天然のソース (組織または細胞系) から抽出されたようなまたは組換え手段により調製されたようなタンパク質の先に挙げたファミリーの使用を包含する。

特異的に p185<sup>erbB2</sup> 受容体に結合する、ほかの化合物、とくにペプチドもまた筋細胞分裂促進剤として本発明にしたがって用いることができる。候補の化合物をルーチンに p185<sup>erbB2</sup> 結合についてスクリーニングすることができ、もしそれが結合すれば、つぎにここに記載された方法を用いてグリア細胞分裂促進活性についてスクリーニングすることができる。

10

20

30

40

50

本発明は重大な活性の低下を示さない先のポリペプチド因子のいかなる改変物または等価物の使用を包含する。たとえば、アミノ酸含有量 (Content) または配列が活性に実質的な悪影響なしに変更される改変は含まれる。よってここに含まれる効果および使用は、したがって本発明の一部である。改変されたまたは等価の因子を用いてこのような使用および効果をともなって組立てられるために記載される。

先に記載されそれぞれ図 30、31、32 および 33、配列番号 132 ~ 146 に示されたヒトペプチド配列は、天然のソース ( 適当な組織から調製された cDNA ライブラリー ) から全長の相補的 DNA ( cDNAS ) として単離することができる、または当業者によって個々のエクソン ( たとえば、別個のエクソンとして誘導された ) をともなう DNA 構築物として組立てることができる一連のスプライシング変異体を示す。

10

本発明はまた先に定義されたようなポリペプチドを有効量投与することによる、筋細胞を治療するための、すなわち筋肉の分裂促進、筋発生、分化、または生存を誘導するための、医薬品を製造する方法を包含する。このような医薬品はポリペプチドを薬学上有効な担体とともに投与することによって製造される。

本発明の別の観点は、それぞれ薬学的または獣医学的 ( veterinary ) 使用のために製剤化された先に定義された因子のいずれかからなる、適宜許容しうる希釈剤、担体または賦形剤 ( excipient ) および / または単位投薬用量形態をともなう薬学上または獣医学上の製剤の使用である。本発明の因子を用いるばあい、通常薬学的または獣医学上のプラクティスが適切な製剤または組成物を提供するために用いられる。

したがって、本発明の一部として用いるべき製剤は、非経口投与、たとえば静脈内、皮下、筋肉、眼窩内、眼科用、脳室内 ( intraventricular )、頭蓋内、嚢内、脊椎内 ( intraspinal )、槽内 ( intracisternal )、腹腔内、局所、鼻内、エアロゾル、乱切 ( scarification ) 投与、およびまた経口、頬側、直腸または膣投与に適用できる。

20

また本発明の製剤は、本発明の方法に効果のあるポリペプチドをコードする DNA を発現する宿主細胞の患者への移植により、または本発明の製剤を放出する外科的インプラントの使用により投与されうる。

非経口製剤は液体溶液 ( liquid solution ) または懸濁液の形態であってもよく ; 経口投与のために、製剤は錠剤またはカプセル剤の形態であってもよく ; 鼻内製剤として粉末、点鼻液、またはエアロゾルの形態であってもよい。

製剤を製造するために当該技術分野において公知の方法は、たとえば「Remington's Pharmaceutical Sciences」において知られている。非経口投与用の製剤は、たとえば賦形剤として滅菌水または滅菌生理食塩水、たとえばポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、野菜起源の油、または水素化されたナフタレンを含有してもよく、生体適合性、生体分解性の ( biodegradable ) のラクチドポリマー、またはポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンコポリマーを本因子の放出をコントロールするために用いてもよい。因子のためのほかの可能性のある非経口の送達システムはエチレン - ビニルアセートコポリマー粒子、浸透ポンプ、インプラントできる注入システム、およびリポソームを含む。吸入用製剤は賦形剤として、たとえばラクトースを含んでもよく、またたとえばポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル、グリコール酸塩およびデオキシコール酸塩を含有する水性溶液であってもよく、また点鼻液の形態、または鼻内に適用されるゲルとして投与するための油状溶液であってもよい。また非経口投与製剤も頬側投与のためにグリコール酸、直腸投与用にメトキシサリチル酸、または膣投与用にクエン酸を含有してもよい。

30

40

本因子は単独の活性試薬として用いてもよく、またほかの活性成分、たとえば、神経学上の疾患においてニューロンの生存を容易にしうるであろうほかの成長因子、またはペプチダーゼまたはプロテアーゼ阻害剤と組合せて用いることができる。

本発明の製剤における本因子の濃度は、投与される投薬量、および投与経路を含む、多数の問題に依存して変わるであろう。

一般的な用語として、本発明の因子は、非経口投与のために約 0 . 1 から 10 % w / v の化合物を含有する水性生理学的緩衝液に提供されてもよい。一般的な用量範囲は 1 日あた

50

り約1mg/kg体重から約1g/kg体重であり；好ましい用量範囲は1日あたり0.01mg/kg体重から約100mg/kg体重である。投与されるべき好ましい投薬量（dosage）は、取りくまれる（addressed）病理学的コンディションの進行のタイプと程度、患者の全身の健康、製剤の調合および投与経路に依存するであろう。

本発明の方法に利用されるポリペプチド因子はまた標準的な技術につづく、たとえばモノクローナル抗体などの抗体を作製するために免疫原として用いることもできる。これらの抗体は、代って治療または診断目的で用いることができる。したがって、因子の正常でないレベルに起因する筋疾患に関係するであろうコンディションがこのような抗体を用いることにより追跡されうる。

標準的な方法を用いる単離されたサンプルについてのアッセイを用いるときにインビトロの技術を用いることができる。抗体に、たとえば腫瘍のイメージングの当該技術分野のための技術を用いる体外にイメージされうる書放射性アイソトープがつけられるイメージング方法も用いる。

本発明のさらなる一般的な観点は、好ましくは筋肉の疾患または障害の治療のための、医薬品の製造における本発明の因子の使用である。「GGF2」という名称はGGF-IIタンパク質に由来するペプチド配列データを用いてすでに単離されたすべてのクローン（すなわち、GGF2HBS5、GGF2BPP3）のために用いられ、単独で存在するとき（すなわちGGF2またはrhGGF2）、GGF-IIタンパク質に由来するペプチド配列データを用いて単離されるプラスミドによりコードされる組換えヒトタンパク質（すなわち、プラスミドHBS5からの昆虫細胞において生産されるような）を示すために用いられる。GGFHBS5クローンからの組換えヒトGGFをGGF2、rhGGF2およびGGF2HBS5ポリペプチドとよぶ。

ここで用いられる治療（treating）とは筋細胞の分裂促進、生存および/または分化を増大する、および/または筋肉の委縮および変性を減らす目的でここに記載された化合物のいかなる投与も意味する。もっとも好ましくは治療は筋細胞の疾患または障害の徴症または進行を減少または衰えさせるためである。またここで用いられる治療は健康な個体における筋細胞を増加するまたは変えるために化合物を投与することを意味する。治療は前記のように、ここに記載された化合物に感受性のあるまたは反応する筋細胞の有効量の化合物との接触により成し遂げられうる。ここに記載された化合物の阻害剤も筋細胞増殖の疾患を停止するまたは遅らせるためにも用いる。

#### 【図面の簡単な説明】

図面についてまず記載する。

#### 図面

図1は筋芽細胞の分裂促進アッセイにおけるrhGGF2の結果を示すグラフである。

図2は筋管中の核数に対するrhGGF2の効果を示すグラフである。

図3は分化された筋管の生存に対するrhGGF2の効果を示す生存アッセイのグラフである。

図4はヒト血小板由来成長因子、ヒト線維芽細胞成長因子、ヒト上皮成長因子、ヒト白血球阻害因子、およびヒトインシュリン様成長因子IおよびIIと比較した分化された筋管に対するrhGGF2の効果を示す生存アッセイのグラフである。

図5はrhGGF2の存在下デュシェーヌ型ジストロフィー細胞の増加した生存を示すグラフである。

図6はAchRデルタサブユニット転写コントロール要素のコントロール下hGH受容体遺伝子からのC2細胞におけるヒト成長ホルモン（hGH）発現の増加のグラフである。この増加は培地へのGGF2の添加に結びつく。

図7はC2細胞にGGF2の量を増加して添加したのちのhGH受容体合成およびAchRsへのバンガロトキシン（bungarotoxin）（BTX）の結合の増加のグラフである。

図8、9、10および11はGGF-IおよびGGF-II、配列番号1~20、22~29、32~50および165に由来するペプチド配列である（以下の実施例11~13参照）。

10

20

30

40

50

図 9、パネル A は変性オリゴヌクレオチドプローブを設計するために用いた G G F - I ペプチドの配列であり、変性 P C R プライマーを示す（配列番号 1、17 および 22 ~ 29）。パネル A の配列のうちいくつかは合成ペプチドを設計するためにも用いられた。パネル B は変性プローブまたは変性 P C R プライマーの設計のためには短すぎた（6 アミノ酸より少ない）新規なペプチド（配列番号 17 および 32）の表である；

図 11、パネル A に、変性オリゴヌクレオチドプローブおよび変性 P C R プライマーを設計するために用いられた G G F - II ペプチドの配列を列挙する（配列番号 42 ~ 49）。パネル A の配列のうちいくつかは合成ペプチドを設計するために用いられた。パネル B は変性プローブまたは変性 P C R プライマーの設計のためには短すぎた（6 アミノ酸より少ない）新規なペプチド（配列番号 50）を示す；

図 12、13 A、13 B、14、15、16、17、18、および 19 は後記の実施例 8 に関連し、本発明の因子の分裂促進活性を示す；

図 20、21、22、23、24、25、26、および 27 は後記の実施例 10 に関連し、以下に簡単に説明する；

図 20 は図 7、パネル A および図 9、パネル A の新規なペプチド配列から設計された変性オリゴヌクレオチドプローブ（配列番号 51 ~ 84）を列挙する；

図 21（配列番号 85）は組換えウシゲノムファージ G G F 2 B G 1 からの推定される（putative）一続きのウシ G G F - II 遺伝子配列を示し、これは変性オリゴヌクレオチドプローブ 609 および 650（図 18、それぞれ配列番号 66 および 69）の結合部位を含む。図は第 3 リーディングフレーム内の D N A 配列のコーディングストランドおよび推定された（deduced）アミノ酸配列である。因子 2 からのペプチド 12 の配列（ボールド（bold））は、66 アミノ酸のオープンリーディングフレーム（ヌクレオチド 75272）の一部である；

図 22 は変性 P C R プライマー（パネル A、配列番号 86 ~ 104）および下垂体前葉からの R N A 中に存在するウシ G G F - II をコードする配列のセグメントを単離するための実験において用いられた独自の P C R プライマー（パネル B、配列番号 105 ~ 115）を列挙する；

図 23 に、P C R 増幅実験でえられた 9 個の別個の隣接する（contiguous）ウシ G G F - II c D N A 構造および配列を示す。図の上に付した線は特徴付けがなされた c D N A 構造に寄与するコーディング配列の図解を示す；

図 24 は G G F 2 B G 1 のウシ組換えファージの物理的地図（physical map）である。ウシフラグメントはおおよそ 20 k b の長さでウシ G G F - II 遺伝子の 2 つのエクソン（ボールド）を含む。酵素 X b a 1、S p e 1、N d e 1、E c o R I、K p n 1、および S s t I に対する制限部位をこの物理的地図に記している。影を付した部分は配列決定のためにサブクローン化されたフラグメントに対応する；

図 25 は推定されるウシ G G F - II 遺伝子の 3 つの副遺伝子産物（alternative gene products）の構造を図式的に示す。エクソンは A から E までそれらの発見の順に列挙する。選択的スプライシングパターン 1、2 および 3 は、3 つのオーバーラップする推定されたタンパク質構造（G G F 2 B P P 1、2、および 3）をつくり、それらを種々の図 27 A、27 B、27 C（後記）に表わす；

図 26（配列番号 116 ~ 128）では、図 9 および図 11 に列挙された新規なペプチド配列をもつ、図 27 A、図 27 B および図 27 C に示す推定されたタンパク質の配列（後記）において同定される G G F - I および G G F - II 配列を比較する。図によって 9 つの新規な G G F - II ペプチド配列のうち 6 つがこれら推定されたタンパク質の配列に対することが示される。G G F - I 配列と類似の 2 つのペプチド配列もまた見出された；

図 27（配列番号 129）は図 25 のスプライシングパターン番号 1 からえられる c D N A のコーディングストランド D N A 配列および推定されたアミノ酸配列を示す。この推定されるウシ G G F - II 遺伝子の部分的な c D N A は、206 アミノ酸長のタンパク質をコードする。ボールドで示すペプチドは図 9 および図 11 に示すリストから同定されたものである。潜在的なグリコシル化部位に下線を付す（ポリアデニル化シグナル A A T A A A

10

20

30

40

50

に加えて) ;

図27(配列番号130)は図25におけるスプライシングパターン番号3からえられるcDNAのコーディングストランドDNA配列および推定されたアミノ酸配列を示す。この推定されるウシGGF-II遺伝子の部分的なcDNAは、257アミノ酸長のタンパク質をコードする。ボールドで示すペプチドは図9および図11におけるリストから同定されたものである。潜在的なグリコシル化部位に下線を付す(ポリアデニル化シグナルAATAAAに加えて) ;

図28は後記の実施例16に関連し、サザンプロット上での種々のホ乳動物DNAへの推定されるウシGGF-II遺伝子配列の交差ハイブリダイゼーション分析のオートラジオグラムを示す。フィルターは図に列挙する種からのEcoRIで消化されたDNA(レーンあたり5μg)のレーンを含む。図24中の物理的地図により予想されるようにウシDNA中の4kbフラグメントを含めて、プローブは各DNAサンプル中に強い単一バンドを検出する。比較的小さい強度のバンドもまた観察され、これらは関連するDNA配列を示しうる。他のホ乳動物DNAサンプルのそれぞれからの強くハイブリダイズするバンドは、おそらくはこれらの種のGGF-II相同物を示す。

10

図29は代表的なスプライシング変異体のダイアグラムである。コーディングセグメントはF、E、B、A、G、C、C/D、C/D、D、D、H、KおよびLで示される。精製されたタンパク質に由来したペプチド配列の位置を「」によって示す。

図30(配列番号136~143、156、157、169~178)は、GGFのコーディングセグメントのDNA配列および予測されるペプチド配列を示す。列1はウシGGFの予測されるアミノ酸配列を表わし、列2はウシGGFのヌクレオチド配列を表わし、列3はヒトGGF(ヘレグリン)のヌクレオチド配列を表わし(ヌクレオチドの塩基のマッチ(matches)を垂直線で示す)また列4はヒトGGF/ヘレグリンの予測されるアミノ酸配列を表わし、この配列は予測されるウシの配列とは異なる。コーディングセグメントE、AおよびKはウシの配列のみを示す。コーディングセグメントDはヒト(ヘレグリン)の配列のみを示す。

20

図31(配列番号144)は、BPP5の予測されるGGF2アミノ酸配列およびヌクレオチド配列である。上側の列はヌクレオチド配列を表わし、下側の列は予測されるアミノ酸配列を表わす。

図32(配列番号145)は、GGF2BPP2の予測されるアミノ酸配列およびヌクレオチド配列である。上側の列はヌクレオチド配列を表わし、下側の列は予測されるアミノ酸配列を表わす。

30

図33(配列番号146)は、GGF2BPP4の予測されるアミノ酸配列およびヌクレオチド配列である。上側の列はヌクレオチド配列を表わし、下側の列は予測されるアミノ酸配列を表わす。

図34(配列番号147~149)は、2つのGGFペプチド配列(GGF2BPP4およびGGF2BPP5)のヒトEGF(hEGF)とのアラインメントを記す。星印は保存されたシステインの位置を示す。

図35は、GGFの量の増加に応じたGGF活性(シュワン細胞分裂促進能アッセイ)および約200kDタンパク質のチロシンリン酸化(抗ホスホチロシンポリクローナル抗体とともに展開されたウェスタンプロットのオートラジオグラム上での200kDのバンドの強度)のレベルを記す。

40

図36は、図30に示す配列に由来するスプライシング変異体のリストである。

図37は、EGFL1の予測されるアミノ酸配列、下部、およびヌクレオチド配列、上部である(配列番号150)。

図38は、EGFL2の予測されるアミノ酸配列、下部、およびヌクレオチド配列、上部である(配列番号151)。

図39は、EGFL3の予測されるアミノ酸配列、下部、およびヌクレオチド配列、上部である(配列番号152)。

図40は、EGFL4の予測されるアミノ酸配列、下部、およびヌクレオチド配列、上部

50

である（配列番号 153）。

図 4 1 は、EGFL5 の予測されるアミノ酸配列、下部、およびヌクレオチド配列、上部である（配列番号 154）。

図 4 2 は、EGFL6 の予測されるアミノ酸配列、下部、およびヌクレオチド配列、上部である（配列番号 159）。

図 4 3 は、クローンのスケールコーディングセグメント地図である。T3 はクローンから mRNA をつくるために用いられたバクテリオファージプロモーターのことである。R = フランキングする EcoRI 制限酵素部位。5' UT は 5' 非翻訳領域のことである。E、B、A、C、C/D および D はコーディングセグメントのことである。O = 翻訳開始部位。 = ウシ E セグメントと相同な領域の 5' 限界（実施例 17 参照）また 3' UT は 3' 非翻訳領域のことである。

10

図 4 4 は、GGF2HBS5 の予測されるアミノ酸配列（中部）およびヌクレオチド配列（上部）である（配列番号 21）。下部（間欠（intermittent）配列）は、GGF-II 調製物に由来したペプチド配列を表わす（図 8、9 参照）。

図 4 5 (A) は分画による陽イオン交換カラム上の rGGF の精製を示すグラフである；図 4 5 (B) は (A) に示された画分と GGFII に特異的な抗体を用いたウェスタンブロットの写真である。

図 4 6 は GGFHBS5、GGFHFB1 および GGF BPP5 ポリペプチドの配列を示す（配列番号：166、167、および 168）。

図 4 7 は プラスミド pcDHRFPolyA の地図である。

20

#### 詳細な説明

本発明は、単離され精製されたニューレグリン因子およびこれらの因子をコードする DNA 配列、これらの因子の筋肉外濃度を増加する制御化合物、およびインビボおよびインビトロの筋細胞の生存、分化および筋細胞分裂促進を誘導するこれらの因子の擬態（mimetics）である化合物の使用に適している。GGF/p185<sup>erbB2</sup> と結合するニューレグリンタンパク質をコードする遺伝子は多数の可変的にサイズ化され（variably-sized）、特異的にスプライスされる（differentially-spliced）RNA 転写物を産生し、これらにより一連のタンパク質の増加（rise）が与えられるということは明らかである。これらのタンパク質は異なる長さのものであり、いくつかの共通のペプチド配列といくつかの独自のペプチド配列を含む。これらの因子が単一の遺伝子によってコードされるという結論は、

30

ウシ下垂体後葉およびヒト胸部癌細胞（MDA-MB-231）から回収可能な特異的にスプライシングされた RNA 配列によって支持される。この結論のさらなる支持は筋組織のための両分裂促進剤（ここに開示されたような）としておよび p185<sup>erbB2</sup> 受容体のリガンド（以下参照）として作用するタンパク質のサイズ範囲から導き出される。GGF/p185<sup>erbB2</sup> 結合タンパク質をコードする遺伝子は相同であるという事実を支持するさらなる証拠はヌクレオチド配列の比較からくる。Holmesら、（Science 256:1205-1210,1992）は受容体タンパク質 p185<sup>erbB2</sup> と特異的に相互に作用する 45 キロダルトンのヒトタンパク質（ヘレグリン - ）の精製を論証する。Pelesら（Cell 69:205（1992））および Wenら（Cell 69:559（1992））は「ニュー分化因子（neu differentiation factor）」（NDF）と呼ばれるタンパク質をコードするラット細胞から単離された相補

40

的 DNA を記載する。NDF cDNA の翻訳産物は p185<sup>erbB2</sup> 結合活性をもつ。いくつかのほかのグループが p185<sup>erbB2</sup> 結合活性をもつ種々の分子量のタンパク質の精製を報告している。これらのグループは Lupuら（（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2287）；Yarden および Peles（（1991）Biochemistry 30:3543）；Lupuら（（1990）Science 249:1552）；Dobashiら（（1991）Biochem. Biophys. Res. Comm. 179:1536）；および Huangら（（1992）J. Biol. Chem. 257:11508-11512）を含む。我々は p185<sup>erbB2</sup> 受容体結合タンパク質は筋細胞分裂促進を刺激し、したがって筋管形成（筋発生）を刺激することを見出した。この刺激により結果として筋芽細胞の形成の増大および筋管（筋発生）の形成の増大が起こる。ここに記載された化合物も筋肉の成長、分化、および筋細胞の生存の増大を刺激する。しかしながら、これらのリガンドは限定

50

されないが、GGFの(GGF's)ニューレグリン、ヘレグリン、NDF、およびARIAを含む。この分裂促進活性の結果として、これらのタンパク質、これらのタンパク質をコードするDNA、および関連化合物は筋組織の外傷性のダメージまたは疾患にかかっている患者に投与されうる。分裂促進の目的で提供されるすべての方法は筋発生のために有用であると理解される。これらのリガンド(たとえば抗体またはペプチドフラグメントなど)の阻害剤は筋肉に由来する腫瘍の治療のために投与されうる。

これらの化合物はここ(実施例9~17)におよびHolmesら、*Science* 256:1205(1992); Pelesら、*Cell* 69:205(1992); Wenら、*Cell* 69:559(1992); Lupuら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2287(1992); YardenおよびPeles、*Biochemistry* 30:3543(1991); Lupuら、*Science* 249:1552(1990); Dobashiら、*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179:1536(1991); Huangら、*J. Biol. Chem.* 257:11508-11512(1992); Marchionniら、*Nature* 362:313,(1993)に; およびここにリファレンスにより組込まれるすべてのGGF-III特許に記載されたプロトコルを用いてえることができる。これらの化合物の多くについて配列が提供され特徴が記載される。配列については図8~11、20~27C、29~34、36~44、および46を参照。タンパク質の特徴については図12~19、28 35、45Aおよび45Bを参照。

化合物は以下の実施例に提供された方法を用いてインビトロのそれらの有用性についてアッセイしうる。インビボの試験は実施例1およびSklarら、*In Vitro Cellular and Developmental Biology* 27A:433-434,1991に記載されたように行ないうる。

#### ほかの実施の態様

本発明は、筋肉の分裂促進を誘導するためのほかの天然に生じるGGFポリペプチドに加えて図30(配列番号132~143、156、1576~147、160、および161)のコーディングセグメントと実質的に相同なタンパク質のいずれかの使用のための方法をも包含する。また対立遺伝子のアレル変異体(allelic variations);天然の突然変異体(mutants);誘導された突然変異体;天然に生じる核酸と高いまたは低いストリンジェンシーコンディション(stringency conditions)の下、ハイブリダイズするDNAによってコードされるタンパク質(高いおよび低いストリンジェンシーの定義については、リファレンスによりここに組込まれる、*Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York, 1989, 6.3.1-6.3.6を参照)の使用; およびGGFポリペプチドに対する抗血清により特異的に結合されるポリペプチドまたはタンパク質の使用が包含される。用語はまた筋肉の分裂促進の誘導のために図28からの配列からなるGGFポリペプチドを含むキメラポリペプチドの使用も含む。

以下の、実施例8からわかるであろうように、本因子は細胞のタイプのある範囲に分裂促進活性を示す。製剤および/または医薬品またはそれらの製造に関連する先の本発明の一般的な記述は明確に適切な生産物および使用を包含するために組立てられるべきである。ここに記載される請求の範囲の追加の根拠を提供する一連の実験が続く。本発明に関連する以下の実施例は本発明を特定の限定されるように組立てられるべきではなく、また本発明のこのような変異は現在知られておりのちに開発される。

実施例は組換えヒトGGF2(rhGGF2)が第1代ヒト筋肉培養物に数種の効果を授与するという我々の発見を例証する。rhGGF2は筋肉培養物に対する3つの独立した生物学的活性アッセイにおける重大な効果をもつ。ポリペプチドはサブコンフルエントの静止した筋芽細胞の増殖により測定されるような分裂促進を増大し、成長因子の存在下コンフルエントの筋芽細胞により分化を増大し、染色除外の損失により測定されるような分化された筋管の生存を増大し、アセチルコリン受容体合成を増大した。これらの活性は、筋肉修復、再生、および筋肉変性に対する予防的効果を誘導する際のGGF2およびほかのニューレグリン類の有効性(efficacy)を示す。

#### 実施例1

##### 筋芽細胞に対するrhGGFの分裂促進活性

クローンGGF2HBS5を、実施例14に記載したごとく、組換えバクテリオファグ感染昆虫細胞で発現させ、得られた組換えヒトGGF2を培養(40μl/mlで添加した

10

20

30

40

50

ならし培地)中の筋芽細胞に添加した。筋芽細胞(057A細胞)を24ウェル・ディッシュ中で前密集まで増殖させた。培地を除去し、 $40\mu\text{l/ml}$ の濃度にて、GGF2ならし培地と共にあるいはそれ無くして、0.5%胎児ウシ血清を含有するDMEMで置き換えた。培地を2日後に交換し、細胞を固定し、5日後に染色した。合計核を、筋芽細胞における核数として計数した(表1)。

表 1

| 処 理                    | 核の合計数<br>/mm <sup>2</sup> | 筋 管 に<br>おける核 | 融合指標         |
|------------------------|---------------------------|---------------|--------------|
| 対 照                    | 395 ± 28.3                | 204 ± 9.19    | 0.515 ± 0.01 |
| GGF40 $\mu\text{l/ml}$ | 636 ± 8.5                 | 381 ± 82.7    | 0.591 ± 0.15 |

GGF処理した筋芽細胞は、分裂促進活性を示す未処理対照(395核)よりも増加した数の合計核(636核)を示した。rhGGF2処理した筋芽細胞は、未処理対照(204核)よりもかなり大きい数の核(381核)を有していた。かくして、rhGGF2は、増殖および細胞生存の増大を通じて、合計核数を増大させる。また、rhGGF2は筋管の形成も増強するようである。

rhGGF2の分裂促進活性は、浸透圧ミニポンプを介してGGF2および<sup>3</sup>Hチミジン<sup>20</sup>をラット筋肉に継続的に供給することによってin vivoで測定することができる。筋肉のバルクは、処理の1および2週間後の湿重量によって決定される。DNA複製は、ShamおよびrhGGF2-処理筋肉におけるオートラジオグラフィ(Sklar et al., In Vitro Cellular and Developmental Biology 27A:433-434, 1991)のためにコーティングした後にセクション中の標識核を計数することによって測定される。また、脱神経筋をこれらの方法を介してこのラット動物モデルで調べたが、この方法は、筋肉の萎縮および修復におけるrhGGF2の役割の評価を可能とする。また、平均線維径を、萎縮の防止に対するGGFの効果を評価するのに使用することができる。

#### 実施例 2

##### 筋細胞分裂促進に対するrhGGF2の効果

休止初代クローン・ヒト筋芽細胞は前記したごとくに調製した(Sklar, R., Hudson, A., Brown, R., In vitro Cellular and Developmental Biology 1991; 27A:433-434)。休止細胞を、DMEM中の $10\mu\text{M}$  BrdU、0.5%FCSの存在下で、示した試薬(rhGGF2ならし培地、メチルプレドニソロンを含むあるいは含まないPDGF、および対照培地)で処理した。2日後、細胞をPBS中の4%パラホルムアルデヒドで30分間固定し、70%エタノールで洗浄した。次いで、細胞を抗-BrdU抗体と共にインキュベートし、洗浄し、抗体結合をペルオキシダーゼ反応で可視化した。次いで、染色核の数を領域当たりにつき定量した。結果は、GGF2は対照よりも大きい、領域当たりの標識核の数の増大を誘導することを示す(表2参照)。<sup>30</sup>

表 2

## ヒト筋芽細胞に対する GGF の分裂促進効果

| 処 理              | 標識核/cm <sup>2</sup> | T-検定の<br>p 値 |
|------------------|---------------------|--------------|
| 対 照              | 120 ± 22.4          |              |
| 感染した対照           | 103 ± 11.9          |              |
| GGF 5 μl/ml      | 223 ± 33.8          | 0.019        |
| PDGF 20ng/ml     | 418 ± 45.8          | 0.0005       |
| IGFI 30ng/ml     | 280 ± 109.6         | 0.068        |
| メチルプレドニソロン1.0 μM | 142 ± 20.7          | 0.293        |

血小板由来成長因子 (PDGF) を陽性対照として用いた。また、rhGGF2 の他に、メチルプレドニソロン (コルチコステロイド) を用いたが、DNA の標識に有意な増加は示さなかった。

また、均質 (>95% 純度) まで精製した rhGGF2 は、ヒト筋芽細胞に対して分裂促進を示す (図1)。

また、組換えヒトGGF2 は、初代ヒト筋芽細胞の分裂促進を引き起こす (表2 および図1 参照)。分裂促進アッセイは前記したごとくに行う。次いで、BrdU 陽性細胞の数を細胞の合計数で割ることによって有糸分裂指標が計算される。

実施例 3筋細胞分化に対する rhGGF2 の効果

筋肉培養分化に対する精製 rhGGF2 (95% 純度) の効果を調査した (図2)。培地の血清含量を 20% から 0.5% まで低下させることによって、密集筋芽細胞培養を誘導して分化させた。テスト培養を、6日間、示した濃度の rhGGF2 で処理し、培地を2日毎に新鮮なものとした。次いで、培養を固定し、染色し、核の数を1ミリリットル当たりで計数した。図2におけるデータは、対照に対する、rhGGF2 が存在した場合における、筋管中の核数の大きな増加を示す。

実施例 4分化した筋管の生存に対する rhGGF2 の効果

分化した筋管の生存は、rhGGF2 処理によって有意に増加した。筋肉培養を rhGGF2 の存在下で分化させ、種々の時間において、死んだ筋管の数をヨウ化プロピジウム染色法によって計数した。図3から分かるように、死んだ筋管の数は、分化4、5、6および8日において、rhGGF2 処理培養ではより低かった。筋管における核の数は、分化8日後、非処理培養と比較して、GGF2 処理によって有意に増加した。特に、ギムザ染色の後に同一プレートで計数した場合、対照は 8.6 筋核/mm<sup>2</sup>を示したのに対し、rhGGF2 処理培養は 57.2 筋核/mm<sup>2</sup> (P = 0.035) を示した。

また、筋肉培養に対して公知の効果を有する他の成長因子で生存アッセイを行った。rhGGF2 効果は、テストした成長因子の中でユニークであった (図4)。この実験において、種々の成長因子の示した濃度にて、培養を、rhGGF2 処理プレートと平行して処理した。筋管の生存は、057A 筋芽細胞の分化8日後において前記したごとくに測定した。因子の濃度は以下の通りであった：

rhGGF2 : 100 ng/ml ; ヒト血小板由来成長因子 ; 20 ng/ml ; ヒト塩基性線維芽細胞成長因子 : 25 ng/ml ; ヒト上皮成長因子 : 30 ng/ml ; ヒト白血球阻害因子 : 10 ng/ml ; ヒト・インスリン様成長因子 I : 30 ng/ml ; ヒト・インスリン様成長因子 II : 25 ng/ml 。

分化した筋管の死滅からの観察された保護は、多数の筋疾患によって特徴付けられる筋肉

10

20

30

40

50

の変性の関与に対する治療として希望が持てるものである。かくして、ニューレグリンの筋肉外濃度を増大させる薬剤は予防効果を有し得るか、あるいは筋肉消耗性障害の進行を遅延させ、および筋肉の分化、修復、コンディショニング、および再生の速度を増大させる。

#### 実施例 5

r h G G F 2 は、Duchenne型筋ジストロフィー遺伝子座における遺伝欠陥を持つ分化筋管の生存を促進する

筋管生存に対する r h G G F 2 の陽性効果は、変性障害における可能な効力を反映し得た。筋管生存に対するこれらの効果を、クローン化に由来する初代デュシェーヌ (Duchenne) 型筋芽細胞についてテストして、正常な筋肉培養で観察される応答が疾患に対する個体に由来する培養でも示され得るか否かを判断した。図 5 に示すデータは、正常個体で用いる同一筋肉培養条件 (前記実施例 4) を用いて得られた。r h G G F 2 は、対照と比較して、分化した Duchenne 型筋肉培養において、死滅した筋管の数を有意に低下させた ( $p = 0.032$ )。濃度は以下の通りであった: G G F 2 :  $100 \text{ ng/ml}$ ; ヒト血小板由来成長因子:  $20 \text{ ng/ml}$ ; ヒト・インスリン様成長因子 I :  $30 \text{ ng/ml}$ 。

本実施例は、r h G G F 2 は分化した Duchenne 型筋管の生存も促進し、r h G G F 2 は哺乳動物における筋肉の変性および消耗の進行を遅延しもしくは防止し得るといふ強力な証拠を提供する。

#### 実施例 6

分化プログラムに対する r h G G F 2 効果: M H C slow およびジストロフィンタンパク質の誘導

培養溶解物のウェスタン分析によって、筋肉培養分化に対する精製 r h G G F 2 の効果も調べた。筋特異的タンパク質のレベルを、三連処理および未処理培養で測定した。これらの培養を調製し、プレートのサイズを  $150 \text{ mm}$  まで増大し、筋肉培養層を Sklar, R., および Brown, R. (J. Neurol. Sci. 101:73-81, 1991) に記載されているごとくにウェスタン分析用に掻き落とした以外は前記したごとくに処理し、テストした。表 A に提示する結果は、r h G G F 2 処理が、ジストロフィン、ミオシン重鎖 (M H C、成人スロー (slow) およびファスト (fast) アイソフォーム) を含めたいくつかの筋肉特異的タンパク質のレベルを増大させるが、H S P 7 2 または M H C ネオネイト (neonate) アイソフォームのレベルを、ウェスタンに負荷したタンパク質の量当たり同様のレベルまでは増大させないことを示す。r h G G F 2 によって誘導された筋肉特異的タンパク質のレベルは、筋核 /  $\text{mm}^2$  の数の定量的増加と同様であった (表 3)。

10

20

30

表 3

対照 ± SD rhGGF2 処理 - p 値

平均 ± SD

|                                    |             |             |       |
|------------------------------------|-------------|-------------|-------|
| 合計タンパク質 ( $\mu\text{g}$ )          | 554 ± 38.4  | 798 ± 73.6  | 0.007 |
| 筋核 / $\text{mm}^2$                 | 29.0 ± 12.2 | 106 ± 24.1  | 0.008 |
| MHC ファスト<br>/ $\mu\text{g}$ タンパク質  | 1.22 ± 0.47 | 4.00 ± 0.40 | 0.001 |
| MHC スロー<br>/ $\mu\text{g}$ タンパク質   | 0.17 ± 0.13 | 1.66 ± 0.27 | 0.001 |
| MHC ネオネイト<br>/ $\mu\text{g}$ タンパク質 | 0.30 ± 0.27 | 0.55 ± 0.04 | 0.199 |
| ジストロフィン<br>/ $\mu\text{g}$ タンパク質   | 6.67 ± 0.37 | 25.5 ± 11.0 | 0.042 |
| HSP 72 / $\mu\text{g}$ タンパク質       | 3.30 ± 0.42 | 4.54 ± 0.08 | 0.008 |

成人ミオシン重鎖アイソフォーム（スローはタイプ I ヒト筋線維で見出され；ファストはタイプ 2 A および 2 B ヒト筋線維で見出される）における rhGGF2 依存性増加は、ネオネイタル（neonatal）アイソフォームが rhGGF2 処理によって有意に増加されなかったため、筋管の成熟を表すであろう。ラット筋の発生の間に、MHC アイソフォームはフェイタル（fatal）形態からネオネイタルアイソフォームにスイッチし、続いて、成熟成人スローおよびファスト MHC アイソフォームにスイッチする（Periasamy et al. J. Biol. Chem. 259:13573-13578, 1984; Periasamy et al., J. Biol. Chem. 260:15856-15862, 1985; Wieczorek et al. J. Cell Biol. 101:618-629, 1985）。筋肉は、神経細胞もしくは組織の不存在下で、これらのアイソフォームの変換のうちのいくつかを自律的に受け得るが、マウス筋外植体はマウス脊髄の存在下で培養した場合のみ成人ファスト MHC アイソフォームを発現する（Ecob-Prince et al. J. Cell Biol. 103:995-1005, 1986）。MHC アイソフォーム変換が神経によって影響されるというさらなる証拠が Whalen et al. (Deve. Biol. 141:24-40, 1990) によって確立され；ノテキシン処理ラットヒウメ筋の再生の後、成人ファスト MHC アイソフォームの変換が新しい脱神経筋で産生されたが、神経支配再生筋はファストおよびスロー成人 MHC アイソフォームを共に産生した。かくして、rhGGF2 は成人 MHC アイソフォームの合成を増加させるという表 3 における証拠は、rhGGF2 が、ニューロン神経支配を模擬し得る筋肉の発生的成熟を誘導し得ることを示す。

#### 実施例 7

rhGGF2 を含めたニューレグリンは筋肉におけるアセチルコリン受容体の合成を誘導する

アセチルコリン受容体（AChR）サブユニットタンパク質の発現は筋細胞をニューレグリンに暴露することによって誘導できる。より詳しくは、本発明者らは、筋細胞を rhGGF2 と接触させることは AChR サブユニットタンパク質の合成を誘導できることを示した。rhGGF2 暴露に続くこの誘導は、2つの方法で観察された：まず、本発明者らは、レポーター遺伝子構築物の産物を介してヒト成長ホルモンの発現の増加を検出し、第 2 に、本発明者らは、アルファ - プンガロトキシンの細胞への結合の増加を検出した。以下の例では、マウス筋芽細胞系 C2 を用いた。C2 細胞は、ヒト成長ホルモン全長 cDNA に連結したマウスの AChR デルタサブユニット遺伝子の 5' 調節配列を含有するトランスジーンでトランスフェクトした（Baldwin and Burden, 1988. J. Cell Biol. 107: 2271-2279）。このレポーター構築物は、培地に分泌された成長ホルモンの量をアッセイ

10

20

30

40

50

することによってAChRデルタ遺伝子の発現の誘導の測定を可能とする。該系は、培地中の血清濃度を20%から0.5%に低下させることによって誘導して筋管を形成することができる。

特に、AChR-ヒト成長ホルモンレポーター構築物でトランスフェクトしたマウスC2筋芽細胞を、rhGGF2での処理に続くhGHの発現につきアッセイした。2つの別々の実験の結果を表4ならびに図6(hGH発現)および7(hGH発現およびアルファ-ブンガロトキシン結合)にまとめる。示したのは、分泌されたヒト成長ホルモンについての、およびrhGGF2で処理した筋肉培養からのブンガロトキシン結合についての、用量応答曲線である。

表 4

AChR デルタサブユニット/hGH トランスジーンの  
発現およびAChRの合成に対するrhGGF2の効果

| 実験 1        |                | 実験 2           |                       |
|-------------|----------------|----------------|-----------------------|
| GGF<br>(ul) | hGH<br>(ng/ml) | hGH<br>(ng/ml) | AChR<br>(cpm/mgタンパク質) |
| 0           | 9.3 + 2.1      | 5.7 + 2.1      | 822 + 170             |
| 0.1         | —              | 6.8 + 1.5      | 891 + 134             |
| 0.5         | —              | 12.0 + 0.9     | 993 + 35              |
| 1.0         | —              | 9.7 + 2.3      | 818 + 67              |
| 5.0         | 17.5 + 2.8     | 14.7 + 3.5     | 1300 + 177            |
| 10.0        | 14.3 + 3.2     | 14.1 + 3.3     | 1388 + 137            |
| 15.0        | 22.0 + 1.4     | —              | —                     |

C2筋管を37℃にて1時間、冷した - BTX (20 nM) で処理し、培地で2回洗浄し、次いで、GGF2で処理した。培地を1 mg/mlの濃度のウシ血清アルブミンで調整した。24時間後、培地を取り出し、hGHアッセイのために保存した。37℃にて、筋肉培養を<sup>125</sup>I - BTX (20 nM) で1時間処理し、洗浄し、1% SDSを含有するPBS中に掻き入れた。非特異的結合は冷した - BTX (40 nM) の存在下で測定した。細胞ホモジネートを放射能につき計数し、合計タンパク質量についてアッセイした。

rhGGF2の存在は、hGH遺伝子発現の増加を2倍以上に導き、それにより、rhGGF2はアセチルコリン受容体のデルタサブユニットの合成を誘導したことが示される。さらに、増大したブンガロトキシン結合は、これらのサブユニットタンパク質の機能的アセチルコリン受容体への取込みと一致する。これらのデータの解釈を補強するために、rhGGF2に反応するはずのない、メタロチエン・プロモーターに連結されたhGHレポーターを有する培養で、分析を繰り返した。その対照実験の結果は、hGH応答はAChRデルタサブユニット遺伝子対照エレメントの転写活性化を通じて媒介されることを示した。

これらの結果は、rhGGF2が、自己免疫疾患重症筋無力症のための治療の一部としてAChRsを補給するのに有用であり得ることを示す。また、この活性は、筋肉の再神経

10

20

30

40

50

支配の鍵となる工程を刺激することによって末梢神経再生およびニューロパシーの治療に有用であり得る。

#### 実施例 8

##### 精製された G G F - I および G G F - II のさらなる分裂促進活性

単一のコクロ培養を DNA 合成、細胞形態学、細胞数および細胞抗原の発現について調査されるのを可能とする定量的方法を用いて、G G F I および II を共に含有する高度に精製された試料の分裂促進活性を実験した。この技術は Muir et al., (Analytical Biochemistry 185, 377-382, 1990) によって従前に報告されている方法を改変した。主な改変は、1) 未被覆マイクロタイタープレートの使用、2) ウェル当たりの細胞数、3) 10% 子ウシ血清 (FCS) の代わりに 5% 子ウシ血漿 (FBP) の使用、および 4) 同時に培養に添加した、分裂促進剤およびプロモデオキシウリジン (BrdU) の存在下におけるインキュベーション時間である。加えて、固定前に細胞単層を洗浄しないで、細胞の喪失を回避し、マウス抗-BrdUモノクローナル抗体およびペルオキシダーゼ結合ヤギ抗-マウス免疫グロブリン (IgG) 抗体のインキュベーション時間を2倍にしてアッセイの感度を増大させた。細胞培養条件に対して適当な改変を加えた後、ラット坐骨神経シュワン細胞について最適化したアッセイもいくつかの細胞系で用いた。

10

##### I. 分裂促進テストの方法

第1日目に、精製したシュワン細胞を、5% FBP / ダルベッコの改良イーグル培地 (DMEM) (5,000細胞/ウェル) 中の未被覆96ウェルプレートに平板培養した。第2日目に、G G F または他のテスト因子、ならびに最終濃度 10  $\mu$ m の BrdU を培養に添加した。48時間後(第4日)に、培地にアスピレーターをかけることによって BrdU の取込みを停止させ、室温にて70%エタノールの200  $\mu$ l / ウェルで20分間細胞を固定した。次に、細胞を水で洗浄し、37  $^{\circ}$ C にて2N HCl 100  $\mu$ l で10分間インキュベートすることによってDNAを変性させた。アスピレーションに続き、ウェルに0.1Mホウ酸緩衝液(pH9.0)を満たすことによって残存する酸を中和し、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄した。次いで、細胞を50  $\mu$ l のブロッキング緩衝液(0.1%トリトンX-100および2%正常ヤギ血清を含有するPBS)で37  $^{\circ}$ C にて15分間処理した。アスピレーションの後、マウス抗-BrdUモノクローナル抗体(Dako Corp., Santa Barbara, CA) (50  $\mu$ l / ウェル、ブロッキング緩衝液に希釈した1.4  $\mu$ g / ml) を添加し、37  $^{\circ}$ C で2時間インキュベートした。0.1%トリトンX-100を含有するPBS中で3回洗浄することによって未結合抗体を除去し、ペルオキシダーゼ-結合ヤギ抗-マウスIgG抗体(Dako Corp., Santa Barbara, CA) (50  $\mu$ l / ウェル、ブロッキング緩衝液に希釈した2  $\mu$ g / ml) を添加し、37  $^{\circ}$ C で1時間インキュベートした。PBS / トリトン中で3回洗浄し、PBS中で最後に濯いだ後、0.05%可溶性クロモゲン o - フェニレンジアミン(OPD)および0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含有する50mMリン酸/クエン酸緩衝液(pH5.0)の100  $\mu$ l / ウェルをウェルに与えた。各ウェルからの80  $\mu$ l を、2N硫酸の40  $\mu$ l / ウェルを含有する清浄なプレートにピペットで加えることによって、室温にて5~20分後に反応を停止させた。プレートリーダー(Dynatech Labs)を用い、490nmで吸光度を記録した。細胞単層を含有するアッセイプレートをPBSで2回洗浄し、基質ジアミノベンジジン(DAB)の100  $\mu$ l / ウェルおよび0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加して不溶性生成物を生じさせることによってBrdU-DNAについて免疫細胞化学的に染色した。10~20分後、水で洗浄することによって染色反応を停止させ、倒立顕微鏡を用いてBrdU-陽性核を観察し、計数した。場合によっては、陰性核が0.001%トルイジンブルーでカウンター染色され、前記したごとくに計数した。

20

30

40

##### II. 分裂促進アッセイで用いた細胞系

スイス(Swiss)3T3線維芽細胞: 空気中10%CO<sub>2</sub>の湿潤雰囲気中、37  $^{\circ}$ C にて、フロー・ラブズ(Flow Labs)からの細胞を、10%FCS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを補足したDMEM中で維持した。細胞に栄養を与え、2日毎に継代培養した。分裂促進アッセイのために、完全培地中5,000細胞/ウェルの密度にて細胞を平

50

板培養し、細胞が密集し休止するまで1週間インキュベートした。血清含有培地を取り出し、細胞単層を無血清培地で2回洗浄した。分裂促進剤および $10\ \mu\text{M}$ のBrdUを含有する無血清培地 $100\ \mu\text{l}$ を各ウェルに添加し、48時間インキュベートした。GGFおよび血清またはPDGF(陽性対照として)に対する用量応答を行った。

BHK(ベビーハムスター腎臓)21 C13線維芽細胞:空气中 $5\% \text{CO}_2$ の湿潤雰囲気中、 $37^\circ\text{C}$ にて、 $25\%$ トリプトゼホスフェートブロス、 $5\%$  FCS、ペンシリンおよびストレプトマイシンを補足したグラスゴウ改良イーグル培地(GMEM)中で、ユーロピーアン・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャーズ(European Collection of Animal Cell Cultures)(ECCACC)からの細胞を維持した。細胞に栄養を与えるか、あるいは2日ないし3日毎に継代培養した。分裂促進アッセイのために、完全培地中 $2,000$ 細胞/ウェルの密度で細胞を24時間平板培養した。次いで、血清含有培地を取り出し、無血清培地で洗浄した後、 $0.1\%$  FCS含有GMEMまたはGMEM単独 $100\ \mu\text{l}$ で置き換えた。GGFおよびFCSまたはbFGF(陽性対照として)を添加し、 $10\ \mu\text{M}$  BrdUと一致させ、48時間インキュベートした。次いで、細胞培養をシュワン細胞について前記したごとく加工した。

C6ラット膠腫細胞系:空气中 $10\% \text{CO}_2$ の湿潤雰囲気中、 $37^\circ\text{C}$ にて、 $5\%$  FCS、 $5\%$ ウマ血清(HS)、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有するDMEM中で、39継代で得られた細胞を維持した。細胞に栄養を与えるか、あるいは3日毎に継代培養した。分裂促進アッセイのために、完全培地中 $2,000$ 細胞/ウェルの密度で細胞を平板培養し、24時間インキュベートした。次いで、無血清培地中で洗浄した後、 $1:1$ のDMEMおよび $0.1\%$  FCS含有F12培地の混合物で置き換えた。次いで、GGF、FCSおよびFCFに対する用量応答を行い、他の細胞型について前記したごとくに細胞をELISA法により加工した。

PC12(ラット副腎クロム親和性細胞腫細胞):空气中 $5\% \text{CO}_2$ の湿潤雰囲気中、 $37^\circ\text{C}$ にて、コラーゲン被覆フラスコ中、 $10\%$  HS、 $5\%$  FCS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを補足したRPMI 1640中で、ECCACCからの細胞を維持した。培地の $80\%$ を置き換えることによって、3日毎に細胞を栄養を与えた。コラーゲン被覆プレート( $50\ \mu\text{l}$ /ウェルコラーゲン、Vitrogen Collagen Corp.、 $1:50$ 希釈、 $37^\circ\text{C}$ で30分間)上、完全培地中 $3,000$ 細胞/ウェルの密度にて細胞を平板培養し、24時間インキュベートした。次いで、新鮮なRPMI単独または $1\ \text{mM}$ インスリンもしくは $1\%$  FCSを含有する新鮮なRPMIで培地を置き換えた。陽性対照としてのFCS/HS( $1:2$ )に対するおよびGGFに対する用量応答を前記したごとくに行った。48時間後、細胞を固定し、前記したごとくELISA法を行った。

### III. 分裂促進アッセイの結果

本実施例に示したすべての実験は、GGF-IおよびGGF-II(GGFs)の混合物を含有するセファロース12クロマトグラフィー精製工程からの高度に精製した試料を用いて行った。

まず、BrdU取込みアッセイで得られた結果を、J. P. Brockes(Methods Enzymol. 147:217, 1987)によって記載されている、分裂細胞のDNAへの $[125]\text{I}$ -UdR取込みに基づいてシュワン細胞についての古典的分裂促進アッセイと比較した。

図12は、同一細胞培養条件( $5,000$ 細胞/ウェル、 $5\%$  FBP/DMEM中、GGFの存在下で48時間インキュベート)で行った、2つのアッセイで得られたデータの比較を示す。明らかに示されるごとく、結果は同等であるが、グラフの左側、すなわちGGFの低濃度への曲線のシフトによって示されるごとく、BrdU取込みアッセイは、わずかにより感度が良好のようである。

「分裂促進テスト方法」のセクションで述べたごとく、OPDペルオキシダーゼ反応の可溶性生成物の強度を読むことによって免疫反応性BrdU-DNAを定量した後、細胞単層を含有するオリジナルのアッセイプレートは第2の反応を受けて不溶性DAB生成物が生じ、これはBrdU陽性核を染色する。次いで、マイクロ培養を倒立顕微鏡で調査でき、細胞の形態学およびBrdU-陽性および陰性核の数を観察できる。

10

20

30

40

50

図13Aおよび図13Bにおいて、490nmにおける吸光度を読むことによって評価したBrdU-DNA免疫反応性を、同一培養で計数した、BrdU-陽性核の数に対して、ウェル当たりの細胞の合計数に対するBrdU-陽性核のパーセンテージに対して比較する。標準偏差は10%未満であった。2つの評価方法は非常に良好な相関を示し、最高用量のGGFにおける値間の矛盾は、BrdU-陽性として検出された細胞におけるDNA合成の異なる程度によって説明できる。

従って、BrdU取込みアッセイは、(125)I-UdR取込みアッセイと比較した場合、シュワン細胞上のポリペプチドの生物学的活性についてのさらなる有用な情報を提供できる。例えば、図15に報告するデータは、GGFはシュワン細胞に作用してDNA合成を誘導できるが、より低用量では、48時間後にミクロ培養中に存在する陰性細胞の数を増加させることができることを示す。

10

該アッセイを異なる起源のいくつかの細胞系に用いた。図15において、GGFに対するシュワン細胞およびSwiss 3T3線維芽細胞の分裂促進応答を比較した；3T3線維芽細胞で得られた弱い応答にも拘わらず、いくつかの明瞭にBrdU-陽性の核がこれらの培養で検出された。FCSまたはヒト組換えPDGFのいくつかの用量の存在下で、対照培養を平行して行い、細胞は適当な刺激に対して応答し得ることが示された(図示せず)。

BHK21 C13細胞系を用いて、GGFに反応する線維芽細胞の能力をさらに調べた。腎臓由来のこれらの線維芽細胞は接触阻止を示さないか、あるいは密集した場合には休止状態に達する。従って、細胞活性を危うくすることなく非常に低いバックグラウンド増殖を有するように実験条件を設計した。図16および図17によって示されるごとく、GGFは、BHK21 C13細胞に対する有意な分裂促進活性を有する。図16は、0.1%FCSの存在下でGGFによって刺激されたBHK21 C13細胞によるBrdUのDNAへの取込みを示す。FCSに対する良好な分裂促進応答は、細胞培養条件が限定的でないことを示す。図17において、GGFの分裂促進効果は、ウェル当たりの、BrdU-陽性およびBrdU-陰性の数として、および計数した細胞の合計数として表す。

20

データは、二連で行った2つの実験の代表であり；ウェル当たり少なくとも3つのフィールドを計数した。低用量における増殖効果に加えてシュワン細胞で観察されたごとく、GGFはまた非応答性細胞の生存数を増加させる。BrdU陽性細胞のパーセンテージは培地に添加したGGFの増加する量に比例する。高濃度のGGFの存在下における48時間後における細胞の合計数は少なくとも2倍となり、GGFはBHK21 C13細胞でDNA合成および増殖を誘導することが確認される。同一条件下、2%FCSの存在下で48時間維持した細胞は約6倍の増加を示した(図示せず)。

30

C6膠腫細胞は、グリア細胞特性を研究する有用なモデルを提供した。発現された表現型は、細胞の継代に依存するらしく、細胞は初期段階における星状膠細胞の表現型、および後の段階における(継代70を超える)稀突起膠細胞の表現型によく似ている。これらの実験で用いたC6細胞は継代39ないし継代52のものであった。C6細胞は高度に増殖性の集団であり、従って、BrdU取込みの非常に低いバックグラウンドを有するように実験条件を最適化した。FCSに対する用量応答によって示されるごとく(図18)、分裂促進応答に有意に影響することなく、細胞活性を維持するのに0.1%の血清の存在が必要であった。

40

図19において、aFGF(酸性線維芽細胞成長因子)およびGGFに対する分裂促進応答は、FCS(8%)の存在下で得られた最大BrdU取込みのパーセンテージとして表す。値は、二連で行った2つの実験の平均である。GGFの効果はaFGFの純粋な調製物のそれに匹敵するものであった。aFGFはC6細胞に特異的な成長因子として記載され(Lim R. et al., Cell Regulation 1:741-746,1990)、その理由で、それは陽性対照として用いられた。BrdU陽性および陰性細胞の直接計数は、ミクロ培養における高細胞密度のため可能ではなかった。これまで報告した細胞系とは対照的に、PC12細胞は、PC12が血清(細胞の維持にルーチン的に使用されるFCSまたはHSの混合物)に反応できる培養条件下で処理する場合、GGFに対するいずれの明らかな反応性も示さなかった。それにも拘わらず、ウェル当たりの平板培養した細胞の数はPC12細胞の挙

50

動に影響を与えるらしく、従って、さらなる実験が必要である。

#### 実施例 9

##### 精製した G G F - I および G G F - II のアミノ酸配列

アミノ酸配列分析実験は、高度に精製したウシ下垂体 G G F - I および G G F - II を用いて行った。配列を記載するのに通常の一文字コードを用いた。ペプチドは、11% SDS - PAGE の 55 - 65 RD 領域から流出 (前記したマーカーに対する MW) した物質について行った G G F - II のリシルエンドペプチダーゼ消化を用い、還元シカルボキシメチル化した試料につき行った、リシルエンドペプチダーゼおよびプロテアーゼ V 8 消化によって得られた。

合計 21 のペプチド配列 (図 8、配列番号 1 ~ 20、165 参照) が G G F - I につき得られ、そのうち 12 のペプチド (図 9、配列番号 1、22 ~ 29、17、19 および 32 参照) が現在のタンパク質データベースには存在せず、従って、ユニークな配列を表す。合計 12 のペプチド配列 (図 10、配列番号 42 ~ 50 および 161 - 163) が G G F - II について得られ、そのうち 10 のペプチド (図 11、配列番号 42 ~ 50) が現在のタンパク質データベースに存在せず、従って、ユニークな配列を表す (例外は、少数の残基であれば恐らくは重要でない多くのタンパク質において同一の配列を示すペプチド G G F - II 06 である)。これらの新規な配列は、G G F I および II の真実のアミノ酸配列の一部に極めて対応しているようである。

明らかに高度に関連する、G G F - I 07 および G G F - II 12 の配列に特別の注意を払うことができる。類似性は、これらのペプチドの配列は、ほとんど確かに割り当てられた G G F 種のものであり、汚染タンパク質に由来するものではほとんどないようであることを示す。

加えて、ペプチド G G F - II 02 において、配列 X S S は、X で示される位置のアスパラギン上の N 結合カルボヒドレート残基の存在と合致する。

一般に、図 8 および 10 において、X は未知の残基を表し、これは、配列決定サイクルには同等のサイズの 1 を超えるシグナルがあるか、あるいはシグナルが存在しないので、単一の位置が確実性を持って呼ばれない配列決定サイクルを示す。星印は、最後であると考えられるアミノ酸がそのペプチドに存在する最後のアミノ酸であるペプチドを示す。残りのペプチドにおいて、最後であると考えられるアミノ酸の後のシグナル強度は、配列の命名をそのペプチド末端まで継続するのに不十分であった。右側のカラムは、N B R F および E M B L 配列データベースを分析するための G C G パッケージ F A S T A および T F A S T A プログラムを用いたコンピューターデータベースサーチの結果を示す。このカラムにおけるタンパク質の名称は、その配列の一部の、最大 2 つのミスマッチを可能とすると考えられるペプチドアミノ酸配列との同一性を示す。疑問符は 3 つの可能なミスマッチを示す。用いた略字は以下の通りである。

|            |                    |
|------------|--------------------|
| H M G - 1  | 高移動性群タンパク質 - 1     |
| H M G - 2  | 高移動性群タンパク質 - 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  |

#### 実施例 10

##### G G F - I および G G F - II ペプチドを含有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列の単離およびクローニング

G G F - II ヌクレオチド配列の単離およびクローニングは、ペプチド配列情報およびライブラリースクリーニングを用い、ここに概略を述べるごとく行い、また、後記するごとくに行った。図 10 および 11 のペプチドは、G G F - I 配列の単離およびクローニング、続いてのここに記載する技術についての出発点として用いることができるのが認識されよう。事実、図 20、配列番号 51 ~ 84 は、この目的のための可能な変性オリゴヌクレオチドプローブを示し、図 22、配列番号 86 ~ 115 は、可能な PCR プライマーをリストする。DNA 配列およびポリペプチド配列は G G F - II に関しこの手段によって得られるはずであり、また、DNA 構築物およびかかる DNA 配列を一体化させる発現ベクター

10

20

30

40

50

、かかる構築物／ベクターを一体化させることによって遺伝的に改変された宿主細胞、およびかかる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様である。本発明はかかる主題にも関する。

### I. オリゴヌクレオチドプローブおよびプライマーの設計および合成

変性DNAオリゴマープローブは、(精製GGFタンパク質から生成したペプチドに由来する)アミノ酸配列をヌクレオチド配列に逆翻訳することによって設計した。オリゴマーは、DNA配列のコーディング鎖または非コーディング鎖いずれかを表す。セリン、アルギニンまたはロイシンがオリゴマー設計に含まれる場合、2つの別々の合成物を調製して不明確さを回避した。例えば、セリンは537および538または609および610におけるごとくTCNまたはAGYによってコードされた。同様のコドン分裂がアルギニンまたはロイシンでなされている(例えば、544、545)。DNAオリゴマーは、0.2マクイロモル規模の合成で働く - シアノエチル化学を用い、バイオサーチ(Biosearch) 8750 4 - カラムで合成した。オリゴマーをカラム(500オングストロームCpG樹脂)から切断し、55~60 で6~24時間濃水酸化アンモニウム中で脱保護した。脱保護オリゴマーを真空下(Speedvac)で乾燥し、15%アクリルアミド(20モノ:1ビス)のゲル、7M尿素を含有する50mMトリス-E D T A緩衝液にての電気泳動によって精製した。UVシャドウイングによって、ゲル中にて全長オリゴマーを検出し、次いで、バンドを切り出し、振とうしつつ4~16時間、DNAオリゴマーを1.5mlずつの水に溶出させた。溶出物を乾燥し、0.1mlの水に再溶解させ、吸光度測定を260nmで行った。

10

20

濃度は以下の式に従って求めた。

$(A_{260} \times \text{ユニット} / \text{ml}) (60.6 / \text{長さ} = x \mu\text{M})$

すべてのオリゴマーを水の添加によって50 $\mu\text{M}$ 濃度に調整した。

前記のごとく設計した変性プローブを図20、配列番号54~88に示す。

PCRプライマーは、以下の改変を施した、プローブで用いたものと実質的に同一の方法によって調製した。制限部位を含有する13のヌクレオチドのリンカーを、ベクターにクローニングするのに用いるため縮重オリゴマーの5'末端に含ませた。DNA合成は、1,000オングストロームCpG樹脂を用いて1マイクロモルの規模で行い、すべての4種のヌクレオチドが通常は縮重プローブに一体化される位置でイノシンを用いた。PCRプライマーの精製は、ゲル電気泳動精製に続いてのエタノール沈殿を含むものであった。

30

### II. ライブラリー構築およびスクリーニング

ウシゲノムDNAライブラリーはStratagene(カタログ番号:945701)から購入した。該ライブラリーはベクターラムダDasHIIにクローン化した $2 \times 10^6$  15~20kb S a u 3 A 1部分ウシDNA断片を含有するものであった。ウシ全脳cDNAライブラリーはClontech(カタログ番号:BL10139)から購入した。相補DNAライブラリーは、ウシ全脳、ウシ下垂体およびウシ下垂体後葉から調製したmRNAから構築した(ヴァイトロジェン(Vitrogen)中:ストラタジーン(Stratagene))。Vitrogen調製した2つのcDNAライブラリーにおいて;1のライブラリーはベクターラムダg10におけるものであり、他のライブラリーはベクターpcDNAIにおけるものであった(プラスミドライブラリー)。ストラタジーン(Stratagene)ライブラリーはベクターラムダ ユニザップ(unizap)にて調製した。集合的に、cDNAライブラリーは1400万の一次組換えファージを含有するものであった。

40

プレート当たり150,000ないし200,000ファージブランクにて、ウシゲノムライブラリーを23x23cmのプレート(Nunc)上の大腸菌K12宿主株LE392に平板培養した。各プレートは、約1のウシゲノム当量を示した。37 における一晩のインキュベーションの後、該プレートを冷却し、Maniatis et al.(2:60-81)の手法に従って複製フィルターを調製した。4つのブランクリフトを各プレートから非荷電ナイロン膜(Pall Biodyne AまたはMSI Nitropure)に調製した。UV光の下で5分間架橋させるか、あるいは80 、真空下で2時間加熱することによってDNAを該膜に固定化した。供給業者の仕様に従い、ガンマ32PATP(New England Nuclear:6500Ci

50

ノミリモル)と共にT4ポリヌクレオチドキナーゼ(New England Biolabs)を用いてDNAプローブを標識した。略言すれば、37にて、600 $\mu$ Ciガンマ<sup>32</sup>P-ATPおよび5ユニットのT4ポリヌクレオチドキナーゼの存在下で、50ピコモルの縮重DNAオリゴマーを30分間インキュベートした。反応を終結させ、ゲル電気泳動負荷緩衝液を添加し、次いで、電気泳動によって放射性同位体標識プローブを精製した。32P標識プローブをゲルスライスから切り出し、水中に溶出させた。別法として、SchowalterおよびSommer, Anal. Biochem 177:90-94(1989)のプロトコルに従って-32P-dATPまたは-32P-dCTPを一体化することによって、DNAプローブをPCR増幅を介して標識した。PCR反応で標識したプローブを、セファデックスG-150カラムで脱塩することによって精製した。

10

GMC緩衝液(0.52M NaPi、7%SDS、1%BSA、1.5mMEDTA、0.1MNaCl 10mg/ml tRNA)中でプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを行った。洗浄は、オリゴウォッシュ(oligowash)(160ml 1MNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、200ml 20%SDS、8.0ml 0.5MEDTA、100ml 5MNaCl、3632ml H<sub>2</sub>O)中で行った。典型的には、10のウシゲノム当量の複製コピーを表す20のフィルター(各々400sq.センチメートル)を、100ピコモルの縮重オリゴヌクレオチドプローブ(128~512倍縮重)を含む200mlのハイブリダイゼーション溶液中でインキュベートした。ハイブリダイゼーションは、縮重プローブについて計算した最小融解温度の5以下で一晩起こさせた。最小融解温度の計算は、AT対につき2を、GC対につき4を見積もっている。

20

フィルターは、ハイブリダイゼーション温度で反復して交換したオリゴウォッシュ中で4ないし5時間、および最後には、DNAプローブ長に応じた温度にて1%SDS中、3.2M塩化テトラメチルアンモニウムで30分間2回洗浄した。20量体については、最終洗浄温度は60であった。フィルターを取り付け、次いで、増感スクリーン(Dupont Cronex Lightening Plus)を用いてX-線フィルム(Kodak XAR5)に暴露した。通常、-80における3日ないし5日間のフィルム暴露が、これらのライブラリースクリーンにおける二連シグナルを検出するのに十分であった。結果の分析に続き、フィルムをストリップし、再プローブできる。フィルターは、10mMEDTA(pH8)を含有する1%SDSの溶液中、フルパワーのマイクロ波オープン中での15分間の2回の連続的サイクルを通じてインキュベートすることによってストリップした。少なくとも3ないし4サイ

30

### III. 組換えファージの単離、増殖およびDNA調製

これらの手法は組換えDNA法で記載されている標準的なプロトコルに従うものであった(Maniatis et al 2:60-2:81)。

### IV. DNA消化およびサザンプロットを用いる単離したクローンの分析

制限エンドヌクレアーゼ供給業者(New England Biolabs)によって推奨される条件に従い、組換えファージDNA試料(2マイクログラム)を消化した。37における4時間のインキュベーションに続き、0.1M酢酸ナトリウムおよび3容量のエタノールの存在下で、反応生成物を沈殿させた。沈殿させたDNAを遠心によって収集し、75%エタノール中で濯ぎ、乾燥した。すべての懸濁した試料をアガロースゲルに負荷した(典型的には、TAE緩衝液; 0.04Mトリスアセテート、0.002MEDTA中1%)。1センチメートル当たり1ボルトにて4ないし20時間、ゲルを泳動させた。マーカーはラムダHind III DNA断片および/またはX174HaeIII DNA(New England Biolabs)を含むものであった。ゲルを0.5マイクログラム/mlの臭化エチジウムで染色し、写真を撮った。サザンプロットティングについては、0.125N HClでの処理によってDNAをまずゲル中で脱プリン化し、0.5N NaOHで変性し、20 $\times$ SSC(3M塩化ナトリウム、0.03Mクエン酸ナトリウム)中にて非荷電ナイロン膜に移した。プロットティングは6時間から24時間まで行い、次いで、0.5トリスHCl pH7.5、0.15M塩化ナトリウム中で中和し、次いで、50mMトリス-ホウ酸

40

50

E D T A 中で簡単に濯いだ。

架橋については、フィルターをまず透明プラスチックラップに包み、次いで、DNA 側を紫外光に5分間暴露した。ハイブリダイゼーションおよび洗浄はライブラリーのスクリーニングについて記載したごとくに行った(本実施例のセクション2参照)。同様の遺伝子が他の種に存在するか否かを判断するためのハイブリダイゼーションのためにわずかに修飾を施した。DNA フィルターはコロネテック (Clonetech) (カタログ番号7753-1) から購入し、それは、レーン当たり種々の種からのE c o R I消化DNAを5マイクログラムを含有するものであった。前記したセクション2に記載したごとくPCR増幅反応によってプローブを標識し、ハイブリダイゼーションは、10%硫酸デキストランを含有する80%緩衝液B(2gのポリビニルピロリドン、2gのF i c o l l - 400、2gのウシ血清アルブミン、50mlの1Mトリス-H C l (p H 7.5)、58gのN a C l、1gの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H<sub>2</sub>O) 中で行った。プローブは、10分間煮沸し、次いで、氷水中で迅速に冷却することによって変性した。プローブを、1ml当たり10<sup>6</sup> d p m<sup>32</sup> Pのハイブリダイゼーション緩衝液に添加し、60 で一晩インキュベートした。フィルターを、60 でまず緩衝液B中で、続いて2×SSC、0.1%SDS、次いで1×SSC、0.1%SDS中で洗浄した。高ストリンジェンシーについては、実験、最終洗浄を0.1×SSC、1%SDS中で温度を65 まで上昇させて行った。

サザンプロットデータを用いて、ゲノムクローンの制限地図を作成し、いずれのサブ断片がGGFプローブにハイブリダイズしたかを示した(サブクロニングのための候補)

#### V. ハイブリダイゼーションプローブに相同なDNAのセグメントのサブクロニング

DNA 消化物(例えば、5マイクログラム)を1%アガロースゲルに負荷し、次いで、適当な断片を染色後のゲルから切り出した。ガラスビーズへの吸着および供給業者(Bio 101)によって記載されているプロトコルを用いる溶出によってDNAを精製した。回収したDNA断片(100~200ng)を、T4リガーゼ(New England Biolabs)を用い、pCU18の誘導体である線状化脱リン酸化ベクター、例えばpT3T7(Ambion)に連結した。このベクターは大腸菌 ラクタマーゼを担持し、よって、形質転換体はアンピシリンを含有するプレートで選択できる。また、該ベクターは、 - ガラクトシダーゼ相補性を宿主細胞に供給し、従って、非組換体(ブルー)はイソプロピルチオガラクトシダーゼおよびBluogal(Bethesda Research Labs)を用いて検出できる。連結反応の一部を用いて、大腸菌K12 X L 1 blueコンピテント細胞(ストラタジーン(Stratagene)カタログ番号:200236)を形質転換し、次いで、アンピシリン1ml当たり50マイクログラムを含有するLBプレートで形質転換体を選択した。白色コロニーを選択し、プラスミドミニプレプ(preps)をDNA消化およびDNA配列分析のために調製した。選択したクローンを再テストして、そのインサートDNAがGGFプローブにハイブリダイズするか否かを判断した。

#### VI. DNA配列決定

標準的なプロトコルに従い、5ml培養から二本鎖プラスミドDNA鋳型を調製した。配列決定は、製造業者のプロトコル[Sanger et al. PNAS;USA 74:5463(1977)]に従い、セクエナーゼ(Sequenase)2.0およびジデオキシヌクレオチド配列決定キット(US Biochemical)を用いてジデオキシ鎖停止法によって行った。別法として、配列決定は、サイクル配列決定キット(New England Biolabs; Bethesda Research Laboratories)を用いてDNAサーマルサイクラー(Perkin Elmer, モデル4800)で行い、5'末端標識プライマーを用い、製造業者の指示に従って行った。配列プライマーは配列キットで供給されたものか、あるいはクローンから決定された配列に従って合成したものであった。6%ポリアクリルアミドの0.4mm厚配列決定用ゲルに配列決定反応物を負荷し、解像した。ゲルを乾燥し、X-線フィルムに暴露した。典型的には、標準的な配列決定キットを用いる場合、35Sを取り込み、サイクル配列決定反応のために32P末端標識プライマーを用いた。ゲルの底部から頂部まで(5'方向から3')の配列をDNA配列エディ

ターに読み込み、ジェネティクス・コンピュータ・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用いてデータを解析した。

#### VII. RNA 調製および PCR 増幅

ゲノム DNA 中に検出され、かつ GGF ペプチドをコードする配列を含有するオープンリーディングフレームを下垂体 RNA の PCR 増幅を介して延長した。RNA は、グアニジン中性 - CsCl 手法 (Chirgwin et al. Biochemistry 18:5294 (1979)) に従い凍結ウシ組織 (Pelfreeze) 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ー (Aviv and Leder PNAS (USA) 69:1408 (1972)) によって選択した。

パーキン・エルマー社製 PCR/RNA キット番号: N808-0017 を用いて cDNA に変換された全 RNA またはポリアデニル化 RNA 試料いずれかで開始して、特異的 DNA 標的配列を増幅した。第 1 鎖逆転写反応は 1  $\mu$ g の鋳型 RNA と、制限酵素認識部位リンカーを付加したオリゴ dT のプライマーまたは制限部位が付加したクローン化配列から決定した特異的アンチセンスプライマーいずれかを用いた。第 2 鎖を生成するには、プライマーは、3' RACE 反応で用いたプラス鎖ユニーク配列 (Frohman et al. PNAS (USA) 85:8998 (1988)) であるか、あるいは第 1 鎖反応生成物を dATP でターミナルトランスフェラーゼターミングすることによって第 2 の標識部位が付加されている場合には制限部位が付加されたオリゴ dT プライマーであった (例えば、5' racc 反応、Frohman et al., 前掲)。別法として、アンカード PCR 反応においては、第 2 鎖プライマーは縮重し、従って、個々のペプチド配列を表す。

増幅プロフィールは以下の一般的スキームの通りである: 1) 95 $^{\circ}$ における 5 分間の浸漬ファイル; 2) 95 $^{\circ}$ 、1 分間の加熱サイクルファイル; 1 分間、45 $^{\circ}$ 、50 $^{\circ}$  または 55 $^{\circ}$  のアニーリング温度に下げる; 1 分間アニーリング温度に維持する; 1 分間にわたって 72 $^{\circ}$  まで上げる; 72 $^{\circ}$  で 1 分間または 1 分間プラス 10 秒間の自己延長にて延長させる; 3) 72 $^{\circ}$ 、5 分間の延長サイクル、および 4) 有限時間での 4 $^{\circ}$ における浸漬ファイル。加熱サイクルファイル (#2) は、通常、30 サイクル行った。1 センチメートル当たり 4 ボルトにて、3 時間の、TAE 緩衝液中における、2% Nusieve 1% アガロースゲルでの電気泳動によって、各 100  $\mu$ l の増幅反応の 16  $\mu$ l の試料を分析した。ゲルを染色し、次いで、非荷電ナイロン膜にプロットし、これを、プライマーに対して内部にある標識 DNA プローブでプローブした。

DNA 増幅産物の特異的セットはプロットング実験で同一であり得、その位置を精製および再増幅のガイドとして用いた。適当には、選択した試料の残存部分を分取用ゲルに負荷し、続いて、電気泳動の後に、0.5 mm 厚の 4 ないし 5 のスライス (特異的産物の予測される位置を括弧に入れる) をゲルから採取した。アガロースを潰し、次いで、40 $^{\circ}$ にて、0.5 ml の電気泳動緩衝液に 2 ~ 16 時間浸漬した。潰したアガロースを 2 分間遠心し、水性相を新しい試験管に移した。

元の反応と同一セットのプライマーおよび反応プロフィールを用い、溶出した物質 5 マイクロリットル (生成物の概略 1%) について再増幅を行った。再増幅反応が完了すると、クロロホルムで試料を抽出し、新しい試験管に移した。濃縮した制限酵素緩衝液および酵素を反応に添加して、リンカー中に存在する制限部位にて切断した。消化した PCR 産物を電気泳動によって精製し、次いで、サブクローニングのセクションで前記したごとくニベクターにサブクローニングした。DNA 配列決定は前記したごとくに行った。

#### VIII. DNA 配列分析

断片組立てプログラムを用いて DNA 配列を組み立て、GCG プログラム Gel Assemble)、地図およびトランスレート (Translate) によってアミノ酸配列を推定した。推定したタンパク質配列を疑問配列として用いて、ワードサーチ (WordSearch) を使用してタンパク質配列データベースをサーチした。分析は、VMS 5.1 下で操作する VAX Station 3100 ワークステーションで行った。データベースサーチは、GCG バージョン 7.0 を用いてスイスプロット (SwissProt) リリース番号 21 で行っ

10

20

30

40

50

た。

### IX. GGF - IおよびGGF - IIをコードする遺伝子のクローニングおよび配列決定の結果

示したごとく、ウシGGF - IIをコードするDNA配列を同定するために、縮重オリゴヌクレオチドプローブをGGF - IIペプチド配列から設計した。GGF - II 12 (配列番号44)、すなわち、精製したGGF - II調製のリシルエンドペプチダーゼ消化を介して生成したペプチドは(図16および12参照)、GGF - I 07 (配列番号39)、すなわち、精製したGGF - I調製から生成したトリプシンペプチドと強いアミノ酸配列相同性を示した。かくして、GGF - II 12を用いて10の縮重オリゴヌクレオチドプローブを得た(各々、図20中のオリゴ609、610および649ないし656、配列番号66、67、68および75参照)。フィルターの二連セットを、GGF - II 12の2つの重複部分をコードするプローブの2つのセット(セット1 = 609、610; セット2 : 649 ~ 656)でプローブした。ハイブリダイゼーションシグナルは観察されたが、1つのクローンのみが両プローブセットにハイブリダイズした。クローン(GGF 2BG1と命名)を精製した。

ファージクローンGGF 2BG1からのDNAのサザンブロット分析により、両プローブセットはそのウシDNA配列にハイブリダイズすることが確認され、さらに、両プローブはクローン内の同一セットのDNA断片と反応することが示された。これらの実験に基づき、元のクローンの4 kb EcoRIサブ断片を同定し、サブクローンし、部分的に配列決定した。図21は、ヌクレオチド配列(配列番号89)、ならびにプローブ609および650のハイブリダイゼーション部位を包む最初のDNA配列のリーディングの推定アミノ酸配列を示し、このウシゲノムDNAの一部がペプチド12(KASLADSG EYM)をコードすることが確認された。

さらなる配列分析は、GGF - II 12は、推定ウシGGF - II遺伝子およびcDNAを表す重複配列の単離の出発点となった66アミノ酸オープンリーディングフレーム(後記参照)に存在することを示した。

いくつかのPCR方法を用いて、推定ウシGGF - II遺伝子についてのさらなるコーディング配列を得た。全RNAおよびオリゴdT-選択(ポリA含有)RNA試料は、ウシ全下垂体、下垂体前葉、下垂体後葉、および視床下部から調製した。図22、配列番号109 - 119に示したリストからのプライマーを用い、片側PCR反応(RACE)を用いて、3'および5'両方向でcDNA末端を増幅し、アンカードPCR反応はさらなるGGF - IIペプチドを表す縮重オリゴヌクレオチドプライマーで行った。図29は、それらの実験で得られた隣接DNA構造および配列をまとめる。3' RACE反応から、3つの別のスプライスしたcDNA配列が得られ、これをクローン化し、配列決定した。5' RACE反応は、少なくとも52アミノ酸のコーディング配列を含有するさらなるエクソンの発見に導いた。その推定アミノ酸配列の分析により、ペプチドGGF - II - 6、およびGGF - I - 18(後記参照)に類似の配列が明らかにされた。アンカードPCR反応は、300 bpのさらなるcDNAセグメント内に含まれるペプチドGGF - II - 1、2、3および10の(cDNA)コーディング配列の同定に導いた。このセグメント(すなわち、セグメントE、図30参照)の5' リミットは、ペプチドGGF - II - 1をコードし、かつPCR反応で用いられたオリゴヌクレオチドによって定義される(さらなる5'配列データは、実施例11におけるヒト・クローンについて記載したごとく存在する)。かくして、このクローンは存在する合計して9つの新規なGGF - IIペプチド配列のうち6つをコードするヌクレオチド配列を含有する。

クローン化遺伝子は、見い出されたコーディング配列(後記、図30参照)の本発明者による位置決めを可能としたGGF 2BG1の物理的地図を構築することによってまず特許付けられた。前記したコーディング配列からのDNAプローブは、このファージクローン上のエクソンを含有するさらなるDNA断片を同定するのに、また、両方向で重複するクローンを同定するのに用いられた。推定ウシGGF - II遺伝子は少なくとも5つのコーディングセグメントに分割される。コーディングセグメントは、普遍的な遺伝暗号を用いて

10

20

30

40

50

ポリペプチド配列に翻訳できる不連続長さのDNA配列と定義される。図36に記載し、本出願で言及したコーディングセグメントは、1)GGF遺伝子内に存在する特定のエクソン(例えば、コーディングセグメントa)、または2)mRNAの特異的サブグループに出現する2以上のエクソンのセットに由来するものであり、ここに、各セットは、示した遺伝子産物におけるごとく特異的ポリペプチドセグメントに翻訳できる。請求の範囲で言及するポリペプチドセグメントは同種DNAコーディングセグメントの翻訳産物である。コーディングセグメントAおよびBのみが、これまでにエクソンとして定義されており、配列決定され、マッピングされている。同定された隣接コーディング配列の要約は図31に示す。エクソンはその発見の順に(アルファベット順にて)リストする。イントロン/エクソン境界より、エクソンBは、コーディングセグメントEおよびコーディングセグメントAを結合するcDNA中に包含され得ることが明らかである。すなわち、エクソンBは、リーディングフレームを損なうことなくスプライシングできない。従って、本発明者らは、3つの別のスプライシングパターンが推定ウシGGF-II cDNA配列1、2および3を生じ得ることを示す。各々GGF2BPP1.CDS、GGF2BPP2.CDSおよびGGF2BPP3.CDSと命名されたこれらのコーディング配列を、各々、図27A(配列番号129)、27B(配列番号130)、および27C(配列番号131)に示す。3つのcDNAの推定されるアミノ酸配列も図27A(配列番号129)、27B(配列番号130)、および27C(配列番号131)に示す。

3つの推定構造は長さ206、281および257アミノ酸のタンパク質をコードする。推定タンパク質配列の第1の183残基はすべての3つの遺伝子産物で同一である。184位において、クローンはかなり異なる。また、GGF2BPP1におけるグリシンについてのコドンGGTは、GGF2BPP2およびGGF2BPP3のためのスプライスドナーとして働き、これは別々に、各々、エクソンC、C/D、C/D'およびDまたはC、C/DおよびDに付加され、図32(配列番号145)に示す。GGF11BPP1は、コーディングセグメントAスプライス連結部を次の介在配列(イントロン)まで読み過ごすことによって生じる切形(truncated)遺伝子産物である。これは、図30(配列番号136)におけるコーディングセグメントA'を表す。転写体はカノニカルAATAAポリアデニル化配列に隣接して終わり、本発明者らは、この切形遺伝子産物がボナ・ファイド(bona fide)成熟転写体を表すことを示す。他の2つのより長い遺伝子産物は同一の3'非翻訳配列およびポリアデニル化部位を共に有する。

すべての3つのこれらの分子は、9つの新規なGGF-IIペプチド配列(図11参照)のうち6つを含有し、他のペプチドはGGF-I-18(図26参照)に対し高度に相同である。この知見は、この組換え分子がウシGGF-IIの少なくとも一部をコードする高い確率を与える。さらに、3つのペプチドについての計算された等電点はGGF-IおよびIIの物理的特性に合致する。GGF-IIの分子サイズはだまか60kDであるので、3つのDNAのうち最大のものは、予測されるアミノ酸数のほとんど半分を持つタンパク質をコードする。

BおよびAエクソンを含むプローブをPCR増幅を介して標識し、ウシ下垂体後葉から単離されたRNAから作製されたcDNAライブラリーをスクリーニングするのに用いた。1のクローン(GGF2BBP5)は図29に示したパターンを示し、コーディングセグメントAおよびCの間にさらなるDNAコーディングセグメント(G)を含有する。全核酸配列を図31に示す(配列番号144)。最長オープンリーディングフレームからの予測される翻訳産物は241アミノ酸である。また、前記したプローブを用い、ウシ下垂体後葉ライブラリーから第2cDNAの一部(GGF2BPP4)を単離した。このクローンは、図29に示すパターンを示した。このクローンは5'末端が不完全であるが、コーディングセグメントGおよびDを欠くという意味でスプライシング変異体である。また、BPP4は領域C/Dを超えて領域H、KおよびLを持つ新規な3'末端を示す。BPP4の配列は図33に示す(配列番号146)。

#### 実施例 1 1

#### 種々の種におけるGGF配列

10

20

30

40

50

G G F タンパク質はタンパク質の新しいスーパーファミリーのメンバーである。他のホ乳動物 DNA に関しての高ストリンジエンシイ・クロスハイブリダイゼーション実験 (DNA プロットング実験) において、本発明者らは、このウシ組換え分子からの DNA プロブはテストした種々の試料において特異的配列を容易に検出できることを明らかに示した。また、高度に相同性の配列がヒトゲノム DNA で検出される。オートラジオグラフィは図 28 に示す。ラットおよびヒト DNA を含有するレーンにおけるシグナルは、G G F 遺伝子のラットおよびヒト同等物を表し、この遺伝子によってコードされるいくつかの cDNA の配列は最近 Hølems et al. (Science 256: 1205 (1992)) および Wen et al. (Cell 69:559 (1992)) によって報告されている。

#### 実施例 12

##### ヒト G G F 2 をコードするヒト配列の単離

脳幹から調製したヒト cDNA ライブラリー (ストラタジーンカタログ番号 935206) をスクリーニングすることによって、ウシ G G F II コーディングセグメント E からの配列を含有するいくつかのヒト・クローンを単離した。この戦略は、G G F 2 ペプチド (G G F 2 に対してユニーク) のほとんどおよびウシ E セグメントを含有するクローンからの予測されるペプチド配列の間の強力なリンクに基づいて追求されたものであった。このライブラリーは、以下にリストするオリゴヌクレオチド 914 ~ 919 を用いて、実施例 8、セクション II に記載されたごとくスクリーニングした。

**914TCGGGCTCCATGAAGAAGATGTA** (SEQ ID NO: 179)  
**915TCCATGAAGAAGATGTACCTGCT** (SEQ ID NO: 180)  
**916ATGTACCTGCTGTCCTCCTTGA** (SEQ ID NO: 181)  
**917TTGAAGAAGGACTCGCTGCTCA** (SEQ ID NO: 182)  
**918AAAGCCGGGGGCTTGAAGAA** (SEQ ID NO: 183)  
**919ATGARGTGTGGGCGGCGAAA** (SEQ ID NO: 184)

これらのプロ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さらに分析した。また、セグメント A からのポリメラーゼ鎖反応 (PCR) 産物を標識することによって産生された、コーディングセグメント A (図 30 参照) に由来するプロブを用いて初代ライブラリーをスクリーニングした。A および E 由来プロブの双方にハイブリダイズするいくつかのクローンを選択し、特定クローン G G F 2 H B S 5 をさらなる分析のために選択した。このクローンはコーディングセグメントのパターン (図 30 に示すごとく E B A C C / D ' D) によって表される。このクローンにおける E セグメントは図 30 で示した E の切形ウシバージョンのヒト同等物である。G G F 2 H B S 5 が、記載したすべての「推定」G G F - II 候補のうち G G F - II をコードする最もそうである候補である。コーディング配列セグメント E の長さは 786 ヌクレオチドプラス非翻訳配列の 264 塩基対である。G G F 2 H B S 5 によってコードされたタンパク質の予測されるサイズはほぼ 423 アミノ酸 (ほぼ 45 キロダルトン、図 44 参照、配列番号: 21) であり、これは、G G F - II からの脱グリコシル化された形態のサイズと同様である (実施例 20 参照)。加えて、図 26 にリストした G G F - II ペプチドの 7 つは、領域 E から予測されるタンパク質配列の範囲内にある同等配列を有する。ペプチド II - 6 および II - 12 は例外であり、各々、コーディングセグメント B およびコーディングセグメント A の範囲内である。G G F 2 H B S 5 タンパク質をコードする RNA は、G G F 2 H B S 5 インサートを含有するベクター (Bluescript SK [Stratagene Inc.] 図 47 参照) に存在するバクテリオファージ T7 プロモーターによって駆動される in vitro 転写系で産生された。この RNA は無細胞 (ウサギ網状赤血球) 転写系で転写され、タンパク質産物のサイズは 45 kd であった。加えて、無細胞タンパク質をシュワン細胞分裂促進アッセイで検定して、生物学的活性を確認した。ならし培地で処理したシュワン細胞は、<sup>125</sup>I - ウリジンの取込みで測定して増加した増殖、および 185 キロダルトン範囲におけるタンパク質のチロシン上のリン酸化の双方を示した。

10

20

30

40

50

かくして、GGF2HBS5によってコードされる産物のサイズおよび図11に示したウシペプチドに対して高度に相同性のヒトペプチドをコードするDNA配列の存在により、GGF2HBS5がウシGGF2のヒト同等物をコードすることが確認された。このクローンで形質転換された細胞から調製したならし培地はシュワン細胞分裂促進活性を誘導するという事実により、(BPP5遺伝子産物とは異なり)GGFIIHBS5遺伝子産物が分泌されることが確認された。加えて、GGFBIBPP5遺伝子産物は、P185<sup>erbB</sup><sup>2</sup>のごとき受容体チロシンキナーゼまたは密接に関連する受容体を介するシュワン細胞増殖応答を媒介するらしい(実施例19参照)。

### 実施例13

#### 哺乳動物および昆虫細胞におけるヒト組換えGGF2の発現

(実施例12に記載し、またHBS5として言及した)ヒトGGF2をコードするGGF2HBS5 cDNAクローンをベクターpcDL-SR 296にクローン化し、COS-7細胞をDEAE-デキストラン法によって100mmディッシュにトランスフェクトした。細胞溶解物および一時的に発現するCOS細胞からのならし培地をトランスフェクション後3および4日に収穫した。溶解物を調製するには、細胞単層をPBSで洗浄し、3回の凍結/解凍のサイクルによって溶解したディッシュから0.25Mトリス-HCl、pH8の150μm中に掻き取った。細胞来雑物をペレット化し、上清を回収した。ならし培地試料(7ml s.)を収集し、次いで、濃縮し、製造業者(Amicon, Beverly, MA)によって記載されているごとくセントリプレップ(Centriprep)-10およびセントリコン(Centricon)-10ユニットを用い、緩衝液を10mMトリス、pH7.4と取り替えた。ラット神経シュワン細胞を、前記したごとくに、DNA合成前駆体の取込みについてアッセイした。ならし培地および細胞溶解物試料をMarchionni et al., Nature 362:313 (1993)に記載されているごとくシュワン細胞増殖アッセイでテストした。GGF2をコードするcDNAであるGGF2HBS5は、タンパク質産物の分泌を培地に向けた。細胞溶解物を用いるアッセイによって測定して、最小活性が細胞内部で検出可能であった。GGF2HFB1およびGGFBPP5 cDNAは、産物の分泌を細胞外培地に向けなかった。これらのクローンからのGGF活性は細胞溶解物でのみ検出可能であった。

また、組換えGGF2をCHO細胞で発現させた。GGF2をコードするGGF2HBS5 cDNAをベクターpcdhfrpolyAのEcoRI部位にクローン化し、リン酸カルシウム共沈法によって、DHFR陰性CHO細胞系(GG44)にトランスフェクトした。96-ウェルプレートにおいてヌクレオチドおよびヌクレオシドのない培地(Gibco)でクローンを選択した。3週間後、個々のクローンからのならし培地試料を、Marchionni et al., Nature 362:313 (1993)に記載されているごとくシュワン細胞増殖アッセイによってGGFの発現についてスクリーニングした。有意なレベルのGGF活性を培地に分泌した安定クローンを同定した。CHO細胞ならし培地の異なる容量アリコートからのシュワン細胞増殖活性を用いて、図46に示す用量応答曲線を得た(GrahamおよびVan Der Eb, Virology 52:456, 1973)。この物質を、GGF2特異的ペプチドに対して生起されたポリクローナル抗血清でプローブしたウェスタンブロットで分析した。ほぼ65Kd(下垂体から抽出したGGF2の予測サイズ)のバンドが特異的に標識された(図48、レーン12)。

また、バクテリオファージ発現を用いて、組換えGGF2をインサート細胞中で発現させた。3~5の多重度(10<sup>6</sup>細胞/ml)にて、Sf9インサート細胞を、GGF2HBS5 cDNAクローンを含有するバクテリオファージで感染させ、Sf900-II培地で培養した。シュワン細胞分裂促進活性が細胞外培地に分泌された。フォルスコリンの不存在下、異なる容量の昆虫細胞ならし培地をシュワン細胞増殖アッセイでテストして、用量応答曲線を得た。

また、この物質を、前記したGGFII特異的抗体でプローブしたウェスタンブロット(図45B)で分析した。

本実施例で用いた方法は以下の通りである。

組換えヒトおよびウシ・グリア成長因子のシュワン細胞分裂促進活性は以下のように測定

10

20

30

40

50

した：一時的ホ乳動物発現実験から得られた粗組換え G G F 調製を用い、培養したシュワン細胞の分裂促進応答を 5  $\mu$  M フォルスコリンの存在下で測定した。[<sup>125</sup>I] - U r d の取込みは、「方法 (Methods)」に記載したごとくトランスフェクトしたまたはモックトランスフェクトした C O S 細胞から得られた物質に 1 8 ~ 2 4 時間暴露した後に測定した。4 セットの平均値および標準偏差のデータを示す。部分的に精製された天然ウシ下垂体 G G F (カルボキシメチルセルロース画分; Goodearl et al., 提出) に対する分裂促進応答は、1 0 0 パーセント活性の標準として示す (G G F)。

c D N A (図 4 6、配列番号 1 6 6 ~ 1 6 8) を p c D L - S R 2 9 6 (Takebe et al., Mol. Cell Biol. 8:466-472 (1988)) にクローン化し、C O S - 7 細胞を D E A E - デキストラン法 (Sambrook et al., In Molecular Cloning. A Laboratory Uanual, 第 2 版 (Cold Spring Harbor Laboratoey Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)) によって 1 0 0 m m ディッシュにトランスフェクトした。トランスフェクション後 3 または 4 日に、細胞溶解物またはならし培地を収穫した。溶解物を調製するには、細胞単層を P B S で洗浄し、ディッシュから掻き取り、0 . 2 5 M トリス - H C l、p H 8 の 1 5 0  $\mu$  l 中、3 回の凍結 / 解凍サイクルによって溶解させた。細胞来雑物をペレット化し、上清を回収した。ならし培地試料 (7 m l s) を収集し、次いで、濃縮し、製業者 (Amicon, Beverly, MA) によって記載されているごとくセントリプレップ-10 およびセントリコン-10 ユニットを用い、緩衝液を 1 0 m M トリス、p H 7 . 4 と取り替えた。ラット坐骨神経シュワン細胞を、記載されているごとく (Davis and Stroobant, J. Cell Biol. 110:1353-1360 (1990)) ; Brockes et al., Brain Res. 165:105-118 (1979))、D N A 合成前駆体の取込みについてアッセイした。

組換え C H O 細胞ならし培地のウェスタンブロットは以下のごとくに行った：組換え C H O クローンを M C D B 3 0 2 無タンパク質中で 3 日間培養した。ならし培地 2 m l を収穫し、濃縮し、1 0 m M トリス - H C l、p H 7 . 4 に関して緩衝液を交換し、凍結乾燥した。ペレットを S D S - P A G E 試料緩衝液に再懸濁し、還元性 S D S ゲル電気泳動に付し、G G F ペプチド抗体でのウェスタンブロットティングによって分析した。C H O 対照は、未トランスフェクト C H O - D G 4 4 宿主からのならし培地を用いてなし、C H O H B S 5 レベルは、組換えクローンからのならし培地を用いてアッセイした。

#### 実施例 1 4

##### G G F の機能的エレメントの同定

G G F 配列のファミリーの推定構造は、( G G F 2 B P P 4 によって表される ) 最長形態が、細胞外部分が上皮成長因子に似たドメインを含有する膜貫通タンパク質をコードすることを示す (Carpenter および Wahl, in Peptide Growth Factors および Their Receptors I, pp. 69-133, Springer-Verlag, NY 1991 参照)。コーディングセグメント C および C / D または C / D ' ペプチド配列に存在するシステインの位置は上皮成長因子 (E G F) ペプチド配列中の相同残基に関して保存されている (図 3 2、配列番号 1 4 7 ~ 1 4 9 参照)。これは、細胞外ドメインが受容体認識部位および生物学的活性化部位として働くことを示す。変異体形態のうちいくつかは H、K、および L コーディングセグメントを欠き、かくして、分泌される拡散可能な生物学的活性タンパク質として発現され得る。E G F - 様ドメイン (E G F L) を含むポリペプチドをコードする G G F D N A 配列は、グリ

A 細胞分裂促進活性を刺激する十分な生物学的活性を有し得る。このタンパク質の膜結合バージョンは、胚形成の間にまたは神経再生の間にニューロンの表面で発現されれば (ここに、ニューロンの表面は増殖するシュワン細胞の表面に親和性である)、シュワン細胞の増殖を誘導し得る。

分泌された (非膜結合) G G F は分泌地点からいくらかの距離にてシュワン細胞と相互反応できる古典的に拡散可能な因子として働き得る。他の形態は、組織の損傷および細胞の破壊を介して源により細胞内から放出され得る。分泌される G G F の例は G G F 2 H B S 5 によってコードされるタンパク質であり ; これは、細胞の外部に向けられることが判明している唯一の公知 G G F である。分泌は、恐らくは、G G F 2 H B S 5 によってコードされた組換え G G F 2 内に含有される N - 末端ドメインである、領域 E にのみ見出される

10

20

30

40

50

N - 末端疎水性配列を介して媒介される。

他のGGF類はスクリーニングされないようである。これらGGF類は、筋肉の損傷の結果として放出される損傷性反応体 (injury response forms) でありうる。

(GGF2HBS5によってコードされる)GGF2の予測されるタンパク質構造ならびに領域BおよびAを含有する他のタンパク質の他の領域はヒト基底膜硫酸ヘパリンプロテオグリカンコアタンパク質に対する類似性を示す。これらのGGF中に置み込まれたC2免疫グロブリンの第2システインの隣に位置するペプチドADSGEYは、その基底膜ラミナタンパク質で見い出される22のC-2リピートのうち9つで生じる。この証拠は、これらのタンパク質は、ニューロンおよびグリアに関連するものごときマトリックスタンパク質と関連し得ることを強く示し、標的部位におけるグリア成長因子の隔離方法を示唆し得る。

10

#### 実施例 15

##### 組換え細胞からのGGFの精製

生物学的活性をアッセイするためにGGFの全長または部分を得るには、クローン化DNAを用いてタンパク質を過剰生産させることができる。いくつかのアプローチを用いることができる。前記配列を含有する組換え大腸菌を構築することができる。pNH8aまたはpHH16a (Stratagene, Inc.)のごとき発現系を以下の製造方法によってこの目的で用いることができる。別法として、これらの配列をホ乳動物発現ベクターに挿入し、過剰生産細胞系を構築することができる。例として、この目的では、GGFをコードするDNA、クローンGGF2BPP5がCOS細胞で発現されており、pMSXND発現ベクター (Lee and Nathans, J. Biol. Chem. 263, 3521-3527, (1981))を用いチャイニーズハムスター卵巣細胞で発現させることができる。GGF DNA配列を含有するこのベクターは確立された手法を用いて宿主細胞にトランスフェクトすることができる。

20

一時的発現を調べることができるか、あるいはメトトレキサートの存在下でG418 - 耐性クローンを増殖させて、(pMSXNDベクターに含有される)dhfr遺伝子を増幅させ、該過程において、隣接するGGFタンパク質コーディング配列を同時増幅させる細胞について選択することができる。CHO細胞は全くタンパク質の無い培地 (Hamilton and Ham, In Vitro 13, 537-547 (1977))で維持することができるので、所望のタンパク質は培地から精製することができる。実施例17で産生された抗血清を用いるウェスタン分析を用いて、過剰生産細胞のならし培地中で所望のタンパク質の存在を検出することができる。

30

所望のタンパク質 (rGGF2) は、以下のごとくCOS細胞を一時的に発現させることによってならし培地から精製することができる。rGGFIIをならし培地から収穫し、陽イオン交換クロマトグラフィー (POROS - HS)を用いて部分的に精製した。カラムは33.3 mM MES、pH 6.0で平衡化した。ならし培地は10 ml / 分の流速で負荷した。シュワン細胞増殖活性および (前記したGGFペプチドに対するポリクローナル抗血清を用いる) 免疫反応性を含有するピークを50 mM トリス、1 M NaCl、pH 8.0で溶出させた。

また、安定したチャイニーズハムスター卵巣細胞系を用いてrhGGF2を発現させる。ならし培地から収穫したrGGF2を、陽イオン交換クロマトグラフィー (POROS - HS)を用いて部分的に精製した。カラムはPBS、pH 7.4で平衡化させた。ならし培地は10 ml / 分で負荷した。シュワン細胞増殖活性および (GGF2ポリクローナル抗血清を用いる) 免疫反応性を含有するピークを50 mM Hepes、500 mM NaCl、pH 8.0で溶出させた。増殖ならびに免疫反応性双方に関し、さらなるピークが50 mM Hepes、1 M NaCl、pH 8.0で観察された (図45)。

40

rhGGF2は、高分解工程としての疎水性相互作用クロマトグラフィー; 陽イオン交換 / 逆相クロマトグラフィー (第2の高分解工程として必要であれば); ウイルス不活性化工程および陰イオン交換クロマトグラフィーのごときDNA除去工程を用いてさらに精製することができる。

陽イオン交換カラムから溶出させた組換えGGF2ピークのシュワン細胞増殖活性は以下

50

のように測定した：培養したシュワン細胞の分裂促進応答を、50 mM トリス 1 M NaCl、pH 8.0 によって溶出させたピークを用い、5 M フォルスコリンの存在下で測定した。ピークは20<sup>1</sup>、10<sup>1</sup> (1:10) および (1:100) 10<sup>1</sup> で添加した。<sup>125</sup>I-ウリジンの取込みを測定し、18~24時間の暴露の後に(CPM)として測定し、表した。

GGF2のペプチドに対して生起したポリクローナル抗体を用いるイムノプロットは以下のごとくに行った：10<sup>1</sup>の異なる画分を4~12%のグラジエントゲルで泳動させた。該ゲルをニトロセルロースペーパーに移し、ニトロセルロースプロットを5%BSAでブロックし、GGF2-特異的抗体(1:250希釈)でプローブした。<sup>125</sup>IプロテインA(1:500希釈、比活性=9.0/Ci/g)を第2抗体として用いた。イムノプロットをコダック社製X-線フィルムに6時間暴露した。1 M NaClで溶出させたピーク画分は69Kで免疫反応性バンドを示した。

陽イオン交換カラムでのGGF2精製は以下のごとくに行った：rGGFIIを発現するCHO細胞ならし培地を10ml/分で陽イオン交換カラムに負荷した。該カラムをPBS、pH 7.4で平衡化した。溶出は各々50 mM Hepes, 500 mM NaCl、pH 8.0および50 mM Hepes, 1 M NaCl、pH 8.0で達成した。前記したシュワン細胞増殖アッセイ(CPM)を用いてすべての画分を分析した。タンパク質濃度(mg/ml)は、標準としてBSAを用いるブラッドフォード(Bradford)アッセイによって測定した。

各画分10<sup>1</sup>を用いるウェスタンプロットを行い、免疫反応性およびシュワン細胞活性は共移動するのが観察された。

ウェスタンプロットアッセイを用い、タンパク質を手法の種々の時点でアッセイすることができる。別法として、前記したシュワン細胞分裂促進アッセイを用いて、全長クローンまたはそのいずれかの生物学的活性タンパク質の発現産物をアッセイすることができる。全長クローンGGF2HBS5はCOS細胞で一時的に発現される。トランスフェクトされたCOS細胞の細胞内抽出物は、実施例8に記載したシュワン細胞増殖アッセイ法でアッセイした場合、生物学的活性を示す。加えて、GGF2BPP5をコードする全長クローンをCOS細胞で一時的に発現させた。この場合、細胞抽出物およびならし培地は共に、実施例8に記載したシュワン細胞増殖アッセイで生物学的活性を示す。(ヘレグリンを包含する)GGF遺伝子に由来するスプライシング変異体相補的DNAのファミリーのいずれのメンバーもこのようにして発現させることができ、当業者がシュワン細胞増殖アッセイでアッセイすることができる。

別法として、スプライシング変異体Neu分化因子(NDF)をCOS-7細胞で発現させたWen et al. (Cell 69:559 (1992)) に従い、他の変異体から組換え物質を単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されたcDNAクローンはSV40初期プロモーターの制御下にあり、SV40終結およびポリアデニル化シグナルで3'がフラックされている。COS-7細胞を、エレクトロポレーションによって以下のごとくにpJT-2プラスミドDNAでトランスフェクトした：6×10<sup>6</sup>細胞(DMEMおよび10%FBSの0.8ml中)を0.4cmのキュベットに移し、TE溶液(10mMトリス-HCl(pH 8.0))、1mMEDTA)10μl中、プラスミドDNA20μgと混合した。200ohmに設定したパルスコントローラーユニットを装備したBio-Rad Geneパルサー装置を用い、1600Vおよび25μFにてエレクトロポレーションを室温で行った。次いで、細胞をDMEM、10%FBSの20mlに希釈し、T75フラスコ(Falcon)に移した。37におけるインキュベーションの14時間後、培地をDMEM、1%FBSで置き換え、インキュベーションをさらに48時間継続した。細胞から収穫した組換えタンパク質を含有するならし培地は、このタンパク質についての受容体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(培養したヒト胸カルシノーマ細胞系AU565)を組換え物質で処理した。処理した細胞は、erbB2受容体の活性化に特徴的な形態学的変化を示した。また、このタイプのならし培地をシュワン細胞増殖アッセイでテストすることもできる。

10

20

30

40

50

## 実施例 16

## N - 末端配列分析

hGGF2をコードするcDNAを増幅可能なベクターpcdhfrpolyAにクローン化し、安定な発現のためにCHO-DG44細胞にトランスフェクトした。rhGGF2がならし培地に分泌された。組換えGGF2の分泌される能力は、恐らくは、N-末端疎水性ストレッチ(シグナル配列)により媒介される。一旦粗小胞体を横切って成長するタンパク質の輸送を開始したならば、シグナル配列は特異的部位において成熟タンパク質から切断される。発現され精製されたrhGGF2のN-末端配列分析は後記にて示す切断部位を示す。タンパク質のN-末端における最初の50のアミノ酸残基の配列は、後記するN-末端配列分析によって確認された(表5)。

表 5

## rhGGF2のN-末端配列分析

| サイクル# | 最初の配列          | ピコモル  |
|-------|----------------|-------|
| 1     | Gly (G)        | 210.6 |
| 2     | Asn (N)        | 163   |
| 3     | GLU (E)        | 149   |
| 4     | Ala (A)        | 220   |
| 5     | Ala (A)        | 180   |
| 6     | Pro (P)        | 173   |
| 7     | Ala (A)        | 177   |
| 8     | Gly (G)        | 154.9 |
| 9     | Ala (A)        | 162.4 |
| 10    | Ser (S)        | 65.4  |
| 11    | Val (V)        | 132.7 |
| 12    | Val (V) *(Cys) | 11.7  |
| 13    | Tyr (Y)        | 112.7 |
| 14    | Ser (S)        | 47.6  |
| 15    | Ser (S)        | 27.1  |

N-末端配列分析はエドマン分解プロセスによって行う。

\* Cys残基は分解プロセスによって破壊され、検出できない。

以下の配列(配列番号: 185)は、hGGF2のアミノ酸配列を表す。影を付けた領域は切断されたシグナル配列を示す。

10

20

30

40

~~MEWRRAIPRRS GRGEPRAORP GSAARSSPPL ELLPILLIIG TAAIAPGAAA~~  
 GNEAAPAGAS VCYSSPPSVG SVQELAQRAA VVIEGKVHPQ RRQOGALDRK  
 AAAAAGEAGA WGGDREPPAA GPRALGPPAE EPLLAANGTV PSWPTAPVPS  
 AGEPGEEAPY LVKVHQVWAV KAGGLKKDSL LTVRLGTWGH PAFPSCGRLK  
 EDSRYIFFME PDANSTSRAP AAFRASFPPL ETGRNLKKEV SRVLCKRCAL  
 PPQLKEMKSQ ESAAGSKLVL RCETSSEYSS LRFKWFKNNGN ELNRKNKPQN  
 IKIQKKPGKS ELRINKASLA DSGEYMCKVI SKLGNDSASA NITIVESNAT  
 STSTTGTSHL VKCAEKEKTF CVNGGECFMV KDLSNPSRYL CKCPNEFTGD  
 RCQNYVMASF YSTSTPFLSL PE (SEQ ID NO: 185)

10

影を付けた領域は、r h G G F 2 の N - 末端における実験的に決定した 15 のアミノ酸残基を表し、A<sub>50</sub> - G<sub>51</sub> 結合がシグナル配列の切断部位であることを示す。

#### 実施例 17

##### さらなるスプライシング変異体の単離

ここに引用して本明細書の一部とみなす、1992年10月23日付け出願の米国特許出願07/965,173号に記載されている他のニューレグリンを更新する (updating) 方法により、スプライシング変異の結果として生じる4つの密接に関連する配列 (ヘレグリン、1、2、3) が産生されている。Peles et al. (Cell 69:205 (1992))、および Wen et al. (Cell 69:559 (1992)) は、p185<sup>erbB2</sup> に結合するタンパク質  
 20  
 に関する実施例1~9および11に記載されたものと同様の精製およびクローニングアプローチを用いてもう1つのスプライシング変異体を (ラットから) 単離している。cDNA クローンは、(形質転換ラット線維芽細胞系から p185<sup>erbB2</sup> 結合タンパク質を精製し配列決定することにより) 以下のようにして得られた。p185<sup>erbB2</sup> 結合タンパク質はならし培地から以下のごとくに精製された。500ローラボトル (合計120リットル) の3つの収穫物からのプールされたならし培地を0.2μフィルターを通す濾過によって清澄化し、20kd分子量カットオフの膜を用い、ペリコン (Pelicon) 限外濾過系にて31倍濃縮した。すべての精製工程は、ファルマシア社製のファストタンパク質液体クロマトグラフィーシステムを用いることによって行った。濃縮した物質をヘパリン - セファロースのカラム (150ml、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) で予め平衡化)  
 30  
 に直接負荷した。280nm波長での吸光度が検出されなくなるまで、0.2M NaCl を含有する PBS でカラムを洗浄した。次いで、結合タンパク質を NaCl の連続的グラジエント (0.2M から 1.0M) (250ml) で溶出し、5ml ずつの画分を収集した。試料 (収集した画分からの 0.01ml) をキナーゼ刺激活性の定量アッセイで用いた。3回カラムを流して (合計容量 = 360ml) 活性画分をプールし、YM10限外濾過膜 (Amicon, Danvers, MA) を用いることによって濃縮し、硫酸アンモニウムを濃度 1.7M に到達するまで添加した。遠心 (10,000 × g, 15分) によって清澄化した後、プールした物質をフェニル - セファロースカラム (HR10/10、ファルマシア社製) に負荷した。該カラムを 0.1M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4) 中の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> のグラジエント (1.7M ないし無塩) 45ml で展開し、2ml ずつの画分を収集し、  
 40  
 (実施例19に記載した) キナーゼ刺激につきアッセイした (試料当たり 0.002ml)。活性の主要ピークをプールし、50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.3) に対して透析した。モノ - S 陽イオン交換カラム (HR5/5、ファルマシア社製) を 50mM リン酸ナトリウムで予め平衡化した。活性物質 (タンパク質 0.884mg; 35ml) を負荷した後、カラムを出発緩衝液で洗浄し、次いで、NaCl のグラジエントにて、1ml / 分の液速で展開した。キナーゼ刺激活性物を 0.45 ~ 0.55M 塩にて回収し、各 2ml ずつの4つの画分にわたって展開した。これらをプールし、Cu<sup>2+</sup>キレート化カラムに直接負荷した (1.6ml、HR2/5キレート化セファロース、ファルマシア社製)。タンパク質のほとんどは樹脂に吸着したが、それらは、塩化アンモニウムの 30ml 直線グラジエント (0 ~ 1M) で徐々に溶出した。活性は 0.05 ないし 0.2M  
 50

NH<sub>4</sub>Clの範囲で、タンパク質の単一ピークにて溶出した。精製の種々の工程からの試料を、ゲル電気泳動、続いてのICNからのキット (Costa Mesa, CA) を用いる銀染色によって分析し、そのタンパク質含量をバイオ-ラド (Bio-Rad) (Richmond, CA) からのキットを用いるクーマシーブルー染料結合アッセイで測定した。

p44タンパク質 (10 μg) を0.1 M炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH 7.8) 200 μl 中で還元した。1:10の酵素-対-基質の比にて、37 °Cで、L-1-トシル-アミド 2-フェニルエチルクロロメチルケトン-処理トリプシン (Serva) で18時間消化を行った。得られたペプチド混合物を逆相HPLCによって分離し、ヴィダック (Vydac) C4マイクロカラム (2.1 mm i.d. × 15 cm, 300 Å) およびダイオード-アレイ検出器およびワークステーションを装備したHP 1090液体クロマトグラ

10

フィーシステムを用いて215 nmでモニターした。カラムを0.1%トリフルオロ酢酸 (移動相A) で平衡化し、溶出は70分間にわたる0%~55%移動相B (0.1%トリフルオロ酢酸中の90%アセトニトリル) からの直線グラジエントで行った。流速は0.2 ml / 分であり、カラム温度は25 °Cで制御した。HPLC系から手動で収集したペプチドピークの1/3アリコートをし、エドマン分解によるN-末端配列分析によって特徴付けた。27.7分 (T27.7) 後に溶出した画分は混合されたアミノ酸配列を含有し、

還元の後に以下のごとくさらに再クロマトグラフィーに付した: ペプチド画分の70%アリコートを真空中で乾燥し、0.2 M炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH 7.8) 100 μl 中で還元した。DTT (終濃度2 mM) を溶液に添加し、これを、次いで、37 °Cで30分間インキュベートした。次いで、ヴィダックカラム (2.1 mm i.d. × 15

20

cm) を用い、還元したペプチド混合物を逆相HPLCによって分離した。溶出条件および流速は前記と同じである。ペプチドのアミノ酸配列分析は、オン-ラインのフェニルチオヒダントイン (PTH) アミノ酸アナライザーおよびモデル900データ解析システム (Hunkapiner et al. (1985) Methods of Protein Microcharacterization, J.E. Shively編 (Clifton, New Jersey: Humana Press, p. 223-247)) を備えたモデル477タン

パク質シーケンサー (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) で行った。予めポリブレンおよびNaClでサイクルを行ったトリフルオロ酢酸処理したガラス繊維ディスクにタンパク質を負荷した。PHT-アミノ酸分析は、デュアルシリンジポンプおよび逆相 (C-18) の狭い孔のカラム (Applied Biosystems, 2.1 mm × 250 mm) を用いてマイクロ液体クロマトグラフィーシステム (Model 120) で行った。標準的な手法 (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, New York (1982))) によってRNAをラット1-EJ細胞から単離し、mRNAセパレータキット (Clontech Lab, Inc., Palo Alto, CA) を用いてポリ(A)<sup>+</sup>を選択した。(BRL

30

Life Technologies, Inc., Bethesda, MDからの) スーパースクリプト (Superscript) キットでcDNAを合成した。カラム分画した二本鎖cDNAをSalI-およびNotI-消化のpJT-2プラスミドベクター、すなわちpCD-Xベクター (OkayamaおよびBerg, Mol. Cell Biol. 3:280 (1983)) の誘導体に連結し、エレクトロポレーション (Dower et al., Nucl. Acids. Res., 16:6127 (1988)) によってDH10B大腸菌細胞に形質転換した。NDFのN-末端のタンパク質配列 (残基5-24) およびT40.0

トリプテック (tryptic) ペプチド (残基7~12) に由来する2つのオリゴヌクレオチドプローブで、ほぼ5 × 10<sup>5</sup>初代形質転換体をスクリーニングした。その各配列は以下の通りである (Nはすべての4つのntを示す) :

40

(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'

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

C G G C

(1: SEQ ID No. 163; 2: SEQ ID No. 164)

T 4 ポリヌクレオチドキナーゼと共に [  $\gamma$ - $^{32}$ P ] ATP で、合成オリゴヌクレオチドを 10  
 末端標識し、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するのに用いた。  
 ハイブリダイゼーション溶液は、6 × S S C、5 0 m M リン酸ナトリウム ( p H 6 . 8  
 )、0 . 1 % ピロリン酸ナトリウム、2 × デンハート溶液、5 0 μ g / m l サケ精子 D N  
 A、および 2 0 % ホルムアミド (プローブ 1 につき) またはホルムアミド無し (プローブ  
 2 につき) を含有するものであった。5 0 ° C で、0 . 5 × S S C、0 . 2 % S D S、2 m  
 M E D T A (プローブ 1 につき) でフィルターを洗浄するか、あるいは 3 7 0 ° C で、2  
 × S S C、0 . 2 % S D S、2 m M E D T A (プローブ 2 につき) でフィルターを洗浄  
 した。フィルターのオートラジオグラフィは両プローブにハイブリダイズする 1 0 のク  
 ローンを与えた。これらのクローンを、前記したごとく再平板培養およびプローブハイブ  
 リダイゼーションによって精製した。製造業者の指示に従い、アプライド・バイオシステ  
 ムズ (Applied Biosystems) 3 7 3 A 自動 D N A シーケンサーおよびアプライド・バイオ  
 システムズ・タック・ダイデオキシ (Taq DyeDeoxy) (商品名) ターミネーターサイクル  
 配列決定キットを用いて、c D N A クローンを配列決定した。いくつかの場合、製造業者  
 の指示に従い、米国バイオケミカルズ社 (Biochemicals) からの [  $^{35}$ S ] d A T P (Amer  
 sham) およびセクエナーゼ (Sequenase) (商品名) キットを用いて配列を得た。c D N  
 A クローン 4 4 の両鎖は、プライマーとして合成オリゴヌクレオチドを用いることによっ  
 て配列決定した。最も 5 ' の 3 5 0 n t の配列は、7 つの独立した c D N A クローンで決  
 定された。得られたクローンは、図 2 7 ( N D F ) に示したパターンを示した。

#### 実施例 1 9

P 1 8 5<sup>erbB2</sup> 受容体に結合する他のタンパク質の精製およびアッセイ 30

##### I . g p 3 0 および p 7 0 の精製

Lupe et al. ( Science 249, 1552 ( 1990 ) ) およびここに引用して本明細書の一部とみ  
 ならず Lippman および Lupe ( 国際出願 P C T / U S 9 1 / 0 3 4 4 3 ( 1 9 9 0 ) ) は、ヒ  
 ト胸癌細胞系 M D A - M B - 2 3 1 のならし培地からタンパク質を精製している。

Lupe et al. ( Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 2287(1992) ) は、p 1 8 5<sup>erbB2</sup> 受容体に  
 結合するもう 1 つのタンパク質を精製している。この特定のタンパク質 p 7 5 は、1 0 %  
 子ウシ血清 (GIBCO) を補足した改良イーグル培地 ( I M E M : GIBCO ) 中で増殖した S K  
 B r - 3 ( ヒト胸癌細胞系 ) の増殖で用いたならし培地から精製された。

##### II . 他の p 1 8 5<sup>erbB2</sup> リガンド

また、Pelesら ( Cell 69, 205 ( 1992 ) ) は、ラット細胞から 1 8 5<sup>erbB2</sup> 刺激リガンドを 40  
 精製している。Holmesら ( Science 256, 1205 ( 1992 ) ) は、p 1 8 5<sup>erbB2</sup> に結合しそれ  
 を刺激するヒト細胞からヘレグリン を精製している。Tarakovsky et al., Oncogene 6:  
 218 ( 1991 ) は、活性化マクロファージから単離された 2 5 k D のポリペプチドの N e u  
 受容体への結合、p 1 8 5<sup>erbB2</sup> 相同性を示しており、ここに引用して本明細書の一部と  
 みならず。

##### III . N D F 単離

Yarden および Peles ( Biochemistry 30, 3543 ( 1991 ) ) は 1 8 5<sup>erbB2</sup> 受容体を刺激する  
 3 5 キロダルトンの糖タンパク質を同定している。

他の文献において、Davisら ( Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 1536 ( 1991 ) ) , P  
 roc. Natl. Acad. Sci. 88, 8582 ( 1991 ) ) および Greeneら ( 国際出願 P C T / U S 9 1 50

/02331(1990))は、ヒトT-細胞(ATL-2)細胞系のならし培地からのタンパク質の精製を記載している。

ここに引用して本明細書の一部とみなす、Huangら(1992, J. Biol. Chem. 257:11508-11512)は、ウシ腎臓からさらなるneu/erb B2リガンド成長因子を単離している。25kDポリペプチド因子は、カラム分画、続いてのDEAE/セルロース(DE52)、スルファデックス(Sulfadex)(硫酸化セファデックスG-50)、ヘパリン-セファロース4B、およびスーパーデックス(Superdex)75(ファストタンパク質液体クロマトグラフィー)の連続的カラムクロマトグラフィーによって単離された。因子NEL-GFはneu/erb B2遺伝子産物のチロシン特異的自己リン酸化を刺激する。

#### IV. アセチルコリン受容体誘導活性(ARIA)の精製

ARIA、アセチルコリン受容体合成を刺激する42kDタンパク質は、ジェラルド・フィッシュバッハ(Gerald Fischbach)(Falls et al., (1993) Cell 72:801-815)の研究所で単離されている。ARIAは185<sup>erbB2</sup>に類似する185kDa筋肉膜貫通タンパク質のチロシンリン酸化を誘導し、培養した胚性筋管でアセチルコリン受容体合成を刺激する。ARIAはまずはGGF/erb B2リガンド群タンパク質のメンバーであるらしく、これは、グリア細胞分裂促進刺激および本明細書に記載した例えばGGF2の適用で潜在的に有用である。

#### 実施例 19

##### GGFによって媒介されるタンパク質チロシンリン酸化

増殖を誘導する十分なレベルのグリア成長因子での処理に続き、ラット・シュワン細胞は、タンパク質チロシンリン酸化の刺激を示す。実施例9に概略を示した手法に従い、種々の量の部分的に精製したGGFをラット・シュワン細胞の初代培養に適用した。シュワン細胞は、ポリD-リシン被覆した24ウェルプレート中、DMEM/10%子ウシ血清/5μMフォルスコリン/GGF-CM1mL当たり0.5μg(ウェル当たり0.5mL)で増殖させた。密集したら、DMEM/ウェル当たり0.5mLの10%子ウシ血清を細胞に与え、休止するまでインキュベーター中に一晩放置した。翌日、細胞にDMEM/10%子ウシ血清の0.2mLを与え、インキュベーター中に1時間放置した。次いで、テスト試料を、要求される異なる濃度および異なる時間にて直接培地に添加した。次いで、細胞を、沸騰する溶解緩衝液(リン酸ナトリウム、5mM、pH6.8; SDS, 2%, β-メルカプトエタノール, 5%; ジチオスレイトール, 0.1M; グリセロール, 10%; プロモフェノールブルー, 0.4%; パナジン酸ナトリウム, 10mM)中で溶解し、沸騰する水浴中で10分間インキュベートし、次いで、直接分析するか、あるいは-70°Cで凍結した。7.5%SDS-PAGEゲル上で泳動させ、次いで、Towbin et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354によって記載されている標準的な手法を用いてニトロセルロースに電気プロットングすることによって、試料を分析した。プロットしたニトロセルロースを、KampsおよびSelton(1988) Oncogene2:305-315に記載されている標準的な方法を用いて抗ホスホチロシン抗体でプローブした。プローブしたプロットをオートラジオグラフィフィルムに一晩暴露し、標準的な実験方法を用いて展開した。デンストメトリー測定は、ウルトラスキャン(Ultrascan)XL増強レーザーデンストメーター(LKB)を用いて行った。分子量の測定は、予め染色した高分子量のスタンダード(Sigma)に対して行った。タンパク質リン酸化およびシュワン細胞増殖の用量応答は非常に似ている(図33)。リン酸化バンドの分子量はp185<sup>erbB2</sup>の分子量に非常に近い。GGF2HBS5クローンでCOS細胞翻訳体から調製したならし培地でシュワン細胞を処理した場合、同様の結果が得られた。これらの結果は、GGFと、185<sup>erbB2</sup>の活性化との予測される相互作用とよく相関する。

この実験を組換えGGF2で反復した。GGF2クローン(GGF2HBS5)で安定に形質転換したCHO細胞系に由来するならし培地は、前記したアッセイを用いると、タンパク質チロシンリン酸化を刺激する。モックトランスフェクトしたCHO細胞はこの活性を刺激しない。

#### 実施例 20

GGFのN-グリコシル化

GGF-II候補クローンGGF2BPP1、2および3のcDNA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含有する。GGFII02ペプチド配列におけるギャップは、これらのモチーフのうちの1つにおけるアスパラギン残基に合致し、これは、炭水化物は恐らくはこの部位にて結合していることを示す。

GGFのN-グリコシル化は、N-グルカナーゼ、すなわち、炭水化物とタンパク質におけるアスパラギン残基との間の共有結合を切断する酵素と共にインキュベーションした後、SDS-PAGEにおける移動度変化を観察することによって調べた。

GGF-IIのN-グルカナーゼ処理により、MW40~42kDの主たるバンドおよび45~48kDaの従たるバンドが生じた。

10

活性 約45~50kDaにおける単一の脱グリコシル化種

また、GGF-Iでの活性溶出実験は、N-グルカナーゼで処理した場合に電気泳動移動度の増大を示し、これは、MW26~28kDaの活性種を与える。用いた試料におけるバックグラウンド染色のためN-脱グリコシル化バンドは割り当てできないにも拘わらず、銀染色により、移動度のシフトがあることが確認された。

(1) 一般情報:

(i) 出願人: ロバート スクラー、マーク マーシオニ、デイビッド アイ グウィン

(ii) 発明の名称: 筋肉のコンディションを変化させる方法

(iii) 配列の数: 185

(iv) 通信住所:

20

(A) 住所を有するもの: フィッシュ アンド リチャードソン

(B) 通り: 225 フランクリン ストリート

(C) 市: ボストン

(D) 州: マサチューセッツ

(F) 郵便番号: 02110-2804

(v) コンピュータで読める形式:

(A) メディアの型: ディスケット、5.25インチ、360kb容量

(B) コンピュータ: IBM

(C) オペレーティングシステム: PC-DOS

(D) ソフトウェア: ワードパーフェクト (Wordperfect)

30

(vi) 現行の出願データ:

(A) 出願番号:

(B) 出願日:

(C) 分類:

(vii) 先の出願データ:

(A) 出願番号: 08/209,204

(B) 出願日: 1994年3月8日

(vii) 先の出願データ:

(A) 出願番号: 08/059,022

(B) 出願日: 1993年5月6日

40

(viii) 弁護士/代理人の情報:

(A) 氏名: クラーク、ポール ティー

(B) 登録番号: 30,162

(C) リファレンス/ドケット (DOCKET) 番号: 04585/028W01

(ix) テレコミュニケーション (TELECOMMUNICATION) の情報:

(A) 電話: (617) 542-5070

(B) テレファックス: 200154

(2) 配列番号1の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 長さ: 8

50

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号 1 :

**Phe Lys Gly Asp Ala His Thr Glu**  
 1 5

( 2 ) 配列番号 2 の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 13

( B ) 型 : アミノ酸

10

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 1 番目の Xaa はリジンまたはアルギニンであり、12 番目の Xaa は不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号 2 :

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

( 2 ) 配列番号 3 の情報 :

( i ) 配列の性質 :

20

( A ) 長さ : 12

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 1 番目の Xaa はリジンまたはアルギニンであり、10 番目の Xaa は不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号 3 :

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

30

( 2 ) 配列番号 4 の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 9

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 1 番目の Xaa はリジンまたはアルギニンである。

( xi ) 配列 : 配列番号 4 :

**Xaa Lys Leu Gly Glu Met Trp Ala Glu**  
 1 5

40

( 2 ) 配列番号 5 の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 7

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 1 番目の Xaa はリジンまたはアルギニンである。

( xi ) 配列 : 配列番号 5 :

50

**Xaa Leu Gly Glu Lys Arg Ala**  
 1 5

(2) 配列番号6の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 長さ: 16

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(D) 他の情報: 1番目のXaaはリジンまたはアルギニンである。

10

(xi) 配列: 配列番号6:

**Xaa Ile Lys Ser Glu His Ala Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys**  
 1 5 10 15

(2) 配列番号7の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 長さ: 13

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(D) 他の情報: 1番目のXaaはリジンまたはアルギニンである。

20

(xi) 配列: 配列番号7:

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

(2) 配列番号8の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 長さ: 16

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(D) 他の情報: 1番目のXaaはリジンまたはアルギニンである。

30

(xi) 配列: 配列番号8:

**Xaa Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys**  
 1 5 10 15

(2) 配列番号9の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 長さ: 13

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(D) 他の情報: 1番目のXaaはリジンまたはアルギニンであり、12番目のXaaは不明である。

40

(xi) 配列: 配列番号9:

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

(2) 配列番号10の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 長さ: 14

50

( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴 :  
 ( D ) 他の情報 : 1 番目の Xaa はリジンまたはアルギニンである。  
 ( xi ) 配列 : 配列番号 10 :  
**Xaa Ser Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys**  
 1 5 10

( 2 ) 配列番号 11 の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 : 10  
 ( A ) 長さ : 10  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴 :  
 ( D ) 他の情報 : 1 番目の Xaa はリジンまたはアルギニンであり、8 番目の Xaa は不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号 11 :  
**Xaa Ala Gly Tyr Phe Ala Glu Xaa Ala Arg**  
 1 5 10 20

( 2 ) 配列番号 12 の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 9  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴 :  
 ( D ) 他の情報 : 1 番目の Xaa はリジンまたはアルギニンであり、7 番目の Xaa は不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号 12 : 30  
**Xaa Lys Leu Glu Phe Leu Xaa Ala Lys**  
 1 5

( 2 ) 配列番号 13 の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 11  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴 :  
 ( D ) 他の情報 : 1 番目の Xaa はリジンまたはアルギニンである。 40

( xi ) 配列 : 配列番号 13 :  
**Xaa Thr Thr Glu Met Ala Ser Glu Gln Gly Ala**  
 1 5 10

( 2 ) 配列番号 14 の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 10  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴 : 50

( D ) 他の情報：1番目のXaaはリジンまたはアルギニンである。

( xi ) 配列：配列番号14：

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

( 2 ) 配列番号15の情報：

( i ) 配列の性質：

( A ) 長さ：8

( B ) 型：アミノ酸

( C ) 鎖の数：

( D ) トポロジー：直鎖状

10

( ix ) 配列の特徴：

( D ) 他の情報：1番目のXaaはリジンまたはアルギニンである。

( xi ) 配列：配列番号15：

**Xaa Phe Val Leu Gln Ala Lys Lys**  
 1 5

( 2 ) 配列番号16の情報：

( i ) 配列の性質：

( A ) 長さ：6

( B ) 型：アミノ酸

( C ) 鎖の数：

( D ) トポロジー：直鎖状

20

( ix ) 配列の特徴：

( D ) 他の情報：1番目のXaaはリジンまたはアルギニンである。

( xi ) 配列：配列番号16：

**Xaa Leu Gly Glu Met Trp**  
 1 5

( 2 ) 配列番号17の情報：

( i ) 配列の性質：

( A ) 長さ：16

( B ) 型：アミノ酸

( C ) 鎖の数：

( D ) トポロジー：直鎖状

30

( xi ) 配列：配列番号17：

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

( 2 ) 配列番号18の情報：

( i ) 配列の性質：

( A ) 長さ：10

( B ) 型：アミノ酸

( C ) 鎖の数：

( D ) トポロジー：直鎖状

40

( ix ) 配列の特徴：

( D ) 他の情報：8番目のXaaは不明である。

( xi ) 配列：配列番号18：

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

( 2 ) 配列番号19の情報：

( i ) 配列の性質：

( A ) 長さ：7

( B ) 型：アミノ酸

50

- ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴 :  
 ( D ) 他の情報 : 2 番目の Xaa は不明である。  
 ( xi ) 配列 : 配列番号 19 :

**Glu Xaa Lys Phe Tyr Val Pro**  
 1 5

- ( 2 ) 配列番号 20 の情報 :

- ( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 26

10

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

- ( xi ) 配列 : 配列番号 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

- ( 2 ) 配列番号 21 の情報 :

- ( i ) 配列の性質 :

20

( A ) 長さ : 2003

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

- ( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 31 番目および 32 番目の N は A または G でありうる。

- ( xi ) 配列 : 配列番号 21 :



| 170  | 175 | 180 | 185 |      |
|--|-----|-----|-----|------|
| GGG ACC TGG GGC CAC CCC GCC TTC CCC TCC TGC GGG AGG CTC AAG GAG<br>Gly Thr Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu | 190 | 195 | 200 | 867  |
| GAC AGC AGG TAC ATC TTC TTC ATG GAG CCC GAC GCC AAC AGC ACC AGC<br>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<br>Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly | 220 | 225 | 230 | 963  |
| CGG AAC CTC AAG AAG GAG GTC AGC CGG GTG CTG TGC AAG CCG TGC GCC<br>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<br>Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly | 250 | 255 | 260 | 1059 |
| TCC AAA CTA GTC CTT CGG TGT GAA ACC AGT TCT GAA TAC TCC TCT CTC<br>Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu | 270 | 175 | 180 | 1107 |
| AGA TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AAT GAA TTG AAT CGA AAA AAC AAA<br>Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys | 185 | 190 | 195 | 1155 |
| CCA CAA AAT ATC AAG ATA CAA AAA AAG CCA GGG AAG TCA GAA CTT CGC<br>Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg | 200 | 205 | 210 | 1203 |
| ATT AAC AAA GCA TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAG TAT ATG TGC AAA GTG<br>Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val | 215 | 220 | 225 | 1251 |
| ATC AGC AAA TTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAT ATC ACC ATC GTG<br>Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val | 230 | 235 | 240 | 1299 |
| GAA TCA AAC GCT ACA TCT ACA TCC ACC ACT GGG ACA AGC CAT CTT GTA<br>Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val | 250 | 255 | 260 | 1347 |
| AAA TGT GCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT GGA GGG GAG TGC<br>Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys | 265 | 270 | 275 | 1395 |
| TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAC CCC TCG AGA TAC TTG TGC AAG TGC<br>Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys | 280 | 285 | 290 | 1443 |
| CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC<br>Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser | 295 | 300 | 305 | 1491 |
| TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA<br>Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu                         | 400 | 405 | 410 | 1530 |

10

20

30

40

TAGGAGCATG CTCAGTTGGT GCTGCTTTCT TGTTGCTGCA TCTCCCCTCA GATTCCACCT 1590  
 AGAGCTAGAT GTGTCTTACC AGATCTAATA TTGACTGCCT CTGCCTGTCTG CATGAGAACA 1650  
 TTAACAAAAG CAATTGTATT ACTTCCTCTG TTCGCGACTA GTTGGCTCTG AGATACTAAT 1710  
 AGGTGTGTGA GGCTCCGGAT GTTCTGGAA TTGATATTGA ATGATGTGAT ACAAATTGAT 1770  
 AGTCAATATC AAGCAGTGAA ATATGATAAT AAAGGCATT CAAAGTCTCA CTTTTATTGA 1830  
 TAAAATAAAA ATCATTCTAC TGAACAGTCC ATCTTCTTTA TACAATGACC ACATCCTGAA 1890  
 AAGGGTGTG CTAAGCTGTA ACCGATATGC ACTTGAAATG ATGGTAAGTT AATTTTGATT 1950  
 CAGAATGTGT TATTTGTCAC AAATAAACAT AATAAAAGGA AAAAAAAAA AAA 2003

10

( 2 ) 配列番号22の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 12

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 11番目のXaaは不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号22 :

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

20

( 2 ) 配列番号23の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 11

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 9番目のXaaは不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号23 :

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

30

( 2 ) 配列番号24の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 12

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号24 :

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

40

( 2 ) 配列番号25の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 9

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 7番目のXaaは不明である。

50

(xi) 配列：配列番号25：

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

(2) 配列番号26の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 長さ：10

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号26：

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

10

(2) 配列番号27の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 長さ：9

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号27：

**Ala Lys Glu Ala Leu Ala Ala Leu Lys**  
 1 5

20

(2) 配列番号28の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 長さ：7

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号28：

**Phe Val Leu Gln Ala Lys Lys**  
 1 5

30

(2) 配列番号29の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 長さ：21

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号29：

**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

40

(2) 配列番号30の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 長さ：21

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ix) 配列の特徴：

(D) 他の情報：1番目、3番目、17番目および19番目のXaaは不明である。

(xi) 配列：配列番号30：

50

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

**Xaa Gly Xaa Gly Lys**  
 20

( 2 ) 配列番号31の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 13

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

10

( xi ) 配列 : 配列番号31 :

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

( 2 ) 配列番号32の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 8

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

20

( D ) 他の情報 : 6番目のXaaは不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号32 :

**Lys Leu Glu Phe Leu Xaa Ala Lys**  
 1 5

( 2 ) 配列番号33の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 9

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

30

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 1番目のXaaはリジンまたはアルギニンである。

( xi ) 配列 : 配列番号33 :

**Xaa Val His Gln Val Trp Ala Ala Lys**  
 1 5

( 2 ) 配列番号34の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 14

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

40

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 1番目のXaaはリジンまたはアルギニンであり、11番目のXaaは不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号34 :

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

( 2 ) 配列番号35の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 14

50

( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴 :  
 ( D ) 他の情報 : 1 番目の Xaa はリジンまたはアルギニンであり、13 番目の Xaa は不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号 35 :

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

( 2 ) 配列番号 36 の情報 :

10

( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 9  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴 :  
 ( D ) 他の情報 : 1 番目の Xaa はリジンまたはアルギニンである。

( xi ) 配列 : 配列番号 36 :

**Xaa Trp Phe Val Val Ile Glu Gly Lys**  
 1 5

20

( 2 ) 配列番号 37 の情報 :

( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 16  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴 :  
 ( D ) 他の情報 : 1 番目の Xaa はリジンまたはアルギニンである。

( xi ) 配列 : 配列番号 37 :

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

30

( 2 ) 配列番号 38 の情報 :

( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 13  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴 :  
 ( D ) 他の情報 : 1 番目の Xaa はリジンまたはアルギニンである。

( xi ) 配列 : 配列番号 38 :

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

40

( 2 ) 配列番号 39 の情報 :

( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 7  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴 :  
 ( D ) 他の情報 : 1 番目の Xaa はリジンまたはアルギニンであり、6 番目の Xaa は不明であ

50

る。

(xi) 配列：配列番号39：

**Xaa Asp Leu Leu Leu Xaa Val**  
1 5

(2) 配列番号40の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 長さ：39

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

10

(xi) 配列：配列番号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

(2) 配列番号41の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 長さ：24

20

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号41：

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

**Thr Gly Cys Cys Cys Thr Thr Cys**  
20

(2) 配列番号42の情報：

(i) 配列の性質：

30

(A) 長さ：8

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号42：

**Val His Gln Val Trp Ala Ala Lys**  
1 5

(2) 配列番号43の情報：

(i) 配列の性質：

40

(A) 長さ：13

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ix) 配列の特徴：

(D) 他の情報：10番目のXaaは不明である。

(xi) 配列：配列番号43：

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

(2) 配列番号44の情報：

(i) 配列の性質：

50

( A ) 長さ : 13  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴 :  
 ( D ) 他の情報 : 12番目のXaaは不明である。  
 ( xi ) 配列 : 配列番号44 :  
**Leu Gly Ala Trp Gly Pro Pro Ala Phe Pro Val Xaa Tyr**  
 1 5 10

( 2 ) 配列番号45の情報 : 10  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 8  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号45 :  
**Trp Phe Val Val Ile Glu Gly Lys**  
 1 5

( 2 ) 配列番号46の情報 : 20  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 15  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号46 :  
**Ala Ser Pro Val Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Val Gln Arg**  
 1 5 10 15

( 2 ) 配列番号47の情報 : 30  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 12  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号47 :  
**Val Cys Leu Leu Thr Val Ala Ala Leu Pro Pro Thr**  
 1 5 10

( 2 ) 配列番号48の情報 : 40  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 9  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号48 :  
**Lys Val His Gln Val Trp Ala Ala Lys**  
 1 5

( 2 ) 配列番号49の情報 : 50  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 13  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :

- ( D ) トポロジ- : 直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴 :  
 ( D ) 他の情報 : 12番目のXaaは不明である。  
 ( xi ) 配列 : 配列番号49 :

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

- ( 2 ) 配列番号50の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 6  
 ( B ) 型 : アミノ酸  
 ( C ) 鎖の数 :  
 ( D ) トポロジ- : 直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴 :  
 ( D ) 他の情報 : 5番目のXaaは不明である。  
 ( xi ) 配列 : 配列番号50 :

**Asp Leu Leu Leu Xaa Val**  
 1 5

- ( 2 ) 配列番号51の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 20  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジ- : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号51 :

**TTTAAAGGNG AYGNCAYAC** 20

- ( 2 ) 配列番号52の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 21  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジ- : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号52 :

**CATRTAYTCR TAYTCRCNG C** 21

- ( 2 ) 配列番号53の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 20  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジ- : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号53 :

**TGYTCNGANG CCATYTCNGT** 20

- ( 2 ) 配列番号54の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 20  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジ- : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号54 :

**TGYTCRCCTNG CCATYTCNGT** 20

- ( 2 ) 配列番号55の情報 :

10

20

30

40

50

- ( i ) 配列の性質 :
- ( A ) 長さ : 20
- ( B ) 型 : 核酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( xi ) 配列 : 配列番号55 :  
**CCDATNACCA TNGGNACYTT** 20
- ( 2 ) 配列番号56の情報 :
- ( i ) 配列の性質 :
- ( A ) 長さ : 20 10
- ( B ) 型 : 核酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( xi ) 配列 : 配列番号56 :  
**GCNGCCANA CYTGRTGNAC** 20
- ( 2 ) 配列番号57の情報 :
- ( i ) 配列の性質 :
- ( A ) 長さ : 20
- ( B ) 型 : 核酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖 20
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( xi ) 配列 : 配列番号57 :  
**GCYTCNGGYT CCATRAARA** 20
- ( 2 ) 配列番号58の情報 :
- ( i ) 配列の性質 :
- ( A ) 長さ : 20
- ( B ) 型 : 核酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( xi ) 配列 : 配列番号58 :  
**CCYTCDATNA CNACRAACCA** 20 30
- ( 2 ) 配列番号59の情報 :
- ( i ) 配列の性質 :
- ( A ) 長さ : 17
- ( B ) 型 : 核酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( xi ) 配列 : 配列番号59 :  
**TCNGCRAART ANCCNGC** 17
- ( 2 ) 配列番号60の情報 : 40
- ( i ) 配列の性質 :
- ( A ) 長さ : 20
- ( B ) 型 : 核酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( xi ) 配列 : 配列番号60 :  
**GCNGCNAGNG CYTCYTTNGC** 20
- ( 2 ) 配列番号61の情報 :
- ( i ) 配列の性質 :
- ( A ) 長さ : 20 50

- ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号61 :  
**GCNGCYAANG CYTCYTTNGC** 20
- ( 2 ) 配列番号62の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 20  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖 10  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号62 :  
**TTYTTNGCYT GNAGNACRAA** 20
- ( 2 ) 配列番号63の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 20  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号63 :  
**TTYTTNGCYT GYAANACRAA** 20
- ( 2 ) 配列番号64の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 17  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号64 :  
**TGNACNAGYT CYTGNAC** 17
- ( 2 ) 配列番号65の情報 : 30  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 17  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号65 :  
**TGNACYAAYT CYTGNAC** 17
- ( 2 ) 配列番号66の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 21 40  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号66 :  
**CATRTAYTCN CCNGARTCNG C** 21
- ( 2 ) 記列番号67の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 21  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖 50

- (D) トポロジ- : 直鎖状  
 (xi) 配列 : 配列番号67 :  
**CATRTAYTCN CCRCTRTCNG C 21**
- (2) 配列番号68の情報 :  
 (i) 配列の性質 :  
 (A) 長さ : 21  
 (B) 型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジ- : 直鎖状
- (xi) 配列 : 配列番号68 :  
**NGARTCNGCY AANGANGCYT T 21** 10
- (2) 配列番号69の情報 :  
 (i) 配列の性質 :  
 (A) 長さ : 21  
 (B) 型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジ- : 直鎖状
- (xi) 配列 : 配列番号69 :  
**NGARTCNGCN AGNGANGCYT T 21**
- (2) 配列番号70の情報 :  
 (i) 配列の性質 :  
 (A) 長さ : 21  
 (B) 型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジ- : 直鎖状
- (xi) 配列 : 配列番号70 :  
**RCTRTCNGCY AANGANGCYT T 21** 20
- (2) 配列番号71の情報 :  
 (i) 配列の性質 :  
 (A) 長さ : 21  
 (B) 型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジ- : 直鎖状
- (xi) 配列 : 配列番号71 :  
**RCTRTCNGCN AGNGANGCYT T 21** 30
- (2) 配列番号72の情報 :  
 (i) 配列の性質 :  
 (A) 長さ : 21  
 (B) 型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジ- : 直鎖状
- (xi) 配列 : 配列番号72 :  
**NGARTCNGCY AARCTNGCYT T 21** 40
- (2) 配列番号73の情報 :  
 (i) 配列の性質 :  
 (A) 長さ : 21  
 (B) 型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジ- : 直鎖状
- (xi) 配列 : 配列番号73 : 50

|                                |           |    |
|--------------------------------|-----------|----|
| <b>NGARTCNGCN AGRCTNGCYT T</b> | <b>21</b> |    |
| ( 2 ) 配列番号74の情報 :              |           |    |
| ( i ) 配列の性質 :                  |           |    |
| ( A ) 長さ : 21                  |           |    |
| ( B ) 型 : 核酸                   |           |    |
| ( C ) 鎖の数 : 一本鎖                |           |    |
| ( D ) トポロジ : 直鎖状               |           |    |
| ( xi ) 配列 : 配列番号74 :           |           |    |
| <b>RCTRTCNGCY AARCTNGCYT T</b> | <b>21</b> |    |
| ( 2 ) 配列番号75の情報 :              |           | 10 |
| ( i ) 配列の性質 :                  |           |    |
| ( A ) 長さ : 21                  |           |    |
| ( B ) 型 : 核酸                   |           |    |
| ( C ) 鎖の数 : 一本鎖                |           |    |
| ( D ) トポロジ : 直鎖状               |           |    |
| ( xi ) 配列 : 配列番号75 :           |           |    |
| <b>RCTRCTNGCN AGRCTNGCYT T</b> | <b>21</b> |    |
| ( 2 ) 配列番号76の情報 :              |           |    |
| ( i ) 配列の性質 :                  |           |    |
| ( A ) 長さ : 20                  |           | 20 |
| ( B ) 型 : 核酸                   |           |    |
| ( C ) 鎖の数 : 一本鎖                |           |    |
| ( D ) トポロジ : 直鎖状               |           |    |
| ( xi ) 配列 : 配列番号76 :           |           |    |
| <b>ACNACNGARA TGGCTCNGA</b>    | <b>20</b> |    |
| ( 2 ) 配列番号77の情報 :              |           |    |
| ( i ) 配列の性質 :                  |           |    |
| ( A ) 長さ : 20                  |           |    |
| ( B ) 型 : 核酸                   |           |    |
| ( C ) 鎖の数 : 一本鎖                |           | 30 |
| ( D ) トポロジ : 直鎖状               |           |    |
| ( xi ) 配列 : 配列番号77 :           |           |    |
| <b>ACNACNGARA TGGCAGYNGA</b>   | <b>20</b> |    |
| ( 2 ) 配列番号78の情報 :              |           |    |
| ( i ) 配列の性質 :                  |           |    |
| ( A ) 長さ : 20                  |           |    |
| ( B ) 型 : 核酸                   |           |    |
| ( C ) 鎖の数 : 一本鎖                |           |    |
| ( D ) トポロジ : 直鎖状               |           |    |
| ( xi ) 配列 : 配列番号78 :           |           | 40 |
| <b>CAYCARGTNT GGGCNGCAA</b>    | <b>20</b> |    |
| ( 2 ) 配列番号79の情報 :              |           |    |
| ( i ) 配列の性質 :                  |           |    |
| ( A ) 長さ : 20                  |           |    |
| ( B ) 型 : 核酸                   |           |    |
| ( C ) 鎖の数 : 一本鎖                |           |    |
| ( D ) トポロジ : 直鎖状               |           |    |
| ( xi ) 配列 : 配列番号79 :           |           |    |
| <b>TTYGTNGTNA THGARGGNA</b>    | <b>20</b> |    |
| ( 2 ) 配列番号80の情報 :              |           | 50 |

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 20

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号80 :

**AARGGNGAYG CNCAYACNGA** 20

( 2 ) 配列番号81の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 20

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号81 :

**GARGCNYTNG CNGCNYTNA** 20

( 2 ) 配列番号82の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 20

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号82 :

**GTNGGNTCNG TNCARGARYT** 20

( 2 ) 配列番号83の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 20

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号83 :

**GTNGGNAGYG TNCARGARYT** 20

( 2 ) 配列番号84の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 21

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号84 :

**NACYTTYTTN ARDATYTGNC C** 21

( 2 ) 配列番号85の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 417

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ : 一直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 14番目、23番目、90番目、100番目、126番目および135番目のXaaは終止コドンである。

( xi ) 配列 : 配列番号85 :

10

20

30

40

TCTAA AAC TAC AGA GAC TGT ATT TTC ATG ATC ATC ATA GTT CTG TGA AAT ATE  
 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  |     |
| 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  | 10  |
| 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  |     |
| 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 | 20  |
| 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 |     |     |

( 2 ) 配列番号86の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 33

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 19番目、25番目および31番目のNはイノシンである。Yはシチジンまたはチミジンでありうる。

( xi ) 配列 : 配列番号86 :

**CCGAATTCTG CAGGARACNC ARCCNGAYCC NGG 33**

( 2 ) 配列番号87の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 37

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 14番目、20番目、23番目、29番目および35番目のNはイノシンである。

( xi ) 配列 : 配列番号87 :

**AAGGATCCTG CAGNGTRTAN GCNCCDATNA CCAATNGG 37**

( 2 ) 配列番号88の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 34

( B ) 型 : 核酸

10

20

30

40

50

( C ) 鎖の数：一本鎖

( D ) トポロジー：直鎖状

( ix ) 配列の特徴：

( D ) 他の情報：16番目、21番目および24番目のNはイノシンである。Yはシチジンまたはチミジンでありうる。

( xi ) 配列：配列番号88：

**CCGAATTCTG CAGGCNGAYT CNGGNGARTA YATG 34**

( 2 ) 配列番号89の情報：

( i ) 配列の性質：

( A ) 長さ：33

10

( B ) 型：核酸

( C ) 鎖の数：一本鎖

( D ) トポロジー：直鎖状

( ix ) 配列の特徴：

( D ) 他の情報：16番目および25番目のNはイノシンである。Yはシチジンまたはチミジンでありうる。

( xi ) 配列：配列番号89：

**CCGAATTCTG CAGGCNGAYA GYGGNGARTA YAT 33**

( 2 ) 配列番号90の情報：

( i ) 配列の性質：

20

( A ) 長さ：34

( B ) 型：核酸

( C ) 鎖の数：一本鎖

( D ) トポロジー：直鎖状

( ix ) 配列の特徴：

( D ) 他の情報：14番目、15番目、16番目、26番目および29番目のNはイノシンである。Yはシチジンまたはチミジンでありうる。

( xi ) 配列：配列番号90：

**AAGGATCCTG CAGNNCATR TAYTCNCCNG ARTC 34**

( 2 ) 配列番号91の情報：

30

( i ) 配列の性質：

( A ) 長さ：34

( B ) 型：核酸

( C ) 鎖の数：一本鎖

( D ) トポロジー：直鎖状

( ix ) 配列の特徴：

( D ) 他の情報：14番目、15番目、16番目および26番目のNはイノシンである。Yはシチジンまたはチミジンでありうる。

( xi ) 配列：配列番号91：

**AAGGATCCTG CAGNNCATR TAYTCNCCRC TRTC 34**

40

( 2 ) 配列番号92の情報：

( i ) 配列の性質：

( A ) 長さ：33

( B ) 型：核酸

( C ) 鎖の数：一本鎖

( D ) トポロジー：直鎖状

( ix ) 配列の特徴：

( D ) 他の情報：21番目、28番目および31番目のNはイノシンである。Yはシチジンまたはチミジンでありうる。

( xi ) 配列：配列番号92：

50

**CCGAATTCTG CAGCAYCARG TNTGGGCNGC NAA 33**

- ( 2 ) 配列番号93の情報：  
 ( i ) 配列の性質：  
 ( A ) 長さ：35  
 ( B ) 型：核酸  
 ( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴：  
 ( D ) 他の情報：31番目の N はイノシンである。 Y はシチジンまたはチミジンでありうる。

10

**( xi ) 配列：配列番号93：  
CCGAATTCTG CAGATHHTTYT TYATGGARCC NGARG 35**

- ( 2 ) 配列番号94の情報：  
 ( i ) 配列の性質：  
 ( A ) 長さ：35  
 ( B ) 型：核酸  
 ( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴：  
 ( D ) 他の情報：18番目、21番目、24番目、27番目および33番目の N はイノシンである。 Y はシチジンまたはチミジンでありうる。

20

**( xi ) 配列：配列番号94：  
CCGAATTCTG CAGGGGGNCC NCCNGCNTTY CCGGT 35**

- ( 2 ) 配列番号95の情報：  
 ( i ) 配列の性質：  
 ( A ) 長さ：33  
 ( B ) 型：核酸  
 ( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴：  
 ( D ) 他の情報：21番目および24番目の N はイノシンである。 Y はシチジンまたはチミジンでありうる。

30

**( xi ) 配列：配列番号95：  
CCGAATTCTG CAGTGGTTYG TNGTNATHGA RGC 33**

- ( 2 ) 配列番号96の情報：  
 ( i ) 配列の性質：  
 ( A ) 長さ：34  
 ( B ) 型：核酸  
 ( C ) 鎖の数：一本鎖  
 ( D ) トポロジー：直鎖状  
 ( ix ) 配列の特徴：  
 ( D ) 他の情報：17番目、20番目および26番目の N はイノシンである。 Y はシチジンまたはチミジンでありうる。

40

**( xi ) 配列：配列番号96：  
AAGGATCCTG CAGYTTNGCN GCCCANACYT GRTG 34**

- ( 2 ) 配列番号97の情報：  
 ( i ) 配列の性質：  
 ( A ) 長さ：33  
 ( B ) 型：核酸  
 ( C ) 鎖の数：一本鎖

50

( D ) トポロジ- : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 19番目の N はイノシンである。 Y はシチジンまたはチミジンでありうる。

( xi ) 配列 : 配列番号 97 :

**AAGGATCCTG CAGGCYTCNG GYTCCATRAA RAA 33**

( 2 ) 配列番号 98 の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 33

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ- : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 16番目、22番目、25番目、28番目および31番目の N はイノシンである。

( xi ) 配列 : 配列番号 98 :

**AAGGATCCTG CAGACNGGRA ANGCNGGNGG NCC 33**

( 2 ) 配列番号 99 の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 35

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ- : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 17番目、26番目および29番目の N はイノシンである。 Y はシチジンまたはチミジンでありうる。

( xi ) 配列 : 配列番号 99 :

**AAGGATCCTG CAGYTTNCCY TCDATNACNA CRAAC 35**

( 2 ) 配列番号 100 の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 33

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ- : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 18番目の N はイノシンである。 Y はシチジンまたはチミジンでありうる。

( xi ) 配列 : 配列番号 100 :

**CATRTAYTCR TAYTCTCNGC AAGGATCCTG CAG 33**

( 2 ) 配列番号 101 の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 33

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ- : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 19番目、25番目および31番目の N はイノシンである。 Y はシチジンまたはチミジンでありうる。

( xi ) 配列 : 配列番号 101 :

**CCGAATTCTG CAGAARGGNG AYGNCAYAC NGA 33**

( 2 ) 配列番号 102 の情報 :

10

20

30

40

50

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 33

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 3 番目および18番目の N はイノシンである。 Y はシチジンまたはチミジンでありうる。

( xi ) 配列 : 配列番号102 :

**GCNGCYAANG CYTCYTTNGC AAGGATCCTG CAG 33**

10

( 2 ) 配列番号103の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 33

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 3 番目、6 番目、9 番目および18番目の N はイノシンである。 Y はシチジンまたはチミジンでありうる。

( xi ) 配列 : 配列番号103 :

**GCNGCNAGNG CYTCYTTNGC AAGGATCCTG CAG 33**

20

( 2 ) 配列番号104の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 30

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 3 番目、12番目および15番目の N はイノシンである。 Y はシチジンまたはチミジンでありうる。

( xi ) 配列 : 配列番号104 :

**TCNGCRAART ANCCNGCAAG GATCCTGCAG 30**

30

( 2 ) 配列番号105の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 38

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号105 :

**CATCGATCTG CAGGCTGATT CTGGAGAATA TATGTGCA 38**

40

( 2 ) 配列番号106の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 37

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号106 :

**AAGGATCCTG CAGCCACATC TCGAGTCGAC ATCGATT 37**

( 2 ) 配列番号107の情報 :

( i ) 配列の性質 :

50

- ( A ) 長さ : 37  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号107 :  
**CCGAATTCTG CAGTGATCAG CAAACTAGGA AATGACA** 37
- ( 2 ) 配列番号108の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 37  
 ( B ) 型 : 核酸 10  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号108 :  
**CATCGATCTG CAGCCTAGTT TGCTGATCAC TTTGCAC** 37
- ( 2 ) 配列番号109の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 37  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状 20  
 ( xi ) 配列 : 配列番号109 :  
**AAGGATCCTG CAGTATATTC TCCAGAATCA GCCAGTG** 37
- ( 2 ) 配列番号110の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 34  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号110 :  
**AAGGATCCTG CAGGCACGCA GTAGGCATCT CTTA** 34 30
- ( 2 ) 配列番号111の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 35  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号111 :  
**CCGAATTCTG CAGCAGAACT TCGCATTAGC AAAGC** 35
- ( 2 ) 配列番号112の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 : 40  
 ( A ) 長さ : 33  
 ( B ) 型 : 核酸  
 ( C ) 鎖の数 : 一本鎖  
 ( D ) トポロジー : 直鎖状  
 ( xi ) 配列 : 配列番号112 :  
**CATCCGGGA TGAAGAGTCA GGAGTCTGTG GCA** 33
- ( 2 ) 配列番号113の情報 :  
 ( i ) 配列の性質 :  
 ( A ) 長さ : 39  
 ( B ) 型 : 核酸 50

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号113 :

**ATACCCGGGC TGCAGACAAT GAGATTCAC ACACCTGCG** 39

( 2 ) 配列番号114の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 36

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

10

( xi ) 配列 : 配列番号114 :

**AAGGATCCTG CAGTTGGAA CCTGCCACAG ACTCCT** 36

( 2 ) 配列番号115の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 39

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号115 :

**ATACCCGGGC TGCAGATGAG ATTCACACA CCTGCGTGA** 39 20

( 2 ) 配列番号116の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 12

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号116 :

**His Gln Val Trp Ala Ala Lys Ala Ala Gly Leu Lys**  
 1 5 10

( 2 ) 配列番号117の情報 :

30

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 16

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号117 :

**Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Asn**  
 1 5 10 15

( 2 ) 配列番号118の情報 :

( i ) 配列の性質 :

40

( A ) 長さ : 13

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 12番目のXaaは不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号118 :

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

( 2 ) 配列番号119の情報 :

50

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 23

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号119 :

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

10

( 2 ) 配列番号120の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 13

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 10番目のXaaは不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号120 :

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

20

( 2 ) 配列番号121の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 23

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号121 :

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

30

Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu  
 20

( 2 ) 配列番号122の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 14

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号122 :

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

40

( 2 ) 配列番号123の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 16

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号123 :

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

50

( 2 ) 配列番号124の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 26

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号124 :

**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

10

( 2 ) 配列番号125の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 13

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 12番目のXaaは不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号125 :

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

20

( 2 ) 配列番号126の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 23

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号126 :

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

30

**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

( 2 ) 配列番号127の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 12

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号127 :

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

40

( 2 ) 配列番号128の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 22

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

50



|   |  |     |
|---|--|-----|
| CCTGCAG CAT CAA GTG TGG GCG GCG AAA GCC GGG GGC TTG AAG AAG GAC TCG CTG<br>55   | His Gln Val Trp Ala Ala Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu<br>1 5 10 15 |     |
| CTC ACC GTG CGC CTG GGC GCC TGG GGC CAC CCC GCC TTC CCC TCC TGC<br>Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys<br>20 25 30            |  | 103 |
| GGG CGC CTC AAG GAG GAC AGC AGG TAC ATC TTC TTC ATG GAG CCC GAG<br>Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu<br>35 40 45            |  | 151 |
| GCC AAC AGC AGC GGC GGG CCC GGC CGC CTT CCG AGC CTC CTT CCC CCC<br>Ala Asn Ser Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu Pro Ser Leu Leu Pro Pro<br>50 55 60            |  | 199 |
| TCT CGA GAC GGG CCG GAA CCT CAA GAA GGA GGT CAG CCG GGT GCT GTG<br>Ser Arg Asp Gly Pro Glu Pro Gln Glu Gly Gly Gln Pro Gly Ala Val<br>65 70 75 80         |  | 247 |
| CAA CGG TGC GCC TTG CCT CCC CGC TTG AAA GAG ATG AAG AGT CAG GAG<br>Gln Arg Cys Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu<br>85 90 95            |  | 295 |
| TCT GTG GCA GGT TCC AAA CTA GTG CTT CGG TGC GAG ACC AGT TCT GAA<br>Ser Val Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu<br>100 105 110         |  | 343 |
| TAC TCC TCT CTC AAG TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AGT GAA TTA AGC<br>Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Ser Glu Leu Ser<br>115 120 125         |  | 391 |
| CGA AAG AAC AAA CCA GAA AAC ATC AAG ATA CAG AAA AGG CCG GGG AAG<br>Arg Lys Asn Lys Pro Glu Asn Ile Lys Ile Gln Lys Arg Pro Gly Lys<br>130 135 140         |  | 439 |
| TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA GCG TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA TAT<br>Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Ser Gly Glu Tyr<br>145 150 155 160 |  | 487 |
| ATG TGC AAA GTG ATC AGC AAA CTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAC<br>Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn<br>165 170 175         |  | 535 |
| ATC ACC ATT GTG GAG TCA AAC GGT AAG AGA TGC CTA CTG CGT GCT ATT<br>Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Gly Lys Arg Cys Leu Leu Arg Ala Ile<br>180 185 190         |  | 583 |
| TCT CAG TCT CTA AGA GGA GTG ATC AAG GTA TGT GGT CAC ACT<br>Ser Gln Ser Leu Arg Gly Val Ile Lys Val Cys Gly His Thr<br>195 200 205                         |  | 625 |
| TGAATCACGC AGGTGTGTGA AATCTCATTG TGAACAAATA AAAATCATGA AAGGAAAAAA<br>AAAAA  |  | 685 |
| AAAAA AATCGATGTC GACTCGAGAT GTGGCTGCAG GTCGACTCTA GAGGATCCC   |  | 744 |

( 2 ) 配列番号130の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 1193

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号130 :

10

20

30

40

|               |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |     |     |
|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|-----|
| CCTGCAG<br>55 | CAT        | CAA        | GTG        | TGG        | GCG        | GCG        | AAA        | GCC        | GGG        | GGC        | TTG        | AAG        | AAG        | GAC        | TCG        | CTG |     |
|               | His        | Gln        | Val        | Trp        | Ala        | Ala        | Lys        | Ala        | Gly        | Gly        | Leu        | Lys        | Lys        | Asp        | Ser        | Leu |     |
|               | 1          |            |            |            | 5          |            |            |            |            | 10         |            |            |            |            | 15         |     |     |
| CTC<br>Leu    | ACC<br>Thr | GTG<br>Val | CGC<br>Arg | CTG<br>Leu | GGC<br>Gly | GCC<br>Ala | TGG<br>Trp | GGC<br>Gly | CAC<br>His | CCC<br>Pro | GCC<br>Ala | TTC<br>Phe | CCC<br>Pro | TCC<br>Ser | TGC<br>Cys |     | 103 |
|               |            | 20         |            |            |            |            | 25         |            |            |            |            |            | 30         |            |            |     |     |
| GGG<br>Gly    | CGC<br>Arg | CTC<br>Leu | AAG<br>Lys | GAG<br>Glu | GAC<br>Asp | AGC<br>Ser | AGG<br>Arg | TAC<br>Tyr | ATC<br>Ile | TTC<br>Phe | TTC<br>Phe | ATG<br>Met | GAG<br>Glu | CCC<br>Pro | GAG<br>Glu |     | 151 |
|               |            | 35         |            |            |            |            | 40         |            |            |            |            | 45         |            |            |            |     |     |
| GCC<br>Ala    | AAC<br>Lys | AGC<br>Ser | AGC<br>Ser | GGC<br>Gly | GGG<br>Gly | CCC<br>Pro | GGC<br>Gly | CGC<br>Arg | CTT<br>Leu | CCG<br>Pro | AGC<br>Ser | CTC<br>Leu | CTT<br>Leu | CCC<br>Pro | CCC<br>Pro |     | 199 |
|               | 50         |            |            |            |            | 55         |            |            |            |            | 60         |            |            |            |            |     | 10  |
| TCT<br>Ser    | CGA<br>Arg | GAC<br>Asp | GGG<br>Gly | CCG<br>Pro | GAA<br>Glu | CCT<br>Pro | CAA<br>Gln | GAA<br>Glu | GGA<br>Gly | GGT<br>Gly | CAG<br>Gln | CCG<br>Pro | GGT<br>Gly | GCT<br>Ala | GTG<br>Val |     | 247 |
|               |            |            |            |            | 70         |            |            |            |            | 75         |            |            |            |            | 80         |     |     |
| CAA<br>Gln    | CGG<br>Arg | TGC<br>Cys | GCC<br>Ala | TTG<br>Leu | CCT<br>Pro | CCC<br>Pro | CGC<br>Arg | TTG<br>Leu | AAA<br>Lys | GAG<br>Glu | ATG<br>Met | AAG<br>Lys | AGT<br>Ser | CAG<br>Gln | GAG<br>Glu |     | 295 |
|               |            |            |            | 85         |            |            |            |            | 90         |            |            |            |            | 95         |            |     |     |
| TCT<br>Ser    | GTG<br>Val | GCA<br>Ala | GGT<br>Gly | TCC<br>Ser | AAA<br>Lys | CTA<br>Leu | GTG<br>Val | CTT<br>Leu | CGG<br>Arg | TGC<br>Cys | GAG<br>Glu | ACC<br>Thr | AGT<br>Ser | TCT<br>Ser | GAA<br>Glu |     | 343 |
|               |            |            | 100        |            |            |            |            | 105        |            |            |            |            | 110        |            |            |     | 20  |
| TAC<br>Tyr    | TCC<br>Ser | TCT<br>Ser | CTC<br>Leu | AAG<br>Lys | TTC<br>Phe | AAG<br>Lys | TGG<br>Trp | TTC<br>Phe | AAG<br>Lys | AAT<br>Asn | GGG<br>Gly | AGT<br>Ser | GAA<br>Glu | TTA<br>Leu | AGC<br>Ser |     | 391 |
|               |            |            | 115        |            |            |            | 120        |            |            |            |            | 125        |            |            |            |     |     |
| CGA<br>Arg    | AAG<br>Lys | AAC<br>Asn | AAA<br>Lys | CCA<br>Gly | GAA<br>Gly | AAC<br>Asn | ATC<br>Ile | AAG<br>Lys | ATA<br>Ile | CAG<br>Gln | AAA<br>Lys | AGG<br>Arg | CCG<br>Pro | GGG<br>Gly | AAG<br>Lys |     | 439 |
|               | 130        |            |            |            |            | 135        |            |            |            |            | 140        |            |            |            |            |     |     |
| TCA<br>Ser    | GAA<br>Glu | CTT<br>Leu | CGC<br>Arg | ATT<br>Ile | AGC<br>Ser | AAA<br>Lys | GCG<br>Ala | TCA<br>Ser | CTG<br>Leu | GCT<br>Ala | GAT<br>Asp | TCT<br>Ser | GGA<br>Gly | GAA<br>Glu | TAT<br>Tyr |     | 487 |
|               | 145        |            |            |            | 150        |            |            |            |            | 155        |            |            |            |            | 160        |     |     |
| ATG<br>Met    | TGC<br>Cys | AAA<br>Lys | GTG<br>Val | ATC<br>Ile | AGC<br>Ser | AAA<br>Lys | CTA<br>Leu | GGA<br>Gly | AAT<br>Asn | GAC<br>Asp | AGT<br>Ser | GCC<br>Ala | TCT<br>Ser | GCC<br>Ala | AAC<br>Asn |     | 535 |
|               |            |            | 165        |            |            |            |            |            | 170        |            |            |            |            | 175        |            |     | 30  |
| ATC<br>Ile    | ACC<br>Thr | ATT<br>Ile | GTG<br>Val | GAG<br>Glu | TCA<br>Ser | AAC<br>Asn | GCC<br>Ala | ACA<br>Thr | TCC<br>Ser | ACA<br>Thr | TCT<br>Ser | ACA<br>Thr | GCT<br>Ala | GGG<br>Gly | ACA<br>Thr |     | 583 |
|               |            |            | 180        |            |            |            | 185        |            |            |            |            |            | 190        |            |            |     |     |
| AGC<br>Ser    | CAT<br>His | CTT<br>Leu | GTC<br>Val | AAG<br>Lys | TGT<br>Ser | GCA<br>Ala | GAG<br>Glu | AAG<br>Lys | GAG<br>Glu | AAA<br>Lys | ACT<br>Thr | TTC<br>Phe | TGT<br>Cys | GTG<br>Val | AAT<br>Asn |     | 631 |
|               |            | 195        |            |            |            | 200        |            |            |            |            |            | 205        |            |            |            |     |     |
| GGA<br>Gly    | GGC<br>Gly | GAG<br>Glu | TGC<br>Cys | TTC<br>Phe | ATG<br>Met | GTG<br>Val | AAA<br>Lys | GAC<br>Asp | CTT<br>Leu | TCA<br>Ser | AAT<br>Asn | CCC<br>Pro | TCA<br>Ser | AGA<br>Arg | TAC<br>Tyr |     | 679 |
|               | 210        |            |            |            |            | 215        |            |            |            |            | 220        |            |            |            |            |     |     |
| TTG<br>Leu    | TGC<br>Cys | AAG<br>Lys | TGC<br>Cys | CAA<br>Gln | CCT<br>Pro | GGA<br>Gly | TTC<br>Phe | ACT<br>Thr | GGA<br>Gly | GCG<br>Ala | AGA<br>Arg | TGT<br>Cys | ACT<br>Thr | GAG<br>Glu | AAT<br>Asn |     | 727 |
|               | 225        |            |            |            | 230        |            |            |            |            | 235        |            |            |            |            | 240        |     | 40  |



| 100   | 105 | 110 |                                    |
|---|-----|-----|------------------------------------|
| TAC TCC TCT CTC AAG TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AGT GAA TTA AGC<br>Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Ser Glu Leu Ser<br>115   | 120 | 125 | 391                                |
| CGA AAG AAC AAA CCA GAA AAC ATC AAG ATA CAG AAA AGG CCG GGG AAG<br>Arg Lys Asn Lys Pro Glu Asn Ile Lys Ile Gln Lys Arg Pro Pro Lys<br>130   | 135 | 140 | 439                                |
| TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA GCG TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA TAT<br>Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr<br>145   | 150 | 155 | 487                                |
| ATG TGC AAA GTG ATC AGC AAA CTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAC<br>Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn<br>165   | 170 | 175 | 535                                |
| ATC ACC ATT GTG GAG TCA AAC GCC ACA TCC ACA TCT ACA GCT GGG ACA<br>Ile Arg Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Ala Gly Thr<br>180   | 185 | 190 | 583                                |
| AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT<br>Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn<br>195   | 200 | 205 | 631                                |
| GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC<br>Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr<br>210   | 215 | 220 | 679                                |
| TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC<br>Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr<br>225   | 230 | 235 | 727                                |
| GTA ATG GCC AGC TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT<br>Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro<br>245   | 250 | 255 | 775                                |
| GAA TAGCGCATCT CAGTCGGTGC CGCTTTCTTG TTGCCGCATC TCCCCTCAGA TTCCGCCTAG<br>838<br>Glu   |     |     |                                    |
| AGCTAGATGC GTTTTACCAG GTCTAACATT GACTGCCTCT GCCTGTCCGA TGAGAACATT<br>AACACAAGCG ATTGTATGAC TTCCTCTGTC CGTGACTAGT GGGCTCTGAG CTACTCGTAG<br>GTCCGTAAGG CTCCAGTGT TCTGAAATTG ATCTTGAATT ACTGTGATAC GACATGATAG<br>TCCCTCTCAC CCAGTGCAAT GACAATAAAG GCCTTGAAAA GTCAAAAAAA AAAAAAAAAA<br>AAAAATCGAT GTCGACTCGA GATGTGGCTG |     |     | 898<br>958<br>1018<br>1078<br>1108 |

10

20

30

40

- ( 2 ) 配列番号132の情報 :
- ( i ) 配列の性質 :
- ( A ) 長さ : 559
- ( B ) 型 : 核酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( ix ) 配列の特徴 :
- ( D ) 他の情報 : 214番目の N は不明である。
- ( xi ) 配列 : 配列番号132 :

AGTTTCCCCC CCCAACTTGT CGGAACTCTG GGCTCGCGCG CAGGGCAGGA GCGGAGCGGC  
60

GGCGGCTGCC CAGGCGATGC GAGCGCGGGC CGGACGGTAA TCGCCTCTCC CTCCTCGGGC  
120

TGGGAGCGCG CCGGACCGAG GCAGCGACAG GAGCGGACCG CCGCGGGAAC CGAGGACTCC  
180

CCAGCGGGCG GCCAGCAGGA GCCACCCCGC GAGNCGTGCG ACCGGGACGG AGCGCCCGCC  
240

AGTCCCAGGT GGCCCGGACC GCACGTTGCG TCCCCGCGCT CCCC GCCCGC GACAGGAGAC  
300

GCTCCCCCCC ACGCCGCGCG CGCCTCGGCC CGGTGCTGG CCCGCCTCCA CTCGCGGGAC  
360

AAACTTTTCC CGAAGCCGAT CCCAGCCCTC GGACCCAAAC TTGTGCGCGG TCGCCTTCGC  
420

CGGGAGCCGT CCGCGCAGAG CGTGCACTTC TCGGGCGAG ATG TCG GAG CGC AGA  
474

Met Ser Glu Arg Arg  
1 5

GAA GGC AAA GGC AAG GGG AAG GGC GGC AAG AAG GAC CGA GGC TCC GGG  
522

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 G  
559

Lys Lys Pro Val Pro Ala Ala Gly Gly Pro Ser Pro Ala  
25 30

( 2 ) 配列番号133の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 252

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 8番目のNはAまたはGでありうる。

( xi ) 配列 : 配列番号133 :

10

20

30

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 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

10

20

( 2 ) 配列番号134の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 178

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号134 :

CCT TGC CTC CCC GCT TGA AAG AGA TGA AGA GTC AGG AGT CTG TGG CAG  
 48  
 Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu His Lys Ser Gln Glu Ser Val Ala Gly  
 1 5 10 15  
 GTT CCA AAC TAG TGC TTC GGT GCG AGA CCA GTT CTG AAT ACT CCT CTC  
 96  
 Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu  
 20 25 30  
 TCA AGT TCA AGT GGT TCA AGA ATG GGA GTG AAT TAA GCC GAA AGA ACA  
 144  
 Lys Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Ser Glu Leu Ser Arg Lys Asn Lys  
 35 40 45  
 AAC CAC AAA ACA TCA AGA TAC AGA AAA GGC CGG G  
 178  
 Pro Gly Asn Ile Lys Ile Gln Lys Arg Pro Gly  
 50 55

30

40

( 2 ) 配列番号135の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 122

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号135 :

G AAG TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA GCG TCA CTG GCT GAT TCT GGA

46

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

GAA TAT ATG TGC AAA GTG ATC AGC AAA CTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT

94

Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser  
20 25 30

GCC AAC ATC ACC ATT GTG GAG TCA AAC G

122

Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala  
35

10

( 2 ) 配列番号136の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 417

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号136 :

TCTAAACTA CAGAGACTGT ATTTTCATGA TCATCATAGT TCTGTGAAAT ATACTTAAAC  
60

CGCTTTGGTC CTGATCTTGT AGG AAG TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA GCG  
110

20

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

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

30

Lys Arg Cys Leu Leu Arg Ala Ile Ser Gln Ser Leu Arg Gly Val Ile  
45 50 55

AAG GTA TGT GGT CAC ACT TGAATCACGC AGGTGTGTGA AATCTCATTG

302

Lys Val Cys Gly His Thr  
60

TGAACAAATA AAAATCATGA AAGGAAACT CTATGTTGA AATATCTTAT GGGTCCTCCT  
362

GTAAGCTCT TCACTCCATA AGGTGAAATA GACCTGAAAT ATATATAGAT TATTT  
417

40

( 2 ) 配列番号137の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 102

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号137 :

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  
 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

10

( 2 ) 配列番号138の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 69

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号138 :

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

20

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

( 2 ) 配列番号139の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 60

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号139 :

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

30

GCC AGC TTC TAC  
 60  
 Ala Ser Phe Tyr  
 20

( 2 ) 配列番号140の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 36

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号140 :

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

40

( 2 ) 配列番号141の情報 :

( i ) 配列の性質 :

50

( A ) 長さ : 27

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号141 :

**AAG CAT CTT GCG ATT GAA TTT ATG GAG**  
**27**

**Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu**  
**1 5**

( 2 ) 配列番号142の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 569

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号142 :

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  
 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  
 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  
 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

( 2 ) 配列番号143の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 735

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号143 :

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

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  
100 105 110

GAG CCG GTT AAG AAA CTC ACC AAC AGC AGC CCG CCG 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  
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  
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 GTAAAACCTT ATTTTATATA ATAAAGTATT CCACCTTAAA TTAAACAA  
730

10

20

30

40

50

( 2 ) 配列番号144の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 1654

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号144 :

**AGTTTCCCCC CCCAACTTGT CCGAACTCTG GGCTCGCGCG CAGGGCAGGA GCGGAGCGGC**  
60

**GGCGGCTGCC CAGGCGATGC GAGCGCGGGC CGGACGGTAA TCGCCTCTCC CTCCTCGGGC**  
120

**TGCGAGCGCG CCGGACCGAG GCAGCGACAG GAGCGGACCG CCGCGGGAAC CGAGGACTCC**  
180

**CCAGCGGCGC GCCAGCAGGA GCCACCCCGC GAGCGTGCGA CCGGGACGGA GCGCCCGCCA**  
240

**GTCCAGGTG GCCCGGACCG CACGTTGCGT CCCC CGCGCTC CCCGCCGGCG ACAGGAGACG**  
300

**CTCCCCCCCA CGCCGCGCGC GCCTCGGCC GGTGCTGGC CCGCCTCCAC TCCGGGGACA**  
360

AACTTTTCCC GAAGCCGATC CCAGCCCTCG GACCCAAACT TGTCGCGCGT CGCCTTCGCC  
420

GGGAGCCGTC CGCGCAGAGC GTGCACTTCT CGGGCGAG ATG TCG GAG CGC AGA  
475

Met Ser Glu Arg Arg  
1 5

GAA GGC AAA GGC AAG GGG AAG GGC GGC AAG AAG GAC CGA GGC TCC GGG  
523  
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  
571  
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  
Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Val Ala Gly Ser Lys Leu  
40 45 50 619

GTG CTT CGG TGC GAG ACC AGT TCT GAA TAC TCC TCT CTC AAG TTC AAG  
667  
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  
715  
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  
763  
Ile Lys Ile Gln Lys Arg Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys  
90 95 100

CGC TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA TAT ATG TGC AAA GTG ATC AGC AAA  
811  
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  
859  
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  
907  
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  
955  
Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr Glu Gly Thr Asn Thr  
150 155 160 165

TCT TCA TCC ACA TCC ACA TCT ACA GCT GGG ACA AGC CAT CTT GTC AAG  
1003  
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  
 1051  
 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  
 1099  
 Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro  
 200 205 210

AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC  
 1147  
 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  
 1193  
 Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu  
 230 235 240

CTCAGTCGGT GCCGCTTTCT TGTTGCCGCA TCTCCCCTCA GATTCAACCT AGAGCTAGAT  
 1253

GCGTTTTACC AGGTCTAACA TTGACTGCCT CTGCCTGTCTG CATGAGAACA TTAACACAAG  
 1313

CGATTGTATG ACTTCCTCTG TCCGTGACTA GTGGGCTCTG AGCTACTCGT AGGTCCGTAA  
 1373

GGCTCCAGTG TTTCTGAAAT TGATCTTGAA TTAGTGTGAT ACGACATGAT AGTCCCTCTC  
 1433

ACCCAGTGCA ATGACAATAA AGGCCTTGAA AAGTCTCACT TTTATTGAGA AAATAAAAAT  
 1493

CGTTCCACGG GACAGTCCCT CTTCTTTATA AAATGACCCT ATCCTTGAAA AGGAGGTGTG  
 1553

TTAAGTTGTA ACCAGTACAC ACTTGAAATG ATGGTAAGTT CGCTTCGGTT CAGAATGTGT  
 1613

TCTTTCTGAC AAATAAACAG AATAAAAAAA AAAAAAAA A  
 1654

10

20

30

- ( 2 ) 配列番号145の情報 :
- ( i ) 配列の性質 :
- ( A ) 長さ : 1140
- ( B ) 型 : 核酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( xi ) 配列 : 配列番号145 :

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  
 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

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

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

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  
 225 230 235 240

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 TTCNCCTAG AGCTAGATGC GTTTTACCAG GTCTAACATT  
 930

GACTGCCTCT GCCTGTGCGCA TGAGAACATT AACACAAGCG ATTGTATGAC TTCCTCTGTC  
 990

CGTGACTAGT GGGCTCTGAG CTA CTCTGCTAG GTGCGTAAGG CTCCAGTGTT TCTGAAATTG  
 1050

ATCTTGAATT ACTGTGATAC GACATGATAG TCCCTCTCAC CCAGTGCAAT GACAATAAAG  
 1110

GCCTTGAAAA GTCAAAAAAA AAAAAAAAAA  
 1140

( 2 ) 配列番号146の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 1764

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号146 :

G AAG TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA GCG TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA  
 49  
 Lys Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu  
 1 5 10 15

TAT ATG TGC AAA GTG ATC AGC AAA CTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC  
 97  
 Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala  
 20 25 30

10

20

30

40

AAC ATC ACC ATT GTG GAG TCA AAC GCC ACA TCC ACA TCT ACA GCT GGG  
 145  
 Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Ala Gly  
 35 40 45

ACA AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG  
 193  
 Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val  
 50 55 60

AAT GGA GGC GAC TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA  
 241  
 Asn Gly Gly Asp Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg  
 65 70 75 80

TAC TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG  
 289  
 Tyr Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu  
 85 90 95

AAT GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA GAA AAA GCG GAG GAG CTC TAC  
 337  
 Asn Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr  
 100 105 110

CAG AAG AGA GTG CTC ACC ATT ACC GGC ATT TGC ATC GCG CTG CTC GTG  
 385  
 Gln Lys Arg Val Leu Thr Ile Thr Gly Ile Cys Ile Ala Leu Leu Val  
 115 120 125

GTT GGC ATC ATG TGT GTG GTG GTC TAC TGC AAA ACC AAG AAA CAA CGG  
 433  
 Val Gly Ile Met Cys Val Val Val Tyr Cys Lys Thr Lys Lys Gln Arg  
 130 135 140

AAA AAG CTT CAT GAC CGG CTT CGG CAG AGC CTT CGG TCT GAA AGA AAC  
 481  
 Lys Lys Leu His Asp Arg Leu Arg Gln Ser Leu Arg Ser Glu Arg Asn  
 145 150 155 160

ACC ATG ATG AAC GTA GCC AAC GGG CCC CAC CAC CCC AAT CCG CCC CCC  
 529  
 Thr Met Met Asn Val Ala Asn Gly Pro His His Pro Asn Pro Pro Pro  
 165 170 175

GAG AAC GTG CAG CTG GTG AAT CAA TAC GTA TCT AAA AAT GTC ATC TCT  
 577  
 Glu Asn Val Gln Leu Val Asn Gln Tyr Val Ser Lys Asn Val Ile Ser  
 180 185 190

AGC GAG CAT ATT GTT GAG AGA GAG GCG GAG AGC TCT TTT TCC ACC AGT  
 625  
 Ser Glu His Ile Val Glu Arg Glu Ala Glu Ser Ser Phe Ser Thr Ser  
 195 200 205

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

10

20

30

40

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  
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  
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  
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  
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 CCG CTG CCG 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

10

20

30

40

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 ACC 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  
 465 470 475 480

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  
 545 550 555 560

TAAAACCGAA ATACACCCAT AGATTCACCT GTAAACTTT ATTTTATATA ATAAAGTATT  
 1741

CCACCTTAAA TTAACAAAA AAA  
 1764

( 2 ) 配列番号147の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 50

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号147 :

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

Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser  
 35 40 45

Phe Tyr  
 50

10

20

30

40

50

( 2 ) 配列番号148の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 50

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号148 :

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

Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn Val Pro Met Lys  
35 40 45

Val Gln  
50

10

( 2 ) 配列番号149の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 46

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号149 :

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

Phe Gly Glu Arg Cys Gly Glu Lys Ser Asn Lys Thr His Ser  
35 40 45

20

( 2 ) 配列番号150の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 198

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号150 :

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  
35 40 45  
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

10

( 2 ) 配列番号151の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 192

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号151 :

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 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

20

30

( 2 ) 配列番号152の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 183

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号152 :

40

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  
Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr  
50 55 60

10

( 2 ) 配列番号153の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 210

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

20

( xi ) 配列 : 配列番号153 :

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 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

30

GCG GAG GAG CTC TAC TAA  
210  
Ala Glu Glu Leu Tyr  
65

( 2 ) 配列番号154の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 267

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

40

( xi ) 配列 : 配列番号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  
 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 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

10

20

( 2 ) 配列番号155の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 252

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号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  
 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

30

40

( 2 ) 配列番号156の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 128

50

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号156 :

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 15  
 1 5 10

GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG 95  
 Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val 30  
 20 25

AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC TTG T GC 10  
 Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu 128  
 35 40

( 2 ) 配列番号157の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 141

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号157 :

A CAT AAC CTT ATA GCT GAG CTA AGG AGA AAC AAG GCC CAC AGA TCC 46 20  
 His Asn Leu Ile Ala Glu Leu Arg Arg Asn Lys Ala His Arg Ser 15  
 1 5 10

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 30  
 20 25

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 45  
 35 40

( 2 ) 配列番号158の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 24

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ix ) 配列の特徴 :

( D ) 他の情報 : 15番目および22番目のXaaは不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号158 :

Ala Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Xaa Phe 30  
 1 5 10 15

Met Val Lys Asp Leu Xaa Asn Pro 40  
 20

( 2 ) 配列番号159の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 745

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号159 :

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  
 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 CCG  
 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  
 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

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  
 Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe  
 195 200 205

10

20

30

40

**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**  
**Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys**  
**245**

10

- ( 2 ) 配列番号160の情報 :
- ( i ) 配列の性質 :
- ( A ) 長さ : 12
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 :
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( ix ) 配列の特徴 :
- ( D ) 他の情報 : 1 番目のXaaは不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号160 :

**Xaa Ala Leu Ala Ala Ala Gly Tyr Asp Val Glu Lys**  
**1 5 10**

20

- ( 2 ) 配列番号161の情報 :
- ( i ) 配列の性質 :
- ( A ) 長さ : 5
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 :
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( ix ) 配列の特徴 :
- ( D ) 他の情報 : 1 番目のXaaは不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号161 :

**Xaa Leu Val Leu Arg**  
**1 5**

30

- ( 2 ) 配列番号162の情報 :
- ( i ) 配列の性質 :
- ( A ) 長さ : 11
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 :
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( ix ) 配列の特徴 :
- ( D ) 他の情報 : 1 番目、2 番目および3 番目のXaaは不明である。

( xi ) 配列 : 配列番号162 :

**Xaa Xaa Xaa Tyr Pro Gly Gln Ile Thr Ser Asn**  
**1 5 10**

40

- ( 2 ) 配列番号163の情報 :
- ( i ) 配列の性質 :
- ( A ) 長さ : 60
- ( B ) 型 : 核酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( ix ) 配列の特徴 :

50

( D ) 他の情報：25番目および36番目のNは不明である。

( xi ) 配列：配列番号163：

**ATAGGGAAGG GCGGGGAAG GGTCCCTC NGCAGGGCCG GGCTTGCCTC TGGAGCCTCT**  
60

( 2 ) 配列番号164の情報：

( i ) 配列の性質：

( A ) 長さ：18

( B ) 型：核酸

( C ) 鎖の数：一本鎖

( D ) トポロジー：直鎖状

10

( ix ) 配列の特徴：

( D ) 他の情報：16番目のNは不明である。

( xi ) 配列：配列番号164：

**TTTACACATA TATTCNCC**  
18

( 2 ) 配列番号165の情報：

( i ) 配列の性質：

( A ) 長さ：21

( B ) 型：アミノ酸

( C ) 鎖の数：

20

( D ) トポロジー：直鎖状

( xi ) 配列：配列番号165：

**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

( 2 ) 配列番号166の情報：

( i ) 配列の性質：

( A ) 長さ：422

( B ) 型：アミノ酸

30

( C ) 鎖の数：

( D ) トポロジー：直鎖状

( xi ) 配列：配列番号166：

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  
 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  
 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  
 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  
 210 215 220

10

20

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  
 305 310 315 320

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

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

10

20

( 2 ) 配列番号167の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 69

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号167 :

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

30

40

( 2 ) 配列番号168の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 19

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

50

( xi ) 配列 : 配列番号 168 :

**Arg Lys Gly Asp Val Pro Gly Pro Arg Val Lys Ser Ser Arg Ser Thr**  
**1 5 10 15**

**Thr Thr Ala**

( 2 ) 配列番号 169 の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 231

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

10

( xi ) 配列 : 配列番号 169 :

**CGCGAGCGCC TCAGCGCGC CGCTCGCTCT CCCCCTCGAG GGACAAACTT TTCCCAAACC**  
**60**

**CGATCCGAGC CTTGGACCA AACTCGCCTG CGCCGAGAGC CGTCCGCGTA GAGCGCTCCG**  
**120**

**TCTCCGGCGA GATGTCGAG CGCAAAGAAG GCAGAGGCAA AGGGAAGGGC AAGAAGAAGG**  
**180**

**AGCGAGGCTC CGGCAAGAAG CCGGAGTCCG CGGCGGGCAG CCAGAGCCCA G**  
**231**

( 2 ) 配列番号 170 の情報 :

20

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 178

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号 170 :

**CCTTGCCTCC CCGATTGAAA GAGATGAAAA GCCAGGAATC GGCTGCAGGT TCCAACTAG**  
**60**

**TCCTTCGGTG TGAACCAGT TCTGAATACT CCTCTCTCAG ATTCAAGTGG TTCAAGAATG**  
**120**

30

**GGAATGAATT GAATCGAAAA AACAAACCAC AAAATATCAA GATACAAAAA AAGCCAGG**  
**178**

( 2 ) 配列番号 171 の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 122

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号 171 :

**GAAGTCAGAA CTTTCGATTA ACAAAGCATC ACTGGCTGAT TCTGGAGAGT ATATGTGCAA**  
**60**

40

**AGTGATCAGC AAATTAGGAA ATGACAGTGC CTCTGCCAAT ATCACCATCG TGGAATCAAA**  
**120**

**CG**  
**122**

( 2 ) 配列番号 172 の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 102

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

50

( D ) トポロジ- : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号172 :

**AGATCATCAC TGGTATGCCA GCCTCAACTG AAGGAGCATA TGTGTCTTCA GAGTCTCCCA**  
60

**TTAGAATATC AGTATCCACA GAAGGAGCAA ATACTTCTTC AT**  
102

( 2 ) 配列番号173の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 128

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ- : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号173 :

**CTACATCTAC ATCCACCACT GGGACAAGCC ATCTTGTAAG ATGTGCGGAG AAGGAGAAAA**  
60

**CTTTCTGTGT GAAITGGAGGG GAGTGCTTCA TGGTGAAAGA CCTTCAAC CCCTCGAGAT**  
120

**ACTTGTGC**  
128

( 2 ) 配列番号174の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 69

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ- : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号174 :

**AAGTGCCAAC CTGGATTCAC TGGAGCAAGA TGTACTGAGA ATGTGCCCAT GAAAGTCCAA**  
60

**AACCAAGAA**  
69

( 2 ) 配列番号175の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 60

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ- : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号175 :

**AAGTGCCCAA ATGAGTTTAC TGGTGATCGC TGCCAAAAC ACGTAATGGC CAGCTTCTAC**  
60

( 2 ) 配列番号176の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 36

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジ- : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号176 :

**AGTACGTCCA CTCCTTTCT GTCTCTGCCT GAATAG**  
36

( 2 ) 配列番号177の情報 :

( i ) 配列の性質 :

10

20

30

40

50

( A ) 長さ : 569

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号177 :

**AAGGCCGAGG AGCTGTACCA GAAGAGAGTG CTGACCATAA CCGGCATCTG CATCGCCCTC**  
60

**CTTGTGGTGC GCATCATGTG TGTGGTGGCC TACTGCAAAA CCAAGAAACA 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 TAGTAAAAG**  
569

( 2 ) 配列番号178の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 730

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号178 :

10

20

30

GTATGTGTCA GCCATGACCA CCCC GGCTCG TATGTCACCT GTAGATTTCC ACACGCCAAG  
60

CTCCCCCAA 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 CCCCCTGGCA GCCAGTCTTG AGGCAACACC  
540

TGCCTTCCGC CTGGCTGACA GCAGGACTAA CCCAGCAGGC CGCTTCTCGA CACAGGAAGA  
600

AATCCAGGCC AGGCTGTCTA GTGTAATTGC TAACCAAGAC CCTATTGCTG TATAAACCT  
660

AAATAAACAC ATAGATTCAC CTGTAAACT TTATTTTATA TAATAAAGTA TTCCACCTTA  
720

AATTAACAA  
730

( 2 ) 配列番号179の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 23

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号179 :

**TCGGGCTCCA TGAAGAAGAT GTA**  
23

( 2 ) 配列番号180の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 23

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号180 :

**TCCATGAAGA AGATGTACCT GCT**  
23

( 2 ) 配列番号181の情報 :

( i ) 配列の性質 :

( A ) 長さ : 22

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

10

20

30

40

50

(xi) 配列：配列番号181：  
**ATGTACCTGC TGTCCTCCTT GA**  
 22

(2) 配列番号182の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 長さ：22

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号182：  
**TTGAAGAAGG ACTCGCTGCT CA**  
 22

10

(2) 配列番号183の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 長さ：20

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号183：  
**AAAGCCGGGG CCTTGAAGAA**  
 20

20

(2) 配列番号184の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 長さ：20

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号184：  
**ATGARGTGTG GCGGCGAAA**  
 20

30

(2) 配列番号185の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 長さ：422

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号185：

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  
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  
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  
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  
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

10

20

30

Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala  
 305 310 315 320

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

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

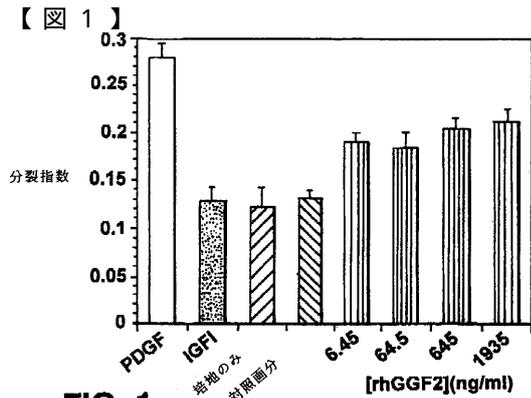


FIG. 1

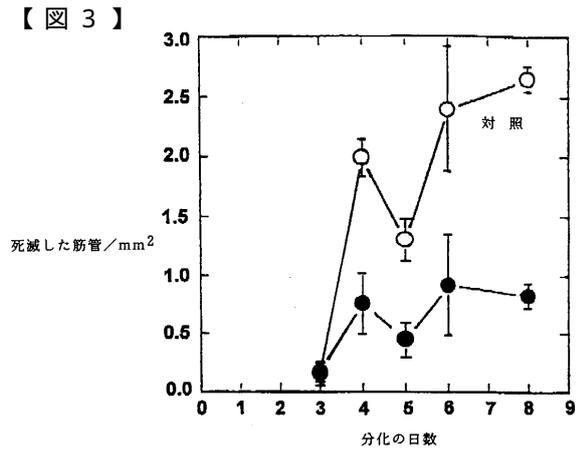


FIG. 3

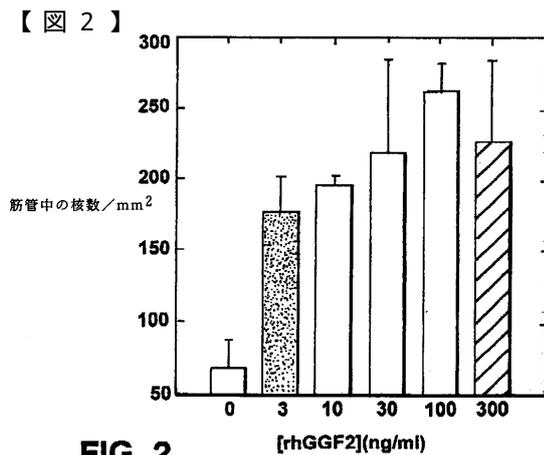


FIG. 2

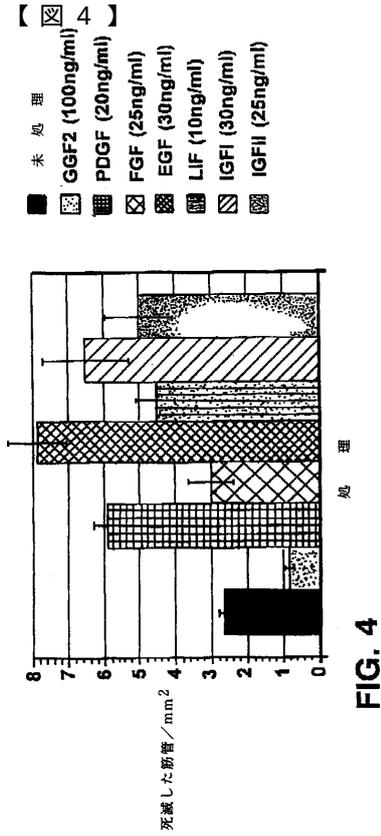


FIG. 4

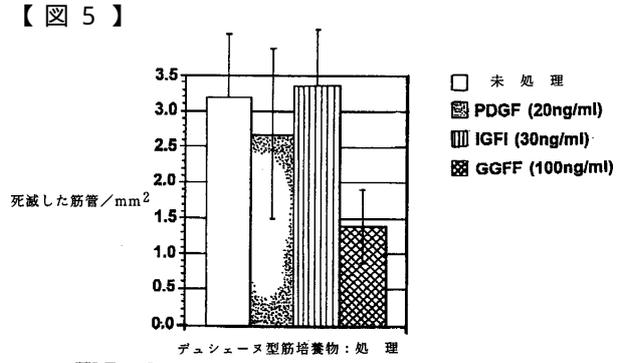


FIG. 5

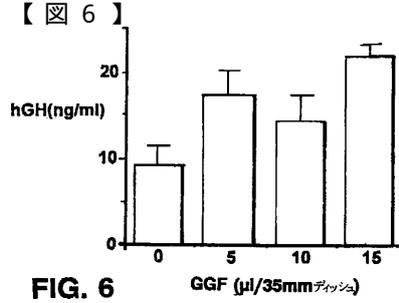


FIG. 6

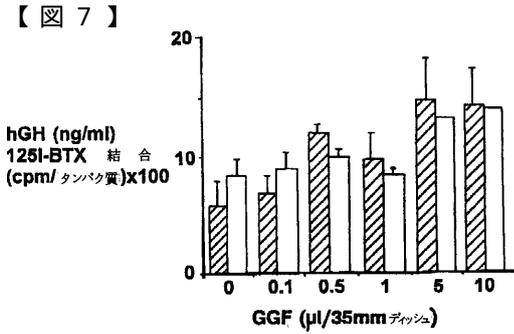


FIG. 7

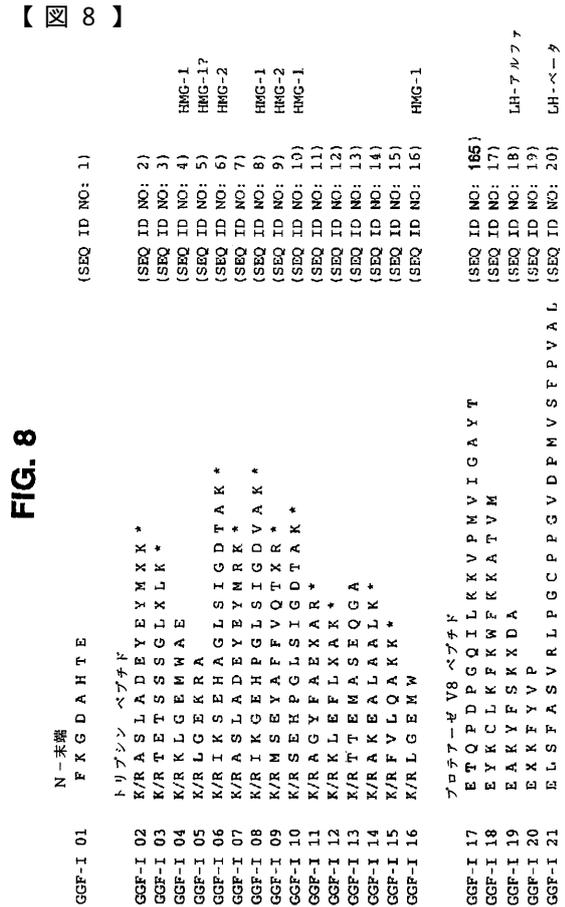


FIG. 8

FIG. 11

【 1 1 1 】

|           |                               |                 |
|-----------|-------------------------------|-----------------|
| GGF-II 01 | V H Q V W A A K               | (SEQ ID NO: 42) |
| GGF-II 02 | Y I F M E P E A X S S G       | (SEQ ID NO: 43) |
| GGF-II 03 | L G A W G P P A F P V X Y     | (SEQ ID NO: 44) |
| GGF-II 04 | W F V V I E G K               | (SEQ ID NO: 45) |
| GGF-II 08 | A S P V S V G S V Q E L V Q R | (SEQ ID NO: 46) |
| GGF-II 09 | V C L L T V A A P P T         | (SEQ ID NO: 47) |
| GGF-II 11 | K V H Q V W A A K             | (SEQ ID NO: 48) |
| GGF-II 12 | K A S L A D S G E Y M X K     | (SEQ ID NO: 49) |

B

新規因子IIペプチド-その他

|           |             |                 |
|-----------|-------------|-----------------|
| GGF-II 10 | D L L L X V | (SEQ ID NO: 50) |
|-----------|-------------|-----------------|

FIG. 9

【 9 9 9 】

|   |          |   |                 |
|---|----------|---|-----------------|
| A | GGF-I 01 | F K G D A H T E                           | (SEQ ID NO: 1)  |
|   | GGF-I 02 | A S L A D E Y E Y M X K                   | (SEQ ID NO: 22) |
|   | GGF-I 03 | T E T S S S G L X L K                     | (SEQ ID NO: 23) |
|   | GGF-I 07 | A S L A D E Y E Y M R K                   | (SEQ ID NO: 24) |
|   | GGF-I 11 | A G Y F A E X A R                         | (SEQ ID NO: 25) |
|   | GGF-I 13 | T T E M A S E Q G A                       | (SEQ ID NO: 26) |
|   | GGF-I 14 | A K E A L A A I K                         | (SEQ ID NO: 27) |
|   | GGF-I 15 | F V L Q A K K                             | (SEQ ID NO: 28) |
|   | GGF-I 17 | E T Q P D P G Q I L K K V P M V I G A Y T | (SEQ ID NO: 29) |
|   | GGF-I 18 | E Y K C L K F K F K K A T V M             | (SEQ ID NO: 17) |

|   |          |                 |                 |
|---|----------|-----------------|-----------------|
| B | GGF-I 20 | E X K F Y V P   | (SEQ ID NO: 19) |
|   | GGF-I 12 | K L E F L X A K | (SEQ ID NO: 32) |

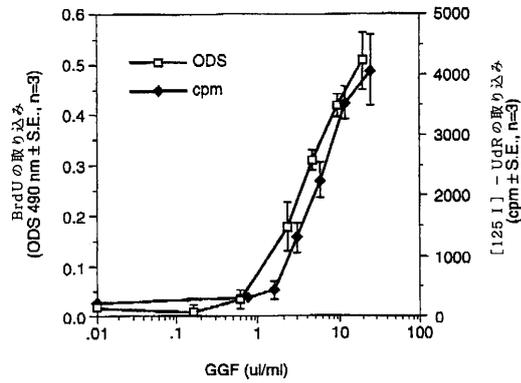
【 1 2 1 0 】

FIG. 10

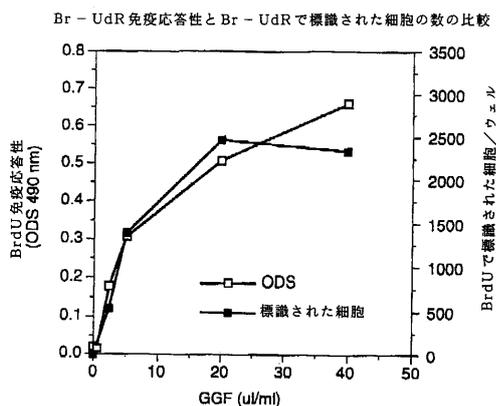
|           |       |                                 |                  |
|-----------|-------|---------------------------------|------------------|
| GGF-II 01 | トリプシン | ペプチド                            | (SEQ ID NO: 42)  |
| GGF-II 02 | K/R   | V H Q V W A A K *               | (SEQ ID NO: 43)  |
| GGF-II 03 | K/R   | Y I F M E P E A X S S G         | (SEQ ID NO: 44)  |
| GGF-II 04 | K/R   | L G A W G P P A F P V X Y       | (SEQ ID NO: 45)  |
| GGF-II 05 | K/R   | W F V V I E G K *               | (SEQ ID NO: 164) |
| GGF-II 06 | K/R   | A L A A A G Y D V E K *         | (SEQ ID NO: 165) |
| GGF-II 07 | K/R   | L V L R *                       | (SEQ ID NO: 166) |
| GGF-II 08 | K/R   | X X Y P P G O I T S N           | (SEQ ID NO: 46)  |
| GGF-II 09 | K/R   | A S P V S V G S V Q E L V Q R * | (SEQ ID NO: 46)  |
| GGF-II 10 | K/R   | V C L L T V A A P P T           | (SEQ ID NO: 50)  |
|           |       | K/R D L L L X V                 |                  |
| GGF-II 11 | リシルエン | ドペプチド                           | (SEQ ID NO: 48)  |
| GGF-II 12 | K     | V H Q V W A A K *               | (SEQ ID NO: 48)  |
|           |       | K A S L A D S G E Y M X K *     | (SEQ ID NO: 49)  |

FIG. 12

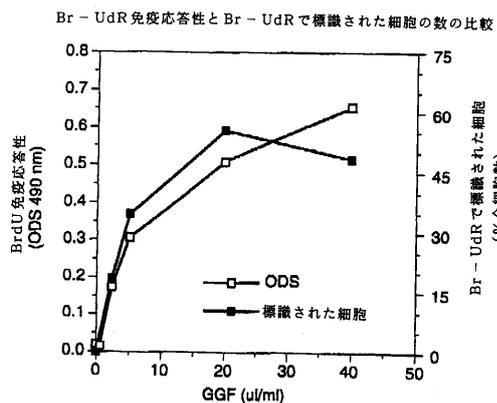
シェワン細胞培養物におけるDNA合成アッセイのための BrdU - ELISA と [125 I] Udr カウント法の比較



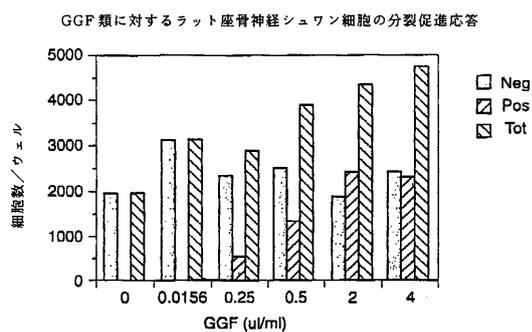
【 図 1 3 A 】  
**FIG. 13A**



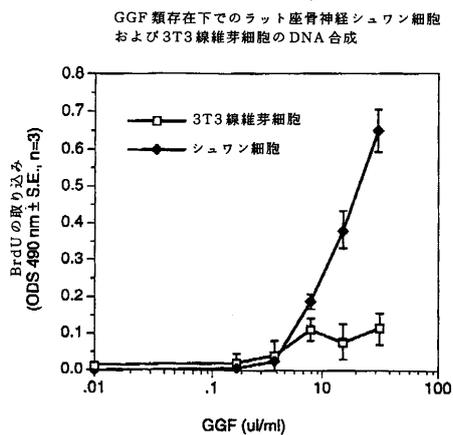
【 図 1 3 B 】  
**FIG. 13B**



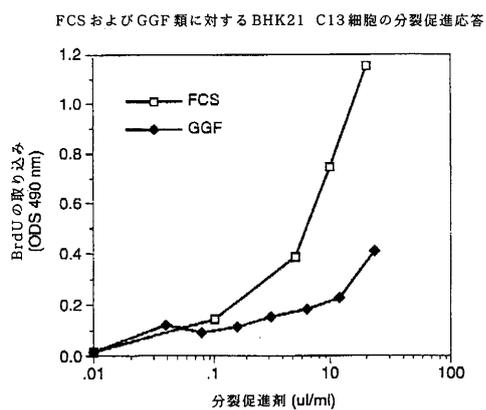
【 図 1 4 】  
**FIG. 14**



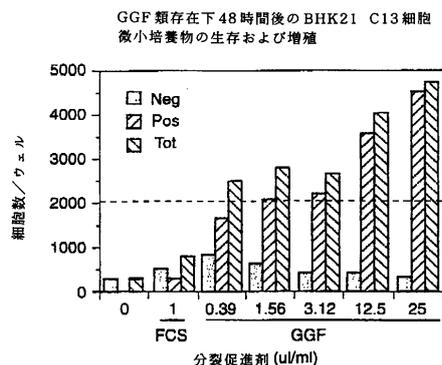
【 図 1 5 】  
**FIG. 15**



【 図 1 6 】  
**FIG. 16**



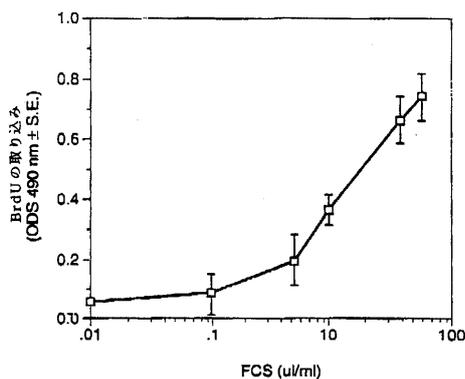
【 図 1 7 】  
**FIG. 17**



【 図 18 】

FIG. 18

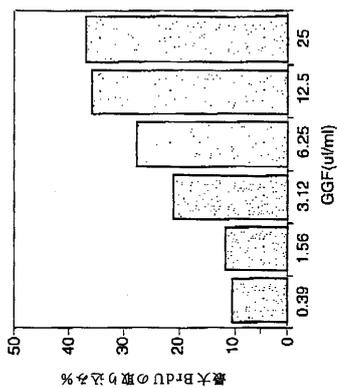
FCS に対する C6 細胞の分裂促進応答



【 図 19 B 】

FIG. 19B

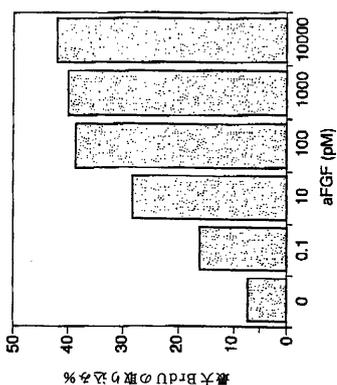
aFGF および GGF 類に対する C6 細胞の分裂促進応答



【 図 19 A 】

FIG. 19A

aFGF および GGF 類に対する C6 細胞の分裂促進応答



【 図 20 】

FIG. 20

因子 I および因子 II のための変性オリゴヌクレオチドプローブ

| オリゴ | 配列                       | ペプチド                     |
|-----|--------------------------|--------------------------|
| 535 | TTYAARGNGAYGCNCAYAC!     | GGFI-1 (SEQ ID NO: 51)   |
| 536 | CATRTAYTCRTAYTCNCGC!     | GGFI-2 (SEQ ID NO: 52)   |
| 537 | TGYTCNCGANGCCATYTCNGT!   | GGFI-13 (SEQ ID NO: 53)  |
| 538 | TCYTCRCITNGCCATYTCNGT!   | GGFI-13 (SEQ ID NO: 54)  |
| 539 | CCDATNACCATNGGNACYTT!    | GGFI-17 (SEQ ID NO: 55)  |
| 540 | GCNGCCANACYTGRITGNAC!    | GGFII-1 (SEQ ID NO: 56)  |
| 541 | GCYTCNNGGYTCCATRAARAA!   | GGFII-2 (SEQ ID NO: 57)  |
| 542 | CCYTCDAITNACNACRAACCA!   | GGFII-4 (SEQ ID NO: 58)  |
| 543 | TCNGCRAARTANCGNC!        | GGFI-11 (SEQ ID NO: 59)  |
| 544 | GCNCGNAGNCGYTCYTTNGC!    | GGFI-14 (SEQ ID NO: 60)  |
| 545 | GCNCGYAAAGCYTCYTTNGC!    | GGFI-14 (SEQ ID NO: 61)  |
| 546 | TTYTTNGCYTGNAGNACRAA!    | GGFI-15 (SEQ ID NO: 62)  |
| 551 | TTYTTNGCYTGYAANACRAA!    | GGFI-15 (SEQ ID NO: 63)  |
| 568 | TGNACNAGYTCYTGAC!        | GGFII-8 (SEQ ID NO: 64)  |
| 569 | TGNACYAAATCYTGAC!        | GGFII-8 (SEQ ID NO: 65)  |
| 609 | CATRTAYTCNCCNGARTCNCG!   | GGFII-12 (SEQ ID NO: 66) |
| 610 | CATRTAYTCNCCRCRTCNCG!    | GGFII-12 (SEQ ID NO: 67) |
| 649 | NGARTCNCGCYAANGANGCYTT!  | GGFII-12 (SEQ ID NO: 68) |
| 650 | NGARTCNCGNAGNANGANGCYTT! | GGFII-12 (SEQ ID NO: 69) |
| 651 | RCRTCNCGCYAANGANGCYTT!   | GGFII-12 (SEQ ID NO: 70) |
| 652 | RCRTCNCGNAGNANGANGCYTT!  | GGFII-12 (SEQ ID NO: 71) |
| 653 | NGARTCNCGYAAARCTNGCYTT!  | GGFII-12 (SEQ ID NO: 72) |
| 654 | NGARTCNCGNAGRCTNGCYTT!   | GGFII-12 (SEQ ID NO: 73) |
| 655 | RCRTCNCGCYAARCTNGCYTT!   | GGFII-12 (SEQ ID NO: 74) |
| 656 | RCRTCNCGNAGRCTNGCYTT!    | GGFII-12 (SEQ ID NO: 75) |
| 659 | ACNACNGARATGGCTNNGA!     | GGFI-13 (SEQ ID NO: 76)  |
| 660 | ACNACNGARATGGCAGYNGA!    | GGFI-13 (SEQ ID NO: 77)  |
| 661 | CAYCARGTNTGGCNGCNAA!     | GGFII-1 (SEQ ID NO: 78)  |
| 662 | TTYGTNGTNAATHARGGNAA!    | GGFII-4 (SEQ ID NO: 79)  |
| 663 | AARGGNGAYGCNCAYACNGA!    | GGFI-1 (SEQ ID NO: 80)   |
| 664 | GARGCNYTNGCNGCNYTNA!     | GGDI-14 (SEQ ID NO: 81)  |
| 665 | GTNGGNTCNGTNCARGARYT!    | GGFII-8 (SEQ ID NO: 82)  |
| 666 | GTNGGNGAYGTNCARGARYT!    | GGFII-8 (SEQ ID NO: 83)  |
| 694 | NACYTTYTTNARHAYTGNCC!    | GGFI-17 (SEQ ID NO: 84)  |

【 図 21 】

FIG. 21

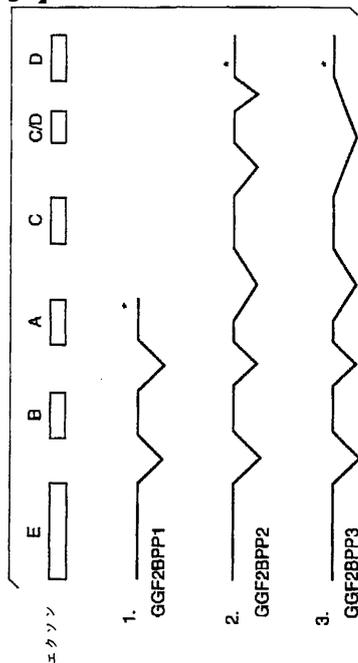
推定されるウシ因子 II 遺伝子配列

| SEQ ID NO: 85 | 配列  | 位置 |
|---------------|---|----|
| 53            | TCTTAA AAC TAC AGA GAC TCGT ATT TTC ATG ATC ATG ATG GTT CTG TGA AAT ATA |    |
|               | Asn Tyr Arg Asp Cys Ile Phe Met Ile Ile Val Leu Xaa Asn Ile             |    |
| 101           | CTT AAA CCG CTT TGG TCC TGA TCT TGT AGG AAG TCA GAA CTT CGC ATT         |    |
|               | Leu Lys Pro Leu Trp Ser Xaa Ser Cys Arg Lys Ser Glu Leu Arg Ile         |    |
| 149           | AGC AAA GCG TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA TAT ATG TGC AAA GTG ATC         |    |
|               | Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Ser Met Cys Lys Val Ile         |    |
| 197           | AGC AAA CTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAC ATC ACC ATT GTG GAG         |    |
|               | Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Arg Ile Val Glu         |    |
| 245           | TCA AAC GGT AAG AGA TGC CTA CTG GCT ATT TCT CAG TCT CTA AGA             |    |
|               | Ser Asn Gly Lys Arg Cys Leu Leu Arg Ala Ile Ser Gln Ser Leu Arg         |    |
| 293           | GGA GTG ATC AAG GTA TGT GGT CAC ACT TGA ATC ACG CAG GTG TGT GAA         |    |
|               | Gly Val Ile Lys Val Cys Gly His Thr Xaa Ile Thr Gln Val Cys Glu         |    |
| 341           | ATC TCA TTG TGA ACA AAT AAA AAT CAT GAA AGG AAA ACT CTA TGT TTG         |    |
|               | Ile Ser Cys Xaa Thr Asn Lys Asn His Glu Arg Lys Thr Leu Cys Leu         |    |
| 389           | AAA TAT CTT ATG GGT CCT CCT GTA AAG CTC TTC ACT CCA TAA GGT GAA         |    |
|               | Lys Tyr Met Met Gly Pro Val Lys Leu Phe Thr Pro Xaa Gly Glu             |    |
| 417           | ATA GAC CTG AAA TAT ATA TAG ATT ATT T                                   |    |
|               | Ile Asp Leu Lys Tyr Ile Xaa Ile Ile                                     |    |



【 図 25 】

FIG. 25  
推定されるウシGGF-IIの副産物



【 図 26 】

FIG. 26

推定されるウシGGF-IIタンパク質の推定されたアミノ酸配列において同定されるGGF-IIペプチド

| ペプチド  | 位置   | 配列のマッチ   | ID 配列                              |
|-------|------|--|------------------------------------|
| II-1  | 1:   | VHQVWAAK<br>HQVWAAK AAGLK                        | (SEQ ID NO:116)                    |
| II-10 | 14:  | DLLLVX<br>GGLKK dslltv RLGAW                     | (SEQ ID NO:117)                    |
| II-03 | 21:  | LGAWGPPAFPVXY<br>LLTVR lgawghpaFpscG RLKED       | (SEQ ID NO:118)<br>(SEQ ID NO:119) |
| II-02 | 41:  | YIFFMEPEAXSSG<br>KEDSR YIFFMEPEANSSG GPGRL       | (SEQ ID NO:120)<br>(SEQ ID NO:121) |
| II-6  | 103: | LVLR<br>VAGSK LVLR CETSS                         | (SEQ ID NO:122)                    |
| I-18  | 112: | EYKCLKFKWFKKATVM<br>CETSS eyslklfkWfngksel SRKNK | (SEQ ID NO:123)<br>(SEQ ID NO:124) |
| II-12 | 151: | KASLADSGEYMKK<br>ELRIS KASLADSGEYMCK VISKL       | (SEQ ID NO:125)<br>(SEQ ID NO:126) |
| I-07  | 152: | ASLADEYEYMRK<br>LRISK asladsgeymck VISKL         | (SEQ ID NO:127)<br>(SEQ ID NO:128) |

【 図 27 】

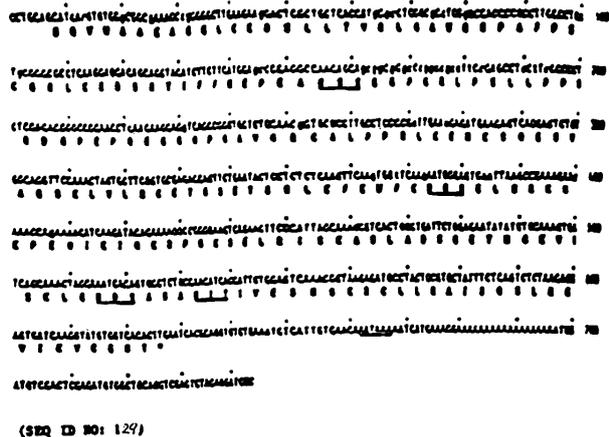


FIGURE 27

【 図 27 B 】

GGF2BPP2のヌクレオチド配列および推定されたアミノ酸配列

|     |   |
|-----|---|
| 55  | CCTGCAG CAT CAA GTG TGG GCG GCG AAA GCC GGG GGC TTG AAG AAG GAC TCG CTG |
| 103 | Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys         |
| 151 | GGG CGC CTC AAG GAG GAC AGC AGG TAC ATC TTC TTC ATG GAG CCC GAG         |
| 199 | GCC AAC AGC AGC GGC CCC GGC CCG CTT CCG AGC CTC CTT CCC CCC             |
| 247 | TCT CGA GAC GGG CCG GAA CCT CAA GAA GGT CAG CCG GGT GCT GTG             |
| 295 | CAA CGG TGC GCC TTG CCT CCC GCG TTG AAA GAG ATG AAG AGT CAG GAG         |
| 343 | TCT GTG GCA GGT TCC AAA CTA GTG CTT CGG TGC GAG ACC AGT TCT GAA         |
| 391 | TAC TCC TCT CTC AAG TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AGT GAA TTA AGC         |
| 439 | CGA AAG AAC AAA CCA GAA AAC ATC AAG ATA CAG AAA AGG CCG GGG AAG         |
| 487 | TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA GCG TCA CTG GCT GAT TCT CGA GAA TAT         |
| 535 | ATG TCC AAA GTG ATC ACC AAA CTA GCA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAC         |

FIG. 27B'

GG2BPP2のヌクレオチド配列および推定されたアミノ酸配列

ATC ACC ATT GTG 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  
 AGC CAT CTT GTC ACA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GGT AAT 631  
 Ser His Leu Val Lys Ser Ala Glu Lys Glu Thr Phe Cys Val Asn  
 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  
 TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA CCG AGA TGT ACT GAG AAT 727  
 Leu Cys Lys Cys Glu Pro Gly Phe Thr Ala Arg Cys Thr Glu Asn  
 GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA GAA AGT GCC CAA ATG AGT TTA CTG 775  
 Val Pro Met Lys Val Glu Thr Glu Ser Ala Glu Met Ser Leu Leu  
 GTG ATC CTT GCC AAA ACT AGC TRATGGCCAG CTTCTACAGT ACCTCCACTC 826  
 Val Ile Ala Ala Lys Thr Thr  
 CCTTTCTGTC TCTGCTGAA TAGCGCATCT CAGTGGGTGC CCGTTTCTTG TTCCCGCATC 886  
 TCCCTCAGA TTCTCTCTAG AGCTAGATGC GTTTTACCAG GTCTAACAVT GACTGCTCT 946  
 GCCTGCGCA TGAGAACATT AACACRAGG ATTGTATGAC TTCTCTCTGC CCGTACTAGT 1006  
 GGGCTCTGAG CTACTCTGAG GTGGCTRAGG CTCCAGCTGTT TCTGAAATG ATCTTGAATT 1066  
 ACTGTGATAC GACATGATAG TCCCTCTCAC CCAGTGCAT GACANTAAAG GCCTTGAATA 1126  
 GTCAAAAAA AAAAAAATA AAAAAATCGA TGTGACTCG AGATGTGGCT CGAGGTGAGC 1186  
 TCTAGAG 1193

FIG. 27C

GGF2BPP3のヌクレオチド配列および推定されたアミノ酸配列

SEQ ID NO: 131:  
 CCTGCGA CAT CAA GTG TGG GCG GCG AAA GCC GGG GGC TTG AAG AAG GAC TCG CTG 55  
 His Glu Val Trp Ala Ala Lys Ala Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu  
 CTC ACC GTG CCG CTG GGC GCC TGG GGC GAC CCC GCC TTC CCC TCC TGC 103  
 Leu Thr Val Arg Leu Glu Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys  
 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 Met Glu Pro Glu  
 CCC AAC AGC AGC GGC CCC GGC CCG CTT CCG AGC CTC CTT CCC CCC 199  
 Ala Asn Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu Pro Ser Leu Leu Pro Pro  
 TCT CGA GAC CCG GAA CCT CAA GAA GGT CAG CCG GGT GCT GCT GTG 247  
 Ser Arg Asp Gly Pro Glu Pro Glu Gly Gly Glu Pro Glu Ala Val  
 CAA CGG TGC GCC TTG CCT CCC TTG AAA GAG ATG AAG AGT CAG GAG 295  
 Glu Arg Cys Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Glu Glu  
 TCT GTG CGA GCT 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  
 TAC TCC TCT CTC TAG TTC AAG TGC TTC TAG AAT CGC AGT GAA TTA GC 391  
 Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Ser Leu Ser  
 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 Glu Lys Arg Pro Pro Lys  
 TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA CCG TCA CTG GCT GAT TCT GGA TAT 487  
 Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr

FIG. 27C'

GGF2BPP3のヌクレオチド配列および推定されたアミノ酸配列

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  
 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  
 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 Thr Phe Cys Val Asn  
 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  
 TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TCC CAA AAC TAC 727  
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Glu Asn Tyr  
 GTA ATG GCC AGC TTC TAC AGT AGC TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CTT 775  
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Thr Pro Phe Leu Ser Leu Leu Pro  
 GAA TAGCGCATCT CAGTGGGTGC CCGTTTCTTG TTGCGGCATC TCCCTCAGA TTCCCGCTAG 838  
 Glu  
 AGCTAGATGC GTTTTACCAG GTCTAACAVT GACTGCTCTT GCCTGTGCGA TGAGAACAVT 898  
 AACACRAGG ATTGTATGAC TTCTCTCTGC CCGTACTAGT GGGCTCTGAG CTACTCTCTAG 958  
 GTGGCTRAGG CTCCAGCTGTT TCTGAAATG ATCTTGAATT ACTGTGATAC GACATGATAG 1018  
 TCCCTCTCAC CCAGTGCAT GACANTAAAG GCCTTGAATA GTCAAAAAA AAAAAAATA 1078  
 AAAAAATCGA TGTGACTCG AGATGTGGCT CGAGGTGAGC 1108

FIG. 28



FIG. 28

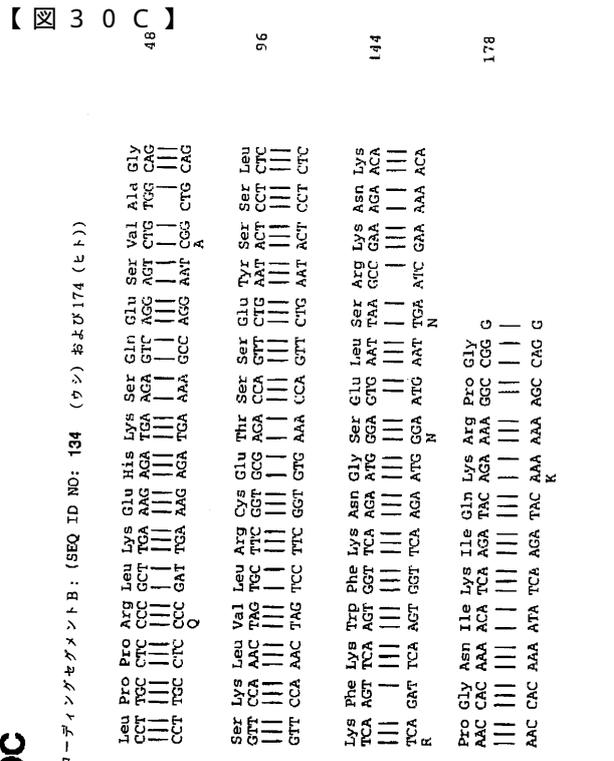
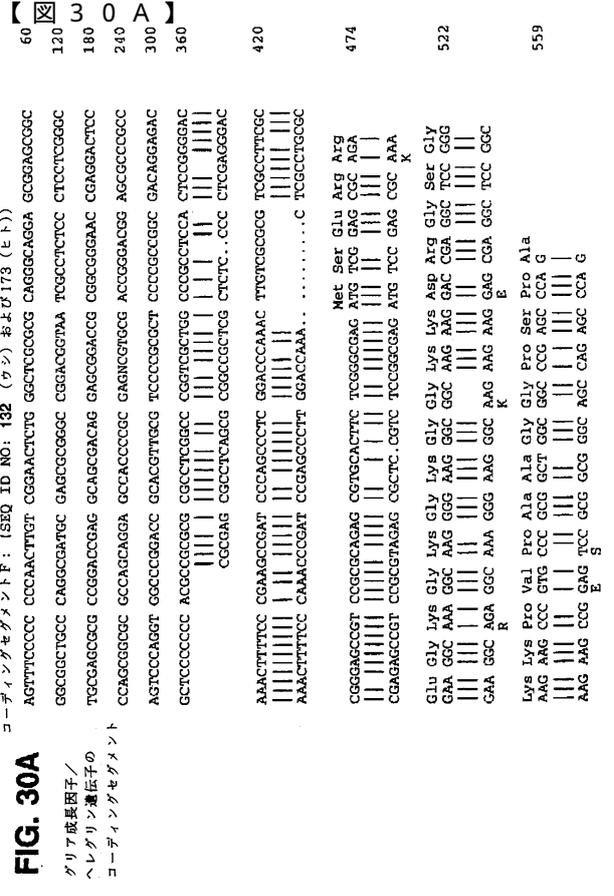
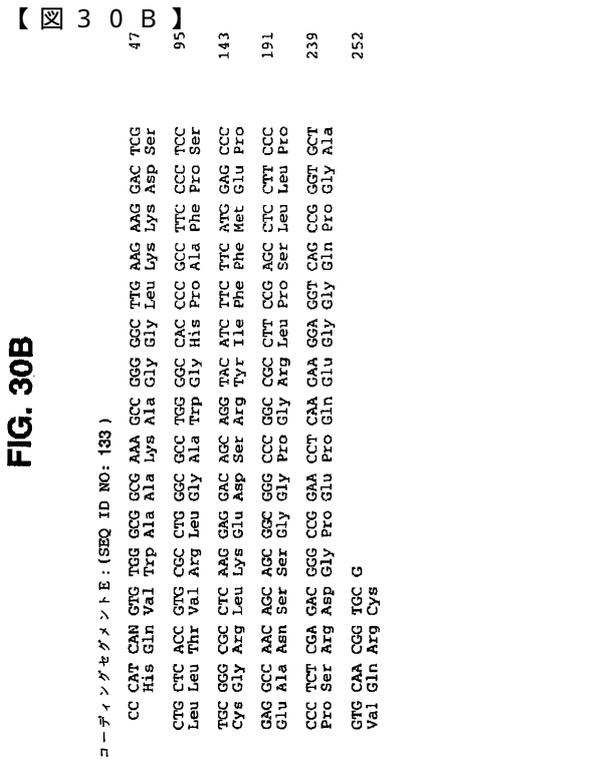
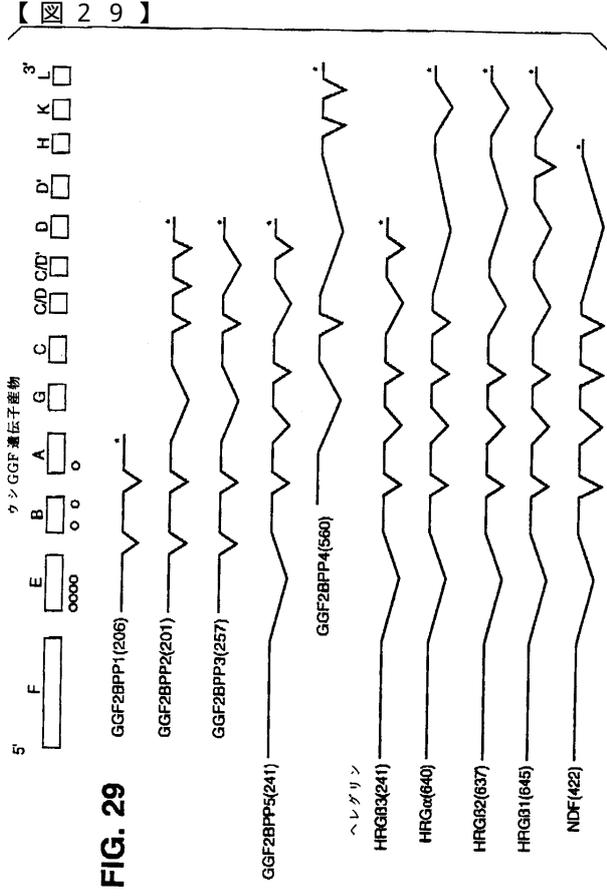








FIG. 31A

GGF2BPP5 マクド配列および推定されたタンパク質の配列

SEQ ID NO: 144:

60 **U** **A** **U**  
 ASFTTTCCTCC CCAGACTTCT CGACTCTCTG GGTCTCCGGC CAGGGCAGGA GCGGAGCGGC  
 120 GCGCGTCCG CAGCGGATGC GAGCGGGGC CGGACGGTAA TCGCTCTTCC CTCCTCGGGC  
 180 TCGAGCGCG CCGGACCGAG GCAGCGACAG GAGCGGACCG CGCGGGGAA CAGGACTCC  
 240 CCAGCGCGC GCCACAGAGA GCCACCCCG CAGCGTCCGA CCGGACGGA CCGCCCGCCA  
 300 GTCCCGGTC GCGCGGACG CAGTCTCGT CCGCGGGTC CCGCGCGCG ACAGAGAGAG  
 360 CTCGCCCGA GCGCGCGGC GCGTCCGGC CGCTCCGTC CCGCTCCAC TCCGGGAGA  
 420 AACTTTTCCC GAGCGCGATC CAGCGCGTCC GAGCCAAACT TGTGCGCGCT CCGCTTCCG  
 475 GGAGCGCTC CCGCGAGAG GTGCACCTCT CCGGCGAG ATG TCG GAG CGC AGA  
 Met Ser Glu Arg Arg  
 523 GAA GGC AAA GGC MAG GGG AAG GGC GGC AAG MAG GAC GGA GGC TCC GGG  
 Glu Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys Lys Asp Arg Gly Ser Gly  
 571 AAG AAG CCC GTG CCC GGT GGC GGC CGC AGC CCA GCC TTG CCT CCC  
 Lys Lys Pro Val Pro Ala Ala Gly Pro Ser Pro Ala Leu Pro Pro  
 619 CCG TTG AAA GAG ATG AAG ATG CAG GAG TCT GTG GCA GGT TCC AAA CTA  
 Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Glu Ser Val Ala Gly Ser Lys Leu  
 667 GTG CTT CCG TTC GAG ACC ACT TCT GAA TAC TCC TCT CAC AAG TTC AAG  
 Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser  
 715 TGG TTC AAG AAT GGG AGT GAA TTA AGC CGA AAG AAC AAA CCA CAA AAC  
 Trp Phe Lys Asn Gly Ser Glu Leu Ser Arg Lys Asn Lys Pro Glu Asn  
 763 ATC AAG ATA CAG AAA AAG CCG GGG AAG TCA GAA CTT GCG ATT ACC AAA  
 Ile Lys Ile Glu Lys Arg Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys  
 811 GGG TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA TAT ATG TCC AAA GTG ATC ACC AAA  
 Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys

FIG. 31B

GGF2BPP5 マクド配列および推定されたタンパク質の配列

859 **U**  
 CTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAC ATC ACC ATT GTG GAG TCA AAC  
 Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn  
 907 **B**  
 GAG ATC ACC ACT GGC ATG GCA GGC TCA ACT GAG ACA GCG TAT GTG TCT  
 Glu Ile Thr Thr Thr Met Pro Ala Ser Thr Glu Thr Ala Tyr Val Ser  
 955 TCA GAG TCT CCC ATT AGA ATA TCA GTA TCA ACA GAA GGA ACA AAT ACT  
 Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr Glu Gly Thr Asn Thr  
 1003 TCT TCA TCC ACA TCT ACA TCT ACA GCT GGG ACA AGC CAT CTT GTC AAG  
 Ser Ser Ser Thr Ser Thr Thr Ala Gly Thr Ser His Leu Val Lys  
 1051 TGT CCA GAG AAG CAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT GGA GGC GAG TCC TTC  
 Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe  
 1099 ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC TTG TCC AAG TCC CCA  
 Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro  
 1147 AAT GAG TTT ACT GGT GAT GCG TCC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC  
 Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Glu Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe  
 1193 TAC AGT AGC TCC ACT CCC TTT CTG TCT GTG GAA TAGGCCATG  
 Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu  
 1253 CTCACCTGGT GCGCGTCTCT TGTTCGCGA TCTCCCTCA GATTCACCT AGAGTAGT  
 GCGTTTACC AGGTCAACA TTGACTGCC CTGCGTGTG CATGAGACA TTAACACAG  
 1313 CGAFTSTATG ACTTCTCTG TCGGTGACTA GTGGGCTGTG AGCTACTCGT AGGTGGTAA  
 1373 GCGTCCAGT TTTCGAAATP TGAATGAAA TTACTGTGAT AGCACATGAT AGTCCCTCIC  
 1413 ACCCGATGCA TCGACATRA AAGCTTCAA AAGTCTCACT TTATTTGAAA AATPMAAAT  
 1493 CGTTCCAGG GACAGTCCCT CTCTTTATA AATGACCCCT ATCCTTGAAG AGGAGGTGTG  
 1553 TTAAGTGTAT ACCAGTACAC ACTTGAATG ATGGTAACTT CCGTCCGTT CAGATGTGT  
 1613 TCTTCTGAC AATPAAACAG AATPAAAAA AAAAAAAA A

FIG. 32A

GGF2BPP2 マクド配列および推定されたタンパク質の配列

SEQ ID NO: 145:

48 **U** **N** **A** **U**  
 CAT CAN GTG TGG GCG GCG AAA GCC GGG GTG AAG AAG GAC TCG CTG  
 His Ile Val Trp Ala Ala Lys Ala Gly Lys Lys Lys Asp Ser Ser Lys  
 96 CTC ACC GTG GCG CTG GGC GCC TGG GGC CAC CCC GCC TTC CCC TCC TCC  
 Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys  
 144 GGG CGC CTT AAG GAG GAC AGC AGG TAC TTC TTC ATG GAG CCC GAG  
 Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu  
 192 GCC AAC AGC AGC GGC GGC CCC CTT CCG AGC CTC CTT CCC CCC  
 Ala Asn Ser Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu Pro Ser Leu Leu Pro Pro  
 240 TCT CGA GAC GGG CCG GAA CCT CAA GGA GGT CAG CCG GGT GCT GTG  
 Ser Arg Asp Gly Pro Glu Pro Glu Gly Gly Glu Pro Glu Ala Val  
 288 GAA CCG TGC GGC CTT CCC CCG TTG AAA GAG ATG AAG AGT CAG GAG  
 Glu Arg Cys Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Glu Glu  
 336 TCT GTG GCA GGT TCC AAA CTA GTG CTT CCG TGC GAG ACC AGT TCT GAA  
 Ser Val Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu  
 384 TAC TCC TCT CTC AAG TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AGT GAA TTA AGC  
 Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Ser Lys Leu Ser  
 432 CGA AAG AAC AAA CCA GAA AAC ATC AAG ATA CAG AAA AGG CCG GGG AAG  
 Arg Lys Asn Lys Pro Glu Asn Ile Lys Ile Glu Lys Arg Pro Gly Lys  
 480 TCA GAA CTT CCG APT AGC AAA GCG TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAA TAT  
 Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr  
 528 ATG TGC AAA GTG ATC AGC AAA CTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAC  
 Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn

FIG. 32B

GGF2BPP2 マクド配列および推定されたタンパク質の配列

576 **U**  
 ATC ACC ATT GTG GAG TCA AAC GCC ACA TCC ACA TCT ACA GCT GGG ACA  
 Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Ala Gly Thr  
 624 **B**  
 AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
 672 GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
 720 TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA JTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT  
 Leu Cys Lys Cys Glu Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn  
 768 CTG CCC ATG AAA GTG CAA ACC CAA GAA AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT  
 Val Pro Met Lys Val Glu Thr Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr  
 816 GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC TAC AGT ACG TCC  
 Gly Asp Arg Cys Glu Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser  
 870 ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA TAGCGAATCT CAGTCGGTCC CCGTTTCTTG  
 Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu  
 930 TTGCGGCATC TCCCTCAGA TTGCGNCTAG AGCTAGATCC GYTTTACCAG GCTAACAATT  
 990 GACTGCTCT GCCTGTCCGA TGAGAACATT AACACAGCG ATTTGATGAC TTTCTCTGTC  
 1050 CGTGACTACT GGGCTCTGAG CTACTCTGAT GTGCGTAAG CTCACAGTGT TCTGAATG  
 1110 ATCTTGAATT ACTGTGATAC GACATGATAG TCCCTCTCAC CCAAGTCAAT GACAATNAG  
 1140 GCGTTGAAA GTCAAAAAA AAAAAAAA

FIG. 33A

GGF2BPP4ヌクレオチド配列および推定されたタンパク質の配列

SEQ ID NO: 146:
G AAG TCA GAA CTT CGC ATT AGC AAA GGC TCA CTG GCT GAT TCT TCG AAG GAA
Lys Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu
TAT ATG TGC AAA GTG ATC AGC AAA CTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC
Tyr Met Cys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala
AAC ATC ACC AAT GTG GAG TCA AAC GCC ACA TCC ACA TCT ACA GCT GGG
Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Ala Gly
ACA AGC CAT CTT CTC AAG TGT GCA GAG ARG GAG AAA ACT TTC TGT GTG
Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Thr Phe Cys Val
AAT GGA GGC GAC TGC ATT ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA
Asn Gly Asp Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg
TAC TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG
Tyr Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu
AAT GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA GAA AAA GCG GAG GCG CTC TAC
Asn Val Pro Met Lys Val Gln Thr Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr
CAG AAG AGA GTG CTC ACC ATT ACC GGC ATT TCC ATC GCG CTC GTG
Gln Lys Arg Val Leu Thr Ile Thr Gly Ile Cys Ile Ala Leu Leu Val
GTT GGC ATC ATG TGT CTC GTG TAC TCC AAA ACC AAG AAA CAA CCG
Val Gly Ile Met Cys Val Val Tyr Cys Lys Thr Lys Lys Lys Arg
AAA AAG CTT CAT GAC CGC CTT GCG CAG AGC CTT GCG TCT GAA AGA BAC
Lys Lys Leu His Asp Arg Leu Arg Gln Ser Leu Arg Ser Glu Arg Asn
ACC ATG ATG AAC GTA GCC AAC GGG CCC CAC ACC AAT CCG CCC CCC
Thr Met Met Asn Val Ala Asn Gly Pro His His Pro Asn Pro Pro Pro
GAG GAG GTG CAG CTG ATG AAT CAA TAC GTA TCT AAA AAT GTC ATC TCT
Glu Asn Val Gln Leu Asn Tyr Val Ser Lys Asn Val Ile Ser

FIG. 33B

GGF2BPP4ヌクレオチド配列および推定されたタンパク質の配列

AGC GAG CAT ATT GTT GAG AGA GAG GCG GAG AGC TCT TTT TCC ACC AGT
Ser Glu His Ile Val Glu Arg Glu Ala Glu Ser Ser Phe Ser Thr Ser
CAC TAC ACT TCG ACA GCT CAT TCC ACT ACT GTC ACT CAG ACT CCG
His Tyr Thr Ser Thr Ala His His Ser Thr Thr Val Thr Gln Thr Pro
AGT CAC AGC TGG AGC AAT GGA CAC ACT GAA AGC ATC ATT TCG GAA AGC
Ser His Ser Trp Ser Asn Gly His Thr Glu Ser Ile Ile Ser Glu Ser
CAC TCT GTC ATC GTG ATG TCA TCC GTA GAA AAC AGT AGG CAC AGC AGC
His Ser Val Ile Val Met Ser Ser Val Glu Asn Ser Arg His Ser Ser
CCG ACT GGG GGC CCG AGA GGA CCG CTT GGC TGG GGA GCG CCT CGT
Pro Thr Gly Gly Pro Arg Arg Leu Asn Gly Leu Gly Pro Arg
GAA TGT AAC AGC TTC CTC AGG CAT GCC AGA GAA ACC CCT GAC TCC TAC
Glu Cys Asn Ser Phe Leu Arg His Ala Arg Glu Thr Pro Asp Ser Tyr
CGA GAG TCT CCT CAT AGT GAA AGA CAT AAC CTT ATA GCT GAG CTA AGG
Arg Asp Ser Pro His Ser Glu Arg His Asn Leu Ile Ala Glu Leu Arg
AGA AAC GAG GCC CAC AGA TCC AAA TGC ATG CAG ATC CAG CTT TCC GCA
Arg Asn Lys Ala His Arg Ser Lys Cys Met Gln Ile Gln Leu Ser Ala
ACT CAT CTT AGA GCT TCT TCC AATT CCC CAT TGG GCT TCA TTC TCT AG
Thr His Leu Arg Ala Ser Ser Ile Pro His Trp Ala Ser Phe Ser Lys
ACC CCT TGG CCT TTA GGA AGG TAT GTA TCA GCA ATG ACC ACC CCG GCT
Thr Pro Trp Pro Leu Leu Gly Arg Tyr Val Ser Ala Met Thr Thr Pro Ala
CGT ATG TCA CCT GTA GAT TTC CAC ACG CCA AGC TCC CCC AAG TCA CCC
Arg Met Ser Pro Val Asp Phe His Thr Pro Ser Lys Ser Ser
CCT TCG GAA ATG TCC CCG GTC TCC ACC AGC AGC GTC TCC ATG CCC
Pro Ser Glu Met Ser Pro Pro Val Ser Thr Thr Val Ser Met Met Pro

FIG. 33C

GGF2BPP4ヌクレオチド配列および推定されたタンパク質の配列

1201 TCC ATG GCG GTC AGT CCC TTC CTG GAA GAG GAG AGA CCC CTG CTC CTT
Ser Met Ala Val Ser Pro Phe Val Glu Glu Arg Pro Leu Leu Leu
1249 GTG ACG CCA CCA CGG CTG GCG GAG AAG TAT GAC CAC CAC GCG CAG CAA
Val Thr Pro Pro Arg Leu Arg Glu Lys Tyr Asp His His Ala Gln Gln
1297 TTC AAC TCG TTC CAC TGC AAC CCC GCG CAT GAG AGC AAC ACC CTG CCC
Phe Asn Ser Phe His Cys Asn Pro Ala His Glu Ser Asn Ser Leu Pro
1345 CCC AGC CCC TTG AGG ATG GTG GAG GAG GAT GAA TAT GAA ACG ACC CAG
Pro Ser Pro Leu Arg Ile Val Glu Asp Glu Glu Tyr Thr Thr Gln
1393 GAG TAC GAA CCA GCT CAA GAG CCG CTT NAG AAA CTC ACC AAC ACC AGC
Glu Tyr Glu Pro Ala Gln Glu Pro Val Lys Lys Leu Thr Asn Ser Ser
1441 CCG GCG GCC AAA AGA ACC AAG CCC AAT GGT CAC ATT GCC CAC AGG TTG
Arg Arg Ala Lys Arg Thr Lys Pro Asn Gly His Ile Ala His Arg Leu
1489 GAA ATG GAC AAC AAC ACA GGC GCT GAC AGC AGT AAC TCA GAG AGC GAA
Glu Met Asp Asn Asn Thr Gly Ala Asp Ser Ser Asn Ser Glu Ser Glu
1537 ACA GAG GAT GAA AGA CTA GGA GAA GAT ACG CCT TTC CTG GCC ATA CAG
Thr Glu Asp Glu Arg Val Gly Glu Asp Thr Pro Phe Leu Ala Ile Gln
1585 AAC CCC CTG GCA GCC AGT CTC GAG GCG GCC CCT GCG TTC CCC CTG GTC
Asn Pro Leu Ala Ala Ser Leu Glu Ala Ala Pro Ala Phe Arg Leu Val
1633 GAC AGC AGG ACT AAC CCA ACA GGC GGC TTC TCT CCG CAG GAA GAA TTG
Gln Ala Arg Leu Ser Gly Val Ile Ala Asn Gln Asp Pro Ile Ala Val
1681 CAG GCC AGG CTC TCC GGT GTA ATC GCT AAC CAA GAC CCT ATC GCT GTC
Glu Ala Arg Leu Ser Gly Val Ile Ala Asn Gln Asp Pro Ile Ala Val
1741 TARACCGAA ATACACCCCAT AGATTCACCT GTAAACCTTT ATTTTATATA ATPAAAGTATT
CCACCTTAAA TTRAACAAA AAA
1764

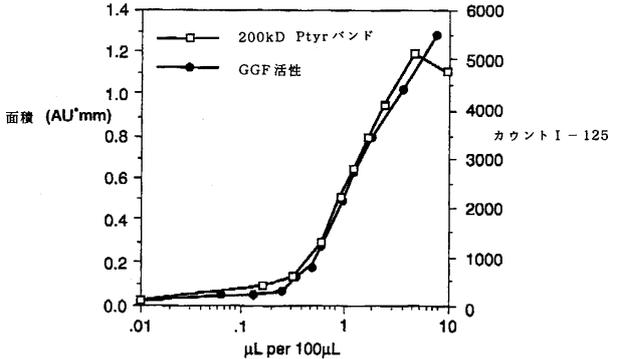
FIGURE 34

GGF2bpo5KCAEKEKTFVCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNFTGDRCONYMASPY1
GGF2bpo5KCAEKEKTFVCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPGFTGDRCTENYPMKVG2
DEGE ECLRKYKDFCH - GECKYKELRAPS - CKCQQEYFGERGCKSNKTH3

- 1 (SEQ ID NO: 147)
2 (SEQ ID NO: 148)
3 (SEQ ID NO: 149)

FIG. 35

分選促進活性と比較した200kDチロシンリン酸化





【 3 9 】  
EGFLJ

```

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAACTTTCTGTGTAATGGAGCCGAGTGC
S H L V K C A E E E K T F C V N G G E C
TTCATGGTAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTCCCAAATGAGTTT
F H V K D L S H P S R Y L C K C P N E F
ACTGGTGATCGCTGCCAAACTACGTAATGGCCAGCTTCTACAAAGCCGAGGAGCTCTAC
T G D R C Q N Y V N A S P Y K A E E L Y
TAA

```

(SEQ ID NO: 152)

FIGURE 39

【 4 0 】  
EGFLA

```

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAACTTTCTGTGTAATGGAGCCGAGTGC
S H L V K C A E E E K T F C V N G G E C
TTCATGGTAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTCCCAAATGAGTTT
F H V K D L S H P S R Y L C K C P N E F
ACTGGTGATCGCTGCCAAACTACGTAATGGCCAGCTTCTACAAAGCCGAGGAGCTCTAC
T G D R C Q N Y V N A S P Y K E L G I E
TTTATGGAGAAAGCCGAGGAGCTCTACTAA
F N E K A E E L Y

```

(SEQ ID NO: 153)

FIGURE 40

【 4 1 】  
EGFLS

```

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAACTTTCTGTGTAATGGAGCCGAGTGC
S H L V K C A E E E K T F C V N G G E C
TTCATGGTAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTCCCAAATGAGTTT
F H V K D L S H P S R Y L C K C Q P G F
ACTGGAGCGAGATGTACTGAGAATGTGCCATGAAAGTCCAAACCAAGAAAAGTCCCA
T G A R C T E N V P N K V Q T Q E K C P
AATGAGTTTACTGGTGATCGCTGCCAAACTACGTAATGGCCAGCTTCTACAGTACCTCC
N E P T G D R C Q N Y V N A S P Y S T S
ACTCCCTTTCTGTCTCTGCTCAATAG
T P F L S L P E

```

(SEQ ID NO: 154)

FIGURE 41

【 4 2 】  
EGFLA

```

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAACTTTCTGTGTAATGGAGCCGAGTGC
S H L V K C A E E E K T F C V N G G E C
TTCATGGTAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTCCCAAATGAGTTT
F H V K D L S H P S R Y L C K C Q P G F
ACTGGAGCGAGATGTACTGAGAATGTGCCATGAAAGTCCAAACCAAGAAAAGTCCCA
T G A R C T E N V P N K V Q T Q E K C P
AATGAGTTTACTGGTGATCGCTGCCAAACTACGTAATGGCCAGCTTCTACAAAGCCGAG
N E P T G D R C Q N Y V N A S P Y K A E
GAGCTCTACTAA
E L Y

```

(SEQ ID NO: 155)

FIGURE 42

GGF2HBS5

【 4 3 】

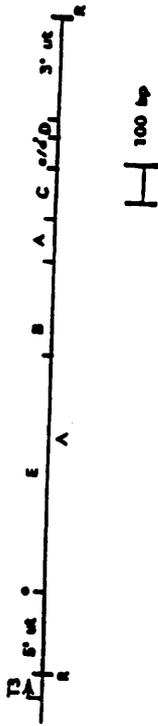


FIGURE 43

GGF2HBS5のヌクレオチド配列および推定されたアミノ酸配列

【 4 4 B 】

579 CAG CGG CCG CAG CAG GCG 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 Ala  
 627 GGC GAG GCA GGG GCG TGG GGC GGC GAT CGC GAG CCG CCA GCC GCG GGC  
 Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly  
 675 CCA CGG CCG CTG GGG CCG CCC GAG CAG CCG CTG CTC GCC GCC AAC  
 Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn  
 723 GGG ACC GTG CCC ACT 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  
 771 CCC GGG GAG GAG CCG 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  
 Lys Val His Glu Val Trp Ala  
 GGF-II 01 & GGF-II 11  
 819 GTG AAA GCC GGG GTG AAG AAG GAC TCG CTG CTC ACC GTG GCG CTG  
 Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu  
 Ala Lys Asp Leu Leu Leu Xaa Val Leu  
 GGF-II 10  
 867 GGG ACC TGG GGC CAC CCC TTC CCG TCC GGG AGG CTC AAG GAG  
 Gly Thr Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu  
 Gly Ala Trp Gly Pro Pro Ala Phe Pro Val Xaa Tyr  
 GGF-II 03  
 915 GAC AGC AGG TAC TTC ATG GAG CCC GAC GCC AAC AGC ACC AGC  
 Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser  
 Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu Ala Xaa Ser Ser Gly  
 GGF-II 02

GGF2HBS5のヌクレオチド配列および推定されたアミノ酸配列

【 4 4 C 】

963 CGC GCG CCG GCC TTC CGA GGC TCT TTC CCC CCT CTG GAG ACG GGC  
 Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly  
 1011 CCG AAC CTC AAG AAG GAG CTC AGC CCG GTG CTG TGC AAG CCG TGC GCC  
 Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala  
 1059 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  
 1107 TCC AAA CTA GTC CTT CCG TGT GAA ACC AGT TCT GAA TAC TCC TCT CTC  
 Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu  
 Leu Val Leu Arg  
 GGF-II 06  
 1155 AGA TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AAT GAA TTG AAT CGA AAA AAC AAA  
 Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Leu Asn Arg Lys Asn Lys  
 1203 CCA CAA AAT ATC AAG ATA CAA AAA AAG CCA GGG AAG TCA GAA CTT CCG  
 Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg  
 1251 ATT AAC AAA GCA TCA CTG GCT TCT GGA GAG TAT ATG TGC AAA CTG  
 Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val  
 Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Xaa Lys  
 GGF-II 12  
 1299 ATC ACC AAA TTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAT ATC ACC ATC GTG  
 Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val  
 1347 GAA TCA AAC GCT ACA TCT ACA TCC ACC ACT GGG ACA AGC CAT CTT GTA  
 Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val

GGF2HBS5のヌクレオチド配列および推定されたアミノ酸配列

【 4 4 A 】

604 GGAAATTCCTT TTTTITTTTTT TTTTTTCTT NNITTTTTTTT TGCCCTTATA CCTCTCGCC  
 120 TTTCTGTGGT TCCATCCACT TCTTCCCCCT CCTCTCCCA TAAACANCT TCTTACCCCT  
 180 GCACCCCAA TAAATAAATA AAAGGAGGAG GGCAGGGGG GAGGAGGAG AGTGTGCTG  
 240 CGAGGGGAG GAAAGGGAG GCAGCCGAG AAGAGCCGG CAGAGTCCG ACCGACACC  
 291 AGAAGCCCG ACCCACTCG CACC ATG AGA TGG CGA CGC GCG CCG CCG CCG  
 Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg  
 Met Arg Trp Arg Ala Pro Arg Arg  
 339 TCC GGG GGT CCC GCG CCC GCG CAG CCG CCC GGC TCC GCC GCC CCG  
 TCG TCG CCG CCG CTG CCG CTG CCA CTA CTG CTG CTG CTG GGG ACC  
 Ser Ser Pro Leu Thr Val  
 Val Cys Leu Leu Thr Val  
 GGF-II 09  
 435 GCG GCC CTG GCG CCG GGG GCG GCG GCC AAC GAG GCG GCT CCC GCG  
 Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala  
 Ala Ala Leu Pro Pro  
 463 GGG GCC TCG GTG TGC TAC TCC CCG CCC AGC GTG GGA TCG GTG CAG  
 Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser Pro Val Ser Val Gly Ser Val Gln  
 Val Ser Pro Val Ser Val Gly Ser Val Gln  
 GGF-II 08  
 531 GAG CTA GCT CAG CGC GCC GCG GTG ATC GAG GGA AAG GTG CAC CCG  
 Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro  
 Glu Leu Val Gln Arg Trp Phe Val Val Ile Glu Gly Lys  
 GGF-II 04

【 4 4 D 】

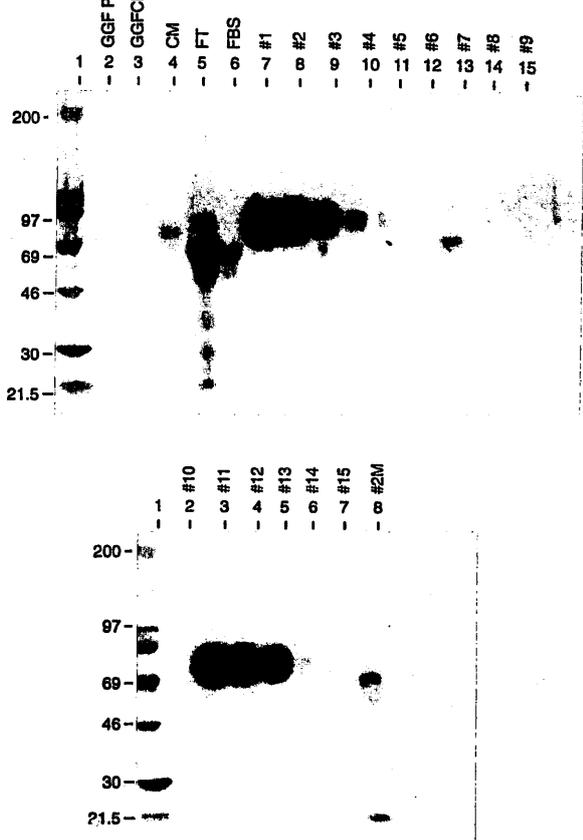
FIG. 44D

GGF2HBS5のヌクレオチド配列および推定されたアミノ酸配列

AAA TGT GCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT GGA GGG GAG TGC  
 Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Ash Gly Gly Glu Cys  
 1395  
 TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAC CCC TCG AGA TAC TTG TGC AAG TGC  
 Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys  
 1443  
 CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC  
 Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Glu Asn Tyr Val Met Ala Ser  
 1491  
 TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA  
 Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Phe Leu Ser Leu Pro Glu  
 1530  
 TAGGACCATG CTCAGTTCCT GCTGCTTCT TGTGCTGCA TCCTCCCTCA GATTCACCT  
 1590  
 AGAGCTAGAT GTGTCTTACC AGATCTAATA TTGACTGCTT CTGCCTCTCG CATGAGAACA  
 1650  
 TTACAAAG CAATTCTATT ACTTCTCTCTG TTCGGACTA GTTGGCTCTG AGATCTAAT  
 1710  
 AGTCTGTGA GGCTCCGGAT GTTCTCTGAA TTGATATGCA ATGATGTGAT ACAATTGAT  
 1770  
 AGTCATATC AAGCAGTGA ATATGATAT AAAGCATTT CAAAGTCTCA CTTTATTTGA  
 1830  
 TAAATAAA ATCATTTTAC TGAACAGTCC ATCTTCTTTA TACAATGACC ACAATCCGAA  
 1890  
 AAGGTCTTG CTAAGCTGA ACCGATATCC ACTTGAATG ATGTTAAGTT AATTTGATT  
 1950  
 CAGANTCTGT TATTTCTCAC AATAAATCAT AATAAAGGA AAAAAAAA AAA  
 2003

【 4 5 B 】

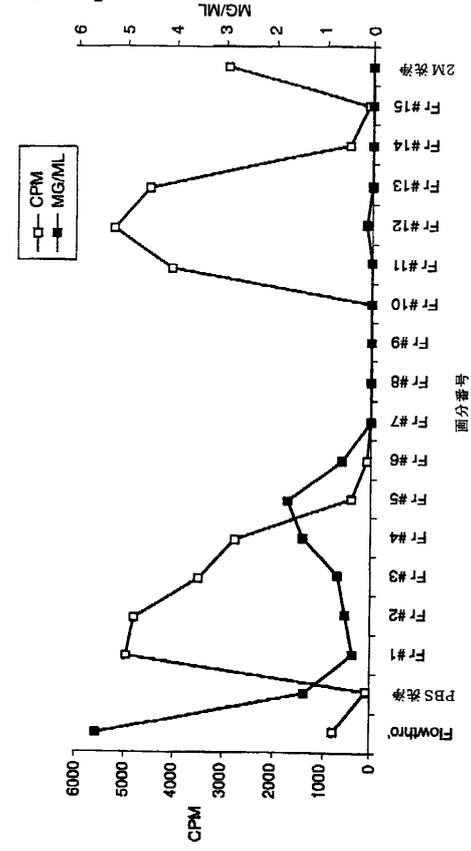
FIG. 45B



【 4 5 A 】

FIG. 45A

陽イオン交換カラムによるrGGFの精製



【 4 6 】

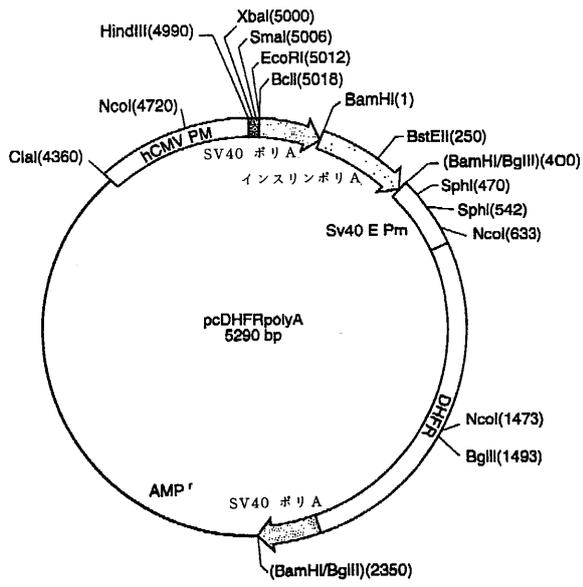
1 MRNRAPRSRGPGRAPGSAARSPPLELLPLLLLLTAAALGGAAGVNEAPRAGS  
 II-8 II-4  
 61 VCVSSPVSQVOLAORAARAVIEGKAVHPQRQGGALDRKRAAARAGEAGAGGDRPPAA  
 II-1 II-10  
 121 GPRALGPPAEPLLAANGTVPSMPTAPVPSAGPGEAEPLYLVKRVQWAVKAGLKKDLSL  
 II-3 II-2  
 181 LTVRLGTVGHPAFPSGGRKEDSRVITPFMEPDANSTSRAPAFRASFPPLGTGRNLKVEV  
 2  
 241 SRVLCRKC.....ALPPQLKMKRSQESAGSK  
 GCFHBS5  
 SEQ ID NO: 167 GCFHBS5  
 1 R K G D VP GP R V  
 1 GCFHBS1  
 1 GCFHBS5  
 268 II-6 II-18 II-14 II-11 I-7, II-12,  
 53 LVLRCTSSYSLSIRFKVFNQNLNKNKPKQIKOKPKRSELIRNKASLADSGEYMC  
 53 II-13  
 328 4 K S S R S  
 113 KVISKLNDASANITIVESK.....ATSTS  
 113 II-12  
 354 6 T TGTSHLVKCAEKETKCVNGGCFPWKDLNPSRYLCKCFEFTGDRCONVYMASFYST  
 173 A  
 173 II-15 8  
 413 STPFSLRPE\*  
 232  
 232

FIG. 46

ヒトおよびウシのグリッ成長因子の推定された配列

【 図 47 】

FIG. 47



## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
**C 1 2 P 21/02 (2006.01)** C 1 2 P 21/02 C  
 C 1 2 R 1/19 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C  
 C 1 2 R 1:19

(72)発明者 スクラー、ロバート  
 アメリカ合衆国、0 2 1 5 9 マサチューセッツ州、ニュートン、スパイアーズ ロード 3 6

(72)発明者 マーシオニ、マーク  
 アメリカ合衆国、0 2 1 7 4 マサチューセッツ州、アーリントン、ツイン サークル ドライブ  
 2 4

(72)発明者 グウィン、デイビッド アイ  
 アメリカ合衆国、0 1 9 1 5 マサチューセッツ州、ビバリー、グローバー ストリート 7 7

審査官 斎藤 真由美

(56)参考文献 Nature, 1 9 9 3年 3月2 5日, Vol.362, p.312-318  
 Science, 1 9 9 2年 5月2 2日, Vol.256, p.1205-1210

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

C12N 15/00 - 90  
 C07K 14/00 - 16/00  
 C12P 21/00 - 08  
 C12N 1/00 - 7/08  
 A61K 31/00 - 48/00  
 A61P 1/00 - 43/00  
 G01N 33/50 - 98  
 PubMed, MEDLINE(STN)  
 BIOSIS/WPI (DIALOG)  
 GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq