

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3717930号

(P3717930)

(45) 発行日 平成17年11月16日(2005.11.16)

(24) 登録日 平成17年9月9日(2005.9.9)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 38/27

A 6 1 P 43/00 1 0 7

A 6 1 P 43/00

C O 7 H 21/04 B

C O 7 H 21/04

C O 7 K 14/51

C O 7 K 14/51

C 1 2 N 1/21

請求項の数 25 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-516293
 (86) (22) 出願日 平成6年12月6日(1994.12.6)
 (65) 公表番号 特表平9-506261
 (43) 公表日 平成9年6月24日(1997.6.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1994/014030
 (87) 国際公開番号 W01995/016035
 (87) 国際公開日 平成7年6月15日(1995.6.15)
 審査請求日 平成13年8月20日(2001.8.20)
 (31) 優先権主張番号 08/164,103
 (32) 優先日 平成5年12月7日(1993.12.7)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 08/217,780
 (32) 優先日 平成6年3月25日(1994.3.25)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 592124573
 ジェネティックス・インスティテュート・リ
 ミテッド・ライアビリティ・カンパニー
 GENETICS INSTITUTE,
 LLC
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州021
 40, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク
 ・ドライブ 87
 (73) 特許権者 592257310
 プレジデント・アンド・フェロウズ・オブ
 ・ハーバード・カレッジ
 アメリカ合衆国02138マサチューセ
 ッ州ケンブリッジ、クウィンシー・ストリ
 ート17

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 BMP-12、BMP-13およびそれらの臚誘導組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

DNA配列が、

(a) 配列番号：1のヌクレオチド496、571もしくは577から882まで；および

(b) (a)の配列に相補的な単離DNA

からなる群より選択されるものである、臚ノ靱帯様組織の形成を誘導する能力を有するBMP-12蛋白をコードする単離DNA。

【請求項2】

DNA配列が、

(a) 配列番号：25のヌクレオチド605もしくは659から964まで；および

(b) (a)の配列に相補的な単離DNA

からなる群より選択されるものである、臚ノ靱帯様組織の形成を誘導する能力を有するBMP-13蛋白をコードする単離DNA。

【請求項3】

請求項1または2のDNA配列に正しい読み取り枠にて連結されたBMPファミリーの蛋白のメンバー由来のプロペプチドをコードするDNA配列を含むキメラDNA分子。

【請求項4】

プロペプチドがBMP-2由来のプロペプチドである請求項3のキメラDNA分子。

【請求項5】

10

20

請求項 1 または 2 の DNA 配列に正しい読み取り枠にて連結された TGF - スーパーファミリーの蛋白のメンバー由来のプロペプチドをコードする DNA 配列を含むキメラ DNA 分子。

【請求項 6】

請求項 1 の DNA で形質転換された宿主細胞。

【請求項 7】

請求項 2 の DNA で形質転換された宿主細胞。

【請求項 8】

請求項 3 の DNA で形質転換された宿主細胞。

【請求項 9】

発現制御配列に作動可能に連結された請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項の DNA を含むベクター。

【請求項 10】

請求項 9 のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 11】

以下の工程：

(a) 請求項 1 の DNA で形質転換された宿主細胞を培養し；次いで、

(b) 培地から該 BMP - 12 蛋白を回収し精製する

ことを特徴とする精製 BMP - 12 蛋白の製造方法。

【請求項 12】

以下の工程：

(a) 請求項 2 の DNA で形質転換された宿主細胞を培養し；次いで、

(b) 培地から該 BMP - 13 蛋白を回収し精製する

ことを特徴とする精製 BMP - 13 蛋白の製造方法。

【請求項 13】

以下の群：

(a) 配列番号：2 に示すアミノ酸 - 25 からアミノ酸 104 まで；

(b) 配列番号：2 に示すアミノ酸 1 からアミノ酸 104 まで；および

(c) 配列番号：2 に示すアミノ酸 3 からアミノ酸 104 まで

から選択されるアミノ酸配列を含む精製ポリペプチド。

【請求項 14】

以下の群：

(a) 配列番号：26 示すアミノ酸 1 からアミノ酸 120 まで；および

(b) 配列番号：26 示すアミノ酸 19 からアミノ酸 120 まで

から選択されるアミノ酸配列を含む精製ポリペプチド。

【請求項 15】

請求項 11 または 12 のアミノ酸配列をそれぞれ有する 2 個のサブユニットを含むダイマーの形態の精製ポリペプチド。

【請求項 16】

下記工程：

(a) 配列番号：1 のヌクレオチド 496、571 もしくは 577 から 882 までの DNA 配列で形質転換された細胞を培養し；次いで

(b) 配列番号：2 のアミノ酸 - 25、1 もしくは 3 から 104 までのアミノ酸を含む蛋白を、培地から回収し精製する

により得られる精製蛋白。

【請求項 17】

下記工程：

(a) 配列番号：25 のヌクレオチド 605 もしくは 659 から 964 までの DNA 配列で形質転換された細胞を培養し；次いで

(b) 配列番号：26 のアミノ酸 1 もしくは 19 から 120 までのアミノ酸を含む蛋白を

10

20

30

40

50

、培地から回収し精製する
により得られる精製蛋白。

【請求項 18】

腱 / 靭帯様組織の形成を誘導する能力により特徴づけられる請求項 13 記載のポリペプチド。

【請求項 19】

腱 / 靭帯様組織の形成を誘導する能力により特徴づけられる請求項 14 記載のポリペプチド。

【請求項 20】

医薬上許容される担体と混合された有効量の請求項 18 または 19 のポリペプチドを含む 10
、腱または靭帯に関連した疾病を治療または予防するための医薬組成物。

【請求項 21】

医薬上許容される担体中の有効量の請求項 13 または 14 記載のポリペプチドを含む、腱 / 靭帯様組織の治癒および組織修復のための医薬組成物。

【請求項 22】

請求項 13 または 14 のポリペプチドのアミノ酸配列を有する 1 のモノマーと、TGF -
スーパーファミリーの蛋白のアミノ酸配列を有する 1 のモノマーとを含むヘテロダイマ
ー蛋白分子。

【請求項 23】

医薬上許容される担体と混合された有効量の請求項 13 または 14 記載のポリペプチドを 20
含む、腱 / 靭帯様組織修復用の医薬組成物。

【請求項 24】

腱 / 靭帯様組織の疾病を治療するための医薬組成物を製造するための、有効量の請求項 1
3 または 14 記載のポリペプチドの使用方法。

【請求項 25】

腱 / 靭帯様組織の疾病を治療するための医薬組成物を製造するための、有効量の MP - 5
2 の使用方法。

【発明の詳細な説明】

関連出願

本願は、1994年3月25日出願の第08/217,780号、1993年12月7日 30
出願の第08/164,103号および1994年11月2日出願の08/333,57
6号の一部継続出願である。

発明の分野

本発明は、精製蛋白の新規ファミリー、およびかかる蛋白を含有する組成物に関し、該組
成物は腱 / 靭帯様組織の形成、傷の治癒および靭帯ならびに他の組織の修復に有用である
。骨形態形成蛋白の活性を増大させるための組成物中にこれらの蛋白を用いてもよい。

発明の背景

骨、軟骨、腱、および骨ならびに他の組織抽出物に存在する他の組織の形成のに關与する
分子の検索は、骨形態形成蛋白 (BMPs) と呼ばれる新規なセットの分子の発見につな
がった。BMP - 1 ないし BMP - 11 と命名されたいくつかの蛋白の構造はすでに調べ 40
られている。これらの蛋白のユニークな誘導活性ならびにそれらの骨における存在は、そ
れらが骨修復プロセスにおける重要なレギュレーターであり、骨組織の通常の維持に必要
とされうるということを示唆する。他の生組織の形成において役割を果たすさらなる蛋白
を同定する必要がある。本発明は、腱 / 靭帯様組織誘導活性を有し、腱 / 靭帯様組織の形
成および修復を誘導するための組成物において有用である蛋白のファミリーの同定に關す
る。

発明の概要

1 の具体例において、本発明は、発明者らが VL - 1 と命名した腱 / 靭帯様組織誘導蛋白
をコードする DNA 分子からなる。この新規蛋白は、現在 BMP - 12 と呼ばれている。
さらに本発明は、BMP - 12 関連蛋白をコードする DNA 分子を包含する。 50

BMP - 12 関連蛋白は、BMP - 12 および VL - 1 を含む BMP / TGF - / Vg - 1 ファミリーの蛋白の部分集合であり、例えば、厳密性を減じた条件下で、下記プライマー 6 および 7 のとき BMP - 12 特異的プライマーを用いる PCR を用いてクローン化され同定される DNA 配列によりコードされる腱 / 靭帯様組織誘導蛋白として定義される。BMP - 12 関連蛋白をコードする DNA 配列が、アミノ酸レベルにおいて、配列番号：1 のアミノ酸 3 から 103 までと少なくとも 80% の相同性を有することが好ましい。

好ましくは、DNA 分子は、配列番号：1 に示す BMP - 12、またはさらに本明細書において説明する BMP - 12 関連蛋白をコードする DNA 配列を有する。BMP - 12 蛋白および BMP - 12 関連蛋白はともに、実施例において説明するアッセイにおいて腱 / 靭帯様組織の形成を誘導する能力により特徴づけられる。

10

本発明 DNA 分子は、好ましくは、配列番号：1 に記載された DNA 配列、より好ましくは、配列番号：1 のヌクレオチド 496 から 882 まで、571 から 882 までもしくは 577 から 882 まで；あるいは厳密条件下で上記のものにハイブリダイゼーションし、腱 / 靭帯様組織を形成する能力を示す蛋白をコードしている DNA 配列からなる。本発明 DNA 分子は、配列番号：25 に記載した DNA 配列；より好ましくは配列番号：25 のヌクレオチド 604 もしくは 658 から 964 までからなってもよい。

さらに本発明 DNA 分子は、配列番号：2 または配列番号：26 に示すアミノ酸配列を有する BMP - 12 関連蛋白をコードする DNA 配列、ならびに天然に存在する対立遺伝子および配列番号：2 もしくは配列番号：26 の等価な縮重コドン配列からなる DNA 分子を包含する。好ましくは、本発明 DNA 配列は、配列番号：2 のアミノ酸 25 から 104 まで、1 から 104 までもしくは 3 から 103 まで；あるいは配列番号：26 のアミノ酸 1 から 120 までしくは 19 から 120 までをコードする。DNA 配列は、5' から 3' 方向において、プロペプチドをコードするヌクレオチド、および配列番号：2 のアミノ酸 25 から 104 まで、1 から 104 までしくは 3 から 103 まで；あるいは配列番号：26 のアミノ酸 1 から 120 までしくは 19 から 120 までをコードするヌクレオチドからなってもよい。好ましくは、上記具体例において有用なプロペプチドは、ネイティブ (native) な BMP - 12 プロペプチドおよび TGF - スーパーファミリーまたは BMP ファミリーの異なるメンバー由来の蛋白プロペプチドからなる群より選択される。さらに本発明は、厳密条件下で上記 DNA 配列にハイブリダイゼーションし、腱 / 靭帯様組織を形成する能力を示す蛋白をコードしている DNA 配列からなる。

20

30

他の具体例において、本発明は、BMP - 12 蛋白または BMP - 12 関連蛋白をコードしている DNA 分子を含んでいる宿主細胞およびベクターからなる。宿主細胞およびベクターは、さらに発現調節配列に作動可能に結合したコーディング配列からなってもよい。

もう一つの具体例において、本発明は、精製 BMP - 12 関連蛋白の製造方法であって、(a) BMP - 12 関連蛋白をコードするヌクレオチド配列からなる上記 DNA 分子またはベクターで形質転換した宿主細胞を培養し；次いで、(b) 培地より該 BMP - 12 関連蛋白を回収し精製する工程からなる方法よりなる。好ましい具体例において、該方法は、(a) 配列番号：1 に示すヌクレオチド配列 496、571 もしくは 577 から 879 もしくは 882 まで；あるいは配列番号：25 のヌクレオチド配列 604 もしくは 658 から 963 までからなる DNA 分子で形質転換した細胞を培養し；次いで、

40

(b) 配列番号：2 に示すアミノ酸 - 25、1 もしくは 3 からアミノ酸 103 もしくは 104 まで；あるいは配列番号：26 に示すアミノ酸 1 もしくは 19 からアミノ酸 120 までのアミノ酸配列からなる蛋白を該培地から回収し精製することからなる。また、本発明は上記方法により製造される精製蛋白を包含する。

さらに本発明は、腱 / 靭帯様組織の形成を誘導する能力によって特徴づけられる精製 BMP

50

P - 1 2 関連蛋白からなる。好ましくは、BMP - 1 2 関連蛋白は配列番号：2 に示すアミノ酸配列からなる。好ましくは、ポリペプチドは配列番号：2 に示すアミノ酸 - 2 5、1 もしくは 3 から 1 0 3 もしくは 1 0 4 まで；あるいは配列番号：2 6 に示すアミノ酸 1 もしくは 1 9 から 1 2 0 までからなる。好ましい具体例において、精製ポリペプチドは、それぞれが配列番号：2 のアミノ酸配列とともに形成される、2 つのサブユニットからなるダイマーの形態であってもよい。

もう1つの具体例において、本発明は、有効量の上記BMP - 1 2 関連蛋白からなる組成物よりなる。該組成物において蛋白は医薬上許容される担体と混合されていてもよい。

また、本発明は、腱炎、または他の腱もしくは靭帯の欠損の治療のための、および腱/靭帯様組織の形成を必要とする患者における腱/靭帯様組織の形成のための、腱/靭帯様組織の治癒および組織の修復方法であって、該患者に有効量の上記組成物を投与することからなる方法を包含する。

他の具体例は、BMP - 1 2 をコードするDNA配列に正しい読み取り枠で結合したTGF - スーパーファミリーのメンバー由来のプロペプチドをコードしているDNA配列からなるキメラDNA分子を包含する。1の適当なプロペプチドはBMP - 2 由来のプロペプチドである。また、本発明は、配列番号：2 に示すアミノ酸配列有する1のモノマー、およびTGF - サブファミリーの別の蛋白のアミノ酸配列を有する1のモノマーからなるヘテロダイマー蛋白分子を包含する。

最後に、本発明は、腱/靭帯様組織の形成を必要とする患者における腱/靭帯様組織の形成の誘導方法であって、腱/靭帯様組織の形成を誘導する能力を示す蛋白であって配列番号：2 または配列番号：4 または配列番号：2 6 に示すアミノ酸配列を有する蛋白からなる有効量の組成物を該患者に投与することからなる方法よりなる。より好ましくは、アミノ酸配列は、(a) 配列番号：2 のアミノ酸 2 5、1 もしくは 3 から 1 0 3 もしくは 1 0 4；(b) 配列番号：4 のアミノ酸 1 もしくは 1 9 から 1 2 0 まで；(c) 配列番号：2 6 のアミノ酸 1 もしくは 1 9 から 1 1 9 もしくは 1 2 0 まで；(d) 腱/靭帯形成能を示す(a)、(b)または(c)の変異体および/または変種のうちの1つである。上記方法の他の具体例において、蛋白は、配列番号：1、配列番号：3 または配列番号：2 5 のDNA配列によりコードされ、より好ましくは、(a) 配列番号：1 のヌクレオチド 4 9 6、5 7 1 もしくは 5 7 7 から 8 7 9 もしくは 8 8 2 まで；(b) 配列番号：3 のヌクレオチド 8 4 5 もしくは 8 9 9 から 1 2 0 1 もしくは 1 2 0 4 まで；(c) 配列番号：2 5 のヌクレオチド 6 0 5 もしくは 6 5 9 から 9 6 1 もしくは 9 6 4 まで；および(d) 厳密条件下で(a)または(b)とハイブリダイゼーションし、腱/靭帯様組織の形成能を示す蛋白をコードしている配列のうちの1つによりコードされる。

配列の説明

配列番号：1 はヒト・BMP - 1 2 をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号：2 は成熟ヒト・BMP - 1 2 ポリペプチドからなるアミノ酸配列である。

配列番号：3 は蛋白MP 5 2 をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号：4 は成熟MP 5 2 ポリペプチドからなるアミノ酸配列である。

配列番号：5 はヒト・BMP - 1 2 をコードする配列の特異的に増幅された部分のヌクレオチド配列である。

配列番号：6 は配列番号：5 のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：7 はヒト・VL - 1 をコードする配列の特異的に増幅された部分のヌクレオチド配列である。

配列番号：8 は配列番号：7 のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：9 はイー・コリにおけるBMP - 1 2 の発現に使用されるプラスミドpALV 1 - 7 8 1 のヌクレオチド配列である。

配列番号：1 0 はネズミ・クローンmV 1 のフラグメントのヌクレオチド配列である。

10

20

30

40

50

配列番号：11はmV1によりコードされるネズミ・蛋白のフラグメントのアミノ酸配列である。

配列番号：12はネズミ・クローンmV2のフラグメントのヌクレオチド配列である。

配列番号：13はmV2によりコードされるネズミ・蛋白のフラグメントのアミノ酸配列である。

配列番号：14はネズミ・クローンmV9のフラグメントのヌクレオチド配列である。

配列番号：15はmV9によりコードされるネズミ・蛋白のフラグメントのアミノ酸配列である。

配列番号：16はBMP/TGF- β 1/Vg-1蛋白のコンセンサス配列のアミノ酸配列である。最初のXaaはGlnまたはAsnのいずれかを示し；2番目のXaaはValまたはIleのいずれかを表す。 10

配列番号：17はオリゴヌクレオチド1のヌクレオチド配列である。

配列番号：18はBMP/TGF- β 1/Vg-1蛋白のコンセンサス配列のアミノ酸配列である。XaaはValまたはLeuのいずれかを示す。

配列番号：19はオリゴヌクレオチド2のヌクレオチド配列である。

配列番号：20はオリゴヌクレオチド3のヌクレオチド配列である。

配列番号：21はオリゴヌクレオチド4のヌクレオチド配列である。

配列番号：22はオリゴヌクレオチド5のヌクレオチド配列である。

配列番号：23はオリゴヌクレオチド6のヌクレオチド配列である。

配列番号：24はオリゴヌクレオチド7のヌクレオチド配列である。 20

配列番号：25はヒト・VL-1(BMP-13)をコードする配列のヌクレオチド配列である。

配列番号：26は配列番号：25のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：27はBMP-1プロペプチドとBMP-12の成熟コーディング配列との融合物をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号：28は配列番号：27のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：29はネズミ・mV1蛋白をコードするヌクレオチド配列である。X01はVal、Ala、GluまたはGly；X02はSer、Pro、ThrまたはAla；X03はSerまたはArg；X04はLeu、Pro、GlnまたはArg；X05はCysまたはTrp；X06はVal、Ala、AspまたはGly；X07はVal、Ala、GluまたはGly；X08はGln、LysまたはGluである。 30

配列番号：30は配列番号：29のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：31はネズミ・mV2蛋白をコードするヌクレオチド配列である。X01はProまたはThr；X02はValである。

配列番号：32は配列番号：31のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列である。X01およびX02は配列番号：31と同じである。

配列番号：33はヒト・BMP-12蛋白をコードするヌクレオチド配列である。 40

配列番号：34は配列番号：33のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：35はオリゴヌクレオチド8のヌクレオチド配列である。

【図面の簡単な説明】

図1はヒト・BMP-12とヒト・MP52配列の比較である。

発明の詳細な説明

本発明DNA配列は、さらに後に説明するように、腱/靭帯様組織の形成を誘導する蛋白の製造にとり有用である。さらに本発明DNA配列は、同様の活性を有するBMP-12関連蛋白をコードするさらなるDNA配列の単位およびクローニングにとり有用である。これらのBMP-12関連蛋白は他の種由来の同族体であってもよく、あるいは同一種内 50

の関連蛋白であってもよい。

さらに、本発明のさらなる態様は、腱/靭帯様組織誘導蛋白の発現をコードするDNA配列である。かかる配列は、配列番号：1または配列番号：25に示す5'から3'の方向のヌクレオチド配列、遺伝コードの縮重を除いては配列番号：1または配列番号：25と同じであって配列番号：2または配列番号：26の蛋白をコードしているDNA配列を包含する。さらに、厳密条件下で配列番号：1または配列番号：25とハイブリダイゼーションし、腱または靭帯の形成を誘導する能力を有する蛋白をコードしているDNA配列は本発明に包含される。好ましいDNA配列は、マニアティス (Maniatis) ら、モレキュラー・クローニング (ア・ラボラトリー・マニュアル) (Molecular Cloning(A Laboratory Manual)), コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) (1982年), 387~389頁に記載の厳密条件下でハイブリダイゼーションするものを包含する。結局、配列番号：1または25の配列の対立遺伝子または他の変種は、かかるヌクレオチド変化がペプチド配列の変化を引き起こしても、引き起こさなくても、そのペプチド配列がやはり腱/靭帯様組織誘導活性を有する場合には本発明に包含される。

ヒト・BMP-12のDNA配列(配列番号：1)およびアミノ酸配列(配列番号：2)を配列表に示す。本発明組成物および方法にとり有用な別の蛋白はVL-1である。VL-1は、BMP-12由来の配列を用いてクローン化されたBMP-12関連蛋白である。本発明者らはここにVL-1をBMP-13と命名した。VL-1の部分DNA配列(配列番号：7)およびコードされるアミノ酸配列(配列番号：8); ならびに成熟VL-1をコードするDNA配列(配列番号：25)およびコードされるアミノ酸配列(配列番号：26)を配列表に示す。配列番号：1および2のBMP-12配列に関してさらなる説明をするが、本発明は、配列番号：25および26に示すVL-1配列のごとき他のBMP-12関連配列について行われてもよい同様の改変および改良を包含することが認識されよう。

配列番号：1に示すBMP-12配列は、全成熟配列およびプロペプチドの約190個のアミノ酸を含む。成熟ヒト・BMP-12蛋白のコーディング配列は配列番号：1のヌクレオチド496または571から開始してヌクレオチド882まで続くと思われる。TGF-蛋白に特徴的な7個のシステインの構造のうち最初のシステインは577において始まる。最後のシステインは879において終了する。よって、活性BMP-12種をコードするDNA配列は配列番号：1のヌクレオチド577から879までからなるであろうと考えられる。

CHO細胞のごとき哺乳動物細胞により発現されるようなBMP-12は、異なるN末端を有するBMP-12蛋白の活性種の異種集団として存在すると考えられる。すべての活性種は、配列番号：2のアミノ酸3におけるシステイン残基から始まりアミノ酸103における最後のシステイン残基もしくはアミノ酸104以降のストップコドンまで続くアミノ酸配列を含む。他の活性種は、N末端方向におけるさらなるアミノ酸を含む。さらに本明細書に記載したように、哺乳動物細胞により産生される活性種のN末端は、ペプチド配列Arg-X-X-Argをコードしているコンセンサス開裂部位の後ろから始まると考えられる。よって、活性BMP-12蛋白をコードするDNA配列は、配列番号：1のヌクレオチド196、199、208、217、361、388、493、496もしくは571からヌクレオチド879もしくは882までのいずれかにおいて開始するヌクレオチド配列からなるヌクレオチド配列を有しているであろうと考えられる。

ヒト・BMP-12の1の活性種のN末端を、イー・コリ (E.coli) における発現により実験的に決定したところ、以下のものであった：[M]SRXSRKPLHVDL (ここにXは明確でないシグナルのアミノ酸残基を示し、その位置のシステイン残基と矛盾しない)。よって、このBMP-12種のN末端は配列番号：1のアミノ酸1におけるものであり、該BMP-12種をコードするDNA配列は配列番号：1のヌクレオチド571において開始するであろうと思われる。このヒト・BMP-12種のダイマーの見かけの分子量をSDS-PAGEにより決定したところ、ノベックス (Novex) 16%トリシン

10

20

30

40

50

ゲル上で約20～22kdであった。ヒト・BMP-12蛋白は、0.1%トリフルオロ酢酸中で無色透明溶液として存在する。

先に説明したように、BMP-12関連蛋白は蛋白のBMP/TGF- β 1ファミリーの部分集合であり、例えば、厳密性を減じた条件下で下記プライマー6および7のごときBMP-12特異的プライマーを用いるPCRを用いてクローン化され同定されるDNA配列によりコードされる腱/靭帯様組織誘導蛋白として定義される。本発明DNA配列が、アミノ酸レベルにおいて、配列番号：1のアミノ酸3から103までをコードするDNAに関して少なくとも80%の相同性を有することが好ましい。本発明の目的からすると、用語BMP-12関連蛋白はヒト・MP52蛋白を含まない。配列番号：1および配列番号：3の配列の情報および図1に示す比較を用いると、BMP-12関連蛋白をコードする遺伝子のクローニングを可能にするBMP-12配列に対するプライマーを設計することは当業者の範囲内である。

本発明BMP-12関連蛋白の一例は、現在BMP-13と呼ばれるVL-1である。全成熟BMP-13の配列およびBMP-13のプロペプチドの少なくとも一部の配列を配列番号：25に示す。BMP-12と同様、CHO細胞のごとき哺乳動物細胞により発現されるようなBMP-13は、異なるN末端を有するBMP-13蛋白の活性種の異種集団として存在すると考えられる。すべての活性種は、配列番号：26のアミノ酸19におけるシステイン残基から始まりアミノ酸119における最後のシステイン残基もしくはアミノ酸120以降のストップコドンまで続くアミノ酸配列を含む。他の活性種は、N末端方向におけるさらなるアミノ酸を含む。さらに本明細書に記載したように、哺乳動物細胞により産生される活性種のN末端は、ペプチド配列Arg-X-X-Argをコードしているコンセンサス開裂部位の後ろから始まると考えられる。よって、活性BMP-13蛋白をコードするDNA配列は、配列番号：25のヌクレオチド410、458、602、605もしくは659からヌクレオチド961もしくは964までのいずれかにおいて開始するヌクレオチド配列からなるヌクレオチド配列を有しているであろうと考えられる。

本発明において有用な精製腱/靭帯様組織誘導蛋白を製造するためには、適当なコーディング配列、特に配列番号：1のヌクレオチド496、571もしくは577から879もしくは882までの配列をコードするDNAからなるDNA配列で形質転換された宿主細胞を培養し；次いで、配列番号：2のアミノ酸-25、1もしくは3から103もしくは104までにより表される配列のアミノ酸配列または実質的にこれと相同的な配列を含む蛋白を培地から回収し精製することからなる方法を用いる。もう一つの具体例において、該方法は、適当なコーディング配列、特に配列番号：25のヌクレオチド605もしくは659から961もしくは964までの配列をコードするDNAからなるDNA配列で形質転換された宿主細胞を培養し；次いで、配列番号：26のアミノ酸1もしくは19から119もしくは120までにより表される配列のアミノ酸配列または実質的にこれと相同的な配列を含む蛋白を培地から回収し精製することからなる。

ヒト・MP52のDNAはWO93/16099に記載されており、その開示を参照により本明細書に取り入れる。しかしながら、この文書は該蛋白の腱/靭帯様組織形成能、または腱/靭帯様組織誘導のための組成物におけるその使用を開示していない。もともと、ヒト・MP52はヒト・胚組織由来のRNAを用いて単離された。ヒト・MP52ヌクレオチド配列（配列番号：3）およびコードされるアミノ酸配列（配列番号：4）を配列表に示す。MP52蛋白は配列番号：3のヌクレオチド845から始まり配列番号：3のヌクレオチド1204をまで続くと思われる。TGF- β 蛋白に特徴的な7個のシステインの構造のうち最初のシステインは899において始まる。最後のシステインは1201において終了する。MP52蛋白の他の活性種は配列番号：3のヌクレオチド845からN末端方向においてさらなるヌクレオチドを有していてもよい。

本発明精製ヒト・MP52蛋白は、配列番号：3のヌクレオチド845から1204までの配列をコードするDNAからなるDNA配列で形質転換された宿主細胞を培養し；

10

20

30

40

50

次いで、配列番号：4のアミノ酸 1から 120までにより表される配列のアミノ酸配列または実質的にこれと相同的な配列を含む蛋白を培地から回収し精製することにより製造されうる。さらに配列番号：4のアミノ酸 17もしくは 19から 119もしくは 120までのアミノ酸配列は活性を保持しているであろうと考えられる。よって、ヌクレオチド 845、 893もしくは 899から 1201もしくは 1204までのDNA配列は活性蛋白をコードすると考えられる。

哺乳動物宿主細胞における蛋白発現のためには、成熟蛋白に関するコーディング配列に正しい読み取り枠において結合している、宿主細胞による蛋白分泌に適するプロペプチドをコードするコーディング配列で宿主細胞を形質転換する。例えば、BMP-2以外の哺乳動物蛋白の前駆体部分をコードするDNAが成熟BMP-2蛋白コードするDNAに融合 10
されている米国特許第5,168,050号参照(その開示を参照により本明細書に取り入れる)。よって、本発明は、腱/靭帯様組織誘導ポリペプチドをコードするDNA配列に正しい読み取り枠において結合している、蛋白のTGF-スーパーファミリーのメンバー由来のプロペプチドをコードするDNA配列からなるキメラDNA分子を包含する。用語「キメラ」は、プロペプチドが、コードされる成熟ポリペプチド以外の異なるポリペプチドに由来することを意味するために用いられる。もちろん、配列番号：2、配列番号：4または配列番号：26に示す成熟蛋白をコードしているコーディング配列に正しい読み取り枠において結合しているネイティブなプロペプチドをコードする配列をコードしているDNA配列を用いて宿主細胞を形質転換してもよい。ネイティブなプロペプチドの全配列を、当該分野において知られた方法により、配列番号：1、配列番号：3または配列番号：25に開示された配列を用いて決定して、クローン全体を同定し単離するのに適したプローブを設計してもよい。 20

また本発明は、他の蛋白性物質をコードしているDNA配列が結合しておらず、蛋白を含む腱/靭帯様組織の発現をコードしている新規DNA配列を包含する。これらのDNA配列は、配列番号：1に示す5'から3'方向の配列、および厳密条件下[例えば、65において、0.1X SSC、0.1% SDS; ティー・マニアティスら、モレキュラー・クロニング(ア・ラボラトリーマニュアル), コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(1982年), 387~389頁参照]においてそれにハイブリダイゼーションし、腱/靭帯様組織誘導活性を有する蛋白をコードしている配列を包含する。

同様に、配列番号：1または配列番号：25の配列によりコードされる蛋白、あるいは配列番号：2または配列番号：26のアミノ酸配列からなる蛋白をコードするが、遺伝コードの縮重または対立遺伝子変異(アミノ酸変化を引き起こしても、引き起こさなくてもよい種の集団における天然に存在する塩基変化)のためにコドン配列が異なっているDNA配列も、本明細書記載の腱/靭帯様組織誘導蛋白をコードする。コードされるポリペプチドの活性、半減期または生産を増大させるために点突然変異または誘導された修飾(挿入、欠失、および置換を含む)により生じた配列番号：1または配列番号：25のDNA配列のパリエーションも、本発明に包含される。 30

本発明のもう一つの態様は、腱/靭帯様組織誘導蛋白の新規製造方法を提供する。本発明方法は、調節配列の調節下にある本発明蛋白をコードしているDNA配列で形質転換された適当な細胞系を培養することからなる。形質転換された宿主細胞を培養し、培地から蛋白を回収し精製する。精製蛋白は、同時生成される他の蛋白ならびに他の汚染物質を実質的に含まない。 40

適当な細胞または細胞系は、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)のごとき哺乳動物細胞であってもよい。上記のごとく、哺乳動物細胞における蛋白発現は蛋白の分泌を保証する適当なプロペプチドを必要とする。適当な哺乳動物宿主細胞および形質転換、培養、増幅、スクリーニング、生成物の生産および精製のための方法は当該分野において知られている。例えば、ゲシング(Gething)およびサムブルック(Sambrook), ネイチャー(Nature), 第293巻: 620~625頁(1981年)、あるいは、例えば、カウフマン(Kaufman)ら, モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 第5巻(7): 1750~1759頁(1985年)またはハウリー(Howley)ら, 50

米国特許第4,419,446号参照。付記した実施例において説明されるもう1つの適当な哺乳動物細胞系はサル・COS-1細胞系である。哺乳動物細胞CV-1も適当である。

細菌細胞も適当な宿主でありうる。例えば、種々のイー・コリ(E.coli)株(例えば、HB101、MC1061)はバイオテクノロジーの分野において宿主細胞としてよく知られている。ビー・サブチリス(B.subtilis)、シュードモナス(Pseudomonas)、他の枯草菌等を本発明方法に用いてもよい。細菌細胞において蛋白を発現させるには、プロペプチドをコードするDNAは必要ない。

TGF-ファミリーを含む哺乳動物細胞の細菌での発現は、グリコシレーションされていない形態、および封入体として知られる不溶性ペレット形態の蛋白を生じることが知られている。これらの封入体を可溶化し、カオトロピック(chaotropic)試薬を用いて蛋白を変性させ、次いで、その可溶性形態を製造するために十分に正しく再生させるための方法は、当該分野において記載されている。例えば、EP0433225(参照によりその開示を本明細書に取り入れる)参照。

別法とし、所望蛋白が融合パートナーを伴った融合蛋白として発現される、遺伝子融合蛋白の発現のごとき封入体形成を回避する方法が工夫されてきた。融合蛋白は、後で開裂されて所望蛋白を生じる。イー・コリに関するかかる遺伝子融合発現系の一例は、融合パートナーとしてのイー・コリ・チオレドキシソリン遺伝子の使用に基づいている。ラバリエ(LaValle)ら、バイオテクノロジー(Bio/Technology)第11巻:187~193頁(1993年)(その開示を参照により本明細書に取り入れる)。

当業者に知られた酵母細胞の多くの株も、本発明ポリペプチド発現のための宿主細胞として使用されうる。さらに、所望ならば、本発明方法における宿主細胞として昆虫細胞を用いてもよい。例えば、ミラー(Miller)ら、ジェネティック・エンジニアリング(Genetic Engineering)第8巻:277~298頁(プレナム・プレス(Plenum Press,1986年)およびそこに引用された文献参照)。

本発明のもう1つの態様は、これらの腱/靭帯様組織誘導蛋白の発現方法に用いるベクターを提供する。好ましくは、ベクターは、本発明新規因子をコードする上記新規DNAの全配列を含んでいる。別法として、上記修飾配列を含んでいるベクターも本発明の具体例である。さらに、配列番号:1または配列番号:3または配列番号:25の配列を操作して、プロペプチド配列を欠失させ、それらをBMP蛋白もしくはTGF-スーパーファミリーのメンバーをコードする配列と置換することにより成熟蛋白を発現させることができよう。よって、本発明は、配列番号:2または配列番号:4または配列番号:26のアミノ酸配列を有する蛋白をコードするDNA配列に正しい読み取り枠において結合しているTGF-スーパーファミリーのメンバー由来のプロペプチドをコードしているキメラDNA分子を包含する。該ベクターを細胞系の形質転換法に用いてもよく、該ベクターは、選択宿主中で複製および発現を指令しうる本発明DNAコーディング配列に作動可能に結合した選択調節配列を含んでいる。かかるベクター用の調節配列は当業者に知られており、宿主細胞に応じて選択することができる。かかる選択は日常的なものであり、本発明の一部を形成しない。

組織が不正常に形成されている環境において腱/靭帯様組織または他の組織の形成を誘導する本発明蛋白は、ヒトおよび他の動物における腱または靭帯の裂傷、形成不全および他の腱または靭帯の損傷の治療に応用される。腱/靭帯様組織誘導蛋白を用いるかかる標品は、腱または靭帯に対するダメージの防止における予防的用途、ならびに骨または他の組織への腱または靭帯の改善された固定および腱または靭帯組織に対する損傷の修復における用途を有しうる。本発明組成物により誘導されるデノボ(De novo)腱/靭帯様組織形成は、先天的な、外傷により誘発される、あるいは別の原因による腱または靭帯の損傷の修復に貢献し、さらに、腱または靭帯を付着または修復させるための整形外科手術にも有用である。また、本発明組成物は、腱炎、手根骨トンネル症候群および他の腱または靭帯の損傷の治療においても有用でありうる。また、本発明組成物を、腱および/または靭帯組織を治療または再生することが必要な他の徴候に使用することもできる。かかる徴候は

10

20

30

40

50

、腱炎において発生するような歯根膜に対する損傷の再生および修復、および骨に対する腱の付着の再生および修復を包含するが、これらに限定されない。本発明組成物は、腱または靭帯形成細胞を引き寄せ、腱または靭帯形成細胞の増殖を刺激し、あるいは腱または靭帯形成細胞前駆細胞の分化を誘導するための環境を提供しうる。

BMP-12関連蛋白を培地から回収し、同時生成される他の蛋白性物質および存在する他の汚染物質から単離することによりそれらを精製することができる。本発明蛋白は腱/靭帯様組織の形成能がある。後に説明するラット・異所性移植動物アッセイにおける腱/靭帯様組織形成を示す能力によりこれらの蛋白をさらに特徴づけてもよい。これらの蛋白は、さらに、靭帯のごとき他のタイプの組織の形成を誘導する能力を有するかもしれないと考えられる。

10

さらに本発明により提供される腱/靭帯様組織誘導蛋白は、配列番号：1または配列番号：25の配列と類似の配列によりコードされる因子であるが、その中において修飾が本来的になされている（例えば、ポリペプチドのアミノ酸変換を生じても生じなくてもよいヌクレオチド配列における対立遺伝子変異）かまたは計画的になされている因子を包含する。例えば、合成ポリペプチドが配列番号：2のアミノ酸残基の連続した配列の全体または一部を複製したものであってもよい。これらの配列は、1次、2次または3次構造およびコンホーメーション的特徴を配列番号：2の腱/靭帯様組織成長因子ポリペプチドと共有することによって、それらに共通した腱/靭帯様組織または他の組織成長因子の生物学的特性を有しうる。よって、天然に存在する腱/靭帯様組織誘導ポリペプチドの生物学的に活性のある代替物としてそれらを治療組成物および治療プロセスにおいて使用してもよい

20

。本明細書記載の腱/靭帯様組織誘導蛋白の配列の他の特異的な変異は、グリコシレーション部位の修飾を包含する。これらの修飾はO-結合またはN-結合グリコシレーション部位を包含しうる。例えば、グリコシレーションの不存在または部分的にのみされたグリコシレーションは、アスパラギン結合グリコシレーション認識部位におけるアミノ酸置換または欠失から起こる。アルパラギン結合グリコシレーション認識部位は、適当な細胞のグリコシレーション酵素により特異的に認識されるトリペプチド配列からなる。これらのトリペプチド配列は、アスパラギン-X-スレオニン、アスパラギン-X-セリンまたはアスパラギン-X-システイン（ここに、通常には、Xはプロリン以外のいずれかのアミノ酸）であってより。グリコシレーション認識部位の第1または第3のアミノ酸位置における種々のアミノ酸置換または欠失（および/または第2の位置におけるアミノ酸欠失）は修飾されたトリペプチド配列における非グリコシレーションを引き起こす。さらに、蛋白の細菌による発現も、グリコシレーションされていない蛋白の生産を引き起こすであろう

30

。本発明組成物は、配列番号：1または配列番号：25のDNA配列で形質転換された細胞を培養し、次いで、配列番号：2または配列番号：26のアミノ酸配列を有する蛋白を培地から回収し精製することにより製造される精製BMP-12関連蛋白からなる。精製された発現蛋白は、同時生成される蛋白性物質、ならびに他の汚染物質を実質的に含まない。回収された精製蛋白は腱/靭帯様組織形成活性、および靭帯再生のごとき他の組織の成長活性を示すと考えられる。後に説明するラットにおけるアッセイにおける腱/靭帯様組織形成活性を示す能力により本発明蛋白をさらに特徴づけてもよい。

40

腱/靭帯様組織形成を誘導するための本発明組成物は有効量の腱/靭帯様組織誘導蛋白からなってもよく、該蛋白は、配列番号：2、好ましくは、配列番号：2のアミノ酸-#25、#1もしくは#3から#103もしくは#104；あるいは配列番号：26のアミノ酸#1もしくは#19から#120まで；ならびに腱および/または靭帯様組織の形成能を示す配列番号：2または配列番号：26の変異体および/または変種からなる。

さらに、発明組成物は、アクチピンのごとき、蛋白のTGF-スーパーファミリーのさらなるメンバーのごときさらなる蛋白からなってもよい。本発明のもう1つの態様は、医薬上許容される賦形剤または担体中の、BMP-12またはVL-1のごとき治療上有効量の腱/靭帯誘導蛋白を含有する医薬組成物を提供する。これらの組成物を用いて腱

50

／靭帯様組織または他の組織の形成を誘導してもよい。腱および靭帯の修復、傷の治療および皮膚の修復のごとき他の組織の修復のためにかかる組成物を用いてもよいと考えられる。本発明蛋白は神経の生存を増加させ、それゆえ、移植および神経の生存の減少を示す症状の治療に有用でありうる。さらに本発明組成物は、米国特許第5,108,922号、第5,013,649号、第5,116,738号、第5,106,748号、第5,187,076号、および第5,141,905号に開示されたBMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6およびBMP-7；PCT出願WO91/18098に開示のBMP-8；PCT出願WO93/00432に開示のBMP-9；および1993年5月12に出願の同時係属特許出願第08/061,695号と第08/061,464号に開示のBMP-10またはBMP-11のごとき少なくとも1種の他の治療上有用な薬剤を含有していてもよい。上記文書の開示を参照により本明細書に取り入れる。

本発明組成物は、BMP-12またはVL-1(BMP-13)のごとき腱／靭帯誘導蛋白のほかに、MP52、表皮増殖因子(EGF)、繊維芽細胞増殖因子(FGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、形質転換増殖因子(TGF- α およびTGF- β)、および繊維芽細胞増殖因子-4(FGF-4)、甲状腺ホルモン(PTH)、白血球阻害因子(LIF/HILDA/DIA)、インスリン様増殖因子(IGF-IおよびIGF-II)を包含する他の治療上有用な薬剤からなってもよい。これらの薬剤の一部を本発明組成物に使用してもよい。例えば、一緒に移植されたBMP-2およびBMP-12の両方からなる組成物は、骨および腱／靭帯様組織を生じさせる。隣接した解剖学的位置において腱、靭帯、および骨が同時に形成される胚関節の損傷の治療にかかる組成物を用いてもよく、さらに該組成物は、骨への腱付着部位における組織の再生に有用でありうる。皮膚の治療および関連組織の修復のごとき傷の治療に本発明組成物を用いてもよいと考えられる。傷のタイプは、熱傷、切り傷および潰瘍を包含するが、これらに限定されない(傷の治療および関連組織の修復に関しては、例えばPCT出願WO84/01106号参照)。

本発明蛋白は他の関連蛋白および増殖因子と協奏して、あるいはおそらく相乗的に作用しうると考えられる。それゆえ、本発明のさらなる治療方法および組成物は、治療量の少なくとも1種の上記BMP蛋白を伴った治療量の少なくとも1種の本発明蛋白からなる。かかる組成物は、個々のBMP蛋白分子あるいは異なるBMP部分からなるヘテロダイマーからなってもよい。例えば、本発明方法および組成物は、BMP-12関連蛋白のサブユニットと上記「BMP」蛋白のうちの1つ由来のサブユニットからなるジスルフィド結合したダイマーからなってもよい。よって、本発明は、1のサブユニットが配列番号：2のアミノ酸#1からアミノ酸#104までのアミノ酸配列からなり、もう1つのサブユニットがBMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9、BMP-10およびBMP-11からなる群より選択される骨形態形成蛋白に関するアミノ酸配列からなるヘテロダイマーである精製BMP-12関連ポリペプチドよりなる組成物を包含する。さらなる具体例は、ジスルフィド結合したBMP-12、VL-1(BMP-13)またはMP52のごとき腱／靭帯様組織誘導部分からなるヘテロダイマーよりなってもよい。例えば、ヘテロダイマーは、配列番号：2の#1から#104までのアミノ酸配列からなる1のサブユニットおよび配列番号：4の#1から#120までもしくは配列番号：26の#1から#120までのアミノ酸配列からなるもう1つのサブユニットからなってもよい。さらに、本発明組成物は、問題となる組織の損傷、障害の治療に有益な他の薬剤を配合されていてもよい。

pH、等張性、安定性等を考慮した、かかる生理学的に許容される蛋白組成物の調製および処方当業者の範囲内である。また、目下のところ、治療組成物は、TGF- β 蛋白における種特異性の欠如のため、獣医用途にも価値がある。特に、ヒトのほかに家畜およびサラブレッドの馬は本発明組成物でのかかる治療のための望ましい対象である。

治療方法は、組成物を局所的に、全身的に、あるいはインプラントまたはデバイスのように

10

20

30

40

50

に局部的に投与することを包含する。投与する場合、本発明に使用する治療組成物は、もちろん、パイロジェン不含の、生理学的に許容される形態である。さらに、望ましくは、組成物をカプセル封入するかまたは組織ダメージ部位への送達用の粘性のある形態で注射してもよい。別法として、あるいはさらに、所望により上記組成物に含有されていてもよい蛋白以外の治療上有用な薬剤を、本発明方法において組成物と同時にあるいは順次投与してもよい。

組成物は適当なマトリックスおよび/または隔離剤 (Sequestering agent) を担体として含んでいてもよい。例えば、マトリックスが組成物を支持し、あるいは腱/靭帯様組織形成および/または他の組織の形成のための表面を提供するものであってもよい。マトリックスが、蛋白および/またはその提供に適した環境をゆっくりと提供するものであってもよい。キレート剤は、注射または他の手段による投与を容易にすることにおいて助けとなる物質であってもよく、あるいは適用部位から蛋白がゆっくりと移動するようにするものであってもよい。

担体材料の選択は、生体適合性、生分解性、機械的特性、美容上の外観および界面の性質による。組成物の特別な適用は適切な処方決定であろう。組成物に適するマトリックスは生分解性で化学的に定義されたものであってもよい。さらなるマトリックスは純粋蛋白または細胞外マトリックス成分からなる。他の使用可能なマトリックスは非生分解性で化学的に定義されているものである。好ましいマトリックスは、ヘリスタット (Helistat[®]) スポンジ (ニュージャージー州プレインズボロのインテグラ・ライフサイエンス (Integra LifeSciences) 社製) のごときコラーゲンに基づく材料、または注射可能な形態のコラーゲン、ならびに隔離剤を包含するが、それらはやはり生分解性であってもよく、アルキルセルロース性材料を包含してもよい。

もう1つの好ましいクラスの担体は多孔性粒子ポリマーマトリックスであり、ポリ(乳酸)のポリマー、ポリ(グリコール酸)のポリマーおよび乳酸とグリコール酸のコポリマーを包含する。さらにこれらのマトリックスが隔離剤を含有してもよい。適当なポリマーマトリックスは、例えば、WO 93 / 00050 (参照により本明細書に取り入れる) に記載されている。

隔離剤の好ましいファミリーはアルキルセルロース (ヒドロキシアルキルセルロースを包含する) のごときセルロース性材料であり、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、およびカルボキシメチルセルロースを包含し、カルボキシメチルセルロース (CMC) のカチオン塩が最も好ましい。他の好ましい隔離剤は、ヒアルロン酸、アルギン酸ナトリウム、ポリ(エチレングリコール)、ポリオキシエチレンオキシド、カルボキシビニルポリマーおよびポリ(ビニルアルコール)を包含する。本発明に有用な隔離剤の量は、処方重量全体に対して0.5 ~ 20重量%、好ましくは1 ~ 10重量%であり、ポリマーマトリックスからの蛋白の脱落を防止し、組成物に適当な扱いやすさを与えるのに必要な量を提供するが、前駆細胞のマトリックスへの浸潤を妨げるような多量であってはならず、それゆえ、前駆細胞の活性を援助する機会を蛋白に付与する量である。

本願の実施において有用なさらなる任意成分は、例えば、マンニトール、シュクロース、ラクトース、グルコースもしくはグリシンのごとき低温性保護剤 (凍結乾燥の間の分解から蛋白を保護する)、メチルパラベンならびにプロピルパラベンおよびベンジルアルコールのごとき抗菌保存料、EDTA、クエン酸およびBHT (ブチル化されたヒドロキシトルエン) のごとき抗酸化剤、およびポリ(ソルベート)ならびにポリ(オキシエチレン)のごとき界面活性剤等を包含する。

上記のごとく、本発明組成物を、腱または靭帯がダメージを受けている部分における腱/靭帯様組織の再生のごとき多くの腱損傷に用いて、腱組織の裂傷および種々のタイプの組織損傷もしくは損害の修復を行ってもよい。本発明によれば、これらの方法は、かかる腱/靭帯様組織または他の組織の修復を必要とする患者に、配列番号: 2、配列番号: 4および/または配列番号: 26に記載されたような有効量の腱/靭帯様組織誘導蛋白からなる組成物を投与することからなる。また、これらの方法は少なくとも1種の上記BMP蛋

10

20

30

40

50

白と混合された腱 / 靭帯様組織誘導蛋白の投与からなってもよい。

もう一つの具体例において、該方法は、1のモノマーがBMP-12、VL-1(BMP-13)またはMP52のごとき腱 / 靭帯様組織誘導ポリペプチドであり、第2のモノマーが増殖因子のTGF-スーパーファミリーのメンバーであるヘテロダイマー蛋白の投与からなってもよい。さらに、これらの方法は、EGF、FGF、TGF-、TGF-およびIGFを包含する他の増殖因子とともに腱 / 靭帯様組織誘導蛋白を投与することを包含してもよい。

よって、本発明のさらなる態様は、腱 / 靭帯様組織の修復、腱もしくは靭帯の修復、ならびに腱炎および腱もしくは靭帯の損傷に関連した他の症状の治療のための治療方法および組成物である。かかる組成物は、医薬上許容される賦形剤、担体またはマトリックスと混合されたBMP-12、BMP-12関連蛋白またはMP52のごとき治療上有効量の1種またはそれ以上の腱 / 靭帯様組織誘導蛋白からなる。

組成物の作用を変化させる種々の要因、例えば、形成が望まれる腱または靭帯組織の量、腱または靭帯のダメージ部位、ダメージを受けた腱または靭帯の状態、傷害のサイズ、ダメージを受けた組織のタイプ、患者の年齢、性別ならびに食事、感染の程度、投与時期および他の臨床的要因を担当医が考慮することにより投与規則が決定されるであろう。再構成に使用するマトリックスのタイプおよび組成物中のさらなる蛋白のタイプに応じて用量を変更してもよい。IGF-I(インスリン様増殖因子I)のごとき知られた増殖因子の最終組成物への添加も用量に影響しうる。

腱 / 靭帯様組織の形成、腱または靭帯の成長および / または修復を定期的に評価することにより進行状況をモニターすることができる。当該分野において知られた方法、例えば、X線、関節鏡検査、組織形態計測的調査およびテトラサイクリン標識により進行状況をモニターすることができる。

以下の実施例は、ヒト・腱 / 靭帯様組織誘導蛋白の回収ならびに特徴づけおよび他の腱 / 靭帯様組織誘導蛋白の回収のためのそれらの使用、ヒト・蛋白の取得、組み換え法による蛋白発現、およびインビボモデルにおいて腱 / 靭帯様組織を形成する本発明組成物の能力を示すことにおける本発明の実施を説明する。実施例はBMP-12に関して本発明を示すが、当業者の範囲内の少しの変更により、MP52およびVL-1についても同じ結果が得られると確信する。

実施例 1

DNAの単離

BMP-12およびBMP-12関連蛋白をコードするDNA配列を、当業者に知られた種々の方法により単離することができる。下記のごとく、他のBMP蛋白、Vg-1関連蛋白および他のTGF-スーパーファミリーの蛋白に存在するアミノ酸配列に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。BMPファミリーの蛋白内およびTGF-スーパーファミリーの蛋白の他のメンバー内において非常に保存的であるアミノ酸配列を含む領域を同定することができ、個々のBMP / TGF- / Vg-1蛋白お対応領域の類似性に基づいてこれらの非常に保存的な領域のコンセンサスアミノ酸配列を構築することができる。かかるコンセンサスアミノ酸配列の例を以下に示す。

コンセンサスアミノ酸配列(I) :

Trp - Gln / Asn - Asp - Trp - Ile - Val / Ile - Ala
(配列番号 : 16)

[式中、X / Yはその位置にいずれかのアミノ酸が存在してもよいことを示す]

上で同定したコンセンサスアミノ酸配列(1)に基づいて以下のオリゴヌクレオチドを設計する。 :

#1: CGGATCCTGGVANGAYTGGATHRTNGC (配列番号 : 17)

このオリゴヌクレオチド配列を自動DNA合成装置により合成する。上で同定したオリゴヌクレオチドプライマーの標準的なヌクレオチドのシンボルは以下のとおり : A, アデノシン ; C, シトシン ; G, グアニン ; T, チミン ; N, アデノシンまたはシトシンまたはグアニンまたはチミン ; R, アデノシンまたはシトシン ; Y, シトシンまたはチミン ; H

10

20

30

40

50

、アデノシンまたはシトシンまたはチミン；V，アデノシンまたはシトシンまたはグアニン；D，アデノシンまたはグアニンまたはチミン。

オリゴヌクレオチド#1の最初の7個のヌクレオチド(下線)は、BMP-12蛋白をコードするDNA配列を特異的に増幅する操作を容易にするために制限エンドヌクレアーゼ BamHI に対する認識部位を含んおり、かくして上記コンセンサスアミノ酸配列(1)由来ではない。

第2のコンセンサスアミノ酸配列は、下記BMP/TGF- β 1蛋白のもう1つの非常に保存的な領域に由来する：

His-Ala-Ile-Val/Leu-Gln-Thr(配列番号：18)

上で同定されたコンセンサスアミノ酸配列(2)に基づいて以下のオリゴヌクレオチドを設計する：

#2: TTTCTAGAARNGTYTGNACDATNGCRTG(配列番号：19)

このオリゴヌクレオチド配列を自動DNA合成装置により合成する。オリゴヌクレオチド#1の最初の7個のヌクレオチド(下線)は、BMP-12蛋白をコードするDNA配列を特異的に増幅する操作を容易にするために制限エンドヌクレアーゼ XbaI に対する認識部位を含んおり、かくして上記コンセンサスアミノ酸配列(2)由来ではない。

本発明BMP-12蛋白および他のBMP/TGF- β 1関連蛋白は上記コンセンサスアミノ酸配列に類似のアミノ酸配列を含んでいてもよく、BMP-12または他の新規関連蛋白中のそれらの配列の位置はそれらが由来した蛋白における相対位置に対応しているであろうと考えられる。さらに、他のBMP/TGF- β 1蛋白の構造から得られるこの位置的情報およびコンセンサスアミノ酸配列(1)ならびに(2)にそれぞれ由来するオリゴヌクレオチド配列#1ならびに#2を用いて、BMP-12蛋白または他のBMP/TGF- β 1関連蛋白の対応アミノ酸をコードするDNA配列を特異的に増幅することができると考えられる。

BMP/TGF- β 1蛋白の遺伝子構造の知識に基づくと、ヒト・ゲノムDNAを鋳型として用いてBMP-12/TGF- β 1(BMP-12関連蛋白)をコードする配列の同定となる特異的増幅反応を行うことができると考えられる。ヒト・ゲノムDNA鋳型のかかる特異的増幅反応を、先に説明したオリゴヌクレオチドプライマー#1および#2を用いて開始することができよう。上で同定したオリゴヌクレオチド#1および#2をプライマーとして用いてヒト・ゲノムDNA由来の特異的ヌクレオチド配列の特異的増幅を可能にする。

増幅反応を以下のように行う：

ジェネティックス・インスティテュート(Genetics Institute)のケン・ジャゴ布斯(Ken Jacobs)により提供されたヒト・ゲノムDNA(起源：末梢血リンパ球)を、25ゲージの注射針中を繰り返し通すことにより切断力を与え、100 $^{\circ}$ Cで5分間変性させ、次いで、氷上で冷却してから200 μ Mの各デオキシヌクレオチドトリホスフェート(dATP、dGTP、dCTPおよびdTTP)、10mM Tris-HCl pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.001%ゼラチン、1.25ユニットのTaq DNAポリメラーゼ、100pMのオリゴヌクレオチド#1および100pMのオリゴヌクレオチド#2を含有する反応混合物に添加する。この反応混合物を94 $^{\circ}$ Cで2分加熱し、次いで、以下の方法のサーマルサイクリングに供する：

94 $^{\circ}$ C 1分、40 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分を3サイクル；次いで、94 $^{\circ}$ C 1分、55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分を37サイクル行う。次いで、72 $^{\circ}$ Cで10分インキュベーションする。

この反応により特異的に増幅されるDNAをエタノール沈殿し、制限エンドヌクレアーゼ BamHI および XbaI で消化し、次いで、アガロースゲル電気泳動に供する。BMP-12または他のBMP/TGF- β 1をコードするDNAフラグメントの予想サイズに反応するゲルの領域を切り取り、そこに存在する特異的に増幅されたDNAフラグメントを電気溶出し、プラスミドベクターpGEM-3のポリリンカーのXbaIとBamHI部位の間にサブクローンする。得られるBMP-12関連サブクローンの1つに関するDNA配列分析は、それに含まれている特異的に増幅されたDNA配列生成物が本

10

20

30

40

50

発明 B M P - 1 2 蛋白の一部をコードしていることを示す。

この特異的に増幅された B M P - 1 2 の D N A フラグメントの D N A 配列 (配列番号 : 5) および誘導されるアミノ酸配列 (配列番号 : 6) を配列表に示す。

配列番号 : 5 のヌクレオチド # 1 ~ # 2 6 はオリゴヌクレオチド # 1 の一部からなり、ヌクレオチド # 1 0 3 ~ # 1 2 8 は特異的増幅反応を行うために用いられるオリゴヌクレオチド # 2 のリバース・コンプリメント (reverse compliment) の一部からなる。増幅反応の開始におけるオリゴヌクレオチド # 1 および # 2 の機能のため、それらは B M P - 1 2 蛋白をコードする実際の配列に正確に対応していなくてもよく、それゆえ、対応するアミノ酸誘導体 (配列番号 : 6) には翻訳されない。

もう一つのサブクローンの D N A 配列分析は、それに含まれている特異的に増幅された D N A 生成物が、 V L - 1 と命名された、本発明のもう一つの B M P / T G F - / V g - 1 (B M P - 1 2 関連) をコードしていることを示す。

この特異的に増幅された D N A フラグメントの D N A 配列 (配列番号 : 7) および誘導されるアミノ酸配列 (配列番号 : 8) を配列表に示す。

配列番号 : 7 のヌクレオチド # 1 ~ # 2 6 はオリゴヌクレオチド # 1 の一部からなり、 # 1 0 3 ~ # 1 2 8 は特異的増幅反応を行うために用いられるオリゴヌクレオチド # 2 のリバース・コンプリメントの一部からなる。増幅反応の開始におけるオリゴヌクレオチド # 1 および # 2 の機能のため、それらは V L - 1 蛋白をコードする実際の配列に正確に対応していなくてもよく、それゆえ、対応するアミノ酸誘導体 (配列番号 : 8) には翻訳されない。

上に示す特異的に増幅された B M P - 1 2 ヒト・ D N A 配列 (配列番号 : 5) に基づいて以下のオリゴヌクレオチドプローブを設計し、自動 D N A 合成装置により合成する。 :

#3: CCACTGCGAGGGCCTTTGCGACTTCCCTTTGCGTTTCGCAC

(配列番号 : 2 0)

このオリゴヌクレオチドプローブを ³²P で放射性標識し、ベクター F I X (ストラタジーン (Stratagene) 社カタログ # 9 4 4 2 0 1) 中に構築されたヒト・ゲノムライブラリーをスクリーニングする。ヒト・ゲノムライブラリーの 5 0 0 0 0 0 個の組み換え体を、プレート 1 枚あたり約 1 0 0 0 0 個の組み換え体の密度で 5 0 枚のプレートに撒く。組み換えバクテリオファージプラークを 2 系のニトロセルロースにレプリカし、標準ハイブリダイゼーションバッファー (S H B = 5 X S S C 、 0 . 1 % S D S 、 5 X デンハーツ、 1 0 0 μ g / m l サケ : 精子 D N A) 中でオリゴヌクレオチドプローブ # 3 と 6 5 で一晩ハイブリダイゼーションさせる。翌日、放射性標識されたオリゴヌクレオチドを含有するハイブリダイゼーション溶液を除去し、フィルターを 0 . 2 X S S C 、 0 . 1 % S D S で、 6 5 において洗浄する。単一のハイブリダイゼーション陽性組み換え体を同定し、プラーク精製する。 B M P - 1 2 オリゴヌクレオチドプローブ # 3 にハイブリダイゼーションする、このプラーク精製された組み換えバクテリオファージクローンを H u G - 4 8 と命名する。バクテリオフェージプレートストックを作成し、バクテリオファージ D N A を H u G - 4 8 ヒト・ゲノムクローンから単離する。バクテリオファージ H u G - 4 8 を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、 1 2 3 0 1 パークローン・ドライブ、ロックビル、 M D (American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD) 「 A T C C 」に、 1 9 9 3 年 1 2 月 7 日に受託番号 # 7 5 6 2 5 の下、寄託されている。この寄託は特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に適合する。この組み換え体 H u G - 4 8 のオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域は 3 . 2 k b の B a m H I フラグメントに局在化している。このフラグメントをプラスミドベクター (p G E M 3) 中にサブクローンし、 D N A 配列分析を行う。このプラスミドサブクローンを P C R 1 - 1 # 2 と命名し、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、 1 2 3 0 1 パークローン・ドライブ、ロックビル、 M D (American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD) 「 A T C C 」に、 1 9 9 3 年 1 2 月 7 日に受託番号 # 6 9 5 1 7 の下、寄託されている。この寄託は特許手続上の微生物

の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に適合する。クローン HuG - 48 由来の、プラスミドサブクローン PCR 1 - 1 # 2 の 3 . 2 k b の DNA インサートの部分 DNA 配列 (配列番号 : 1) および誘導されるアミノ酸配列 (配列番号 : 2) を配列表に示す。

配列番号 : 1 のヌクレオチド # 639 ~ # 714 は、配列番号 : 5 に示す特異的に増幅された BMP - 12 をコードする DNA フラグメントのヌクレオチド # 27 ~ # 102 に対応し、かくして、ヒト・ゲノムバクテリオファージクローン HuG - 48 および誘導されたサブクローン PCR 1 - 1 # 2 は少なくとも本発明 BMP - 12 蛋白の一部をコードしている。プラスミド PCR 1 - 1 # 2 の 3 . 2 k b の BamHI インサートの一部分のヌクレオチド配列は、配列番号 : 1 のヌクレオチド # 1 ~ # 882 により定義される少なくとも 882 塩基対の読み取り枠を含んでいる。この読み取り枠は本発明 BMP - 12 蛋白の少なくとも 294 個のアミノ酸をコードしている。コードされた 294 個のアミノ酸のヒト・BMP - 12 蛋白は成熟ヒト・BMP - 12 蛋白の全体 (配列番号 : 2 のアミノ酸 # 1 ~ # 104)、ならびに 1 次翻訳産物のプロペプチド領域の C 末端部分 (配列番号 : 2 のアミノ酸 # - 190 から # - 1 まで) を含んでいる。

10

配列番号 : 33 に示すプラスミド PCR 1 - 1 # 2 の 3 . 2 k b の BamHI インサートのさらなる DNA 配列は、配列番号 : 33 のヌクレオチド # 138 から 1301 により定義される 1164 塩基対の読み取り枠の存在を示す [注、配列番号 : 1 の開示されたすべての配列は配列番号 : 33 に含まれる]。この配列はゲノムクローンに由来するため、コーディング配列の 5' 伸長部と介在配列 (イントロン / 非イントロン配列) の 3' 限界との間の境界を確定することは困難である。

20

他の BMP 蛋白および TGF - ファミリーに属する他の蛋白に関する知識に基づくと、提案されているコンセンサス蛋白分解プロセッシング配列 Arg - X - X - Arg と一致して、前駆体ポリペプチドが多塩基性配列 Arg - Arg - Gly - Arg において開裂されるであろうと予想される。BMP - 12 前駆体ポリペプチドの開裂は、配列番号 : 2 の位置 # 1 におけるアミノ酸セリンから始まる 104 個のアミノ酸成熟ペプチドを生じると考えられる。成熟形態への BMP - 12 のプロセッシングは、関連蛋白 TGF - のプロセッシング [ジェントリー (Gentry) ら, モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Molec. & Cell. Biol.) 第 8 巻 : 4162 頁 (1988 年); デリンク (Derynck) ら, ネイチャー (Nature) 第 316 巻 : 701 頁 (1985 年)] と類似の様式でのダイマー化および N 末端領域の除去を包含すると考えられる。

30

それゆえ、BMP - 12 の成熟活性種は 2 つのポリペプチドサブユニットのホモダイマーからなり、各サブユニットは配列番号 : 2 のアミノ酸 # 1 から # 104 までからなり、サブユニットの予想分子量約 12000 ダルトンである。さらなる活性種は、少なくとも配列番号 : 2 のアミノ酸 # 3 から # 103 までからなり、それゆえ、最初と最後の保存されたシステイン残基を含んでいると考えられる。蛋白の TGF - / BMP ファミリーの他のメンバーと同様に、BMP - 12 蛋白のカルボキシ末端部分はアミノ末端部分よりも高い配列保存性を示す。システインに富む C 末端ドメイン (アミノ酸 # 3 ~ # 104) におけるヒト・BMP - 12 蛋白の、ヒト・BMP 蛋白および TGF - ファミリーの他の蛋白の対応ヒト・BMP 領域に対するアミノ酸同一性のパーセンテージは以下のものである

40

: BMP - 2, 55%; BMP - 3, 43%; BMP - 4, 53%; BMP - 5, 49%; BMP 6, 49%; BMP - 7, 50%; BMP - 8, 57%; BMP - 9, 48%; BMP - 10, 57%; アクチピン WC (BMP - 11), 38%; Vg 1, 46%; GDF - 1, 47%; TGF - 1, 36%; TGF - 2, 36%; TGF - 3, 39%; インヒピン (B), 36%; インヒピン (A), 41%。

ヒト・BMP - 12 DNA 配列 (配列番号 : 1)、またはその一部をプローブとして用いて、BMP - 12 mRNA を合成するヒト・細胞系または組織を同定することができる。簡単に説明すると、RNA を選択細胞または組織源から抽出し、ホルムアルデヒドアガロースゲルによる電気泳動を行いニトロセルロースに移すか、あるいはホルムアルデヒドと反応させてニトロセルロース上に直接スポットする。次いで、ニトロセルロースを、

50

ヒト・BMP-12コーディング配列由来のプロープとハイブリダイゼーションさせる。別法として、ヒト・BMP-12配列を用いて、特異的増幅反応を行うために使用されるプライマー間の領域に存在するBMP-12コーディング配列の一部を特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを設計する。これらのヒト・BMP-12由来のプライマーは、mRNA、cDNAまたはゲノムDNA鋳型由来の対応BMP-12コーディング配列を特異的に増幅することを可能にするであろうと考えられる。上記方法の1つにより使用可能な源が同定されたならば、オリゴ(dT)セルロースクロマトグラフィーによりmRNAを選択し、cDNAを合成し、次いで、当業者に知られたgt10または他のバクテリオファージベクター、例えばZAP中に確立された方法(ツール(Toole)ら, 上記)によってクローンする。上記のオリゴヌクレオチドプライマーにより行われる増幅反応を、バクテリオファージベクター中にクローンされた前以て確立されている、ヒト・cDNAまたはゲノムライブラリーに対して直接行うことも可能である。かかる場合には、増幅されたBMP-12をコードするDNAのフラグメントをプロープとして用いて、ヒト・BMP-12蛋白の一部をコードする特異的に増幅されたDNA生成物を生じるライブラリーを直接スクリーニングすることができよう。

10

ヒト・BMP-12ゲノムクローン HuG-48のDNA配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを予想して、市販(すなわち、カリフォルニア州ラジョラのストラタジーン(Stratagene)社製またはカリフォルニア州パロ・アルトのクローンテック・ラボラトリーズ, インコーポレイテッド(Clontech Laboratories, Inc.)製)されている、前以て確立されたヒト・cDNAライブラリー由来のヒト・BMP-12をコードするDNA配列の特異的増幅を行う。配列番号: 1に示すDNA配列のヌクレオチド#571から#590までに基づいて以下のオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、自動DNA合成装置により合成する:

20

#4: TGCGGATCCAGCCGCTGCAGCCGCAAGCC (配列番号: 21)

プライマー#4の最初の9個のヌクレオチド(下線)は、BMP-12蛋白をコードするDNA配列を特異的に増幅する操作を容易にするために制限エンドヌクレアーゼBamHIに対する認識部位を含んでおり、かくして配列番号: 1に示すDNA配列由来ではない。配列番号: 1に示すDNA配列のヌクレオチド#866から#885までに基づいて以下のオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、自動DNA合成装置により合成する:

30

#5 GACTCTAGACTACCTGCAGCCGCAGGCCT (配列番号: 22)

プライマー#5の最初の9個のヌクレオチド(下線)は、BMP-12蛋白をコードするDNA配列を特異的に増幅する操作を容易にするために制限エンドヌクレアーゼXbaIに対する認識部位を含んでおり、かくして配列番号: 1に示すDNA配列由来ではない。上に同定された標準的なヌクレオチドシンボルは以下のごとし: A, アデノシン; C, シトシン; G, グアニン; T, チミン

上で同定したプライマー#4および#5をプライマーとして用いて、以下のもの:

ヒト・胎児脳cDNA / ZAPII(ストラタジーンのカタログ#936206)、ヒト・肝臓 / UNI-ZAP XR(ストラタジーンのカタログ#937200)、ヒト・肺 / UNI-ZAP XR(ストラタジーンのカタログ#937206)、およびヒト胎児脾臓 / UNI-ZAP XR(ストラタジーンのカタログ#937205)を包含してもよい前以て確立されたcDNAライブラリー由来の特異的なBMP-12をコードするヌクレオチド配列の増幅を行う。

40

上で詳述したヒト・cDNAインサートバクテリオファージライブラリー約 1×10^8 pfu(ブランク形成単位)を95で5分間変性させた後、200 μ Mの各デオキシヌクレオチドトリホスフェート(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、10mM Tris-HCl pH 8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.001%ゼラチン、1.25ユニットのTaq DNAポリメラーゼ、100pMのオリゴヌクレオチドプライマー#4および100pMのオリゴヌクレオチドプライマー#5を含有する反応混合物に添加する。次いで、反応混合物を以下の方法のサーマルサイクリングに供

50

する：94 1分、50 1分、72 1分を39サイクル、次いで、72 で10分インキュベーションする。

この反応により特異的に増幅されるDNAは、約333塩基対のBMP-12をコードする生成物を生じると考えられよう。その内部の315塩基対は配列番号：1のヌクレオチド#571から#885に対応し、さらにプライマー#4および#5のヌクレオチド#1~#9により定義される制限部位に対するBMP-12特異的フラグメントの各末端の9塩基対を含んでいる。得られる333塩基対のDNA生成物を制限エンドヌクレアーゼBamHIおよびXbaIで消化し、フェノール抽出し、クロロホルム抽出し、対で、エタノール沈殿する。

別法として、エタノール沈殿、バッファー交換、次いで、消化されたDNA生成物を10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA中に希釈し、その後セントリコン(Centricon)TM 30マイクロコンセントレーター(マサチューセッツ州ビバリーのダブリュ・アール・グレイス・アンド・カンパニー(W.R. Grace & CO.)製;製品番号#4209)により遠心分離することにより、BamHI/XbaI制限消化により生じるDNAの小フラグメントの除去を行う。得られるBamHI/XbaI消化された増幅DNA生成物を、プラスミドベクター(すなわち、pBluescript、pGEM-3等)のポリリンカー領域のBamHI部位とXbaI部位との間にサブクローンする。得られるサブクローンのDNA配列分析は、BMP-12をコードするインサートの完全性を確認するために必要であろう。この方法において使用可能なcDNA源が同定されたならば、333塩基対のBMP-12特異的配列が増幅された対応cDNAライブラリーを、333塩基対のインサートまたは他のBMP-12特異的プローブを用いて直接スクリーニングして本発明のBMP-12蛋白の全長をコードするcDNAクローンを同定し単離することができよう。

当業者に知られたさらなる方法を用いてヒト・BMP-12関連蛋白をコードする他のcDNAの全長、あるいはヒト以外、特に他の哺乳動物種由来の本発明BMP-12関連蛋白をコードするcDNAクローンの全長を単離してもよい。

以下の実施例は、ネズミ・ゲノムDNAライブラリー中のBMP-12関連蛋白由来の相同体を単離するためのヒト・BMP-12配列の使用を示す。

本発明ヒト・BMP-12蛋白をコードするDNA配列は、ヒト以外の種由来のBMP-12およびBMP-12関連蛋白の配列に対して有意に相同的であると予想され、ヒトBMP-12配列を用いて、対応するBMP-12関連蛋白をコードするそれらの他の種由来のDNA配列を特異的に増幅することができよう。特別には、ヒト・BMP-12配列(配列番号：1)に基づいて以下のオリゴヌクレオチドを設計し、自動DNA合成装置により合成する：

#6: GCGGATCCAAGGAGCTCGGCTGGGACGA (配列番号：23)

#7: GGAATTCCCCCACCACCATGTCCTCGTAT (配列番号：24)

プライマー#6および#7の最初の8個のヌクレオチド(下線)は、それぞれ制限エンドヌクレアーゼBamHIおよびEcoRIからなる。ヒト以外の種由来のBMP-12またはBMP-12関連蛋白をコードする特異的に増幅されたDNA配列の操作を容易にするためにこれらの配列を用いることができ、よって、配列番号：1に示すDNA配列由来でない。配列番号：1のヌクレオチド#607~#626に基づいてオリゴヌクレオチドプライマー#6を設計する。配列番号：1に示すDNA配列のヌクレオチド#846~#865のリバース・コンプリメント列に基づいて、オリゴヌクレオチドプライマー#7を設計する。

上で同定したオリゴヌクレオチドプライマー#6および#7をプライマーとして用いて、ヒト以外の種由来のゲノムDNAからの特異的BMP-12関連配列の増幅を行う。増幅反応を以下のように行う：

ネズミ・ゲノムDNA(源：Balb c株)を、25ゲージの注射針中を繰り返し通すことにより剪断力を与え、100 で5分間変性させ、次いで、氷上で冷却してから200 μM 50

の各デオキシヌクレオチドトリホスフェート (dATP、dGTP、dCTPおよびdTTP)、10mM Tris-HCl pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.001%ゼラチン、1.25ユニットのTaq DNAポリメラーゼ、100pMのオリゴヌクレオチド#6および100pMのオリゴヌクレオチド#7を含有する反応混合物に添加する。反応混合物を以下の方法のサーマルサイクリングに供する：95 1分、55 1分、72 1分を40サイクル、次いで、72 で10分インキュベーションする。

この反応により特異的に増幅されるDNAをエタノール沈殿し、制限エンドヌクレアーゼ BamHIおよびEcoRIで消化し、次いで、アガロースゲル電気泳動に供する。BMP-12またはBMP-12関連蛋白をコードするDNAフラグメントの予想サイズに
10
対応するゲルの領域を切り取り、そこに存在する特異的に増幅されたDNAフラグメントを溶出し(当業者に知られた電気溶出または他の方法により)、pGEM-3またはpBluescriptのごときプラスミドベクターのポリリンカーのBamHIとEcoRI部位の間にサブクローンする。得られるサブクローンの1つ(mV1と命名)に関するDNA配列分析は、それに含まれている特異的に増幅されたDNA配列が、本発明BMP-12またはVL-1配列のいずれかに対するネズミ・相同体であると思われる蛋白の一部をコードしていることを示す。この特異的に増幅されたネズミ・DNAフラグメントのDNA配列(配列番号：10)および誘導されるアミノ酸配列(配列番号：11)を配列表に示す。

配列番号：10のヌクレオチド 1~26はオリゴヌクレオチド 6からなり、ヌクレオチド 246~272は、特異的増幅反応を行うために用いられるオリゴヌクレオチド 7のリバース・コンプリメントの一部からなる。配列番号：10のヌクレオチド 27はコドントリプレットの最後のヌクレオチドであると思われ、配列番号：10のヌクレオチド 244~245はコドントリプレットの最初の2個のヌクレオチドであるように思われる。それゆえ、配列番号：10のヌクレオチド 28から243まではmV1の部分コーディング配列に対応する。増幅反応を開始させることにおけるオリゴヌクレオチド 6および 7の機能のため、それらは、本発明ヒト・BMP-12またはVL-1蛋白に対するネズミ・相同配列をコードする実際の配列に正確に対応していなくてもよく、それゆえ、それらは対応するアミノ酸配列誘導體(配列番号：11)に正確に翻訳されない。

当業者は、配列番号：10に示す特異的に増幅されたネズミ・BMP-12またはVL-1 DNA配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチドプローブを用いて全長のネズミBMP-12またはVL-1をコードするクローン(cDNAまたはゲノムDNAのいずれか)を同定することができよう。
30

mV2と命名されたもう1つの得られたクローンのDNA配列分析は、特異的に増幅されたDNA配列はその中に本発明ネズミ・BMP-12関連配列の一部を含んでいたことを示す。この特異的に増幅されたネズミ・DNAフラグメントのDNA配列(配列番号：12)および誘導されるアミノ酸配列(配列番号：13)を配列表に示す。

配列番号：12のヌクレオチド 1~26は、オリゴヌクレオチド 6の一部からなり、ヌクレオチド 246~272は特異的増幅反応を行うために用いられたオリゴヌクレオチド 7のリバース・コンプリメントの一部からなる。配列番号：12のヌクレオチド 27はコドントリプレットの最後のヌクレオチドであると思われ、配列番号：12のヌクレオチド 244~245はコドントリプレットの最初の2つのヌクレオチドであると思われる。それゆえ、配列番号：12のヌクレオチド 28から243まではmV2の部分コーディング配列に対応する。増幅反応開始におけるオリゴヌクレオチド 6および 7の機能のために、それらは本発明ネズミ・BMP-12関連蛋白をコードする実際の配列に正確に対応していなくてもよく、それゆえ、対応するアミノ酸配列誘導體(配列番号：13)に翻訳されない。
40

ネズミ・BMP-12関連蛋白の全長をコードしているクローン(cDNAまたはゲノムのいずれか)を同定するために、配列番号：12に示す特異的に増幅されたネズミ・BMP-12関連DNA配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチドプローブが当業者によ
50

り用いられうる。

mV9と命名されたもう1つの得られたクローンのDNA配列分析は、特異的に増幅されたDNA配列はその中に本発明ネズミ・BMP-12関連配列の一部を含んでいたことを示す。この配列は、配列番号：3に記載されたヒト・MP52 DNA配列に対するネズミ・相同体であると思われる。この特異的に増幅されたネズミ・DNAフラグメントのDNA配列（配列番号：14）および誘導されるアミノ酸配列（配列番号：15）を配列表に示す。

配列番号：14のヌクレオチド 1～26はオリゴヌクレオチド 6の一部からなり、ヌクレオチド 246～272は特異的増幅反応を行うために用いられたオリゴヌクレオチド 7のリバース・コンプリメントの一部からなる。配列番号：14のヌクレオチド 27はコドントリプレットの最後のヌクレオチドであると思われ、配列番号：14のヌクレオチド 244～245はコドントリプレットの最初の2つのヌクレオチドであるように思われる。それゆえ、配列番号：14のヌクレオチド 28～243まではmV9の部分コーディング配列に対応する。増幅反応開始におけるオリゴヌクレオチド 6および7の機能のために、それらは本発明ネズミ・BMP-12関連蛋白をコードする実際の配列に正確に対応していなくてもよく、それゆえ、対応するアミノ酸配列誘導體（配列番号：15）に翻訳されない。

ネズミ・BMP-12関連蛋白の全長をコードしているクローン（cDNAまたはゲノムのいずれか）を同定するために、配列番号：14に示す特異的に増幅されたネズミ・BMP-12関連DNA配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチドプローブが当業者により用いられうる。

別法として、上で同定したオリゴヌクレオチドプライマー 6および7をプライマーとして用いて、BMP-12をコードしているプラスミドサブクローンPCR1-12由来の275塩基対のDNAプローブの特異的増幅を行う。該DNAプローブの内部の259塩基対は配列番号：1のオリゴヌクレオチド 607から865までに対応している。この275塩基対のDNAプローブを³²Pで放射性標識し、ベクター FIX II（ストラタジーン（Stratagene）社カタログ 946306）中に構築されたネズミ・ゲノムライブラリーをスクリーニングするのに用いた。該ネズミ・ゲノム遺伝子ライブラリーの100万個の組み換え体を、プレート1枚あたり約20000個の組み換え体の密度で50枚のプレートに撒く。組み換えバクテリオファージプラークに関する2系のニトロセルロースレプリカを、厳密性を減じた条件下において、標準的なハイブリダイゼーションバッファ（SHB = 5XSSC、0.1%、5Xデンハーツ、100μg/mlサケ・精子DNA）中、一晚60分において特異的に増幅された333塩基対のプローブとハイブリダイゼーションさせる。翌日、放射性標識されたオリゴヌクレオチドを含有するハイブリダイゼーション溶液を除去し、厳密性を減じた条件下において、2XSSC、0.1%SDSにてフィルターを洗浄する。複数のハイブリダイゼーション陽性組み換え体を同定し、プラーク精製する。ハイブリダイゼーション陽性ネズミ・ゲノム組み換えクローンのフラグメントを標準的なプラスミドベクター（すなわちpGEM3）中にサブクローンし、DNA配列分析に供する。

MVR3と命名されたこれらのサブクローンのうちの1つのDNA配列分析は、それが上記PCR生成物mV1に対応するマウス・遺伝子の一部をコードしていることを示す。このサブクローンの部分DNA配列および対応アミノ酸翻訳物を、それぞれ、配列番号：29および配列番号：30に示す。

MVR32と命名されたこれらのサブクローンのうちのもう1つのサブクローンのDNA配列分析は、それが、上記PCR生成物mV2（配列番号：7に示すヒト・VL1配列のネズミ・相同体）に対応するマウス・遺伝子の一部をコードすることを示す。このサブクローンの部分DNA配列および対応アミノ酸翻訳物を、それぞれ、配列番号：31および配列番号：32に示す。

MVR23と命名されたこれらのサブクローンのうちのもう1つのサブクローンのDNA配列分析は、それが、上記PCR生成物mV9（配列番号：3に示すMP52配列のネズ

10

20

30

40

50

ミ・相同体)に対応するマウス・遺伝子の一部をコードすることを示す。

本発明 BMP - 12 蛋白をコードするヒト・ゲノムクローンを同定し単離することに関して上で説明したのと同様の方法で、配列番号：7に示す VL - 1 をコードする配列に対応するオリゴヌクレオチドプローブを設計することができ、VL - 1 (BMP - 13) 蛋白をコードするヒト・ゲノムまたは cDNA 配列を同定するために用いることができる。これらのオリゴヌクレオチドは VL - 1 をコードする配列に特異的な領域に対して設計されるであろうし、それゆえ、特異的に増幅された VL - 1 をコードする配列 (配列番号：7) と特異的に増幅された BMP - 12 をコードする配列 (配列番号：5) との間の最低の程度のヌクレオチド配列同一性の領域由来である可能性があるだろう。

別法として、上で同定したオリゴヌクレオチド 4 および 5 をプライマーとして用いて、BMP - 12 をコードするプラスミドクローン PCR1 - 1 2 由来の 333 塩基対の DNA プローブの特異的増幅を行う。該 DNA プローブの内部の 315 塩基対は配列番号：1 のヌクレオチド 571 から 885 までに対応している。この 333 塩基対の DNA プローブを ³²P で放射性標識し、ベクター DASHII (ストラタジーン (Stratagene) 社カタログ 945203) 中に構築されたネズミ・ゲノムライブラリーをスクリーニングするのに用いた。該ネズミ・ゲノム遺伝子ライブラリーの 100 万個の組み換え体を、プレート 1 枚あたり約 20000 個の組み換え体の密度で 50 枚のプレートに撒く。組み換えバクテリオファージプラークに関する 2 系のニトロセルロースレプリカを、厳密性を減じた条件下において、標準的なハイブリダイゼーションバッファー (SHB = 5 X SSC、0.1%、5 X デンハーツ、100 μg/ml サケ・精子 DNA) 中、一晚 60 において特異的に増幅された 333 塩基対のプローブとハイブリダイゼーションさせる。翌日、放射性標識されたオリゴヌクレオチドを含有するハイブリダイゼーション溶液を除去し、厳密性を減じた条件下において、2 X SSC、0.1% SDS にてフィルターを洗浄する。複数 (約 15 個) のハイブリダイゼーション陽性組み換え体を同定し、プラーク精製する。

このスクリーニング工程に用いる、BMP - 12 をコードするプラスミド PCR1 - 1 2 から得られた 333 塩基対の DNA プローブに陽性ハイブリダイゼーションすると予測される BMP - 12 および他の BMP - 12 寒天蛋白をコードする組み換え体と、本発明 VL - 1 をコードするハイブリダイゼーション陽性組み換え体とを区別するために、配列番号：7 に示す VL - 1 に基づく下記オリゴヌクレオチドプローブを設計し、自動 DNA 合成装置により合成する：

#8: TGTATGCGACTTCCCGC [配列番号：35]

配列番号：1 に示す BMP - 12 をコードする配列の対応領域 (ヌクレオチド 672 から 689 まで) に対して 5 個のヌクレオチド相違を有する、配列番号：7 のヌクレオチド 60 から 76 までに対応するオリゴヌクレオチド。VL - 1 オリゴヌクレオチドプローブ 8 にハイブリダイゼーションする組み換えバクテリオファージクローンの 1 つを JLDc31 と命名する。この組み換えバクテリオファージクローンをプラーク精製し、バクテリオファージプレートストックを作成し、JLDc31 ヒト・ゲノムクローンからバクテリオファージ DNA を単離する。バクテリオファージ JLDc31 を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、12301 パークローン・ドライブ、ロックビル、MD (「ATCC」) に、受託番号 75922 の下、1994 年 10 月 20 日に寄託した。この寄託は特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に適合する。この組み換え体 JLDc31 のオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域は 2.5 kb の EcoRI フラグメントに局在化している。このフラグメントをプラスミドベクター (gGEM3) 中にサブクローンし、DNA 配列分析を行う。このプラスミドサブクローンを gGEMJLDc31/2.5 と命名し、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、12301 パークローン・ドライブ、ロックビル、MD (「ATCC」) に、受託番号 69710 の下、1994 年 10 月 20 日に寄託した。この寄託は特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に適合する。

クローン JLDc31 由来のプラスミドサブクローン gGEMJLDc31/2.5 の

10

20

30

40

50

2.5 kbのDNAインサートの部分DNA配列(配列番号:25)および誘導されるアミノ酸配列(配列番号:26)を配列表に示す。

プラスミドpGEMJLDc31/2.5の2.5 kbのEcoRIインサートの一部のDNA配列を配列番号:25に示す。配列番号:25のヌクレオチド52から963により定義される912塩基対の読み取り枠を含んでいる。この配列がゲノムクローンに由来するため、コーディング配列の5'伸長部と介在配列(イントロン/非コーディング配列)の3'端との間の境界を決定することは困難である。全読み取り枠(配列番号:25のヌクレオチド52から963まで)は、304個のアミノ酸までの本発明VL-1蛋白の一部をコードしている。

BMP蛋白およびTGF- β ファミリーに属する他の蛋白に関する知識に基づくと、前駆体ポリペプチドは、提案されているコンセンサス蛋白分解配列Arg-X-X-Argと一致した多塩基性配列Arg-Arg-Arg-Argにおいて開裂されるであろうと予測される。VL-1前駆体ポリペプチドの開裂は、配列番号:26の位置1におけるアミノ酸Thrから始まる120個のアミノ酸の成熟ペプチドを生じると考えられる。成熟形態へのVL-1のプロセッシングは、関連蛋白TGF- β のプロセッシング[ジェントリー(Gentry)ら,モレキュラー・アンド・セル・バイオロジー(molec & Cell.Biol.),第8巻:4162頁(1988年);デリンク(Derynck)ら,ネイチャー(Nature),第316巻:701頁(1985年)]に類似した様式でのダイマー化およびN末端領域の除去を包含すると考えられる。

それゆえ、VL-1の成熟活性種は、各サブユニットが配列番号:26のアミノ酸1から120まで(予想分子量約12000ダルトン)からなる2個のポリペプチドサブユニットのホモダイマーからなると考えられる。さらなる活性種は、少なくとも配列番号:26のアミノ酸19から119もしくは120までからなり、それゆえ、最初と最後の保存されたシステイン残基を含むと考えられる。

かかる方法を用いて、成熟ヒト・VL-1(BMP-13)をコードするクローンを得た。このクローンによりコードされるヌクレオチド配列および対応アミノ酸配列を、それぞれ、配列番号:25および26において配列表に示す。

実施例2

BMP-12の発現

BMP-12蛋白を製造するために、慣用的な遺伝子工学的的方法により、それをコードするDNAを適当な発現ベクター中に移行させ、哺乳動物細胞または他の好ましい真核もしくは原核宿主の細胞中に導入する。

細菌細胞においてBMP-12蛋白を製造するために、以下の方法を用いる。

イー・コリにおけるBMP-12の発現

イー・コリにおいてBMP-12を製造するために、以下の主要な特徴を有する発現プラスミドpALV1-781を構築した。ヌクレオチド1~2060は、宿主イー・コリ株における抗生物質アンピシリン耐性を付与する-lactamaseに関する遺伝子およびColE1由来の複製開始点を含むプラスミドpUC18[ノランダール(Norrandar)ら,ジーン(Gene)第26巻:101~106頁(1983年)]由来のDNA配列を含む。ヌクレオチド2061~2221は、3つのオペレーター配列O_L1、O_L2、O_L3を含むバクテリオファージ[サンガー(Sanger)ら,ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J.Mol.Biol.)第162巻:729~773頁(1982年)]の大左方プロモーター(pL)に関するDNA配列を含む。該オペレーターはcIリプレッサー蛋白の結合部位であり、該蛋白の細胞内レベルはpLからの転写開始量を調節する。ヌクレオチド2222~2723は、サンガー(Sanger)ら,ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J.Mol.Biol.)第162巻:729~773頁(1982年)に記載されたバクテリオファージ由来のヌクレオチド35566から35472までおよび38137から38361までに由来する配列上に含まれる強力なりボソーム結合配列を含む。ヌクレオチド2724~3041は、すべての3'非翻訳配列が除去されている成熟BMP-12蛋白をコードするDNA配列を含む。pALV1-781発現ベクター中に導入さ

10

20

30

40

50

れたBMP-12 DNA配列を5'末端において修飾してコーディング能力を変化させずにA+T含量を増加させた。これらの変更を行ってイー・コリ中のBMP-12 mRNA上への翻訳効率を上昇させた。ヌクレオチド3042~3058は、制限エンドヌクレアーゼ部位を有する「リンカー」DNA配列を提供する。ヌクレオチド3059~3127は、イー・コリのaspA遺伝子の転写終結配列[タカギ(Takagi)]ら、ヌクレイック・アシズ・リサーチ(Nucl. Acids Res.)第13巻:2063~2074頁(1985年)]に基づく転写終結配列を提供する。ヌクレオチド3128~3532はpUC18由来のDNA配列である。

ダガート(Dagert)およびエールリッヒ(Ehrlich), ジーン(Gene)第6巻:23頁(1979年)の手順によりプラスミドpALV1-781をイー・コリ宿主株GI724 (F, lacI^q, lacp^{L8}, ampC::cl⁺)中に形質転換した。

GI724(ATCC受託番号55151)はampC遺伝子座における染色体中に安定に組み込まれたcIリプレッサー遺伝子のコピーを含んでおり、該遺伝子はサルモネラ・チフィムリウム(Salmonella typhimurium)のtrpプロモーター/オペレーター配列の転写調節下に置かれている。最少培地または上記IMCのごときカサミノ酸を捕捉した最少培地のようなトリプトファン不含培地中での増殖の間のみ、GI724中においてcI蛋白が生産される。

GI724培養へのトリプトファン添加はtrpプロモーターを抑制し、cI合成のスイッチをオフにし、pLプロモーターが細胞中に存在する場合にはpLプロモーターからの転写誘導を徐々に引き起こすであろう。

1mM MgSO₄を含有し、0.5%w/vグルコース、0.2%w/vカザミノ酸および100μg/mlアンピシリンを捕捉したM9培地[ミラー(Miller), 「イクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Experiments in Molecular Genetics) コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・ニューヨーク(Cold Spring Harbor Laboratory, New York)(1972年)]からなるIMC培地を含有する1.5%w/v寒天プレート上で形質転換を選択した。pALV1-781で形質転換したGI724を、100μgアンピシリン含有IMC培地中で、A₅₅₀が0.5になるまで37で増殖させた。次いで、最終濃度100μg/mlとなるようにトリプトファンを添加し、さらに培養物を4時間インキュベーションした。この間に、BMP-12蛋白は「封入体」フラクション中に蓄積する。

蛋白モノマーの調整

18gの凍結細胞を計量し、60mlの100mM Tris、10mM EDTA、1mM フッ化フェニルメチルスルホニル[PMSF], pH8.3中に再懸濁した。マイクロフルイダイザー(Microfluidizer)TM[MCF100T型]に3回通すことにより細胞を溶解させた。4で20分間15000gでの遠心分離により封入体ペレットを得た。上清を傾斜法で捨て、100mlの100mM Tris、1.0M NaCl、10mM EDTA、1mM PMSF, pH8.3で洗浄した。懸濁物を、4で10分間15000gで再度遠心分離し、上清を傾斜法で捨てた。次いで、ペレットを、100mM Tris、10mM EDTA、1% Triton X-100、1mM PMSF, pH8.3で洗浄した。懸濁物を4で10分間15000gで再度遠心分離し、上清を傾斜法で捨てた。ガラス製組織ホモジナイザー中で、1%DTTを含有する50mlの20mM Tris、1mM EDTA、1mM PMSF, pH8.3にペレットを再懸濁した。次いで、氷酢酸で酸性にしてpHを2.5にすることによりモノマーBMP-12を可溶化した。4で20分間15000gで遠心分離することにより可溶性フラクションを単離した。

この遠心分離により得られた上清を集め、20mlずつSephacryl S-100TMサイズ排除カラム(83cm x 2.6cm; ベッド約440ml)上でクロマトグラフィーを行った。1%酢酸を移動相として流速1.4ml/分でSephacryl S-100TMカラムを操作した。コンピューター計算した吸光係数18200M⁻¹cm⁻¹および分子量(11667ダルトン)を用い、280nmにおける吸光度によりBMP-12

10

20

30

40

50

モノマーに対応するフラクションを検出した。このサイズ排除カラムによりプールされた材料を再生反応の出発材料として用いた。

上記方法の別法として、 -80°C に保存された 1.0 g の細胞を計り取る。溶液 (3.4 ml の 100 mM Tris 、 10 mM EDTA 、 $\text{pH } 8.5$) を添加する。十分に懸濁するまで溶液をボルテックス攪拌する。 $40\text{ }\mu\text{l}$ のイソプロパノール中 100 mM PMSF を添加する。フレンチプレスで細胞を 1000 psi において溶解させる。封入体をエッペンドルフ管中、 4°C で 20 分遠心分離してペレットを形成する。上清を傾斜法で捨てる。1個のペレット (全部で4個) に 250 mM DTT を含有する脱気した 1.0 ml の 8.0 M グアニジン塩酸、 0.5 M Tris 、 5 mM EDTA 、 $\text{pH } 8.5$ を添加する。ペレットを溶解し、液にアルゴンを 30 秒間吹き付ける。次に、溶液を 37°C で 1 時間インキュベーションする。エッペンドルフ微量遠心を 23°C で $2\sim 3$ 分行って不溶性物質をペレット化する。 $0.5\sim 1.0\text{ ml}$ の上清をスぺルコ (Supelco) の 2 cm ガードカートリッジ (LC-304) に注入し、 0.1% TFA 中アセトニトリルを 35 分で $1\sim 70\%$ とするグラジエントで溶離する。BMP-12 は 29 ないし 31 分の間に溶離する。フラクションをプールし、アミノ酸組成に基づく理論吸光係数を用いて、 0.1% TFA に対する 280 ナノメートルの吸光度により蛋白濃度を決定する。

上記方法の第2の別法として、上記のごとくイー・コリから得た凍結細胞ペレットを 30 ml の TE8.3 ($100:10$) バッファー (100 mM Tris-HCl $\text{pH } 8.3$ 、 $10\text{ mM Na}_2\text{EDTA}$ 、 1 mM PMSF) 中で融解する。マイクロフルイダイザー (Microfluidizer)TM [MCF100T型] に3回通すことにより細胞を溶解させる。最初に得られた封入体ペレットを、 100 mM DTT を含有する 8 M グアニジン-HCl、TE8.5 ($100:10$) バッファー (100 mM Tris-HCl $\text{pH } 8.5$)、 $10\text{ mM Na}_2\text{EDTA}$) 中に溶解し、 37°C で 1 時間インキュベーションする。この材料を室温で 15 分間 12000 g で遠心分離する。

CHAPS系を用いるBMP-12蛋白の再生

十分な体積のBMP-12プールを凍結乾燥して $10\text{ }\mu\text{g}$ の蛋白を得る。ガラス製装置で蒸留した $5\text{ }\mu\text{l}$ の水を添加して残渣を再溶解し、次いで、 $100\text{ }\mu\text{l}$ の再生用混合物 (50 mM Tris 、 1.0 M NaCl 、 2% 3-(3-クロラミドプロピル)ジメチルアンモニオ-1-プロパン-サルフェート (CHAPS)、 5 mM EDTA 、 2 mM グルタチオン (還元型)、 1 mM グルタチオン (酸化型); pH 約 8.5) を添加する。部分試料をノベックス (Novex) の 16% トリシンゲル上を 125 ボルトで 2.5 時間泳動させ、次いで、クーマシーブルー (Coomassie Blue) 染色ならびに脱色することによりダイマー形成を評価する。

1% B バッファー (A バッファー中に希釈) に対して平衡化された C4 分析用 RP-HP LC (逆相高品質液体クロマトグラフィー) カラム (ビダック (Vydac) 214TP54) を用い、流速 1 ml/分 として以下のグラジエント (A バッファー = 0.1% トリフルオロ酢酸、B バッファー = 95% アセトニトリル、 0.1% トリフルオロ酢酸) を 35 分かけて行う間に蛋白を溶離させて BMP-12 ダイマーを精製した:

- 1 - 5分 20% B バッファー
- 5 - 10分 $20\sim 30\%$ B バッファー
- 10 - 30分 $30\sim 50\%$ B バッファー
- 30 - 35分 $50\sim 100\%$ B バッファー

蛋白を 280 nm における吸光度によりモニターした。ピーク BMP-12 フラクション (29 ないし 31 分の間に溶離) をプールした。SDS-PAGE により純度を評価した。上で示したコンピューターにより計算した吸光係数および分子量を用いて、 280 nm における吸光度により蛋白濃度を決定した。

哺乳動物細胞におけるBMP-12の発現

生物学的に活性のある組み換えヒト・BMP-12のためのもう1つの考えられる好ましい発現系は安定に形質転換された哺乳動物細胞である。

配列番号: 1の配列またはBMP-12をコードする他のDNA配列もしくは他の修飾配

10

20

30

40

50

列および p C D [オカヤマ (Okayama) ら , モレキュラー・セル・バイオロジー (Mol. Cell Biol.) , 第 2 巻 1 6 1 ~ 1 7 0 頁 (1 9 8 2 年)] 、 p J L 3 、 p J L 4 [ゴフ (Gou gh) ら , E M B O J . , 第 4 巻 : 6 4 5 ~ 6 5 3 頁 (1 9 8 5 年)] ならびに p M T 2 C X M のごとき既知ベクターを用いることにより当業者は哺乳動物発現ベクターを構築することができる。

哺乳動物発現ベクター p M T 2 C X M は p 9 1 0 2 3 (b) (ウォング (Wong) ら , サイエンス第 2 2 8 巻 : 8 1 0 ~ 8 1 5 頁 , 1 9 8 5 年) の誘導体であるが、それがテトラサイクリン耐性遺伝子のかわりにアンピシリン耐性遺伝子を含み、さらに c D N A クローン挿入のための X h o I 部位を含んでいるという点で p 9 1 0 2 3 (b) とは異なる。p M T 2 C X M の機能的エレメントは記載されており (カウフマン , アール・ジェイ (Ka ufman, R.J.) , 1 9 8 5 年 , プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 第 8 2 巻 : 6 8 9 ~ 6 9 3 頁) 、 アデノウイルス V A 遺伝子、 7 2 塩基対のエンハンサーを含む S V 4 0 複製開始点、 5 ' スプライス部位ならびにアデノウイルス後期 m R N A 上に存在するアデノウイルス三分節リーダー配列の大部分を含むアデノウイルス大後期プロモーター、 3 ' スプライスアクセプター部位、 D H F R インサート、 S V 4 0 初期ポリアデニレーション部位 (S V 4 0) 、 およびイー・コリ中での増殖に必要な p B R 3 2 2 配列を含む。

p M T 2 - V W F の E c o R I 消化によりプラスミド p M T 2 C X M を得て、これを米国メリーランド州ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに、受託番号 A T C C 6 7 1 2 2 の下で寄託した。E c o R I 消化により p M T 2 - V W F 中に存在する c D N A インサートを切除し、直鎖状の p M T 2 を得て、これを結合してイー・コリ H B 1 0 1 または D H - 5 をアンピシリン耐性に形質転換することができる。プラスミド p M T 2 D N A を慣用的方法により調製することができる。次いで、ループアウト / イン突然変異 [モリナガ (Morinaga) ら , バイオテクノロジー (Biotechnology) 第 8 4 巻 : 6 3 6 頁 (1 9 8 4 年)] を用いて p M T 2 C X M を構築する。これにより、S V 4 0 複製開始点および p M T 2 のエンハンサー配列に近い H i n d I I I 部位に対する塩基 1 0 7 5 から 1 1 4 5 までを除去する。さらに、それは、制限エンドヌクレアーゼ X h o I に関する認識部位を含む配列を挿入する。p M T 2 3 と命名した p M T 2 C X M の誘導体は制限エンドヌクレアーゼ P s t I 、 E c o R I 、 S a l I および X h o I に関する認識部位を含んでいる。プラスミド p M T 2 C X M および p M T 2 3 D N A を慣用的方法により調製してもよい。

p M T 2 1 由来の p E M C 2 1 も本発明の実施に適する。p M T 2 1 は、p M T 2 - V W F 由来の p M T 2 に由来する。上記のごとく、E c o R I 消化により p M T 2 - V W F 中に存在する c D N A インサートを切除し、直鎖状の p M T 2 を得て、これを結合してイー・コリ H B 1 0 1 または D H - 5 をアンピシリン耐性に形質転換することができる。プラスミド p M T 2 D N A を慣用的方法により調製することができる。

p M T 2 1 は以下の 2 つの修飾により p M T 2 に由来する。まず、c D N A クローニングのための G / C テイリングからの 1 9 個の G 残基の伸長を含む D H F R c D N A の 7 6 塩基対の 5 ' 非翻訳領域を欠失させる。この工程において、X h o I 部位を挿入して D H F R のすぐ上流に続く配列を得る。次に、E c o R V および X b a I での消化、D N A ポリメラーゼのクレノウフラクションでの処理、次いで、C l a I リンカーへの結合により唯一の C l a I 部位を導入する。これにより、2 5 0 塩基対のセグメントがアデノウイルス関連 R N A (V A I) 領域から欠失されるが、V A I R N A 遺伝子の発現または機能は妨害されない。p M T 2 1 を E c o R I および X h o I で消化し、ベクター p E M C 2 B 1 を誘導するために用いる。

E c o R I および P s t I での消化により p M T 2 - E C A T 1 [エス・ケイ・ジュング (S.k.Jung) ら , ジャーナル・オブ・ウイルス学 (J.Virology) 第 6 3 巻 : 1 6 5 1 ~ 1 6 6 0 頁 (1 9 8 9 年)] から E M C V リーダーの一部を得て、2 7 5 2 塩基対のフラグメントを生じさせる。このフラグメントを T a q I で消化して、5 0 8 塩基対の E c o R I - T a q I フラグメントを得て、これを低融点アガロースゲル上の電気泳動により精製

10

20

30

40

50

する。68塩基対のアダプターおよびその相補鎖を、5' T a q I 突出末端およびヌクレオチド763から827までのEMCウイルスリーダー配列にマッチする配列を有する3' X h o I 突出末端とともに合成する。さらに、EMCウイルスリーダー中の位置10におけるATGをATTに変更し、X h o I 部位に続ける。p M T 2 1 E c o R I - X h o I フラグメント、EMCウイルスE c o R I - T a q I フラグメント、および68塩基対のオリゴヌクレオチドアダプターであるT a q I - X h o I アダプターのスリー・ウェイ (three way) 結合によりベクターp E M C 2 1 を得る。

このベクターは、哺乳動物細胞における所望cDNAの高レベル発現を指令する関係となっているSV40複製開始点ならびにエンハンサー、アデノウイルス大後期プロモーター、アデノウイルス三分節リーダー配列の大部分のcDNAコピー、小型のハイブリッド介在配列、SV40ポリアデニレーションシグナルならびにアデノウイルスVA I 遺伝子、DHFRならびに - ラクターゼマーカーおよびEMC配列を含んでいる。

ベクター構造はBMP - 1 2 DNA配列の修飾を含んでいてもよい。例えば、コーディング領域の5'および3'末端の非コーディングヌクレオチドを除去することによりBMP - 1 2 cDNAを修飾することができる。欠失された非コーディングヌクレオチドを、発現に有益であることが知られている他の配列に置換してもよく、置換しなくてもよい。これらのベクターをBMP - 1 2 蛋白発現に適する宿主細胞中に形質転換する。さらに、配列番号：1のヌクレオチド571から882までの成熟コーディング配列を単離し、他のBMP蛋白の完全なプロペプチドをコードする配列5'末端配列を付加することにより、配列番号：1の配列またはBMP - 1 2 蛋白をコードする他の配列を操作してBMP - 1 2 蛋白を発現させることができる。

例えば、当業者は、BMP - 2プロペプチドをコードするDNA配列が正しい読み取り枠において成熟BMP - 1 2 ペプチドをコードする配列に結合しているDNAベクターを調製することにより、BMP - 2のプロペプチドが作動可能なように成熟BMP - 1 2 ペプチドに結合している融合蛋白を製造することができる。かかる融合蛋白のDNA配列を配列番号：27に示す。

当業者は、コーディング配列に隣接する哺乳動物の調節配列を除去することにより、配列番号：1の配列を操作して上記のごとく細菌細胞による細胞内または細胞外発現用の細菌ベクターを作り出すことができる。もう1つの例として、さらにコーディング配列を操作することもできる(例えば、他の既知リンカーに結合する、非コーディング配列を欠失させることにより修飾する、あるいは他の既知方法によりヌクレオチドを変更する)。次いで、ティー・タニグチ(T. Taniguchi)ら、プロナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエイ(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)第77巻：5230~5233頁の記載のごとき手順を用いて、修飾されたBMP - 1 2 コーディング配列を既知細菌ベクター中に挿入することができる。次いで、この代表的な細菌ベクターを細菌宿主細胞中に形質転換し、それによりBMP - 1 2 を発現することができる。細菌細胞でのBMP - 1 2 蛋白の細胞外発現生産については、例えば、欧州特許出願EPA177,343参照。

昆虫細胞における発現のための昆虫ベクターの構築を行うために同様の操作をすることができる。酵母細胞による本発明因子の細胞内もしくは細胞外発現のために、酵母の調節配列を用いて酵母ベクターを構築することもできる[例えば、公開されたPCT出願WO86/00639および欧州特許出願EPA123,289参照]。

哺乳動物細胞における高レベルの本発明BMP - 1 2 蛋白の製造方法は、多コピーの異種BMP - 1 2 遺伝子を含む細胞の構築を包含してもよい。異種遺伝子を増幅可能なマーカー、例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子に結合する。ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子のために、増加した遺伝子コピーを含む細胞をメトトレキセート(MTX)濃度を増加させていった場合の増殖について選択できる(カウフマン(Kaufman)およびシャープ(sharp), ジャーナル・オブ・モレキュラー・マイオロジー(J.Mol.Biol.), 第159巻：601~629頁(1982年)の手順に従う)。このアプローチを多くの異なる細胞タイプに関して用いることができる。

例えば、リン酸カルシウム共沈およびトランスフェクション、エレクトロポレーション

10

20

30

40

50

またはプロトプラスト融合を包含する種々の方法により、その発現を可能にする他のプラスミド配列に作動可能に結合した本発明 BMP - 12 に関する DNA 配列を含むプラスミドおよび DHFR 発現プラスミド pAdA26SV(A)3 [カウフマンおよびシャープ, モレキュラー・セル・バイオロジー第2巻: 1304頁(1982年)]を DHFR 欠損 CHO 細胞 DUKX - BII 中に同時導入することができる。透析したウシ・胎児血清を含むアルファ培地での増殖に関して DHFR 発現形質転換体を選択し、次いで、カウフマンら, モレキュラー・セル・バイオロジー第5巻: 1750頁(1983年)に記載されたように MXT 濃度を増加させていった場合(例えば、連続的ステップで MXT を 0.02、0.2、1.0 次いで、5 μM とする)の増殖について選択する。形質転換体をクローンし、下記実施例5において説明するローゼン - 改変サムパス - レデイラットアッセイ (the Rosen-modified Sampath-Reddi rat assay) により生物学的に活性のある BMP - 12 の発現をモニターする。BMP - 12 発現は MXT 耐性レデイの増加に伴って増加するはずである。[35S]メチオニンもしくはシステインでのパルスラベリングおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動のごとき当該分野において知られた標準的方法を用いて BMP - 12 ポリペプチドを特徴づける。同様の手順に従って他の関連 BMP - 12 蛋白を製造することができる。

10

実施例3

BMP - 2 プロペプチド / BMP - 12 成熟ペプチド融合物の調製

BMP - 2 プロペプチド / BMP - 12 成熟ペプチド融合物をコードするベクターを構築するために、以下のクローニング手順を用いて2つの配列を融合させた。

20

まず、ヒト BMP - 2 蛋白のプロペプチドからなる DNA 制限酵素フラグメント、すなわち、配列番号: 27 のヌクレオチド1から843からなるフラグメントを pBMP2 EMC から切断する。pBMP2 EMC は、ヒト・BMP - 2 蛋白に関する全コーディング配列からなるラムダ U20S - 39 (ATCC # 40345) 由来のプラスミドであり、BMP - 2 の非翻訳3'および5'配列をベクターから欠失してある。使用5'制限酵素は BglII であり、それはベクター中の pBMP2 EMC をヌクレオチド979において切断する。使用3'制限酵素は MaeII であり、それは BMP - 2 プロペプチド中の pBMP2 EMC をカルボキシ末端のわずかに手前のヌクレオチド1925において切断する。次いで、得られた954塩基対の生成物をゲルにより単離し、遺伝子を精製した。

次に、ヒト・BMP - 12 成熟ペプチド DNA 配列の5'部分からなる DNA 制限酵素フラグメントを pPCR1 - 1 # 2 V1 - 1 (ATCC # 69517) から切断する。使用5'制限酵素は EaeI であり、それはヒト・BMP - 12 成熟ペプチド配列のN末端の丁度3'のところで pPCR1 - 1 # 2 V1 - 1 を切断する。得られた259塩基対の生成物をゲルにより精製し、遺伝子を精製した。次いで、アニーリングした場合にヒト・BMP - 2 プロペプチドの最先の3'末端と BMP - 12 成熟ペプチドの5'末端との融合配列からなる小型の DNA フラグメントを生じるように2つの DNA オリゴを設計し合成した。該 DNA フラグメントは、ヒト・BMP - 2 プロペプチドからなる3'制限酵素フラグメントにアニールする5' MaeII 相補性粘着末端を有する。アニールしたオリゴ DNA フラグメントは、ヒト・BMP - 12 成熟ペプチドからなる制限酵素フラグメントの5'にアニールする3' EaeI 相補性粘着末端を有する。コーディング鎖オリゴを B2 / 12 と命名し、それは13塩基対の長さである。次に、BMP - 12 成熟ペプチドフラグメントの3'末端における123塩基対をコードする DNA フラグメントを以下のよう

30

にして得た。まず、ヒト・BMP - 2 蛋白のプロペプチドからなる DNA フラグメント、すなわちヌクレオチド1から846を、pBMP2 EMC から PCR 増幅する。5'プライマー(オリゴ655a)はポリリンカーの丁度5'のところにアニールし、沈黙の変異により BglII 制限酵素部位を導入する。得られた PCR 生成物を、ポリリンカー中で開裂する SalI、および BglII で切断した。850塩基対の制限酵素フラグメント(アミノ酸配列 REKE で終わる)をゲルにより精製し、遺伝子を精製した。沈黙の変異により BglII 制限酵素部位をコードしてアミノ酸配列 SRC S から始まる成熟開裂生成物の5'末端にアニーリングする5'プライマー(オリゴ5 - 1)を用いて BMP - 1

40

50

2成熟ペプチドをPCR増幅した。3'プライマー(V1-13)はBMP-12成熟ペプチド3'末端にアニーリングし、ストップコドンの後ろにXbaI制限酵素部位を導入する。得られたPCR生成物をBglIIおよびXbaIで切断した。321塩基対の制限酵素フラグメントをゲルにより精製し、遺伝子を精製した。

前以てSalIおよびXbaIで切断したベクター中に2つの制限フラグメントをスリー・ウェイ結合させた。得られた構築物を配列決定してPCRにより誘発されたエラーをチェックしたところ、沈黙のCからTへの変異がプロペプチドの塩基対185において観察された。このプラスミドをpREKRSRCと命名した。次いで、pREKRSRCをBglIIおよびNgoMIで切断し、それによりBMP-12成熟配列の123塩基対を包含するベクターフラグメントを単離した。その3つの制限フラグメントおよびアニーリングしたオリゴリンカーをフォー・ウェイ(four way)結合して、BMP-12成熟ペプチドの(TAL)5'末端に融合した3'末端における成熟開裂部位を伴ったBMP-2プロペプチドを有するpREKR-TALを得た。得られた結合ベクターのコーディング配列を配列番号:27に示す。

実施例4

発現されたBMP-12の生物学的活性

上記実施例2で得られた発現BMP-12蛋白の生物学的活性を測定するために、細胞培養物から蛋白を回収し、同時生成される他の蛋白性物質ならびに他の汚染物質からBMP-12蛋白を単離する。精製蛋白を下記実施例5のアッセイに従ってアッセイしてもよい。

当業者に知られた標準的方法を用いて精製を行う。

クーマシーブルーまたは銀[オウクリー(Oakley)ら, アナリティカル・バイオケミストリー(Anal.Biochem)第105巻:361頁(1980年)]で染色するSDS-PAGEアクリルアミド[レムリ(Laemmli), ネイチャー(Nature)第227巻:680頁(1970年)]のごとき標準的方法を用い、さらにイムノプロット[トウビン(Towbin)ら, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)第76巻:4350頁(1979年)]により、蛋白分析を行う。

実施例5

ローゼン改変サムパス-レディアッセイ

サムパス(Sampath)およびレディ(Reddi), プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)第80巻:6591~6595頁(1983年)記載のラット異所性インプラントアッセイの改変バージョンを用いてBMP-12蛋白の活性を評価する。この改変アッセイを本明細書においてローゼン-改変サムパス-レディアッセイと呼ぶ。サムパス-レディ法のエタノール沈殿工程を、アッセイすべきフラクションを水に対して透析(組成物が溶液の場合)または限界濾過(組成物が懸濁液の場合)することに置き換える。次いで、溶液または懸濁液を0.1%TFAに対して平衡化する。得られた溶液を20mgのラット・マトリックスに添加する。蛋白で処理されない模擬ラット・マトリックス試料は対照として役立つ。この材料を凍結乾燥し、得られた粉末を#5ゼラチンカプセルに封入する。21~49日齢のロング・エバンス・ラット(Long Evans Rats)の腹胸部位の皮下にカプセルを移植する。10日後にインプラントを除去する。各インプラントの切片を固定し、組織学的分析用に処理する。1μmのグリコールメタクリレート切片をフォン・コッサ(Von Kossa)および酸フクシンで染色して各インプラントに存在する誘導された腱/靭帯様組織量のスコアをつける。

インプラント1個あたり1、5、25および50μgの用量でBMP-12を10日間移植した。5μgの用量のBMP-2は陽性対照として役立った。試験したすべてのBMP-12用量に関して、10日後にインプラントにおいて骨または軟骨の形成は観察されなかった。そのかわり、同じ平面に並んでおり互いに固く充填されている線維芽細胞の高密度の束の存在により容易に認識される、胚性の腱に類似した組織でインプラントが満たさ

10

20

30

40

50

れていた〔腱ノ靭帯様組織は、例えば、ハム（Ham）およびコーマック（Cormack）、ヒストロロジー（Histology）（JB・リップニコット・カンパニー（JB Lippencott Co.）（1979年）、367～369頁に記載されており、引用によりその開示を本明細書に記載されているものとみなす〕。腱ノ靭帯様組織がすべてのBMP-12含有インプラントに存在していた次のセットのアッセイにおいてこれらの知見が再び得られた。対照的に、期待されたように、BMP-12インプラントは骨および軟骨の形成を示したが、腱ノ靭帯様組織を含んでいなかった。

本発明BMP-12蛋白および関連蛋白をこのアッセイにおける活性に関して評価してもよい。

実施例 6

上記実施例による方法を用い、当業者が行える範囲内のわずかな変更を行って、ヒトMP52蛋白およびBMP-13ネズミ・相同体を発現し、腱ノ靭帯様組織誘導活性に関してアッセイした。すべての蛋白は、BMP-12に関して上に記載した結果と同等の結果を示した。

上記記載は、本発明の目下好ましい具体的を詳述するものである。これらの記載を考慮して本発明の実施における多くの改変および変更が当業者により行われると考えられる。それらの改変および変更は添付した請求の範囲に包含されると確信する。本明細書において議論したすべての文献の開示を引用により本明細書に記載されているものとみなす。

配 列 表

(1) 一般的情報：

(i) 出願人：ジェネティックス・インスティテュート・インコーポレイテッド
プレジデント・アンド・フェロウズ・オブ・ハーバード・カレッジ

(ii) 発明の名称：腱誘導組成物

(iii) 配列の数：35

(vi) 連絡先：

(A) 宛て先：ジェネティックス・インスティテュート・インコーポレイテッド

(B) 通り名：ケンブリッジ・パーク・ドライブ87番

(C) 都市名：ケンブリッジ

(D) 州名：マサチューセッツ

(E) 国名：アメリカ合衆国

(F) ZIP：02140

(v) コンピューター・リーダブル・フォーム：

(A) メディウムタイプ：フロッピーディスク

(B) コンピューター：IBM PCコンパチブル

(C) オペレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：Patent In Release #1.0, バージョン #1.25

(vi) 現在の出願データ：

(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：US 08 / 164, 103

(B) 出願日：1993年12月7日

(C) 出願番号：US 08 / 217, 780

(D) 出願日：1994年3月25日

(E) 出願番号：US 08 / 333, 576

(F) 出願日：1994年11月2日

(viii) 代理人等の情報：

(A) 氏名：レイザー, スチーブン・アール

10

20

30

40

50

- (B) 登録番号 : 3 2 , 6 1 8
- (C) 代理人等における処理番号 : 5 2 0 2 D - P C T
- (i x) テレコミュニケーションの情報 :
- (A) 電話番号 : 6 1 7 4 9 8 - 8 2 6 0
- (B) ファックス番号 : 6 1 7 8 7 6 - 5 8 5 1
- (2) 配列番号 : 1 に関する情報 :
- (i) 配列の特徴 :
- (A) 配列の長さ : 9 2 6 塩基対
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (i i) 配列の種類 : D N A (ゲノム)
- (v i) 起源 :
- (A) 生物名 : ホモ・サピエンス
- (v i i) 直接の起源 :
- (B) クローン : V 1 - 1
- (i x) 特徴 :
- (A) 特徴を表す記号 : m a t _ p e p t i d e
- (B) 存在位置 : 5 7 1 . . . 8 8 2
- (i x) 特徴 :
- (A) 特徴を表す記号 : C D S
- (B) 存在位置 : 1 . . . 8 8 2
- (x i) 配列の記載 : 配列番号 : 1 :

10

20

GCG CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG AAT TGG GTA CGG GGC CCA GGC Ala Arg Asn Thr Thr His Tyr Arg Ala Asn Trp Val Arg Gly Pro Gly -190 -185 -180 -175	48	
AGC TGG ACT TCT CCG CCG TTG CTG CTG CTG TCC ACG TGC CCG GGC GCC Ser Trp Thr Ser Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ser Thr Cys Pro Gly Ala -170 -165 -160	96	
GCC CGA GCG CCA CGC CTG CTG TAC TCG CGG GCA GCT GAG CCC CTA GTC Ala Arg Ala Pro Arg Leu Leu Tyr Ser Arg Ala Ala Glu Pro Leu Val -155 -150 -145	144	
GGT CAG CGC TGG GAG GCG TTC GAC GTG GCG GAC GCC ATG AGG CGC CAC Gly Gln Arg Trp Glu Ala Phe Asp Val Ala Asp Ala Met Arg Arg His -140 -135 -130	192	10
CGT CGT GAA CCG CGC CCC CCC CGC GCG TTC TGC CTC TTG CTG CGC GCA Arg Arg Glu Pro Arg Pro Pro Arg Ala Phe Cys Leu Leu Leu Arg Ala -125 -120 -115	240	
GTG GCA GGC CCG GTG CCG AGC CCG TTG GCA CTG CGG CGA CTG GGC TTC Val Ala Gly Pro Val Pro Ser Pro Leu Ala Leu Arg Arg Leu Gly Phe -110 -105 -100 -95	288	
GGC TGG CCG GGC GGA GGG GGC TCT GCG GCA GAG GAG CGC GCG GTG CTA Gly Trp Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Glu Glu Arg Ala Val Leu -90 -85 -80	336	
GTC GTC TCC TCC CGC ACG CAG AGG AAA GAG AGC TTA TTC CGG GAG ATC Val Val Ser Ser Arg Thr Gln Arg Lys Glu Ser Leu Phe Arg Glu Ile -75 -70 -65	384	20
CGC GCC CAG GCC CGC GCG CTC GGG GCC GCT CTG GCC TCA GAG CCG CTG Arg Ala Gln Ala Arg Ala Leu Gly Ala Ala Leu Ala Ser Glu Pro Leu -60 -55 -50	432	
CCC GAC CCA GGA ACC GGC ACC GCG TCG CCA AGG GCA GTC ATT GGC GGC Pro Asp Pro Gly Thr Gly Thr Ala Ser Pro Arg Ala Val Ile Gly Gly -45 -40 -35	480	
CGC AGA CGG AGG AGG ACG GCG TTG GCC GGG ACG CGG ACA GCG CAG GGC Arg Arg Arg Arg Thr Ala Leu Ala Gly Thr Arg Thr Ala Gln Gly -30 -25 -20 -15	528	
AGC GGC GGG GGC GCG GGC CGG GGC CAC GGG CGC AGG GGC CGG AGC CGC Ser Gly Gly Gly Ala Gly Arg Gly His Gly Arg Arg Gly Arg Ser Arg -10 -5 1	576	30
TGC AGC CGC AAG CCG TTG CAC GTG GAC TTC AAG GAG CTC GGC TGG GAC Cys Ser Arg Lys Pro Leu His Val Asp Phe Lys Glu Leu Gly Trp Asp 5 10 15	624	
GAC TGG ATC ATC GCG CCG CTG GAC TAC GAG GCG TAC CAC TGC GAG GGC Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly 20 25 30	672	
CTT TGC GAC TTC CCT TTG CGT TCG CAC CTC GAG CCC ACC AAC CAT GCC Leu Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala 35 40 45 50	720	

ATC ATT CAG ACG CTG CTC AAC TCC ATG GCA CCA GAC GCG GCG CCG GCC	768
Ile Ile Gln Thr Leu Leu Asn Ser Met Ala Pro Asp Ala Ala Pro Ala	
55 60 65	
TCC TGC TGT GTG CCA GCG CGC CTC AGC CCC ATC AGC ATC CTC TAC ATC	816
Ser Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile	
70 75 80	
GAC GCC GCC AAC AAC GTT GTC TAC AAG CAA TAC GAG GAC ATG GTG GTG	864
Asp Ala Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val	
85 90 95	
GAG GCC TGC GGC TGC AGG TAGCGCGCGG GCCGGGGAGG GGGCAGCCAC	912
Glu Ala Cys Gly Cys Arg	
100	
GCGGCCGAGG ATCC	926

10

- (2) 配列番号 : 2 に関する情報 :
- (i) 配列の特徴 :
- (A) 配列の長さ : 2 9 4 アミノ酸
- (B) 配列の型 : アミノ酸
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (i i) 配列の種類 : 蛋白
- (x i) 配列の記載 : 配列番号 : 2 :

Ala Arg Asn Thr Thr His Tyr Arg Ala Asn Trp Val Arg Gly Pro Gly -175
 -190 -185 -180

Ser Trp Thr Ser Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ser Thr Cys Pro Gly Ala -160
 -170 -165

Ala Arg Ala Pro Arg Leu Leu Tyr Ser Arg Ala Ala Glu Pro Leu Val -145
 -155 -150

Gly Gln Arg Trp Glu Ala Phe Asp Val Ala Asp Ala Met Arg Arg His -130
 -140 -135

Arg Arg Glu Pro Arg Pro Pro Arg Ala Phe Cys Leu Leu Leu Arg Ala -115
 -125 -120

Val Ala Gly Pro Val Pro Ser Pro Leu Ala Leu Arg Arg Leu Gly Phe -95
 -110 -105 -100

Gly Trp Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Glu Glu Arg Ala Val Leu -80
 -90 -85

Val Val Ser Ser Arg Thr Gln Arg Lys Glu Ser Leu Phe Arg Glu Ile -65
 -75 -70

Arg Ala Gln Ala Arg Ala Leu Gly Ala Ala Leu Ala Ser Glu Pro Leu -50
 -60 -55

Pro Asp Pro Gly Thr Gly Thr Ala Ser Pro Arg Ala Val Ile Gly Gly -35
 -45 -40

Arg Arg Arg Arg Arg Thr Ala Leu Ala Gly Thr Arg Thr Ala Gln Gly -15
 -30 -25 -20

Ser Gly Gly Gly Ala Gly Arg Gly His Gly Arg Arg Gly Arg Ser Arg 1
 -10 -5

Cys Ser Arg Lys Pro Leu His Val Asp Phe Lys Glu Leu Gly Trp Asp 15
 5 10

Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly 30
 20 25

Leu Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala 50
 35 40 45

Ile Ile Gln Thr Leu Leu Asn Ser Met Ala Pro Asp Ala Ala Pro Ala 65
 55 60

Ser Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile 80
 70 75

Asp Ala Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val 95
 85 90

Glu Ala Cys Gly Cys Arg 100

(2) 配列番号 : 3 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 1 2 0 7 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 1 本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : D N A (ゲノム)

(v i) 起源 :

(A) 生物名 : ホモ・サピエンス

(v i i) 直接の起源 :

(B) クローン : M P 5 2

(i x) 特徴 :

10

20

30

40

50

(A) 特徴を表す記号 : C D S

(B) 存在位置 : 8 4 5 . . . 1 2 0 4

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 3 :

ACCGGGCGGC	CCTGAACCCA	AGCCAGGACA	CCCTCCCCAA	ACAAGGCAGG	CTACAGCCCG	60											
GACTGTGACC	CCAAAAGGAC	AGCTTCCCGG	AGGCAAGGCA	CCCCAAAAG	CAGGATCTGT	120											
CCCCAGCTCC	TTCCTGCTGA	AGAAGGCCAG	GGAGCCCGGG	CCCCACGAG	AGCCCAAGGA	180											
GCCGTTTCGC	CCACCCCCCA	TCACACCCCA	CGAGTACATG	CTCTCGCTGT	ACAGGACGCT	240											
GTCCGATGCT	GACAGAAAGG	GAGGCAACAG	CAGCGTGAAG	TTGGAGGCTG	GCCTGGCCAA	300											
CACCATCACC	AGCTTTATTG	ACAAAGGGCA	AGATGACCGA	GGTCCCCTGG	TCAGGAAGCA	360	10										
GAGGTACGTG	TTTGACATTA	GTGCCCTGGA	GAAGGATGGG	CTGCTGGGGG	CCGAGCTCCG	420											
GATCTTGCGG	AAGAAGCCCT	CGGACACGGC	CAAGCCAGCG	GCCCCCGGAG	GCGGGCGGGC	480											
TGCCCAGCTG	AAGCTGTCCA	GCTGCCCCAG	CGGCCGGCAG	CCGGCCTCCT	TGCTGGATGT	540											
GCGCTCCGTG	CCAGGCCTGG	ACGGATCTGG	CTGGGAGGTG	TTCGACATCT	GGAAGCTCTT	600											
CCGAAACTTT	AAGAACTCGG	CCCAGCTGTG	CCTGGAGCTG	GAGGCCTGGG	AACGGGGCAG	660											
GGCCGTGGAC	CTCCGTGGCC	TGGGCTTCGA	CCGCGCCGCC	CGGCAGGTCC	ACGAGAAGGC	720											
CCTGTTCCCTG	GTGTTTGCC	GCACCAAGAA	ACGGGACCTG	TTCTTTAATG	AGATTAAGGC	780	20										
CCGCTCTGGC	CAGGACGATA	AGACCGTGTA	TGAGTACCTG	TTCAGCCAGC	GGCGAAAACG	840											
GCGG	GCC	CCA	CTG	GCC	ACT	CGC	CAG	GGC	AAG	CGA	CCC	AGC	AAG	AAC	CTT	889	
	Ala	Pro	Leu	Ala	Thr	Arg	Gln	Gly	Lys	Arg	Pro	Ser	Lys	Asn	Leu		
	1				5				10					15			
AAG	GCT	CGC	TGC	AGT	CGG	AAG	GCA	CTG	CAT	GTC	AAC	TTC	AAG	GAC	ATG	937	
Lys	Ala	Arg	Cys	Ser	Arg	Lys	Ala	Leu	His	Val	Asn	Phe	Lys	Asp	Met		
			20						25					30			
GGC	TGG	GAC	GAC	TGG	ATC	ATC	GCA	CCC	CTT	GAG	TAC	GAG	GCT	TTC	CAC	985	
Gly	Trp	Asp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Leu	Glu	Tyr	Glu	Ala	Phe	His		
			35					40					45				
TGC	GAG	GGG	CTG	TGC	GAG	TTC	CCA	TTG	CGC	TCC	CAC	CTG	GAG	CCC	ACG	1033	
Cys	Glu	Gly	Leu	Cys	Glu	Phe	Pro	Leu	Arg	Ser	His	Leu	Glu	Pro	Thr		
		50					55					60					
AAT	CAT	GCA	GTC	ATC	CAG	ACC	CTG	ATG	AAC	TCC	ATG	GAC	CCC	GAG	TCC	1081	
Asn	His	Ala	Val	Ile	Gln	Thr	Leu	Met	Asn	Ser	Met	Asp	Pro	Glu	Ser		
	65					70					75						
ACA	CCA	CCC	ACC	TGC	TGT	GTG	CCC	ACG	CGG	CTG	AGT	CCC	ATC	AGC	ATC	1129	
Thr	Pro	Pro	Thr	Cys	Cys	Val	Pro	Thr	Arg	Leu	Ser	Pro	Ile	Ser	Ile		
	80				85					90				95			
CTC	TTC	ATT	GAC	TCT	GCC	AAC	AAC	GTG	GTG	TAT	AAG	CAG	TAT	GAG	GAC	1177	
Leu	Phe	Ile	Asp	Ser	Ala	Asn	Asn	Val	Val	Tyr	Lys	Gln	Tyr	Glu	Asp		
			100					105						110			
ATG	GTC	GTG	GAG	TCG	TGT	GGC	TGC	AGG	TAG							1207	
Met	Val	Val	Glu	Ser	Cys	Gly	Cys	Arg									
			115				120										

(2) 配列番号 : 4 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 1 2 0 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : 蛋白

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 4 :

10

20

30

40

50

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

10

(2) 配列番号 : 5 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 1 2 8 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 1 本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : D N A (ゲノム)

(v i) 起源 :

(A) 生物名 : ホモ・サピエンス

(v i i) 直接の起源 :

(B) クローン : V 1 - 1 フラグメント

(i x) 特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : C D S

(B) 存在位置 : 2 8 . . . 1 0 2

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 5 :

GGATCCTGGA AGGATTGGAT CATTGCG CCG CTG GAC TAC GAG GCG TAC CAC 51
 Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His
 1 5

TGC GAG GGC CTT TGC GAC TTC CCT TTG CGT TCG CAC CTC GAG CCC ACC 99
 Cys Glu Gly Leu Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr
 10 15 20

AAC CACGCTATAG TCCAAACCTT TCTAGA 128
 Asn
 25

(2) 配列番号 : 6 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 2 5 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : 蛋白

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 6 :

Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly Leu Cys Asp Phe Pro
 1 5 10 15

Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn
 20 25

20

30

40

50

(2) 配列番号：7に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：128塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (ゲノム)

(vi) 起源：

(A) 生物名：ホモ・サピエンス

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：V1-1

(ix) 特徴：

(A) 特徴を表す記号：CDS

(B) 存在位置：28...102

(xi) 配列の記載：配列番号：7：

```
GGATCCTGGG ATGACTGGAT TATGGCG CCG CTG GAC TAC GAG GCG TAC CAC      51
                    1                    5
                    Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His
```

```
TGC GAG GGT GTA TGC GAC TTC CCG CTG CGC TCG CAC CTG GAG CCC ACC      99
Cys Glu Gly Val Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr
    10                    15                    20
```

```
AAC CACGCCATGC TACAAACGCT TCTAGA      128
Asn
  25
```

(2) 配列番号：8に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：25アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：蛋白

(xi) 配列の記載：配列番号：8：

```
Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly Val Cys Asp Phe Pro      30
  1                    5                    10                    15
```

```
Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn
    20                    25
```

(2) 配列番号：9に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：3585塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (ゲノム)

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：pALV1-781

(xi) 配列の記載：配列番号：9：

10

20

30

40

CTAACTACCC AACTCAAAAA AAAAAAAAAA AAAAACCCCC TCTAACCCCC ATTGACGAAA 60
GGGCGCTCGTG ATACGCCTAT TTTTATAGGT TAATGTCATG ATAATAATGG TTTCTTAGAC 120
GTCAGGTGGC ACTTTTCGGG GAAATGTGCG CGGAACCCCT ATTTGTTTAT TTTTCTAAAT 180
ACATTCAAAT ATGTATCCGC TCATGAGACA ATAACCCTGA TAAATGCTTC AATAATATTG 240
AAAAAGGAAG AGTATGAGTA TTCAACATTT CCGTGTGCGC CTTATTCCCT TTTTTCGGGC 300
ATTTTGCCTT CCTGTTTTTTG CTCACCCAGA AACGCTGGTG AAAGTAAAAG ATGCTGAAGA 360
TCAGTTGGGT GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC AACAGCGGTA AGATCCTTGA 420
GAGTTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTTAAAGTTC TGCTATGTGG 480
CGCGGTATTA TCCCGTATTG ACGCCGGGCA AGAGCAACTC GGTGCGCGCA TACACTATTG 540
TCAGAATGAC TTGGTTGAGT ACTCACCAGT CACAGAAAAG CATCTTACGG ATGGCATGAC 600
AGTAAGAGAA TTATGCAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT AACACTGCGG CCAACTTACT 660
TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT TTGCACAACA TGGGGGATCA 720
TGTAACTCGC CTTGATCGTT GGGAAACCGA GCTGAATGAA GCCATACCAA ACGACGAGCG 780
TGACACCACG ATGCCTGTAG CAATGGCAAC AACGTTGCGC AAACCTATTAA CTGGCGAACT 840
ACTTACTCTA GCTTCCCGGC AACAAATTAAT AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAGG 900
ACCACTTCTG CGCTCGGCC TTCCGGCTGG CTGGTTTATT GCTGATAAAT CTGGAGCCGG 960
TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC ACTGGGGCCA GATGGTAAGC CCTCCCGTAT 1020
CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC AACTATGGAT GAACGAAATA GACAGATCGC 1080
TGAGATAGGT GCCTCACTGA TTAAGCATTG GTAAGTGTCA GACCAAGTTT ACTCATATAT 1140
ACTTTAGATT GATTTAAAAAC TTCATTTTTTA ATTTAAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCTTTT 1200
TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTTCG TTCCACTGAG CGTCAGACCC 1260
CGTAGAAAAG ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTTT CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT 1320
GCAAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTTCGTTTG CCGGATCAAG AGCTACCAAC 1380
TCTTTTTCCG AAGGTAAGT GCTTCAGCAG AGCGCAGATA CCAAATACTG TCCTTCTAGT 1440
GTAGCCGTAG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT 1500
GCTAATCCTG TTACCAGTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGCTTA CCGGGTTGGA 1560
CTCAAGACGA TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC TGAACGGGGG GTTCGTGCAC 1620
ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC CGAACTGAGA TACCTACAGC GTGAGCATTG 1680
AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA GGCGGACAGG TATCCGGTAA GCGGCAGGGT 1740
CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGGAAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC 1800
TGTCGGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTTG TGATGCTCGT CAGGGGGGCG 1860
GAGCCTATGG AAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTTACGG TTCTGGCCT TTTGCTGGCC 1920
TTTTGCTCAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC CCCTGATTCT GTGGATAACC GTATTACCGC 1980
CTTTGAGTGA GCTGATACCG CTCGCCGAG CCGAACGACC GAGCGCAGCG AGTCAGTGAG 2040
CGAGGAAGCG GAAGAGCGCC CAATACGCAA ACCGCCTCTC CCCGCGGTT GGCCGATTCA 2100
TTAATGCAGA ATTGATCTCT CACCTACCAA ACAATGCCCC CCTGCAAAAA ATAAATTCAT 2160
ATAAAAAACA TACAGATAAC CATCTGCGGT GATAAATTAT CTCTGGCGGT GTTGACATAA 2220

10

20

30

40

ATACCACTGG CGGTGATACT GAGCACATCA GCAGGACGCA CTGACCACCA TGAAGGTGAC	2280	
GCTCTTAAAA ATTAAGCCCT GAAGAAGGGC AGCATTCAAA GCAGAAGGCT TTGGGGTGTG	2340	
TGATACGAAA CGAAGCATTG GCCGTAAGTG CGATTCCGGA TTAGCTGCCA ATGTGCCAAT	2400	
CGCGGGGGGT TTTCGTTTTCAG GACTACAACCT GCCACACACC ACCAAAAGCTA ACTGACAGGA	2460	
GAATCCAGAT GGATGCACAA ACACGCCGCC GCGAACGTCG CGCAGAGAAA CAGGCTCAAT	2520	
GGAAAGCAGC AAATCCCCTG TTGGTTGGGG TAAGCGCAAA ACCAGTCCG AAAGATTTTT	2580	
TTAACTATAA ACGCTGATGG AAGCGTTTAT GCGGAAGAGG TAAAGCCCTT CCCGAGTAAC	2640	
AAAAAAACAA CAGCATAAAT AACCCCGCTC TTACACATTC CAGCCCTGAA AAAGGGCATC	2700	10
AAATTAACC ACACCTATGG TGTATGCATT TATTGCATA CATTCAATCA ATTGTTATCT	2760	
AAGGAAATAC TTACATATGT CTCGTTGTTC TCGTAAACCA CTGCATGTAG ATTTTAAAGA	2820	
GCTCGGCTGG GACGACTGGA TCATCGCGCC GCTGGACTAC GAGGCGTACC ACTGCGAGGG	2880	
CCTTTGCGAC TTCCCTTTGC GTTCGCACCT CGAGCCCACC AACCATGCCA TCATTCAGAC	2940	
GCTGCTCAAC TCCATGGCAC CAGACGCGGC GCCGGCCTCC TGCTGTGTGC CAGCGCGCCT	3000	
CAGCCCCATC AGCATCCTCT ACATCGACGC CGCCAACAAC GTTGTCTACA AGCAATACGA	3060	
GGACATGGTG GTGGAGGCCT GCGGCTGCAG GTAGTCTAGA GTCGACCTGC AGTAATCGTA	3120	20
CAGGGTAGTA CAAATAAAAA AGGCACGTCA GATGACGTGC CTTTTTCTT GTGAGCAGTA	3180	
AGCTTGGCAC TGGCCGTCGT TTTACAACGT CGTGACTGGG AAAACCCTGG CGTTACCCAA	3240	
CTTAATCGCC TTGCAGCACA TCCCCCTTTC GCCAGCTGGC GTAATAGCGA AGAGGCCCGC	3300	
ACCGATCGCC CTTCCCAACA GTTGCAGCAGC CTGAATGGCG AATGGCGCCT GATGCGGTAT	3360	
TTTCTCCTTA CGCATCTGTG CCGTATTTC CACCGCATAT ATGGTGCACCT CTCAGTACAA	3420	
TCTGCTCTGA TGCCGCATAG TTAAGCCAGC CCCGACACCC GCCAACACCC GCTGACGCGC	3480	
CCTGACGGGC TTGTCTGCTC CCGGCATCCG CTTACAGACA AGCTGTGACC GTCTCCGGGA	3540	
GCTGCATGTG TCAGAGGTTT TCACCGTCAT CACCGAAACG CGCGA	3585	30

(2) 配列番号 : 1 0 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 2 7 2 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 1 本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : D N A (ゲノム)

(v i) 起源 :

(A) 生物名 : マウス

(v i i) 直接の起源 :

(B) クローン : m V 1

(i x) 特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : C D S

(B) 存在位置 : 2 8 . . . 2 4 3

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 1 0 :

GGATCCAAGG AGCTCGGCTG GGACGAC TGG ATC ATC GCG CCA TTA GAC TAC 51
 Trp Ile Ile Ala Pro Leu Asp Tyr
 1 5

GAG GCA TAC CAC TGC GAG GGC GTT TGC GAC TTT CCT CTG CGC TCG CAC 99
 Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly Val Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His
 10 15 20

CTG GAG CCT ACC AAC CAC GCC ATC ATT CAG ACG CTG CTC AAC TCC ATG 147
 Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Ile Ile Gln Thr Leu Leu Asn Ser Met
 25 30 35 40

GCG CCC GAC GCT GCG CCA GCC TCC TGC TGC GTG CCC GCA AGG CTC AGT 195
 Ala Pro Asp Ala Ala Pro Ala Ser Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser
 45 50 55

10

CCC ATC AGC ATT CTC TAC ATC GAT GCC GCC AAC AAC GTG GTC TAC AAG 243
 Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile Asp Ala Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys
 60 65 70

CAATACGAGG ACATGGTGGT GGGGAATTC 272

(2) 配列番号 : 1 1 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 7 2 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : 蛋白

20

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 1 1 :

Trp Ile Ile Ala Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly Val
 1 5 10 15

Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Ile
 20 25 30

Ile Gln Thr Leu Leu Asn Ser Met Ala Pro Asp Ala Ala Pro Ala Ser
 35 40 45

Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile Asp
 50 55 60

Ala Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys 30
 65 70

(2) 配列番号 : 1 2 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 2 7 2 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 1 本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : D N A (ゲノム)

(v i) 起源 :

(A) 生物名 : マウス

40

(v i i) 直接の起源 :

(B) クローン : m V 2

(i x) 特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : C D S

(B) 存在位置 : 2 8 . . . 2 4 3

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 1 2 :

GGATCCAAGG AGCTCGGCTG GGACGAC TGG ATT ATC GCG CCC CTA GAG TAC 51
 Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr
 1 5

GAG GCC TAT CAC TGC GAG GGC GTG TGC GAC TTT CCG CTG CGC TCG CAC 99
 Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly Val Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His
 10 15 20

CTT GAG CCC ACT AAC CAT GCC ATC ATT CAG ACG CTG ATG AAC TCC ATG 147
 Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Ile Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met
 25 30 35 40

GAC CCG GGC TCC ACC CCG CCT AGC TGC TGC GTT CCC ACC AAA CTG ACT 195
 Asp Pro Gly Ser Thr Pro Pro Ser Cys Val Pro Thr Lys Leu Thr
 45 50 55 10

CCC ATT AGC ATC CTG TAC ATC GAC GCG GGC AAT AAT GTA GTC TAC AAG 243
 Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile Asp Ala Gly Asn Asn Val Val Tyr Lys
 60 65 70

CAATACGAGG ACATGGTGGT GGGGAATTC 272

(2) 配列番号 : 1 3 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 7 2 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

20

(i i) 配列の種類 : 蛋白

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 1 3 :

Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly Val
 1 5 10 15

Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Ile
 20 25 30

Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Gly Ser Thr Pro Pro Ser
 35 40 45

Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Thr Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile Asp
 50 55 60 30

Ala Gly Asn Asn Val Val Tyr Lys
 65 70

30

(2) 配列番号 : 1 4 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 2 7 2 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 1 本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : D N A (ゲノム)

(v i) 起源 :

40

(A) 生物名 : マウス

(v i i) 直接の起源 :

(B) クローン : m V 9

(i x) 特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : C D S

(B) 存在位置 : 2 8 . . . 2 4 3

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 1 4 :

GGATCCAAGG AGCTCGGCTG GGACGAC TGG ATC ATC GCA CCT CTT GAG TAT	51	
Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr		
1 5		
GAG GCC TTC CAC TGC GAA GGA CTG TGT GAG TTC CCC TTG CGC TCC CAC	99	
Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His		
10 15 20		
TTG GAG CCC ACA AAC CAC GCA GTC ATT CAG ACC CTA ATG AAC TCT ATG	147	
Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met		
25 30 35 40		
GAC CCT GAA TCC ACA CCA CCC ACT TGT TGT GTG CCT ACA CGG CTG AGT	195	
Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser		10
45 50 55		
CCT ATT AGC ATC CTC TTC ATC GAC TCT GCC AAC AAC GTG GTG TAT AAA	243	
Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys		
60 65 70		
CAATACGAGG ACATGCTGGT GGGGAATTC	272	

(2) 配列番号 : 1 5 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 7 2 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : 蛋白

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 1 5 :

Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu		
1 5 10 15		
Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val		
20 25 30		
Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr		
35 40 45		
Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp		
50 55 60		30
Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys		
65 70		

(2) 配列番号 : 1 6 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 7 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : ペプチド

(v i) 起源 :

(A) 生物名 : B M P / T G F - ベータコンセンサス配列

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 1 6 :

Trp Xaa Asp Trp Ile Xaa Ala	
1 5	

(2) 配列番号 : 1 7 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 2 7 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 1 本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : D N A (ゲノム)

50

- (v i i) 直接の起源 :
- (B) クローン : オリゴヌクレオチド # 1
- (x i) 配列の記載 : 配列番号 : 1 7 :
CGGATCCTGG VANGAYTGGA THRTNGC 27
- (2) 配列番号 : 1 8 に関する情報 :
- (i) 配列の特徴 :
- (A) 配列の長さ : 6 アミノ酸
- (B) 配列の型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状 10
- (i i) 配列の種類 : ペプチド
- (v i i) 直接の起源 :
- (B) クローン : B M P / T G F - ベータコンセンサス配列
- (x i) 配列の記載 : 配列番号 : 1 8 :
His Ala Ile Xaa Gln Thr
 1 5
- (2) 配列番号 : 1 9 に関する情報 :
- (i) 配列の特徴 :
- (A) 配列の長さ : 2 8 塩基対
- (B) 配列の型 : 核酸 20
- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (i i) 配列の種類 : D N A (ゲノム)
- (v i i) 直接の起源 :
- (B) クローン : オリゴヌクレオチド # 2
- (x i) 配列の記載 : 配列番号 : 1 9 :
TTTCTAGAAR NGTYTGNACD ATNGCRTG 28
- (2) 配列番号 : 2 0 に関する情報 :
- (i) 配列の特徴 :
- (A) 配列の長さ : 4 0 塩基対 30
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (i i) 配列の種類 : D N A (ゲノム)
- (v i i) 直接の起源 :
- (B) クローン : オリゴヌクレオチド # 3
- (x i) 配列の記載 : 配列番号 : 2 0 :
CCACTGCGAG GGCCTTTGCG ACTTCCCTTT GCGTTCGCAC 40
- (2) 配列番号 : 2 1 に関する情報 :
- (i) 配列の特徴 :
- (A) 配列の長さ : 2 9 塩基対 40
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (i i) 配列の種類 : D N A (ゲノム)
- (v i i) 直接の起源 :
- (B) クローン : オリゴヌクレオチド # 4
- (x i) 配列の記載 : 配列番号 : 2 1 :
TGCGGATCCA GCCGCTGCAG CCGCAAGCC 29
- (2) 配列番号 : 2 2 に関する情報 :
- 50

- (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：29塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：1本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (i i) 配列の種類：DNA (ゲノム)
 (v i i) 直接の起源：
 (B) クローン：オリゴヌクレオチド # 5
 (x i) 配列の記載：配列番号：22：
GACTCTAGAC TACCTGCAGC CGCAGGCCT 29 10
- (2) 配列番号：23に関する情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：28塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：1本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (i i) 配列の種類：DNA (ゲノム)
 (v i i) 直接の起源：
 (B) クローン：オリゴヌクレオチド # 6
 (x i) 配列の記載：配列番号：23：
GCGGATCCAA GGAGCTCGGC TGGGACGA 28 20
- (2) 配列番号：24に関する情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：28塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：1本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (i i) 配列の種類：DNA (ゲノム)
 (v i i) 直接の起源：
 (B) クローン：オリゴヌクレオチド # 7 30
 (x i) 配列の記載：配列番号：24：
GGAATCCCC ACCACCATGT CCTCGTAT 28
- (2) 配列番号：25に関する情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：1171塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：1本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (i i) 配列の種類：DNA (ゲノム)
 (v i i) 直接の起源： 40
 (B) クローン：ヒト・V1-1蛋白
 (i x) 特徴：
 (A) 特徴を表す記号：CDS
 (B) 存在位置：2...964
 (i x) 特徴：
 (A) 特徴を表す記号：mat__peptide
 (B) 存在位置：605...964
 (x i) 配列の記載：配列番号：25：

G AAT TCG GAT CTC TCG CAC ACT CCT CTC CGG AGA CAG AAG TAT TTG Asn Ser Asp Leu Ser His Thr Pro Leu Arg Arg Gln Lys Tyr Leu -201-200 -195 -190	46	
TTT GAT GTG TCC ATG CTC TCA GAC AAA GAA GAG CTG GTG GGC GCG GAG Phe Asp Val Ser Met Leu Ser Asp Lys Glu Glu Leu Val Gly Ala Glu -185 -180 -175	94	
CTG CGC CTC TTT CGC CAG GCG CCC TCA GCG CCC TGG GGG CCA CCA GCC Leu Arg Leu Phe Arg Gln Ala Pro Ser Ala Pro Trp Gly Pro Pro Ala -170 -165 -160 -155	142	
GGG CCG CTC CAC GTG CAG CTC TTC CCA TGC CTT TCG CCC CTA CTG CTG Gly Pro Leu His Val Gln Leu Phe Pro Cys Leu Ser Pro Leu Leu Leu -150 -145 -140	190	10
GAC GCG CGG ACC CTG GAC CCG CAG GGG GCG CCG CCG GCC GGC TGG GAA Asp Ala Arg Thr Leu Asp Pro Gln Gly Ala Pro Pro Ala Gly Trp Glu -135 -130 -125	238	
GTC TTC GAC GTG TGG CAG GGC CTG CGC CAC CAG CCC TGG AAG CAG CTG Val Phe Asp Val Trp Gln Gly Leu Arg His Gln Pro Trp Lys Gln Leu -120 -115 -110	286	
TGC TTG GAG CTG CGG GCC GCA TGG GGC GAG CTG GAC GCC GGG GAG GCC Cys Leu Glu Leu Arg Ala Ala Trp Gly Glu Leu Asp Ala Gly Glu Ala -105 -100 -95	334	
GAG GCG CGC GCG CGG GGA CCC CAG CAA CCG CCG CCC CCG GAC CTG CGG Glu Ala Arg Ala Arg Gly Pro Gln Gln Pro Pro Pro Pro Asp Leu Arg -90 -85 -80 -75	382	20
AGT CTG GGC TTC GGC CGG AGG GTG CGG CCT CCC CAG GAG CGG GCU CTG Ser Leu Gly Phe Gly Arg Arg Val Arg Pro Pro Gln Glu Arg Ala Leu -70 -65 -60	430	
CTG GTG GTA TTC ACC AGA TCC CAG CGC AAG AAC CTG TTC GCA GAG ATG Leu Val Val Phe Thr Arg Ser Gln Arg Lys Asn Leu Phe Ala Glu Met -55 -50 -45	478	
CGC GAG CAG CTG GGC TCG GCC GAG GCT GCG GGC CCG GGC GCG GCC GCC Arg Glu Gln Leu Gly Ser Ala Glu Ala Ala Gly Pro Gly Ala Gly Ala -40 -35 -30	526	
GAG GGG TCG TGG CCG CCG CCG TCC GGC GCC CCG GAT GCC AGG CCT TGG Glu Gly Ser Trp Pro Pro Pro Ser Gly Ala Pro Asp Ala Arg Pro Trp -25 -20 -15	574	30
CTG CCC TCG CCC GGC CGC CGG CGG CGG CGC ACG GCC TTC GCC AGT CGC Leu Pro Ser Pro Gly Arg Arg Arg Arg Arg Thr Ala Phe Ala Ser Arg -10 -5 1 5	622	
CAT GGC AAG CCG CAC GGC AAG AAG TCC AGG CTA CGC TGC AGC AAG AAG His Gly Lys Arg His Gly Lys Lys Ser Arg Leu Arg Cys Ser Lys Lys 10 15 20	670	
CCC CTG CAC GTG AAC TTC AAG GAG CTG GGC TGC GAC GAC TGG ATT ATC Pro Leu His Val Asn Phe Lys Glu Leu Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile 25 30 35	718	

GCG CCC CTG GAG TAC GAG GCC TAT CAC TGC GAG GGT GTA TGC GAC TTC	766
Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly Val Cys Asp Phe	
40 45 50	
CCG CTG CGC TCG CAC CTG GAG CCC ACC AAC CAC GCC ATC ATC CAG ACG	814
Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Ile Ile Gln Thr	
55 60 65 70	
CTG ATG AAC TCC ATG GAC CCC GGC TCC ACC CCG CCC ACC TGC TCC GTG	862
Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Gly Ser Thr Pro Pro Ser Cys Cys Val	
75 80 85	
CCC ACC AAA TTG ACT CCC ATC AGC ATT CTA TAC ATC GAC GCG GGC AAT	910
Pro Thr Lys Leu Thr Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile Asp Ala Gly Asn	
90 95 100	
AAT GTG GTC TAC AAG CAG TAC GAG GAC ATG GTG GTG GAG TCG TGC GGC	958
Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ser Cys Gly	
105 110 115	
TGC AGG TAGCGGTGCC TTTCCCGCCG CCTTGGCCCC GAACCAAGGT GGGCCAAGGT	1014
Cys Arg	
120	
CCGCCTTGCA GGGGAGGCCT GGCTGCAGAG AGGCGGAGGA GGAAGCTGGC GCTGGGGGAG	1074
GCTGAGGGTG AGGGAACAGC CTGGATGTGA GAGCCGGTGG GAGAGAAGGG AGCGCACCTT	1134
CCCAGTAACT TCTACCTGCC AGCCCAGAGG GAAATAT	1171

10

20

- (2) 配列番号 : 2 6 に関する情報 :
- (i) 配列の特徴 :
- (A) 配列の長さ : 3 2 1 アミノ酸
- (B) 配列の型 : アミノ酸
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (i i) 配列の種類 : 蛋白
- (x i) 配列の記載 : 配列番号 : 2 6 :

Asn Ser Asp Leu Ser His Thr Pro Leu Arg Arg Gln Lys Tyr Leu Phe
 -201 -200 -195 -190
 Asp Val Ser Met Leu Ser Asp Lys Glu Glu Leu Val Gly Ala Glu Leu
 -185 -180 -175 -170
 Arg Leu Phe Arg Gln Ala Pro Ser Ala Pro Trp Gly Pro Pro Ala Gly
 -165 -160 -155
 Pro Leu His Val Gln Leu Phe Pro Cys Leu Ser Pro Leu Leu Leu Asp
 -150 -145 -140
 Ala Arg Thr Leu Asp Pro Gln Gly Ala Pro Pro Ala Gly Trp Glu Val
 -135 -130 -125
 Phe Asp Val Trp Gln Gly Leu Arg His Gln Pro Trp Lys Gln Leu Cys
 -120 -115 -110
 Leu Glu Leu Arg Ala Ala Trp Gly Glu Leu Asp Ala Gly Glu Ala Glu
 -105 -100 -95 -90
 Ala Arg Ala Arg Gly Pro Gln Gln Pro Pro Pro Asp Leu Arg Ser
 -85 -80 -75
 Leu Gly Phe Gly Arg Arg Val Arg Pro Pro Gln Glu Arg Ala Leu Leu
 -70 -65 -60
 Val Val Phe Thr Arg Ser Gln Arg Lys Asn Leu Phe Ala Glu Met Arg
 -55 -50 -45
 Glu Gln Leu Gly Ser Ala Glu Ala Ala Gly Pro Gly Ala Gly Ala Glu
 -40 -35 -30
 Gly Ser Trp Pro Pro Pro Ser Gly Ala Pro Asp Ala Arg Pro Trp Leu
 -25 -20 -15 -10
 Pro Ser Pro Gly Arg Arg Arg Arg Arg Thr Ala Phe Ala Ser Arg His
 -5 1 5
 Gly Lys Arg His Gly Lys Lys Ser Arg Leu Arg Cys Ser Lys Lys Pro
 10 15 20
 Leu His Val Asn Phe Lys Glu Leu Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala
 25 30 35
 Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly Val Cys Asp Phe Pro
 40 45 50 55
 Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Ile Ile Gln Thr Leu
 60 65 70
 Met Asn Ser Met Asp Pro Gly Ser Thr Pro Pro Ser Cys Cys Val Pro
 75 80 85
 Thr Lys Leu Thr Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile Asp Ala Gly Asn Asn
 90 95 100
 Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ser Cys Gly Cys
 105 110 115
 Arg
 120

(2) 配列番号：27に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1233塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (ゲノム)

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：BMP2プロペプチド/BMP-12成熟ペプチドをコードするDNA 50

(i x) 特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : C D S

(B) 存在位置 : 1 . . . 1 2 3 3

(i x) 特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : m a t _ p e p t i d e

(B) 存在位置 : 8 4 7 . . . 1 2 3 3

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 2 7 :

ATG GTG GCC GGG ACC CGC TGT CTT CTA GCG TTG CTG CTT CCC CAG GTC	48	
Met Val Ala Gly Thr Arg Cys Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Gln Val		
-282 -280 -275 -270		
CTC CTG GGC GGC GCG GCT GGC CTC GTT CCG GAG CTG GGC CGC AGG AAG	96	10
Leu Leu Gly Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro Glu Leu Gly Arg Arg Lys		
-265 -260 -255		
TTC GCG GCG GCG TCG TCG GGC CGC CCC TCA TCC CAG CCC TCT GAC GAG	144	
Phe Ala Ala Ala Ser Ser Gly Arg Pro Ser Ser Gln Pro Ser Asp Glu		
-250 -245 -240 -235		
GTC CTG AGC GAG TTC GAG TTG CGG CTG CTC AGC ATG TTC GGC CTG AAA	192	
Val Leu Ser Glu Phe Glu Leu Arg Leu Leu Ser Met Phe Gly Leu Lys		
-230 -225 -220		
CAG AGA CCC ACC CCC AGC AGG GAC GCC GTG GTG CCC CCC TAC ATG CTA	240	
Gln Arg Pro Thr Pro Ser Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Tyr Met Leu		20
-215 -210 -205		
GAC CTG TAT CGC AGG CAC TCA GGT CAG CCG GGC TCA CCC GCC CCA GAC	288	
Asp Leu Tyr Arg Arg His Ser Gly Gln Pro Gly Ser Pro Ala Pro Asp		
-200 -195 -190		
CAC CGG TTG GAG AGG GCA GCC AGC CGA GCC AAC ACT GTG CGC AGC TTC	336	
His Arg Leu Glu Arg Ala Ala Ser Arg Ala Asn Thr Val Arg Ser Phe		
-185 -180 -175		
CAC CAT GAA GAA TCT TTG GAA GAA CTA CCA GAA ACG AGT GGG AAA ACA	384	
His His Glu Glu Ser Leu Glu Glu Leu Pro Glu Thr Ser Gly Lys Thr		
-170 -165 -160 -155		
ACC CGG AGA TTC TTC TTT AAT TTA AGT TCT ATC CCC ACG GAG GAG TTT	432	30
Thr Arg Arg Phe Phe Phe Asn Leu Ser Ser Ile Pro Thr Glu Glu Phe		
-150 -145 -140		
ATC ACC TCA GCA GAG CTT CAG GTT TTC CGA GAA CAG ATG CAA GAT GCT	480	
Ile Thr Ser Ala Glu Leu Gln Val Phe Arg Glu Gln Met Gln Asp Ala		
-135 -130 -125		
TTA GGA AAC AAT AGC AGT TTC CAT CAC CGA ATT AAT ATT TAT GAA ATC	528	
Leu Gly Asn Asn Ser Ser Phe His His Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Ile		
-120 -115 -110		
ATA AAA CCT GCA ACA GCC AAC TCG AAA TTC CCC GTG ACC AGA CTT TTG	576	
Ile Lys Pro Ala Thr Ala Asn Ser Lys Phe Pro Val Thr Arg Leu Leu		
-105 -100 -95		
GAC ACC AGG TTG GTG AAT CAG AAT GCA AGC AGG TGG GAA AGT TTT GAT	624	40
Asp Thr Arg Leu Val Asn Gln Asn Ala Ser Arg Trp Glu Ser Phe Asp		
-90 -85 -80 -75		
GTC ACC CCC GCT GTG ATG CGG TGG ACT GCA CAG GGA CAC GCC AAC CAT	672	
Val Thr Pro Ala Val Met Arg Trp Thr Ala Gln Gly His Ala Asn His		
-70 -65 -60		
GGA TTC GTG GTG GAA GTG GCC CAC TTG GAG GAG AAA CAA GGT GTC TCC	720	
Gly Phe Val Val Glu Val Ala His Leu Glu Glu Lys Gln Gly Val Ser		
-55 -50 -45		
AAG AGA CAT GTT AGG ATA AGC AGG TCT TTG CAC CAA GAT GAA CAC AGC	768	
Lys Arg His Val Arg Ile Ser Arg Ser Leu His Gln Asp Glu His Ser		
-40 -35 -30		

TGG TCA CAG ATA AGG CCA TTG CTA GTA ACT TTT GGC CAT GAT GGA AAA 816
 Trp Ser Gln Ile Arg Pro Leu Leu Val Thr Phe Gly His Asp Gly Lys
 -25 -20 -15

GCG CAT CCT CTC CAC AAA AGA GAA AAA CGT ACG GCG TTG GCC GGG ACG 864
 Gly His Pro Leu His Lys Arg Glu Lys Arg Thr Ala Leu Ala Gly Thr
 -10 -5 1 5

CGG ACA GCG CAG GGC AGC GGC GGG GGC GCG GGC CGG GGC CAC GGG CGC 912
 Arg Thr Ala Gln Gly Ser Gly Gly Gly Ala Gly Arg Gly His Gly Arg
 10 15 20

AGG GGC CGG AGC CGC TGC AGC CGC AAG CCG TTG CAC GTG GAC TTC AAG 960
 Arg Gly Arg Ser Arg Cys Ser Arg Lys Pro Leu His Val Asp Phe Lys
 25 30 35

GAG CTC GGC TGG GAC GAC TGG ATC ATC GCG CCG CTG GAC TAC GAG GCG 1008
 Glu Leu Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Asp Tyr Glu Ala
 40 45 50

TAC CAC TGC GAG GGC CTT TGC GAC TTC CCT TTG CGT TCG CAC CTC GAG 1056
 Tyr His Cys Glu Gly Leu Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu
 55 60 65 70

CCC ACC AAC CAT GCC ATC ATT CAG ACG CTG CTC AAC TCC ATG GCA CCA 1104
 Pro Thr Asn His Ala Ile Ile Gln Thr Leu Leu Asn Ser Met Ala Pro
 75 80 85

GAC GCG GCG CCG GCC TCC TGC TGT GTG CCA GCG CGC CTC AGC CCC ATC 1152
 Asp Ala Ala Pro Ala Ser Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile
 90 95 100

AGC ATC CTC TAC ATC GAC GCC GCC AAC AAC GTT GTC TAC AAG CAA TAC 1200
 Ser Ile Leu Tyr Ile Asp Ala Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr
 105 110 115

GAG GAC ATG GTG GTG GAG GCC TGC GGC TGC AGG 1233
 Glu Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly Cys Arg
 120 125

(2) 配列番号 : 2 8 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 4 1 1 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : 蛋白

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 2 8 :

Met Val Ala Gly Thr Arg Cys Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Gln Val
 -282 -280 -275 -270

Leu Leu Gly Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro Glu Leu Gly Arg Arg Lys
 -265 -260 -255

Phe Ala Ala Ala Ser Ser Gly Arg Pro Ser Ser Gln Pro Ser Asp Glu
 -250 -245 -240 -235

Val Leu Ser Glu Phe Glu Leu Arg Leu Leu Ser Met Phe Gly Leu Lys
 -230 -225 -220

Gln Arg Pro Thr Pro Ser Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Tyr Met Leu
 -215 -210 -205

10

20

30

40

(B) クローン : ネズミ ・ M V 1

(i x) 特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : C D S

(B) 存在位置 : 2 . . . 7 2 1

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 2 9 :

A	AAG	TTC	TGC	CTG	GTG	CTG	GNG	NCG	GTG	ACG	GCC	TCG	GAG	AGC	AGN	46
	Lys	Phe	Cys	Leu	Val	Leu	X01	X02	Val	Thr	Ala	Ser	Glu	Ser	X03	
	1				5				10						15	
CNG	CTG	GCC	CTG	AGA	CGA	CTG	GGC	TTC	GGC	TGN	CCG	GGC	GGT	GGC	GAC	94
X04	Leu	Ala	Leu	Arg	Arg	Leu	Gly	Phe	Gly	X05	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	
			20					25						30		10
GGC	GGC	GGC	ACT	GCG	GNC	GAG	GAG	CGC	GCG	CTG	TTG	GTG	ATC	TCC	TCC	142
Gly	Gly	Gly	Thr	Ala	X06	Glu	Glu	Arg	Ala	Leu	Leu	Val	Ile	Ser	Ser	
			35					40					45			
CGT	ACG	CAA	AGG	AAA	GAG	AGT	CTG	TTC	CGG	GAG	ATC	CGA	GCC	CAG	GCC	190
Arg	Thr	Gln	Arg	Lys	Glu	Ser	Leu	Phe	Arg	Glu	Ile	Arg	Ala	Gln	Ala	
		50					55					60				
CGT	GCT	CTC	CGG	GCC	GCT	GCA	GAG	CCG	CCA	CCG	GAT	CCA	GGA	CCA	GGC	238
Arg	Ala	Leu	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Pro	Pro	Pro	Asp	Pro	Gly	Pro	Gly	
	65				70						75					
GCT	GGG	TCA	CGC	AAA	GCC	AAC	CTG	GGC	GGT	CGC	AGG	CGG	CAG	CGG	ACT	286
Ala	Gly	Ser	Arg	Lys	Ala	Asn	Leu	Gly	Gly	Arg	Arg	Arg	Gln	Arg	Thr	20
80					85					90					95	
GCG	CTG	GCT	GGG	ACT	CGG	GGA	GNG	NAG	GGA	AGC	GGT	GGT	GGC	GGC	GGT	334
Ala	Leu	Ala	Gly	Thr	Arg	Gly	X07	X08	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	
				100					105						110	
GGC	GGT	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GCA	382
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	
			115				120						125			
GGC	AGG	GGC	CAC	GGG	CGC	AGA	GGC	CGG	AGC	CGC	TGC	GGT	CGC	AAG	TCA	430
Gly	Arg	Gly	His	Gly	Arg	Arg	Gly	Arg	Ser	Arg	Cys	Gly	Arg	Lys	Ser	
		130					135					140				

CTG CAC GTG GAC TTT AAG GAG CTG GGC TGG GAC GAC TGG ATC ATC GCG Leu His Val Asp Phe Lys Glu Leu Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala 145 150 155	478	
CCA TTA GAC TAC GAG GCA TAC CAC TGC GAG GGC GTT TGC GAC TTT CCT Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly Val Cys Asp Phe Pro 160 165 170 175	526	
CTG CGC TCG CAC CTG GAG CCT ACC AAC CAC GCC ATC ATT CAG ACG CTG Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Ile Ile Gln Thr Leu 180 185 190	574	
CTC AAC TCC ATG GCG CCC GAC GCT GCG CCA GCC TCC TGC TGC GTG CCC Leu Asn Ser Met Ala Pro Asp Ala Ala Pro Ala Ser Cys Cys Val Pro 195 200 205	622	10
GCA AGG CTC AGT CCC ATC AGC ATT CTC TAC ATC GAT GCC GCC AAC AAC Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile Asp Ala Ala Asn Asn 210 215 220	670	
GTG GTC TAC AAG CAG TAC GAA GAC ATG GTG GTG GAG GCC TGC GGC TGC Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly Cys 225 230 235	718	
AGG TAGCATGCGG TCTGGGGAGG GTCTGGCCGC CCAGGACCCT AGCTCAAGAG Arg 240	771	
CAGGTGTCAT CAGGCCCGAG GGACGGCGGA CTATGGCCTC TGCCAGCACA GAGGAGAGCA	831	20
CACAGTTAAC ACTCACATT ACACACTCCT TCACTCACGC ACATGTTTAC CGTGGACGGC	891	
AGGCGCTAAA AGCCTTGCTT ATTTGCTACC ATTGATACAA ACCTCTGTCC TTTTCGGGAG	951	
AGGGAAGGGC ATCTGTGTTT ATGTTGCAGT AATTGGCACT AAATCCAAGT AGAAATGGGT	1011	
TAGCATTGGA TTCTCCTTTT AGTTGGAGGC GGTGTGGCTG GATTCCTGAC GTTGGATATG	1071	
GAGTGCCTG CAGGGCTGGG ATACCCAGAT TCTCTGGAGT GGGCATTGGG AACCTTCAA	1131	
AGTAAGGAGC CACTGGGGCT TGGGAGGGAG CACCCGGTTC CTAACAAGT CTGATGTGTA CTGCTCAGTT TG	1191 1203	

(2) 配列番号 : 3 0 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 2 4 0 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : 蛋白

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 3 0 :

30

Lys Phe Cys Leu Val Leu X01 X02 Val Thr Ala Ser Glu Ser X03 X04
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Arg Arg Leu Gly Phe Gly X05 Pro Gly Gly Gly Asp Gly
 20 25 30
 Gly Gly Thr Ala X06 Glu Glu Arg Ala Leu Leu Val Ile Ser Ser Arg
 35 40 45
 Thr Gln Arg Lys Glu Ser Leu Phe Arg Glu Ile Arg Ala Gln Ala Arg
 50 55 60
 Ala Leu Arg Ala Ala Ala Glu Pro Pro Pro Asp Pro Gly Pro Gly Ala
 65 70 75 80
 Gly Ser Arg Lys Ala Asn Leu Gly Gly Arg Arg Arg Gln Arg Thr Ala
 85 90 95
 Leu Ala Gly Thr Arg Gly X07 X08 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly
 115 120 125
 Arg Gly His Gly Arg Arg Gly Arg Ser Arg Cys Gly Arg Lys Ser Leu
 130 135 140
 His Val Asp Phe Lys Glu Leu Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro
 145 150 155 160
 Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly Val Cys Asp Phe Pro Leu
 165 170 175
 Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Ile Ile Gln Thr Leu Leu
 180 185 190
 Asn Ser Met Ala Pro Asp Ala Ala Pro Ala Ser Cys Cys Val Pro Ala
 195 200 205
 Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile Asp Ala Ala Asn Asn Val
 210 215 220
 Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly Cys Arg
 225 230 235 240

10

20

30

(2) 配列番号 : 3 1 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 1 0 4 6 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 1 本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : D N A (ゲノム)

(i i i) ハイポセティカル : なし

(i v) アンチセンス : なし

(v i i) 直接の起源 :

(B) クローン : ネズミ・M V 2

(i x) 特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : C D S

(B) 存在位置 : 2 . . . 7 9 0

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 3 1 :

40

A AGA AAA CAA GCT TGC ATT CCT GCA GGT CCG ACT CTA AGA GGA TCC Arg Lys Gln Ala Cys Ile Pro Ala Gly Pro Thr Leu Arg Gly Ser 1 5 10 15	46	
TCA GGG ACC CAA CCC AGG CCG GCT GGG AAG TCT TTC GAC GTG TGG CAG Ser Gly Thr Gln Pro Arg Pro Ala Gly Lys Ser Phe Asp Val Trp Gln 20 25 30	94	
GGC CTG CGC CCT CAG CCT TGG AAG CAG CTG TGC CTG GAG TTG CCG GCA Gly Leu Arg Pro Gln Pro Trp Lys Gln Leu Cys Leu Glu Leu Arg Ala 35 40 45	142	
GCC TGG GGT GAG CTG GAC RCC GGG GAT ACG GGG GCG CGC GCG AGG GGT Ala Trp Gly Glu Leu Asp X01 Gly Asp Thr Gly Ala Arg Ala Arg Gly 50 55 60	190	10
CCC CAG CAG CCA CCG CCT CTG GAC CTG CCG AGT CTG GGC TTC GGT CCG Pro Gln Gln Pro Pro Pro Leu Asp Leu Arg Ser Leu Gly Phe Gly Arg 65 70 75	238	
AGG GTG AGA CCG CCC CAG GAG CGC GCC CTG CTT GTA GTG TTC ACC AGA Arg Val Arg Pro Pro Gln Glu Arg Ala Leu Val Val Phe Thr Arg 80 85 90 95	286	
TCG CAG CGC AAG AAC CTG TTC ACT GAG ATG CAT GAG CAG CTG GGC TCT Ser Gln Arg Lys Asn Leu Phe Thr Glu Met His Glu Gln Leu Gly Ser 100 105 110	334	
GCA GAG GCT GCG GGA GCC GAG GGG TCA TGT CCA GCG CCG TCG GGC TCC Ala Glu Ala Ala Gly Ala Glu Gly Ser Cys Pro Ala Pro Ser Gly Ser 115 120 125	382	20
CCA GAC ACC GGG TCT TGG CTG CCC TCG CCC GGC CGC CGG CGG CGA CGC Pro Asp Thr Gly Ser Trp Leu Pro Ser Pro Gly Arg Arg Arg Arg Arg 130 135 140	430	
ACC GCC TTC GCC AGC CGT CAC GGC AAG CGA CAT GGC AAG AAG TCC AGG Thr Ala Phe Ala Ser Arg His Gly Lys Arg His Gly Lys Lys Ser Arg 145 150 155	478	
CTG CGC TGC AGC AGA AAG CCT CTG CAC GTG AAT TTT AAG GAG TTA GGC Leu Arg Cys Ser Arg Lys Pro Leu His Val Asn Phe Lys Glu Leu Gly 160 165 170 175	526	
TGG GAC GAC TGG ATT ATC GCG CCC CTA GAG TAC GAG GCC TAT CAC TGC Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Tyr His Cys 180 185 190	574	30
GAG GGC GTG TGC GAC TTT CCG CTG CGC TCG CAC CTT GAG CCC ACT AAC Glu Gly Val Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn 195 200 205	622	
CAT GCC ATC ATT CAG ACG CTG ATG AAC TCC ATG GAC CCG GGC TCC ACC His Ala Ile Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Gly Ser Thr 210 215 220	670	
CCG CCT AGC TGC TGC GTT CCC ACC AAA CTG ACT CCC ATT AGC ATC CTG Pro Pro Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Thr Pro Ile Ser Ile Leu 225 230 235	718	40
TAC ATC GAC GCG GGC AAT AAT GTN GTC TAC AAG CAG TAT GAG GAC ATG Tyr Ile Asp Ala Gly Asn Asn X02 Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met 240 245 250 255	766	
GTG GTG GAG TCC TGC GGC TGT AGG TAGCGGTGCT GTCCCGCCAC CTGGGCCAGG Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg 260	820	

GACCATGGAG GGAGGCCTGA CTGCCGAGAA AGGAGCAGGA GCTGGCCTTG GAAGAGGCCA 880
 CAGGTGGGGG ACAGCCTGAA AGTAGGAGCA CAGTAAGAAG CAGCCCAGCC TTCCCAGAAC 940
 CTTCCAATCC CCCAACCCAG AAGCAGCTAA GGGGTTTCAC AACTTTTGGC CTTGCCAGCC 1000
 TGGAAAGACT AGACAAGAGG GATTCTTCTC TTTTATTAT GGCTTG 1046

(2) 配列番号 : 3 2 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 2 6 3 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

10

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : 蛋白

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 3 2 :

Arg Lys Gln Ala Cys Ile Pro Ala Gly Pro Thr Leu Arg Gly Ser Ser
 1 5 10 15
 Gly Thr Gln Pro Arg Pro Ala Gly Lys Ser Phe Asp Val Trp Gln Gly
 20 25 30
 Leu Arg Pro Gln Pro Trp Lys Gln Leu Cys Leu Glu Leu Arg Ala Ala
 35 40 45
 Trp Gly Glu Leu Asp X01 Gly Asp Thr Gly Ala Arg Ala Arg Gly Pro
 50 55 60
 Gln Gln Pro Pro Pro Leu Asp Leu Arg Ser Leu Gly Phe Gly Arg Arg
 65 70 75 80
 Val Arg Pro Pro Gln Glu Arg Ala Leu Leu Val Val Phe Thr Arg Ser
 85 90 95
 Gln Arg Lys Asn Leu Phe Thr Glu Met His Glu Gln Leu Gly Ser Ala
 100 105 110
 Glu Ala Ala Gly Ala Glu Gly Ser Cys Pro Ala Pro Ser Gly Ser Pro
 115 120 125
 Asp Thr Gly Ser Trp Leu Pro Ser Pro Gly Arg Arg Arg Arg Thr
 130 135 140
 Ala Phe Ala Ser Arg His Gly Lys Arg His Gly Lys Lys Ser Arg Leu
 145 150 155 160
 Arg Cys Ser Arg Lys Pro Leu His Val Asn Phe Lys Glu Leu Gly Trp
 165 170 175
 Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu
 180 185 190
 Gly Val Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His
 195 200 205
 Ala Ile Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Gly Ser Thr Pro
 210 215 220
 Pro Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Thr Pro Ile Ser Ile Leu Tyr
 225 230 235 240
 Ile Asp Ala Gly Asn Asn X02 Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val
 245 250 255
 Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg
 260

20

30

40

(2) 配列番号 : 3 3 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 1 3 4 5 塩基対

50

- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (i i) 配列の種類 : D N A (ゲノム)
- (i i i) ハイボセティカル : なし
- (i v) アンチセンス : なし
- (v i i) 直接の起源 :
- (B) クローン : ヒト・V L - 1

(i x) 特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : C D S

10

(B) 存在位置 : 1 3 8 . . . 1 3 0 1

(i x) 特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : m a t _ p e p t i d e

(B) 存在位置 : 9 9 0 ~ 1 3 0 1

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 3 3 :

A A C T A T A G C A	C C T G C A G T C C	C T G G T C T T G G	G T G T A G G G G T	G C G C T C C T G G	T C C C G C G G C T	60										
C A G G G A T A T G	C A G T G A C C A A	T G G G T T G T T G	G C C T G A T G G G	A C T T T T G G C T	T G C T A A A C C A	120										
A A G C T C G G T T	C G G A T A G	C C C	G G G	C G A	A G A	C G T	C C G	C T G	C T C	T G G	G C C	A G G	170			
		Pro	Gly	Arg	Arg	Arg	Pro	Leu	Leu	Trp	Ala	Arg				
		-284				-280						-275	20			
C T G	G C A	G C G	T T C	A G G	C T G	G G G	C A G	A G A	C G C	G G A	G T C	G G G	C G C	T G G	C T C	218
Leu	Ala	Ala	Phe	Arg	Leu	Gly	Gln	Arg	Arg	Gly	Val	Gly	Arg	Trp	Leu	
			-270				-265						-260			

CAA CAG GCC TGG CTC CCA CAT CGA AGA CAG CTG GGC CAT TTG CTG TTA Gln Gln Ala Trp Leu Pro His Arg Arg Gln Leu Gly His Leu Leu Leu -255 -250 -245	266	
GGA GGC CCC GCG CTG ACA GTG TGC AGG ATT TGC TCT TAC ACA GCT CTT Gly Gly Pro Ala Leu Thr Val Cys Arg Ile Cys Ser Tyr Thr Ala Leu -240 -235 -230	314	
TCT CTC TGT CCC TGC CGG TCC CCC GCA GAC GAA TCG GCA GCC GAA ACA Ser Leu Cys Pro Cys Arg Ser Pro Ala Asp Glu Ser Ala Ala Glu Thr -225 -220 -215 -210	362	
GGC CAG AGC TTC CTG TTC GAC GTG TCC AGC CTT AAC GAC GCA GAC GAG Gly Gln Ser Phe Leu Phe Asp Val Ser Ser Leu Asn Asp Ala Asp Glu -205 -200 -195	410	10
GTG GTG GGT GCC GAG CTG CGC GTG CTG CGC CGG GGA TCT CCA GAG TCG Val Val Gly Ala Glu Leu Arg Val Leu Arg Arg Gly Ser Pro Glu Ser -190 -185 -180	458	
GGC CCA GGC AGC TGG ACT TCT CCG CCG TTG CTG CTG CTG TCC ACG TGC Gly Pro Gly Ser Trp Thr Ser Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ser Thr Cys -175 -170 -165	506	
CCG GGC GCC GCC CGA GCG CCA CGC CTG CTG TAC TCG CGG GCA GCT GAG Pro Gly Ala Ala Arg Ala Pro Arg Leu Leu Tyr Ser Arg Ala Ala Glu -160 -155 -150	554	
CCC CTA GTC GGT CAG CGC TGG GAG GCG TTC GAC GTG GCG GAC GCC ATG Pro Leu Val Gly Gln Arg Trp Glu Ala Phe Asp Val Ala Asp Ala Met -145 -140 -135 -130	602	20
AGG CGC CAC CGT CGT GAA CCG CGC CCC CCC CGC GCG TTC TGC CTC TTG Arg Arg His Arg Arg Glu Pro Arg Pro Pro Arg Ala Phe Cys Leu Leu -125 -120 -115	650	
CTG CGC GCA GTG GCA GGC CCG GTG CCG AGC CCG TTG GCA CTG CGG CGA Leu Arg Ala Val Ala Gly Pro Val Pro Ser Pro Leu Ala Leu Arg Arg -110 -105 -100	698	
CTG GGC TTC GGC TGG CCG GGC GGA GGG GGC TCT GCG GCA GAG GAG CGC Leu Gly Phe Gly Trp Pro Gly Gly Gly Ser Ala Ala Glu Glu Arg -95 -90 -85	746	
GCG GTG CTA GTC GTC TCC TCC CGC ACG CAG AGG AAA GAG AGC TTA TTC Ala Val Leu Val Val Ser Ser Arg Thr Gln Arg Lys Glu Ser Leu Phe -80 -75 -70	794	30
CGG GAG ATC CGC GCC CAG GCC CGC GCG CTC GGG GCC GCT CTG GCC TCA Arg Glu Ile Arg Ala Gln Ala Arg Ala Leu Gly Ala Ala Leu Ala Ser -65 -60 -55 -50	842	
GAG CCG CTG CCC GAC CCA GGA ACC GGC ACC GCG TCG CCA AGG GCA GTC Glu Pro Leu Pro Asp Pro Gly Thr Gly Thr Ala Ser Pro Arg Ala Val -45 -40 -35	890	
ATT GGC GGC CGC AGA CGG AGG AGG ACG GCG TTG GCC GGG ACG CGG ACA Ile Gly Gly Arg Arg Arg Arg Thr Ala Leu Ala Gly Thr Arg Thr -30 -25 -20	938	
GCG CAG GGC AGC GGC GGG GGC GCG GGC CGG GGC CAC GGG CGC AGG GGC Ala Gln Gly Ser Gly Gly Gly Ala Gly Arg Gly His Gly Arg Arg Gly -15 -10 -5	986	40
CGG AGC CGC TGC AGC CGC AAG CCG TTG CAC GTG GAC TTC AAG GAG CTC Arg Ser Arg Cys Ser Arg Lys Pro Leu His Val Asp Phe Lys Glu Leu 1 5 10 15	1034	

Ala Pro Arg Leu Leu Tyr Ser Arg Ala Ala Glu Pro Leu Val Gly Gln
 -155 -150 -145

Arg Trp Glu Ala Phe Asp Val Ala Asp Ala Met Arg Arg His Arg Arg
 -140 -135 -130 -125

Glu Pro Arg Pro Pro Arg Ala Phe Cys Leu Leu Leu Arg Ala Val Ala
 -120 -115 -110

Gly Pro Val Pro Ser Pro Leu Ala Leu Arg Arg Leu Gly Phe Gly Trp
 -105 -100 -95

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Glu Glu Arg Ala Val Leu Val Val
 -90 -85 -80 10

Ser Ser Arg Thr Gln Arg Lys Glu Ser Leu Phe Arg Glu Ile Arg Ala
 -75 -70 -65

Gln Ala Arg Ala Leu Gly Ala Ala Leu Ala Ser Glu Pro Leu Pro Asp
 -60 -55 -50 -45

Pro Gly Thr Gly Thr Ala Ser Pro Arg Ala Val Ile Gly Gly Arg Arg
 -40 -35 -30

Arg Arg Arg Thr Ala Leu Ala Gly Thr Arg Thr Ala Gln Gly Ser Gly
 -25 -20 -15

Gly Gly Ala Gly Arg Gly His Gly Arg Arg Gly Arg Ser Arg Cys Ser
 -10 -5 1 20

Arg Lys Pro Leu His Val Asp Phe Lys Glu Leu Gly Trp Asp Asp Trp
 5 10 15 20

Ile Ile Ala Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly Leu Cys
 25 30 35

Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Ile Ile
 40 45 50

Gln Thr Leu Leu Asn Ser Met Ala Pro Asp Ala Ala Pro Ala Ser Cys
 55 60 65

Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile Asp Ala
 70 75 80 30

Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ala
 85 90 95 100

Cys Gly Cys Arg

(2) 配列番号 : 3 5 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 1 7 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 1 本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : DNA (ゲノム) 40

(i i i) ハイポセティカル : なし

(i v) アンチセンス : なし

(v i i) 直接の起源 :

(C) 個々の単離 : プライマー番号 8

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 3 5 :

TGTATGCGAC TTCCCGC

【 図 1 】

FIG 1

ヒト・MP-52に対するヒト・V1-1の比較

```

V1-1 Ser Arg Cys Ser Arg Lys Pro Leu His Val Asp Phe Lys Glu Leu
1 AGC CGC TGC AGC CGC AAG CCG TTG CAC GTG GAC TTC AAG GAG CTC
MP52 GCT CGC TGC AGT CGG AAG GCA CTG CAT GTC AAC TTC AAG GAC ATG
1 Ala Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met
16 Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr
46 GGC TGG GAC GAC TGG ATC ATC GCG CCG CTG GAC TAC GAG GCG TAC
46 GGC TGG GAC GAC TGG ATC ATC GCA CCC CTT GAG TAC GAG GCT TTC
16 Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe
31 His Cys Glu Gly Leu Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu
91 CAC TGC GAG GGC CTT TGC GAC TTC CCT TTG CGT TCG CAC CTC GAG
91 CAC TGC GAG GGC CTG TGC GAG TTC CCA TTG CGC TCC CAC CTG GAG
31 His Cys Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu
46 Pro Thr Asn His Ala Ile Ile Gln Thr Leu Leu Asn Ser Met Ala
121 CCC ACC AAC CAT GCC ATC ATT CAG ACG CTG CTC AAC TCC ATG GCA
121 CCC ACG AAT CAT GCA GTC ATC CAG ACC CTG ATG AAC TCC ATG GAC
46 Pro Thr Asn His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp
61 Pro Asp Ala Ala Pro Ala Ser Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser
181 CCA GAC GCG GCG CCG GCC TCC TGC TGT GTG CCA GCG CGC CTC AGC
181 CCC GAG TCC ACA CCA CCC ACC TGC TGT GTG CCC ACC CGG CTG AGT
61 Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser
76 Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile Asp Ala Ala Asn Asn Val Val Tyr
226 CCC ATC AGC ATC CTC TAC ATC GAC GCC GCC AAC AAC GTT GTG TAC
226 CCC ATC AGC ATC CTC TTC ATT GAC TCT GCC AAC AAC GTG GTG TAT
76 Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr
91 Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly Cys Arg
271 AAG CAA TAC GAG GAC ATG GTG GTG GAG GCC TGC GGC TGC AGG
271 AAG CAG TAT GAG GAC ATG GTC GTG GAG TCG TGT GGC TGC AGG
91 Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg

```

ヌクレオチドレベルでの相同性 : 249/312 = 79.8%

アミノ酸レベルでの相同性 : 84/104 = 80.8%

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷		F I	
C 1 2 N 1/21		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 P 21/02		A 6 1 K 37/36	
//(C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 R 1:19)		C 1 2 R 1:19	
(C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 R 1:91	
(C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 R 1:19)		C 1 2 R 1:19	

(31)優先権主張番号 08/333,576

(32)優先日 平成6年11月2日(1994.11.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100062144

弁理士 青山 稔

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(72)発明者 セレスト, アンソニー・ジェイ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州01749、ハドソン、パッカード・ストリート86番

(72)発明者 ウォズニー, ジョン・エム

アメリカ合衆国マサチューセッツ州01749、ハドソン、オールド・ボルトン・ロード59番

(72)発明者 ローゼン, ビッキー・エイ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02146、ブルックライン、キルシス・ロード・ナンバー7
・127番

(72)発明者 ウルフマン, ニール・エム

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02030、ドーバー、ローリング・レーン30番

(72)発明者 トムセン, ジェラルド・エイチ

アメリカ合衆国ニューヨーク州11777、ポート・ジェファーソン、ベイビュー・テラス201
番

(72)発明者 メルトン, ダグラス・エイ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02173、レキシントン、スローカム・ロード22番

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第93/016099(WO, A1)

特表平09-503903(JP, A)

特表平09-503904(JP, A)

特表平08-505857(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 15/09 ZNA

C12N 9/14 - 9/46

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq