

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年4月21日 (21.04.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/035562 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 14/47, 19/00, C12N 15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00, C12P 21/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/015009
- (22) 国際出願日: 2004年10月5日 (05.10.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2003-347838 2003年10月7日 (07.10.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5418510 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka (JP).
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 山中 伸弥 (YAMANAKA, Shinya) [JP/JP]; 〒5430033 大阪府大阪市天王寺区堂ヶ芝2-9-7-1401 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 五十部 穰 (ISOBE, Yutaka); 〒5540022 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社 知的財産部内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。



WO 2005/035562 A1

(54) Title: NOVEL CELL GROWTH PROMOTER

(54) 発明の名称: 新規な細胞増殖促進剤

(57) Abstract: It is intended to provide an agent promoting the growth of cells, in particular, embryonic stem cells and somatic stem cells. By using a fused protein or a chemical conjugation characterized by containing a protein-transfer domain and ERas protein, the proliferation of cells, in particular, embryonic stem cells and somatic stem cells can be promoted. This cell growth promoter can be reversibly prepared and, therefore, is clinically applicable at a high level compared with the gene transfer method.

(57) 要約: 細胞、特に胚性幹細胞や体性幹細胞の増殖を促進する剤を提供する。本発明のタンパク質導入ドメインおよびERasタンパク質を含んでいることを特徴とする融合タンパク質あるいは化学的結合体を用いることによって細胞、特に胚性幹細胞や体性幹細胞の増殖を促進することができる。本発明の細胞増殖促進剤は、可逆的に調整をすることができるため、遺伝子導入法に比べてより臨床応用が可能である。

明細書

新規な細胞増殖促進剤

技術分野

- 5 本発明は細胞増殖促進剤に関するものである。具体的には、胚性幹細胞や体性幹細胞の細胞増殖促進剤を提供するものである。

背景技術

- 10 胚性幹細胞（ES細胞）や体性幹細胞（組織幹細胞）などの幹細胞は神経疾患、糖尿病、白血病などに対する移植療法の資源として期待されている。ES細胞は受精卵（胚盤胞）の内部細胞塊に由来し、分化多能性を有することから特に価値が高い。マウスES細胞は白血病阻害因子（LIF）により分化多能性を維持することができる。しかしヒトおよびサルES細胞はLIF存在下でも、分化多能性を完全に維持しつ
- 15 うな倫理的問題が無いという長所を持つ。しかし体性幹細胞は受精卵を利用しないためES細胞のような倫理的問題が無いという長所を持つ。しかし体性幹細胞はES細胞よりも増殖が悪く、十分な細胞数を得ることが難しい。そのため、これらES細胞や体性幹細胞の増殖促進物質が望まれている。

- 本発明者は、ES細胞で特異的に発現する遺伝子群ECAT（ES cell associated transcript）を同定し、その機能を解析してきた（WO 02/097090 A1）。これまで
- 20 に、ECAT4（Nanog）はホメオボックス転写因子であり、NanogをES細胞で過剰に発現させるとLIF非依存的に分化多能性を維持できること（Cell, 113, 631-642（2003））、およびECAT5（ERas）は恒常活性型のRas蛋白質であり、ERasはPI3キナーゼの活性化を介してES細胞の増殖を促進していること（Nature, 423, 541-545（2003））などが明らかとなっている。ERasはES細胞だけでなくNIH3T3細胞やマウス
- 25 胎児線維芽細胞（MEF）に対しても強い増殖促進を示す。

発明の開示

本発明は、可逆的な細胞増殖促進剤、特に胚性幹細胞（ES細胞）や体性幹細胞の可逆的な細胞増殖促進剤を提供することを目的とする。

現在、多分化能を維持したままES細胞や体性幹細胞を大量生産することは極めて困難であり、未だ達成されていない。また遺伝子導入は、リポフェクション法やレトロウイルスベクター法などの公知の方法により達成できるが、(i)高い導入効率を得ることが難しい、(ii)導入された遺伝子は染色体に取り込まれるが染色体のどこに組み込まれるか不明で不可逆的であるため癌化するリスクが高い、(iii)操作が煩雑なために多数の細胞を一度に処理しにくい、などの様々な課題がある。したがって臨床応用を考えると、細胞増殖に関与する遺伝子を遺伝子導入して細胞を増殖させることは現実的ではない。

そのため、本発明は遺伝子導入によらない臨床応用可能な細胞増殖促進剤を提供することを目的とする。

本発明者は、上記の問題点を解決すべく鋭意検討し、ERas (ECAT5) タンパク質にHIV由来のTATペプチドを組み合わせた融合タンパク質を培地に添加することによって、該融合タンパク質が細胞に取り込まれて細胞増殖が促進されることを見出した。なお、培地から融合蛋白質を除去すると、細胞内に取り込まれた蛋白質が分解されるとともに反応は停止するため、本発明における細胞増殖促進作用は可逆的である。

これらの知見から、本発明者は、ERasタンパク質を細胞に取り込ませることによって細胞増殖を可逆的に促進させることができ、特に、多分化能を保ったまま培養して増殖させるのが困難な胚性幹細胞や体性幹細胞を増殖させるのに有用であると考え、本発明を完成するに至った。

即ち本発明の要旨は、以下のとおりである。

- [1] タンパク質導入ドメインおよびERasタンパク質を含んでいることを特徴とする融合タンパク質、
- [2] ERasタンパク質がヒト、サル、ウシまたはマウス由来のものである、上記[1]記載の融合タンパク質、
- [3] タンパク質導入ドメインが、HIV TAT、アンテナペディア・ホメオドメイン (Antennapedia homeodomain)、HSV VP22またはこれらのうちいずれかのフラグメントである、上記[1]または[2]記載の融合タンパク質、
- [4] タンパク質導入ドメインが、HIV Revのフラグメント、flock house virus

Coat (FHV Coat)のフラグメント、brome mosaic virus Gag (BMV Gag)のフラグメント、human T cell leukemia virus-II Rex (HTLV -II Rex)のフラグメント、cowpea chlorotic mottle virus Gag (CCMV Gag)のフラグメント、P22 Nのフラグメント、 λ Nのフラグメント、 ϕ 21Nのフラグメント、酵母PRP6のフラグメント、またはオリゴアルギニンからなるペプチドである、上記〔1〕または〔2〕記載の融合タンパク質、

〔5〕タンパク質導入ドメインが、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) またはこれらのうちいずれかのフラグメントである、上記〔1〕または〔2〕記載の融合タンパク質、

〔6〕上記〔1〕～〔5〕いずれか記載の融合タンパク質をコードする塩基配列を含有する核酸、

〔7〕上記〔6〕記載の核酸を含有する発現ベクター、

〔8〕上記〔7〕記載の発現ベクターを含有する細胞、

〔9〕上記〔8〕記載の細胞を、融合タンパク質の発現可能な条件下で培養することを特徴とする、上記〔1〕～〔5〕いずれか記載の融合タンパク質の製造方法、

〔10〕ビスフォスフォネート化合物、グルコース-6-リン酸、P糖タンパク質に結合活性を持つ化合物またはアルギニンを有する分岐型ペプチドと、ERasタンパク質との化学的結合体、

〔11〕上記〔1〕～〔5〕いずれか記載の融合タンパク質または上記〔10〕記載の化学的結合体を有効成分として含有する細胞増殖促進剤、

〔12〕Nanogタンパク質をさらに含有する、上記〔11〕記載の細胞増殖促進剤、

〔13〕細胞が胚性幹細胞または体性幹細胞である、上記〔11〕または〔12〕記載の細胞増殖促進剤、

〔14〕上記〔1〕～〔5〕いずれか記載の融合タンパク質または上記〔10〕記載の化学的結合体と細胞とを接触させる工程を含む、細胞増殖促進方法、

〔15〕Nanogタンパク質をさらに接触させる、上記〔14〕記載の細胞増殖促進方法、

〔16〕細胞が胚性幹細胞または体性幹細胞である、上記〔14〕または〔15〕

記載の細胞増殖促進方法、

〔17〕ピノサイトーシスで上記〔1〕～〔5〕いずれか記載の融合タンパク質または上記〔10〕記載の化学的結合体を細胞内に取り込ませる工程を含む、上記〔14〕～〔16〕いずれか記載の細胞増殖促進方法、

- 5 〔18〕上記〔1〕～〔5〕いずれか記載の融合タンパク質または上記〔10〕の化学的結合体を含有する細胞。

図面の簡単な説明

10 図1は、融合タンパク質の例で、ERasタンパク質のN末端にHIV由来のTATペプチドを融合させたものを示している。これらのタンパク質は大腸菌内やCell Free合成系で合成、精製することができる。

図2は、TAT-ERasタンパク質による細胞増殖促進作用を示している。

発明を実施するための最良の形態

15 本発明において「融合タンパク質」とは、タンパク質導入ドメインとERasタンパク質を含んでいる融合タンパク質であり、細胞に取り込まれることにより細胞増殖活性の亢進が認められるものであればよい。この融合タンパク質を細胞に取り込ませることにより、細胞、特に胚性幹細胞や体性幹細胞などの培養の効率性と経済性の向上が期待できる。

20 融合タンパク質における2つのドメインの融合はいずれの可能な位置でもよく、タンパク質導入ドメインはERasタンパク質のN末端またはC末端のいずれに融合してもよいが、好ましくはERasタンパク質のN末端に融合する。

25 タンパク質導入ドメインは、公知の方法で融合することができ、例えば、直接的な化学結合により、あるいはリンカー分子を介して、ERasタンパク質に融合してもよい。かかる場合、リンカー分子は、2つのドメインを連結させることのできるいずれの2価の化学構造物であってもよい。本発明の好ましいリンカー分子は短いペプチド、例えば、1～20個のアミノ酸残基、好ましくは1～10個のアミノ酸残基を有するものである。融合タンパク質は公知の遺伝子工学的な手法を用いて作製することもできる。

本明細書において「タンパク質」には、特定のアミノ酸配列（配列番号：2，4，6または8）で示されるタンパク質だけでなく、これらと生物学的機能が同等であることを限度として、その同族体（ホモログやスプライズバリエーション）、変異体、誘導体などが包含される。ここでホモログとしては、ヒトのタンパク質に対応するマウスやラットなど他生物種のタンパク質が例示でき、これらはHomoloGene（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>）により同定された遺伝子の塩基配列から演繹的に同定することができる。また変異体には、天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体、及び人為的に欠失、置換、付加および挿入されることによって改変されたアミノ酸配列を有する変異体が包含される。なお、上記変異体としては、変異のないタンパク質と、少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは95%、さらにより好ましくは97%相同なものを挙げる事ができる。

従って、本明細書において「ERasタンパク質」は、特に言及しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号2，4，6または8）で示されるERasタンパク質やその同族体、変異体、誘導体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有するマウスERasタンパク質、配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有するヒトERasタンパク質、配列番号：6に記載のアミノ酸配列を有するサルERasタンパク質、配列番号：8に記載のアミノ酸配列を有するウシERasタンパク質、およびラットホモログなどが包含される。ここで配列番号2に示すタンパク質は、マウス由来のERas遺伝子によってコードされるタンパク質である。配列番号4に示すタンパク質は、ヒト由来のERas遺伝子によってコードされるタンパク質である。配列番号6に示すタンパク質は、サル由来のERas遺伝子によってコードされるタンパク質である。配列番号8に示すタンパク質は、ウシ由来のERas遺伝子によってコードされるタンパク質である。

ERasタンパク質には、配列番号2，4，6または8に示す各アミノ酸配列を有するタンパク質のみならず、その相同物も包含される。該相同物としては、上記各アミノ酸配列において、1もしくは複数（通常数個）のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、且つもとのアミノ酸配列のERasタンパク質と実質的に同等の活性を有するタンパク質を挙げる事ができる。

ここで実質的に同等の活性とは、該タンパク質を発現させた細胞の細胞増殖が促

進される、あるいは該タンパク質を取り込ませた細胞の細胞増殖が促進されるという性質を示す。このようなERasタンパク質の性質は、公知の方法 (Nature, 423, 541-545 (2003)) などにより容易に測定することができる。

5 なお、タンパク質におけるアミノ酸の変異数および変異部位は、その活性が保持される限り制限はない。活性を消失することなくアミノ酸残基が、どのように、何個置換、挿入あるいは欠失されればよいかを決定する指標は、当業者に周知のコンピュータプログラム、例えばDNA Star softwareを用いて見出すことができる。例えば変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内である。また置換される

10 アミノ酸は、置換後に得られるタンパク質がERasタンパク質の活性を保持している限り、特に制限されない。この置換されるアミノ酸は、タンパク質の構造保持の観点から、アミノ酸の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性、両親媒性などにおいて置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、

15 Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、PheおよびTrpは互いに非極性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、AsnおよびGlnは互いに非荷電性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、AspおよびGluは互いに酸性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、またLys、ArgおよびHisは互いに塩基性アミノ酸に分類されるアミノ酸である。ゆえに、これらを指標として同群に属するアミノ酸を適宜選択することができる。

20 ERasタンパク質は、後述するERasタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む形質転換体を培養することによって製造することができる。

本発明において「タンパク質導入ドメイン」とは、タンパク質を導入することができる、またはタンパク質導入を補助することのできるものであればよく、何ら限定されない。例えば、(i)公知であるHIV TAT、アンテナペディア・ホメオドメイン

25 (Antonnepedia homeodomain)、HSV VP22またはこれらのうちいずれかのフラグメント、(ii)HIV Revのフラグメント、flock house virus Coat (FHV Coat)のフラグメント、brome mosaic virus Gag (BMV Gag)のフラグメント、human T cell leukemia-II Rex (HTLV -II Rex)のフラグメント、cowpea chlorotic mottle virus Gag (CCMV Gag)のフラグメント、P22 Nのフラグメント、 λ Nのフラグメント、 ϕ

21Nのフラグメントまたは酵母PRP6のフラグメント、(iii)オリゴアルギニンを有するペプチド、(iv)cell penetrating peptides (CPP)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) またはこれらのうちいずれかのフラグメント、などを挙げるができる。

5 前記(i)～(iii)のいずれかのタンパク質導入ドメインを用いることによって、広範囲な細胞にERasを細胞内に取り込ませることができる。また、目的細胞において特異的に発現するレセプターと結合する物質をタンパク質導入ドメインとして用いることによって組織あるいは細胞特異的な取り込みが可能となるため、前記(iv)のタンパク質導入ドメインを用いれば、対応するレセプターが発現した組織あるいは
10 細胞特異的にERasを細胞内に取り込ませることができる。

前記(i)のタンパク質導入ドメインであるHIV TAT、アンテナペディア・ホメオドメイン (Antennapedia homeodomain)、HSV VP22には、HIV由来のTAT (Green and Loewenstein, Cell, 56(6), 1179-88 (1988)、Frankel and Pabo, Cell, 55(6), 1189-93 (1988))、ショウジョウバエ由来のアンテナペディア蛋白 (Vives et
15 al., J. Biol. Chem, 272(25), 16010-7 (1997))、HSV由来のVP22 (Elliott and O'Hare, Cell, 88(2), 223-33 (1997))のみならず、その機能が同等であることを限度として、その同族体 (ホモログやスプライズバリエーション)、変異体などが包含される。なお、変異体としては、変異のないタンパク質と少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは95%、さらにより好ましくは97%相同なものを挙げるこ
20 とができる。

更に前記(i)のタンパク質導入ドメインは、HIV TATのフラグメント、アンテナペディア・ホメオドメインのフラグメントまたはHSV VP22のフラグメントであり、且つタンパク質導入機能またはタンパク質導入を補助する機能を有するものも包含する。該フラグメントの長さは、タンパク質導入またはタンパク質導入を補助する機能
25 を有するのであればよく、何ら限定はされない。

HIV TAT、アンテナペディア・ホメオドメインおよびHSV VP22は、細胞膜を貫通する能力を有する蛋白トランスダクションドメイン (以下、「PTD」という) が同定されているため、タンパク質導入ドメインであるHIV TATのフラグメント、アンテナペディア・ホメオドメインのフラグメントおよびHSV VP22のフラグメントには

、これらのPTDからなるフラグメントも包含される。異種蛋白とPTDを融合することにより、培養細胞中に導入することができることは公知であり、その作製方法も知られている (Fawell et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(2), 664-8 (1994)、Elliott and O'Hare (1997), Phelan et al., Nature Biotech. 16, 440-443 (1998)およびDilber et al., Gene Ther., 6(1), 12-21 (1999)、特許番号第2702285号)。HIV TATのPTDについては、HIV TAT蛋白由来の11アミノ酸のPTDに融合した β -ガラクトシダーゼ蛋白が、生きたマウスのすべての組織に浸潤してすべての単一細胞に到達できることが報告されている (Schwarze et al., Science, 285(5433), 1569-72 (1999))。

5 HIV TATのフラグメントとしては、具体的には、前記の公知文献等に記載されているものを挙げるができるが、好ましくは特許番号第2702285号に記載のHIV TATフラグメントであり、更に好ましくは配列番号13で示される配列を含有するペプチドが挙げられる。配列番号13で示される配列を含有するペプチドとしては、例えば、配列番号17に示されるアミノ酸配列を有するHIV TAT-(48-60)ペプチドが挙げられる。

15 アルギニンに富む塩基性ペプチドは細胞膜透過能を有しており、HIV TATのフラグメントは分子中央部を全てアルギニンに置換しても (配列番号16)、該フラグメント (ペプチド) は細胞膜透過能を有することが知られているため (J. Biol. Chem., 276, 5836-5840 (2001))、HIV TATのフラグメント、アンテナペペ
20 イア・ホメオドメインのフラグメントおよびHSV VP22のフラグメントは、複数個のアミノ酸がアルギニンに置換されていてもよく、置換後のフラグメントがタンパク質導入機能またはタンパク質導入を補助する機能を有していれば、本発明のタンパク質導入ドメインに含まれる。

25 前記(ii)のタンパク質導入ドメインであるHIV Revのフラグメント、flock house virus Coat (FHV Coat)のフラグメント、brome mosaic virus Gag (BMV Gag)のフラグメント、human T cell leukemia virus-II Rex (HTLV -II Rex)のフラグメント、cowpea chlorotic mottle virus Gag (CCMV Gag)のフラグメント、P22 Nのフラグメント、 λ Nのフラグメント、 ϕ 21Nのフラグメントおよび酵母PRP6のフラグメントは、タンパク質導入機能またはタンパク質導入を補助する機能を有するものであれ

ばよく、何ら限定されない。これらのフラグメントは、細胞膜透過能を有することが知られている (J. Biol. Chem., 276, 5836-5840(2001))。例えば、HIV RevのフラグメントとしてはHIV Rev-(34-50)ペプチド (配列番号18)、FHV CoatのフラグメントとしてはFHV Coat-(35-49)ペプチド (配列番号19)、BMV GagのフラグメントとしてはBMV Gag-(7-25)ペプチド (配列番号20)、HTLV-II RexのフラグメントとしてはHTLV-II Rex-(4-16)ペプチド (配列番号21)、CCMV GagのフラグメントとしてはCCMV Gag-(7-25)ペプチド (配列番号22)、P22 NのフラグメントとしてはP22 N-(14-30)ペプチド (配列番号23)、 λ Nのフラグメントとしては λ N-(1-22)ペプチド (配列番号24)、 ϕ 21Nのフラグメントとしては ϕ 21N-(12-29)ペプチド (配列番号25)、酵母PRP6のフラグメントとしては酵母PRP6-(129-144)ペプチド (配列番号26)の全部または一部を有するフラグメントが挙げられる。また、これらのフラグメントの配列において複数個のアミノ酸がアルギニンに置換されてもよく、置換後のフラグメントがタンパク質導入機能またはタンパク質導入を補助する機能を有していれば、本発明のタンパク質導入ドメインに含まれる。

前記(iii)のタンパク質導入ドメインであるオリゴアルギニンからなるペプチドは、タンパク質導入機能またはタンパク質導入を補助する機能を有していればよく、何ら限定されない。オリゴアルギニンおよびオリゴアルギニンを有するペプチドが細胞膜透過能を有することは公知であるため (J. Biol. Chem., 276, 5836-5840(2001)、J. Biol. Chem., 277(4), 2437-2743 (2002))、例えば、これらの文献に挙げられている細胞膜透過能を有するペプチドをタンパク質導入ドメインとして用いることができる。オリゴアルギニンを有するペプチドは、オリゴアルギニン ($n = 5 \sim 9$) を有するペプチドが好ましく、オリゴアルギニン ($n = 6 \sim 8$) を有するペプチドが更に好ましい。

前記(iv)のタンパク質導入ドメインである、「線維芽細胞増殖因子 (FGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) またはこれらのうちいずれかのフラグメント」とは、公知のFGFタンパク質、公知のHGFタンパク質またはこれらのうちいずれかのフラグメントであり、対応するレセプター発現細胞にタンパク質を導入する機能またはタンパク質導入を補助する機能を有するものであればよく、何ら限定されない。線維芽細胞増殖因子 (FGF) のフラグメントとの結合体が細胞内に取り込まれることは公知で

ある (Rojas, M. et al., Nat. Biotechnol., 16, 370-375 (1998)、Lin, Y. Z. et al., J. Biol. Chem. 270, 14255-14258(1995))。従って、これらの文献に報告されているFGFフラグメントをタンパク質導入ドメインとして用いることができる。FGFのフラグメントとしては、例えば、配列番号15に記載のアミノ酸配列を含有するフラグメントを挙げることができる。

本発明には、前記の本発明融合タンパク質をコードする塩基配列を含有する核酸も含まれる。

ここで「核酸」とは、「RNA」または「DNA」が含まれ、その長さによって特に制限されるものではない。「DNA」とは、特に言及しない限り、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNA、cDNAを含む1本鎖DNA（正鎖）並びに該正鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA（相補鎖）、およびこれらの断片のいずれもが含まれる。「RNA」とは、1本鎖RNAのみならず、それに相補的な配列を有する1本鎖RNA、さらにはそれらから構成される2本鎖RNAを包含する趣旨で用いられる。なお、核酸は機能領域の別を問うものではなく、例えば発現制御領域、コード領域、エキソン、またはイントロンを含むことができるため、上記DNAには、cDNA、ゲノムDNA、及び合成DNAのいずれもが含まれ、上記RNAには、total RNA、mRNA、rRNA、及び合成のRNAのいずれもが含まれる。

本発明の融合タンパク質をコードする塩基配列を含有する核酸は、前記ERasタンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドとタンパク質導入ドメインをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有する。

タンパク質導入ドメインがHIV TATフラグメントである場合は、本発明の融合タンパク質をコードする塩基配列を含有する核酸は、具体的には、例えば

(a) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドと配列番号：

1 3 記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含有する核酸、

(b) 配列番号：4 記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドと配列番号：

1 3 記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含有する核酸、

(c) 配列番号：6 記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドと配列番号：

1 3 記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含有する核酸、

(d) 配列番号：8 記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドと配列番号：

1 3 記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含有する核酸、

(e) 配列番号：1 記載の塩基配列と配列番号：1 1 または 1 2 記載の塩基配列を含有する核酸、

5 (f) 配列番号：3 記載の塩基配列と配列番号：1 1 または 1 2 記載の塩基配列を含有する核酸、

(g) 配列番号：5 記載の塩基配列と配列番号：1 1 または 1 2 記載の塩基配列を含有する核酸、

(h) 配列番号：7 記載の塩基配列と配列番号：1 1 または 1 2 記載の塩基配列を含有する核酸、

10 (i) 配列番号：1 記載の塩基配列の第178番目のヌクレオチドから第858番目までのヌクレオチドで示される塩基配列と配列番号：1 1 または 1 2 記載の塩基配列を含有する核酸、

15 (j) 配列番号：3 記載の塩基配列の第252番目のヌクレオチドから第950番目までのヌクレオチドで示される塩基配列と配列番号：1 1 または 1 2 記載の塩基配列を含有する核酸、

(k) 配列番号：5 記載の塩基配列の第1番目のヌクレオチドから第699番目までのヌクレオチドで示される塩基配列と配列番号：1 1 または 1 2 記載の塩基配列を含有する核酸、

20 (l) 配列番号：7 記載の塩基配列の第116番目のヌクレオチドから第817番目までのヌクレオチドで示される塩基配列と配列番号：1 1 または 1 2 記載の塩基配列を含有する核酸、

(m) 配列番号：1 0 記載のアミノ酸配列をコードする核酸、

(n) 配列番号：1 4 記載のアミノ酸配列をコードする核酸、

(o) 配列番号：9 記載の塩基配列を含有する核酸、

25 (p) 配列番号：9 記載の塩基配列からなる核酸、

またはこれら (a) ~ (p) の核酸と実質的に同一の塩基配列を含有する核酸が挙げられる。

これら配列番号：1, 3, 5 または 7 に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチドは、本明細書の配列表の配列番号：1, 3, 5 または 7 に開示されている塩基

配列の適当な部分をハイブリダイゼーションのプロープあるいはPCRのプライマーに用いて、例えばES細胞由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることなどによりクローニングすることができる。該クローニングは、例えばMolecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。

また前記(a)～(p)のいずれかの核酸と実質的に同一の塩基配列を含有する核酸とは、具体的には、

(q) 前記(a)～(p)のいずれかの核酸の相補鎖に対してストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする核酸、

10 (r) 前記(a)～(p)のいずれかの核酸との配列同一性を示す塩基配列を含有する核酸、

(s) 前記(a)～(p)のいずれかの核酸によりコードされるタンパク質において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする核酸、

15 などが挙げられる。

ここで前記(a)～(p)のいずれかの核酸の相補鎖に対してストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする核酸とは、例えば前記(a)～(p)のいずれかの核酸の塩基配列と約40%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の配列同一性を有する塩基配列を含有する核酸が挙げられる。具体的には、

20 前記(a)～(p)のいずれかの核酸の部分配列などが挙げられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えばMolecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に記載の方法に従って行うことができる。また市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

25 「ストリンジेंटな条件」とは、例えば、6×SSC(20×SSCは、333mM Sodium citrate、333mM NaClを示す)、0.5%SDSおよび50%ホルムアミドを含む溶液中で42℃にてハイブリダイズさせる条件、または6×SSCを含む(50%ホルムアミドは含まない)溶液中で65℃にてハイブリダイズさせる条件などが挙げられる。またハ

ハイブリダイゼーション後の洗浄の条件としては、0.1×SSC、0.5%SDSの溶液中で68℃にて洗浄するような条件が挙げられる。

前記(a)～(p)のいずれかの核酸との配列同一性を示す塩基配列を含有する核酸とは、例えば前記(a)～(p)のいずれかの核酸の塩基配列と約40%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の配列同一性を示す塩基配列を含有する核酸が挙げられる。具体的には、前記(a)～(p)のいずれかの核酸の部分配列などが挙げられる。このような配列同一性を有する核酸は、前述のハイブリダイゼーション反応やPCR反応により、または後述する核酸の改変（欠失、付加、置換）反応により作製することができる。

前記(a)～(p)のいずれかの核酸によりコードされるタンパク質において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする核酸とは、人為的に作製したいわゆる改変タンパク質や、生体内に存在するアレル変異対等のタンパク質をコードする核酸を意味する。

ここでタンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、本発明の核酸によりコードされるタンパク質の活性（細胞増殖促進活性）が保持される限り制限はない。このように活性を喪失することなくアミノ酸残基が、どのように、何個欠失、置換及び／又は付加されればよいかを決定する指標は、当業者に周知のコンピュータプログラム、例えばDNA Star softwareを用いて見出すことができる。例えば変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内である。また置換されるアミノ酸は、タンパク質の構造保持の観点から、残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性並びに両親媒性など、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe及びTrpは互いに非極性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn及びGlnは互いに非荷電性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Asp及びGluは互いに酸性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、またLys、Arg及びHisは互いに塩基性アミノ酸に分類されるアミノ酸である。ゆえに、これらを指標として同群に属するアミノ酸を適宜選択することができる。

この改変タンパク質をコードする核酸は、例えば、Molecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に記載の種々の方法、例えば部位特異的変異誘発やPCR法等によって製造することができる。また市販のキットを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの公知の方法に従って製造することもできる。

以上のような、前記(a)～(p)のいずれかの核酸と実質的に同一の塩基配列を含有する本発明の核酸は、当該核酸によりコードされるタンパク質が、細胞内への導入が可能であり、導入された後は配列番号：2，4，6または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質であることが好ましい。ここで実質的に同質の活性とは、本発明の核酸によりコードされるタンパク質を発現させた細胞は細胞増殖が促進されるという性質、あるいは当該タンパク質を取り込んだ細胞の細胞増殖が促進するという性質を指す。当該活性およびその測定については、公知の方法にて実施することができる。

本発明の核酸が2本鎖の場合、前記本発明の核酸を発現ベクターに挿入することにより、本発明のタンパク質を発現するための組換え発現ベクターを作製することができる。

ここで用いる発現ベクターとしては、用いる宿主や目的等に応じて適宜選択することができ、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター等が挙げられる。

例えば、宿主が大腸菌の場合、ベクターとしては、pUC118、pUC119、pBR322、pCR3等のプラスミドベクター、λZAPII、λgt11などのファージベクターが挙げられる。宿主が酵母の場合、ベクターとしては、pYES2、pYEUra3などが挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合には、pAcSGHisNT-Aなどが挙げられる。宿主が動物細胞の場合には、pCEP4、pKCR、pCDM8、pGL2、pcDNA3.1、pRc/RSV、pRc/CMVなどのプラスミドベクターや、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクターなどのウイルスベクターが挙げられる。

前記ベクターは、発現誘導可能なプロモーター、シグナル配列をコードする遺伝子、選択用マーカー遺伝子、ターミネーターなどの因子を適宜有していても良い。

また、単離精製が容易になるように、チオレドキシン、Hisタグ、あるいはGST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）等との融合タンパク質として発現する配列が

付加されていても良い。この場合、宿主細胞内で機能する適切なプロモーター（lac、tac、trc、trp、CMV、SV40初期プロモーターなど）を有するGST融合タンパクベクター（pGEX4Tなど）や、Myc、Hisなどのタグ配列を有するベクター（pcDNA3.1/Myc-Hisなど）、さらにはチオレドキシシンおよびHisタグとの融合タンパク質を発現するベクター（pET32a）などを用いることができる。

前記で作製された発現ベクターで宿主を形質転換することにより、当該発現ベクターを含有する形質転換細胞を作製することができる。

ここで用いられる宿主としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。大腸菌としては、E. coli K-12系統のHB101株、C600株、JM109株、DH5 α 株、AD494(DE3)株などが挙げられる。また酵母としては、サッカロミセス・セルビジエなどが挙げられる。動物細胞としては、L929細胞、BALB/c3T3細胞、C127細胞、CHO細胞、COS細胞、Vero細胞、Hela細胞、293-EBNA細胞などが挙げられる。昆虫細胞としてはsf9などが挙げられる。

宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、前記宿主細胞に適合した通常の導入方法を用いれば良い。具体的にはリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド（Lipofectamine、Lipofectin; Gibco-BRL社）を用いる方法などが挙げられる。導入後、選択マーカを含む通常の培地にて培養することにより、前記発現ベクターが宿主細胞中に導入された形質転換細胞を選択することができる。

以上のようにして得られた形質転換細胞を好適な条件下で培養し続けることにより、本発明のタンパク質を製造することができる。得られたタンパク質は、一般的な生化学的精製手段により、さらに単離・精製することができる。ここで精製手段としては、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等が挙げられる。また本発明のタンパク質を、前述のチオレドキシシンやHisタグ、GST等との融合タンパク質として発現させた場合は、これら融合タンパク質やタグの性質を利用した精製法により単離・精製することができる。

なお、実施例に示すように、これらの融合タンパク質は、試験管内で合成、精製することもできる。

本発明の「化学的結合体」とは、ERasタンパク質を、ビスフォスフォネート化合物、グルコース-6-リン酸、P糖タンパク質に結合活性を持つ化合物（たとえばBCRPインヒビター）またはアルギニンを有する分岐型ペプチドと化学的に結合して得られる結合体のことである。

5 「ビスフォスフォネート化合物」とは、例えば、エチドロネート、アレンドロネート、リセドロネート、インカドロネート、パミドロネート等の公知の化合物を挙げることができる。ビスフォスフォネート化合物は骨芽細胞に選択的に取り込まれるため、この公知の性質を利用したビスフォスフォネート化合物との結合体が報告されている (Calcif. Tissue Int., 59, 168-173 (1996)、Bioorg. Med. Chem. Lett., 4, 1375-1380(1995))。そのため、ERasタンパク質にビスフォスフォネート化合物を化学的に結合させた化学的結合体は骨芽細胞に将来分化していく間質系幹細胞特異的に取り込まれる。

15 「グルコース-6-リン酸」は公知の物質であり、ERasタンパク質とグルコース-6-リン酸を化学的に結合させた化学的結合体は肝細胞および膵細胞に将来分化していく前駆細胞特異的に取り込まれる。

「P糖タンパク質に結合活性を持つ化合物」とは、例えばBCRPインヒビターを挙げることができる。具体的には、例えば、BCRPインヒビターであるGF120918などを挙げることができる。P糖タンパク質に結合活性を持つ化合物とNanogタンパク質と化学的に結合させることにより、化学的結合体はSP細胞と呼ばれる各種体性幹細胞特異的に取り込まれる。

20 「アルギニンを有する分岐型ペプチド」とは、例えば、文献Biochemistry, 41, 7925-7930, (2002)に記載されているような細胞膜透過能をもつ8個程度のアルギニンを有する分岐型ペプチドのことであり、具体的には、該文献の $(R_2)_4$ ペプチドや $(R_3R)_4$ ペプチドなどが挙げられる。

25 ERasタンパク質は前記のように作製することができる。精製されたERasタンパク質と上記物質の化学的結合体は公知の方法に従って化学的に結合させて作製することができる。例えば、アミノ基を持つリンカーをつけることで酸アミド結合など公知の方法に従って化学的に結合させることによって作製することができる。

本発明の「細胞増殖促進剤」とは、上記の本発明の融合タンパク質あるいは化学

的結合体のうち少なくとも1つを含有する剤のことであり、細胞に取り込まれることによって該細胞の増殖を促進する。

ここで細胞は、特に限定されないが、哺乳動物細胞を挙げることができる。哺乳動物細胞とは、ヒト、サル、ウシ、ラットやマウス等の哺乳動物の組織・臓器細胞
5 またはこれら由来の細胞であって、個体の細胞、個体から取り出した初代細胞、または培養細胞のいずれでもよい。好ましくは、市販の培養細胞（ATCC社など）、胚性幹細胞や体性幹細胞などの幹細胞を挙げることができ、より好ましくはヒト胚性幹細胞やヒト体性幹細胞である。

また、マウスES細胞にNanogタンパク質を強制発現させるとLIFなしでも万能性を維持したまま継代することができるため（Cell, 113, 631-642 (2003)）、本発明の細胞増殖促進剤は本発明の融合タンパク質あるいは化学的結合体だけでなく、
10 Nanog（ECAT4）タンパク質も含有されていてもよい。

本発明の「Nanogタンパク質」とは、Nanogタンパク質のみに限定されず、本発明の融合タンパク質や化学的結合体と同様に、細胞内に取り込まれやすくした態様のものも包含される。本発明のNanogタンパク質は、そのアミノ酸配列および塩基配列が公知であるため（WO 02/097090 A1）、前記のERasタンパク質、融合タンパク質、あるいは化学的結合体と同様の方法にて作製することができる。
15

本発明の細胞増殖促進剤を作用させるには、当該剤を直接体内に導入するin vivo法、ヒトからある種の細胞を採取し、体外で該細胞に添加してその細胞を体内
20 に戻すex vivo法、および培養細胞に添加するin vitro法がある。

投与方法としては、ex vivo法またはin vitro法であれば、細胞を培養している培養液中に添加、あるいは細胞に直接添加すればよい。添加量は、細胞の種類、細胞数等により適宜調整することができるが、細胞毒性が認められず細胞増殖促進活性が認められればよい。製剤中の本発明の融合タンパク質または結合体の添加量は
25 通常培地に0.0001 μ M～1000 μ M、好ましくは0.0001 μ M～10 μ M、より好ましくは0.0001 μ M～1 μ Mであり、これを1～数日に1回添加するのが好ましい。

また、in vivo法の投与方法としては、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられる。製剤中の本発明の融合タンパク質または結合体の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重などにより適宜調整することができるが、

通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～100mg、より好ましくは0.01mg～10mgであり、これを1～数日に1回投与するのが好ましい。

細胞増殖促進剤の有効成分である本発明の融合タンパク質あるいは結合体は、そのままもしくは自体公知の薬学的に許容される担体(賦形剤、増量剤、結合剤、滑沢剤などが含まれる)、慣用の添加剤などと混合して試薬あるいは医薬組成物として調製することができ、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)または培地等を含むものであってもよい。当該医薬組成物は、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、注射剤、点滴剤、外用剤、坐剤などに調整することができる。

10 本発明の「細胞増殖促進方法」とは、本発明の融合タンパク質あるいは化学的結合体のいずれかを細胞に接触させることにより、細胞増殖を促進する方法である。具体的には、例えば、本発明の細胞増殖促進剤を細胞培養培地中に添加して細胞に接触させ、細胞に取り込ませることによって細胞増殖を促進する方法のことである。

15 本発明の細胞増殖促進方法は、本発明の融合タンパク質あるいは化学的結合体のいずれかを細胞と接触させた後に、細胞のピノサイトーシス(飲作用)により取り込まれ、細胞の増殖が促進される方法であってもよい。細胞のピノサイトーシスを利用した取り込み(導入)は、例えば、市販のキットであるInflux(登録商標) Pinocytic Cell-Loading Reagent(Molecular Probe社)を用いることによって実施
20 することができる。

本発明の細胞増殖促進方法は、本発明の融合タンパク質あるいは化学的結合体だけでなく、さらに前記Nanogタンパク質を接触させる工程を加えることもできる。

細胞は、特に限定されないが、哺乳動物細胞を挙げることができる。哺乳動物細胞とは、ヒト、サル、ウシ、ラットやマウス等の哺乳動物の組織・臓器細胞または
25 これら由来の細胞であって、個体の細胞、個体から取り出した初代細胞、または培養細胞のいずれでもよい。好ましくは、市販の培養細胞(ATCC社など)、胚性幹細胞や体性幹細胞などの幹細胞を挙げることができ、より好ましくはヒト胚性幹細胞やヒト体性幹細胞である。

前記の細胞増殖促進剤あるいは細胞増殖促進方法により、本発明の融合タンパク

質あるいは化学的結合体を含有する細胞を作製することができる。

実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1

(1) TAT-ERas発現ベクターの構築

オリゴDNAのTAT-S (配列番号11) とTAT-AS (配列番号12) を94度で1分間変性の後、徐々に室温に戻し2本鎖DNAを作製した。これをpCDNA3.1のHindIII/BamHI部位にライゲーションした (pCDNA3.1-TAT) 。このpCDNA3.1-TATのBamHI/EcoRV部位に Gateway rfB Casetteを挿入してpCDNA3.1-TAT-GWを作製した。pCDNA3.1-TAT-GWと pEnter-mERasでLR組み換え反応 (Invitrogen社) を行い、pCDNA3.1-TAT-ERas (図1) を作製した。TAT-ERasのDNA配列は配列番号9に、アミノ酸配列は配列番号10で示されている。

(2) TAT-ERasタンパク質の合成と精製

融合タンパク質の合成と精製は、PureGeneシステムを用いてin vitroにおいて行った。

(3) TAT-ERasタンパク質による細胞増殖促進

マウス12.5日胚よりマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を単離した。MEFは10%牛胎児血清を含むDMEM中で培養した。ここにTAT-ERasタンパク質を加えると増殖が有意に促進された (図2) 。一方、ERasのC末端のCAAXモチーフを欠失し膜局在できなくしたTAT-ERas-ΔCを加えても細胞増殖促進は認められなかった。

実施例 2

(1) TAT-ERas発現ベクターの構築

オリゴDNAのTAT-S (配列番号11) とTAT-AS (配列番号12) を94度で1分間変性の後、徐々に室温に戻し2本鎖DNAを作製する。これをpCDNA3.1のHindIII/BamHI部位にライゲーションする (pCDNA3.1-TAT) 。このpCDNA3.1-TATのBamHI/EcoRV部位に Gateway rfB Casetteを挿入してpCDNA3.1-TAT-GWを作製する。pCDNA3.1-TAT-GWと pEnter-mERasでLR組み換え反応 (Invitrogen社) を行い、実施例1と同様に、

pCDNA3.1-TAT-ERasを作製する。TAT-ERasのERasは、マウスERasではなくヒトERasを用いるため、作製されるTAT-ERasのアミノ酸配列は配列番号14に示されている。

(2) TAT-ERasタンパク質の合成と精製

融合タンパク質の合成と精製は、実施例1と同様に、PureGeneシステムを用いて
5 in vitroにおいて行う。

(3) TAT-ERasタンパク質による細胞増殖促進

ヒト胚性幹細胞（ES細胞）およびヒト体性幹細胞を常法により培養する。細胞に、実施例1または実施例2で作製したTAT-ERasタンパク質を加えることにより、い
10 ずれの細胞についても細胞増殖が有意に促進されることが観察される。

産業上の利用可能性

本発明により、細胞、特に胚性幹細胞や体性幹細胞の増殖を促進することができる融合タンパク質、または化学的結合体を提供することができる。本発明の細胞増殖促進剤は、多能性を維持させたまま増殖させることが困難な胚性幹細胞や体性幹
15 細胞にも用いることができる。また本発明の細胞増殖促進剤は、多数の細胞を一度に簡便に処理することができるだけでなく、可逆的に調整をすることができるため、遺伝子導入法に比べてより臨床応用が可能である。

配列表フリーテキスト

- 20 配列番号：11に記載の塩基配列はTAT-Sである。
配列番号：12に記載の塩基配列はTAT-ASである。
配列番号：13に記載のアミノ酸配列はHIV TATペプチドである。
配列番号：15に記載のアミノ酸配列はFGFフラグメントである。
配列番号：16に記載のアミノ酸配列は置換後のHIV TATペプチドである。
25 配列番号：17に記載のアミノ酸配列はHIV TATペプチドである。
配列番号：18に記載のアミノ酸配列はHIV Rev-(34-50)ペプチドである。
配列番号：19に記載のアミノ酸配列はFHV Coat-(35-49)ペプチドである。
配列番号：20に記載のアミノ酸配列はBMV Gag-(7-25)ペプチドである。
配列番号：21に記載のアミノ酸配列はHTLV-II Rex-(4-16)ペプチドである。

配列番号：22に記載のアミノ酸配列はCCMV Gag-(7-25)ペプチドである。

配列番号：23に記載のアミノ酸配列はP22 N-(14-30)ペプチドである。

配列番号：24に記載のアミノ酸配列は λ N-(1-22)ペプチドである。

配列番号：25に記載のアミノ酸配列は ϕ 21N-(12-29)ペプチドである。

5 配列番号：26に記載のアミノ酸配列は酵母PRP6-(129-144)ペプチドである。

請求の範囲

1. タンパク質導入ドメインおよびERasタンパク質を含んでいることを特徴とする融合タンパク質。
- 5 2. ERasタンパク質がヒト、サル、ウシまたはマウス由来のものである、請求項1記載の融合タンパク質。
3. タンパク質導入ドメインが、HIV TAT、アンテナペディア・ホメオドメイン (Antennapedia homeodomain)、HSV VP22またはこれらのうちいずれかのフラグメントである、請求項1または2記載の融合タンパク質。
- 10 4. タンパク質導入ドメインが、HIV Revのフラグメント、FHV Coatのフラグメント、BMV Gagのフラグメント、HTLV-II Rexのフラグメント、またはオリゴアルギニンからなるペプチドである、請求項1または2記載の融合タンパク質。
5. タンパク質導入ドメインが、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) またはこれらのうちいずれかのフラグメントである、請求項1または2
- 15 記載の融合タンパク質。
6. 請求項1～5いずれか記載の融合タンパク質をコードする塩基配列を含有する核酸。
7. 請求項6記載の核酸を含有する発現ベクター。
8. 請求項7記載の発現ベクターを含有する細胞。
- 20 9. 請求項8記載の細胞を、融合タンパク質の発現可能な条件下で培養することを特徴とする、請求項1～5いずれか記載の融合タンパク質の製造方法。
10. ビスフォスフォネート化合物、グルコース-6-リン酸、P糖タンパク質に結合活性を持つ化合物またはアルギニンを有する分岐型ペプチドと、ERasタンパク質との化学的結合体。
- 25 11. 請求項1～5いずれか記載の融合タンパク質または請求項10記載の化学的結合体を有効成分として含有する細胞増殖促進剤。
12. Nanogタンパク質をさらに含有する、請求項11記載の細胞増殖促進剤。
13. 細胞が胚性幹細胞または体性幹細胞である、請求項11または12記載

の細胞増殖促進剤。

14. 請求項1～5いずれか記載の融合タンパク質または請求項10記載の化学的結合体と細胞とを接触させる工程を含む、細胞増殖促進方法。

5 15. Nanogタンパク質をさらに接触させる、請求項14記載の細胞増殖促進方法。

16. 細胞が胚性幹細胞または体性幹細胞である、請求項14または15記載の細胞増殖促進方法。

17. 請求項1～5いずれか記載の融合タンパク質または請求項10記載の化学的結合体を含有する細胞。

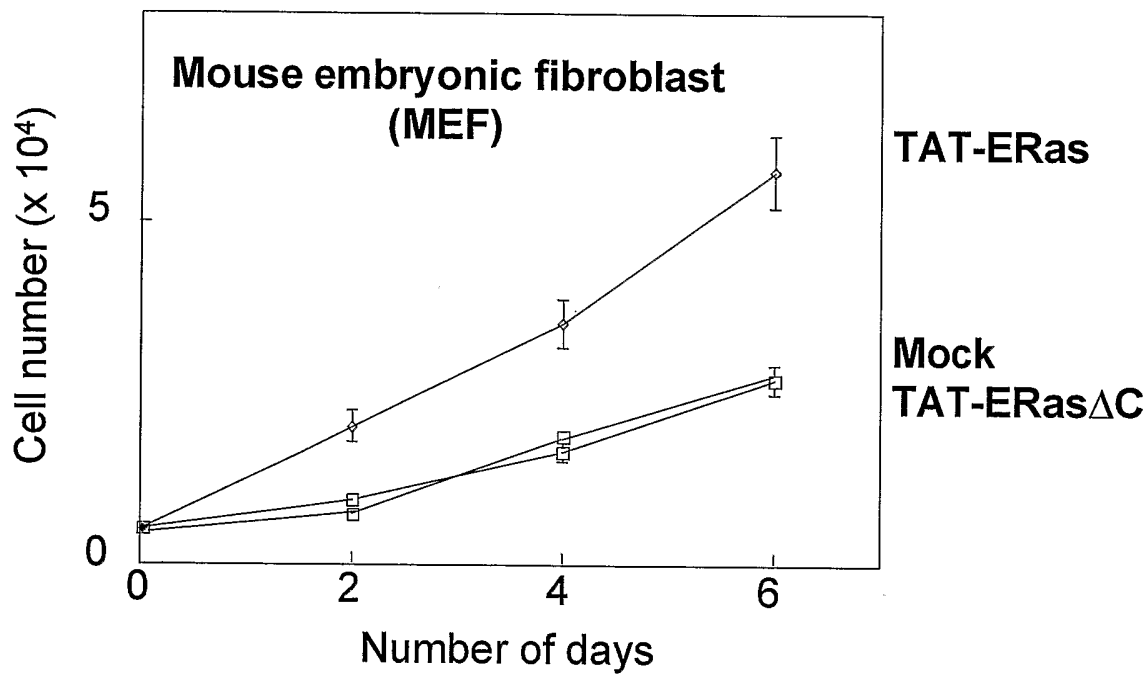
1/1

図 1

TAT-ERas



図 2



SEQUENCE LISTING

<110> Yamanaka, Shinya
Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Cell proliferation drug

<130> 533752

<150> JP 2003-347838

<151> 2003-10-07

<160> 26

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1077

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (178)..(861)

<400> 1

caggggtcgg gcaggtggga gggggaagct cacatctccg ccctctgctg cctctggggg 60

tagggagcat cctaaccccc aactgtccgg tcagatccgc ctactgcccc tcatcagact 120

gctactcctg ggagcacagc acctgctctt tacacctctt ccttgagctg ctgggga 177

atg gct ttg cct aca aag tct agc atc ttg gac ctg agc tcc ggc acc 225

Met Ala Leu Pro Thr Lys Ser Ser Ile Leu Asp Leu Ser Ser Gly Thr

1 5 10 15

cca tgc acc aga tct cca gag gaa agt cac gag gct tgg gca cag tgc 273

Pro Cys Thr Arg Ser Pro Glu Glu Ser His Glu Ala Trp Ala Gln Cys

20 25 30

aaa gat gct ggc agg cag cta ccc gag tac aag gca gtg gtg gtg ggt 321

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

2/24

35	40	45	
gca agt ggt gtt ggt aaa agt gct ctc acc atc cag atg act cac caa			369
Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Met Thr His Gln			
50	55	60	
tgc ttc gtg aaa gac cat gac ccc act atc caa gat tcc tac tgg aag			417
Cys Phe Val Lys Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys			
65	70	75	80
gaa gtg gcc agg gac aac gga ggc tac att cta aat gtt ctg gat aca			465
Glu Val Ala Arg Asp Asn Gly Gly Tyr Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr			
85	90	95	
tct ggg cag gat att cac cgg gct ctg cgt gac cag tgc ttg gca tct			513
Ser Gly Gln Asp Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Ser			
100	105	110	
ggt gat ggt gtg ctg ggc gtc ttt gct ctt gac gac ccc tcg tct ctg			561
Gly Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu			
115	120	125	
gac cag ttg cag cag ata tgg tcc acc tgg acc cct cac cac aag cag			609
Asp Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ser Thr Trp Thr Pro His His Lys Gln			
130	135	140	
cct ctg gta cta gtg ggc aac aag tgt gac ctg gtg acc act gct gga			657
Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly			
145	150	155	160
gat gct cat gct gcc gca gcc ctc ctt gct cac aag ttg ggg gcc ccc			705
Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Ala Pro			
165	170	175	
ttg gtg aag acc tca gcc aag acg cgg caa ggt gtg gag gaa gcc ttt			753
Leu Val Lys Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe			
180	185	190	
gcc ctg ctt gtc cat gag att cag agg gcc cag gag gct gtg gcc gaa			801
Ala Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Ala Gln Glu Ala Val Ala Glu			
195	200	205	
tca agc aag aag acc cga cac cag aaa gcc gtg tgt agc tgt ggc tgc			849

3/24

Ser Ser Lys Lys Thr Arg His Gln Lys Ala Val Cys Ser Cys Gly Cys
 210 215 220

tct gta gcc tga agatctttgt ctagcaaatt gacccttgtc tcatgtcaag 901
 Ser Val Ala
 225

gtgacaattc tcttgtaata agatctcct ctccgaccaa gttaccacag acatcttttt 961

attgtcattt ggtgagaagt tacgtggtaa catgggacat ccctcattga ctgtgtttta 1021

tgaaactcta tgcaaaatta aataaatgtt ttcaggattc aaagcttctt ttatac 1077

<210> 2

<211> 227

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Ala Leu Pro Thr Lys Ser Ser Ile Leu Asp Leu Ser Ser Gly Thr
 1 5 10 15

Pro Cys Thr Arg Ser Pro Glu Glu Ser His Glu Ala Trp Ala Gln Cys
 20 25 30

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

Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Met Thr His Gln
 50 55 60

Cys Phe Val Lys Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys
 65 70 75 80

Glu Val Ala Arg Asp Asn Gly Gly Tyr Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr
 85 90 95

4/24

Ser Gly Gln Asp Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Ser
 100 105 110

Gly Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu
 115 120 125

Asp Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ser Thr Trp Thr Pro His His Lys Gln
 130 135 140

Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly
 145 150 155 160

Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Ala Pro
 165 170 175

Leu Val Lys Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe
 180 185 190

Ala Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Ala Gln Glu Ala Val Ala Glu
 195 200 205

Ser Ser Lys Lys Thr Arg His Gln Lys Ala Val Cys Ser Cys Gly Cys
 210 215 220

Ser Val Ala
 225

<210> 3

<211> 1266

<212> DNA

<213> Homo sapiens

5/24

<220>

<221> CDS

<222> (252)..(953)

<400> 3

cgtgaggagg gaaggagaga tggggggacg tgggacaggg agaaaacaac ataatcata 60

tatatatagc atgcaaattg gaaggtgatc agcacacaat aggcattcaa taaatgttga 120

aataatgaca cccaactgtc tccttgcctt caaatggtct ccctaactg atccccctgtt 180

gtcttgcctt ttctcttccc acttgcagag cctgctgccc acgtctcttc cctgagctgc 240

ctgctgggggt c atg gag ctg cca aca aag cct ggc acc ttc gac ctg ggc 290

Met Glu Leu Pro Thr Lys Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly

1 5 10

ctg gcc aca tgg agc cct tcc ttc cag ggg gaa acc cac cgg gct cag 338

Leu Ala Thr Trp Ser Pro Ser Phe Gln Gly Glu Thr His Arg Ala Gln

15 20 25

gca cgc cgc agg gat gtt ggc agg cag ctg cct gag tac aag gct gtg 386

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

30 35 40 45

gtg gtg ggc gcc agt ggc gtg ggc aag agt gcg ctg acc atc cag ctg 434

Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu

50 55 60

aac cac cag tgc ttc gtg gag gac cac gac ccc acc atc cag gat tcc 482

Asn His Gln Cys Phe Val Glu Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser

65 70 75

tac tgg aag gag ttg acc ctg gac agt ggg gac tgc att ctg aat gtg 530

Tyr Trp Lys Glu Leu Thr Leu Asp Ser Gly Asp Cys Ile Leu Asn Val

80 85 90

ctg gac aca gca ggg cag gcc atc cat agg gcc ctg cgt gac cag tgc 578

Leu Asp Thr Ala Gly Gln Ala Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys

95 100 105

ctg gct gtc tgt gat ggt gtg ctg ggc gtc ttc gct ctc gat gac ccc 626

6/24

Leu Ala Val Cys Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro	
110	115 120 125
tcg tct ctg atc cag ctg cag cag ata tgg gcc acc tgg ggc cct cac	674
Ser Ser Leu Ile Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ala Thr Trp Gly Pro His	
	130 135 140
ccc gcc cag ccc ctt gtc ctc gtg ggc aac aag tgt gac ctt gtg acc	722
Pro Ala Gln Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr	
	145 150 155
act gct gga gat gct cat gcc gct gct gca gcc ctc gca cac agc tgg	770
Thr Ala Gly Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Leu Ala His Ser Trp	
	160 165 170
ggg gcc cac ttc gtg gag acc tcg gcc aaa aca cgg caa ggc gtg gag	818
Gly Ala His Phe Val Glu Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu	
	175 180 185
gag gcc ttt tcc ctg ctg gtc cat gag atc cag agg gtc cag gag gcc	866
Glu Ala Phe Ser Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Val Gln Glu Ala	
	190 195 200 205
atg gcg aag gag ccc atg gca agg tcc tgt agg gag aag acc cgg cac	914
Met Ala Lys Glu Pro Met Ala Arg Ser Cys Arg Glu Lys Thr Arg His	
	210 215 220
cag aag gcc acc tgc cac tgt ggc tgc tct gtg gcc tga aggtcttggc	963
Gln Lys Ala Thr Cys His Cys Gly Cys Ser Val Ala	
	225 230
caagaaatgt agacctttcc ccaggccagg gtgattgttc atttgacatg agaccctga	1023
ggcaactagc tttgaggac acatcaggta tactagggaa agatggacat ctctcttgtt	1083
ttcacttggg gaggggcttt ttggtaacat gggagtgcct aatgttgctt ttgttatgtc	1143
aagttgaaag attttgtgca aaattaaata aatgggtgttt tgggtttcaa agctgcctcc	1203
atgccgagtg ttgtgtgggt gggagtgaga ctgggtagaa tgttacttga gttgtgagaa	1263
ttc	1266

7/24

<210> 4
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Leu Pro Thr Lys Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly Leu Ala Thr
 1 5 10 15

Trp Ser Pro Ser Phe Gln Gly Glu Thr His Arg Ala Gln Ala Arg Arg
 20 25 30

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

Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Asn His Gln
 50 55 60

Cys Phe Val Glu Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys
 65 70 75 80

Glu Leu Thr Leu Asp Ser Gly Asp Cys Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr
 85 90 95

Ala Gly Gln Ala Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Val
 100 105 110

Cys Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu
 115 120 125

Ile Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ala Thr Trp Gly Pro His Pro Ala Gln
 130 135 140

8/24

Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly
 145 150 155 160

Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala His Ser Trp Gly Ala His
 165 170 175

Phe Val Glu Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe
 180 185 190

Ser Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Val Gln Glu Ala Met Ala Lys
 195 200 205

Glu Pro Met Ala Arg Ser Cys Arg Glu Lys Thr Arg His Gln Lys Ala
 210 215 220

Thr Cys His Cys Gly Cys Ser Val Ala
 225 230

<210> 5
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> *Macaca fascicularis*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(702)

<400> 5
 atg gag ctg cca aca aag cct ggc acc ttc gac ctg ggc ctg gcc aca 48
 Met Glu Leu Pro Thr Lys Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly Leu Ala Thr
 1 5 10 15

tgg agc cct tcc ttc cag ggg gaa acc cac cgg gca cag gca cgc tgc 96
 Trp Ser Pro Ser Phe Gln Gly Glu Thr His Arg Ala Gln Ala Arg Cys
 20 25 30

9/24

agg gat gtt ggc agg cag ctg cct gag tac aag gct gtg gtg gtg ggc	144
Arg Asp Val Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly	
35 40 45	
gcg agt ggc gtg ggc aag agt gcg ctg acc atc cag ctg aac cac cag	192
Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Asn His Gln	
50 55 60	
tgc ttc gtg gag gac cat gac ccc acc atc cag gat tcc tac tgg aag	240
Cys Phe Val Glu Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys	
65 70 75 80	
gag ttg acc ctg gac agt ggg gac tgc att ctg aat gtg ttg gac aca	288
Glu Leu Thr Leu Asp Ser Gly Asp Cys Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr	
85 90 95	
gca ggg cag gcc atc cat agg gcc ctg cgt gac cag tgc ctg gct gtc	336
Ala Gly Gln Ala Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Val	
100 105 110	
tgt gat ggt gtg ctg ggc gtc ttc gct ctc gat gac ccc tcg tct ctg	384
Cys Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu	
115 120 125	
atc cag ctg caa cag ata tgg gcc acc tgg ggc cct cac ccc gcc cag	432
Ile Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ala Thr Trp Gly Pro His Pro Ala Gln	
130 135 140	
ccc ctt gtc ctc gtg ggc aac aag tgt gac ctt gtg acc acc gct gga	480
Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly	
145 150 155 160	
gat gct cat gcc gct gct gca gcc ctt gca cac agc tgg ggg gcc cac	528
Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala His Ser Trp Gly Ala His	
165 170 175	
ttc gtg gag acc tca gcc aaa aca cgg caa ggc gtg gag gag gcc ttt	576
Phe Val Glu Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe	
180 185 190	
tct ctg ctg gtc cat gag atc cag agg gtc cag gag gcc atg gcc aag	624
Ser Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Val Gln Glu Ala Met Ala Lys	

10/24

195

200

205

gag ccc atg gca agg tcc tgt agg gag aag gcc cgg cac cag aag gcc 672
 Glu Pro Met Ala Arg Ser Cys Arg Glu Lys Ala Arg His Gln Lys Ala
 210 215 220

acc tgc cac tgt ggc tgc tct gtg gcc tga 702
 Thr Cys His Cys Gly Cys Ser Val Ala
 225 230

<210> 6
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 6

Met Glu Leu Pro Thr Lys Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly Leu Ala Thr
 1 5 10 15

Trp Ser Pro Ser Phe Gln Gly Glu Thr His Arg Ala Gln Ala Arg Cys
 20 25 30

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

Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Asn His Gln
 50 55 60

Cys Phe Val Glu Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys
 65 70 75 80

Glu Leu Thr Leu Asp Ser Gly Asp Cys Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr
 85 90 95

Ala Gly Gln Ala Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Val

11/24

100

105

110

Cys Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu
115 120 125

Ile Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ala Thr Trp Gly Pro His Pro Ala Gln
130 135 140

Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly
145 150 155 160

Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala His Ser Trp Gly Ala His
165 170 175

Phe Val Glu Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe
180 185 190

Ser Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Val Gln Glu Ala Met Ala Lys
195 200 205

Glu Pro Met Ala Arg Ser Cys Arg Glu Lys Ala Arg His Gln Lys Ala
210 215 220

Thr Cys His Cys Gly Cys Ser Val Ala
225 230

<210> 7

<211> 1006

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> CDS

12/24

<222> (116)..(820)

<400> 7

```

ggagacaagg agcacctgcc ttagaaatag aaggctcaca gccagtccca gctacaccct      60

ggcctgggaa gggcctgctg tccacatctc ttcctgagc tgcccgcttg gagcc atg      118
                                         Met
                                         1

gca cag cca aca aag cct gac atg ttt gat ttg ggc ctg ggc acc tgg      166
Ala Gln Pro Thr Lys Pro Asp Met Phe Asp Leu Gly Leu Gly Thr Trp
                    5                      10                      15

agc cct aga tcc cgg gag cag agc cac agg gct tgg ggg tca ccc tcc      214
Ser Pro Arg Ser Arg Glu Gln Ser His Arg Ala Trp Gly Ser Pro Ser
                    20                      25                      30

aag ggt gta ggc aag aag ctg cct gag tac aag gca gtg gtg gtg ggc      262
Lys Gly Val Gly Lys Lys Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly
                    35                      40                      45

gca agt ggt gtg gga aag agt gca ctg acc atc cag ctg aac aac cag      310
Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Asn Asn Gln
50                      55                      60                      65

tgc ttt gtg gaa gac cac gac ccc acc atc cag gat tcc tac tgg aag      358
Cys Phe Val Glu Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys
                    70                      75                      80

gag atg gcc cta gac cac gga ggc tgc att ctg aac gtg ctg gac aca      406
Glu Met Ala Leu Asp His Gly Gly Cys Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr
                    85                      90                      95

gcg ggg caa gcc act cat caa gcc ctg cgt gac cag tgt gtg gcg att      454
Ala Gly Gln Ala Thr His Gln Ala Leu Arg Asp Gln Cys Val Ala Ile
                    100                      105                      110

ggc gat ggt gtg ctg ggt gtc ttc gcc ctc gat gac ccc tca tct cta      502
Gly Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu
                    115                      120                      125

gcc cag ctg cag cag atg cgg gcc acc tgg ggc cca cac cac acc cag      550
Ala Gln Leu Gln Gln Met Arg Ala Thr Trp Gly Pro His His Thr Gln

```

13/24

130	135	140	145	
ccc ctt gtc ctt gtg ggc aac aaa tgt gac ctt gtg acc act act gga				598
Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Thr Gly				
	150	155	160	
gat gct cgt gcc gct gct gca gcc ctc gca aaa agc tgg ggg gcc cct				646
Asp Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala Lys Ser Trp Gly Ala Pro				
	165	170	175	
ttc gta gag acc tca gcc aag aca cgc cag ggt gtg gta gag gcc ttt				694
Phe Val Glu Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Val Glu Ala Phe				
	180	185	190	
tcc cta ctc atc cag gag atc caa agg gtc cgg gaa gcc atg gca aag				742
Ser Leu Leu Ile Gln Glu Ile Gln Arg Val Arg Glu Ala Met Ala Lys				
	195	200	205	
gag gcc acg aca ggg cca ggt ggg gat aaa ggc cgg cac cag aaa gcc				790
Glu Ala Thr Thr Gly Pro Gly Gly Asp Lys Gly Arg His Gln Lys Ala				
	210	215	225	
atg tgc cac tgt ggc tgc tct gtg gcc tga aggtcttaag tctagaaaag				840
Met Cys His Cys Gly Cys Ser Val Ala				
	230			
tggaccctcc cccagaccag ggtgatggtt ccttcacatg agccccgcc taccagcaag				900
tagctgtgtg gaacattggt ggtgtctctc tctggggag gttttctttt ggtgatgggc				960
tttttggcag tgtgggacat agtgttggtt gtgttatgtc aagttg				1006

<210> 8

<211> 234

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 8

Met	Ala	Gln	Pro	Thr	Lys	Pro	Asp	Met	Phe	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly	Thr
1				5					10				15		

14/24

Trp Ser Pro Arg Ser Arg Glu Gln Ser His Arg Ala Trp Gly Ser Pro
 20 25 30

Ser Lys Gly Val Gly Lys Lys Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val
 35 40 45

Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Asn Asn
 50 55 60

Gln Cys Phe Val Glu Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp
 65 70 75 80

Lys Glu Met Ala Leu Asp His Gly Gly Cys Ile Leu Asn Val Leu Asp
 85 90 95

Thr Ala Gly Gln Ala Thr His Gln Ala Leu Arg Asp Gln Cys Val Ala
 100 105 110

Ile Gly Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser
 115 120 125

Leu Ala Gln Leu Gln Gln Met Arg Ala Thr Trp Gly Pro His His Thr
 130 135 140

Gln Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Thr
 145 150 155 160

Gly Asp Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala Lys Ser Trp Gly Ala
 165 170 175

Pro Phe Val Glu Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Val Glu Ala
 180 185 190

15/24

Phe Ser Leu Leu Ile Gln Glu Ile Gln Arg Val Arg Glu Ala Met Ala
 195 200 205

Lys Glu Ala Thr Thr Gly Pro Gly Gly Asp Lys Gly Arg His Gln Lys
 210 215 220

Ala Met Cys His Cys Gly Cys Ser Val Ala
 225 230

<210> 9
 <211> 765
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> TAT-ERas

<400> 9
 atgggcgctg caggctgcaa gaaacgtcgc caacgtcgcc gtggatcatc aacaagtttg 60
 tacaaaaaag caggctgggg aatggctttg cctacaaagt ctagcatctt ggacctgagc 120
 tccggcacc ccatgcaccag atctccagag gaaagtcacg aggcttgggc acagtgcaaa 180
 gatgctggca ggcagctacc cgagtacaag gcagtgggtg tgggtgcaag tgggtttggt 240
 aaaagtgctc tcaccatcca gatgactcac caatgcttcg tgaagacca tgacccact 300
 atccaagatt cctactggaa ggaagtggcc agggacaacg gaggctacat tctaaatgtt 360
 ctggatacat ctgggcagga tattcaccgg gctctgcgtg accagtgett ggcatctggt 420
 gatggtgtgc tgggcgtctt tgctcttgac gaccctctgt ctctggacca gttgcagcag 480
 atatggtcca cctggacccc tcaccacaag cagcctctgg tactagtggg caacaagtgt 540
 gacctggtga ccaactgctgg agatgctcat gctgccgcag ccctccttgc tcacaagttg 600

16/24

ggggccccct tggatgaagac ctcagccaag acgcggcaag gtgtggagga agcctttgcc 660
 ctgcttgtcc atgagattca gagggcccag gaggtgtgg ccgaatcaag caagaagacc 720
 cgacaccaga aagccgtgtg tagctgtggc tgctctgtag cctga 765

<210> 10
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> TAT-ERas

<400> 10

Met Gly Ala Ala Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Trp Gly Met Ala Leu Pro Thr
 20 25 30

Lys Ser Ser Ile Leu Asp Leu Ser Ser Gly Thr Pro Cys Thr Arg Ser
 35 40 45

Pro Glu Glu Ser His Glu Ala Trp Ala Gln Cys Lys Asp Ala Gly Arg
 50 55 60

Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly
 65 70 75 80

Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Met Thr His Gln Cys Phe Val Lys Asp
 85 90 95

His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys Glu Val Ala Arg Asp
 100 105 110

17/24

Asn Gly Gly Tyr Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr Ser Gly Gln Asp Ile
 115 120 125

His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Ser Gly Asp Gly Val Leu
 130 135 140

Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu Asp Gln Leu Gln Gln
 145 150 155 160

Ile Trp Ser Thr Trp Thr Pro His His Lys Gln Pro Leu Val Leu Val
 165 170 175

Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly Asp Ala His Ala Ala
 180 185 190

Ala Ala Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Ala Pro Leu Val Lys Thr Ser
 195 200 205

Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe Ala Leu Leu Val His
 210 215 220

Glu Ile Gln Arg Ala Gln Glu Ala Val Ala Glu Ser Ser Lys Lys Thr
 225 230 235 240

Arg His Gln Lys Ala Val Cys Ser Cys Gly Cys Ser Val Ala
 245 250

<210> 11

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial

18/24

<220>

<223> TAT-S

<400> 11

agcttcacca tgggcgctgc aggtcgcaag aaacgtcgcc aacgtcgccg tg

52

<210> 12

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> TAT-AS

<400> 12

gatccacggc gacgttgcg acgtttcttg cgacctgcag cgccatggt ga

52

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> TAT peptide

<400> 13

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

<210> 14

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> TAT-ERas

<400> 14

19/24

Met Gly Ala Ala Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Trp Gly Met Glu Leu Pro Thr
 20 25 30

Lys Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly Leu Ala Thr Trp Ser Pro Ser Phe
 35 40 45

Gln Gly Glu Thr His Arg Ala Gln Ala Arg Arg Arg Asp Val Gly Arg
 50 55 60

Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly
 65 70 75 80

Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Asn His Gln Cys Phe Val Glu Asp
 85 90 95

His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys Glu Leu Thr Leu Asp
 100 105 110

Ser Gly Asp Cys Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr Ala Gly Gln Ala Ile
 115 120 125

His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Val Cys Asp Gly Val Leu
 130 135 140

Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu Ile Gln Leu Gln Gln
 145 150 155 160

Ile Trp Ala Thr Trp Gly Pro His Pro Ala Gln Pro Leu Val Leu Val
 165 170 175

20/24

Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly Asp Ala His Ala Ala
 180 185 190

Ala Ala Ala Leu Ala His Ser Trp Gly Ala His Phe Val Glu Thr Ser
 195 200 205

Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe Ser Leu Leu Val His
 210 215 220

Glu Ile Gln Arg Val Gln Glu Ala Met Ala Lys Glu Pro Met Ala Arg
 225 230 235 240

Ser Cys Arg Glu Lys Thr Arg His Gln Lys Ala Thr Cys His Cys Gly
 245 250 255

Cys Ser Val Ala
 260

<210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> FGF peptide

<400> 15

Ala Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10

<210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

22/24

<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FHV Coat-(35-49) peptide

<400> 19

Arg Arg Arg Arg Asn Arg Thr Arg Arg Asn Arg Arg Arg Val Arg
1 5 10 15

<210> 20
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> BMV Gag-(7-25) peptide

<400> 20

Lys Met Thr Arg Ala Gln Arg Arg Ala Ala Ala Arg Arg Asn Arg Trp
1 5 10 15

Thr Ala Arg

<210> 21
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> HTLV-II Rex-(4-16) peptide

<400> 21

Thr Arg Arg Gln Arg Thr Arg Arg Ala Arg Arg Asn Arg
1 5 10

<210> 22
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CCMV Gag-(7-25) peptide

<400> 22

Lys Leu Thr Arg Ala Gln Arg Arg Ala Ala Ala Arg Lys Asn Lys Arg
1 5 10 15

Asn Thr Arg

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> P22 N-(14-30) peptide

<400> 23

Asn Ala Lys Thr Arg Arg His Glu Arg Arg Arg Lys Leu Ala Ile Glu
1 5 10 15

Arg

<210> 24
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C07K14/47, C07K19/00, C12N15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/47, C07K19/00, C12N15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), Igaku Yakugaku Yokoshu (web)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TAKAHASHI, K. et al., Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. Nature, 2003.05., Vol.423, pages 541 to 545	1-17
<u>Y</u>	JP 2702285 B2 (Biogen Inc.), 03 October, 1997 (03.10.97), A & WO 94/04686 A1 & EP 656950 B1 & US 5674980 A	1-3, 6-9, <u>11-17</u> 4, 5, 10
<u>Y</u>	FUTAKI, S. et al., Arginine-rich Peptides. J.Biol.Chem., 2001, Vol.276, No.8, pages A 5836 to 5840	1, 2, 4, 6-9, <u>11-17</u> 3, 5, 10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 November, 2004 (09.11.04)Date of mailing of the international search report
22 November, 2004 (22.11.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015009

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	Lin YZ. et al., Inhibition of Nuclear Translocation of Transcription Factor NF- κ B by a Synthetic Peptide Containing a Cell Membrane-permeable Motif and Nuclear Localization Sequence. J.Biol. Chem., 1995, Vol.270, No.24, pages 14255 to 14258	1, 2, 5-9, <u>11-17</u> 3, 4, 10
<u>Y</u> A	Bauss F. et al., Effect of 17 β -Estradiol-Bisphosphonate Conjugates, Potential Bone-Seeking Estrogen Pro-Drugs, on 17 β -Estradiol Serum Kinetics and Bone Mass in Rats. Calcif. Tissue.Int., 1996, Vol.59, pages 168 to 173	<u>10-17</u> 1-9
<u>Y</u> A	Chambers I. et al., Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. Cell, 2003. 05., Vol.113, pages 643 to 655	<u>12, 13, 15, 16</u> 1-11, 14, 17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ C07K14/47, C07K19/00, C12N15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00, C12P21/02

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ C07K14/47, C07K19/00, C12N15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), 医学・薬学予稿集 (web)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Takahashi K. et al., Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. Nature, 2003.05., Vol.423, p.541-545	1-17
Y	JP 2702285 B2 (バイオジェン, インコーポレイテッド)	1-3, 6-9,
—	1997.10.03 & WO 94/04686 A1	<u>11-17</u>
A	& EP 656950 B1 & US 5674980 A	4, 5, 10

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
 09.11.2004

国際調査報告の発送日
 22.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 深草 亜子
 4N 3228
 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> — A	Futaki S. et al., Arginine-rich Peptides. J. Biol. Chem., 2001, Vol.276, No. 8, p.5836-5840	1, 2, 4, 6-9, <u>11-17</u> 3, 5, 10
<u>Y</u> — A	Lin YZ. et al., Inhibition of Nuclear Translocation of Transcription Factor NF- κ B by a Synthetic Peptide Containing a Cell Membrane-permeable Motif and Nuclear Localization Sequence. J. Biol. chem., 1995, Vol.270, No.24, p.14255-14258	1, 2, 5-9, <u>11-17</u> 3, 4, 10
<u>Y</u> A	Bauss F. et al., Effect of 17 β -Estradiol-Bisphosphonate Conjugates, Potential Bone-Seeking Estrogen Pro-Drugs, on 17 β -Estradiol Serum Kinetics and Bone Mass in Rats. Calcif. Tissue. Int., 1996, Vol.59, p.168-173	<u>10-17</u> 1-9
<u>Y</u> A	Chambers I. et al., Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. Cell, 2003.05., Vol.113, p.643-655	<u>12, 13, 15, 16</u> 1-11, 14, 17