

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-357702
(P2004-357702A)

(43) 公開日 平成16年12月24日(2004.12.24)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 B 0 3 0
A O 1 H 5/00	A O 1 H 5/00 A	2 G 0 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B 0 2 4
C O 7 K 14/485	C O 7 K 14/485	4 B 0 2 9
C O 7 K 16/22	C O 7 K 16/22	4 B 0 6 3
審査請求 未請求 請求項の数 21 O L (全 52 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-139527 (P2004-139527)	(71) 出願人	502235522
(22) 出願日	平成16年5月10日 (2004.5.10)		バイオテクノロジー開発技術研究組合
(31) 優先権主張番号	特願2003-131452 (P2003-131452)		東京都港区西新橋二丁目3番9号
(32) 優先日	平成15年5月9日 (2003.5.9)	(72) 発明者	磯貝 隆夫
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		茨城県稲敷郡阿見町大室511-12
		(72) 発明者	山本 順一
			千葉県木更津市高柳1486-1-E205
		(72) 発明者	西川 哲夫
			東京都板橋区氷川町27-3-403
		(72) 発明者	五十野 祐子
			千葉県木更津市高柳1485-A203
		(72) 発明者	杉山 友康
			東京都墨田区横川5-4-3-512
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 新規蛋白質およびそれをコードするDNA

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 完全長cDNAライブラリーに含まれるcDNAクローンの塩基配列を解析し、このうち配列が新規なcDNAについては、これがコードする蛋白質の生理活性を特定し、該生理活性に基づく蛋白質およびそれをコードするDNAの利用方法を提案すること。

【解決手段】 以下の(a)~(c)のいずれかの蛋白質；(a)ヒト由来の特定のアミノ酸配列からなるEGF活性を持つ蛋白質、(b)上記蛋白質のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ癌細胞または癌組織において発現が増加する蛋白質、(c)上記蛋白質のアミノ酸配列における部分アミノ酸配列からなり、かつ癌細胞または癌組織において発現が増加する蛋白質。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) ~ (f) のいずれかの蛋白質；

(a) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、

(b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ癌細胞または癌組織において発現が増加する蛋白質、

(c) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列における部分アミノ酸配列からなり、かつ癌細胞または癌組織において発現が増加する蛋白質、

(d) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ EGF 様生理活性を有する蛋白質

(e) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列における部分アミノ酸配列からなり、かつ EGF 様生理活性を有する蛋白質、

(f) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 10 ~ 12 のいずれかに記載のアミノ酸配列を少なくとも一つ含む蛋白質。

【請求項 2】

癌が乳癌、大腸癌、肺癌または膵臓癌である、請求項 1 に記載の蛋白質。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の蛋白質をコードする DNA。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載の蛋白質をコードする完全長 cDNA。

【請求項 5】

以下の (a) ~ (f) のいずれかの DNA；

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA、

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換および/または付加された塩基配列を有し、かつ癌細胞または癌組織において発現が増加する蛋白質をコードする DNA、

(c) 配列番号 1 に記載の塩基配列における部分塩基配列からなり、かつ癌細胞または癌組織において発現が増加する蛋白質をコードする DNA、

(d) 配列番号 1 に記載の塩基配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換および/または付加された塩基配列を有し、かつ EGF 様生理活性を有する蛋白質をコードする DNA、

(e) 配列番号 1 に記載の塩基配列における部分塩基配列からなり、かつ EGF 様生理活性を有する蛋白質をコードする DNA、

(f) 配列番号 1 に記載の塩基配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換および/または付加された塩基配列を有し、かつ配列番号 10 ~ 12 のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を少なくとも一つ含む DNA。

【請求項 6】

癌が乳癌、大腸癌、肺癌または膵臓癌である、請求項 5 に記載の DNA。

【請求項 7】

請求項 3 ~ 6 のいずれかに記載の DNA を含む組換えベクター。

【請求項 8】

請求項 3 ~ 6 のいずれかに記載の DNA または請求項 7 に記載の組換えベクターを導入した遺伝子導入細胞または該細胞からなる個体。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の細胞により産生される蛋白質。

【請求項 10】

請求項 3 ~ 6 のいずれかに記載の DNA の塩基配列中の連続した 5 ~ 100 塩基と同じ配

10

20

30

40

50

列を有するセンスオリゴヌクレオチド、当該センスオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、および、当該センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体、ならびに、当該塩基配列中の連続した15～30塩基と同じ配列を有するセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる2本鎖オリゴヌクレオチド、および当該2本鎖オリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から成る群から選ばれるオリゴヌクレオチド。

【請求項11】

請求項1、2または9のいずれかに記載の蛋白質に特異的に結合する抗体あるいはその部分フラグメント。

【請求項12】

抗体が請求項1、2または9のいずれかに記載の蛋白質の有する活性を中和する作用を有することを特徴とする請求項11に記載の抗体。

10

【請求項13】

請求項1、2または9のいずれかに記載の蛋白質と被検物質を接触させ、該被検物質による該蛋白質が有する活性の変化を測定することを特徴とする、該蛋白質の活性調節物質のスクリーニング方法。

【請求項14】

請求項1または2に記載の蛋白質をコードするDNAを発現する細胞または請求項8に記載の遺伝子導入細胞と被検物質を接触させ、該細胞に導入されているDNAの発現レベルの変化を検出することを特徴とする、該DNAの発現調節物質のスクリーニング方法。

20

【請求項15】

請求項1または2に記載の蛋白質のアミノ酸配列から選択される少なくとも1以上のアミノ酸配列情報および/または請求項3～6のいずれかに記載のDNAの塩基配列から選択される少なくとも1以上の塩基配列情報を保存したコンピュータ読み取り可能記録媒体。

【請求項16】

請求項1、2もしくは9のいずれかに記載の蛋白質、請求項3～6のいずれかに記載のDNAおよび/または請求項11もしくは12に記載の抗体を結合させた担体。

【請求項17】

生体試料中の請求項3～6のいずれかに記載のDNAの発現状態を測定することを特徴とする、癌の検出方法。

30

【請求項18】

生体試料中の請求項1または2に記載の蛋白質を、請求項11または12に記載の抗体またはその部分フラグメントを用いて免疫学的に測定することを特徴とする、癌の検出方法。

【請求項19】

生体試料中の請求項1または2に記載の蛋白質に対する自己抗体を、請求項1、2または9のいずれかに記載の蛋白質を用いて免疫学的に測定することを特徴とする、癌の検出方法。

【請求項20】

癌が乳癌、大腸癌、肺癌または膵臓癌である、請求項17～19のいずれかに記載の検出方法。

40

【請求項21】

請求項1、2もしくは9のいずれかに記載の蛋白質、請求項11もしくは12に記載の抗体、または請求項16に記載の担体からなる群から選ばれる少なくとも一つを含むことを特徴とする癌の検出を行うための試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な癌関連蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質をコードする完全長cDNA、該DNAを有する組換えベクター、該DNAの部分配列から成るオリゴ

50

ヌクレオチド、該DNAを導入した遺伝子導入細胞、および該蛋白質に特異的に結合する抗体等に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、世界的なレベルで様々な生物のゲノム配列の解明とその解析が進められている。既に約百数十の原核微生物、下等真核生物の出芽酵母、多細胞性真核生物である線虫で、その全ゲノム配列が決定された。30億塩基対といわれるヒトのゲノムについては2001年2月にその塩基配列のドラフトが発表されていたが、2003年4月に完全配列が解読され公表された。ゲノム配列を明らかにする目的は、全ての遺伝子の機能や制御、あるいは遺伝子間、蛋白質間、細胞間さらには個体間における相互作用のネットワークとして複雑な生命現象を理解するところにある。種々の生物種のゲノム情報から生命現象を解明していくことは、単に学術分野における研究課題として重要であるのみならず、そこで得られる研究成果をいかに産業上の応用へと発展させていくかという点で、その社会的な意義も大きい。

10

【0003】

ところが単にゲノム配列を決定しただけでは、全ての遺伝子の機能を明らかにできるわけではない。例えば酵母では、ゲノム配列から推定された約6,000の遺伝子の約半数しか、その機能を推定できなかった。一方、ヒトには約10万種類の蛋白質が存在するといわれる。そこで、ゲノム配列から明らかにされてくる膨大な量の新しい遺伝子の機能を、迅速かつ効率的に解明していくための「ハイスループット遺伝子機能解析システム」の確立が、強く望まれている。

20

【0004】

真核生物のゲノム配列では、多くの場合、一つの遺伝子がイントロンによって複数のエクソンに分断されている。そのため、ゲノム配列情報だけからそこにコードされる蛋白質の構造を正確に予測するには、多くの問題がある。一方、イントロンが除かれたmRNAから作製されるcDNAでは、蛋白質のアミノ酸配列の情報が一つの連続した配列情報として得られるため、容易にその一次構造を明らかにすることが可能である。ヒトのcDNAの研究では、これまでに500万以上のEST (Expressed Sequence Tags) データが公共データベースに公開されている。

【0005】

これらの情報は、ヒト遺伝子構造の解明やゲノム配列におけるエクソン領域の予測、あるいはその発現プロファイルの推定など、様々な角度から利用されている。ところが、これらのヒトEST情報の多くはcDNAの3'末端側近傍に集中しているため、特にmRNAの5'末端側近傍の情報が極端に不足している状況にある。また、世界の研究機関(ヘリックス研究所、かずさDNA研究所、東大医科学研究所、ドイツ癌研究センター、MGCプロジェクトなど)で行われている解析の結果明らかにされているcDNAは4万数千に上り、数的には3万数千と言われる遺伝子座の大半をカバーしていると思われるが、全長クローンとして取得されているcDNAの割合は80%程度であることや、重複やスプライシングバリエーションが含まれていることを考慮すると、まだ取得されていないcDNAは多数存在していると考えられる。

30

40

【0006】

完全長cDNAを取得できれば、その5'末端配列からゲノム配列上でのmRNA転写開始点が推定できる上、その配列の中に含まれるmRNAの安定性や翻訳段階での発現制御に関わる因子の解析が可能である。また、翻訳開始コドンであるatgを5'側に含むことから、正しいフレームで蛋白質への翻訳を行うことができる。したがって、適当な遺伝子発現系を適用することで、そのcDNAがコードする蛋白質を大量に生産したり、蛋白質を発現させてその生物学的活性を解析することも可能になる。このように、完全長cDNAの解析からはゲノム配列解析を相補する重要な情報が得られる。また、発現可能な全長cDNAクローンは、その遺伝子の機能の実証的な解析や産業分野での応用への展開において、その重要性はきわめて高い。

50

【0007】

一方、同一の遺伝子から転写修飾されたmRNAであっても、転写直後の前駆RNAから成熟mRNAを生成する過程でスプライシングを受ける際、遺伝子配列中一部のエクソンが挿入・欠失して結合する異性体（以下、これを「スプライシングバリエーションmRNA」と称することがある）がある。実際、これらのmRNAが翻訳されて生成される、複数種の類似の蛋白質（以下、これらを「スプライシングバリエーション」と称することがある）が生体内において確認されている。スプライシングバリエーションは、組織特異的、発生段階特異的、あるいは疾患特異的に発現し、それぞれ異なる機能を有していると考えられている。

【0008】

例えば、エストロゲン受容体は、10種類のエクソン欠失スプライシングバリエーションmRNAが様々なヒト組織より同定されている。このうち9種類が正常乳房組織で発現しているが、その中で、5番と6番のエクソンを欠いたmRNAの発現が、大部分の癌組織で有意に減少することが明らかにされている。また、5番のエクソンを欠いたmRNAは、癌の進行度に応じて、有意にその発現量が変動することが明らかにされている（例えば、非特許文献1を参照）。このようにスプライシングバリエーションの発現量が病態と有意な相関を示すことがある。

【0009】

このようなスプライシングバリエーションのmRNAあるいはcDNAも、従来のcDNAライブラリーやESTからは取得されにくく、転写開始点を含む完全長cDNAライブラリーにより取得される可能性の高いクローンである。

【0010】

中でも癌関連蛋白質は、1963年に α -フェトプロテイン（alpha-fetoprotein, AFP）が、続いて腫瘍胎児性抗原（carcino embryonic antigen, CEA）が報告されて以来、種々見出され、「腫瘍（癌）細胞が産生する物質又は腫瘍の存在に応じて非腫瘍細胞が産生する物質であり、その測定が腫瘍の存在を示唆し、臨床診断補助や転移・再発の早期発見に有用なもの」と定義される腫瘍マーカーとして、X線CT・超音波・MRIなどで得られる形態情報とは異なる悪性腫瘍の生物学的情報として活用されている。

【0011】

前癌細胞や癌細胞は、癌関連マーカー蛋白質を産生する特徴がある。これらの蛋白質はしばしば野生型蛋白質の異常型（修飾型）により構成されるが、それらは遺伝的変異または翻訳後のプロセシングの改変の結果として癌細胞により産生されるものである。あるいは、癌マーカーは、通常、遺伝子増幅または異常な転写調節の結果として、腫瘍細胞中で過剰発現した蛋白質でもあり得る。ある場合には、これら2種の現象は同時に生起し、病状進展中を通じて修飾蛋白質を集積し続ける。例えば、Ras、p53、c-myc、MUC-1、c-erbB2などの修飾型が、各種の癌に関連するものとして見出されている。

【0012】

癌関連蛋白質は、前癌細胞または癌細胞を保有する個体の組織および体液中のいずれにおいても見出される。それらのレベルは発癌過程の早期段階においては極めて低いですが、病状が進展する間に増加する。これらの蛋白質の検出は、日常の検査において癌の診断に効果的に用いられているが、残念なことに、これらの測定試薬には種々の限界がある。殊に、標準的な検査用の市販の抗体は、通例、治療が最も効果的な病状のごく早期の段階、例えば無症候性患者で見られるような低レベルの癌関連蛋白質の検出には感度が不十分である。加えて、大部分の市販の抗体は、癌関連マーカーの修飾型には特異的でなく、これらの蛋白質の野生型と交叉反応する。そのため、これらの市販抗体は、通例、癌が進行した段階で起こる、癌マーカー蛋白質の血清レベル中での実質的増加の検出においてのみ有用であった。

【0013】

例えば、乳癌マーカーであるCA15-3（carbohydrate antigen 15-3）の測定試薬

10

20

30

40

50

は、MUC1の修飾型および未修飾型の両方を検出し、MUC1の血清レベルの上昇がその特徴である、転移乳癌の診断には有用である。しかしながら、この測定試薬は、新生物または初期乳癌のスクリーニングには、これらの段階においてはMUC1の血清レベルが健常者におけるそれと有意に異ならないので、使用できない(例えば、非特許文献2を参照)。他の癌マーカー、例えば、CEAおよびCA19.9(carbohydrate antigen 19.9)は、転移乳癌および結腸直腸癌を有する患者の血清中で上昇するが、初期癌の患者ではそうならないと報告されている(例えば、非特許文献3、4を参照)。また、これらの癌マーカーの場合、市販の測定試薬は、蛋白質の修飾型と野生型とを区別できないため、使用上の限界がある。さらに、市販の抗体は、正常型の癌関連蛋白質と交叉反応することにより、偽陽性結果を導くこともある。従って、この分野では、これらの測定に使用し、前癌性および早期の発癌性変化を検出するための、より鋭敏でかつ特異的な抗体が必要とされていると同時に、上記の問題を生じさせない新しい癌関連蛋白質の提供が望まれている。

10

【0014】

特に、乳癌は、女性において主要な癌であり、欧米では女性の10人に1人が乳癌に罹ると言われている。日本における乳癌患者数は欧米に比べて少ない傾向にあったが、近年の生活様式の欧米化に伴い日本人の乳癌罹患率は急増し、1995年以降には女性の癌罹患率の1位となり、現在では、年間約3万人の女性が乳癌に罹患し、約8,000人以上が死亡している。

【0015】

乳癌の診断には、触診、超音波検査、マンモグラフィー(乳腺専用のX線(レントゲン)撮影)、細胞診あるいは組織診などが用いられてきた。しかし、早期に乳癌を検出するためには触診や超音波検査では限界があり、一方X線撮影は高価な装置およびそれを操作し造影図を解釈する高度に訓練された専門家が必要とされるのみならずX線被爆の機会を増やすという問題がある。また、細胞診や組織診も特定の施設における検体採取が必須であり、専門的な組織学的検査や解釈を必要とする侵襲性方法であるという問題がある。

20

【0016】

上記のとおり、特に血清中の癌マーカーによる癌の検出は、簡便に行える優れた方法であり、より精度の高い癌の検出が可能となる新規な癌マーカー蛋白質が求められている。

【非特許文献1】Poola I et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 82: 169-179 (2002)

30

【非特許文献2】Robertson, et al., Eur. J. Cancer, 26: 1127-1132 (1990)

【非特許文献3】Robertson et al., Cancer Immunol. Immunother., 133: 403-410 (1991)

【非特許文献4】Thomas et al., Br. J. Cancer 63: 975-976 (1991)

【非特許文献5】Payne, et al., Clin. Chem., 46: 175-182 (2000)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明は、新規な蛋白質、その蛋白質をコードするDNA、その蛋白質に特異的に結合する抗体等、およびそれらの用途の提供を課題としている。特に、本発明は、癌に関連する新規な蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質に特異的に結合する抗体、該DNAの転写産物に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド等、およびそれらを用いた診断薬等の新規な用途の提供を課題としている。

40

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明者らは、オリゴキャップ法(Maruyama, K., et al., Gene, 138: 171-174 (1994); Suzuki, Y. et al., Gene, 200: 149-156 (1997))を用いて取得されたスプライシングパリアントを含む配列が新規な完全長cDNAについて、該cDNAクローンの塩基配列の相同性に基つきデータベースを検索し、癌関連蛋白質をコードすると推定される

50

完全長 cDNA を選択した。そしてこれらの癌関連蛋白質をコードすると推定される該 cDNA のうち、TBAES2007379 (配列番号 1、2) が、癌に特異的に発現していることを見出し、TBAES2007379 がコードしている蛋白質が癌関連蛋白質であることを同定した。本発明は、これらの知見に基づいて成し遂げられたものである。

【0019】

すなわち本発明によれば、以下の 1 ~ 21 に記載の発明が提供される。

1. 以下の (a) ~ (f) のいずれかの蛋白質；
 - (a) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、
 - (b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ癌細胞または癌組織において発現が増加する蛋白質、
 - (c) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列における部分アミノ酸配列からなり、かつ癌細胞または癌組織において発現が増加する蛋白質、
 - (d) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ EGF 様生理活性を有する蛋白質、
 - (e) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列における部分アミノ酸配列からなり、かつ EGF 様生理活性を有する蛋白質、
 - (f) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 10 ~ 12 のいずれかに記載のアミノ酸配列を少なくとも一つ含む蛋白質。
2. 癌が乳癌、大腸癌、肺癌または膵臓癌である、前項 1 に記載の蛋白質。
3. 前項 1 または 2 に記載の蛋白質をコードする DNA。
4. 前項 1 または 2 に記載の蛋白質をコードする完全長 cDNA。
5. 以下の (a) ~ (f) のいずれかの DNA；
 - (a) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA、
 - (b) 配列番号 1 に記載の塩基配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換および/または付加された塩基配列を有し、かつ癌細胞または癌組織において発現が増加する蛋白質をコードする DNA、
 - (c) 配列番号 1 に記載の塩基配列における部分塩基配列からなり、かつ癌細胞または癌組織において発現が増加する蛋白質をコードする DNA、
 - (d) 配列番号 1 に記載の塩基配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換および/または付加された塩基配列を有し、かつ EGF 様生理活性を有する蛋白質をコードする DNA、
 - (e) 配列番号 1 に記載の塩基配列における部分塩基配列からなり、かつ EGF 様生理活性を有する蛋白質をコードする DNA、
 - (f) 配列番号 1 に記載の塩基配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換および/または付加された塩基配列を有し、かつ配列番号 10 ~ 12 のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を少なくとも一つ含む DNA。
6. 癌が乳癌、大腸癌、肺癌または膵臓癌である、前項 5 に記載の DNA。
7. 前項 3 ~ 6 のいずれかに記載の DNA を含む組換えベクター。
8. 前項 3 ~ 6 のいずれかに記載の DNA または前項 7 に記載の組換えベクターを導入した遺伝子導入細胞または該細胞からなる個体。
9. 前項 8 に記載の細胞により産生される蛋白質。
10. 前項 3 ~ 6 のいずれかに記載の DNA の塩基配列中の連続した 5 ~ 100 塩基と同じ配列を有するセンスオリゴヌクレオチド、当該センスオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、および、当該センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導體、ならびに、当該塩基配列中の連続した 15 ~ 30 塩基と同じ配列を有するセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる二本鎖オリゴヌクレオチド、および当該二本鎖オリゴヌクレオチドの

オリゴヌクレオチド誘導体から成る群から選ばれるオリゴヌクレオチド。

11. 前項1、2または9のいずれかに記載の蛋白質に特異的に結合する抗体あるいはその部分フラグメント。

12. 抗体が前項1、2または9のいずれかに記載の蛋白質の有する活性を中和する作用を有することを特徴とする前項11に記載の抗体。

13. 前項1、2または9のいずれかに記載の蛋白質と被検物質を接触させ、該被検物質による該蛋白質が有する活性の変化を測定することを特徴とする、該蛋白質の活性調節物質のスクリーニング方法。

14. 前項1または2に記載の蛋白質をコードするDNAを発現する細胞または前項8に記載の遺伝子導入細胞と被検物質を接触させ、該細胞に導入されているDNAの発現レベルの変化を検出することを特徴とする、該DNAの発現調節物質のスクリーニング方法。 10

15. 前項1または2に記載の蛋白質のアミノ酸配列から選択される少なくとも1以上のアミノ酸配列情報および/または前項3～6のいずれかに記載のDNAの塩基配列から選択される少なくとも1以上の塩基配列情報を保存したコンピュータ読み取り可能記録媒体。

16. 前項1、2もしくは9のいずれかに記載の蛋白質、前項3～6のいずれかに記載のDNAおよび/または前項11もしくは12に記載の抗体を結合させた担体。

17. 生体試料中の前項3～6のいずれかに記載のDNAの発現状態を測定することを特徴とする、癌の検出方法。

18. 生体試料中の前項1または2に記載の蛋白質を、前項11または12に記載の抗体またはその部分フラグメントを用いて免疫学的に測定することを特徴とする、癌の検出方法。 20

19. 生体試料中の前項1または2に記載の蛋白質に対する自己抗体を、前項1、2または9のいずれかに記載の蛋白質を用いて免疫学的に測定することを特徴とする、癌の検出方法。

20. 癌が乳癌、大腸癌、肺癌または膵臓癌である、前項17～19のいずれかに記載の検出方法。

21. 前項1、2もしくは9のいずれかに記載の蛋白質、前項11もしくは12に記載の抗体、または請求項16に記載の担体からなる群から選ばれる少なくとも一つを含むことを特徴とする癌の検出を行うための試薬キット。 30

【発明の効果】

【0020】

本発明のDNAによりコードされる蛋白質は癌細胞または癌組織において発現が増加することから、該蛋白質あるいは該蛋白質に対する抗体、該蛋白質をコードするDNAもしくはRNAもしくはその一部を用いた、各種の癌、例えば乳癌、大腸癌、肺癌、膵臓癌等の診断薬の開発に有用である。また、該蛋白質が関連する疾患等に作用し得る医薬品の開発に有用である。さらに該蛋白質をコードするDNAを用いた遺伝子治療、該蛋白質をコードするDNA配列より得られたsiRNA、アンチセンスRNAもしくはDNAもしくは各種アプタマーを利用した、生体内における該蛋白質もしくは該蛋白質をコードするmRNAに対する発現抑制剤として利用することも可能である。 40

【0021】

さらに詳述すれば、乳癌組織から選択・単離された本発明の遺伝子は、乳癌細胞、前癌状態の細胞またはこれらの細胞を含む組織で有意に発現が上昇していることから、この遺伝子を各種の癌の、例えば乳癌の、予防、治療または診断に用いることができる。

【0022】

例えば、本発明の遺伝子がコードする蛋白質が、乳癌の進展および/または転移に関与する場合には、転移先の組織において本蛋白質に結合する蛋白質(例えばリガンドなど)は、転移に対する予防や治療に利用できると考えられる。後述するように、本発明の遺伝子がコードする蛋白質を利用してそのリガンドを単離することが可能となり、本発明の遺伝子がコードする蛋白質とそれに結合する蛋白質との結合を競合的に阻害する 50

化合物は、乳癌の進展、転移を予防するための医薬品候補化合物となる。

【0023】

本発明によって提供される塩基配列からなる遺伝子は、特に乳癌の発生に密接に関連していると言える。そのため、この遺伝子の発現や、この遺伝子によってコードされる蛋白質の作用を調節することによって、乳癌の診断や治療を達成できるものと考えられる。

【0024】

すなわち、生体内における本発明の遺伝子の発現を阻害すれば、乳癌の発生、進行、および転移を効果的に抑制できる。あるいは、本発明の蛋白質の働きを阻害することによっても、乳癌の抑制が達成される。前記遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンス核酸医薬や、あるいはその転写調節領域を明らかにした上でデコイ核酸によって発現を阻害することができる。蛋白質の働きそのものを阻害するには、この蛋白質に結合する化合物の投与によって活性部位の立体構造に変化を与えたり、あるいは蛋白質とその標的化合物との結合を妨げることが有効である。

10

【0025】

さらに、本発明の蛋白質を利用して癌ワクチンを開発することもできる。すなわち本発明の遺伝子によってコードされる蛋白質やその断片に対する免疫応答を誘導することができる。このような免疫応答は、本発明の蛋白質やその断片を投与することによって引き起こされる。生体内への蛋白質の投与は、蛋白質の投与や、それをコードする遺伝子の導入と発現によって達成できる。必要な遺伝子は、アデノウイルスベクターや、レトロウイルスベクターを用い、公知の方法に基づいて導入することができる。

20

【0026】

さらに、本発明の遺伝子は乳癌以外の癌においても同様の役割を果たしている可能性が考えられ、乳癌と同様に、癌の予防や治療、あるいは悪性度の予測に用いることができる。すなわち、配列番号1(アミノ酸配列は配列番号2)で示される配列を持つ遺伝子「TBAES2007379」は、乳癌細胞のみならず大腸癌細胞、肺癌細胞、膵臓癌細胞またはこれらの癌細胞を含む組織においても発現が有意に上昇することが判明した。

【0027】

したがって、ヒトにおいて分離が進んでいないスプライシングバリエーションを含む新規な癌関連蛋白質の全長cDNAを提供する意義は大きく、この遺伝子が関与している種々の疾患に対する診断薬または医薬品の開発に利用され得る。また、この遺伝子がコードする蛋白質または該蛋白質に対する抗体に、診断薬または医薬品としての有用性を期待できる。したがって、新規なヒト蛋白質をコードするcDNAの全長を取得することには大きな意義がある。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

以下、本発明をさらに詳細に説明するが、これらの記載は本発明の実施態様の一例(代表例)であり、本発明の範囲を限定するものではない。

(1) 完全長cDNAの取得

本発明のDNAは、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、または配列番号2に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個(ここで、数個とは、例えば5個以下、好ましくは3個以下、より好ましくは2個以下を意味する)のアミノ酸残基の置換、欠失および/または付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ癌細胞または癌組織において発現が増加する蛋白質をコードし得るものであればいかなるものであってもよい。具体的には、該アミノ酸配列をコードする翻訳領域(以下、「オープンリーディングフレーム」または「ORF」と称することがある)のみでも、あるいはそのcDNAの全長を含むものでよい。

40

【0029】

より具体的には、cDNAの全長を含むDNAとしては、例えば配列番号1に記載の塩基配列からなるDNA等が挙げられる。また、その翻訳領域としては、配列番号1の塩基

50

番号70~2118(終止コドンを含む)に示される配列を有するものが挙げられる。さらに上記のcDNAの全長でなくても、上記翻訳領域とその3'および/または5'端に隣接する、翻訳領域の発現に最低限必要な部分を含むもの等も本発明のDNAに含まれる。

【0030】

本発明のDNAは、これを取得できる方法であればいかなる方法により取得したものであってもよいが、具体的には例えば下述の方法により取得することができる。まず、ヒトの組織あるいは培養細胞等からそれ自体既知の通常用いられる方法によりmRNAを調製する。次に、このmRNAを鋳型としてオリゴキャップ法(Maruyama, K., et al., Gene, 138: 171-174 (1994))によりcDNAを取得する。具体的には、取得したmRNAについて酸性ピロフォスファターゼにより5'キャップをはずし、その後露出した5'末端のリン酸基を標的に、オリゴキャップリンカーをRNAライゲースを用いて連結する。ここで、キャップ構造を5'末端に有していないRNA分子について、上記オリゴキャップリンカーが結合しないように、予め5'末端に存在するリン酸基を、5'キャップは外さないが5'端のリン酸基のみ外す活性を有するフォスファターゼ等を用いて外しておくことは有効である。このRNA分子を鋳型として、3'側のプライマーとしてオリゴdTプライマーを用いて逆転写酵素により逆転写を行った後、RNA鎖を分解除去する。

10

【0031】

さらに取得された1本鎖DNAを鋳型として、上記オリゴキャップリンカーの部分配列を有するオリゴヌクレオチドを5'プライマーとし、3'末端に特異的なプライマー(オリゴdTプライマー等)を用いてポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)を行うことにより完全長cDNAライブラリーを作製することができる。ここで、5'プライマーおよび3'プライマーは、上記合成オリゴヌクレオチドおよび逆転写プライマーの全長に対して相補的なものではなく、3'側に3~10塩基ずらした配列を用いることが好ましい。プライマーの鎖長としては、通常15~100塩基、好ましくは15~30塩基が挙げられるが、増幅するcDNAの鎖長が長い場合には25~35塩基の長さとするのが好ましく、また、Long and Accurate PCR(LA PCR: 林健志、実験医学別冊・PCRの最新技術、羊土社; Cheng, S. et al., Nature 369: 684-685 (1994))を用いることが好ましい。

20

【0032】

このようにして取得されたcDNAは、これを適当なクローニングベクターに挿入してクローニングを行う。ここで用いられるベクターとしては、取得されたcDNAクローンを細胞に導入して該cDNAがコードする蛋白質を発現できるような蛋白質発現用ベクターが好ましく用いられる。具体的には例えば、宿主が哺乳動物細胞等の場合にはpME18SFL3(Genbank AB009864)等が好ましく、また大腸菌の場合には、pET3、pET11(ストラタジーン社製)、pGEX(アマシャムファルマシアバイオテク社製)等が挙げられ、酵母の場合にはpESP-Iエクスプレッションベクター(ストラタジーン社製)等が挙げられ、さらに昆虫細胞の場合にはBacPAK6(クロンテック社製)等が用いられる。また宿主が動物細胞の場合には、ZAP Express(ストラタジーン社製)、pSVK3(アマシャムファルマシアバイオテク社製)等が挙げられる。

30

40

【0033】

かくして取得されるcDNAライブラリーは、それ自体既知の通常用いられる方法により塩基配列の解析を行う。本発明のDNAは、取得されたcDNAの5'末端あるいは3'末端の塩基配列を解析し、これをNCBI(National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)で運用しているGenbank、EMBL、DDBJ、dbEST等の塩基配列データベースをBLAST(Basic local alignment search tool; Altschul, S.F., et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410(1990))を用いて検索し、その全長について完全に一致する配列が見出されない場合は新規として以下の解析に供することとした。

50

【0034】

上記でcDNAの配列が新規であるとされたクローン、すなわち完全長cDNAの塩基配列を有するDNAとしては、例えば配列番号1に記載の塩基配列からなるDNA等が挙げられ、これらの塩基配列がコードするアミノ酸配列は配列番号2に示すものが挙げられる。さらにその翻訳領域としては、具体的には配列番号1の塩基番号70～2118（終止コドンを含む）に示される配列を有するものが挙げられる。さらに上記のcDNAの全長でなくても、上記翻訳領域とその3'および/または5'端に隣接する、翻訳領域の発現に最低限必要な部分を含むもの等も本発明のDNAに含まれる。

【0035】

さらに、本発明のDNAは、上述の方法により取得されたものでも、また合成されたものでもよい。DNAの塩基配列の置換は、例えばサイトダイレクテッドミュータジェネシスキット（宝酒造社製）や、クイックチェンジサイトダイレクテッドミュータジェネシスキット（ストラタジーン社製）等の市販キットで容易に行うことができる。

【0036】

かくして取得され、塩基配列が決定され、また機能が推定される本発明のDNAは上記の配列番号1に記載の塩基配列、あるいはその翻訳領域として上記に示した塩基配列を有するものだけでなく、これらの塩基配列において、1もしくはは数個（ここで、言う数個とは、例えば15個以下、好ましくは9個以下、より好ましくは6個以下を意味する）の塩基が欠失、置換および/または付加された塩基配列を有し、かつ癌細胞または癌組織において発現が増加する蛋白質をコードするDNA等も含まれる。これらDNAには、配列番号2に記載のアミノ酸配列において1もしくはは数個のアミノ酸配列が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、さらに癌細胞または癌組織において発現が増加する蛋白質をコードするものも含まれる。

【0037】

(2) 完全長cDNAの塩基配列およびアミノ酸配列の解析

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/web/GenBank>)、EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>)、DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)、dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>)等の塩基配列データベースを対象としたBLASTによる相同性検索 (homology search) を行い取得されたcDNAの全長として新規な塩基配列は、さらに、配列の詳細な解析として、NRDB蛋白質データベース (SWISS-PROT (http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/SwissProt_db/swisshome.html))、PIR (<http://pir.georgetown.edu/pirwww/pirhome.shtml>)、TRMBL (<http://kr.expasy.org/sprot/sprot-search.html>)、GENPEPT (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genbank>)、PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/index.html>)、PRF (<http://www.prf.or.jp/en/>))から作成された重複のないアミノ酸配列のデータベース)等のアミノ酸配列データベースを対象としたBLASTによる相同検索等を行うことにより、該塩基配列がコードする蛋白質の機能を推定することができる。BLASTによる相同性検索においては、検索の結果得られた相同性が十分有意なヒット配列に付随する種々のアノテーション情報から、解析対象としているクローンの機能を推定することができる。その機能予測の具体例として以下に説明する。

【0038】

配列番号1に記載の塩基配列を有するDNA (TB AES 2007379) は、3119塩基から成り、そのうち塩基番号70から2118までがオープンリーディングフレーム (終止コドンを含む) である。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列は、682アミノ酸残基から成る (配列番号2)。TB AES 2007379は、配列データベース (RefSeq) の登録記号NM020974 (SCUBE2 (Signal peptide-CUB-EGF-like domain containing protein 2)) のORF領域をカバーする22個のエクソンのうち4つのエクソンが欠失しているスプライシングバリエーションであり配列は新規である (図2参照)。なお、NM020974は、詳しくはSCUBE2の「SCUBE2a」と呼ばれるバリエーションであったが、SCUBE2の中でもこのSCUBE2

a が最も広く存在することで知られ、S C U B E 2 と略記されることも多いことから、本実施例中においては、これを S C U B E 2 と称する。

【0039】

なお、配列の詳細な解析に先立つ予備的相同性検索の場合は G e n B a n k、S w i s s - P r o t、U n i G e n e、N R D B、R e f S e q (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/refseq.html>) といった各データベースを対象に B L A S T や F A S T A など
10
で相同性検索を行い、ヒットした遺伝子とそれがコードしている蛋白質の機能を参照することで本発明の c D N A がコードしている蛋白質の機能を推定することができる。また、構造からの予測においては全塩基配列から推定されたアミノ酸配列に対して、シグナル配列、膜貫通領域の予測ならば P S O R T (K. Nakai & M. Kanehisa, Genomics, 14: 897-911 (1992)) や S O S U I (T. Hirokawa et al. Bioinformatics, 14: 378-379 (1998)、三井情報開発株式会社販売)、M E M S A T (D.T. Jones, W.R. Taylor & J.M. Thornton, Biochemistry, 33: 3038-3049 (1994)) など、またモチーフやドメインの予測ならば P f a m や P R O S I T E (<http://www.expasy.ch/prosite/>) 等に対して検索を行うことによ
10
って、クローン中にコードされる蛋白質のより詳細な機能予測が可能である。

【0040】

このようにして、新規な塩基配列を有することが明らかとなった T B A E S 2 0 0 7 3 7 9 (配列番号1) について、G e n B a n k、S w i s s - P r o t、N R D B、R e f S e q の各データベースを対象に相同性検索を行うことができる(実施例3および5参照)。また全長塩基配列から推定されたアミノ酸配列に対して P S O R T、S O S U I を
20
用いたシグナル配列、および膜貫通領域の検索を行うことができる(実施例4参照)。

【0041】

また、S w i s s - P r o t ヒットデータ、および N R D B、R e f S e q ヒットデータが、ヒトの遺伝子と疾患のデータベースである Online Mendelian Inheritance in Man (O M I M) に登録されている遺伝子、蛋白質であれば、疾患関連蛋白質と推定できる(実施例5参照)。このようにして、アノテーションを基本とした機能予測(S w i s s - P r o t のヒットデータであればキーワードを参照する。N R D B、R e f S e q のヒットデータであれば Definition や Reference 情報を参照する)、および推定 O R F に対する P S O R T を用いたシグナルシーケンス検索、S O S U I を用いた膜貫通領域の検索、O M I M 登録の結果をあわせて、14種類の機能カテゴリー(分泌・膜蛋白質、糖蛋白関
30
連蛋白質、シグナル伝達関連蛋白質、転写関連蛋白質、疾患関連蛋白質、酵素・代謝関連蛋白質、細胞分裂・増殖関連蛋白質、細胞骨格関連蛋白質、核蛋白質・R N A 合成関連蛋白質、蛋白質合成・輸送関連蛋白質、細胞防御関連蛋白質、発生・分化関連蛋白質、D N A ・R N A 結合蛋白質、A T P ・G T P 結合蛋白質)への分類を行うことができる。

具体的には、配列番号2のアミノ酸配列を有する蛋白質は、分泌・膜蛋白質に属すると推定できる。

【0042】

(3) 新規 c D N A がコードする蛋白質のアミノ酸配列のモチーフおよびドメイン解析

蛋白質全体の構造はモチーフ、ドメインといった最小限構造の寄せ集めで成り立っており、その結果、蛋白質全体としての機能が発揮されると考えられるので、本発明において
40
全塩基配列が明らかになった新規な完全長 c D N A がコードする蛋白質のアミノ酸配列に対して、種々の蛋白質が有する最小単位の共通したモチーフ、ドメイン構造に着目し、本発明の蛋白質を解析し、共通となるモチーフ、ドメイン構造もしくは共通となるモチーフ、ドメイン構造機能の解析を行うことができる。具体的には、H M M E R (隠れ Markov モデルによる配列解析手法; Eddy, S. R., Bioinformatics 14: 755-763 (1998)) の機能群のひとつである H M M P F A M による蛋白質特徴検索(profile search: <http://pfam.wustl.edu>) 等を行うことにより、ドメインやモチーフ構造の解析から、その蛋白質が全体として細胞内でどのような働きを担っているかということをも分子レベルで予測することができる(実施例4および6参照)。H M M P F A M は、P f a m という蛋白質プロファイルを集積したデータベース中にあるエントリーが有するアミノ酸配列の特徴を、解析対象で
50

ある塩基配列のコードするアミノ酸配列が有するかどうかを洗い出す方法による解析である。プロファイルは一連の同一特徴を持つ蛋白質群から抽出されており、一配列対一配列の全長に亘る比較では明確化できない機能でも、配列中にその特徴領域があればこれを見出し機能予測ができる。このように、それがコードする蛋白質が特定の活性を有すると予測される cDNA は、後述する生化学的実験によりその特定の活性を確認することができる。

【0043】

例えば、アミノ酸配列中にシグナル配列、膜貫通領域、核移行シグナル、糖鎖付加シグナル、リン酸化部位、および Zinc finger モチーフ、SH3 ドメイン等を見出すことにより、本発明の cDNA がコードしている蛋白質の共通となる機能推定を試みることができる。特にモチーフ、ドメインなどの構造はいくつかの蛋白質に共通して見出される部分配列構造で、蛋白質の最小限機能構造であり、現在までに機能が明らかとなっているもの、なっていないもの全て合わせて Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) においては 4832 種類が同定され、データベース化されている。

10

【0044】

さらに、本発明において全塩基配列が明らかになった新規な完全長 cDNA を有するクローンについて、推定されたアミノ酸配列の Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) に対するドメイン検索の結果（実施例 6 参照）から得られるヒットデータのドメイン、モチーフ名やアクセッション番号を用いて、Pfam のサイト内や InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)、PROSITE (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/prosite-list.pl>) 等の各リンク先における各ドメイン、モチーフの詳細な説明や、特に PROSITE においては独自の機能カテゴリー分類を参照することができる。このようにして、Pfam でヒットしたクローン中にコードされる蛋白質の機能予測を行い、14 種類の機能カテゴリー（分泌・膜蛋白質、糖蛋白関連蛋白質、シグナル伝達関連蛋白質、転写関連蛋白質、疾患関連蛋白質、酵素・代謝関連蛋白質、細胞分裂・増殖関連蛋白質、細胞骨格関連蛋白質、核蛋白質・RNA 合成関連蛋白質、蛋白質合成・輸送関連蛋白質、細胞防御関連蛋白質、発生・分化関連蛋白質、DNA・RNA 結合蛋白質、ATP・GTP 結合蛋白質）への分類を行うことができる。

20

【0045】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列は、EGF-like と呼ばれるドメイン（EGF 様ドメイン）、および EGF 様ドメインの繰り返し（EGF 様リピート）を有している。そのドメイン、リピートが有する性質より、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質は EGF 様生理活性、すなわち EGF 様ドメインまたは EGF 様リピートを有する蛋白質と同様の生理活性を有していると考えられる。また、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列は、トリプシンインヒビター様システインリッチドメイン、ケラチン (high sulfur B2 protein) モチーフ、グラニュリンモチーフといった、膜蛋白質に特徴的であるシステインリッチなモチーフ、ドメインを有する。

30

【0046】

なお、モチーフやドメインの機能が必ずしも上記に示す機能カテゴリーの一つのみに属するわけではないため、いずれの予測された機能カテゴリーにも該当する可能性がある。またこれら以外に Pfam でヒットデータがなかった場合でも、今後蛋白質のデータの蓄積と共に新たなドメイン、モチーフが見い出された場合、再びクローンの推定アミノ酸配列を新しいデータベースに対して解析することで新たな機能を有したドメイン、モチーフが発見され、カテゴリー分類できる可能性がある。

40

【0047】

(4) 本発明の cDNA がコードする蛋白質

本発明の DNA がコードする蛋白質の翻訳領域は、例えば、該 DNA が有する塩基配列について 3 種類の読み枠によりアミノ酸に変換していき、最も長いポリペプチドをコードする範囲を本発明の蛋白質の翻訳領域としてそのアミノ酸配列を推定することができる。このようなアミノ酸配列として例えば、配列番号 2 に記載のもの等が挙げられる。また、

50

本発明の蛋白質は、上記のアミノ酸配列に限られるものではなく、該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ癌細胞または癌組織において発現が増加するものも含まれる。

【0048】

本発明の蛋白質の取得方法としては、(1)に記載の本発明のDNAを適当な方法により転写/翻訳する方法が好ましく用いられる。具体的には、適当な発現用ベクターもしくは適当なベクターに適当なプロモーターとともに挿入した組換えベクターを作製し、この組換えベクターで適当な宿主微生物を形質転換したり、適当な培養細胞に導入することにより発現させ、これを精製することにより取得することができる。

【0049】

また、そのN末端またはC末端に適当なタグが融合するように設計されたベクターなどに挿入してタグを付加した蛋白質も本発明の蛋白質に含まれる。タグとして具体的には、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン、Flag、ヒトIgGのFc領域などが挙げられる。

【0050】

上記形質転換体が産生する蛋白質には、蛋白質合成時に重原子などで置換・修飾したアミノ酸を取り込ませることにより修飾することができる。また、蛋白質を、精製の前または後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することにより修飾蛋白質とすることができる。例えば、N末端アセチル化、C末端アミド化などの末端修飾、糖鎖付加、脂質付加、アシル化、メチル化、スルホン化、カルボキシル化、水酸化、リン酸化、ADP-リボシル化などであるが、必ずしもこれらに限定されない。これらの修飾蛋白質も本発明の蛋白質と機能的に同等なものであれば本発明の範囲に含まれる。ある蛋白質が本発明の蛋白質と機能的に同等であるかどうかは、本発明の蛋白質が備える生物学的な活性、例えば抗原性などを指標として、該活性のある蛋白質が有するかどうかを調べることによって確認することができる。

【0051】

また、上記形質転換体が産生する蛋白質を、精製の前または後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することにより修飾蛋白質とすることができる。これらの修飾蛋白質も上記したように本発明の蛋白質と機能的に同等なものであれば本発明の範囲に含まれる。

【0052】

本発明の蛋白質の産生を行う際、本発明のDNAを含む組換えベクターの作製に用いるベクターとしては、形質転換体内で該DNAが発現されるものであれば特に制限はなく、プラスミドベクター、ファージベクターのいずれでもよい。これらのうち通常は、該DNAが導入される宿主に適したプロモーター等の発現制御領域DNAが既に挿入されている市販の蛋白質発現用ベクターを用いる。このような蛋白質発現用ベクターとして、具体的には例えば、宿主が大腸菌の場合では、pET3、pET11(ストラタジーン社製)、pGEX(アマシャムファルマシアバイオテク社製)等が挙げられ、酵母の場合ではpESP-Iエクスプレッションベクター(ストラタジーン社製)等が挙げられ、さらに昆虫細胞の場合ではBacPAK6(クロンテック社製)等が用いられる。また宿主が動物細胞の場合では、ZAP Express(ストラタジーン社製)、pSVK3(アマシャムファルマシアバイオテク社製)が挙げられ、宿主が哺乳動物細胞等の場合にはpME18SFL3(Genbank AB009864)等が好ましい。

【0053】

発現制御領域が挿入されていないベクターを用いる場合には、発現制御領域として少なくともプロモーターを挿入する必要がある。ここでプロモーターとしては、宿主微生物または培養細胞が保有するプロモーターを用いることができるが、これに限られるものではなく、具体的には例えば、宿主が大腸菌の場合にはT3、T7、tac、lacプロモーター等を用いることができ、酵母の場合にはnmt1プロモーター、Gal1プロモーター等を用いることができる。昆虫細胞の場合には、ポリヘドリンプロモーター等を用いる

10

20

30

40

50

ことができる。また宿主が動物細胞の場合にはSV40プロモーター、CMVプロモーター等が好ましく用いられる。

【0054】

また哺乳動物由来のプロモーターが機能可能な宿主を用いる場合には、本発明の遺伝子に固有のプロモーターを用いることもできる。これらのベクターへの本発明のDNAの挿入は、該DNAまたはこれを含むDNA断片をベクター中のプロモーターの下流に該遺伝子DNAがコードする蛋白質のアミノ酸配列を連結して行えばよい。

【0055】

このようにして作製した組換えベクターは、それ自体既知の方法により後述する宿主を形質転換して、DNA導入体を作製することができる。宿主への該ベクターの導入方法として、具体的には、ヒートショック法(J. Mol. Biol., 53: 154 (1970))、リン酸カルシウム法(Science, 221: 551 (1983))、DEAEデキストラン法(Science, 215: 166 (1982))、インビトロパッケージング法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 581 (1975))、ウイルスベクター法(Cell, 37: 1053 (1984))、および電気パルス法(Chu et al., Nuc. Acids Res., 15: 1331 (1987))等が挙げられる。

10

【0056】

DNA導入体を作製するための宿主としては、本発明のDNAが体内で発現するものであれば特に限定されないが、例えば大腸菌、酵母、バキュロウイルス(節足動物多角体ウイルス)-昆虫細胞、あるいは動物細胞等が挙げられる。具体的には、大腸菌ではBL21、XL-2 Blue(ストラタジーン社製)等、酵母ではSP-Q01(ストラタジーン社製)等、バキュロウイルスではAcNPV(J. Biol. Chem., 263: 7406 (1988))とその宿主であるSf9(ATCC CRL-1711; J. Biol. Chem., 263: 7406 (1988))等が挙げられる。また動物細胞としてはマウス繊維芽細胞株C127(ATCC CRL-1804; J. Virol., 26: 291 (1978))やチャイニーズハムスター卵巣細胞株CHO-K1(ATCC CCL-61; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980))等が挙げられるが、発現量やスクリーニングの簡便さから好ましくはアフリカミドリザル腎臓由来細胞株COS-7(ATCC CRL1651; アメリカン タイプ カルチャー コレクション保存細胞)、ヒトアデノウイルス5型でトランスフォームしたヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293(ATCC CRL1573; 以下、「HEK293細胞」と称することがある。)またはヒト子宮頸部癌由来細胞株HeLa(ATCC CCL-2; 以下、「HeLa細胞」と称することがある。)が用いられる。

20

30

【0057】

上記したような蛋白質発現用ベクターを用いる発現方法の他に、プロモーターを連結した本発明のDNA断片を宿主微生物の染色体中に直接挿入する相同組換え技術(Vertes, A. A. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 57: 2036 (1993))、あるいはトランスポゾンや挿入配列(Vertes, A. A. et al., Molecular Microbiol., 11: 739 (1994))等を用いてDNA導入体を作製することもできる。

【0058】

上記で得られた培養物は細胞または菌体を遠心分離等の方法により収集し、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチーム、および/または凍結融解等のそれ自体既知の適当な方法により破壊した後、遠心分離や濾過等により蛋白質粗精製液を得、さらに適当な精製方法を組み合わせることにより精製することができる。

40

【0059】

かくして、本発明の蛋白質が取得される。上記した蛋白質発現組換えベクターを用いる発現方法の他に、上記(1)で取得された本発明のDNAを無細胞転写翻訳系に供することにより蛋白質発現を誘導し、本発明の蛋白質を取得することができる。本発明で用いられる無細胞転写翻訳系(または「無細胞蛋白質合成系」とも称する)とは、DNAからmRNAへの転写、およびmRNAから蛋白質への翻訳に必要な全ての要素を含む系であり、そこにDNAを加えることによってそのDNAがコードしている蛋白質が合成されるようなあらゆる系を指す。無細胞転写翻訳系の具体例としては、真核細胞、およびバクテリ

50

ア細胞、またはそれらの一部からの抽出液に基づいて調製された転写翻訳系が挙げられる。無細胞蛋白質合成系として具体的には、大腸菌、植物種子の胚芽、ウサギ網状赤血球等の細胞抽出液等の既知のものが用いられる。これらは市販のものを用いることもできるし、それ自体既知の方法、具体的には大腸菌抽出液は、Pratt, J. M. et al., *Transcription and Translation*, Hames, 179-209, B.D. & Higgins, S. J., eds, IRL Press, Oxford (1984)に記載の方法等に準じて調製することもできる。市販の無細胞蛋白質合成系、または細胞抽出液としては、大腸菌由来のものは、E. coli S30 extract system (Promega社製)とRTS500 Rapid Translation System (Roche社製)等が挙げられ、ウサギ網状赤血球由来のものはRabbit Reticulocyte Lysate System (Promega社製)等、さらにコムギ胚芽由来のものはPROTEIOS^{T M} (TOYOBO社製)等が挙げられる。

10

【0060】

得られた無細胞転写翻訳系の転写翻訳産物からの、本発明の蛋白質の分離、および精製は、それ自体既知の通常用いられる方法で行うことができる。具体的には、例えばエピトープペプチド、ポリヒスチジンペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合蛋白質等をコードするDNA領域を、前記した転写翻訳されるべきDNAに導入し、前記の通り発現させ、該蛋白質と親和性を有する物質とのアフィニティを利用して精製することができる。

【0061】

目的とする蛋白質の発現は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動等で分離し、クマシーブリリアントブルー(シグマ社製)等で染色するか、または後述する本発明の蛋白質に特異的に結合する抗体により検出する方法等によって確認できる。また一般的に、発現された蛋白質は生体内に存在する蛋白質分解酵素により切断されること(プロセッシング)が知られている。当然のことながらこのように切断されたアミノ酸配列の部分断片であっても、本発明の蛋白質と機能的に同等なものであれば、本発明の蛋白質に含まれる。

20

【0062】**(5) 本発明の蛋白質が有する活性の確認**

本発明の蛋白質は、これを上記(4)に記載のとおり組換え蛋白質として作製し、これを解析することにより(2)または(3)で推測した活性を有していることを確認することができる。また、下記(6)に記載のように、ある種の細胞に本発明のDNAを導入し、その表現型の変化を解析することにより確認することができる。さらに下記(9)に記載の抗体等との組み合わせにより解析することもできる。

30

【0063】

本発明の蛋白質が、例えばEGF様生理活性を有することは、それ自体既知の常法を用いて確認することができる。例えば、細胞増殖作用、胃酸分泌抑制作用、抗潰瘍作用、消化管粘膜保護作用、DNA合成促進作用、角膜修復作用、カルシウム遊離促進作用、創傷治癒促進作用、抗炎症作用、鎮痛作用、肝細胞障害抑制作用及び毛胞退縮作用などの、EGFの生理活性(日本組織培養学会編、「細胞成長因子」、朝倉書店、1984年)を指標にすることができる。より具体的には、培地に該蛋白質を添加して細胞を培養し、分光光度計等による吸光度または³H-チミジンの取り込み等で細胞増殖を測定する方法が挙げられる。細胞は、生殖系列または体性、分化全能、または多分化能、分割または非分割、実質組織または上皮、不滅化したものまたは形質転換したもの等であってよいが、上皮細胞が好ましい。ここで上皮細胞とは、器官の自由表面(角質、粘膜又は漿膜性の)を被覆するか、又は動物体の管若しくは体腔を裏打ちする、細胞性で非脈管性の層に位置する細胞を意味する。具体的には、ヒト乳腺上皮細胞、正常ヒト皮膚上皮細胞(NHEK細胞(Normal human epidermal keratinocyte)など)、ヒト血管平滑筋細胞、ヒト網膜色素上皮細胞等が挙げられる。

40

【0064】

このようなEGF様生理活性の解析系は、本発明のEGF様生理活性等を有する蛋白質のアゴニストやアンタゴニストの評価にも用いることができる。なお、本発明の蛋白質が有する活性の確認は、上記した方法に限定されるものではない。

50

【0065】

(6) 本発明の蛋白質の機能解析

かくして得られた完全長cDNAによりコードされる蛋白質であって、かつEGF様生理活性等を有する本発明の蛋白質は、さらに以下に述べる方法を用いて機能を解析することによりその新規の利用法が提供される。特に、本発明の蛋白質には、公知の蛋白質のスプライシングバリエーションであるため、このバリエーションが公知のバリエーションとどのような異なる機能があるかを同定することは重要である。

【0066】

具体的な機能の解析方法としては、例えば、(i)各組織、疾患、あるいは発生段階における発現状態を比較解析する方法、(ii)他の蛋白質、DNAとの相互作用を解析する方法、(iii)適当な細胞あるいは個体へ導入し、表現型の変化を解析する方法、(iv)適当な細胞あるいは個体において該蛋白質の発現を阻害して表現型の変化を解析する方法などが挙げられる。

【0067】

(i)の方法においては、本発明の蛋白質の発現を、mRNAレベルあるいは蛋白質レベルで解析することができる。mRNAレベルで発現量を解析する場合は、例えば、*in situ*ハイブリダイゼーション法(In situ hybridization: Application to Developmental Biology & Medicine. ,Ed. by Harris, N. and Wilkinson, D. G.) ,Cambridge University Press(1990))、DNAチップを利用したハイブリダイゼーション法、定量PCR法等が用いられる。ここで、解析の対象蛋白質に公知のバリエーションが存在するスプライシングバリエーションである場合には、解析対象蛋白質をコードするcDNAにのみ存在し、公知のバリエーションをコードするcDNAとはハイブリダイズしないプローブを用いることが好ましい。定量PCR法の場合には、対象バリエーションと公知バリエーション間で異なる長さの増幅断片ができるプライマーを選択して行う方法(Wong, Y. W., Neuroscience Lett., 320: 141-145(2002))等が挙げられる。また、蛋白質レベルで解析する場合には、後述する本発明の蛋白質に特異的に結合する抗体を用いた組織染色法などが挙げられる。この場合、対象蛋白質にのみ反応し、公知のバリエーションには反応しない抗体を用いることが好ましい。

【0068】

(ii)の相互作用の解析法としては、それ自体既知の常法を用いることができるが、具体的には、例えば、酵母ツーハイブリッド法、蛍光偏光解消法、表面プラズモン法、ファージディスプレイ法、リボソームディスプレイ法等が挙げられる。該方法においても、解析対象蛋白質が公知のバリエーションが存在するスプライシングバリエーションの場合には、公知のバリエーションも同様にして相互作用する物質を解析し、対象蛋白質特異的に相互作用する物質を同定することが好ましい。

【0069】

(iii)の方法では、本発明のcDNAを導入する細胞は特に制限はないが、ヒト培養細胞等が特に好ましく用いられる。DNAの細胞への導入法としては、上記(2)に記載のものが挙げられる。さらに導入細胞の表現型としては、細胞の生死、細胞の増殖速度、細胞の分化、細胞が神経細胞の場合には神経突起の伸長度、細胞内蛋白質の局在や移行など顕微鏡等で観察可能なものや、細胞内の特定蛋白質の発現変化など生化学的実験により解析可能なものも含む。これらの表現型は、公知のバリエーションが存在するスプライシングバリエーションの場合には、公知のものも同様に細胞へ導入し、比較解析することにより解析対象バリエーションに関連する表現型を同定することができる。また、本発明の蛋白質は癌細胞または癌組織において発現が増加するおよび/またはEGF様生理活性を有するものであることがわかっているので、癌やEGFが関連する疾患に見られる表現型等に注目して解析することも好ましい。

【0070】

本発明において、ある遺伝子が癌化をもたらすことは、その遺伝子の形質転換による宿主細胞の癌化を観察することにより確認することができる。あるいは悪性化をもたらすこ

10

20

30

40

50

とは、転移能を持たない癌細胞株にその遺伝子を形質転換したときに、細胞が転移能を獲得することを指標として確認することができる。

【0071】

本発明のDNAにコードされる蛋白質は、全長アミノ酸配列を備えることから、前述のように、適当な発現系を適用して組み換え体として発現させたり、細胞にインジェクションすることにより、あるいは、その蛋白質を特異的に認識する抗体を作製し、用いることで、その生物学的活性、および細胞増殖・分化といった細胞状態変化への作用を解析することが可能である。

【0072】

各蛋白質は、それぞれ次に示す文献に記載されている手法にもとづいて、それぞれの蛋白質の生物学的活性の解析が可能である。 10

分泌蛋白質、膜蛋白質：

「The Practical Approach Series」(IRL PRESS社)の『Ion Channels』(R.H.Ashley編、1995)、

『Growth Factors』(I.McKay, I.Leigh編、1993)、『Extracellular Matrix』(M.A.Haralson, J.R.Hassell編、1995)

糖蛋白質関連蛋白質：

「The Practical Approach Series」(IRL PRESS社)の『Glycobiology』(M.Fukuda, A.Kobata編、1993)、

「Method in Molecular Biology」(Humana Press社)シリーズの『Glycoprotein Analysis in Biomedicine』(Elizabeth F.Hounsell編、1993)、 20

シグナル伝達関連蛋白質：

「The Practical Approach Series」(IRL PRESS社)の『Signal Transduction』(G.Milligan編、1992)、

『Protein Phosphorylation』(D.G.Hardie編、1993)、または「Method in Molecular Biology」(Humana Press社)シリーズの『Signal Transduction Protocols』(David A. Kendall, Stephen J.Hill編、1995)、

転写関連蛋白質：

「The Practical Approach Series」(IRL PRESS社)の『Gene Transcription』(B.D.Hames, S.J.Higgins編、1993)、 30

『Transcription Factors』(D.S.Latchman編、1993)、

酵素・代謝関連蛋白質：

「The Practical Approach Series」(IRL PRESS社)の『Enzyme Assays』(ROBERT EISENTHAL and MICHAEL J. DANSON編、1992)、

細胞分裂・増殖関連蛋白質：

「The Practical Approach Series」(IRL PRESS社)の『Cell Growth, Differentiation and Senescence』(GEORGE STUDZINSKI編、2000)、

細胞骨格関連蛋白質：

「The Practical Approach Series」(IRL PRESS社)の『Cytoskeleton: Signalling and Cell Regulation』(KERMIT L. CARRAWAY and CAROLIE A. CAROTHERS CARRAWAY編、2000) 40

、
「Method in Molecular Biology」(Humana Press社)シリーズの『Cytoskeleton Methods and Protocols』(Gavin, Ray H.編、2000)、

核蛋白質・RNA合成関連蛋白質：

「The Practical Approach Series」(IRL PRESS社)の『Nuclear Receptors』(DIDIER PICARD編、1999)、

『RNA Processing』(STEPHEN J. HIGGINS and B. DAVID HAMES編、1994)、

蛋白質合成・輸送関連蛋白質：

「The Practical Approach Series」(IRL PRESS社)の『Membrane Transport』(STEPHEN A. BALDWIN編、2000)、

「Method in Molecular Biology」(Humana Press社)シリーズの『Protein Synthesis Methods and Protocols』(Martin, Robin編、1998)、

細胞防御関連蛋白質：

「Method in Molecular Biology」(Humana Press社)シリーズの『DNA Repair Protocols』(Henderson, Daryl S.、1999)、

『Chaperonin Protocols』(Schneider, Christine編、2000)、

発生・分化関連蛋白質：

「Method in Molecular Biology」(Humana Press社)シリーズの『Developmental Biology Protocols』(ROBERT EISENTHAL and MICHAEL J. DANSON編、1992)、

DNA・RNA結合蛋白質：

「Method in Molecular Biology」(Humana Press社)シリーズの『DNA-Protein Interactions Principles and Protocols』(Kneale, G. Geoff編、1994)、

『RNA-Protein Interaction Protocols』(Haynes, Susan R.編、1999)、

ATP・GTP結合蛋白質：

「Method in Molecular Biology」(Humana Press社)シリーズの『Signal Transduction Protocols』(David A. Kendall, Stephen J.Hill編、1995)。

10

【0073】

これら以外の手法については、Methods in Enzymology(Academic Press)を参照して蛋白質の活性を解析することができる。

【0074】

(iv)の方法では、後述するオリゴヌクレオチドを用いた方法や、RNAインターフェアレンス法により効率的に行うことができる。この方法においても、解析する対象蛋白質が、公知のパリアントが存在するスプライシングパリアントである場合には、公知のパリアントやその他のパリアントについても同様の解析を行い、比較解析することにより対象蛋白質特異的な機能を同定することができる。

20

【0075】

(7)本発明のDNAと疾患との関連の解析

(7-1)OMIMを用いた解析

疾患関連蛋白質については、前述したように機能ごとの解析が可能であるほか、疾患関連蛋白質を発現して得られた特異認識抗体を用いて、特定の疾患と蛋白質の発現量や活性との相関を知ることができる。あるいは、ヒトの遺伝子と疾患のデータベースであるOnline Mendelian Inheritance in Man(OMIM)を利用し、解析が可能である(実施例5参照)。なおOMIMには常に新しい情報が付加されている。したがって当業者は、特定の疾患と本発明の遺伝子との新たな関係を最新のデータベースから見出すことができる。疾患関連蛋白質は、診断マーカー、発現・活性の増減を制御する薬剤、あるいは遺伝子治療のターゲットになるなど医薬品の開発等に有用である。

30

【0076】

また、分泌蛋白質、膜蛋白質、シグナル伝達関連蛋白質、糖蛋白質関連蛋白質、転写関連蛋白質をはじめ、上記の14種類のカテゴリーの蛋白質に限らず、種々の機能をもつ蛋白質についても、OMIMを利用してキーワードで検索すると、各キーワードにおいて、多くの疾患に関連した結果が得られる。あるいは、例えば転写関連蛋白質やシグナル伝達関連蛋白質については、疾患との関連がそれぞれ、藤井・田村・諸橋・影山・佐竹編の実験医学増刊「転写因子研究1999」Vol.17, No.3, (1999)や、遺伝子医学Vol.3, No.2(1999)で報告されている。例えば、癌を例に挙げると、裳華房生命科学シリーズ「がんの生物学」(松原聡著、1992)にあるように、癌には分泌蛋白質、膜蛋白質、シグナル伝達関連蛋白質、糖蛋白質関連蛋白質、転写関連蛋白質ばかりでなく、酵素・代謝関連蛋白質、細胞骨格関連蛋白質、細胞分裂・増殖関連蛋白質といった多くの蛋白質が関与することが示されている。このように、疾患関連蛋白質ばかりでなく、分泌蛋白質、膜蛋白質、シグナル伝達関連蛋白質、糖蛋白質関連蛋白質、転写関連蛋白質等も疾患に関与することが多く、医療産業上のターゲットとして、有用なことがわかる。

40

50

【0077】

(7-2) 本発明のDNAの発現解析による機能および疾患との関連の予測

本発明のcDNAの塩基配列を用いれば、そのcDNAの塩基配列を有する遺伝子の発現頻度を解析することができる。さらにこうして解析された発現頻度情報に基づいて、当該遺伝子の機能を予測することができる(実施例8および9参照)。

【0078】

疾患に関連した遺伝子を調べる方法として病態組織と正常組織において遺伝子発現量の違いを調べる発現頻度解析がある。発現頻度解析には、ノーザンブロット法やRT-PCR法、およびDNAマイクロアレイやDNAマイクロアレイを用いた発現頻度解析法がある(実験医学 Vol.17, No.8, 980-1056 (1999)、村松・那波監修 細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」(秀潤社, 2000))。さらに、こういった解析方法以外に、発現している遺伝子の塩基配列をコンピュータを利用した解析で比較することによっても発現頻度を解析することができる。例えば、BODYMAPと呼ばれるデータベースは、様々な組織・細胞のcDNAライブラリーから、無作為に遺伝子クローンを抽出し、3'末端領域の塩基配列の相同性情報をもとにして、相同性のあるものはまとめてクラスターとすることによって、クラスター単位で遺伝子を分類して、各クラスターに含有されるクローンの個数を比較することによって遺伝子の発現頻度情報を得ている(<http://bodymap.ims.u-tokyo.ac.jp/>)。 10

【0079】

このような解析手法により、病態組織と正常組織において遺伝子発現量の違いを調べた結果から発現量の違いが明らかな遺伝子は、その疾患に関連した遺伝子といえる。また、病態組織でなくとも、病態に関連した特異的な現象を再現させた培養細胞と正常細胞において遺伝子発現量の違いを調べた結果から発現量の違いが明らかな遺伝子は、その疾患に関連した遺伝子といえる。 20

【0080】

本発明のDNAを有するクローンであるTBAES2007379について、以下のデータベースを用いて、特定の病態や機能に関連する遺伝子を選択することができる(実施例8参照)。本発明の解析に用いるデータベースは、1,402,069個のクローンの塩基配列をデータベース化したものであり、解析母数としては十分なデータベースである。このデータベースを構成している配列情報は、実施例1に示した様々な組織や細胞由来のcDNAライブラリーからcDNAクローンを無作為に選択して、その5'末端領域の配列を決定することによって得ることができる。 30

【0081】

次にこのデータベースにある各クローンの塩基配列を、塩基配列の相同性検索プログラムによって相同な配列同士をカテゴライズし(クラスター化)、各クラスターに属するクローン数を各ライブラリー毎に集計し規格化することによって、ある遺伝子のcDNAライブラリー内での存在比を解析できる。この解析によって、cDNAライブラリーのソースとなっている組織や細胞における、ある遺伝子の発現頻度情報を得ることができる。

【0082】

次に本発明のcDNAの塩基配列を持つ遺伝子の、組織や細胞間での発現を解析するために、大量のcDNAクローンを解析した組織や細胞由来のライブラリーを組織・細胞間での発現量の比較の対象にすることができる。すなわち600個以上のcDNAクローンの塩基配列を解析した組織や細胞について、先に規格化した数値を組織間や細胞間で比較し、遺伝子の発現頻度の変化を解析することができる。この解析によって以下に続く病態や機能に関連する遺伝子であることが示すことができる。 40

【0083】

(8) オリゴヌクレオチドの調製および該オリゴヌクレオチドを用いる機能解析

上記(1)に記載の方法で取得した本発明のDNAまたはその断片を用いて、DNA合成機などを用いる常法により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することが 50

できる。該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～100塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAを挙げることができる。具体例としては、配列番号1で表される塩基配列中の連続した5～100塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAを挙げることができる。ここで、対象蛋白質が、公知のバリエーションDNAが存在するスプライシングバリエーションの場合には、公知のバリエーションと異なる部分の塩基配列を選択することが好ましい。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度(T_m)および塩基数が極端に変わることのない上記のオリゴヌクレオチドが好ましい。また、配列の長さは、一般的には5～100塩基であり、好ましくは10～60塩基であり、より好ましくは15～50塩基である。

10

【0084】

また、これらオリゴヌクレオチドの誘導体も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン(phenoxazine-modified cytosine)で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる。

20

【0085】

また、本発明のオリゴヌクレオチドは、これを2本鎖RNA(dsRNA)として調製することにより、RNAインターフェアレンス法(RNAi法)に適用することができる。このうち、鎖長が短いもの特に21塩基程度のものを「siRNA」(small interfering RNAs)と称することがある。2本鎖RNAの作製方法、およびRNAインターフェアレンス法については、例えば、Elbashir, S., et al., Nature, 411: 494-498 (2001)に記載の方法等を用いることができる。上記2本鎖RNAは、そのすべてがRNAである必要はない。具体的には、その一部がDNAであるものとして、WO02/10374号公報に記載のものを用いることができる。

30

【0086】

このRNAインターフェアレンス法において標的となる遺伝子(以下これを「標的遺伝子」と称することがある)は、本発明のDNAであれば、いかなるものであってもよい。また、該遺伝子DNAのオルソログと予想される遺伝子も標的遺伝子とすることができる。これらのDNAの少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一な配列を有するRNAからなる2本鎖オリゴヌクレオチド(以下、これを「2本鎖オリゴヌクレオチド」と称することがある)とは、標的遺伝子の塩基配列のうち、いずれの部分でもよい15bp以上の配列と実質的に同一な配列からなるものである。ここで、実質的に同一とは、標的遺伝子の配列と80%以上の相同性を有することを意味する。

40

【0087】

また、解析対象蛋白質が公知蛋白質と比較して、挿入型あるいは置換型バリエーションである場合は、2本鎖オリゴヌクレオチド配列は挿入あるいは置換部位に設定することができる。また、解析対象蛋白質が公知蛋白質の欠失型バリエーションである場合は、欠失部を跨ぐ配列を2本鎖オリゴヌクレオチド配列とすることにより、該蛋白質特異的に効果のある配列を選定することができる。さらに、解析対象蛋白質と公知蛋白質のそれぞれをコードするDNAの塩基配列と比較して、解析対象蛋白質をコードするDNAに特異的な塩基配列

50

を選定することによれば、解析対象蛋白質特異的にその発現を阻害することができる。

【0088】

ヌクレオチドの鎖長は15bpから標的遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)の全長までのいかなる長さでもよいが、15~500bp程度のものが好ましく用いられる。ただし、哺乳類動物由来の細胞においては、30bp以上の長い2本鎖RNAに反応して活性化するシグナル伝達系の存在が知られている。これはインターフェロン反応と呼ばれており(Mareus, P. I., et al., Interferon, 5: 115-180 (1983))、該2本鎖RNAが細胞内に侵入すると、PKR(dsRNA-responsive protein kinase: Bass, B. L., Nature, 411: 428-429 (2001))を介して多くの遺伝子の翻訳開始が非特異的に阻害され、それと同時に2'-5' oligoadenylate synthetase(Bass, B. L., Nature, 411: 428-429(2001))を介してRNAse Lの活性化が起こり、細胞内のRNAの非特異的な分解が惹起される。これらの非特異的な反応のために、標的遺伝子の特異的な反応が隠蔽されてしまう。従って哺乳類動物または該動物由来の細胞あるいは組織を被導入体として用いる場合には15~30bp、好ましくは19~24bp、さらに好ましくは21bpの2本鎖オリゴヌクレオチドを用いることが好ましい。2本鎖オリゴヌクレオチドはその全体が2本鎖である必要はなく、5'または3'末端が一部突出したものも含むが、3'末端が2塩基突出したものを用いることが好ましい。2本鎖オリゴヌクレオチドは相補性を有する2本鎖のオリゴヌクレオチドを意味するが、自己相補性を有する1本鎖オリゴヌクレオチドが自己アニーリングしたものでもよい。自己相補性を有する1本鎖オリゴヌクレオチドとしては、例えば、逆方向反復配列を有するもの等が挙げられる。

10

20

【0089】

2本鎖オリゴヌクレオチドの調製方法としては特に制限はないが、それ自体既知の化学合成方法を用いることが好ましい。化学合成は相補性を有する1本鎖オリゴヌクレオチドを別個に合成し、これを適当な方法で会合させることにより2本鎖とすることができる。会合の方法としては上記オリゴヌクレオチドを混合し、2本鎖が解離する温度にまで加熱し、その後徐々に冷却する方法等が挙げられる。会合した2本鎖オリゴヌクレオチドは、アガロースゲル等を用いて確認し、残存する1本鎖オリゴヌクレオチドを適当な酵素により分解する等して除去する。

【0090】

このようにして調製した2本鎖オリゴヌクレオチドを導入する被導入体としては、標的遺伝子はその細胞内でRNAに転写、または蛋白質に翻訳を受け得るものであればいかなるものであってもよいが、具体的には、植物、動物に属するものが挙げられる。植物は単子葉植物、双子葉植物または裸子植物であってよく、動物は、脊椎動物または無脊椎動物であってよい。脊椎動物の例には、魚類、ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、ハムスター、マウス、ラットおよびヒトを含む哺乳動物が含まれ、無脊椎動物には、線虫、キイロショウジョウバエ(Drosophila)、および他の昆虫が含まれる。好ましくは、細胞は脊椎動物細胞である。

30

【0091】

被導入体は、細胞、組織あるいは個体を意味する。ここで細胞とは、生殖系列または体性、分化全能、または多分化能、分割または非分割、実質組織または上皮、不滅化したものまたは形質転換したもの等からであってよい。細胞は、配偶子または胚であってよく、胚の場合、単一細胞胚または構成性細胞、または多重細胞胚からの細胞であり、胎児組織を含む。さらには、幹細胞のような未分化細胞、または胎児組織を含む器官または組織の細胞からのような分化細胞、または生物内に存在する任意の他の細胞であってよい。分化している細胞型には、脂肪細胞、繊維芽細胞、筋細胞、心筋細胞、内皮細胞、神経細胞、グリア細胞、血液細胞、巨核球、リンパ球、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、白血球、顆粒球、ケラチン生成細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝細胞および内分泌腺または外分泌腺の細胞が含まれる。

40

【0092】

被導入体への2本鎖オリゴヌクレオチドの導入法としては、被導入体が細胞、あるいは

50

組織の場合は、カルシウムフォスフェート法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、ウイルス感染、2本鎖オリゴヌクレオチド溶液への浸漬、あるいは形質転換法等が用いられる。また、胚に導入する方法としては、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション法、あるいはウイルス感染等が挙げられる。被導入体が植物の場合には、植物体の体腔または間質細胞等への注入または灌流、あるいは噴霧による方法が用いられる。また、動物個体の場合には、経口、局所、非経口（皮下、筋肉内および静脈内投与を含む）、経膈、経直腸、経鼻、経眼、腹膜内投与等によって全身的に導入する方法、あるいはエレクトロポレーション法やウイルス感染等が用いられる。経口導入のための方法には、2本鎖オリゴヌクレオチドを生物の食物と直接混合することができる。さらに、個体に導入する場合には、例えば埋め込み長期放出製剤等として投与することや、2本鎖オリゴヌクレオチドを導入した導入体を摂取させることにより行うこともできる。

10

【0093】

導入する2本鎖オリゴヌクレオチドの量は、導入体や、標的遺伝子によって適宜選択することができるが、細胞あたり少なくとも1コピー導入されるに充分量を導入することが好ましい。具体的には、例えば、被導入体がヒト培養細胞で、カルシウムフォスフェート法により2本鎖オリゴヌクレオチドを導入する場合、0.1~1000 nMが好ましい。

【0094】

RNAインターフェアレンスによる本発明のDNAの導入体内での発現抑制により、本発明のDNAがコードする蛋白質の機能の確認、あるいは新たな機能の解析等を行うことができる。

20

【0095】

本発明のオリゴヌクレオチドは、臨床へ応用するに際し、例えば、遺伝子治療への応用が考えられる。本発明の蛋白質が癌細胞または癌組織において発現が増加するおよび/またはEGF様生理活性を有するものであるもので、遺伝子治療の標的となる疾患としては、例えば癌が好適であると考えられる。該オリゴヌクレオチドを遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、*ex vivo*法や*in vivo*法などにより患者へ投与すればよく、抗癌剤として用いられ得る。

【0096】

(9) 本発明の蛋白質に特異的に結合する抗体

30

本発明の蛋白質と特異的に結合する抗体の調製方法としては、通常用いられる公知の方法を用いることができる。例えば、ポリクローナル抗体を作製する場合には、BSA（牛血清アルブミン）、豚甲状腺グロブリン、KLH（キーホール・リンペット・ヘモシアニン）等の担体蛋白に、カルボジイミド、マレイミド等の適当な縮合剤を用いて前記抗原ポリペプチドを結合させ、免疫用の抗原（免疫原）を作製する。ここで、担体蛋白への抗原ポリペプチドの結合は、それ自体公知の通常用いられる方法により行えばよいが、例えばKLHを担体蛋白として用いて、マレイミド化して抗原ポリペプチドを結合させる。この方法の場合には、KLHに、好ましくはSulfo-SMCC（Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate）等の二官能性の縮合剤を反応させてマレイミド化し、これにアミノ末端又はカルボキシル末端のうち結合を生じさせたい方の末端にシステインを付加した抗原ポリペプチドを反応させれば、チオールを介して容易に結合して免疫用の抗原を調製することができる。また、カルボジイミドを用いた場合には、KLHと抗原ポリペプチドとの脱水縮合によりペプチド結合を形成させて結合させることができる。

40

【0097】

抗原として用いられるポリペプチドについても、公知の方法に従って抗原性が高くエピトープ（抗原決定基）として適した配列を選択して用いることができる。エピトープの選択方法としては、例えばEpitope Adviser（富士通九州システムエンジニアリング社製）等の市販のソフトウェアを用いることができる。また、対象蛋白質が、公知のバリエーションが存在するスプライシングバリエーションである場合には、対象蛋白質にのみ反応し、公知の、またはそれ以外のバリエーションには反応しない抗体を用いることにより、対象蛋白質に特

50

異的な機能を同定することができる。このような抗体のエピトープとしては、例えば、対象蛋白質が公知のバリエーションと比較して欠失しているアミノ酸配列がある場合、欠失部分の前後のアミノ酸配列（ジャンクション部分）等が好ましい。また、対象蛋白質が公知のバリエーションのN末またはC末が添加されているアミノ酸配列を有する場合、添加されているアミノ酸配列をエピトープとすることも好ましい。

【0098】

具体的には、本発明のDNAであるTB AES 2007379に特異的なアミノ酸配列として、例えば、TB AES 2007379の11番目のエクソンによりコードされるアミノ酸配列と12番目のエクソンによりコードされるアミノ酸配列の連結部分のアミノ酸配列（例えば、配列番号2のアミノ酸番号443～444番）等が挙げられる。抗原ポリペプチドとして、例えば、この連結部分のアミノ酸配列（アミノ酸番号443（Val）と444（Ala）のアミノ酸）を含む5アミノ酸残基以上のポリペプチドを用いることが好ましく、より好ましくは8残基以上、最も好ましくは10残基以上のポリペプチドが用いられる。抗原ポリペプチドの長さの上限は、TB AES 2007379に特異的な抗体が得られるものであれば特に限定されないが、通常20残基以下、好ましくは15残基以下である。本発明で用いる抗原ポリペプチドの好ましい配列としては、少なくともエクソン連結部分のアミノ酸配列（Val Ala）を含み、その両端に付加される配列は特に限定されないが、配列番号2に示すTB AES 2007379の配列そのものを用いるのが好ましい。エクソン連結部分のアミノ酸配列の位置は特に限定されないが、該配列が中央部に位置することが好ましい。すなわち、抗原ポリペプチドとしては、エクソン連結部分のアミノ酸配列（Val Ala）の両末端に1～8残基、好ましくは3～6残基程度のTB AES 2007379の配列そのものを有するポリペプチドを含むものが好ましい。その好ましい配列としては、具体的には、配列番号2のアミノ酸番号443～444番を含む抗原ペプチドのアミノ酸配列として配列番号10、13等が挙げられる。

10

20

【0099】

また、TB AES 2007379は、エクソンの欠失により、それに続く16番目のエクソン内でフレームシフトを生じて終止コドンが生じている。この結果、TB AES 2007379のアミノ酸配列には、TB AES 2007379に特異的なC末端配列（配列番号2のアミノ酸番号678～682番）が存在する。具体的には、配列番号2のアミノ酸番号678～682番を含む抗原ペプチドのアミノ酸配列として配列番号11、12等

30

【0100】

上記以外の方法として、対象蛋白質に対して取得したポリクローナル抗体から、公知の、またはそれ以外のバリエーションに反応する抗体を除去することにより、対象蛋白質にのみ反応する抗体を取得することができる。除去する方法としては、公知の、またはそれ以外のバリエーションをリガンドとして固定したアフィニティークロマトグラフィー、あるいは、公知の、またはそれ以外のバリエーションによる免疫沈降法等が用いられる。

【0101】

上記の抗原として用いるポリペプチドは、公知の方法に従って合成した合成ペプチドでも、また本発明の蛋白質そのものを用いることもできる。抗原となるポリペプチドは、公知の方法に従って適当な溶液等に調製して、哺乳動物、例えばウサギ、マウス、ラット等や鳥類、例えばニワトリ等に免疫を行えばよいが、安定的な免疫を行ったり抗体価を高めるために抗原ペプチドを適当なキャリア蛋白質とのコンジュゲートにして用いたり、アダプタント等を加えて免疫を行うのが好ましい。

40

【0102】

免疫に際しての抗原の投与経路は特に限定されず、例えば皮下、腹腔内、静脈内、あるいは筋肉内等のいずれの経路を用いてもよい。具体的には、例えばBALB/cマウスに抗原ポリペプチドを数日～数週間おきに数回接種する方法等が用いられる。また、抗原の摂取量としては、抗原がポリペプチドの場合0.3～0.5mg/1回程度が好ましいが、ポリペプチドの種類、また免疫する動物種によっては適宜調節される。

50

【0103】

また、T B A E S 2 0 0 7 3 7 9 をコードしている D N A もしくは T B A E S 2 0 0 7 3 7 9 遺伝子を導入した細胞を直接免疫用動物に投与し、抗体を作製してもよい (Kather in E. et al., HYBRIDOMA, 19: 297-302 (2000); 円城寺 慶一, 日本血栓止血学会誌., 11, 265-267(2000))。

【0104】

免疫後、適宜試験的に採血を行ってオクタロニー法、固相酵素免疫検定法(以下、これを「E L I S A 法」と称することがある)やウエスタンブロッティング等の方法で抗体価の上昇を確認し、十分に抗体価の上昇した動物から採血を行う。これに抗体の調製に用いられる適当な処理を行えばポリクローナル抗体を得ることができる。具体的には、例えば、公知の方法に従い血清から抗体成分を精製した精製抗体を取得する方法等が挙げられる。抗体成分の精製は、塩析、イオン交換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等の方法を用いることができる。

10

【0105】

また、該動物の脾臓細胞とミエローマ細胞とを用いて公知の方法に従って融合させたハイブリドーマを用いる (Milstein, et al., Nature, 256: 495 (1975)) ことによりモノクローナル抗体を作製することもできる。モノクローナル抗体は、例えば以下の方法により取得することができる。

【0106】

まず、上記した抗原の免疫により抗体価の高まった動物から抗体産生細胞を取得する。抗体産生細胞は、形質細胞、およびその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体のいずれから取得してもよいが、好ましくは脾臓、リンパ節、末梢血等から取得する。これらの細胞と融合させるミエローマとしては、一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば 8 - アザグアニン耐性マウス (B A L B / c 由来等) ミエローマ細胞株である P 3 X 6 3 - A g 8 . 6 5 3 (A T C C : C R L - 1 5 8 0)、P 3 - N S 1 / 1 A g 4 . 1 (理研セルバンク: R C B 0 0 9 5) 等が好ましく用いられる。細胞の融合は、抗体産生細胞とミエローマ細胞を適当な割合で混合し、適当な細胞融合培地、例えば R P M I 1 6 4 0 やイスコフ改変ダルベッコ培地 (I M D M)、あるいはダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M) 等に、50% ポリエチレングリコール (P E G) を溶解したもの等を用いることにより行うことができる。また電気融合法 (Zimmermann, U. et al., Naturwissenschaft 30 en, 68: 577 (1981)) によっても行うことができる。

20

30

【0107】

ハイブリドーマは、用いたミエローマ細胞株が 8 - アザグアニン耐性株であることを利用して適量のヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン (H A T) 液を含む正常培地 (H A T 培地) 中で 5% C O₂、37℃ で適当時間培養することにより選択することができる。この選択方法は用いるミエローマ細胞株によって適宜選択して用いることができる。選択されたハイブリドーマが産生する抗体の抗体価を上記した方法により解析し、抗体価の高い抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈法等により分離し、分離した融合細胞を適当な培地で培養して得られる培養上清から硫酸分画、アフィニティークロマトグラフィー等の適当な方法により精製してモノクローナル抗体を得ることができる。また精製には市販のモノクローナル抗体精製キットを用いることもできる。さらには、免疫した動物と同系統の動物、またはヌードマウス等の腹腔内で上記で得られた抗体産生ハイブリドーマを増殖させることにより、本発明のモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることもできる。

40

【0108】

また、本発明の蛋白質としてヒト由来のものを取得した場合には、かかるポリペプチド、あるいはその部分ペプチドを抗原として、ヒト末梢血リンパ球を移植した Severe combined immune deficiency (S C I D) マウスに上記した方法と同様にして免疫し、該免疫動物の抗体産生細胞とヒトのミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製することによってもヒト型抗体を作製することができる (Mosier, D. E., et al., Nature, 335: 256-259

50

(1988); Duchosal, M. A., et al., Nature, 355: 258-262 (1992))。

【0109】

また、取得したヒト型抗体を産生するハイブリドーマからRNAを抽出し、目的のヒト型抗体をコードする遺伝子をクローニングして、この遺伝子を適当なベクターに挿入し、これを適当な宿主に導入して発現させることにより、さらに大量にヒト型抗体を作製することができる。ここで、抗原との結合性の低い抗体は、それ自体既知の進化工学的手法を用いることによりさらに結合性の高い抗体として取得することもできる。一価性抗体等の部分フラグメントは、例えばパピイン等を用いてFab部分とFc部分を切断し、アフィニティカラム等を用いてFab部分を回収することによって作製することができる。

【0110】

かくして得られる本発明の蛋白質と特異的に結合する抗体は、本発明の蛋白質に特異的に結合することによって該蛋白質が有するEGF様生理活性等を阻害する中和抗体として用いることもできる。蛋白質が有する活性を阻害するものの選択方法としては特に制限はないが、例えば、上記(4)で作製したDNA導入体に抗体を接触させ、導入体中の目的蛋白質の機能が阻害されるか否かを解析する方法等が挙げられる。

【0111】

かかる中和抗体は、臨床へ応用するに際し、上記有効成分を単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることもできる。この時の有効成分の担体に対する割合は、1~90重量%の間で変動され得る。また、かかる薬剤は種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、あるいはシロップ剤等による経口投与、または注射剤、点滴剤、リポソーム剤、坐薬剤等による非経口投与を挙げることができる。また、その投与量は、症状、年齢、体重等によって適宜選択することができる。

【0112】

(10)本発明の蛋白質が有する活性を調節する分子のスクリーニングおよびスクリーニング用キット

本発明の蛋白質に特異的に結合し、かつ本発明の蛋白質の機能(活性)を阻害、拮抗または増強する作用を有する物質をスクリーニングすることにより本発明の蛋白質の機能調節物質(以下、これを「調節物質」と称することがある)を得ることができる。

【0113】

この調節物質のスクリーニング方法は、本発明の蛋白質に特異的に結合し、かつ該蛋白質の活性を阻害、拮抗または増強する作用を有する物質が得られる方法であればいかなるものであってもよい。例えば、まずはじめに本発明の蛋白質とスクリーニングに供する物質(以下、これを「被検物質」と称することがある)とを接触させ、該蛋白質との結合性を指標として選抜した後に、本発明の蛋白質が有する活性の変化を指標として被検物質を選抜する方法を用いることができる。

【0114】

被検物質としては、本発明の蛋白質と相互作用して、該蛋白質が有する活性に影響を及ぼす可能性のある物質であればいかなるものであってもよいが、具体的には、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、低分子化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、動物組織抽出液等が挙げられる。これらの物質は新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよい。被検物質と本発明の蛋白質の相互作用の解析法としては、それ自体既知の常法を用いることができるが、具体的には、例えば、酵母ツーハイブリッド法、蛍光偏光解消法、表面プラズモン法、ファージディスプレイ法、リポソームディスプレイ法、あるいは上記(9)に記載した抗体との競合解析法等が挙げられる。このような方法により、本発明の蛋白質に結合する活性を見いだされた物質は、次に該物質の存在下で本発明の蛋白質が有する活性がどのような影響を受けるかを解析することによって、調節物質として用いられるか否かが同定される。ここで、対象蛋白質が、公知のバリエーションが存在するスプライシングバリエーションである場合には、対象蛋白質にのみ結合し、公知のまたは他のバリエーションには結合しない物質についてその影響を解析するか、または公知の

10

20

30

40

50

あるいは他のバリエーションにおいても同様に結合するか否かを同定し、結合した場合にはその影響の相違を解析することによって、対象蛋白質に対する該物質の影響を解析することができる。また、該物質の個体内での分布を検討することにより、対象蛋白質や公知のまたは他のバリエーションに対する影響を解析することができる。

【0115】

具体的な解析方法としては、例えば、EGF様生理活性を調節する物質を解析する場合には、(4)に記載したDNA導入体に標的となる蛋白質(例えば受容体蛋白質)も同様の方法で導入する。この導入体について選択された物質の存在下/または非存在下で標的となる蛋白質の活性等をそれ自体既知の通常用いられる方法により解析する。具体的には、上記(5)に記載の方法等を用いて行うことができる。標的となる蛋白質の活性等が、物質の非存在下の場合と比べて増加した場合には、該物質はEGF様蛋白質の活性化物質として機能する可能性があり、また低下、または阻害された場合には物質はEGF様蛋白質の阻害物質として機能する可能性があると同定できる。

10

【0116】

ここで、医薬活性成分の取得を目的として調節物質をスクリーニングするために用いる本発明のDNA、あるいは組み換え蛋白質を用いる場合は、ヒトのDNAあるいは蛋白質を用いることが好ましい。さらに上記方法によってスクリーニングされた物質は、さらに生体内でのスクリーニングによって医薬候補としての選択を行ってもよい。なお、本発明の蛋白質の機能調節物質の評価は、上記した方法に限定されるものではない。

【0117】

本発明の蛋白質が有する活性の1つであるEGF様生理活性としては、例えば、細胞増殖作用、胃酸分泌抑制作用、抗潰瘍作用、消化管粘膜保護作用、DNA合成促進作用、角膜修復作用、カルシウム遊離促進作用、創傷治癒促進作用、抗炎症作用、鎮痛作用、肝細胞障害抑制作用及び毛胞退縮作用などの、EGF様ドメインまたはEGF様リピートを有する蛋白質と同様の生理活性である。そこで、本スクリーニング方法により同定できる調節物質は、制癌剤、消化器系疾患治療剤、再生組織誘導剤、免疫・炎症性疾患治療剤等として用いられ得るものである。

20

【0118】

また、本発明の蛋白質をコードするDNAは、乳癌等の組織、器官または細胞由来のRNAから構築されたcDNAライブラリーよりクローニングされており、取得された本発明の蛋白質は、上記組織または器官等において特有の機能を有している可能性があるので、本発明の蛋白質の機能調節物質は該組織または器官に特有の疾患の治療剤として用いられ得る。

30

【0119】

かかる調節物質は、臨床へ応用するに際し、上記有効成分を単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることもできる。この時の有効成分の担体に対する割合は、1~90重量%の間で変動され得る。また、かかる薬剤は種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、あるいはシロップ剤等による経口投与、または注射剤、点滴剤、リポソーム剤、坐薬剤等による非経口投与を挙げることができる。また、その投与量は、症状、年齢、体重等によって適宜選択することができる。

40

【0120】

また、かかる調節物質のスクリーニング用キットは、本発明の蛋白質等を含むものである。

【0121】

(11)本発明のDNAの発現調節物質のスクリーニングおよびスクリーニング用キットスクリーニングの方法としては、被検物質の存在下で本発明の蛋白質、あるいはそれをコードするmRNAの発現量を解析する方法等が挙げられる。具体的には、例えば、(4)に記載した本発明の蛋白質を発現する細胞を被検物質を含む適当な培地で培養し、該細胞内に発現している本発明の蛋白質の量をELISA等の常法を用いて解析するか、ある

50

いは該細胞内の本発明の蛋白質をコードする mRNA 量を、定量的逆転写 PCR 法や、ノーザンブロット法等により解析することにより行うことができる。

【0122】

被検物質としては、(10)に記載のものを用いることができる。この解析により、被検物質の非存在下で培養された当該細胞内で発現された蛋白質、あるいは mRNA 量と比べてその量が増加すれば、この被検物質は本発明の DNA の発現促進物質として機能する可能性があり、逆に減少した場合には、この被検物質は本発明の DNA の発現阻害物質として用いられ得ると判断することができる。

【0123】

かかる発現調節物質は、臨床へ応用するに際し、上記有効成分を単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることもできる。この時の有効成分の担体に対する割合は、1~90重量%の間で変動され得る。また、かかる薬剤は種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、あるいはシロップ剤等による経口投与、または注射剤、点滴剤、リポソーム剤、坐薬剤等による非経口投与を挙げることができる。また、その投与量は、症状、年齢、体重等によって適宜選択することができる。

10

【0124】

また、かかる発現調節物質のスクリーニング用キットは、本発明の DNA、該 DNA を含む組換えベクターまたは該組換えベクターを導入した遺伝子導入細胞等を含むものである。

20

【0125】

(12) 本発明の DNA 導入動物

上記(1)に記載の、本発明の DNA を含む導入 DNA を構築し、ヒト以外の哺乳動物の受精卵に導入して、これを雌個体卵管に移植して発生させることにより、本発明の DNA が導入された非ヒト哺乳動物を作製することができる。より具体的には、例えば、雌個体をホルモン投与により過剰排卵させた後、雄と交配し、交配後1日目の卵管から受精卵を摘出し、該受精卵に導入 DNA をマイクロインジェクション等の方法により導入する。この後、適当な方法で培養した後、生存している受精卵を、偽妊娠させた雌個体(仮親)の卵管に移植して出産させる。新生仔に目的の DNA が導入されているか否かは、該個体の細胞から抽出した DNA のサザンブロット解析を行うことにより同定することができる。

30

【0126】

かくして得られた本発明の DNA 導入動物は、この個体を交配し、導入された DNA が安定的に保持されていることを確認しながら通常の飼育環境で継代飼育することによりその子孫を得ることができる。また、体外受精を繰り返すことによりその子孫を得て、系統を維持することもできる。

【0127】

本発明の DNA が導入された非ヒト哺乳動物は、本発明の DNA の生体内における機能の解析や、またこれを調節する物質のスクリーニング系等として用いることができる。

40

【0128】

(13) 本発明の蛋白質、それを特異的に認識する抗体、および本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含む DNA の他の利用

本発明の蛋白質および/またはそれを特異的に認識する抗体は、それを基盤上に結合させた担体として利用することができる。また、本発明の蛋白質をコードする塩基配列、例えば、配列番号1に記載の塩基配列を有する DNA またはその部分断片は、それらを基盤上に結合させた担体として用いられ得る。これらを、以下、「プロテインチップ」、「抗体チップ」、「DNA チップ」または「DNA アレイ」(DNA マイクロアレイおよび DNA マクロアレイ)と称することがある。これらのプロテインチップ、抗体チップ、または DNA チップもしくはアレイには、本発明の蛋白質や抗体や DNA 以外に、他の蛋白質

50

や抗体やDNAが含まれていてもよい。ここで、対象蛋白質が公知のバリエーションが存在するスプライシングバリエーションである場合、上記プロテインチップには対象蛋白質特異的なアミノ酸配列部分断片を用いることもできるが、他のバリエーションと異なる立体構造を有している可能性もあるためその全長を用いることもできる。また、抗体チップには、対象蛋白質のアミノ酸配列のうち、他のバリエーションと異なるアミノ酸配列または立体構造を認識する抗体を用いることが好ましい。同様に、DNAアレイには、対象蛋白質をコードするDNA配列のうち、他のバリエーションDNAと異なる配列を選択することが好ましい。

【0129】

また、蛋白質や抗体やDNAを結合させる基盤としては、ナイロン膜、ポリプロピレン膜等の樹脂基盤、ニトロセルロース膜、ガラスプレート、シリコンプレート、金属薄膜特に金薄膜をコートした樹脂基盤等が用いられるが、ハイブリダイゼーションの検出を非RI的に、例えば、蛍光物質等を用いて行う場合には、蛍光物質を含まないガラスプレート、シリコンプレート等が好適に用いられる。また該基盤への蛋白質、抗体あるいはDNAの結合は、それ自体公知の通常用いられる方法により容易に行うことができる。これらのプロテインチップ、抗体チップ、DNAチップ、あるいはDNAアレイも、本発明の範囲に含まれる。

10

【0130】

また、本発明の蛋白質のアミノ酸配列およびDNAの塩基配列は、配列情報としても用いることができる。このDNAの塩基配列には、対応するRNAの塩基配列も含まれる。すなわち、得られたアミノ酸配列や塩基配列をコンピュータが読みとり可能な所定の形式で適当な記録媒体に格納することにより、アミノ酸配列や塩基配列のデータベースが構築できる。このデータベースには、他の種類の蛋白質やそれをコードするDNAの塩基配列が含まれていてもよい。また、本発明においてデータベースとは、上記配列を適当な記録媒体に書き込み、所定のプログラムに従って検索を行うコンピュータシステムをも意味する。ここで適当な記録媒体としては、例えば、フレキシブルディスク、ハードディスク、磁気テープ等の磁気媒体、CD-ROM、MO、CD-R、CD-RW、DVD-R、DVD-RAM等の光ディスク、半導体メモリ等を挙げることができる。

20

【0131】

(14) 解析対象となる生体試料の調製

本発明において解析対象となる生体試料は、本発明の蛋白質を含む可能性のあるものであればよい。例えば、癌の疑いのある個体から得られる血液、髄液、腹水、尿、乳汁、汗、唾液等の体液等が挙げられるが、中でも特に血液が好ましい。例えば血液の場合には、癌の疑いのある個体から採血された試料は、試料中の本発明の蛋白質の変化(分解等)や、血液の凝固等を防止するために、酵素阻害剤を試料採取時又は試料採取後に加えるのが好ましい。酵素阻害剤としては、蛋白質分解酵素阻害剤として、例えば、アプロチニン、アンチパイン、ペプスタチン、ロイペプチン、EGTA、PMSF(フェニルメタンсульフォニルフルオリド)、TLCK(トリシルリシンクロロメチルケトン)等が、また抗凝固剤として、例えばヘパリン等が用いられる。これらのうち、本発明の試料として最も好ましくは、アプロチニン、ヘパリン等が添加された採血管等を用いて採血を行い、得られた血液を遠心分離等で分離して取得した血清成分または血漿が用いられる。これらの試料は、採取後、本発明の蛋白質の解析に供するまで、例えば4 以下で保存することが好ましく、より好ましくは-20 以下で凍結保存するのが好ましい。

30

40

【0132】

さらに、所望により、当該試料を蛋白可溶化剤の存在下で変性処理をして夾雑蛋白質を除去してから、これを試料として用いることも好ましい。特に試料として血液を用いる場合には、高濃度の蛋白により抗原抗体反応が妨害される等の理由から、除蛋白を行うことが好ましい。また、必要に応じてさらに濃縮を行った試料も本発明の方法の試料として用いることができる。

【0133】

かくして取得される試料は、さらに必要に応じて、既知の方法に従って濃縮することに

50

より本発明の蛋白質の検出感度を上昇させることができる。

【0134】

(15) 本発明の癌の検出方法

上記(14)の記載のとおり癌の疑いのある個体から取得した生体試料溶液について、本発明の蛋白質の存在を解析し、癌を検出する。本発明の蛋白質の存在の解析は、本発明の蛋白質に特異的な抗体を用いて行われるものであれば特に限定されず、試料と本発明の蛋白質に特異的な抗体との反応性、すなわち試料中に含まれる蛋白質と該抗体との免疫反応を、陽性コントロールと該抗体との免疫反応と比較することのできる方法であればよい。なお、濃度既知の陽性コントロールを用いて得られる結果と、試料を用いて得られる結果を比較して試料中の本発明の蛋白質の量を求め、その測定結果を癌の存在と関連付けることにより、癌を検出することができる。

10

【0135】

本発明の抗体と癌の疑いのある個体から得られた生体試料中の蛋白質の免疫反応による解析は、生化学実験法11「エンザイムイムノアッセイ」(Tijssen P.著、東京化学同人)、"Antibodies: A LABORATORY MANUAL"(Ed Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory(1988))等の実験書に記載のそれ自体既知の通常用いられる方法で行うことができる。具体的には、例えば、免疫プロット法、酵素免疫測定法(ELISA法)等のサンドイッチ法、競合法等が挙げられる。

【0136】

ここで、ドットプロット法により試料中の本発明の蛋白質の存在を検出する方法を例に挙げて、以下に説明する。上記(14)の記載の方法で得られる試料を、PVDf(Poly vinylidene difluoride)膜やニトロセルロース膜等の通常蛋白質の転写に用いられる膜に転写する。得られた膜をスキムミルク等の蛋白溶液でプロッキングした後、これに、本発明の蛋白質に特異的な抗体を反応させる。膜を洗浄して未反応の該抗体を除去した後、あらかじめ標識物質を結合させた二次抗体を反応させる。標識物質が、例えば、酵素等のそれ自体はシグナルを発する性質を有していない物質の場合には、反応後の膜を洗浄して未反応の二次抗体を除去した後、標識物質と特異的に反応してシグナルを発する基質等の物質を反応させ、該物質より発せられるシグナルを検出する。その検出結果と、濃度既知の陽性コントロールを用いて得られた結果とを比較することにより、試料中の本発明の蛋白質の存在量を知ることができる。標識物質として用いられる酵素としては、アルカリフォスファターゼ、Horseradish peroxidase(以下、これを「HRP」と称することがある)等が挙げられる。

20

30

【0137】

標識物質が、例えば、蛍光物質、放射性物質等のそれ自体シグナルを発する性質を有する物質の場合には、反応後の膜を洗浄して未反応の二次抗体を除去した後、標識物質より発せられるシグナルを検出し、その検出結果と濃度既知の陽性コントロールを用いて得られた結果とを比較することにより、試料中の本発明の蛋白質の存在量を知ることができる。

【0138】

また、このような検出において、試料等から持ち込まれる抗体による影響を除くために、抗原抗体反応ではない特異的結合能を持つ物質による反応を利用することもできる。特異的結合能を持つ物質としては、例えば、ビオチンとストレプトアビジン、レセプター蛋白質とそのリガンド物質等の組み合わせが用いられ、ビオチンとストレプトアビジンの組み合わせが特に好ましい。

40

【0139】

次に、解析法の他の例として、ELISA法により試料中の本発明の蛋白質の存在を解析する場合を例に挙げて、以下に説明する。まず、本発明の抗体を固相化用抗体として96ウェルELISAプレートに固相化する。抗体を固相化したプレートは、スキムミルク、ウシ血清アルブミン(以下これを「BSA」と称することがある)等の蛋白溶液でプロッキング処理を施しておくのが好ましい。そして、上記(14)に記載の方法で得られる

50

生体試料を加えて、試料中の本発明の蛋白質を固相に結合させる。続いて、結合した本発明の蛋白質を検出するための検出用抗体として、本発明の抗体のうち、固相化した抗体と別のものを加えてインキュベートする。

【0140】

また、本発明の蛋白質に対するポリクローナル抗体を使用する場合は、本発明の蛋白質を異なる動物種に免疫して得られた2種類のポリクローナル抗体を組合わせて、それぞれ固相化用抗体と検出用抗体として使用すればよい。例えば、固相化用抗体にウサギポリクローナル抗体、検出用抗体にマウスポリクローナル抗体を使用することができるが、この組合わせに限定されるものではない。

【0141】

検出用抗体を加えてインキュベートを行った後、洗浄液で洗浄し、検出用の抗体を認識し、かつ標識物質で標識化された抗体、例えば検出用の抗体がマウス抗体の場合は、酵素標識抗マウスIgG抗体等を反応させる。または、検出用抗体にあらかじめビオチン等を結合させておき、これに酵素標識ストレプトアビジン等を反応させる。洗浄液で洗浄後、固相に結合した標識物質の活性を測定し、濃度既知の陽性コントロールを用いて得られた結果と比較すること等によって、試料中の本発明の蛋白質の量を測定することができる。

【0142】

本発明の検出方法において用いられる陽性コントロールとしては、本発明の抗体と特異的に結合するものであればいずれのものであってもよく、例えば、遺伝子組み換えによって調製した配列番号2に記載のアミノ酸からなる蛋白質が挙げられる。

【0143】

また、癌マーカーは、しばしば、個体の免疫系により異種分子と認識され、自己免疫応答を誘発させる。この免疫応答は、体液性であり、癌マーカー蛋白質に対する自己抗体を産生させ得る。自己抗体は、実際は当該個体由来の抗原であっても当該個体の免疫系が異種のものとして認識する抗原に対して自然に生じる抗体である。本発明の蛋白質は、癌細胞または癌組織において発現が増加する蛋白質であるから、自己抗体の産生を誘発する可能性がある。したがって、生体試料中の本発明の蛋白質に対する自己抗体の存在は、癌の指標となりうる。かかる自己抗体は、本発明の蛋白質を用いれば、例えば上述の方法に準じて免疫学的に測定することができる。さらに、かかる自己抗体を測定することにより、自己免疫疾患の検出も可能となる。

【0144】

さらに、細胞、組織、生体試料における本発明のDNAの発現状態を調べることも癌を検出することができる。DNAの発現状態は、上記(6)に記載のように、mRNAレベルあるいは蛋白質レベルで解析することができる。mRNAレベルで発現量を解析する場合は、例えば、*in situ*ハイブリダイゼーション法、DNAチップを利用したハイブリダイゼーション法、定量PCR法等が用いられる。蛋白質レベルで発現量を解析する場合は、例えば、上述のように、本発明の蛋白質の量を免疫学的に測定すればよい。

【0145】

(16) 本発明の蛋白質または本発明の抗体を含む試薬キット

本発明の試薬キットは、少なくとも、TB AES 2007379がコードしている蛋白質または該蛋白質に特異的な抗体を含み、通常の免疫反応を利用したキットに準じた構成によって提供される。さらに任意の要素として、洗浄液、検出用標識化抗体、蛋白可溶化剤を含有する前処理液、陽性コントロール、希釈液、蛋白変性剤、濃縮用器具又は試薬等を含む。

【0146】

具体的には、例えば、ELISA法に適用されるキットの場合、少なくとも、TB AES 2007379がコードしている蛋白質に特異的な抗体を含み、さらに、固相化抗TB AES 2007379蛋白質抗体、標識化抗IgG抗体を含み、任意の要素として蛋白可溶化剤を含有する前処理液等を含む。また、競合法に適用されるキットの場合には、標識化TB AES 2007379蛋白質、TB AES 2007379蛋白質特異的抗体等を含

10

20

30

40

50

み、任意の要素として蛋白可溶化剤を含有する前処理液等を含む。このような試薬キットを用いることにより、本発明の癌の検出方法をより迅速、簡便に行うことができる。

【0147】

以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。なお、各種ベクターの作製、蛋白質の発現等は、特に記載のない限り、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition (Sambrook and Russell著、Cold Spring Harbor Laboratory Press刊 (2001))等に記載の公知の手法に従って行った。なお、以下の実施例において、本発明のDNAまたは蛋白質は、単にクローン名を引用し「TB AES 2007379」として表記することがある。

【実施例1】

【0148】

オリゴキャップ法によるcDNAライブラリーの作製

ヒト各組織より全RNAとして抽出された市販のmRNA (クロンテック社製：乳癌 (#64015-1))から、オリゴキャップ法 (Maruyama, K., et al., Gene, 138: 171-174 (1994))によりcDNAライブラリーを作製した。

【0149】

まず、上記RNAをBAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) およびTAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) で処理した後に、オリゴキャップリンカー (配列番号3) をRNAライゲースを用いて連結した。このRNA鎖を鋳型としてオリゴdTプライマー (配列番号4) を用いた逆転写反応により第1鎖cDNAを合成し、続いてRNA鎖を分解除去した (鈴木ら、蛋白質 核酸 酵素、41: 603-607 (1996); Suzuki, Y. et al., Gene, 200: 149-156 (1997))。次いで、5'のPCRプライマー (配列番号5) と3'のPCRプライマー (配列番号6) を用いPCR (polymerase chain reaction) により2本鎖cDNAを増幅し、増幅されたDNA鎖をSfiIにより切断した。

【0150】

次いで、発現用ベクターであるpME18SFL3 (GenBank AB009864) のDraIIIサイトに上記で取得したSfiI切断断片をクローニングし、cDNAライブラリーを作成した。上記で用いたpME18SFL3ベクターは、クローニング部位の上流にSRプロモーターとSV40 small tイントロンが組み込まれており、またその下流にはSV40ポリ(A)付加シグナル配列が挿入されている。pME18SFL3のクローン化部位は非対称性のDraIIIサイトとなっており、cDNA断片の末端にはこれと相補的なSfiI部位を付加しているため、クローン化したcDNA断片はSRプロモーターの下流に一方向性に挿入される。したがって、全長cDNAを含むクローンでは、得られたプラスミドをそのままCOS細胞に導入することにより、一過的に遺伝子を発現させることが可能である。すなわち、非常に容易に、遺伝子産物である蛋白質として、あるいはそれらの生物学的活性として実験的に解析することが可能となっている。

【0151】

これらより得たクローンのプラスミドDNAについて、cDNAの5'端または3'端の塩基配列をDNAシーケンシング試薬 (Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction KitまたはBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit:PE Biosystems社製) を用い、マニュアルに従ってシーケンシング反応後、DNAシーケンサー (ABI PRISM 3700: PE Biosystems社製) でDNA塩基配列を解析した。

【0152】

実施例8および実施例9の発現頻度解析に用いたデータベースに供したクローンを含むcDNAライブラリーも、上記と同様の方法で作成した。cDNAライブラリー名とその由来の関係を以下に示す。『』内にライブラリー名を、その後の()内にライブラリーソースのタイプと由来などを/で区切って記載した。

『3NB69』 (培養細胞/NB69細胞 (RCB #RCB0480))

10

20

30

40

50

- 『ADIPS』 (組織 / 脂肪組織 (Adipose) (Invitrogen #D6005-01))
- 『ADRGL』 (組織 / 副腎 (Adrenal gland) (CLONTECH #64016-1))
- 『AHMSC』 (培養細胞 / HMSC細胞 (間葉細胞; Human mesenchymal cell))
- 『ASTRO』 (初代培養細胞 / 正常神經膠星狀細胞 (Normal Human Astrocyte) NHA5732 (宝酒造 #CC2565))
- 『BEAST』 (組織 / 成人乳房 (Adult Breast) (STARATAGENE #735044))
- 『BLADE』 (組織 / 膀胱 (Bladder) (Invitrogen #D6020-01))
- 『BRALZ』 (組織 / アルツハイマー患者大脳皮質 (Brain, cortex, Alzheimer) (Invitrogen #D6830-01))
- 『BRCAN』 (組織 / 尾状核 (Brain, caudate nucleus) (CLONTECH #6575-1)) 10
- 『BRCOC』 (組織 / 脳梁 (Brain, corpus callosum) (CLONTECH #6577-1))
- 『BRSSN』 (組織 / 黒質 (Brain, substantia nigra) (CLONTECH #6580-1))
- 『BRSTN』 (組織 / 視床下核 (Brain, subthalamic nucleus) (CLONTECH #6581-1))
- 『CERVX』 (組織 / 子宮頸管 (Cervix) (Invitrogen #D6047-01))
- 『CHONS』 (培養細胞 / 軟骨細胞 (Chondrocyte))
- 『COLON』 (組織 / 結腸 (Colon) (Invitrogen #D6050-0))
- 『CTONG』 (組織 / 舌癌 (Tongue, Cancer))
- 『D9OST』 (初代培養細胞 / CD34+細胞 (ODF誘導9日))
- 『DFNES』 (初代培養細胞 / 新生児正常皮膚纖維芽細胞 (Normal Human Dermal Fibroblasts (Neonatal Skin); NHDF-Neo) NHDF2564 (宝酒造 #CC2509)) 20
- 『ERLTF』 (培養細胞 / TF-1細胞 (赤白血病細胞; erythroleukemia))
- 『FEBRA』 (組織 / 胎児脳 (Brain, Fetal) (CLONTECH #64019-1))
- 『FEHRT』 (組織 / 胎児心臓 (Heart, Fetal) (STARATAGENE #738012))
- 『FEKID』 (組織 / 胎児腎臓 (Kidney; Fetal))
- 『FELNG』 (組織 / 胎児肺 (Lung, Fetal) (STARATAGENE #738020))
- 『HCASM』 (初代培養細胞 / 正常冠動脈平滑筋細胞 HCASMC (Human coronary artery smooth muscle cells) (東洋紡 #T305K-05))
- 『HCHON』 (初代培養細胞 / 正常軟骨細胞 HC (Human Chondrocytes) (東洋紡 #T402K-05))
- 『HEART』 (組織 / 心臓 (Heart) (CLONTECH #64025-1))
- 『HHDPC』 (初代培養細胞 / 正常頭髪毛乳頭細胞 HDPC (Human dermal papilla cells) (東洋紡 #THPCK-001)) 30
- 『HLUNG』 (組織 / 肺 (Lung) (CLONTECH #64023-1))
- 『HSYRA』 (初代培養細胞 / 滑膜細胞 HS-RA (Human synoviocytes from rheumatoid arthritis) (東洋紡 #T404K-05))
- 『JCMLC』 (培養細胞 / 白血球細胞 (Leukemia, myelogenous))
- 『KIDNE』 (組織 / 腎臓 (Kidney) (CLONTECH #64030-1))
- 『LIVER』 (組織 / 肝臓 (Liver) (CLONTECH #64022-1))
- 『LYMPB』 (初代培養細胞 / リンパ芽球 (Lymphoblast, EB virus transferred B cell))
- 『MESAN』 (初代培養細胞 / 正常メサンギウム細胞 (Normal human mesangial cells) NHMC 56046-2 (宝酒造 #CC2559)) 40
- 『MESTC』 (培養細胞 / 間葉系幹細胞 (Mesenchyme stem cell))
- 『N1ESE』 (培養細胞 / 間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell))
- 『NETRP』 (初代培養細胞 / 好中球 (Neutrophil))
- 『NOVAR』 (組織 / 成人卵巣 (Adult Ovary) (STARATAGENE #735260))
- 『NT2NE』 (培養細胞 / NT2細胞 神経分化後濃縮回収 (NT2 Neuron))
- 『NT2RI』 (培養細胞 / NT2細胞 RA誘導5週間後生育阻害剤処理2週間)
- 『NT2RP』 (培養細胞 / NT2細胞 RA誘導5週間)
- 『NTONG』 (組織 / 正常舌 (Tongue))
- 『OCBBF』 (組織 / 胎児脳 (Brain, Fetal))
- 『PEBLM』 (初代培養細胞 / 正常末梢血単核細胞 (Human peripheral blood mononuclear c 50

ells) HPBMC5939 (宝酒造 #CC2702))

『PERIC』(組織/心膜(Pericardium)(Invitrogen #D6105-01))

『PLACE』(組織/胎盤(Placenta))

『PROST』(組織/前立腺(Prostate)(CLONTECH #64038-1))

『PUAEN』(初代培養細胞/正常肺動脈内皮細胞(Human pulmonary artery endothelial cells)(東洋紡 #T302K-05))

『RECTM』(組織/直腸(Rectum)(Invitrogen #D6110-01))

『SKMUS』(組織/骨格筋(Skeletal Muscle)(CLONTECH #64033-1))

『SKNMC』(培養細胞/SK-N-MC細胞(ATCC #HTB-10))

『SKNSH』(培養細胞/SK-N-SH細胞(RCB #RCB0426))

10

『SMINT』(組織/小腸(Small Intestine)(CLONTECH #64039-1))

『SPLEN』(組織/脾臓(Spleen)(CLONTECH #64034-1))

『STOMA』(組織/胃(Stomach)(CLONTECH #64090-1))

『SYNOV』(組織/滑膜組織(Synovial membrane tissue from rheumatoid arthritis))

『T1ESE』(培養細胞/間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell)(トリコスタチンと5アザシチジン処理))

『TBAES』(組織/乳癌(Breast, Tumor)(CLONTECH #64015-1))

『TESOP』(組織/食道癌(Esophageal, Tumor)(Invitrogen #D6860-01))

『TKIDN』(組織/腎臓癌(Kidney, Tumor)(Invitrogen #D6870-01))

『TLIVE』(組織/肝臓癌(Liver, Tumor)(Invitrogen #D6880-01))

20

『TLUNG』(組織/肺癌(Lung; Tumor))

『TRACH』(組織/気管(Trachea)(CLONTECH #64091-1))

『TSTOM』(組織/胃癌(Stomach, Tumor)(Invitrogen #D6920-01))

『TUTER』(組織/子宮癌(Uterus, Tumor)(CLONTECH #64008-1))

『UTERU』(組織/子宮(Uterus)(CLONTECH #64029-1))

【実施例2】

【0153】

オリゴキャップ法で作製したcDNAライブラリーからのクローンの5'末端の全長性の評価

実施例1で作製したヒトcDNAライブラリーの5'末端の塩基配列は、これを公共データベース中のヒト既知mRNAの配列と比較し、5'末端配列が一致する全クローンについて、公共データベース中の既知mRNA配列より長く5'末端が伸びている場合、または5'末端は短いが翻訳開始コドンは有している場合を「全長」と判断し、翻訳開始コドンを含まない場合を「非全長」と判断した。

30

【0154】

次に、ESTimateFLによるクローンの評価を行った。ESTimateFLは、公共データベース中のESTの5'末端配列や3'末端配列との比較によって全長cDNAの可能性の高いクローンを選択するために、ヘルリクス研究所の西川・太田らにより開発された方法である。実施例1で解析したcDNAクローンの5'末端や3'末端配列をESTデータベースに登録されている塩基配列と比較し、取得されたcDNAクローンの配列よりも、5'側または3'側へ伸長しているESTが存在する場合には、そのクローンは「全長ではない可能性が高い」と判断した。公共データベース中のEST配列より5'末端が伸長している場合、あるいは5'末端が短いクローンでも、その差が50塩基以内の場合を便宜的に全長とし、それ以上短い場合を非全長とした。

40

【0155】

その結果、TBAES2007379(配列番号1、2)は、新規な全長cDNAを有することが明らかとなった。

【実施例3】

【0156】

相同性検索による解析

50

実施例 2 で新規な cDNA を有することが明らかとなった TBAES2007379 (配列番号 1、2) について、決定された塩基配列および蛋白質をコードすると推定される ORF 部分のアミノ酸配列について SwissProt、RefSeq、NRDB に対する BLAST 検索を行った。P 値または E 値が 10^{-4} 以下であり、かつアミノ酸データベースを対象にした解析においてはコンセンサス長 × 相同性 = 30 以上の BLAST 検索ヒットデータの中から、相同性がより高く、塩基配列および推定アミノ酸配列に対して機能の予測が比較的容易なヒットデータの中から代表的なものを選択し、相同性検索結果データとして以下に示した。したがって示したデータはあくまで代表的なものであり、クローンに相同性を示す分子が、これのみに限定されるというわけではない。

【0157】

全長塩基配列および推定アミノ酸配列に対する相同性検索結果データを以下に示す。各データは配列名 (配列番号)、ヒットデータの Definition、P 値、比較配列の長さ、相同性、ヒットデータの Accession No. の順に // で区切って記載した。

TBAES2007379 (配列番号 1、2) // // SCUBE2 (CEGP1) protein [Homo sapiens] // 0 // 545aa // 67% // NM_020974。

【実施例 4】

【0158】

推定アミノ酸配列に対するシグナル配列、膜貫通領域および機能ドメインの検索

全長塩基配列から推定されたアミノ酸配列に対して、アミノ末端のシグナル配列の有無と膜貫通領域の有無を予測、さらに蛋白質の機能ドメイン (モチーフ) 検索を行った。アミノ末端のシグナル配列については P S O R T (K. Nakai, M. Kanehisa, Genomics, 14: 897-911 (1992)) を、膜貫通領域については S O S U I (T. Hirokawa et al., Bioinformatics, 14: 378-379 (1998)、三井情報開発株式会社販売) を用いて解析を行った。機能ドメインの検索については P f a m (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いた。P S O R T や S O S U I により、アミノ末端のシグナル配列や膜貫通領域が予測されたアミノ酸配列は分泌、膜蛋白質であると予測された。また、P f a m による機能ドメイン検索において、ある機能ドメインにヒットしたアミノ酸配列はヒットデータをもとに、例えば P R O S I T E (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/prosite-list.pl>) にある機能カテゴリー分類を参照にしてその蛋白質の機能を予測することができる。また、P R O S I T E での機能ドメインの検索も可能である。各ソフトウェアによる検索結果を以下に示す。

【0159】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質は、P S O R T により推定アミノ酸配列にシグナル配列は検出された。また S O S U I により推定アミノ酸配列に膜貫通領域が 1 つ検出された。

【0160】

P f a m により推定アミノ酸配列に機能ドメインを検出し、その検索結果を、クローン名 (配列番号) // 機能ドメイン名のように示し、複数の機能ドメインがヒットした場合には // で区切って並記した。なお同一の機能ドメインが複数ヒットした場合も省略せずに記載した。

TBAES2007379 (配列番号 2) // EGF-like domain // EGF-like domain // Trypsin Inhibitor like cysteine rich domain // EGF-like domain // EGF-like domain // Keratin, high sulfur B2 protein // EGF-like domain // EGF-like domain // Granulins // EGF-like domain // EGF-like domain // EGF-like domain。

【実施例 5】

【0161】

推定アミノ酸配列の相同性検索による機能カテゴリー分類

実施例 2 で新規な cDNA を有することが明らかとなった TBAES2007379 について、推定アミノ酸配列の SwissProt、NRDB、RefSeq の各データベースを対象に行った相同性検索の結果 (実施例 3 参照) から、クローン中にコードされ

10

20

30

40

50

る蛋白質の機能予測、カテゴリー分類を行った。

【0162】

分泌・膜蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンとは、ヒットデータ中に growth factor, cytokine, hormone, signal, transmembrane, membrane, extracellular matrix, receptor, G-protein coupled receptor, ionic channel, voltage-gated channel, calcium channel, cell adhesion, collagen, connective tissue 等、分泌・膜蛋白質と推定される記載があった、もしくは P s o r t と S O S U I による推定 O R F の解析の結果、シグナルシーケンスや膜貫通領域があったクローンである。

【0163】

糖蛋白質関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されるクローンとは、ヒットデータ中に glycoprotein 等、糖蛋白質関連蛋白質と推定される記載があるクローンである。 10

【0164】

シグナル伝達関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンとは、ヒットデータ中に serine/threonine-protein kinase, tyrosine-protein kinase, SH3 domain, SH2 domain等、シグナル伝達関連蛋白質と推定される記載があったクローンである。

【0165】

転写関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンとは、ヒットデータ中に transcription regulation, zinc finger, homeobox 等、転写関連蛋白質と推定される記載があったクローンである。

【0166】

疾患関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンとは、ヒットデータ中に disease mutation, syndrome 等、疾患関連蛋白質と推定される記載があった、あるいは全長塩基配列に対する S w i s s - P r o t ヒットデータ、および N R D B、R e f S e q ヒットデータが、ヒトの遺伝子と疾患のデータベースである Online Mendelian Inheritance in Man (O M I M) に登録されている遺伝子、蛋白質であったクローンである。 20

【0167】

酵素・代謝関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンとは、ヒットデータ中に metabolism, oxidoreductase, E.C.No. (Enzyme commission number)等、酵素・代謝関連蛋白質と推定される記載があったクローンである。

【0168】

細胞分裂・増殖関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンとは、cell division, cell cycle, mitosis, chromosomal protein, cell growth, apoptosis等、細胞分裂・増殖関連蛋白質と推定される記載があったクローンである。 30

【0169】

細胞骨格関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されるクローンとは、ヒットデータ中に structural protein, cytoskeleton, actin-binding, microtubules等、細胞骨格関連蛋白質と推定される記載があるクローンである。

【0170】

核蛋白質・RNA合成関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンとは、ヒットデータ中に nuclear protein, RNA splicing, RNA processing, RNA helicase, polyadenylation等、核蛋白質・RNA合成関連蛋白質と推定される記載があったクローンである。 40

【0171】

蛋白質合成・輸送関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されるクローンとは、ヒットデータ中に translation regulation, protein biosynthesis, amino-acid biosynthesis, ribosomal protein, protein transport, signal recognition particle等、蛋白質合成・輸送関連蛋白質と推定される記載があるクローンである。

【0172】

細胞防御関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されるクローンとは、ヒットデータ中に heat shock, DNA repair, DNA damage等、細胞防御関連蛋白質と推定される記載がある 50

クローンである。

【0173】

発生・分化関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されるクローンは、developmental protein等、発生・分化関連蛋白質と推定される記載があるクローンである。

【0174】

DNA・RNA結合蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンは、ヒットデータ中にDNA-binding, RNA-binding等と記載があったクローンである。

【0175】

ATP・GTP結合蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンは、ヒットデータ中にATP-binding, GTP-binding等と記載があったクローンである。

10

【0176】

この機能カテゴリー分類では一つのクローンが上記の複数のカテゴリーに該当する場合は、そのまま複数のカテゴリーに分類した。ただし、蛋白質の機能は必ずしも分類された機能カテゴリーに限定されるわけではなく、今後その他の機能も明らかになる可能性がある。

【0177】

配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質は、分泌・膜蛋白質に属すると推定できた。

【0178】

なお、現在のところ相同性検索の情報からは機能を推定できる情報の得られない場合でも、今後、データベースのアップデートによって機能が明らかになる可能性がある。

20

【実施例6】

【0179】

推定アミノ酸配列に対する機能ドメインの検索による機能カテゴリー分類

ドメイン、モチーフは蛋白質の最小限の機能構造である。一蛋白質の構造はこの最小限構造の寄せ集めで成り立ち、その結果、蛋白質全体としての機能が決定される。よってドメインやモチーフ構造の解析から全体としての蛋白質が持つ機能を比較的正確に予測することが可能である。また、この結果を機能別にデータベース化することは、特定の機能を持つクローンが容易に選択可能ということであり、個々のクローンの機能解析の際に非常に有用である。

30

【0180】

全長塩基配列から推定されたアミノ酸配列のPfamに対するドメイン検索(実施例4参照)の結果から、ヒットデータのドメイン、モチーフ名やアクセッション番号、Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>)における詳細な記述データや、PROSITE (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/prosite-list.pl>)にある機能カテゴリー分類を参照に、ヒットしたクローン中にコードされる蛋白質の機能予測、カテゴリー分類を行った。

【0181】

分泌・膜蛋白質のカテゴリーに属すると推定されるクローンは、受容体、イオンチャンネル、ホルモン、成長因子などと推測されるような例えば7 transmembrane receptor, Pancreatic hormone peptides, Ion transport protein, Fibroblast growth factor等のドメイン、モチーフを持つクローンである。

40

【0182】

糖蛋白質関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されるクローンは、糖蛋白質、糖転移酵素などGlycobiologyに関わると推測されるような例えばImmunoglobulin domain, Glycosyl transferases group 1等のドメイン、モチーフを持つクローンである。

【0183】

シグナル伝達関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンは、蛋白質リン酸化酵素、脱リン酸化酵素、SH2ドメイン、Small G蛋白質などと推測されるような例えばEukaryotic protein kinase domain, Protein phosphatase 2C, Ras family等のドメ

50

イン、モチーフを持つクローンである。

【0184】

転写関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンとは、転写因子、転写調節に関わる蛋白質などと推測されるような例えばbZIP transcription factor, Zinc finger, C2H2 type等のドメイン、モチーフを持つクローンである。

【0185】

疾患関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されるクローンとは、特定の疾患で発現が見られるような蛋白質や、疾患で発現が上昇したり減少したりすると推測されるような例えばWilm's tumour protein, von Hippel-Lindau disease tumor suppressor protein等のドメイン、モチーフを持つクローンである。

10

【0186】

酵素・代謝関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンとは、転移酵素、合成酵素、加水分解酵素などと推測されるような例えばAldehyde dehydrogenase family, Chitin synthase, Glucose-6-phosphate dehydrogenase等のドメイン、モチーフを持つクローンである。

【0187】

細胞分裂・増殖関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されるクローンとは、サイクリン、細胞増殖制御蛋白質などと推測されるような例えばCyclin, Cell division protein等のドメイン、モチーフを持つクローンである。

【0188】

細胞骨格関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されるクローンとは、アクチン、キネシン、フィブロネクチンなどと推測されるような例えばActin, Fibronectin type I domain, Kinesin motor domain等のドメイン、モチーフを持つクローンである。

20

【0189】

核蛋白質・RNA合成関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンとは、スプライシング因子、RNA合成酵素、ヘリカーゼなどと推測されるような例えばHepatitis C virus RNA dependent RNA polymerase, DEAD/DEAH box helicase等のドメイン、モチーフを持つクローンである。

【0190】

蛋白質合成・輸送関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されるクローンとは、翻訳関連蛋白質、ユビキチン関連蛋白質、Ribosomal proteinなどと推測されるような例えばTranslation initiation factor SU11, Ubiquitin family, Ribosomal protein L16等のドメイン、モチーフを持つクローンである。

30

【0191】

細胞防御関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されるクローンとは、分子シャペロン、DNA修復蛋白質などと推測されるような例えばHsp90 protein, DNA mismatch repair protein等のドメイン、モチーフを持つクローンである。

【0192】

発生・分化関連蛋白質のカテゴリーに属すると推定されるクローンとは、器官形成関連蛋白質などと推測されるような例えばFloricaula / Leafy protein等のドメイン、モチーフを持つクローンである。

40

【0193】

DNA・RNA結合蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンとは、転写因子、DNAリガーゼをはじめとしたDNA・RNA関連酵素類、Zinc-finger関連蛋白質などと推測されるような例えばTranscription factor WhiB, B-box zinc finger, tRNA synthetases class I (C)等のドメイン、モチーフを持つクローンである。

【0194】

ATP・GTP結合蛋白質のカテゴリーに属すると推定されたクローンとは、ATPase等をはじめとしたATP・GTP関連酵素類、G蛋白質などと推測されるような例えばE1-E2 ATPase, Ras family等のドメイン、モチーフを持つクローンである。

50

【0195】

なお、この機能カテゴリー分類では一つのクローンが上記の複数のカテゴリーに該当する場合は、そのまま複数のカテゴリーに分類した。ただし、蛋白質の機能は必ずしも分類された機能カテゴリーに限定されるわけではない。

【0196】

配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質は、Pfamでヒットデータ（実施例4参照）があったものの、上記のいずれのカテゴリーに属するか明らかでないクローンであった。しかし、EGF-likeと呼ばれるドメイン（EGF様ドメイン）、およびEGF様ドメインの繰り返し（EGF様リピート）を有している。そのドメイン、リピートが有する性質より、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質はEGF様生理活性、すなわちEGF様ドメインまたはEGF様リピートを有する蛋白質と同様の生理活性を有していると推定できた。また、配列番号2に記載のアミノ酸配列は、トリプシンインヒビター様システインリッチドメイン、ケラチン（high sulfur B2 protein）モチーフ、グラニューリンモチーフといった、膜蛋白質に特徴的であるシステインリッチなモチーフ、ドメインを有するので、分泌・膜蛋白質に属すると推定できた。

10

【0197】

今後同様のドメイン、モチーフを持つ蛋白質のデータの蓄積と共に機能がより詳細に解明され、上記のカテゴリーに分類できる可能性がある。

【0198】

またこれら以外にPfamでヒットデータがなかった場合でも、今後蛋白質のデータの蓄積と共に新たなドメイン、モチーフが見い出された場合、再びクロンの推定アミノ酸配列を新しいデータベースに対して解析することで新たな機能を有したドメイン、モチーフが発見され、カテゴリー分類できる可能性がある。

20

【実施例7】

【0199】

cDNAクローンTB AES 2007379（配列番号1、2）の配列の詳細な解析

実施例3～6で解析したcDNAクローンの全塩基配列について、BLAST（Basic local alignment search tool; Altschul, S. F., et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1990)）による相同性検索（homology search）や、HMMER（隠れMarkovモデルによる配列解析手法; Eddy, S. R., Bioinformatics, 14: 755-763 (1998)）の機能群のひとつであるHMMPFAMによる蛋白質特徴検索（profile search: <http://pfam.wustl.edu>）に加え、PROSITE（蛋白質の機能の類似性によりドメイン構造やファミリーを分類したアミノ酸パターンのデータベース; Nucleic Acids Res., 30: 235-8 (2002)）を検索し、各cDNAクローンがコードする蛋白質の機能を推定した。また、その塩基配列の一部が完全に一致する公知のクローンが存在するスプライシングバリエーションと推定されるクローンについては、そのゲノム配列が解析可能であればどのエクソンが欠失してスプライシングしたものであるかを解析した。さらに、蛋白質の細胞内局在の予測プログラムであるPSORTII（Trends Biochem. Sci., 24: 34-6 (1999)）による詳細な解析を行った。その結果を以下に示す。

30

【0200】

実施例3～6で分泌・膜蛋白質であると推定されたクローンであるTB AES 2007379は、配列番号1に示すように、3119塩基からなり、そのうち塩基番号70番から2118番までがオープンリーディングフレーム（終止コドンを含む）である。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列は、682アミノ酸残基からなる（配列番号2）。配列番号1の配列について公共DBおよびGeneSeqに対してBLASTを用いて相同性検索を行い、配列番号2のアミノ酸配列に対して高い相同性を有する配列を複数見いだした。これらのうち、RefSeqの登録記号NM020974にコードされる蛋白質は、SCUBE2（Signal peptide-CUB-EGF-like domain containing protein 2）と呼ばれる既知の蛋白質であった（J. Biol. Chem., 277: 46364-46373 (2002)）。前述したように、ここで見出されたのは、詳しくはSCUBE2の「SCUBE2 a

40

50

」と呼ばれるバリエーションであったが、SCUBE2の中でもこのSCUBE2aが最も広く存在することで知られ、SCUBE2と略記されることも多いことから、本実施例中においては、これをSCUBE2と称する。

【0201】

その他に、GeneSeqの登録番号ABK92209(WO02/30268号公報)、ABN86363(WO02/55988号公報)、ABT07724(WO02/59377号公報)、ABT17101(WO02/98358号公報)、ABZ11546(WO02/70539号公報)、ACC50098(WO03/004989号公報)、ADG89346(WO03/078662号公報)が見出され、これらの配列は、NM020974(SCUBE2)と塩基配列の相違は認められるがアミノ酸配列としては完全に一致した。TB AES 2007379とNM020974(SCUBE2)の構造比較を図1に示す。

10

【0202】

また、GeneSeqの登録番号ABT31918(WO03/000012号公報)、AAL51944(WO03/002610号公報)、ADD78281(WO03/077875号公報)、RefSeqの登録番号AK123039の各配列については、それぞれNM020974(SCUBE2)と比較して、TB AES 2007379と同様に、一部欠失、アミノ酸置換、一部配列付加が認められた。

【0203】

これらの中でも特にTB AES 2007379には、NM020974(SCUBE2)の中央部分とC末端部分に比較的長い欠失が認められた(図1)。これらの欠失はゲノム解析の結果から特定のエクソンが欠失していることに起因すると考えられた。TB AES 2007379とNM020974(SCUBE2)のゲノム構造の比較を図2に示す。図2に示すとおり、NM020974(SCUBE2)は全部で22個のエクソンを有しているが、TB AES 2007379はそのうち12~14番目のエクソンと、19番目のエクソンを欠失しており、19番目のエクソンの欠失によりそれに続くエクソン内のフレームシフトを生じて終止コドンが生じている。この結果、TB AES 2007379のアミノ酸配列には、NM020974(SCUBE2)と比較して、特異的な連結配列(配列番号2のアミノ酸番号443~444番)およびC末端配列(配列番号2のアミノ酸番号678~682番)が存在することがわかった。また、NM020974(SCUBE2)のアミノ酸番号280番アルギニンがTB AES 2007379では280番グルタミンとなっている。これらのTB AES 2007379に特異的な配列を利用すれば、TB AES 2007379特異的抗体の作製等が可能であると推察された。

20

30

【実施例8】

【0204】

in silicoにおける発現頻度解析

実施例1に示した様々な組織・細胞由来のcDNAライブラリーを作製し、各ライブラリーからcDNAクローンを無作為に選択して、その5'末端領域の配列を決定し、データベース化した。本データベースは1,402,069個のクローンの塩基配列をデータベース化したものであり、解析母数としては十分なデータベースである。なお、cDNAクローンを無作為に選択したが、データベースにTB AES 2007379が含まれていた

40

【0205】

このデータベースにある各クローンの塩基配列を、塩基配列の相同性検索プログラムによって相同な配列同士をカテゴライズし(クラスター化)、各クラスターに属するクローン数を各ライブラリー毎に集計し規格化することによって、ある遺伝子のcDNAライブラリー内での存在比を解析した。この解析によって、cDNAライブラリーのソースとなっている組織や細胞における、ある遺伝子の発現頻度情報を得た。

【0206】

次に本発明のcDNAの塩基配列を持つ遺伝子の、組織や細胞間での発現を解析するた

50

めに、大量の cDNA クローンを解析した組織や細胞由来のライブラリーを組織・細胞間での発現量の比較の対象にした。すなわち 600 個以上の cDNA クローンの塩基配列を解析した組織や細胞について、先に規格化した数値を組織間や細胞間で比較し、遺伝子の発現頻度の変化を解析した。

【0207】

癌の組織では、正常組織とは異なる遺伝子のセットが発現して組織・細胞の癌化に寄与していると考えられている。したがって、正常組織とは異なる発現をする遺伝子は癌関連遺伝子である。正常な組織と比較して癌組織で発現変化する遺伝子を探索した。

【0208】

その中で、TBAES2007379 (配列番号1) は、乳癌由来のライブラリー (TBAES) と、正常な乳房由来のライブラリー (BEAST) の cDNA を解析して比較した結果 (表1)、両者で顕著な発現変化を示した。よって TBAES2007379 は乳癌に関する遺伝子であると推定された。なお、表1中の各数値は、相対的な発現頻度を示し、数値が大きいほど発現量が多いことを示す。

[表1]

Clone ID	BEAST	TBAES
TBAES2007379	0.000	100.000

【0209】

なお、他の各種癌組織、各種正常組織、各種成体組織、各種胎児組織、各種細胞由来のライブラリーの cDNA についても TBAES2007379 の発現頻度を解析して種々比較したが、TBAES2007379 が発現変化を示すものはなかった。

【実施例9】

【0210】

蛋白質の調製

(1) TBAES2007379 の CHO 発現系の構築

実施例2で新規な cDNA を有することが明らかとなったクローンである TBAES2007379 を鋳型とし、PCR法により TBAES2007379 遺伝子を増幅させた。なお、PCR法では、合成 forward プライマー (配列番号7) 及び合成 reverse プライマー (配列番号8) を使用した。

【0211】

増幅された PCR 産物を、制限酵素 EcoRI (TAKARA社製) で処理した後、PstI (TAKARA社製) で部分分解し、アガロースゲル電気泳動にて、約 2 kb のバンドを切り出し、DNA断片を回収した。この DNA断片を目的遺伝子として pME-sigXaIg (配列番号9) の EcoRI (890)、PstI (1319) 部位に導入して発現ベクターとした。なお、制限酵素名の後に () で示した数字は、配列番号9に記載のプラスミド pME-sigXaIg の配列上の塩基番号であり、制限酵素部位を示す。得られたプラスミドで大腸菌 DH5 株 (TOYOBO社製) を形質転換し、コロニーからプラスミド DNA を抽出・精製した後に、DNA配列を確認した。

【0212】

ここで作製した発現ベクターは、挿入された目的遺伝子上流に HAI-2 遺伝子 (FEBS Letters, 436:111-114(1998)) のシグナル配列、挿入された目的遺伝子下流にヒト IgG1 の Fc 領域の配列 (タグ付加用)、目的遺伝子とヒト Fc 領域の間にプロテアーゼ認識配列 (FactorXa用) を有するベクターである。これを発現させると、TBAES2007379 の全長蛋白質の C 末端側に、プロテアーゼ認識配列を介してヒト Fc タグが連結された融合蛋白質が発現される。

(2) CHO 発現系による TBAES2007379 の発現

10

20

30

40

50

【0213】

上記(1)で作製した発現ベクターをピューロマイシン耐性を付与するためのベクターである pBS pac p (Gene, 62(1):121-126(1988)) とともに、CHO 細胞株に形質導入した。形質導入には Transfectam^R (BIOSEPRAS 社製) を用い、実験プロトコールは試薬に付属の説明書に従った。ピューロマイシン耐性が付与され、ピューロマイシン (10 μg/ml) および FBS (10% : GIBCO 社製) を含有する eRDF 培地 (極東製薬社製) に生育してきた形質導入株を選択し、それぞれを 96 ウェルの細胞培養用プレート (Corning 社製) にて培養した。

【0214】

次に、96 ウェルの細胞培養用プレートで培養した培養上清について、ヒトFc を検出する ELISA (酵素免疫測定法) を行うことで、目的の融合蛋白を発現しているクローンを選択した。ヒトFc を検出する ELISA は、ヒトIgG に反応するヤギポリクローナル抗体 (ICN 社製) を 96 ウェルの細胞培養用プレートに予め固相化しておき、これに前記の各クローンの培養上清を加えて 37 °C で 1 時間反応させた後洗浄し、HRP (西洋わさびペルオキシターゼ) 標識抗ヒトIgG ヤギポリクローナル抗体 (ICN 社製) を反応させ、洗浄後に OPD (o-Phenylenediamine) を基質とした発色反応を行い、発色の強度を吸光度計で測定することにより行った。

【0215】

上記のように選択されたクローンは、それぞれ直径 10 cm の培養用プレート (Corning 社製) で培養し、細胞を回収した。回収した細胞に PBS 緩衝液 100 μl を添加し、氷上にて超音波により細胞を破碎した。細胞破碎物について、ウェスタンブロッティング解析を実施した。

【0216】

ウェスタンブロッティング解析において用いる検出用の抗体としては、(a) HRP 標識されたヒトFc に反応するヤギポリクローナル抗体 (ICN 社製)、および、(b) 実施例 10 に後述するペプチドを免疫して得られた実施例 11 に後述する 2 種類のウサギ抗血清を用いた。すなわち、部分ペプチド 4 を免疫して得られたウサギ抗血清と、部分ペプチド 2 ~ 4 の混合物を免疫して得られたウサギ抗血清を用いることとし、これら 2 種類の抗血清を混合したものも用いた。なお、(b) の場合は、抗血清の非特異的反応を低減させるために、遺伝子を導入していない CHO 細胞の破碎物とあらかじめ 37 °C で 1 hr 反応させてから用いた。(b) の場合の標識抗体としては HRP 標識抗ウサギIgG ヤギポリクローナル抗体 (DAKO 社製) を用い、検出は (a) および (b) のいずれの場合も ECL プラス化学発光キット (アマシャムバイオサイエンス社) を用いて行った。

【0217】

以上の蛋白質の発現確認の結果を図 3 に示す。図 3 において、いずれの抗体を反応させた場合も、TB AES 2007379 の全長とヒトFc の融合蛋白質として期待される分子量 (98.4 kDa) 付近にバンドが認められ、TB AES 2007379 が発現されたことが確認された。

【0218】

また、実施例 11 に後述する 2 種類のウサギ抗血清は、いずれも発現した蛋白質と特異的に結合することが示された。

【実施例 10】

【0219】

TB AES 2007379 の部分ペプチドと免疫用抗原の作製

ペプチド合成機 (アプライドバイオ社) を用い TB AES 2007379 の部分ペプチドを合成した。合成する配列は、TB AES 2007379 と SCUBE 2 のアミノ酸配列を比較し、異なっている配列 (TB AES 2007379 に特異的な配列) を利用した。すなわち、部分ペプチド 2 および 3 は、TB AES 2007379 の 12 ~ 14 番目のエクソンが欠失していることにより生じる特異的な連結配列 (アミノ酸番号 443 ~ 444 番) を含む配列である。また、部分ペプチド 1 は、19 番目のエクソンを欠失している

ためにそれに続くエクソン内でのフレームシフトを生じて終止コドンが生じていることから、このC末端の配列（アミノ酸番号678～682番）を利用するものである。

【0220】

抗体作製用としては、部分ペプチド1（配列番号10：配列番号2のアミノ酸番号666～682に対応）は、キャリアー蛋白との結合に必要な官能基とリンカーを導入した部分ペプチド4（配列番号13）として合成した。部分ペプチド2（配列番号11：配列番号2のアミノ酸番号439～458に対応）と部分ペプチド3（配列番号12：配列番号2のアミノ酸番号431～450に対応）は、末端に官能基を持つアミノ酸がすでにあるため、そのままの配列を用いて合成した。

部分ペプチド1：TTDFDGSTNITQFCDNI（配列番号10）

部分ペプチド2：KKDCVASCDLSCIVKRTEKR（配列番号11）

部分ペプチド3：PGYKLHWNKKDCVASCDLSC（配列番号12）

部分ペプチド4：CGTTDFDGSTNITQFCDNI（配列番号13）

【0221】

作製した各ペプチドは、KLH（キーホール・リンペット・ヘモシアニン：PIERCE社）をキャリアー蛋白質として用いて、免疫用のペプチド蛋白質コンジュゲート（ペプチドKLHコンジュゲート）を作製した。

【0222】

各部分ペプチドとKLHの結合方法は2種類実施した。一つ目の方法（カルボジイミド法）は、各ペプチドとKLHをモル比で10：1になるようにMES緩衝液pH6.0に溶解した液を用意し、そこにペプチドに対してモル比で10倍当量になるようにカルボジイミド（同仁社）を加え、室温にて1時間反応させた。その後、未反応物を除去するためにリン酸緩衝液pH7.0を用いて一晚透析を行った。2つ目の方法（マレイミド法）はKLHにマレイミド基が導入されているImject Maleimide Activated Carrier Proteins（PIERCE社）を用いてこのキットに記載されている方法に従い行った。

【0223】

具体的には、まず、3種類の部分ペプチド2、3、4について、それぞれKLHとカルボジイミド法又はマレイミド法により結合させ、計6種類のコンジュゲートを作製した。次に、2通りの方法で作製したコンジュゲート3種類をそれぞれ混合して2種類の混合物を調製した。作製した各コンジュゲートと免疫動物の組み合わせを、表2に示した。

【表2】

	作製方法	部分ペプチド	免疫動物
1	カルボジイミド法	4	マウス
2	カルボジイミド法	2	マウス
3	カルボジイミド法	3	マウス
4	カルボジイミド法	2+3+4	マウス
5	マレイミド法	4	マウス
6	マレイミド法	2+3+4	マウス
7	マレイミド法	4	ウサギ
8	マレイミド法	2+3+4	ウサギ

【実施例11】

【0224】

TBAES2007379に対するポリクローナル抗体の作製

実施例10にて作製したペプチドKLHコンジュゲートを含む各溶液を、同容量のフロイント完全アジュバントとともに、Balb/cマウスの皮下および腹腔内に4週間間隔で2回投与した。この後、マウス血清中で抗体価が上昇していることを確認し、マウスの尾静脈より採血して、遠心分離にて血清を分離しTBAES2007379に対するマウスポリクローナル抗体を得た。

10

20

30

40

50

【0225】

ウサギのポリクローナル抗体も作製した。実施例10にて作製したペプチドKLHコンジュゲートを含む溶液を、同容量のフロイント完全アジュバントとともに、ウサギの皮下に投与した。8週後に耳より採血し、遠心分離にて血清を分離しTB AES 2007379に対するウサギポリクローナル抗体を得た。

【0226】

免疫に用いたコンジュゲートと免疫動物の組み合わせは、上記実施例10の表2に示したとおりである。

【実施例12】

【0227】

TB AES 2007379に対する抗体の解析用ELISAプレートの作製

実施例10で作製した6種のペプチドKLHコンジュゲートを抗体解析用の抗原として、各ペプチドKLHコンジュゲートが最終濃度 $2\mu\text{g/ml}$ になる様に混合し生理的リン酸水素緩衝液(PBS(-))に希釈後、96ウェルプレート(コースター社)のウェルに $50\mu\text{l}$ ずつ添加した。この後、4下にて24時間保存して、各抗原を96ウェルプレートに吸着させた。この抗原付着プレートより溶液を除き、5%BSAを含むPBS(-)を $250\mu\text{l}$ ずつウェルに添加して、4にて一昼夜(12時間程度)または37にて2時間以上おくことによりブロッキング操作を行い、特異性解析用ELISAプレートとして、4下にて保存した。また、コントロールとしてKLHのみを吸着させた96ウェルプレートも同様に作製した。これらのELISAプレートは、使用直前にプレート中のブロッキング溶液を除いて使用した。

【実施例13】

【0228】

TB AES 2007379に対する抗体の特異性及び親和性解析

実施例12で作製したTB AES 2007379に対する抗体の解析用ELISAプレートのうち、ペプチドKLHコンジュゲートを吸着したプレートに対して、実施例11で得られた6種類のマウス抗血清および2種類のウサギ抗血清を希釈して添加し、抗血清に含まれるポリクローナル抗体の反応性を解析した。

【0229】

TB AES 2007379に対する抗体の特異性解析用ELISAプレート2種類(ペプチドKLHコンジュゲート吸着プレートと、KLHのみ吸着したプレート)に対し、それぞれ希釈した抗血清を $50\mu\text{l}$ /ウェルにて添加した後4下にて2時間以上反応させた。希釈液にはPBS(-)を用い、希釈倍率は20250、60750、182250、546750倍とした。

【0230】

この後、0.05% Tween 20を含むPBS(-)液(以下、これを「PBST液」と称することがある)を用いて十分な洗浄を行ない、これに二次抗体として、マウス抗血清の場合はHRP標識ヒツジ抗マウスIgGポリクローナル抗体(DAKO社) $1\mu\text{g/ml}$ および1%BSAを含むPBS(-)を $100\mu\text{l}$ ずつウェルに添加し、ウサギ抗血清の場合はHRP標識ヒツジ抗ウサギIgGポリクローナル抗体(DAKO社) $1\mu\text{g/ml}$ および1%BSAを含むPBS(-)を $100\mu\text{l}$ ずつウェルに添加して、さらに室温で1時間反応させた。PBST液で十分に洗浄操作を行った後、 0.4mg/ml オルトフェニレンジアミン(OPD、Sigma社P-9029)および0.015~0.03%過酸化水素溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.0)を添加して室温にて反応させ、発色反応を行なった。この後1N H_2SO_4 溶液を添加して反応を止め、測定波長490nm、リファレンス波長650nmにて吸光度測定を行った。得られた結果を図4に示す。また、KLHのみを吸着させたプレートに対する反応との差を図5に示す。

【0231】

実施例11で作製した抗体は実施例12で作製したペプチドKLHコンジュゲートプレートに反応した。また、ペプチドKLHコンジュゲートと同量のKLHのみを吸着させた

10

20

30

40

50

プレートよりも反応性が高く、T B A E S 2 0 0 7 3 7 9 に特異的に反応する抗体が作製できたことが確認できた。また、5 4 6 7 5 0 倍という高倍率で希釈しても反応があることから、高親和性の抗体が作製できたことも確認できた。

【実施例 1 4】

【0 2 3 2】

T B A E S 2 0 0 7 3 7 9 に対する抗体を用いた解析

実施例 1 1 で得られた抗体を用いて、各種の癌細胞株およびヒト正常組織での T B A E S 2 0 0 7 3 7 9 の存在についてドットプロットにて解析を行った。

【0 2 3 3】

用いた癌細胞株の名称は表 3 に示した。各癌細胞株は A T C C 社等で入手可能な市販品を用いた。各癌細胞株は、直径 1 0 c m の培養用プレート (Corning 社製) で培養し、細胞を回収した。回収した細胞に P B S 緩衝液 1 0 0 μ l を添加し、氷上にて超音波により細胞を破碎した。得られた細胞破碎物の 1 μ l をニトロセルロース膜にプロットし、解析を実施した。

[表 3]

	名前	臓器	
1	M K N 1	胃	20
2	M K N 2 8	胃	
3	M K N 4 5	胃	
4	H S C - 3	胃	
5	L i c	肝	
6	H e p G 2	肝	
7	M C F 7	乳房	
8	S W 3 8 7	大腸	
9	D L D - 1	大腸	
10	C o l o 2 0 5	大腸	
11	H L C	肺	30
12	L K A Z	肺	
13	P C - 3	肺	
14	P C - 9	肺	
15	P A N C - 1	膵	
16	H 6 2	肺	
17	コントロール (組換え発現した T B A E S 2 0 0 7 3 7 9)		

【0 2 3 4】

ヒト正常組織の実験は、クロンテック社より購入した市販の正常組織 (プロテインモデル、C a t . N o . 1 6 0 2 - 1) に付属の実験プロトコールに従って行った。用いた正常組織の種類は、表 4 に示した。これらも 1 0 m g / m l の溶液からそれぞれ 1 μ l をプロットに用いた。

[表 4]

	臓器	
1	脳	
2	甲状腺	50

- 3 心臓
- 4 肺
- 5 リンパ節
- 6 脾臓
- 7 肝臓
- 8 胃
- 9 小腸
- 10 腎臓
- 11 卵巣
- 12 子宮
- 13 胎盤
- 14 精巣
- 15 膀胱
- 16 コントロール (組換え発現した
T B A E S 2 0 0 7 3 7 9)

10

【 0 2 3 5 】

コントロールとしては、上記実施例 9 で発現させた組換え T B A E S 2 0 0 7 3 7 9 を用いることとし、組換え T B A E S 2 0 0 7 3 7 9 を発現している C H O 細胞の破砕物をポジティブコントロールとして適量プロットした。

20

【 0 2 3 6 】

一次抗体として実施例 1 1 で作製した抗体を用いた。非特異的反応を低減させるために遺伝子を導入していない C H O 細胞の破砕物とあらかじめ 3 7、1 h r 反応させてから用いた。二次抗体としては、H R P 標識抗ウサギ I g G ヤギポリクローナル抗体 (D A K O 社) を用いた。検出は E C L プラス化学発光キット (アマシャムバイオサイエンス社) を用いて行った。各種癌細胞株のドットプロットの結果を図 6 に、正常組織のドットプロットの結果を図 7 に示す。

【 0 2 3 7 】

その結果、癌細胞株では乳房由来の M C F 7 と大腸由来の D L D - 1、C o l o 2 0 5 と肺由来の H L C でコントロールと同程度のはっきりとした反応が得られた。また、ヒト正常組織では反応したものはなく、コントロールのみが反応した。よって T B A E S 2 0 0 7 3 7 9 は癌細胞特異的に蛋白発現しており、特に乳癌細胞、大腸癌細胞、肺癌細胞で強い蛋白発現していることがわかった。この結果から、T B A E S 2 0 0 7 3 7 9 は癌の診断や治療に応用でき、特に癌の診断には非常に有用性が高いと考えられた。

30

【 実施例 1 5 】

【 0 2 3 8 】

T B A E S 2 0 0 7 3 7 9 測定系の構築とヒト血液中の T B A E S 2 0 0 7 3 7 9 の測定

実施例 1 1 で得られたウサギ抗体を一次抗体として使用した。この抗体を 3 0 μ g / m l の濃度になるように 0 . 0 5 M 炭酸 - 重炭酸緩衝液 (p H 9 . 6) に溶解し、1 0 0 μ l / ウェルにて 9 6 ウェルプレートへ添加し、4 にて一昼夜 (1 2 時間程度以上) おいて固相化した。この一次抗体付着プレートより一次抗体溶液を除いた後、1 % B S A を含む P B S (-) を 2 5 0 ~ 3 0 0 μ l / ウェルずつ添加し、4 にて一昼夜 (1 2 時間程度) または 3 7 にて 2 時間以上おいてブロッキングした。このプレートからブロッキング溶液を除き、これに、各種癌患者のヒト血清を 1 0 0 μ l、もしくは、コントロールとして上記実施例 9 で発現させた組換え T B A E S 2 0 0 7 3 7 9 を C H O 細胞の培養上清として 1 0 0 μ l ずつ添加し、室温にて約 1 時間反応させた。各種癌患者のヒト血清は、ベリタス社から購入した。膵臓癌患者の血清を 8 検体、肝癌患者の血清を 6 検体、大腸癌患者の血清を 5 検体、胃癌患者の血清を 1 検体、小腸癌患者の血清を 1 検体、また、健康者 (正常) 血清を 2 検体用いた。

40

【 0 2 3 9 】

50

反応後、500 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 20 mM Tris-HCl pH 7.5を組成とする洗浄液を使用して十分な洗浄を行なった後、実施例11で作製したマウス抗体1 µg/mlおよび1% BSAを含むPBS(-)を100 µlずつウェルに添加し、室温にて約1時間反応させた。次に上記の洗浄液を使用して十分な洗浄を行ない、二次抗体としてHRP標識ヒツジ抗マウスIgGポリクローナル抗体(DAKO社)を2000倍希釈した1% BSAを含むPBS(-)を100 µlずつウェルに添加し、さらに室温で1時間反応させた。洗浄液で十分に洗浄操作を行った後、0.4 mg/ml オルトフェニレンジアミン(OPD, Sigma社 P-9029)および0.015~0.03% 過酸化水素溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液(pH 5.0)を100 µl/ウェルずつ添加して室温にて反応させ、発色を行なった。その後1 N H₂SO₄ 10
 溶液を100 µl/ウェルずつ添加して反応を止め、測定波長490 nm、リファレンス波長650 nmにて吸光度測定を行なった。結果を図8に示す。

【0240】

その結果、正常人より高い値を示した癌患者血清は21検体中15検体あった。特に膵癌患者では高値を示す検体があった。また、肝癌、小腸癌でも高い値を示す検体があった。この結果から、TB AES 2007379の血液中測定が、癌の診断に有用であることが示された。

【実施例16】

【0241】

TB AES 2007379に対するモノクローナル抗体の作製

実施例10にて作製したペプチドKLHコンジュゲートを含む各溶液を、同容量のフロイント完全アジュバントとともに、Balb/cマウスの皮下および腹腔内に4週間間隔で3回投与する。マウスの血清中に抗体が産生していることを確認後、10 µgのペプチドKLHコンジュゲートを含む溶液を尾静脈内に投与する。3日後に脾臓を取り出し、「単クローン抗体実験マニュアル」(講談社サイエンティフィック1987年出版)に従い、ポリエチングリコール1500を使用して、脾臓細胞をミエローマ細胞P3U1と細胞融合させ、96ウェルプレートに注入後HAT培地を添加して14日間の培養を行う。

【0242】

この後、TB AES 2007379に対して特異的なモノクローナル抗体を培地中に産生するハイブリドーマの選別を行う。すなわち、実施例12で作製したTB AES 2007379に対する抗体の解析用ELISAプレートのうちペプチドKLHコンジュゲートを吸着したプレートに対して、選択するハイブリドーマの培養上清を添加し、培養上清に存在するモノクローナル抗体の反応性を解析する。TB AES 2007379に対する抗体の特異性解析用ELISAプレートに対し、選択するハイブリドーマの培養上清を100 µl/ウェルにて添加した後4 下にて2時間以上反応させる。

【0243】

この後、0.05% Tween 20を含むPBS(-)液(PBST液)を用いて十分な洗浄を行ない、HRP標識ヒツジ抗マウスIgG・Fcポリクローナル抗体(ICN社)1 µg/mlおよび1% BSAを含むPBS(-)を100 µlずつウェルに添加し、さらに室温で1時間反応させる。PBST液で十分に洗浄操作を行った後、0.4 mg/ml オルトフェニレンジアミン(OPD, Sigma社 P-9029)および0.015~0.03% 過酸化水素溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液(pH 5.0)を添加して室温にて反応させ、発色を行なう。その後1 N H₂SO₄ 溶液を添加して反応を止め、測定波長490 nm、リファレンス波長650 nmにて吸光度測定を行う。

【0244】

次に、ここで得られたペプチドKLHコンジュゲートに対して反応性を有するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を用い、実施例12で作製したKLHのみを吸着させたELISAプレートにて同様にスクリーニングを行い、KLHに対して反応性を全く示さないハイブリドーマを選択する。このスクリーニングにより、TB AES 2007379に対して特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られる。

【0245】

得られた各ハイブリドーマは、限界希釈法による4回のクローニング操作後、培養上製を回収してプロテインAが結合したアフィニティークロマトグラフィー（アマシャムファルマシアバイオテク製）により、モノクローナル抗体の精製を行う。かくして本発明の蛋白質（TB AES 2007379）に対して特異的な反応性を有するモノクローナル抗体を得ることができる。

【0246】

なお、本出願は、2003年5月9日付けの日本特許出願（特願2003-131452）に基づくものであり、その内容は本明細書に参照として取り込まれる。また、本明細書において引用された全ての先行技術文献も、参照として本明細書に取り込まれる。

10

【図面の簡単な説明】

【0247】

【図1】図1は、配列番号2のアミノ酸配列を有する蛋白質（TB AES 2007379蛋白質）の構造と既知蛋白質NM020974（SCUBE2）の構造を比較した図である。

【図2】図2は、配列番号1の塩基配列を有するDNA（TB AES 2007379）と既知蛋白質NM020974（SCUBE2）をコードするcDNAのゲノム構造を比較した図である。

【図3】図3は、CHO発現系によるTB AES 2007379蛋白質の発現を、ウェスタンブロッティングにより確認した結果を示す。

20

【図4】図4は、部分ペプチド2～4（混合物も含む）とKLHのコンジュゲートを吸着させたプレートに対する、該コンジュゲートを免疫原として得たポリクローナル抗体の反応性を測定した結果を示す。

【図5】図5は、ペプチドコンジュゲートを免疫原として得たポリクローナル抗体の、ペプチドKLHプレートに対する反応性とKLHのみを吸着させたプレートに対する反応性の差を示す。

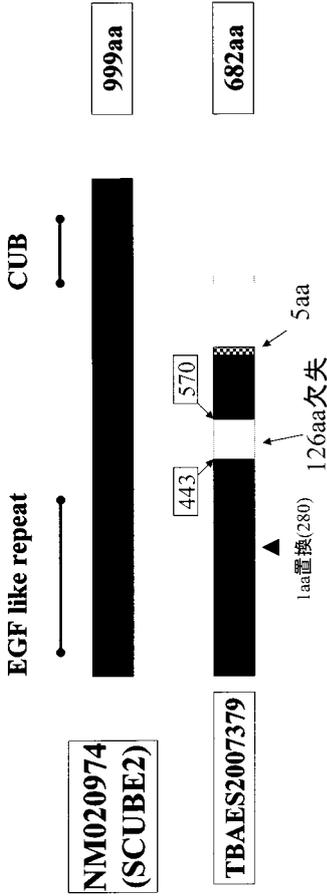
【図6】図6は、TB AES 2007379に特異的な抗体を用いた各種癌細胞に対するドットプロットの結果を示す。

【図7】図7は、TB AES 2007379に特異的な抗体を用いた正常組織に対するドットプロットの結果を示す。

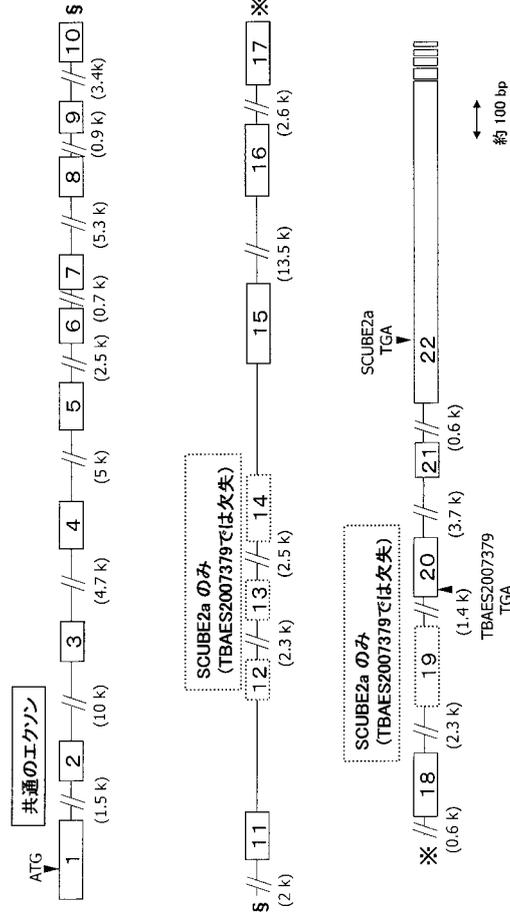
30

【図8】図8は、各種癌患者血清中のTB AES 2007379をELISAで測定した結果を示す。

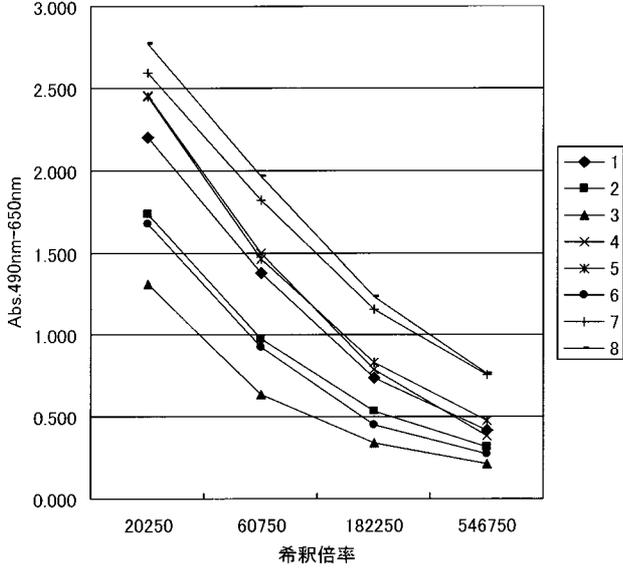
【 図 1 】



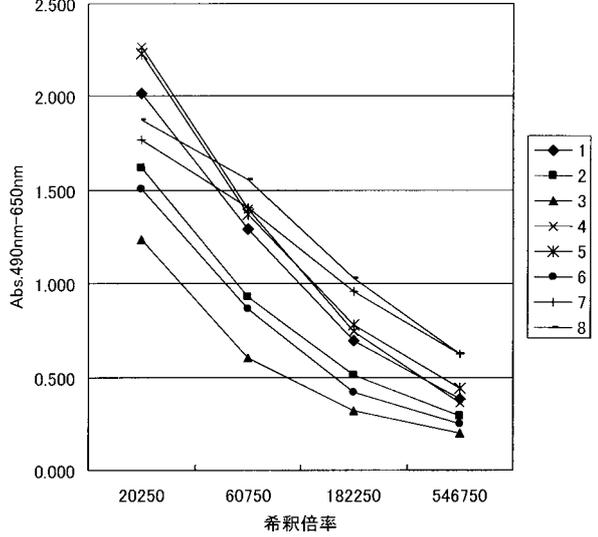
【 図 2 】



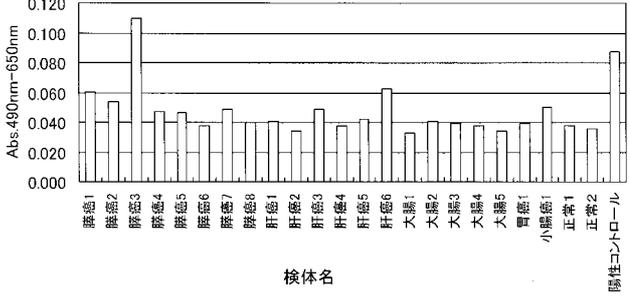
【 図 4 】



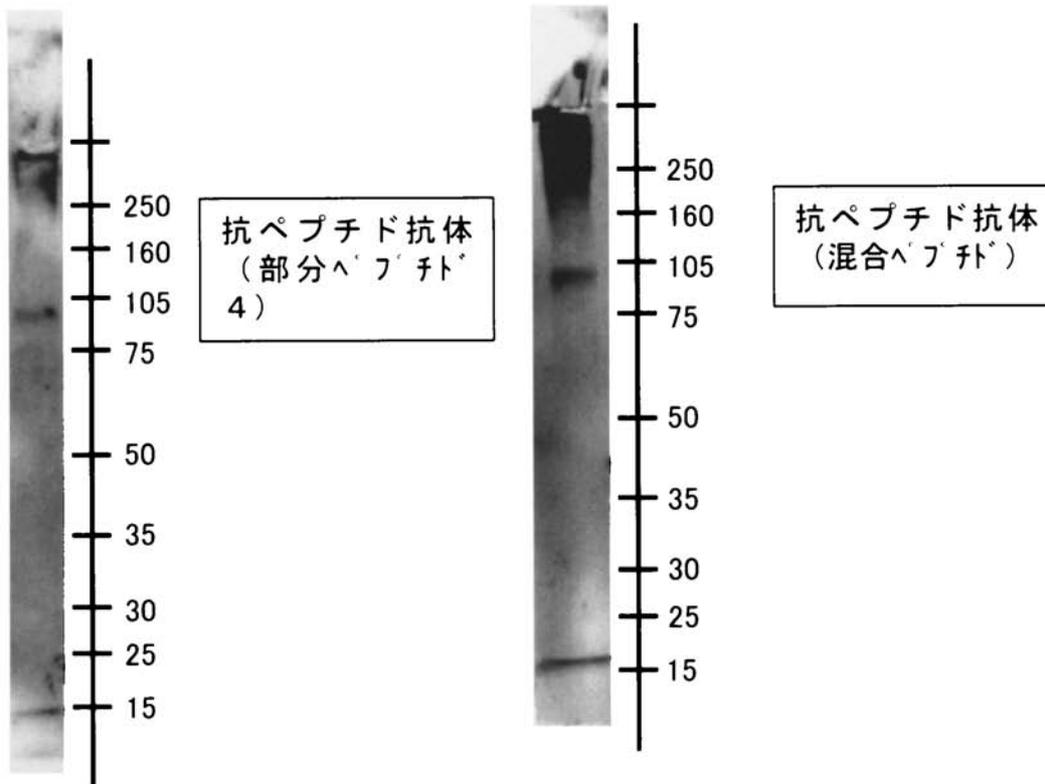
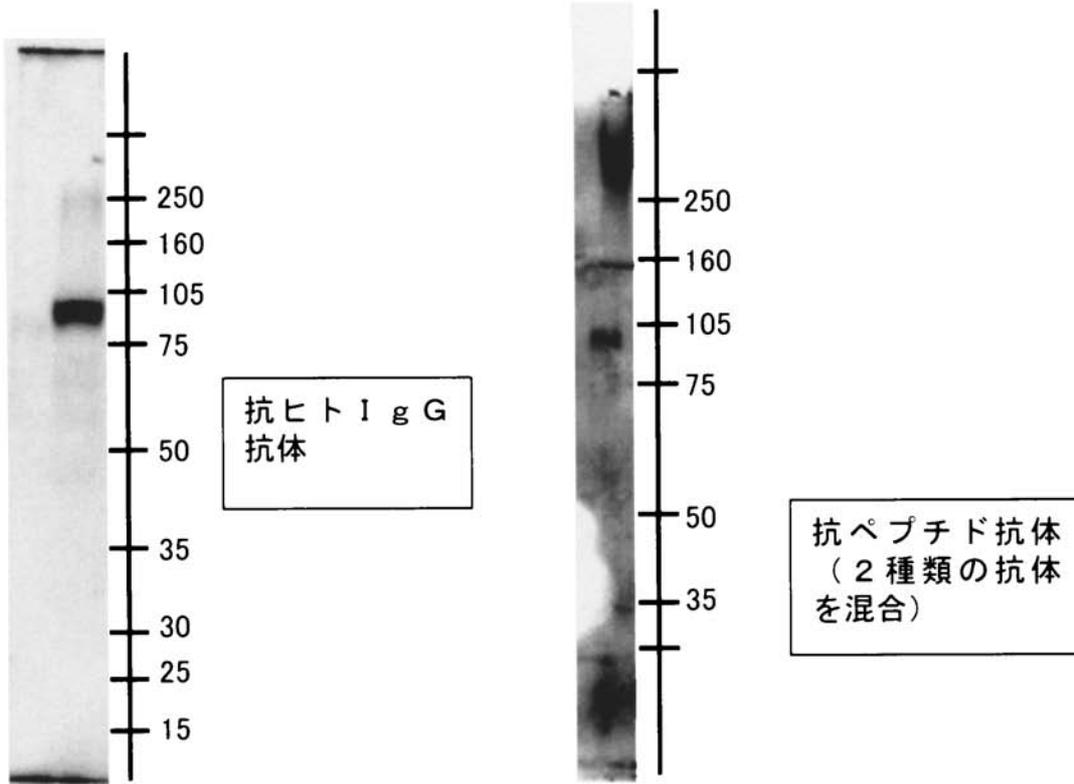
【 図 5 】



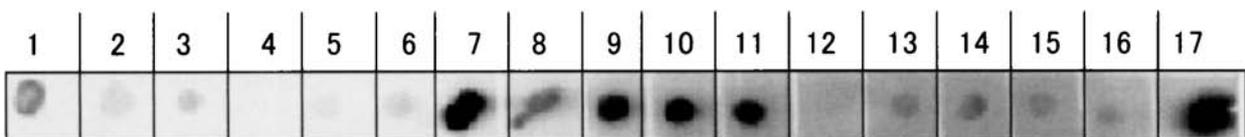
【 図 8 】



【 図 3 】



【 図 6 】



【 図 7 】

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

【 配 列 表 】

2004357702000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 6 5
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/34	Z 4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 15/00	F

(72)発明者 大槻 哲嗣

東京都西東京市谷戸町 2 - 8 - 2 7 - 1 1 1

(72)発明者 若松 愛

千葉県木更津市高柳 1 4 7 3 - 4 - 2 0 2

(72)発明者 畚野 信剛

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内

(72)発明者 山岸 俊哉

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内

(72)発明者 吉川 勉

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 三菱ウェルファーマ株式会社内

(72)発明者 田谷 千歳

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 三菱ウェルファーマ株式会社内

Fターム(参考) 2B030 AD08 CA14

2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA12 AA19 BA21 BA56 BA80 CA04 CA07 CA09 CA12
 CA20 DA02 EA04 GA11 GA27 HA11 HA13 HA14 HA17
 4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC08 FA12 FA15
 4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ53 QQ61 QQ79
 QQ89 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR56 QR62 QR77 QR80
 QR84 QS16 QS25 QS33 QS34 QS36 QX01 QX02
 4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AB01 AC14 BA02 CA24 CA43 CA44
 CA46
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA20 DA75 DA76
 EA20 EA51 FA71 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	新蛋白质和编码相同的DNA		
公开(公告)号	JP2004357702A	公开(公告)日	2004-12-24
申请号	JP2004139527	申请日	2004-05-10
[标]申请(专利权)人(译)	研究协会生物技术		
申请(专利权)人(译)	研究协会生物技术		
[标]发明人	磯貝隆夫 山本順一 西川哲夫 五十野祐子 杉山友康 大槻哲嗣 若松愛 畚野信剛 山岸俊哉 吉川勉 田谷千歳		
发明人	磯貝 隆夫 山本 順一 西川 哲夫 五十野 祐子 杉山 友康 大槻 哲嗣 若松 愛 畚野 信剛 山岸 俊哉 吉川 勉 田谷 千歳		
IPC分类号	A01H5/00 A01K67/027 C07K14/485 C07K16/22 C12M1/00 C12M1/34 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01H5/00.A A01K67/027 C07K14/485 C07K16/22 C12M1/00.A C12M1/34.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A C12N15/00.F C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/09.200 C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2B030/AD08 2B030/CA14 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA19 4B024/BA21 4B024/BA56 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA27 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR84 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA20 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		

摘要(译)

解决的问题：分析全长cDNA文库中包含的cDNA克隆的核苷酸序列，鉴定由具有新序列的cDNA的cDNA编码的蛋白质的生理活性，基于生理活性和目的鉴定蛋白质。建议如何使用编码的DNA。解决方案：根据以下(a)至(c)中任一项的蛋白质；(a)具有EGF活性的蛋白质，该蛋白质由特定的人源氨基酸序列组成，(b)上述蛋白质的氨基酸序列中的一种或几种蛋白质。缺失，取代和/或由氨基酸序列组成的氨基酸，以及在癌细胞或癌组织中表达增加的蛋白质，(c)由该蛋白质的氨基酸序列中的部分氨基酸序列组成，以及癌细胞或在癌症组织中表达增加的蛋白质。[选择图]无

【表 2】

	作製方法	部分ペプチド	免疫動物
1	カルボジイミド法	4	マウス
2	カルボジイミド法	2	マウス
3	カルボジイミド法	3	マウス
4	カルボジイミド法	2+3+4	マウス
5	マレイミド法	4	マウス
6	マレイミド法	2+3+4	マウス
7	マレイミド法	4	ウサギ
8	マレイミド法	2+3+4	ウサギ