

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3801917号
(P3801917)

(45) 発行日 平成18年7月26日(2006.7.26)

(24) 登録日 平成18年5月12日(2006.5.12)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 37/48	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

請求項の数 37 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-528594 (P2001-528594)	(73) 特許権者	593005895
(86) (22) 出願日	平成12年10月2日(2000.10.2)		コンセホ・スベリオール・デ・インベステ
(65) 公表番号	特表2003-511033 (P2003-511033A)		イガシオネス・シエンティフィカス
(43) 公表日	平成15年3月25日(2003.3.25)		CONSEJO SUPERIOR DE
(86) 国際出願番号	PCT/GB2000/003784		INVESTIGACIONES CI
(87) 国際公開番号	W02001/025442		ENTIFICAS
(87) 国際公開日	平成13年4月12日(2001.4.12)		スペイン・エ-28006・マドリッド・
審査請求日	平成14年4月1日(2002.4.1)		カリエ・セラノ113
(31) 優先権主張番号	P 9902169	(74) 代理人	100064908
(32) 優先日	平成11年10月1日(1999.10.1)		弁理士 志賀 正武
(33) 優先権主張国	スペイン(ES)	(74) 代理人	100089037
			弁理士 渡邊 隆
前置審査		(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAポリメラーゼラムダおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEQ ID NO: 5に記載されたアミノ酸配列を含む単離されたDNAポリメラーゼ (Pol)ポリペプチド。

【請求項2】

438位のアルギニン残基がトリプトファンに置換されている、請求項1記載のPolポリペプチド。

【請求項3】

SEQ ID NO: 2に記載されたアミノ酸配列を含む単離されたDNAポリメラーゼ (Pol)ポリペプチド。

【請求項4】

SEQ ID NO: 7、9または11のいずれか一つに記載されたアミノ酸配列を含む単離されたDNAポリメラーゼポリペプチドアイソフォーム。

【請求項5】

DNAポリメラーゼ活性を有し、かつ、請求項1ないし4のいずれか一項に記載のPolポリペプチドと少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

【請求項6】

DNAポリメラーゼ活性を有し、かつ、請求項1ないし4のいずれか一項に記載のPolポリペプチドをコードする核酸配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイ

ズすることができる核酸によりコードされる単離されたポリペプチド。

【請求項 7】

DNAポリメラーゼ活性を有し、かつ、請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載の P o l 　ポリペプチドの配列変異体またはアレルであって、SEQ ID NO : 5 または 2 に記載されたアミノ酸配列に対して少なくとも 90% のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

【請求項 8】

DNAポリメラーゼ活性を有する、請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載の P o l 　ポリペプチドの単離されたフラグメントまたは活性部分。

【請求項 9】

請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の P o l 　ポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

10

【請求項 10】

SEQ ID NO : 1 または 4 に記載された P o l 　コード配列を含む単離された核酸分子。

【請求項 11】

SEQ ID NO : 4 のアミノ酸残基 438 (Arg) からトリプトファン (Trp) への変化をもたらす、P o l 　cDNA の 1683 位において一塩基多型 (C から T) を有する、請求項 10 記載の核酸分子。

【請求項 12】

SEQ ID NO : 6、8 または 10 に記載された配列を有する核酸を含む単離された核酸分子。

20

【請求項 13】

DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、かつ、SEQ ID NO : 1 または 4 に記載された P o l 　コード配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する単離された核酸分子。

【請求項 14】

DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、かつ、SEQ ID NO : 1、4、6、8 または 10 に記載された核酸配列に、明細書中に記載されたストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる単離された核酸分子。

30

【請求項 15】

その発現を指示する調節配列に機能的に結合した請求項 9 ないし 14 のいずれか一項に記載の核酸配列を含む発現ベクター。

【請求項 16】

ベクターが、プラスミド、コスミド、バクテリオファージ、またはウイルスベクターである、請求項 15 記載のベクター。

【請求項 17】

請求項 15 または 16 に記載の発現ベクターでトランスフォームされた宿主細胞。

【請求項 18】

P o l 　ポリペプチド、またはそのアイソフォーム、フラグメントまたは活性部分を産生する方法であって、請求項 17 に記載の宿主細胞を培養し、かくして産生された P o l 　ポリペプチドを単離することを含む方法。

40

【請求項 19】

遺伝子治療法に使用するための請求項 10 ないし 14 のいずれか一項に記載の核酸配列を含むベクター。

【請求項 20】

請求項 10 ないし 14 のいずれか一項に記載の P o l 　核酸分子を含む 医薬組成物。

【請求項 21】

請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の P o l 　ポリペプチドを含む 医薬組成物。

【請求項 22】

50

医学的治療方法における使用のための請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の P o l
ポリペプチド。

【請求項 2 3】

請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の P o l ポリペプチドに特異的に結合できる抗体。

【請求項 2 4】

(a) アッセイにおける P o l ポリペプチドの存在または量を検出または定量するため、または (b) P o l ポリペプチドを精製するための、請求項 2 3 記載の抗体の使用。

【請求項 2 5】

P o l に特異的に結合することができる抗体を産生する方法であって、免疫原として請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載のポリペプチドを用いることを含む方法。

【請求項 2 6】

(a) P o l 生物学的活性を有する、または (b) P o l ポリペプチドに結合する、または (c) P o l ポリペプチドの生物学的活性を阻害する候補化合物をスクリーニングするための、請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の P o l ポリペプチドの使用。

【請求項 2 7】

D N A 分子を修復または再構成するための医薬を調製するための、D N A ポリメラーゼ活性を有する請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の P o l ポリペプチドの使用。

【請求項 2 8】

P o l 核酸配列を増幅するプライマーを設計するための、請求項 1 0 ないし 1 4 のいずれか一項に記載の核酸分子の使用。

【請求項 2 9】

試験サンプルにおける P o l 核酸またはその変異形態の存在および / または核酸配列内の変異を調べる方法であって、

(a) 核酸の試験サンプルと、請求項 1 0 ないし 1 4 のいずれか一項に記載の核酸配列にハイブリダイズし得るプローブとを接触させる工程 ; および

(b) 核酸プローブが試験サンプルに存在する核酸に結合するか否かを調べる工程を含む方法。

【請求項 3 0】

試験サンプルにおける P o l 核酸配列を増幅する方法であって、

(a) 請求項 1 0 ないし 1 4 のいずれか一項に記載の核酸配列に基づくプライマーを用いて、P o l 核酸配列を増幅する工程 ; および

(b) かくして産生された増幅された P o l 核酸を分離する工程を含む方法。

【請求項 3 1】

試験サンプルにおける P o l 核酸もしくはその変異形態、または P o l ポリペプチドもしくはそのアイソフォームの存在を調べる方法であって、

(a) サンプル内の核酸の配列を、S E Q I D N O : 4 に記載された P o l 核酸配列の全てまたは一部と比較して、患者に由来するサンプルが一以上の変異を含むか否かを調べる工程 ; または

(b) 患者に由来するサンプルにおける請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の P o l ポリペプチドの存在を調べ、存在する場合には、そのポリペプチドが、全長であるか、および / または野生型であるか、および / または野生型ポリペプチドのアイソフォームであるか、および / または正常レベルで発現されているかを調べる工程 ; または、

(c) D N A フィンガープリンティングを用いて、患者に由来する核酸のサンプルを制限酵素で切断した場合に得られる制限パターンを、請求項 9 ないし 1 4 のいずれか一項に記載の核酸から得られた制限パターンと比較する工程 ; または、

(d) 請求項 9 ないし 1 4 のいずれか一項に記載の P o l 核酸配列に結合できる特異的結合メンバを用いる工程であって、前記特異的結合メンバが、P o l 核酸配列と

10

20

30

40

50

ハイブリダイズし得る核酸を含むか、天然もしくは変異した P o l 核酸配列またはそれにコードされたポリペプチドに対する特異性を備えた抗体ドメインを含む物質を含み、特異的結合メンバが、その結合パートナーに対する特異的結合メンバの結合が検出可能であるようにラベルされている工程；または

(e) 請求項 9 ないし 1 4 のいずれか一項に記載の配列に基づく一以上のプライマーを用いた P C R を使用して、患者に由来するサンプルにおける正常または変異 P o l 遺伝子をスクリーニングする工程、
の一以上を含む方法。

【請求項 3 2】

変異 P o l 核酸配列が、 2 5 7 6 位においてシトシンをチミジンに置換する変異、
および 2 5 7 9 位においてチミジンをグアニジンに置換する変異を含む、請求項 3 1 記載の方法。

10

【請求項 3 3】

P o l またはそのアイソフォームに関連した腫瘍の予後の診断のためである、請求項 3 1 または 3 2 記載の方法。

【請求項 3 4】

D N A 修復を調節することができる化合物を同定する方法であって、

(a) 請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の P o l ポリペプチドと候補化合物とを接触させる工程、および

(b) 候補化合物が、 P o l ポリペプチドの D N A ポリメラーゼ活性を調節および
/ または結合するか否かを調べる工程
を含む方法。

20

【請求項 3 5】

P o l ポリペプチドを発現する細胞系統で実施される、請求項 3 4 記載の方法。

【請求項 3 6】

化合物により引き起こされる調節が、 D N A ポリメラーゼ活性のアッセイにおいて調べられる、請求項 3 4 または 3 5 記載の方法。

【請求項 3 7】

(c) P o l の D N A ポリメラーゼ活性を阻害することができる候補化合物を選択する工程

30

をさらに含む、請求項 3 4 ないし 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は D N A ポリメラーゼの同定および単離、並びにこのポリメラーゼの使用に関する。特に本発明は、 D N A ポリメラーゼラムダ (P o l) のヒト遺伝子のヌクレオチド配列、 P o l のアミノ酸配列、およびその m R N A の選択的スプライシングから誘導されたいくつかのアイソフォーム (isoform) のアミノ酸配列を記載する。これらのアイソフォームの一部と腫瘍サンプルとの結合から、 P o l は、腫瘍プロセスの診断、予後および進展のマーカーとなる。

40

【 0 0 0 2】

【従来の技術】

D N A 修復メカニズムの存在に対する第一の仮説の一つは、多細胞生物の胚細胞に存在する D N A が、減数分裂に関連した効率的な D N A 修復により、損傷、そして結果的には老化から保護されるということを提案するものであった。一方、体細胞は、より低い D N A 修復力しか備えていないので、 D N A の損傷をはるかに受けやすい。しかしながら、ゲノムで起こる損傷および変更の殆どを消失する、体性レベルでも作用するいくつかの D N A 修復機構が存在すること、そして、これらの保護メカニズムの過剰な損傷または機能不全が早発性の老化および細胞死を引き起こし、あるいは、腫瘍プロセスを特徴付ける増殖を促すことが知られている。

50

【 0 0 0 3 】

哺乳動物では、種々の種の寿命とそのDNA修復実行力との間に明確な相関関係が存在する。さらに、老化は、DNAに損傷を与える処理またはDNA修復に関係する遺伝子における遺伝的欠陥により加速されうる。ヒトでは、老化のキーポイントの一つは、中枢神経系(CNS)の変性であり、これは、遺伝子毒性剤に対するその極度の感受性に関連する。時にCNSの早期老化の症状を示すほとんどの変性疾患は、DNAの損傷の蓄積によるものであると、広く受け入れられている。

【 0 0 0 4 】

さらに、DNA修復の欠陥による変異の固定(体性変異)は、細胞のトランスフォーメーションを引き起こしうる。発癌は、DNAにおける損傷により始まり、次いで、DNAセグメントの変異または転座が起こり、最後は細胞の表現型のトランスフォーメーションが起こる、複雑なプロセスである。一部の正常な遺伝子(プロトオンコジーン)が、DNA鎖を破壊するいくつかの薬剤の作用により腫瘍性(オンコジーン)になりうるということが広く刊行物に記載されている。しばしば、これらの変化は、直接的にプロトオンコジーンの配列に影響し、これは、異なる染色体における別の破壊ポイントに転座される。当該技術分野で知られているように、殆どの細胞は、このゲノムの損傷を認識および消失するDNA修復メカニズムを付与されている。これらのシステムの不在または機能不全は、細胞トランスフォーメーションの可能性を増加する。ポリADP-リボースポリメラーゼ(PARP)は、DNA鎖破壊のDNA修復に関与する第一の酵素の一つである。その活性は、コントロールと比べて、SV40でトランスフォームした繊維芽細胞の核においてより高いことが示された。同様に、PARPの酵素活性は、正常細胞と比べて、白血病においてより高いことが示され、これと同様の増加が、健常者と比較して結腸直腸ガン患者の粘膜において観察されている(Miwaら, Arch.Biochem.Biophys.181:313-321 (1977); Burzioら, Proc.Soc.Exp.Biol.Med.149:933-938(1975); Hiraiら, Cancer Res.43:3441-3446 (1983))。この研究は、PARPのDNAポリメラーゼ活性がDNAの損傷後に増加するという結論付けさせるものである。さらに、特定の薬剤の添加によるPARPのポリメライゼーション活性の増加は、ゲノムDNA損傷および腫瘍形成トランスフォーメーションの危険性の増加を引き起こした[Harris, Int.J.Radiat.Biol.48:675-690 (1985)]。これらのデータは、腫瘍マーカーとして、およびガン進展の傾向の指標としてPARPを用いることを示唆した。米国特許第5449605号参照。

【 0 0 0 5 】

一方、近年、非遺伝的結腸ガン、および約15%の散発性胃ガンが、DNAの反復性配列の不安定性により特徴付けされることが示された(マイクロサテライト(microsatellite))。ミューテーター表現型と呼ばれるこの表現型は、自発的変異の数百倍の増加を伴う[Eshlemanら, (1995), Oncogene 10, 33-37; Eshlemanら, (1996), Oncogene 12, 1425-1432]。これは、DNAミスマッチ修復のプロセスに関与する遺伝子の機能不全による[Hofman & Cazaux, (1998), Int.J.Oncol.12, 377-382; Umar & Kunkel, (1996), Eur.J.Biochem.238, 297-307]。かくして、結腸ガンの疾病素質(素因)の基準は、複製後ミスマッチ修復に必要とされる遺伝子の一部(hMSH2、hMLH1、PMS1、PMS2、hMSH3およびhMSH6)における生殖細胞系変異(遺伝)の存在に基づくことができ[Prollaら, (1998), Nature Genetics 18, 276-279]；欠陥DNA修復の結果として現れうる第二の散発性変異が、同一の遺伝子の他のアレルを標的化、またはDNA修復に関与する別の遺伝子を標的化した場合に、ミューテーター表現型を増加させ、増殖性変異体のさらなる選別を可能にし、かつ、腫瘍形成を引き起こす。いくつかの変異は、遺伝的結腸ガン患者における、しばしば、連続的なアデニン残基とシトシン残基のシリーズに発生するフレームシフトである、ミスマッチ修復に関与する二つのヒトの遺伝子(hMSH3とhMSH6)に記載されていた。

【 0 0 0 6 】

これまでに、P01 が“ミスマッチ修復”のプロセスに関係するという証拠は無い。しかしながら、P01のアレルの一つにおける、活性部位に近い、特異的欠失(アミノ酸208から236)は、一部の乳ガンおよび結腸ガンに関係して見出されている[Batta

10

20

30

40

50

charyya & Banerjee, (1997), P.N.A.S. USA 94, 10324-10329]。さらに、83%のヒト大腸ガンは、P o l 遺伝子の変異の存在を示す[Wangら(1992), Cancer Res.52,4824-4827; Dobashiら,(1995),Hum.Genet.95,389-390]。また、膀胱ガンに關与するP o l 変異の存在についても証拠が報告されている。しかし、この場合には、p 1 6 およびR Bのような腫瘍サプレッサー遺伝子に關連したさらなる変異も存在する[Matsuzakiら(1996), Mol.Carcinog.15,38-43]。腫瘍形成(tumourogenesis)におけるP o l の重要性を証明する試みは成功しなかった。これは、P o l の生殖細胞系(germline)欠失が致死的表現型をもたらすからである[Guら(1994), Science 265, 103-106]。

【0007】

これまで、10の真核細胞性DNAポリメラーゼが記載されている(DNAポリメラーゼ、 、 、 、 、 、 、 、 および)。DNAポリメラーゼ、 、 および は、DNA複製に關する[Wood & Shivji (1997), Carcinogenesis 18, 605-610]。ほとんどのDNA修復メカニズムが、損傷したヌクレオチドを置換または破壊されたDNAの末端を架橋するためにDNA合成工程に關与する。細胞内でしばしば用いられるメカニズムの一つは、僅かに修飾された塩基または無塩基のヌクレオチドを消失させる“塩基排除修復”である。このプロセスに關与するDNA合成酵素は、X R C C 1 およびDNAリガーゼIIIと共同して作用するP o l であることが示された[Dianov & Lindahl, (1994), Nature 362, 709-715; Sobolら,(1996),Nature 379, 183-186; Nichollら(1997), Biochemistry 36, 7557-7566]。プロセシビティーファクターPCNAとDNAポリメラーゼ および に關与する、選択的な、より大きなスケールのプロセスの存在について考察されていた。“ヌクレオチド排除修復”と称されるプロセスにおいて実施される、DNAにおけるチミジンダイマーの消失およびバルク付加は、DNAポリメラーゼ または も關与することを示す。これと同じ意味で、DNAポリメラーゼ または は、挿入エラーの複製後修復(ミスマッチ修復)を触媒する際に引き出される。これは、この処理がP o l に欠陥のある細胞で通常行われるからである。ハウスキーピング遺伝子であるP o l の発現は一定であり、かつ、調節された細胞増殖または細胞周期のいずれによっても刺激されない[Zmudzkaら,(1988), Nucleic Acids Res. 16,9587-9596]。明らかに、ミスマッチ修復はDNA複製と対であるべきであり、両方のプロセスが共制御されるべきである。DNAポリメラーゼ、 および は、複製エラーを修正するのに適していない。一方、その生化学的特性は、これらの酵素がDNAレシジョン(lesion)のバイパス、DNA修復の別法に關与することを支持する[Lawrence & Hinkle, (1996), Cancer Surv. 28, 21-31; Masutaniら(1991), Nature 399, 700-704; Shariefら(1991), Genomics 1, 90-96]。

【0008】

さらに、ミュテーター表現型の取得に關与するさらなるDNAポリメラーゼを同定するという技術課題が残っている。これらのポリメラーゼは、ガン発達の疾病素質を有する患者を同定するためのツールを提供するために臨床的に極めて重要であり、早期検出の臨床的検視および早期段階での介入の効率を改善し[de la Chapelle & Peltomaki, (1995), Annual Rev.Genet.29,329-348]、これらのターゲットに基づいた治療の新規手法を開発する。また、これらのDNAポリメラーゼの一部は、中枢神経系の神経変性疾患に關与している。これは、これらのプロセスが、おそらくは、不完全な、または誤りの傾向のあるDNA修復と關連しているからである。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

概して、本発明は、DNAポリメラーゼラムダ(P o l)のヒトおよびマウス遺伝子の核酸配列、P o l のアミノ酸配列、およびそのmRNAの選択的スプライシングから得られたいくつかのアイソフォームのアミノ酸配列を記載する。これらのアイソフォームの一部と腫瘍サンプルとの結合は、P o l を、一部の腫瘍プロセスの予後、診断および進展の潜在的マーカーとする。活性部位の近くに位置づけられた一塩基多型に相当するアレル変異体、および腫瘍形成に關連するポリAの近くのダブルミュテーションについても開示する。さらに、P o l が非常に低い挿入適合度を有するDNAポリメラー

ぜであるという事実から、胚細胞および体細胞の両方で、この酵素の制御不全がゲノムの変異頻度を増大させるという可能性が開かれる。さらに、P o l の発現の変更は、ミューター表現型の出現を導く、DNA修復欠如と関連した病理学的プロセスに関連する。

【0010】

【課題を解決するための手段】

従って、第一の態様では、本発明は、SEQ ID NO: 4に記載されたアミノ酸配列を含む単離されたDNAポリメラーゼ (P o l)ポリペプチドを提供する。これは、ヒトP o l の野生型アミノ酸配列である。他の関連する態様では、本発明は、ヒトのP o l のアイソフォームである単離されたポリペプチドを提供する。このポリペプチドは、SEQ ID NO: 7、9および11に記載されたアミノ酸配列を有する。

10

【0011】

さらなる態様では、本発明は、SEQ ID NO: 1に記載されたアミノ酸配列を含む単離されたDNAポリメラーゼ (P o l)ポリペプチドを提供する。これは、マウスのP o l の野生型アミノ酸配列である。

【0012】

さらなる態様では、本発明は、上記P o l アミノ酸配列のいずれか一つと、40%より大きいアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチドを提供する。さらなる態様では、本発明は、ストリンジェントな条件下で、ヒトまたはマウスのP o l またはそのアイソフォームをコードする核酸配列の一つにハイブリダイズすることができる核酸によってコードされた単離されたポリペプチドを提供する。

20

【0013】

さらなる態様では、本発明は、上記ポリペプチドのいずれか一つの配列変異体またはアレルであるポリペプチドである物質を提供する。

【0014】

さらなる態様では、本発明は、上記ポリペプチドのいずれか一つのフラグメントまたは活性部位である物質を提供する。

【0015】

さらなる態様では、本発明は、上記ポリペプチドのいずれか一つをコードする単離された核酸分子を提供する。全長ヒトP o l のcDNA配列はSEQ ID NO: 5に記載されている。全長マウスP o l のcDNA配列はSEQ ID NO: 1に示されており、対応するゲノム配列はSEQ ID NO: 3に記載されている。ヒトアイソフォームの核酸配列は、SEQ ID NO: 6、8および10に記載されている。

30

【0016】

また本発明は、上記核酸配列のいずれか一つと90%より高い配列同一性を有する核酸分子を含む。他の実施態様では、本発明は、SEQ ID NO: 1、5、6、8または10に記載した配列に、例えば以下に記載するストリンジェントな条件下で、ハイブリダイズする核酸配列に関する。

【0017】

さらなる態様では、本発明は、その発現を指示するコントロール配列に機能的に結合した上記核酸のいずれか一つを含む発現ベクター、およびこのベクターでトランスフォームされた宿主細胞を提供する。また、本発明は、宿主細胞を培養し、かつかくして産生されたポリペプチドを単離することを含む、P o l ポリペプチド、もしくはそのアイソフォーム、フラグメントまたは活性部位を産生する方法も含む。

40

【0018】

さらなる態様では、本発明は、遺伝子治療法に使用するためのP o l 核酸を含む発現ベクターを提供する。

【0019】

さらなる態様では、本発明は、ここに定義するP o l 核酸分子を含む組成物を提供する。

50

【0020】

さらなる態様では、本発明は、上記一以上の P o l ポリペプチドを含む組成物を提供する。

【0021】

さらなる態様では、本発明は、医学的治療方法に使用するための上記 P o l ポリペプチドまたは核酸分子を提供する。

【0022】

さらなる態様では、本発明は、例えば、薬学的研究におけるリード化合物として発展する、P o l ポリペプチドのペプチドまたは非ペプチド模擬物を見出すための、(a) P o l 生物学的活性を備えるか、(b) P o l ポリペプチドに結合するか、(c) P o l ポリペプチドの生物学的活性を阻害する候補化合物をスクリーニングするための P o l ポリペプチドの使用を提供する。

10

【0023】

さらなる態様では、本発明は、上記 P o l ポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。これらの抗体は、P o l ポリペプチドの存在を検出および定量するアッセイにおいて、P o l ポリペプチドを精製する方法において、および P o l 生物学的活性のインヒビターとして、使用することができる。

【0024】

さらなる態様では、本発明は、ここに提供された P o l 核酸配列に基づく核酸プローブに対する試験サンプル核酸のハイブリダイゼーションを検出することを含む、試験サンプルにおける P o l 核酸の存在および/または核酸配列内の変異を調べる方法を提供する。

20

【0025】

さらなる態様では、本発明は、上記 P o l ポリペプチドをコードする核酸を用いて核酸ポリメラーゼ反応を開始することを含む、核酸試験サンプルを増幅する方法を提供する。また、本発明は、例えば一本鎖コンフォメーション多型 (S S C P) のような技術を用いる、P o l 遺伝子における変異の調査における上記核酸の使用も提供する。

【0026】

本発明のこれらのおよびその他の態様を、以下により詳細に記載する。例示的に、本発明の実施態様を、添付図面を参照しながらより詳細に記載する。

30

【0027】

【発明の実施の形態】

P o l のクローニング、発現、および特徴決定

先の出願では、P o l が“ P o l k ”と呼ばれていたこと、および優先日から採用されてきた学名と一致させるために、本発明のポリメラーゼは、当該技術分野およびここにおいては“ P o l ”と称し、また、それをコードする遺伝子について“ P O L L ”と称することに注意すべきである。本発明では、“ P o l の生物学的活性 ”とは、D N A ポリメラーゼとしてのこれらのポリペプチドの活性を指す。

【0028】

本発明の新規の D N A ポリメラーゼ (P o l) は、豚コレラウイルス (ASFV) P o l X のアミノ酸配列をプローブとして用いて同一性を調べることにより同定された [Olivero s r a , (1997), J. Biol. Chem. 272, 30899-30911]。このウイルス性 D N A ポリメラーゼは、P o l X ファミリーと呼ばれる P o l 様 D N A ポリメラーゼのファミリーに属する。この D N A ポリメラーゼが存在することに対する第一の指標は、ゲノム D N A フラグメントを見出したことから得られ、その翻訳は低かったものの、P o l X ファミリーメンバと、特に、触媒中心の最も保存された領域において、顕著な同一性があった。この D N A フラグメント (クローン C I T 282 B 21 : g b A C 0 0 3 6 9 4) は、マウスの 1 9 番染色体に位置づけられ (M u s m u s c u l u s) 、 H T G S (H i g h T h r o u g h p u t G e n o m e S e q u e n c e s) データベースから得られ、P o l が同定されたとき、さらに 1 8 4 9 D N A フラグメントを含んでいた。E S T (d b E S T / G e n B a n k) データベースでさらに同一性を調べた後、この潜在的な D N A ポリメ

40

50

ラーゼの発現の第一の証拠が得られた。マウス P o l に対応する E S T の中で、その完全な c D N A を潜在的にコードするものが同定された。この E S T (クローン 1162340; AA692052) を、L L N L (Lawrence Livermore National Laboratory) の I M A G E 協会 (I M A G E Consortium) から入手し、配列決定した。

【 0 0 2 9 】

得られた配列は、5 7 3 アミノ酸タンパクをコードする、2 2 7 7 ヌクレオチドのオープンリーディングに相当するものであった。c D N A の 5 ' 末端に対応するさらなる配列 (5 9 ヌクレオチド) は、R A C E 5 ' により、マウス精巢の m R N A をもとに得られた。

【 0 0 3 0 】

かくして、P o l 遺伝子 (P O L L) に対応する c D N A は、全部で 2 3 3 6 b p からなり (S E Q I D N O : 1)、8 3 b p の 5 '-非翻訳領域 (ヌクレオチド 1 から 8 3)、1 7 2 2 b p のコード領域 (ヌクレオチド 8 4 から 1 8 0 5)、および 5 3 1 b p の 3 '-非翻訳領域 (ヌクレオチド 1 8 0 6 - 2 3 3 6) を有する。誘導されたタンパクであるマウス P o l は、5 7 3 アミノ酸を有する (S E Q I D N O : 1 または 2)。

【 0 0 3 1 】

c D N A 配列とゲノムクローン AC003694 との比較により、マウス P O L L 遺伝子のエキソン-イントロン機構が定義された (S E Q I D N O : 3 参照)。この遺伝子は、約 8 キロベースにわたり、マウスの第 1 9 染色体に位置づけられる。このゲノム配列は、いくつかのイントロンに位置づけられるいくつかのマイクロサテライトを含む：位置 1 0 7 9 . . . 1 1 5 6 y 3 0 8 8 . . . 3 1 3 8 の (A) 1 2 ; 位置 3 7 7 9 . . . 3 8 2 3 y 4 9 1 4 . . . 4 9 8 2 の (C A) 3 2 ; 位置 4 0 1 7 . . . 4 2 7 2 の (G C C T C T) 4 0 ; 位置 1 5 6 5 . . . 1 5 8 9 の “ A T リッチ ” ; および位置 3 8 7 4 . . . 3 9 0 1 の (T G G) n 。 m R N A 転写物は、9 のエキソンからなる。アミノ酸残基 2 4 7 から 5 7 3 を含む C 末端セグメントは、D N A ポリメラーゼ X ファミリーのメンバと高い同一性を示す [Ito & Braithwaite, (1991), Nucleic Acids Res.19, 4045-4057]。このファミリーのメンバは、D N A 修復に選択的に関与してきた唯一の真核 D N A ポリメラーゼである P o l ; ウイルス性 D N A 修復に関与する A F S V、P o l X ; 抗原レセプター変異性の生成に関与する末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (T d T) である。マウス P o l は、整列されうる部位 (アミノ酸残基 2 4 0 から 5 7 3) に、P o l と 3 2 % のアミノ酸配列同一性を有する。この比較的低い値にも関わらず、鋳型として P o l の構造を用いてこの D N A ポリメラーゼの構造を作製することができ、かつ、全ての構造化された要素 (ヘリックス、ターン、および鎖)、および P o l に記載されている 4 つの異なるサブドメインの三次折り畳み：“ 8 k D a ”、“フィンガー”、“パーム”、および“サム”を保存していた。一次配列および構造予測は、新たに同定されたタンパクが、P o l と呼ばれ、そして、本発明の一部を形成する、新規の D N A ポリメラーゼであるという仮説を支持した。

【 0 0 3 2 】

一方、P o l の最初の 2 3 9 アミノ酸 (P o l には対応部分がない) は、B R C T ドメインを含む (アミノ酸残基 3 4 - 1 2 5)。この B R C T ドメインは、D N A 修復に直接関連する、あるいは、D N A 損傷に反応した細胞周期調節チェックポイントに関連するタンパクの N 末端または C 末端の多重コピーの一つに存在することが最近報告されている。B R C A 1 タンパクに最初に同定された B R C T ドメインは、E C T 2 オンコジーン、タンパク p 5 3 B P、およびヒト R B のような腫瘍形成に関与する他のタンパクにも存在する。B R C T ドメインを触媒ドメイン (P o l 様) と関連させる、アミノ酸残基 S e r と P r o に富んだ領域 (残基 1 2 6 - 2 3 9) が存在し、これは、公知のタンパクとは同一性を有さず、柔軟なヒンジを提供して D N A ポリメラーゼ活性を、D N A 修復プロセスに必要な種々の相互作用、タンパク：タンパク、およびタンパク：D N A に結びつける。

【 0 0 3 3 】

次の工程では、マウス c D N A の完全配列を含むベクターを用いて、形質転換した E. coli

10

20

30

40

50

細胞において P o l を発現させた。これにより、高い量の精製された組み換え P o l を得ることができ、かつ、特異的ポリクローナル抗体を得ることができた。タンパクの発現と、P o l タンパクに特異的に結合できる抗体の生成は、本発明の一部である（さらに以下を参照）。本発明は、かくして、P o l の遺伝子配列；P o l の c D N A 配列；P o l のアミノ酸配列；P o l 核酸を含むベクター、P o l を発現するトランスフォームされた細胞；および P o l に特異的なモノクローナルおよびポリクローナル抗体を含む。

【0034】

P o l に関連した本来的な D N A ポリメラーゼ活性は、S D S -ポリアクリルアミドゲル [Blanco & Salas, (1984), P.N.A.S.USA 81,5325-5329] および P o l の発現が誘導された粗製の E.coli 抽出物における *in situ* D N A ポリメラーゼ分析を用いて行うことができる。分子生物学におけるツールとしてのこの新規 D N A ポリメラーゼの適用の基盤である、この新規酵素の D N A ポリメラーゼ活性は、本発明の一部を形成する。

【0035】

8 キロベースの P o l ゲノム配列の入手可能性が、P o l のヒト c D N A の配列 (S E Q I D N O : 4)、並びにそのコードされているタンパクのアミノ酸配列 (S E Q I D N O : 5) の同定および決定を可能にし、これらの両方が本発明の一部を形成する。P o l のマウスおよびヒトのホモログは、80% 以上のアミノ酸同一性を有し、最も保存された領域では 90% に達し、S e r / P r o -リッチの柔軟なヒンジでは 57% である。P o l のヒトホモログの同定は、最初は、dbEST/GeneBank データベースの同一性調査に基づくものであった。全部で 1323073 の非重複配列のうち、11 がマウス P o l と顕著な同一性を有していた。これらの 11 の D N A フラグメントは、胎児組織（心臓、肝臓および脾臓；5 ケース）、幼児脳（2 ケース）、胚中心 B 細胞（1 ケース）、および、残りの 3 つのケースが一部の腫瘍サンプル（結腸、乳房および生殖細胞）に対応する。P o l に対応する全ての E S T が高い増殖の程度を有する組織（正常または病的）に由来し、それゆえ、これに対応して D N A 修復に関連した酵素の高い量を必要とすることが重要であろう。

【0036】

P o l の m R N A の発現は、精巣において高度に富んでいる（ヒトおよびマウスの両方において）が、殆どの組織において基礎的な発現がある。それゆえ、発現データは、この D N A ポリメラーゼの正常または優勢な機能が、体細胞に起こった D N A 破壊を修復すること、および胚細胞の D N A のプログラムされた二本鎖破壊により開始されるプロセスである減数分裂に関係することであると示唆する。*in vitro* D N A ポリメライゼーションアッセイ中に観察されたエラー傾向の上昇から誘導される興味深い可能性は、P o l により触媒された D N A 合成が、突然変異誘発性であり、ゲノム進化に必要な変異性の背景となりうる変異を D N A に導入し得るということである。

【0037】

この新規 D N A ポリメラーゼの生化学的特性は、分子生物学における新規 D N A 修飾酵素としての潜在的な使用の基盤であり、本発明のさらなる態様を構成する。

【0038】

そのマウスホモログとは異なって、ヒト P o l は、正常組織、腫瘍組織、および細胞系統に検出できる顕著な数のスプライシング変異体を示す。幼児脳から得られたヒト P o l (H11886) に対応する E S T の一つは、P o l プレ m R N A に起こる選択的スプライシングの結果であると考えられ、エキソン 5 と 8 の融合をもたらし、その結果、エキソン 6 と 7 を欠失する（エキソンスキッピング）。これらのエキソンに対応するプライマーを用いた R T - P C R 増幅は、胎児 c D N A に存在するが、成人の c D N A には存在しない二つの主なスプライシング変異体の存在を示した。その一方はエキソン 6 の欠損に対応し (D 6)、他方はエキソン 6 および 7 の同時欠損に対応する (D 6 + 7) (図 2 a)。さらに、これと同じスプライシング変異体とより大きなサイズの別のものが、腫瘍細胞系統および卵巣ガン、結腸腺癌および乳ガンのようなヒト腫瘍から誘導された生物学的サ

10

20

30

40

50

ンプルから誘導された cDNA の増幅により観察された (図 2 b)。5 つのプライス変異体の全てを特徴決定した。そのうちの 3 つは、元のリーディングフレームを維持しており、それゆえ、得られたタンパクは切り詰められていない。P o l のマウス遺伝子のエキソン - イントロン機構によれば、切り詰められていない変異体の一つはエキソン 6 の欠失に対応し、他のものはエキソン 6 および 7 の同時的欠失に対応する。第三の切り詰められていない変異体は、ヒト配列のエキソン 5 内に存在する隠れたプライシング部位の使用により生成される。最も豊富に発現されるこれらの変異体は、以下に命名および詳説する。

【 0 0 3 9 】

hPOL デルタ 5 (クローンタイプ a60b4) : cDNA のヌクレオチド 9 8 7 - 1 2 6 2 の欠失を有する ; エキソン 5 の 8 7 % を欠失し、位置 6 0 7 から 2 7 7 塩基を欠失する (S E Q I D N O : 6) ; 得られたアミノ酸配列は S E Q I D N O : 7 に示されている。

10

【 0 0 4 0 】

hPOL デルタ 6 (クローンタイプ a31m) : cDNA のヌクレオチド 1 2 6 3 - 1 4 3 6 の欠失を有する ; エキソン 6、位置 2 6 から 1 7 5 ベースを完全に欠失し (S E Q I D N O : 8) ; 得られたアミノ酸配列は S E Q I D N O : 9 に示されている。

【 0 0 4 1 】

hPOL デルタ 6 + 7 (クローンタイプ a31c) : ヌクレオチド 1 2 6 3 - 1 5 6 5 の欠失を有する ; エキソン 6 および 7 (位置 2 6 から 3 0 4 ベース (S E Q I D N O : 1 0)) を完全に欠失し ; その得られたアミノ酸配列は S E Q I D N O : 1 1 に示されている。

20

【 0 0 4 2 】

他の二つのプライシング変異体は、より興味の薄い “ プライオリ (piori) ” である。これは、これらがオープンリーディングフレームの早期切りつめを生じるからである。正常 - 腫瘍組織における P o l の各プライシング変異体の選択的発現分析を実施するために、P C R - プライマーのプライシング特異的対を設計した。これらのプライマーは、各変異体を選択的に増幅することができ (実施例 2 参照)、その存在および異なる生物学的サンプルにおける相対量を調べることができる。変異体の相対的な量を評価する方法は、本発明の一部を形成する。

【 0 0 4 3 】

かくして、成体の脳には存在しないが幼児の脳に存在する変異体 D 6 が、分析した正常組織の殆ど (膵臓を除く) に存在しないが、対応する組織の一次腫瘍に検出されることが観察された (図 3)。

30

【 0 0 4 4 】

変異体 D 6 + 7 の選択的増幅は、胎児脳に起こるが、成人脳に起こらないことから、この変異体が正常組織の殆どに存在し、かつ、その対応する腫瘍において同様にまたは僅かに多く存在することを示した (図 4)。興味深いことに、イントロン 8 のさらなる保持に対応する新たな変異体が成人脳に観察された。この新たなアイソフォームは、正常な膵臓においてのみ検出可能であり、かつ、通常は存在しない組織に対応する腫瘍サンプルにも見られる。最も顕著な例は結腸であり、そこでは正常 - 腫瘍組織を比較した場合、アイソフォームの完全な置換がある。

40

【 0 0 4 5 】

アミノ酸レベルにおいて、欠失 D 6 + 7 はサブドメイン 8 k D a の一部、および “ フィンガー ” サブドメインの完全な欠失を生じ、結果的に “ ヘリックス - ヘアピン - ヘリックスモチーフ ” と呼ばれる、酵素の二つの重要な DNA 結合ドメインを欠失する [Doherty ら, (1996), Nucleic Acids Res. 24, 2488-2497]。3 つの変異体 D 5、D 6 および D 6 + 7 は、タンパクの切りつめを生じず、触媒部位を形成するサブドメインを維持する。それゆえ、ポリメラーゼの機能的なバージョンを示すと考えられる。これは、最小コアに限定されたそのポリメラーゼーションドメインが、DNA 修復におけるその機能が最近報告されている A S F V P o l X のそれと非常に類似しているからである [Oliveros ら, (1997),

50

J. Biol. Chem. 272, 30899-30911]。先に記載されているように、腫瘍トランスフォーメーションを引き起こすミューテーター表現型の取得は、最初は、DNA修復メカニズムにおける変更による。本発明では、DNA損傷蓄積を妨げることにより、腫瘍のサプレッサーとして作用し得る、あるいは、エラー傾向のあるDNA修復メカニズムへの関与という副作用としてDNAに変異を導入することによる腫瘍形成に直接寄与する、新規のヒトDNAポリメラーゼが記載されている。後者の説は、未損傷DNA鋳型に*in vitro*でアッセイした場合の、Pol の低い挿入忠実度によって支持されている。さらに、Pol の特定のアイソフォームが、機能的であり、腫瘍形成に寄与しうるミューテーター表現型を示した。このアイデアは、腫瘍サンプルにおけるこれらの変異体の一部の、選択的PCR増幅により同定された、特異的な存在によって支持されている。それゆえ、Pol とそのアイソフォームは、これらの悪性腫瘍の予後および診断の両方に結果的な利点を有する、ヒトにおける潜在的腫瘍マーカーと考えることができる。一方、これらの各アイソフォームの発現は、同定および診断のより特異的な方法を開発することを可能にする特異的抗体を生じるための精製されたポリペプチドを得ることを可能にし、これは本発明の一部を成す。さらに、各アイソフォームに対応するcDNA配列の知識は、同定および診断のための特異的プローブを生成することを可能にし、これも本発明の一部を成す。

【0046】

ここに提案された魅力的な仮説は、選択的スプライシングにより産生されたDNAポリメラーゼ変異体が、優勢なエラー傾向のあるバージョンとして作用し、正常レベルのDNA修復を妨げかつ/または変更し得る“ミューテーター(mutator)”DNAポリメラーゼを示すことであり、これは、これらの変異体が発現される細胞の細胞性トランスフォーメーションを誘導するか、あるいは、神経変性疾患および老化に起こるような、不十分なDNA修復力に関連した別のプロセスを促す。

【0047】

POLL遺伝子(Pol をコードする)およびその発現変異体に関する我々の知識は、正常細胞生理機能のメンテナンスまたは細胞トランスフォーメーションの促進において、これらの酵素の機能を調べるための戦略を開発することを可能にする。これらの戦略は、Pol の特異的変異体を過剰発現するプラスミドの種々の組合せで正常細胞をトランスフォーメーションし、細胞表現型に対する発現されたアイソフォームの効果を調べることに基づいている。

【0048】

病理的表現型を誘導できる特定のPol アイソフォーム(またはアイソフォームの組合せ)の同定は、DNA修復の欠陥に関連したプロセス(神経変性疾患、ガン)を妨げる新規ターゲットを提供し、本発明のさらなる態様を形成する。一方、腫瘍表現型を示すPol 形質転換細胞の入手可能性は、治療化合物を提供する特異的インヒビターの開発を可能にする。

【0049】

さらに、Pol に関する本発明の開示により、マウスにおけるPol 欠陥モデル(ノックアウト)が生成され、そこではこの遺伝子が選択的に欠失され[Schawartzbergら(1989), Science 246, 799-803]、病理の誘導の研究、および新規治療化合物の同定に非常に有益である。

【0050】

mRNAの3'-末端に対応する情報を含むヒトPol に対応するESTを探すために、dbEST/GeneBankで行った同様の調査では、多数のESTが見出された。存在するESTは以下の同定番号を有していた: A1970471; AA576526; A1199486; A1123218; AA989195; A1091150; AA922738; W69567; A1560660; A1612820; AA927738; AA742404; R16877; H11524; T81488; R71372; A1538103; AA807380; AA991853; AA468875。これらの20の配列の内、9は正常組織に対応するが、残りの11の配列は種々の起源の腫瘍に対応する。

【0051】

これら20のESTのヌクレオチド配列アライメントは、7つのケースにダブルミューテ

10

20

30

40

50

ーションの存在を示した。このダブルミューテーションは、全てのケースで、二つのヌクレオチドのみによって分けられた、ヌクレオチド T 2 5 7 6 および G 2 5 7 9 において生じた (SEQ ID NO: 12)。全てのケースで、これら二つのヌクレオチドは、同様に置換された: T 2 5 7 6 -> C y G 2 5 7 9 -> T。7つの変異した配列はいずれも、正常組織から得られた E S T には対応しないが (全部で9の E S T)、これら全てが腫瘍から得られた E S T に対応する (11 サンプルの内の7つの変異配列)。この変異した E S T は、以下の同定番号を有する: A1970471; AA576526; AA922738; A1612820; AA927738; A1538103; AA468875。これらの3つは、生殖細胞腫瘍から得られ、1つは卵巣ガン、1つは子宮腺癌、そして残りの2つは乳ガンおよび結腸ガンから得られる。本発明の一部の核酸の態様では、これらの E S T は本発明から排除される。

10

【0052】

それゆえ、より徹底的かつ有意な統計的分析の不在下では、異なる性質の腫瘍サンプルにおけるこのダブル変異の発生は、64%という顕著に高い値に達する。最も妥当な解釈は、腫瘍発達の高い結合または可能性を有する、このダブル変異がアレル変異体に対応するということである。この相互関係は、アレル変異体を有する患者の P o l m R N A の変更された安定性の結果である。これは、P o l 機能、そしてそれゆえ、DNA修復の特異的プロセスを実施する細胞の能力に不全を含む。in situハイブリダイゼーションまたはPCRのような、分子生物学の種々の技術による、ヒト生物学的サンプルにおけるこのダブル変異の同定は、この変異を有する患者の早期診断を可能にし、危険性のある集団の適切な監視およびコントロールを明確にすることを助ける。

20

【0053】

体細胞ハイブリッドのパネルを用いて (マウス/ヒト)、ヒト P o l 遺伝子を第10染色体に最初に位置づけた。放射線ハイブリッドを用いて、マッピングを、10q24位へとしばった。この領域は、非常に高い頻度の分子変異、主に欠失および再配列を示す。

【0054】

9キロベースだけの領域に7以上の破壊点が存在することは、その活性化が選択的な利点を与える隣接する遺伝子の存在を示唆する。同じ領域である10q24は、T細胞急性リンパ芽球性白血病における転座に関与し [Parkら, (1992), Genes Chromosomes Cancer 4, 32-40]、高い割合の前立腺ガン [Fordら, (1998), Cancer Genet. Cytogenet. 102, 6-11] およびヒトグリオーム (glioma) [Chernovaら, (1998), Cancer Genet. Cytogenet. 105-60-68] でしばしば欠失される。最後に、P o l が、顕著なレベルの発現をヒトの脳、特にニューロンにおいて有することに注意すべきである。さらに、アイソフォームのパターンは、種々の発生段階を比較した場合に異なる (胎児 - 成体) (図2a)。DNA修復における P o l の役割、およびDNA修復不全が神経変性疾患の基盤であることを仮定すると、本発明に記載された新規ポリメラーゼの散発的または遺伝的変性がこれらの疾患の出現および発達に重要であると推測される。それゆえ、P o l の機能および制御に関する広い知識は、これらの病理の診断および治療に新たな道を開く。

30

【0055】

P o l 核酸

“P o l 核酸”とは、SEQ ID NO: 1または4に示されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を有する核酸分子を含む。P o l コード配列は、SEQ ID NO: 1または4に記載された全長配列、相補的核酸配列であり、あるいはこれらの配列のミュータント、誘導體またはアレルであってもよい。配列は、示された配列の1以上のヌクレオチドの1以上が付加、挿入、欠失、および置換により、示された配列から異なるものであってもよい。ヌクレオチド配列に対する変化は、タンパクレベルでアミノ酸の変化をもたらしなくても、そうでなくてもよく、これは遺伝コードによって決定される。かくして、本発明にかかる核酸は、SEQ ID NO: 1または4に示された配列とは異なる配列を含むが、同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができる。

40

【0056】

50

一方、コードされたポリペプチドは、SEQ ID NO: 1または4に示されたアミノ酸配列とは、一以上のアミノ酸残基が異なるアミノ酸配列を含んでもよい。SEQ ID NO: 1または4に示された配列のアミノ酸配列ミュータント、変異体、誘導體またはアレルであるポリペプチドをコードする核酸が、本発明によりさらに提供される。かかるポリペプチドは以下に記載されている。かかるポリペプチドをコードする核酸は、好ましくはSEQ ID NO: 1または4に示されたコード配列と少なくとも40%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも80%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも90%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の配列同一性、そして最も好ましくは少なくとも98%の配列同一性を有する。

【0057】

また本発明は、ここに記載したPol 核酸配列のフラグメントを含む。フラグメントは好ましくは、少なくとも60、120、180、240または480ヌクレオチドの長さである。

【0058】

一般的に、本発明にかかる核酸は、単離物として、単離されたおよび/または精製された形態で、あるいは、一以上の発現制御配列を除く、ヒトゲノムの遺伝子に隣接する遊離または実質的に遊離の核酸のような、自然に結合する遊離または実質的に遊離の物質として提供される。核酸は、全体的または部分的に合成されてもよく、ゲノムDNA、cDNA、またはRNAを含んでもよい。本発明にかかる核酸はRNAを含むが、示された配列の参照は、UをTに置換したRNA等価物の参照として解釈されるべきである。

【0059】

POLL遺伝子の全てまたは一部、および/またはその制御エレメントをコードする核酸配列は、ここに含まれる情報および参考文献並びに技術常識を用いて、当業者であれば容易に調製できる(例えば、Sambrook, Fritsch and Maniatis, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, および Ausubelら, Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 1992参照)。これらの技術は、(i)例えば、ゲノム源から、かかる核酸のサンプルを増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の使用、(ii)化学合成、または(iii)E.coliでの増幅を含む。修飾されたPol ポリペプチドを発現させたり、核酸を発現させるために用いられる宿主細胞におけるコドン選択を考慮するために、例えば、部位特異的変異導入を用いて、Pol 配列の修飾を行うことができる。

【0060】

Pol 核酸配列の発現を得るために、この配列を、Pol 核酸に機能的に結合されたコントロール配列を有するベクターに取り込み、その発現をコントロールすることができる。このベクターは、挿入された核酸の発現を誘導するプロモーターまたはエンハンサー、Pol ポリペプチドが融合物として産生されるような核酸配列、および/または宿主細胞で産生されたポリペプチドが細胞から分泌されるように分泌シグナルをコードする核酸配列のような、他の配列を含むことができる。Pol ポリペプチドは、ベクターを、そのベクターが機能する宿主細胞にトランスフォーミングし、Pol ポリペプチドが産生されるようにその宿主細胞を培養し、かつ、宿主細胞または周りの培地からPol ポリペプチドを回収することにより得ることができる。E.coli、酵母、およびCOSまたはCHO細胞のような真核細胞の株を含む、原核および真核細胞は、当該技術においてこの目的のために用いられる。宿主細胞の選択は、例えば、ポリペプチドが宿主細胞に蓄積されることを制御する、またはそのグリコシレーションおよびホスホリレーションのような特性に影響を与えるといった、これらの細胞において発現されたPol ポリペプチドの特性をコントロールするために用いられる。

【0061】

核酸の増幅のためのPCR技術は、米国特許第4683195号に記載されている。一般に、かかる技術は、標的配列の末端からの配列情報が知られていて、適切なフォワードおよびリバースオリゴヌクレオチドプライマーが増幅の標的であるポリヌクレオチド配列に

10

20

30

40

50

同一または類似するように設計できることが必要である。PCRは、鋳型核酸の変性（二本鎖の場合）、プライマーをターゲットにアニーリング、およびポリメライゼーションの工程を含む。この増幅反応の鋳型としてプローブされまたは用いられる核酸は、ゲノムDNA、cDNA、またはRNAであってもよい。PCRは、ゲノムDNAから特定配列、特定のRNA配列、およびmRNA、バクテリオファージまたはプラスミドから転写されたcDNAを増幅するために用いることができる。ここに示されたPol 核酸配列は、当業者であれば容易にPCRプライマーを設計することができる。PCR技術の一般的使用の参考文献は、Mullisら, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263, (1987), Ehrlich(ed), PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989, Ehrlichら, Science, 252:1643-1650, (1991), "PCR protocols; A Guide to Methods and Applications", Eds. Innis 10
ら, Academic Press, New York, (1990)を含む。

【0062】

ここに示された核酸配列は、試験サンプルにおいて、興味のある核酸（および、本発明にかかり得るもの）を同定するのに有益である。本発明は、興味のある核酸を得る方法、ここに記載された配列または相補配列の全てまたは一部を有するプローブをターゲット核酸にハイブリダイズさせることを含む方法を与える。

【0063】

ハイブリダイゼーションは、一般に、後で、成功したハイブリダイゼーションの同定、およびプローブにハイブリダイズした核酸の単離を行い、これらは、PCRの一以上の工程を含んでもよい。 20

【0064】

本発明にかかる核酸は、ここに記載した核酸配列の一以上のフラグメント、特に、コドン使用または統計的分析に基づいて、比較的稀な配列のフラグメントとハイブリダイズするように設計された一以上のオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを用いて得られる。添付図に記載した核酸配列のフラグメントとハイブリダイズするように設計されたプライマーは、ターゲットの核酸がクローン化されたクローニングベクター内の配列にハイブリダイズするように設計された一以上のオリゴヌクレオチドと関連して用いられるか、あるいはいわゆる“RACE” (rapid amplification of cDNA ends)、すなわち、ライブラリーのcDNAがオリゴヌクレオチドリンカーにライゲートされ、PCRがここに記載された配列とハイブリダイズするプライマーとオリゴヌクレオチドリンカーにハイブリダイズするプライマーとを用いて行われる方法において用いられる。 30

【0065】

かかるオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマー、および全長配列（および、ミュータント、アレル、変異体、および誘導体）も、アレル、ミュータント、および変異体、特に、Pol タンパクの不活性または機能不全形態の産生を導くものの存在に関して、核酸を含む試験サンプルをスクリーニングすることにおいて有益であり、このプローブは、試験される患者から得られたサンプルに由来するターゲット配列とハイブリダイズさせられる。ハイブリダイゼーションの条件は、非特異的結合を最小限にするように調節される。好ましくは、ストリンジェントから適度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が好ましい。当業者であれば、Sambrookら(1989)およびAusubelら(1992)のような 40
教科書に従って、容易に、かかるプローブを設計し、それらをラベルし、ハイブリダイゼーション反応に適した条件を工夫することができる。

【0066】

Pol 配列における多型または変異の存在を調べるのと同様に、このプローブを、Pol をコードするmRNAが細胞または組織に存在するか否かを調べるためにも使用することができる。多型の例は、実施例5に詳細に記載されている1389位の一塩基多型である。

【0067】

一以上の細胞（例えばヒト）から単離および/または精製された核酸、または細胞から単離および/または精製された核酸から誘導された核酸ライブラリー（例えば、細胞から単 50

離された mRNA から誘導された cDNA ライブラリー) は、選択的ハイブリダイゼーションの条件下でプローブされ、かつ/または、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のような特異的核酸増幅反応が行われてもよい。

【0068】

クローニングに関連して、一以上の遺伝子フラグメントが、全長コード配列を生成するためにライゲートされる必要があるかもしれない。また、全長コード化核酸分子が得られなかった場合は、全長分子の一部を示すより小さい分子が、全長クローンを得るために用いられてもよい。インサートは、部分的 cDNA クローンから調製され、cDNA ライブラリーをスクリーニングするために用いられてもよい。単離された全長クローンを発現ベクターにサブクローニングすることができ、例えばレポータープラスミドを有する適切な宿主細胞に、トランスフェクションすることによって活性をアッセイしてもよい。

10

【0069】

一以上の (例えば 2 の) プローブまたはプライマーのターゲット核酸へのハイブリダイゼーションを含んでもよい。核酸が二本鎖 DNA である場合には、ハイブリダイゼーションは、一般に、変性させて一本鎖 DNA を最初に生じさせる。ハイブリダイゼーションは、PCR 法の一部、または PCR に関連しないプロービング方法の一部である。例示的方法は、PCR と低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションとの組合せである。当業者に利用される多くの方法から選択されたスクリーニング方法は、成功したハイブリダイゼーションを同定し、かつ、単離されたハイブリダイズした核酸を同定するために用いられる。

20

【0070】

標的核酸 (例えば DNA) に対するプローブの結合は、当業者の自由で、種々の技術のいずれかを用いて測定することができる。例えば、プローブは、放射能、蛍光、または酵素ラベルされてもよい。プローブのラベル化を用いない別の方法は、制限フラグメント長さ多型の調査、PCR を用いた増幅、RNA アーゼ切断、および、アレル特異的オリゴヌクレオチドプロービングを含む。

【0071】

プロービングは、標準的なサザンブロットング技術を用いてもよい。例えば、DNA は、細胞から抽出されて、種々の制限酵素で切断されてもよい。制限フラグメントは、アガロースゲルでの電気泳動により分離され、変性し、ニトロセルロースフィルターに移されてもよい。ラベル化されたプローブは、フィルターの DNA フラグメントにハイブリダイズされ、結合が調べられてもよい。プロービングの DNA は、細胞からの RNA 調製物から調製されてもよい。

30

【0072】

予備的実験は、制限酵素で切断した DNA のサザンブロットに種々のプローブをストリンジェンシーの低い条件下でハイブリダイズさせて行ってもよい。適切な条件は、多数のハイブリダイジングフラグメントが得られるが、バックグラウンドハイブリダイゼーションが低い場合に達成される。これらの条件を用いて、核酸ライブラリー、例えば発現された配列を表す cDNA ライブラリーを、調査してもよい。

【0073】

当業者であれば、オリゴヌクレオチドの長さや塩基の組成、温度などのファクターを考慮して、選択的ハイブリダイゼーションに適した所望のストリンジェンシーの条件を用いることができる。

40

【0074】

アミノ酸配列情報に基づいて、遺伝コードの縮重、および、適切であれば、候補の核酸が誘導される生物のコドン使用を考慮して、オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを設計することができる。核酸増幅に使用されるオリゴヌクレオチドは、約 10 以下のコドン (例えば、6、7 または 8)、すなわち、約 30 以下の長さのヌクレオチド (例えば、18、21 または 24) を有する。一般的に、特異的プライマーは、14 ヌクレオチド以上の長さであるが、18 - 20 以下である。当業者であれば、PCR のような使用プロ

50

セスのためのプライマーの設計に精通している。

【0075】

本発明のさらなる態様は、特に、核酸を得るおよび/またはスクリーニングする方法において使用される、ここに記載されたヌクレオチド配列の一つのオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドフラグメント、または相補的配列を提供する。上記配列は、一以上のヌクレオチドの付加、置換、挿入、または欠失によって修飾されてもよいが、好ましくは、ここに記載された配列を有する核酸と選択的にハイブリダイズできる能力を損なわないものである。すなわち、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと、記載された配列の一つとの配列同一性の程度が、顕著に高いものとされる。

【0076】

一部の好ましい実施態様では、ここに開示された核酸配列のいずれかのフラグメントである、本発明にかかるオリゴヌクレオチド、またはその相補配列は、少なくとも約10ヌクレオチドの長さ、より好ましくは少なくとも約15ヌクレオチドの長さ、より好ましくは少なくとも約20ヌクレオチドの長さである。かかるフラグメントは、それぞれ、本発明の態様を示す。フラグメントおよび他のオリゴヌクレオチドは、上記のようにプライマーまたはプローブとして用いられてもよいが、試験サンプルにおけるP o l 核酸の存在を調べることに関連した方法で生成(例えば、PCRによる)されてもよい。

【0077】

本発明にかかる核酸は、遺伝子治療法、例えば、上記状態を予防または治癒(全体的または部分的)する目的の患者の治療法において、用いることができる。このツールは以下に記載する。

【0078】

本発明にかかるポリペプチドを産生する簡便な方法は、それをコードする核酸を、発現系においてその核酸を使用することにより発現させることである。発現系の使用は、高度に洗練されている。

【0079】

従って、本発明は、ポリペプチド(開示)を調製する方法を含み、当該方法はそのポリペプチドをコードする核酸(一般的には、本発明にかかる核酸)からの発現を含む。これは、都合のよいことには、ポリペプチドの発現を引き起こし、あるいは可能にする適切な条件下で、かかるベクターを含む、培養における宿主細胞の増殖によって達成される。ポリペプチドは、網赤血球溶解物のような、in vitro系で発現されてもよい。

【0080】

種々の宿主細胞におけるポリペプチドのクローニングおよび発現のためのシステムが周知である。適切な宿主細胞は、細菌、哺乳動物および酵母のような真核細胞、およびバキュロウイルス系を含む。異種ポリペプチドの発現に関する技術において利用できる哺乳動物細胞系統は、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎細胞、COS細胞およびその他多くを含む。一般的な、好ましい細菌宿主はE.coliである。

【0081】

安定なベクターは、適切な制御配列、適当に、プロモーター配列、ターミネーターフラグメント、ポリアデニレーション配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子、およびその他の配列を含むように選択または構成される。ベクターは、適当に、プラスミド、ウイルス、例えば、ファージ、またはファージミドとすることができる。さらに詳しくは、例えば、Molecular Cloning: a laboratory Manual:2nd edition, Sambrookら,1989, Cold Spring harbor Laboratory Pressを参照。核酸を操作するための多くの公知技術およびプロトコール、例えば核酸構成物の調製、変異、シーケンシング、細胞へのDNAの挿入および遺伝子発現、およびタンパク分析は、詳細に、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら, eds., John Wiley & Sons, 1992に記載されている。

【0082】

かくして、本発明のさらなる態様は、ここに開示された核酸を含む宿主細胞を提供する。本発明の核酸は、宿主細胞のゲノム(例えば染色体)に組み込まれてもよい。組み込みは

10

20

30

40

50

、標準的な技術に従って、ゲノムと組み換えを促進する配列の封入により促進されてもよい。核酸は、細胞内の染色体外ベクターにあってもよい。

【0083】

本発明のさらなる態様は、宿主細胞に核酸を組み込むことを含む方法を提供する。(特に *in vitro* 組み込みで) 制限することなく、一般的に“トランスフォーメーション”として称される組み込みは、あらゆる利用可能な技術を用いることができる。真核細胞では、適切な技術は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、リポソーム媒介トランスフェクション、およびレトロウイルスまたは他のウイルス、例えば、ワクシニア、または昆虫細胞用のバキュロウイルスを用いた形質導入を含むことができる。細菌細胞では、適切な技術は、塩化カルシウムトランスフォーメーション、エレクトロポレーション、およびバクテリオファージを用いたトランスフェクションを含むことができる。別法として、直接的核酸注入を用いることができる。

10

【0084】

抗生物質耐性または感受性遺伝子のようなマーカー遺伝子を、当該技術分野で周知のように、興味のある核酸を含むクローンを同定することにおいて用いることができる。

【0085】

導入後、その核酸から、例えば、コードされたポリペプチドが産生されるような、遺伝子の発現の条件下で、宿主細胞(実際にトランスフォームされた細胞を含むが、好ましくはトランスフォームした細胞の子孫)を培養することにより、発現を引き起こすまたは可能にする。適切なシグナルリーダーペプチドに結合したポリペプチドが発現される場合には、培養培地に細胞から分泌され得る。発現による産生後、ポリペプチドは、宿主細胞および/または培養培地から単離および/または精製されてもよく、次いで、所望の通りに、例えば、一以上のさらなる成分を含む組成物、例えば一以上の薬学的に許容できる賦形剤、ビヒクル、またはキャリアーを含む薬学的組成物の製造に用いられてもよい(例えば、以下参照)。

20

【0086】

例えば、細胞またはその細胞の祖先核酸を導入した結果、および/または細胞または祖先に内因的な配列の遺伝的変更の結果(導入または変更は *in vivo* または *ex vivo* で起こる)として本発明にかかる核酸を含む宿主細胞は、動物、特に哺乳動物である生命体内に含まれてもよい(例えば体幹)。この動物は、ヒトであってもよく、ヒト以外、例えば、ウサギ、モルモット、ラット、マウスまたは他の齧歯類、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、またはウマであってもよく、またニワトリのようなトリであってもよい。かかる細胞を含む遺伝的に修飾されたまたはトランスジェニック動物またはトリは、本発明のさらなる態様をもたらす。

30

【0087】

これは、治療目的を有してもよい。(遺伝子治療は以下に記載する)。特に同族内因性配列の代わりに、生物体の細胞におけるミュータント、アレルまたは変異体配列の存在は、前記生物体を、*in vitro* で Pol 遺伝子またはコードされたポリペプチドの活性を調節する物質の役割を試験および/または研究するモデルとして用いることを可能にする。

【0088】

トランスジーンによりコードされたポリペプチドの産生に用いられることに加えて、宿主細胞は、大量に生成するために、関心の向けられた核酸を複製するための核酸製造所として用いられてもよい。関心の向けられた核酸の多重コピーが、DHFRのような増幅可能な遺伝子に結合されて、細胞内で形成されてもよい。関心の核酸で形質転換された宿主細胞、または、核酸が導入された宿主細胞の子孫は、適切な条件下で、例えば、発酵槽において培養されて、その培養物から回収され、かつ、核酸を精製するための処理を受けてもよい。精製後、核酸またはその一以上のフラグメントを、所望の通りに、例えば、以下に記載する診断または予後アッセイにおいて用いることができる。

40

【0089】

Pol ポリペプチド

50

当業者であれば、ここに記載された技術または当該技術分野で周知の他の技術を用いて、医薬としての使用のため、薬剤の開発、およびその特性および *in vivo* での役割に関するさらなる研究のために、大量の P o l ポリペプチド、そのフラグメントまたは活性部分を、生成することができる。

【 0 0 9 0 】

かくして、本発明のさらなる態様は、S E Q I D N O : 1 または 4 に記載されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供する。これは、単離および/または精製された形態であってもよく、天然で結合している物質、例えば他のポリペプチドまたは P o l ポリペプチド以外のヒトポリペプチドから遊離または実質的に遊離した、または(例えば原核細胞における発現により産生された場合)天然グリコシレーションを欠く、例えば非グリコシル化された形態であってもよい。

10

【 0 0 9 1 】

アミノ酸配列変異体、アレル、誘導体またはアイソフォームであるポリペプチドも、本発明により提供される。変異体、アレル、誘導体またはアイソフォームであるポリペプチドは、一以上のアミノ酸の一以上の付加、置換、欠失および挿入により、ここに開示された配列から異なるアミノ酸配列を有してもよい。好ましいポリペプチドは、上記のように、P o l ポリメラーゼ機能を有する。

【 0 0 9 2 】

好ましくは、S E Q I D N O : 1 または 4 に記載されたアミノ酸配列のアミノ酸配列変異体、アレル、誘導体またはミュータントであるポリペプチドは、S E Q I D N O : 1 または 4 の配列に対して、少なくとも 4 0 % の配列同一性を有し、さらに好ましくは少なくとも 5 0 % の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも 6 0 % の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも 7 0 % の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも 8 0 % の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも 9 0 % の配列同一性、そして最も好ましくは少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する。

20

【 0 0 9 3 】

当業者であれば、当該技術分野で周知の技術、例えば、Genetics Computer Group, Oxford Molecular Group, Madison, Wisconsin, USA, Version 9.1 から入手できる G C G プログラムを用いて、容易に配列比較を行い、かつ、同一性を調べることができる。特定のアミノ酸配列変異体は、1 のアミノ酸、2、3、4、5 - 1 0、1 0 - 2 0、2 0 - 3 0、3 0 - 5 0、5 0 - 1 0 0、1 0 0 - 1 5 0 または 1 5 0 以上のアミノ酸の挿入、付加、置換または欠失により、S E Q I D N O : 1 または 4 に記載された配列から異なってもよい。

30

【 0 0 9 4 】

ハイブリダイゼーション反応の“ストリンジェンシー”は、当業者により容易に決定され、一般的には、プローブの長さ、洗浄温度、および塩濃度に依存して経験的に予測される。一般的に、より長いプローブは適切なアニリングのためにより高い温度を必要とするが、より短いプローブはより低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般的には、相補的な鎖がそれらの溶解温度以下の環境に存在する場合に再アニールする変性 D N A の能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間の所望のホモロジーの程度が高くなればなるほど、使用できる相対温度がより高くなる。結果として、より高い相対温度が、反応条件をよりストリンジェントにし、より低い温度がよりストリンジェンシーを低下させる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーの詳細および説明については、Ausubelら、Current Protocoles in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照。

40

【 0 0 9 5 】

“ストリンジェントな条件”または“高ストリンジェンシー条件”とは、以下のように同定される：(1) 洗浄に低イオン強度および高温を用いる、例えば、0 . 0 1 5 M 塩化ナトリウム / 0 . 0 0 1 5 M クエン酸ナトリウム / 0 . 1 % ドデシル硫酸ナトリウムで、5 0 ; (2) ハイブリダイゼーション中に変性剤、例えばホルムアミドを用いる、例

50

例えば、50% (v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウムバッファー、pH6.5、(760mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを含む)、42 ;あるいは、(3)50%ホルムアミド、5xSSC(0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5xDenhardt's溶液、超音波処理したサーモンスパームDNA(salmon sperm DNA)(501g/ml)、0.1%SDSおよび10%デキストランスルファート、42 を用い、42 で0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)および50%ホルムアミドで55 で洗浄し、次いで、EDTAを含む0.1xSSCからなる、55 での高ストリンジェンシー洗浄を行う。

10

【0096】

ここに記載したP o l ポリペプチド配列に関して“パーセント(%)アミノ酸配列同一性”とは、必要であれば、最大の配列同一性のパーセントを達成するために、配列をアラメントシギャップを導入した後で、そして、配列同一性の部分としてあらゆる保存的置換も考慮せずに、P o l 配列のアミノ酸残基と同一の候補配列におけるアミノ酸残基のパーセントとして定義される。ここで用いられる%同一性の値は、[Altschulら, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996): <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>]から入手したWU-BLAST-2により得られたものである。WU-BLAST-2は、いくつかのサーチパラメーターを用いる。その殆どはデフォルト値に設定されている。調節可能なパラメーターは、以下の値にセットされている: オーバーラップスパン=1、オーバーラップフラクシオン=0.125、ワード閾値(T)=11。HSP SおよびHSP S 2パラメーターは、動的値であり、特定の配列の組成と、興味のある配列について調べられる特定のデータベースの組成に基づいてそのプログラムにより確立される。しかしながら、この値は、感度を増大させるために調節されてもよい。アミノ酸配列同一性値は、一致した同一の残基の総数を、整列された領域の“より長い”配列の残基の総数で割ることにより決定される。“より長い”配列とは、整列された領域における最大の実際の残基を有するものである(アラメントスコアを最大化するためにWU-BLAST-2により導入されたギャップは無視される)。

20

【0097】

同様に、ここに記載されたP o l ポリペプチドのコード配列に関する“パーセント(%)核酸配列同一性”とは、SEQ ID NO: 1および4に記載されたP o l コード配列の核酸残基と同一の候補配列における核酸残基のパーセントである。ここで用いられる同一性の値は、デフォルトのパラメーターにセットされたWU BL AST-2のBLASTNモジュールにより、オーバーラップスパンとオーバーラップフラクシオンをそれぞれ1と0.125にセットして得られた。

30

【0098】

本発明は、本発明のP o l ポリペプチドの活性部分及びフラグメントも含む。

【0099】

P o l ポリペプチドの“活性部分”は、前記全長P o l ポリペプチドよりも短いが、例えばDNAポリメラーゼとしての本質的な生物学的活性の少なくとも一部を維持するペプチドを意味する。例えば、P o l のより小さいフラグメントは、他のタンパクと相互作用することにより封鎖剤または競合アンタゴニストとして作用することができる。

40

【0100】

P o l ポリペプチドの“フラグメント”は、SEQ ID NO: 1、4、7、9または11に記載された配列の少なくとも5つ連続するアミノ酸のアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも7つ連続するアミノ酸、より好ましくは少なくとも10連続するアミノ酸、より好ましくは少なくとも20連続するアミノ酸、より好ましくは少なくとも40連続するアミノ酸を意味する。P o l ポリペプチド配列のフラグメントは、P o l アミノ酸配列の一部に対する抗体を生じるエピトープまたは抗原決定基として使用することができる。

50

【0101】

P o l 1 ポリペプチドの“誘導體”またはそのフラグメントは、タンパクのアミノ酸配列を変更することによって、例えば、タンパクをコードする核酸の操作、またはタンパクそのものを変更することによって、修飾されたポリペプチドを意味する。天然アミノ酸配列のかかる誘導體は、P o l 1 ポリペプチドの本質的な活性を基本的に変更することなく、1、2、3、5またはそれ以上のアミノ酸の挿入、付加、欠失、または置換を含むことができる。

【0102】

本発明にかかるポリペプチドは、例えば、コード化核酸から発現により産生した後に、（例えば、抗体を用いて）単離および/または精製されてもよい（以下を参照）。本発明にかかるポリペプチドは、化学合成により全体的または部分的に生成されてもよい。この単離および/または精製されたポリペプチドは、少なくとも一つのさらなる成分を含む組成物、例えば、薬学的に許容できる賦形剤、ビヒクル、またはキャリアーを含む製薬学的組成物の製剤に用いることができる。本発明にかかるポリペプチドを含む組成物は、以下に記載する予防および/または治療処置に使用することができる。

10

【0103】

本発明にかかるポリペプチド、ペプチドフラグメント、アレル、ミュータントまたは変異体は、特異的抗体を得るための免疫原等として用いられる。抗体は、ポリペプチドおよびペプチドの精製およびその他の操作、診断的スクリーニング、および治療において有益である。これについては、以下にさらに記載する。

20

【0104】

本発明にかかるポリペプチドは、その活性または機能に影響するまたは調節する分子をスクリーニングすることに使用できる。かかる分子は、治療（予防も含む）に有益である。

【0105】

P o l 1 ポリペプチドは、結合パートナー、例えば、エフェクター分子、ラベル、試薬、毒素および/またはキャリアーまたは輸送分子に結合されてもよい。本発明のペプチドをペプチジルおよび非ペプチジル結合パートナーの両方に結合させるための技術は、当該技術分野において周知である。

【0106】

P o l 1 ポリペプチドに結合できる抗体

30

P o l 1 ポリペプチドのさらなる重要な用途は、P o l 1 ポリペプチド、またはそのフラグメントまたは活性部分に特異的に結合する特性を有する抗体を生じることである。

【0107】

P o l 1 タンパクに対するモノクローナル抗体を産生することが可能であり、これを行う技術は当該技術分野でよく確立されている。モノクローナル抗体は、元の抗体の特異性を維持する別の抗体またはキメラ分子を生じる組み換えDNA技術に処理されてもよい。かかる技術は、抗体のイムノグロブリン可変領域、または相補性決定領域（CDR）をコードするDNAを、別のイムノグロブリンの定常領域、または定常領域+フレームワーク領域に導入することを含んでもよい。例えば、EP-A-184187、GB-A-2188638またはEP-A-239400を参照。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、産生された抗体の結合特性を変更しうる、または変更しない、遺伝的変異または別の変化を受けてもよい。

40

【0108】

新規P o l 1 ポリペプチドの供給が、それと特異的に結合することができる抗体の産生を初めて可能にする。従って、本発明のさらなる態様は、抗P o l 1 抗体を提供する。かかる抗体は、それが結合できるポリペプチドと、それが全くまたは実質的に全く結合親和性を持たない（例えば結合親和性が約1000x以下）別のヒトポリペプチドとの間を識別することができるという意味で、特異的である。特異的な抗体は、他の分子には存在しないまたはアクセスできない分子上のエピトープに結合する。本発明にかかる抗体は、野生型のポリペプチドに特異的である。本発明にかかる抗体は、以下に記載される診断および予防的方法に有益であるように、野生型P o l 1 ポリペプチドとの間で、特定のミ

50

ュータント、変異体、アレルまたは誘導体ポリペプチドに特異的である。また抗体は、例えば、コードする核酸からの組み換え発現による産生後に、それらの抗体が結合するポリペプチドを精製することにも有益である。

【0109】

本発明にかかる好ましい抗体は、他のポリペプチドに結合できる抗体のような不純物を含まない、および/または血清成分を含まないという意味で、単離されている。モノクローナル抗体は、一部の目的にとって好ましいが、ポリクローナル抗体は本発明の範囲内にある。

【0110】

抗体は、当該技術分野で標準的な技術を用いて得られる。抗体産生方法は、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、またはサル）をそのタンパクまたはそのフラグメントで免疫することを含む。抗体は、当該技術分野で公知の種々の技術を用いて免疫化された動物から得られ、好ましくは興味の抗原に対する抗体の結合を用いてスクリーニングされる。例えば、ウェスタンブロットイング技術または免疫沈降法を用いることができる (Armitageら, Nature, 357:80-82, 1992)。抗体および/または動物からの抗体産生細胞の単離は、動物を殺す工程を伴ってもよい。

【0111】

ペプチドで哺乳動物を免疫化することに代えて、あるいはこれに加えて、タンパクに特異的な抗体が、例えば、その表面に機能的なイムノグロブリン結合ドメインを提示するラムダバクテリオファージまたは糸状バクテリオファージを用いて、発現されたイムノグロブリン可変ドメインの組み換え産生ライブラリーから得られてもよい。例えば、W092/01047参照。ライブラリーは、タンパク（またはフラグメント）で免疫されていない生物から得られた配列から構成されたナイーブであってもよく、また、興味の抗原に曝された生物から得られた配列を用いて構築されたものであってもよい。

【0112】

本発明にかかる抗体は、多数の方法で修飾されてもよい。用語“抗体”とは、必要な特異性を備えた結合ドメインを有する結合物質をカバーするように構成されるべきである。かくして、本発明は、抗体フラグメント、誘導体、機能的等価物およびホモログをカバーし、合成分子および抗原またはエピトープに結合可能にする抗体の形状に類似する形状を備えた分子を含む。

【0113】

抗原または他の結合パートナーに結合できる抗体フラグメントの例は、V_L、V_H、C₁およびC_H1ドメインからなるF_abフラグメント；V_HおよびC_H1ドメインからなるF_dフラグメント；抗体の単一の腕のV_LおよびV_HドメインからなるF_vフラグメント；V_Hドメインからなるd_Abフラグメント；単離されたC_DR領域およびF（a_b'）₂フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド結合により結合した二つのF_abフラグメントを含む二価のフラグメントである。一本鎖F_vフラグメントも含まれる。

【0114】

非ヒト源のC_DRがヒトフレームワーク領域にグラフトしており、通常は、フレームワークアミノ酸残基の一部の変更を伴い、親の非ヒト抗体よりも低い免疫原性を有する抗体を生じるヒト化抗体も、本発明の範囲内に含まれる。

【0115】

本発明にかかるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、遺伝的変異または他の変化を受けてもよい。さらに、当業者であれば、モノクローナル抗体は、元の抗体の特異性を維持した別の抗体またはキメラ分子を生じる組み換えDNA技術で処理されてもよいことを理解できるであろう。かかる技術は、抗体のイムノグロブリン可変領域または相補性決定領域（C_DR）をコードするDNAを、別のイムノグロブリンの定常領域または定常領域+フレームワーク領域に導入することを含んでもよい。例えば、EP-A-184187、GB-A-2188638またはEP-A-0239400を参照。キメラ抗体のクローニングおよび発現は、EP-A-0120694およびEP-A-0125023に開示されている。

10

20

30

40

50

【0116】

抗体（抗体フラグメントを含む）をコードする核酸を含み、かつ、その発現をすることができる、真核または原核性の宿主細胞である、所望の結合特性を備えた抗体を産生することができるハイブリドーマは、本発明の範囲内である。本発明は、抗体が産生される、好ましくは分泌される条件下で、抗体を産生することができる細胞を培養することを含む抗体の産生方法も提供する。

【0117】

サンプルに対する抗体の反応性は、あらゆる適切な手段によって調べることができる。個々のレポーター分子でタグを付すこともできる。レポーター分子は、直接または間接的に、検出可能、かつ、好ましくは測定可能なシグナルを生じる。レポーター分子の結合は、直接または間接的に、例えばペプチド結合を介して共有、あるいは非共有とすることができる。ペプチド結合を介した結合は、抗体およびレポーター分子をコードする遺伝子融合物の組み換え発現の結果であってもよい。

10

【0118】

好ましい方法の一つは、各抗体を、個々の蛍光色素、蛍光体、または分光学的に単離された吸収または放射特性を備えたレーザー励起染料と共有結合させる。適切な蛍光色素は、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリンおよびテキサスレッド (Texas Red) を含む。適切な発色染料は、ジアミノベンジジンを含む。

【0119】

別のレポーターは、視覚的に観察、電気的に検出、またはその他により記録されるような、直接的または間接的に検出可能なシグナルを生じる、高分子コロイド状粒子または微粒子状物質、例えば、着色されたラテックスビーズ、磁性物質または常磁性物質、および生物学的または化学的活性剤を含む。これらの分子は、例えば、発色または変色する、あるいは電気特性に変化を生じる反応を触媒する酵素であってもよい。これらは、エネルギー状態間の電子項遷移が特徴的な分光学的吸収または放射を生じるような、分子的に励起可能なものであってもよい。これらは、バイオセンサーに関連して用いられる化学的物質を含んでもよい。ピオチン/アビジンまたはピオチン/ストレプトアミジンおよびアルカリホスファターゼ検出システムを用いることができる。

20

【0120】

結合を調べる方法は、本発明の特徴ではなく、当業者であれば、好みと一般的知識に従って適切な方法を選択することができる。

30

【0121】

本発明にかかる抗体は、例えば細胞または細胞溶解物を含む試験サンプルにおいて、ポリペプチドの存在をスクリーニングすることに使用でき、かつ、例えば、それをコードする核酸の発現によるポリペプチドの産生の後に、本発明のポリペプチドを精製および/または単離することに使用できる。抗体は、それが結合するポリペプチドの活性を変更することができる、そのため、そのポリペプチドが患者において有害な影響を与える場合には、治療に有益である（予防を含む）。

【0122】

抗体は、キットとして提供されてもよく、キットは、抗体の使用に関する説明、例えば、試験サンプルにおける特定の物質の存在を調べることの説明を含んでもよい。一以上のその他の試薬、例えばラベル化分子、バッファー溶液、溶出剤などを含んでもよい。試薬は、それを外部環境から保護する容器、例えば密封バイアル内に提供されてもよい。

40

【0123】

診断方法

患者が野生型の、または多型を含む P o l アレルを有することを調べるために、患者の生物学的サンプルを分析する多数の方法が、当該技術分野で知られている。かかる分析の目的は、症状の深刻さまたはその後の経過を決定することにおいて医師を助ける、および/またはその治療を最適化するために、診断または予後、特に腫瘍または腫瘍の悪性度の診断または予後のために用いられる。

50

【 0 1 2 4 】

概して、この方法は、P o l 核 酸配列の存在をスクリーニングする方法と、P o l ポリペプチドまたはそのアイソフォームの存在または不在を検出する方法とに分けられる。この方法は、かかる核酸配列またはポリペプチドを含むことが疑われる患者の生物学的サンプルを利用する。生物学的サンプルの例は、血液、血漿、血清、組織サンプル、腫瘍サンプル、唾液および尿を含む。

【 0 1 2 5 】

P o l 核 酸またはポリペプチドを検出するための例示的アプローチは、以下を含む。

(a) サンプル内の核酸の配列を、P o l 核 酸配列と比較して、患者に由来するサンプルが一以上の変異を含むか否かを調べる工程；または

(b) 患者に由来するサンプルにおけるP O L L 遺伝子によりコードされるポリペプチドの存在を調べ、存在する場合には、そのポリペプチドが、全長であるか、および/または野生型であるか、および/または野生型ポリペプチドのアイソフォームであるか、および/または正常レベルで発現されているかを調べる工程；または、

(c) D N A フィンガープリンティングを用いて、患者に由来する核酸のサンプルを制限酵素で切断した場合に得られる制限パターンを、正常P O L L 遺伝子またはその変異形態から得られた制限パターンと比較する工程；または、

(d) P o l 核 酸配列に結合できる特異的結合メンバ(正常配列または公知の変異配列)を用いる工程であって、前記特異的結合メンバが、P o l 核 酸配列とハイブリダイズし得る核酸を含むか、天然もしくは変異したP o l 核 酸配列またはそれにコードされたポリペプチドに対する特異性を備えた抗体ドメインを含む物質を含み、特異的結合メンバが、その結合パートナーに対する特異的結合メンバの結合が検出可能であるようにラベルされている工程；または

(e) 正常または変異したP O L L 遺伝子配列に基づく一以上のプライマーを用いたP C R を使用して、患者に由来するサンプルにおける正常または変異P O L L 遺伝子をスクリーニングする工程、

【 0 1 2 6 】

“特異的結合対”は、特異的結合メンバ(s b m)と結合パートナー(b p)を含み、これらは、互いに特別な特異性を有し、かつ、通常の条件で、他方の分子に選択的に互いに結合する。特異的結合対の例は、抗原と抗体、分子とレセプター、および相補的ヌクレオチド配列である。当業者であれば他の多くの例を考えることができ、ここに列挙するまでもないであろう。さらに、用語“特異的結合対”は、特異的結合メンバと結合パートナーの両方またはいずれかが、巨大分子の一部を含む場合にも適用できる。特異的結合対が核酸配列である実施態様では、アッセイの条件下で互いにハイブリダイズする長さ、好ましくは10ヌクレオチドの長さ以上、より好ましくは15または20ヌクレオチドの長さ以上とされる。

【 0 1 2 7 】

P o l 核 酸のスクリーニングに関係する本発明の殆どの実施態様では、サンプルは、最初に、P C R 等を用いて増幅されて、サンプルに存在する別の配列と比較してアナライトの量を増大させる。これは、サンプルに存在するのであれば、高い感度でターゲット配列を検出可能にする。この最初の工程は、当該技術分野で重要性の増しつつある高感度アレー技術を用いることによって、回避されてもよい。

【 0 1 2 8 】

P O L L 遺伝子の変異形態は、遺伝子の機能を妨げうる、または妨げることのない、野生型配列と比較して一以上のヌクレオチドの一以上の挿入、欠失、置換および/または付加を含んでもよい。核酸レベルでの差異は、コードされたポリペプチドのアミノ酸配列の差異に必ずしも反映されるものではないが、公知の機能不全に関連しうる。しかしながら、遺伝子の変異または他の差異が、(たとえあるとしても)産生されたポリペプチドの性質に深刻に影響するフレームシフトまたは停止コドンをもたらす場合があり、あるいは、ポリペプチドの一以上のアミノ酸または領域の挿入、欠失、置換および/または付加を含

10

20

30

40

50

む、コードされたポリペプチドにポイントミューテーションまたは顕著な変異的变化をもたらす場合がある。プロモーター配列または他の制御配列における変異は、遺伝子からの発現を妨げ、または低減し、あるいは、mRNA転写のプロセッシングまたは安定性に影響する。腫瘍形成に関連した一塩基多型の例は、P o l c D N A の 1 6 8 3 位の一塩基対変化トランジション (C から T) であり、これは、P o l のコード領域においてアミノ酸残基 4 3 8 (A r g) からトリプトファン (T r p) への変化をもたらす。

【 0 1 2 9 】

試験サンプル中に、特定の核酸配列またはそのミュータント、変異体、またはアレルの存在または不在を調べる種々の方法がある。例示的試験は、ヌクレオチドシーケンシング、チップ上に固定された核酸を用いたハイブリダイゼーション、分子表現型試験、タンパク切りつめ試験 (P T T)、一本鎖コンホメーション多型 (S S C P) 試験、ミスマッチ切断検出、および変性勾配ゲル電気泳動 (D G G E) を含む。これらの技術およびその利点および欠点は、Nature Biotechnology, 15:422-426,1997に記載されている。

10

【 0 1 3 0 】

試験は、ゲノムDNA、cDNAおよび/またはmRNAを含む調製物に対して行ってもよい。cDNAまたはmRNAを試験することは、核酸の複雑さがイントロン配列の不在により低減されるという利点を有するが、その調製物の作製に余計な時間と努力が必要であるという欠点もある。RNAは、RNAアーゼが広範囲に存在することから、DNAよりも操作が困難である。

【 0 1 3 1 】

試験サンプル中の核酸を配列決定し、その配列をSEQ ID NO : 4の配列と比較して、差異が存在するか否かを調べてもよい。もしそうであれば、その差異を、公知の罹病性アレルと比較し、その試験核酸が記載された一以上のバリエーションを含むか否かを調べることができる。

20

【 0 1 3 2 】

一般には、試験サンプル中の全ての核酸または全POLL遺伝子さえ配列決定することは時間または労力の面から効率的ではないので、一以上の対のプライマーを用いたPCRのような特異的な増幅反応を用いて、その核酸の興味のある領域、例えば、POLL遺伝子、または、上記症状の一つに対する罹病性と関連した変異の特定の領域を増幅する。次いで、この増幅された核酸を、上述したように配列決定し、および/または他の方法で試験して、特定の特徴の存在または不在を調べる。試験用の核酸は、細胞から取り出された、あるいはライブラリーの核酸から、制限酵素切断および電気泳動のような種々の別の技術を用いて調製することができる。

30

【 0 1 3 3 】

核酸は、変異体 - またはアレル - 特異的プローブを用いてスクリーニングされてもよい。かかるプローブは、上記状態に対する罹病性と関連することが知られている配列変化を有するPOLL遺伝子の領域またはその相補鎖に対応する。適切にストリンジェントな条件下における、テスト核酸に対するかかるプローブの特異的ハイブリダイゼーションは、試験核酸の配列変化の存在を示す指標である。効率的なスクリーニングのために、一以上のプローブを同一の試験サンプルに用いる。

40

【 0 1 3 4 】

アレル - または変異体 - 特異的オリゴヌクレオチドは、試験サンプルに存在するのであれば、同様に、特定の配列を特異的に増幅するためにPCRで用いることができる。PCRバンドが遺伝子変異体を含んでいるかどうかの評価は、当業者になじみの深い多くの方法で実施できる。PCR産物は、例えば、遺伝子変異体を選択されたことに関連する特異的バンドを用いて、変性ポリアクリルアミドDNAシーケンシングゲルで変異または多型を示すことを可能にするように処理されてもよい。

【 0 1 3 5 】

試験サンプルにおける変異配列の存在を探すことに代えて、あるいはこれに加えて、例えば、適度に特異的なオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを用いて、正常配列の

50

存在を探す。

【0136】

プローブと試験核酸との間のハイブリダイゼーションを用いたアプローチおよびミスマッチの検出を用いることができる。適切な条件下では（温度、pH等）、オリゴヌクレオチドプローブは、完全には相補的でない配列とハイブリダイズする。二つの分子間の塩基対形成の程度は、ミスマッチであるにも関わらずアニールするのに十分なのであろう。二つのアニーリング核酸分子間のミスマッチの存在を検出するための種々のアプローチが当該技術分野で知られている。

【0137】

例えば、RNAアーゼAは、ミスマッチの部位を切断する。切断は、関連するプローブがアニールした試験核酸を電気泳動し、全長プローブ/試験ハイブリッドよりも短い分子（すなわち、より高い電気泳動移動度を有する分子）を探すことによって検出することができる。他のアプローチは、レソルバーゼまたはエンドヌクレアーゼのような酵素を使用する。

10

【0138】

かくして、正常POLL遺伝子の一部の領域の配列を有するオリゴヌクレオチドプローブ（センスまたはアンチセンス鎖）（そこで変異が生じることが知られている）を、試験核酸にアニールさせてもよく、ミスマッチの存在または不在が調べられる。ミスマッチの存在の検出は、試験核酸に変異の存在を示唆する。一方、変異を含むPOLL遺伝子の領域の配列を有するオリゴヌクレオチドプローブを、試験核酸にアニールさせて、ミスマッチの存在または不在が調べられてもよい。ミスマッチの不在は、試験サンプル中の核酸が正常な配列を有することを示唆しうる。いずれの場合でも、一連の遺伝子の種々の領域に対するプローブを用いることができる。

20

【0139】

核酸分子の配列における差異の存在は、制限酵素切断により検出することができる。例えば、一以上の制限酵素を用いて核酸サンプルを切断した場合に得られた制限パターンと、正常遺伝子または変異体またはアレルを含むサンプルを前記と同一の酵素を用いて切断した場合に得られるパターンとを比較する、DNAフィンガープリンティングの方法である。

【0140】

プロモーターまたはイントロンに位置する別の制御配列における重要な制御エレメントの存在または不在は、転写によるmRNA産生レベルまたはmRNAからの翻訳によるポリペプチド産生レベルを調べることにより評価してもよい。

30

【0141】

核酸の試験サンプルは、例えば、唾液または好ましくは血液における細胞から核酸を抽出することによって提供されてもよく、あるいは、羊膜、胎盤または胎児自身から出生前試験であってもよい。

【0142】

SEQ ID NO: 4に記載されたアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはそのアミノ酸配列ミュータント、変異体、アレルまたはアイソフォームのような、試験サンプルにおける特定のポリペプチドの存在または不在を調べるための種々の方法が存在する。

40

【0143】

サンプルは、例えば、Pol ポリペプチドの一以上の特定の变異体に特異的な抗体（または抗体の混合物）のような、特異的結合メンバに対する結合パートナーの存在について試験されてもよい。

【0144】

サンプルは、ポリペプチドに特異的な抗体（または抗体の混合物）のような特異的結合メンバに対する結合パートナーの存在について試験されてもよい。

【0145】

この場合、サンプルは、特異的結合に適切な条件下で、抗体のような特異的結合メンバと

50

接触させ、次いで、例えば、上記レポーターシステムを用いて、結合が調べることによって試験されてもよい。抗体のパネルが用いられる場合には、それぞれの結合が調べられるように、種々のレポーターグラベルが、各抗体に用いられてもよい。

【0146】

抗体のような特異的結合メンバを用いて、試験サンプルからその結合パートナーポリペプチドを単離および/または精製し、ポリペプチドの配列決定および/または生化学分析により、それがP o l 1 ポリペプチドの配列および/または特性を有するか否か、あるいはそれがミュータントまたは変異形態であるかを調べることができる。アミノ酸配列決定は、自動化配列決定装置を用い、当該技術分野では機械的な手段である。

【0147】

医薬およびペプチド治療

P o l 1 ポリペプチド並びにアンタゴニストおよびアゴニストは、広範囲の疾患の治療に有益である。特に、P o l 1 酵素のインヒビターは、ガンを治療するために用いることができ、特に、DNA損傷を引き起こして例えば細胞にアポトーシスを誘導する試薬と組み合わせることにより、それによって、疾患を有する細胞が、前記試薬処理によって引き起こされた損傷を修復できないようにする。さらに、エラー傾向のあるDNA修復プロセスにおけるP o l 1 の役割は、クラススイッチ組み換えおよび体性のハイパーミューテーションのような、二次免疫応答を生じうる。かくして、P o l 1 インヒビターは、免疫抑制、乾癬、関節炎、および移植拒絶の治療に使用される。

【0148】

本発明にかかるP o l 1 ポリペプチド、インヒビター、アンタゴニスト(例えば、抗体)、ペプチドおよび核酸は、薬学的組成物に製剤化され得る。これらの組成物は、上記物質に加えて、薬学的に許容できる賦形剤、キャリアー、バッファー、安定剤、または当業者に周知の他の物質を含んでもよい。かかる物質は、非毒性かつ活性成分の効力を妨げないものとすべきである。キャリアーまたは他の物質の正確な性質は、投与経路、例えば、経口、静脈内、皮膚または皮下、鼻腔、筋肉内、腹腔内経路による。

【0149】

経口投与用の薬学的組成物は、錠剤、カプセル、粉末、または液状とすることができる。錠剤は、ゼラチンまたはアジュバントのような固形キャリアーを含んでもよい。液状の薬学的組成物は、一般に、水、ペトロレウム、動物または植物油、鉱物油または合成油のような液状キャリアーを含む。生理食塩水、ブドウ糖または他の糖溶液、またはエチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールのようなグリコールを含んでもよい。

【0150】

静脈内、皮膚または皮下注射、または、罹患部位での注射では、活性成分は、発熱物質を含まない、適切なpH、等張性および安定性を備えた経口的に許容できる水溶液の形態とされる。当業者であれば、例えば、塩化ナトリウム液、リンガー液、乳酸加リンガー液のような、等張ビヒクルを用いて適切な溶液を調製することができる。必要であれば、防腐剤、安定剤、バッファー、酸化防止剤および/または他の添加剤を含むことができる。

【0151】

患者に与えられるものが本発明にかかるポリペプチド、抗体、ペプチド、核酸分子、小さい分子、または他の薬学的に使用できる化合物であろうと、投与は、好ましくは“予防的に有効な量”または“治療的に有効な量”(場合により、予防は治療と考えられる)とされる。これは、患者に利益を示すのに十分なものである。投与の実際の量、および速度およびタイムコースは、治療されるものの性質および深刻度に依存する。治療の処方、例えば、投与量等の決定は、医師およびその他の医療ドクターの責務の範囲内であり、通常は、治療すべき疾患、患者の状態、輸送部位、投与方法、および医師の知るその他のファクターを考慮する。上記技術およびプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A.(ed), 1980に記載されている。

【0152】

10

20

30

40

50

あるいは、ターゲティング療法を、抗体または細胞特異性リガンドのようなターゲティングシステムの使用により、あるタイプの細胞に対してより特異的に活性剤を輸送するために用いることができる。ターゲティングは、種々の理由から望ましい。例えば、薬剤が許容不可能な毒性である場合、あるいは、あまりにも高い投与量を必要とする場合、あるいは、ターゲット細胞に侵入できない場合である。

【0153】

これらの薬剤を直接投与する代わりに、例えばウイルスベクターの、細胞内に導入されたコード遺伝子から発現させることによってターゲット細胞において産生させてもよい(VDEPT技術の変形 - 以下参照)。ベクターは、治療される特異的細胞にターゲット化されるか、あるいは、多かれ少なかれ選択的にターゲット細胞によりスイッチされる制御エレメントを含むことができる。

10

【0154】

あるいは、薬剤は、治療されるべき細胞において産生、またはその細胞にターゲット化された活性化剤により活性形態に変換される前駆体形態で投与されてもよい。この種のアプローチは、ADEPTまたはVDEPTとして知られる。前者は、細胞特異的抗体に結合することによって細胞に活性化剤をターゲット化することを含み、後者は、ウイルスベクターのコードDNAから発現させることによりベクターの活性化剤、例えば酵素を産生することを含む(例えば、EP-A-415731およびW090/07936参照)。

【0155】

組成物は、単独で投与されてもよく、また、治療すべき症状に依存して、同時または連続的に、他の治療剤と組み合わせて投与されてもよい。

20

【0156】

P o l インヒビターおよび試薬のスクリーニング方法

本発明にかかるポリペプチドは、その活性または機能に影響または変更する分子をスクリーニングすることに用いることができる。かかる分子は、治療に有益である(予防を含む)。

【0157】

新たな薬剤の同定を導く薬学的調査は、リード化合物が見出される前およびその後で、非常に大量の候補物質のスクリーニングを含むことが周知である。これは、薬学的研究を、非常に高価かつ時間のかかるものとする要因の一つである。スクリーニングプロセスにおける補助手段は、顕著な商業的重要性および有用性を有する。

30

【0158】

ポリペプチドの活性を変更する物質のスクリーニング方法は、一以上の試験物質を、適切な反応媒体でポリペプチドと接触させること、処理されたポリペプチドの活性を試験すること、およびその活性を、試験物質で処理していない比較反応媒体中のポリペプチドの活性と比較することを含む。処理および未処理ポリペプチドの間の活性の差異は、関連する試験物質の変更効果の指標である。

【0159】

コンビナトリアルライブラリー技術は、多数の種々の物質を、ポリペプチドの活性を変更する能力について調べるのに効率的な方法を与える。かかるライブラリーおよびその使用は、当該技術分野で公知である。ペプチドライブラリーの使用が好ましい。

40

【0160】

活性の変更についてスクリーニングする前またはこれと同時に、例えば、酵母2ハイブリッドシステム(ポリペプチドと試験物質の両方がコード核酸から酵母において発現されることを必要とする)において、試験物質をポリペプチドと相互作用する能力についてスクリーニングしてもよい。これは、物質を、ポリペプチドの活性を変更する実際の能力について試験する前の、粗いスクリーニングとして用いることができる。あるいは、スクリーニングを用いて、例えば、治療剤として試験するための、P o l ポリペプチドの類似物を見出すべく、P o l 特異的結合パートナーに対する結合について試験物質をスクリーニングすることができる。

50

【0161】

ポリペプチド活性を変更または影響する物質の同定後、この物質をさらに調査してもよい。さらに、製剤、医薬のような組成物、薬学的組成物または薬剤のような、調製物において使用および/または製造されてもよい。これらは、患者に投与することができる。

【0162】

かくして、本発明は、ここの開示に従って、ポリペプチド活性のモジュレーターとして核酸分子を用いて同定された物質だけでなく、薬学的組成物、医薬、薬剤、またはかかる物質を含む別の組成物、かかる物質を患者に投与することを含む方法、投与用組成物の製造におけるかかる物質の使用、およびかかる物質と薬学的に許容できる賦形剤、ビヒクルまたはキャリアー、および任意に他の成分とを混合することを含む薬学的組成物の調製方法

10

【0163】

【実施例】

実施例1：ヒトP o l に対応するc D N Aのクローニング

ヒトP O L L 遺伝子のクローニングを、我々の先の研究により得られていたマウスP O L L 遺伝子のc D N A 配列と高い同一性を示したE S T 群の、公共のデータベースdbEST/GenBankにおける同定により開始した。これらのE S T は、以下の同定番号を有する：AA742404、AA922738、AI091150、AA989195、W69567、AI123218、AI199486、AA576526、W69888、T81701 y H11886。P o l のコード流域の一部を含むと思われる、E S T H11886を除く、前記の全てが3'-未翻訳領域に対応していた。ヒト胎盤から得られた全c D N A から出発して、P o l に対応するc D N A が、P C R 増幅により、一連の重複フラグメントとして得られた(図1)。第一フラグメント(a136-20、図1)は、上記E S T から誘導されたプライマーを用いて特異的P C R により得られた。このフラグメントは、E S T H11886の配列と重複し、かつ、3'-末端に対応するE S T 群と重複する。このフラグメントは、1419 b p の長さを有し、ここに記載した完全なc D N A の1107から2525位にわたる。2526から2678位にわたる3'末端セグメントは、E S T のコンセンサスから推定された。

20

【0164】

第2フラグメント(a60-a、図1)は、開始コドンに近いマウス配列から誘導されたセンスプライマーと、ヒトP C R フラグメントa136-20から誘導されたアンチセンスプライマーとを用いて、半特異的P C R により得られた。この第2フラグメントは、996 b p の長さを有し、ヒトP o l c D N A の380から1575位に対応するコード配列を含む。このc D N A 配列は、フラグメントa91で完成する(図1)。このフラグメントは、5'R A C E により得られ、未翻訳5'領域を含む504 b p 長のフラグメントであり、コード領域の最初の部分である。それゆえ、ヒトP o l の完全なc D N A は、全部で2678 b p を含み、371 b p の5'未翻訳領域(1-371)、1728 b p にわたるコード配列(372-2099)、および579 b p の3'未翻訳領域(2100-2678)を有する。対応するタンパクであるP o l は、575アミノ酸残基を有する。P o l のマウスおよびヒトホモログに対応するコード配列は、D N A レベルで84%の同一性を有する。タンパクレベルでは、マウスおよびヒトP o l は、全体的に80%の同一性を有し、最も保存されたドメインでは90%に至り、B R C T ドメインとP o l コアを連結する領域では57%に減少する。

30

40

【0165】

実施例2：正常および腫瘍性の種々の起源に由来するc D N A におけるP o l 変異体のP C R 分析

種々の組織におけるスプライシング変異体hPOLLデルタ6およびhPOLLデルタ(6+7)の発現を調べるために、c D N A レベルでこれらの変異体を検出するアッセイを開発した。このアッセイは、P o l の各変異体に対応するc D N A フラグメントを増幅することを可能にする特異的プライマーを用いる。種々の変異体の中から識別することができる特異的プライマーとして、スプライシング特異的センスプライマーを用い、その一方で、全てのケ

50

ースにおいて、共通のアンチセンスプライマーを用いた。

【 0 1 6 6 】

2 B 2 と称する両方の変異体のアンチセンスプライマーは、エキソン 9 に位置づけられた共通領域に対応する。

2 B 2 5'-GGAGCGGTTGAAGTGTGC-3'

【 0 1 6 7 】

2 B 3 と称される、変異体 hPOLL デルタ 6 に特異的なセンスプライマーは、その最初の 1 1 の 5'-ヌクレオチドがエキソン 5 の最後に対応するが、残りのプライマーがエキソン 7 の最初の配列に対応するように設計された。

2 B 3 5'-CCTCGTACCAGGGCTTCC-3'

10

【 0 1 6 8 】

一方、2 B 4 と称される、変異体 hPOLL デルタ (6+7) に対応する特異的プライマーは、その最初の 5'-ヌクレオチドがエキソン 5 の最後に対応し、残りのヌクレオチドがエキソン 8 の最初の配列に対応するように設計された。

2 B 4 5'-CACCTCGTACCAGGTCCAGA-3'

【 0 1 6 9 】

アッセイを行うために、別個の反応チューブに、種々の起源に由来する cDNA サンプル、および以下の組み合わせのプライマー：1) 2 B 3 と 2 B 2 (図 2 および 3)、2 B 4 と 2 B 2 (図 4) とを、1 μM の濃度で含めた。反応混合物は、Tris-HCl 10mM pH 9、KCl 50mM、MgCl₂ 1.5mM、0.2mM の各ヌクレオチド (dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、および 0.025 U/ml の Taq DNA pol を含む。反応は 40 サイクルの PCR で行われた。各サイクルは、94 で 10 秒、60 20 秒であった。フラグメントの同定を、クローニングおよびシーケンシングにより確かめた。

20

【 0 1 7 0 】

実施例 3：マウス P o l の発現および精製、並びに特異的抗体の生成

P o l をコードする cDNA 領域を、ベクター p T 7 の EcoRI および NdeI 部位、または発現プラスミド pRSET-A (Invitrogen) の EcoRI および BamHI 部位にさらにクローニングするように設計されたプラスミドを用いて、LLNL により提供されたプラスミドから PCR 増幅した。後者の場合、6 x ヒスチジンタグが、組み換えタンパクの N 末端に添加される。

30

【 0 1 7 1 】

トランスフォーメーションのために、E. coli 株 TOP10F' を用いた。シーケンシングにより全ての構成物をチェックした後に、トランスフォーメーションを E. coli 株 BL21 (DE3) pLysS に実施した。これは、IPTG により誘導可能な、lacUV5 プロモーターの調節下に T 7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する。P o l 発現の誘導を、30、32 および 37 で、0.6 (A600) の光学密度で行った。IPTG (Sigma) を、0.5 mM の濃度で添加した。Rifampicine (Sigma) を誘導の 20 分後に、120 μg/ml の濃度で添加した。誘導の最適な時間が 2 時間であることが示された。また、2.5 mM の Betaine (Sigma) および 1 M のソルビトール (BDH) の存在下で行った。いずれの条件でも、マウス P o l は不溶性であった。対照的に、同じ方法による、ヒト P o l の E. coli における発現は、可溶性かつ活性なタンパクを生じた。

40

【 0 1 7 2 】

E. coli において発現されたマウス P o l に対応する不溶性フラクションを用いて、ポリクローナル抗体を産生した。SDS の存在下で電気泳動により分離した後に、P o l に対応するバンドを、ゲルから切り出し、“フレンチプレス”を用いて粉碎した。P o l の 100 μg に相当する分注物を、抗原として用いて、多重皮内接種によりウサギを免役した。標準的な免疫化プロトコールの後に得られた血清は、ウェスタンブロット分

50

析により特異的に P o l Ⅰ を認識することができた。

【 0 1 7 3 】

実施例 5 : ヒト P o l Ⅰ の全コード領域の P C R / S S C P スクリーニング

正常 - 腫瘍ヒト組織の c D N A ライブラリーのパネル (Clontech) を、ヒト P o l Ⅰ 遺伝子における潜在的遺伝変異の調査のためのテンプレートとして用いた。ヒト P o l Ⅰ 遺伝子の全コード配列をカバーするためにプライマーセットを選択した。得られたアンプリマーを、S S C P により別個にスクリーニングした。プライマー : センス 5 'GGCATGTGGTTCATACCGAC とアンチセンス 5 'GGAGCGGTTGAAGTGTGC を用いて、P o l Ⅰ の触媒ドメインの一部 (~ 320bp) を増幅した。この領域の P C R 産物は多型変異を含む。

【 0 1 7 4 】

テンプレートの分注物を 5 倍希釈し、得られた分注物を P C R の 5 倍ストックとして用いた。全ての P C R 反応は、標準的な条件下で、10pmol の各プライマー、0.25mM dNTP、1xTaq バッファー (10mM Tris, 50mM, KCl, ゼラチン, 0.2mg/ml BSA, pH8.5)、0.25U の Taq ポリメラーゼを用い、P C R 混合物の全体量 1 0 m l で行った。P C R パラメーターは以下の通りであった : 3 5 サイクル : 変性に 9 4 / 1 5 秒 ; プライマーアニーリングに 6 0 / 3 0 秒、および伸長に 7 2 / 1 5 秒。P C R 産物を、S S C P 分析した。

【 0 1 7 5 】

1 2 人の無関係の患者に由来するゲノム D N A を、記載したように抹消血液リンパ球から調製した。P C R を、約 2 0 - 5 0 n g のゲノム D N A を用いて、標準的な条件下で行った : 10pmol の各プライマー、0.25mM dNTP、1xTaq バッファー (10mM Tris, 50mM, KCl, ゼラチン, 0.2mg/ml BSA, pH8.5)、0.25U の Taq ポリメラーゼ。P C R 混合物の全体量を 1 0 m l とした。ヒト P o l Ⅰ の触媒ドメインの部分 (全エキソン 8) を増幅するためのプライマーの配列は、センス 5 'GGCATGTGGTTCATACCGAC ; アンチセンス 5 'TTCCTGCCGAAGACTGTCA であった。P C R パラメーターは以下の通りであった : 3 5 サイクル : 変性に 9 4 / 1 5 秒 ; プライマーアニーリングに 6 0 / 3 0 秒、および伸長に 7 2 / 1 5 秒。P C R 産物を、TA クローニングベクター pCRII (Invitrogen) にクローニングし、ABI373 (Applied Biosystems) 自動シーケンサーで自動化ジデオキシターミネーションダイ法により配列決定した。

【 0 1 7 6 】

一本鎖コンホメーション多型分析 (S S C P) を記載の通りに実施した (Orita ら, 1989)。P C R 産物を 1 x ホルムアミドローディング染料に希釈し、9 5 °C で 3 分間変性した。サンプルを、1 5 % のグリセロールを含む 8 % ポリアクリルアミドゲルに適用した。流した後で、ゲルを記載されているように銀染色した : 1 0 % エタノールで 1 5 分固定、1 % H N O ₃ で 1 0 分間インキュベーションし、0 . 1 % ホルムアルデヒドを含む 0 . 2 % A g N O ₃ で 3 0 分間インキュベーションし、かつ、バンドが見えるまで 0 . 0 5 % ホルムアルデヒドを含む 3 % N a ₂ C O ₃ で発色させ、1 0 % 酢酸で 1 0 分間固定化した。

【 0 1 7 7 】

一本鎖コンホメーション多型 (S S C P) と D N A シーケンシングを用いて、ヒト P o l Ⅰ の全 c D N A をカバーする重複 P C R 産物を分析し、ガンに関する変異の存在を調査した。最初に、正常 - 腫瘍ヒト組織のパネル (Clontech) を用いた。図 5 に示されているように、S S C P は、S S C P 分析における移動度の変化が、触媒部位に近いヒト P o l Ⅰ の部分において卵巣ガン c D N A ライブラリーのケースに観察されたことを示した。これらのフラグメントのクローニングおよび配列決定が、卵巣ガン c D N A においてホモ接合形態で存在する一塩基対置換を同定したが、ヘテロ接合構成物が、正常卵巣組織 c D N A ライブラリーに対応する S C C P プロフィールにおいて検出された。P o l Ⅰ c D N A の 1 6 8 3 位における一塩基対変化トランジション (C から T) は、P o l Ⅰ コード領域のアミノ酸残基 4 3 8 (Arg) からトリプトファン (Trp) への変化をもたらす。我々は、1 2 人の無関係の患者のゲノム D N A をスクリーニングすることにより、集団におけるこの特定の多型の発生率を分析した。結果は、この多型のメンデル学的隔離を示した。Arg のバージョンをコードするアレルがやや優性であった。次に、各特定のアレル変

10

20

30

40

50

異体に対するヒト P o l の活性アッセイを研究した。

【 0 1 7 8 】

実施例 6 : in situハイブリダイゼーション

非放射活性 in situハイブリダイゼーションを、ポリ L - リシン被覆ガラススライドに載せた 1 2 - 1 4 μ m 厚の組織切片に対して行った。出生後 2 0 日および成体の試験片を切り出し、直ちに D E P C 処理 P B S 中の 4 % パラホルムアルデヒドに 4 で一晩固定した。アガーに固定された切片を 0 . 1 μ g / m l のセンスまたはアンチセンスのジゴキシゲニンラベル化リポプローブ (Boehringer Mannheim) とハイブリダイズさせた。最後に、このスライドを Hoechst 33258 で染色し、蛍光および明視野顕微鏡で観察し、CCD カメラで記録した。次いで、カバースリップを取り出し、スライドを脱水し、DePex (Serva) を載せた。

10

【 0 1 7 9 】

これらの実験は、P o l m R N A が増殖性精原細胞には検出されないものの、減数分裂の組み換えが起こるステージであるパキテン期精母細胞の細胞質に豊富に存在することを示した。

【 0 1 8 0 】

実施例 7 : ヒト P o l の生化学的特徴決定

D N A ポリメラーゼの機能的バージョンを示すヒト P o l のスプライシング変異体 (切り詰められていない) の検出をすることは、この形態の一部が腫瘍サンプルに特異的に発現されると思われることから、非常に興味深い。それゆえ、これらの形態が、腫瘍形成に必要なポリメラーゼの変異した (ミューテーター) 変異体を示すのか否かを調べた。

20

【 0 1 8 1 】

また、ヒト P o l を E . coli において、可溶性かつ活性な形態で発現させることにも成功した。予備的データは、P o l が高度にエラー傾向であることを示し、これは、P o l 機能が、減数分裂中の D N A 修復に関与しうると言う事実が再考されなくてはならないということを示す。P o l は、配偶子を産生するプロセスに関連して、胚細胞において選択的に発現される。この酵素が、損傷を受けていない鋳型について合成する際に、変異を導入しうるということを考慮すると、P o l の機能は、我々の胚細胞にある程度の変異性を生じることであり、かかる変異誘発のバックグラウンドが、ゲノム進化にとっては重要となりうる。

【 0 1 8 2 】

かかる推定される機能の証拠は、ヒト P o l により触媒された D N A ポリメライゼーションの in vitro 分析から誘導される。P o l が ムターゼとして挙動していることを示すために、鋳型鎖がホモポリメリック (ポリ d T) であり、それゆえプライマー鎖 (オリゴ d A) が単独の正確なもの (相補的ヌクレオチド) として d A T P を用いて伸長される、明白な in vitro アッセイを用いた。顕著な挿入忠実性を有する対照の酵素 (Klenow) とは異なって、ヒト P o l によるラベル化 d A T P の取り込みは、相対的に低い濃度 (1 μ M) の各非相補的デオキシヌクレオチドの添加により強く阻害された。阻害のレベルは、P o l m u (ムターゼ) について先に報告されたものよりも高かった、図 7 参照。

30

【 0 1 8 3 】

また、図 8 は、P o l の阻害が、アッセイで用いられた活性化マグネシウムまたはマンガニオンの性質とは無関係であることを示す。

40

【 0 1 8 4 】

かくして、P o l のエラー傾向は、この酵素を、変異性を生じさせるプロセスにおいて、すなわち、体性ハイパーミューテーションとして、および / または、ことによると、優勢的に、配偶子形成中に起こる特異的プロセスとして、D N A 情報を生成 / 変更する良い候補にすると考えられる。後者の考えは、パキテン期精母細胞および精子細胞における P o l の卓越した発現により支持される。

【 0 1 8 5 】

上記参考文献の全てを、特別に参考としてここに含める。

50

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒトPOLL遺伝子をクローニングする方法のスキーム。異なるクローニング工程が、得られた異なるcDNAフラグメントのアライメントにより示されている。フラグメント1-3は、胎盤から得られた。フラグメント4から14は、dbEST/GenBankデータベースから得られた配列を示し、その受理番号を用いて示されている。H11886と同定されたESTは内部欠失を示した。アスタリスクは、開始および終結コドンの相対的な位置を示す。

【図2】 ヒトPOLL遺伝子に対応するmRNAのRT-PCR増幅。特異的プライマーを用いて、スプライシングに差異を示すmRNAの部位を選択的に増幅するした。Mはサイズマーカーである。a) 胎児および成体の脳からのサンプルの増幅。b) 細胞系およびヒト腫瘍から得られたサンプルの増幅。c) RT-PCR増幅により同定されたPol mRNAのスプライシング変異体の図示。

10

【図3】 Pol mRNAに対応するスプライシング変異体D6のRT-PCR増幅。この反応は、正常および腫瘍組織の両方において、スプライシング変異体D6を選択的に増幅するために、スプライシング特異的プライマー（明細書中に記載）を用いて実施した。Mはサイズマーカー；Nは正常組織；Tは腫瘍組織；？は特徴決定されていない増幅産物である。

【図4】 Pol mRNAに対応するスプライシング変異体D6+7のRT-PCR増幅。この反応は、正常および腫瘍組織の両方において、スプライシング変異体D6+7を選択的に増幅するために、スプライシング特異的プライマー（明細書中に記載）を用いて実施した。Mはサイズマーカー；Nは正常組織；Tは腫瘍組織；？は特徴決定されていない増幅産物である。

20

【図5】 A. ヒトPolのコード配列における潜在的アレル変異体の発生を示す一本鎖コンホメーション多型(SSCP)分析。この変異体は、CLONTECHの卵巣ガン細胞系に最初に見出された(レーン3および4)。レーン1および2は、正常卵巣組織を示す。B. クローニングおよび配列決定後に、ヒトPol cDNAの1683位に位置する、一塩基多型(CからT)が観察された。スペイン人の集団に確認されたこの多型は、活性部位に非常に近いところに位置する酵素の部位に一つのアミノ酸残基の変化を生じる(Arg438からTrpへ)。

【図6】 腫瘍形成と関連したヒトPolの推定上のアレル変異体。

30

【図7】 Polポリメライゼーションが非相補的dNTPにより強く阻害されることを示す(ポリdT/ポリdA、1mMMnCl₂、Pol(PC0.5M)、30で10分)。

【図8】 Polポリメライゼーションが、マンガンまたはマグネシウムイオンの存在下でポリdA/ポリdT鋳型を用いて、非相補的dNTPにより強く阻害されることを示す。

【配列表】

LIST OF SEQUENCES

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

<120> human DNA polymerase lambda, a novel tumoral marker

<130> DNA Polymerase lambda

<140>

<141>

10

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2336

<212> ADN

<213> Mus musculus

20

<220>

<221> CDS

<222> (84)..(1805)

<400> 1

tttttttttt ttccctcta cccctcctc cccaatcgg ttctcattgg ctcccatgaa 60

aggccaggat ccagcgcctt tca atg gac cct cag ggc atc gtg aag gcc ttt 113

Met Asp Pro Gln Gly Ile Val Lys Ala Phe

1 5 10

30

ccc aag cgg aag aaa agt cat gca gat cta tct tca aaa gca ctt gca 161

Pro Lys Arg Lys Lys Ser His Ala Asp Leu Ser Ser Lys Ala Leu Ala

15 20 25

aag att ccc aaa agg gag gtg gga gaa gct aga gga tgg ctg agc tcc 209

Lys Ile Pro Lys Arg Glu Val Gly Glu Ala Arg Gly Trp Leu Ser Ser

30 35 40

caa gcc cag ctc agc tca gag gat gaa acc agc gat gga gaa ggg ccc	689	
Gln Ala Gln Leu Ser Ser Glu Asp Glu Thr Ser Asp Gly Glu Gly Pro		
190	195	200
cag gtt agc tca gca gat ctg caa gcc ttg atc act ggg cac tac ccc	737	
Gln Val Ser Ser Ala Asp Leu Gln Ala Leu Ile Thr Gly His Tyr Pro		
205	210	215
act ccc cct gag gaa gat ggt ggg cct gac cca gca cca gaa gct ctg	785	
Thr Pro Pro Glu Glu Asp Gly Gly Pro Asp Pro Ala Pro Glu Ala Leu		
220	225	230
gat aaa tgg gtc tgt gca cag ccc tcg agc cag aag gca act aac tac	833	
Asp Lys Trp Val Cys Ala Gln Pro Ser Ser Gln Lys Ala Thr Asn Tyr		
235	240	245
aat ctg cac atc aca gag aag ctg gaa gtg ctg gct aaa gcc tac agt	881	
Asn Leu His Ile Thr Glu Lys Leu Glu Val Leu Ala Lys Ala Tyr Ser		
255	260	265
gtc cag gga gac aag tgg agg gcc ctg ggc tat gca aag gcc atc aat	929	20
Val Gln Gly Asp Lys Trp Arg Ala Leu Gly Tyr Ala Lys Ala Ile Asn		
270	275	280
gct ctc aag agc ttc cac aag cct gtc agc tcc tac cag gag gcc tgt	977	
Ala Leu Lys Ser Phe His Lys Pro Val Ser Ser Tyr Gln Glu Ala Cys		
285	290	295
agc atc ccg gga att ggc aag cgg atg gcg gag aag gtc atg gag atc	1025	
Ser Ile Pro Gly Ile Gly Lys Arg Met Ala Glu Lys Val Met Glu Ile		
300	305	310
ctg gag agt ggg cat ctg cgg aag cta gac cac atc agt gac agt gtg	1073	
Leu Glu Ser Gly His Leu Arg Lys Leu Asp His Ile Ser Asp Ser Val		
315	320	325
cct gtc ttg gag ctc ttc tcc aac atc tgg gga gct ggg acg aag act	1121	
Pro Val Leu Glu Leu Phe Ser Asn Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Thr		
335	340	345
		10
		20
		30

gcc cag atg tgg tac cat cag ggc ttc cga aac cta gaa gat ctc caa 1169
 Ala Gln Met Trp Tyr His Gln Gly Phe Arg Asn Leu Glu Asp Leu Gln
 350 355 360

agc ctg ggc tcc ctg acc gct cag cag gcc att ggc ttg aag cac tac 1217
 Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ala Gln Gln Ala Ile Gly Leu Lys His Tyr
 365 370 375

gat gac ttc ctg gac cgc atg ccc agg gag gag gct gcg gaa att gag 1265
 Asp Asp Phe Leu Asp Arg Met Pro Arg Glu Glu Ala Ala Glu Ile Glu
 380 385 390

10

cag acg gtc cgg ata tca gcc cag gcc ttc aac cct ggg ctg ctg tgt 1313
 Gln Thr Val Arg Ile Ser Ala Gln Ala Phe Asn Pro Gly Leu Leu Cys
 395 400 405 410

gtg gct tgt ggc tct tac cga cgg ggg aag atg acg tgc ggg gat gtg 1361
 Val Ala Cys Gly Ser Tyr Arg Arg Gly Lys Met Thr Cys Gly Asp Val
 415 420 425

gat gta ctc att act cac ccc gat ggc cga tcc cac cgg gcc atc ttc 1409
 Asp Val Leu Ile Thr His Pro Asp Gly Arg Ser His Arg Gly Ile Phe
 430 435 440

20

agc tgc ctc ctt gat agc ctt cgg cag caa ggg ttc ctc aca gat gac 1457
 Ser Cys Leu Leu Asp Ser Leu Arg Gln Gln Gly Phe Leu Thr Asp Asp
 445 450 455

ttg gtg agc cag gag gag aac ggc caa cag cag aaa tac ctg ggt gtg 1505
 Leu Val Ser Gln Glu Glu Asn Gly Gln Gln Gln Lys Tyr Leu Gly Val
 460 465 470

30

tgc cgg ctc cca ggg ccc ggg aag cgc cac cgg cga ctg gac atc atc 1553
 Cys Arg Leu Pro Gly Pro Gly Lys Arg His Arg Arg Leu Asp Ile Ile
 475 480 485 490

gtg gta ccc tac tgt gag ttt gcc tgt gcc ctg ctc tac ttc acc ggc 1601
 Val Val Pro Tyr Cys Glu Phe Ala Cys Ala Leu Leu Tyr Phe Thr Gly
 495 500 505

tct gcc cac ttc aac cgg tcc atg aga gct ctg gcc aag acc aag ggc 1649
 Ser Ala His Phe Asn Arg Ser Met Arg Ala Leu Ala Lys Thr Lys Gly
 510 515 520

atg agc ctg tcg gag cat gcg ctc agt gca gct gta gtc cgg aac agc 1697
 Met Ser Leu Ser Glu His Ala Leu Ser Ala Ala Val Val Arg Asn Ser
 525 530 535

10

caa ggt gtc aag gtg ggg cct gga caa gtg ctg ccc acc ccc acg gag 1745
 Gln Gly Val Lys Val Gly Pro Gly Gln Val Leu Pro Thr Pro Thr Glu
 540 545 550

aag gac gtc ttc aag cac tta ggc ctg ccc tac cgg gag cca gct gaa 1793
 Lys Asp Val Phe Lys His Leu Gly Leu Pro Tyr Arg Glu Pro Ala Glu
 555 560 565 570

cgg gac tgg tga cctaggactt ggagcaaggg gaacctggtt gaatgaactg 1845
 Arg Asp Trp

20

actcatgtag ccctctccca ccctctttagc tgtgctctgc tttgtcgggtt acgcttgccc 1905

tgagtgacca agctaggagc tttgggctg cggggaagag ccagtctgat tctgagagcc 1965

cgcaagctct ctctcctgga caggatttat gctgctgtcc cctctcctcc cagtgcacag 2025

ttttcacacg gcccttccc tgttcaagca gaacagggtg ctggtttcaa ggcggtttcc 2085

30

tgcaactgaag gccogagctt ccctttccac cccaagactg atgtagctgt gtggggtcag 2145

caggggctgc aggagagggg agcagctgtg ggctcagcgt ctccctgag ccttcacagt 2205

agagaaagcc atgtggattc tctcaccgc tcacttctg tgcagctgga gctgctggg 2265

gtggcctgtc cagaccatga ggggtggcttc taagggccct ggggcctaataaagtgcttc 2325

tgacattcaa a 2336

<210> 2
<211> 573
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2
Met Asp Pro Gln Gly Ile Val Lys Ala Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ser
1 5 10 15

10

His Ala Asp Leu Ser Ser Lys Ala Leu Ala Lys Ile Pro Lys Arg Glu
20 25 30

Val Gly Glu Ala Arg Gly Trp Leu Ser Ser Leu Arg Ala His Ile Met
35 40 45

Pro Ala Gly Ile Gly Arg Ala Arg Ala Glu Leu Phe Glu Lys Gln Ile
50 55 60

20

Ile His His Gly Gly Gln Val Cys Ser Ala Gln Ala Pro Gly Val Thr
65 70 75 80

His Ile Val Val Asp Glu Asp Met Asp Tyr Glu Arg Ala Leu Arg Leu
85 90 95

Leu Arg Leu Pro Gln Leu Pro Pro Gly Ala Gln Leu Val Lys Ser Thr
100 105 110

30

Trp Leu Ser Leu Cys Leu Gln Glu Gly Arg Leu Thr Asp Thr Glu Gly
115 120 125

Phe Ser Leu Pro Met Pro Lys Arg Ser Leu Asp Glu Pro Gln Pro Ser
130 135 140

Lys Ser Gly Gln Asp Ala Ser Ala Pro Gly Thr Gln Arg Asp Leu Pro
145 150 155 160

Arg Thr Thr Leu Ser Leu Ser Pro Pro His Thr Arg Ala Val Ser Pro
165 170 175

Pro Pro Thr Ala Glu Lys Pro Ser Arg Thr Gln Ala Gln Leu Ser Ser
180 185 190

Glu Asp Glu Thr Ser Asp Gly Glu Gly Pro Gln Val Ser Ser Ala Asp
195 200 205

Leu Gln Ala Leu Ile Thr Gly His Tyr Pro Thr Pro Pro Glu Glu Asp
210 215 220

Gly Gly Pro Asp Pro Ala Pro Glu Ala Leu Asp Lys Trp Val Cys Ala
225 230 235 240

Gln Pro Ser Ser Gln Lys Ala Thr Asn Tyr Asn Leu His Ile Thr Glu
245 250 255

Lys Leu Glu Val Leu Ala Lys Ala Tyr Ser Val Gln Gly Asp Lys Trp
260 265 270

Arg Ala Leu Gly Tyr Ala Lys Ala Ile Asn Ala Leu Lys Ser Phe His
275 280 285

Lys Pro Val Ser Ser Tyr Gln Glu Ala Cys Ser Ile Pro Gly Ile Gly
290 295 300

Lys Arg Met Ala Glu Lys Val Met Glu Ile Leu Glu Ser Gly His Leu
305 310 315 320

Arg Lys Leu Asp His Ile Ser Asp Ser Val Pro Val Leu Glu Leu Phe
325 330 335

Ser Asn Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Thr Ala Gln Met Trp Tyr His
340 345 350

10

20

30

Gln Gly Phe Arg Asn Leu Glu Asp Leu Gln Ser Leu Gly Ser Leu Thr
 355 360 365

Ala Gln Gln Ala Ile Gly Leu Lys His Tyr Asp Asp Phe Leu Asp Arg
 370 375 380

Met Pro Arg Glu Glu Ala Ala Glu Ile Glu Gln Thr Val Arg Ile Ser
 385 390 395 400

Ala Gln Ala Phe Asn Pro Gly Leu Leu Cys Val Ala Cys Gly Ser Tyr
 405 410 415

Arg Arg Gly Lys Met Thr Cys Gly Asp Val Asp Val Leu Ile Thr His
 420 425 430

Pro Asp Gly Arg Ser His Arg Gly Ile Phe Ser Cys Leu Leu Asp Ser
 435 440 445

Leu Arg Gln Gln Gly Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Ser Gln Glu Glu
 450 455 460

Asn Gly Gln Gln Gln Lys Tyr Leu Gly Val Cys Arg Leu Pro Gly Pro
 465 470 475 480

Gly Lys Arg His Arg Arg Leu Asp Ile Ile Val Val Pro Tyr Cys Glu
 485 490 495

Phe Ala Cys Ala Leu Leu Tyr Phe Thr Gly Ser Ala His Phe Asn Arg
 500 505 510

Ser Met Arg Ala Leu Ala Lys Thr Lys Gly Met Ser Leu Ser Glu His
 515 520 525

Ala Leu Ser Ala Ala Val Val Arg Asn Ser Gln Gly Val Lys Val Gly
 530 535 540

Pro Gly Gln Val Leu Pro Thr Pro Thr Glu Lys Asp Val Phe Lys His
 545 550 555 560

10

20

30

Leu Gly Leu Pro Tyr Arg Glu Pro Ala Glu Arg Asp Trp
565 570

<210> 3
<211> 8300
<212> ADN
<213> HOUSE MOUSE

<220>
<221> exon
<222> 1..58

10

<220>
<221> exon
<222> 828..964

<220>
<221> exon
<222> 1625..1919

20

<220>
<221> exon
<222> 2512..2829

<220>
<221> exon
<222> 4472..4645

<220>
<221> exon
<222> 5356..5484

30

<220>
<221> exon
<222> 6898..7066

<220>

<221> exon

<222> 7405..8300

<220>

<221> microsatellite (CAAA)n

<222> 1079..1156

<220>

<221> microsatellite (CAAA)n

<222> 3088..3138

10

<220>

<221> microsatellite AT rich

<222> 1565..1599

<220>

<221> microsatellite (GT)n

<222> 3779..3823

<220>

<221> microsatellite (GT)n

<222> 4914..4982

20

<220>

<221> microsatellite (TGG)n

<222> 3874..3901

<220>

<221> microsatellite (GCCTCT)n

<222> 4017..4272

30

<400> 3

tttttttttt ttccctcta ccccttcctc cccaatccg ttttcattgg ctcccatggt 60

gagtttattt ctctttgccg ggagattcta acctactttg gaccggctct ggggcoggg 120

ggggggggga tgctcccaga acttttaggg atccagcacc aactctcttc tgcccaccgc 180

tgggagtccc tggttcacac cagctgctca cagtggatgt ggcacgtctg cttcgggtctt 240
 gcccacctcc agctgtgagg gctccctaca tctgctgogg ctgcactcca cctccctgca 300
 gctgcggggc tcagaccgc gcgatggggc tgctgogaca gggacaggtg cgcagcgtgc 360
 ccacaacttt cctgaagcc tcactcccca ggttttcttc tgcqaatgca cattgaggct 420
 agagaaagat gatgogagg ttatgtgaca tgtcccttag actccaattc gttggggaga 480
 tgaagactct cctaaagat tagtccggtt cccaaaccg tcatcatttt ggaaaagtct 540
 cttggaaggg gacgcagagg ctgactctgc gctatattcc tccccacc cccacccat 600
 gttgtttcct ttgatccac acctccccta cacccacaag aatcccaacc ttccctggc 660
 ttccctcagt acgactaggg ttgaaaggct ggtatgtgtg tgtggcactc ggattaaatc 720
 acttaagttt aactggggtt tccgagacct ctgagaaagg gacctgttac cctaaacc 780
 cacctctatg ccaaattatt aagggtggc tctcaatct ttaacagaaa ggccaggatc 840
 cagcgccctt caatggacc tcaggcactc gtgaaggcct tccccagcg gaagaaaagt 900
 catgcagatc tatcttcaaa agcacttgca aagattcca aaagggagggt gggagaagct 960
 agaggtgagc cgttccacc tcacacactg gaacgttcag cttcttgtt ttcagctaga 1020
 gtcagattaa cagaagtgac ctaacctgtg gccaaagatca ggttggcctc aaactcgaaa 1080
 agcaaaacaa aacaacaaaa aaggaagttt gctgaaaaaa acaaaacaaa acaaaagcaa 1140
 aaacaaaaac aaaaaacccc tggggggtat cgctagcaag caagccttta gcctttaatc 1200
 ccagcacttg ggaagcagag gcaggcagat ttctgagttc gaggccagcc tggctetacag 1260
 agtgagttcc agaacagcca gggctacaca gagaaacct gtcttgaaac taaccacccc 1320
 cccccaaaa aaggaagttt gttgtacgtt tgcggtagaa ttctttgaag gtattttgtt 1380

10

20

30

ctctggatgg caggaaaagg aaggagggtg gcttcgaaca gttcattata gctctgacct 1440
acaactgtaa tcccagctct tagaggtaa ggcaggagaa tcagaaactc aaggttatcc 1500
tctgctacat agtcagtttg aggccagcct gggctacatg agaccctatc tcaaataata 1560
gtgcaataaa attaataata ataataatag ctatggatg accacttgaa tctcctctcc 1620
acaggatggc tgagctcct gagagcccac attatgcccg ctggcattgg acgtgcccgg 1680
gctgaactct ttgagaagca gattatccac catggcgccc aggtgtgctc tgcccaggcc 1740
ccaggagtca ctacattgt ggtggatgaa gacatggact atgagcgggc tctccggctc 1800
ctcaggttc cccagctacc ccctggtgcc cagctggtga agtccacctg gctgagcttg 1860
tgctgcagg agggaaggct gacagacacg gaaggattca gccttccat gcccaagagg 1920
ttggcagctc ttagccttc tcagggttt gttgatgatg ttgagttc catcttgagt 1980
tattgaaaa aaaaacactc gtactttta aattggacat attggaaac caagtttct 2040
gtatagagaa agattgggtt ggggtgggg gacagagaca gtaagaatt tgatacccta 2100
actctctgtg acctcccctg cctctaggt cttggatga accacagccc agcaagtcag 2160
gccaagatgc ttctctcct ggcaccacg gggatttacc caggaccacc cttctcttt 2220
cccctctca caccagagct gtatctctc cccaacggc aaaaagcca tcaagaacc 2280
aagcccaggt gaggagctc ccagcccagg gtgctgatca cagaaatgga aggacctgga 2340
ggttagacag aaaattctag gtctctctca attatgcacc tgtccatctc ttccaacat 2400
ttttcagttc tgcattcaac tagttatgtc tgcccaggc tgggtcttt tcttgagtc 2460
aaagcaggag acgctcccc accagacagc gctctctct tctatttga gctcagctca 2520

10

20

30

gaggatgaaa ccagcgatgg agaaggccc caggttagct cagcagatct gcaagccttg 2580
atcaactgggc actacccac tccccctgag gaagatggtg ggctgaccc agcaccagaa 2640
gctctggata aatgggtctg tgcacagccc tcgagccaga aggcaactaa ctacaatctg 2700
cacatcacag agaagctgga agtgctggct aaagcctaca gtgtccaggg agacaagtgg 2760
agggccctgg gctatgcaaa ggccatcaat gctctcaaga gcttcacaaa gcctgtcagc 2820
tcctaccagg tacgtggggg aagggggttg tttcttcttt actcagtact ggttacagca 2880
gcactagtca ttaactagtg gttactgta gttaccagtg ggtgtccgac ttagtgctta 2940
agagtttata atgagccgag cgtggtggca cacgccttta atcccagcac tctggaggca 3000
gaggcaggcg gatttctgag ttcaaggcca gcttggctca caaagtgagt tccaggacag 3060
ccaggactat acagagaaac cctgtctcaa aaaaacaaaa caaaacaaaa caaaaaaaaa 3120
aaacaaaaac aaaaaaaaaa gtttghtaatg gctgggatct acatacagag acaaaactgat 3180
agaaggggga ggggaggaaa acagaccagc attaggacta gaaaatgggt gcttaggggc 3240
ttattacata cactgtttcc tctacatctg agtgttttat atgataagtt taaagccagg 3300
cgtggtggtt catacgttag actctggggg ccattgatta tggactctag gcaagttagt 3360
tactctgtca gttttccaat cactggaaag gaatgaacaa ctataggcca ttcacagggg 3420
ttttgtaagg ttggaagatg atctcagtag cacagaatga catagagtaa gccctcaggc 3480
agtgtggtgc agggagcctt cagtcaggca gtgtggtgca gtgagtcccc agtcaggcag 3540
tgctgtgacc ccaacaggca gtgtcatgca gtgagcccca cccaggtcag gcagtgtgtg 3600
gactcccccc aaccocgcc ccaggcagtg aggtatagtg agccctcagg tagtgtgatg 3660
cagtgggctc ccagtcaggt agtgctgtga cccctcccc caggcagtggt ggtgcagtga 3720

10

20

30

gcctgcagtc aggcagtggt gtacagggag ccctaggca agcagtgag cgagaccca 3780
cacacacaca cacacacaca catacacaca cacacacaca cacgctgcag gcaatacagt 3840
gggcccgcag ggagtgtgca tgcagagttg tgatgtggtg gtggcagtg tgggtggtgat 3900
gagcactgtc attttctcta cctctttttg tggttatttt gttttatttt ttctttttaga 3960
gacaagagtc tctctccaca gccctgactg ggctggaact cacagatcct ctctctgcct 4020
ctgcctctgc ctctctgccc tctgccttcc tgcctctgccc tctgcctctg cctctgccc 4080
tgcctctgccc tctgcctctg cctctgccc tgcctctgccc tctgcctctg cctctctgccc 4140
tctgcctctg cctctgccc tgcctctgccc tctgcctctg cctctgccc tgcctctctg 4200
cctctctgccc tctctgccc tctgcctctg cctctgccc tgcctctgccc tctgcctctg 4260
cctttctgccc tccaggagtt ctgggalita aggcctgcca ggcattttc tctacttctt 4320
attgctggtc tctgggaacc aaaggacaag ctccataggt ttgctgggct acctttgggg 4380
cagatattct gctgaaggag ccacattccc ctctctggtc tctcccttcc tagcctcttc 4440
ctcactctcc tctgtgccac ttcctcccta ggaggcctgt agcatcccgg gaattggcaa 4500
gcggatggcg gagaagggtca tggagatcct ggagagtggg catctgcgga agctagacca 4560
catcagtgac agtgtgcctg tcttgagct ctctccaac atctggggag ctgggacgaa 4620
gactgcccag atgtggtacc atcaggatcat gccagcccgc ctgcctctta aagtattgct 4680
gttacagagt ctctgccac acccttctct gttcacctgc aggaatctgg gtcctctgt 4740
ttcccaccc tgggccccta tgggagtga atccaactac aaggatgcca gagttcacat 4800
tggccccct cctgtcccca gaacagccat gtagcttagt gtccttgacc tgtggacaga 4860

10

20

30

aacaataaat acattactct gtcccacaca ccagcagga tttgctgtg ttatgtttgt 4920
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgttt gtgtgtgtgt gtgtgtgttt 4980
gttttaaaaa ctatatgtca ccatgtagcc ctggctaacc tagaacttac tatgtagacc 5040
aggctgatct gcctggcttc agcaaggac tttctcagga gcccaggctt tgggctccat 5100
gtctogaaca gtggctctca aacttgcca tgccaagaat gatcttggga gttagtgagc 5160
gtgaagccct gaccatttt agaccagga atgagggacc agcatgcca gatcacgtcc 5220
cactgaatag aggctggact tgattggtcc tgccttctgt ctccatggc agctgctgtg 5280
acagccccc atgacttctg gcctgtttat tagtctggg tcctcatagc ctcttttctg 5340
gttgccttct tccagggtt ccgaaaccta gaagatctcc aaagcctggg ctccctgacc 5400
gtcagcagg ccattggctt gaagcactac gatgacttcc tggaccgat gcccaggag 5460
gaggctgctg aaattgagca gacggtaggc acagctcgag ccaacagctc ctgaagccct 5520
agctgggcaa cccacaggc agcggagtt aagaggtcga cagagattgt gtctaccaga 5580
gctgtaggtc caggaacccc aggtgggtg ggcactgcag tggcagccct ctggtctcag 5640
ggtcactaag catgaactct gggcactagt cgcttagcat ggggcaagca cagcctcaag 5700
gcctgagtac aatcaaggcc tgagtatgtc gttcagaggt agcgtcctg agcatgccta 5760
agaccctgcc catcctcagc atcacagaaa ggggaaaaa aaaaacaaac aaaaaacatc 5820
tagttggcca agaaatcagg tttagccaag ttaaaggttc agcttagagc taggggctga 5880
gtctgtaagt tcatgtgcag ggttgagtca agagagacgg ggtataccag atgtctgcta 5940
ttgtatagt ggcattggga gcaggctggt acatgggcag ggtcttgggt gagtgcaga 6000
tgaaccagtc tgtagcaga aggatcggag agacctagtg aggaagaata agcctccacc 6060

10

20

30

agcggccaca gatggaacta tgggacgggt gctggatgga tagacccatc acagagctgc 6120
ggtgctaattg cggaccocctg cactcagcta cgggtgtccgg gcacagagaa tgcocctggtc 6180
agccggccagc tcctagccca tcagaagaga ccggcttccc cactgcaggc tgcctgcaag 6240
cagggctcca gctgtaggga ttccgggtggg attgctcaac cagacggcct ctlocattc 6300
tcctgggagg tccaagaagg gattgaaggg accagcagaa ctatgtcagg gcaattgggg 6360
tgtcctggct gtgagcacc caggccocctg aaactgcagt gtccctgcaga gggggcgggc 6420
taggtctctc aggtccttct ttaacaggcc ggcctcacc ctccaagaac ggtgtgggca 6480
gtcctggcc tccccttccc acagggtcag tggatattcg tgcctcattt tctcccagcc 6540
gggttgagg ctgtctgcca gccacctgct caggcctcga ccctgagctt ccacacagcc 6600
atcagctaca ggctgcttga gctgcatggg cgtggccttt gtgattggca ggcctttcac 6660
aggcctggcc actggatgtg agtcgggggc cagaaccac ggagtgtcac toggctcttg 6720
cacaggagcc ttctgctgag gcagagccaa tgcctcagg cctctaacag gcttgccctt 6780
ccagtgcccc ggcacgtccc ctacagcttaa tatgaalccc gggggaaggc tggggcgaag 6840
gctgggtgct gtccctgggag aggcctcaga ctctcacccc tccctgttct tcccaggtc 6900
cggatatacag ccaggcctt caaccctggg ctgctgtgtg tggcttgtgg ctcttaccga 6960
cgggggaaga tgacgtgagg ggatgtggat gtactcatta ctacccccga tggccgatcc 7020
caccggggca tcttcagctg cctccttgat agccttcggc agcaaggat ccattttgac 7080
tttgggtgag caggctacca gtgggcagcc acctcctagc agtcacttcc aagttctcga 7140
tttgagacag actgggtggg aaaggctct gcaagaatcc tacctctcct ggggccaaag 7200

10

20

30

acaataaaac aggggcagat ctcacctgat gacactgccc gctttccaca gatgaggaat 7260
 tgggccccaga ggggcgaggc cactcaactc aacacacaaa taggcacagg gtatgctggg 7320
 aataaagatc cttaggcaac ctgagaaggt gagactatca ggctggctc cctgccctac 7380
 cagacatccc ttgtgttga ccagggttcc tcacagatga cttgggtgagc caggaggaga 7440
 acggccaaca gcagaaatac ctgggtgtgt gcgggtccc agggcccggg aagcgcacc 7500
 ggcgactgga catcatcgtg gtaccctact gtgagtttgc ctgtgccctg ctctacttca 7560
 ccggctctgc ccacttcaac cgggtccatga gagctctggc caagaccaag ggcatgagcc 7620
 tglcggagca tgcgctcagt gcagctgtag tcoggaacag ccaagggtgc aaggtggggc 7680
 ctggacaagt gctgccacc cccacggaga aggacgtctt caagcactta ggctgccct 7740
 accgggagcc agctgaacgg gactggtgac ctaggacttg gagcaagggg aaccatgttg 7800
 aatgaactga ctcatgtagc catctcccac cctcttagct gtgcctcgtt ttgtcggtta 7860
 cgcttgccct gagtgaccaa gctaggagct ttgggcctgc ggggaagagc cagctcgatt 7920
 ctgagagccc gcaagctctc tctcctggac aggatttatg ctgctgtccc ctctcctccc 7980
 agtgacaggt ttccacacgg ccccttccct gttcaagcag aacaggtggc tggtttcaag 8040
 gcggtttctt gcactgaagg cccgagcttc cctttccacc ccaagactga tgtagctgtg 8100
 tggggtcagc aggggctgca ggagaggaa gcagctgtgg gctcagcgtc ttccgtgagc 8160
 cttcacagta gagaaagcca tglggattct ctcaccgct cacttctgt gcagctggag 8220
 ctgctggggg tggcctgtcc agaccatgag ggtggcttct aagggcctg gggcctaata 8280
 aagtgttct gacattcaaa 8300

10

20

30

<210> 4
<211> 2678
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (372)..(2099)

<400> 4

ctgctggttaa gtggtctatt cctgccacc cccgggtgac tagcttggcc agtagtcgac 60

10

cccaccggg gaccgactct gggggttgga gagactcttg gggccggggt cgggcactcc 120

agctttcttc tagccccgag ctgggattcc ctggcctgcg ccagctgcgt acacggcgag 180

tacaccgcac ctgccccgga cttcaccgc agctgcgaga ctctccatt cccggagggc 240

tccccacacc tgctgaggcc gtgcccatc tccccgcagc tgcggcgctg agcaccceca 300

tgctgagagg ctgagaccag gacagcagcc ctgaccaacg ctccaatagg ccgggatcca 360

20

gccatacttc a atg gat ccc agg ggt atc ttg aag gca ttt ccc aag cgg 410

Met Asp Pro Arg Gly Ile Leu Lys Ala Phe Pro Lys Arg

1 5 10

cag aaa att cat gct gat gca tca tca aaa gta ctt gca aag att cct 458

Gln Lys Ile His Ala Asp Ala Ser Ser Lys Val Leu Ala Lys Ile Pro

15 20 25

agg agg gaa gag gga gaa gaa gca gaa gag tgg ctg agc tcc ctt cgg 506

30

Arg Arg Glu Glu Gly Glu Glu Ala Glu Glu Trp Leu Ser Ser Leu Arg

30 35 40 45

gcc cat gtt gtg cgc act ggc att gga cga gcc cgg gca gaa ctc ttt 554

Ala His Val Val Arg Thr Gly Ile Gly Arg Ala Arg Ala Glu Leu Phe

50 55 60

gag aag cag att gtt cag cat ggc ggc cag cta tgc cct gcc cag ggc 602

tcc ctt gag gga gat tgt gag cct agc cca gcc cct gct gtc ctg gat 1082
 Ser Leu Glu Gly Asp Cys Glu Pro Ser Pro Ala Pro Ala Val Leu Asp
 225 230 235

aag tgg gtc tgt gca cag ccc tca agc cag aag gcg acc aat cac aac 1130
 Lys Trp Val Cys Ala Gln Pro Ser Ser Gln Lys Ala Thr Asn His Asn
 240 245 250

ctc cat atc aca gag aag ctg gaa gtt ctg gcc aaa gcc tac agt gtt 1178
 Leu His Ile Thr Glu Lys Leu Glu Val Leu Ala Lys Ala Tyr Ser Val
 255 260 265

cag gga gac aag tgg agg gcc ctg ggc tat gcc aag gcc atc aat gcc 1226
 Gln Gly Asp Lys Trp Arg Ala Leu Gly Tyr Ala Lys Ala Ile Asn Ala
 270 275 280 285

ctc aag agc ttc cat aag cct gtc acc tcg tac cag gag gcc tgc agt 1274
 Leu Lys Ser Phe His Lys Pro Val Thr Ser Tyr Gln Glu Ala Cys Ser
 290 295 300

atc cct ggg att ggg aag cgg atg gct gag aaa atc ata gag atc ctg 1322
 Ile Pro Gly Ile Gly Lys Arg Met Ala Glu Lys Ile Ile Glu Ile Leu
 305 310 315

gag agc ggg cat ttg cgg aag ctg gac cat atc agt gag agc gtg cct 1370
 Glu Ser Gly His Leu Arg Lys Leu Asp His Ile Ser Glu Ser Val Pro
 320 325 330

gtc ttg gag ctc ttc tcc aac atc tgg gga gct ggg acc aag act gcc 1418
 Val Leu Glu Leu Phe Ser Asn Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Thr Ala
 335 340 345

cag atg tgg tac caa cag ggc ttc cga agt ctg gaa gac atc cgc agc 1466
 Gln Met Trp Tyr Gln Gln Gly Phe Arg Ser Leu Glu Asp Ile Arg Ser
 350 355 360 365

cag gcc tcc ctg aca acc cag cag gcc atc ggc ctg aag cat tac agt 1514
 Gln Ala Ser Leu Thr Thr Gln Gln Ala Ile Gly Leu Lys His Tyr Ser
 370 375 380

10

20

30

gac ttc ctg gaa cgt atg ccc agg gag gag gct aca gag att gag cag 1562
 Asp Phe Leu Glu Arg Met Pro Arg Glu Glu Ala Thr Glu Ile Glu Gln
 385 390 395

aca gtc cag aaa gca gcc cag gcc ttt aac tct ggg ctg ctg tgt gtg 1610
 Thr Val Gln Lys Ala Ala Gln Ala Phe Asn Ser Gly Leu Leu Cys Val
 400 405 410

gca tgt ggt tca tac cga cgg gga aag gcg acc tgt ggt gat gtc gac 1658
 Ala Cys Gly Ser Tyr Arg Arg Gly Lys Ala Thr Cys Gly Asp Val Asp
 415 420 425

gtg ctc atc act cac cca gat ggc cgg tcc cac cgg ggt atc ttc agc 1706
 Val Leu Ile Thr His Pro Asp Gly Arg Ser His Arg Gly Ile Phe Ser
 430 435 440 445

cgc ctc ctt gac agt ctt cgg cag gaa ggg ttc ctc aca gat gac ttg 1754
 Arg Leu Leu Asp Ser Leu Arg Gln Glu Gly Phe Leu Thr Asp Asp Leu
 450 455 460

gtg agc caa gag gag aat ggt cag caa cag aag tac ttg ggg gtg tgc 1802
 Val Ser Gln Glu Glu Asn Gly Gln Gln Gln Lys Tyr Leu Gly Val Cys
 465 470 475

cgg ctc cca ggg cca ggg cgg cgg cac cgg cgc ctg gac atc atc gtg 1850
 Arg Leu Pro Gly Pro Gly Arg Arg His Arg Arg Leu Asp Ile Ile Val
 480 485 490

gtg ccc tat agc gag ttt gcc tgt gcc ctg ctc tac ttc acc ggc tct 1898
 Val Pro Tyr Ser Glu Phe Ala Cys Ala Leu Leu Tyr Phe Thr Gly Ser
 495 500 505

gca cac ttc aac cgc tcc atg cga gcc ctg gcc aaa acc aag ggc atg 1946
 Ala His Phe Asn Arg Ser Met Arg Ala Leu Ala Lys Thr Lys Gly Met
 510 515 520 525

10

20

30

agt ctg tca gaa cat gcc ctc agc act gct gtg gtc cgg aac acc cat 1994
 Ser Leu Ser Glu His Ala Leu Ser Thr Ala Val Val Arg Asn Thr His
 530 535 540

ggc tgc aag gtg ggg cct ggc cga gtg ctg ccc act ccc act gag aag 2042
 Gly Cys Lys Val Gly Pro Gly Arg Val Leu Pro Thr Pro Thr Glu Lys
 545 550 555

gat gtc ttc agg ctc tta ggc ctc ccc tac cga gaa cct gct gag cgg 2090
 Asp Val Phe Arg Leu Leu Gly Leu Pro Tyr Arg Glu Pro Ala Glu Arg
 560 565 570

10

gac tgg tga cccatggctg ggggtgctga ggagagccga gttggactgg 2139
 Asp Trp
 575

ctaccctcc tggccacca gtactccctc cagcctcagc tggctgaacc tgcctgctcc 2199

aaccaccagc ttctcagcg agcagggccc agggctctgg gcctgaagca agagccagcc 2259

cgctccag tgtctgccc gctcccagtg tctgccagc cctctccag acaggagcag 2319

20

gctgccacc cttctacctc accactgcc ctogaagaat tttgcaaatg gcccttgcc 2379

ccattttaag caggagcagg tggctggttt gaagccccag gtatccccct tcctgctat 2439

gggaaaggcc aagctgctgg gtggggacag aagctgcagg ggagagggaa gcagccgtgc 2499

tgtcaacatc atccggcacc ctctggggta ggagaacagc cattccacat gtgttccctc 2559

tatccgtcct gcttctctggg cagctggtgg tgctgggaat ggggtgcccc agccttggtg 2619

30

aggacagtgt tgggagggcc aggggcccag taaagtgcac ttgacattga aaaaaaaaa 2678

<210> 5

<211> 575

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

His Ala Asp Ala Ser Ser Lys Val Leu Ala Lys Ile Pro Arg Arg Glu
 20 25 30

Glu Gly Glu Glu Ala Glu Glu Trp Leu Ser Ser Leu Arg Ala His Val
 35 40 45

Val Arg Thr Gly Ile Gly Arg Ala Arg Ala Glu Leu Phe Glu Lys Gln
 50 55 60

10

Ile Val Gln His Gly Gly Gln Leu Cys Pro Ala Gln Gly Pro Gly Val
 65 70 75 80

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

Leu Leu Arg Leu Pro Gln Leu Pro Pro Gly Ala Gln Leu Val Lys Ser
 100 105 110

20

Ala Trp Leu Ser Leu Cys Leu Gln Glu Arg Arg Leu Val Asp Val Ala
 115 120 125

Gly Phe Ser Ile Phe Ile Pro Ser Arg Tyr Leu Asp His Pro Gln Pro
 130 135 140

Ser Lys Ala Glu Gln Asp Ala Ser Ile Pro Pro Gly Thr His Glu Ala
 145 150 155 160

30

Leu Leu Gln Thr Ala Leu Ser Pro Pro Pro Pro Thr Arg Pro Val
 165 170 175

Ser Pro Pro Gln Lys Ala Lys Glu Ala Pro Asn Thr Gln Ala Gln Pro
 180 185 190

Ile Ser Asp Asp Glu Ala Ser Asp Gly Glu Glu Thr Gln Val Ser Ala
 195 200 205

Ala Asp Leu Glu Ala Leu Ile Ser Gly His Tyr Pro Thr Ser Leu Glu
 210 215 220

Gly Asp Cys Glu Pro Ser Pro Ala Pro Ala Val Leu Asp Lys Trp Val
 225 230 235 240

Cys Ala Gln Pro Ser Ser Gln Lys Ala Thr Asn His Asn Leu His Ile
 245 250 255

Thr Glu Lys Leu Glu Val Leu Ala Lys Ala Tyr Ser Val Gln Gly Asp
 260 265 270

Lys Trp Arg Ala Leu Gly Tyr Ala Lys Ala Ile Asn Ala Leu Lys Ser
 275 280 285

Phe His Lys Pro Val Thr Ser Tyr Gln Glu Ala Cys Ser Ile Pro Gly
 290 295 300

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

His Leu Arg Lys Leu Asp His Ile Ser Glu Ser Val Pro Val Leu Glu
 325 330 335

Leu Phe Ser Asn Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Thr Ala Gln Met Trp
 340 345 350

Tyr Gln Gln Gly Phe Arg Ser Leu Glu Asp Ile Arg Ser Gln Ala Ser
 355 360 365

Leu Thr Thr Gln Gln Ala Ile Gly Leu Lys His Tyr Ser Asp Phe Leu
 370 375 380

Glu Arg Met Pro Arg Glu Glu Ala Thr Glu Ile Glu Gln Thr Val Gln
 385 390 395 400

10

20

30

Lys Ala Ala Gln Ala Phe Asn Ser Gly Leu Leu Cys Val Ala Cys Gly
 405 410 415

Ser Tyr Arg Arg Gly Lys Ala Thr Cys Gly Asp Val Asp Val Leu Ile
 420 425 430

Thr His Pro Asp Gly Arg Ser His Arg Gly Ile Phe Ser Arg Leu Leu
 435 440 445

Asp Ser Leu Arg Gln Glu Gly Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Ser Gln
 450 455 460

10

Glu Glu Asn Gly Gln Gln Gln Lys Tyr Leu Gly Val Cys Arg Leu Pro
 465 470 475 480

Gly Pro Gly Arg Arg His Arg Arg Leu Asp Ile Ile Val Val Pro Tyr
 485 490 495

Ser Glu Phe Ala Cys Ala Leu Leu Tyr Phe Thr Gly Ser Ala His Phe
 500 505 510

20

Asn Arg Ser Met Arg Ala Leu Ala Lys Thr Lys Gly Met Ser Leu Ser
 515 520 525

Glu His Ala Leu Ser Thr Ala Val Val Arg Asn Thr His Gly Cys Lys
 530 535 540

Val Gly Pro Gly Arg Val Leu Pro Thr Pro Thr Glu Lys Asp Val Phe
 545 550 555 560

Arg Leu Leu Gly Leu Pro Tyr Arg Glu Pro Ala Glu Arg Asp Trp
 565 570 575

30

<210> 6

<211> 720

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

caggggtatc ttgaagcat ttccaagcg gcagaaaatt catgctgatg catcatcaa 60
 agtacttgca aagattccta ggagggaaga gggagaagaa gcagaagagt ggctgagctc 120
 ccttcgggcc catgttgtgc gcactggcat tggacgagcc cgggcagaac tctttgagaa 180
 gcagattggt cagcatggcg gccagctatg cctgcccag ggcccagggtg tcaactcaat 240
 tgtggtggat gaaggcatgg actatgagcg agccctccgc cttctcagac taccacagct 300
 gccccgggt gctcagctgg tgaagtcagc ctggctgagc ttgtgccttc aggagaggag 360
 gctggtggat gtatctggat tcagcatctt catccccagt aggtacttgg accatccaca 420
 gccagcaag gcagagcagg atgcttctat tctctctggc acccatgagg ccttcttca 480
 gacagcctt tctctctc cctctcccac caggcctgtg tctctctccc aaaaggcaaa 540
 agaggcacca aacacccaag cccagcccat ctctgatgat gaagccagtg atggggaaga 600
 aaccagagg gcttcagta tccctgggat tgggaagcgg atggctgaga aaatcataga 660
 gatcctggag agcgggcatt tggggaagct ggaccatata agtgagagcg tgccctgttt 720

10

20

<210> 7

<211> 239

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 7

Arg Gly Ile Leu Lys Ala Phe Pro Lys Arg Gln Lys Ile His Ala Asp
 1 5 10 15
 Ala Ser Ser Lys Val Leu Ala Lys Ile Pro Arg Arg Glu Glu Gly Glu
 20 25 30

Glu Ala Glu Glu Trp Leu Ser Ser Leu Arg Ala His Val Val Arg Thr
 35 40 45

Gly Ile Gly Arg Ala Arg Ala Glu Leu Phe Glu Lys Gln Ile Val Gln
 50 55 60

His Gly Gly Gln Leu Cys Pro Ala Gln Gly Pro Gly Val Thr His Ile
 65 70 75 80

Val Val Asp Glu Gly Met Asp Tyr Glu Arg Ala Leu Arg Leu Leu Arg
 85 90 95

Leu Pro Gln Leu Pro Pro Gly Ala Gln Leu Val Lys Ser Ala Trp Leu
 100 105 110

Ser Leu Cys Leu Gln Glu Arg Arg Leu Val Asp Val Ala Gly Phe Ser
 115 120 125

Ile Phe Ile Pro Ser Arg Tyr Leu Asp His Pro Gln Pro Ser Lys Ala
 130 135 140

Glu Gln Asp Ala Ser Ile Pro Pro Gly Thr His Glu Ala Leu Leu Gln
 145 150 155 160

Thr Ala Leu Ser Pro Pro Pro Pro Thr Arg Pro Val Ser Pro Pro
 165 170 175

Gln Lys Ala Lys Glu Ala Pro Asn Thr Gln Ala Gln Pro Ile Ser Asp
 180 185 190

Asp Glu Ala Ser Asp Gly Glu Glu Thr Gln Glu Ala Cys Ser Ile Pro
 195 200 205

Gly Ile Gly Lys Arg Met Ala Glu Lys Ile Ile Glu Ile Leu Glu Ser
 210 215 220

Gly His Leu Arg Lys Leu Asp His Ile Ser Glu Ser Val Pro Val
 225 230 235

10

20

30

<210> 8
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 tccataagcc tgtcacctcg taccagggct tccgaggtct ggaagacatc cgcagccagg 60
 cctccctgac aaccagcag gccatcggcc tgaagcatta cagtgacttc ctggaacgta 120
 tgcccaggga ggaggtaca gagattgagc agacagtcca gaaagcagcc caggccttta 180
 actccgggct gctgtgtgtg gcatgtggtt cataccgacg gggaaaggcg acctgtggtg 240
 atgtcgacgt gctcatcact caccagatg gccgggccca cgggggtatc ttcagccgcc 300
 tccttgacag tcttcggcag gaagggttcc tcacagatga ctggtgagc caagaggaga 360
 atggtcagca acagaagtac ttgggggtgt gccggctccc agggccaggg cggcggcacc 420
 ggcgcctgga catcatcgtg gtgccctata gcgagtttgc ctgtgccctg ctctacttca 480
 ccggctctgc acaattcaac cgctccatgc gagccctggc caaaaccaag ggcatgagtc 540
 tgcagaaca tgcctcagc actgctgtgg tccggaacac ccatggctgc aaggtggggc 600
 ctggccgagt gotgcccact cccactgaga aggatgtctt caggctctta ggccctcc 657

10

20

<210> 9
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 His Lys Pro Val Thr Ser Tyr Gln Gly Phe Arg Ser Leu Glu Asp Ile
 1 5 10 15

30

Arg Ser Gln Asn Ser Gly Leu Leu Cys Val Ala Cys Gly Ser Tyr Arg
 20 25 30

Arg Gly Lys Ala Thr Cys Glu Asn Gly Gln Gln Gln Lys Tyr Leu Gly
 35 40 45

Val Cys Arg Leu Pro Gly Pro Gly Arg Lys Met Ser Leu Ser Glu His
 50 55 60

Ala Leu Ser Thr Ala Val Val Arg Asn Thr His Gly Cys
 65 70 75

10

<210> 10
 <211> 528
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 tccataagcc tgtcacctcg taccaggctc agaaagcagc ccaggccttt aactctgggc 60
 tgctgtgtgt ggcattgtgt tcataccgac ggggaaagcc gacctgtggt gatgtcgacg 120
 tgctcatcac tcaccagat ggccggtccc accgggttat cttcagccgc ctcttgaca 180
 gtcttcggca ggaagggttc ctacagatg acttggtgag ccaagaggag aatggtcagc 240
 aacagaagta cttgggggtg tgccggctcc cagggccagg gggcggcac cggcgcctgg 300
 acatcatcgt ggtgcctat agcgagttg cctgtgcctt getctacttc accggtctg 360
 cacacttcaa ccgctccatg cgagccctgg ccaaaaccaa gggcatgagt ctgtcagaac 420
 atgccctcag cactgctgtg gtcggaaca cccatggctg caaggtgggg cctggccgag 480
 tgctgcccac tcccactgag aaggatgtct tcaggctctt aggcctcc 528

20

30

<210> 11

<211> 175

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

His Lys Pro Val Thr Ser Tyr Gln Val Gln Lys Ala Ala Gln Ala Phe

1 5 10 15

Asn Ser Gly Leu Leu Cys Val Ala Cys Gly Ser Tyr Arg Arg Gly Lys

20 25 30

10

Ala Thr Cys Gly Asp Val Asp Val Leu Ile Thr His Pro Asp Gly Arg

35 40 45

Ser His Arg Gly Ile Phe Ser Arg Leu Leu Asp Ser Leu Arg Gln Glu

50 55 60

Gly Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Ser Gln Glu Glu Asn Gly Gln Gln

65 70 75 80

20

Gln Lys Tyr Leu Gly Val Cys Arg Leu Pro Gly Pro Gly Arg Arg His

85 90 95

Arg Arg Leu Asp Ile Ile Val Val Pro Tyr Ser Glu Phe Ala Cys Ala

100 105 110

Leu Leu Tyr Phe Thr Gly Ser Ala His Phe Asn Arg Ser Met Arg Ala

115 120 125

Leu Ala Lys Thr Lys Gly Met Ser Leu Ser Glu His Ala Leu Ser Thr

130 135 140

30

Ala Val Val Arg Asn Thr His Gly Cys Lys Val Gly Pro Gly Arg Val

145 150 155 160

Leu Pro Thr Pro Thr Glu Lys Asp Val Phe Arg Leu Leu Gly Leu

165 170 175

【 図 1 】

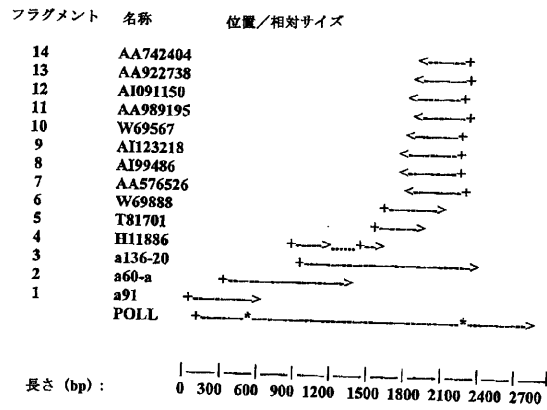
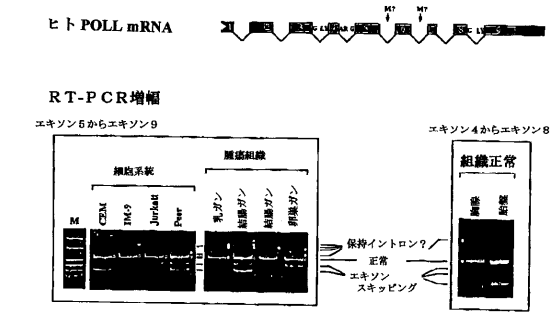


Fig. 1

【 図 2 】



同定されたスプライシング変異体

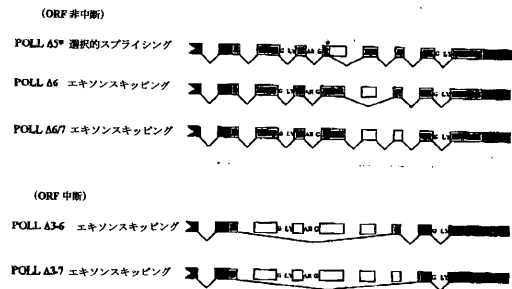


Fig. 2

【 図 3 】

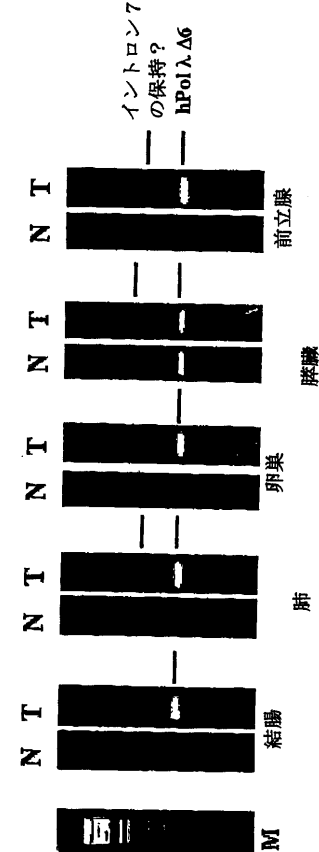


Fig. 3

【 図 4 】

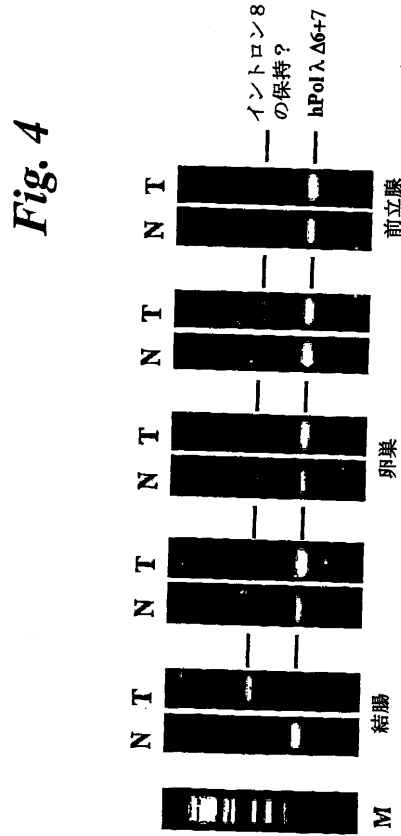
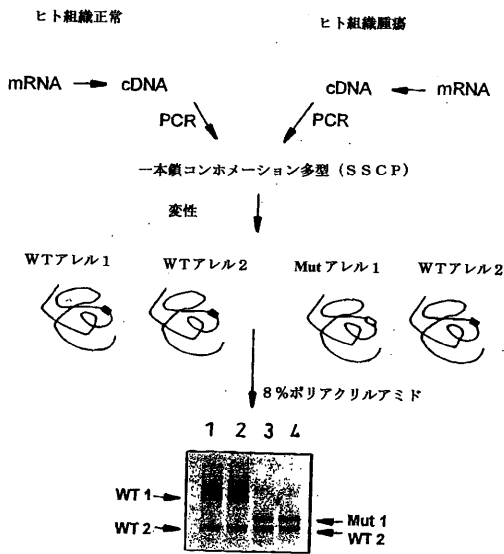


Fig. 4

【 図 5 】

A.



B.

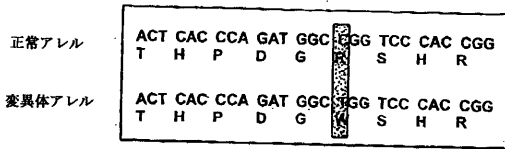


Fig. 5

【 図 6 】

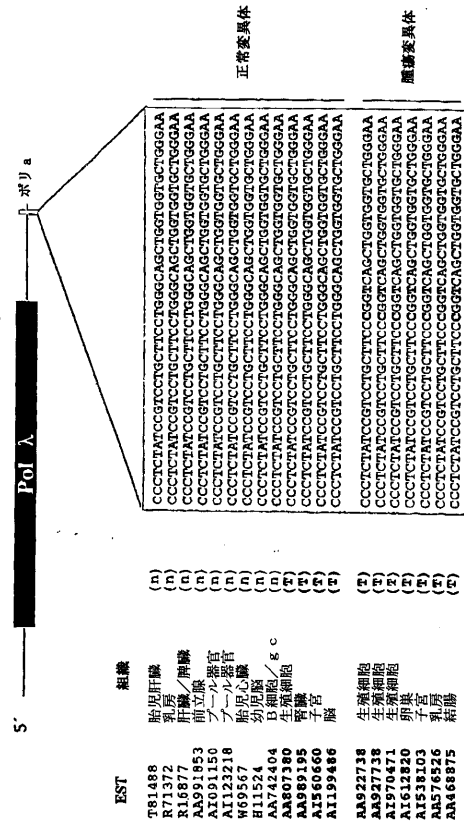


Fig. 6

【 図 7 】

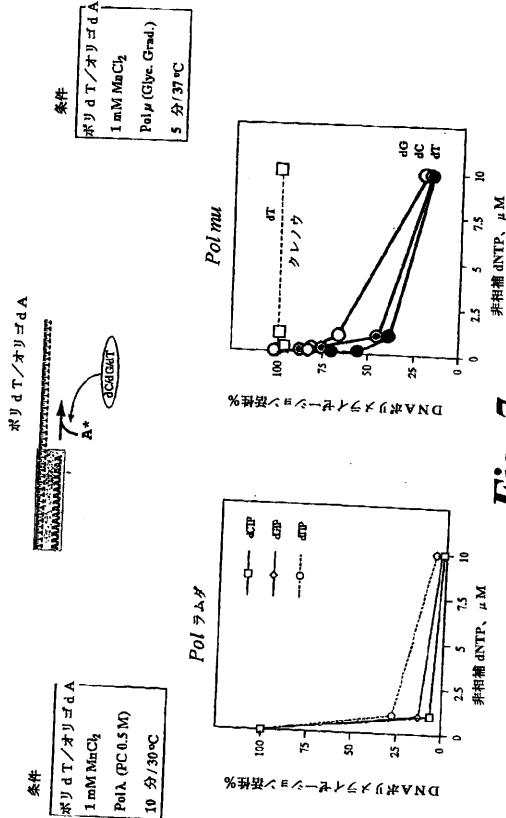


Fig. 7

【 図 8 】

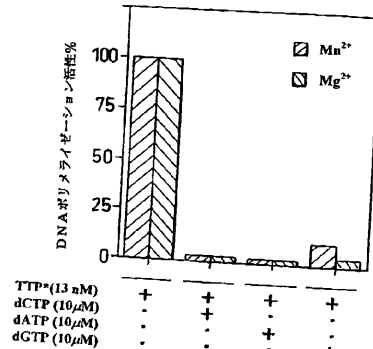


Fig. 8

条件
 ポリ dA 分リ dT
 dTTP (α-³²P) 13 nM
 1mM MnCl₂
 10 mM MgCl₂
 PolA (PC pool)
 5 分 / 30°C

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 0 7 K	16/40	(2006.01)	C 0 7 K	16/40	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
C 1 2 N	9/12	(2006.01)	C 1 2 N	9/12	
C 1 2 N	9/99	(2006.01)	C 1 2 N	9/99	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/48	(2006.01)	C 1 2 Q	1/48	Z
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/566	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
			G 0 1 N	33/566	

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 ダビラ・ルイス・ブランコ

スペイン・E - 2 8 4 1 0 ・マドリード・マンサナーレス・エル・レアル・ヌーメロ・1・スエルテ・デル・パロマル・(番地なし)

(72)発明者 アントーニオ・ベルナード・ミアーナ

スペイン・マドリード・5 4 ・コルメナール・ピエーホ・プラスコミジャン・(番地なし)

(72)発明者 オランダ・ドミンゲス・ロペス

スペイン・6 4 D ・オビエード・アストゥーリアス・ヘローニモ・イブラン・(番地なし)

(72)発明者 ミゲール・ガルーシア・ディアス

スペイン・E - 2 8 0 0 6 ・マドリード・6 0 ・3 D ・ディエーゴ・デ・レオン・(番地なし)

審査官 内藤 伸一

(56)参考文献 特表平4 - 5 0 0 4 5 8 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

C12N 15/09

A61K 38

C12N 1

C12Q 1

G01N 33

C07K 16

CA(STN)

BIOSIS(DIALOG)
BIOTECHABS(STN)
MEDLINE(STN)
EMBASE(STN)
WPIDS(STN)
SwissProt/PIR/GeneSeq

专利名称(译)	DNA聚合酶 λ 及其用途		
公开(公告)号	JP3801917B2	公开(公告)日	2006-07-26
申请号	JP2001528594	申请日	2000-10-02
[标]申请(专利权)人(译)	科学研究高等机关		
申请(专利权)人(译)	Konseho-高级DE库存Sutiga SHIO内斯乳木果榕实体		
当前申请(专利权)人(译)	Konseho-高级DE库存Sutiga SHIO内斯乳木果榕实体		
[标]发明人	ダビラルイスブランコ アントーニオベルナードミアーナ オルランドドミンゲスロベス ミゲールガルシアディアス		
发明人	ダビラ・ルイス・ブランコ アントーニオ・ベルナード・ミアーナ オルランド・ドミンゲス・ロベス ミゲール・ガルシア・ディアス		
IPC分类号	C12N15/09 A61K35/76 C12N5/10 A61K38/43 A61K45/00 A61K48/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 A61K38/00 C12N9/12 C12N9/99 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 A61K39/00 C12N15/54		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K39/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 C12N9/1252		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA A61K35/76 C12N5/00.A A61K37/48 A61K45/00 A61K48/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00.111 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 A61K37/02 C12N9/12 C12N9/99 C12Q1/02 C12Q1/48.Z C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	1999002169 1999-10-01 ES		
其他公开文献	JP2003511033A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及DNA聚合酶的鉴定和分离以及该聚合酶的用途。特别地，本发明描述了DNA聚合酶 λ (Pol λ) 的人基因的核苷酸序列，Pol λ 的氨基酸序列以及衍生自其mRNA的可变剪接的几种同工型的氨基酸序列。这些同工型中的一些与肿瘤样品的关联使Pol λ 成为诊断，预后和发展肿瘤过程的标志。

【 図 4 】
Fig. 4

