

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3425620号
(P3425620)

(45)発行日 平成15年7月14日(2003.7.14)

(24)登録日 平成15年5月9日(2003.5.9)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 K 14/47
C 0 7 K 14/47		C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/15		1/19
1/19		1/21
1/21		C 1 2 P 21/02

請求項の数7(全11頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-76840(P2000-76840)
(22)出願日 平成12年3月17日(2000.3.17)
(65)公開番号 特開2001-258561(P2001-258561A)
(43)公開日 平成13年9月25日(2001.9.25)
審査請求日 平成12年3月17日(2000.3.17)

特許法第30条第1項適用申請有り 特許法第30条第1項適用、平成11年12月8日福岡ドーム、シーホークホテル&リゾート、福岡SRPセンターホール、国立病院九州医療センターにおいて開催された第22回日本分子生物学学会年会において発表

特許法第30条第1項適用申請有り 特許法第30条第1項適用、第22回日本分子生物学学会年会プログラム第390ページに発表

(73)特許権者 391012501
九州大学長
福岡県福岡市東区箱崎6丁目10番1号
(72)発明者 平野 勝也
福岡県福岡市東区箱崎1丁目4番25-901号
(74)代理人 100058479
弁理士 鈴江 武彦 (外5名)

審査官 小暮 道明

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プロテアソーム分解に抵抗性を示す新規p27Kip1分子種の核酸及びアミノ酸配列と同蛋白質の発現ベクター及び発現細胞

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に記載されている塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項2】 配列番号1に記載されている塩基配列の1~519位からなるポリヌクレオチド。

【請求項3】 配列番号1に記載されている塩基配列の22~519位からなるポリヌクレオチド。

【請求項4】 上流に開始コドンが付加された請求項2に記載のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質。

【請求項5】 請求項3に記載のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質。

【請求項6】 請求項2に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

【請求項7】 請求項6に記載の組換えベクターを含む

形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、プロテアソーム分解に抵抗性を示す新規p27Kip1分子種の核酸及びアミノ酸配列と同蛋白質の発現ベクター及び発現細胞に関する。本発明は、がんや動脈硬化薬などの細胞増殖性病変の遺伝子治療を目指した医療工学分野に利用可能である。

【0002】

【従来の技術】p27Kip1は、サイクリン依存性キナーゼ(cyclin dependent kinase)インヒビターとしての作用を有する蛋白質の一つである。p27Kip1が活性を阻害するサイクリン依存性キナーゼとは、その名のとおり活性にサイクリンを必要とするプロテインキナーゼであ

り、真核生物の細胞周期の進行に中心的な役割を果たしている。詳しくは、サイクリン依存性キナーゼの活性が、細胞周期のS期(DNA合成期)の開始およびM期(分裂期)の開始に作用し、細胞周期を制御している。

【0003】p27Kip1は、上記サイクリン依存性キナーゼの活性を抑制することにより、細胞周期(即ち、細胞増殖)を抑制する因子である。従来公知のp27Kip1は一種のみであり、これは細胞周期のG1期(DNA合成準備期)からS期(DNA合成期)へ移行する際にプロテアソームにより分解されるため、上述の細胞周期の抑制作用は失われる。詳しくは、p27Kip1従来種の187番目のトレオニンが、G1期からS期へ移行する際にリン酸化を受け、プロテアソームにより分解される。

【0004】このため、がんや動脈硬化薬などの細胞増殖性病変の治療を目指して病的細胞にp27Kip1遺伝子を導入する際に、p27Kip1従来種ではその発現が、長時間維持されないことが問題であった。また、従来種に人工的に変異を加えることにより、分解抵抗性を高めた蛋白質に改変させることが可能であるが、自然界に存在しない蛋白質であるため安全性についての問題があった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記問題点を解決すべく、プロテアソーム分解に抵抗性を示すp27Kip1分子種を提供すること、並びに当該分子種の発現ベクター及び発現細胞を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、プロテアソーム分解に抵抗性を示す新たな核酸及びアミノ酸配列を有する新しい分子種を見出し、更に、当該蛋白質を、細菌、酵母、および動物細胞に安定に発現させることにより、本発明に至った。

【0007】本発明は、(1)配列番号1に記載されている塩基配列を有するポリヌクレオチド、(2)配列番号1に記載されている塩基配列の1~519位を有するポリヌクレオチド、(3)配列番号1に記載されている塩基配列の22~519位を有するポリヌクレオチド、(4)上流に開始コドン(アタG)を付加された(2)に記載のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、(5)(3)に記載のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、(6)(2)に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、(7)(6)に記載の組換えベクターを含む形質転換体を提供するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。

【0009】[新規p27Kip1分子種の核酸のクローニング]本発明の新規p27Kip1分子種の核酸は、細胞接触により増殖を停止したブタ正常血管内皮細胞cDNAライブラリーからクローニングされた。詳しくは、従来種の

核酸配列を元にプローブを作製し、定法のブランクハイブリダイゼーション法により、新規p27Kip1分子種の核酸を25万個のファージの中からクローニングした。

【0010】クローニングされた新規p27Kip1分子種の塩基配列を決定し、当該塩基配列から予想されるアミノ酸配列を決定した。新規p27Kip1分子種の塩基配列およびアミノ酸配列を、下記配列表の配列番号1に記す。また、従来種の塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号2に記す。

【0011】[従来種との比較]ブタ正常血管内皮細胞cDNAライブラリーから得たp27Kip1従来種(p27Kip1)のアミノ酸配列と、本発明の新規p27Kip1分子種(p27Kip1R)のアミノ酸配列とを比較した。その結果を図1に示し、同一のアミノ酸を縦線で結んで記す。

【0012】新規分子種p27Kip1Rは、アミノ末端の8アミノ酸を欠損しているが、162番目までのアミノ酸配列は従来種と同一である。この同一性により、新規分子種p27Kip1Rは、従来種と同じサイクリン依存性キナーゼの阻害活性を有する。また両分子種は、163番目以降のC末端領域において異なり、新規分子種p27Kip1Rはリン酸化部位(Thr 187)を欠損している。このリン酸化部位(Thr 187)が、プロテアソーム分解に先立ってリン酸化を受けることが、従来種p27Kip1のプロテアソーム分解にとって必須である。よって新規分子種p27Kip1Rは、この部位の欠損により、プロテアソームの分解を受けないと考えられる。

【0013】[組換えベクターおよび形質転換体の作製]上記方法によりクローニングされた新規p27Kip1分子種のDNA配列のうち、アミノ酸をコードするDNA領域を、発現ベクターに組込む。この操作によりp27Kip1R遺伝子の挿入された組換えベクターを作製することができる(図2参照)。本発明で使用される発現ベクターは、挿入された外来遺伝子のコードする蛋白質を目的細胞で発現することが可能であれば特に限定されない。発現ベクターとしては、例えば、細菌に発現させるためにはpQE32ベクター(独国、キアゲン社製)を用いることができ、動物細胞に発現させるためにはpEGFP-N1(米国、クローンテック社製)を使用することができる。発現ベクターへの遺伝子の組込みは、公知の遺伝子工学的手法により行うことができる。

【0014】尚、本発明の配列番号1に記載の新規p27Kip1分子種は、アミノ酸をコードするDNA領域が開始コドン(atg)から始まっておらずgggであるため、開始コドン(アタG)を有するベクターに組み込んだ場合はgggから翻訳され得るが、開始コドン(アタG)を含有しないベクターに組み込んだ場合は、塩基配列22位のメチオニンコドン(atg)から翻訳される。そのため、ベクターに応じて2種類の蛋白質が産生されることとなる。

【0015】例えば、上記pQE32発現ベクターに新規p27Kip1分子種のアミノ酸コード領域を組み込んだ場

合は、ベクターが開始コドン有しているためアミノ酸配列1番目のグリシンから発現可能であるが、上記pEGFP-N1発現ベクターに組み込んだ場合には、ベクターが開始コドン含有していないため、アミノ酸配列8番目のメチオニン(初めてのメチオニン)からの発現となる。このような2種類の発現蛋白質は何れも、新規p27Kip1分子種としての性質(即ち、プロテアソーム分解に対する抵抗性および細胞増殖を抑制する性質)を同様に有している。

【0016】新規p27Kip1分子種のアミノ酸コード領域を、開始コドン有するベクターに組み込む場合、開始コドンは、アミノ酸コード領域の上流に位置する限り特に制限されず、アミノ酸コード領域に隣接して位置していてもよいし、アミノ酸コード領域から離れて位置していてもよい。但し、開始コドンの位置は、当該開始コドンを有して発現した蛋白質が、新規p27Kip1分子種としての性質、即ち、プロテアソーム分解に対する抵抗性および細胞増殖を抑制する性質を備えている範囲に限る。例えば、上記pQE32発現ベクターに前記分子種のアミノ酸コード領域を挿入した場合、開始コドンは、アミノ酸コード領域から13残基アミノ末端側に位置している。

【0017】上述のように作製された組換えベクターを、細菌、酵母、動物細胞などに導入して、p27Kip1R遺伝子を発現する発現細胞(即ち、p27Kip1R蛋白質を産生する形質転換体)を作製することができる。本発明で使用される形質転換の対象となる細胞は、形質転換が可能であれば、細菌、動物、植物の何れでも特に限定されない。組換えベクターの細胞への導入は、電気穿孔法、化学的遺伝子導入法など、公知の遺伝子導入法により行うことができる。

【0018】図2に示すとおり、本発明の組換えベクターを細菌、酵母などに導入することにより、本発明のp27Kip1R蛋白質を大量精製することができる。また、p27Kip1R遺伝子を組み込んだ発現ベクターをがん細胞などの増殖細胞に導入することにより、細胞増殖を抑制することができる。更に、動物個体への上記組換えベクターの遺伝子導入により、がん、動脈硬化の遺伝子治療に利用することも可能である。

【0019】

【実施例】(1)[新規p27Kip1分子種の核酸のクローニングおよび配列決定]

以下、本発明の新規p27Kip1分子種のクローニング方法について詳説する。まず、ブタ大動脈由来培養内皮細胞を以下のとおり調製した。即ち、食肉市場にて屠殺直後のブタから大動脈を採取し、機械的に内膜を剥離し、培養液に培養することにより調製を行った。その詳細は以下の文献に記載されている：Hirano K, Hirano M, Kanai de H: Enhancement by captopril of bradykinin-induced calcium transients in cultured endothelial cells

of the bovine aorta. Eur J Pharmacol 244: 133-137, 1993; Hirano M, Niino N, Hirano K, Nishimura J, Hartshome DJ, Kanaide H: Expression, subcellular localization and cloning of the 130kDa regulatory subunit of myosin phosphatase in porcine aortic endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 254, 490-496, 1999.

【0020】細胞間接触により細胞増殖を停止したブタ大動脈由来培養内皮細胞からメッセンジャーRNAを抽出し、それを鋳型としてcDNAを合成し、ラムダファージHybriZap(米国、ストラタジーン社製)をベクターとしてcDNAライブラリーを作製した。

【0021】一方、ヒトp27Kip1従来種の核酸配列に基づいてプライマー(逆転写反応プライマー：GGC TTC TTG GGC GTC TGC TC、PCR反応上流プライマー：ATG TCA AAC GTG CGA GTG TC、PCR反応下流プライマー：ATT TTC TTC TGT TCT GTT GG)を作製し、逆転写PCR法を用いて、ブタ大動脈培養内皮細胞から抽出したRNAから、ヒトp27Kip1従来種の1から173番目のアミノ酸をコードする核酸配列に相当するDNA断片を得た。ここで使用した各プライマーの配列は、逆転写反応プライマーについては配列番号3、PCR反応上流プライマーについては配列番号4、そしてPCR反応下流プライマーについては配列番号5に記載される。

【0022】得られたDNA断片を³²P-dCTPで標識し、これをプローブとして、先に作製したラムダファージライブラリーを、ブランク・ハイブリダイゼーション法により25万個のファージを探索し、最終的に計13の陽性クローンを得た。このうち6クローンは同一のクローンであった。

【0023】Dideoxynucleotide termination法とPCR法に基づいたサイクルシーケンシング法により核酸配列を決定した。一度の反応で平均約300ないし400対の核酸配列が決定されるので、決定された配列に基づいて次の核酸配列決定反応のためのプライマーを作製し、これを繰り返すことでクローンの全核酸配列を決定した。また、全核酸配列は順・逆両方向で決定した。

【0024】(2)[組換えベクターおよび形質転換体の作製]

細菌に蛋白質として発現させるためには、プラスミドベクターpQE32(独国、キアゲン社製)を用い、動物細胞に緑色蛍光蛋白質との融合蛋白質として発現させるためにはプラスミドベクターpEGFP-N1(米国クローンテック社製)を使用した。

【0025】上述のcDNAライブラリースクリーニングから得られた新規p27Kip1分子種の核酸を含むクローンを鋳型として、PCR法により、蛋白質として発現させるDNA断片を増幅し、それぞれの発現ベクターに組み込んだ。

【0026】pQE32ベクターに組み込む場合、BamH

I部位を組み込んだ上流プライマー（GAA TTC GGA TCC A GG GGA GCC CGA GCC TGG；下線部がBamHI部位）と、Sal I部位を組み込んだ下流プライマー（AGT TAC GTC GAC T GA TTA CCA AAC TGA TGA；下線部がSal I部位）を用いてDNA断片を増幅した。前記上流プライマーおよび下流プライマーの配列は、それぞれ配列番号6および配列番号7に記載される。

【0027】pEGFP-N1ベクターに組み込む場合には、スクリーニングで得られたクローンが組み込まれているベクターに対するプライマー（GTA ATA ATT CAA AACCCAC TGT CAC C）を上流プライマーとして、BamHI部位を組み込んだプライマー（CTG GAG TGG ATC CCA AAC TGA TGA ATA GTT；下線部がBamHI部位）を下流プライマーとして用い、DNA断片を増幅した。前記上流プライマーおよび下流プライマーの配列は、それぞれ配列番号8および配列番号9に記載される。尚、pEGFP-N1ベクターに組み込む場合の上流プライマーは、上述のように「スクリーニングで得られたクローンが組み込まれているベクターに対するプライマー」であり、これはクローンが組み込まれている制限酵素部位より上流に位置している。発現ベクターに組換えのための制限酵素部位には、本来クローンがベクターに組み込まれているEcoRI部位を使用した。

【0028】上記PCR法により増幅されたDNA断片を適当な制限酵素で切断し、T4DNAリガーゼを用いて、同じ制限酵素で切断した上述のベクターと結合させ、組換え発現ベクターを作製した。

【0029】細菌細胞を、公知の方法で化学的にコンピテントな状態（DNAを取り込みやすい状態）とした後、組換え発現ベクターを加え、氷上30分間で取り込ませ、摂氏42度、60から90秒の熱ショックを加えて形質転換細菌細胞を作製した。

【0030】培養動物細胞の場合、血清を含まない培地に、予めリポフェクトアミン（ライフテクノロジー社製）に結合させた発現プラスミドを加え、約5時間処理することで、発現プラスミドで細胞を形質転換させた。これまで形質転換を行った細胞は、ブタ大動脈培養内皮細胞、ラット大動脈中膜平滑筋細胞、ヒト子宮頸ガン由来HeLa細胞、COS7細胞、NIH3T3線維芽細胞である。

【0031】(3) [プロテアソーム分解に抵抗性を示す実験]

A. 方法

細胞周期のG1/S移行期に同調させたブタ大動脈培養内皮細胞あるいはS期に同調させたヒト子宮頸ガン由来HeLa細胞を低張液で抽出し、プロテアソーム粗標品を得た。前記のG1/S移行期に同調した内皮細胞は、細胞間接触により静止期にある内皮細胞をトリプシン処理により培養ディッシュから回収し、植え付け直して20時間後に細胞を採集することにより得た。一方、前記のS期に同調したHeLa細胞は、HeLa細胞をヒドロキシ尿素で

24時間処理後、ヒドロキシ尿素を含まない培養液に換えて3時間30分後に細胞を採集することにより得た。新規p27Kip1分子種および従来種を、(2)に記載した細菌の発現系を用いて発現し、蛋白質標品を精製した。

【0032】緩衝液中で、精製蛋白質標品と上述のプロテアソーム粗標品を混合し、摂氏30度で反応を行い、反応後0時間、30分、1時間、2時間、4時間で反応を停止した。反応産物をポリアクリルアミド電気泳動法により分離し、新規p27Kip1分子種と従来種の双方を認識する特異抗体を用いたウエスタンブロット法により、分解されずに残っている新規p27Kip1分子種及び従来種の蛋白質を検出し、分解の時間経過を解析した。

【0033】B. 結果

内皮細胞抽出液、HeLa細胞抽出液、いずれの場合も、従来種は1時間以内に分解された。これに対し、新規p27Kip1分子種は、HeLa細胞抽出液で4時間反応させた場合以外は、全く分解を受けなかった。HeLa細胞抽出液で4時間反応させた場合でも、分解の程度はごくわずかで、大部分の蛋白質(>80%)が分解されずに残った。

【0034】(4) [細胞増殖の抑制実験]

A. 方法

(2)に記載した方法により、緑色蛍光蛋白質との融合蛋白質として新規p27Kip1分子種を発現させる発現プラスミドと5時間反応させて、形質転換HeLa細胞を作製した。引き続き、血清を含む培地で細胞培養を再開し、その後の細胞増殖を解析した。培養ディッシュに一定数の細胞を植え付け、培養再開から1日目、2日目、3日目、5日目に、トリプシン処理により細胞を回収し、総細胞数を計測した。次いで、フローサイトメーターを用いて、緑色蛍光蛋白質が発する蛍光が陽性の細胞と陰性の細胞の比率を測定した。この比率に基づいて先に計測した総細胞数から、蛍光陽性細胞数と陰性細胞数を推定した。対照実験として、緑色蛍光蛋白質だけを発現させる発現プラスミドで形質転換したHeLa細胞を用いた。

【0035】B. 結果

対照実験において、蛍光陰性細胞数は、1日目から5日目にかけ、約6.5倍となり、蛍光陽性細胞数は約7.0倍となった。このことは、即ち、緑色蛍光蛋白質を発現する細胞は、発現しない細胞とほぼ同等に増殖することを示すものであり、換言すれば、緑色蛍光蛋白質は細胞増殖に影響を与えないことを示唆する。

【0036】一方、新規p27Kip1分子種を緑色蛍光蛋白質との融合蛋白質として発現させる発現ベクターで形質転換した場合、蛍光陰性細胞数は、培養再開後1日目から5日目にかけて約5.6倍となったが、蛍光陽性細胞数は約0.8倍となった。即ちこのことは、新規p27Kip1分子種を発現する細胞の増殖は完全に停止したことを示す。緑色蛍光蛋白質は細胞増殖に影響を与えないので、新規p27Kip1分子種は、ガン細胞において細胞増殖を抑制することが示された。

【0037】

【発明の効果】上述のとおり、本発明の新規 p27^{Kip1}分子種は、従来種と異なりプロテアソーム分解に抵抗性を示すため、細胞内で安定に発現し、細胞の増殖阻止作用を長時間維持することができる。また、本発明の新規 p27^{Kip1}分子種は、本来生物が発現する蛋白質であるの

で、生体に応用しても安全性が高いものである。更に人工産物と異なり生体応用した際に細胞内の調節を受けるという利点を有する。

【0038】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<;110>; The President of Kyushu University

<;120>; Nucleic acid encoding a proteasome-degradation-resistant novel isoform of p27^{Kip1} protein, expression vector of the nucleic acid and cells expressing the protein

<;130>; A000000294

<;160>; 9

<;170>; PatentIn Ver. 2.0

<;210>; 1

<;211>; 1167

<;212>; DNA

<;213>; Sus scrofa

<;220>;

<;221>; CDS

<;222>; (1)..(516)

<;400>; 1

ggg agc ccg agc ctg gag cgg atg gac gcc aga cag gcg gag tac ccc 48

Gly Ser Pro Ser Leu Glu Arg Met Asp Ala Arg Gln Ala Glu Tyr Pro

1 5 10 15

aag ccc tcg gcc tgc cga aac ctc ttc ggc ccg gtc aat cac gaa gag 96

Lys Pro Ser Ala Cys Arg Asn Leu Phe Gly Pro Val Asn His Glu Glu

20 25 30

tta acc cgg gac ttg gag aag cac tgc aga gac atg gaa gag gcc agc 144

Leu Thr Arg Asp Leu Glu Lys His Cys Arg Asp Met Glu Glu Ala Ser

35	40	45	
cag cgc aag tgg aat ttt gat ttt cag aat cac aag ccc ctg gag ggc	192		
Gln Arg Lys Trp Asn Phe Asp Phe Gln Asn His Lys Pro Leu Glu Gly			
50	55	60	
aaa tac gag tgg cag gag gtg gaa aag ggc agc ttg ccc gag ttc tac	240		
Lys Tyr Glu Trp Gln Glu Val Glu Lys Gly Ser Leu Pro Glu Phe Tyr			
65	70	75	80
tac aga ccc ccg cgg cca ccc aaa ggc gcc tgc aag gtg ccg gcg cag	288		
Tyr Arg Pro Pro Arg Pro Pro Lys Gly Ala Cys Lys Val Pro Ala Gln			
85	90	95	
gag ggc cag ggt gtc agc ggg acc cgc cag gcg gtg cct tta att ggg	336		
Glu Gly Gln Gly Val Ser Gly Thr Arg Gln Ala Val Pro Leu Ile Gly			
100	105	110	
tct cag gcc aac tca gag gac aca cat ttg gta gac caa aag act gat	384		
Ser Gln Ala Asn Ser Glu Asp Thr His Leu Val Asp Gln Lys Thr Asp			
115	120	125	
gca ccg gac agc cag acg ggg tta gcg gag cag tgc act ggg ata agg	432		
Ala Pro Asp Ser Gln Thr Gly Leu Ala Glu Gln Cys Thr Gly Ile Arg			
130	135	140	
aag cga cct gcc aca gac gat tcc tct cct ccc tct gtc tcc ctt aaa	480		
Lys Arg Pro Ala Thr Asp Asp Ser Ser Pro Pro Ser Val Ser Leu Lys			
145	150	155	160
att gga atg tac cag tta aac tat tca tca gtt tgg taatcactcc	526		
Ile Gly Met Tyr Gln Leu Asn Tyr Ser Ser Val Trp			
165	170		
aggtaactgg gcaaaaatct ggcatgtatg ggggggagtt tgaatgctca gaattgacca	586		

tctagttttt atcagatttg ttgagaaaat ttttaatttt cttttcactt caggggtgtg 646
 agacacagtc aaaataattc taaatccttg gatattttta aagatctgta agtaactcga 706
 cataaaaaat aatgaaataa tttttaattt aaagactcat tctattttgt tatttgccca 766
 aaggaaagtg gtgtttttta aggaaagtgc gtatagagaa aagcaccocg ggggatgagt 826
 gaaatggata ctacatcttt aaacagtatt ttacattgc ctgtgtatgt gtatgaaca 886
 aaaccatttg aagtgtacct gtgtacataa ctctgtaaag aactgaaaa ttatactaac 946
 ttatttatgt taaaagaga tttttttttt aatctagaca atatacaagc caaagtggca 1006
 tgtttgtgca tttgtaaag ctgtattggg tagagtaggt tttttcccct catctgttaa 1066
 ataatatggc ttaaaggtt gcatactgag ccaagtataa tttttttgt aatgtgtgaa 1126
 aaaaatgcc aattattgta aacatcaagc aatcaataaa g 1167

<;210>; 2

<;211>; 1958

<;212>; DNA

<;213>; Sus scrofa

<;220>;

<;221>; CDS

<;222>; (43)..(636)

<;400>; 2

gcgagagcgc gagagaggcg gtcgccgagc cccgggagga ag atg tca aac gtg 54

Met Ser Asn Val

1

aga gtg tct aac ggg agc ccg agc ctg gag cgg atg gac gcc aga cag 102

Arg Val Ser Asn Gly Ser Pro Ser Leu Glu Arg Met Asp Ala Arg Gln

5

10

15

20

gcg gag tac ccc aag ccc tcg gcc tgc cga aac ctc ttc ggc ccg gtc 150

Ala Glu Tyr Pro Lys Pro Ser Ala Cys Arg Asn Leu Phe Gly Pro Val
25 30 35
aat cac gaa gag tta acc cgg gac ttg gag aag cac tgc aga gac atg 198

Asn His Glu Glu Leu Thr Arg Asp Leu Glu Lys His Cys Arg Asp Met
40 45 50
gaa gag gcc agc cag cgc aag tgg aat ttt gat ttt cag aat cac aag 246

Glu Glu Ala Ser Gln Arg Lys Trp Asn Phe Asp Phe Gln Asn His Lys
55 60 65
ccc ctg gag ggc aaa tac gag tgg cag gag gtg gaa aag ggc agc ttg 294

Pro Leu Glu Gly Lys Tyr Glu Trp Gln Glu Val Glu Lys Gly Ser Leu
70 75 80
ccc gag ttc tac tac aga ccc ccg cgg cca ccc aaa ggc gcc tgc aag 342

Pro Glu Phe Tyr Tyr Arg Pro Pro Arg Pro Pro Lys Gly Ala Cys Lys
85 90 95 100
gtg ccg gcg cag gag ggc cag ggt gtc agc ggg acc cgc cag gcg gtg 390

Val Pro Ala Gln Glu Gly Gln Gly Val Ser Gly Thr Arg Gln Ala Val
105 110 115
cct tta att ggg tct cag gcc aac tca gag gac aca cat ttg gta gac 438

Pro Leu Ile Gly Ser Gln Ala Asn Ser Glu Asp Thr His Leu Val Asp
120 125 130
caa aag act gat gca ccg gac agc cag acg ggg tta gcg gag cag tgc 486

Gln Lys Thr Asp Ala Pro Asp Ser Gln Thr Gly Leu Ala Glu Gln Cys
135 140 145
act ggg ata agg aag cga cct gcc aca gac gat tcc tct cct caa aac 534

Thr Gly Ile Arg Lys Arg Pro Ala Thr Asp Asp Ser Ser Pro Gln Asn
150 155 160
aaa aga gcc aac aga aca gaa gaa aat gtt tca gac ggt tcc ccg aac 582

Lys Arg Ala Asn Arg Thr Glu Glu Asn Val Ser Asp Gly Ser Pro Asn
165 170 175 180
tcg gct tca gtg gag cag acg ccc aag aag ccc ggc ctc aga agg cgt 630

Ser Ala Ser Val Glu Gln Thr Pro Lys Lys Pro Gly Leu Arg Arg Arg
185 190 195
caa acg taaactgctc gtattaagag tatgtttcct tgttgatcag atacatcacc 686
Gln Thr
gcttgatgaa gcaaggaaga taaaaataa aaattttaag tgcatatctg actccatgaa 746
agggacaacc cgtataaagc actgaacagc aacaagtcaa taacactaaa attttaggca 806
cacttaaaat catctgcctc taaaagcatt ggatgtagca ttgtgcaatt aggttttcc 866

ttatttgctt cattgtacta cctgtgtata tagtttttac cttttatgta gcacataaac 926

 ttggggaag ggagggcggg tggggctgag gaattggcac ggggtggggg gttatgaaga 986
 gcttgcttgg atttagagca aggagaaaa tatttgactc acatgaagag aagcagtttg 1046
 ggggaaagat ttttgaatgg ttttctttaa agatgtaatg tccctttcag tgagaaccga 1106

 tacttcattt aaaaaatcca aatttgaaca ctggctgcaa atcattgcta tttattttg 1166

 catgaagctt tttcttattt gggagtctg atgattccgt tatgtggcag caaattttt 1226

 ttttaaaata acaacatcct cagccccct ccctctgtct cccttaaaat tggaatgtac 1286

 cagttaaact attcatcagt ttggtaatca ctccaggtaa ctgggcaaaa atctggcatg 1346
 tatggggggg agtttgaatg ctcagaatg accatctagt tttatcaga tttgttgaga 1406
 aaatttttaa ttttctttc acttcagggt gtgtagacac agtcaaaata attctaaatc 1466

 ctggatatt tftaaagatc tgtaagtaac tcgacataaa aaataatgaa ataattttta 1526
 atttaagac tcattctatt tgtttatttg cccaaaggaa agtgggtgtt ttaaaggaaa 1586
 gtgcttatag agaaaagcac cccgggggat gagtgaatg gatactacat ctttaaacag 1646
 tatttttaca ttgcctgtgt atgtgtatga acaaaaacca tttgaagtgt acctgtgtac 1706

 ataactctgt aaagacactg aaaattatac taacttattt atgttaaaaa gagatttttt 1766
 ttttaacta gacaatatac aagccaaagt ggcatgtttg tgcatttgta aatgctgtat 1826
 tgggtagagt aggtttttc ccctcttctg ttaataata tggcttaaaa ggttgcatat 1886

 tgagccaagt ataatttttt ttgtaatgtg tgaaaaaat gccaatatt gttaaacatc 1946
 aagcaatcaa ta 1958
 <;210>; 3
 <;211>; 20
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;400>; 3
 ggcttcttgg gcgtctgctc 20
 <;210>; 4
 <;211>; 20
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;400>; 4
 atgtcaaacg tgcgagtgct 20
 <;210>; 5
 <;211>; 20
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;400>; 5
 attttcttct gttctgttgg 20
 <;210>; 6
 <;211>; 30
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

```

<;400>; 6
gaattcggat ccaggggagc ccgagcctgg           30
<;210>; 7
<;211>; 30
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;400>; 7
agttacgtcg actgattacc aaactgatga           30
<;210>; 8
<;211>; 25
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;400>; 8
gtaataattc aaaaccactg tcacc                 25
<;210>; 9
<;211>; 30
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;400>; 9
ctggagtgga tcccaactg atgaatagtt           30

```

c 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の新規p27^{Kip1}分子種のアミノ酸配列と従来種のアミノ酸配列との比較図。

【図2】 本発明の新規p27^{Kip1}分子種の発現ベクターおよび発現細胞の作製を概説する図。

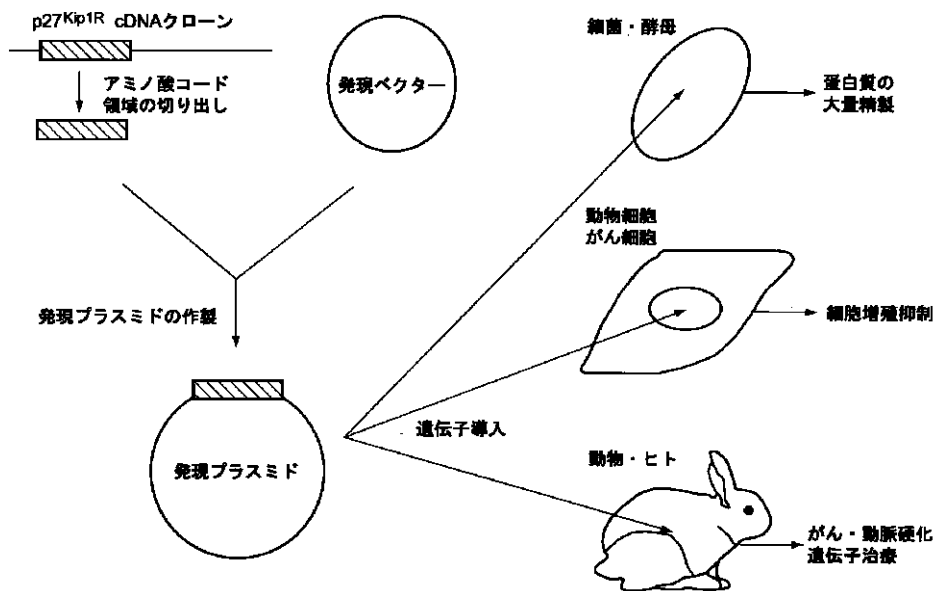
【図1】

```

p27Kip1R 9      GSPSLERMDARQAEYPKPSACRNLFPGPVNHEELTRDLEKHCR 42
p27Kip1 1      MSNVRVSNGSPSLERMDARQAEYPKPSACRNLFPGPVNHEELTRDLEKHCR 50
p27Kip1R 51     DMEEASQRKWNFDFQNHKPLEGKYEWQEVEVEKSLPEFYRPPRPPKGACK 92
p27Kip1 51     DMEEASQRKWNFDFQNHKPLEGKYEWQEVEVEKSLPEFYRPPRPPKGACK 100
p27Kip1R 101    VPAQEGQGVSGTRQAVPLIGSQANSEDTHLVDQKTDAPDSQTGLAEQCTG 142
p27Kip1 101    VPAQEGQGVSGTRQAVPLIGSQANSEDTHLVDQKTDAPDSQTGLAEQCTG 150
p27Kip1R 151    IRKRPATDDSSPPSVSLKIGMYQLNYSSVW* 180
p27Kip1 151    IRKRPATDDSSPQNKRANRTEENVSDGSPNSASVEQTPKKPGLRRRQT* 198

```

【図2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.7

識別記号

F I

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/00

Z N A A

// C 1 2 P 21/02

5/00

A

(56) 参考文献 Genes and Development, 1999年, vol. 13, p. 1181 - 1189
 The EMBO Journal, 1997年, Vol. 16, No. 17, p. 5334 - 5344
 Molecular and Cellular Biology, 1999年, Vol. 19, No. 2, p. 1190 - 1201
 The Journal of Biological Chemistry, 1997年, Vol. 272, No. 35, p. 21669 - 21672

(58) 調査した分野(Int.Cl.7, DB名)
 C12N 15/00 - 15/90
 SwissProt/PIR/GeneSeq
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 BIOSIS/WPI(DIALOG)
 PubMed