

【公報種別】特許公報の訂正

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成26年1月15日(2014.1.15)

【特許番号】特許第5349294号(P5349294)

【登録日】平成25年8月30日(2013.8.30)

【特許公報発行日】平成25年11月20日(2013.11.20)

【年通号数】特許・実用新案公報2013-043

【出願番号】特願2009-508036(P2009-508036)

【訂正要旨】国等の委託研究の成果に係る記載事項の遺漏により下記のとおり全文を訂正する。

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 5/00 1 0 2

【記】別紙のとおり

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5349294号
(P5349294)

(45) 発行日 平成25年11月20日(2013.11.20)

(24) 登録日 平成25年8月30日(2013.8.30)

(51) Int.Cl.		F I			
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 2

請求項の数 5 (全 189 頁)

(21) 出願番号	特願2009-508036 (P2009-508036)	(73) 特許権者	504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(86) (22) 出願日	平成20年10月31日(2008.10.31)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/070365	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(87) 国際公開番号	W02009/057831	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(87) 国際公開日	平成21年5月7日(2009.5.7)	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
審査請求日	平成23年10月7日(2011.10.7)	(74) 代理人	100145964 弁理士 植村 昭三
(31) 優先権主張番号	61/001, 108		
(32) 優先日	平成19年10月31日(2007.10.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/996, 289		
(32) 優先日	平成19年11月9日(2007.11.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	12/213, 035		
(32) 優先日	平成20年6月13日(2008.6.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核初期化方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

体細胞から人工多能性幹細胞を製造する方法であって、N a n o gを含有しない下記の5種の遺伝子：

(1) O c t 3 / 4、(2) S o x 1、S o x 2、S o x 3、S o x 1 5、S o x 1 7及びS o x 1 8から選択される遺伝子、(3) K l f 1、K l f 2、K l f 4及びK l f 5から選択される遺伝子、(4) L - M y c、並びに(5) L i n 2 8

を体細胞に導入する工程を含む方法。

【請求項2】

前記5種の遺伝子が、O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、L - M y c、及びL i n 2 8である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

体細胞がヒトを含む哺乳類動物の体細胞である請求項1ないし2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項4】

体細胞がヒトの体細胞である請求項1ないし2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

下記の工程(1)及び(2):

(1) 請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法により人工多能性幹細胞を得る工程、及び

(2) 上記工程(1)で得られた人工多能性幹細胞を分化誘導する工程、を含む、体細胞の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は分化した体細胞を初期化して人工多能性幹細胞を製造する方法に関するものである。

10

【背景技術】

【0002】

胚性幹細胞(ES細胞)はヒトやマウスの初期胚から樹立された幹細胞であり、生体中存在する全ての細胞へと分化できる多能性を維持したまま長期にわたって培養することができるという特徴を有している。この性質を利用してヒトES細胞はパーキンソン病、若年性糖尿病、白血病など多くの疾患に対する細胞移植療法の資源として期待されている。しかしながら、ES細胞の移植は臓器移植と同様に拒絶反応を惹起してしまうという問題がある。また、ヒト胚を破壊して樹立されるES細胞の利用に対しては倫理的見地から反対意見も多い。

【0003】

20

患者自身の分化体細胞を利用して脱分化を誘導し、ES細胞に近い多能性や増殖能を有する細胞(この細胞を本明細書において「人工多能性幹細胞」又は「iPS細胞」と呼ぶが、この細胞は「誘導多能性幹細胞」、「胚性幹細胞様細胞」、又は「ES様細胞」と呼ばれる場合もある)を樹立することができれば、拒絶反応や倫理的問題のない理想的な多能性細胞として利用できるものと期待される。最近、このiPS細胞をマウス及びヒトの体細胞から製造できることが報告され、極めて大きな反響を呼んでいる(国際公開WO2007/69666; Cell, 126, pp. 663-676, 2006; Cell, 131, pp. 861-872, 2007)。

【0004】

上記の方法は複数の特定因子(Cell, 126, pp. 663-676, 2006ではOct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Mycの4因子が用いられている)を体細胞に導入して初期化を行う工程を含んでおり、因子の導入にはレトロウイルスベクターが用いられている。しかしながら、c-Mycはがん関連転写因子であり、c-Mycを含む上記の4因子を体細胞に導入して初期化を行った場合には、得られた人工多能性幹細胞から分化誘導した細胞や組織が腫瘍化する可能性も否定できない。レトロウイルスベクターを用いてES細胞に遺伝子を導入すると遺伝子がサイレンシングを受けることが知られており、レトロウイルスベクターを用いて作製された上記のiPS細胞においても導入した遺伝子がサイレンシングを受けていることが確認されているが(国際公開WO2007/69666の実施例7)、導入した外因性のc-Mycが子孫の個体においても発現しない保障はない。c-Mycを用いずにOct3/4、Sox2、Lin28、及びNanogの4因子で核初期化を行う方法がトムソンらにより提案されている(Science, 318, pp. 1917-1920, 2007; 国際公開WO2008/118820)。しかしながらiPS細胞の研究開発は、世界的に見ても、依然としてOct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Mycの4因子主体で進められているのが現状である。

30

40

【0005】

なお、上記国際公開WO2007/69666にはMycファミリー遺伝子を用いずにサイトカインで置き換えることができることが教示されており、上記公報の実施例5には、c-Mycに換えて塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を用いることにより核初期化が可能になることが具体的に示されている。また、上記の国際公開には初期化因子の候

50

補として選択された24種類の遺伝子のなかにSa114が含まれることが示されているものの(表4のNo.13)、Sa114が核初期化活性を有することは示されていない。また、Mycファミリー遺伝子の一つであるL-Myc又はN-MycをOct3/4、Sox2、及びKlf4と組み合わせることによりc-Mycと同程度の効率でiPS細胞を樹立できることが示されている(実施例の例6)。

【特許文献1】国際公開WO2007/69666

【特許文献2】国際公開WO2008/118820

【非特許文献1】Cell, 126, pp. 663 - 676, 2006

【非特許文献2】Cell, 131, pp. 861 - 872, 2007

【非特許文献3】Science, 318, pp. 1917 - 1920, 2007

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、安全な人工多能性幹細胞を製造する方法を提供することにある。より具体的には、人工多能性幹細胞を分化誘導して得られる細胞や組織において腫瘍化の懸念のない安全な人工多能性幹細胞を提供することが本発明の課題である。

また、本発明の別の課題は、人工多能性幹細胞を効率的に製造する方法を提供することにある。

本発明の特に好ましい課題は、上記の安全な人工多能性幹細胞を効率的に製造する方法を提供することにある。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、c-Mycを用いることなく安全な人工多能性幹細胞を製造できることを見出した。

また、本発明者らは、c-Mycを用いることなく、L-Myc、Sa111、又はSa114を用いて核初期化を行うことにより、分化誘導して得られる細胞や組織において腫瘍化の懸念のない安全な人工多能性幹細胞を提供できること、及びこの方法により極めて効率的に安全な人工多能性幹細胞を製造できることを見出した。

本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

【0008】

30

すなわち、本発明により、体細胞から人工多能性幹細胞を製造する方法であって、下記の3種の遺伝子：Octファミリー遺伝子、Klfファミリー遺伝子、及びSoxファミリー遺伝子を体細胞に導入する工程を含む方法が提供される。

【0009】

この方法の好ましい態様によれば、下記の3種の遺伝子：Octファミリー遺伝子、Klfファミリー遺伝子、及びSoxファミリー遺伝子を体細胞に導入した後、該細胞が多能性を獲得して増殖するのに十分な時間にわたり該細胞を培養する工程を含む方法が提供される。

この方法の別の好ましい態様によれば、下記の3種の遺伝子：Oct3/4、Klf4、及びSox2を体細胞に導入する工程を含む方法；及び下記の3種の遺伝子：Oct3/4、Klf4、及びSox2を体細胞に導入した後、該細胞が多能性を獲得して増殖するのに十分な時間にわたり該細胞を培養する工程を含む方法が提供される。

40

【0010】

また、この方法のさらに別の好ましい態様によれば、Octファミリー遺伝子を含むウイルスベクター、Klfファミリー遺伝子を含むウイルスベクター、及びSoxファミリー遺伝子を含むウイルスベクターをそれぞれ別のパッケージング細胞にトランスフェクトして該細胞を培養することにより3種類の培養上清を得る工程、及び上記工程により得られた3種類の培養上清の混合物を調製し、該混合物を用いて体細胞の初期化を行う工程を含む上記の方法が提供される。

さらに、この方法の別の好ましい態様により、薬剤選択を行わずに体細胞の初期化を行

50

う工程を含む上記の方法が提供される。

【0011】

上記の方法において、上記の遺伝子導入を必要に応じてサイトカインの非存在下又は存在下に行うことができ、好ましくはサイトカインの非存在下に行うことができる。また、上記の培養を必要に応じてサイトカインの非存在下又は存在下に行うことができ、好ましくはサイトカインの非存在下に行うことができる。

【0012】

この発明により提供される人工多能性幹細胞は、分化誘導後に得られる細胞や組織において腫瘍の発生が実質的に低減ないし排除されている。従って、さらに本発明により、分化誘導後に得られる細胞や組織において腫瘍の発生が実質的に低減ないし排除された人工多能性幹細胞を製造する方法であって、下記の3種の遺伝子：Octファミリー遺伝子、Klfファミリー遺伝子、及びSoxファミリー遺伝子、好ましくはOct3/4遺伝子、Klf4遺伝子およびSox2遺伝子を体細胞に導入する工程を含む方法が提供される。

10

【0013】

別の観点からは、本発明により、体細胞から人工多能性幹細胞を製造する方法であって、下記の2種の遺伝子：Octファミリー遺伝子及びSoxファミリー遺伝子の組み合わせ又は下記の2種の遺伝子：Octファミリー遺伝子及びKlfファミリー遺伝子の組み合わせと、下記の3種の遺伝子から選ばれる少なくとも1種の遺伝子：L-My c、Sal11、及びSal14とを体細胞に導入する工程を含む方法が提供される。

20

【0014】

上記の発明の好ましい態様によれば、下記の2種の遺伝子：Oct3/4及びSox2の組み合わせ又は下記の2種の遺伝子：Oct3/4及びKlf4の組み合わせと、下記の3種の遺伝子から選ばれる少なくとも1種の遺伝子：L-My c、Sal11、及びSal14とを体細胞に導入する工程を含む上記の方法が提供される。上記の遺伝子に加えて下記の遺伝子：Lin28及び/又はNanogを体細胞に導入する工程を含む方法も好ましい態様であり、Lin28を体細胞に導入する工程を含む方法がより好ましい態様である。上記の方法において、所望によりc-My cを適宜組合わせて用いることも可能である。

【0015】

上記の発明のさらに好ましい態様によれば、下記の3種の遺伝子：Octファミリー遺伝子、Soxファミリー遺伝子、及びKlfファミリー遺伝子の組み合わせ、好ましくはOct3/4、Sox2、及びKlf4の組み合わせと、下記の3種の遺伝子から選ばれる少なくとも1種の遺伝子：L-My c、Sal11、及びSal14とを体細胞に導入する工程を含む上記の方法が提供される。

30

【0016】

より具体的には、下記の4種の遺伝子：Oct3/4、Sox2、Klf4、及びSal11を体細胞に導入する工程を含む上記の方法；下記の4種の遺伝子：Oct3/4、Sox2、Klf4、及びSal14を体細胞に導入する工程を含む上記の方法；下記の4種の遺伝子：Oct3/4、Sox2、Klf4、及びL-My cを体細胞に導入する工程を含む上記の方法；下記の5種の遺伝子：Oct3/4、Sox2、Klf4、Sal11、及びL-My cを体細胞に導入する工程を含む上記の方法；下記の5種の遺伝子：Oct3/4、Sox2、Klf4、Sal14、及びL-My cを体細胞に導入する工程を含む上記の方法；下記の5種の遺伝子：Oct3/4、Sox2、Klf4、Sal11、及びSal14を体細胞に導入する工程を含む上記の方法；及び下記の6種の遺伝子：Oct3/4、Sox2、Klf4、Sal11、Sal14、及びL-My cを体細胞に導入する工程を含む上記の方法が提供される。

40

L-My cを用いる場合には、体細胞がヒト体細胞であることが好ましい。

上記のいずれかの方法において、さらにLin28を体細胞に導入する工程を含む方法も本発明により提供され、好ましい態様としてOct3/4、Sox2、Klf4、L-

50

Myc、及びLin28を体細胞に導入する工程を含む上記の方法が提供される。

【0017】

この発明により提供される人工多能性幹細胞は、分化誘導後に得られる細胞や組織において腫瘍の発生が実質的に低減ないし排除されている。従って、さらに本発明により、分化誘導後に得られる細胞や組織において腫瘍の発生が実質的に低減ないし排除された人工多能性幹細胞を製造する方法であって、下記の2種の遺伝子：Octファミリー遺伝子及びSoxファミリー遺伝子、好ましくはOct3/4及びSox2と、下記の3種の遺伝子から選ばれる少なくとも1種の遺伝子：L-Myc、Sal11、及びSal14とを体細胞に導入する工程を含む方法が提供される。この方法において、さらにKlfファミリー遺伝子、例えばKlf4を体細胞に導入する工程を含む方法も好ましい態様であり、さらにKlfファミリー遺伝子とともに又はKlfファミリー遺伝子に換えてLin28を体細胞に導入する工程を含む方法も好ましい態様である。

10

【0018】

さらに別の観点からは、本発明により、体細胞から人工多能性幹細胞を製造する方法であって、下記の6種の遺伝子：Octファミリー遺伝子、Klfファミリー遺伝子、Soxファミリー遺伝子、Mycファミリー遺伝子、Lin28、及びNanog、好ましくは下記の6種の遺伝子：Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc、Lin28、及びNanogを体細胞に導入する工程を含む方法が提供される。この方法において、c-Mycに換えて下記の3種の遺伝子から選ばれる少なくとも1種の遺伝子：L-Myc、Sal11、及びSal14を用いることができ、この方法も好ましい態様である。

20

【0019】

上記の各方法において、体細胞への上記遺伝子の導入を組換えベクターにより行うことができ、上記の各方法において定義される遺伝子の組み合わせから選ばれる少なくとも1種以上を含む組換えベクターを用いて体細胞に該遺伝子を導入することが好ましい。ベクターとしてはウイルスベクター又は非ウイルスベクターのいずれを用いてもよい。

【0020】

さらに、上記の各発明において定義される遺伝子の組み合わせを含む核初期化因子が本発明により提供される。上記の組み合わせにさらにTERT遺伝子及び/又はSV40 Large T antigen遺伝子を組み合わせることも好ましい。

【0021】

また、上記の各発明において定義される遺伝子の遺伝子産物の組み合わせを含む核初期化因子も本発明により提供され、上記の各発明において定義される遺伝子の遺伝子産物の組み合わせを含む核初期化因子を体細胞に接触させる工程を含む方法も本発明により提供される。好ましい態様として、体細胞の培養物中に上記の核初期化因子を添加する工程を含む上記の方法も提供される。

30

【0022】

上記の各発明において、体細胞がヒトを含む哺乳類動物、好ましくは霊長類の体細胞、より好ましくはヒトの体細胞である上記の方法；体細胞がヒト胎児細胞又は成人ヒト由来の体細胞である上記の方法；体細胞が患者から採取した体細胞である上記の方法が提供される。

40

【0023】

別の観点からは、上記の方法により得ることができる人工多能性幹細胞が本発明により提供される。また、上記の方法により得ることができる人工多能性幹細胞から分化誘導された体細胞も本発明により提供される。分化誘導された体細胞の集団である組織、臓器、体液、及び個体も本発明により提供される。

【0024】

さらに本発明により、幹細胞療法であって、患者から分離採取した体細胞を用いて上記の方法により得られた人工多能性幹細胞を分化誘導し、得られた体細胞又はその集団である組織、臓器、若しくは体液を該患者に移植する工程を含む療法が提供される。

さらに本発明により、上記の方法により得られた人工多能性幹細胞を分化誘導して得ら

50

れる各種細胞を用いて、化合物、薬剤、毒物などの生理作用や毒性を評価する方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1はヒト成人皮膚線維芽細胞 (adult HDF) から誘導された iPS 細胞のアルカリフォスファターゼ染色結果を示した図である。マウスレトロウイルス受容体 (Slc7a1) をレンチウイルス感染により発現させた adult HDF (HDFa-Slc7a1) に、左段に示した遺伝子をレトロウイルスベクターで導入した。「-」は、「Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc」の4遺伝子を導入した HDFa-Slc7a1 細胞での染色結果を示す。写真の最右段及び右から第二段目は、遺伝子導入から10日後に位相差で観察されたアルカリフォスファターゼ染色結果を示す。

10

【図2】図2は新生児包皮由来線維芽細胞 (BJ) から誘導された iPS 細胞のアルカリフォスファターゼ染色結果を示した図である。マウスレトロウイルス受容体 (Slc7a1) をレンチウイルス感染により発現させた BJ (BJ-Slc7a1) に対して左段に示した遺伝子をレトロウイルスベクターで導入した。写真の右から第二段目は、遺伝子導入から10日後に位相差で観察されたアルカリフォスファターゼ染色結果を示す。

【図3】図3は adult HDF 由来の iPS 細胞 (クローン iPS-HDFaSlc-87E6) の ABCG-2、SSEA-3、及び SSEA-4 の発現に関する免疫染色解析の結果、及び陰性対照としての2次抗体のみ (マウス IgG 又はラット IgM) の染色結果を示した図である。写真は位相差像及びローダミン・フィルターを介した位相差像 (それぞれ対物×10) を示す。

20

【図4】図4は adult HDF 由来の iPS 細胞 (クローン iPS-HDFaSlc-87E3、4、及び12) 及びマウス Slc7a1 遺伝子を発現する adult HDF (HDFa) の ABCG-2、E-cadherin、SSEA-3、及び SSEA-4 の発現についての免疫染色の結果を示した図である。写真は位相差像及びローダミン・フィルターを介した位相差像 (それぞれ対物×10) を示す。

【図5】図5は adult HDF 由来の iPS 細胞 (クローン iPS-HDFaSlc-87E1~8、11及び12)、NTERA2クローンD1ヒト胚癌細胞 (NTERA2)、及びマウス Slc7a1 遺伝子を発現する adult HDF (HDF) から単離された RNA を基に得られた cDNA における、OCT4、Sox2、Nanog、REX1、FGF4、GDF3、DPPA4、DPPA2、ESG1、hTERT、及び G3PDH の各領域の PCR 増幅結果を示した図である。

30

【図6】図6は BJ 由来の iPS 細胞 (クローン iPS-BJSlc-97G3、G5、H3、H5、E1~10、E11、及びE12)、NTERA2クローンD1ヒト胚癌細胞 (NTERA2)、及びマウス Slc7a1 遺伝子を発現する BJ (BJ-Slc7a1) から単離された RNA を基に得られた cDNA における OCT4、Sox2、Nanog、REX1、FGF4、GDF3、ECAT15-1、ECAT15-2、ESG1、hTERT、及び G3PDH の各領域の PCR 増幅結果を示した図である。

【図7】図7はクローン iPS-HDFaSlc-87E12 を皮下注射し、5週間後のマウス及び該マウスから摘出された腫瘍を示した図 (A)、並びにクローン iPS-HDFaSlc-87E3 (B)、クローン iPS-HDFaSlc-87E6 (C)、及びクローン iPS-HDFaSlc-87E12 (D) のそれぞれを皮下注射したマウスから摘出された奇形腫由来組織のヘマトキシリン・エオジン染色結果を示した図である。

40

【図8】図8はヒト iPS 細胞の in vitro での分化を示した免疫染色の図である。ヒト iPS 様細胞を HEMA コートプレート上で7日間培養し、さらにゼラチンでコートしたディッシュ上で7日間培養した後に、細胞を集めて固定液 (10% フォルマリン含 PBS) で固定した。細胞に抗-平滑筋アクチン抗体 (a-smooth muscle actin)、抗-III-チューブリン抗体 (bIII-tubulin)、及び抗-フェトプロテイン抗体 (a-fetoprotein) を1次抗体として反応させ、さらに2次抗体を用いて免疫染色した。

50

【図9】図9はヒトHDFへのレトロウイルスの遺伝子導入効率の改善結果を示した図である。HDF又はマウスSlc7a1遺伝子を発現しているHDF(HDF-Slc7a1)にGFP cDNAを含むecotropic(Eco)又はamphotropic(Ampho)レトロウイルスを導入した。図の上部の写真は蛍光顕微鏡観察結果を示し(バーは100µmである)、図の下部のグラフはフローサイトメトリー結果を示す。

【図10】図10はadult HDFからのiPS細胞の誘導結果を示した図である。AはiPS細胞樹立のタイムチャートを示す。BはHDFの細胞形態画像、Cは非ES細胞様コロニーの典型的画像、DはヒトES細胞様コロニーの典型的画像、Eは樹立されたiPS細胞株の継代数6(クローン201B7)の細胞形態、Fは高い拡大率でのiPS細胞の画像、GはヒトiPS細胞コロニーの中心部の自発的に分化した細胞画像をそれぞれ示す。H~Nは、それぞれSSEA-1(H)、SSEA-3(I)、SSEA-4(J)、TRA-1-60(K)、TRA-1-81(L)、TRA-2-49/6E(M)、及びNanog(N)の免疫組織染色による分析結果を示す。核はHoechst33342(青)により染色された。各画像におけるバーは、200µm(B~E、G)、20µm(F)、及び100µm(H~N)を示す。

10

【図11】図11はヒトiPS細胞のフィーダー細胞依存性を示した図である。Aはゼラチンコートされたプレート上に撒いたiPS細胞の画像を示す。Bはマトリゲルコートされたプレート上のMEF用の調整培地(MEF-CCM)中で培養したiPS細胞の画像を示す。Cはマトリゲルコートされたプレート上のヒトES用の非調整培地で培養したiPS細胞の画像を示す。

20

【図12】図12はヒトiPS細胞におけるヒトES細胞マーカー遺伝子の発現について、ES細胞マーカー遺伝子のRT-PCR解析結果を示した図である。RNAを単離した細胞は、iPS細胞クローン201B、ES細胞、NTERA2クローンD1ヒト胚癌細胞(NTERA2)、及びマウスSlc7a1遺伝子を発現するadult HDF(HDF)である。

【図13】図13はヒトiPS細胞におけるヒトES細胞マーカー遺伝子の発現について、ES細胞マーカー遺伝子のウェスタンブロット分析(A)及びレトロウイルス導入遺伝子の発現の定量的PCR結果(B)を示した図である。Bは3回の試験の平均値を示し、バーは標準偏差を示す。

【図14】図14はヒトiPS細胞におけるヒトES細胞マーカー遺伝子の発現について、Oct3/4、REX1及びNanogのプロモーター領域のバイサルファイトゲノミックシーケンスの結果(A)及びルシフェラーゼアッセイの結果(B)を示した図である。Aにおいて、白丸及び黒丸は、非メチル化及びメチル化CpGsを示す。Bは4回の試験の平均値を示し、バーは標準偏差を示す。

30

【図15】図15は高レベルのテロメラーゼ活性及びヒトiPS細胞の指数関数的増殖を示した図である。Aは熱処理により非活性化された(+)サンプルを陰性対照として使用したTRAP法によるテロメラーゼ活性の検出結果を示す(ICは内部対照)。BはiPS細胞の増殖曲線を示し、4回の試験の平均値及び標準偏差を示した。

【図16】図16はヒトiPS細胞の遺伝子分析結果を示した図である。Aは全てのクローンの染色体中に4種全てのレトロウイルスが組み込まれている結果を示すゲノムPCRの結果である。Bはc-Myc cDNAプローブを用いたサザンブロット分析の結果を示す。図中の星印は内因性c-Myc対立遺伝子(2.7kb)を示し、矢印はSNLフィーダー細胞に由来するマウスc-Myc対立遺伝子(9.8kb)を示す。

40

【図17】図17はヒトiPS細胞の胚様体を介した分化を示した図である。Aは8日目におけるiPS細胞の浮遊培養画像を示す。B~Eは16日目の分化した細胞(B)、ニューロン様細胞(C)、上皮細胞(D)、及び敷石様細胞(E)の画像をそれぞれ示す。F~Kは、 α -フェトプロテイン(F)、 α -ビメンチン(G)、 α -平滑筋アクチン(H)、 α -デスミン(I)、 α -IIIチューブリン(J)、及びGFAP(K)の免疫組織化学分析の結果をそれぞれ示す。図中のバーは、200µm(A、B)及び100µm(C~K)を示す。F~Kにおいて、核はHoechst33342(青)により染色した。Lは

50

、3種の胚葉の様々な分化マーカーのRT-PCR分析結果を示す。

【図18】図18はヒトiPS細胞の方向付けされた分化を示した図である。Aは、PA6細胞上で18日間培養した後の分化したiPS細胞の位相差画像である。Bは、I I Iチューブリン(赤)及びチロシンヒドロキシダーゼ(緑)抗体によるAに示した細胞の免疫組織化学分析の結果を示す。核はHoechst 33342(青)により染色した。Cは、ドーパミン作用性ニューロンマーカーのRT-PCR分析結果を示す。Dは心筋細胞へ分化したiPS細胞の位相差画像である。Eは心筋細胞マーカーのRT-PCR分析結果を示す。A、B、及びDの画像におけるバーは200µm(A、D)及び100µm(B)である。

【図19】図19はヒトiPS細胞から誘導された奇形腫を示した図である。iPS細胞から誘導された奇形腫由来組織のヘマトキシリン・エオジン染色画像を示す(クローン201B7を使用)。

10

【図20】図20は成人線維芽細胞様滑膜細胞(HFLS、クローン243H1)及び新生児包皮由来線維芽細胞(BJ、クローン246G1)から樹立されたヒトiPS細胞の位相差画像である。各画像において、バーは200µmを示す。

【図21】図21はHFLS及びBJに由来するiPS細胞中のES細胞マーカー遺伝子の発現を示した図である。

【図22】図22はHFLS及びBJから樹立されたiPS細胞から胚様体を介して分化した細胞を示す図である。平滑筋アクチン、I I Iチューブリン、フェトプロテインの発現を免疫染色により確認した。

20

【図23】図23はNanogレポーターマウス由来MEFからのiPS細胞の誘導におけるファミリー遺伝子及びc-Mycを除外した場合の効果を示す図である。Aは、ファミリー遺伝子を用いたNanog選択によるMEFからのiPS細胞の誘導結果を示す。グラフはGFP陽性コロニー数を示す。3回の独立した実験結果を異なる色(白、灰、及び黒)で示した。「4 factors」は、Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Mycの組み合わせを示す。BはiPS細胞誘導におけるピューロマイシン選択のタイミングの影響を示しており、4遺伝子又はc-Mycを除いた3遺伝子の導入の28日後に観察されたGFP陽性コロニーを示す。Cは全コロニーに対するGFP陽性コロニーの百分率に対するピューロマイシン選択のタイミングの影響を示す。

【図24】図24はMyc、Klf、Soxのファミリータンパク質を用いてFbx15レポーターマウス由来MEFから誘導されたiPS細胞に由来する奇形腫の組織像を示す図である。

30

【図25】図25はc-Myc以外の3つの遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4)をレトロウイルスによりNanogレポーターマウス由来MEFに導入し樹立したiPS細胞の特徴を示す図である。ES細胞マーカー遺伝子及び4遺伝子の発現レベルを示すRT-PCRの結果を示す。特異的なプライマーセットを用いることにより、全転写産物、内在性遺伝子からの転写産物(endo)、及びレトロウイルスからの転写産物(Tg)を4遺伝子について区別した。

【図26】図26はc-Myc以外の3つの遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4)をレトロウイルスによりFbx15レポーターマウス由来MEFに導入し樹立したiPS細胞を誘導した結果、並びに導入したGFPの発現結果を示す図である。Aは、c-Myc以外の3つの遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4)導入により樹立したiPS細胞の形態を示す。写真下のバーは500µmを示す。BはES、MEF、及びc-Myc以外の3つの遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4)導入により樹立したiPS細胞におけるESマーカー遺伝子のRT-PCRによる分析結果を示す。

40

【図27】図27はc-Myc以外の3つの遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4)導入により樹立したiPS細胞(クローン142B-6及び142B-12)に由来するキメラマウスを示す図である。

【図28】図28は薬剤選択なしでiPS細胞を効率的に単離した結果を示す図である。AはNanog-GFP-IRES-Puro「レポーター」を有するアダルトマウス由来

50

の T T F から誘導した i P S 細胞の形態画像である。細胞に D s R e d とともに 4 遺伝子又は c - M y c を除いた 3 遺伝子のいずれかを導入し、薬剤選択なしで 30 日間培養した。N a n o g レポーター (N a n o g - G F P) 及び D s R e d レトロウイルス (T g - D s R e d) の発現は、蛍光顕微鏡によって確認した。バーは 500 μ m を示す。B は実際に活性なプロモーター (A C T B、 β -アクトチン遺伝子) により調節される D s R e d 導入遺伝子を含むが、N a n o g 又は F b x 15 選択カセットを欠いているアダルトマウス由来 T T F から誘導した i P S 細胞の形態画像を示す。細胞は G F P とともに 4 遺伝子又は c - M y c を除いた 3 遺伝子のいずれかを導入し、薬剤選択なしで 30 日間培養した。G F P レトロウイルス (T g - G F P) の発現は、蛍光顕微鏡によって確認した。バーは 500 μ m を示す。C は薬剤選択なしで T T F から誘導した i P S 細胞及び E S 細胞における E S マーカー遺伝子の R T - P C R による分析結果を示す。D は薬剤選択又は c - M y c レトロウイルスを用いずにアダルトの T T F から誘導した i P S 細胞に由来するキメラマウス画像である。

10

【図 29】図 29 は c - M y c 以外の 3 つの遺伝子 (O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4) 導入によりヒト i P S 細胞を誘導した結果を示す図である。A は樹立されたヒト i P S 細胞 (クローン 253 G 及び 246 H) がヒト E S 細胞様形態を呈することを示す画像である。B は c - M y c 以外の 3 つの遺伝子 (O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4) 導入により樹立した i P S 細胞 (253 G)、又は c - M y c を含む 4 つの遺伝子 (O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4 , c - M y c) 導入により樹立した i P S 細胞 (253 F) を用いて樹立された H D F に由来するヒト i P S 細胞における E S 細胞マーカー遺伝子の発現結果を示す。

20

【図 30】図 30 は c - M y c 以外の 3 つの遺伝子 (O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4) を成人線維芽細胞 (H D L ; 253 G) 及び新生児包皮由来線維芽細胞 (B J ; 246 G) 導入により樹立されたヒト i P S 細胞から胚様体を介して分化を誘導させた図である。 α -平滑筋アクチン、 α -I I I チューブリン、 α -フェトプロテインの発現を免疫染色により確認した。

【図 31】図 31 は 293 F T 細胞に 6 遺伝子 (K l f 4、c - M y c、O c t 3 / 4、S o x 2、N a n o g、及び L i n 28)、又は 4 遺伝子の 2 つの異なる組み合わせ (Y 4 F で表される K l f 4、c - M y c、O c t 3 / 4、及び S o x 2 ; 並びに T 4 F で表される O c t 3 / 4、S o x 2、N a n o g、及び L i n 28) を導入した後確認されるコロニーの数をグラフで示した図である。“ E S - l i k e ” は E S 細胞のコロニーと形態的に類似したコロニーの数を示し、“ t o t a l ” は E S 様コロニーと非 E S 様コロニーの数の総数を示す。E x p # 1、E x p # 2、E x p # 3、及び E x p # 4 は、それぞれ個別に実験を行った結果を示す。縦軸はコロニー数を示す。

30

【図 32】図 32 はマウス胚性線維芽細胞 (M E F) を用いて行った実験結果を示す。A は実験のタイムチャートを示す。N a n o g G F P⁺ / - F b x 15⁻ / - マウスから得られた 1.0×10^5 個の M E F 細胞を、ゼラチンコートした 6 ウェルプレートに撒いた。翌日、4 遺伝子 (O c t 3 / 4、K l f 4、S o x 2、及び S a l l 4 ; O S K A) 又は 3 遺伝子 (O c t 3 / 4、K l f 4、及び S o x 2 ; O S K) を M E F にレトロウイルスを用いて導入した。感染から 4 日後に細胞をマイトマイシン C 処理 S T O 細胞で被覆した 6 ウェルプレート上に 1 : 2 又は 1 : 6 の割合で再び撒いた。薬剤選択は 14 日目又は 21 日目に開始した。28 日目に G F P 陽性細胞をカウントし、細胞をアルカリフォスファターゼ (A P) 及びクリスタルバイオレット (C V) で染色した。B は 3 つの独立した実験 (# 1、2、及び 3) における G F P 陽性コロニー数の総数を示す。C は 3 つの独立した実験 (# 1、2、及び 3) における G F P 陽性コロニーの百分率を示す。

40

【図 33】図 33 はヒト成人皮膚由来線維芽細胞 (a d u l t H D F) を用いて行った実験結果を示す。マウスレトロウイルス受容体 s l c 7 a を発現する 1.0×10^5 個の a d u l t H D F 細胞を 6 ウェルプレートに撒いた。翌日、図に示す各種遺伝子の組み合わせをレトロウイルスベクターにより細胞に導入した。感染の 6 日後に細胞を 5.0×10^5 個に調整し、この細胞を 1.5×10^6 個のマイトマイシン C 処理 S T O 細胞で被

50

覆した100mmプレート上に再び播いた。7日後に培地を4ng/ml bFGFを補充した霊長類用ES細胞培地に交換した。図は感染から30日後のコロニー数を示す。

【図34】図34はマウスレトロウイルス受容体Slc7aを発現したヒト成人皮膚由来線維芽細胞(HDF)にヒト由来の4遺伝子(Y4F:Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Myc)又は3遺伝子(Y3F:Oct3/4、Sox2、及びKlf4)と、マウスSal14(mSal14)若しくはマウスSal11(mSal11)又はその両方についてレトロウイルスベクターを用いて導入し、感染後32日目(左側のバー)及び40日目(右側のバー)に確認されたコロニーの数を示した図である。「+Mock」は、Y3F又はY4Fに換えて空ベクターであるレトロウイルスを感染させた群、「+mSal14」はY3F又はY4Fと同時にSal14を導入した群、「+mSal11」はY3F又はY4Fと同時にmSal11を導入した群、「+mSal14+mSal11」はY3F又はY4Fと同時にmSal14及びmSal11の両方を同時に導入した群を示す。縦軸は10cmシャーレ上に確認されたヒトiPS細胞のコロニー数を示す。同じ実験を3回繰り返してグラフのバー上に各実験のコロニー数の総数を示した。

10

【図35】図35はマウスレトロウイルス受容体Slc7aを発現したヒト成人皮膚由来線維芽細胞(HDF)にヒト由来の4遺伝子(T4F:Oct3/4、Sox2、Nanog、及びLin28)又は3遺伝子(T3F:Oct3/4、Sox2、及びNanog)と、マウスSal14(mSal14)若しくはマウスSal11(mSal11)又はその両方をレトロウイルスベクターを用いて導入し、感染後32日目(左側のバー)及び40日目(右側のバー)に確認されたコロニーの数を示した図である。「+Mock」はT3F又はT4Fに換えて空ベクターであるレトロウイルスを感染させた群、「+mSal14」はT3F又はT4Fと同時にmSal14を導入した群、「+mSal11」はT3F又はT4Fと同時にmSal11を導入した群、「+mSal14+mSal11」はT3F又はT4Fと同時にmSal14及びmSal11の両方を同時に導入した群を示す。縦軸は10cmシャーレ上に確認されたヒトiPS細胞のコロニー数を示す。同じ実験を2回繰り返してグラフのバー上に各実験のコロニー数の総数を示した。

20

【図36】図36はマウスレトロウイルス受容体Slc7aを発現したヒト成人皮膚由来線維芽細胞(HDF)にヒト由来の4遺伝子(Y4F)又は3遺伝子(Y3F)とヒトSal14(hSal14)とをレトロウイルスベクターを用いて導入し、感染性32日目(左側のバー)及び40日目(右側のバー)に確認されたコロニーの数を示した図である。「+Mock」は、Y3F又はY4Fに換えて空ベクターであるレトロウイルスを感染させた群、「+hSal14」はY3F又はY4Fと同時にhSal14を導入した群を示す。縦軸は10cmシャーレ上に確認されたヒトiPS細胞のコロニー数を示す。同じ実験を2回又は3回繰り返してグラフのバー上に各実験のコロニー数の総数を示した。

30

【図37】図37はOct3/4、Klf4、及びSox2の3遺伝子に、c-Myc、L-Myc、又はN-Myc遺伝子を加えた計4遺伝子をレンチウイルスベクターを用いてマウスレトロウイルス受容体Slc7aを発現したヒト成人皮膚由来線維芽細胞(HDFa-Slc7a1)に導入し、樹立したヒトiPS細胞のコロニー数をカウントした結果を示したグラフである。各グラフ上の数値はコロニーの総数に対するiPS細胞のコロニー数の割合を示す。

40

【図38】図38は4遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、L-Myc)をレンチウイルスベクターを用いてマウスレトロウイルス受容体Slc7aを発現したヒト成人皮膚由来線維芽細胞(HDFa-Slc7a1)に導入して樹立したヒトiPS細胞(32R2、32R6)が、三胚葉系への分化能を有することを、平滑筋アクチン、フェトプロテイン、及びIII-チューブリン抗体を用いた免疫染色により確認した結果を示す写真である。

【図39】図39は4遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、及びL-Myc)を導入して樹立したヒトiPS細胞(32R6)をSCIDマウスの精巣内に注射して得られた奇形腫の組織染色像(ヘマトキシリン・エオジン染色)である。上段は左から神経組織、腸管様組織、及び軟骨組織の組織像を示す。下段は左から毛髪組織、脂肪組織、及び

50

色素組織の組織像を示す。

【図40】図40は3遺伝子(Oct3/4、Klf4、及びL-My c)をレトロウイルスベクターを用いてNanogレポーターマウス由来MEF(MEF-Ng)に導入して得られたGFP陽性コロニー(iPS-MEF-Ng-443-3)の形態を示す写真である。上段はGFP陽性コロニー像、下段は位相差像である。

【図41】図41は図40で示したGFP陽性コロニー(iPS-MEF-Ng-443-3)由来のクローンについてRT-PCR及びGenomic PCRを行った結果を示した写真である。図中、「Total」は内在性及びレトロウイルス由来の遺伝子発現を示し、「Tg」はレトロウイルス由来の遺伝子発現を示し、「Genome」はゲノムDNA中に挿入されたレトロウイルス由来の遺伝子の存在を各遺伝子に特異的なプライマーで検出した結果を示す。写真右側の数字はPCRのサイクル数を示す。図中、「RF8」はコントロールであるES細胞、「20D17」はMEF-Ngに4遺伝子(Oct3/4、Klf4、L-My c、及びSox2)を導入して得られたiPS細胞(Nanog-iPS細胞; Nature, 448, pp. 313-317, 2007)、「142E-9」はMEF-Fbxに4遺伝子(Oct3/4、Klf4、L-My c、及びSox2)を導入して得られたiPS細胞(Fbx-iPS)を示し、これらの細胞について同様の実験を行った結果を示す。図中、「Plasmid」は各遺伝子を含むプラスミド(pMXs-Sox2、pMXs-Oct3/4、pMXs-Klf4、pMXs-c-My c、及びpMXs-L-My c)を用いた結果を示す。

【図42】図42は3遺伝子(Oct3/4、Klf4、及びL-My c)を導入して樹立したマウスiPS細胞(443-3-3、443-3-6、443-3-12、及び443-3-13)が三胚葉系への分化能を有することを抗平滑筋アクチン抗体、抗フェトプロテイン抗体、及び抗III-チューブリン抗体を用いた染色により確認した結果を示した写真である。RF8はコントロールのマウスES細胞である。

【図43】図43は3遺伝子(Oct3/4、Klf4、及びL-My c)を導入して樹立したマウスiPS細胞(443-3-3、443-3-6、443-3-12、及び443-3-13)をヌードマウスの皮下に注射して得られた奇形腫の組織染色像(ヘマトキシリン・エオジン染色)である。上から神経組織、腸管様組織、筋肉組織、表皮組織、及び軟骨組織の組織像を示す。

【図44】図44はOct3/4、Klf4、及びSox2の3遺伝子にc-My c、L-My c、及び/又はLin28遺伝子をレンチウイルスベクターを用いてマウスレトロウイルス受容体Slc7aを発現したヒト成人皮膚由来線維芽細胞(HDFa-Slc7a1)に導入して樹立したヒトiPS細胞のコロニー数をカウントした結果を示したグラフである。黒棒は全コロニー数を示し、白棒はiPS細胞コロニー数を示す。

【図45】図45は各種My cキメラ遺伝子及び変異遺伝子の構造を模式的に示した図である。Ms-c-My cの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号153及び154に示し、Ms-L-My cの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号155及び156に示し、Ms-cL-My cの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号157及び158に示し、Ms-Lc-My cの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号159及び160に示し、Ms-cLc-My cの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号161及び162に示し、Ms-LcL-My cの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号163及び164に示し、Ms-c cL-My cの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号165及び166に示し、Ms-cLL-My cの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号167及び168に示し、Ms-LLc-My cの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号169及び170に示し、Ms-Lcc-My cの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号171及び172に示し、c-My cW135Eの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号173及び174に示し、c-My cV394Dの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号175及び176に示し、c-My cL420Pの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号177及び178に示し、L-My cW96Eの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号179及び180に示し、L-

10

20

30

40

50

My c V 3 2 5 D の塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 8 1 及び 1 8 2 に示し、L - My c L 3 5 1 P の塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 8 3 及び 1 8 4 に示す。

【図 4 6】図 4 6 は各種 My c キメラ遺伝子及び変異遺伝子をレンチウイルスベクターを用いてマウスレトロウイルス受容体 S l c 7 a を発現したヒト成人皮膚由来線維芽細胞 (H D F a - S l c 7 a 1) に導入して樹立したヒト i P S 細胞のコロニー数をカウントした結果を示したグラフである。上から、i P S 細胞コロニー数、全コロニー数、及び i P S 細胞コロニー数の全コロニー数に対する割合 (%) をそれぞれ示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 2 6 】

第一の観点から提供される本発明の方法は、体細胞から人工多能性幹細胞を製造する方法であって、下記の 3 種の遺伝子：O c t ファミリー遺伝子、K l f ファミリー遺伝子、及び S o x ファミリー遺伝子を体細胞に導入する工程を含むことを特徴としており、上記方法の好ましい態様では、下記の 3 種の遺伝子：O c t ファミリー遺伝子、K l f ファミリー遺伝子、及び S o x ファミリー遺伝子を体細胞に導入した後、該細胞が多能性を獲得して増殖するのに十分な時間にわたり該細胞を培養する工程を含んでいる。

【 0 0 2 7 】

O c t ファミリー遺伝子、K l f ファミリー遺伝子、及び S o x ファミリー遺伝子については国際公開 W O 2 0 0 7 / 6 9 6 6 6 にファミリー遺伝子の具体例が示されている。O c t ファミリー遺伝子としては O c t 3 / 4 が好ましく、K l f ファミリー遺伝子としては K l f 4 が好ましく、S o x ファミリー遺伝子としては S o x 2 が好ましい。これらの遺伝子としては、野生型の遺伝子のほか、数個 (例えば 1 ~ 3 0 個、好ましくは 1 ~ 2 0 個、より好ましくは 1 ~ 1 0 個、さらに好ましくは 1 ~ 5 個、特に好ましくは 1 又は 2 個) の塩基が置換、挿入、及び / 又は欠失した変異遺伝子や、ファミリー遺伝子の適宜の組み合わせにより得られるキメラ遺伝子であって、野生型の遺伝子と同様の機能、又は改善された機能を有する遺伝子なども利用可能である。

【 0 0 2 8 】

第二の観点から提供される本発明の方法は、体細胞から人工多能性幹細胞を製造する方法であって、下記の 2 種の遺伝子：O c t ファミリー遺伝子及び S o x ファミリー遺伝子の組み合わせ又は下記の 2 種の遺伝子：O c t ファミリー遺伝子及び K l f ファミリー遺伝子の組み合わせと、下記の 3 種の遺伝子から選ばれる少なくとも 1 種の遺伝子：L - M y c、S a l l 1、及び S a l l 4 とを体細胞に導入する工程を含むことを特徴としている。いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、L - M y c、S a l l 1、及び S a l l 4 からなる群から選ばれる遺伝子は核初期化の効率を高める作用を有する核初期化因子であり、核初期化のために不可欠な核初期化因子 (例えば O c t ファミリー遺伝子及び S o x ファミリー遺伝子の組み合わせ、又は O c t ファミリー遺伝子及び K l f ファミリー遺伝子の組み合わせなど) と合わせて用いることにより、核初期化の効率を顕著に改善することができる。

【 0 0 2 9 】

より具体的には、上記の方法は、

- (a) 下記の 2 種の遺伝子：O c t ファミリー遺伝子及び S o x ファミリー遺伝子の組み合わせ、並びに L - M y c を体細胞に導入する工程；
- (b) 下記の 2 種の遺伝子：O c t ファミリー遺伝子及び S o x ファミリー遺伝子の組み合わせ、並びに S a l l 1 を体細胞に導入する工程；
- (c) 下記の 2 種の遺伝子：O c t ファミリー遺伝子及び S o x ファミリー遺伝子の組み合わせ、並びに S a l l 4 を体細胞に導入する工程；
- (d) 下記の 2 種の遺伝子：O c t ファミリー遺伝子及び S o x ファミリー遺伝子の組み合わせ、並びに L - M y c 及び S a l l 1 を体細胞に導入する工程；
- (e) 下記の 2 種の遺伝子：O c t ファミリー遺伝子及び S o x ファミリー遺伝子の組み合わせ、並びに L - M y c 及び S a l l 4 を体細胞に導入する工程；

10

20

30

40

50

(f) 下記の 2 種の遺伝子 : O c t ファミリー遺伝子及び S o x ファミリー遺伝子の組み合わせ、並びに S a l l 1 及び S a l l 4 を体細胞に導入する工程 ;

(g) 下記の 2 種の遺伝子 : O c t ファミリー遺伝子及び S o x ファミリー遺伝子の組み合わせ、並びに L - M y c、S a l l 1、及び S a l l 4 を体細胞に導入する工程 ;

【 0 0 3 0 】

(h) 下記の 2 種の遺伝子 : O c t ファミリー遺伝子及び K l f ファミリー遺伝子の組み合わせ、並びに L - M y c を体細胞に導入する工程 ;

(i) 下記の 2 種の遺伝子 : O c t ファミリー遺伝子及び K l f ファミリー遺伝子の組み合わせ、並びに S a l l 1 を体細胞に導入する工程 ;

(j) 下記の 2 種の遺伝子 : O c t ファミリー遺伝子及び K l f ファミリー遺伝子の組み合わせ、並びに S a l l 4 を体細胞に導入する工程 ;

(k) 下記の 2 種の遺伝子 : O c t ファミリー遺伝子及び K l f ファミリー遺伝子の組み合わせ、並びに L - M y c 及び S a l l 1 を体細胞に導入する工程 ;

(l) 下記の 2 種の遺伝子 : O c t ファミリー遺伝子及び K l f ファミリー遺伝子の組み合わせ、並びに L - M y c 及び S a l l 4 を体細胞に導入する工程 ;

(m) 下記の 2 種の遺伝子 : O c t ファミリー遺伝子及び K l f ファミリー遺伝子の組み合わせ、並びに S a l l 1 及び S a l l 4 を体細胞に導入する工程 ; 又は

(o) 下記の 2 種の遺伝子 : O c t ファミリー遺伝子及び K l f ファミリー遺伝子の組み合わせ、並びに L - M y c、S a l l 1、及び S a l l 4 を体細胞に導入する工程 ;

を含んでいる。

【 0 0 3 1 】

また、上記の (a) ないし (g) のいずれかの態様において、さらに K l f ファミリー遺伝子を体細胞に導入する工程を含んでもよい。さらに上記の (a) ないし (o) のいずれかの態様、または上記の (a) ないし (g) のいずれかの態様に K l f ファミリー遺伝子を加えた態様において、L i n ファミリー遺伝子及び / 又は N a n o g、好ましくは L i n 2 8 及び / 又は N a n o g、より好ましくは L i n 2 8 を体細胞に導入する工程を含んでもよい。さらに、所望により c - M y c を体細胞に導入する工程を含んでもよい。

【 0 0 3 2 】

O c t ファミリー遺伝子としては O c t 3 / 4 が好ましく、S o x ファミリー遺伝子としては S o x 2 が好ましく、K l f ファミリー遺伝子としては K l f 4 が好ましい。また L i n ファミリー遺伝子としては L i n 2 8 および L i n 2 8 b が知られているが、L i n 2 8 が好ましい。L - M y c については国際公開 W O 2 0 0 7 / 6 9 6 6 6 の表 1 に記載されており、S a l l 4 については同国際公開の表 4 及び表 5 に記載されている。S a l l 1 は E S 細胞特異的発現遺伝子であり、かつ z i n c フィンガー蛋白の一つとして知られており、腎臓の発生に関与していると考えられている。S a l l 1 の N C B I アクセション番号は N M _ 0 2 1 3 9 0 (マウス) 及び N M _ 0 0 2 9 6 8 (ヒト) である。また L i n 2 8 の N C B I アクセション番号は N M _ 1 4 5 8 3 3 (マウス) 及び N M _ 0 2 4 6 7 4 (ヒト) である。

【 0 0 3 3 】

これらの遺伝子としては、野生型の遺伝子のほか、数個 (例えば 1 ~ 3 0 個、好ましくは 1 ~ 2 0 個、より好ましくは 1 ~ 1 0 個、さらに好ましくは 1 ~ 5 個、特に好ましくは 1 又は 2 個) の塩基が置換、挿入、及び / 又は欠失した変異遺伝子や、ファミリー遺伝子の適宜の組み合わせにより得られるキメラ遺伝子であって、野生型の遺伝子と同様の機能、又は改善された機能を有する遺伝子なども利用可能である。

【 0 0 3 4 】

例えば、L - M y c 又は c - M y c としては野生型の遺伝子のほか、数個 (例えば 1 ~ 3 0 個、好ましくは 1 ~ 2 0 個、より好ましくは 1 ~ 1 0 個、さらに好ましくは 1 ~ 5 個、特に好ましくは 1 又は 2 個) の塩基が置換、挿入、及び / 又は欠失した変異遺伝子、又はキメラ M y c 遺伝子であって、野生型の遺伝子と同様か、又は改善された機能を有する

10

20

30

40

50

遺伝子も利用可能である。Myc 遺伝子について各種の Myc キメラ遺伝子及び Myc 点変異遺伝子の機能を具体的に解析する手法及び結果が明細書の実施例に具体的に示されているので、この解析手法を用いることにより、所望の改善された機能を有する変異 c - Myc 遺伝子、変異 L - Myc 遺伝子、又はキメラ Myc 遺伝子などを容易に選択して使用することができる。当該キメラ Myc 遺伝子の好ましい例としては、Ms - cL - Myc (配列番号：157 及び 158) 及び Ms - cLc - Myc (配列番号：161 及び 162) が挙げられ、より好ましくは Ms - cL - Myc が挙げられる。

【0035】

この方法の好ましい態様としては、上記の方法において

- (a - 1) Oct3 / 4、Sox2、及び L - Myc を体細胞に導入する工程； 10
- (a - 2) Oct3 / 4、Sox2、Klf4、及び L - Myc を体細胞に導入する工程；
- ；
- (b - 1) Oct3 / 4、Sox2、及び Sal11 を体細胞に導入する工程；
- (b - 2) Oct3 / 4、Sox2、Klf4、及び Sal11 を体細胞に導入する工程；
- ；
- (c - 1) Oct3 / 4、Sox2、及び Sal14 を体細胞に導入する工程；
- (c - 2) Oct3 / 4、Sox2、Klf4、及び Sal14 を体細胞に導入する工程；
- ；
- (d - 1) Oct3 / 4、Sox2、L - Myc、及び Sal11 を体細胞に導入する工程； 20
- (d - 2) Oct3 / 4、Sox2、Klf4、L - Myc、及び Sal11 を体細胞に導入する工程；
- (e - 1) Oct3 / 4、Sox2、L - Myc、及び Sal14 を体細胞に導入する工程；
- (e - 2) Oct3 / 4、Sox2、Klf4、L - Myc、及び Sal14 を体細胞に導入する工程；
- (f - 1) Oct3 / 4、Sox2、Sal11、及び Sal14 を体細胞に導入する工程；
- (f - 2) Oct3 / 4、Sox2、Klf4、Sal11、及び Sal14 を体細胞に導入する工程； 30
- (g - 1) Oct3 / 4、Sox2、L - Myc、Sal11、及び Sal14 を体細胞に導入する工程；
- (g - 2) Oct3 / 4、Sox2、Klf4、L - Myc、Sal11、及び Sal14 を体細胞に導入する工程；

【0036】

- (h - 1) Oct3 / 4、Klf4、及び L - Myc を体細胞に導入する工程；
 - (i - 1) Oct3 / 4、Klf4、及び Sal11 を体細胞に導入する工程；
 - (j - 1) Oct3 / 4、Klf4、及び Sal14 を体細胞に導入する工程；
 - (k - 1) Oct3 / 4、Klf4、L - Myc、及び Sal11 を体細胞に導入する工程； 40
 - (l - 1) Oct3 / 4、Klf4、L - Myc、及び Sal14 を体細胞に導入する工程；
 - (m - 1) Oct3 / 4、Klf4、Sal11、及び Sal14 を体細胞に導入する工程；又は
 - (o - 1) Oct3 / 4、Klf4、L - Myc、Sal11、及び Sal14 を体細胞に導入する工程
- を含む方法を挙げることができる。

【0037】

さらに、上記の方法において

- (a - 3) Oct3 / 4、Sox2、L - Myc、及び Lin28 を体細胞に導入する工 50

程；

(a - 4) O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、L - M y c、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(b - 3) O c t 3 / 4、S o x 2、S a l l 1、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(b - 4) O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、S a l l 1、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(c - 3) O c t 3 / 4、S o x 2、S a l l 4、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(c - 4) O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、S a l l 4、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(d - 3) O c t 3 / 4、S o x 2、L - M y c、S a l l 1、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(d - 4) O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、L - M y c、S a l l 1、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(e - 3) O c t 3 / 4、S o x 2、L - M y c、S a l l 4、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(e - 4) O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、L - M y c、S a l l 4、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(f - 3) O c t 3 / 4、S o x 2、S a l l 1、S a l l 4、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(f - 4) O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、S a l l 1、S a l l 4、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(g - 3) O c t 3 / 4、S o x 2、L - M y c、S a l l 1、S a l l 4、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(g - 4) O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、L - M y c、S a l l 1、S a l l 4、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

【 0 0 3 8 】

(h - 2) O c t 3 / 4、K l f 4、L - M y c、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(i - 2) O c t 3 / 4、K l f 4、S a l l 1、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(j - 2) O c t 3 / 4、K l f 4、S a l l 4、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(k - 2) O c t 3 / 4、K l f 4、L - M y c、S a l l 1、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(l - 2) O c t 3 / 4、K l f 4、L - M y c、S a l l 4、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；

(m - 2) O c t 3 / 4、K l f 4、S a l l 1、S a l l 4、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程；又は

(o - 2) O c t 3 / 4、K l f 4、L - M y c、S a l l 1、S a l l 4、及び L i n 2 8 を体細胞に導入する工程

を含む方法も好ましい。

【 0 0 3 9 】

上記の各方法において、L i n 2 8 とともに、又は L i n 2 8 に換えて N a n o g を体細胞に導入する工程を含む方法も好ましい。例えば、上記 (a - 4) の態様において、L i n 2 8 とともに N a n o g を用いる態様、すなわち O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、L - M y c、L i n 2 8、及び N a n o g を体細胞に導入する工程を含む方法などが例示される。

また、上記の各方法において、L - M y c とともに、又は L - M y c に換えて N - M y

10

20

30

40

50

c を体細胞に導入する工程を含んでいてもよい。

さらに、上記の各方法において、必要に応じて c - M y c を体細胞に導入する工程を含んでいてもよいが、分化誘導後に得られる細胞や組織において腫瘍の発生を実質的に低減ないし排除するためには c - M y c を体細胞に導入する工程を含まないほうが好ましい場合がある。

【 0 0 4 0 】

L - M y c を含む態様については、核初期化すべき体細胞としてヒト体細胞を用いることが好ましい。また、O c t 3 / 4、S o x 2、及びK l f 4 の組み合わせ、又はO c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、及びL - M y c (又はL - M y c に換えてc - M y c) の組み合わせを含む場合には、S a l l 4 をさらに組み合わせる場合、又はS a l l 1 及びS a l l 4 の両方をさらに組み合わせる場合が好ましい。さらに、O c t 3 / 4、S o x 2、N a n o g、及びL i n 2 8 の組み合わせを含む場合には、S a l l 1 をさらに組み合わせる場合、又はS a l l 1 及びS a l l 4 の両方をさらに組み合わせる場合が好ましい。これらの場合についても核初期化すべき体細胞としてヒト体細胞を用いることが好ましい。

10

【 0 0 4 1 】

第三の観点から提供される本発明の方法は、体細胞から人工多能性幹細胞を製造する方法であって、下記の6種の遺伝子：O c t ファミリー遺伝子、K l f ファミリー遺伝子、S o x ファミリー遺伝子、M y c ファミリー遺伝子、L i n 2 8、及びN a n o g を体細胞に導入する工程を含むことを特徴としており、好ましくは下記の6種の遺伝子：O c t 3 / 4、K l f 4、S o x 2、c - M y c、L i n 2 8、及びN a n o g を体細胞に導入する工程を含んでいる。

20

【 0 0 4 2 】

上記の第一ないし第三の観点から提供される本発明の各方法において、「人工多能性幹細胞」とはE S 細胞に近い性質を有する細胞のことであり、より具体的には、未分化細胞であって多能性及び増殖能を有する細胞を包含するが、この用語をいかなる意味においても限定的に解釈してはならず、最も広義に解釈する必要がある。核初期化因子を用いて人工多能性幹細胞を調製する方法については国際公開W O 2 0 0 7 / 6 9 6 6 6、C e l l , 1 2 6 , p p . 6 6 3 - 6 7 6 , 2 0 0 6 及びC e l l , 1 3 1 , p p . 8 6 1 - 8 7 2 , 2 0 0 7 に具体的に説明されており、人工多能性幹細胞の分離手段についても上記公報に具体的に説明されている。

30

【 0 0 4 3 】

本発明の方法により初期化すべき「体細胞」とは、E S 細胞等の分化全能性細胞を除く全ての細胞を意味し、その種類は特に限定されない。例えば、胎児期の体細胞のほか、成熟した体細胞を用いてもよい。好ましくはヒトを含む哺乳類動物由来の体細胞が用いられ、より好ましくはマウス由来の体細胞や霊長類由来の体細胞が用いられる。特に好ましくはヒト由来の体細胞を用いることができる。体細胞としては、具体的には(1)神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞(体性幹細胞)、(2)組織前駆細胞、又は(3)リンパ球、上皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞(皮膚細胞等)、毛細胞、肝臓細胞、胃粘膜細胞等の分化した細胞が挙げられる。人工多能性幹細胞を疾病の治療に用いる場合には、患者自身から分離した体細胞や、H L A 抗原の型が同一である他人から分離した体細胞を用いることが望ましく、例えば、疾病に關与する体細胞や疾病治療に關与する体細胞などを用いることができる。

40

【 0 0 4 4 】

上記遺伝子を体細胞に導入する方法は特に限定されないが、例えば、上記遺伝子を発現可能なベクターを用いることが一般的である。ベクターとしてレトロウイルスベクターを用いる具体的手段が国際公開W O 2 0 0 7 / 6 9 6 6 6、C e l l , 1 2 6 , p p . 6 6 3 - 6 7 6 , 2 0 0 6 及びC e l l , 1 3 1 , p p . 8 6 1 - 8 7 2 , 2 0 0 7 に開示されており、ベクターとしてレンチウイルスベクターを用いる場合についてはS c i e n c e , 3 1 8 , p p . 1 9 1 7 - 1 9 2 0 , 2 0 0 7 に開示がある。また、非ウイルスベクターであるプラスミドを用いる場合については沖田らの論文(S c i e n c e , P u b l

50

ished online: October 9, 2008; 10.1126/science.1164270)に記載されているので、当業者はこれらのなかから適宜の手段を選択して採用することができる。ベクターを用いる場合には、ベクターに上記の遺伝子から選ばれる2種以上の遺伝子を組み込んでよいが、1種類の遺伝子を組み込んだベクターを数種類用いてもよい。初期化すべき体細胞において上記の遺伝子のうちの1種又は2種がすでに発現している場合には、導入すべき上記の遺伝子の組み合わせから発現している1種又は2種の遺伝子を除くこともできるが、このような態様が本発明の範囲に含まれることは言うまでもない。

【0045】

上記遺伝子を体細胞に導入する手段としてウイルスベクター、例えばレトロウイルスベクターを用いる場合には、導入すべきそれぞれの遺伝子を含むウイルスベクターを調製した後、各ウイルスベクターを別々のパッケージング細胞にトランスフェクトして該細胞を培養することにより各ウイルスを含む培養上清をそれぞれ独立に調製し、それらの培養上清の混合物を調製して遺伝子を含むウイルスを感染させることによる遺伝子導入に用いることが好ましい。この手段を採用することにより、遺伝子導入効率を顕著に高めることができる場合があり、特にc-My cを用いずに核初期化を行う場合に好ましい場合がある。もっとも、複数のウイルスベクターを単一のパッケージング細胞にトランスフェクトし、複数のウイルスベクターを含む培養上清を調製して遺伝子導入に用いることも可能である。

【0046】

遺伝子を体細胞に導入する場合には、フィーダー細胞上に培養された体細胞に対して発現ベクターの導入を行ってもよいが、フィーダー細胞を使用することなく体細胞に発現ベクター導入を行ってもよい。発現ベクターの導入効率を高めるために後者の方法が適している場合がある。フィーダー細胞としては胚性幹細胞の培養に用いられるフィーダー細胞を適宜使用することができるが、例えば、マウス14～15日胚の線維芽細胞初代培養細胞や線維芽細胞由来細胞株であるSTO細胞等をマイトマイシンCなどの薬剤で処理した細胞や放射線処理した細胞などを用いることができる。遺伝子導入後の体細胞の培養はフィーダー細胞上で行うことが好ましい。また、遺伝子導入後、数日ないし30日程度の間ピューロマイシンなどを用いて薬剤選択を付加することもできる。もっとも、薬剤選択を行わずにiPS細胞を誘導できる手法も知られており(国際公開WO2007/69666の例9など)、薬剤選択を行わずにiPS細胞を誘導することも好ましい。

【0047】

核初期化因子を導入した体細胞を適宜の条件下で培養することにより自律的に核初期化が進行し、体細胞から人工多能性幹細胞を製造することができる。遺伝子を体細胞に導入した後、該細胞が多能性を獲得して増殖するのに十分な時間にわたり細胞を培養することが好ましい。ヒト人工多能性幹細胞を製造する場合には、発現ベクター導入後の細胞の培養密度を通常の動物細胞培養の場合よりも低く設定することが望ましい。例えば、細胞培養用ディッシュあたり1～10万個、好ましくは5万個程度の細胞密度で培養を継続することが好ましい。

【0048】

通常は体細胞の動物種に適した培地、例えば胚性幹細胞(ES細胞)用の培地(例えばヒト体細胞に遺伝子導入する場合には霊長類ES細胞用、好ましくはヒトES細胞用の培地)を用いて、例えば25日以上培養することにより人工多能性幹細胞を得ることができる。第一の観点から提供される方法では、c-My c、L-My c、N-My c、Sa111、又はSa114の1種又は2種以上を含む組み合わせを用いて核初期化を行う場合に比べて、核初期化の効率が低下する場合があり、一般的には長期間の培養が必要になることが多い。例えば、この方法においては、好ましくは28日以上、より好ましくは30日以上、さらに好ましくは33日以上、特に好ましくは35日以上培養を継続する必要がある。特にヒト体細胞に遺伝子導入する場合には40日以上、さらには45日以上の培養日数が至適な培養日数になる場合もある。もっとも、第一の観点から提供される方法によ

10

20

30

40

50

れば、バックグラウンドとなる夾雑細胞の混入を排除して、より純粋な細胞集団としての人工多能性幹細胞コロニーを取得することができ、遺伝子発現や分化能などの点で極めて高品質な人工多能性幹細胞を得ることが可能になる。一方、第二の観点及び第三の観点から提供される本発明の方法では、一般的には人工多能性幹細胞の生成効率が十分に高いことから、より短い培養日数、例えば15日ないし30日間、好ましくは20日程度の培養期間で所望の個数の人工多能性幹細胞を取得できる場合がある。

【0049】

遺伝子導入した細胞が多能性を獲得したことは、例えば未分化細胞に特有の各種マーカー、例えばアルカリフォスファターゼ (ALP)、SSEA-3、SSEA-4、ABC G-2、及びE-cadherinなどを検出することにより容易に判定することができる。マーカーの種類や判定手段については上記刊行物(例えばCell, 126, pp. 663-676, 2006、Cell, 131, pp. 861-872, 2007など)に具体的かつ詳細に説明されている。ES細胞特異的発現遺伝子のプロモーター下流にGFPなどのマーカー遺伝子を組み込んだ遺伝子を有する体細胞を用いて核初期化を行った場合は、マーカー(GFP)陽性を指標として人工多能性幹細胞を特定することが可能である。

10

また、増殖については一般的にはコロニー形成により判定することができるが、コロニー(通常は約500個~1,000個程度の人工多能性幹細胞からなる細胞集団である)の形状は動物種により特徴的な外観を呈することが知られているので、人工多能性幹細胞が増殖して形成したコロニーを容易に特定することができる。

20

【0050】

例えば、マウス人工多能性幹細胞は盛り上がったコロニーを形成するのに対して、ヒト人工多能性幹細胞は扁平なコロニーを形成することが知られており、これらのコロニー形状はそれぞれマウスES細胞及びヒトES細胞のコロニーと極めて類似しているため、当業者は生成した人工多能性幹細胞のコロニーを検出することにより人工多能性幹細胞の増殖程度を確認することができる。ES細胞の未分化性及び多能性を維持可能な培地又はその性質を維持することができない培地は当業界で種々知られており、適宜の培地を組み合わせることで、人工多能性幹細胞を効率よく分離することができる。分離された人工多能性幹細胞の分化能及び増殖能はES細胞について汎用されている確認手段を利用することにより当業者が容易に確認可能である。

30

【0051】

上記の方法において、必要に応じて遺伝子導入をサイトカインの非存在下又は存在下に行うことができ、好ましくはサイトカインの非存在下に行うことができる。また、上記の方法において、必要に応じて遺伝子導入後の体細胞の培養をサイトカインの非存在下又は存在下に行うことができる。サイトカインとしては典型的にはbasic fibroblast growth factor (bFGF)、Stem Cell Factor (SCF)、Leukemia Inhibitory Factor (LIF)などが挙げられるが、これらに限定されることはなく、当業界でサイトカインとして分類されている生理活性物質の存在下又は非存在下で遺伝子導入及び/又は培養を行うことができる。サイトカインを発現するように改変したフィーダー細胞上で遺伝子導入後の体細胞を培養することもできる。

40

【0052】

上記の方法において、上記遺伝子に換えて上記遺伝子がコードする遺伝子産物を用いて核初期化を行うこともできる。遺伝子産物である核初期化因子を用いて上記の方法を行う場合には、体細胞及び人工多能性幹細胞が増殖可能な環境において核初期化因子と体細胞とを接触させればよい。より具体的には、例えば、上記の遺伝子産物を培地中に添加するなどの手段を採用することができる。これらの遺伝子の遺伝子産物のうちの1種又は2種を融合タンパク質や核内へのマイクロインジェクションなどの手法により核内に導入し、残りの1種又は2種の遺伝子を適宜の遺伝子導入方法、例えば組換えベクターを用いる方法などによって導入することもできる。

50

【0053】

該遺伝子産物としては、例えば上記遺伝子から産生されるタンパク質自体のほか、該タンパク質とその他のタンパク質又はペプチドなどの融合遺伝子産物の形態であってもよい。例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）との融合タンパク質やヒスチジンタグなどのペプチドとの融合遺伝子産物を用いることもできる。また、HIVウイルスに由来するTATペプチドとの融合タンパク質を調製して用いることにより、細胞膜からの核初期化因子の細胞内取り込みを促進させることができ、遺伝子導入などの煩雑な操作を回避して、融合タンパク質を培地に添加するだけで初期化を誘導することが可能になる。このような融合遺伝子産物の調製方法は当業者によく知られているので、当業者は目的に応じて適宜の融合遺伝子産物を容易に設計して調製することが可能である。

10

【0054】

上記の各方法において、1種又は2種以上の遺伝子の体細胞への導入を体細胞への低分子化合物の接触で置き換えることができる場合もある。このような低分子化合物としては、例えばOctファミリー遺伝子、Klfファミリー遺伝子、Soxファミリー遺伝子、Myfファミリー遺伝子、Linファミリー遺伝子、Sal11、Sal14、及びNanog遺伝子からなる群から選ばれる1種以上の遺伝子の発現を促進する作用を有する低分子化合物を用いることができるが、このような低分子化合物は各遺伝子の発現量を指標として当業者が容易にスクリーニングすることができる。

【0055】

上記の方法において、定義された各遺伝子に加えて、細胞の不死化を誘導する因子をコードする遺伝子をさらに組み合わせてもよい。国際公開WO2007/69666に開示されているように、例えば、TERT遺伝子、及び下記の遺伝子：SV40 Large T antigen、HPV16 E6、HPV16 E7、及びBmi1からなる群から選ばれる1種以上の遺伝子を単独で、あるいは適宜組み合わせ用いることができる。さらに、上記の遺伝子に加えて、Fbx15、Eras、ECAT15-2、Tcl1、及び-cateninからなる群から選ばれる1種以上の遺伝子を組み合わせてもよく、及び/又はECAT1、Esg1、Dnmt3L、ECAT8、Gdf3、Sox15、ECAT15-1、Fthl17、Rex1、UTF1、Stella、Stat3、及びGrb2からなる群から選ばれる1種以上の遺伝子を組み合わせることもできる。これらの組み合わせについては国際公開WO2007/69666に具体的に説明されている。もっとも、本発明の方法において使用可能な遺伝子は上記に具体的に説明した遺伝子に限定されることはない。

20

30

【0056】

本発明の方法においては、核初期化因子として機能することができる他の遺伝子のほか、分化、発生、又は増殖などに関係する因子あるいはその他の生理活性を有する因子をコードする遺伝子の1種又は2種以上含むことができ、そのような態様も本発明の範囲に含まれることは言うまでもない。例えば、核初期化因子を確認する手段としては国際公開WO2005/80598に記載された核初期化因子のスクリーニング方法や国際公開WO2007/69666に記載された具体的な核初期化因子の特定方法を利用することができる。国際公開WO2005/80598及び国際公開WO2007/69666の全

40

【0057】

本発明の方法において、人工多能性幹細胞の樹立効率を向上させるために、種々の樹立効率改善剤の導入及び/又は添加を行うこともできる。iPS細胞の樹立効率改善物質としては、例えば、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤〔例えば、バルプロ酸（V

50

PA) (Nat. Biotechnol., 26(7), pp. 795-797, 2008)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC1293やM344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNA及びshRNA(例えば、HDAC1 siRNA Smartpool(登録商標、Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1(OriGene))などの核酸系発現阻害剤など]、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤[例えば、BIX-01294(Cell Stem Cell, 2, pp. 525-528, 2008)等の低分子阻害剤、G9aに対するsiRNA及びshRNA(例えば、G9a siRNA(human)(Santa Cruz Biotechnology))などの核酸系発現阻害剤など]などが挙げられるが、これらに限定されることはない。核酸系発現阻害剤はsiRNA又はshRNAをコードするDNAを含む発現ベクターの形態であつてもよい。

10

【0058】

本発明の方法により製造される人工多能性幹細胞の用途は特に限定されず、ES細胞を利用して行われているあらゆる試験・研究やES細胞を用いた疾病の治療などに使用することができる。例えば、本発明の方法により得られた人工多能性幹細胞をレチノイン酸、EGFなどの増殖因子、又はグルココルチコイドなどで処理することにより、所望の分化細胞(例えば神経細胞、心筋細胞、血球細胞など)を誘導することができ、適宜の組織を形成させることができる。分化誘導方法については国際公開WO2007/69666などに具体的に説明されている。このようにして得られた分化細胞や組織を患者に戻すことにより自家細胞移植による幹細胞療法を達成することができる。例えば、患者自身の体細胞から安全性の高い人工多能性幹細胞を効率的に作製することができ、この細胞を分化させることにより得られる細胞(例えば心筋細胞、インスリン産生細胞、又は神経細胞など)を心不全、インスリン依存性糖尿病、パーキンソン病や脊髄損傷など多様な疾患に対する幹細胞移植療法において安全に利用することができる。

20

【0059】

また、例えば、ヒト体細胞から本発明の方法により人工多能性幹細胞を調製した後、この人工多能性幹細胞を分化誘導して体細胞、組織、又は臓器などを調製し、この体細胞、組織、又は臓器などに対しての化合物、医薬、毒物などの生理作用や毒性を評価することもできる。あるいは、特定の疾患の患者の体細胞から本発明の方法により人工多能性幹細胞を調製した後、この人工多能性幹細胞を分化誘導して体細胞、組織、又は臓器などを調製し、この体細胞、組織、又は臓器などに対して医薬候補化合物を作用させて治療及び/又は予防効果を判定することにより、医薬候補化合物のスクリーニングを行うこともできる。もっとも、本発明の人工多能性幹細胞の用途は上記の特定の態様に限定されることはない。

30

【実施例】

【0060】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1：マウスES細胞培地におけるadult HDFからのiPS細胞の樹立

40

ヒト成人皮膚由来線維芽細胞(adult HDF)又はヒト新生児包皮由来線維芽細胞(BJ)にレンチウイルスでSlc7a1(マウスレトロウイルス受容体)遺伝子を導入し(それぞれ、「HDFa-Slc7a1」、「BJ-Slc7a1」とする)、HDFa-Slc7a1又はBJ-Slc7a1は800,000個に調製した後、フィーダー細胞(マイトマイシン処理STO細胞)上にまき、以下の組み合わせでレトロウイルスベクターにより遺伝子を導入した。

1. Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, hTERT, Bmi1

2. Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, hTERT, HPV16 E6, HPV16 E7

3. Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, hTERT, HPV16 E7

50

4 . O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4 , c - M y c , h T E R T , S V 4 0 L a r g e T a n t i g e n

5 . O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4 , c - M y c , h T E R T , H P V 1 6 E 6

6 . O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4 , c - M y c

図中で示す「 - 」は、上記の組み合わせの「 6 . O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4 , c - M y c 」を示す。

(O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4 , c - M y c , T E R T はヒト由来、 B m i 1 はマウス由来)

【 0 0 6 1 】

マウス E S 細胞の培養条件下で薬剤選択無しで培養を続けたところ、 4 の組み合わせで遺伝子を導入したディッシュにおいて、ウイルス感染 8 日後において i P S 細胞と思われるコロニーが出現した。他の組み合わせ (1 から 3 および 5) においても、 1 の組み合わせの場合ほどは明瞭ではないが、 i P S 細胞様のコロニーが出現した。 4 遺伝子 (6) のみを導入しても、全くコロニーは出現しなかったが、上記条件下で 4 遺伝子のみが導入された細胞はアルカリフォスファターゼ染色に対して明らかに陽性を呈していた (図 1)。

10

【 0 0 6 2 】

同様に、マウス S l c 7 a 1 遺伝子を発現するヒト新生児包皮由来線維芽細胞 (B J) を 8 0 , 0 0 0 個に調製後、フィーダー細胞 (マイトマイシン処理 S T O 細胞) 上にまき、以下の組み合わせでレトロウイルスベクターにより遺伝子を導入した。

1 . 4 s (O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4 , c - M y c) , h T E R T , S V 4 0 L a r g e T a n t i g e n

20

2 . 4 s (O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4 , c - M y c) , h T E R T , B m i 1

3 . h T E R T , S V 4 0 L a r g e T a n t i g e n

4 . 4 s (O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4 , c - M y c) , h T E R T , H P V 1 6 E 6

5 . 4 s (O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4 , c - M y c) , h T E R T , H P V 1 6 E 7

6 . 4 s (O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4 , c - M y c) , h T E R T , H P V 1 6 E 6 , H P V 1 6 E 7

7 . 4 s (O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4 , c - M y c) , h T E R T

30

8 . 4 s (O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4 , c - M y c)

9 . D s R e d

(O c t 3 / 4 , S o x 2 , K l f 4 , c - M y c , T E R T はヒト由来、 B m i 1 はマウス由来)

マウス E S 細胞の培養条件下で 2 週間培養を続けたところ、 4 遺伝子 (8) のみが導入された細胞はアルカリフォスファターゼ染色に対して陽性を呈した (図 2)。

【 0 0 6 3 】

例 2 : i P S 細胞による E C A T 発現 (1)

ヒト成人皮膚由来線維芽細胞 (a d u l t H D F) から樹立されたヒト i P S 細胞が、 E S 細胞で特異的に発現する遺伝子群である E C A T (E S c e l l a s s o c i a t e d t r a n s c r i p t) を発現するか否かを調べた。

40

a d u l t H D F に由来する i P S 細胞 (クローン i P S - H D F a S l c - 8 7 E 6) を 6 ウェルプレートにあらかじめ培養していたフィーダー細胞 (マイトマイシン C 処理 S T O 細胞) 上に、各ウェルあたり 5×10^4 個の割合で撒き、 4 日間培養した。細胞を 10 % ホルマリンを含む P B S で固定し、固定液を除去後、 P B S で洗浄し、さらに室温で 45 分間 3 % B S A 含 P B S を加え静置した。一次抗体 (抗ヒト A B C G - 2 抗体 (マウス I g G) 、抗 S S E A - 3 抗体 (ラット I g M) 、及び抗 S S E A - 4 抗体 (マウス I g G)) を 3 % B S A 含 P B S で 1 : 100 に希釈し、 4 で一晩反応させた後、細胞を 1 % B S A を含む P B S で 3 回洗浄し、 1 % B S A を含む P B S で 1 : 300 に希釈した二次抗体を用いて室温で 1 時間、遮光下で反応させた。二次抗体として C y - 3 で標識

50

した抗マウスIgG抗体(ABC G-2及びSSEA-4に対する抗体;ケミコン)及び抗ラットIgM抗体(SSEA-3に対する抗体;ジャクソン・イムノリサーチ)を使用した。細胞をPBSで洗浄し、次いで顕微鏡下で観察及び撮影した(図3)。この結果、adult HDFに由来するiPS細胞がABC G-2、SSEA-3、及びSSEA-4を発現していることが観察された。

【0064】

例3:iPS細胞によるECAT発現(2)

ヒト成人皮膚由来線維芽細胞(adult HDF)に由来するiPS細胞(クローンiPS-HDFaSlc-87E3、87E4、及び87E12)をあらかじめ6ウェルプレートに播いておいたフィーダー細胞(マイトマイシンC処理STO細胞)上に各ウェルあたり 5×10^4 個の割合で撒き、5日間培養した。コントロールとして上記iPS細胞の由来細胞であるHDFを上記6ウェルプレート上に撒き、2日間維持した。細胞を10%ホルマリンを含むPBSで固定した。固定液を除去し、細胞をPBSで洗浄した後、細胞を室温で45分間ブロッキングバッファー(3%BSA含PBS)を加え静置した。一次抗体(抗ABC G-2抗体(マウスIgG;ブロッキングバッファーで1:80に希釈)、抗E-cadherin(マウスIgG;ブロッキングバッファーで1:80に希釈)、抗SSEA-3抗体(ラットIgM;ブロッキングバッファーで1:250に希釈)、抗SSEA-4抗体(マウスIgG;ブロッキングバッファーで1:250に希釈))と4で一晩反応させた後、細胞をブロッキングバッファーで洗浄した。洗浄後、さらに細胞を二次抗体を用いて室温で1時間反応させた。二次抗体は、ブロッキングバッファーで1:300に希釈したCy-3で標識した抗マウスIgG抗体(ABC G-2、E-cadherin、及びSSEA-4に対する抗体)及び抗ラットIgM抗体(SSEA-3に対する抗体)を用いた。2次抗体反応後抗体溶液を除去し、PBSで洗浄した後、細胞に50%グリセロールを含むPBSを加えて観察した(図4)。

【0065】

ヒト成人皮膚由来線維芽細胞(adult HDF)に由来するiPS細胞はES細胞の表面マーカーであるSSEA-3、SSEA-4、ABC G-2、及びE-cadherinを発現していた。これに対して、iPS細胞の由来細胞であるHDFaはSSEA-3、SSEA-4、ABC G-2、及びE-cadherinのいずれも発現していなかった。

【0066】

例4:iPS細胞によるECAT発現(3)

全RNAを、ヒトiPS細胞クローン(iPS-HDFaSlc87E-1~8、11及び12)、NTERA2クローンD1ヒト胚癌細胞(継代数35)、及びマウスSlc7a1遺伝子を発現するadult HDF(継代数6)から単離した。第1鎖cDNAはoligo-dT20プライマー及びReverse Transcription Kit(東洋紡)を製造業者のプロトコルに従って使用して合成した。PCRはプライマーを用いて以下の通りに行った。内在性OCT3/4に対してhOCT3/4-S1165及びhOCT3/4-AS1283;内在性Sox2に対してhSox2-S1430及びhSox2-AS1555;Nanogに対してECAT4-macaca-968S及びECAT4-macaca-1334AS;REX1に対してhRex1-RT-U及びhRex1-RT-L;FGF4に対してhFGF4-RT-U及びhFGF4-RT-L;GDF3に対してhGDF3-S243及びhGDF3-AS850;ECAT15-1に対してhECAT15-S532及びhECAT15-AS916;ECAT15-2に対してhECAT15-2-S85及びhECAT15-2-AS667;ESG1に対してhpH34-S40及びhpH34-AS259;hTERTに対してhTERT-S3556及びhTERT-AS3713;並びにG3PDHに対してG3PDH-F及びG3PDH-Rを使用した(表1:配列表の配列番号1から22)。

この結果、多数のヒトiPS細胞クローン(iPS-HDFaSlc87E-1~8、11及び12)がECATを発現しており、特に87E6クローンは種々のECATを発

10

20

30

40

50

現していた(図5)。

【0067】

【表1】

Primer	Sequence (5' to 3')	Applications
hOct3/4-S1165	GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG	Endo Oct3/4
hOct3/4-AS1283	CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC	RT-PCR
hSox2-S1430	GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG	Endo Sox2
hSox2-AS1555	TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG	RT-PCR
ECAT4(Nanog)-macaca-968S	CAG CCC CGA TTC TTC CAC CAG TCC C	Nanog RT-PCR
ECAT4(Nanog)-macaca-1334AS	CGG AAG ATT CCC AGT CGG GTT CAC C	
hREX1-RT-U	CAG ATC CTA AAC AGC TCG CAG AAT	REX1 RT-PCR
hREX1-RT-L	GCG TAC GCA AAT TAA AGT CCA GA	
hFGF4-RT-U	CTA CAA CGC CTA CGA GTC CTA CA	FGF4 RT-PCR
hFGF4-RT-L	GTT GCA CCA GAA AAG TCA GAG TTG	
hGDF3-S243	CTT ATG CTA CGT AAA GGA GCT GGG	GDF3 RT-PCR
hGDF3-AS850	GTG CCA ACC CAG GTC CCG GAA GTT	
hECAT15-1-S532	GGA GCC GCC TGC CCT GGA AAA TTC	DPPA4 RT-PCR
hECAT15-1-AS916	TTT TTC CTG ATA TTC TAT TCC CAT	
hECAT15-2-S85	CCG TCC CCG CAA TCT CCT TCC ATC	DPPA2 RT-PCR
hECAT15-2-AS667	ATG ATG CCA ACA TGG CTC CCG GTG	
hpH34-S40	ATA TCC CGC CGT GGG TGA AAG TTC	ESG1 RT-PCR
hpH34-AS259	ACT CAG CCA TGG ACT GGA GCA TCC	
hTERT-S3234	CCT GCT CAA GCT GAC TCG ACA CCG TG	hTERT RT-PCR
hTERT-AS3713	GGA AAA GCT GGC CCT GGG GTG GAG C	
G3PDH-F	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	G3PDH PCR
G3PDH-R	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	

10

20

30

【0068】

例5：iPS細胞によるECAT発現(4)

ヒト新生児包皮由来繊維芽細胞(BJ線維芽細胞)に由来するヒトiPS細胞がECATを発現するか否かを確認した。

全RNAをヒトiPS細胞(iPS-BJS1c-97E-1、2、4、5、6、7、8、10、11、12、-97G-3、5、-97H-3、及び5)、NTERA2クローンD1ヒト胚性癌細胞(継代数35)、及びマウスSlc7a1遺伝子を発現する新生児包皮由来線維芽細胞(BJ)(継代数6)から単離した。第1鎖cDNAはoligo-dT20プライマー及びReverse Transcription Kit(東洋紡)を用いて製造業者のプロトコルに従って合成した。PCRはプライマーを用いて以下の通りに行った。内在性Oct3/4に対してhOct3/4-S1165及びhOct3/4-AS1283；内在性Sox2に対してhSox2-S1430及びhSox2-AS1555；Nanogに対してECAT4-macaca-968S及びECAT4-macaca-1334AS；REX1に対してhREX1-RT-U及びhREX1-RT-L；FGF4に対してhFGF4-RT-U及びhFGF4-RT-L；GDF3に対してhGDF3-S243及びhGDF3-AS850；ECAT15-1に対してhECAT15-S532及びhECAT15-AS916；ECAT15-2に対してhECAT15-2-885及びhECAT15-2-AS667；ESG1に対してhpH34-S40及びhpH34-AS259；hTERTに対してhTERT-S3556及び

40

50

hTERT-AS3713 ; 並びにG3PDHに対してG3PDH-F及びG3PDH-Rを使用した(表2:配列表の配列番号23から44)。

【0069】

この結果、多数のヒトiPS細胞クローン(iPS-BJS1c-97E-1、2、4、5、6、7、8、10、11、12、-97G-3、5、-97H-3、及び5)がECATを発現していた(図6)。

【0070】

【表2】

Primer	Sequence (5' to 3')	Applications
hOct3/4-S1165	GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG	Endo Oct3/4
hOct3/4-AS1283	CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC	RT-PCR
hSox2-S1430	GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG	Endo Sox2
hSox2-AS1555	TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG	RT-PCR
ECAT4(Nanog)-macaca-968S	CAG CCC CGA TTC TTC CAC CAG TCC C	Nanog RT-PCR
ECAT4(Nanog)-macaca-1334AS	CGG AAG ATT CCC AGT CGG GTT CAC C	
hREXI-RT-U	CAG ATC CTA AAC AGC TCG CAG AAT	REX1 RT-PCR
hREXI-RT-L	GCG TAC GCA AAT TAA AGT CCA GA	
hFGF4-RT-U	CTA CAA CGC CTA CGA GTC CTA CA	FGF4 RT-PCR
hFGF4-RT-L	GTT GCA CCA GAA AAG TCA GAG TTG	
hGDF3-S243	CTT ATG CTA CGT AAA GGA GCT GGG	GDF3 RT-PCR
hGDF3-AS850	GTG CCA ACC CAG GTC CCG GAA GTT	
hECAT15-1-S532	GGA GCC GCC TGC CCT GGA AAA TTC	DPPA4 RT-PCR
hECAT15-1-AS916	TTT TTC CTG ATA TTC TAT TCC CAT	
hECAT15-2-S85	CCG TCC CCG CAA TCT CCT TCC ATC	DPPA2 RT-PCR
hECAT15-2-AS667	ATG ATG CCA ACA TGG CTC CCG GTG	
hPH34-S40	ATA TCC CGC CGT GGG TGA AAG TTC	ESG1 RT-PCR
hPH34-AS259	ACT CAG CCA TGG ACT GGA GCA TCC	
hTERT-S3234	CCT GCT CAA GCT GAC TCG ACA CCG TG	hTERT RT-PCR
hTERT-AS3713	GGA AAA GCT GGC CCT GGG GTG GAG C	
G3PDH-F	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	G3PDH PCR
G3PDH-R	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	

【0071】

例6:ヒトiPS細胞による奇形腫形成

例6:ヒトiPS細胞による奇形腫形成

5.0 × 10⁶個のヒトiPS細胞を、SCIDマウス(雌、5週齢)の背側に皮下注射した。注射の5週間後に大きな腫瘍が観察された。腫瘍を切除して重量を計測し、外観を撮影した。この腫瘍を10%ホルマリンを含むPBSで固定した。パラフィン包埋した腫瘍を4.5 μm切片にスライスした薄切片をスライドガラス上に載せ風乾した後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。図7のAは、iPS-HDFaSlc-87E12クローンを皮下注射したマウス及びその奇形腫を示す。図7のBはクローンiPS-HDFaSlc-87E3、同CはクローンiPS-HDFaSlc-87E6、同DはクローンiPS-HDFaSlc-87E12を皮下注射したマウスから切除された奇形腫由来の組織像をそれぞれ示す。

【0072】

例7:ヒトiPS細胞のin vitro分化

浮遊培養を行うことにより胚様体(Embryoid body:EBs)を形成させ

て、*in vitro*でのヒト*iPS*細胞の分化能を評価した。ヒト*iPS*細胞(*iPS*-HDFaSlc-127F2、E3)を7日間浮遊培養し、胚様体を形成させた。その後、胚様体をゼラチンコートしたプレートに移し、さらに8日間培養を継続し、その後免疫組織化学分析を行った。使用した一次抗体は以下の通りである。抗-平滑筋アクチン抗体(ダコ)、抗I-II-チューブリン抗体(ケミコン)、抗-フェトプロテイン抗体(ダコ)、正常マウスIgG(2mg/ml、ケミコン)、及び正常ウサギIgG(2mg/ml、ケミコン)は、それぞれ3%BSA含PBSで1:100で希釈し、一次抗体として使用した。一次抗体を室温で1時間反応させた後に細胞をPBSで洗浄し、二次抗体(3%BSA含PBSで1:300に希釈)を反応させた。なお、核はDAPIにより染色した。その結果、-平滑筋アクチン(-SMA、中胚葉マーカー)、I-II 10
I-IIIチューブリン(外胚葉マーカー)、-フェトプロテイン(内胚葉マーカー)が陽性を示したことにより、ヒト*iPS*細胞は胚様体形成を介して*in vitro*で分化することを確認した(図8)。

【0073】

例8:ヒト*iPS*細胞の作製のためのレトロウイルスによる遺伝子導入の最適化
マウス線維芽細胞からの*iPS*細胞の誘導には高い遺伝子導入効率を有するレトロウイルスが有効であると考えられている(Takahashi et al., Cell, 126, pp. 663-676, 2006)。そこで、ヒト成人皮膚由来線維芽細胞(adult HDF)における遺伝子導入方法を最適化した。最初にPLAT-Aパッケージング細胞において作製した両種性(amphotropic)レトロウイルスを用いてadult 20
HDFに緑色蛍光タンパク質(GFP)を導入した。対照として、PLAT-Eパッケージング細胞(Morita et al., Gene Ther., 7, pp. 1063-66, 2000)において作製した同種指向性(ecotropic)レトロウイルスを用いてマウス胎児線維芽細胞(MEF)にGFPを導入した。MEFにおいては、80%以上の細胞がGFPを発現した(図9)。一方、20%未満のadult HDFはMEFの場合より明らかにGFPの発現強度が低く、GFP発現率は20%未満であった。

【0074】

遺伝子導入効率を改善するために、マウスレトロウイルスのレセプターSlc7a1(Verrey et al., Pflugers Arch., 447, pp. 532-542, 2004)(mCAT1としても知られている)をレンチウイルスを用いてadult 30
HDFに導入した。次に同種指向性レトロウイルスを用いてHDFa-Slc7a1にGFPを導入した。この方法により60%の遺伝子導入効率が達成された(図9)。

【0075】

例9:霊長類ES細胞培地を用いたadult HDFからの*iPS*細胞の作製
ヒト*iPS*細胞を誘導するためのプロトコルを図10Aに概略を示した。ヒトOct3/4、Sox2、Klf4、及びc-MycをレトロウイルスベクターにてHDF-Slc7a1に導入した(図10B、 8×10^5 細胞/100mmディッシュ)。
遺伝子導入の6日後、細胞をトリプシン処理により回収し、 5×10^4 又は 5×10^5 40
細胞/100mmディッシュに調整した後、マイトマイシンC処理SNLフィーダー細胞(McMahon et al., Cell, 62, pp. 1073-85, 1990)上に撒いた。翌日、培地(10%FBSを含むDMEM)を4ng/mlの塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)を補充した霊長類ES細胞用培地(リプロセル)に交換した。約2週間後、細胞形態がヒトES細胞とは類似しない幾つかの粒状コロニーが現れた(図10C)。25日目頃、平らでヒトES細胞コロニーに類似した別のタイプのコロニーが観察された(図10D)。 5×10^4 個の線維芽細胞から、約10個のヒトES細胞様コロニー及び約100個の粒状コロニーが観察された(6回の独立した実験において、7/122、8/84、8/171、5/73、6/122、及び11/213個を観察した。結果を表3にまとめた)。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 6 】

【 表 3 】

実験番号	親細胞	遺伝子導入 後6日目に撒 いた細胞数	ES様コロ ニー数	全コロニー 数	ピックア ップされ たコロニ ー数	樹立され たクロー ン数
201B	HDF	50000	7	129	7	5
243H	HFLS	500000	0	>1000		
		50000	17	679	6	2
246B	HDF	500000	0	420		
		500000	2	508		
		50000	8	92	6	6
246G	BJ	50000	7	10	6	5
		500000	86	98		
		500000	106	108		
249D	HDF	500000	0	320		
		500000	0	467		
		50000	8	179	6	4
253F	HDF	50000	5	78	3	2
		50000	6	128	3	3
		500000	10	531		
		500000	3	738		
282C	HDF	50000	11	224	3	1
282H	BJ	50000	13	15	3	2
282R	HFLS	5000	31	98	6	2

10

20

【 0 0 7 7 】

30日目に、ヒトES細胞様コロニーを取り、酵素消化を行うことなく小さな塊に機械的にばらばらにした。5 × 10⁵個の線維芽細胞から始めた場合、ディッシュは300個を超える粒状コロニーによりほぼ覆われた。幾つかのヒトES細胞様コロニーが粒状コロニーの間に観察される場合もあったが、粒状コロニーが高密度であったため、ヒトES細胞様コロニーを単離することは困難であった。

30

【 0 0 7 8 】

ヒトiPS細胞をbFGFを含む霊長類ES細胞様培地を用いてSNLフィーダー細胞上で増殖させたところ、細胞は固く密集した平らなコロニーを形成した(図10E)。それぞれの細胞は、大きな核小体とわずかな細胞質を特徴とするヒトES細胞と同様の細胞形態を示した(図10F)。ヒトES細胞の場合と同様に、コロニーの中心に自発性分化が観察される場合があった(図10G)。また、これらの細胞はヒトES細胞と類似してフィーダー細胞依存性を示し、ゼラチンコートした組織培養プレートには接着しなかった。一方、これらの細胞はマトリゲルコートされたプレート上のMEF調整霊長類ES細胞用培地(MEF-CM)中では未分化状態を維持したが、非調整霊長類ES細胞用培地中では未分化状態を維持しなかった(図11)。樹立されたヒトiPS細胞のクローンを表4にまとめた。

40

【 0 0 7 9 】

【表 4】

クローン	起源	マーカーの発現		多能性			
		RT-PCR	IC	EB	PA6	心筋細胞	奇形腫
201B1	HDF	√					
201B2		√	√	√	√	√	
201B3		√					
201B6		√	√	√	√	√	√
201B7		√	√	√	√	√	√
243H1	HFLS	√		√			
243H7		√		√	√		√
246B1	HDF	√					
246B2		√					
246B3		√					
246B4		√					
246B5		√					
246B6		√					
246G1	BJ	√		√	√		√
246G3		√		√	√		
246G4		√					
246G5		√					√
246G6		√					
253F1	HDF	√					
253F2		√					
253F3		√					
253F4		√					
253F5		√					

IC: 免疫組織化学(immunocytochemistry), EB: 胚様体(embryoid body)

【0080】

例10: ヒトiPS細胞によるヒトES細胞マーカーの発現

免疫染色解析により、ヒトiPS細胞はSSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、及びTRA-2-49/6E(アルカリフォスファターゼ)を含むヒトES細胞特異的表面抗原(Adey et al., Nat. Biotechnol., 25, pp. 803-816, 2007)、並びにNanog蛋白の発現を示した(図10のI~N)。

【0081】

RT-PCRにより、ヒトiPS細胞は、未分化ES細胞の多数の遺伝子マーカー(例えば、Oct3/4、Sox2、Nanog、GDF3、REX1、FGF4、ESG1、DPPA2、DPPA4、及び(hTERT)など)をヒト胚性癌細胞株NTERA-2の場合と同等以上のレベルで発現していることが示された(図12)。ウェスタンブロットの結果からは、Oct3/4、Sox2、Nanog、Sal14、E-CADHERIN、及びhTERTの蛋白質レベルは、ヒトiPS細胞及びヒトES細胞において同等であった(図13A)。ヒトiPS細胞においては、染色体に組み込まれたレトロウイルスからの導入遺伝子の発現は効率的にサイレンシングされていたことから、これらの遺伝子の内因性発現に依存していることが示唆された(図13B)。

【0082】

例11: ヒトiPS細胞内におけるES細胞特異的遺伝子プロモーターの活性

バイサルファイトゲノミックシーケンス法により、Oct3/4、REX1及びNanogなどの多能性に関連する遺伝子のプロモーター領域におけるシトシングアニンジヌ

10

20

30

40

50

クレオチド (CpG) のメチル化の状態を評価した結果、その領域の CpG ジヌクレオチドは由来源の親 HDF (HDF) においては高度にメチル化されているのに対して、ヒト iPS 細胞 (201B2, 201B6, 201B7) では高度に脱メチル化されていることが判明した (図 14A)。これらの知見から、これらのプロモーターがヒト iPS 細胞において活性化されていることが示唆された。

【0083】

ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいても、ヒト Oct3/4 及び REX1 プロモーターは、ヒト iPS 細胞においては高レベルの転写活性を有したが、HDF では有さないことが示された。ヒト RNA ポリメラーゼ II (Pol II) などの普遍的に発現する遺伝子のプロモーター活性はヒト iPS 細胞及び HDF の両方において同等の活性を示した (図 14B)。

10

【0084】

例 12: ヒト iPS 細胞の高テロメラーゼ活性及び指数関数的増殖

hTERT の高い発現レベルから推測される通り、ヒト iPS 細胞は高いテロメラーゼ活性を示した (図 15A)。ヒト iPS 細胞は、少なくとも 4 ヶ月間は指数関数的に増殖した (図 15B)。ヒト iPS 細胞の計算上の倍增時間は、 46.9 ± 12.4 (クローン 201B2)、 47.8 ± 6.6 (201B6)、及び 43.2 ± 11.5 (201B7) 時間であった (図 15B)。これらの時間は、既報のヒト ES 細胞の倍增時間と同等であった (Cowan et al., N. Engl. J. Med., 350, pp. 1353-56, 2004)。

20

【0085】

例 13: HDF 由来ヒト iPS 細胞の交差汚染 (cross-contamination) 評価

ヒト iPS 細胞のゲノム DNA の PCR により、全クローンが 4 種全てのレトロウイルスの組み込みを有することが示された (図 16A)。c-Myc cDNA プロブを用いたサザンブロット分析により、それぞれのクローンがレトロウイルス組み込み部位の特有のパターンを有することが判明した (図 16B)。また、16 のショートタンデムリピートのパターンは、ヒト iPS クローンと親の HDF との間で完全に一致した。HDF 由来 iPS 細胞の STR 解析の結果を表 5 に示す。

【0086】

30

【表 5】

Locus/ Clone	201B1	201B2	201B3	201B6	201B7	NTERA-2	HDF
D3S1358	15 17	15 17	15 17	15 17	15 17	15	15 17
TH01	6	5	5	5	5	9	5
D21S11	28	28	28	28	28	29 30	28
D18S51	14	14	14	14	14	13	14
Penta_E	7 19	7 19	7 19	7 19	7 19	5 14	7 19
D5S818	11	11	11	11	11	8 11	11
D13S317	10 14	10 14	10 14	10 14	10 14	14	10 14
D7S820	9 10	9 10	9 10	9 10	9 10	12	9 10
D16S539	11 13	11 13	11 13	11 13	11 13	11 16	11 13
CSF1PO	10	10	10	10	10	9 11	10
Penta_D	8 10	8 10	8 10	8 10	8 10	11 12	8 10
AMEL	X	X	X	X	X	X Y	X
vWA	15 18	15 18	15 18	15 18	15 18	19	15 18
D8S1179	8 10	8 10	8 10	8 10	8 10	13 15	8 10
TPOX	8 9	8 9	8 9	8 9	8 9	8 9	8 9
FGA	20 22	20 22	20 22	20 22	20 22	23	20 22

【 0 0 8 7 】

これらのパターンは、ナショナル・インスティテュート・オブ・ヘルスのウェブサイト (<http://stemcells.nih.gov/research/nihresearch/scunit/genotyping.htm>) で報告されている樹立されたヒトES細胞株の何れとも異なっていた。また、染色体のG横縞分析により、ヒトiPS細胞が正常な46XX核型を有することが示された。従って、ヒトiPSクローンはHDFに由来するものであり、ES細胞のコンタミネーションによるものではないと結論された。

【 0 0 8 8 】

例 1 4 : ヒトiPS細胞の胚様体を介した分化

*in vitro*でのヒトiPS細胞の分化能を決定するために、浮遊培養を使用して胚様体 (Embryoid body : EBs) を形成させた。浮遊培養の8日目後、iPS細胞はボール状の構造を形成した (図 1 7 A)。これらのEmbryoid bod

y 様構造をゼラチンコートしたプレートに移し、さらに 8 日間培養を継続した。付着した細胞は、神経様細胞、敷石様細胞、及び上皮細胞などの様々な細胞形態を示した (図 17 B - E)。免疫組織化学分析により、III チューブリン (外胚葉マーカー)、グリア原線維酸性蛋白 (GFAP、外胚葉)、 α -平滑筋アクチン (α -SMA、中胚葉)、デスミン (中胚葉)、 α -フェトプロテイン (内胚葉)、及びビメンチン (中胚葉及び体壁の内胚葉) に対して陽性の細胞が検出された (図 17 F - K)。RT-PCR の結果から、これらの分化した細胞において FOXA2 (内胚葉マーカー)、AFP (内胚葉)、サイトケラチン 8 及び 18 (内胚葉)、SOX17 (内胚葉)、BRACHYURY (中胚葉)、MSX1 (中胚葉)、MAP2 (外胚葉)、及び PAX6 (外胚葉) が発現していることが確認された (図 17 L)。一方、Oct3/4、Sox2、及び Nanog の発現は明らかに低減していた。これらの結果より、iPS 細胞が 3 胚葉系にインビトロで分化できることが示された。

10

【0089】

例 15 : ヒト iPS 細胞の神経細胞への分化

ヒト iPS 細胞からの分化をヒト ES 細胞についての既報の方法により誘導できるか否かを検討した。PA6 フィーダー細胞層の上にヒト iPS 細胞を撒き、分化条件下で 2 週維持・培養間した (Kawasaki et al., Neuron, 28, pp. 31 - 40, 2000)。細胞は大きく広がり、いくつかの神経構造が観察された (図 18 A)。免疫組織化学分析により、培養物中にチロシンヒドロキシナーゼ及び III チューブリン陽性細胞が検出された (図 18 B)。PCR 分析の結果から、ADC、CHAT、DAT、及び LMX1B などのドーパミン作用性神経マーカー、並びに他の神経マーカーである MAP2 の発現が確認された (図 18 C)。また、Oct3/4、Sox2、及び Nanog の発現は低減した (図 18 C)。これらの結果から、iPS 細胞が PA6 細胞との共培養によりドーパミン作用性ニューロンを含む神経細胞に分化できることが示された。

20

【0090】

例 16 : ヒト iPS 細胞の心臓細胞への方向付けした分化

アクチビン A 及び骨形成因子 (BMP) 4 を利用した心臓細胞への分化に関する文献 (Lafamme et al., Nat. Biotechnol., 25, pp. 1015 - 24, 2007) を用いてヒト iPS 細胞の心臓への分化を検討した。分化誘導から 12 日後、細胞塊は鼓動を始めた (図 18 D)。RT-PCR の結果から、これらの細胞が TnTc、MEF2C、NKX2.5、MYL2A、及び MYHCB などの心筋細胞マーカーを発現していることが示された (図 18 E)。一方、Oct3/4、Sox2、及び Nanog の発現は著しく低減していた。これらの結果から、ヒト iPS 細胞がインビトロで心筋細胞へと分化できることが示された。

30

【0091】

例 17 : ヒト iPS 細胞からの奇形腫形成

インビボでの多能性を試験するため、ヒト iPS 細胞 (クローン 201B7) を免疫不全 (SCID) マウスの背側の側腹部へ皮下移植した。9 週間後に腫瘍形成が観察された。組織学的観察により、原腸管様上皮組織 (外胚葉)、横紋筋 (中胚葉)、軟骨 (筋肉)、神経組織 (内胚葉)、及びケラチン含有扁平組織 (内胚葉) を含む様々な組織 (図 19) が腫瘍に含まれていることが示された。

40

【0092】

例 18 : 他のヒト体細胞からの iPS 細胞の作製

HDF に加えて、成人男性の滑膜組織の初代ヒト由来線維芽細胞様滑膜細胞 (HFLS) 及び新生児の包皮由来の線維芽細胞から樹立された細胞株 (BJ 細胞) 新生児の包皮由来の線維芽細胞から樹立された細胞株を使用した (表 3)。HFLS (5 x 10⁴ 細胞 / 100 mm ディッシュ) から iPS 細胞の作成を試みた結果、600 個以上の粒状コロニー及び 17 個のヒト ES 細胞様コロニーを得た。これらの 17 個のコロニーのうち 6 コロニーを試験に供したところ、それらのうちの 2 コロニーのみが増殖可能であった (図 20

50

)。 5×10^5 の HFLS を撒いたディッシュは粒状コロニーで覆われており、ヒト ES 細胞様コロニーは確認できなかった。一方、BJ細胞から iPS細胞の作成を試みた結果、 $5 \times 10^4 / 100 \text{ mm}$ ディッシュからの場合、僅かな粒状コロニーも認められたものの 7 ~ 13 個のヒト ES 細胞様コロニー及び $5 \times 10^5 / 100 \text{ mm}$ ディッシュからの場合は 100 個のヒト ES 細胞様コロニーを得た (表 3)。そのうち 6 個のヒト ES 細胞様コロニーを取り、5 個のコロニーから iPS細胞を確認した (図 20)。HFLS 及び BJ に由来するヒト iPS細胞は、ヒト ES 細胞の場合と同等以上のレベルでヒト ES 細胞マーカー遺伝子を発現していた (図 21)。これらのヒト iPS細胞は、EBs を介して 3 胚葉系に分化した (図 22)。STR 分析により、iPS-HFLS 細胞及び iPS-BJ 細胞はそれぞれ HFLS 及び BJ 細胞に由来することが確認された。表 6 は HFLS 由来 iPS細胞の STR 解析の結果を示し、表 7 は BJ 由来 iPS細胞の STR 解析の結果を示す。

【 0 0 9 3 】

【 表 6 】

Locus/ Clone	243H1	243H7	HFLS
D3S1358	16 17	16 17	16 17
TH01	5 9	5 9	5 9
D21S11	28 30	28 30	28 30
D18S51	14 17	14 17	14 17
Penta_E	5 12	5 12	5 12
D5S818	10 12	10 12	10 12
D13S317	13	13	13
D7S820	9 12	9 12	8 12
D16S539	11 13	11 13	11 13
CSF1PO	10 11	10 11	10 11
Penta_D	9 11	9 11	9 11
AMEL	X	X Y	X Y
vWA	17 19	17 19	17 19
D8S1179	13	13	13
TPOX	8 11	8 11	8 11
FGA	21 22	21 22	21 22

10

20

30

40

50

【 0 0 9 4 】

【 表 7 】

Locus/ Clone	246G1	246G3	246G4	246G5	246G6	BJ
D3S1358	13 15	13 15	13 15	13 15	13 15	13 15
TH01	6 7	6 7	6 7	6 7	6 7	6 7
D21S11	28	28	28	28	28	28
D18S51	16 18	16 18	16 18	16 18	16 18	16 18
Penta_E	7 17	7 17	7 17	7 17	7 17	7 17
D5S818	11	11	11	11	11	11
D13S317	9 10	9 10	9 10	9 10	9 10	9 10
D7S820	11 12	11 12	11 12	11 12	11 12	11 12
D16S539	9 13	9 13	9 13	9 13	9 13	9 13
CSF1PO	9 11	9 11	9 11	9 11	9 11	9 11
Penta_D	11 12	11 12	11 12	11 12	11 12	11 12
AMEL	X Y	X Y	X Y	X Y	X Y	X Y
vWA	16 18	16 18	16 18	16 18	16 18	16 18
D8S1179	9 11	9 11	9 11	9 11	9 11	9 11
TPOX	10 11	10 11	10 11	10 11	10 11	10 11
FGA	22 23	22 23	22 23	22 23	22 23	22 23

【 0 0 9 5 】

以上の結果から、4種の遺伝子：Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Mycのレトロウイルスによる遺伝子導入により、adult HDF及び他の体細胞からiPS細胞を作製できることが示された。樹立されたヒトiPS細胞は、細胞形態、増殖、フィーダー細胞依存性、表面マーカーの発現パターン、遺伝子発現、プロモーター活性、テロメラーゼ活性、インビトロでの分化能、及び奇形腫形成能を含む多くの点でヒトES細胞と類似していた。また、4種のレトロウイルスはヒトiPS細胞内でほぼ完全にサイレンシングされていた。このことから、これらの細胞は完全に初期化されており、自己再生

10

20

30

40

50

については導入遺伝子の継続的な発現に依存しないことが示された。

【0096】

例8～18における実験材料及び方法は以下の通りである。

1. 細胞培養

36歳のカフカス人女性の顔の皮膚から得たHDFs及び69歳のカフカス人男性の滑膜組織から得たHFLsはセルアプリケーション社から購入した。新生児の包皮から得たBJ線維芽細胞及びNTERA-2クローンD1ヒト胚性癌細胞は、アメリカンタイプカルチャーコレクションから入手した。ヒト線維芽細胞NTERA-2、PLAT-E、及びPLAT-A細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)、並びに0.5%ペニシリン及びストレプトマイシン(インビトロジェン)を含有するダルベッコ改変イーグル培地(DMEM、ナカライテスク)で維持した。293FT細胞は10%FBS、2mMグルタミン(インビトロジェン)、 1×10^{-4} M非必須アミノ酸(インビトロジェン)、及び1mMピルビン酸ナトリウム(シグマ)、並びに0.5%ペニシリン及びストレプトマイシンを含有するDMEMで維持した。PA6間質細胞(理研バイオリソースセンター)は、10%FBS及び0.5%ペニシリン及びストレプトマイシンを含有するMEMで維持した。iPS細胞は4ng/ml組換えヒト塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF、和光純薬)を補充した霊長類ES細胞用培地(リプロセル)で樹立及び維持した。継代においては、ヒトiPS細胞は、PBSで一回洗浄し、その後37℃で1mg/mlコラゲナーゼIV(インビトロジェン)を含むDMEM/F12でインキュベートした。ディッシュの縁にあるコロニーが底面から分離し始めた時に、DMEM/F12/コラゲナーゼを除去し、ヒトES細胞培地で洗浄した。細胞をかきとり、15mlの円錐形チューブに回収した。適量の培地を添加し、SNLフィーダー細胞上に新しいディッシュに移した。分割比は常に1:3とした。iPS細胞をフィーダー細胞を含まない状態で培養するためには、プレートは48穴で一晩0.3mg/mlマトリゲル(、BDバイオサイエンス)でコートした。プレートは使用前に室温に加温した。未結合のマトリゲルは吸引除去し、DMEM/F12で洗浄した。iPS細胞は、マトリゲルコートされたプレート上に、4ng/mlのbFGFを補充したMEF-調整霊長類ES細胞用培地(MEF-CM)又はMEF-非調整霊長類ES細胞用培地(リプロセル)を用いて撒いた。培地は毎日交換した。MEF-CMの調製のために、ICRマウスの受精後13.5日目の胚を回収し得たMEFsを 1×10^6 cells/100mmでプレートにまき一晩培養した。翌日、細胞をPBSで一回洗浄し、10mlの霊長類ES細胞用培地で培養した。24時間培養後、MEF培養の培養上清液を回収し、孔径0.22µmのフィルターで濾過し、使用するまで-20℃で保存した。

【0097】

2. プラスミド構築

ヒトOct3/4のオープンリーディングフレームをRT-PCRにより増幅し、pCR2.1-TOPOにクローニングした。pCR2.1-hOct3/4のEcoRIフラグメントを、pMXsレトロウイルスベクターのEcoRI部位に導入した。それぞれの実験を区別するために、N₂₀バーコードと命名した20-bpのランダム配列をOct3/4発現ベクターのNotI/SalI部位へ導入した。実験間でのコンタミネーションを防ぐため、各実験において特有のバーコードを使用した。ヒトSox2、Klf4及びc-MycのオープンリーディングフレームもRT-PCRにより増幅し、pENTR-D-TOPO(インビトロジェン)へサブクローニングした。pENTR-D-TOPOへサブクローニングした全遺伝子を、ゲイトウェイクローニングシステム(インビトロジェン)を取扱説明書に従って用いてpMXsレトロウイルスベクターに導入した。マウスSlc7a1オープンリーディングフレームも増幅し、pENTR-D-TOPOにサブクローニングし、ゲイトウェイシステムによりpLenti6/Ubc/V5-DEST(インビトロジェン)に導入した。ヒトOct3/4遺伝子及びREX1遺伝子の調節領域を、PCRにより増幅し、pCRXL-TOPO(インビトロジェン)にサブクローニングした。PhOCT4-Luc及びpREX1-Lucのために、pCRXLベ

10

20

30

40

50

クターから K p n I / B g l I I 消化により除去したフラグメントを p G V - B M 2 の K p n I / B g l I I 部位にサブクロニングした。p P o l I I - L u c のために、p Q B I - p o l I I の A a t I I (平滑末端) / N h e I フラグメントを p G V - B M 2 の K p n I (平滑末端) / N h e I 部位に挿入した。全てのフラグメントをシーケンスにより確認した。プライマー配列を表 8 (配列表の配列番号 45 から 126) に示す。

【 0 0 9 8 】

【表 8】

Primer	Sequence (5' to 3')	Applications
hOct3/4-S944	CCC CAG GGC CCC ATT TTG GTA CC	Oct3/4 Tg PCR
hSox2-S691	GGC ACC CCT GGC ATG GCT CTT GGC TC	Sox2 Tg PCR
hKlf4-S1128	ACG ATC GTG GCC CCG GAA AAG GAC C	Klf4 endo and Tg PCR
hMYC-S1011	CAA CAA CCG AAA ATG CAC CAG CCC CAG	c-Myc Tg PCR
pMXs-AS3200	TTA TCG TCG ACC ACT GFG CTG CTG	Tg PCR
pMXs-L3205	CCC TTT TTC TGG AGA CTA AAT AAA	Tg PCR
hOct3/4-S1165	GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG	Endo Oct3/4
hOct3/4-AS1283	CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC	RT-PCR
hSox2-S1430	GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG	Endo Sox2
hSox2-AS1555	TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG	RT-PCR
ECAT4-macaca-968S	CAG CCC CGA TTC TTC CAC CAG TCC C	Nanog RT-PCR
ECAT4-macaca-1334AS	CGG AAG ATT CCC AGT CGG GTT CAC C	
hGDF3-S243	CTT ATG CTA CGT AAA GGA GCT GGG	GDF3 RT-PCR
hGDF3-AS850	GTG CCA ACC CAG GTC CCG GAA GTT	
hREX1-RT-U	CAG ATC CTA AAC AGC TCG CAG AAT	REX1 RT-PCR
hREX1-RT-L	GCG TAC GCA AAT TAA AGT CCA GA	
hFGF4-RT-U	CTA CAA CGC CTA CGA GTC CTA CA	FGF4 RT-PCR
hFGF4-RT-L	GTT GCA CCA GAA AAG TCA GAG TTG	
hpH34-S40	ATA TCC CGC CGT GGG TGA AAG TTC	ESG1 RT-PCR
hpH34-AS259	ACT CAG CCA TGG ACT GGA GCA TCC	
hECAT15-1-S532	GGA GCC GCC TGC CCT GGA AAA TTC	DPPA4 RT-PCR
hECAT15-1-AS916	TTT TTC CTG ATA TTC TAT TCC CAT	
hECAT15-2-S85	CCG TCC CCG CAA TCT CCT TCC ATC	DPPA2 RT-PCR
hECAT15-2-AS667	ATG ATG CCA ACA TGG CTC CCG GTG	
hTERT-S3234	CCT GCT CAA GCT GAC TCG ACA CCG TG	hTERT RT-PCR
hTERT-AS3713	GGA AAA GCT GGC CCT GGG GTG GAG C	
hKlf4-AS1826	TGA TTG TAG TGC TTT CTG GCT GGG CTC C	Endo Klf4 RT-PCR
hMYC-S253	GCG TCC TGG GAA GGG AGA TCC GGA GC	Endo c-Myc
hMYC-AS555	TTG AGG GGC ATC GTC GCG GGA GGC TG	RT-PCR
hMSX1-S665	CGA GAG GAC CCC GTG GAT GCA GAG	MSX1 RT-PCR
hMSX1-AS938	GGC GGC CAT CTT CAG CTT CTC CAG	
hBRACHYURY-S1292	GCC CTC TCC CTC CCC TCC ACG CAC AG	BRACHYURY/T
hBRACHYURY-AS1540	CGG CGC CGT TGC TCA CAG ACC ACA GG	RT-PCR
hGFAP-S1040	GGC CCG CCA CTT GCA GGA GTA CCA GG	GFAP RT-PCR
hGFAP-AS1342	CTT CTG CTC GGG CCC CTC ATG AGA CG	

10

20

30

40

hPAX6-S1206	ACC CAT TAT CCA GAT GTG TTT GCC CGA G	PAX6 RT-PCR
hPAX6-AS1497	ATG GTG AAG CTG GGC ATA GGC GGC AG	
hFOXA2-S208	TGG GAG CGG TGA AGA TGG AAG GCC AC	FOXA2 RT-PCR
hFOXA2-AS398	TCA TGC CAG CGC CCA CGT ACG ACG AC	
hSOX17-S423	CGC TTT CAT GGT GTG GGC TAA GGA CG	SOX17 RT-PCR
hSOX17-AS583	TAG TTG GGG TGG TCC TGC ATG TGC TG	
hAADC-S1378	CGC CAG GAT CCC CGC TTT GAA ATC TG	AADC RT-PCR
hAADC-AS1594	TCG GCC GCC AGC TCT TTG ATG TGT TC	
hChAT-S1360	GGG GGC GTG GAG CTC AGC GAC ACC	ChAT RT-PCR
hChAT-AS1592	CGG GGA GCT CGC TGA CGG AGT CTG	
hMAP2-S6401	CAG GTG GCG GAC GTC TGA AAA TTG AGA GTG	MAP2 RT-PCR
hMAP2-AS5587	CAC GCT GGA TCT GCC TGG GGA CTG TG	
hDAT-S 1935	ACA GAG GGG AGG TGC GCC AGT TCA CG	SLC6A3/DAT RT-PCR
hDAT-AS2207	ACG GGG TGG ACC TCG CTG CAC AGA TC	
hLMX1B-S770	GGC ACC AGC AGC AGC AGG AGC AGC AG	LMX1B RT-PCR
hLMX1B-AS1020	CCA CGT CTG AGG AGC CGA GGA AGC AG	
hMYL2A-S258	GGG CCC CAT CAA CTT CAC CGT CTT CC	MYL2A RT-PCR
hMYL2A-AS468	TGT AGT CGA TGT TCC CCG CCA GGT CC	
hTnTc-S524	ATG AGC GGG AGA AGG AGC GGC AGA AC	TnTc RT-PCR
hTnTc-AS730	TCA ATG GCC AGC ACC TTC CTC CTC TC	
hMEF2C-S1407	TTT AAC ACC GCC AGC GCT CTT CAC CTT G	MEF2C RT-PCR
hMEF2C-AS1618	TCG TGG CGC GTG TGT TGT GGG TAT CTC G	
hMYHCB-S5582	CTG GAG GCC GAG CAG AAG CGC AAC G	MYHCB RT-PCR
hMYHCB-AS5815	GTC CGC CCG CTC CTC TGC CTC ATC C	
dT ₂₀	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT	Reverse transcription
hMYC-S857	GCC ACA GCA AAC CTC CTC ACA GCC CAC	Southern blot probe
hMYC-AS1246	CTC GTC GTT TCC GCA ACA AGT CCT CTT G	
hOct3/4-S	CAC CAT GGC GGG ACA CCT GGC TTC AG	Oct3/4 cloning
hOct3/4-AS	ACC TCA GTT TGA ATG CAT GGG AGA GC	
hSox2-S	CAC CAT GTA CAA CAT GAT GGA GAC GGA GCT G	Sox2 cloning
hSox2-AS	TCA CAT GTG TGA GAG GGG CAG TGT GC	
hKlf4-S	CAC CAT GGC TGT CAG TGA CGC GCT GCT CCC	Klf4 cloning
hKlf4-AS	TTA AAA ATG TCT CTT CAT GTG TAA GGC GAG	

10

20

30

40

hMYC-S	CAC CAT GCC CCT CAA CGT TAG CTT CAC CAA	c-Myc cloning
hMYC-AS	TCA CGC ACA AGA GTT CCG TAG CTG TTC AAG	
Slc7a1-S	CAC CAT GGG CTG CAA AAA CCT GCT CGG	Mouse Slc7a1 cloning
Slc7a1-AS	TCA TTT GCA CTG GTC CAA GTT GCT GTC	
hREX1-pro5K-S	ATT GTC GAC GGG GAT TTG GCA GGG TCA CAG GAC	Promoter cloning
hREX1-pro5K-AS	CCC AGA TCT CCA ATG CCA CCT CCT CCC AAA CG	
hOct3/4-pro5K-S	CACTCG AGG TGG AGG AGC TGA GGG CAC TGT GG	
hOct3/4-pro5K-AS	CAC AGA TCT GAA ATG AGG GCT TGC GAA GGG AC	
mehREX1-F1-S	GGT TTA AAA GGG TAA ATG TGA TTA TAT TTA	Bisulfite sequencing
mehREX1-F1-AS	CAA ACT ACA ACC ACC CAT CAA C	
mehOct3/4 F2-S	GAG GTT GGA GTA GAA GGA TTG TTT TGG TTT	
mehOct3/4 F2-AS	CCC CCC TAA CCC ATC ACC TCC ACC ACC TAA	
mehNanog-F1-S	TGG TTA GGT TGG TTT TAA ATT TTT G	
mehNanog-F1-AS	AAC CCA CCC TTA TAA ATT CTC AAT TA	

10

20

【 0 0 9 9 】

3. レンチウイルス作製及び感染

6 × 10⁶ 細胞の 293FT 細胞 (インビトロジェン) を 100 mm ディッシュに播き、一晚培養した。リポフェクトアミン 2000 (インビトロジェン) を取扱説明書に従って用いて 293FT 細胞に 9 μg のピラパワーパッケージングミックス (Virapower packaging mix) と一緒に 3 μg の pLenti6/Ubc-Slc7a をトランスフェクションした。トランスフェクションの翌日培地交換をおこなった。さらに 24 時間後、上清を回収し、孔径 0.45 μm のセルロースアセテートフィルター (ワットマン) により濾過した。遺伝子導入の 1 日前にヒト線維芽細胞を 8 × 10⁵ 細胞 / 100 mm ディッシュで撒いた。培地を 4 μg / ml ポリブレン (ナカライテスク) を補充したウイルス含有上清液を用いて置換して 24 時間培養した。

30

【 0 1 0 0 】

4. レトロウイルス感染及び iPS 細胞の作出

PLAT-E パッケージ細胞を 8 × 10⁶ 細胞 / 100 mm ディッシュでプレートに撒き、一晚培養した。翌日、PLAT-E 細胞に Eugene6 トランスフェクション試薬 (ロッシュ) を用いて pMXs ベクターをトランスフェクトした。トランスフェクションの 24 時間後、新しい培地と交換し、さらに 24 時間後に培養上清をウイルス含有液として回収した。遺伝子導入の 1 日前にマウス Slc7a1 遺伝子を発現しているヒト線維芽細胞 (HDFa-Slc7a1) を 8 × 10⁵ 細胞 / 100 mm ディッシュに調整し播いておいた。ウイルス含有液を孔径 0.45 μm フィルターにより濾過し、4 μg / ml ポリブレンを補充した。4 種のレトロウイルスをそれぞれ含有する等量の上清液を混合し、HDFa-Slc7a1 のディッシュに移して、一晚感染させた。24 時間後、ウイルスを含む上清を除去し、新しい培地と交換した。6 日後、HDFa-Slc7a1 細

40

50

胞をトリプシン処理により採取し、SNLフィーダー細胞層の上に 5×10^4 細胞/100 mmディッシュに調整し再度播いた。その翌日、培地を 4 ng/ml bFGFを補填した霊長類ES細胞用培地に交換した。培地は一日おきに交換した。遺伝子導入の30日後、コロニーを採取し、 0.2 ml の霊長類ES細胞培地に移した。コロニーを弱いピペティングにより小さな塊に機械的に分離した。この細胞懸濁液をSNLフィーダー細胞をあらかじめ播いておいた24ウェルプレート上に移した。この段階を継代数1とした。

【0101】

5. RNA単離及び逆転写

全RNAをトライゾール試薬(インビトロジェン)により抽出し、ゲノムDNAの混在を除去するためにターボDNAフリーキット(アンピオン)により処理した。 $1 \mu\text{g}$ の全RNAを用いて、Rever Tra Ace-(東洋紡)及びdT₂₀プライマーを取扱説明書に従って用いて逆転写反応を行った。PCRはExTaq(タカラ)で行った。定量的PCRはプラチナSYBRグリーンqPCRスーパーミックスUDG(インビトロジェン)を用いて行い、7300リアルタイムPCRシステム(アプライドバイオシステム)により分析した。プライマー配列を表8に示す。

【0102】

6. アルカリフォスファターゼ染色及び免疫組織化学分析

アルカリフォスファターゼ染色は、白血球アルカリフォスファターゼキット(シグマ)を用いて行った。免疫組織化学分析のために、細胞を室温で10分間4%のパラホルムアルデヒドを含有するPBSにより固定した。PBSで洗浄後、細胞を室温で45分間、5%正常ヤギ又はロバ血清(ケミコン)、1%ウシ血清アルブミン(BSA、ナカライテスク)、及び0.1%トリトンX-100を含むPBSにより処理した。一次抗体としてSSEA1(1:100に希釈、デベロップメンタルスタディーズハイブリドーマバンク)、SSEA3(1:10に希釈、Dr. Peter W. Andrewsから寄贈)、SSEA4(1:100に希釈、デベロップスタディーハイブリドーマバンク)、TRA-2-49/6E(1:20に希釈、デベロップメンタルスタディーズハイブリドーマバンク)、TRA-1-60(1:50に希釈、Dr. Peter W. Andrewsから寄贈)、TRA-1-81(1:50に希釈、Dr. Peter W. Andrewsから寄贈)、Nanog(1:20に希釈、AF1997、R&Dシステム)、IIIチューブリン(1:100に希釈、CB412、ケミコン)、グリア原繊維酸性蛋白(1:500に希釈、Z0334、ダコ)、平滑筋アクチン(希釈済み、N1584、ダコ)、デスミン(1:100に希釈ラビビジョン)、ビメンチン(1:100に希釈、SC-6260、サンタクルズ)、-フェトプロテイン(1:100に希釈、MAB1368、R&Dシステム)、チロシンヒドロキシラーゼ(1:100に希釈、AB152、ケミコン)を使用した。二次抗体は、cyanine 3(Cy3)結合ヤギ抗ラットIgM(1:500期尺、ジャクソン・イムノリサーチ)、Alexa 546結合ヤギ抗マウスIgM(1:500に希釈、インビトロジェン)、Alexa 488結合ヤギ抗ウサギIgG(1:500に希釈、インビトロジェン)、Alexa 488結合ロバ抗ヤギIgG(1:500に希釈、インビトロジェン)、Cy3結合ヤギ抗マウスIgG(1:500に希釈、ケミコン)、及びAlexa 488結合ヤギ抗マウスIgG(1:500に希釈、インビトロジェン)を使用した。核は $1 \mu\text{g/ml}$ のHoechst 33342(インビトロジェン)により染色した。

【0103】

7. インビトロでの分化

ヒトiPS細胞をコラゲナーゼIVにより処理した後、hydroxyrthyl methacrylateでコートしたディッシュ上に移し20%KSR(インビトロジェン)、 2 mM L-グルタミン、 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ 非必須アミノ酸、 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ 2-メルカプトエタノール(インビトロジェン)及び0.5%のペニシリン及びストレプトマイシンを含むDMEM/F12培地を使用し、浮遊培養を行い胚様体(EBs)を形成した。培地は一日おきに交換した。浮遊培養の8日後、EBsをゼラチンコートしたプレー

10

20

30

40

50

トに移し、同じ培地中でさらに8日間培養した。

ドーパミン作用性ニューロンへの分化のために、まず、PA6フィーダー細胞をゼラチンコートされた6ウェルプレート上に撒き、コンフルエントになるまで4日間インキュベートした。EBsを介して培養したiPS細胞の小さな塊をPA6フィーダー細胞層上加え、10%KSR(インビトロジェン)、 1×10^{-4} M非必須アミノ酸、及び 1×10^{-4} M 2-メルカプトエタノール(インビトロジェン)、並びに0.5%ペニシリン及びストレプトマイシンを含むグラスゴー最小必須培地(インビトロジェン)を用いて培養した。

心筋細胞への分化のためには、iPS細胞をマトリゲルコートされたプレート上で4 ng/ml bFGFを補充したMEF-CM中に6日間維持した。その後、RPMI1640にB27サプリメント(インビトロジェン)を補充した培地(RPMI/B27)に100 ng/mlヒト組換えアクチビンA(R&Dシステム)を添加した培地を用いて24時間培養し、続いて10 ng/mlヒト組換え骨形成因子4(BMP4、R&Dシステム)を補充してさらに4日間置いた。サイトカインによる刺激後、細胞はサイトカイン無しでRPMI/B27中に維持した。培地は一日おきに交換した。

【0104】

8. バイサルファイトシーケンス法

ゲノムDNA(1 µg)を、CpゲノムDNA修飾キット(ケミコン)を用いて製造業者が推奨する方法に従って処理した。処理したDNAをQIAquickカラム(QIAGEN)により精製した。ヒトOct3/4、Nanog、及びRex1遺伝子のプロモーター領域をPCRによって増幅した。PCR産物をpCR2.1-TOPOにサブクローニングした。それぞれのサンプルの10クローンをM13ユニバーサルプライマーを用いてシーケンシングした。PCR増幅に使用したプライマー配列を表8に示した。

【0105】

9. ルシフェラーゼアッセイ

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むそれぞれのレポータープラズミド(1 µg)を50 ngのpRL-TK(プロメガ)を用いてヒトiPS細胞又はHDFに導入した。遺伝子導入の48時間後、細胞を1xPassive lysis buffer(プロメガ)により溶解し、室温で15分間インキュベートした。ルシフェラーゼ活性をDualルシフェラーゼレポーターアッセイシステム(プロメガ)及びCentro LB 960検出システム(バーソルド)を用いて製造業者のプロトコルに従って測定した。

【0106】

10. 奇形腫形成

細胞をコラゲナーゼIV処理により採取し、チューブに回収して遠心し、ペレットをDMEM/F12に懸濁した。コンフルエントな100 mmディッシュから取った細胞の4分の1をSCIDマウス(日本クレア)の背側の側腹部へ皮下注入した。9週間後に腫瘍を切除して重量を測定し、4%パラホルムアルデヒドを含有するPBSにより固定した。パラフィン包埋した組織をスライスし、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

【0107】

11. ウェスタンブロット

セミコンフルエント状態にある細胞をプロテアーゼ阻害剤カクテル(ロッシュ)を補充したRIPA緩衝液(50 mM Tris-HCl、pH 8.0、150 mM NaCl、1% Nonidet P-40(NP-40)、1%デオキシコール酸ナトリウム及び0.1% SDS)により溶解した。MEL-1ヒトES細胞株の細胞溶解物をアブカムから購入した。細胞溶解物(20 µg)を8%又は12% SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、ポリビニリデンジフルオリド膜(ミリポア)に移した。膜は1%スキムミルクを含むTBST(20 mM Tris-HCl、pH 7.6、136 mM NaCl、及び0.1% Tween-20)でブロッキングし、その後、一晚4℃で一次抗体を反応させた。TBSTによる洗浄後、膜を西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合二次抗体とともに室温で一時間反応させた。シグナルをイモビロンウェスタン化学発光H

10

20

30

40

50

R P 基質 (ミリポア) 及び L A S 3 0 0 0 画像化システム (富士フィルム) により検出した。1 次抗体としては、抗 O c t 3 / 4 (1 : 6 0 0 に希釈、S C - 5 2 7 9、サンタクルズ)、抗 S o x 2 (1 : 2 0 0 0 に希釈、A B 5 6 0 3、ケミコン)、抗 N a n o g (1 : 2 0 0 に希釈、R & D システム)、抗 K l f 4 (1 : 2 0 0 に希釈、S C - 2 0 6 9 1、サンタクルズ)、抗 c - M y c (1 : 2 0 0 に希釈、S C - 7 6 4、サンタクルズ)、抗 E - c a d h e r i n (1 : 1 0 0 0 に希釈、6 1 0 1 8 2、B D バイオサイエンス)、抗 D p p a 4 (1 : 5 0 0 に希釈、a b 3 1 6 4 8、アブカム)、抗 F o x D 3 (1 : 2 0 0 に希釈、A B 5 6 8 7、ケミコン)、抗 テロメラーゼ (1 : 1 0 0 0 に希釈、a b 2 3 6 9 9、アブカム)、抗 S a l l 4 (1 : 4 0 0 に希釈、a b 2 9 1 1 2、アブカム)、抗 L i n 2 8 (1 : 5 0 0 に希釈、A F 3 7 5 7、R & D システム)、抗 アクチン (1 : 5 0 0 0 に希釈、A 5 4 4 1、シグマ)、2 次抗体としては抗マウス I g G - H R P (1 : 3 0 0 0 に希釈、# 7 0 7 6、セルシグナリング)、抗ウサギ I g G - H R P (1 : 2 0 0 0 に希釈、# 7 0 7 4、セルシグナリング)、及び抗ヤギ I g G - H R P (1 : 3 0 0 0 に希釈、S C - 2 0 5 6、サンタクルズ) を使用した。

10

【 0 1 0 8 】

1 2 . サザンプロット

ゲノム DNA (5 μ g) を、B g l I I , E c o R I、及び N c o I により一晩消化した。消化した DNA フラグメントを 0 . 8 % アガロースゲルで分離し、ナイロン膜 (アマシヤム) に移した。膜をジゴキシゲニン (D I G) で標識した DNA プローブと共に D I G E a s y H y b 緩衝液 (ロッシュ) 中で一定の振盪下に 4 2 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合抗 D I G 抗体 (1 : 1 0 0 0 0 に希釈、ロッシュ) を膜に添加した。シグナルは C D P スター (ロッシュ) により増強させ、L A S 3 0 0 0 画像化システムにより検出した。

20

【 0 1 0 9 】

1 3 . ショートタンDEMリピート分析及び核型分析 (k a r y o t y p i n g)

ゲノム DNA を用いて、パワーブックス 1 6 システム (プロメガ) により P C R を行い、A B I P R I S M 3 1 0 0 G e n e t i c a n a l y z e r 及び G e n e M a p p e r v 3 . 5 (アプライドバイオシステム) により分析した。染色体 G バンド分析は日本遺伝子研究所 (日本) で行った。

30

【 0 1 1 0 】

1 4 . テロメラーゼ活性の検出

テロメラーゼ活性は T R A P E Z E テロメラーゼ検出キット (ケミコン) により取扱説明書に従って検出した。サンプルは T B E をベースにした 1 0 % アクリルアミド非変性ゲル電気泳動により分離した。ゲルは S Y B R ゴールド (1 : 1 0 0 0 0 に希釈、インビトロジェン) により染色した。

【 0 1 1 1 】

1 5 . クロマチン免疫沈降アッセイ

約 1×10^7 個の細胞を室温下で 1 % ホルムアルデヒドで 5 分間架橋し、グリシン添加により反応を停止した。細胞ライセートを超音波処理することにより、クロマチン - D N A 複合体を切断した。D y n a b e a d s P r o t e i n G (インビトロジェン) 結合抗トリメチル L y s 4 ヒストン H 3 (0 7 - 4 7 3 , U p s t a t e)、抗トリメチル L y s 2 7 ヒストン H 3 (0 7 - 4 4 9 , U p s t a t e)、又は正常ウサギ I g G 抗体を用いて免疫沈降を行った。溶出液を定量的 P C R の鋳型として用いた。

40

【 0 1 1 2 】

1 6 . D N A マイクロアレイ

H D F 及び h i P S 細胞 (クローン 2 0 1 B) からの全 R N A を C y 3 により標識した。サンプルを全ヒトゲノムマイクロアレイ 4 x 4 4 K (G 4 1 1 2 F、アジレント) とハイブリダイズさせた。各サンプルは 1 つのカラープロトコールと 1 回ハイブリダイズさせた。アレイを G 2 5 6 5 B A マイクロアレイスキャナーシステム (アジレント) を用いてスキャンし、データを G e n e S p r i n g G X 7 . 3 . 1 ソフトウェアを用いて分析し

50

た。2種の標準化手法を適用した。まず、0.01未満のシグナル強度を0.01と設定した。次いで、各チップを、そのチップから取得した測定の50番目の百分位数に標準化した。hES H9細胞のマイクロアレイデータ(Tesar et al., Nature, 448, pp. 196-199, 2007)をGEO Data Sets (GSM194390, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gds&cmd=search&term=GSE7902>)から回収した。3つの全てのサンプルにおいて present フラグ値を有する遺伝子を分析に用いた(32, 266遺伝子)。HDF及びhiPS細胞のマイクロアレイデータをGEO Data Setsにアクセス番号GSE9561として登録した。

【0113】

例19: c-Mycを用いないiPS細胞の樹立

Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Mycをマウス線維芽細胞にレトロウイルスを用いて導入することにより得られるマウスiPS細胞(Takahashi et al., Cell, 126, pp. 663-76, 2006)のiPSクローンは各遺伝子について数個のレトロウイルスの組み込みを含んでいる。各クローンは全部で20を超えるレトロウイルスの組み込み部位を有しており、腫瘍形成の危険を増大させる可能性がある。マウスiPS細胞の場合、iPS細胞に由来するキメラマウス及びその子孫の~20%において腫瘍が発生することが分かっており(Okita et al., Nature, 448, pp. 313-17, 2007)、c-Mycレトロウイルスの再活性化は、iPS細胞を用いて作製したキメラマウス及びその子孫マウスにおいて腫瘍形成発生率を増加させる可能性がある。そこでc-Mycを用いずにiPS細胞を樹立する方法を検討した。

【0114】

また、Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Mycの4種の遺伝子のファミリー遺伝子を用いてiPS細胞を樹立できるか否かを検討した。この目的のためにNanog遺伝子調節エレメントによって調節される緑色蛍光タンパク質(GFP)-IRES-Puro^r導入遺伝子を含むマウス胚性線維芽細胞(MEF)を使用した(Okita et al., Nature, 448, pp. 313-317, 2007)。NanogはマウスES細胞及び着床前胚細胞において特異的に発現しているため(Chambers et al., Cell, 113, pp. 643-655, 2003; Mitsui et al., Cell, 113, pp. 631-642, 2003)、iPS細胞誘導における選択マーカーとして有用である。初期化誘導されればGFPが発現し、これがiPS細胞であるとの指標になる。Nanogで選択したiPS細胞はES細胞と区別ができず、生殖系列に寄与する(germline-competent)キメラマウスを作製することが示されている(Wernig et al., Nature, 448, pp. 318-324, 2007; Okita et al., Nature, 448, pp. 313-317, 2007; Maherali et al., Cell Stem Cell, 1, pp. 55-70, 2007)。

【0115】

Oct3/4はPOUDメインを含むOctファミリー転写因子に属する(Ryan et al., Genes Dev 11:1207-25, 1997)。Oct3/4に最も近いホモログはOct1及びOct6である。Oct3/4、Oct1又はOct6を残りの3遺伝子とともにレトロウイルスによりNanogレポーターMEFに導入した。Oct3/4を用いた場合、多くのGFP陽性コロニーが観察された(図23a)。

【0116】

Sox2は高移動度群(high-mobility group; HMG)ドメインの存在によって特徴づけられるSox(SRY関連HMGボックス)転写因子に属する(Schepers et al., Dev. Cell, 3, pp. 167-170, 2002)。Sox1、Sox3、Sox7、Sox15、Sox17、及びSox18について試験を行い、Sox1を用いた場合にGFP陽性コロニーが得られた。また、Sox

10

20

30

40

50

3、Sox15、及びSox18を用いた場合も少数のGFP陽性コロニーが得られた(図23a)。

【0117】

Klf4はショウジョウバエ胚パターンレギュレーターKruppelのアミノ酸配列と類似するアミノ酸配列を含む亜鉛フィンガータンパク質であるKruppel様因子(Klfs)に属する(Dang et al., Int. J. Biochem. Cell Biol., 32, pp. 1103 - 1121, 2000)。Klf1、Klf2、及びKlf5について試験を行い、Klf2を用いた場合にGFP発現コロニーが得られた(図23a)。Klf1及びKlf5を用いた場合もiPS細胞を誘導することができた。

10

【0118】

c-Mycには2種の関連する遺伝子(N-Myc及びL-Myc)が存在する(Adhikary et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 6, pp. 635 - 645, 2005)。N-Myc又はL-Mycを用いることによりGFP陽性コロニーが出現した(図23a)。従って、4遺伝子のファミリー遺伝子を用いることによってiPS細胞を誘導することができることが示された。

【0119】

ファミリー遺伝子についてgeoがFbx15遺伝子座にノックインされたMEF(Tokuzawa et al., Mol. Cell Biol., 23, pp. 2699 - 2708, 2003)からiPS細胞を誘導することができるかどうかを検討したところ、Nanogに基づいた選択で得られた結果と類似した結果が得られた。すなわち、Sox2はSox1又はSox3で置き換えることができ、Klf4はKlf2で置き換えることができ、またc-MycはN-Myc又はL-Mycで置き換えることができた。ファミリー遺伝子を用いて作製された細胞は増殖可能であり、ES細胞と区別ができない形態を呈し、かつヌードマウスにおいて奇形腫を形成した(図24)。従って、これらのファミリー遺伝子がNanogレポーターMEF及びFbx15レポーターMEFの両方からiPS細胞を誘導できることが示された。

20

【0120】

NanogレポーターMEFから数個のES細胞様GFP陽性コロニーがc-Mycを用いることなく得られた(図23a)。先に沖田らはGFP陽性コロニーがc-Mycなしでは得られないことを報告しているが(Okita et al., Nature, 448, pp. 313 - 17, 2007)、この刊行物で報告されている方法と上記の方法との相違点の一つは薬剤選択のタイミングにある。上記刊行物に記載された方法ではピューロマイシン選択を遺伝子導入の7日後に開始しているが、今回の方法では薬剤選択を14日目開始した。NanogレポーターMEFに4遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Myc)又はc-Mycを除いた3遺伝子のいずれかを導入し、遺伝子導入の7日後、14日後、又は21日後にピューロマイシン選択を開始した(図23b)。4遺伝子を用いた場合にはGFP陽性コロニーがすべての条件において観察され、ピューロマイシン選択を遅らせた場合にコロニー数は顕著に増加した。c-Mycを用いない場合は、選択を遺伝子導入の7日後に開始した場合にはGFP陽性コロニーは観察されなかったが、選択を遺伝子導入の14日後又は21日後に開始した場合にGFP陽性コロニーが出現した。コロニー数は各条件において4遺伝子を用いる場合よりも3遺伝子を用いる場合の方が少なかった。c-Mycレトロウイルス以外の3遺伝子(Oct3/4、Sox2、klf4)を導入することで得られたNanogで選択したiPS細胞は、ES細胞マーカー遺伝子をES細胞の場合のレベルに匹敵するレベルで発現しており(図25)、胚盤胞に移植した場合にアダルトのキメラマウスを作出することができた(表9)。

30

40

【0121】

【表 9】

iPS clones	由来の遺伝子型*	選択	注入された 胚盤胞	誕生マウス	キメラマウス
142B-6	MEF-FB/GFP	G418	39	7	3
142B-12			46	12	5
178B-1	MEF-Ng	Puro	156	50	5
178B-2			142	43	17
178B-5			60	20	5
178B-6			28	10	4
256H-4	TTF-ACTB-DsRed	No	72	6	5
256H-13			96	8	5
256H-18			90	17	11

iPS クロームは全て、MEF 又は TTF から MYC を除いた 3 遺伝子で誘導した。

*FB : Fbx15-βgeo レポーター；

Ng : Nanog-GFP-IRES-Puro^r レポーター；

GFP : CAG-EGFP

【0122】

もう一つの相違点は、c-Myc を除いた 3 遺伝子を用いて iPS 細胞を誘導した場合には、GFP 陰性コロニー及びバックグラウンド細胞の数が 4 遺伝子を導入した場合よりも少ないということである（図 23c）。従って、c-Myc を用いずに iPS 細胞を誘導する方法は c-Myc を用いる iPS 細胞誘導に比べて遅く、かつ効率は低下するものの、iPS 細胞誘導の特異性は向上するという利点がある。

【0123】

geo が Fbx15 遺伝子座にノックインされた MEF (Tokuzawa et al., Mol. Cell Biol., 23, pp. 2699-2708, 2003) から c-Myc を用いずに数個の iPS 細胞を生成することができた（図 26A）。先に高橋らは iPS 細胞は c-Myc なしでは得られなかったことを報告しているが (Takahashi et al., Cell, 126, pp. 663-676, 2006)、この刊行物で報告されている方法と上記の方法において、G418 選択は同じタイミング、すなわち遺伝子導入の 3 日後に開始している。しかしながら、上記刊行物で報告されている方法ではコロニーを遺伝子導入の 14~21 日後に選択しているのに対して、今回の実験では約 30 日後にコロニー選択を行っている。また、今回の実験においては 4 遺伝子（又は 3 遺伝子）を含むレトロウイルスをそれぞれ独立した PLAT-E 細胞 (Morita et al., Gene Ther., 7, pp. 1063-1066, 2000) を用いて別々に調製している。この操作によりレトロウイルスのトランスフェクション効率が改善しており、4 遺伝子の全てを単一の Plat-E 細胞で調製した既報の方法に比べて iPS 細胞コロニー数の顕著な増加が観察された。

【0124】

4 遺伝子を用いて作製した Fbx15 選択による iPS 細胞では ES 細胞マーカー遺伝子の発現レベルは ES 細胞に比べて低レベルである (Takahashi et al., Cell, 126, pp. 663-676, 2006)。この iPS 細胞は胚盤胞へマイクロインジェクションした場合にアダルトのキメラマウスを作ることができないが、c-Myc を用いずに作製した iPS 細胞は、Fbx15 選択を用いた場合においても ES 細胞に匹敵するレベルで ES 細胞マーカー遺伝子を発現していた（図 26B）。また、c-Myc を用いずに作製した iPS 細胞からはアダルトのキメラマウスが高い iPS 細胞寄与率で得られた（図 27、表 9）。腫瘍形成の発生率の増加はこれらのキメラマウス

10

20

30

40

50

スにおいては観察されなかった。すなわち、4遺伝子により樹立したiPS細胞由来のキメラマウスは、生後100日以内に37匹中6匹のキメラマウスが腫瘍が原因で死亡したが、c-Mycの無い3遺伝子により樹立したiPS細胞由来のキメラマウスは、26匹のキメラ全てが観察期間内(4か月弱)生存していたことから、c-Mycを用いないことにより、腫瘍形成性のリスクが減少することが明らかとなった。

【0125】

c-Mycを用いずに、かつ薬剤選択なしでiPS細胞を効率的に単離できるか否かを調べた。4遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Myc)又はc-Mycを除く3遺伝子をNanogレポーターを含むアダルトの尻尾線維芽細胞(tail tip fibroblasts; TTF)に導入し、ピューロマイシン選択を適用せずに培養を継続した。遺伝子導入された細胞を視覚化するために、DsRedレトロウイルスを4遺伝子又は3遺伝子とともに導入した。レトロウイルス導入の30日後には、4遺伝子を用いて遺伝子導入したディッシュは多数のGFP陰性コロニー及びバックグラウンド細胞で覆われた(図28A、表10: Nanog-GFPレポーターTTF+薬剤選択なし)。表中の括弧内の数値は、GFP陽性コロニー又はクローンの数を示す。レトロウイルス(Oct3/4, Sox2, Klf4, (c-Myc), 及びDsRed)の割合は、No. 256において1:1:1:(1):4、No. 272及び309において1:1:1:(1):1であった。No. 220においてはDsRedを導入しなかった。

【0126】

【表10】

実験番号	遺伝子	まかれた細胞数	コロニーの合計	ピックアップされたコロニー数	樹立されたコロニー数
220	4	5x10 ⁴	many (107)	26(24)	25(22)
256	4	5x10 ⁴	many (4)		
	3	3.5x10 ⁵	7(4)	7(4)	6(5)
272	4	5.4x10 ⁴	many (132)	6(6)	5(4)
	3	3.1x10 ⁵	21(8)	4(4)	2(2)
309	4	2.3x10 ⁴	many (424)		
	3	9.6x10 ⁵	43(24)		

【0127】

蛍光顕微鏡下でこれらのコロニーのなかにGFP陽性コロニーが観察された(3回の独立した実験において4個、132個、及び424個のコロニー)。GFP陽性コロニーはDsRed陰性であり、この結果はNanogで選択したiPS細胞において観察されたレトロウイルスのサイレンシングの結果と一致していた(Okita et al., Nature, 448, pp. 313-17, 2007)。c-Mycを除いた3遺伝子を用いた場合には、コロニーのなかでバックグラウンド細胞をほとんど持たないコロニーとして観察された(3回の独立した実験において7個、21個、及び43個)。これらのコロニーの約半分はパッチ状態(patchy manner)でGFPを発現していた。DsRedは少数のコロニーにおいてのみ検出され、DsRedは大部分がサイレンシングされていることが示された。GFP及びDsRedの間でオーバーラップは観察されなかった。これらのコロニーのほとんどは増殖可能であり、継代数2においてもGFP陽性であり、かつDsRed陰性であった。従って、薬剤選択を行わない場合においてもc-Mycを用いることなくiPS細胞を作製でき、iPS細胞作製の特異性が向上することが示された。このiPS細胞においてはNanog-GFPは活性化され、かつレトロウ

イルスはサイレンシングされていた。

【0128】

選択マーカーを有さないが、構成的に活性なプロモーターによって調節される *DsRed* 組換え遺伝子 (*Vintersten et al., Genesis, 40, pp. 241-246, 2004*) を有するアダルト TTF から、iPS 細胞の作製を試みた。4 遺伝子 (*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、及び *c-Myc*) 又は *c-Myc* を除く 3 遺伝子を細胞に導入した。さらに GFP レトロウイルスを導入してサイレンシングをモニターした。4 遺伝子を導入した 0.5×10^5 個の細胞から薬剤選択なしで 30 日後に約 1,000 個のコロニーが出現した。これらの大部分は GFP 陽性であり、これらの細胞ではレトロウイルスのサイレンシングが生じていないことが示された。一方、*c-Myc* を除いた 3 遺伝子を導入した 3.5×10^5 個の細胞から 16 個のコロニーが出現した (図 28B)。これらのコロニーの大部分は GFP を発現しておらず、残りのコロニーはわずかに GFP を発現していた。これらのコロニーは全て増殖可能であり、継代数 2 においても iPS 細胞の形態 (ES 細胞様形態) を示した。また、これらの細胞は全て GFP 陰性であり、レトロウイルスのサイレンシングが生じていることが示された。RT-PCR により、これらの細胞では ES 細胞に匹敵するレベルで ES 細胞マーカー遺伝子が発現していることが示された (図 28C)。さらに、RT-PCR により 3 遺伝子を用いて作製された iPS 細胞において *Klf4* のレトロウイルスのサイレンシング及び *c-Myc* 導入遺伝子の不存在が確認され、これらの iPS 細胞を胚盤胞に移植した場合にはキメラマウスが得られた (図 28D 及び表 9)。以上の結果から、*c-Myc* を用いることなく優れた特性を有する iPS 細胞を得ることができ、薬剤選択を用いることなくアダルト TTF から iPS 細胞を効率的に作製できることが示された。

10

20

【0129】

次に、*Oct3/4*、*Sox2* 及び *Klf4* に対するレトロウイルスをヒト新生児包皮由来線維芽細胞 (BJ) (クローン 246H) 又はヒト成人皮膚由来繊維芽細胞 HDF (253G) に導入した。30 日後、数個のヒト iPS 細胞コロニーが出現した。これらの細胞はヒト ES 細胞様のコロニー形態を示し、かつ増殖することができた (図 29A)。*c-Myc* 以外の 3 遺伝子を導入した場合 (253G)、又は *c-Myc* に 3 遺伝子を加えて同時に導入した場合 (253F) に、HDF に由来するヒト iPS 細胞が ES 細胞マーカー遺伝子を発現することが確認された (図 29B)。また、*c-Myc* レトロウイルスを用いずに誘導されたヒト iPS 細胞の胚様体を介した分化が確認された (図 30)。

30

【0130】

例 19 における実験材料及び方法は以下の通りである。

1. プラスミドの構築

ファミリー遺伝子のコード領域を表 11 (配列表の配列番号 127 から 152) にリストしたプライマーを用いた RT-PCR により増幅し、pDONR201 又は pENTR-D-TOPO (インビトロジェン) にサブクローニングし、LR 反応 (インビトロジェン) により pMXs-gw に連結した。

【0131】

【表 1 1】

Genes	Sequences
Sox1	CAC CAT GTA CAG CAT GAT GAT GGA GAC CGA CCT
	CTA GAT ATG CGT CAG GGG CAC CGT GC
Sox3	CAC CAT GTA CAG OCT GCT GGA GAC TGA ACT CAA G
	TCA GAT GTG GGT CAG CGG CAC CGT TCC ATT
Sox7	CAC CTC GGC CAT GGC CTC GCT GCT GGG
	CTC CAT TCC TCC AGC TCT ATG ACA CAC
Sox15	CAC CAT GGC GCT GAC CAG CTC CTC ACA A
	TTA AAG GTG GGT TAC TGG CAT GGG
Sox17	CAC CAG AGC CAT GAG CAG CCC GGA TG
	CGT CAA ATG TCG GGG TAG TTG CAA TA
Sox18	CAC CAT GCA GAG ATC GCC GCC CGG CTA CG
	CTA GCC TGA GAT GCA AGC ACT GTA ATA GAC
Oct1	CAC CAT GAA TAA TCC ATC AGA AAC CAA T
	GCT CTG CAC TCA GCT CAC TGT GCC
Oct6	CAC CAT GGC CAC CAC CGC GCA GTA TCT G
	GGA ACC CAG TCC GCA GGG TCA CTG
Klf1	CAC CAT GAG GCA GAA GAG AGA GAG GAG GC
	TCA GAG GTG ACG CTT CAT GTG CAG AGC TAA
Klf2	CAC CAT GGC GCT CAG CGA GCC TAT CTT GCC
	CTA CAT ATG TCG CTT CAT GTG CAA GGC CAG
Klf5	CAC CAT GCC CAC GCG GGT GCT GAC CAT G
	TCG CTC AGT TCT GGT GGC GCT TCA
L-MycWT	CAC CAT GGA CTT CGA CTC GTA TCA GCA CTA TTT C
	TTA GTA GCC ACT GAG GTA CGC GAT TCT CTT
N-MycWT	CAC CAT GCC CAG CTG CAC CGC GTC CAC CAT
	TTA GCA AGT CCG AGC GTG TTC GAT CT

10

20

30

【 0 1 3 2 】

2. レトロウイルスの形質導入

Fugene 6 試薬 (ロッシュ) を製造業者の指示に従って用いて pMXs に基づいたレトロウイルスベクターを PLAT-E 細胞 (Morita et al., Gene Ther., 7, pp. 1063 - 1066, 2000) にトランスフェクションした。24 時間後に培地を交換し、さらに 24 時間後にウイルス含有上清を採取し、レトロウイルス感染による遺伝子導入を行った。「混合」プロトコルでは 4 遺伝子をそれぞれ含むベクターの混合物を用いて PLAT-E 細胞の単一ディッシュに遺伝子導入した。「個別」方法では、各ベクターを PLAT-E 細胞を含む個別のディッシュに遺伝子導入した。ウイルス含有上清は遺伝子導入の前に混合した。「個別」方法において有意に高い遺伝子導入効率が観察された。

40

【 0 1 3 3 】

3. 薬剤選択を用いた iPS 細胞の誘導

iPS 細胞の誘導は既報の方法 (Takahashi et al., Cell, 12

50

6, pp. 663 - 676, 2006; Okita et al., Nature, 448, pp. 313 - 17, 2007) を修正して行った。Nanog - GFP - IRES - Puror レポーター又は Fbx15 - geo レポーターのいずれか又は両方を含む MEF を SNL フィーダー細胞 (McMahon et al., Cell, 62, pp. 1073 - 1085, 1990) をあらかじめ播いておいた 6 ウェルプレート及び 100 mm ディッシュに 1.3×10^5 細胞/ウェル (6 ウェルプレート) 及び 8.0×10^5 細胞/ウェル (100 mm ディッシュ) の割合で撒いた。遺伝子を導入した細胞を LIF (Meiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93, pp. 14041 - 14046, 1996) を含む ES 細胞用培地で培養した。G418 ($300 \mu\text{g}/\text{ml}$) 又はピューロマイシン ($1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) による選択は既報の方法の通り開始した。遺伝子導入の 25 日から 3 日後にコロニー数を測定した。コロニーの一部を選択して継代させた。

10

【0134】

4. 薬剤選択を用いない iPS 細胞誘導

TTF をアダルト Nanog レポーターマウス又はアダルト DsRed トランスジェニックマウスから単離した (Vintersten et al., Genesis, 40, pp. 241 - 246, 2004)。レトロウイルス含有上清は「個別」方法で調製した。4 遺伝子の導入のために Klf4、c-Myc、Oct3/4、Sox2、及び DsRed のレトロウイルス含有上清を 1:1:1:1:4 の比率で混合した。3 遺伝子を導入する場合は、Klf4、Oct3/4、Sox2、Mock (空ベクター)、及び DsRed のレトロウイルス含有上清を、1:1:1:1:4 の比率で混合した。DsRed トランスジェニックマウスについては、GFP レトロウイルスを DsRed の代わりに使用した。トランスフェクションのために TTF をフィーダー細胞層を有しない 100 mm ディッシュに 1 ディッシュあたり 8.0×10^5 細胞の割合で撒いた。TTF にウイルス/ポリブレン含有上清を添加し、24 時間感染させた。遺伝子導入の 4 日後に 3 遺伝子を導入した TTF を SNL フィーダー細胞層を有する 100 mm ディッシュに 1 ディッシュあたり 3.5×10^5 細胞の割合で再び撒き、ES 細胞用培地で培養した。4 遺伝子を導入した TTF は SNL フィーダー細胞層を有する 100 mm ディッシュに 1 ディッシュあたり 0.5×10^5 細胞の割合で再度撒いた。遺伝子導入の 30 日から 40 日後にコロニー数を測定した。コロニーの一部を選択して継代した。

20

30

5. iPS 細胞の評価

RT-PCR 及び奇形腫形成を既報の方法の通り行った。キメラ実験については 15 から 20 個の iPS 細胞を BDF1 由来胚盤胞に注入し、これを偽妊娠マウスの子宮に移植した。

【0135】

例 20: 6 遺伝子を用いた上皮細胞からのヒト iPS 細胞の樹立

下記遺伝子: Klf4、c-Myc、Oct3/4、Sox2、Nanog、及び Lin28 (NCBI accession number NM_145833 (マウス) 又は NM_024674 (ヒト)) の組み合わせ、又はその組み合わせから 1 又は 2 以上の遺伝子を除いた組み合わせを用いて iPS 細胞の誘導を行った。

40

【0136】

6×10^6 個の 293FT 細胞を 10 cm シャーレに播いて一晩培養し、このシャーレに $3 \mu\text{g}$ の pLenti6/Ubc-Slc7a1 レンチウイルスベクターを $9 \mu\text{g}$ の Virapower packaging mix と一緒にリポフェクトアミン 2000 (インビトロジェン) を用いてトランスフェクションした。24 時間後、培地を新しい培地に交換した。さらに 20 時間後、培養上清を採取し、孔径 $0.45 - \mu\text{m}$ のセルロースアセテートフィルター (ワットマン) で濾過した。 5×10^5 個の上皮細胞を前日に用意した。培養上清を取り除いた上皮細胞のシャーレに上記の濾過した培養上清に $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のポリブレン (ナカライタスク) を添加したものを加え、細胞を 24 時間培養した。

【0137】

50

6 cmのシャーレに 1.0×10^6 個のPLAT-E細胞を播いて培養した。その翌日、細胞にKlf4、c-Myc、Oct3/4、Sox2、Nanog、及びLin28を含むpMXを基礎としたレトロウイルスベクター $9.0 \mu\text{g}$ を $27 \mu\text{l}$ のFugene 6トランスフェクション試薬(ロシュ)を用いてトランスフェクションした。24時間後、培地を新しい培地に交換した。さらに次の日、PLAT-E細胞の上清を回収し、孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のセルロースアセテート・フィルター(ワットマン)で濾過した。レンチウイルス感染の7日後に、上皮細胞を 3.0×10^5 /6 cmディッシュに播き直し、レトロウイルスとポリブレンを含む上記の培養上清を添加した。

【0138】

結果を表12に示す。表中の“6F”は6遺伝子(Klf4、c-Myc、Oct3/4、Sox2、Nanog、及びLin28)を示し、“L”はLin28、“N”はNanog、“M”はc-Myc、“O”はOct3/4、“S”はSox2、“K”はKlf4をそれぞれ示す。文字の前の“-”は“-”に続く文字が示す遺伝子を上記6遺伝子から除いた場合を意味しており、例えば“-L”は6遺伝子からLin28を除いた残りの5遺伝子を意味し、“-KS”は6遺伝子からKlf4及びSox2を除いた4遺伝子を意味する。表中の数値はコロニー数を示し、“non-ES like”は非ES様形態を有するコロニーを示し、“ES like”はES様細胞形態を有するコロニーを示す。

【0139】

【表12】

	Day 23		Day 29		Day 23	
	non ES like	ES like	non ES like	ES like	non ES like	ES like
6F	59	39	167	42	16	27
-L	49	5	53	14		
-N	220	11	216	47		
-M	2	0	15	0		
-O	0	0	0	0		
-S	491	0	489	0		
-K	61	0	51	0		
-KS	1208	0	1305	0		
-KO	0	0	0	0		
-KM	0	0	0	0	0	0
-KN	51	0	57	0		
-KL	28	0	41	0		
-SO	0	0	0	0		
-SM	0	0	0	0		
-SN	188	0	171	0		
-SL	112	0	136	0		
-OM	0	0	0	0		
-ON	0	0	0	0		
-OL	0	0	0	0		
-MN	3	0	8	0		
-ML	0	0	0	0		
-NL	98	1	119	9	17	6
GFP	0	0	0	0		
KO	0	0	0	0		
KS	0	0	0	0		

【0140】

表12には2回の実験結果を示した。1回目の実験結果は、遺伝子導入後23日又は29日目に各遺伝子の組み合わせを導入して誘導した細胞のコロニー数を示し、2回目の実験結果(右欄のDay 23)は“6F”、“-KM”、及び“-NL”の場合のコロニー数を示す。-LのようにLin28を導入しない細胞のコロニー数の方がLin-

28を導入した場合のコロニー数よりも少なかったことから、Lin28がiPS細胞の樹立効率を向上させるのに重要な役割を担っていることが示された。

【0141】

さらに、6遺伝子(Klf4、c-Myc、Oct3/4、Sox2、Nanog、及びLin28)、及び4遺伝子の2つの異なる組み合わせ(図31においてY4Fで示されるKlf4、c-Myc、Oct3/4、及びSox2、並びに図31においてT4Fで示されるOct3/4、Sox2、Nanog、及びLin28)を用いてiPS細胞誘導を行った。T4FはYu et al., Science, 318, pp. 1917-1920, 2007に開示されているものと同じ組み合わせである。図31において“ES-like”はES細胞のコロニーと形態的に類似したコロニーの数を示し、“total”はES様コロニーと非ES様コロニーの数の総数を示す。Exp#1、Exp#2、Exp#3、及びExp#4はそれぞれ個別に実験を行った結果を示す。これらの実験において、6遺伝子及びY4Fの4遺伝子の組み合わせを用いることによってES様細胞コロニーと類似した形態を有するiPS細胞コロニーが得られた。しかしながら、T4Fの組み合わせでは、ES様細胞コロニーと類似した形態を有するコロニーの生成は認められなかった。

10

【0142】

例21：Sal14を用いた効率的なiPS細胞の生成

マウス胚性線維芽細胞(MEF)及びヒト成人皮膚由来繊維芽細胞(adult HDF)を用いて実験を行った結果、3遺伝子(Klf4、Oct3/4、及びSox2)を用いたiPS細胞誘導は、Sal14をこの組み合わせに加えた場合、即ちKlf4、Oct3/4、Sox2、及びSal14を用いた場合にiPS細胞の作製効率を上昇させることが判明した(図32及び33)。Sal14を4遺伝子(Klf4、Oct3/4、Sox2、及びc-Myc)に加えた場合、より多数のiPS細胞コロニーが観察された。これらの実験から、核初期化因子にSal14を追加することによってiPS細胞の誘導効率を改善できることが示された。

20

【0143】

例22：マウスSal14及び/又はマウスSal11のiPS細胞誘導促進効果

既報の方法(Cell, 131, pp. 861-872, 2007)に従い、レンチウイルスを用いてマウスエクトロピックレセプターSlc7a遺伝子を発現させた成人皮膚由来線維芽細胞(adult HDF)に、ヒト由来の4遺伝子(Y4F: Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Myc)又は3遺伝子(Y3F: Oct3/4、Sox2、及びKlf4)と、マウスSal14(mSal14)遺伝子又はマウスSal11(mSal11)遺伝子とをレトロウイルスを用いて導入した。

30

【0144】

導入後6日目に一旦HDFを回収し、その後 5×10^5 個に調整したHDFを 1.5×10^6 個のマイトマイシンCで処理したSTO細胞上に播種した。翌日以降は、4ng/mlのリコンビナントヒトbFGF(WAKO)を含んだ霊長類ES細胞培養用培地(リプロセル)で培養した。感染後32日目及び40日目にES細胞様コロニー数をカウントした結果を図34に示す。感染後32日目においては、Y3F+Mock(空ベクター)を導入した場合のコロニー数は1個、Y4F+Mockを導入した場合のコロニー数は37個であったのに対して、Y3F又はY4Fと同時にSal14を導入した場合にはY3F+mSal14導入群で22個、Y4F+mSal14導入群で73個のコロニーが認められた。Y3F又はY4FにmSal11を導入した場合には、Y3F+mSal11導入群で2個、Y4F+mSal11導入群で43個のコロニーが認められ、Y3F又はY4Fのみを導入した場合と比べてコロニー数の差は大きくなかった。さらにY3F又はY4FにmSal14とmSal11とを同時に導入した場合のコロニー数は、Y3F+mSal14+mSal11導入群で34個、Y4F+mSal14+mSal11導入群で79個であった。

40

【0145】

50

感染後40日目においては、Y3F+Mockを導入した場合のコロニー数は8個、Y4F+Mockを導入した場合のコロニー数は57個であったのに対して、Y3F又はY4Fと同時にmSall4を導入した場合にはY3F+mSall4導入群で62個、Y4F+mSall4導入群で167個のコロニーが認められた。Y3F又はY4FにmSall1を導入した場合には、Y3F+mSall1導入群で14個、Y4F+mSall1導入群で103個のコロニーが認められた。さらにY3F又はY4FにmSall4とmSall1とを同時に導入した場合のコロニー数はY3F+mSall4+mSall1導入群で98個、Y4F+mSall4+mSall1導入群で193個であった。以上の結果から、Y3FにmSall4を導入することにより、又はmSall4とmSall1とを同時に導入することによって20ないし100倍の効率でヒトiPS細胞を誘導できることが示された。また、Y4FにmSall4を導入することにより、又はmSall4とmSall1とを同時に導入することによって2ないし4倍の効率でヒトiPS細胞を誘導できることも示された。

10

【0146】

例23：マウスSall4及び/又はマウスSall1のiPS細胞誘導促進効果(2)

既報の方法(Cell, 131, pp. 861-872, 2007)に従い、レンチウイルスを用いてマウスエコトロピック受容体Slc7aを発現させたヒト成人皮膚由来線維芽細胞(HDfa-Slc7a1)にヒト由来の4遺伝子(T4F: Oct3/4、Sox2、Nanog、及びLin28)又は3遺伝子(T3F: Oct3/4、Sox2、及びNanog)とともに、マウスSall4(mSall4)又はマウスSall1(mSall1)あるいはその両方をレトロウイルスを用いて導入した。

20

【0147】

導入後6日目に一旦HDfa-Slc7a1を回収し、その後 5×10^5 個に調整したHDfa-Slc7a1を 1.5×10^6 個のマイトマイシンCで処理したSTO細胞の上に播種した。さらに7日間培養した後、リコンビナントヒト4ng/ml bFGF(和光純薬)を含んだ霊長類ES細胞培養用培地(リプロセル)で培養した。感染後32日目及び40日目にES細胞様コロニー数をカウントした結果を図35に示す。感染後32日目においては、T3F+Mock及びT4F+Mockを導入した場合のコロニー数は0個であったのに対して、T3F又はT4Fと同時にmSall4を導入した場合にはT3F+mSall4導入群で2個のコロニーが認められた。T4F+mSall4導入群ではヒトES細胞様コロニーは確認できなかった。

30

【0148】

T3F又はT4Fと同時にmSall1を導入した場合にはT3F+mSall1導入群で3個、T4F+mSall1導入群では6個のコロニーが認められた。さらにT3F又はT4FとともにmSall4とmSall1とを同時に導入した場合には、T3F+mSall4+mSall1導入群で3個のコロニーが認められた。T4F+mSall4+mSall1導入群ではヒトES様コロニーは確認できなかった。感染後40日目においては、T3F+Mock及びT4F+Mockを導入した場合のコロニー数は0個であったのに対して、T3F又はT4Fと同時にmSall4を導入した場合にはT3F+mSall4導入群で6個のコロニーが認められ、T4F+mSall4導入群で2個のコロニーが認められた。

40

【0149】

T3F又はT4Fと同時にmSall1を導入した場合にはT3F+mSall1導入群で13個、T4F+mSall1導入群で22個のコロニーが認められた。さらにT3F又はT4FにmSall4とmSall1とを同時に導入した場合には、T3F+mSall4+mSall1導入群で17個のコロニーが認められ、T4F+mSall4+mSall1導入群では11個のコロニーが認められた。T3F及びT4Fの導入によるiPS細胞樹立においては、mSall4を追加することでiPS細胞コロニー形成における促進効果が認められ、mSall1のほうがより効率的にヒトiPS細胞コロニーの形成を誘導した。さらにmSall1とmSall4の両方をT3F又はT4Fとともに

50

導入することによってヒト*iPS*細胞のコロニー形成をより促進できることが分かった。

【0150】

例24：ヒト*Sa114*の*iPS*細胞誘導促進効果

Cell, 131, pp. 861 - 872, 2007に記載の方法に従い、レンチウイルスを用いてマウスエクトロピック受容体*Slc7a*を発現させたヒト成人皮膚由来線維芽細胞(*HDFa-Slc7a1*)を用意し、翌日、ヒト由来の4遺伝子(*Y4F: Oct3/4, Sox2, Klf4*、及び*c-Myc*)又は3遺伝子(*Y3F: Oct3/4, Sox2, Klf4*)とヒト*Sa114*(*hSa114*)とをレトロウイルスを用いて導入した。導入後6日目に一旦*HDF*を回収し、その後 5×10^5 個に調整した*HDF*を 1.5×10^6 個のマイトマイシンCで処理した*STO*細胞の上に播種した。翌日以降は4 ng/mlリコンビナントヒト*bFGF*(和光純薬)を含んだ霊長類*ES*細胞培養用培地(リプロセル)で培養した。感染後32日目及び40日目に*ES*細胞様コロニー数をカウントした結果を図36に示す。

10

【0151】

感染後32日目においては、*Y3F + Mock*を導入した場合のコロニー数は1個、*Y4F + Mock*を導入した場合のコロニー数は34個であったのに対して、*Y3F*又は*Y4F*と同時に*hSa114*を導入した場合には*Y3F + hSa114*導入群で8個、*Y4F + hSa114*導入群で52個のコロニーが認められた。感染後40日目においては、*Y3F + Mock*を導入した場合のコロニー数は5個、*Y4F + Mock*を導入した場合のコロニー数は52個であったのに対して、*Y3F*及び*Y4F*と同時に*hSa114*を導入した場合には*Y3F + hSa114*導入群で32個、*Y4F + hSa114*導入群で137個のコロニーが認められた。この結果、*Y3F*に*hSa114*を同時に導入することにより6ないし8倍の効率でヒト*iPS*細胞コロニーを得ることができ、*Y4F*と同時に*hSa114*を導入することによって1.5ないし2.5倍の効率でヒト*iPS*細胞コロニーを得ることができることが示された。

20

【0152】

例25：L-*Myc*の効果

(A) 4遺伝子(*Oct3/4, Klf4, Sox2*、及びL-*Myc*)導入による核初期化の検討

(1) ヒト*iPS*細胞誘導に対する効果

30

マウスエクトロピックウイルスレセプター*Slc7a1*遺伝子を発現させた成人皮膚由来線維芽細胞(*aHDF-Slc7a1*)を既報の方法(*Cell, 131, pp. 861 - 872, 2007*)に従って作製した。この*aHDF-Slc7a1*を 3×10^5 個/60mmディッシュの割合で蒔き、その翌日、上記刊行物に記載された方法に従ってヒト由来の4遺伝子(*Oct3/4, Klf4*、及び*Sox2*の3遺伝子にL-*Myc1*(以下、単に「L-*Myc*」と称する)、*c-Myc*、又はN-*Myc*遺伝子を加えた合計4遺伝子)をレトロウイルスで導入した。ウイルス感染から6日後に細胞を回収し、*MSSTO*細胞上への蒔き直しを行った(5×10^5 個/100mmディッシュ)。その翌日から霊長類*ES*細胞培養用培地(リプロセル)に4 ng/mlのリコンビナントヒト*bFGF*(和光純薬)を加えた培地で培養を行った。

40

【0153】

レトロウイルス感染後、37日目に出現したヒト*iPS*細胞コロニー数をカウントした。4回の実験結果をまとめて表13及び図37に示す(図37は表13をグラフ化したものであり、グラフ上の数値はトータルコロニー数に対する*iPS*細胞コロニー数の割合を示す)。L-*Myc*を用いることにより、*iPS*細胞コロニーの誘導効率が*c-Myc*に比べて6倍も高くなり、トータルコロニー数に対する*iPS*細胞コロニー数の割合についても*c-Myc*の場合に比べてL-*Myc*を用いた場合のほうが約2倍増加していた。N-*Myc*を用いた場合にも*c-Myc*の場合に比べて*iPS*細胞コロニー数の増加が認められた。マウス線維芽細胞(MEF)由来の*iPS*細胞誘導においては、*c-Myc*を用いた場合とL-*Myc*を用いた場合との間に差が無いことが報告されているが(Natu

50

re Biotech., 26, pp. 101 - 106, 2008)、ヒト細胞を用いる場合には、c-MycよりもL-Mycを用いたほうがiPS細胞の誘導効率が顕著に向上することが明らかとなった。

【0154】

【表13】

< Number of hiPS colonies >

		ES-like	Total	%
h32	c-MYC	3	38	7.89
	L-MYC	18	35	51.4
	N-MYC	32	431	7.42
h44	c-MYC	11	14	78.6
	L-MYC	82	100	82.0
	N-MYC	31	63	49.2
h51	c-MYC	7	69	10.1
	L-MYC	62	124	50.0
	N-MYC	25	225	11.1
h58	c-MYC	14	55	25.5
	L-MYC	53	70	75.7
	N-MYC	52	298	17.4

10

【0155】

(2) in vitro 分化誘導

20

Oct3/4、Klf4、Sox2、及びL-Mycの4遺伝子導入により樹立されたヒトiPS細胞(32R2, 32R6)をlow-binding dishに播き、既報の方法(Cell, 131, pp. 861 - 872, 2007)に従って胚様体(embryoid body: EB)を形成させた(100mmディッシュ)。2週間培養後、内胚葉系細胞の分化マーカーである - フェトプロテイン(R&Dシステムズ)、中胚葉系細胞の分化マーカーである - 平滑筋アクチン(和光純薬)、及び外胚葉系の分化マーカーである III-チューブリン(ケミコン)の各抗体を用いた染色を行った。結果を図38に示す。上記染色により各マーカーの発現が確認され、得られたヒトiPS細胞は三胚葉系への分化能を有することが確認された。

【0156】

30

(3) 奇形腫形成能

Oct3/4、Klf4、Sox2、及びL-Mycの4遺伝子導入により樹立されたヒトiPS細胞(32R6)を、リコンビナントヒトbFGF(4ng/ml)及びRhキナーゼ阻害剤Y-27632(10µM)を含有する霊長類ES細胞培養用培地(ReproCELL)中で培養した。1時間後、collagen IVで処理して細胞を採取後、遠心して細胞を回収し、Y-27632(10µM)を含有するDMEM/F12中に浮遊させた。コンフルエントになった細胞(100mmディッシュ)の1/4量をSCIDマウスの精巢内に注射した。2~3ヶ月後、腫瘍を切り刻んで4%ホルムアルデヒドを含有するPBS(-)で固定した。パラフィン包埋組織をスライスし、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。この結果を図39に示す。組織学的に腫瘍は複数の種類の細胞から構成されており、神経組織、腸管様組織、軟骨組織、毛髪組織、脂肪細胞、及び色素組織が認められたことから、iPS細胞の多能性が証明された。

40

【0157】

(4) キメラマウスの腫瘍形成に対する影響

Nanog遺伝子座にEGFPとピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んで作製したNanogレポーターを有するマウス(Nature, 448, pp. 313 - 317, 2007)よりMEFを単離した(MEF-Ng)。同様にFbx15遺伝子座に - geo遺伝子を組み込んで作製したFbx15レポーターを有するマウス(Cell, 126, pp. 663 - 676, 2006)よりMEFを単離した(MEF-Fbx)。これらのMEFに4遺伝子(Oct3/4、Klf4、Sox2、及びL-Myc)をレトロウ

50

イルスを用いて導入し、MEF - Ngについてはピューロマイシンで選択し、MEF - FbxについてはG418で選択することによりiPS細胞を樹立した(それぞれNanog - iPS及びFbx - iPSと称する)。これらのiPS細胞をC57BL/6マウスの胚盤胞に移植することによりキメラマウスを作出した。キメラマウス及びF1マウスにおける腫瘍形成を検討した結果、現時点でそれぞれ以下の日数生存しており、また生存しているいずれのマウスにおいても腫瘍の発生は認められなかった。

【0158】

キメラマウスFbx - iPS : 19 / 19匹 349日生存中
 キメラマウスNanog - iPS : 15 / 16匹 363日生存中
 F1 Nanog - iPS : 1 / 1匹 255日生存中
 F1 Nanog - iPS : 3 / 3匹 181日生存中
 F1 Nanog - iPS : 1 / 1匹 132日生存中
 キメラマウスNanog - iPS : 30 / 30匹 63日生存中
 キメラマウスNanog - iPS : 12 / 14匹 62日生存中

Oct3 / 4、Klf4、Sox2、及びc - Mycの4遺伝子により初期化を行ったiPS細胞を用いた場合には、生後100日以内に37匹中6匹のキメラマウスが腫瘍が原因で死亡したが(Nature Biotech., 26, pp. 101 - 106, 2008)、c - Mycに代えてL - Mycを用いることにより生存日数に顕著な改善が認められ、かつ腫瘍発生が劇的に減少することが明らかとなった。

【0159】

(B) 3遺伝子(Oct3 / 4, Klf4, L - Myc) 導入による核初期化の検討

(1) iPS細胞コロニー形成の有無

既報の方法(Nature Biotech., 26, pp. 101 - 106, 2008)に従い3遺伝子(Oct3 / 4、Klf4、及びL - Myc) 導入によるiPSの樹立を試みた。上記(A)(1)ないし(4)に記載したMEF - Ngをゼラチンコートした6ウェル培養プレートに 1.3×10^5 個/ウェルの割合で蒔き、24時間後にマウス由来の3遺伝子(Oct3 / 4、Klf4、及びL - Myc)をレトロウイルスを用いて導入した。ウイルス感染から4日後に細胞を回収し、MSTO細胞上への蒔き直しを行った(1.5×10^5 個/6ウェルプレート)。翌日から細胞をLIFを加えたES細胞培養用培地(DMEM(ナカライタスク)に15%牛胎仔血清、2mM L - グルタミン(インビトロジェン)、100 μ M非必須アミノ酸(インビトロジェン)、100 μ M 2 - メルカプトエタノール(インビトロジェン)、50U/mLペニシリン(インビトロジェン)と50mg/mLストレプトマイシン(インビトロジェン)を加えたもの)を用いて培養した。ウイルス感染から46日目にGFP陽性コロニーをピックアップした(iPS - MEF - Ng - 443 - 3クローン)。ピックアップした16個の細胞の写真を図40に示す。いずれの細胞もGFP陽性を示すiPS細胞コロニーであった。

【0160】

これらのGFP陽性コロニー由来のクローンについて、遺伝子発現を検討するためにRT - PCR及びGenomic - PCRを行った。結果を図41に示す。いずれのクローンもES細胞のマーカー遺伝子であるNanog、Rex1、及びECAT1を発現していた。また、全てのiPS細胞コロニーにおいて導入した3種の遺伝子(Oct3 / 4、Klf4、及びL - Myc)がゲノム中に組み込まれていた。一方、mRNAの発現が検出されないクローンもあったが、これはサイレンシングを受けているためと考えられる。

【0161】

(2) in vitro分化誘導

前記(1)で樹立した4つのクローン(iPS - MEF - Ng - 443 - 3 - 3、iPS - MEF - Ng - 443 - 3 - 6、iPS - MEF - Ng - 443 - 3 - 12、及びiPS - MEF - Ng - 443 - 3 - 13)をlow - binding dishに播き(2×10^6 個/6ウェルプレート)、胚様体(embryoid body: EB)を形成させた。ES細胞培養用培地で2週間培養後、内胚葉系細胞の分化マーカーである

10

20

30

40

50

フェトプロテイン (R & D システムズ) , 中胚葉系細胞の分化マーカーである - 平滑筋誘導に (ダコ) , 外胚葉系の分化マーカーである I I I - チューブリン (ケミコン) の各抗体を用いた染色を行った。結果を図 4 2 に示す。染色によりこれらのマーカーの発現が確認され、得られたマウス i P S 細胞は三胚葉系への分化能を有することが確認された。

【 0 1 6 2 】

(3) 奇形腫形成能

前記 (1) で樹立した 4 つのクローン (i P S - M E F - N g - 4 4 3 - 3 - 3 、 i P S - M E F - N g - 4 4 3 - 3 - 6 、 i P S - M E F - N g - 4 4 3 - 3 - 1 2 、 及び i P S - M E F - N g - 4 4 3 - 3 - 1 3) をそれぞれヌードマウスの皮下に注射した。4 週間後に全例で奇形腫の形成が確認された。組織学的に腫瘍は複数の種類の細胞から構成されており、神経組織、腸管様組織、筋肉組織、表皮組織、及び軟骨組織が認められたことから (図 4 3) 、 i P S 細胞の多能性が証明された。

【 0 1 6 3 】

例 2 6 : ヒト i P S 細胞誘導における L - M y c 及び L i n 2 8 の効果

マウスエコトロピックウイルスレセプター S l c 7 a 1 遺伝子を発現させた成人皮膚由来線維芽細胞 (a H D F - S l c 7 a 1) を既報の方法 (C e l l , 1 3 1 , p p . 8 6 1 - 8 7 2 , 2 0 0 7) に記載の方法に従い作製した。この a H D F - S l c 7 a 1 を 3×10^5 個 / 6 0 m m ディッシュの割合で蒔き、その翌日、上記刊行物に記載された方法に従ってヒト由来の以下の 3 遺伝子、4 遺伝子、又は 5 遺伝子をレトロウイルスで導入した。

- ・ S o x 2 、 O c t 3 / 4 、 及び K l f 4
- ・ S o x 2 、 O c t 3 / 4 、 K l f 4 、 及び c - M y c
- ・ S o x 2 、 O c t 3 / 4 、 K l f 4 、 及び L - M y c
- ・ S o x 2 、 O c t 3 / 4 、 K l f 4 、 及び L i n 2 8
- ・ S o x 2 、 O c t 3 / 4 、 K l f 4 、 c - M y c 、 及び L i n 2 8
- ・ S o x 2 、 O c t 3 / 4 、 K l f 4 、 L - M y c 、 及び L i n 2 8

【 0 1 6 4 】

ウイルス感染から 6 日後に細胞を回収し M S T O 細胞上への蒔き直しを行った (5×10^5 個 / 1 0 0 m m ディッシュ) 。その翌日から霊長類 E S 細胞培養用培地 (リプロセル) に 4 n g / m l のリコンビナントヒト b F G F (和光純薬) を加えた培地で培養を行った。レトロウイルス感染後、3 7 日目に出現した全コロニー (T o t a l c o l o n i e s) 及びヒト i P S 細胞コロニー数 (h i P S c o l o n i e s) をカウントした。結果を表 1 4 及び図 4 4 に示す (図 4 4 は表 1 4 をグラフ化したものである) 。

【 0 1 6 5 】

【表 1 4 】

						hIPS colonies	Total colonies	hIPS (%)
1	Mock	Mock	Mock	Mock	A	0	0	0
2	SOX2	OCT4	KLF4	Mock	D	3	5	60.0
3	SOX2	OCT4	KLF4	c-MYC	B	38	103	36.9
4	SOX2	OCT4	KLF4	L-MYC	C	156	211	73.9
5	SOX2	OCT4	KLF4	Mock	LIN28	90	97	92.8
6	SOX2	OCT4	KLF4	c-MYC	LIN28	98	154	63.6
7	SOX2	OCT4	KLF4	L-MYC	LIN28	366	432	84.7

【 0 1 6 6 】

S o x 2 、 O c t 3 / 4 、 K l f 4 、 及び L - M y c の 4 遺伝子に L i n 2 8 を加えることにより、i P S 細胞コロニー数が顕著に増加した。この i P S 細胞コロニー数は、S o x 2 、 O c t 3 / 4 、 K l f 4 、 及び c - M y c の 4 遺伝子に L i n 2 8 を加えた場合よりも顕著に多かった。また、L i n 2 8 は c - M y c の作用に対して相乗効果を示した

が、L - M y c の作用に対してはさらに強い相乗効果を示した (表 1 4)。トータルコロニー数に対する i P S 細胞コロニーの割合についても S o x 2、O c t 3 / 4、K l f 4、L - M y c、及び L i n 2 8 の 5 遺伝子を用いた場合は極めて高い割合 (8 4 . 7 %) を与えた。以上の結果から、ヒト i P S 細胞の誘導効率を改善するためには、S o x 2、O c t 3 / 4、K l f 4、L - M y c、及び L i n 2 8 の 5 遺伝子の組み合わせが極めて有効であることが明らかとなった。

【 0 1 6 7 】

例 2 7 : ヒト i P S 細胞誘導における M y c キメラ遺伝子及び変異遺伝子の効果

図 4 5 に示す各種 M y c キメラ遺伝子 (M s - c L - M y c、M s - L c - M y c、M s - c L c - M y c、M s - L c L - M y c、M s - c c L - M y c、M s - c L L - M y c、M s - L L c - M y c、M s - L c c - M y c)、及び M y c 点変異遺伝子 (c - M y c W 1 3 5 E、c - M y c V 3 9 4 D、c - M y c L 4 2 0 P、L - M y c W 9 6 E、L - M y c V 3 2 5 D、L - M y c L 3 5 1 P) を以下のとおり構築した。まず、マウス c - M y c (M s - c - M y c) 及び L - M y c (M s - L - M y c) をそれぞれ p E N T R - D - T O P O (I n v i t r o g e n) に組み込み、p E N T R - D - T O P O - M s - c - M y c 及び p E N T R - D - T O P O - M s - L - M y c を作製した。次に、マウス c - M y c (N C B I A c c . N o . N M _ 0 1 0 8 4 9) 及び L - M y c (N C B I A c c . N o . N M _ 0 0 8 5 0 6) の配列情報に基づいて、図 4 5 に示した点変異を導入するためのプライマーを作製し、これを用いて p E N T R - D - T O P O - M s - c - M y c 及び p E N T R - D - T O P O - M s - L - M y c を鋳型として P C R を行った。各変異についてシーケンスで確認後、L R 反応にてレトロウイルスベクターの p M X s にサブクローニングした。図 4 5 に示したキメラ M y c については、各フラグメントを P C R にて増幅し、それぞれの組み合わせに応じて混合したものを鋳型として P C R を行い、先と同様にレトロウイルスベクターの p M X s にサブクローニングした。

【 0 1 6 8 】

得られた各レトロウイルスベクターと例 2 5 で用いた S o x 2、O c t 3 / 4、及び K l f 4 の各レトロウイルスベクターとを例 2 5 と同様にして成人皮膚由来線維芽細胞 (a H D F - S l c 7 a 1) に導入し、レトロウイルス感染後、3 1 日目に出現した全コロニー (T o t a l c o l o n i e s) 及びヒト i P S 細胞コロニー (h i P S c o l o n i e s) の数をカウントした。結果を図 4 6 及び表 1 5 に示す (図 4 6 は表 1 5 をグラフ化したものである)。

【 0 1 6 9 】

10

20

30

【表 15】

						hiPS colonies	Total colonies	hiPS (%)
1	Mock	OCT4	MLF4	Mock	A	0	0	0
2	SDG2	OCT4	MLF4	-MYC	B	2	5	40
3	SDG2	OCT4	MLF4	c-MYC	C	70	162	43.2
4	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-c-Myc	D	106	228	46.5
5	SDG2	OCT4	MLF4	L-MYC	E	212	358	59.2
6	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-L-Myc	F	164	292	56.2
13	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-cL-Myc	M	330	446	74.0
14	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-Lc-Myc	N	98	192	51.0
15	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-clc-Myc	O	282	410	68.8
16	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-Lcl-Myc	P	216	318	67.9
17	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-ocl-Myc	Q	200	304	53.0
18	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-clL-Myc	R	208	350	57.9
19	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-LLc-Myc	S	150	240	62.5
20	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-Lcc-Myc	T	81	170	47.6
7	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-c-Myc-W135E	G	112	280	40.0
8	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-c-Myc-V394D	H	194	308	63.0
9	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-c-Myc-L420D	I	0	0	0.0
10	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-L-Myc-W96E	J	6	6	100.0
11	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-L-Myc-V325D	K	144	216	66.7
12	SDG2	OCT4	MLF4	Ms-L-Myc-L351P	L	1	6	16.7

10

20

【0170】

c-Myc及びL-Mycは、いずれもヒトとマウスにおいてアミノ酸レベルで100%近い同一性を有している。図46及び表15に示されるように、マウス遺伝子(Ms-c-Myc及びMs-L-Myc)を用いた場合にもヒト遺伝子(c-Myc及びL-Myc)と同様にヒトiPS細胞コロニーが生じたことから、マウスのc-Myc及びL-Mycはヒトのc-Myc及びL-Mycと実質的に同一の機能を持つことが確認された。

【0171】

各種のMycキメラ遺伝子及び点変異遺伝子での結果を野生型と比較した結果、Ms-cL-Myc及びMs-cLc-Mycを用いた場合に、野生型L-Myc(L-Myc)と比べてiPS細胞コロニー数が増加しており、特にMs-cL-Mycを用いた場合に最も良好な結果が得られた。また、点変異遺伝子での結果から、c-Myc及びL-Myc共にC末端の1つのアミノ酸(c-MycL420P及びL-MycL351P)が非常に重要なことも明らかとなった。以上の結果から、ヒトiPS細胞樹立におけるMycの重要な機能領域は、c-MycのN末端側1/3の部分、L-Mycの中央部分、及びc/L-MycのC末端部分であることが示唆された。

30

【産業上の利用可能性】

【0172】

本発明により安全な人工多能性幹細胞の製造方法及び効率的な人工多能性幹細胞の製造方法が提供される。

40

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kyoto University
 <120> Nuclear reprogramming method
 <130> A81342M
 <150> 61/001,108
 <151> 2007-10-31
 <150> 60/996,289 10
 <151> 2007-11-9
 <150> 12/213,035
 <151> 2008-06-13
 <160> 184
 <170> PatentIn version 3.4

<210> 1
 <211> 24 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hOct3/4-S1165
 <400> 1
 gacaggggga ggggaggagc tagg 24

<210> 2
 <211> 26 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hOct3/4-AS1283
 <400> 2
 cttccctcca accagttgcc ccaaac 26

<210> 3 40
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hSox2-S1430
 <400> 3

gggaaatggg aggggtgcaa aagagg	26	
<210> 4		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hSox2-AS1555		10
<400> 4		
ttgcgtgagt gtggatggga ttggtg	26	
<210> 5		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for ECAT4(Nanog)-macaca-968S		20
<400> 5		
cagccccgat tcttccacca gtccc	25	
<210> 6		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		30
<223> Primer for ECAT4(Nanog)-macaca-1334AS		
<400> 6		
cggaagattc ccagtcgggt tcacc	25	
<210> 7		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		40
<220>		
<223> Primer for hREXI-RT-U		
<400> 7		
cagatcctaa acagctcgca gaat	24	
<210> 8		

<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hREXI-RT-L		
<400> 8		
gcgtacgcaa attaaagtcc aga	23	10
<210> 9		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hFGF4-RT-U		
<400> 9		
ctacaacgcc tacgagtcct aca	23	20
<210> 10		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hFGF4-RT-L		
<400> 10		
gttgaccag aaaagtcaga gttg	24	30
<210> 11		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hGDF3-S243		
<400> 11		
cttatgctac gtaaaggagc tggg	24	40
<210> 12		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		

<220>		
<223>	Primer for hGDF3-AS850	
<400>	12	
	gtgccaaccc aggtcccgga agtt	24
<210>	13	
<211>	24	
<212>	DNA	10
<213>	Artificial sequence	
<220>		
<223>	Primer for hECAT15-1-S532	
<400>	13	
	ggagccgect gccctggaaa attc	24
<210>	14	
<211>	24	
<212>	DNA	20
<213>	Artificial sequence	
<220>		
<223>	Primer for hECAT15-1-AS916	
<400>	14	
	tttttctga tattctatcc ccat	24
<210>	15	
<211>	24	
<212>	DNA	30
<213>	Artificial sequence	
<220>		
<223>	Primer for hECAT15-2-S85	
<400>	15	
	ccgtcccgc aatctccttc catc	24
<210>	16	
<211>	24	
<212>	DNA	40
<213>	Artificial sequence	
<220>		
<223>	Primer for hECAT15-2-AS667	
<400>	16	

atgatgccaa catggctccc ggtg	24	
<210> 17		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hpH34-S40		10
<400> 17		
atatcccgcc gtgggtgaaa gttc	24	
<210> 18		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		20
<220>		
<223> Primer for hpH34-AS259		
<400> 18		
actcagccat ggactggagc atcc	24	
<210> 19		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		30
<220>		
<223> Primer for hTERT-S3234		
<400> 19		
cctgctcaag ctgactcgac accgtg	26	
<210> 20		
<211> 25		
<212> DNA		40
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hTERT-AS3713		
<400> 20		
ggaaaagctg gccctgggggt ggagc	25	

<210> 21		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for G3PDH-F		
<400> 21		
accacagtcc atgccaacac	20	10
<210> 22		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for G3PDH-R		
<400> 22		
tccaccaccc tgttgctgta	20	20
<210> 23		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hOct3/4-S1165		
<400> 23		
gacaggggga ggggaggagc tagg	24	30
<210> 24		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hOct3/4-AS1283		
<400> 24		
cttcctcca accagttgcc ccaaac	26	40
<210> 25		
<211> 26		
<212> DNA		

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hSox2-S1430
 <400> 25
 gggaaatggg aggggtgcaa aagagg 26

<210> 26
 <211> 26 10
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hSox2-AS1555
 <400> 26
 ttgogtgagt gtggatggga ttggtg 26

<210> 27 20
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for ECAT4(Nanog)-macaca-968S
 <400> 27
 cagccccgat tctccacca gtccc 25

<210> 28 30
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for ECAT4(Nanog)-macaca-1334AS
 <400> 28
 eggaagattc ccagtcgggt tcacc 25

<210> 29 40
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hREXI-RT-U

<400> 29		
cagatcctaa acagctcgca gaat		24
<210> 30		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		10
<223> Primer for hREXI-RT-L		
<400> 30		
gcgtacgcaa attaaagtcc aga		23
<210> 31		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		20
<223> Primer for hFGF4-RT-U		
<400> 31		
ctacaacgcc tacgagtcct aca		23
<210> 32		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		30
<223> Primer for hFGF4-RT-L		
<400> 32		
gttgcaccag aaaagtcaga gttg		24
<210> 33		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		40
<223> Primer for hGDF3-S243		
<400> 33		
cttatgctac gtaaaggagc tggg		24

<210> 34		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hGDF3-AS850		
<400> 34		
gtgccaaccc aggtcccgga agtt	24	10
<210> 35		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hECAT15-1-S532		
<400> 35		
ggagccgcct gccctgaaa attc	24	20
<210> 36		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hECAT15-1-AS916		
<400> 36		
tttttctga tattctattc ccat	24	30
<210> 37		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hECAT15-2-S85		
<400> 37		
ccgtccccgc aatctccttc catc	24	40
<210> 38		
<211> 24		
<212> DNA		

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hECAT15-2-AS667
 <400> 38
 atgatgccaa catggtccc ggtg 24

<210> 39
 <211> 24 10
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hpH34-S40
 <400> 39
 atatcccgcc gtgggtgaaa gttc 24

<210> 40 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hpH34-AS259
 <400> 40
 actcagccat ggactggagc atcc 24

<210> 41 30
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hTERT-S3234
 <400> 41
 cctgctcaag ctgactcgac accgtg 26

<210> 42 40
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hTERT-AS3713

<400> 42		
ggaaaagctg gccctggggt ggagc		25
<210> 43		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		10
<223> Primer for G3PDH-F		
<400> 43		
accacagtcc atgccatcac		20
<210> 44		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		20
<223> Primer for G3PDH-R		
<400> 44		
tccaccacc tgttgctgta		20
<210> 45		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		30
<223> Primer for hOCT3/4-S944		
<400> 45		
ccccagggcc ccattttggt acc		23
<210> 46		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		40
<223> Primer for hSOX2-S691		
<400> 46		
ggcaccctg gcatggctct tggetc		26

<210> 47		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hKLF4-S1128		
<400> 47		
acgategtg ccccgaaaa ggacc	25	10
<210> 48		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hMYC-S1011		
<400> 48		
caacaaccga aaatcacca gccccag	27	20
<210> 49		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for pMXs-AS3200		
<400> 49		
ttatcgtcga ccaactgtget gctg	24	30
<210> 50		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for pMXs-L3205		
<400> 50		
cccttttct ggagactaaa taaa	24	40
<210> 51		
<211> 24		
<212> DNA		

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hOCT3/4-S1165
 <400> 51
 gacaggggga ggggaggagc tagg 24

<210> 52
 <211> 26 10
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hOCT3/4-AS1283
 <400> 52
 cttccctcca accagttgcc ccaaac 26

<210> 53 20
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hSOX2-S1430
 <400> 53
 gggaaatggg aggggtgcaa aagagg 26

<210> 54 30
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hSOX2-AS1555
 <400> 54
 ttgcgtgagt gtggatggga ttggtg 26

<210> 55 40
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for ECAT4-macaca-968S

<400> 55		
cagccccgat tcttccacca gtccc		25
<210> 56		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		10
<223> Primer for ECAT4-macaca-1334AS		
<400> 56		
cggaagattc ccagtcgggt tcacc		25
<210> 57		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		20
<223> Primer for hGDF3-S243		
<400> 57		
cttatgctac gtaaaggagc tggg		24
<210> 58		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		30
<223> Primer for hGDF3-AS850		
<400> 58		
gtgccaaccc aggtcccgga agtt		24
<210> 59		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		40
<223> Primer for hREXI-RT-U		
<400> 59		
cagatcctaa acagctcgca gaat		24

<210> 60		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hREXI-RT-L		
<400> 60		
gcgtacgcaa attaaagtcc aga	23	10
<210> 61		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hFGF4-RT-U		
<400> 61		
ctacaacgcc tacgagtct aca	23	20
<210> 62		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hFGF4-RT-L		
<400> 62		
gttgaccag aaaagtcaga gttg	24	30
<210> 63		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hpH34-S40		
<400> 63		
atatcccgcc gtgggtgaaa gttc	24	40
<210> 64		
<211> 24		
<212> DNA		

<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hpH34-AS259		
<400> 64		
actcagccat ggactggagc atcc	24	
<210> 65		
<211> 24		10
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hECAT15-1-S532		
<400> 65		
ggagccgcct gccctggaaa attc	24	
<210> 66		20
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hECAT15-1-AS916		
<400> 66		
tttttcctga tattctatcc ccat	24	
<210> 67		30
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hECAT15-2-S85		
<400> 67		
ccgtccccgc aatctccttc catc	24	
<210> 68		40
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hECAT15-2-AS667		

<400> 68		
atgatgccaa catggctccc ggtg	24	
<210> 69		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		10
<223> Primer for hTERT-S3234		
<400> 69		
cctgctcaag ctgactcgac accgtg	26	
<210> 70		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		20
<223> Primer for hTERT-AS3713		
<400> 70		
ggaaaagctg gccctggggt ggagc	25	
<210> 71		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		30
<223> Primer for hKLF4-AS1826		
<400> 71		
tgattgtagt gctttctggc tgggctcc	28	
<210> 71		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		40
<223> Primer for hMYC-S253		
<400> 72		
gcgtcctggg aaggagatc cggagc	26	

<210> 73		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hMYC-AS555		
<400> 73		
ttgaggggca tcgtcgcggg aggctg	26	10
<210> 74		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hMSX1-S665		
<400> 74		
cgagaggacc ccgtggatgc agag	24	20
<210> 75		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hMSX1-AS938		
<400> 75		
ggcggccatc ttcagcttct ccag	24	30
<210> 76		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hBRACHYURY-S1292		
<400> 76		
gccctctccc tcccctccac gcacag	26	40
<210> 77		
<211> 26		
<212> DNA		

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hBRACHYURY-AS1540
 <400> 77
 cggcgccggtt gctcacagac cacagg 26

<210> 78
 <211> 26 10
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hGFAP-S1040
 <400> 78
 ggccccccac ttgcaggagt accagg 26

<210> 79 20
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hGFAP-AS1342
 <400> 79
 cttctgctcg ggcccctcat gagacg 26

<210> 80 30
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hPAX6-S1206
 <400> 80
 acccattatc cagatgtggt tgccccgag 28

<210> 81 40
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hPAX6-AS1497

<400> 81		
atggtgaagc tgggcatagg cggcag	26	
<210> 82		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		10
<223> Primer for hFOXA2-S208		
<400> 82		
tgggagcggc gaagatggaa gggcac	26	
<210> 83		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		20
<220>		
<223> Primer for hFOXA2-AS398		
<400> 83		
tcatgccagc gccacgtac gacgac	26	
<210> 84		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		30
<220>		
<223> Primer for hSOX17-S423		
<400> 84		
cgttttcattg gtgtgggcta aggacg	26	
<210> 85		
<211> 26		
<212> DNA		40
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hSOX17-AS583		
<400> 85		
tagttggggt ggtcctgcat gtgctg	26	

<210> 86		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hAADC-S1378		
<400> 86		
cgccaggatc cccgctttga aatctg	26	10
<210> 87		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hAADC-AS1594		
<400> 87		
tcggccgcca gctctttgat gtgttc	26	20
<210> 88		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hChAT-S1360		
<400> 88		30
ggaggcgtgg agctcagcga cacc	24	
<210> 89		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hChAT-AS1592		40
<400> 89		
cggggagctc gctgacggag tctg	24	
<210> 90		
<211> 30		
<212> DNA		

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hMAP2-S5401
 <400> 90
 caggtggcgg acgtgtgaaa attgagagtg 30

<210> 91
 <211> 26 10
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hMAP2-AS5587
 <400> 91
 cacgctggat ctgcctgggg actgtg 26

<210> 92 20
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hDAT-S 1935
 <400> 92
 acagagggga ggtgcgccag ttcacg 26

<210> 93 30
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hDAT-AS2207
 <400> 93
 acggggtgga cctcgtgca cagatc 26

<210> 94 40
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hLMX1B-S770

<400> 94		
ggcaccagca gcagcaggag cagcag	26	
<210> 95		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		10
<223> Primer for hLMXIB-AS1020		
<400> 95		
ccacgtctga ggagccgagg aagcag	26	
<210> 96		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		20
<223> Primer for hMYL2A-S258		
<400> 96		
gggcccacac aacttcaccg tcttcc	26	
<210> 97		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		30
<223> Primer for hMYL2A-AS468		
<400> 97		
tgtagtcgat gttccccgcc aggtcc	26	
<210> 98		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		40
<223> Primer for hTnTc-S524		
<400> 98		
atgagcggga gaaggagcgg cagaac	26	

<210> 99		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hTnTc-AS730		
<400> 99		
tcaatggcca gcacettect cctctc	26	10
<210> 100		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hMEF2C-S1407		
<400> 100		
tttaacaccg ccagecctct tcaccttg	28	20
<210> 101		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hMEF2C-AS1618		
<400> 101		
tcgtggcgcg tgtgtgtgg gtatctcg	28	30
<210> 102		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hMYHCB-S5582		
<400> 102		
ctggaggccg agcagaagcg caacg	25	40
<210> 103		
<211> 25		
<212> DNA		

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hMYHCB-AS5815
 <400> 103
 gtccgcccgc tcctctgcct catcc 25

<210> 104
 <211> 20 10
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for dT20
 <400> 104
 tttttttttt tttttttttt 20

<210> 105 20
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hMYC-S857
 <400> 105
 gccacagcaa acctctctcac agcccac 27

<210> 106 30
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hMYC-ASi246
 <400> 106
 ctcgctgttt ccgcaacaag tcctcttc 28

<210> 107 40
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hOCT3/4-S

<400> 107	
caccatggcg ggacacctgg cttcag	26
<210> 108	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	10
<223> Primer for hOCT3/4-AS	
<400> 108	
acctcagttt gaatgcatgg gagagc	26
<210> 109	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	20
<220>	
<223> Primer for hSOX2-S	
<400> 109	
caccatgtac aacatgatgg agacggagct g	31
<210> 110	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	30
<220>	
<223> Primer for hSOX2-AS	
<400> 110	
tcacatgtgt gagaggggca gtgtgc	26
<210> 111	
<211> 30	
<212> DNA	40
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Primer for hKLF4-S	
<400> 111	
caccatggct gtcagtgacg cgctgtccc	30

<210> 112		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hKLF4-AS		
<400> 112		
ttaaaaatgt ctcttcatgt gtaaggcgag	30	10
<210> 113		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hMYC-S		
<400> 113		
caccatgccc ctcaacgtta gettcaccaa	30	20
<210> 114		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for hMYC-AS		
<400> 114		
tcacgcacaa gagttccgta gctgttcaag	30	30
<210> 115		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for Slc7a1-S		
<400> 115		
caccatgggc tgcaaaaacc tgctcgg	27	40
<210> 116		
<211> 27		
<212> DNA		

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for Slc7a1-AS
 <400> 116
 tcatttgac tggccaagt tgctgtc 27

<210> 117
 <211> 33 10
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hREX1-pro5K-S
 <400> 117
 attgtcgacg gggatttggc agggtcacag gac 33

<210> 118 20
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hREXx1-pro5K-AS
 <400> 118
 cccagatctc caatgccacc tctctccaaa cg 32

<210> 119 30
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hOCT3/4-pro5K-S
 <400> 119
 cactcgaggt ggaggagctg agggcactgt gg 32

<210> 120 40
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for hOCT3/4-pro5K-AS

<400> 120		
cacagatctg aaatgagggc ttgcgaaggg ac		32
<210> 121		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		10
<223> Primer for mehREX1-F1-S		
<400> 121		
ggtttaaaag ggtaaatgtg attatattta		30
<210> 122		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		20
<220>		
<223> Primer for mehREX1-F1-AS		
<400> 122		
caaaactaaa ccacccatca ac		22
<210> 123		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		30
<220>		
<223> Primer for mehOCT3/4 F2-S		
<400> 123		
gaggttggag tagaaggatt gttttggttt		30
<210> 124		
<211> 30		
<212> DNA		40
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for mehOCT3/4 F2-AS		
<400> 124		
ccccccctaac ccatcaacct caccacctaa		30

<210> 125		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for mehNANOG-FI-S		
<400> 125		
tggttaggtt ggttttaaat tttg	25	10
<210> 126		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for mehNANOG-FI-AS		
<400> 126		
aaccaccct tataaattct caatta	26	20
<210> 127		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for Sox1		
<400> 127		
caccatgtac agcatgatga tggagaccga cct	33	30
<210> 128		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for Sox1		
<400> 128		
ctagatatgc gtcaggggca ccgtgc	26	40
<210> 129		
<211> 34		
<212> DNA		

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for Sox3
 <400> 129
 caccatgtac agcctgctgg agactgaact caag 34

<210> 130
 <211> 30 10
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for Sox3
 <400> 130
 tcagatgtgg gtcagcggca ccgttcatt 30

<210> 131 20
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for Sox7
 <400> 131
 caccteggcc atggcctcgc tgctggg 27

<210> 132 30
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for Sox7
 <400> 132
 ctccattect ccagctctat gacacac 27

<210> 133 40
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for Sox15

<400> 133		
caccatggcg ctgaccagct cctcaca	28	
<210> 134		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		10
<223> Primer for Sox15		
<400> 134		
ttaaaggtagt gttactggca tggg	24	
<210> 135		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		20
<223> Primer for Sox17		
<400> 135		
caccagagcc atgagcagcc cggatg	26	
<210> 136		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		30
<223> Primer for Sox17		
<400> 136		
cgtcaaatgt cgggtagtt gcaata	26	
<210> 137		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		40
<223> Primer for Sox18		
<400> 137		
caccatgcag agatcgccgc cgggtacg	29	

<210> 138		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for Sox18		
<400> 138		
ctagcctgag atgcaagcac tgtaatagac	30	10
<210> 139		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for Oct1		
<400> 139		20
caccatgaat aatccatcag aaaccaat	28	
<210> 140		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for Oct1		
<400> 140		30
gctctgcact cagctcactg tgcc	24	
<210> 141		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for Oct6		40
<400> 141		
caccatggcc accaccgogc agtatctg	28	
<210> 142		
<211> 24		
<212> DNA		

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for Oct6
 <400> 142
 ggaaccctagt ccgcagggtc actg 24

<210> 143
 <211> 29 10
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for Klf1
 <400> 143
 caccatgagg cagaagagag agaggaggc 29

<210> 144 20
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for Klf1
 <400> 144
 tcagaggtga cgcttcatgt gcagagctaa 30

<210> 145 30
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for Klf2
 <400> 145
 caccatggcg ctcagcgagc ctatcttgcc 30

<210> 146 40
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for Klf2

<400> 146		
ctacatatgt cgcttcatgt gcaaggccag		30
<210> 147		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		10
<223> Primer for Klf5		
<400> 147		
caccatgccc acgcgggtgc tgacccatg		28
<210> 148		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		20
<220>		
<223> Primer for Klf5		
<400> 148		
tcgctcagtt ctgggtggcgc ttca		24
<210> 149		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		30
<220>		
<223> Primer for L-MycWT		
<400> 149		
caccatggac ttegactcgt atcagcacta tttc		34
<210> 150		
<211> 30		
<212> DNA		40
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Primer for L-MycWT		
<400> 150		
ttagtagcca ctgaggtacg cgattctctt		30

<210> 151
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for N-MycWT
 <400> 151
 caccatgccc agctgcaccg cgtccacat 30 10

<210> 152
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for N-MycWT
 <400> 152
 ttagcaagtc cgagcgtggtt cgatct 26 20

<210> 153
 <211> 1320
 <212> DNA
 <213> Mouse
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1320) 30
 <223>
 <400> 153
 atg ccc ctc aac gtg aac ttc acc aac agg aac tat gac ctc gac tac 48
 Met Pro Leu Asn Val Asn Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr
 1 5 10 15
 gac tcc gta cag ccc tat ttc atc tgc gac gag gaa gag aat ttc tat 96
 Asp Ser Val Gln Pro Tyr Phe Ile Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr
 20 25 30 40
 cac cag caa cag cag agc gag ctg cag ccg ccc gcg ccc agt gag gat 144
 His Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp
 35 40 45
 atc tgg aag aaa ttc gag ctg ctt ccc acc cgg ccc ctg tcc ccg agc 192
 Ile Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser
 50 55 60

cct gcc aag agg tgg gag tgg ggc tca tct cca tcc cga ggc cac agc	864	
Pro Ala Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Gly His Ser		
275	280	285
aaa cct ccg cac agc cca ctg gtc etc aag agg tgc cac gtc tcc act	912	
Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr		
290	295	300
cac cag cac aac tac gcc gca ccc ccc tcc aca agg aag gac tat cca	960	
His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro		10
305	310	315
gct gcc aag agg gcc aag ttg gac agt ggc agg gtc ctg aag cag atc	1008	
Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp Ser Gly Arg Val Leu Lys Gln Ile		
325	330	335
agc aac aac cgc aag tgc tcc agc ccc agg tcc tca gac acg gag gaa	1056	
Ser Asn Asn Arg Lys Cys Ser Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu		
340	345	350
aac gac aag agg cgg aca cac aac gtc ttg gaa cgt cag agg agg aac	1104	
Asn Asp Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn		20
355	360	365
gag ctg aag cgc agc ttt ttt gcc ctg cgt gac cag atc cct gaa ttg	1152	
Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu		
370	375	380
gaa aac aac gaa aag gcc ccc aag gta gtg atc etc aaa aaa gcc acc	1200	
Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr		
385	390	395
gcc tac atc ctg tcc att caa gca gac gag cac aag etc acc tet gaa	1248	
Ala Tyr Ile Leu Ser Ile Gln Ala Asp Glu His Lys Leu Thr Ser Glu		30
405	410	415
aag gac tta ttg agg aaa cga cga gaa cag ttg aaa cac aaa etc gaa	1296	
Lys Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu		
420	425	430
cag ctt cga aac tct ggt gca taa	1320	
Gln Leu Arg Asn Ser Gly Ala		
435		40

<210> 154
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Mouse
 <400> 154

Met	Pro	Leu	Asn	Val	Asn	Phe	Thr	Asn	Arg	Asn	Tyr	Asp	Leu	Asp	Tyr	
1			5						10					15		
Asp	Ser	Val	Gln	Pro	Tyr	Phe	Ile	Cys	Asp	Glu	Glu	Glu	Asn	Phe	Tyr	
			20					25					30			
His	Gln	Gln	Gln	Gln	Ser	Glu	Leu	Gln	Pro	Pro	Ala	Pro	Ser	Glu	Asp	
			35				40					45				
Ile	Trp	Lys	Lys	Phe	Glu	Leu	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Leu	Ser	Pro	Ser	
	50					55				60						10
Arg	Arg	Ser	Gly	Leu	Cys	Ser	Pro	Ser	Tyr	Val	Ala	Val	Ala	Thr	Ser	
65					70					75					80	
Phe	Ser	Pro	Arg	Glu	Asp	Asp	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Phe	Ser	Thr	
				85					90					95		
Ala	Asp	Gln	Leu	Glu	Met	Met	Thr	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp	Met	Val	
			100					105					110			
Asn	Gln	Ser	Phe	Ile	Cys	Asp	Pro	Asp	Asp	Glu	Thr	Phe	Ile	Lys	Asn	
		115					120					125				20
Ile	Ile	Ile	Gln	Asp	Cys	Met	Trp	Ser	Gly	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Lys	
		130				135					140					
Leu	Val	Ser	Glu	Lys	Leu	Ala	Ser	Tyr	Gln	Ala	Ala	Arg	Lys	Asp	Ser	
145					150					155					160	
Thr	Ser	Leu	Ser	Pro	Ala	Arg	Gly	His	Ser	Val	Cys	Ser	Thr	Ser	Ser	
				165					170					175		
Leu	Tyr	Leu	Gln	Asp	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Ser	Glu	Cys	Ile	Asp	Pro	
			180					185					190			
Ser	Val	Val	Phe	Pro	Tyr	Pro	Leu	Asn	Asp	Ser	Ser	Ser	Pro	Lys	Ser	
		195					200					205				30
Cys	Thr	Ser	Ser	Asp	Ser	Thr	Ala	Phe	Ser	Pro	Ser	Ser	Asp	Ser	Leu	
	210					215					220					
Leu	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Pro	Arg	Ala	Ser	Pro	Glu	Pro	Leu	Val	Leu	
225					230					235					240	
His	Glu	Glu	Thr	Pro	Pro	Thr	Thr	Ser	Ser	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu	Gln	
				245						250				255		
Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Ile	Asp	Val	Val	Ser	Val	Glu	Lys	Arg	Gln	Thr	
			260					265					270			40
Pro	Ala	Lys	Arg	Ser	Glu	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	His	Ser	
		275					280					285				
Lys	Pro	Pro	His	Ser	Pro	Leu	Val	Leu	Lys	Arg	Cys	His	Val	Ser	Thr	
		290				295					300					
His	Gln	His	Asn	Tyr	Ala	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Arg	Lys	Asp	Tyr	Pro	

cct gga ggg ggt gcc ggg gac gag gcg gaa tct cgg ggc cat tcg aaa	240	
Pro Gly Gly Gly Ala Gly Asp Glu Ala Glu Ser Arg Gly His Ser Lys		
65	70	75
gcc tgg ggc agg aat tat gct tcc atc att cgc cgt gac tgc atg tgg	288	
Ala Trp Gly Arg Asn Tyr Ala Ser Ile Ile Arg Arg Asp Cys Met Trp		
	85	90
agc ggc ttc tcc gcc cga gaa cgg ctg gag aga gtg gtg agc gac agg	336	
Ser Gly Phe Ser Ala Arg Glu Arg Leu Glu Arg Val Val Ser Asp Arg		10
	100	105
ctg gcc cca ggc gcg ccc cgg ggg aac ccg ccc aaa gcg ccc gct acc	384	
Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr		
	115	120
ccg gac ggc act cct agt ctg gaa gcc agt aac ccg gcg ccc gcc acc	432	
Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr		
	130	140
caa tgt cag ctg ggc gag ccc aag act cag gcc tgc tcc ggg tcc gag	480	
Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu		20
	145	155
agc ccc agc gat tct gaa ggt gaa gag att gac gtg gtg acc gtg gag	528	
Ser Pro Ser Asp Ser Glu Gly Glu Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu		
	165	170
aag agg cga tct ctg gac atc cga aag cca gtc acc atc acg gtg cga	576	
Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg		
	180	185
gca gac ccc ctg gac ccc tgc atg aag cac ttc cat atc tct atc cac	624	
Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met Lys His Phe His Ile Ser Ile His		30
	195	205
caa cag cag cat aac tat gct gcc cgt ttt cct cca gaa agt tgc tct	672	
Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser		
	210	220
caa gag ggg gat cct gag cca ggt ccc cag gaa gag gct ccg gag ata	720	
Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile		
	225	235
gaa gct ccc aag gag aaa gag gag gag gaa gag gaa gag gag gaa gaa	768	
Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu		40
	245	255
gag att gtg agc ccc cca cct gtc gga agt gag gct ccc cag tcc tgc	816	
Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys		
	260	270

cac ccc aaa cct gtc agt tct gac act gag gac gtg acc aag agg aag 864
His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp Thr Glu Asp Val Thr Lys Arg Lys
275 280 285
aac cat aac ttc ttg gaa cga aaa agg agg aat gac ctc cgc tcc cgg 912
Asn His Asn Phe Leu Glu Arg Lys Arg Arg Asn Asp Leu Arg Ser Arg
290 295 300
ttc cta gcc ctg cgg gac cag gtt ccc acc ctg gcc agc tgc tct aag 960
Phe Leu Ala Leu Arg Asp Gln Val Pro Thr Leu Ala Ser Cys Ser Lys 10
305 310 315 320
gcc ccc aaa gtc gtg atc ctc agc aag gcg tta gaa tac ttg cag gct 1008
Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Ser Lys Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Ala
325 330 335
ttg gtg ggg gct gaa aag aaa atg gct aca gag aaa agg cag ctc cgg 1056
Leu Val Gly Ala Glu Lys Lys Met Ala Thr Glu Lys Arg Gln Leu Arg
340 345 350
tgt cgg caa cag caa ctg caa aag aga atc gcg tac ctc agt ggc tac 1104 20
Cys Arg Gln Gln Gln Leu Gln Lys Arg Ile Ala Tyr Leu Ser Gly Tyr
355 360 365
taa 1107

<210> 156

<211> 368

<212> PRT

<213> Mouse

30

<400> 156

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

Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr
 115 120 125
 Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr
 130 135 140
 Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu
 145 150 155 160
 Ser Pro Ser Asp Ser Glu Gly Glu Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu
 165 170 175
 Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg
 180 185 190
 Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met Lys His Phe His Ile Ser Ile His
 195 200 205
 Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser
 210 215 220
 Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile
 225 230 235 240
 Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
 245 250 255
 Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys
 260 265 270
 His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp Thr Glu Asp Val Thr Lys Arg Lys
 275 280 285
 Asn His Asn Phe Leu Glu Arg Lys Arg Arg Asn Asp Leu Arg Ser Arg
 290 295 300
 Phe Leu Ala Leu Arg Asp Gln Val Pro Thr Leu Ala Ser Cys Ser Lys
 305 310 315 320
 Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Ser Lys Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Ala
 325 330 335
 Leu Val Gly Ala Glu Lys Lys Met Ala Thr Glu Lys Arg Gln Leu Arg
 340 345 350
 Cys Arg Gln Gln Gln Leu Gln Lys Arg Ile Ala Tyr Leu Ser Gly Tyr
 355 360 365

10

20

30

40

<210> 157
 <211> 1275
 <212> DNA
 <213> Mouse
 <220>
 <221> CDS

<222> (1)..(1275)

<223>

<400> 157

atg ccc ctc aac gtg aac ttc acc aac agg aac tat gac ctc gac tac	48	
Met Pro Leu Asn Val Asn Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr		
1 5 10 15		
gac tcc gta cag ccc tat ttc atc tgc gac gag gaa gag aat ttc tat	96	
Asp Ser Val Gln Pro Tyr Phe Ile Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr		10
20 25 30		
cac cag caa cag cag agc gag ctg cag ccg ccc gcg ccc agt gag gat	144	
His Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp		
35 40 45		
atc tgg aag aaa ttc gag ctg ctt ccc acc ccg ccc ctg tcc ccg agc	192	
Ile Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser		
50 55 60		
cgc cgc tcc ggg ctc tgc tet cca tcc tat gtt gcg gtc gct acg tcc	240	20
Arg Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Ala Thr Ser		
65 70 75 80		
ttc tcc cca agg gaa gac gat gac ggc ggc ggt ggc aac ttc tcc acc	288	
Phe Ser Pro Arg Glu Asp Asp Asp Gly Gly Gly Gly Asn Phe Ser Thr		
85 90 95		
gcc gat cag ctg gag atg atg acc gag tta ctt gga gga gac atg gtg	336	
Ala Asp Gln Leu Glu Met Met Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val		
100 105 110		
aac cag agc ttc atc tgc gat cct gac gac gag acc ttc atc aag aac	384	30
Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn		
115 120 125		
atc atc atc cag gac tgt atg tgg agc ggt ttc tca gcc gct gcc aag	432	
Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys		
130 135 140		
ctg gtc tcg gag aag ctg gcc tcc tac cag gct gcg cgc aaa gac agc	480	
Leu Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser		
145 150 155 160		40
acc agc ctg age ccc gcc cgc ggg cac age gtc tgc tcc acc tcc agc	528	
Thr Ser Leu Ser Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser		
165 170 175		
ctg tac ctg cag gac ctc acc gcc gcc gcg tcc gag tgc att gac ccc	576	
Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Thr Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro		
180 185 190		

tca gtg gtc ttt ccc tac ccg ctc aac gac agc agc tcg ccc aaa tcc	624	
Ser Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser		
195	200	205
tgt acc tcg tcc gat tcc acg gcc ttc tct agc gat tct gaa ggt gaa	672	
Cys Thr Ser Ser Asp Ser Thr Ala Phe Ser Ser Asp Ser Glu Gly Glu		
210	215	220
gag att gac gtg gtg acc gtg gag aag agg cga tet ctg gac atc cga	720	
Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg		10
225	230	235 240
aag cca gtc acc atc acg gtg cga gca gac ccc ctg gac ccc tgc atg	768	
Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met		
245	250	255
aag cac ttc cat atc tct atc cac caa cag cag cat aac tat gct gcc	816	
Lys His Phe His Ile Ser Ile His Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala		
260	265	270
cgt ttt cct cca gaa agt tgc tct caa gag ggg gat cct gag cca ggt	864	
Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly		20
275	280	285
ccc cag gaa gag gct ccg gag ata gaa gct ccc aag gag aaa gag gag	912	
Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu		
290	295	300
gag gaa gag gaa gag gag gaa gaa gag att gtg agc ccc cca cct gtc	960	
Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val		
305	310	315 320
gga agt gag gct ccc cag tcc tgc cac ccc aaa cct gtc agt tct gac	1008	
Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp		30
325	330	335
act gag gac gtg acc aag agg aag aac cat aac ttc ttg gaa cga aaa	1056	
Thr Glu Asp Val Thr Lys Arg Lys Asn His Asn Phe Leu Glu Arg Lys		
340	345	350
agg agg aat gac ctc cgc tcc egg ttc cta gcc ctg egg gac cag gtt	1104	
Arg Arg Asn Asp Leu Arg Ser Arg Phe Leu Ala Leu Arg Asp Gln Val		
355	360	365
ccc acc ctg gcc agc tgc tct aag gcc ccc aaa gtc gtg atc ctc agc	1152	
Pro Thr Leu Ala Ser Cys Ser Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Ser		
370	375	380
aag gcg tta gaa tac ttg cag gct ttg gtg ggg gct gaa aag aaa atg	1200	
Lys Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Ala Leu Val Gly Ala Glu Lys Lys Met		
385	390	395 400

gct aca gag aaa agg cag ctc cgg tgt cgg caa cag caa ctg caa aag 1248
 Ala Thr Glu Lys Arg Gln Leu Arg Cys Arg Gln Gln Gln Leu Gln Lys
 405 410 415
 aga atc gcg tac ctc agt ggc tac taa 1275
 Arg Ile Ala Tyr Leu Ser Gly Tyr
 420

<210> 158 10
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> Mouse
 <400> 158

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

210	215	220	
Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg			
225	230	235	240
Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met			
	245	250	255
Lys His Phe His Ile Ser Ile His Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala			
	260	265	270
Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly			10
	275	280	285
Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu			
	290	295	300
Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val			
305	310	315	320
Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp			
	325	330	335
Thr Glu Asp Val Thr Lys Arg Lys Asn His Asn Phe Leu Glu Arg Lys			20
	340	345	350
Arg Arg Asn Asp Leu Arg Ser Arg Phe Leu Ala Leu Arg Asp Gln Val			
	355	360	365
Pro Thr Leu Ala Ser Cys Ser Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Ser			
	370	375	380
Lys Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Ala Leu Val Gly Ala Glu Lys Lys Met			
385	390	395	400
Ala Thr Glu Lys Arg Gln Leu Arg Cys Arg Gln Gln Gln Leu Gln Lys			
	405	410	415
Arg Ile Ala Tyr Leu Ser Gly Tyr			30
	420		

<210> 159

<211> 1146

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1146)

<223>

<400> 159

atg gac ttc gac tcg tat cag cac tat ttc tac gac tat gac tgc gga
Met Asp Phe Asp Ser Tyr Gln His Tyr Phe Tyr Asp Tyr Asp Cys Gly

48

40

30

1	5	10	15		
gag gat ttc tac cgc tcc acg gcg ccc agc gag gac atc tgg aag aaa				96	
Glu Asp Phe Tyr Arg Ser Thr Ala Pro Ser Glu Asp Ile Trp Lys Lys					
	20	25	30		
ttc gag ctg gtg ccg tgg ccc ccc acg tgg cgg ccc tgg ggc tcc ggt				144	
Phe Glu Leu Val Pro Ser Pro Pro Thr Ser Pro Pro Trp Gly Ser Gly					
	35	40	45		
ccc ggc gcc gtg gac cca gcc tct ggg att aat ccc ggg gag ccg tgg				192	10
Pro Gly Ala Val Asp Pro Ala Ser Gly Ile Asn Pro Gly Glu Pro Trp					
	50	55	60		
cct gga ggg ggt gcc ggg gac gag gcg gaa tct cgg ggc cat tgg aaa				240	
Pro Gly Gly Gly Ala Gly Asp Glu Ala Glu Ser Arg Gly His Ser Lys					
65		70	75	80	
gcc tgg ggc agg aat tat gct tcc atc att cgc cgt gac tgc atg tgg				288	
Ala Trp Gly Arg Asn Tyr Ala Ser Ile Ile Arg Arg Asp Cys Met Trp					
	85	90	95		20
agc ggc ttc tcc gcc cga gaa cgg ctg gag aga gtg gtg agc gac agg				336	
Ser Gly Phe Ser Ala Arg Glu Arg Leu Glu Arg Val Val Ser Asp Arg					
	100	105	110		
ctg gcc cca ggc gcg ccc cgg ggg aac cgg ccc aaa gcg ccc gct acc				384	
Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr					
	115	120	125		
cgg gac ggc act cct agt ctg gaa gcc agt aac cgg gcg ccc gcc acc				432	
Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr					30
	130	135	140		
caa tgt cag ctg ggc gag ccc aag act cag gcc tgc tcc ggg tcc gag				480	
Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu					
145		150	155	160	
agc ccc tgg gac tgg ctg ctg tcc tcc gag tcc tcc cca cgg gcc agc				528	
Ser Pro Ser Asp Ser Leu Leu Ser Ser Glu Ser Ser Pro Arg Ala Ser					
	165	170	175		
cct gag ccc cta gtg ctg cat gag gag aca cgg ccc acc acc agc agc				576	
Pro Glu Pro Leu Val Leu His Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser					40
	180	185	190		
gac tct gaa gaa gag caa gaa gat gag gaa gaa att gat gtg gtg tct				624	
Asp Ser Glu Glu Glu Gln Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser					
	195	200	205		
gtg gag aag agg caa acc cct gcc aag agg tgg gag tgg ggc tca tct				672	
Val Glu Lys Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Ser					

210	215	220		
cca tcc cga ggc cac agc aaa cct ccg cac agc cca ctg gtc ctc aag			720	
Pro Ser Arg Gly His Ser Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys				
225	230	235	240	
agg tgc cac gtc tcc act cac cag cac aac tac gcc gca ccc ccc tcc			768	
Arg Cys His Val Ser Thr His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser				
	245	250	255	
aca agg aag gac tat cca gct gcc aag agg gcc aag ttg gac agt ggc			816	10
Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp Ser Gly				
	260	265	270	
agg gtc ctg aag cag atc agc aac aac cgc aag tgc tcc agc ccc agg			864	
Arg Val Leu Lys Gln Ile Ser Asn Asn Arg Lys Cys Ser Ser Pro Arg				
	275	280	285	
tcc tca gac acg gag gaa aac gac aag agg cgg aca cac aac gtc ttg			912	
Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn Asp Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu				
	290	295	300	20
gaa cgt cag agg agg aac gag ctg aag cgc agc ttt ttt gcc ctg cgt			960	
Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg				
305	310	315	320	
gac cag atc cct gaa ttg gaa aac aac gaa aag gcc ccc aag gta gtg			1008	
Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val				
	325	330	335	
atc ctc aaa aaa gcc acc gcc tac atc ctg tcc att caa gca gac gag			1056	
Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala Tyr Ile Leu Ser Ile Gln Ala Asp Glu				
	340	345	350	30
cac aag ctc acc tct gaa aag gac tta ttg agg aaa cga cga gaa cag			1104	
His Lys Leu Thr Ser Glu Lys Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln				
	355	360	365	
ttg aaa cac aaa ctc gaa cag ctt cga aac tct ggt gca taa			1146	
Leu Lys His Lys Leu Glu Gln Leu Arg Asn Ser Gly Ala				
	370	375	380	

<210> 160 40
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Mouse
 <400> 160

Met Asp Phe Asp Ser Tyr Gln His Tyr Phe Tyr Asp Tyr Asp Cys Gly
 1 5 10 15

Glu Asp Phe Tyr Arg Ser Thr Ala Pro Ser Glu Asp Ile Trp Lys Lys
 20 25 30
 Phe Glu Leu Val Pro Ser Pro Pro Thr Ser Pro Pro Trp Gly Ser Gly
 35 40 45
 Pro Gly Ala Val Asp Pro Ala Ser Gly Ile Asn Pro Gly Glu Pro Trp
 50 55 60
 Pro Gly Gly Gly Ala Gly Asp Glu Ala Glu Ser Arg Gly His Ser Lys
 65 70 75 80
 Ala Trp Gly Arg Asn Tyr Ala Ser Ile Ile Arg Arg Asp Cys Met Trp
 85 90 95
 Ser Gly Phe Ser Ala Arg Glu Arg Leu Glu Arg Val Val Ser Asp Arg
 100 105 110
 Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr
 115 120 125
 Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr
 130 135 140
 Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu
 145 150 155 160
 Ser Pro Ser Asp Ser Leu Leu Ser Ser Glu Ser Ser Pro Arg Ala Ser
 165 170 175
 Pro Glu Pro Leu Val Leu His Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser
 180 185 190
 Asp Ser Glu Glu Glu Gln Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser
 195 200 205
 Val Glu Lys Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Ser
 210 215 220
 Pro Ser Arg Gly His Ser Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys
 225 230 235 240
 Arg Cys His Val Ser Thr His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser
 245 250 255
 Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp Ser Gly
 260 265 270
 Arg Val Leu Lys Gln Ile Ser Asn Asn Arg Lys Cys Ser Ser Pro Arg
 275 280 285
 Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn Asp Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu
 290 295 300
 Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg
 305 310 315 320
 Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val

10

20

30

40

	325		330		335										
Ile	Leu	Lys	Lys	Ala	Thr	Ala	Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gln	Ala	Asp	Glu
			340					345				350			
His	Lys	Leu	Thr	Ser	Glu	Lys	Asp	Leu	Leu	Arg	Lys	Arg	Arg	Glu	Gln
		355				360						365			
Leu	Lys	His	Lys	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Asn	Ser	Gly	Ala			
	370					375					380				

10

- <210> 161
- <211> 1233
- <212> DNA
- <213> Mouse
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1233)
- <223>
- <400> 161

20

atg	ccc	ctc	aac	gtg	aac	ttc	acc	aac	agg	aac	tat	gac	ctc	gac	tac	48
Met	Pro	Leu	Asn	Val	Asn	Phe	Thr	Asn	Arg	Asn	Tyr	Asp	Leu	Asp	Tyr	
1			5					10						15		
gac	tcc	gta	cag	ccc	tat	ttc	atc	tgc	gac	gag	gaa	gag	aat	ttc	tat	96
Asp	Ser	Val	Gln	Pro	Tyr	Phe	Ile	Cys	Asp	Glu	Glu	Glu	Asn	Phe	Tyr	
		20						25					30			
cac	cag	caa	cag	cag	agc	gag	ctg	cag	ccg	ccc	gcg	ccc	agt	gag	gat	144
His	Gln	Gln	Gln	Gln	Ser	Glu	Leu	Gln	Pro	Pro	Ala	Pro	Ser	Glu	Asp	30
		35				40					45					
atc	tgg	aag	aaa	ttc	gag	ctg	ctt	ccc	acc	ccg	ccc	ctg	tcc	ccg	agc	192
Ile	Trp	Lys	Lys	Phe	Glu	Leu	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Leu	Ser	Pro	Ser	
	50					55					60					
cgc	cgc	tcc	ggg	ctc	tgc	tct	cca	tcc	tat	gtt	gcg	gtc	gct	acg	tcc	240
Arg	Arg	Ser	Gly	Leu	Cys	Ser	Pro	Ser	Tyr	Val	Ala	Val	Ala	Thr	Ser	
65				70						75				80		
ttc	tcc	cca	agg	gaa	gac	gat	gac	ggc	ggc	ggt	ggc	aac	ttc	tcc	acc	288
Phe	Ser	Pro	Arg	Glu	Asp	Asp	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Phe	Ser	Thr	40
			85							90				95		
gcc	gat	cag	ctg	gag	atg	atg	acc	gag	tta	ctt	gga	gga	gac	atg	gtg	336
Ala	Asp	Gln	Leu	Glu	Met	Met	Thr	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp	Met	Val	
		100						105					110			
aac	cag	agc	ttc	atc	tgc	gat	cct	gac	gac	gag	acc	ttc	atc	aag	aac	384

Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn				
115	120	125		
atc atc atc cag gac tgt atg tgg agc ggt ttc tca gcc gct gcc aag		432		
Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys				
130	135	140		
ctg gag aga gtg gtg agc gac agg ctg gcc cca ggc gcg ccc cgg ggg		480		
Leu Glu Arg Val Val Ser Asp Arg Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly				
145	150	155	160	10
aac ccg ccc aaa gcg ccc gct acc ccg gac ggc act cct agt ctg gaa		528		
Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu				
165	170	175		
gcc agt aac ccg gcg ccc gcc acc caa tgt cag ctg ggc gag ccc aag		576		
Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys				
180	185	190		
act cag gcc tgc tcc ggg tcc gag agc ccc agc gat tct gaa ggt gaa		624		
Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu Ser Pro Ser Asp Ser Glu Gly Glu			20	
195	200	205		
gag att gac gtg gtg acc gtg gag aag agg cga tct ctg gac atc cga		672		
Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg				
210	215	220		
aag cca gtc acc atc acg gtg cga gca gac ccc ctg gac ccc tgc atg		720		
Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met				
225	230	235	240	
aag cac ttc cat atc tct atc cac caa cag cag cat aac tat gct gcc		768		
Lys His Phe His Ile Ser Ile His Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala			30	
245	250	255		
cgt ttt cct cca gaa agt tgc tct caa gag ggg gat cct gag cca ggt		816		
Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly				
260	265	270		
ccc cag gaa gag gct ccg gag ata gaa gct ccc aag gag aaa gag gag		864		
Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu				
275	280	285		
gag gaa gag gaa gag gag gaa gaa gag att gtg agc ccc cca cct gtc		912		40
Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val				
290	295	300		
gga agt gag gct ccc cag tcc tgc cac ccc aaa cct gtc tcc tca gac		960		
Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp				
305	310	315	320	
acg gag gaa aac gac aag agg cgg aca cac aac gtc ttg gaa cgt cag		1008		

Thr Glu Glu Asn Asp Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln
325 330 335
agg agg aac gag ctg aag cgc agc ttt ttt gcc ctg cgt gac cag atc 1056
Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile
340 345 350
cct gaa ttg gaa aac aac gaa aag gcc ccc aag gta gtg atc ctc aaa 1104
Pro Glu Leu Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys
355 360 365 10
aaa gcc acc gcc tac atc ctg tcc att caa gca gac gag cac aag ctc 1152
Lys Ala Thr Ala Tyr Ile Leu Ser Ile Gln Ala Asp Glu His Lys Leu
370 375 380
acc tct gaa aag gac tta ttg agg aaa cga cga gaa cag ttg aaa cac 1200
Thr Ser Glu Lys Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His
385 390 395 400
aaa ctc gaa cag ctt cga aac tct ggt gca taa 1233
Lys Leu Glu Gln Leu Arg Asn Ser Gly Ala 20
405 410

<210> 162

<211> 410

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 162

Met Pro Leu Asn Val Asn Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr
1 5 10 15 30
Asp Ser Val Gln Pro Tyr Phe Ile Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr
20 25 30
His Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp
35 40 45
Ile Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser
50 55 60
Arg Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Ala Thr Ser
65 70 75 80 40
Phe Ser Pro Arg Glu Asp Asp Asp Gly Gly Gly Gly Asn Phe Ser Thr
85 90 95
Ala Asp Gln Leu Glu Met Met Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val
100 105 110
Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn
115 120 125

Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys	
130	135 140
Leu Glu Arg Val Val Ser Asp Arg Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly	
145	150 155 160
Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu	
	165 170 175
Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys	
	180 185 190
Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu Ser Pro Ser Asp Ser Glu Gly Glu	
	195 200 205
Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg	
	210 215 220
Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met	
	225 230 235 240
Lys His Phe His Ile Ser Ile His Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala	
	245 250 255
Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly	
	260 265 270
Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu	
	275 280 285
Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val	
	290 295 300
Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp	
	305 310 315 320
Thr Glu Glu Asn Asp Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln	
	325 330 335
Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile	
	340 345 350
Pro Glu Leu Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys	
	355 360 365
Lys Ala Thr Ala Tyr Ile Leu Ser Ile Gln Ala Asp Glu His Lys Leu	
	370 375 380
Thr Ser Glu Lys Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His	
	385 390 395 400
Lys Leu Glu Gln Leu Arg Asn Ser Gly Ala	
	405 410

<210> 163

<211> 1194

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1194)

<223>

<400> 163

atg gac ttc gac tog tat cag cac tat ttc tac gac tat gac tgc gga	48	10
Met Asp Phe Asp Ser Tyr Gln His Tyr Phe Tyr Asp Tyr Asp Cys Gly		
1 5 10 15		
gag gat ttc tac cgc tcc acg gcg ccc agc gag gac atc tgg aag aaa	96	
Glu Asp Phe Tyr Arg Ser Thr Ala Pro Ser Glu Asp Ile Trp Lys Lys		
20 25 30		
ttc gag ctg gtg ccg tcg ccc ccc acg tcg ccg ccc tgg ggc tcc ggt	144	
Phe Glu Leu Val Pro Ser Pro Pro Thr Ser Pro Pro Trp Gly Ser Gly		
35 40 45		20
ccc ggc gcc gtg gac cca gcc tct ggg att aat ccc ggg gag ccg tgg	192	
Pro Gly Ala Val Asp Pro Ala Ser Gly Ile Asn Pro Gly Glu Pro Trp		
50 55 60		
cct gga ggg ggt gcc ggg gac gag gcg gaa tct cgg ggc cat tcg aaa	240	
Pro Gly Gly Gly Ala Gly Asp Glu Ala Glu Ser Arg Gly His Ser Lys		
65 70 75 80		
gcc tgg ggc agg aat tat gct tcc atc att cgc cgt gac tgc atg tgg	288	
Ala Trp Gly Arg Asn Tyr Ala Ser Ile Ile Arg Arg Asp Cys Met Trp		
85 90 95		30
agc ggc ttc tcc gcc cga gaa cgg ctg gtc tcg gag aag ctg gcc tcc	336	
Ser Gly Phe Ser Ala Arg Glu Arg Leu Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser		
100 105 110		
tac cag gct gcg cgc aaa gac agc acc agc ctg agc ccc gcc cgc ggg	384	
Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser Thr Ser Leu Ser Pro Ala Arg Gly		
115 120 125		
cac agc gtc tgc tcc acc tcc agc ctg tac ctg cag gac ctc acc gcc	432	
His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Thr Ala		40
130 135 140		
gcc gcg tcc gag tgc att gac ccc tea gtg gtc ttt ccc tac ccg ctc	480	
Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro Ser Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu		
145 150 155 160		
aac gac agc agc tog ccc aaa tcc tgt acc tgg tcc gat tcc acg gcc	528	
Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser Cys Thr Ser Ser Asp Ser Thr Ala		

	165	170	175		
ttc tct cct tcc teg gac tgc ctg ctg tcc tcc gag tcc tcc cca cgg				576	
Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu Leu Ser Ser Glu Ser Ser Pro Arg					
	180	185	190		
gcc agc cct gag ccc cta gtg ctg cat gag gag aca cgg ccc acc acc				624	
Ala Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu His Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr					
	195	200	205		
agc agc gac tct gaa gaa gag caa gaa gat gag gaa gaa att gat gtg				672	10
Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val					
	210	215	220		
gtg tct gtg gag aag agg caa acc cct gcc aag agg tgc gag tgc ggc				720	
Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Ser Glu Ser Gly					
	225	230	235	240	
tca tct cca tcc cga ggc cac agc aaa cct ccg cac agc cca ctg gtc				768	
Ser Ser Pro Ser Arg Gly His Ser Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val					
	245	250	255		20
ctc aag agg tgc cac gtc tcc act cac cag cac aac tac gcc gca ccc				816	
Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro					
	260	265	270		
ccc tcc aca agg aag gac tat cca gct gcc aag agg gcc aag ttg gac				864	
Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp					
	275	280	285		
agt ggc agg gtc ctg aag cag atc agc aac aac cgc aag tgc tcc agc				912	
Ser Gly Arg Val Leu Lys Gln Ile Ser Asn Asn Arg Lys Cys Ser Ser					30
	290	295	300		
ccc agg agt tct gac act gag gac gtg acc aag agg aag aac cat aac				960	
Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Asp Val Thr Lys Arg Lys Asn His Asn					
	305	310	315	320	
ttc ttg gaa cga aaa agg agg aat gac ctc cgc tcc cgg ttc cta gcc				1008	
Phe Leu Glu Arg Lys Arg Arg Asn Asp Leu Arg Ser Arg Phe Leu Ala					
	325	330	335		
ctg cgg gac cag gtt ccc acc ctg gcc agc tgc tct aag gcc ccc aaa				1056	
Leu Arg Asp Gln Val Pro Thr Leu Ala Ser Cys Ser Lys Ala Pro Lys					40
	340	345	350		
gtc gtg atc ctc agc aag gcg tta gaa tac ttg cag gct ttg gtg ggg				1104	
Val Val Ile Leu Ser Lys Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Ala Leu Val Gly					
	355	360	365		
gct gaa aag aaa atg gct aca gag aaa agg cag ctc cgg tgt cgg caa				1152	
Ala Glu Lys Lys Met Ala Thr Glu Lys Arg Gln Leu Arg Cys Arg Gln					

370 375 380 1194
 cag caa ctg caa aag aga atc gcg tac etc agt ggc tac taa
 Gln Gln Leu Gln Lys Arg Ile Ala Tyr Leu Ser Gly Tyr
 385 390 395

<210> 164

<211> 397

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 164

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

10

20

30

40

225 230 235 240
 Ser Ser Pro Ser Arg Gly His Ser Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val
 245 250 255
 Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro
 260 265 270
 Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp
 275 280 285
 Ser Gly Arg Val Leu Lys Gln Ile Ser Asn Asn Arg Lys Cys Ser Ser
 290 295 300
 Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Asp Val Thr Lys Arg Lys Asn His Asn
 305 310 315 320
 Phe Leu Glu Arg Lys Arg Arg Asn Asp Leu Arg Ser Arg Phe Leu Ala
 325 330 335
 Leu Arg Asp Gln Val Pro Thr Leu Ala Ser Cys Ser Lys Ala Pro Lys
 340 345 350
 Val Val Ile Leu Ser Lys Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Ala Leu Val Gly
 355 360 365
 Ala Glu Lys Lys Met Ala Thr Glu Lys Arg Gln Leu Arg Cys Arg Gln
 370 375 380
 Gln Gln Leu Gln Lys Arg Ile Ala Tyr Leu Ser Gly Tyr
 385 390 395

10

20

<210> 165
 <211> 1314
 <212> DNA
 <213> Mouse
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1314)
 <223>
 <400> 165

30

atg ccc ctc aac gtg aac ttc acc aac agg aac tat gac ctc gac tac 48
 Met Pro Leu Asn Val Asn Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr
 1 5 10 15
 gac tcc gta cag ccc tat ttc atc tgc gac gag gaa gag aat ttc tat 96
 Asp Ser Val Gln Pro Tyr Phe Ile Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr
 20 25 30
 cac cag caa cag cag agc gag ctg cag ccc ccc gcg ccc agt gag gat 144
 His Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp

40

35	40	45		
atc tgg aag aaa ttc gag ctg ctt ccc acc ccg ccc ctg tcc ccg agc			192	
Ile Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser				
50	55	60		
cgc cgc tcc ggg ctc tgc tct cca tcc tat gtt gcg gtc get acg tcc			240	
Arg Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Ala Thr Ser				
65	70	75	80	
ttc tcc cca agg gaa gac gat gac ggc ggc ggt ggc aac ttc tcc acc			288	10
Phe Ser Pro Arg Glu Asp Asp Asp Gly Gly Gly Gly Asn Phe Ser Thr				
85	90	95		
gcc gat cag ctg gag atg atg acc gag tta ctt gga gga gac atg gtg			336	
Ala Asp Gln Leu Glu Met Met Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val				
100	105	110		
aac cag agc ttc atc tgc gat cct gac gac gag acc ttc atc aag aac			384	
Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn				
115	120	125		20
atc atc atc cag gac tgt atg tgg agc ggt ttc tca gcc gct gcc aag			432	
Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys				
130	135	140		
ctg gtc tcg gag aag ctg gcc tcc tac cag gct gcg cgc aaa gac agc			480	
Leu Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser				
145	150	155	160	
acc agc ctg agc ccc gcc cgc ggg cac agc gtc tgc tcc acc tcc agc			528	
Thr Ser Leu Ser Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser				
165	170	175		30
ctg tac ctg cag gac ctc acc gcc gcc gcg tcc gag tgc att gac ccc			576	
Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Thr Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro				
180	185	190		
tca gtg gtc ttt ccc tac ccg ctc aac gac agc agc tcg ccc aaa tcc			624	
Ser Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser				
195	200	205		
tgt acc teg tcc gat tcc acg gcc ttc tct cct tcc teg gac teg ctg			672	
Cys Thr Ser Ser Asp Ser Thr Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu				40
210	215	220		
ctg tcc tcc gag tcc tcc cca cgg gcc agc cct gag ccc cta gtg ctg			720	
Leu Ser Ser Glu Ser Ser Pro Arg Ala Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu				
225	230	235	240	
cat gag gag aca ccg ccc acc acc agc agc gac tct gaa gaa gag caa			768	
His Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln				

245	250	255		
gaa gat gag gaa gaa att gat gtg gtg tet gtg gag aag agg caa acc			816	
Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Thr				
260	265	270		
cct gcc aag agg tcg gag tcg ggc tca tet cca tcc cga ggc cac agc			864	
Pro Ala Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Gly His Ser				
275	280	285		
aaa cct ccg cac agc cca ctg gtc ctc aag agg tgc cac gtc tcc act			912	10
Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr				
290	295	300		
cac cag cac aac tac gcc gca ccc ccc tcc aca agg aag gac tat cca			960	
His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro				
305	310	315		
gct gcc aag agg gcc aag ttg gac agt ggc agg gtc ctg aag cag atc			1008	
Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp Ser Gly Arg Val Leu Lys Gln Ile				
325	330	335		
age aac aac cgc aag tgc tcc agc ccc agg agt tet gac act gag gac			1056	20
Ser Asn Asn Arg Lys Cys Ser Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Asp				
340	345	350		
gtg acc aag agg aag aac cat aac ttc ttg gaa cga aaa agg agg aat			1104	
Val Thr Lys Arg Lys Asn His Asn Phe Leu Glu Arg Lys Arg Arg Asn				
355	360	365		
gac ctc cgc tcc cgg ttc cta gcc ctg cgg gac cag gtt ccc acc ctg			1152	
Asp Leu Arg Ser Arg Phe Leu Ala Leu Arg Asp Gln Val Pro Thr Leu				
370	375	380		30
gcc agc tgc tet aag gcc ccc aaa gtc gtg atc ctc agc aag gcg tta			1200	
Ala Ser Cys Ser Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Ser Lys Ala Leu				
385	390	395		
gaa tac ttg cag gct ttg gtg ggg gct gaa aag aaa atg gct aca gag			1248	
Glu Tyr Leu Gln Ala Leu Val Gly Ala Glu Lys Lys Met Ala Thr Glu				
405	410	415		
aaa agg cag ctc cgg tgt egg caa cag caa ctg caa aag aga atc gcg			1296	
Lys Arg Gln Leu Arg Cys Arg Gln Gln Gln Leu Gln Lys Arg Ile Ala				40
420	425	430		
tac ctc agt ggc tac taa			1314	
Tyr Leu Ser Gly Tyr				
435				

<211> 437

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 166

Met Pro Leu Asn Val Asn Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr

1 5 10 15

Asp Ser Val Gln Pro Tyr Phe Ile Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr

20 25 30

10

His Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp

35 40 45

Ile Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser

50 55 60

Arg Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Ala Thr Ser

65 70 75 80

Phe Ser Pro Arg Glu Asp Asp Asp Gly Gly Gly Gly Asn Phe Ser Thr

85 90 95

20

Ala Asp Gln Leu Glu Met Met Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val

100 105 110

Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn

115 120 125

Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys

130 135 140

Leu Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser

145 150 155 160

Thr Ser Leu Ser Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser

165 170 175

30

Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Thr Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro

180 185 190

Ser Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser

195 200 205

Cys Thr Ser Ser Asp Ser Thr Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu

210 215 220

Leu Ser Ser Glu Ser Ser Pro Arg Ala Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu

225 230 235 240

40

His Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln

245 250 255

Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Thr

260 265 270

Pro Ala Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Gly His Ser

```

                275                280                285
Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr
    290                295                300
His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro
305                310                315                320
Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp Ser Gly Arg Val Leu Lys Gln Ile
                325                330                335
Ser Asn Asn Arg Lys Cys Ser Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Asp
                340                345                350
Val Thr Lys Arg Lys Asn His Asn Phe Leu Glu Arg Lys Arg Arg Asn
    355                360                365
Asp Leu Arg Ser Arg Phe Leu Ala Leu Arg Asp Gln Val Pro Thr Leu
    370                375                380
Ala Ser Cys Ser Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Ser Lys Ala Leu
385                390                395                400
Glu Tyr Leu Gln Ala Leu Val Gly Ala Glu Lys Lys Met Ala Thr Glu
                405                410                415
Lys Arg Gln Leu Arg Cys Arg Gln Gln Gln Leu Gln Lys Arg Ile Ala
    420                425                430
Tyr Leu Ser Gly Tyr
    435

```

10

20

```

<210> 167
<211> 1227
<212> DNA
<213> Mouse
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1227)
<223>
<400> 167

```

30

```

atg ccc ctc aac gtg aac ttc acc aac agg aac tat gac ctc gac tac      48
Met Pro Leu Asn Val Asn Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr      40
1                5                10                15
gac tcc gta cag ccc tat ttc atc tgc gac gag gaa gag aat ttc tat      96
Asp Ser Val Gln Pro Tyr Phe Ile Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr
                20                25                30
cac cag caa cag cag agc gag ctg cag ccg ccc gcg ccc agt gag gat      144
His Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp

```

40

35	40	45		
atc tgg aag aaa ttc gag ctg ctt ccc acc ccg ccc ctg tcc ccg agc			192	
Ile Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser				
50	55	60		
cgc cgc tcc ggg ctc tgc tct cca tcc tat gtt gcg gtc gct acg tcc			240	
Arg Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Ala Thr Ser				
65	70	75	80	
ttc tcc cca agg gaa gac gat gac ggc ggc ggt ggc aac ttc tcc acc			288	10
Phe Ser Pro Arg Glu Asp Asp Asp Gly Gly Gly Gly Asn Phe Ser Thr				
85	90	95		
gcc gat cag ctg gag atg atg acc gag tta ctt gga gga gac atg gtg			336	
Ala Asp Gln Leu Glu Met Met Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val				
100	105	110		
aac cag agc ttc atc tgc gat cct gac gac gag acc ttc atc aag aac			384	
Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn				
115	120	125		20
atc atc atc cag gac tgt atg tgg age ggt ttc tca gcc gct gcc aag			432	
Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys				
130	135	140		
ctg gag aga gtg gtg agc gac agg ctg gcc cca ggc gcg ccc cgg ggg			480	
Leu Glu Arg Val Val Ser Asp Arg Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly				
145	150	155	160	
aac ccg ccc aaa gcg ccc gct acc ccg gac ggc act cct agt ctg gaa			528	
Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu				
165	170	175		30
gcc agt aac ccg gcg ccc gcc acc caa tgt cag ctg ggc gag ccc aag			576	
Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys				
180	185	190		
act cag gcc tgc tcc ggg tcc gag age ccc agc gat tct gaa ggt gaa			624	
Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu Ser Pro Ser Asp Ser Glu Gly Glu				
195	200	205		
gag att gac gtg gtg acc gtg gag aag agg cga tct ctg gac atc cga			672	
Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg				40
210	215	220		
aag cca gtc acc atc acg gtg cga gca gac ccc ctg gac ccc tgc atg			720	
Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met				
225	230	235	240	
aag cac ttc cat atc tet atc cac caa cag cag cat aac tat gct gcc			768	
Lys His Phe His Ile Ser Ile His Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala				

	245	250	255		
cgt ttt cct cca gaa agt tgc tet caa gag ggg gat cct gag cca ggt				816	
Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly					
	260	265	270		
ccc cag gaa gag gct ccg gag ata gaa gct ccc aag gag aaa gag gag				864	
Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu					
	275	280	285		
gag gaa gag gaa gag gag gaa gaa gag att gtg agc ccc cca cct gtc				912	10
Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val					
	290	295	300		
gga agt gag gct ccc cag tcc tgc cac ccc aaa cct gtc agt tet gac				960	
Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp					
305	310		315	320	
act gag gac gtg acc aag agg aag aac cat aac ttc ttg gaa cga aaa				1008	
Thr Glu Asp Val Thr Lys Arg Lys Asn His Asn Phe Leu Glu Arg Lys					
	325	330	335		20
agg agg aat gac etc cgc tcc egg ttc cta gcc ctg egg gac cag gtt				1056	
Arg Arg Asn Asp Leu Arg Ser Arg Phe Leu Ala Leu Arg Asp Gln Val					
	340	345	350		
ccc acc ctg gcc agc tgc tet aag gcc ccc aaa gtc gtg atc etc agc				1104	
Pro Thr Leu Ala Ser Cys Ser Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Ser					
	355	360	365		
aag gcg tta gaa tac ttg cag gct ttg gtg ggg gct gaa aag aaa atg				1152	
Lys Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Ala Leu Val Gly Ala Glu Lys Lys Met					30
	370	375	380		
gct aca gag aaa agg cag etc cgg tgt cgg caa cag caa ctg caa aag				1200	
Ala Thr Glu Lys Arg Gln Leu Arg Cys Arg Gln Gln Gln Leu Gln Lys					
385	390		395	400	
aga atc gcg tac etc agt ggc tac taa				1227	
Arg Ile Ala Tyr Leu Ser Gly Tyr					
	405				

<210>	168	40
<211>	408	
<212>	PRT	
<213>	Mouse	
<400>	168	

Met	Pro	Leu	Asn	Val	Asn	Phe	Thr	Asn	Arg	Asn	Tyr	Asp	Leu	Asp	Tyr
1				5					10				15		

Asp Ser Val Gln Pro Tyr Phe Ile Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr	
20 25 30	
His Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp	
35 40 45	
Ile Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser	
50 55 60	
Arg Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Ala Thr Ser	
65 70 75 80	10
Phe Ser Pro Arg Glu Asp Asp Asp Gly Gly Gly Gly Asn Phe Ser Thr	
85 90 95	
Ala Asp Gln Leu Glu Met Met Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val	
100 105 110	
Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn	
115 120 125	
Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys	
130 135 140	20
Leu Glu Arg Val Val Ser Asp Arg Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly	
145 150 155 160	
Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu	
165 170 175	
Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys	
180 185 190	
Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu Ser Pro Ser Asp Ser Glu Gly Glu	
195 200 205	
Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg	
210 215 220	30
Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met	
225 230 235 240	
Lys His Phe His Ile Ser Ile His Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala	
245 250 255	
Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly	
260 265 270	
Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu	
275 280 285	40
Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val	
290 295 300	
Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp	
305 310 315 320	
Thr Glu Asp Val Thr Lys Arg Lys Asn His Asn Phe Leu Glu Arg Lys	

```

          325              330              335
Arg Arg Asn Asp Leu Arg Ser Arg Phe Leu Ala Leu Arg Asp Gln Val
          340              345              350
Pro Thr Leu Ala Ser Cys Ser Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Ser
          355              360              365
Lys Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Ala Leu Val Gly Ala Glu Lys Lys Met
          370              375              380
Ala Thr Glu Lys Arg Gln Leu Arg Cys Arg Gln Gln Gln Leu Gln Lys
          385              390              395              400
Arg Ile Ala Tyr Leu Ser Gly Tyr
          405

```

10

```

<210> 169
<211> 1113
<212> DNA
<213> Mouse
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1113)
<223>
<400> 169

```

20

```

atg gac ttc gac tcg tat cag cac tat ttc tac gac tat gac tgc gga      48
Met Asp Phe Asp Ser Tyr Gln His Tyr Phe Tyr Asp Tyr Asp Cys Gly
1          5          10          15
gag gat ttc tac cgc tcc acg gcg ccc agc gag gac atc tgg aag aaa      96
Glu Asp Phe Tyr Arg Ser Thr Ala Pro Ser Glu Asp Ile Trp Lys Lys
          20          25          30
ttc gag ctg gtg ccg tgc ccc ccc acg tcg ccg ccc tgg ggc tcc ggt      144
Phe Glu Leu Val Pro Ser Pro Pro Thr Ser Pro Pro Trp Gly Ser Gly
          35          40          45
ccc ggc gcc gtg gac cca gcc tct ggg att aat ccc ggg gag ccg tgg      192
Pro Gly Ala Val Asp Pro Ala Ser Gly Ile Asn Pro Gly Glu Pro Trp
          50          55          60
cct gga ggg ggt gcc ggg gac gag gcg gaa tct cgg ggc cat tcg aaa      240
Pro Gly Gly Gly Ala Gly Asp Glu Ala Glu Ser Arg Gly His Ser Lys
65          70          75          80
gcc tgg ggc agg aat tat gct tcc atc att cgc cgt gac tgc atg tgg      288
Ala Trp Gly Arg Asn Tyr Ala Ser Ile Ile Arg Arg Asp Cys Met Trp
          85          90          95

```

30

40

agc ggc ttc tcc gcc cga gaa cgg ctg gag aga gtg gtg agc gac agg	336	
Ser Gly Phe Ser Ala Arg Glu Arg Leu Glu Arg Val Val Ser Asp Arg		
100 105 110		
ctg gcc cca ggc gcg ccc cgg ggg aac ccg ccc aaa gcg ccc gct acc	384	
Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr		
115 120 125		
ccg gac ggc act cct agt ctg gaa gcc agt aac ccg gcg ccc gcc acc	432	
Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr		10
130 135 140		
caa tgt cag ctg ggc gag ccc aag act cag gcc tgc tcc ggg tcc gag	480	
Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu		
145 150 155 160		
agc ccc agc gat tct gaa ggt gaa gag att gac gtg gtg acc gtg gag	528	
Ser Pro Ser Asp Ser Glu Gly Glu Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu		
165 170 175		
aag agg cga tct ctg gac atc cga aag cca gtc acc atc acg gtg cga	576	
Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg		20
180 185 190		
gca gac ccc ctg gac ccc tgc atg aag cac ttc cat atc tct atc cac	624	
Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met Lys His Phe His Ile Ser Ile His		
195 200 205		
caa cag cag cat aac tat get gcc cgt ttt cct cca gaa agt tgc tct	672	
Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser		
210 215 220		
caa gag ggg gat cct gag cca ggt ccc cag gaa gag gct ccg gag ata	720	
Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile		30
225 230 235 240		
gaa gct ccc aag gag aaa gag gag gag gaa gag gaa gag gag gaa gaa	768	
Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu		
245 250 255		
gag att gtg agc ccc cca cct gtc gga agt gag gct ccc cag tcc tgc	816	
Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys		
260 265 270		40
cac ccc aaa cct gtc tcc tea gac acg gag gaa aac gac aag agg cgg	864	
His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn Asp Lys Arg Arg		
275 280 285		
aca cac aac gtc ttg gaa cgt cag agg agg aac gag ctg aag cgc agc	912	
Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser		
290 295 300		

ttt ttt gcc ctg cgt gac cag atc cct gaa ttg gaa aac aac gaa aag 960
 Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu Asn Asn Glu Lys
 305 310 315 320
 gcc ccc aag gta gtg atc ctc aaa aaa gcc acc gcc tac atc ctg tcc 1008
 Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala Tyr Ile Leu Ser
 325 330 335
 att caa gca gac gag cac aag ctc acc tct gaa aag gac tta ttg agg 1056
 Ile Gln Ala Asp Glu His Lys Leu Thr Ser Glu Lys Asp Leu Leu Arg 10
 340 345 350
 aaa cga cga gaa cag ttg aaa cac aaa ctc gaa cag ctt cga aac tct 1104
 Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu Gln Leu Arg Asn Ser
 355 360 365
 ggt gca taa 1113
 Gly Ala
 370

<210> 170
 <211> 370
 <212> PRT
 <213> Mouse
 <400> 170

Met Asp Phe Asp Ser Tyr Gln His Tyr Phe Tyr Asp Tyr Asp Cys Gly
 1 5 10 15
 Glu Asp Phe Tyr Arg Ser Thr Ala Pro Ser Glu Asp Ile Trp Lys Lys 30
 20 25 30
 Phe Glu Leu Val Pro Ser Pro Pro Thr Ser Pro Pro Trp Gly Ser Gly
 35 40 45
 Pro Gly Ala Val Asp Pro Ala Ser Gly Ile Asn Pro Gly Glu Pro Trp
 50 55 60
 Pro Gly Gly Gly Ala Gly Asp Glu Ala Glu Ser Arg Gly His Ser Lys
 65 70 75 80
 Ala Trp Gly Arg Asn Tyr Ala Ser Ile Ile Arg Arg Asp Cys Met Trp
 85 90 95 40
 Ser Gly Phe Ser Ala Arg Glu Arg Leu Glu Arg Val Val Ser Asp Arg
 100 105 110
 Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr
 115 120 125
 Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr
 130 135 140

Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu
145 150 155 160
Ser Pro Ser Asp Ser Glu Gly Glu Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu
165 170 175
Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg
180 185 190
Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met Lys His Phe His Ile Ser Ile His
195 200 205
Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser
210 215 220
Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile
225 230 235 240
Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
245 250 255
Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys
260 265 270
His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn Asp Lys Arg Arg
275 280 285
Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser
290 295 300
Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu Asn Asn Glu Lys
305 310 315 320
Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala Tyr Ile Leu Ser
325 330 335
Ile Gln Ala Asp Glu His Lys Leu Thr Ser Glu Lys Asp Leu Leu Arg
340 345 350
Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu Gln Leu Arg Asn Ser
355 360 365
Gly Ala
370

10

20

30

- <210> 171
- <211> 1200
- <212> DNA
- <213> Mouse
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1200)
- <223>

40

<400> 171

atg gac ttc gac tcg tat cag cac tat ttc tac gac tat gac tgc gga 48
Met Asp Phe Asp Ser Tyr Gln His Tyr Phe Tyr Asp Tyr Asp Cys Gly
1 5 10 15

gag gat ttc tac cgc tcc acg gcg ccc agc gag gac atc tgg aag aaa 96
Glu Asp Phe Tyr Arg Ser Thr Ala Pro Ser Glu Asp Ile Trp Lys Lys
20 25 30

ttc gag ctg gtg ccg tcg ccc ccc acg tcg ccg ccc tgg ggc tcc ggt 144 10
Phe Glu Leu Val Pro Ser Pro Pro Thr Ser Pro Pro Trp Gly Ser Gly
35 40 45

ccc ggc gcc gtg gac cca gcc tct ggg att aat ccc ggg gag ccg tgg 192
Pro Gly Ala Val Asp Pro Ala Ser Gly Ile Asn Pro Gly Glu Pro Trp
50 55 60

cct gga ggg ggt gcc ggg gac gag gcg gaa tct cgg ggc cat tcg aaa 240
Pro Gly Gly Gly Ala Gly Asp Glu Ala Glu Ser Arg Gly His Ser Lys
65 70 75 80

gcc tgg ggc agg aat tat gct tcc atc att cgc cgt gac tgc atg tgg 288 20
Ala Trp Gly Arg Asn Tyr Ala Ser Ile Ile Arg Arg Asp Cys Met Trp
85 90 95

agc ggc ttc tcc gcc cga gaa cgg ctg gtc tcg gag aag ctg gcc tcc 336
Ser Gly Phe Ser Ala Arg Glu Arg Leu Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser
100 105 110

tac cag gct gcg cgc aaa gac agc acc agc ctg agc ccc gcc cgc ggg 384
Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser Thr Ser Leu Ser Pro Ala Arg Gly
115 120 125

cac agc gtc tgc tcc acc tcc agc ctg tac ctg cag gac ctc acc gcc 432
His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Thr Ala
130 135 140

gcc gcg tcc gag tgc att gac ccc tca gtg gtc ttt ccc tac ccg ctc 480
Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro Ser Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu
145 150 155 160

aac gac agc agc tcg ccc aaa tcc tgt acc teg tcc gat tcc acg gcc 528
Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser Cys Thr Ser Ser Asp Ser Thr Ala
165 170 175

ttc tet cct tcc teg gac tcg ctg ctg tcc tcc gag tcc tcc cca cgg 576
Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu Leu Ser Ser Glu Ser Ser Pro Arg
180 185 190

gcc agc cct gag ccc cta gtg ctg cat gag gag aca ccg ccc acc acc 624
Ala Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu His Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr

195	200	205		
agc agc gac tct gaa gaa gag caa gaa gat gag gaa gaa att gat gtg			672	
Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val				
210	215	220		
gtg tct gtg gag aag agg caa acc cct gcc aag agg tcg gag tcg ggc			720	
Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Ser Glu Ser Gly				
225	230	235	240	
tca tct cca tcc cga ggc cac agc aaa cct ccg cac agc cca ctg gtc			768	10
Ser Ser Pro Ser Arg Gly His Ser Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val				
245	250	255		
ctc aag agg tgc cac gtc tcc act cac cag cac aac tac gcc gca ccc			816	
Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro				
260	265	270		
ccc tcc aca agg aag gac tat cca gct gcc aag agg gcc aag ttg gac			864	
Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp				
275	280	285		20
agt ggc agg gtc ctg aag cag atc agc aac aac cgc aag tgc tcc agc			912	
Ser Gly Arg Val Leu Lys Gln Ile Ser Asn Asn Arg Lys Cys Ser Ser				
290	295	300		
ccc agg tcc tca gac acg gag gaa aac gac aag agg cgg aca cac aac			960	
Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn Asp Lys Arg Arg Thr His Asn				
305	310	315	320	
gtc ttg gaa cgt cag agg agg aac gag ctg aag cgc agc ttt ttt gcc			1008	
Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala				
325	330	335		30
ctg cgt gac cag atc cct gaa ttg gaa aac aac gaa aag gcc ccc aag			1056	
Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys				
340	345	350		
gta gtg atc ctc aaa aaa gcc acc gcc tac atc ctg tcc att caa gca			1104	
Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala Tyr Ile Leu Ser Ile Gln Ala				
355	360	365		
gac gag cac aag ctc acc tct gaa aag gac tta ttg agg aaa cga cga			1152	
Asp Glu His Lys Leu Thr Ser Glu Lys Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg				
370	375	380		40
gaa cag ttg aaa cac aaa ctc gaa cag ctt cga aac tct ggt gca taa			1200	
Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu Gln Leu Arg Asn Ser Gly Ala				
385	390	395		

<211> 399

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 172

Met Asp Phe Asp Ser Tyr Gln His Tyr Phe Tyr Asp Tyr Asp Cys Gly

1 5 10 15

Glu Asp Phe Tyr Arg Ser Thr Ala Pro Ser Glu Asp Ile Trp Lys Lys

20 25 30

10

Phe Glu Leu Val Pro Ser Pro Pro Thr Ser Pro Pro Trp Gly Ser Gly

35 40 45

Pro Gly Ala Val Asp Pro Ala Ser Gly Ile Asn Pro Gly Glu Pro Trp

50 55 60

Pro Gly Gly Gly Ala Gly Asp Glu Ala Glu Ser Arg Gly His Ser Lys

65 70 75 80

Ala Trp Gly Arg Asn Tyr Ala Ser Ile Ile Arg Arg Asp Cys Met Trp

85 90 95

20

Ser Gly Phe Ser Ala Arg Glu Arg Leu Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser

100 105 110

Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser Thr Ser Leu Ser Pro Ala Arg Gly

115 120 125

His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Thr Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser Cys Thr Ser Ser Asp Ser Thr Ala

165 170 175

30

Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu Leu Ser Ser Glu Ser Ser Pro Arg

180 185 190

Ala Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu His Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr

195 200 205

Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val

210 215 220

Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Ser Glu Ser Gly

225 230 235 240

40

Ser Ser Pro Ser Arg Gly His Ser Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val

245 250 255

Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro

260 265 270

Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp

65	70	75	80		
ttc tcc cca agg gaa gac gat gac ggc ggc ggt ggc aac ttc tcc acc				288	
Phe Ser Pro Arg Glu Asp Asp Asp Gly Gly Gly Gly Asn Phe Ser Thr					
	85	90	95		
gcc gat cag ctg gag atg atg acc gag tta ctt gga gga gac atg gtg				336	
Ala Asp Gln Leu Glu Met Met Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val					
	100	105	110		
aac cag agc ttc atc tgc gat cct gac gac gag ace ttc atc aag aac				384	10
Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn					
	115	120	125		
atc atc atc cag gac tgt atg gag agc ggt ttc tca gcc gct gcc aag				432	
Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Glu Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys					
	130	135	140		
ctg gtc tcg gag aag ctg gcc tcc tac cag gct gcg cgc aaa gac agc				480	
Leu Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser					
	145	150	155		20
acc agc ctg agc ccc gcc cgc ggg cac agc gtc tgc tcc acc tcc agc				528	
Thr Ser Leu Ser Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser					
	165	170	175		
ctg tac ctg cag gac etc acc gcc gcc gcg tcc gag tgc att gac ccc				576	
Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Thr Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro					
	180	185	190		
tca gtg gtc ttt ccc tac ccg etc aac gac agc agc teg ccc aaa tcc				624	
Ser Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser					30
	195	200	205		
tgt acc teg tcc gat tcc acg gcc ttc tct cct tcc teg gac teg ctg				672	
Cys Thr Ser Ser Asp Ser Thr Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu					
	210	215	220		
ctg tcc tcc gag tcc tcc cca cgg gcc agc cct gag ccc cta gtg ctg				720	
Leu Ser Ser Glu Ser Ser Pro Arg Ala Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu					
	225	230	235		
cat gag gag aca ccg ccc acc acc agc agc gac tet gaa gaa gag caa				768	
His Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln					40
	245	250	255		
gaa gat gag gaa gaa att gat gtg gtg tct gtg gag aag agg caa acc				816	
Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Thr					
	260	265	270		
cct gcc aag agg teg gag teg ggc tca tet cca tcc cga gcc cac agc				864	
Pro Ala Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Gly His Ser					

275	280	285		
aaa cct ccg cac agc cca ctg gtc ctc aag agg tgc cac gtc tcc act			912	
Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr				
290	295	300		
cac cag cac aac tac gcc gca ccc ccc tcc aca agg aag gac tat cca			960	
His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro				
305	310	315	320	
gct gcc aag agg gcc aag ttg gac agt ggc agg gtc ctg aag cag atc			1008	10
Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp Ser Gly Arg Val Leu Lys Gln Ile				
325	330	335		
agc aac aac cgc aag tgc tcc agc ccc agg tcc tca gac acg gag gaa			1056	
Ser Asn Asn Arg Lys Cys Ser Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu				
340	345	350		
aac gac aag agg cgg aca cac aac gtc ttg gaa cgt cag agg agg aac			1104	
Asn Asp Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn				
355	360	365		20
gag ctg aag cgc agc ttt ttt gcc ctg cgt gac cag atc cct gaa ttg			1152	
Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu				
370	375	380		
gaa aac aac gaa aag gcc ccc aag gta gtg atc ctc aaa aaa gcc acc			1200	
Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr				
385	390	395	400	
gcc tac atc ctg tcc att caa gca gac gag cac aag ctc acc tct gaa			1248	
Ala Tyr Ile Leu Ser Ile Gln Ala Asp Glu His Lys Leu Thr Ser Glu				
405	410	415		30
aag gac tta ttg agg aaa cga cga gaa cag ttg aaa cac aaa ctc gaa			1296	
Lys Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu				
420	425	430		
cag ctt cga aac tct ggt gca taa			1320	
Gln Leu Arg Asn Ser Gly Ala				
435				

<210> 174 40

<211> 439

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 174

Met Pro Leu Asn Val Asn Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr

1 5 10 15

Asp Ser Val Gln Pro Tyr Phe Ile Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr	
20 25 30	
His Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp	
35 40 45	
Ile Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser	
50 55 60	
Arg Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Ala Thr Ser	
65 70 75 80	10
Phe Ser Pro Arg Glu Asp Asp Asp Gly Gly Gly Gly Asn Phe Ser Thr	
85 90 95	
Ala Asp Gln Leu Glu Met Met Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val	
100 105 110	
Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn	
115 120 125	
Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Glu Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys	
130 135 140	20
Leu Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser	
145 150 155 160	
Thr Ser Leu Ser Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser	
165 170 175	
Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Thr Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro	
180 185 190	
Ser Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser	
195 200 205	
Cys Thr Ser Ser Asp Ser Thr Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu	
210 215 220	30
Leu Ser Ser Glu Ser Ser Pro Arg Ala Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu	
225 230 235 240	
His Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln	
245 250 255	
Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Thr	
260 265 270	
Pro Ala Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Gly His Ser	
275 280 285	40
Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr	
290 295 300	
His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro	
305 310 315 320	
Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp Ser Gly Arg Val Leu Lys Gln Ile	

65	70	75	80		
ttc tcc cca agg gaa gac gat gac ggc ggc ggt ggc aac ttc tcc acc				288	
Phe Ser Pro Arg Glu Asp Asp Asp Gly Gly Gly Gly Asn Phe Ser Thr					
	85	90	95		
gcc gat cag ctg gag atg atg acc gag tta ctt gga gga gac atg gtg				336	
Ala Asp Gln Leu Glu Met Met Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val					
	100	105	110		
aac cag agc ttc atc tgc gat cct gac gac gag acc ttc atc aag aac				384	10
Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn					
	115	120	125		
atc atc atc cag gac tgt atg tgg agc ggt ttc tca gcc gct gcc aag				432	
Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys					
	130	135	140		
ctg gtc tcg gag aag ctg gcc tcc tac cag gct gcg cgc aaa gac agc				480	
Leu Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser					
	145	150	155	160	20
acc agc ctg agc ccc gcc cgc ggg cac agc gtc tgc tcc acc tcc agc				528	
Thr Ser Leu Ser Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser					
	165	170	175		
ctg tac ctg cag gac ctc acc gcc gcc gcg tcc gag tgc att gac ccc				576	
Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Thr Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro					
	180	185	190		
tca gtg gtc ttt ccc tac ccg ctc aac gac agc agc teg ccc aaa tcc				624	
Ser Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser					
	195	200	205		30
tgt acc tcg tcc gat tcc acg gcc ttc tct cct tcc tcg gac tcg ctg				672	
Cys Thr Ser Ser Asp Ser Thr Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu					
	210	215	220		
ctg tcc tcc gag tcc tcc cca cgg gcc agc cct gag ccc cta gtg ctg				720	
Leu Ser Ser Glu Ser Ser Pro Arg Ala Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu					
	225	230	235	240	
cat gag gag aca ccg ccc acc acc agc agc gac tct gaa gaa gag caa				768	
His Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln					
	245	250	255		40
gaa gat gag gaa gaa att gat gtg gtg tct gtg gag aag agg caa acc				816	
Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Thr					
	260	265	270		
cct gcc aag agg tcg gag tcg ggc tca tct cca tcc cga ggc cac agc				864	
Pro Ala Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Gly His Ser					

275	280	285		
aaa cct ccg cac agc cca ctg gtc ctc aag agg tgc cac gtc tcc act			912	
Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr				
290	295	300		
cac cag cac aac tac gcc gca ccc ccc tcc aca agg aag gac tat cca			960	
His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro				
305	310	315	320	
gct gcc aag agg gcc aag ttg gac agt ggc agg gtc ctg aag cag atc			1008	10
Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp Ser Gly Arg Val Leu Lys Gln Ile				
325	330	335		
agc aac aac cgc aag tgc tcc agc ccc agg tcc tca gac acg gag gaa			1056	
Ser Asn Asn Arg Lys Cys Ser Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu				
340	345	350		
aac gac aag agg cgg aca cac aac gtc ttg gaa cgt cag agg agg aac			1104	
Asn Asp Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn				
355	360	365		20
gag ctg aag cgc agc ttt ttt gcc ctg cgt gac cag atc cct gaa ttg			1152	
Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu				
370	375	380		
gaa aac aac gaa aag gcc ccc aag gta gat atc ctc aaa aaa gcc acc			1200	
Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Asp Ile Leu Lys Lys Ala Thr				
385	390	395	400	
gcc tac atc ctg tcc att caa gca gac gag cac aag ctc acc tet gaa			1248	
Ala Tyr Ile Leu Ser Ile Gln Ala Asp Glu His Lys Leu Thr Ser Glu				
405	410	415		30
aag gac tta ttg agg aaa cga cga gaa cag ttg aaa cac aaa ctc gaa			1296	
Lys Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu				
420	425	430		
cag ctt cga aac tet ggt gca taa			1320	
Gln Leu Arg Asn Ser Gly Ala				
435				
<210> 176				40
<211> 439				
<212> PRT				
<213> Mouse				
<400> 176				
Met Pro Leu Asn Val Asn Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr				
1	5	10	15	

Asp Ser Val Gln Pro Tyr Phe Ile Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr	
20 25 30	
His Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp	
35 40 45	
Ile Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser	
50 55 60	
Arg Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Ala Thr Ser	
65 70 75 80	10
Phe Ser Pro Arg Glu Asp Asp Asp Gly Gly Gly Gly Asn Phe Ser Thr	
85 90 95	
Ala Asp Gln Leu Glu Met Met Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val	
100 105 110	
Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn	
115 120 125	
Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys	
130 135 140	20
Leu Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser	
145 150 155 160	
Thr Ser Leu Ser Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser	
165 170 175	
Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Thr Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro	
180 185 190	
Ser Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser	
195 200 205	
Cys Thr Ser Ser Asp Ser Thr Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu	
210 215 220	30
Leu Ser Ser Glu Ser Ser Pro Arg Ala Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu	
225 230 235 240	
His Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln	
245 250 255	
Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Thr	
260 265 270	
Pro Ala Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Gly His Ser	
275 280 285	40
Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr	
290 295 300	
His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro	
305 310 315 320	
Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp Ser Gly Arg Val Leu Lys Gln Ile	

325 330 335
 Ser Asn Asn Arg Lys Cys Ser Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu
 340 345 350
 Asn Asp Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn
 355 360 365
 Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu
 370 375 380
 Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Asp Ile Leu Lys Lys Ala Thr
 385 390 395 400
 Ala Tyr Ile Leu Ser Ile Gln Ala Asp Glu His Lys Leu Thr Ser Glu
 405 410 415
 Lys Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu
 420 425 430
 Gln Leu Arg Asn Ser Gly Ala
 435

10

- <210> 177
- <211> 1320
- <212> DNA
- <213> Mouse
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1320)
- <223>

20

<400> 177
 atg ccc ctc aac gtg aac ttc acc aac agg aac tat gac ctc gac tac 48
 Met Pro Leu Asn Val Asn Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr
 1 5 10 15
 gac tcc gta cag ccc tat ttc atc tgc gac gag gaa gag aat ttc tat 96
 Asp Ser Val Gln Pro Tyr Phe Ile Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr
 20 25 30
 cac cag caa cag cag agc gag ctg cag ccg ccc gcg ccc agt gag gat 144
 His Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp 40
 35 40 45
 atc tgg aag aaa ttc gag ctg ctt ccc acc ccg ccc ctg tcc ccg agc 192
 Ile Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser
 50 55 60
 cgc cgc tcc ggg etc tgc tet cca tcc tat gtt gcg gtc gct acg tcc 240
 Arg Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Ala Thr Ser

30

40

65	70	75	80		
ttc tcc cca agg gaa gac gat gac ggc ggc ggt ggc aac ttc tcc acc				288	
Phe Ser Pro Arg Glu Asp Asp Asp Gly Gly Gly Gly Asn Phe Ser Thr					
	85	90	95		
gcc gat cag ctg gag atg atg acc gag tta ctt gga gga gac atg gtg				336	
Ala Asp Gln Leu Glu Met Met Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val					
	100	105	110		
aac cag agc ttc atc tgc gat cct gac gac gag acc ttc atc aag aac				384	10
Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn					
	115	120	125		
atc atc atc cag gac tgt atg tgg agc ggt ttc tca gcc gct gcc aag				432	
Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys					
	130	135	140		
ctg gtc tcg gag aag ctg gcc tcc tac cag gct gcg cgc aaa gac agc				480	
Leu Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser					
145	150	155	160		20
acc agc ctg agc ccc gcc cgc ggg cac agc gtc tgc tcc acc tcc agc				528	
Thr Ser Leu Ser Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser					
	165	170	175		
ctg tac ctg cag gac ctc acc gcc gcc gcg tcc gag tgc att gac ccc				576	
Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Thr Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro					
	180	185	190		
tca gtg gtc ttt ccc tac ccg ctc aac gac agc agc tcg ccc aaa tcc				624	
Ser Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser					30
	195	200	205		
tgt acc tcg tcc gat tcc acg gcc ttc tct cct tcc tcg gac tcg ctg				672	
Cys Thr Ser Ser Asp Ser Thr Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu					
	210	215	220		
ctg tcc tcc gag tcc tcc cca cgg gcc agc cct gag ccc cta gtg ctg				720	
Leu Ser Ser Glu Ser Ser Pro Arg Ala Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu					
225	230	235	240		
cat gag gag aca ccg ccc acc acc agc agc gac tct gaa gaa gag caa				768	
His Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln					40
	245	250	255		
gaa gat gag gaa gaa att gat gtg gtg tct gtg gag aag agg caa acc				816	
Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Thr					
	260	265	270		
cct gcc aag agg tcg gag tcg gcc tca tct cca tcc cga gcc cac agc				864	
Pro Ala Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Gly His Ser					

275	280	285		
aaa cct ccg cac agc cca ctg gtc etc aag agg tgc cac gtc tcc act			912	
Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr				
290	295	300		
cac cag cac aac tac gcc gca ccc ccc tcc aca agg aag gac tat cca			960	
His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro				
305	310	315		
gct gcc aag agg gcc aag ttg gac agt ggc agg gtc ctg aag cag atc			1008	10
Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp Ser Gly Arg Val Leu Lys Gln Ile				
325	330	335		
agc aac aac cgc aag tgc tcc agc ccc agg tcc tca gac acg gag gaa			1056	
Ser Asn Asn Arg Lys Cys Ser Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu				
340	345	350		
aac gac aag agg cgg aca cac aac gtc ttg gaa cgt cag agg agg aac			1104	
Asn Asp Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn				
355	360	365		20
gag ctg aag cgc agc ttt ttt gcc ctg cgt gac cag atc cct gaa ttg			1152	
Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu				
370	375	380		
gaa aac aac gaa aag gcc ccc aag gta gtg atc etc aaa aaa gcc acc			1200	
Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr				
385	390	395		
gcc tac atc ctg tcc att caa gca gac gag cac aag etc acc tct gaa			1248	
Ala Tyr Ile Leu Ser Ile Gln Ala Asp Glu His Lys Leu Thr Ser Glu				
405	410	415		30
aag gac tta ccg agg aaa cga cga gaa cag ttg aaa cac aaa etc gaa			1296	
Lys Asp Leu Pro Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu				
420	425	430		
cag ctt cga aac tct ggt gca taa			1320	
Gln Leu Arg Asn Ser Gly Ala				
435				

<210> 178 40

<211> 439

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 178

Met Pro Leu Asn Val Asn Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr

1 5 10 15

Asp Ser Val Gln Pro Tyr Phe Ile Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr	
20	25
30	
His Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp	
35	40
45	
Ile Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser	
50	55
60	
Arg Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Ala Thr Ser	
65	70
75	80
10	
Phe Ser Pro Arg Glu Asp Asp Asp Gly Gly Gly Gly Asn Phe Ser Thr	
85	90
95	
Ala Asp Gln Leu Glu Met Met Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val	
100	105
110	
Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn	
115	120
125	
Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys	
130	135
140	
20	
Leu Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser	
145	150
155	160
Thr Ser Leu Ser Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser	
165	170
175	
Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Thr Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro	
180	185
190	
Ser Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser	
195	200
205	
30	
Cys Thr Ser Ser Asp Ser Thr Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu	
210	215
220	
Leu Ser Ser Glu Ser Ser Pro Arg Ala Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu	
225	230
235	240
His Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln	
245	250
255	
Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Thr	
260	265
270	
40	
Pro Ala Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Gly His Ser	
275	280
285	
Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr	
290	295
300	
His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro	
305	310
315	320
Ala Ala Lys Arg Ala Lys Leu Asp Ser Gly Arg Val Leu Lys Gln Ile	

```

          325              330              335
Ser Asn Asn Arg Lys Cys Ser Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu
          340              345              350
Asn Asp Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn
          355              360              365
Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu
          370              375              380
Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr
          385              390              395              400
Ala Tyr Ile Leu Ser Ile Gln Ala Asp Glu His Lys Leu Thr Ser Glu
          405              410              415
Lys Asp Leu Pro Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu
          420              425              430
Gln Leu Arg Asn Ser Gly Ala
          435

```

10

```

<210> 179
<211> 1107
<212> DNA
<213> Mouse
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1107)
<223>

```

20

<400> 179

30

```

atg gac ttc gac tcg tat cag cac tat ttc tac gac tat gac tgc gga      48
Met Asp Phe Asp Ser Tyr Gln His Tyr Phe Tyr Asp Tyr Asp Cys Gly
1           5           10           15
gag gat ttc tac cgc tcc acg gcg ccc agc gag gac atc tgg aag aaa      96
Glu Asp Phe Tyr Arg Ser Thr Ala Pro Ser Glu Asp Ile Trp Lys Lys
          20           25           30
ttc gag ctg gtg ccg tcg ccc ccc acg tcg ccg ccc tgg ggc tcc ggt      144
Phe Glu Leu Val Pro Ser Pro Pro Thr Ser Pro Pro Trp Gly Ser Gly
          35           40           45
ccc ggc gcc gtg gac cca gcc tct ggg att aat ccc ggg gag ccg tgg      192
Pro Gly Ala Val Asp Pro Ala Ser Gly Ile Asn Pro Gly Glu Pro Trp
          50           55           60
cct gga ggg ggt gcc ggg gac gag gcg gaa tct cgg ggc cat tcg aaa      240
Pro Gly Gly Gly Ala Gly Asp Glu Ala Glu Ser Arg Gly His Ser Lys

```

40

65	70	75	80		
gcc tgg ggc agg aat tat get tcc atc att cgc cgt gac tgc atg gag				288	
Ala Trp Gly Arg Asn Tyr Ala Ser Ile Ile Arg Arg Asp Cys Met Glu					
	85	90	95		
agc ggc ttc tcc gcc cga gaa cgg ctg gag aga gtg gtg agc gac agg				336	
Ser Gly Phe Ser Ala Arg Glu Arg Leu Glu Arg Val Val Ser Asp Arg					
	100	105	110		
ctg gcc cca ggc gcg ccc cgg ggg aac ccg ccc aaa gcg ccc gct acc				384	10
Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr					
	115	120	125		
ccg gac ggc act cct agt ctg gaa gcc agt aac ccg gcg ccc gcc acc				432	
Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr					
	130	135	140		
caa tgt cag ctg ggc gag ccc aag act cag gcc tgc tcc ggg tcc gag				480	
Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu					
	145	150	155	160	20
agc ccc agc gat tct gaa ggt gaa gag att gac gtg gtg acc gtg gag				528	
Ser Pro Ser Asp Ser Glu Gly Glu Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu					
	165	170	175		
aag agg cga tct ctg gac atc cga aag cca gtc acc atc acg gtg cga				576	
Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg					
	180	185	190		
gca gac ccc ctg gac ccc tgc atg aag cac ttc cat atc tct atc cac				624	
Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met Lys His Phe His Ile Ser Ile His					30
	195	200	205		
caa cag cag cat aac tat gct gcc cgt ttt cct cca gaa agt tgc tct				672	
Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser					
	210	215	220		
caa gag ggg gat cct gag cca ggt ccc cag gaa gag gct ccg gag ata				720	
Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile					
	225	230	235	240	
gaa gct ccc aag gag aaa gag gag gag gaa gag gaa gag gag gaa gaa				768	
Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu					40
	245	250	255		
gag att gtg agc ccc cca cct gtc gga agt gag gct ccc cag tcc tgc				816	
Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys					
	260	265	270		
cac ccc aaa cct gtc agt tct gac act gag gac gtg acc aag agg aag				864	
His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp Thr Glu Asp Val Thr Lys Arg Lys					

275	280	285		
aac cat aac ttc ttg gaa cga aaa agg agg aat gac ctc cgc tcc cgg			912	
Asn His Asn Phe Leu Glu Arg Lys Arg Arg Asn Asp Leu Arg Ser Arg				
290	295	300		
ttc cta gcc ctg cgg gac cag gtt ccc acc ctg gcc agc tgc tct aag			960	
Phe Leu Ala Leu Arg Asp Gln Val Pro Thr Leu Ala Ser Cys Ser Lys				
305	310	315		
gcc ccc aaa gtc gtg atc ctc agc aag gcg tta gaa tac ttg cag gct			1008	10
Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Ser Lys Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Ala				
	325	330		
ttg gtg ggg gct gaa aag aaa atg gct aca gag aaa agg cag ctc cgg			1056	
Leu Val Gly Ala Glu Lys Lys Met Ala Thr Glu Lys Arg Gln Leu Arg				
	340	345		
tgt cgg caa cag caa ctg caa aag aga atc gcg tac ctc agt ggc tac			1104	
Cys Arg Gln Gln Gln Leu Gln Lys Arg Ile Ala Tyr Leu Ser Gly Tyr				
	355	360		
taa			1107	20

<210> 180

<211> 368

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 180

Met Asp Phe Asp Ser Tyr Gln His Tyr Phe Tyr Asp Tyr Asp Cys Gly				
1	5	10	15	30
Glu Asp Phe Tyr Arg Ser Thr Ala Pro Ser Glu Asp Ile Trp Lys Lys				
	20	25	30	
Phe Glu Leu Val Pro Ser Pro Pro Thr Ser Pro Pro Trp Gly Ser Gly				
	35	40	45	
Pro Gly Ala Val Asp Pro Ala Ser Gly Ile Asn Pro Gly Glu Pro Trp				
	50	55	60	
Pro Gly Gly Gly Ala Gly Asp Glu Ala Glu Ser Arg Gly His Ser Lys				
65	70	75	80	40
Ala Trp Gly Arg Asn Tyr Ala Ser Ile Ile Arg Arg Asp Cys Met Glu				
	85	90	95	
Ser Gly Phe Ser Ala Arg Glu Arg Leu Glu Arg Val Val Ser Asp Arg				
	100	105	110	
Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr				
	115	120	125	

Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr	
130	135 140
Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu	
145	150 155 160
Ser Pro Ser Asp Ser Glu Gly Glu Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu	
	165 170 175
Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg	
	180 185 190
Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met Lys His Phe His Ile Ser Ile His	
	195 200 205
Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser	
	210 215 220
Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile	
	225 230 235 240
Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu	
	245 250 255
Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys	
	260 265 270
His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp Thr Glu Asp Val Thr Lys Arg Lys	
	275 280 285
Asn His Asn Phe Leu Glu Arg Lys Arg Arg Asn Asp Leu Arg Ser Arg	
	290 295 300
Phe Leu Ala Leu Arg Asp Gln Val Pro Thr Leu Ala Ser Cys Ser Lys	
	305 310 315 320
Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Ser Lys Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Ala	
	325 330 335
Leu Val Gly Ala Glu Lys Lys Met Ala Thr Glu Lys Arg Gln Leu Arg	
	340 345 350
Cys Arg Gln Gln Gln Leu Gln Lys Arg Ile Ala Tyr Leu Ser Gly Tyr	
	355 360 365
<210> 181	
<211> 1107	40
<212> DNA	
<213> Mouse	
<220>	
<221> CDS	
<222> (1)..(1107)	
<223>	

195	200	205		
caa cag cag cat aac tat gct gcc cgt ttt cct cca gaa agt tgc tct			672	
Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser				
210	215	220		
caa gag ggg gat cct gag cca ggt ccc cag gaa gag gct ccg gag ata			720	
Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile				
225	230	235	240	
gaa gct ccc aag gag aaa gag gag gag gaa gag gaa gag gag gaa gaa			768	10
Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu				
245	250	255		
gag att gtg agc ccc cca cct gtc gga agt gag gct ccc cag tcc tgc			816	
Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys				
260	265	270		
cac ccc aaa cct gtc agt tct gac act gag gac gtg acc aag agg aag			864	
His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp Thr Glu Asp Val Thr Lys Arg Lys				
275	280	285		20
aac cat aac ttc ttg gaa cga aaa agg agg aat gac ctc cgc tcc cgg			912	
Asn His Asn Phe Leu Glu Arg Lys Arg Arg Asn Asp Leu Arg Ser Arg				
290	295	300		
ttc cta gcc ctg cgg gac cag gtt ccc acc ctg gcc agc tgc tct aag			960	
Phe Leu Ala Leu Arg Asp Gln Val Pro Thr Leu Ala Ser Cys Ser Lys				
305	310	315	320	
gcc ccc aaa gtc gac atc ctc agc aag gcg tta gaa tac ttg cag gct			1008	
Ala Pro Lys Val Asp Ile Leu Ser Lys Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Ala				30
325	330	335		
ttg gtg ggg gct gaa aag aaa atg gct aca gag aaa agg cag ctc cgg			1056	
Leu Val Gly Ala Glu Lys Lys Met Ala Thr Glu Lys Arg Gln Leu Arg				
340	345	350		
tgt cgg caa cag caa ctg caa aag aga atc gcg tac ctc agt ggc tac			1104	
Cys Arg Gln Gln Gln Leu Gln Lys Arg Ile Ala Tyr Leu Ser Gly Tyr				
355	360	365		
taa			1107	

<210> 182

<211> 368

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 182

Met Asp Phe Asp Ser Tyr Gln His Tyr Phe Tyr Asp Tyr Asp Cys Gly

1	5	10	15	
Glu Asp Phe Tyr Arg Ser Thr Ala Pro Ser Glu Asp Ile Trp Lys Lys				
	20	25	30	
Phe Glu Leu Val Pro Ser Pro Pro Thr Ser Pro Pro Trp Gly Ser Gly				
	35	40	45	
Pro Gly Ala Val Asp Pro Ala Ser Gly Ile Asn Pro Gly Glu Pro Trp				
	50	55	60	
Pro Gly Gly Gly Ala Gly Asp Glu Ala Glu Ser Arg Gly His Ser Lys				10
65	70	75	80	
Ala Trp Gly Arg Asn Tyr Ala Ser Ile Ile Arg Arg Asp Cys Met Trp				
	85	90	95	
Ser Gly Phe Ser Ala Arg Glu Arg Leu Glu Arg Val Val Ser Asp Arg				
	100	105	110	
Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr				
	115	120	125	
Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr				20
	130	135	140	
Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu				
145	150	155	160	
Ser Pro Ser Asp Ser Glu Gly Glu Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu				
	165	170	175	
Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg				
	180	185	190	
Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met Lys His Phe His Ile Ser Ile His				30
	195	200	205	
Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser				
	210	215	220	
Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile				
225	230	235	240	
Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu				
	245	250	255	
Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys				
	260	265	270	40
His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp Thr Glu Asp Val Thr Lys Arg Lys				
	275	280	285	
Asn His Asn Phe Leu Glu Arg Lys Arg Arg Asn Asp Leu Arg Ser Arg				
	290	295	300	
Phe Leu Ala Leu Arg Asp Gln Val Pro Thr Leu Ala Ser Cys Ser Lys				
305	310	315	320	

Ala Pro Lys Val Asp Ile Leu Ser Lys Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Ala
 325 330 335
 Leu Val Gly Ala Glu Lys Lys Met Ala Thr Glu Lys Arg Gln Leu Arg
 340 345 350
 Cys Arg Gln Gln Gln Leu Gln Lys Arg Ile Ala Tyr Leu Ser Gly Tyr
 355 360 365

<210> 183 10
 <211> 1107
 <212> DNA
 <213> Mouse
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1107)
 <223>
 <400> 183 20

atg gac ttc gac tcg tat cag cac tat ttc tac gac tat gac tgc gga 48
 Met Asp Phe Asp Ser Tyr Gln His Tyr Phe Tyr Asp Tyr Asp Cys Gly
 1 5 10 15

gag gat ttc tac cgc tcc acg gcg ccc agc gag gac atc tgg aag aaa 96
 Glu Asp Phe Tyr Arg Ser Thr Ala Pro Ser Glu Asp Ile Trp Lys Lys
 20 25 30

ttc gag ctg gtg ccg tcg ccc ccc acg tcg ccg ccc tgg ggc tcc ggt 144
 Phe Glu Leu Val Pro Ser Pro Pro Thr Ser Pro Pro Trp Gly Ser Gly
 35 40 45 30

ccc ggc gcc gtg gac cca gcc tct ggg att aat ccc ggg gag ccg tgg 192
 Pro Gly Ala Val Asp Pro Ala Ser Gly Ile Asn Pro Gly Glu Pro Trp
 50 55 60

cct gga ggg ggt gcc ggg gac gag gcg gaa tct cgg ggc cat tcg aaa 240
 Pro Gly Gly Gly Ala Gly Asp Glu Ala Glu Ser Arg Gly His Ser Lys
 65 70 75 80

gcc tgg ggc agg aat tat gct tcc atc att cgc cgt gac tgc atg tgg 288
 Ala Trp Gly Arg Asn Tyr Ala Ser Ile Ile Arg Arg Asp Cys Met Trp
 85 90 95 40

agc ggc ttc tcc gcc cga gaa cgg ctg gag aga gtg gtg agc gac agg 336
 Ser Gly Phe Ser Ala Arg Glu Arg Leu Glu Arg Val Val Ser Asp Arg
 100 105 110

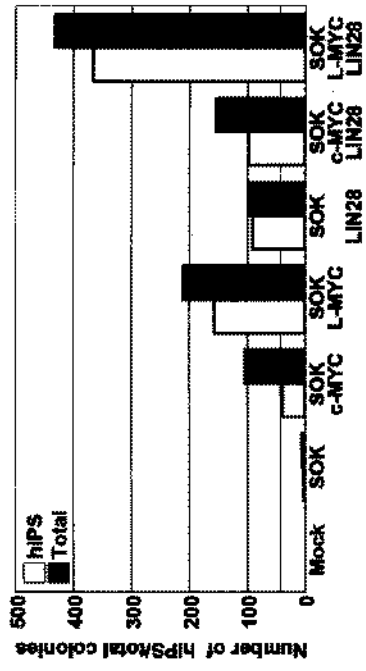
ctg gcc cca ggc gcg ccc cgg ggg aac ccg ccc aaa gcg ccc gct acc 384
 Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr

115	120	125		
ccg gac ggc act cct agt ctg gaa gcc agt aac ccg gcg ccc gcc acc			432	
Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr				
130	135	140		
caa tgt cag ctg ggc gag ccc aag act cag gcc tgc tcc ggg tcc gag			480	
Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu				
145	150	155	160	
agc ccc agc gat tct gaa ggt gaa gag att gac gtg gtg acc gtg gag			528	10
Ser Pro Ser Asp Ser Glu Gly Glu Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu				
165	170	175		
aag agg cga tct ctg gac atc cga aag cca gtc acc atc acg gtg cga			576	
Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg				
180	185	190		
gca gac ccc ctg gac ccc tgc atg aag cac ttc cat atc tct atc cac			624	
Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met Lys His Phe His Ile Ser Ile His				
195	200	205		20
caa cag cag cat aac tat gct gcc cgt ttt cct cca gaa agt tgc tct			672	
Gln Gln Gln His Asn Tyr Ala Ala Arg Phe Pro Pro Glu Ser Cys Ser				
210	215	220		
caa gag ggg gat cct gag cca ggt ccc cag gaa gag gct ccg gag ata			720	
Gln Glu Gly Asp Pro Glu Pro Gly Pro Gln Glu Glu Ala Pro Glu Ile				
225	230	235	240	
gaa gct ccc aag gag aaa gag gag gag gaa gag gaa gag gag gaa gaa			768	
Glu Ala Pro Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu				30
245	250	255		
gag att gtg agc ccc cca cct gtc gga agt gag gct ccc cag tcc tgc			816	
Glu Ile Val Ser Pro Pro Pro Val Gly Ser Glu Ala Pro Gln Ser Cys				
260	265	270		
cac ccc aaa cct gtc agt tet gac act gag gac gtg acc aag agg aag			864	
His Pro Lys Pro Val Ser Ser Asp Thr Glu Asp Val Thr Lys Arg Lys				
275	280	285		
aac cat aac ttc ttg gaa cga aaa agg agg aat gac ctc cgc tcc cgg			912	
Asn His Asn Phe Leu Glu Arg Lys Arg Arg Asn Asp Leu Arg Ser Arg				40
290	295	300		
ttc cta gcc ctg cgg gac cag gtt ccc acc ctg gcc agc tgc tct aag			960	
Phe Leu Ala Leu Arg Asp Gln Val Pro Thr Leu Ala Ser Cys Ser Lys				
305	310	315	320	
gcc ccc aaa gtc gtg atc etc agc aag gcg tta gaa tac ttg cag gct			1008	
Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Ser Lys Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Ala				

	325	330	335	
ttg gtg ggg gct gaa aag aaa atg gct aca gag aaa agg cag ccc egg				1056
Leu Val Gly Ala Glu Lys Lys Met Ala Thr Glu Lys Arg Gln Pro Arg				
	340	345	350	
tgt cgg caa cag caa ctg caa aag aga atc gcg tac ctc agt ggc tac				1104
Cys Arg Gln Gln Gln Leu Gln Lys Arg Ile Ala Tyr Leu Ser Gly Tyr				
	355	360	365	
taa				1107
				10
<210>	184			
<211>	368			
<212>	PRT			
<213>	Mouse			
<400>	184			
Met Asp Phe Asp Ser Tyr Gln His Tyr Phe Tyr Asp Tyr Asp Cys Gly				
1	5	10	15	20
Glu Asp Phe Tyr Arg Ser Thr Ala Pro Ser Glu Asp Ile Trp Lys Lys				
	20	25	30	
Phe Glu Leu Val Pro Ser Pro Pro Thr Ser Pro Pro Trp Gly Ser Gly				
	35	40	45	
Pro Gly Ala Val Asp Pro Ala Ser Gly Ile Asn Pro Gly Glu Pro Trp				
	50	55	60	
Pro Gly Gly Gly Ala Gly Asp Glu Ala Glu Ser Arg Gly His Ser Lys				
65	70	75	80	30
Ala Trp Gly Arg Asn Tyr Ala Ser Ile Ile Arg Arg Asp Cys Met Trp				
	85	90	95	
Ser Gly Phe Ser Ala Arg Glu Arg Leu Glu Arg Val Val Ser Asp Arg				
	100	105	110	
Leu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gly Asn Pro Pro Lys Ala Pro Ala Thr				
	115	120	125	
Pro Asp Gly Thr Pro Ser Leu Glu Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Thr				
	130	135	140	
Gln Cys Gln Leu Gly Glu Pro Lys Thr Gln Ala Cys Ser Gly Ser Glu				
145	150	155	160	40
Ser Pro Ser Asp Ser Glu Gly Glu Glu Ile Asp Val Val Thr Val Glu				
	165	170	175	
Lys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Arg Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Arg				
	180	185	190	
Ala Asp Pro Leu Asp Pro Cys Met Lys His Phe His Ile Ser Ile His				

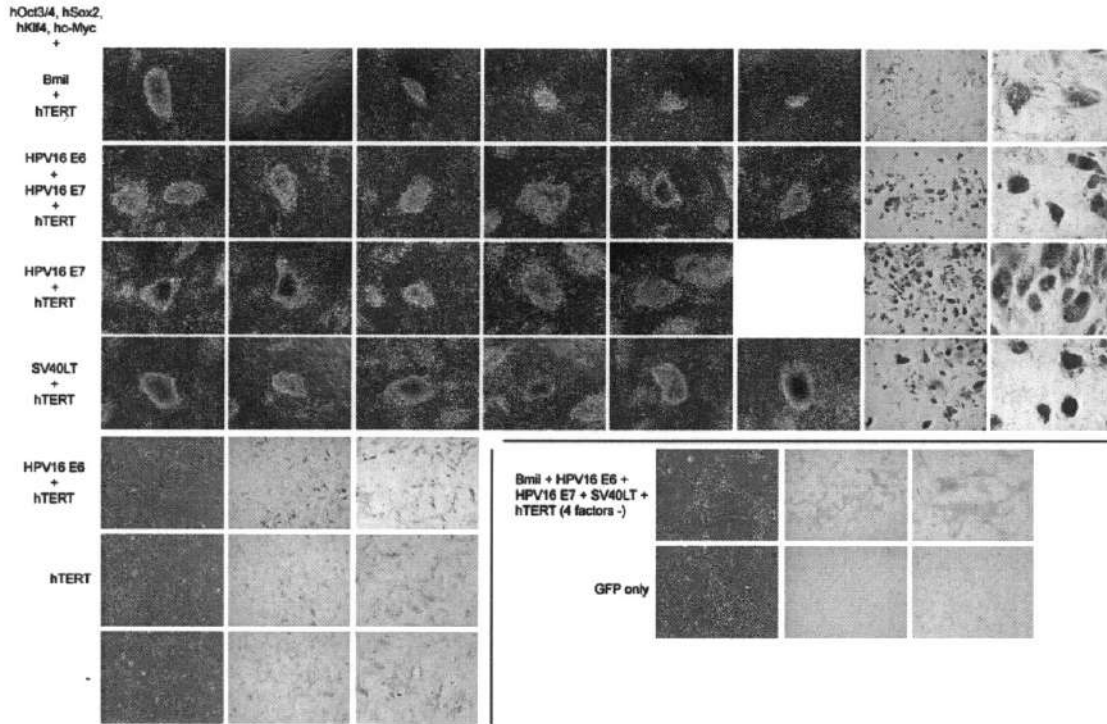
【 4 4 】

4 4



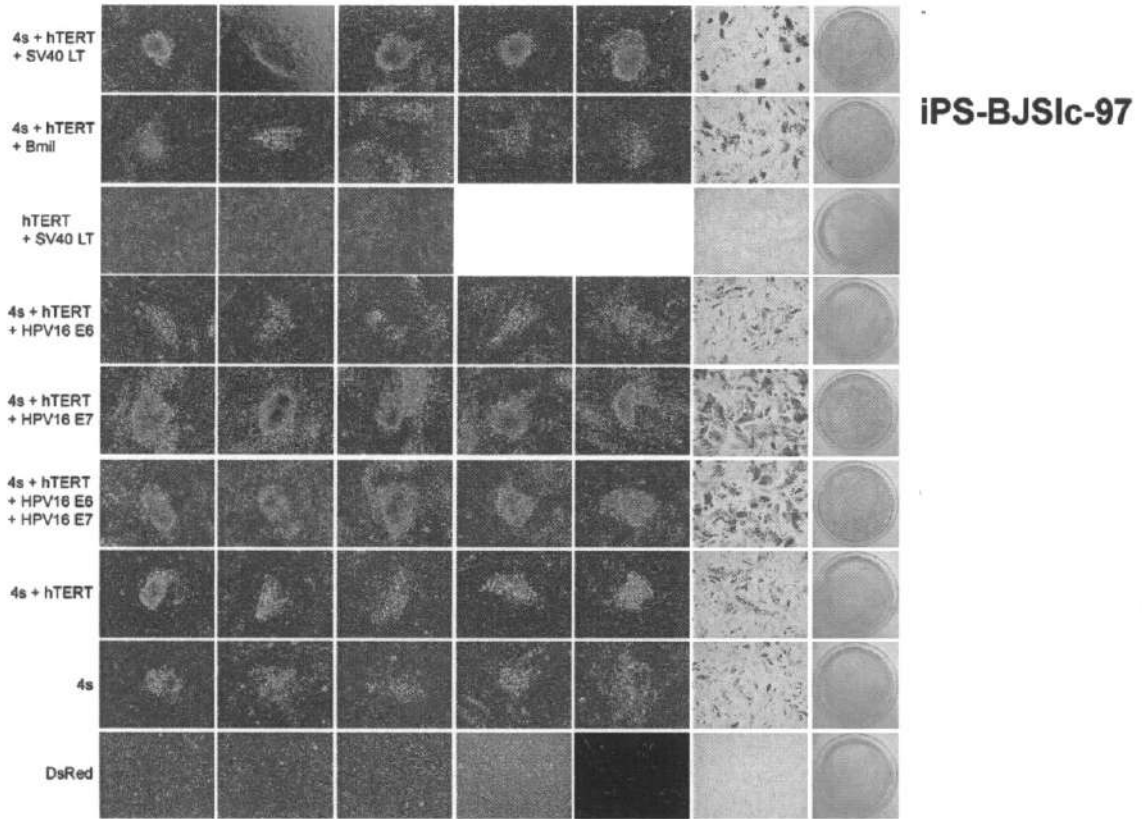
【 1 】

1



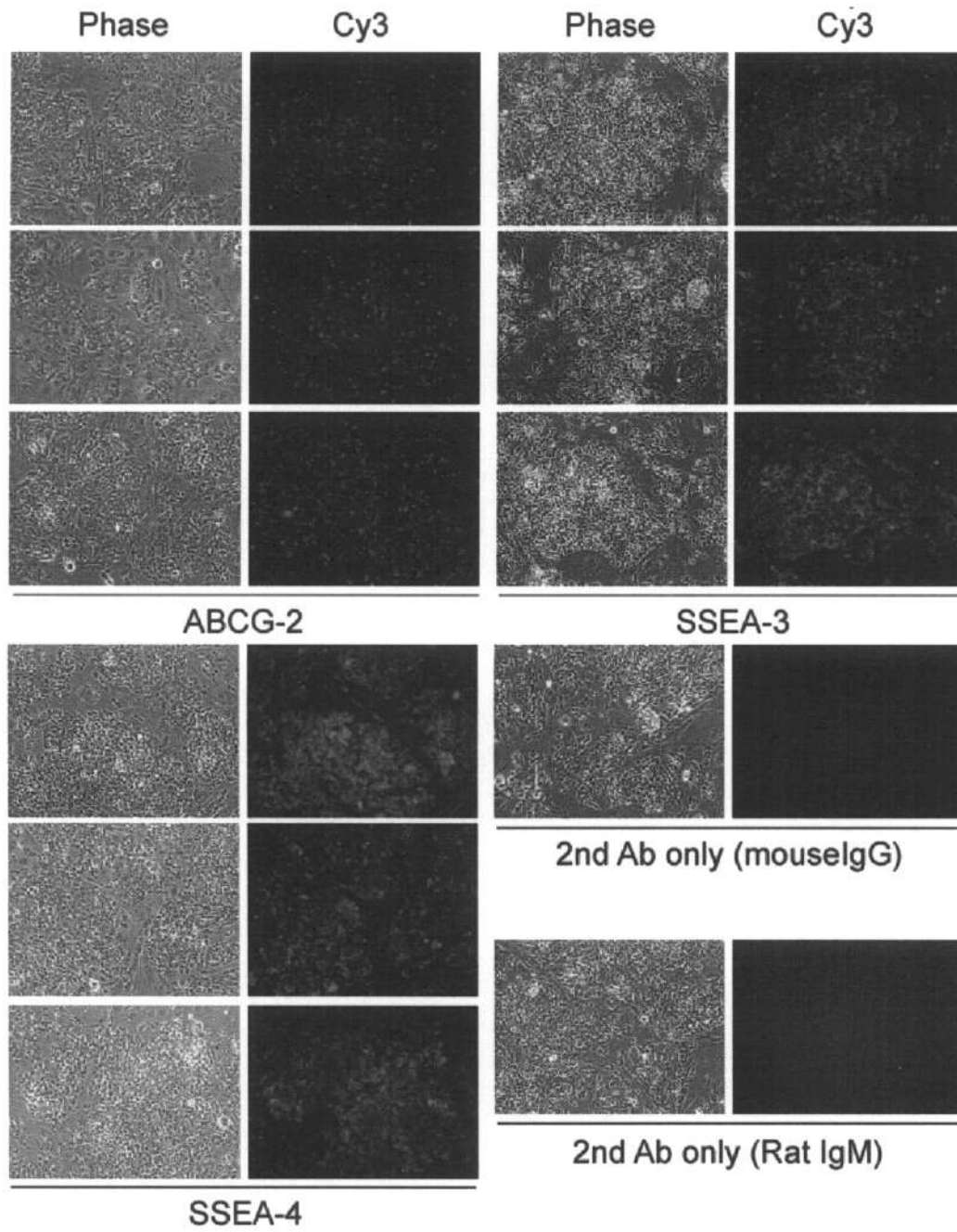
【 2 】

2



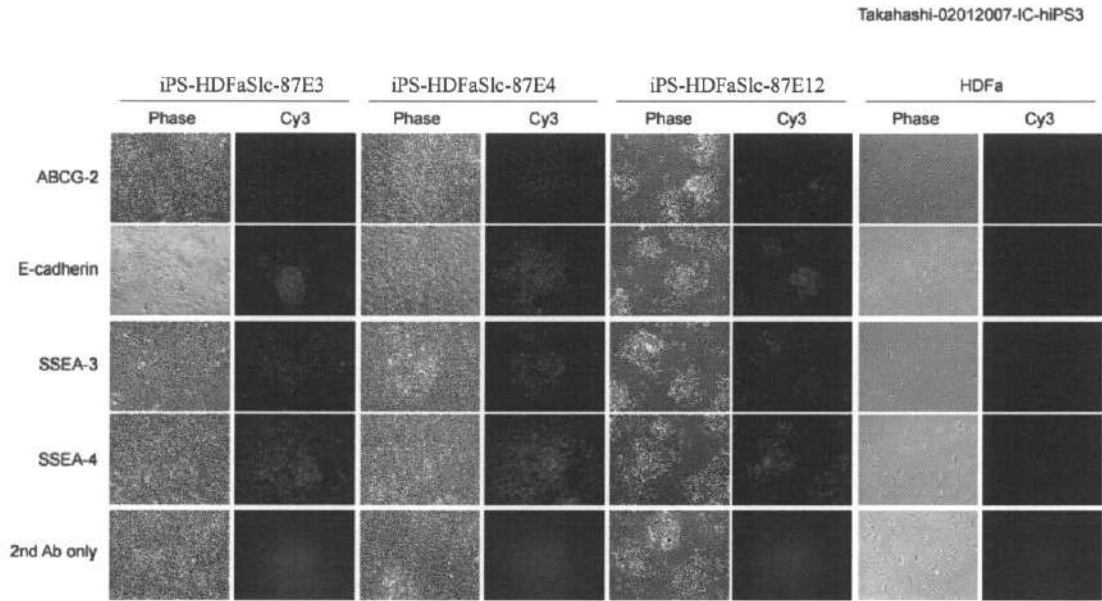
【 図 3 】

図 3



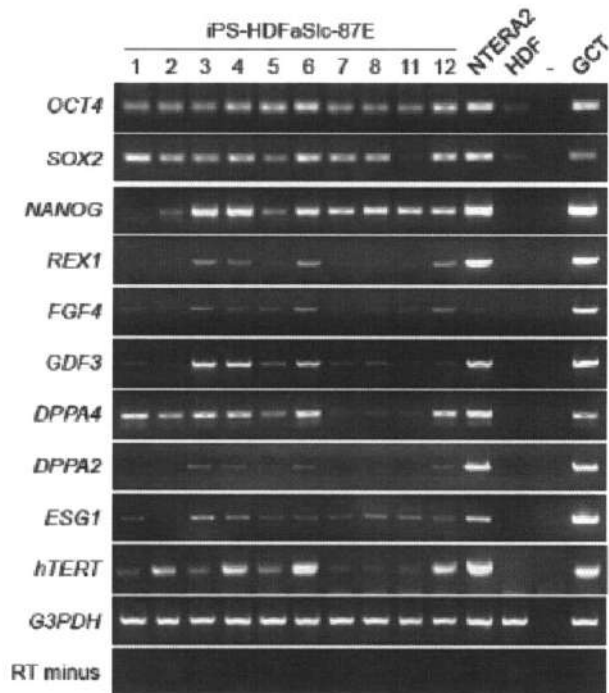
【 4 】

4



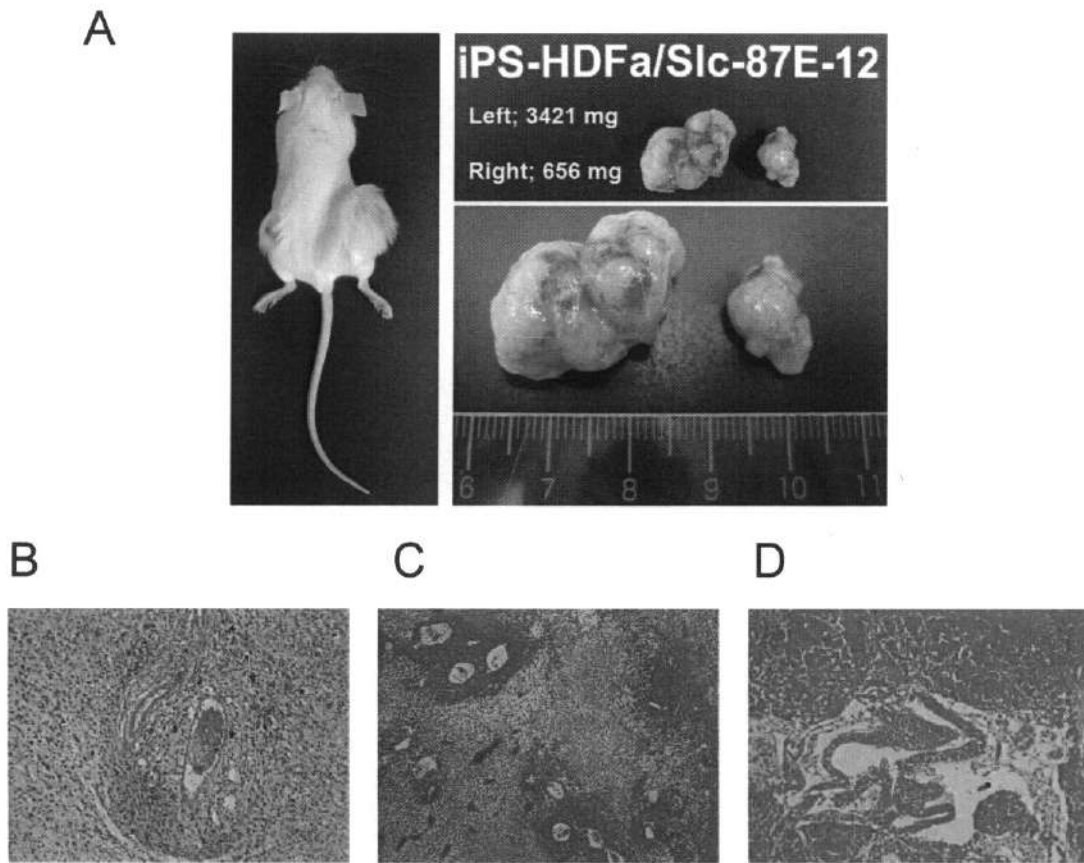
【 5 】

5



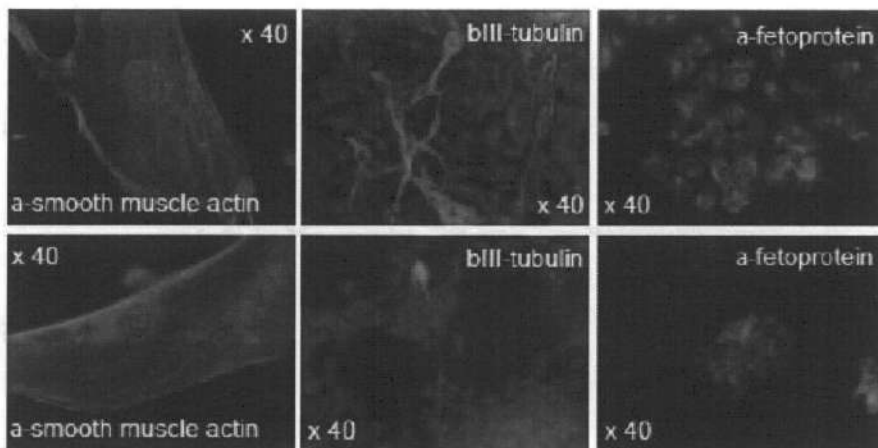
【 図 7 】

図 7



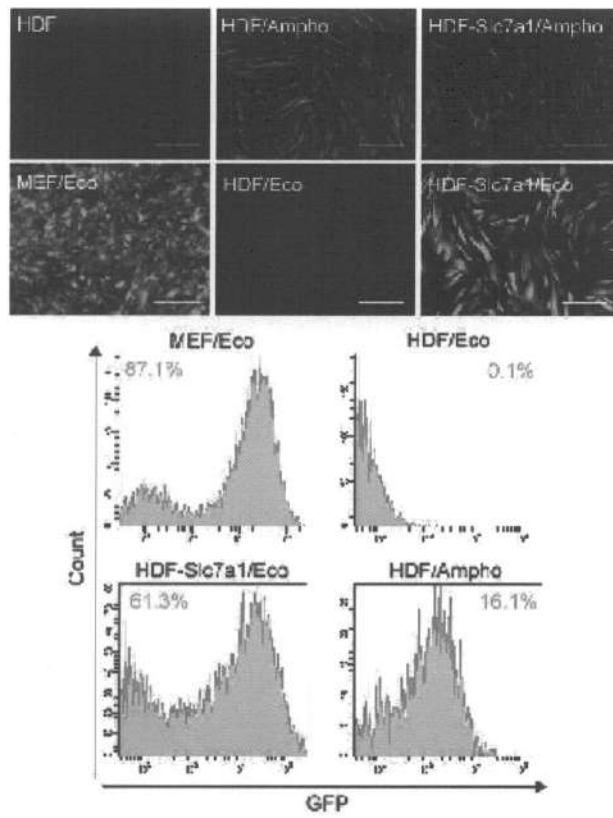
【 図 8 】

図 8



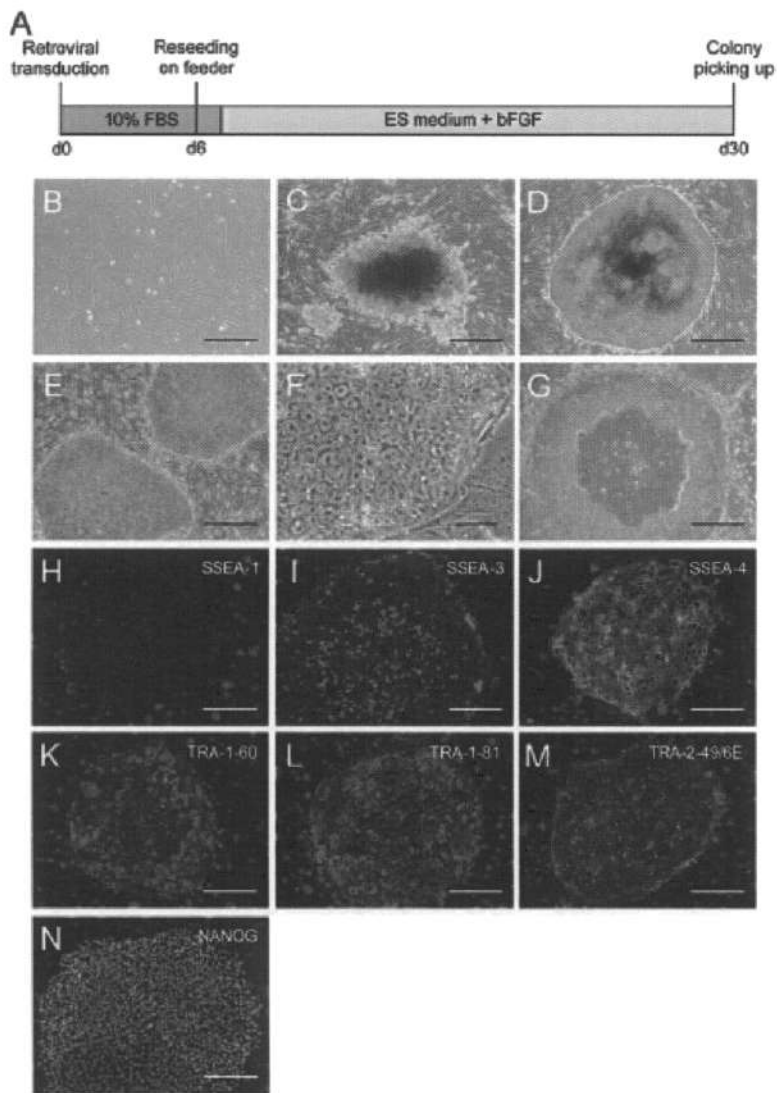
【 図 9 】

図 9



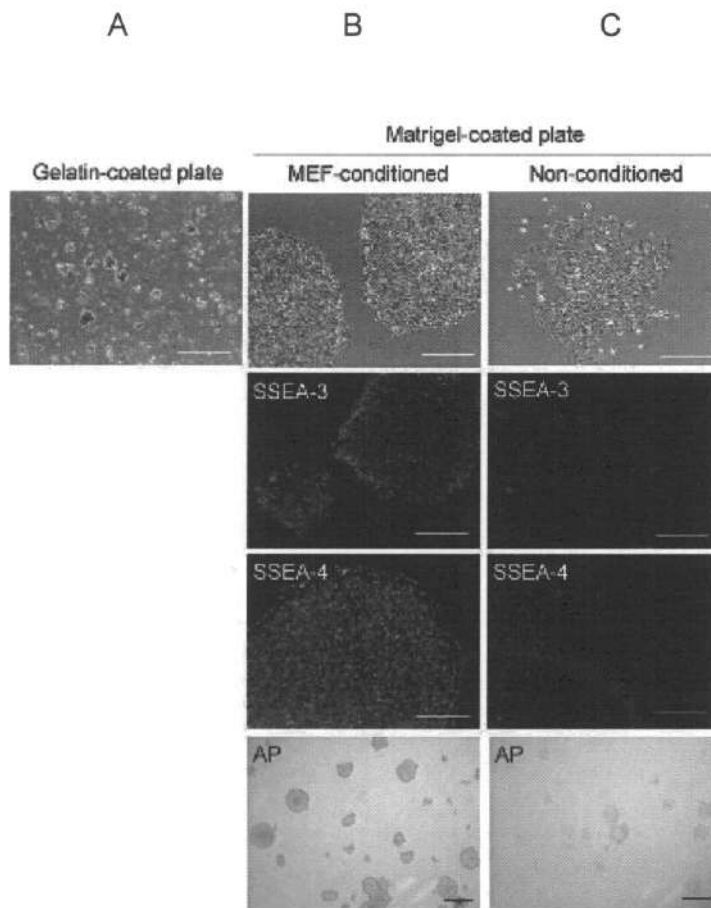
【 1 0 】

1 0



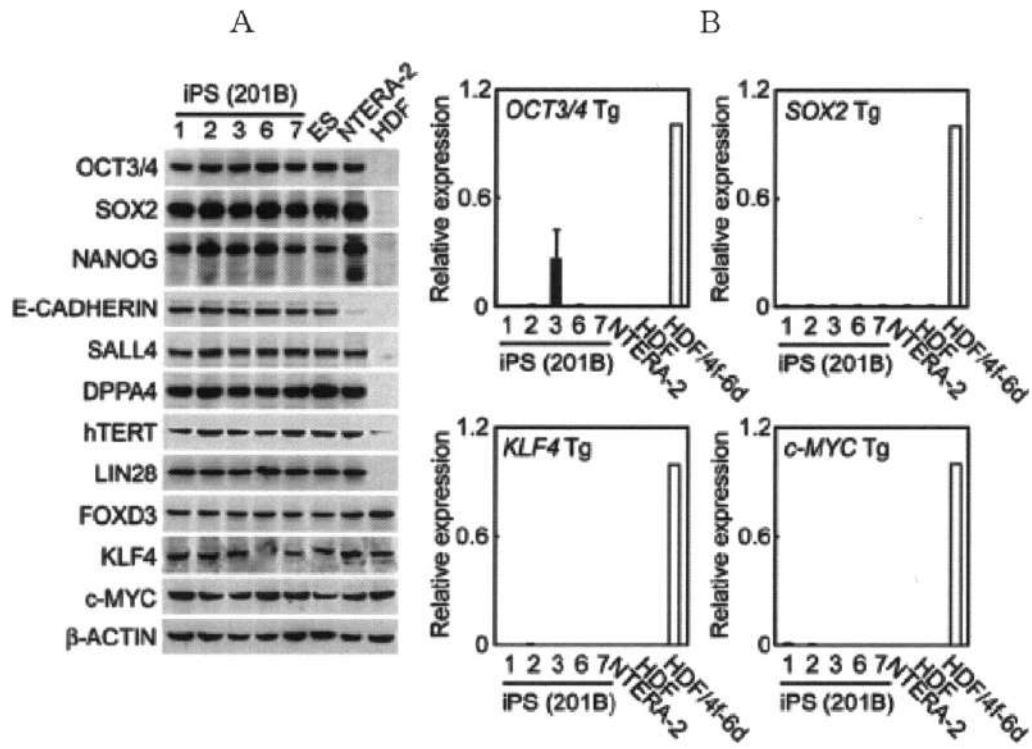
【 1 1 】

1 1



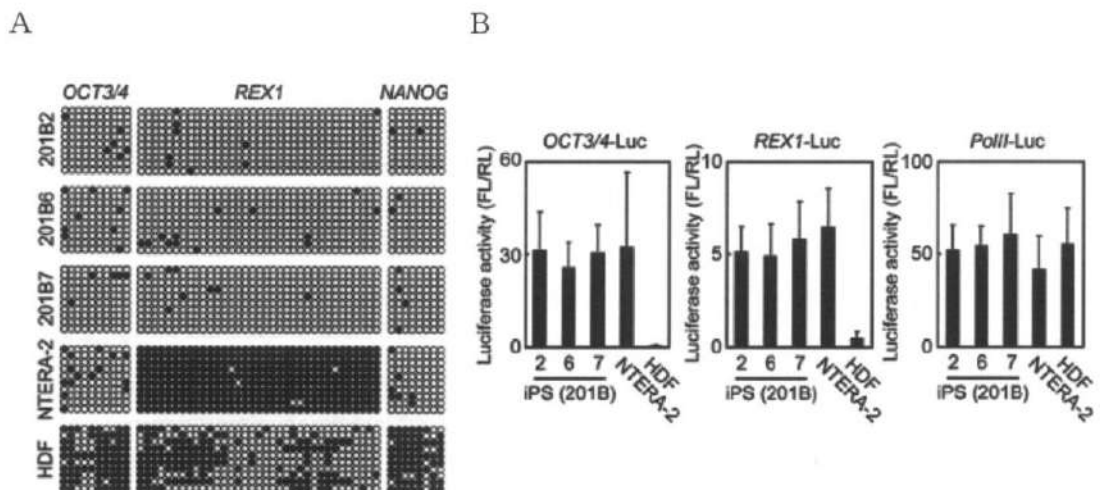
【 図 1 3 】

図 1 3



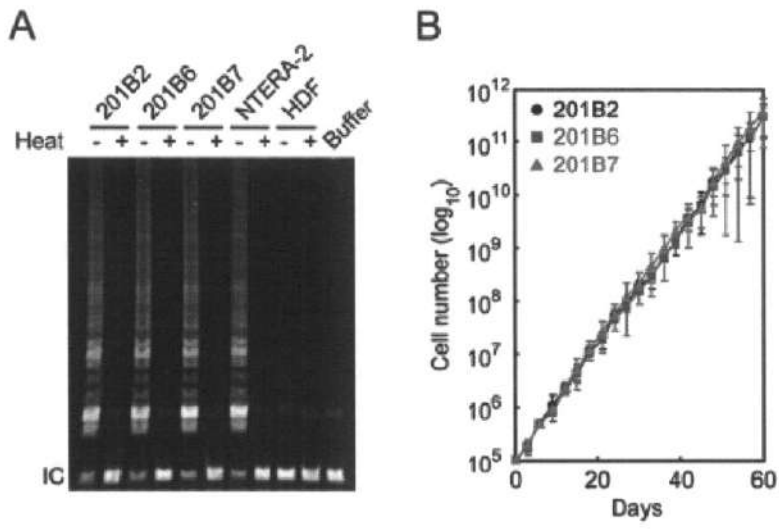
【 図 1 4 】

図 1 4



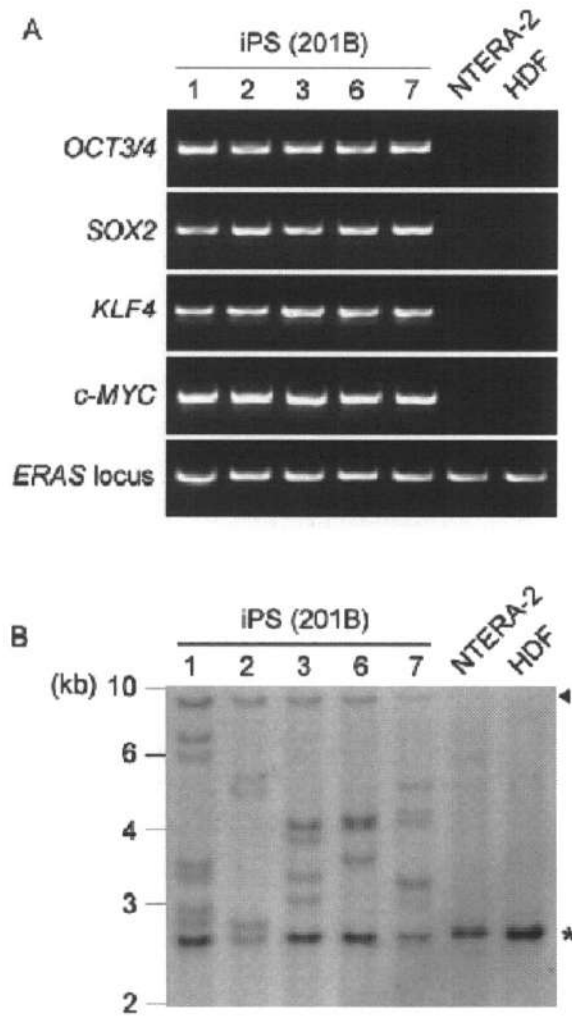
【 図 1 5 】

図 1 5



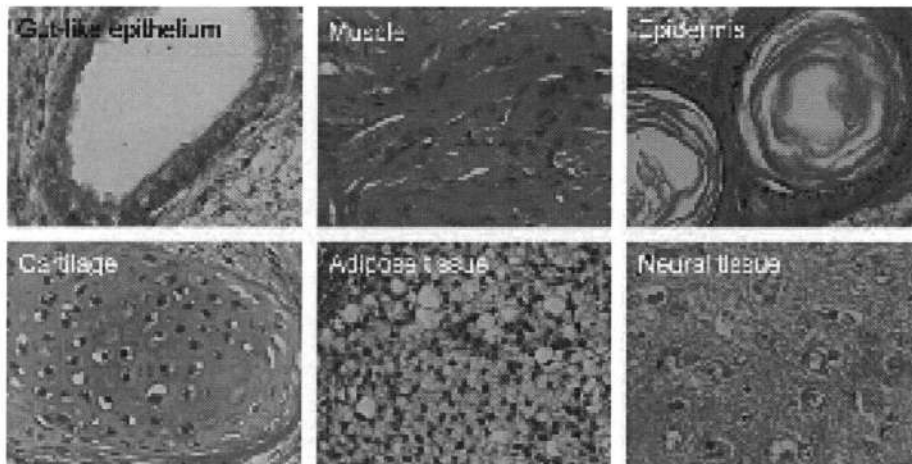
【 16 】

16



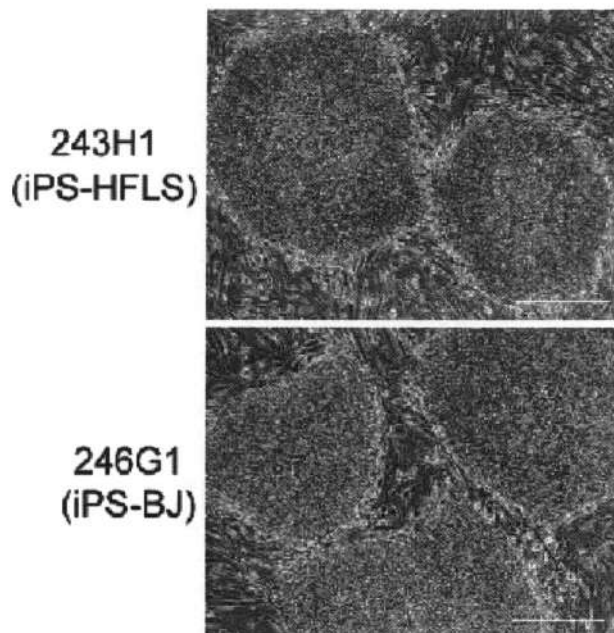
【 図 19 】

図 19



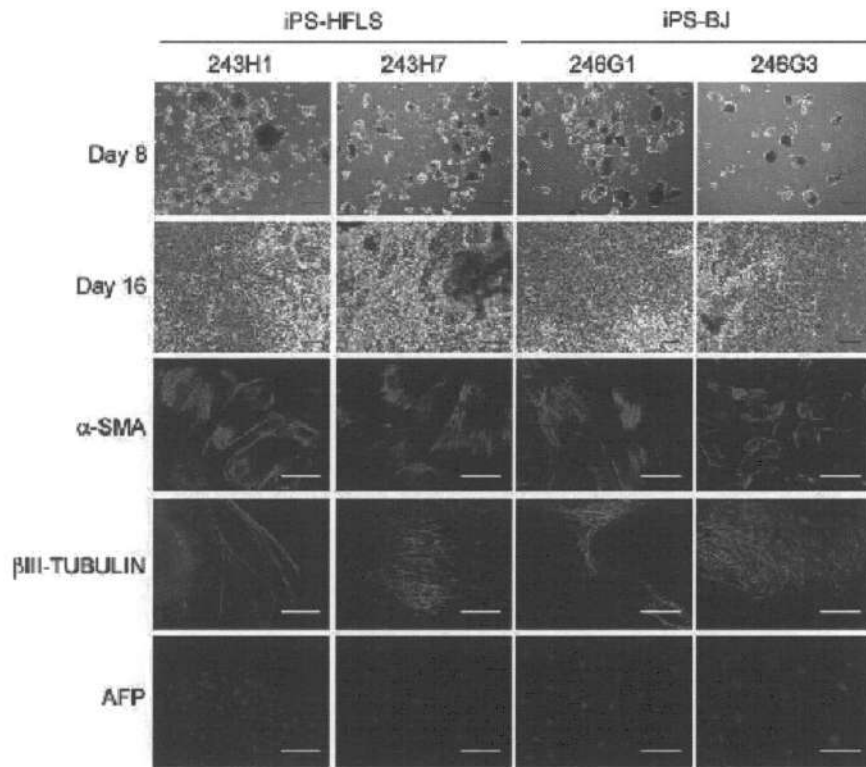
【 図 20 】

図 20



【 2 2 】

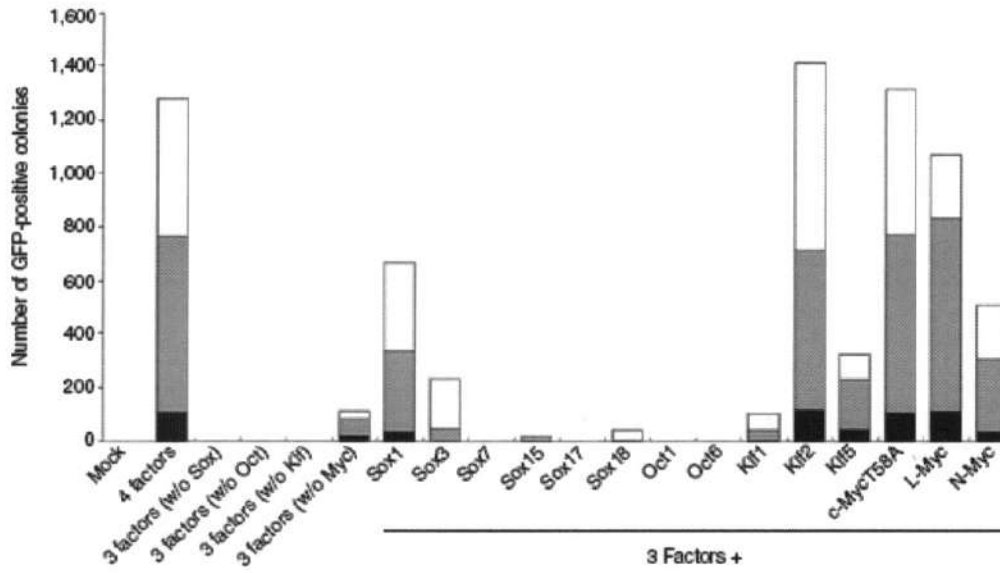
2 2



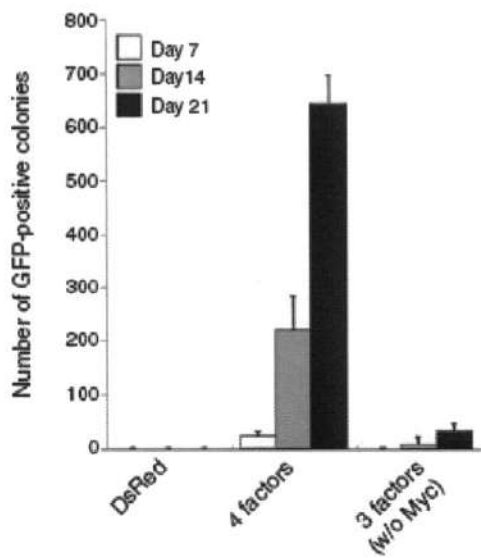
【 2 3 】

2 3

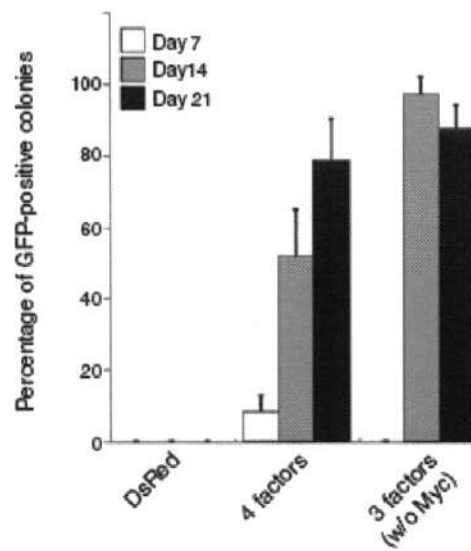
A



B

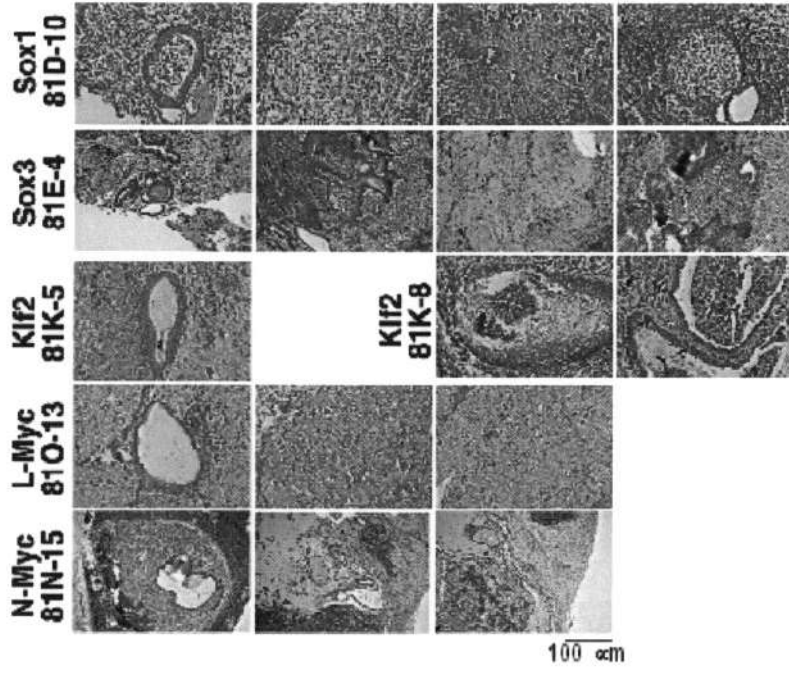


C



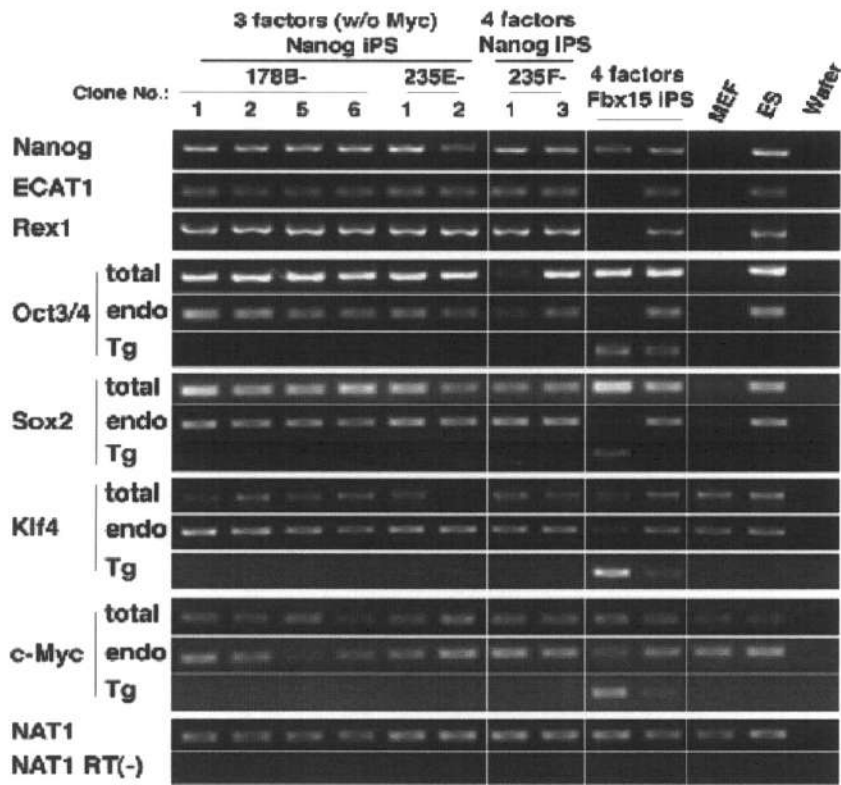
【 2 4 】

2 4



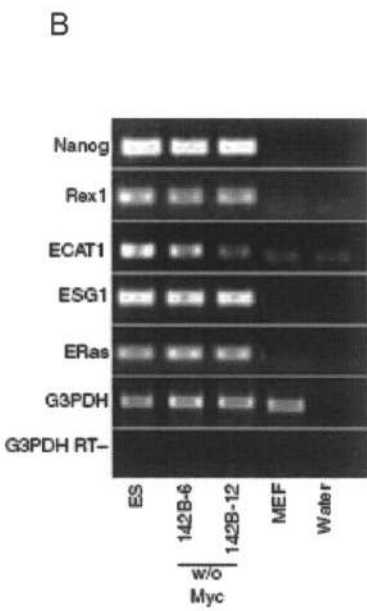
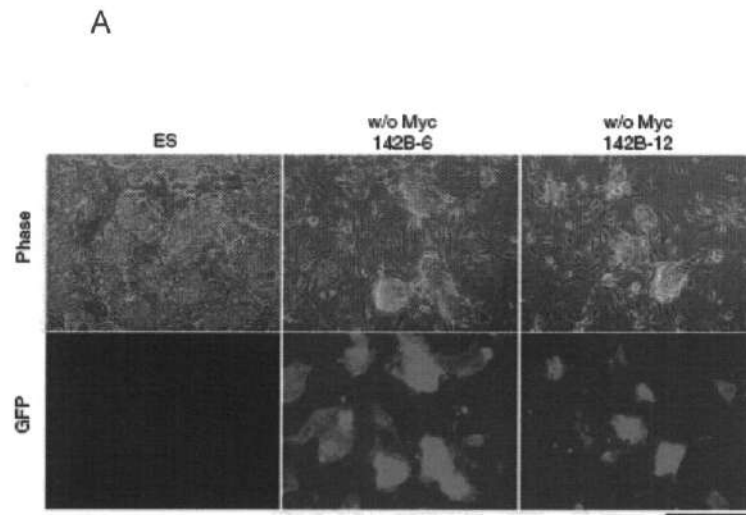
【 25 】

25



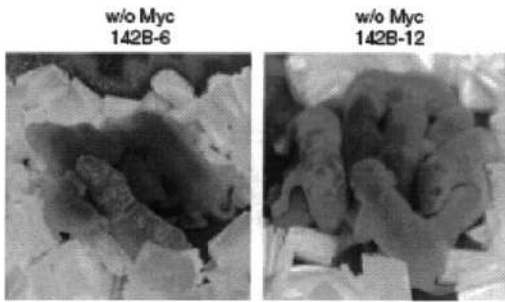
【 2 6 】

2 6



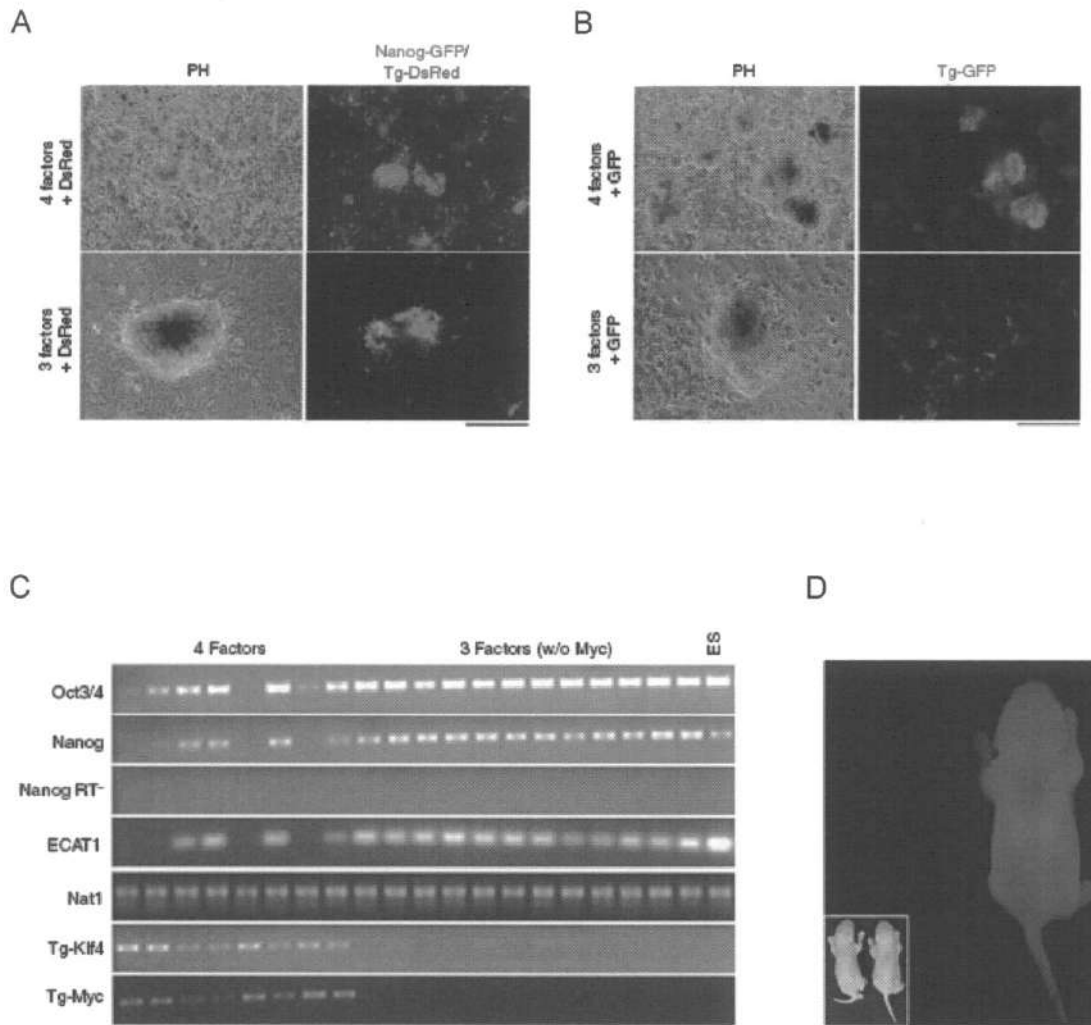
【 2 7 】

2 7



【 28 】

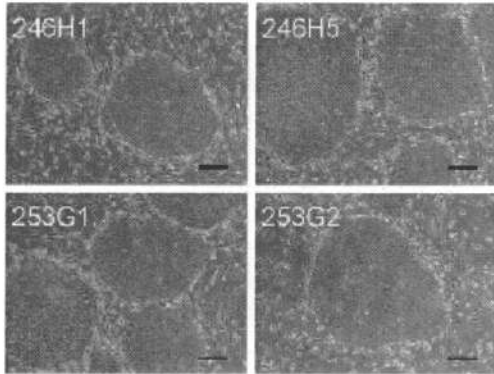
28



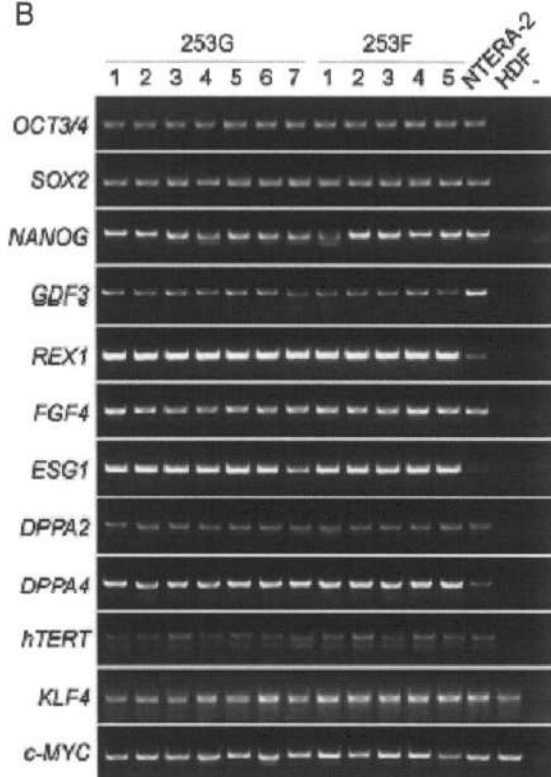
【 29 】

29

A

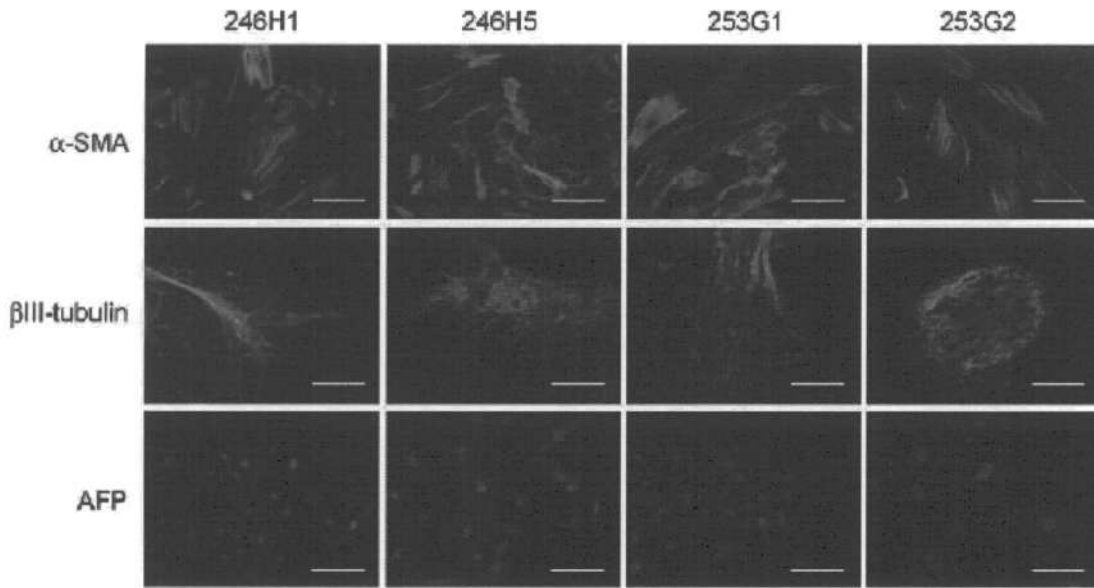


B



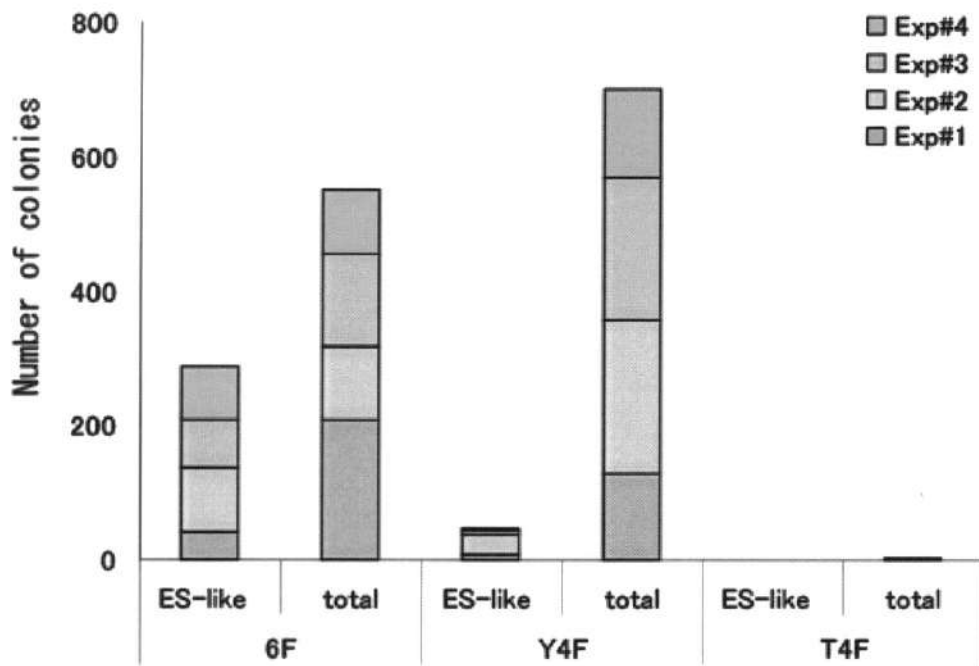
【 3 0 】

3 0



【 3 1 】

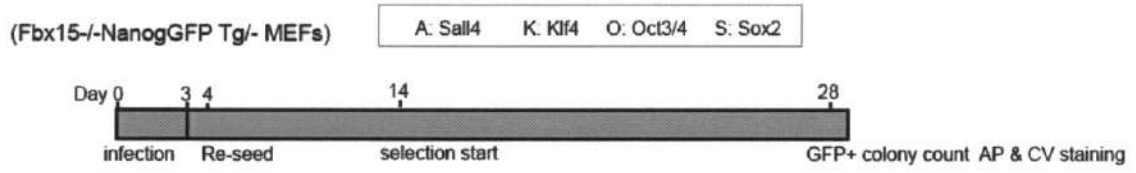
3 1



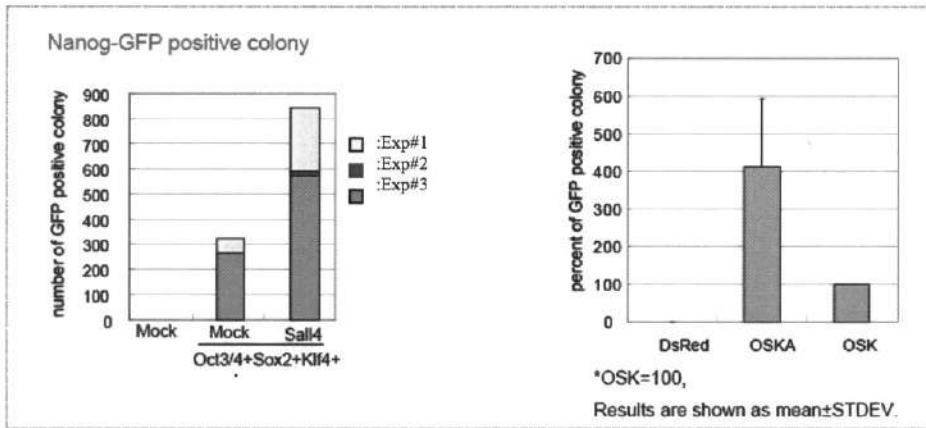
【 3 2 】

3 2

A



Sum of the three independent experiment



B

C

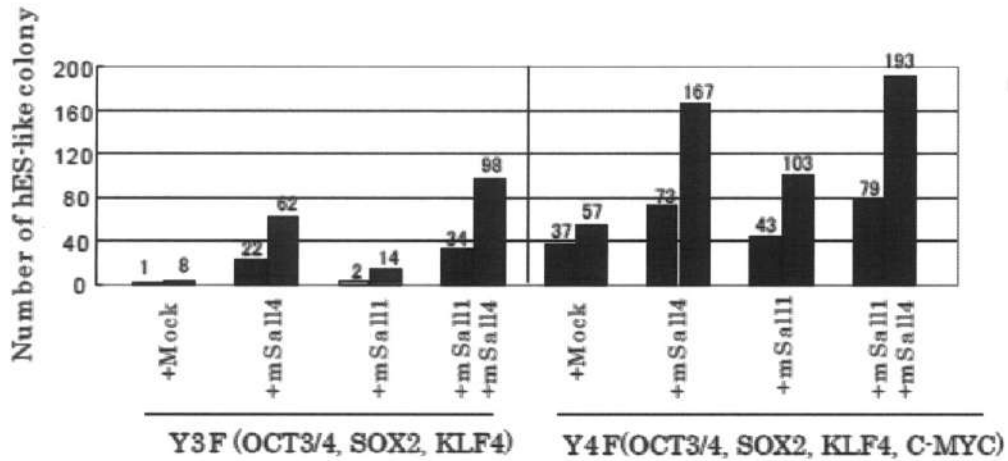
【 図 3 3 】

図 3 3

	(ml)	day 6 number of cells (x10 ⁵)							day 30 number of colony		day 30 number of colony													
		Mock	Oct3/4	Sox2	Klf4	cMyc	mSall4	mSall1	DsRed	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
DsRed								2					0	0										
Mock		2											0	0										
Y3F + Mock		0.5	0.5	0.5	0.5								0	0										
+ Mock x2		0.8	0.4	0.4	0.4								0	1										
+ DsRed			0.5	0.5	0.5			0.5					0	0										
+ DsRed x2			0.4	0.4	0.4			0.8					0	0										
+ mSall4			0.5	0.5	0.5		0.5						7	1										
+ mSall1			0.5	0.5	0.5			0.5					0	0										
+ mSall1+mSall4			0.4	0.4	0.4		0.4	0.4					5	0										
Y4F + Mock		0.4	0.4	0.4	0.4								5	30										
+ DsRed			0.4	0.4	0.4	0.4		0.4					7	21										
+ mSall4			0.4	0.4	0.4	0.4	0.4						18	23										
+ mSall1			0.4	0.4	0.4	0.4		0.4					6	33										
+ mSall1+mSall4			0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33					19	12										

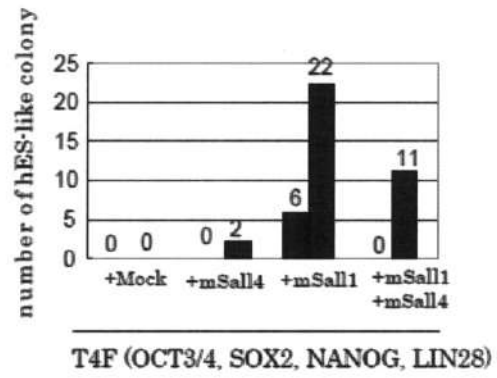
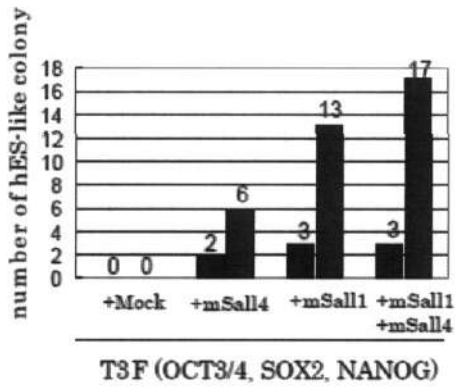
【 図 3 4 】

図 3 4



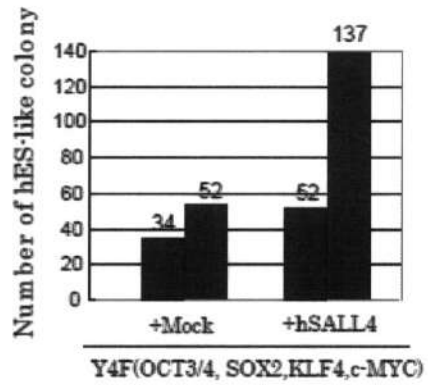
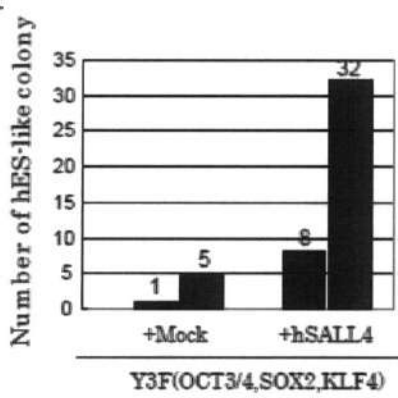
【 図 3 5 】

図 3 5



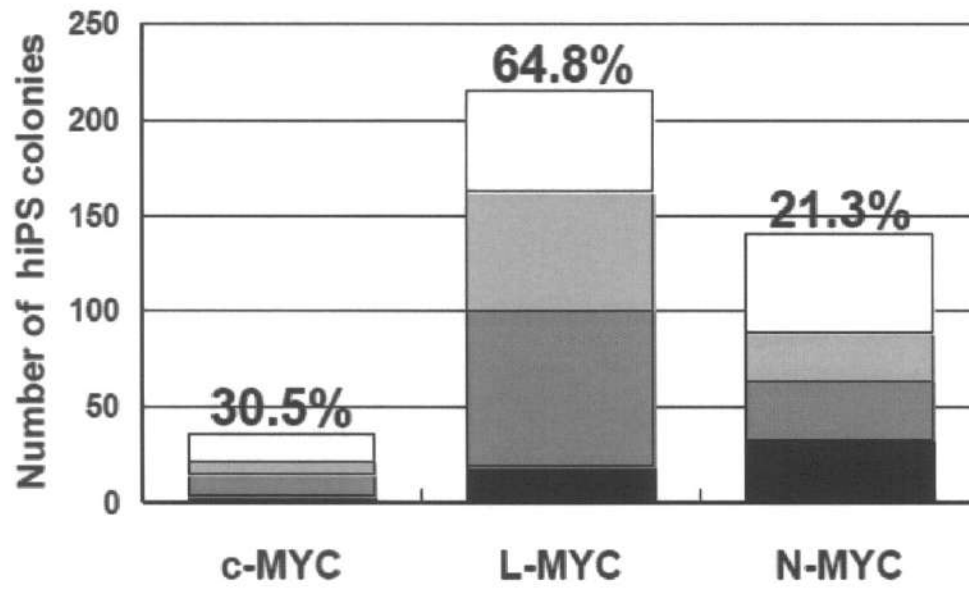
【 図 3 6 】

図 3 6



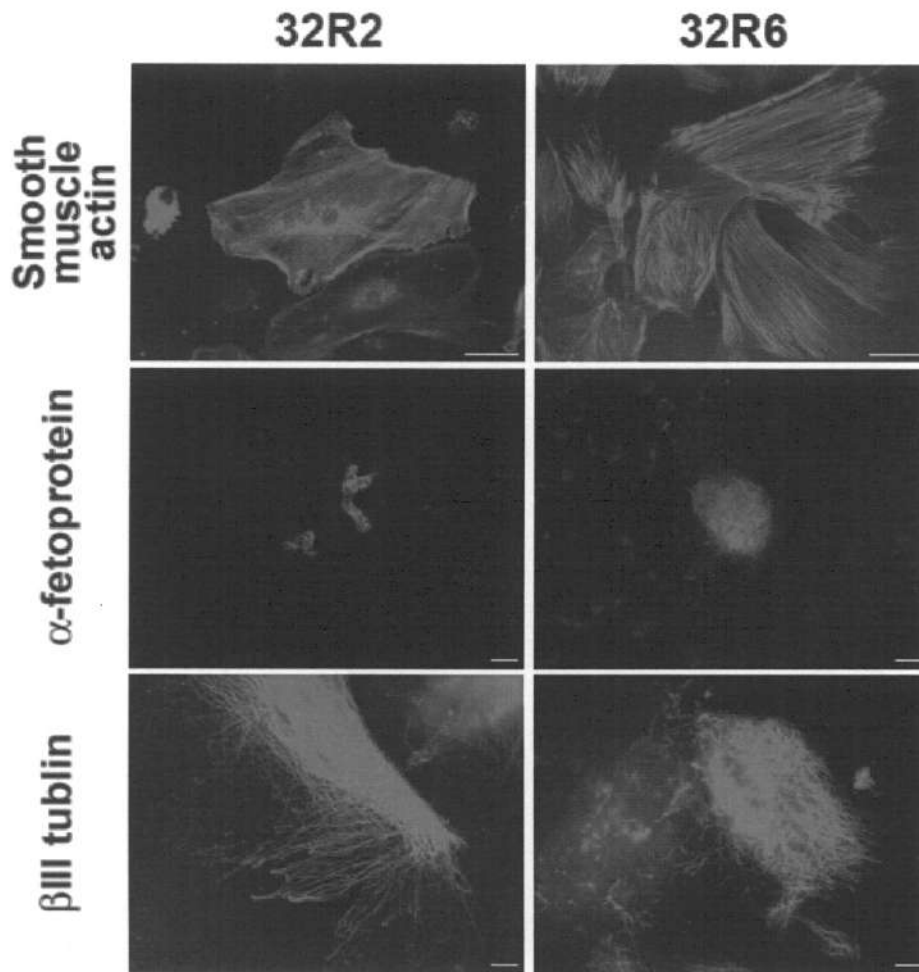
【 図 3 7 】

図 3 7



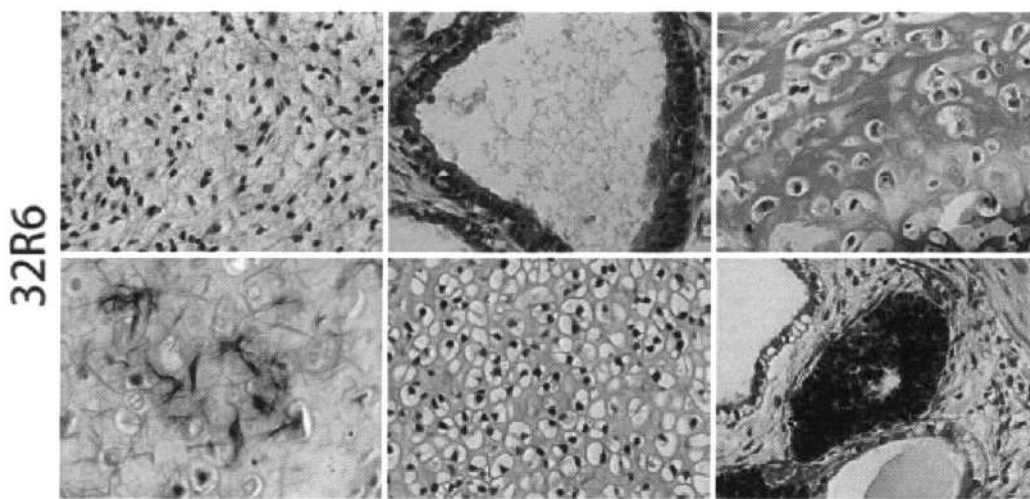
【 3 8 】

3 8



【 3 9 】

3 9



【 図 40 】

図 40

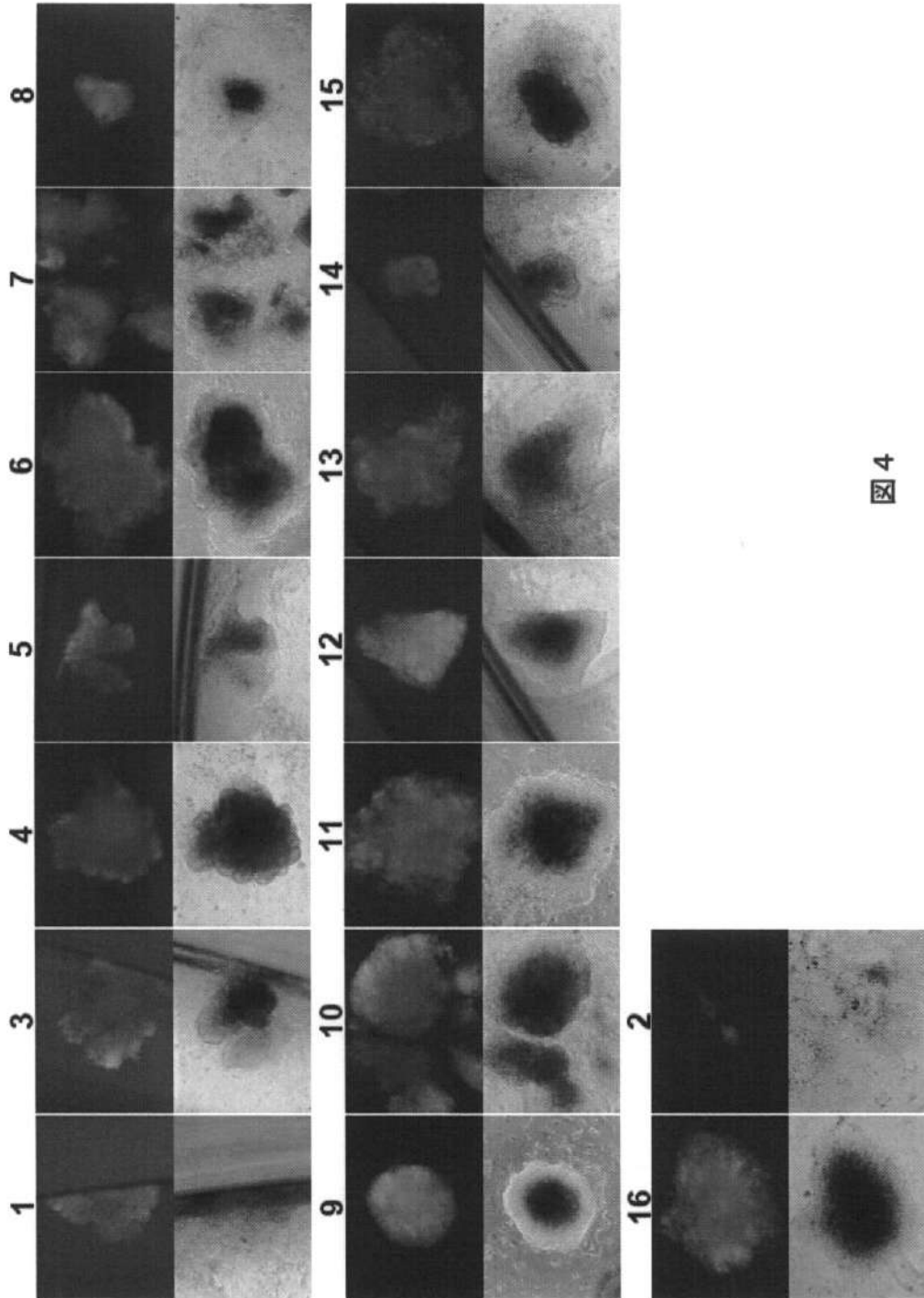
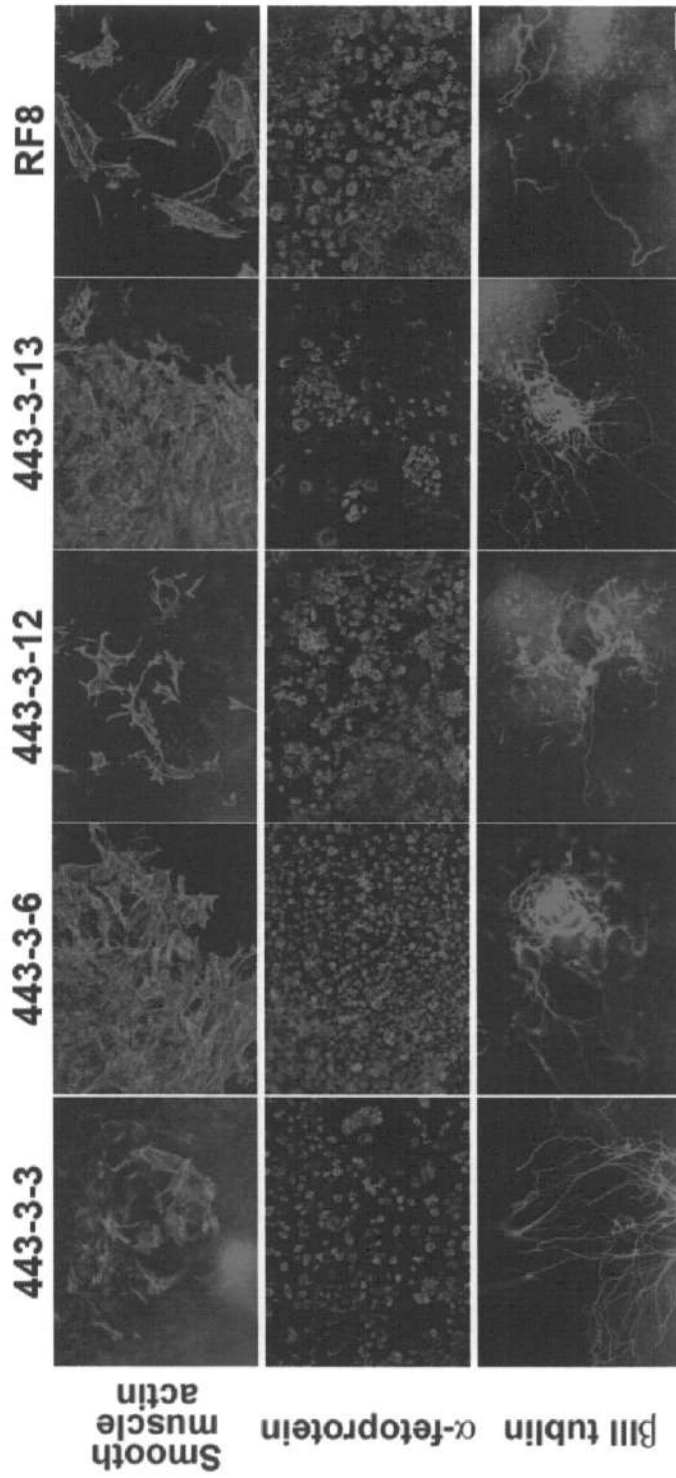


図 4

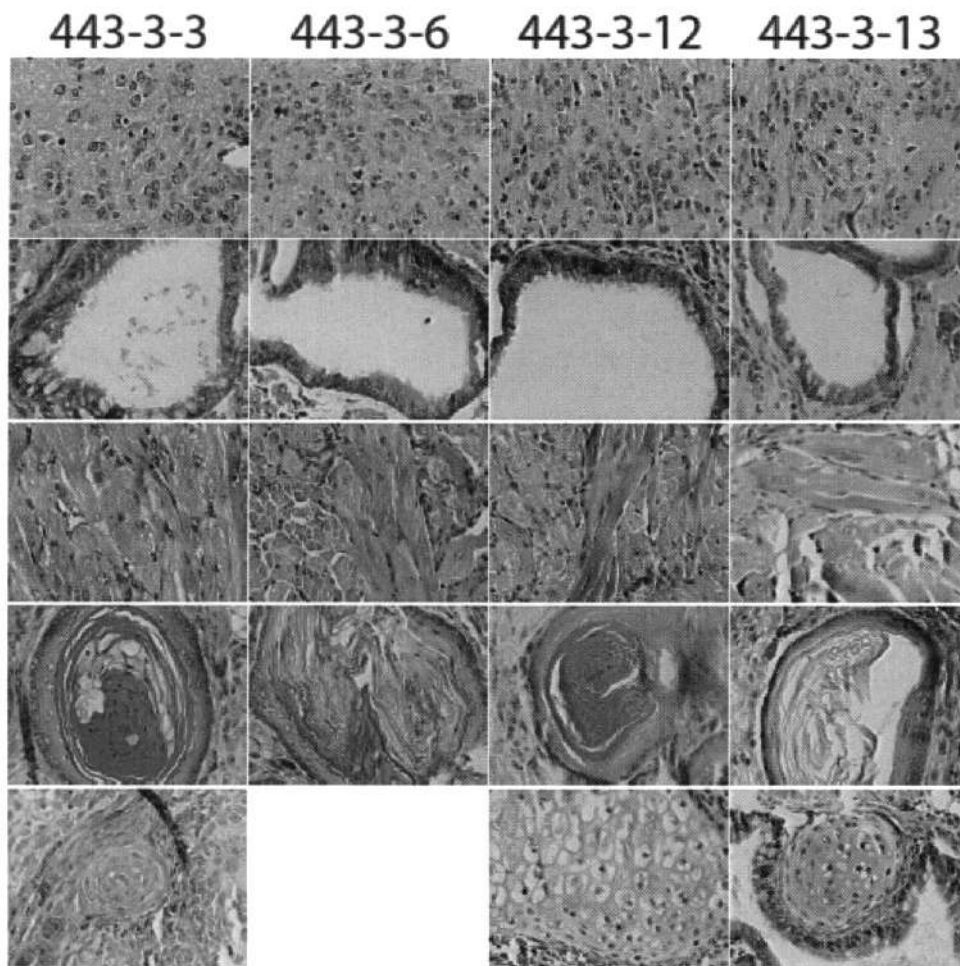
【 図 4 2 】

図 4 2



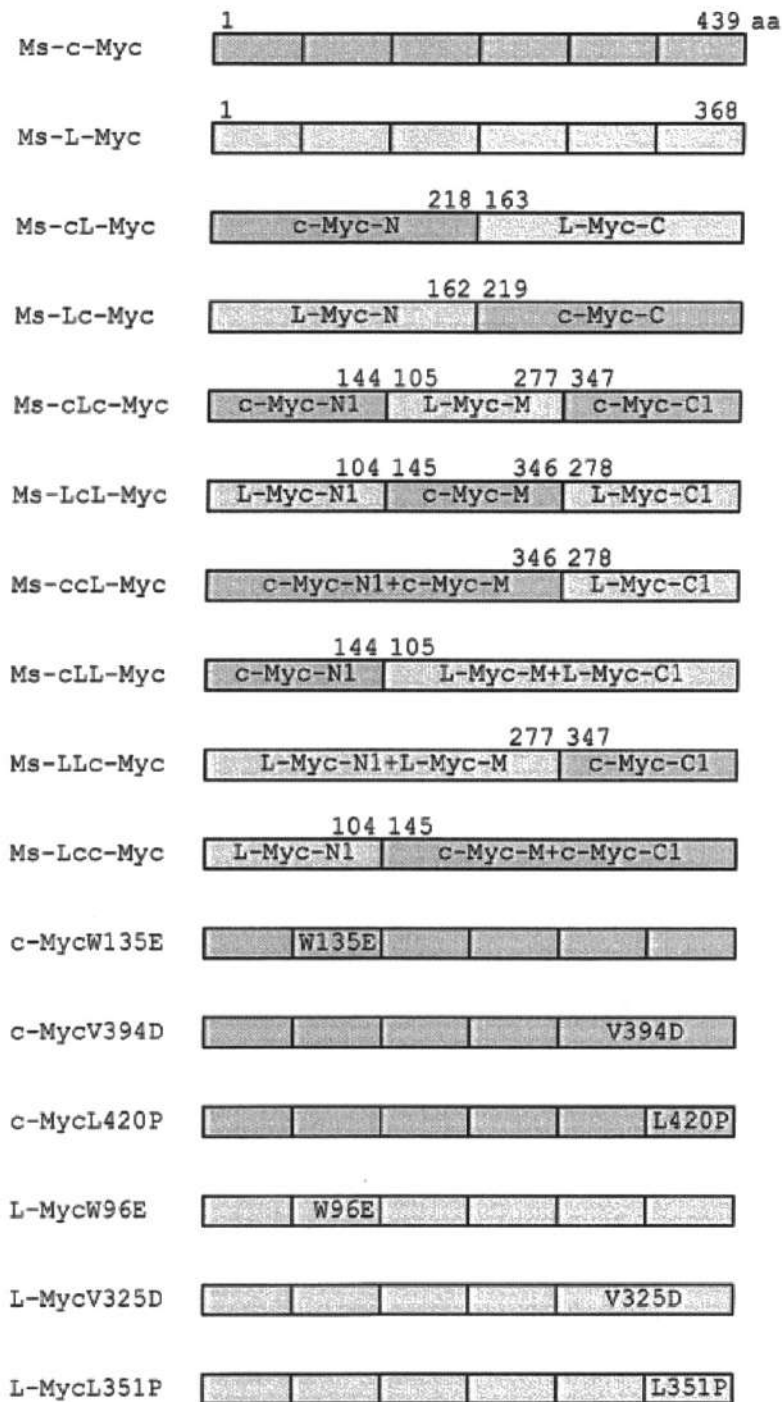
【 図 4 3 】

図 4 3



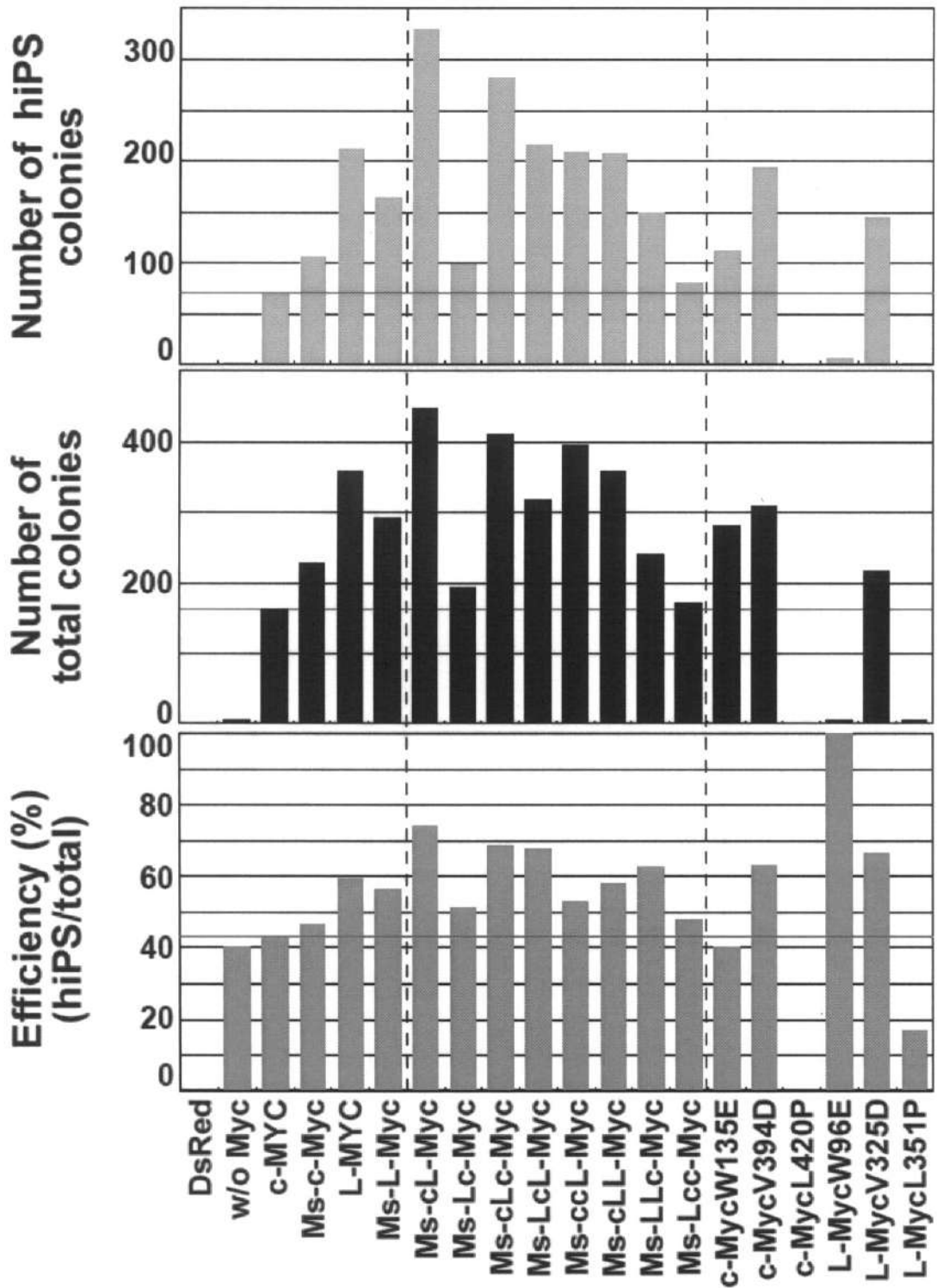
【 図 4 5 】

図 4 5



【 図 4 6 】

図 4 6



フロントページの続き

(出願人による申告)平成20年度文部科学省、「科学技術試験研究委託事業」、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

- (72)発明者 山中 伸弥
京都府京都市左京区聖護院川原町53 国立大学法人京都大学 物質 - 細胞統合システム拠点 i
P S細胞センター内
- (72)発明者 高橋 和利
京都府京都市左京区聖護院川原町53 国立大学法人京都大学 物質 - 細胞統合システム拠点 i
P S細胞センター内
- (72)発明者 中川 誠人
京都府京都市左京区聖護院川原町53 国立大学法人京都大学 物質 - 細胞統合システム拠点 i
P S細胞センター内

審査官 高 美葉子

- (56)参考文献 国際公開第2007/069666(WO, A1)
特表2002-511248(JP, A)
特表2011-525794(JP, A)
Science(2007 Dec), Vol.318, No.5858, p.1917-1920
Cell Res. (2008 May), Vol.18, No.5, p.600-603
Genomics. 2006 Apr;87(4):474-82. Epub 2006 Feb 7.
Dev Cell. 2002 Aug;3(2):167-70.
千葉医学 2006 Feb;84(1)1-7
EMBO J. 1989 Sep;8(9):2543-50.
Genes Dev. 1988 Dec;2(12A):1570-81.
Neuron. 1992 Mar;8(3):541-58.
Cell Growth Differ. 1994 Nov;5(11):1153-8.
Mol Cell Biol. 1988 Aug;8(8):3168-74.
J Virol. 1982 June; 42(3): 773-779.
株式会社ニュートンプレス「細胞の分子生物学」第4版(2004)第22頁

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00
C12N 5/00
CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
医学・薬学予稿集全文データベース