(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4007611号

(P4007611)

(45)発行日　平成19年11月14日(2007.11.14)　(24)登録日　平成19年9月7日(2007.9.7)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	

請求項の数 11　(全 92 頁)

(21)出願番号	特願平8-501081
(86)(22)出願日	平成7年5月30日(1995.5.30)
(65)公表番号	特表平10-501135
(43)公表日	平成10年2月3日(1998.2.3)
(86)国際出願番号	PCT/US1995/006722
(87)国際公開番号	WO1995/033052
(87)国際公開日	平成7年12月7日(1995.12.7)
審査請求日	平成11年2月3日(1999.2.3)
審判番号	不服2002-4608(P2002-4608/J1)
審判請求日	平成14年3月18日(2002.3.18)
(31)優先権主張番号	08/250,795
(32)優先日	平成6年5月27日(1994.5.27)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	08/360,144
(32)優先日	平成6年12月20日(1994.12.20)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　502096794
アリアド・ファーマシューチカルズ・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１２３９ケンブリッジ・ランズダウンストリート２６
(74)代理人　100060782
弁理士　小田島　平吉
(72)発明者　バーリン，　ビビアン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１８２７ダンステイブル・メインストリート６３４

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫抑制剤標的蛋白質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

（ａ）配列番号１のヌクレオチド配列からなる核酸、

（ｂ）ＡＴＣＣ受託番号７５７８７のｐＩＣ５２４のＲＡＰＴ１遺伝子挿入断片のヌクレオチド配列からなる核酸、または

（ｃ）配列番号２のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸。

【請求項２】

発現ベクターとして役立つように請求項１に記載の核酸に操作的に連結された転写配列調節物を含んでなる核酸。

【請求項３】

請求項２に記載の核酸であって、転写調節配列が天然のＲＡＰＴ１蛋白質の転写を天然で調節している配列以外である、上記核酸。

【請求項４】

請求項１に記載の核酸であって、ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体に結合しうるポリペプチドをコードする、上記核酸。

【請求項５】

請求項１～４のいずれかに記載の核酸であって、ＲＡＰＴ１遺伝子がヒト遺伝子である、上記核酸。

【請求項６】

請求項１～５のいずれかに記載の核酸を構成する第一のヌクレオチド配列および第一のヌ

クレオチド配列とインフレームで共有結合している異なるポリペプチドをコードする第二のヌクレオチド配列を含んでなる核酸。

【請求項７】

原核生物細胞または真核生物細胞の少なくとも一つにおいて複製でき、かつ、請求項３～６のいずれかに記載の核酸を含んでなる発現ベクター。

【請求項８】

請求項７に記載の発現ベクターでトランスフォームされ、かつ、該ポリペプチドを発現できる真核宿主細胞。

【請求項９】

請求項８に記載の宿主細胞を細胞培養培地において培養して該ポリペプチドを発現させ、次いで該ポリペプチドを細胞培養物から単離することを含んでなる請求項７に記載の発現ベクターによりコードされるポリペプチドの生産方法。

【請求項１０】

請求項１～６のいずれかに記載の核酸によりコードされたポリペプチド。

【請求項１１】

融合蛋白質である請求項１０記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

シクロスポリンＡ、ＦＫ５０６、およびラパマイシンは、主にＴリンパ球活性化の選択的阻害から生じる有望な免疫抑制性特性を有する微生物産物である。ラパマイシンは最初にはストレプトミセス属の菌株（ストレプトミセス　ヒグロスコピクス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｈｙｇｒｏｓｃｏｐｉｃｕｓ））から抽出された抗真菌性抗生物質として記載された（Ｖｅｚｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．（１９７５）　Ｊ．Ａｎｔｉｂｉｏｌ．、２８：７２１；Ｓｅｈｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９７５）　Ｊ．Ａｎｔｉｂｉｏｔ．　２８：７２７；およびＳｅｈｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．、米国特許第３，９２９，９９２号）。その後、マクロライド剤であるラパマイシンが、免疫抑制性、ならびに抗新生物性および抗増殖性特性を呈示することが示された（Ｍｏｒｒｉｓ（１９９２）　Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ　Ｒｅｓ　６：３９－８７）。

これらの化合物、すなわちシクロスポリンＡ、ＦＫ５０６、およびラパマイシンの各々は明らかに異なる生化学的反応（これらの反応は通常は免疫細胞の活性化を開始させるであろう）を遮断することにより免疫系を抑制する。簡潔に記載すると、シクロスポリンＡおよびＦＫ５０６はCa^{2+}－依存的Ｔ細胞活性化後にまもなく作用して、免疫応答の永続化および増幅化に重要なサイトカインの合成を阻害する。ラパマイシンはより後期に作用して免疫細胞におけるサイトカインの複数の影響を遮断する（これには、インターロイキン－２（ＩＬ－２）により開始されるＴ細胞増殖の阻害が含まれる）が、その抗増殖性効果は単にＴおよびＢ細胞に制約されるには留まらない。ラパマイシンは更に、成長因子－依存性および成長因子－非依存性の非免疫細胞の増殖をも選択的に阻害する。ラパマイシンは一般的には、リンパ球（Ｂｉｅｒｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）　ＰＮＡＳ　８７：９２３１－９２３５；およびＤｕｍｏｎｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）　Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ　１４４：１４１８－１４２４）、ならびに肝臓細胞（Ｆｒａｎｃａｖｉｌｌａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）　Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ　１５：８７１－８７７；およびＰｒｉｃｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５７：９７３－９７７）を一例とする非免疫細胞を含む多数のタイプの細胞におけるＳ期の開始に必要な特異的シグナル伝達現象を遮断することにより細胞増殖を阻害するものと考えられている。幾つかの一連の証拠により、細胞内ＦＫ５０６／ラパマイシン結合性蛋白質（ＦＫＢＰ）（複数）のファミリーの内の様々なメンバーとラパマイシンとの結合が、ラパマイシンにより媒介されるG_1期進行の阻害に必要であることが示唆されている。例えば、ラパマイシンの作用は過剰量の構造的ＦＫＢＰ－リガンド　ＦＫ５０６もしくは５０６ＢＤにより逆行する（Ｂｉｅｒｅｒ　ｅｔ　ａｌ．上述；Ｄｕｍｏｎｔ　ｅｔ　ａｌ．上述；およびＢｉｅｒｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５０：５５６－５５９）。

シクロスポリンAはシクロフィリン（Ｗａｌｓｈ ｅｔ ａｌ.（１９９２） Ｊ.Ｂｉｏｌ.Ｃｈｅｍ. ２６７：１３１１５－１３１１８）と称されるある種の蛋白質に結合する一方で、先に記載されるＦＫ５０６およびラパマイシンの両方のための初期標的はＦＫＢＰである（Ｈａｒｄｉｎｇ ｅｔ ａｌ.（１９８９） Ｎａｔｕｒｅ ３４１：７５８－７６０１；Ｓｉｅｋｉｅｎｋａ ｅｔ ａｌ（１９８９） Ｎａｔｕｒｅ ３４１：７５５－７５７；およびＳｏｌｔｏｆｆ ｅｔ ａｌ.（１９９２） Ｊ.Ｂｉｏｌ.Ｃｈｅｍ. ２６７：１７４７２－１７４７７）。シクロフィリン／シクロスポリンとＦＫＢＰＩ２／ＦＫ５０６との両複合体が特異的蛋白質ホスファターゼ（カルシニュリン（ｃａｌｃｉｎｅｕｒｉｎ））に結合し、この蛋白質ホスファターゼはＩＬ－２遺伝子特異的転写活性化因子の活性を制御するものと仮定されている（Ｓｃｈｒｅｉｂｅｒ（１９９１） Ｃｅｌｌ ７０：３６５－３６８）に総説が記載されている）。それとは対照的に、ラパマイシン感受性シグナル伝達経路のための下流細胞性標的、具体的にはＦＫＢＰ－ラパマイシン複合体の直接的標的の同定に関してはは未だに詳細には特徴決定がなされてはいない。

Ｓ. ケレビシアエ（Ｓ. ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のＴＯＲ１およびＴＯＲ２遺伝子はもともとはラパマイシンに対する耐性を細胞に付与する突然変異により同定され（Ｈｅｉｔｍａｎ ｅｔ ａｌ.（１９９１） Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５３：９０５－９０９）、そしてＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体は、ＴＯＲ１もしくはＴＯＲ２のいずれかのホスホセリン残基に直接結合することによりＴＯＲ遺伝子産物の細胞性機能を阻害することがあるという初期の仮説が存在していた。しかしながらその後には、ＴＯＲ蛋白質に対するＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体の直接的結合は関与していないというラパマイシン剤相互作用についての新規のモデルが提案された。例えば、ラパマイシンで処理した細胞におけるサイクリン－ｃｄｋ活性に関する実験データを基にして、Ｓｃｈｒｅｉｂｅｒ研究所はＡｌｂｅｒｓ ｅｔ ａｌ.（１９９３） Ｊ.Ｂｉｏｌ.Ｃｈｅｍ. ２６８：２２８２５－２２８２９中に以下の記述を行った：

「ＴＯＲ２遺伝子産物がＦＫＢＰ－ラパマイシン複合体の直接標的である可能性は考えられるものの、一層もっともらしい説明は、ＴＯＲ２遺伝子産物はラパマイシンの直接標的の下流に存在すること、およびＴＯＲ２突然変異によりその蛋白質が構造的に活性となるということである。後者のモデルが正しいとすると、ＴＯＲ２遺伝子産物は$p70^{s6k}$、サイクリン－依存的キナーゼ、およびサイクリンＤ１に、ＦＫＢＰ－ラパマイシン複合体の直接標的の下流に存在する蛋白質として結合することとなり、かつ細胞周期の進行にとって重要な役割を担うことが既に示されている。ＦＫＢＰ－ラパマイシン複合体の直接標的を同定することで、Ｇ１期への進行をもたらすシグナル変換経路の上流構成成分が明らかになりそうである、そしてそのことが成長因子－媒介性シグナル伝達現象と細胞周期の進行に必要とされるサイクリン－ｃｄｋ活性とを結び付けるシグナル変換経路の詳細を浮き彫りにする手助けとなるであろう。」

同様に、ラパマイシン－耐性イースト細胞におけるＴＯＲ１およびＴＯＲ２突然変異の役割を研究した後に、ＬｉｖｉのグループはＣａｆｆｅｒｋｅｙら（１９９３） Ｍｏｌ.Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ. １３：６０１２－６０２３において以下のように記述している：

「従って、ラパマイシンにより放出されたＤＲＲ１［ＴＯＲ１］蛋白質において我々が同定したアミノ酸変化により、その蛋白質がＦＫＢＰ１２－ラパマイシン複合体との結合を妨害することによるよりはむしろ別のシグナルを構造的に活性化させることによりラパマイシンによって阻害される増殖性シグナルの損失を補うことが可能となることがある。そのキナーゼドメイン内に含まれるがただしＰＩ ３－キナーゼと共有されてはいない領域内に存在する突然変異の位置によってこの構想が支持される。従って、ＤＲＲ１は野生型イースト細胞内のラパマイシン感受性経路の構成成分ではないという見込みは確実なものである。その代わりＳｅｒ－１９７２でのＤＲＲ１のミスセンス突然変異はその正常活性を変化させ、そしてその活性をラパマイシンの真の標的である主要蛋白質の機能の代用とさせることがある。」

ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体にとっての直接的下流標的蛋白質である細胞性蛋白質を同

定し、そしてそれらの蛋白質をコードする遺伝子を同定することが、本発明の目的である。

発明の要約

本発明は、ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体にとって直ぐ下流の標的である哺乳類起源の新規の蛋白質の発見に関する。本明細書に記載されるように、薬剤依存的相互作用捕捉アッセイを用いて、ＦＫ５０６－結合性蛋白質／ラパマイシン複合体と相互作用を行い、そして本明細書内では集合的に「ＲＡＰ－結合性蛋白質」もしくは「ＲＡＰ－ＢＰ」として引用される多数の蛋白質が単離された。具体的には数々の哺乳類遺伝子（オーソロガス遺伝子）を、本明細書では「ＲＡＰＴ１」として引用される蛋白質（この蛋白質はイーストのＴＯＲ１およびＴＯＲ２遺伝子産物との明らかな関連性を有している）についてクローン化した。それに加え新規のユビキチン－結合性酵素（本明細書では「ｒａｐ－ＵＢＣ」として引用される）を、ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体に結合するその酵素の能力に基づきクローン化した。それに加え、ＲＡＰＴ１－様蛋白質をヒト病原体カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）からクローン化した。従って本発明は、新規の蛋白質（組換えおよび精製化の両形態）、組換え遺伝子、ＲＡＰ－結合性蛋白質に対する抗体、診断および治療用使用のための他の新規の試薬およびアッセイを利用可能とさせる。

本発明は真核生物細胞、特にヒト細胞内での、ＦＫ５０６－結合性蛋白質／ラパマイシン複合体と、本明細書内では「ＲＡＰ－結合性蛋白質」もしくは「ＲＡＰ－ＢＰ」として引用される所定の細胞性蛋白質との間の新規の蛋白質－蛋白質相互作用の発見に関する。

一般的には本発明は哺乳類ＲＡＰＴ１ポリペプチド、好ましくはＲＡＰＴ１ポリペプチドの実質的に純粋な調製物もしくは組換えＲＡＰＴ１ポリペプチドを特徴とする。好ましい態様では、それらのポリペプチドはラパマイシンへの結合に関連する生物学的活性を有する（一例ではそのポリペプチドはＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体に結合する能力を保持している）ものの、そのポリペプチドはラパマイシン－依存的複合体の構築に対する作動性作用もしくは拮抗性作用のいずれかを行うことが可能であるかもしれない。そのポリペプチドは配列番号２もしくは１２の内の一つに示されるポリペプチドと同一であることができるか、あるいは単にその配列に相同であることができる。例えばそのポリペプチドは好ましくは、配列番号２もしくは１２のいずれかの内の少なくとも一つのアミノ酸配列に少なくとも７０％相同なアミノ酸配列を有する一方で、例えば８０％、９０％、もしくは９５％のような一層高目の配列相同性も予期され、そして一般的にはそれらが好ましいであろう。このポリペプチドは全長蛋白質を含むか、もしくは全長蛋白質の一部分（例えば、配列番号２もしくは１２のいずれかに表されるＲＡＰＴ１ポリペプチド）、あるいはその蛋白質の更に小さめの断片さえ（その断片は例えば少なくとも５、１０、２０、５０、１００、もしくは１５０アミノ酸の長さである）をも含むことができる。以下に記載されるようにＲＡＰＴ１ポリペプチドは、その蛋白質の天然に存在する形態の生物学的活性のアゴニスト（例えば、疑似物）、もしくは別法ではアンタゴニストの内のいずれかであることができ、例えばそのポリペプチドはラパマイシン複合体（例えば、ＦＫ５０６－結合性蛋白質もしくは細胞周期調節性蛋白質に関与する複合体）の構築を調節することが可能である。

好ましい態様では表題ＲＡＰＴ１ポリペプチドの内の少なくとも一つの生物学的活性を有するポリペプチドは配列番号２もしくは１２の配列とはアミノ酸配列が異なるかもしれないが、このような差異により天然のＲＡＰＴ１蛋白質と同一もしくは類似の様式で機能するか、あるいは天然のＲＡＰＴ１蛋白質と同一もしくは類似の特徴を有する改変化蛋白質がもたらされる。しかしながら、天然に存在する蛋白質の細胞上での正常な役割の拮抗剤となる天然に存在する蛋白質の相同体が企画されている。

更に他の好ましい態様ではＲＡＰＴ１蛋白質は、第二ポリペプチド部分（例えば、ＲＡＰＴ１ポリペプチド部分に無関係なアミノ酸配列を有する第二ポリペプチド）を含む組換え融合蛋白質であり、一例ではその第二ポリペプチド部分はグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼであり、一例ではその第二ポリペプチド部分は転写調節蛋白質のＤＮＡ結合性ドメインであり、一例ではその第二ポリペプチド部分はＲＮＡポリメラーゼ活性性ドメイン

であり、一例ではその融合蛋白質は二重ハイブリッドアッセイにおいて機能を示す。
本発明の更に他の態様は、免疫原性調製物中にＲＡＰＴ１ペプチドを含む免疫原に関し、その免疫原はＲＡＰＴ１ポリペプチドに特異的な免疫応答を誘導することが可能であり、そのような免疫応答は；例えば液性応答、例えば抗体応答；例えば細胞性応答である。好ましい態様では、免疫原は、配列番号２および／または１２により表される蛋白質からの抗原決定基（例えば、独特な決定基）を含む。
本発明の更に別の態様は、ＲＡＰＴ１免疫原のエピトープと特異的な反応性を示す抗体調製物を特徴とする。
更に他の態様では本発明は、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）種（ｃａＲＡＰＴ１）からのＲＡＰＴ１－様ポリペプチド、好ましくはｃａＲＡＰＴ１ポリペプチドの実質的に純粋な調製物、もしくは組換えｃａＲＡＰＴ１ポリペプチドを特徴とする。先に記載されるように、好ましい態様ではｃａＲＡＰＴ１ポリペプチドはラパマイシンへのその結合性に関連する生物学的活性を有し、例えばそのポリペプチドはラパマイシン複合体（例えば、ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体）に結合する能力を保持する。そのポリペプチドは配列番号１４に示されるポリペプチドと同一であることができるか、あるいはそのポリペプチドは単にその配列に相同であることができる。例えば、ｃａＲＡＰＴ１ポリペプチドは配列番号１４のアミノ酸配列に少なくとも６０％相同なアミノ酸配列を有することが好ましい一方で、一例では８０％、９０％、もしくは９５％のような一層高目の配列相同性も予期される。ｃａＲＡＰＴ１ポリペプチドは配列番号１４に表される全ポリペプチドを含むことができるか、あるいはその蛋白質の断片を含むことができ、その断片は例えば少なくとも５、１０、２０、５０、もしくは１００アミノ酸の長さのものであるかもしれない。ｃａＲＡＰＴ１ポリペプチドは、その蛋白質の天然に存在する形態の生物学的活性のアゴニスト（例えば疑似物）もしくは別法ではアンタゴニストのいずれかであることができる。
好ましい態様では、表題ｃａＲＡＰＴ１ポリペプチドの少なくとも一つの生物学的活性を有するペプチドは配列番号１４の配列とはアミノ酸配列が異なるかもしれないが、そのような差異により天然のｃａＲＡＰＴ１と同一もしくは類似の様式で機能するか、あるいは天然の蛋白質と同一もしくは類似の特徴を有する改変化蛋白質がもたらされる。しかしながら、天然に存在する蛋白質の細胞上での正常な役割の拮抗剤となる天然に存在するｃａＲＡＰＴ１蛋白質の相同体が期待される。
更に他の好ましい態様では、ｃａＲＡＰＴ１蛋白質は第二ポリペプチド部分を含む組換え融合蛋白質であり、例えば第二ポリペプチドはｃａＲＡＰＴ１配列とは無関係なアミノ酸配列を有し、例えばその第二ポリペプチド部分はグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼであり、例えば第二ポリペプチド部分はＲＮＡポリメラーゼ活性性ドメインであり、例えばその融合蛋白質は二重ハイブリッドアッセイにおいて機能を示す。
本発明の更に他の態様は、免疫原性調製物内にｃａＲＡＰＴ１ペプチドを含む免疫原に関し、その免疫原はｃａＲＡＰＴ１ポリペプチドに特異的な免疫応答を誘導することが可能であり、その免疫応答は：例えば液性応答、例えば抗体応答；例えば細胞性応答である。好ましい態様では、免疫原は、例えば配列番号１４により表される蛋白質からの抗原決定基（例えば、独特な決定基）を含む。
本発明の更に別の態様は、ｃａＲＡＰＴ１免疫原のエピトープと特異的に反応する抗体調製物を特徴とする。
本発明の更に別の態様は、ＲＰＡＴ１の断片（例えば、ｈＲＡＰＴ１もしくはｍＲＡＰＴ１）、あるいは他のＲＡＰＴ１－様ポリペプチド（例えば、ｃａＲＡＰＴ１、ＴＯＲ１、もしくはＴＯＲ２）を特徴とし、これらの断片はラパマイシン依存的様式でＦＫ－結合性蛋白質に結合する能力を保持する。従って本発明は、免疫抑制剤、抗－真菌剤、およびＲＡＰＴ１－様蛋白質のラパマイシン結合性ドメインの結合を通して作用する類似物のための薬剤スクリーニングアッセイ、特に以下に記載される高処理量アッセイの作製を容易にする。例えば本発明は、全長蛋白質と比較して操作が一層容易なＲＡＰＴ１－様蛋白質の複数部分を提供する。全長蛋白質はそのサイズがために、ラパマイシン－結合性活性を保持するであろう組換え蛋白質もしくは融合蛋白質として発現することが一層困難であり、

かつ非常に高い確立で不溶性となることがある。従って本発明は、例えば配列番号２（ｍＲＡＰＴ１）のＶａｌ２６－Ｔｙｒ１６０、配列番号１２（ｈＲＡＰＴ１）のＶａｌ２０１２－Ｔｙｒ２１４４、配列番号１４（ｃａＲＡＰＴ１）のＶａｌ４１－Ｔｙｒ１７３、配列番号１６（ＴＯＲ１）のＶａｌ１－Ｔｙｒ１３３、および配列番号１８（ＴＯＲ２）のＶａｌ１－Ａｒｇ１３３からなる群より選択されるアミノ酸配列により表されるラパマイシン－結合性ドメインのような、前記ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体に結合するＲＡＰＴ１－様ポリペプチドの可溶性部分を含む可溶性ポリペプチドを提供する。

本発明の他の態様は、ＲＡＰＴ１ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する実質的に単離された核酸を提供する。好ましい態様では：コードされるポリペプチドは実質的にラパマイシン複合に結合し、そして／またはラパマイシン－含有性蛋白質複合体の構築の作動性作用もしくは拮抗性作用のいずれかを行うことが可能である。その核酸のコーディング配列はＲＡＰＴ１をコードする配列（この配列は配列番号１もしくは１１に示されるｃＤＮＡと同一であるか、あるいは単にその配列に相同であることができる）を含むことができる。例えば、ＲＡＰＴ１をコードする配列は配列番号１もしくは１１のヌクレオチド配列の一つもしくは両方に対する少なくとも７０％の相同性を有することが好ましい一方で、例えば８０％、９０％、もしくは９５％のような一層高い配列相同性も期待される。この核酸は配列番号１に表されるヌクレオチド配列を含むことができるか、あるいはその核酸の断片を含むことができ、その断片は例えば一例では少なくとも５、１０、２０、５０、１００、もしくは１３３アミノ酸の長さである断片をコードすることがある。この核酸によりコードされるポリペプチドはＲＡＰＴ１蛋白質の天然に存在する形態の生物学的活性のアゴニスト（例えば疑似物）か、あるいは別法ではアンタゴニストのいずれかであることができ、例えばそのポリペプチドはラパマイシン媒介性蛋白質複合体を調節することが可能である。

それに加え所定の好ましい態様では、表題ＲＡＰＴ１核酸は、転写調節配列（例えば、転写プロモーターもしくは転写エンハンサー配列の内の少なくとも一つ）を含み、そしてその調節配列はＲＡＰＴ１遺伝子配列に操作的に連結されるであろう。そのような調節配列を用いてＲＡＰＴ１遺伝子配列を発現ベクターとしての使用に適切なものにすることができる。

別の好ましい態様では、この核酸は緊縮条件下で、配列番号１および／または１１の内の少なくとも１２の連続ヌクレオチド；好ましくは少なくとも２０の連続ヌクレオチド、そして一層好ましくは少なくとも４０の連続ヌクレオチオドに相当する核酸プローブにハイブリダイズする。更に別の態様では、この核酸は、ラパマイシンのための結合性ドメインに相当するヒトもしくはマウスＲＡＰＴ１遺伝子の領域にハイブリダイズする。

本発明の他の態様は、ｃａＲＡＰＴ１ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する実質的に単離された核酸配列を提供する。好ましい態様では：コードされるポリペプチドはラパマイシン複合体と特異的に結合し、そして／またはラパマイシン含有性蛋白質複合体の構築の作動性作用もしくは拮抗性作用のいずれかを行うことが可能である。この核酸のコーディング配列は配列番号１３に示されるｃＤＮＡと同一であることができるか、あるいは単にその配列に相同であることができる。例えばｃａＲＡＰＴ１をコードする配列は配列番号１３のヌクレオチド配列に少なくとも６０％相同な配列を有する一方で、例えば８０％、９０％、もしくは９５％のような一層高目の配列相同性も予期される。この核酸は配列番号１３に表されるヌクレオチド配列を含むことができるか、あるいはその核酸配列の断片を含むことができ、その断片は例えば一例では少なくとも５、１０、２０、５０、１００、もしくは１４０のアミノ酸の長さの断片をコードすることがある。その核酸によりコードされるポリペプチドは、ｃａＲＡＰＴ１蛋白質の天然に存在する形態の生物学的活性のアゴニスト（例えば疑似物）もしくは別法ではアンタゴニストのいずれかであることができ、例えばそのポリペプチドはラパマイシン媒介性蛋白質複合体を調節することが可能である。

その上、所定の好ましい態様では表題ｃａＲＡＰＴ１核酸は転写調節配列（例えば、転写プロモーターもしくは転写エンハンサー配列の内の少なくとも一つ）を含み、そしてその

調節配列はｃａＲＡＰＴ１遺伝子配列に操作的に連結されるであろう。そのような調節配列を用いてｃａＲＡＰＴ１遺伝子配列を発現ベクターとしての使用に適するものにすることができる。

更に別の好ましい態様では、この核酸は緊縮条件下では、配列番号１３の内の少なくとも１２の連続ヌクレオチド；好ましくは少なくとも２０の連続ヌクレオチド、および一層好ましくは少なくとも４０の連続ヌクレオチドに相当する核酸プローブにハイブリダイズする。

本発明は更に、トランスジーンを有する形質転換非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、もしくはブタ）、例えば本明細書に記載されるＲＡＰ－ＢＰ遺伝子の内の一つの異種形態（例えばヒトに由来する遺伝子）を含む（および好ましくは発現する）動物、例えば表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の内の一つもしくは複数の発現が破壊される動物をも特徴とする。このような形質転換動物は、突然変異を生じたかもしくは過誤発現されるＲＡＰ－ＢＰ対立遺伝子を含む細胞性障害を研究するため、あるいは薬剤スクリーニングにおける使用のための動物モデルとして役立つことができる。

本発明は更に、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含むプローブ／プライマーを提供し、この場合、このオリゴヌクレオチドは緊縮条件下で配列番号１、１１、もしくは１３、またはその天然に存在する突然変異体の内の一つのセンスもしくはアンチセンス配列の内の少なくとも１０の連続ヌクレオチドにハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。好ましい態様ではそのプローブ／プライマーは更にそれらに連結されかつ検出が可能なラベル基を含む。そのラベル基は例えば、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、および酵素補助因子からなる群より選択することができる。本発明のプローブは、形質転換化細胞をも同定するため、例えば患者から単離された細胞の試料内において表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の内の一つをコードする核酸のレベルを検出するため；例えば細胞内のＲＡＰ－ＢＰ　ｍＲＮＡレベルを測定するか、あるいはそのゲノムＲＡＰ－ＢＰ遺伝子が突然変異もしくは欠失を生じているかどうかを決定するための診断検査キットの一部分として用いることができる。そのオリゴヌクレオチドが少なくとも１０のヌクレオチドの長さを有することが好ましい一方で、２０、３０、５０、１００、もしくは１５０のヌクレオチドの長さのプライマーも予期される。

更に別の態様では本発明は、ＲＡＰ－結合性蛋白質とラパマイシン／蛋白質複合体との間の相互作用を誘導する分子について検査化合物をスクリーニングするためのアッセイ系を提供する。例示的な方法は、（ｉ）本発明のＲＡＰ－結合性蛋白質、ＦＫ５０６－結合性蛋白質、および検査化合物を、例えばその検査化合物が存在しなければＦＫ５０６－結合性蛋白質とＲＡＰ－結合性蛋白質とが相互作用を行うことが不可能である条件下で合わせる段階：および（ｉｉ）ＦＫ５０６－結合性蛋白質およびＲＡＰ－結合性蛋白質を含む薬剤依存的複合体の形成を検出する段階を含む。検査化合物の存在下での複合体形成における統計的に有意な変化（例えば増加）（その検査化合物の非存在下において観察されるものと比較される）が、ＦＫ５０６－結合性蛋白質とＲＡＰ－結合性蛋白質との間の相互作用の調節（例えば誘導）を意味する。その上、ＦＫ５０６－結合性蛋白質およびＲＡＰ－結合性蛋白質が無細胞系において合わせられ、そしてその検査化合物に接触される初期スクリーニングが提供されるが；これはすなわち、その無細胞系は、細胞溶解物および再構成させた蛋白質混合物からなる群より選択されるということである。別法ではＦＫ５０６－結合性蛋白質およびＲＡＰ－結合性蛋白質が、ある細胞中で同時に発現され（例えば、組換え的に）、そしてその細胞は例えば相互作用捕獲アッセイとしてその検査化合物と接触される（二重ハイブリッドアッセイ）。

本発明は更に、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の内の一つもしくは複数の野生型機能の喪失を特徴とする所望されない細胞成長を示す動物を治療するための方法を提供し、その方法は、他の細胞性もしくはウイルス性蛋白質とＲＡＰ－結合性蛋白質との相互作用を阻害することができる作用物質の治療学的有効量を投与することを含む。ある態様では、その方法は配列番号２もしくは１２の内の一つに表されるポリペプチドをコードする核酸構築物を、その構築物がそのＲＡＰ－結合性蛋白質中で欠損を生じている細胞により取込まれる条

件下、およびその組換え遺伝子が例えば遺伝子療法技術により発現される条件下で投与することを含む。他の態様では天然に存在するＲＡＰ－結合性蛋白質の作用が、例えばラパマイシンにより媒介される複合体の構築のアンタゴニストであるＲＡＰ－ＢＰ相同物の治療的発現によるか、あるいは標的化ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子の転写および／または翻訳を阻害するアンチセンス核酸分子の輸送により拮抗される。

本発明の他の態様は、被検体（例えばヒト患者）が所望されない細胞増殖を特徴とする障害の危険にさらされているかどうかを決定する方法を提供する。この方法はその被検体の組織内で、（ｉ）配列番号１もしくは１１、またはその相同物の内の一つにより表される蛋白質をコードする遺伝子の突然変異；（ｉｉ）配列番号１もしくは１１の内の一つにより表される蛋白質をコードする遺伝子の過誤発現；あるいは（ｉｉｉ）調節蛋白質複合体（例えばラパマイシン含有性複合体）におけるＲＡＰ－結合性蛋白質の過誤取込み、の内の少なくとも一つを特徴とする遺伝子病変の存在および非存在を検出することを含む。好ましい態様では：遺伝子病変の検出は：ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子からの一つもしくは複数のヌクレオチドの欠失；その遺伝子への一つもしくは複数のヌクレオチドの添加；その遺伝子の一つもしくは複数のヌクレオチドの置換、その遺伝子の総体的染色体再構成；その遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ転写物のレベルの変化；その遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ転写物の非野生型タイプのスプライシングパターンの存在；もしくはその蛋白質の非野生型レベル、の内の少なくとも一つの存在を確認することを含む。

例えば、遺伝子病変の検出は、（ｉ）配列番号１もしくは１１、または天然に存在するそれらの突然変異体、あるいはＲＡＰ－ＢＰ遺伝子に天然の状態で連結する５’もしくは３’フランク配列の内の一つのセンスもしくはアンチセンス配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含むオリゴヌクレオチドを含むプローブ／プライマーを提供すること；（ｉｉ）その組織の核酸に対してそのプローブ／プライマーを露出すること；および（ｉｉｉ）その核酸へのそのプローブ／プライマーのハイブリダイゼーションにより遺伝子病変の存在もしくは非存在を検出すること、を含むことができ：この場合、例えばその病変の検出は、ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子および場合によってはフランク核酸配列のヌクレオチド配列を決定する目的でそのプローブ／プライマーを利用することを含む。例えば、そのプローブ／プライマーをポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）もしくは連結連鎖反応（ＬＣＲ）において利用することができる。別の態様ではＲＡＰ－結合性蛋白質のレベルが、配列番号１もしくは１１の内の一つにより表される蛋白質と特異的免疫反応性を示す抗体を用いる免疫アッセイにおいて検出される。

類似様式ではカンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）感染を、ＲＡＰＴ１－様蛋白質をコードするカンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）遺伝子にハイブリダイズするプローブ／プライマーの使用により検出することができる。例えばこの方法は、（ｉ）配列番号１３、または天然に存在するその突然変異体、あるいはｃａＲＡＰＴ１遺伝子に天然の状態で連結する５’もしくは３’フランク配列の内の一つのセンスもしくはアンチセンス配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含むオリゴヌクレオチドを含むプローブ／プライマーを提供すること；（ｉｉ）そのプローブ／プライマーを生物学的試料（例えば、組織生検、液体試料、便等）の核酸に露出すること；ならびに（ｉｉｉ）その核酸へのそのプローブ／プライマーのハイブリダイゼーションによりカンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）生物体の存在および非存在を検出すること、を含むことができる。

本発明の他の態様は、「おとり」用蛋白質／薬剤複合体と物理的に相互作用する蛋白質をコードする遺伝子の単離のための新規のインビボでの方法に関する。この方法は薬剤の存在下、特にその薬剤が非ペプチジル性小有機分子（例えば＜２５００Ｋ）（例えばマクロライド、例えばラパマイシン、ＦＫ５０６、もしくはシクロスポリン）である場合における転写活性化因子の再構成の検出を頼みとしている。具体的には、この方法はハイブリッド蛋白質を発現するキメラ遺伝子を利用する。第一ハイブリッド蛋白質は、おとり用蛋白質に融合された転写活性因子のＤＮＡ－結合性ドメインを含む。第二ハイブリッド蛋白質は「魚」役蛋白質（例えばｃＤＮＡライブラリーに由来する検査蛋白質）に融合された転写活性化ドメインを含む。その魚役およびおとり用の蛋白質が薬剤依存性様式で相互作用

を行う場合には、それらの蛋白質はその転写活性化因子の二つのドメインに極めて接近するようになる。この接近状況は、転写活性化因子に対して応答性である転写調節部位に操作的に連結されるレポーター遺伝子の転写を生じるに十分なものであり、そしてそのマーカー遺伝子の発現を検出し、そしてそれを利用して他の蛋白質と、そのおとり用蛋白質／薬剤複合体との相互作用についての評定を行うことができる。

本発明の実施は他に特別な記載がない限りは、細胞生物学、細胞培養法、分子生物学、形質転換生物学、微生物額、組換えＤＮＡ法、および免疫学の通常の技術を利用するであろうし、そしてそれらの技術は当業者の技術範囲内に含まれる。そのような技術は刊行物において詳細に記載されている。例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、２ｎｄ Ｅｄ.、ｅｄ. ｂｙ Ｓａｍｂｒｏｏｋ、Ｆｒｉｔｓｃｈ ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ：１９８９）；ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ、Ｖｏｌｕｍｅｓ Ｉ ａｎｄ ＩＩ（Ｄ.Ｎ.Ｇｌｏｖｅｒ ｅｄ.、１９８５）；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｍ.Ｊ.Ｇａｉｔ ｅｄ.、１９８４）；Ｍｕｌｌｉｓ ｅｔ ａｌ. 米国特許第４，６８３，１９５号；Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ（Ｂ.Ｄ.Ｈａｍｅｓ ＆ Ｓ.Ｊ.Ｈｉｇｇｉｎｓ ｅｄｓ. １９８４）；Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ（Ｂ.Ｄ.Ｈａｍｅｓ ＆ Ｓ.Ｊ.Ｈｉｇｇｉｎｓ ｅｄｓ. １９８４）；Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ（Ｒ.Ｉ.Ｆｒｅｓｈｎｅｙ、Ａｌａｎ Ｒ.Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ.、１９８７）；Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ Ｃｅｌｌｓ Ａｎｄ Ｅｎｚｙｍｅｓ（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ、１９８６）；Ｂ.Ｐｅｒｂａｌ、Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ Ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（１９８４）；ｔｈｅ ｔｒｅａｔｉｓｅ、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ.、Ｎ.Ｙ.）；Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ Ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ（Ｊ.Ｈ.Ｍｉｌｌｅｒ ａｎｄ Ｍ.Ｐ.Ｃａｌｏｓ ｅｄｓ.、１９８７、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）；Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、Ｖｏｌｓ.１５４ ａｎｄ １５５（Ｗｕ ｅｔ ａｌ.ｅｄｓ）、Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｃｅｌｌ Ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｍａｙｅｒ ａｎｄ Ｗａｌｋｅｒ、ｅｄｓ.、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｌｏｎｄｏｎ、１９８７）；Ｈａｎｄｂｏｏｋ Ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｖｏｌｕｍｅｓ Ｉ－ＩＶ（Ｄ.Ｍ.Ｗｅｉｒ ａｎｄ Ｃ.Ｃ.Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ.ｅｄｓ.、１９８６）；Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｍｏｕｓｅ Ｅｍｂｒｙｏ、（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ.Ｙ.、１９８６）、を参照されたい。

本発明の他の特徴および利点は以下の詳細な記述および請求の範囲から明白になるであろう。

図面の説明

図１はヒトＲＡＰＴ１クローンをクローン化するのに用いたｐＡＣＴベクターのマップを説明する。「ｐＩＣ５２４」と称されるｐＡＣＴのＲＡＰＴ１含有性異形は既にＡＴＣＣに寄託してある。

図２はラパマイシン濃度の関数としてのＦＫＢＰ１２およびｈＲＡＰＴ１（ラパマイシン－結合性ドメイン）の相互作用を説明する。相互作用はβ－ガラクトシダーゼ活性として検出される。ＦＫ５０６をラパマイシンの代わりに用いた場合、もしくはｌｅｘ．ｄａ（対照プラスミド）をＦＫＢＰ１２に置換した際には相互作用は全く検出されない。

図３はＦＫ５０６－含有性蛋白質とラパマイシン－結合性ドメイン（ＢＤ）融合物のペアの間の、様々な濃度のラパマイシンの存在下における、β－ガラクトシダーゼ発現により測定される相互作用の相対的強度を説明する（図８を参照されたい）。イーストのレポーター株ＶＢＹ５６７を指示されるプラスミドペアで形質転換させた。ヒトＦＫＢＰ１２、イーストＦＫＢＰ１２、および陰性対照として作用する無関係の配列に対するＬｅｘＡ

ＤＮＡ－結合性ドメイン融合物を「おとり」として用いた。ヒトＲＡＰＴ１　ＢＤ、アルギニンへのセリン置換を含むヒトＲＡＰＴ１　ＢＤ、イーストＴｏｒＩ　ＢＤ、イーストＴｏｒ２　ＢＤ（非公開）、およびカンジダ　アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）ＲＡＰＴ１　ＢＤに対するＶＰ１６酸性活性化ドメイン融合物をおとり用融合物に対する相互作用について検査した。各ペアのプラスミドを含む形質転換体を、色素産生性基質Ｘ－ｇａｌを含む培地上でのβ－ガラクトシダーゼ発現について検査した。コロニーを、３０℃下、２日間の成長の後に白色（白抜き棒）もしくは青色（黒塗り棒）のいずれかとして評定した。β－ガラクトシダーゼ発現のレベルを、１（明るい青色）～４（暗い青色）の範囲にわたる青色の強度により定量的に評定した。

発明の詳細な記述

最近の研究により真核生物細胞周期調節の分子的基盤に対する幾つかの驚くべき知見が提供された。細胞周期を通過する哺乳類細胞の進行は、多数の主要制御地点で調節される。中でも、それらは静止期（G_0）、制限地点、G_1／Ｓ過渡期、およびG_2／Ｍ過渡期内への移入およびそこからの脱出の地点である（総説については例えば、Ｄｒａｅｔｔｅ（１９９０）　Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｌ　Ｓｃｉ　１５：３７８－３８３；およびＳｈｅｒｒ（１９９３）　Ｃｅｌｌ　７３：１９５９－１０６５、を参照されたい）。究極的にはこれらのチェックポイント制御からの情報が関連するキナーゼの一群、すなわちサイクリン－依存性キナーゼ（ＣＤＫ）の調節された活性を通して統合される。例えばG_1期からＳ期への過渡期は現在では、多数のサイクリンおよびサイクリン－依存性キナーゼの周期的相互作用に関わる多重蛋白質複合体の一過性構築により厳密に時間的調節が行われていると考えられている。

詳細に説明すると、細胞結合化抗原による静止期のＴリンパ球の刺激化が複合体活性化プログラムの口火を切り、そのことにより細胞周期移入（G_0期からG_1期への過渡期）および高親和性インターロイキン－２（ＩＬ－２）レセプターの発現がもたらされる。その後に生じるその高親和性レセプターへのＩＬ－２の結合により、活性化Ｔ細胞の後期G_1期「制限地点」を通過する進行が誘導され（Ｐａｒｄｅｅ（１９８９）　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４６：６０３－６０８）、そしてその後にはその細胞はＤＮＡ複製、および究極的には有糸分裂という比較的自律的なプログラムを完了するように仕向けられる。

真核生物細胞周期調節に関連する情報の内の一つの重要な結果が、有望な成長調節剤についての新規の種類の分子標的の詳細な説明となる。マクロライドエステルであるラパマイシンは有望な免疫抑制剤であり、その作用メカニズムはサイトカイン－依存性Ｔ細胞増殖の阻害に関連する（Ｂｉｅｒｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）　ＰＮＡＳ　８７：９２３１－９２３５；Ｄｕｍｏｎｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）　Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ　１４４：１４１８－１４２４；Ｓｉｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）　Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ　Ｐｒｏｃ　２３：１－５：およびＳｉｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）　Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１０：５１９－５６０）。ラパマイシンは、ＩＬ－２刺激化細胞がＳ期に移入する進行に必要とされる後期G_1期現象を特異的に妨害する（Ｍｏｒｉｃｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２６８：３７３４－３７３８）。ラパマイシンにより誘導される細胞周期拘束地点の位置により、この薬剤が特にリンパ球におけるＧ１期からＳ期への過渡期を支配する調節地点を妨害することのヒントが与えられる。

本明細書に記載されるように、本発明はＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体のための直ぐ下流の標的である哺乳類起源の新規の蛋白質の発見に関する。以下に記載されるように、薬剤－依存性相互作用捕獲アッセイを用いてＦＫＢＰ１２／ラパマイシン複合体に結合し、かつ本明細書では「ＲＡＰ－結合性蛋白質（複数）」もしくは「ＲＡＰ－ＢＰ（複数）」として集合的に引用される多数の蛋白質を単離した。具体的には、マウスおよびヒトの遺伝子を、イーストＴＯＲ１およびＴＯＲ２遺伝子産物に関連すると思われる蛋白質（本明細書では「ＲＡＰＴ１」として引用される）についてクローン化した。それに加え、新規のユビキチン－複合体形成性酵素（本明細書では「ｒａｐ－ＵＢＣ」として引用される）を、ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体に結合するその能力に基づいてクローン化した。従って

本発明は、新規の蛋白質（組換えおよび精製化の両形態）、組換え遺伝子、ＲＡＰ－結合性蛋白質に対する抗体、ならびに診断的および治療的使用のための他の新規の試薬およびアッセイを利用可能とする。それに加え、ＦＫ５０６－結合性蛋白質との一つもしくは複数の表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の結合を調節することができる作用物質を同定するための薬剤発見用アッセイが提供される。そのような作用物質は細胞の成長および／または分化を変化させる目的では治療的に有用であり得るが、更に細胞培養物および組織の増殖および／または分化を制御するための細胞培養用添加物としてインビトロで用いることもできる。本発明の他の態様は以下に記載されてか、もしくは本開示を考慮する際に当業者には明らかになるであろう。

便宜を図るため、本明細書、実施例、および添付される請求の範囲に利用される所定の用語をここに終結させた。

本明細書で用いられる際には用語「核酸」は、例えばデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）および適切な場合にはリボ核酸（ＲＮＡ）のようなポリヌクレオチドを意味する。この用語は更に、等価物としてヌクレオチドアナログから作製されたＲＮＡもしくはＤＮＡのいずれかのアナログ、ならびに記載される態様に適応可能な際には一本鎖（例えばセンスもしくはアンチセンス）および二本鎖のポリヌクレオチドを含むことが理解されるはずである。

用語「遺伝子」もしくは「組換え遺伝子」は、本発明のＲＡＰ－結合性蛋白質をコードする読み取り枠を含み、エキソンおよび（場合によっては）イントロン配列を含む核酸を意味する。「組換え遺伝子」はＲＡＰ－結合性蛋白質をコードし、かつＲＡ－ＢＰをコードするエキソン配列を含むことを意味する一方で、その組換え遺伝子は場合によっては染色体ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子もしくは無関係の染色体遺伝子のいずれかに由来するイントロン配列を含むことがある。説明的なＲＡＰ－結合性蛋白質をコードする例示的組換え遺伝子は、配列番号１、１１、１３、もしくは２３の内の一つにより表される核酸配列を含む。用語「イントロン」は所定のＲＡＰ－ＢＰ遺伝子中に存在するＤＮＡ配列（これは、蛋白質に翻訳されず、かつ一般的にはエキソン間に見いだされる）を意味する。

本明細書で用いられる場合には、用語「トランスフェクション」は核酸（例えば、発現ベクター）の、核酸により媒介される遺伝子移送によるレシピエント細胞内への組込みを意味する。「形質転換」は本明細書で用いられる際には、細胞の遺伝型が外因性ＤＮＡもしくはＲＮＡの細胞性取込みの結果として変化する過程を意味し、そして例えば形質転換化細胞は本発明のＲＡＰ－結合性蛋白質の組換え形態を発現するか、あるいは移送された遺伝子からアンチセンス発現が生じる場合にはＲＡＰ－結合性蛋白質の天然に存在する形態についての発現が破壊される。

本明細書で用いられる際には用語「ベクター」は、予め連結されている他の核酸を輸送することが可能な核酸分子を意味する。好ましいベクターの内の一つのタイプはエピソームであり、これはすなわち過剰な染色体複製が可能な核酸である。好ましいベクターは、連結されている核酸の自律的複製および／または発現が可能なものである。操作的に連結される遺伝子の発現を指令することが可能なベクターは、本発明では「発現ベクター」として引用される。一般的には、組換えＤＮＡ技術に使用される発現ベクターは「プラスミド」の形態をとることがよくあり、このプラスミドは環状の二本鎖ＤＮＡループを意味し、そのようなベクター形態ではこのＤＮＡループは染色体には結合することはない。本明細書では「プラスミド」および「ベクター」は互換的に用いられるが、それはプラスミドが最も一般的に用いられるベクターの形態であるためである。しかしながら本発明は、等価機能を果たし、かつ本明細書の精読後に当該技術分野に知られるようになる他の形態の発現ベクターを含むことが意図される。

「転写調節配列」は、例えば開始シグナル、エンハンサー、およびプロモーターのような、操作的に連結されている蛋白質コーディング配列の転写を誘導もしくは制御するＤＮＡ配列を意味するために、本明細書を通して用いられる遺伝子用語である。好ましい態様では、組換えＲＡＰ－ＢＰ遺伝子の転写は、発現が意図される細胞タイプ内での組換え遺伝子の発現を制御するプロモーター配列（もしくは他の転写調節配列）の制御下に置かれている。組換え遺伝子がＲＡＰ－結合性蛋白質の天然に存在する形態の転写を制御する配列

と同一であるかもしくは異なる転写調節蛋白質の制御下に置かれることがあり得ることも理解されるであろう。
本明細書で用いられる際には用語「組織特異的プロモーター」は、プロモーターとして作用する、すなわちそのプロモーターに操作的に連結される選択されたＤＮＡ配列の発現を調節するＤＮＡ配列を意味し、そしてそのようなプロモーターは例えばリンパ系系列（例えば、ＢもしくはＴリンパ球）の細胞、あるいは別法では例えば肝細胞のような、ある組織内の特異的細胞内での選択されたＤＮＡ配列の発現を実施する。説明的態様ではリンパ系－特異的プロモーターを利用する遺伝子構築物を、リンパ系組織においてのみのＲＡＰ－ＢＰの突然変異形態の発現を指令することによりリンパ系細胞をラパマイシンに対して耐性にさせるためのＲＡＰ－結合性蛋白質の優性ネガティブ突然変異形態を提供するための遺伝子療法の一部分として用いることができる。この用語は更に、ある組織内では主に選択されたＤＮＡの発現を調節するが、他の組織でも同様に発現を引き起こすいわゆる「リーキー」プロモーターをも含む。
本明細書で用いられる際には「形質転換動物」はいずれかの動物、好ましくは非ヒト動物、鳥類もしくは両生類であり、それらの動物においてはその動物の内の一つもしくは複数の細胞がヒトの介入（例えば当該技術分野において熟知される形質転換技術）により導入された異種核酸を含む。核酸は、直接的もしくは間接的に、その細胞の前駆体内への組込みによるか、慎重な遺伝子操作（例えばマイクロインジェクション）によるか、あるいは組換えウイルスでの感染によりその細胞内に組込まれる。用語「遺伝子操作」は古典的雑種形成もしくはインビトロ受精を含まず、むしろ組換えＤＮＡ分子の組込みを意味する。この分子は染色体内に組み込まれることがあるか、あるいは染色体外で複製するＤＮＡであることがある。本明細書に記載される典型的形質転換動物では、そのトランスジーンにより細胞が表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の組換え形態（例えば、アゴニストもしくはアンタゴニストのいずれかの形態）を発現するようになる。しかしながら組換えＲＡＰ－ＢＰ遺伝子がサイレントである形質転換動物も企画されており、その例は以下に記載されるＦＬＰもしくはＣＲＥレコンビナーゼ依存的構築物である。本発明の「非ヒト動物」は脊椎動物（例えば、齧歯類、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類など）を含む。好ましい非ヒト動物はラットおよびマウスを初めとする齧歯類科から選択され、最も好ましくはマウスである一方で、形質転換両生類（例えば、キセノプス（ゼノパス）（Ｘｅｎｏｐｕｓ）属）および形質転換ニワトリも、例えば胚発生および組織パターン形成を理解するための重要な道具を提供することができる。用語「キメラ動物」は本明細書では組換え遺伝子が見いだされるか、もしくは組換え遺伝子がその動物の全体ではなく幾つかの細胞において発現される動物を意味する。用語「組織特異的キメラ動物」は、その組換えＲＡＰ－ＢＰ遺伝子が存在し、そして／または幾つかの組織では発現されるが他の組織では発現されないことを意味する。
本明細書で用いられる際には用語「トランスジーン」は核酸配列（例えば、ＲＡＰ－結合性蛋白質をコードする）を意味し、このトランスジーンはそれが組込まれる形質転換動物もしくは細胞に対して部分的もしくは完全に異種（すなわち外来性）であるか、あるいはそれが組込まれる形質転換動物もしくは細胞の内在性遺伝子に対して同種であるが、ただしそのトランスジーンはそれが挿入される細胞のゲノムを変化させる様式でその動物のゲノム内に挿入されるように設計されるか、あるいは挿入される（例えば、天然の遺伝子ものとは異なる位置に挿入されるか、あるいはその挿入によりノックアウトがもたらされる）。トランスジーンは一つもしくは複数の転写調節配列、および選択される核酸の至適発現に必要とされることがあるいずれかの他の核酸（例えばイントロン）を含むことができる。
熟知されるように、特別なポリペプチドのための遺伝子が、ある個体のゲノム内に単独もしくは多重コピーとして存在することがある。このような重複遺伝子は同一であることがあるか、あるいはヌクレオチド置換、添加、もしくは欠失を初めとする所定の改変を有することがあるが、このような遺伝子は全て依然として実質的に同一の活性を有するポリペプチドをコードしている。用語「ＲＡＰ－結合性蛋白質をコードするＤＮＡ配列」は従っ

て、特別な個体内の一つもしくは複数の遺伝子を意味することがある。それに加え、ヌクレオチド配列内の所定の差異が個々の生物体間に存在することがあり、これは対立遺伝子と称される。このような対立遺伝子の違いは、同一の生物学的活性を有する蛋白質を依然としてコードするコード化ポリペプチドのアミノ酸配列の違いをもたらすこともあるし、あるいはそうでないこともある。

「相同性」は、２本のペプチド間もしくは２つの核酸分子間の配列類似性を意味する。相同性は、比較の目的で整列されることがある各配列内のある位置を比較することにより決定することができる。比較される配列のある位置が同一塩基もしくはアミノ酸で占められている場合には、その分子はその位置においては相同となる。配列間の相同性の程度はそれらの配列により共有される対合するかもしくは相同な位置の数の関数となる。

「細胞」、「宿主細胞」、もしくは「組換え宿主細胞」は本明細書では互換的に用いられる用語である。そのような用語は特別な被検体細胞のみばかりでなくそのような細胞の子孫もしくは潜在的子孫をも意味することが理解される。所定の改変が突然変異もしくは環境的影響のいずれかのために次の世代に生じることがあるため、そのような子孫は実際にはその親細胞とは同一でなくなることがあるかもしれないが、それでも依然として本明細書で用いられるこの用語の範囲内に含まれる。

「キメラ蛋白質」もしくは「融合蛋白質」は、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の内の一つをコードする第一アミノ酸配列と、その表題ＲＡＰ－ＢＰのいずれかのドメインについて外来性であるかあるいは実質的には相同ではないドメインを特定する第二アミノ酸配列との融合物である。キメラ蛋白質はその第一蛋白質をも発現する生物体内に見いだされる（異なる蛋白質内であるにもかかわらず）外来性ドメインを表すことがあるか、あるいは異なる種類の生物体により発現される蛋白質構造の「種間」、「遺伝子間」などの融合物であることがある。例えば本発明の融合蛋白質は一般式$Z_1-Z_2-Z_3$［式中、Z_2はＲＡＰ－結合性蛋白質のポリペプチド配列の全部もしくは一部分を表し、そしてZ_1およびZ_3は各々ＲＡＰ－ＢＰ配列に対して異種であるポリペプチド配列を表し、Z_1およびZ_3の内の少なくとも一つは融合蛋白質内に存在する］により表すことができる。

用語「進化的に関連する」はＲＡＰ－結合性蛋白質をコードする核酸配列に関しては、ある生物体において天然に生じた核酸配列を意味し、これには天然に存在する突然変異体が含まれる。それに加えこの用語は、ＲＡＰ－結合性蛋白質の天然に生じるイソ型に当初は由来しながらも、例えば以下に記載される組み合わせ突然変異誘発のような突然変異誘発により既に改変されているものの、それでも依然としてＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体に結合するか、もしくはＲＡＰ－結合性親蛋白質の少なくとも一つの活性を保持するポリペプチドを依然としてコードするか、あるいはその蛋白質活性のアンタゴニストである核酸配列をも意味する。

用語「単離された」は核酸（例えばＤＮＡもしくはＲＮＡ）に関して本明細書において用いられる際には更に、その巨大分子の天然の源中に存在する他のＤＮＡもしくはＲＮＡから各々単離された分子をも意味する。例えば、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の内の一つをコードする単離された核酸は、ゲノムＤＮＡ遺伝子の特別なＲＡＰ－ＢＰ遺伝子を天然の状態で直にフランクする１０キロベース（ｋｂ）程度の核酸配列を含むことが好ましく、５ｋｂ程度のそのような天然に存在するフランク配列であることがより好ましく、そして１．５ｋｂを下回るそのような天然に存在するフランク配列が最も好ましい。用語「単離された」は本明細書で用いられる際には更に、組換えＤＮＡ技術により産生される場合には、細胞性物質、ウイルス性物質、もしくは培養培地を、あるいは化学的に合成される場合には、化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない核酸もしくはペプチドをも意味する。それに加え、「単離された核酸」は、断片としては天然には存在することがなく、かつ天然の状況では見いだされることがないであろう核酸断片を含むことが意味される。

本明細書で用いられる際には「ラパマイシン－結合性ドメイン」は、ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体と特異的に相互作用するための結合性活性を付与するポリペプチド配列を意味する。例示的ラパマイシン－結合性ドメインは、配列番号２（ｍＲＡＰＴ１）のＶａｌ２

６－Ｔｙｒ１６０、配列番号１２（ｈＲＡＴＰ１）のＶａｌ２０１２－Ｔｙｒ２１４４、配列番号１４（ｃａＲＡＰＴ１）のＶａｌ４１－Ｔｙｒ１７３、配列番号１６（ＴＯＲ１）のＶａｌ１－Ｔｙｒ１３３、および配列番号１８（ＴＯＲ２）のＶａｌ１－Ａｒｇ１３３により特定されるポリペプチド内に表される。

「ＲＡＰＴ１－様ポリペプチド」は、ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体のための直接的結合性標的蛋白質であり、かつ本発明の哺乳類ＲＡＰＴ１蛋白質と幾分かの配列相同性を共有する真核生物細胞性蛋白質を意味する。例示的ＲＡＰＴ１－様ポリペプチドにはイーストＴＯＲ１およびＴＯＲ２蛋白質が含まれる。

「可溶性蛋白質」は生理学的等張条件下（例えば、０．１４Ｍ　ＮａＣｌ、あるいはせいぜい１０μＭ、より好ましくはせいぜい１０ｍＭの蛋白質濃度のスクロース）で、水性緩衝液から沈殿することのない（例えば、少なくとも９５－パーセント、より好ましくは少なくとも９９－パーセントがその上清中に残留する）ポリペプチドを意味する。これらの条件は具体的には効果的な濃度での洗剤もしくは他の変性剤が非存在である場合に関連するものである。

以下に記載されるように本発明の内の一つの態様は、ＲＡＰ－結合性蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、その断片、および／またはそのような核酸の等価物に関する。用語「核酸」は本明細書で用いられる場合にはそのような断片および等価物を含むことが意図され、例えば用語「等価物」は、機能的に等価なＲＡＰ－結合性蛋白質をコードするヌクレオチド配列、もしくは例えばＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体に結合する能力を保持し、かつ追加的に本明細書に記載されるようなＲＡＰ－結合性蛋白質の他の活性を保持することがある機能的等価ペプチドを含むことが理解される。等価ヌクレオチド配列は、一つもしくは複数のヌクレオチド置換、添加、もしくは欠失により異なる配列（例えば、対立遺伝子変異体）を含むであろうし；かつ配列番号１もしくは配列番号１１に表される哺乳類ＲＡＰＴ１遺伝子のヌクレオチド配列か、あるいは配列番号１３に表される真菌類ＲＡＰＴ１蛋白質のヌクレオチド配列か、あるいは配列番号２３に表されるＵＢＣ酵素をコードするヌクレオチド配列とは、遺伝子コードの縮重により異なる配列をも含むであろう。等価核酸配列は更に、緊縮条件下（すなわち、約１Ｍの塩中で形成されるＤＮＡ二重らせんの溶解温度（T_m）以下の約２０～２７℃に等しい）で、配列番号２もしくは１２に表されるいずれかの配列を含むＲＡＰＴ１蛋白質のヌクレオチド配列か、あるいはｐＩＣ５２４（ＡＴＣＣ受託番号７５７８７）のＲＡＰＴ１遺伝子挿入断片のヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列をも含むであろう。同様に、表題ｒａｐ－ＵＢＣ酵素の相同物をコードする等価核酸は、緊縮条件下で、配列番号２３に表されるヌクレオチド配列か、あるいはＳＭＲ４－１５（ＡＴＣＣ受託番号７５７８６）のｒａｐ－ＵＢＣ遺伝子挿入断片のヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。ある態様では等価物は、配列番号１もしくは配列番号１１もしくは配列番号１３もしくは配列番号２３のいずれかに表される配列を含むヌクレオチド配列に由来し、かつその配列に進化的に関連する核酸配列を更に含むであろう。

配列番号２に示されるアミノ酸配列およびＡＴＣＣクローン７５７８７として表される断片は、哺乳類ＲＡＰＴ１蛋白質のより大きな全長形態の生物学的活性部分を表す。好ましい態様ではＲＡＰＴ１ポリペプチドはＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体への結合のための結合性ドメイン（例えば、配列番号２の残基２８～１６０もしくは配列番号１２の残基２０１２～２１４４により表されるｒａｐ－結合性ドメイン）を含む。好ましい態様では全長形態から単離されたＲＡＰＴ１蛋白質の複数部分が、ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体（例えば、ＦＫＢＰ１２／ラパマイシン複合体）についての特異的結合親和性（例えば、そのようなラパマイシン複合体についてのＲＡＰＴ１の天然に存在する形態の結合親和性のものの少なくとも５０％、より好ましくは少なくとも７５％、そして更に一層好ましくは少なくとも９０％の親和性）を保持するであろう。ポリペプチドは、そのポリペプチドが一つもしくは複数の以下の特徴を有する場合にはＲＡＰＴ１蛋白質の生物学的活性を保持するとして見なされ、それらの特徴とは：ＦＫＢＰ／薬剤複合体（例えば、ＦＫＢＰ／マクロライド複合体、例えばＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体）と結合する能力：ＦＫＢＰ１２

／ラパマイシン複合体に結合する能力：ＦＫＢＰ／ラパマイシン－複合体の構築を調節する能力：細胞増殖を調節する（例えば、細胞周期を調節する、例えば、G_1期を通過する細胞の進行を調節する）能力、である。その上、配列分析に基づくと、表題ＲＡＰＴ１蛋白質の生物学的機能はホスファチジルイノシトール－キナーゼ活性（例えばＰＩ－３－キナーゼ活性）を含むことができる。ある蛋白質は更に、その蛋白質が先に引用される特徴の内の一つの特異的アゴニスト（疑似物）もしくはアンタゴニストである場合には、ＲＡＰＴ１生物活性に関しては生物活性を示すものと見なされる。

ｒａｐ－ＵＢＣ酵素に関しては、表題蛋白質の好ましい態様は、ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体と結合する能力か細胞性蛋白質にユビキチンを複合体形成させる能力のいずれかか、あるいはその両方を保持する配列番号２４（もしくは実施例５に記載されるＳＭＲ４－１５のｒａｐ－ＵＢＣ遺伝子挿入断片）のアミノ酸配列の少なくとも一部分を含む。ラパマイシンがG_1期中に細胞周期の遮断を生じるとすると、表題ｒａｐ－ＵＢＣ酵素の生物学的活性スペクトラムが所定の細胞周期調節蛋白質、特に比較的寿命の短い蛋白質（例えば、３０分～２時間の単位での半減期を有する蛋白質）の制御を含むもことがありそうである。例えば表題ＵＢＣは、一例ではｐ５３、ｍｙｃ、および／またはサイクリンのユビキチン化を媒介する能力を有することがあり、そしてそのため増殖性細胞内での細胞周期調節性蛋白質の細胞性半減期に影響を及ぼす。ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体へのｒａｐ－ＵＢＣの結合は、その基質蛋白質からの酵素の解離をもたらすことがある。従ってラパマイシンは、細胞性ｐ５３レベルを上昇させ、そしてそのことにより次にはG_1期の進行を阻害するという様式でｐ５３のユビキチン－媒介化変性を妨害することがある。

それに加え、所定の条件下では、その蛋白質の天然に存在する形態の生物学的活性の内のたった一つのサブセットのみの促進もしくは阻害のいずれかを行わせる目的で、ＲＡＰ－ＢＰアゴニストもしくはＲＡＰ－ＢＰアンタゴニストのいずれかの内の一つとしての限定された能力内で機能するクローン化ＲＡＰ－結合性蛋白質の相同物を提供することが有利であるかもしれないことが一般的に認識されるであろう。従って、特異的生物学的効果を、限定された機能の相同物を用い、かつ全ＲＡＰ－ＢＰ関連性生物学的活性に対するアゴニストもしくはアンタゴニストでの処理と比較すると一層少ない副作用を示す処理により誘導することができる。例えば、ＦＫＢＰ－ラパマイシン複合体にはいずれかの実質的な様式では結合しないが、それでもその蛋白質の天然に存在する形態に起因する他の生物学的機能の大半を保持するＲＡＰＴ１アナログおよびｒａｐ－ＵＢＣアナログを作製することができる。例えば、ＲＡＰＴ１相同体は、例えばホスファチジルイノシトールキナーゼ活性（一例ではＰＩ－３－キナーゼ活性）のようなキナーゼ活性を保持することがあるかもしれない。それとは対照的に、ＲＡＰＴ１相同体は、キナーゼ活性を喪失させながらも、依然としてＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体と結合する能力を保持するように工学的に操作されることがあるかもしれない。例えば、ＲＡＰＴ１相同体のＦＫＢＰ／ラパマイシン結合性部分（例えば、配列番号２もしくは１２に表されるラパマイシン－結合性ドメイン）を、ＲＡＰＴ１の天然に存在する形態によるラパマイシン複合体への結合性の競合的阻害を行うように用いることができる。

表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の相同体を、突然変異誘発（例えば、不連続の点突然変異誘発（複数））もしくは切断化により作製することができる。例えば、突然変異は、取得されてくるＲＡＰ－ＢＰ形態の生物学的活性と実質的に同一な活性もしくは単にそのサブセットを保持する相同体をもたらすことができる。別法では、例えばＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体に競合的に結合することにより、その蛋白質の天然に存在する形態の機能を阻害することが可能なその蛋白質のアンタゴニスト形態を作製することができる。

配列番号１に示されるヌクレオチド配列はマウスＲＡＰＴ１蛋白質の生物学的活性部分をコードし、かつ具体的にはラパマイシン－結合性ドメインを含む。従って本発明のある態様は、配列番号２により表されるＲＡＰＴ１蛋白質のその部分に実質的に相同なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸を提供する。その核酸が配列番号１に示されるヌクレオチド配列の少なくとも一部分を含むｃＤＮＡ配列であることが好ましい。本発明の更に別の態様は、配列番号１２により表されるＲＡＰＴ１蛋白質の一部分（これはラパ

マイシン－結合性ドメインに相当する）（例えば、配列番号１２のＶａｌ２０１２～Ｔｙｒ２１４４）に実質的に相同なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸を提供する。類似様式で、本発明は配列番号１４のカンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）ＲＡＰＴ１ポリペプチドの少なくとも一部分（例えば、ラパマイシン－結合性部分）をコードする核酸を提供する。

好ましい核酸は、配列番号２、１２、もしくは１４の内の一つもしくは複数に示されるアミノ酸配列と、少なくとも６０％相同であり、より好ましくは７０％相同であり、そして最も好ましくは８０％相同であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードすることが好ましい。ペプチド、特にＲＡＰＴ１蛋白質の活性を有するペプチドをコードし、かつ配列番号２、１２、もしくは１４のいずれかに示される配列と少なくとも約９０％相同な、より好ましくは少なくとも約９５％、そして最も好ましくは少なくとも約９８～９９％相同なアミノ酸配列を含む核酸もやはり本発明の範囲内に含まれ、当然のことながら同様に既述の配列リストにおいて確認される蛋白質も本発明の範囲内に含まれる。ある態様では核酸は、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の少なくとも一つの活性を有するペプチドをコードするｃＤＮＡである。この核酸が、配列番号２、１２、もしくは１４の内の一つに表されるヌクレオチド配列の少なくとも一部分を含むｃＤＮＡ分子であることが好ましい。これらのｃＤＮＡ分子の好ましい部分には、その遺伝子のコーディング領域が含まれる。例えば組換えＲＡＰ－ＢＰ遺伝子は、ＡＴＣＣ受託番号７５７８７のＲＡＰ－ＢＰクローンの内の一つのためのコーディング配列を増幅させることにより作製されるＰＣＲ断片のヌクレオチド配列を含むことができる。

配列番号２３に示されるヌクレオチド配列は生物学的に活性なヒトユビキチン複合体形成性酵素をコードする。従って、本発明のある態様では、核酸は配列番号２４により表されるｒａｐ－ＵＢＣ蛋白質のラパマイシン－結合性ドメインを含むポリペプチドをコードする。その核酸が配列番号２３に示されるヌクレオチド配列の少なくとも一部分を含むｃＤＮＡ分子であることが好ましい。好ましい核酸は、配列番号２４に示されるアミノ酸配列と、少なくとも６０％相同である、より好ましくは７０％相同である、そして最も好ましくは８０％相同であるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする。ポリペプチド、特にユビキチン複合体形成性活性を有し、かつ配列番号２４に示される配列と少なくとも約９０％、より好ましくは少なくとも約９５％、そして最も好ましくは少なくとも約９８～９９％相同なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸もやはり本発明の範囲内に含まれる。

本発明の更に別の態様では、組換えＲＡＰ－ＢＰ遺伝子は更に、添付される配列表に示されるアミノ酸配列に加え、それらの配列表には示されてはいないものの、その蛋白質のＣ－末端およびＮ－末端のアミノ酸をコードする追加的ヌクレオチド配列を含むことができる。例えば、組換えＲＡＰＴ１遺伝子は、実施例４に記載されるプライマーセットを用いてｐＩＣ５２４のＲＡＰＴ１コーディング配列を増幅することにより作製されるＰＣＲ断片のヌクレオチド配列を含むことができる。それに加え、本開示を考慮すると、日常的な実験方法程度の技術を用いることで、例えばｃＤＮＡライブラリーからＲＡＰＴ１の残存性５’配列を、例えばｐＩＣ５２４クローンの配列から設計されたプライマー（複数）を用いるＲＡＣＥ　ＰＣＲにより単離すること（一例では、配列番号１２の全長配列を作製すること）が可能であるだろう。具体的には本発明は、全長ＲＡＰＴ１蛋白質をコードする組換えＲＡＰＴ１遺伝子を企画している。本発明の更に他の態様は、マウスもしくはヒトのＲＡＰＴ１のイソ型、特にＦＫＢＰ１２／ラパマイシン複合体に結合することが可能なイソ型（例えば、スプライシング変異体、対立遺伝子変異体など）をコードする核酸を含む。このようなイソ型はＲＡＰ－結合性蛋白質の巨大ファミリーの他のメンバーと同様に、これ以降に更に詳細が記載される薬剤依存性相互作用捕獲アッセイを用いて単離することができる。

本発明の他の態様は、高緊縮性もしくは低緊縮性条件下で、配列番号２、１２、もしくは１４の内の一つにより表されるアミノ酸配列の内の少なくとも一部分を有するペプチドをコードする核酸にハイブリダイズする核酸を提供する。ＤＮＡハイブリダイゼーションを

促進させる適切な緊縮条件（例えば、約４５℃下での６．０×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）、およびその後の５０℃下での２．０×ＳＳＣの洗浄）は当業者に知られているか、もしくはＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｅｌｙ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｎ．Ｙ．（１９８９）、６．３．１－６．３．６、において見いだすことができる。例えば洗浄段階の塩濃度は、５０℃下での約２．０×ＳＳＣの低緊縮性から５０℃下での約０．２×ＳＳＣの高緊縮性までから選択することができる。それに加え、洗浄段階の温度を室温（約２２℃）での低緊縮性条件から約６５℃での高緊縮条件にまで上昇させることができる。

遺伝子コードの縮重により、配列番号１、１１、もしくは１３の内のいずれかに示されるヌクレオチド配列とは異なる配列を有する核酸もやはり本発明の範囲内に含まれる。このような核酸は、機能的には等価であるペプチド（すなわち、ＲＡＰ－結合性蛋白質の生物学的活性を有するペプチド）であるが、遺伝子コードの縮重により添付される配列表からものとは配列が異なるペプチドをコードする。例えば、多数のアミノ酸が一つを上回るトリプレットにより表示される。同一アミノ酸を特定するコドンすなわち同義コドン（例えば、ＣＡＵおよびＣＡＣは各々ヒスチジンをコードする）は、ＲＡＰ－結合性蛋白質のアミノ酸配列には影響を及ぼさない「サイレント」突然変異をもたらすことがある。しかしながら、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質のアミノ酸配列の変化をもたらすことのないＤＮＡ配列多形性が脊椎動物内に存在するであろうことが予期される。当業者は、ＲＡＰ－結合性蛋白質の活性を有するポリペプチドをコードする核酸の一つもしくは複数のヌクレオチドのこれらの変異体（そのヌクレオチドの内の最高約３～５％）が、天然の対立遺伝子変異により所定の種の個体中に存在するかもしれないことを認識するであろう。いずれかもしくは全てのこのようなヌクレオチド変異体および得られるアミノ酸多形性は本発明の範囲内に含まれる。

本発明は更に、ＲＡＰＴ１蛋白質の一部分（例えば、ラパマイシン－結合性ドメイン）のみをコードする核酸を提供する。本明細書で用いられる際には、ＲＡＰ－結合性蛋白質のそのような一部分をコードする核酸の断片は、全長ＲＡＰ－結合性蛋白質の全アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列よりも少なめのヌクレオチドを有しながらも、ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体に結合することが可能なポリペプチドをコードするのに十分なコーディング配列を依然として含むヌクレオチド配列を意味する。それに加え、本発明の範囲内に含まれる核酸断片は他の脊椎動物種、特に他の哺乳類からの核酸と、高緊縮性もしくは低緊縮性条件下でハイブリダイズすることが可能な断片を含み、かつこれを、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の相同体を検出するためのスクリーニングプロトコールに使用することができる。本発明の範囲内に含まれる核酸は更に、リンカー配列、改変化制限エンドヌクレアーゼ部位、ならびにＲＡＰ－結合性蛋白質に由来する組換えペプチドの分子クローニング、発現、もしくは精製に役立つ他の配列をも含むことがある。

以下に記載される実施例により示されるように、ＲＡＰ－結合性蛋白質をコードする核酸は脊椎動物生物体、特に哺乳類（例えば、マウスもしくはヒト）からの多数の細胞の内のいずれかの中に存在するｍＲＮＡから取得されることがある。ＲＡＰ－結合性蛋白質をコードする核酸を、成体および胎仔の両方から取得されるゲノムＤＮＡから取得することも可能であるはずである。例えば、ＲＡＰ－結合性蛋白質をコードする遺伝子を、本明細書内に記載されるプロトコール、ならびに当該技術分野において一般的に知られるプロトコールに従ってｃＤＮＡもしくはゲノムライブラリーのいずれかからクローン化することができる。例えば、ＲＡＰＴ１蛋白質、特に配列番号２もしくは１２により表されるＲＡＰＴ１蛋白質の他のイソ型（例えば、パラログもしくはオートログ）をコードするｃＤＮＡを、哺乳類細胞（例えばヒト細胞）から総ｍＲＮＡを単離し、その総ｍＲＮＡから二本鎖ｃＤＮＡを作製し、そのｃＤＮＡを適切なプラスミドもしくはバクテリオファージ内にクローン化し、そして多数の既知の技術（例えば、オリゴヌクレオチドプローブもしくはウエスタンブロット分析）の内のいずれか一つを用いてＲＡＰＴ１クローンを単離することにより取得することができる。表題ＲＡＰ－結合性蛋白質に関連する蛋白質をコードする遺伝子は、本発明により提供されるヌクレオチド配列情報に従って、既に確立されている

ポリメラーゼ連鎖反応技術を用いてクローン化することもできる。本発明の核酸はＤＮＡもしくはＲＮＡであることができる。

本発明の他の態様は、「アンチセンス」療法における単離化核酸の使用に関する。本明細書で用いられる際には「アンチセンス」療法は、細胞性条件下で、ＲＡＰ－結合性蛋白質をコードする細胞性ｍＲＮＡおよび／またはゲノムＤＮＡと特異的にハイブリダイズし（例えば、結合し）、その結果その蛋白質の発現を阻害する（例えば、転写および／または翻訳を阻害することにより）オリゴヌクレオチドもしくはそれらの誘導体の投与もしくはインサイチュー作製を意味する。結合は、通常の塩基対相補性によるか、例えばＤＮＡ二重らせんへの結合の場合にはその二重らせんの主溝内での特異的相互作用を介するものであることがある。一般的には「アンチセンス」療法は当該技術分野において一般的に利用される技術の範囲を意味し、かつオリゴヌクレオチド配列への特異的結合を頼みとするいずれかの療法を含む。

本発明のアンチセンス構築物を例えば、細胞内で転写される際には、ＲＡＰ－結合性蛋白質をコードする細胞性ｍＲＮＡの内の少なくとも独特な部分に相補的なＲＮＡを産生する発現プラスミドとして輸送することができる。別法ではアンチセンス構築物は、エックスビボで作製され、かつ細胞内に組み込まれた際には、ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子のｍＲＮＡおよび／またはゲノム配列とハイブリダイズすることにより発現の阻害を引き起こすオリゴヌクレオチドプローブであることができる。このようなオリゴヌクレオチドプローブは内因性ヌクレアーゼ（例えば、エキソヌクレアーゼおよび／またはエンドヌクレアーゼ）に対して耐性を示し、かつそのためインビボで安定である改変化オリゴヌクレオチドであることが好ましい。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしての使用のための例示的核酸分子は、ＤＮＡのホスホルアミダイト、ホスホチオエート、およびメチルホスホネートアナログである（米国特許第５，１７６，９９６号；第５，２６４，５６４号；および第５，２５６，７７５号も参照されたい）。それに加え、アンチセンス療法に有用なオリゴマーの構築のための一般的研究方法が、例えばｖａｎ　ｄｅｒ　Ｋｒｏｌら（１９８８）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　６：９５８－９７６；およびＳｔｅｉｎら（１９８８）　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．　４８：２６５９－２６６８、により既に総説としてまとめられている。従って、本発明のオリゴマーは、治療的、診断的、および研究用の状況において有用である。治療的適用法ではオリゴマーは一般的にアンチセンス療法に適切な様式で利用される。そのような療法のためには本発明のオリゴマーを多様な投与経路（これには、全身投与および局所もしくは局在化投与が含まれる）のために製剤することができる。技術および製剤法は一般的にはＲｅｍｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｍｅａｄ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．、Ｅａｓｔｏｎ、ＰＡ、において見いだすことができる。全身投与のためには注入が好ましく、それには注入用の筋肉内、静脈内、腹膜内、および皮下経路が含まれ、本発明のオリゴマーを液体溶液、好ましくは例えばハンクス（Ｈａｎｋ’ｓ）溶液もしくはリンゲル（Ｒｉｎｇｅｒ’ｓ）溶液のような生理学的適合性緩衝液中で製剤することができる。それに加え、これらのオリゴマーは固形形態として製剤され、そして使用直前に再溶解もしくは懸濁されることがある。凍結乾燥化形態もそれに含まれる。

全身投与は経粘膜的もしくは経皮的手法によるものであることもあり得るか、あるいはその化合物を経口的に投与することができる。経粘膜的もしくは経皮的投与のためには浸透予定の関門に適切な浸透剤がその製剤内に用いられる。このような浸透剤は当該技術分野において一般的に知られており、そして例えば経粘膜投与のためには胆汁塩およびフシジン酸誘導体がこれに含まれる。それに加え、洗剤が浸透を促進させるために用いられることがあるかもしれない。経粘膜投与は鼻内噴霧を通してか、もしくは座薬を用いてものであることがある。経口投与のためには、オリゴマーは通常の経口投与剤形態（例えば、カプセル剤、錠剤、および強壮剤）に製剤される。局所投与のためには本発明のオリゴマーは、当該技術分野において一般的に知られるように、軟膏（ｏｉｎｔｍｅｎｔ）、軟膏（ｓａｌｖｅｓ）、ゲル、もしくはクリームに製剤される。

療法における使用に加え、本発明のオリゴマーを、特異的に結合する標的ＤＮＡもしくは

ＲＮＡ配列の存在もしくは非存在を検出するための診断用試薬として用いることがある。このような診断用検査は以下に更に詳細に記載される。
同様に本発明のアンチセン構築物は、ＲＡＰ－結合性蛋白質の正常な生物学的活性を拮抗することにより、インビボおよびエックスビボでの両方における組織培養系のための組織の操作（例えば、組織増殖および／または分化）に用いることができる。
本発明は更に、少なくとも一つの転写調節配列に操作的に連結される、本発明のＲＡＰ－結合性蛋白質をコードする核酸を含む発現ベクターをも提供する。「操作的に連結される」は、そのヌクレオチド配列が、そのヌクレオチド配列の発現を可能にさせる様式で調節配列に連結されることを意味することが意図される。調節配列は当業者には熟知されており、そして組換えＲＡＰ－結合性蛋白質の発現を指令するように選択される。従って、用語「転写調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御因子を含む。このような調節配列は、Ｇｏｅｄｄｅｌ：Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　１８５、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ（１９９０）、に記載されている。例えば、操作的に連結された際にＤＮＡ配列の発現を制御する多種多様の発現制御配列－配列の内のいずれかをこれらのベクターに用いて本発明のＲＡＰ－結合性蛋白質をコードするＤＮＡ配列を発現させることがあるかもしれない。このような有用な発現制御配列には例えば、ＳＶ４０の初期および後期プロモーター、アデノウイルスもしくはサイトメガロウイルスの前初期プロモーター、ｌａｃ系、ｔｒｐ系、ＴＡＣもしくはＴＣＲ系、それ自体の発現がＴ７　ＲＮＡポリメラーゼにより指令されるＴ７プロモーター、ファージラムダーの主要オペレーターおよびプロモーター領域、ｆｄコート蛋白質のための制御領域、３－ホスホグリセレートキナーゼもしくは他の糖分解酵素のためのプロモーター、酸性ホスファターゼのためのプロモーター（例えば、Ｐｈｏ５）、イーストのα－交配因子のプロモーター、バキュロウイルス系のポリヘドロンプロモーター、および原核生物もしくは真核生物細胞、またはそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られている他の配列、あるいはそれらの組み合わせ物が含まれる。発現ベクターの設計は形質転換予定の宿主細胞の選択および／または発現されることが所望される蛋白質の種類のような因子に依存することがあることが理解されるはずである。それに加え、ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、およびそのベクターによりコードされる他のいずれかの蛋白質（例えば、抗生物質マーカー）の発現も考慮されるはずである。ある態様では発現ベクターは、ＲＡＰ－結合性蛋白質の作用を模倣するもしくはそうでなければその作用の作動活性を行うポリペプチドをコードする組換え遺伝子を含むか、あるいは別法ではその組換え遺伝子は真のＲＡＰ－結合性蛋白質の作用の拮抗作用を行うポリペプチドをコードする。そのような発現ベクターを用いて細胞をトランスフェクトさせ、そしてそのことにより、本明細書に記載される核酸によりコードされるポリペプチド（これには融合蛋白質が含まれる）を産生することができる。
それに加え、本発明の遺伝子構築物は更に、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の内の一つもしくは複数のアゴニストもしくはアンタゴニストのいずれかの形態をコードする核酸を輸送するための遺伝子療法プロトコールの一部分として用いることもできる。従って、本発明の他の態様は、ある細胞（その細胞内ではその蛋白質もしくはそれに結合する他の転写調節蛋白質が過誤発現される）内での表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の内の一つもしくは複数の機能を再構築させるかもしくは別法では排除するような、特別な細胞タイプ内でのＲＡＰ－結合性蛋白質のインビボトランスフェクションおよび発現のための発現ベクターを特徴とする。例えば、遺伝子療法を使用して、特別な組織もしくは細胞タイプにラパマイシン誘導化細胞周期拘束に対する耐性を付与する目的で、ラパマイシン－非感受性ＲＡＰ－結合性蛋白質をコードする遺伝子を輸送することができる。
表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の発現構築物およびその突然変異体をいずれかの生物学的に有効な担体（例えば、ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子をインビボで細胞に効率よく輸送することが可能ないずれかの製剤もしくは組成物）として投与することがある。そのような研究方法には、組換えレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ－関連性ウイルス、および単純疱疹ウ

イルス－１、あるいは細菌性もしくは真核生物性の組換えプラスミドを初めとするウイルスベクター内への表題遺伝子の挿入が含まれる。ウイルス性ベクターは細胞を直接トランスフェクトし；プラスミドＤＮＡは例えばカチオン性ポリソーム（リポフェクション）もしくは誘導化させた（例えば、抗体複合体形成させた）ポリリシン複合体、グラミシジンＳ、人工ウイルス包膜、もしくは他のそのような細胞内担体、ならびにインビボで実施される遺伝子構築物もしくは$CaPO_4$沈殿物の直接注入の助けを借りて輸送され得る。適切な標的細胞の形質導入は遺伝子療法の重要な第一段階であるがために、特別な遺伝子輸送系の選択は、意図される標的の表現型および投与経路（例えば、局所投与もしくは全身投与）のような因子に依存するであろうことが理解されるであろう。それに加え、ＲＡＰ－ＢＰ発現のインビボ形質導入のために提供される特別な遺伝子構築物も細胞のインビトロ形質導入（例えば診断用アッセイとしてのもの）にとって有用である。

細胞内への核酸のインビボ導入のための好ましい研究方法は、所望されるＲＡＰ－結合性蛋白質の特別な形態をコードする核酸（例えば、ｃＤＮＡ）を含むウイルス性ベクターの使用による。ウイルス性ベクターでの細胞の感染は、大多数の割合の標的細胞がその核酸を受け取ることができるという利点を有する。それに加え、そのウイルス性ベクター内にコードされる分子（例えば、ウイルス性ベクター内に含まれるｃＤＮＡにより）は、ウイルス性ベクターの核酸を既に取り込んでいる細胞内では効率よく発現される。

レトロウイルスベクターおよびアデノ－関連性ウイルスベクターは一般的には、インビボでの外因性遺伝子の、特にヒトへの移送のためのよりすぐりの組換え遺伝子輸送系であるとして理解されている。これらのベクターは遺伝子の細胞内への効率的輸送を提供し、そして移送された核酸は宿主の染色体ＤＮＡ内に安定に取込まれる。レトロウイルスの使用のための主要な必須事項はそれらの使用、特に細胞集団内での野生型ウイルスの拡散の可能性に関する安全性を確認することである。複製欠陥性レトロウイルスのみを産生する特殊化細胞株（「パッケージング細胞」と称される）の開発により、遺伝子療法のためのレトロウイルスの利用性が増大し、かつ欠陥性レトロウイルスは遺伝子療法の目的のための遺伝子移送における使用についての特徴決定が詳細に行われている（総説に関してはＭｉｌｌｅｒ，Ａ．Ｄ．（１９９０）Ｂｌｏｏｄ　７６：２７１、を参照されたい）。従って、レトロウイルスのコーディング配列の部分（ｇａｇ、ｐｏｌ、ｅｎｖ）がレトロウイルスに複製欠陥性を付与する表題レセプターの内の一つをコードする核酸で予め置換してある組換えレトロウイルスを構築することができる。

その後にこの複製欠陥レトロウイルスをビリオン内にパッケージングし、そしてそれを用いて標準的技術によるヘルパーウイルスの使用を通して標的細胞を感染することができる。組換えレトロウイルスを産生するため、およびそのようなウイルスを用いて細胞をインビトロもしくはインビボで感染するためのプロトコールは、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ｅｔ　ａｌ．（ｅｄｓ．）Ｇｒｅｅｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ、（１９８９）、Ｓｅｃｔｉｏｎｓ９．１０－９．１４、および他の標準的研究室用手引書に見いだすことができる。適切なレトロウイルスの例にはｐＬＪ、ｐＺＩＰ、ｐＷＥ、およびｐＥＭが含まれ、これらは当業者には熟知されている。環境栄養性および両栄養性の両方のレトロウイルス系を調製するための適切なパッケージング用ウイルス株の例には、ΨＣｒｉｐ、ΨＣｒｅ、Ψ２、およびΨＡｍが含まれる。レトロウイルスは多くの異なる細胞タイプ（これにはリンパ球が含まれる）内にインビトロおよび／またはインビボで、様々な遺伝子を組み込ませるのに用いられている（例えば、Ｅｇｌｉｔｉｓ，ｅｔ　ａｌ．（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３０：１３９５－１３９８；Ｄａｎｏｓ　ａｎｄ　Ｍｕｌｌｉｇａｎ（１９８８）　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　８５：６４６０－６４６４；Ｗｉｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　８５：３０１４－３０１８；Ａｒｍｅｎｔａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　８７：６１４１－６１４５；Ｈｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　８８：８０３９－８０４３；Ｆｅｒｒｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９

1）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８８：８３７７－８３８１；Ｃｈｏｗｄｈｕｒｙ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５４：１８０２－１８０５；ｖａｎ Ｂｅｕｓｅｃｈｅｍ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：７６４０－７６４４；Ｋａｙ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ３：６４１－６４７；Ｄａｉ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：１０８９２－１０８９５；Ｈｗｕ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：４１０４－４１１５；米国特許第４，８６８，１１６号；米国特許第４，９８０，２８６号；国際公開第８９／０７１３６号；国際公開第８９／０２４６８号；国際公開第８９／０５３４５号；および国際公開第９２／０７５７３号、を参照されたい）。

それに加え、レトロウイルスおよびその結果レトロウイルスを基にするベクターの感染スペクトラムを、そのウイルス粒子表面上のウイルス性パッケージング用蛋白質を改変化することにより制限することが可能であることが既に示されている（例えば、国際公開第９３／２５２３４号および国際公開第９４／０６９２０号を参照されたい）。例えば、レトロウイルスベクターの感染スペクトラムの改変化のための手法には：ウイルスのｅｎｖ蛋白質に、細胞表面抗原に特異的な抗体を結合させることか（Ｒｏｕｘ ｅｔ ａｌ．（１９８９）ＰＮＡＳ ８６：９０７９－９０８３；Ｊｕｌａｎ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ ７３：３２５１－３２５５；およびＧｏｕｄ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １６３：２５１－２５４）；もしくはウイルスのｅｎｖ蛋白質に、細胞表面レセプターリガンドを結合させること（Ｎｅｄａ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２６６：１４１４３－１４１４６）が含まれる。結合は、蛋白質もしくは他の多様なもの（例えば、ｅｎｖ蛋白質をアシアロ糖蛋白質に転化させるためのラクトース）との化学的架橋結合形成の形態をとることも、そして融合蛋白質（例えば、一本鎖抗体／ｅｎｖ融合蛋白質）を作製することによることもあり得る。この技術は所定のタイプの組織への感染を制限するか、もしくはそうでなければ指令するのに有用であると同時に、この技術を用いて環境栄養性ベクターを両栄養性ベクターへと転化させることもできる。

それに加え、レトロウイルス遺伝子輸送の使用は更に、そのレトロウイルスベクターのＲＡＰ－ＢＰ遺伝子の発現を制御する組織もしくは細胞特異的転写調節配列により亢進され得る。

本発明に役立つ他のウイルス遺伝子輸送系はアデノウイルス由来のベクターを利用する。アデノウイルスのゲノムを、そのゲノムが目的の遺伝子産物をコードおよび発現するが、ただし正常な溶菌性ウイルス生命環中で複製する能力に関しては不活化されるように操作することができる。例えば、Ｂｅｒｋｎｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８８）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ６：６１６；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５２：４３１－４３４；およびＲｏｓｅｎｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｃｅｌｌ ６８：１４３－１５５、を参照されたい。アデノウイルス株Ａｄタイプ５ ｄ１３２４、もしくはアデノウイルスの他の株（例えば、Ａｄ２、Ａｄ４、Ａｄ７など）に由来する適切なアデノウイルスベクターが当業者には熟知されている。組換えアデノウイルスは、それらが非分裂性細胞を感染することが不可能であり、かつ多種多様タイプの細胞を感染するのに用いることができるという点で有利であり得る。それに加え、このウイルス粒子は比較的安定であり、かつ精製および濃縮が容易であり、そして先に記載するように感染のスペクトラムに影響を及ぼすように改変することができる。その上、導入されたアデノウイルスＤＮＡ（およびそこに含まれる外来性ＤＮＡ）は、宿主のゲノム内には組込まれはしないがしかしエピソームに留まり、そのことにより導入されたＤＮＡが宿主ゲノム（例えばレトロウイルスＤＮＡ）内に組み込まれるようになるインサイチューでの挿入性突然変異誘発という結果をもたらし得るという潜在的問題が回避される。それに加え、外来性ＤＮＡについてのアデノウイルスゲノムの保持能力（最高８キロベースまで）は他の遺伝子輸送ベクターと比較すると大きい（Ｂｅｒｋｎｅｒ ｅｔ ａｌ、先に引用；Ｈａｊ－Ａｈｍａｎｄ ａｎｄ Ｇｒａｈａｍ（１９８６）Ｊ．Ｖｉｏｌ．

５７：２６７）。現在用いられており、そしてそのため本発明にも好ましい大半の複製欠陥性アデノウイルスベクターは、ウイルス性Ｅ１およびＥ３遺伝子の全部もしくは複数部分について欠損を生じているが、８０％ものアデノウイルス性遺伝子物質を保持している（例えば、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．（１９７９） Ｃｅｌｌ １６：６８３；Ｂｅｒｋｎｅｒ ｅｔ ａｌ、上述；およびＧｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｅ．Ｊ．Ｍｕｒｒｙ、Ｅｄ（Ｈｕｍａｎａ、Ｃｌｉｆｔｏｎ、ＮＪ、１９９１） ｖｏｌ．７、ｐｐ１０９－１２７、を参照されたい）。挿入されたＲＡＰ－ＢＰ遺伝子の発現は、例えばＥ１Ａプロモーター、主要後期プロモーター（ＭＬＰ）、および連結されるリーダー配列、Ｅ３プロモーター、もしくは外から添加されたプロモーター配列の制御下に置くことができる。

表題ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子の輸送に有用な更に他のウイルス性ベクター系はアデノ関連性ウイルス（ＡＡＶ）である。アデノ関連性ウイルスは、効率的な複製および産生的生命環のためのヘルパーウイルスとして他のウイルス（例えば、アデノウイルスもしくはヘルペスウイルス）を必要とする天然に存在する欠陥ウイルスである（総説に関しては、Ｍｕｚｙｃｚｋａ ｅｔ ａｌ．Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏ．ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌ．（１９９２） １５８：９７－１２９、を参照されたい）。このウイルスは、それ自体のＤＮＡを非分裂性細胞内に組込ませることがあり、かつ高頻度での安定な組込みを示す数少ないウイルスの内の一つでもある（例えば、Ｆｌｏｔｔｅ ｅｔ ａｌ．（１９９２） Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ． ７：３４９－３５６：Ｓａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ． ６３：３８２２－３８２８；およびＭｃＬａｕｇｈｌｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９８９） Ｊ．Ｖｉｒｏｌ． ６２：１９６３－１９７３、を参照されたい）。ＡＡＶの内の３００程の少数の塩基対を含むベクターをパッケージングすることができ、かつ組込みを行うことができる。外因性ＤＮＡのための余地は約４．５ｋｂに限定されている。例えばＴｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９８５） Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ． ５：３２５１－３２６０に記載されるようなＡＡＶベクターを用いてＤＮＡを細胞内に導入することができる。様々な核酸が、ＡＡＶベクターを用いることで様々なタイプの細胞内に既に導入されている（例えば、Ｈｅｒｍｏｎａｔ ｅｔ ａｌ．（１９８４） Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ． ＵＳＡ ８１：６４６６－６４７０：Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９８５） Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ． ４：２０２７－２０８１；Ｗｏｎｄｉｓｆｏｒｄ ｅｔ ａｌ．（１９８８） Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ． ２：３２－３９；Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９８４） Ｊ．Ｖｉｒｏｌ． ５１：６１１－６１９；およびＦｌｏｔｔｅ ｅｔ ａｌ．（１９９３） Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ． ２６８：３７８１－３７９０、を参照されたい）。

例えば先に説明されるようなウイルス移送方法に加え、非ウイルス的方法を利用しても、動物の組織内へのＲＡＰ－結合性蛋白質の発現を生じることができる。遺伝子移送の大半の非ウイルス的方法は、巨大分子の取り込みおよび細胞内輸送のために哺乳類細胞により用いられる正常なメカニズムを頼みとしている。好ましい態様では本発明の非ウイルス性遺伝子輸送系は、標的化細胞による表題ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子の取り込みのためのエンドサイトーシス経路を頼みとしている。このタイプの例示的遺伝子輸送系には、リポソームに由来する系、ポリ－リシン複合体、および人工ウイルス包膜が含まれる。

代表的態様では、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の内の一つをコードする遺伝子をその表面に陽性電荷を保持するリポソーム内に捕獲し（例えば、リポフェクション）、そして（場合によっては）それを、その標的組織の細胞表面抗原に対する抗体で標識化することができる（Ｍｉｚｕｎｏ ｅｔ ａｌ．（１９９２） Ｎｏ Ｓｈｉｎｋｅｉ Ｇｅｋａ ２０：５４７－５５１；国際公開第９１／０６３０９号；日本特許出願第１０４７３８１号；および欧州特許出願公開第４３０７５号）。例えば、細胞のリポフェクションを、例えばＴ細胞上に存在するいずれかの細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体で標識化させたリポソームを用いて実施することができる。

臨床的状況下では治療用ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子のための遺伝子輸送系を多数の方法（これら

各々は当該技術分野においてはよく知られている）の内のいずれかにより患者内に導入することができる。例えば遺伝子輸送系の薬剤学的調製物を例えば静脈内注入により全身的に導入することができ、そして標的細胞内での蛋白質の特異的形質導入が、遺伝子輸送用担体により提供されるトランスフェクションの特異性、レセプター遺伝子の発現を制御する転写調節配列に起因する細胞タイプもしくは組織タイプ発現、あるいはそれらの組み合わせ物から広範囲にわたりに生じる。他の態様では組換え遺伝子の初期輸送は動物内への導入に関しては一層限定されており、非常に局在化される。例えば、遺伝子輸送用担体をカテーテルによるか（米国特許第５，３２８，４７０号を参照されたい）、あるいは定位的注入（例えば、Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９４）　ＰＮＡＳ　９１：３０５４－３０５７）により導入することができる。

遺伝子療法用構築物の薬剤学的調製物は本質的には許容される賦形剤中の遺伝子輸送系でできていることがあるか、あるいは遺伝子輸送用担体が包埋されている徐放性マトリックスを含むことができる。別法では完全な遺伝子輸送系を組換え細胞（例えばレトロウイルス性ベクター）から完全な形のままで産生させることができる場合には、その薬剤学的調製物はその遺伝子輸送系を産生する一つもしくは複数の細胞を含むことができる。

本発明の他の態様は、真核生物細胞、例えば哺乳類細胞、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、もしくはブタからの細胞に由来する遺伝子によりコードされる組換えＲＡＰ－結合性蛋白質に関する。用語「組換え蛋白質」は、一般的には例えばＲＡＰＴ１蛋白質をコードするＤＮＡが適切な発現ベクター内に挿入され、そして次にはそれを用いて宿主細胞を形質転換させて異種蛋白質を産生させる組換えＤＮＡ技術により産生される本発明の蛋白質を意味する。それに加え、成句「～に由来する」は組換えＲＡＰ－結合性蛋白質をコードする組換え遺伝子に関しては、「組換え蛋白質」の意味の範囲内に、天然のＲＡＰ－結合性蛋白質のアミノ酸配列もしくはそれに類似するアミノ酸配列を有する蛋白質であって、ある生物体のＲＡＰ－結合性蛋白質の天然に存在する形態と比較すると置換および／または欠失を含むような突然変異により作製される蛋白質を含むことを意味する。本発明により好ましいとされる組換えＲＡＰＴ１蛋白質は、天然のＲＡＰＴ１蛋白質のアミノ酸配列を有するものに加え、配列番号２、１２、もしくは１４の内の一つに示されるアミノ酸配列と少なくとも７０％相同であり、より好ましくは８０％相同であり、そして最も好ましくは９０％相同であるアミノ酸配列を含む。ＲＡＰＴ１蛋白質の生物学的活性を有し、そして配列番号２、１２、もしくは１４の内の一つに表される配列に少なくとも約９５％、より好ましくは少なくとも約９８％、そして最も好ましくはそれと同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドも本発明の範囲内に含まれる。

同様に、組換えｒａｐ－ＵＢＣ蛋白質の好ましい態様は、配列番号２４により表されるアミノ酸配列と少なくとも７０％相同、より好ましくは８０％相同、そして最も好ましくは９０％相同であるアミノ酸配列を含む。配列番号２４のアミノ酸配列と同一であるかもしくは実質的に同一である（例えば、９５～９８％相同である）組換えｒａｐ－ＵＢＣ蛋白質も本発明により具体的に企画されている。

それに加え、本発明は実施例４に記載されるＡＴＣＣに寄託してあるクローンから（例えばＡＴＣＣ受託番号７５７８７から）産生される組換えＲＡＰＴ１蛋白質、ならびに実施例５に記載されるＡＴＣＣ受託番号７５７８６から産生される組換えユビキチン－複合体形成性酵素を特に含む。

本発明は更に、配列番号２もしくは１２の内の一つに表されるＲＡＰ－結合性蛋白質に進化的に関連するが、その配列とは同一ではなく、それでも依然としてＲＡＰ－結合性蛋白質の生物学的活性の内の少なくとも一つのアゴニストもしくはアンタゴニストとして機能することが可能な表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の組換え形態に関する。用語「進化的に関連する」は組換えＲＡＰ－結合性蛋白質のアミノ酸配列に関しては、天然に生じるアミノ酸配列を有する蛋白質、ならびに例えば組換え突然変異誘発により取得される突然変異性変異体を意味する。

本発明の他の態様は、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質を産生する方法に関する。例えば、表題ＲＡＰＴ１蛋白質もしくはｒａｐ－ＵＢＣをコードするヌクレオチド配列の発現を指令す

る核酸ベクターでトランスフェクトさせた宿主細胞を、そのペプチドの発現を生じさせるための適切な条件下で培養することができる。そのペプチドは、その細胞から分泌され、そしてその細胞および組換え蛋白質を含む培地の混合物から単離されることがある。別法ではそのペプチドは、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の天然に存在する形態がそうであると考えられているのと同様に細胞質に滞留することがあり、このような場合にはその細胞を回収、溶解し、そして蛋白質を単離する。細胞培培養物は宿主細胞、培地、および他の副産物を含む。細胞培養に適する培地は当該技術分野において熟知されている。組換えＲＡＰ－結合性蛋白質を、細胞培養培地、宿主細胞、もしくはその両者から、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動法、およびＲＡＰ－結合性蛋白質に特異的な抗体での免疫親和性精製を初めとする蛋白質精製のために当該技術分野において知られる技術を用いて単離することができる。ある態様ではＲＡＰ－結合性蛋白質は、精製を容易にさせるドメインを含む融合蛋白質（例えば、ＲＡＰＴ１－ＧＳＴ融合蛋白質もしくはｒａｐＵＢＣ－ＧＳＴ融合蛋白質）である。

本発明は更に、ＲＡＰ－結合性蛋白質の組換え形態を発現するためのＲＡＰ－ＢＰ遺伝子でトランスフェクトさせた宿主細胞をも提供する。この宿主細胞はいずれかの原核生物もしくは真核生物細胞であるかもしれない。従って、本発明のＲＡＰ－結合性蛋白質のクローニングにより取得され、ある蛋白質の全部もしくは選択された部分をコードするヌクレオチド配列を用いて、微生物学的もしくは真核生物細胞的過程を介してＲＡＰ－ＢＰの組換え形態を産生することができる。遺伝子構築物（例えば、発現ベクター）内へのポリヌクレオチド配列の連結、およびそのベクターでの宿主細胞の形質転換もしくはトランスフェクションは、他の熟知される蛋白質（例えば、インシュリン、インターフェロン、ｐ５３、ｍｙｃ、およびサイクリンなど）を産生させる際に用いられる標準的方法である。類似の方法もしくはその変法を利用して組換えＲＡＰ－結合性蛋白質もしくはその複数部分を、本発明に従う微生物学的手法もしくは組織培養技術により調製することができる。組換えＲＡＰ－結合性蛋白質の発現に適する宿主細胞を例えば、真核生物（イースト、鳥類、昆虫、もしくは哺乳類）細胞あるいは原核生物（細菌）細胞から選択することができる。

組換えＲＡＰ－ＢＰ遺伝子は、ＲＡＰ－結合性蛋白質をコードする核酸もしくはその一部分を、原核生物細胞、真核生物細胞、もしくはその両者のいずれかにおける発現に適するベクター内に連結させることにより産生することができる。ＲＡＰ－結合性蛋白質の組換え形態の産生のための発現ベクターにはプラスミドおよび他のベクターが含まれる。例えば、ＲＡＰ－ＢＰの発現に適するベクターには以下のタイプのプラスミドが含まれ、それらは：原核生物細胞（例えば大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ））内での発現のためのｐＢＲ３２２－由来のプラスミド、ｐＥＭＢＬ－由来のプラスミド、ｐＥＸ－由来のプラスミド、ｐＢＴａｃ－由来のプラスミド、およびｐＵＣ－由来のプラスミド、である。

多数のベクターがイースト内での組換え蛋白質の発現用に存在する。例えば、ＹＥＰ２４、ＹＩＰ５１、ＹＥＰ５２、ｐＹＥＳ２、およびＹＲＰ１７は、Ｓ．ケレビシアエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）内への遺伝子構築物の導入に有用なクローニング用および発現用担体である（例えば、Ｂｒｏａｃｈ　ｅｔ　ａｌ．（１９８３）　ｉｎ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ、ｅｄ．Ｍ．Ｉｎｏｕｙｅ　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、ｐ８３（これは引用により本明細書に取り込まれる）、を参照されたい）。これらのベクターは、ｐＢＲ３２２ｏｒｉの存在のために大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ）内で、そしてイースト　２ミクロンプラスミドの複製決定基のためにＳ．ケレビシアエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）内で複製することができる。それに加え、例えばアンピリシンのような薬剤耐性マーカーを使用することができる。

好ましい哺乳類発現ベクターは、細菌内でのベクターの増殖を容易にさせるための原核生物性の配列、および真核生物細胞内での組換えＲＡＰ－ＢＰ遺伝子の発現を生じる一つもしくは複数の真核生物性転写調節配列を含む。ｐｃＤＮＡＩ／ａｍｐ、ｐｃＤＮＡＩ／ｎｅｏ、ｐＲｃ／ＣＭＶ、ｐＳＶ２ｇｐｔ、ｐＳＶ２ｎｅｏ、ｐＳＶ２－ｄｈｆｒ、ｐＴｋ

２、ｐＲＳＶｎｅｏ、ｐＭＳＧ、ｐＳＶＴ７、ｐｋｏ－ｎｅｏ、およびｐＨｙｇ由来のベクターは、真核生物細胞のトランスフェクションに適する哺乳類発現ベクターの例である。これらのベクターの内の幾つかは、原核生物および真核生物の両細胞内での複製および薬剤耐性選択を容易にさせる目的で、細菌性プラスミド（例えば、ｐＢＲ３２２）からの配列で改変される。別法では、例えばウシパピローマウイルス（ＢＰＶ－１）もしくはエプスタイン－バール（Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒ）ウイルス（ｐＨＥＢｏ、ｐＲＥＰ－由来のもの、およびｐ２０５）のようなウイルスの誘導体を、真核生物細胞内での蛋白質の一過性発現のために用いることができる。他のウイルス性（レトロウイルスを含む）発現系の例は、遺伝子療法輸送系の記載において先に見いだすことができる。

幾つかの事例では、組換えＲＡＰ－結合性蛋白質をバキュロウイルス発現系の使用により発現させることが所望されることがある（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、ｅｄｓ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ：１９９２、を参照されたい）。このようなバキュロウイルス発現系の例には、ｐＶＬ－由来のベクター（例えば、ｐＶＬ１３９２、ｐＶＬ１３９３、およびｐＶＬ９４１）、ｐＡｃＵＷ－由来のベクター（例えば、ｐＡｃＵＷ１）、ならびにｐＢｌｕｅＢａｃ－由来のベクター（例えば、β－ｇａｌ含有性ｐＢｌｕｅＢａｃ ＩＩＩ）が含まれる。

プラスミドの調製および宿主生物体の形質転換に利用される様々な方法は当該技術分野において熟知されている。原核生物および真核生物の両細胞に適切な他の発現系、ならびに一般的組換え方法については、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、２ｎｄ Ｅｄ．、ｅｄ ｂｙ Ｓａｍｂｒｏｏｋ、Ｆｒｉｔｓｃｈ ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｌｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ：１９８９）第１６章および第１７章を参照されたい。

表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の内の一つの内の一部分の発現が所望される場合には（すなわち、切断突然変異体（例えば、配列２、１２、もしくは１４のＲＡＰＴ１ポリペプチド））、開始コドン（ＡＴＧ）を発現が予定される所望の配列を含むオリゴヌクレオチド断片に添加する必要があることがある。Ｎ－末端の位置のメチオニンは酵素メチオニンアミノペプチダーゼ（ＭＡＰ）の使用により酵素的に開裂されることは当該技術分野において熟知されている。ＭＡＰは大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（Ｂｅｎ－Ｂａｓｓａｔ ｅｔ ａｌ．（１９８７） Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１６９：７５１－７５７）およびサルモネラ チフィムリウム（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）から既にクローン化されており、かつそのインビトロ活性が組換え蛋白質について既に記載されている（Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８７） ＰＮＡＳ ８４：２７１８－１７２２）。従って所望される場合には、Ｎ－末端メチオニンの除去を、ＭＡＰを産生する宿主（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）もしくはＣＭ８９もしくはＳ．ケレビシアエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ））内でＲＡＰ－ＢＰ－由来のポリペプチドをインビボで発現させることによるか、あるいはインビトロでの精製化ＭＡＰの使用によるか（例えば、Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ、上述の方法）のいずれかで達成することができる。

別法では、そのポリペプチドのためのコーディング配列を、異なるポリペプチドをコードする第二ヌクレオチド配列とインフレームで共有結合により連結させるように融合遺伝子の一部分を取込ませることができる。このタイプの発現系は、例えばＲＡＰ－結合性蛋白質の免疫原性断片を産生することが所望される場合には有用であり得る。例えば、ロタウイルスのＶＰ６カプシド蛋白質をＲＡＰＴ１ポリペプチドの複数部分のための免疫原性担体蛋白質として、単量体形態もしくはウイルス粒子の形態のいずれかで用いることができる。抗体を作製する予定のＲＡＰＴ１蛋白質の部分に相当する核酸配列を、ある融合遺伝子構築物内に取込ませることができるが、その融合遺伝子構築物はそのビリオンの部分として蛋白質ＲＡＰＴ１の一部分を含む融合蛋白質を発現する一連の組換えウイルスを産生するための後期ワクシニアウイルス構造蛋白質のためのコーディング配列を含む。組換えＢ型肝炎ビリオンを同様にこの役割に利用することができることが、Ｂ型肝炎表面抗原融合蛋白質を利用する免疫原性融合蛋白質の使用に関して既に証明されている。これに類似

して、ＲＡＰＴ１蛋白質の一部分およびポリオウイルスカプシド蛋白質を含む融合蛋白質をコードするキメラ構築物を作製して、一連のポリペプチド抗原の免疫原性を亢進させることができる（例えば、欧州特許出願公開第０２５９１４９号；およびＥｖａｎｓ ｅｔ ａｌ．（１９８９） Ｎａｔｕｒｅ ３３９：３８５；Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９８８） Ｊ．Ｖｉｒｏｌ． ６２：３８５５；およびＳｃｈｌｉｅｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９２） Ｊ．Ｖｉｒｏｌ． ６６；２、を参照されたい）。表題ユビキチン－複合体形成性酵素を類似の様式で免疫原として操作することができる。

ペプチドを基にする免疫化のための多重抗原ペプチド（Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ａｎｔｉｇｅｎ Ｐｅｐｔｉｄｅ）系を利用することもでき、この系ではＲＡＰ－結合性蛋白質の所望される部分が、オリゴマー性の分岐性リシンコア上へのペプチドの有機化学合成から直接的に取得される（例えば、Ｐｏｓｎｅｔｔ ｅｔ ａｌ．（１９８８） ＪＢＣ ２６３：１７１９およびＮａｒｄｅｌｌｉ ｅｔ ａｌ．（１９９２） Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ． １４８：９１４、を参照されたい）。ＲＡＰ－結合性蛋白質の抗原決定基を細菌性細胞により発現および呈示させることもできる。

免疫原性を亢進させるための融合蛋白質の利用に加え、融合蛋白質が蛋白質（例えば、本発明のＲＡＰ－結合性蛋白質の内のいずれか一つ）の発現および精製を促進させることもできることは広く認識されている。例えばＲＡＰ－結合性蛋白質をグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）融合蛋白質として作製することができる。このようなＧＳＴ融合蛋白質はＲＡＰ－結合性蛋白質の精製を簡素化させることができるが、それは例えばグルタチオン－誘導化マトリックスを用いる親和性精製により実施される（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、ｅｄｓ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（Ｎ．Ｙ．：Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、１９９１、を参照されたい）。他の態様では、精製用リーダー配列（例えば、ポリ－（Ｈｉｓ）／エンテロキナーゼ開裂配列を含むペプチドリーダー配列）をコードする融合遺伝子を、$Ｎｉ^{2+}$金属樹脂を用いる親和性クロマトグラフィーによるポリ－（Ｈｉｓ）－融合蛋白質の精製を可能にさせる目的で、ＲＡＰ－結合性蛋白質の所望の部分のＮ－末端に添加することができる。その後にこの精製用リーダー配列をエンテロキナーゼでの処理により除去することができる（例えば、Ｈｏｃｈｕｌｉ ｅｔ ａｌ．（１９８７） Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ ４１１：１７７；およびＪａｎｋｎｅｃｈｔ ｅｔ ａｌ． ＰＮＡＳ ８８：８９７２、を参照されたい）。

融合遺伝子を作製する技術は当業者には知られている。本質的には、異なるポリペプチド配列をコードする様々なＤＮＡ断片の連結を、通常の技術に従い、連結のための平滑末端もしくは食い違い末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適切な場合には付着性末端の充填、所望されない連結を回避するためのアルカリ性ホスファターゼ処理、および酵素的連結を利用することで実施される。他の態様では、融合遺伝子を、自動化ＤＮＡ合成機を初めとする通常の技術により合成することができる。別法では、遺伝子断片のＰＣＲ増幅をアンカープライマーを用いて実施し、このことにより２つの連続的遺伝子断片の間に相補的張り出し構造を生じ、そしてその後にその構造をアニールしてキメラ遺伝子配列を作製することができる（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、ｅｄｓ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ． Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、１９９２、を参照されたい）。

本発明は更に、通常ではＲＡＰ－結合性蛋白質と結合していることがある、他の細胞性蛋白質、特にＦＫＢＰもしくは他のラパマイシン結合性蛋白質、ならびにユビキチンおよびユビキチン－依存性酵素、シグナル変換および細胞周期の調節蛋白質から単離されているか、あるいはそうでなければ実質的にそれらを含まない表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の精製された、もしくはそうでなければ単離された形態を取得可能とさせる。用語「他の細胞性もしくはウイルス性蛋白質（本明細書では「混入性蛋白質」としても引用される）を実質的に含まない」または「実質的に純粋もしくは精製された調製物」は２０％を下回る（乾燥重量により）混入性蛋白質を有する、そして好ましくは５％を下回る混入性蛋白質を有するＲＡＰ－結合性蛋白質の調製物を含むとして特定される。表題ＲＡＰ－結合性蛋白質

の機能性形態を、本明細書に記載される組換え蛋白質を使用することにより精製化調製物として初めて調製することができる。別法では、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質を、例えばマトリックス結合化ＦＫＢＰ／ラパマイシン蛋白質を用いる親和性精製により単離することができる。「精製された」によっては、ペプチド、ＤＮＡ、もしくはＲＮＡ配列について言及する際には、指示される分子が他の生物学的巨大分子（例えば他の蛋白質（特にＦＫ５０６結合性蛋白質ならびに他の混入性蛋白質））が実質的に非存在である状態で存在することが意味される。用語「精製された」は本明細書で用いられる際には、少なくとも８０乾燥重量％、より好ましくは９５～９９重量％の範囲内の、そして最も好ましくは９９重量％の同一タイプの生物学的巨大分子が存在することを意味することが好ましい（しかし、水、緩衝液、および他の小分子、特に５０００を下回る分子量を有する分子は存在し得る）。用語「純粋」は本明細書で用いられる際には、直ぐ上の「精製された」と同一の数値的制限を有することが好ましい。「単離された」および「精製された」は、天然の状態をとる天然物質あるいは予め構成成分に分離されてはいる（例えばアクリルアミドゲル内で）が、純粋な（例えば、混入性蛋白質、あるいは一例では変性剤およびポリマー（例えば、アクリルアミドもしくはアガロース）のようなクロマトグラフィー用試薬を含まない）物質もしくは溶液のいずれとしても取得されてはいない天然物質のいずれをも含みはしない。

それに加え、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の単離されたペプチジル部分を、そのようなペプチドをコードする核酸の対応断片から組換え的に産生されるペプチドをスクリーニングすることにより取得することもできる。それに加え、断片を、例えば通常のメリフィールド（Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ）固相ｆ－Ｍｏｃもしくはｔ－Ｂｏｃ化学法のような当該技術分野において知られる技術を使用する化学的に合成することができる。例えば、本発明のＲＡＰ－結合性蛋白質は、断片の重複がないような所望の長さの断片に随意に分断されるか、あるいは好ましくは所望の長さの重複性断片に分割されることがある。これらの断片を産生させ（組換え的にか、もしくは化学合成により）、そして検査を行って、ＲＡＰ－結合性蛋白質活性のアゴニストもしくはアンタゴニストのいずれかとして機能することができるペプチジル断片を同定することができるが、それは例えばマイクロインジェクションアッセイもしくはインビトロ蛋白質結合性アッセイによって実施される。説明的態様では、ＲＡＰ－結合性蛋白質のペプチジル部分（複数）（例えば、ＲＡＰＴ１もしくはｒａｐＵＢＣ）をＦＫＢＰ／ラパマイシン－結合性活性について検査することができる。

治療的もしくは予防的効果、あるいは安定性（例えば、エックスビボでの貯蔵期間、およびインビボでの蛋白質分解に対する耐性）を亢進させるような目的でＲＡＰ－結合性蛋白質の構造を改変することも可能であろう。このような改変化ペプチドは、その蛋白質の天然に存在する形態の少なくとも一つの活性を保持するように設計された場合には、本明細書に一層詳細に記載されるＲＡＰ－結合性蛋白質の機能的等価物と見なされる。このような改変化ペプチドは例えば、アミノ酸置換、欠失、もしくは添加により産生することができる。

例えば、ロイシンのイソロイシンもしくはバリンとの隔離的置換、アスパラギン酸のグルタミン酸との置換、スレオニンのセリンとの置換、もしくはあるアミノ酸の構造的関連性のあるアミノ酸との類似置換（すなわち、保存的突然変異）はその蛋白質の折り畳み構造には主要な影響を及ぼすことはいなであろうし、そして得られる分子の生物学的活性には大きな影響を与えることがあることも、あるいはないこともある。保存的置換は、それらの側鎖が関連するアミノ酸ファミリー内で生じる置換である。一般的には、コードされるアミノ酸は以下の４つのファミリーに分割することができ、それらは：（１）酸性＝アスパラギン酸、グルタミン酸；（２）塩基性＝リシン、アルギニン、ヒスチジン：（３）無極性＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；ならびに（４）非荷電極性＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン、である。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは時としてはひとまとめにされて芳香族性アミノ酸として分類される。類似様式で、アミノ酸レパートリーを、（１）酸性＝アスパラギン酸、グルタミ

ン酸；（２）塩基性＝リシン、アルギニン、ヒスチジン；（３）脂肪族性＝グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、（ただし、セリンとスレオニンとは場合によっては別個に脂肪族性ヒドロキシルとして分類される）；（４）芳香族性＝フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン；（５）アミド＝アスパラギン、グルタミン；ならびに（６）硫黄含有性＝システインおよびメチオニン（例えば、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、２ｎｄ ｅｄ．、Ｅｄ ｂｙ Ｌ．Ｓｔｒｙｅｒ、ＷＨ Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ．：１９８１、を参照されたい）。別法ではアミノ酸置換は立体障害的基準に基づくことがあり（例えば、等配電子置換）、この場合にはアミノ酸側鎖の極性もしくは荷電は考慮されない。あるペプチドのアミノ酸配列内の荷電が機能的ＲＡＰ－ＢＰ相同体をもたらすかどうか（例えば、野生型形態を模倣もしくは拮抗するように作用するという意味における機能性）は、野生型ＲＡＰ－ＢＰに類似の様式での細胞内の応答を産生するか、もしくはそのような応答を競合的に阻害する変異体ペプチドの能力を評定することにより容易に決定することができる。一つを上回る置換が行われているペプチドを同一様式で容易に検査することができる。

本発明は更に、ＲＡＰ－結合性蛋白質（例えば、ＲＡＰＴ１蛋白質および／またはｒａｐ－ＵＢＣ酵素）の組み合わせ突然変異体、ならびにその切断化突然変異体のセットを作製する方法を企画しており、かつ特にラパマイシン－媒介性効果ならびに細胞成長もしくは分化の他の特徴を調節する機能を示す変異体配列（例えばＲＡＰ－ＢＰ相同体）を同定するのに有用である。類似の様式で、その蛋白質の真の形態の細胞上での正常な機能を妨害することが可能であるという点でアンタゴニストとされるＲＡＰ－ＢＰ相同体を、本組み合わせ研究方法により作製することができる。

そのような組み合わせライブラリーをスクリーニングするための一つの目的は例えば、野生型（「真の」）蛋白質の生物学的活性のアゴニストもしくはアンタゴニストのいずれかの内の一つとしての能力という点で機能するか、あるいは別法では新規の生物学的活性をひとまとめにして保持する新規のＲＡＰ－ＢＰ相同物をそのライブラリーから単離することである。説明すると、ＲＡＰＴ１相同体は、ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体には結合することができないが、それでも依然として真のＲＡＰＴ１に関連する細胞上での正常な活性の少なくとも一部分を保持する相同体を提供するための本方法により工学的に作製することができる。従って組み合わせライブラリーに由来する相同体を作製してラパマイシン－耐性を提供することができる。このような蛋白質は組換えＤＭＡ構築物から発現される場合には、遺伝子療法プロトコールで用いることができる。

同様に、突然変異誘発により、対応する野生型蛋白質とは劇的に異なる細胞内半減期を有するＲＡＰ－ＢＰ相同体をもたらすことができる。例えば、改変化蛋白質を、真のＲＡＰ－結合性蛋白質の破壊もしくはそうでない場合にはその不活化をもたらす蛋白質分解もしくは他の細胞性過程に対してより強いもしくはより弱い安定性を示すようにすることができる。このような相同体、およびそれらをコードする遺伝子を利用して、その蛋白質の半減期を改変することにより特別なＲＡＰ－ＢＰの発現物の包膜を改変することができる。例えば短い半減期により一層一過性的特質の強いＲＡＰＴ１生物学的効果をもたらすことができ、そしてそれが誘導性発現系の部分である際には細胞内での組換えＲＡＰＴ１レベルのより強固な制御が可能となり得る。先と同様に、そのような蛋白質および特にそれらの組換え核酸構築物を遺伝子療法プロトコールで用いることができる。

本方法の説明的態様では、ＲＡＰ－ＢＰ相同体の集団もしくは他の関連性蛋白質のためのアミノ酸配列を、好ましくは可能な限りの最高の相同性を促進させるように整列させる。このような変異体集団は例えば一つもしくは複数の種からのＲＡＰＴ１相同体（例えば、配列２および１２により表されるマウスおよびヒトのＲＡＰＴ１蛋白質の配列アラインメント）か、もしくは同一種からの様々なＲＡＰ－ＢＰイソ型（例えば、様々なヒトＲＡＰＴ１イソ型）を含むことができる。配列アラインメントの各地点に出現するアミノ酸を、組み合わせ配列の縮重セットを作製するために選択することができる。

好ましい態様では、組み合わせＲＡＰ－ＢＰライブラリーは、ポリペプチドのライブラリー（そのポリペプチドの各々は有望なＲＡＰ－ＢＰ配列の少なくとも一部分（例えば、配

列番号２もしくは１２により表されるＲＡＰＴ１の部分か、あるいは配列２４により表されるｒａｐ－ＵＢＣの部分）を含む）をコードする遺伝子の縮重ライブラリーにより産生される。合成オリゴヌクレオチドの混合物を酵素的に遺伝子配列に連結させ、その結果有望なＲＡＰ－ＢＰ配列の縮重セットが個々のポリペプチドとしてか、もしくは別法ではＲＡＰ－ＢＰ配列ライブラリーを含む一層大きな融合蛋白質のセット（例えば、ファージ呈示用のもの）として発現可能となる。 ＲＡＰ－ＢＰ相同体のライブラリーを縮重オリゴヌクレオチド配列から作製することができる多くの方法が存在する。例えば、縮重遺伝子配列の化学的合成を自動化ＤＮＡ合成機内で実施することができ、そしてその後にその合成遺伝子の発現にとって適切な遺伝子に連結させる。ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子の縮重セットの目的は、一つの混合物内に、有望なＲＡＰ－ＢＰ配列の所望されるセットをコードする全配列を提供することである。縮重オリゴヌクレオチドの合成法は当該技術分野では熟知されている（例えば、Ｎａｒａｎｇ，ＳＡ（１９８３） Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ ３９：３；Ｉｔａｋｕｒａ ｅｔ ａｌ．（１９８１） Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ，Ｐｒｏｃ ３ｒｄ Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ Ｓｙｍｐｏｓ．Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ、ｅｄ． ＡＧ Ｗａｌｔｏｎ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ：Ｅｌｓｅｖｉｅｒ ｐｐ２７３－２８９；Ｉｔａｋｕｒａ ｅｔ ａｌ．（１９８４） Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ． ５３：３２３；Ｉｔａｋｕｒａ ｅｔ ａｌ．（１９８４） Ｓｃｉｅｎｃｅ １９８：１０５６；Ｉｋｅ ｅｔ ａｌ．（１９８３） Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ． １１：４７７、を参照されたい）。このような技術は他の蛋白質の有向進化においても既に利用されている（例えば、Ｓｃｏｔｔ ｅｔ ａｌ．（１９９０） Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６－３９０；Ｒｏｂｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．（１９９２） ＰＮＡＳ ８９：２４２９－２４３３；Ｄｅｖｌｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９０） Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：４０４－４０６；Ｃｗｉｒｌａ ｅｔ ａｌ．（１９９０） ＰＮＡＳ ８７：６３７８－６３８２：ならびに米国特許第５，２２３，４０９号、第５，１９８，３４６号、および第５，０９６，８１５号、を参照されたい）。

別法では他の形態の突然変異誘発を利用して組み合わせライブラリーを作製することができる。例えば、ＲＡＰ－ＢＰ相同体（アゴニストおよびアンタゴニストの両形態）を、例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発など（Ｒｕｆ ｅｔ ａｌ．（１９９４） Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３３：１５６５－１５７２：Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９４） Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ． ２６９：３０９５－３０９９；Ｂａｌｉｎｔ ｅｔ ａｌ．（１９９３） Ｇｅｎｅ １３７：１０９－１１８；Ｇｒｏｄｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．（１９９３） Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ． ２１８：５９７－６０１；Ｎａｇａｓｈｉｍａ ｅｔ ａｌ．（１９９３） Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ． ２６８：２８８８－２８９２：Ｌｏｗｍａｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１） Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３０：１０８３２－１０８３８；およびＣｕｎｎｉｎｇｈａｍ ｅｔ ａｌ．（１９８９） Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４４：１０８１－１０８５）を使用することによるか；リンカースキャニング突然変異誘発（Ｇｕｓｔｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９３） Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９３：６５３－６６０；Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．（１９９２） Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ． １２：２６４４－２６５２；ＭｃＫｎｉｇｈｔ ｅｔ ａｌ．（１９８２） Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３２：３１６）；飽和突然変異誘発（Ｍｅｙｅｒｓ ｅｔ ａｌ．（１９８６） Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３２：６１３）によるか；ＰＣＲ突然変異誘発（Ｌｅｕｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９８９） Ｍｅｔｈｏｄ Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ １：１１－１９）によるか；あるいはランダム突然変異誘発（Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９２） Ａ Ｓｈｏｒｔ Ｃｏｕｒｓｅ ｉｎ Ｂａｃｔｅｒｉａｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、ＣＳＨＬ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ；およびＧｒｅｅｎｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９４） Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｉｎ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ７：３２－３４）を用いることにより作製されるライブラリーから作製および単離することができる。

所定の特性を有する個々の遺伝子産物を同定するために特に組み合わせ突然変異誘発により作製される多彩な遺伝子ライブラリーの遺伝子産物のスクリーニングのための多種多様

な技術が当該技術分野に知られている。このような技術は一般的には例えばＲＡＰＴ１相同体の組み合わせ突然変異により作製された遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用されるであろう。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするために最も広く用いられる技術は典型的には、その遺伝子ライブラリーの複製性発現ベクター内へのクローニング、得られるライブラリーベクターでの適切な細胞の形質転換、および所望される活性の検出が検出される産物の遺伝子をコードするベクターの単離を比較的容易にさせる条件下でその組み合わせ遺伝子を発現させることを含む。以下に記載される各説明的アッセイは、必要に応じて、組み合わせ突然変異誘発技術により作製される多数の縮重ＲＡＰ－ＢＰ配列をスクリーニングするための高処理量分析に適応可能である。

あるスクリーニングアッセイでは、候補ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子産物が細胞もしくはウイルス粒子の表面上に呈示され、そして特別な細胞もしくはウイルス粒子がこの遺伝子産物を介してＦＫＢＰ／１２ラパマイシン複合体に結合する能力が「パニングアッセイ」において検出される。例えば、縮重ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子ライブラリーを細菌性細胞の表面膜蛋白質のための遺伝子内にクローン化し、そして得られる融合蛋白質をパニングプロトコールにより検出することができる（例えば、Ｌａｄｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、国際公開第８８／０６６３０号；Ｆｕｃｈｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）　Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　９：１３７０－１３７１；およびＧｏｗａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）　ＴＩＢＳ　１８：１３６－１４０、を参照されたい）。類似様式で、ＲＡＰ－結合性蛋白質と結合する蛍光ラベル化分子（例えば、蛍光ラベル化させたラパマイシンもしくはＦＫＢＰ１２／ラパマイシン複合体）を用いて機能する可能性のあるＲＡＰ－ＢＰ相同体についての評定を行うことができる。細胞は蛍光顕微鏡下で可視的に調査および分離することができるか、あるいは細胞の形態が許す場合には蛍光活性化細胞分別装置により分離することができる。

別の態様では、遺伝子ライブラリーはウイルス粒子の表面上の融合蛋白質として発現される。例えば、線維状ファージ系では外来性ペプチド配列は感染性ファージの表面上に発現され、そのことにより２つの有意な利点を付与することができる。第一には、それらのファージを非常な高濃度で親和性マトリックスに適用することができるため、多数のファージを一度にスクリーニングすることができる。第二に、各感染性ファージはその表面に組み合わせ遺伝子産物を呈示するため、特別なファージが低収率で親和性マトリックスから回収された際には、もう一度感染周期を繰り返すことによりそのファージを増幅させることができる。ほぼ同一な大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ）線維状ファージ　Ｍ１３、ｆｄ、およびｆ１のグループがファージ呈示ライブラリーとしては最も頻繁に使用されるが、それはファージｇＩＩＩもしくはｇＶＩＩＩのいずれかのコート蛋白質を用いると、そのウイルス粒子の最終パッケージングを破壊することなく融合蛋白質を作製することができるためである（Ｌａｄｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、国際公開第９０／０２０９０号；Ｇａｒｒａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．、国際公開第９２／０９６９０号；Ｍａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）　Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．　２６７：１６００７－１６０１０；Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）　ＥＭＢＯ　Ｊ　１２：７２５－７３４；Ｃｌａｃｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）　Ｎａｔｕｒｅ　３５２：６２４－６２８；およびＢａｒｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）　ＰＮＡＳ　８９：４４５７－４４６１）。説明的態様では組換えファージ抗体系（ＲＰＡＳ、Ｐｈａｒｍａｃｉａ社カタログ番号２７－９４００－０１）をＲＡＰ－ＢＰ組み合わせライブラリーを発現およびスクリーニングする際の使用のために容易に改変することができ、そしてＲＡＰ－ＢＰファージライブラリーをグルタチオン固定化ＦＫＢＰ－ＧＳＴ／ラパマイシン複合体上でパニングさせることができる。再感染の連続周期、ファージ増幅、およびパニングにより、ＦＫＢＰ／ラパマイシン結合性を保持する相同体をかなり濃縮することができるであろうし、そしてその後にアゴニストとアンタゴニストとの間を識別する目的での更に詳細な生物学的活性についてその相同体をスクリーニングすることができる。

ヒトおよびマウスのＲＡＰ－結合性蛋白質の相同体は、ＲＡＰ－ＢＰ突然変異体の組み合わせライブラリーをスクリーニングするための相互作用捕獲アッセイの使用を通して作製

することもできる。以下の実施例１０に記載されるように、薬剤－依存的様式でＦＫ５０６－結合性蛋白質と相互作用する蛋白質についてｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするために用いられるものと同一の二重ハイブリッドアッセイを用いて、例えばＲＡＰＴ１突然変異体の組み合わせライブラリーを通す選別を行ってアゴニストとアンタゴニストの両形態を見いだすこともできる。例えばレポーター構築物の発現を稼働するのに用いられるプロモーター配列の強度の操作を通して相互作用についてのアッセイの感度を制御することにより、その蛋白質の真の形態と比較するとラパマイシンに対して一層強い結合親和性を有するＲＡＰＴ１のアゴニスト形態に有利となるように作用するアッセイを作製することができる。別法では実施例１０に記載されるように、このアッセイを用いて、現在ではラパマイシン複合体に結合することができず、そしてそのためその細胞をそのマクロライドでの処理に対して非感受性にさせることができるＲＡＰＴ１蛋白質の異形であるＲＡＰＴ１相同体を選択することができる。

本発明は更に、ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体との本発明のポリペプチドの結合を破壊することが可能な疑似物（例えば、ペプチドもしくは非ペプチド性作用物質）を作製するための、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質のラパマイシン－結合性ドメインの変形法を提供する。従って、先に記載されるような突然変異誘発技術も、例えばＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体に対する結合に関わる相互作用に関与するＲＡＰ－結合性蛋白質の決定基のマッピングを行うのにも有用である。説明すると、ＦＫＢＰ／ラパマイシンの分子認識に関わるＲＡＰ－結合性蛋白質の重要な残基を決定し、そしてそれを用いてラパマイシン複合体へのＲＡＰ－ＢＰの結合を競合的に阻害するＲＡＰ－ＢＰ－由来のペプチド疑似物を作製することができる。例えばＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体の結合に関わる特別なＲＡＰ－結合性蛋白質のアミノ酸残基のマッピングを行うためのスキャニング突然変異誘発を利用することにより、ラパマイシン複合体に結合する際にそれらの残基を模倣し、かつＦＫＢＰ／ラパマイシンへのＲＡＰ－ＢＰの結合を阻害することにより細胞周期拘束におけるラパマイシンの機能を妨害することができるペプチド疑似体化合物を作製することができる。例えば、非加水分解性ペプチドアナログのそのような残基を、レトロ－インバースペプチド（例えば、米国特許第５，１１６，９４７号および第５，２１８，０８９号；ならびにＰａｌｌａｉ ｅｔ ａｌ．（１９８３） Ｉｎｔ Ｊ Ｐｅｐｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｓ ２１：８４－９２、を参照されたい）、ベンゾジアゼピン（例えば、Ｆｒｅｉｄｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．、ｉｎ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ：Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｇ．Ｒ．Ｍａｒｓｈａｌｌ ｅｄ．、ＥＳＣＯＭ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ：Ｌｅｉｄｅｎ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ、１９８８）、を参照されたい）、アゼピン（例えば、Ｈｕｆｆｍａｎ ｅｔ ａｌ．、ｉｎ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ：Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｇ．Ｒ．Ｍａｒｓｈａｌｌ ｅｄ．、ＥＳＣＯＭ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ：Ｌｅｉｄｅｎ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ、１９８８）、を参照されたい）、置換化ガンマーラクタム環（Ｇａｒｖｅｙ ｅｔ ａｌ．、ｉｎ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ：Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｇ．Ｒ．Ｍａｒｓｈａｌｌ ｅｄ．、ＥＳＣＯＭ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ：Ｌｅｉｄｅｎ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ、１９８８）、ケトーメチレンプソイドペプチド（Ｅｗｅｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８６） Ｊ Ｍｅｄ Ｃｈｅｍ ２９：２９５；およびＥｗｅｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．、ｉｎ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ（Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ ９ｔｈ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ）Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．社、Ｒｏｃｋｌａｎｄ、ＩＬ、１９８５）、β－ターンジペプチドコア（Ｎａｇａｉ ｅｔ ａｌ．（１９８５） Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ ２６：６４７；およびＳａｔｏ ｅｔ ａｌ．（１９８６） Ｊ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ Ｐｅｒｋｉｎ Ｔｒａｎｓ １：１２３１）、ならびにβ－アミノアルコール（Ｇｏｒｄｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８５） Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ １２６：４１９；およびＤａｎｎ ｅｔ ａｌ．（１９８６） Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ １３４：７１）、を用いて作製することができる。側鎖毎のアッセイを利用して、哺乳類細胞内でのＦＫＢＰ１２／ラパマイシン複合体

のヒトＲＡＰＴ１（もしくは他の哺乳類相同体）の相互作用を特異的に阻害はするが、ＦＫＢ１／ラパマイシン複合体とのイースト蛋白質ＴＯＲ１もしくはＴＯＲ２の相互作用には実質的には影響を及ぼさないペプチド疑似物を設計することができる。このようなペプチドアナログは、ラパマイシンの副作用（例えば、免疫抑制）から宿主哺乳類を保護するための真菌感染のラパマイシン治療法と組み合わせ、抗真菌剤としてのラパマイシンの効果を実質的に減少させることなく用いることができるであろう。

本発明の他の態様は、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の内の一つもしくは複数と特異的に反応する抗体に関する。例えば、ＲＡＰ－結合性蛋白質に由来する免疫原を用いることにより、抗－蛋白質／抗－ペプチド抗血清もしくはモノクローナル抗体を標準的プロトコールにより作製することができる（例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ｅｄ．ｂｙ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ：１９８８）、を参照されたい）。例えばマウス、ハムスター、もしくはウサギのような哺乳類をそのペプチドの免疫原性形態（例えば、全長ＲＡＰ－結合性蛋白質、もしくは抗体応答を誘導することが可能な抗原性断片）で免疫化することができる。蛋白質もしくはペプチドに免疫原性を付与するための技術には、担体への複合体形成もしくは当該技術分野において熟知される他の技術が含まれる。表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の免疫原性部分をアジュバントの存在下で投与することができる。免疫化の進行を、血漿もしくは血清中の抗体力価の検出によりモニターすることができる。標準的ＥＬＩＳＡもしくは他の免疫アッセイを、抗体のレベルを評定するための抗原としての免疫原と共に用いることができる。好ましい態様では、表題抗体は本発明のＲＡＰ－結合性蛋白質の抗原決定基（例えば、配列番号２、１２の内の一つに表される蛋白質、もしくはそれらの密接に関連するヒトもしくは非ヒト哺乳類相同体の抗原決定基）に対して免疫特異性を示す。例えば、本発明の好ましい抗－ＲＡＰ－ＢＰ抗体は、配列番号２もしくは１２の内の一つに対して９０％を下回る相同性を示す蛋白質とは実質的には交差反応性（すなわち、特異的反応）を行わないものの；配列番号２、１２、もしくは２４の内の一つと９５パーセントを下回る相同性を示すか、あるいは更には配列番号２もしくは１２の内の一つと９８～９９パーセントを下回る相同性を示す蛋白質とは実質的には交差反応（すなわち、特異的反応）を行わない抗体が具体的に企画されている。「実質的に交差反応を行わない」によっては、その抗体が、哺乳類ＲＡＰＴ１蛋白質（例えば、配列番号２もしくは１２の内の一つに表される蛋白質）に対して１０パーセントを下回る、より好ましくは５パーセントを下回る、そして更により好ましくは１パーセントを下回る結合親和性を示す非相同性蛋白質（例えば、イーストのＴＯＲ１もしくはＴＯＲ２蛋白質）に対する結合親和性を有することが意味される。

免疫化後には抗－ＲＡＰ－ＢＰ抗血清を取得し、そして所望される場合にはポリクローナル抗－ＲＡＰ－ＢＰ抗体をその血清から単離することができる。モノクローナル抗体を産生するためには抗体産生性細胞（リンパ球）を免疫化動物から回収し、そして標準的な体細胞融合方法により例えば黒色腫細胞のような不滅化細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を産生することができる。当該技術分野に熟知されているこのような技術には例えば、ハイブリドーマ技術（もともとはＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ、（１９７５）Ｎａｔｕｒｅ、２５６：４９５－４９７、により開発された）、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Ｋｏｚｂａｒ ｅｔ ａｌ．、（１９８３）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ、４：７２）、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのＥＢＶ－ハイブリドーマ技術（Ｃｏｌｅ ｅｔ ａｌ．、（１９８５）Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ、Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．ｐｐ．７７－９６）が含まれる。ハイブリドーマ細胞を、本発明のＲＡＰ－結合性蛋白質と特異的反応性を示す抗体の産生について免疫化学的にスクリーニングし、そしてモノクローナル抗体をそのようなハイブリドーマ細胞を含む培養物から単離することができる。

先に記載されるポリペプチドから調製される本発明の抗体調製物は、凍結乾燥により取得される乾燥形態をとることができる。しかしながら抗体は通常は、血清中もしくは例えば

ＰＢＳのような適切な緩衝液中の水性液体組成物として使用および供給される。
用語「抗体」は本明細書で用いられる際には、やはり表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の内の一つと特異的に反応するその断片を含むことが意図される。抗体は、組換え工学的操作を初めとする通常の技術を用いて断片化し、そしてその断片を、完全な抗体について先に記載されるものと同一の様式での利用のためにスクリーニングすることができる。例えばＦ（ａｂ’）$_2$断片をペプシンでの抗体の処理により作製することができる。得られるＦ（ａｂ’）$_2$断片を、ジスルフィド架橋を還元するための処理に付してＦａｂ’断片を産生することができる。本発明の抗体は更に、抗－ＲＡＰ－ＢＰ部分を有する二重特異的かつキメラ的分子を含むことが意図される。
ＲＡＰ－結合性蛋白質に対するモノクローナルおよびポリクローナルの両抗体（Ａｂ）を用いてその蛋白質の作用を遮断し、そして例えば一般的には細胞周期調節の、あるいは具体的には増殖性および／または分化的障害の病因の、あるいはラパマイシンの作用メカニズムにおける、ある特別なＲＡＰ－結合性蛋白質の役割の研究を、例えば細胞内への抗－ＲＡＰ－ＢＰ抗体のマイクロインジェクションにより可能にすることができる。
ＲＡＰ－ＢＰエピトープに特異的に結合する抗体を、各々の表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の発現の量およびパターンを評定する目的で、組織試料の免疫細胞化学的染色にも用いることができる。抗－ＲＡＰ－ＢＰ抗体を診断的に免疫沈降法および免疫ブロッティングに用いて、臨床検査方法の部分として組織および体液中のＲＡＰ－ＢＰレベルを検出および評定することができる。例えば、遊離のＲＡＰ－ＢＰのＲＡＰ－ＢＰ／ＦＫＢＰ／薬剤複合体に対するレベルのような測定値は特別なラパマイシンアナログの効果の予測的評価の際に有効であり得、かつある個体にとっての所定の治療方法の効果を決定することを可能にし得る。ＲＡＰ－結合性蛋白質のレベルを体液中に見いだされる細胞（例えば、血液の試料からの細胞）中で測定することができるか、あるいは組織（例えば生検により産生されるもの）中で測定することができる。
表題抗体の他の適用法は、例えばλｇｔ１１、λｇｔ１８－２３、λＺＡＰ、およびλＯＲＦ８のような発現ベクター中に構築されるｃＤＮＡの免疫学的スクリーニングにおけるものである。コーディング配列が正しい読み取り枠内および配向で挿入されているこのタイプのメッセンジャーライブラリーは融合蛋白質を産生することができる。例えばλｇｔ１１は、アミノ末端がβ－ガラクトシダーゼのアミノ酸配列からできており、かつカルボキシ末端が外来性ポリペプチドでできている融合蛋白質を産生するであろう。その後にＲＡＰ－結合性蛋白質の抗原性エピトープを抗体で検出することができるが、それは例えば感染化プレートから拾いあげてきたニトロセルロースフィルターと抗－ＲＡＰ－ＢＰ抗体とを反応させる際に検出される。その後には、このアッセイにより評定されるファージを、その感染化プレートから単離することができる。従ってＲＡＰ－ＢＰ相同体の存在を他の動物から検出およびクローン化することができ、そして別のイソ型（これにはスプライシング変異体が含まれる）をヒトの源から検出およびクローン化することができる。
それに加え、ヒト細胞株からの表題ＲＡＰ－結合性蛋白質のクローニングから決定されるヌクレオチド配列は更に、他のヒト細胞タイプにおける相同体、ならびに他の哺乳類からのＲＡＰ－ＢＰ相同体（例えば、オートログ）を同定する際の使用のために設計されるプローブの作製を考慮するものとなるであろう。例えば、イーストＴＯＲ遺伝子との哺乳類ＲＡＰＴ１遺伝子の比較を通して高度に保存されるヌクレオチド配列を同定することにより、実際にいずれかの真核生物細胞からＲＡＰＴ１相同体を単離するための縮重プライマーを設計することが可能となるであろう。例えば、マウスＲＡＰＴ１遺伝子配列ならびにイーストＤＲＲ－１およびＴＯＲ２配列のアラインメントから、我々は他の哺乳類相同体から、ならびに病原性真菌類からＲＡＰＴ１相同体を単離するための至適プライマーには、プライマーＧＲＧＡＹＴＴＲＡＷＢＧＡＢＧＣＨＹＡＭＧＡＷＴＧＧ、ＣＡＡＧＣＢＴＧＧＧＡＹＭＴＹＭＴＹＴＡＹＴＡＴＭＡＹＧＴＢＴＴＣＡＧおよびＧＡＹＹＢＧＡＲＴＴＧＧＣＴＧＴＢＣＣＨＧＧが含まれることを決定した。
従って本発明は更に、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含むプローブ／プライマーをも提供し、そのオリゴヌクレオチドは配列番号１もしくは１１、あるいはそれらの天

然に存在する突然変異体の内の一つのセンスもしくはアンチセンス配列の内の少なくとも１０の連続ヌクレオチドに対して緊縮条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。好ましい態様では、そのプローブ／プライマーは更に、それに連結されかつ検出することが可能なラベル基を含み、例えばそのラベル基は、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、および酵素補助因子からなる群より選択される。そのようなプローブを、形質転換化細胞を同定するため（たとえば、患者からの細胞試料中のＲＡＰ－ＢＰ核酸のレベルを測定するため；例えば、ＲＡＰ－ＢＰ　ｍＲＮＡをコードするｍＲＮＡレベルを検出する；例えば、ゲノムＲＡＰ－ＢＰ遺伝子が突然変異もしくは欠失を受けているかどうかを決定するため）の診断検査用キットの一部分として用いることができる。

それに加え、ＲＡＰ－ＢＰ　ｍＲＮＡの存在についての未処理組織および組織試料の組織学的スクリーニングを考慮するヌクレオチドプローブを作製することができる。抗－ＲＡＰ－ＢＰ抗体の診断的使用に類似して、ＲＡＰ－ＢＰ　ｍＲＮＡもしくはゲノムＲＡＰ－ＢＰ配列に対するプローブの使用を、例えば新生物性もしくは過形成性障害（例えば、所望されない細胞成長）、あるいは組織の異常分化として出現することがある対立遺伝子突然変異の予防的および治療的の両方の評定のために用いることができる。抗体免疫アッセイと組み合わせて用いることで、これらのヌクレオチドプローブは、ＲＡＰ－結合性蛋白質の発現（もしくはその欠失）に関連する幾つかの異常性に関与することがある発生障害についての分子的基盤の決定を容易にする手助けとなることができる。例えば、ＲＡＰ－結合性蛋白質の合成についての変種を、遺伝子コーディング配列についての突然変異体から識別することができる。

従って本発明は、被検体が所望されない細胞増殖もしくは分化の異常制御を特徴とする障害についての危険性をはらむかどうかを決定するための方法を提供する。好ましい態様では、表題方法は一般的には、その被検体（例えば、ヒト患者）の組織試料中で、（ｉ）表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の内の一つをコードする遺伝子の突然変異、もしくは（ｉｉ）ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子の過誤発現、の内の一つを特徴とする遺伝子病変の存在もしくは非存在を検出することを含むとして特徴付けることができる。説明すると、そのような遺伝子病変を、（ｉ）ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子からの一つもしくは複数のヌクレオチドの欠失、（ｉｉ）そのようなＲＡＰ－ＢＰ遺伝子への一つもしくは複数のヌクレオチドの添加、（ｉｉｉ）ＲＡＢＰ－ＢＰ遺伝子の一つもしくは複数の置換、（ｉｖ）ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子の内の一つの総体的染色体再配列、（ｖ）ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ転写物のレベルの総体的変化、（ｖｉ）ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、および（ｖｉｉ）ＲＡＰ－結合性蛋白質の非野生型レベル、の内の少なくとも一つの存在を証明することにより検出することができる。本発明のある態様では、配列番号１もしくは１１、または天然に存在するその突然変異体、あるいは５’もしくは３’フランク配列、または表題ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子と天然の状態で結合するイントロン配列の内の一つのセンスもしくはアンチセンス配列にハイブリダイズすることが可能なヌクレオチド配列の領域を含むオリゴヌクレオチドを含むプローブ／プライマーが提供される。このプローブは組織試料の核酸に露出され：そしてそのプローブの試料核酸へのハイブリダイゼーションが検出される。所定の態様では、病変の検出はポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）（例えば、米国特許第４，６８３，１９５号および第４，６８３，２０２号を参照されたい）か、あるいは別法では連結連鎖反応（ＬＣＲ）（例えば、Ｌａｎｄｅｇｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）　Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４１：１０７７－１０８０：およびＮａｋａｚａｗａ　ｅｔ　ａｌ．（１９４４）　ＰＮＡＳ　９１：３６０－３６４、を参照されたい）においてそのプローブ／プライマーを利用することを含み、これらの反応の内の後者はＲＡＰ－ＢＰ遺伝子における点突然変異を検出するのに特に有用であり得る。別法では、免疫アッセイを利用してＲＡＰ－結合性蛋白質、および／または蛋白質複合体、特に転写調節性複合体（例えば、ＦＫＢＰ／ラパマイシンに関与するもの）へのその関与のレベルを決定することができる。

更に、特別なＲＡＰ－結合性蛋白質の内因性産生を阻害することにより、アンチセンス技術（例えば、アンチセンス分子のマイクロインジェクション、もしくは転写物がＲＡＰ－

ＢＰのｍＲＮＡもしくは遺伝子配列に関してアンチセンスとなるプラスミドでのトランスフェクション）を用いて、成長および分化現象（例えば、ウイルム（Ｗｉｌｍ’ｓ）腫瘍を生じる現象）における各表題ＲＡＰ－ＢＰの役割、ならびに各表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の正常な細胞性機能（例えば、転写の調節における機能）を調査することができる。このような技術を細胞培養物に利用することができるが、これを形質転換動物の作製にも用いることができる。

それに加え、精製化された組換えＲＡＰ－結合性蛋白質を利用可能にすることにより、本発明は各表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の細胞性機能、もしくは増殖性および分化性障害の病原性におけるそれらの役割のアゴニストもしくはアンタゴニストのいずれかである薬剤についてのスクリーニングを行うために用いることができるアッセイの作製を提供する。例えば、ＲＡＰ－結合性蛋白質とＦＫ５０６－結合性蛋白質との間の結合性を調節する化合物の能力を評定するアッセイを、本発明に従って作製することができる。特にこのようなアッセイを用いて、新規のラパマイシンアナログの設計およびスクリーニング、ならびに比較的無関係の化合物を、ＦＫＢＰ／ＲＡＰ－ＢＰ複合体の形成を媒介するそれらの能力について検査することができる。このようなアッセイを用いて、ラパマイシンに類似する作用メカニズムを有する、より有望な抗－真菌剤（例えば、ラパマイシンアナログ）を作製することができる。様々なアッセイフォーマットは有能なものであろうし、そして本発明を考慮することで、当業者はそのようなアッセイフォーマットを思い浮かべることができるであろう。

薬剤スクリーニングアッセイ、特に以下に記載される高処理能アッセイの作製を容易にさせる本発明の態様は、ＲＡＰＴ１－様蛋白質のラパマイシン結合性ドメインの同定である。例えば本発明は、その全長蛋白質と比較すると操作が一層容易であるＲＡＰＴ１－様蛋白質の複数部分を提供する。その全長蛋白質はそのサイズゆえに、ラパマイシン－結合性活性を保持するであろう組換え蛋白質もしくは融合蛋白質として発現するのが一層困難であり、かつ往々にして不溶性であることがある。従って本発明は、前記ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体に結合するＲＡＰＴ１－様ポリペプチドの可溶性部分（例えば、配列番号２のＶａｌ１２６－Ｔｙｒ１６０、配列番号１２のＶａｌ２０１２－Ｔｙｒ２１４４、配列番号１４のＶａｌ４１－Ｔｙｒ１７３、配列番号１６のＶａｌ１－Ｔｙｒ１３３、および配列番号１８のＶａｌ１－Ａｇｒ１３３からなる群より選択されるアミノ酸配列により表されるラパマイシン－結合性ドメイン）を含む可溶性ポリペプチドを提供する。

例えば、表題スクリーニングアッセイに有用なＲＡＰＴ１ポリペプチドは、一般式Ｘ－Ｙ－Ｚにより表されることがあり、Ｙは配列番号１２の残基２０１２～２１４４内に含まれるラパマイシン－結合性ドメインのアミノ酸配列を表し、Ｘは非存在であるか、あるいはＹによっては表されない配列番号１２のおおよその残基１７００および２１４４の間のアミノ酸配列の全てもしくはＣ－末端部分を表し、そしてＺは非存在であるか、あるいはＹによっては表されない配列番号１２の内の残基２０１２と２５４９との間のアミノ酸配列の全てもしくはＮ－末端部分を表す。そのポリペプチドがＲＡＰＴ１蛋白質配列の内の約５０～２００残基のみを含むに過ぎず、かつその部分がラパマイシン－結合性ドメインを含むことが好ましい。類似のポリペプチドを他のＲＡＰＴ１－様蛋白質について作製することができる。

別の態様では、同一の式を用いて表題ＲＡＰＴ１蛋白質の生物活性性断片を表示することができ、その場合式中、Ｙは配列番号１２の残基２０１２～２１４４内に含まれるラパマイシン－結合性ドメインを表し、Ｘは非存在であるか、あるいはラパマイシン－結合性ドメインの直ぐＮ－末端側にある配列番号１２の内の１～約５００アミノ酸残基のポリペプチドを表し、そしてＺは非存在であるか、あるいは選択されたラパマイシン－結合性ドメインの直ぐＣ－末端側にある配列番号２の内の１～約３６５アミノ酸残基を表す。

化合物および天然抽出物のライブラリーを検査する多くの薬剤スクリーニングプログラムでは、所定の期間内に調査される化合物数を最大限にする目的では高処理能アッセイが所望される。無細胞系で実施されるアッセイ（例えば、精製されたかもしくは半精製された蛋白質を用いて取得されることがあるアッセイ）が、検査用化合物と接触させた際には分

子標的の変化の迅速な発生および比較的容易な検出を可能にさせるようにそれらのアッセイを作製することができるという点で、「初期」スクリーニングとして好まれることがよくある。それに加え、その検査化合物の細胞毒性の効果および／または生物利用性は一般的にインビトロ系では無視することができ、その代わりそのアッセイは、他の蛋白質との結合親和性の変化として表されることがある分子標的におけるその薬剤の効果か、あるいはその分子標的の酵素的特性の変化に主に焦点を当てている。従って本発明の例示的スクリーニングアッセイにおいては、目的の化合物（「薬剤」）を、単離および精製されたＲＡＰ－結合性蛋白質（例えば、ＲＡＰＴ１もしくはｒａｐＵＢＣ）およびＦＫ５０６－結合性蛋白質から作製される混合物と接触させる。薬剤－依存性ＦＫＢＰ／ＲＡＰ－ＢＰ複合体の検出および定量化により、それら２つの蛋白質間の複合体形成を媒介するためのその化合物の効率を決定するための手段が提供される。その化合物の効率は、様々な濃度の検査化合物を用いて取得されるデータから用量反応性曲線を作製することにより評定することができる。それに加え、対照アッセイを行って比較のための基準線を提供することもできる。その対照アッセイでは、単離および精製されたＲＡＰ－ＢＰをＦＫ５０６－結合性蛋白質を含む組成物に添加し、そしてＦＫＢＰ／ＲＡＰ－ＢＰ複合体の形成をその検査化合物の非存在下で定量する。

ＲＡＰ－結合性蛋白質とＦＫＢＰ／薬剤複合体との間の複合体形成はは様々な技術により検出されることがある。例えば、複合体の形成における調節を、一例では検出可能なようにラベル化された蛋白質（例えば、放射性ラベル化、蛍光ラベル化、もしくは酵素ラベル化された蛋白質）を用い、免疫アッセイによるか、もしくはクロマトグラフィー的検出により定量化することができる。

典型的にはＦＫ５０６－結合性蛋白質かもしくはＲＡＰ－結合性蛋白質かのいずれかを固定化させて、それらの蛋白質の内の一つの非複合体形成化形態からの薬剤－依存的蛋白質複合体の分離を容易にさせ、同時にそのアッセイの自動化の便宜を図ることが所望されるであろう。説明的態様では、その蛋白質が不溶性マトリックスに結合することを可能にさせるドメインを添加する融合蛋白質を提供することができる。例えば、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ／ＦＫＢＰ（ＦＫＢＰ－ＧＳＴ）融合蛋白質をグルタチオンセファロースビーズ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ社、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）もしくはグルタチオンで誘導化させてあるマイクロタイタープレート上に吸着させ、そしてその後にそれらをＲＡＰ－結合性蛋白質（例えば、^{35}Ｓ－ラベル化ＲＡＰ－結合性蛋白質）および検査化合物と連結させ、そして複合体形成を推進させる条件下でインキュベートすることができる（例えば実施例９を参照されたい）。インキュベーション後にはそれらのビーズを洗浄して、いすれかの非結合化ＲＡＰ－ＢＰを除去し、そしてそのマトリックス－ビーズ結合化放射ラベルを直接決定するか（例えば、ビーズをシンチラント中に入れる）、あるいはＦＫＢＰ／ＲＡＰ－ＢＰ複合体が解離した後に（例えば、マイクロタイタープレートを使用した際に）上清中で決定する。別法では、非結合化蛋白質の洗い落とし後に、その複合体をマトッリクスから解離させ、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルにより分離し、そしてそのマトリックス結合化分画中に見いだされるＲＡＰ－ＢＰのレベルを標準的電気泳動技術を用いてそのゲルから定量化することができる。

マトリックス上に蛋白質を固定化するための他の技術も表題アッセイにおける使用に利用可能である。例えば、ＦＫ５０６－結合性蛋白質を、ビオチンおよびストレプトアビジンの複合体形成化を利用して固定化することができる。ビオチニル化ＦＫＢＰを、ビオチン－ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシル－スクシンイミド）から、当該技術分野に熟知される技術（例えば、ビオチニル化キット、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ社、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いて調製し、そしてストレプトアビジンでコートした９６ウエルプレート（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ社）のウエルに固定化することができる。別法では、ＦＫＢＰとの反応性を示す抗体をプレートのウエルに誘導化させ、そしてＦＫＢＰを抗体複合体形成によりそれらのウエル内に捕獲することができる。先と同様にＲＡＰ－結合性蛋白質の調製物と検査化合物とを、そのプレートのＦＫＢＰが呈示されているウエル内でインキュベートし、そしてそのウエル内に捕獲されるＦＫＢＰ／ＲＡＰ－ＢＰ複合体の量

を定量化することができる。そのような複合体を検出するための例示的方法には、ＧＳＴ－固定化複合体について先に記載されるものに加えて、ＲＡＰ－結合性蛋白質との反応性を示す抗体、もしくはＦＫ５０６－結合性蛋白質との反応性を示しかつＲＡＰ－ＢＰとの結合に関して競合する抗体を用いる複合体の免疫検出；ならびにＲＡＰ－結合性蛋白質と結合する酵素活性を検出することを頼みとする酵素抗体アッセイが含まれる。後者の例では、その酵素活性は内因性のもの（例えば、キナーゼ（ＲＡＰＴ１）もしくはユビキチンリガーゼ（ｒａｐＵＢＣ）活性）であることができるか、あるいは化学的複合体形成されるかもしくはＲＡＰ－結合性蛋白質との融合蛋白質として提供される外因性活性であることができる。説明すると、ＲＡＰ－結合性蛋白質はアルカリ性ホスファターゼと化学的に架橋結合させることができ、そしてその複合体中に捕獲されるＲＡＰ－ＢＰの量を酵素の色素産生性基質（例えば、リン酸パラニトロフェニル）を用いて評定することができる。同様に、ＲＡＰ－ＢＰおよびグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼを含む融合蛋白質を提供することができ、そして複合体形成を、１－クロロ－２，４－ジニトロベンゼン（Ｈａｂｉｇ ｅｔ ａｌ．（１９７４） Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２４９：７１３０）を用いてＧＳＴ活性を検出することにより定量化することができる。

複合体内に捕獲される蛋白質の内の一つを定量化するための免疫検出を頼みとする方法のためには、蛋白質に対する抗体（例えば、本明細書内に記載される抗－ＲＡＰ－ＢＰ抗体）を用いることができる。別法では複合体内に含まれる検出予定の蛋白質を、ＲＡＰ－ＢＰもしくはＦＫＢＰ配列に加え、抗体を容易に利用することができる（例えば、商業的源から）第二ポリペプチドを含む融合蛋白質の形態での「エピトープ標識化」を施すことができる。例えば、先に記載されるＧＳＴ融合蛋白質を、ＧＳＴ部分に対する抗体を用いる結合の定量化のために用いることもできる。他の有用なエピトープ標識には、ｍｙｃ－エピトープ（例えば、Ｅｌｌｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１） Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２６６：２１１５０－２１１５７）（これは、ｃ－ｍｙｃからの１０残基分の配列を含む）、ならびにｐＦＬＡＧ系（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．社）、もしくはｐＥＥＺ－プロテインＡ系（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社、ＮＪ）が含まれる。

それに加え、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質を用いて、ＲＡＰ－結合性蛋白質とＦＫ５０６－結合性蛋白質との間の複合体形成を誘導する作用性物質を検出するための薬剤－依存性相互作用捕獲アッセイ（以下の実施例に記載される）を作製することができる。以下に示されるように、相互作用捕獲アッセイは、２つの個別の融合蛋白質からインビボで機能的転写活性因子蛋白質を再構築することを頼みとしており、それら２つの融合蛋白質の内の一つはＦＫ５０６－結合性蛋白質に融合される転写活性化因子のＤＮＡ－結合性ドメインを含む（例えば、米国特許第５，２８３，３１７号；国際公開第９４／１０３００号；Ｚｅｒｖｏｓ ｅｔ ａｌ．（１９９３） Ｃｅｌｌ ７２：２２３－２３２；Ｍａｄｕｒａ ｅｔ ａｌ．（１９９３） Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２６８：１２０４６－１２０５４；Ｂａｒｔｅｌ ｅｔ ａｌ．（１９９３） Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １４：９２０－９２４；およびＩｗａｂｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．（１９９３） Ｏｎｃｏｇｅｎｅ ８：１６９３－１６９６、を参照されたい）。この第二融合蛋白質は、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の内の一つに融合される転写活性化ドメインを含む（例えば、ＲＮＡポリメラーゼ転写を活性化することが可能である）。ＦＫＢＰおよびＲＡＰ－結合性蛋白質が例えばラパマイシンのような作用物質の存在下で相互作用する場合には、その転写活性化因子蛋白質の内の２つのドメインはレポーター遺伝子の転写を生じるのに十分に近接するようになる。以下の実施例に記載されるＬｅｘＡ相互作用捕獲に加え、更に他の説明的態様は、ＧＡＬ４ｄｂ－ＦＫＢＰ融合物（ｄｂ：ＤＮＡ結合性ドメイン）をコードするプラスミド、および表題ＲＡＰ－ＢＰに融合されるＧＡＬ４活性化ドメイン（ＧＡＬ４ａｄ）をコードするプラスミドとで同時に形質転換させたサッカロミセス ケレビシアエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＹＰＢ２細胞を含む。それに加えその株は、ＧＡＬ４－応答性プロモーターが表現型マーカーの発現を稼働するように形質転換させられる。例えば、ヒスチジンの非存在下で増殖する能力は、ＨＩＳ３遺伝子の発現に依存

することがあり得る。ＨＩＳ３遺伝子がＧＡＬ４－応答性プロモーターの制御下に置かれる場合には、この栄養要求表現型の緩和により、機能性ＧＡＬ４活性化因子がＦＫＢＰとＲＡＰ－ＢＰとの薬剤－依存的相互作用を通して予め再構築されていることが示される。従って、ＦＫＢＰとのＲＡＰ－ＢＰの相互作用を促進させることが可能な作用物質は、ヒスチジンの非存在下で成長することが可能なイースト細胞をもたらすであろう。表題ＲＡＰ－結合性蛋白質に関する二重－ハイブリッドアッセイを開発するために改変することができる市販キットが現在では入手可能である（例えば、ＭＡＴＣＨＭＡＫＥＲキット、ＣｌｏｎＴｅｃｈ社、カタログ番号　Ｋ１６０５－１、Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ、ＣＡ）。

好ましい態様では、表題哺乳類ＲＡＰ－結合性蛋白質を利用するアッセイを使用して、ラパマイシンと比較すると一層好ましい治療指数を有するラパマイシン疑似体を同定することができる。例えば、ラパマイシンと比較して亢進した組織タイプもしくは細胞タイプ特異性を有するラパマイシン－様薬剤を本発明により同定することができる。説明すると、表題アッセイを用いて、他の組織（例えば、肝細胞）を実質的に妨害することなくＩＬ－２により媒介されるリンパ球の増殖／活性化を特異的に阻害する化合物を作製することができる。同様に類似のアッセイを用いて、イースト細胞もしくは他のより下等な真核生物の増殖を阻害するが、ただし哺乳類細胞については実質的に低下した効果を有し、そのためラパマイシンと比較すると抗－真菌剤としての薬剤の治療学的指数が改善されているラパマイシン－様薬剤を同定することができる。

ある態様では、そのような化合物の同定は、２つもしくはそれを上回る様々なタイプのＦＫＢＰ／ＲＡＰ－ＢＰ複合体の薬剤に媒介される形成を検出および比較する特異的スクリーニングアッセイの使用により可能となる。説明すると、このアッセイを、組織タイプ特異的ＦＫＢＰ／ＲＡＰＴ１複合体の形成に関する検査化合物の効果の並列比較用に設計することができる。ＦＫＢＰの多様性およびＲＰＴ１が関連性蛋白質の巨大ファミリーの単一メンバーを表すことの実質的な可能性が存在するとすると、様々な機能性ＦＫＢＰ／ＲＡＰＴ１複合体が存在し、そして所定の事例ではそれらは特別な組織もしくは細胞タイプに局在化する見込みがありそうである。「Ｍｅｔｈｏｄ　ｏｆ　Ｄｅｔｅｃｔｉｎｇ　Ｔｉｓｓｕｅ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ＦＫ５０６　Ｂｉｎｄｉｎｇ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｍｅｓｓｅｎｇｅｒ　ＲＮＡｓ　ａｎｄ　Ｕｓｅｓ　Ｔｈｅｒｅｏｆ」という表題の国際公開第９３／２３５４８号に記載されるように、ＦＫＢＰの組織分布はある種の蛋白質と次の種の蛋白質とでは異なっている。従って、検査用化合物をＦＫＢＰ／ＲＡＰＴ１複合体の有望なレパートリーの内のたった一つのサブセットのみの組織特異的形成を媒介することが可能な作用物質についてスクリーニングすることができる。例示的態様では、相互作用捕獲アッセイを、２つもしくはそれを上回る様々なおとり用蛋白質（例えば、ＦＫＢＰ１２（配列番号５および６）、ＦＫＢＰ２５（ＧｅｎＢａｎｋ　受託番号Ｍ９０３０９）、もしくはＦＫＢＰ５２（ＧｅｎＢａｎｋ　受託番号Ｍ８８２７９）を用いて取得することができる一方で、魚役の蛋白質は各アッセイにおいて不変である（例えば、ヒトＲＡＰＴ１構築物）。ＩＴＳを並列に実施することにより、他のＦＫＢＰ複合体の形成についてと比較すると、ＦＫＢＰ／ＲＡＰＲＴ１複合体の内の一つの形成について一層大きな効果（例えば、統計的に有意な効果）を有する作用物質の検出が可能となる。

類似の様式で、特異的スクリーニングアッセイを用いて、哺乳類複合体と比較するイースト複合体についての特異性において統計的に有意な増加を示す作用物質を同定する目的では、哺乳類ＦＫＢＰ／ＲＡＰ－ＢＰ複合体およびイーストＦＫＢＰ／ＴＯＲ複合体の薬剤により媒介される形成における差異を活用することができる。従って、病原体（例えば、真菌感染に関与する真菌類）に特異的に作用する先駆的化合物を開発することができる。説明すると、本アッセイを用いて、カンジダ症、アスペルギルス症、ムコール症、ブラストミセス症、ゲオトリクム症、クリプトコッカス症、色素酵母菌症、コクイジオミセス症、コニオスポリウム症、ヒストプラスマ症、マズラミコーシス、リノスポリジウム症、ノカルジア症、パラ－アクチノミセス症、ペニシリウム症、モニリア症、もしくはスポロトリクム症のような真菌症に関わる少なくとも一つの真菌類を阻害するのに結局は役立つことがある作用物質についてスクリーニングを行うことができる。例えば、治療が所望され

る真菌感染がカンジダ症である場合には、本アッセイは、哺乳類ＦＫＢＰ／ＲＡＰＴ１複合体の形成を媒介することについての検査化合物の相対的効果を、カンジダ　アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）、カンジダ　ステラトイディア（Ｃａｎｄｉｄａ　ｓｔｅｌｌａｔｏｉｄｅａ）、カンジダ　トロピカリス（Ｃａｎｄｉｄａ　ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ）、カンジダ　パラプシロシス（Ｃａｎｄｉｄａ　ｐａｒａｐｓｉｌｏｓｉｓ）、カンジダ　クルセイ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｋｒｕｓｅｉ）、カンジダ　プセウドトロピカリス（Ｃａｎｄｉｄａ　ｐｓｅｕｄｏｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ）、カンジダ　クゥイレルモンディイ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｑｕｉｌｌｅｒｍｏｎｄｉｉ）、もしくはカンジダ　ルゴサ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｒｕｇｏｓａ）からなる群より選択されるイーストからクローン化される遺伝子から形成されるそのような複合体を媒介することに対する効果と比較することを含む。同様に、本アッセイを用いて、例えばアスペルギルス　フミガトゥス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｕｍｉｇａｔｕｓ）、アスペルギルス　フラブス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｌａｖｕｓ）、アスペルギルス　ニゲル（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）、アスペルギルス　ニドゥランス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｄｕｌａｎｓ）、もしくはアスペルギルス　テレウス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｔｅｒｒｅｕｓ）のようなイーストからクローン化されるＦＫＢＰおよびＴＯＲ遺伝子に由来する表題薬剤依存的相互作用捕獲アッセイの使用を行うことによりアスペルギルス症を治療する際に治療的価値を有することがある抗－真菌剤を同定することができる。真菌感染がムコール症である場合には、その化合物は、例えばリゾプス　アルヒズス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ　ａｒｒｈｉｚｕｓ）、リゾプス　オリザエ（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ　ｏｒｙｚａｅ）、アブジディア　コリムビフェラ（Ａｂｓｉｄｉａ　ｃｏｒｙｍｂｉｆｅｒａ）、アブシジア　ラモサ（Ａｂｓｉｄｉａ　ｒａｍｏｓａ）、もしくはムコル　プシルス（Ｍｕｃｏｒ　ｐｕｓｉｌｌｕｓ）のようなイーストに由来することができる。哺乳類ＦＫＢＰ／ＲＡＰＴ１複合体との比較のための他のラパマイシン－依存的複合体の源には、病原体プネウモシスチス　カリニイ（Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ　ｃａｒｉｎｉｉ）が含まれる。ヒト病原体および他の下等真核生物からの例示的ＦＫ５０６－結合性蛋白質は、例えばＧｅｎＢａｎｋ　受託番号：Ｍ８４７５９（カンディダ　アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ））；Ｕ０１１９５、Ｕ０１１９８、Ｕ０１１９７、Ｕ０１１９３、Ｕ０１１８８、Ｕ０１１９４、Ｕ０１１９９（ネイッセリア　エスピーピー（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ　ｓｐｐ．））；およびＭ９８４２８（ストレプトミセス　クリソマルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｃｈｒｙｓｏｍａｌｌｕｓ））により提供される。

例示的態様では、特異的スクリーニングアッセイを、カンディダ　アルビカン（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎ）のＲＡＰＴ１蛋白質（実施例１１を参照されたい）、およびカンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）ＦＫ５０６－結合性蛋白質（例えば、ＲＢＰ１、ＧｅｎＢａｎｋ　受託番号Ｍ８４７５９、Ｆｅｒｒａｒａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）　Ｇｅｎｅ　１１３：１２５－１２７、も参照されたい）、もしくはイーストＦＫ５０６－結合性蛋白質（実施例８および図３を参照されたい）の内の少なくともラパマイシン－結合性ドメインを用いて作製することができる。ヒトＲＡＰＴ１複合体およびカンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）ＲＰＴ１複合体との形成の比較により、ｃａＲＡＰＴ１複合体の形成について一層高い選択性を示し、そしてそのためラパマイシンと比較して抗－真菌剤としての特異性が一層高いと思われる作用物質を同定するための手段が提供される。

本発明の他の態様は、本発明のトランスジーンを含み、そして動物の一つもしくは複数の細胞内で外因性ＲＡＰ－結合性蛋白質を恐らく（場合によってではあるが）発現する細胞（その動物の）を含んでなる形質転換動物に関する。ＲＡＰ－ＢＰトランスジーンはその蛋白質の野生型形態をコードすることができるか、あるいはその相同体をコードすることができ、それらの相同体には、アゴニストとアンタゴニストの両方、ならびに内因性遺伝子の発現を阻害するために設計されるアンチセンス構築物が含まれる。好ましい態様では、そのトランスジーンの発現は、例えば所望されるパターンでの発現を制御するシス－作用性配列の使用を通して、細胞、組織、もしくは発達段階の特異的サブセットに限定される。本発明では、表題ＲＡＰ－結合性蛋白質のそのようなモザイク発現が多くの形態の系

列分析にとって必須であることがあり得、そして追加的には機能喪失突然変異（この欠陥は他の点では正常な胎仔内の組織の小パッチ内の成長を総体的に変化させることがあるであろう）の効果を評定する手段を提供することができる。この目的のためには、組織特異的調節配列および条件的調節配列を用いて、所定の空間的パターンでのトランスジーンの発現を制御することができる。その上、一過性パターンの発現を、例えば条件的組換え系もしく原核生物転写調節配列により提供することができる。

トランスジーンの発現を考慮する遺伝子技術を、当業者に知られるインビボでの部位特異的遺伝子操作を介して調節することができる。例えば、標的配列の遺伝子組換えの触媒反応を行うリコンビナーゼの調節化発現を考慮する遺伝子系が利用可能である。本明細書で用いられる際には成句「標的配列」は、リコンビナーゼにより遺伝子的に組換えられるヌクレオチド配列を意味する。標的配列はリコンビナーゼ認識配列によりフランクされ、そして一般的にはリコンビンナーゼ活性を発現する細胞からの切り出しかもしくは逆位のいずれかが施される。リコンビナーゼによる触媒反応を受ける組換え現象を、その標的配列の組換えが表題ＲＡＰ－結合性蛋白質の発現の活性化もしくは抑制のいずれかをもたらすように設計することができる。例えば、組換えＲＡＰ－ＢＰ遺伝子の発現を妨害する標的配列の切り出しがその遺伝子の発現を活性化させるように設計することができる。この蛋白質の発現の妨害は様々なメカニズム（例えば、その遺伝子のプロモーター因子もしくは内部停止コドンからの空間的隔離）により生じることがある。それに加え、遺伝子のコーディング配列がリコンビナーゼ認識配列によりフランクされ、かつ最初にはプロモーター因子に関して３’－５’方向に細胞内にトランスフェクトされるトランスジーンを作製することができる。このような事例では、標的配列の逆位は表題遺伝子の再配向を行うことになるであろうが、、それはプロモーター因子に関する配向（これはプロモーターにより稼働される転写活性を考慮するものである）にそのコーディング配列の５’末端を配置することによるものである。

説明的態様では、バクテリオファージＰ１のｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系（Ｌａｋｓｏ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）　ＰＮＡＳ　８９：６２３２－６２３６；Ｏｒｂａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）　ＰＮＡＳ　８９：６８６１－６８６５）かもしくはサッカロミセス　ケレビシアエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のＦＬＰリコンビナーゼ系（Ｏ’Ｇｏｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５１：１３５１－１３５５：国際公開第９２／１５６９４号）のいずれかを用いてインビボでの部位特異的遺伝子組換え系を作製することができる。ＣｒｅリコンビナーゼはｌｏｘＰ配列間に存在する介在性標的配列の部位特異的組換えの触媒反応を行う。ｌｏｘＰ配列はＣｒｅリコンビナーゼが結合し、そしてＣｒｅリコンビナーゼ媒介性遺伝子組換えに必要とされる３４塩基対のヌクレオチド反復配列である。ｌｏｘＰ配列の配向が、Ｃｒｅリコンビナーゼが存在する際に、その介在性標的配列が切り出されるかもしくは逆位を生じるかを決定し（Ａｂｒｅｍｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８４）　Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．　２５９：１５０９－１５１４）；ｌｏｘＰ配列が正の反復構造としての配向をとる際には標的配列の切り出しの触媒反応が行われ、そしてｌｏｘＰ配列が逆位の反復配列としての配向をとる場合にはその標的配列の逆位の触媒反応が行われる。

従って、標的配列の遺伝子組換えはＣｒｅリコンビナーゼの発現に依存する。リコンビナーゼの発現は、調節性制御（例えば、組織特異的、分化段階特異的、外部から添加された作用物質により誘導もしくは抑制される制御）に供されるプロモーター因子により調節することができる。このような調節性制御により、リコンビナーゼ発現がプロモーター因子により媒介される細胞内でのみ標的配列の遺伝子組換えがもたらされるであろう。従って、ＲＡＰ－結合性蛋白質の活性化発現を、リコンビナーゼ発現の調節を介して調節することができる。

組換えＲＡＰ－結合性蛋白質（例えば、ＲＡＰＴ１もしくはｒａｐＵＢＣ）の発現を調節するためのｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系の使用には、Ｃｒｅリコンビナーゼと表題蛋白質との両方をコードするトランスジーンを含む形質転換動物の構築が必要とされる。Ｃｒｅリコンビナーゼと組換えＲＡＰ－ＢＰ遺伝子との両方を含む動物を、「二重」形質

転換動物の構築を通して提供することができる。そのような動物を提供するのに都合のよい方法は、それぞれ、ある動物がトランスジーン（例えば、ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子）を含み、そしてもう一方の動物がリコンビナーゼ遺伝子を含むという２匹の形質転換動物を交配させることである。

リコンビナーゼ－媒介性発現性フォーマット内にトランスジーンを含む形質転換動物を最初に構築することにより取得される一つの利点は、その表題蛋白質がその形質転換動物中での発現の際に有毒となるだろうという可能性に由来する。このような事例では、表題トランスジーンが全組織中でサイレントである創始体集団の作製により、特別な組織もしくは分化段階での細胞周期調節の破壊が例えば致死的表現型をもたらすであろう、そのような創始細胞からの子孫の研究が可能となるであろう。

類似の条件性トランスジーンを、トランスジーンの発現を容易にさせる目的で、原核生物蛋白質が同時に発現されることを指令する原核生物プロモーター配列を用いて提供することができる。例示的プロモーターおよび対応するトランス－活性性原核生物蛋白質は米国特許第４，８３３，０８０号に記載されている。その上、条件的トランスジーンの発現を、そのトランス－活性性蛋白質（例えば、リコンビナーゼもしくは原核生物性蛋白質）をコードする遺伝子が組織に輸送され、そして例えば先に記載される遺伝子療法用構築物の内の一つを使用して発現を生じさせる、遺伝子療法－様方法により誘導することができる。この方法によりＲＡＰ－ＢＰトランスジーンを成体期になってもサイレントのままにさせておくことができ、そしてその発現はトランス－活性化因子の導入によって「スイッチオン」となるであろう。

例示的態様では本発明の「形質転換非ヒト動物」は非ヒト生殖系列内にトランスジーンを組込むことにより作製される。様々な分化段階の胎仔標的細胞を用いてトランスジーンを組み込ませることができる。胎仔標的細胞の発生段階に依存して様々な方法が用いられる。受精体がマイクロインジェクションにとっての最善の標的である。マウスではオスの前核は直径約２０マイクロメーターのサイズに到達し、そのことにより１～２ｐｌのＤＮＡ溶液の再現的注入が可能となる。遺伝子移送の標的としての受精体の使用は、大半の事例では注入したＤＮＡが第一分裂以前に宿主遺伝子内に組込まれるであろうという点での主な利点を有する（Ｂｒｉｎｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８５） ＰＮＡＳ ８２：４４３８－４４４２）。結果として形質転換非ヒト動物の全細胞は組み込まれたトランスジーンを保持するであろう。このことは一般的には創始体の子孫へのそのトランスジーンの効率的伝達にも反映されるであろうが、それは生殖細胞の５０％がそのトランスジーンを保持であろうからである。受精体のマイクロインジェクションは、本発明を実施する際にトランスジーンを組込ませるための好ましい方法である。

レトロウイルス感染も非ヒト動物内にＲＡＰ－ＢＰトランスジーンを組込ませるのに用いられる。発育中の非ヒト胎仔をインビトロで培養して胞胚段階にもってゆくことができる。この期間中、分割細胞はレトロウイルスにとっての標的となることができる（Ｊａｅｎｉｃｈ，Ｒ．（１９７６） ＰＮＡＳ ７３：１２６０－１２６４）。分割細胞の効率的感染は、透明体を除去するための酵素的処理により達成することができる（Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｍｏｕｓｅ Ｅｍｂｒｙｏ、Ｈｏｇａｎ ｅｄｓ．（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、１９８６）。トランスジーンを組込ませるのに用いられるウイルス性ベクター系は典型的には、トランスジーンを保持する複製欠陥レトロウイルスである（Ｊａｈｎｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８５） ＰＮＡＳ ８２：６９２７－６９３１；Ｖａｎ ｄｅｒ Ｐｕｔｔｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９８５） ＰＮＡＳ ８２：６１４８－６１５２）。トランスフェクションは、単層のウイルス産生性細胞上で分割細胞を培養することにより簡便かつ効率的に取得される（Ｖａｎ ｄｅｒ Ｐｕｔｔｅｎ、上述；Ｓｔｅｗａｒｔ ｅｔ ａｌ．（１９８７） ＥＭＢＯ Ｊ．６：３８３－３８８）。別法では、感染をもっと後期の段階で実施することができる。ウイルスもしくはウイルス産生性細胞を分割腔内に注入することができる（Ｊａｈｎｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８２） Ｎａｔｕｒｅ ２９８：６２３－６２８）。大半の創始体トランスジーンについてモザイクと

なるであろうが、それは組込みが形質転換非ヒト動物を形成した細胞のサブセットにのみ生じるためである。更にその創始体はゲノムの様々な位置にそのトランスジーンの様々なレトロウイルス挿入断片を含むことがあり、この場合一般的にはこれらの挿入断片は子孫細胞では隔離されるであろう。それに加え、トランスジーンを、妊娠中期の胎仔の子宮内レトロウイルス感染により生殖系列内に組込ませることも可能である（Ｊａｈｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９８２）、上述）。

トランスジーン組込みのための第三のタイプの標的細胞は胚幹細胞（ＥＳ）である。ＥＳ細胞はインビトロで培養される移植前胎仔から取得され、そしてこれが胚と融合される（Ｅｖａｎｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９８１）Ｎａｔｕｒｅ　２９２：１５４－１５６；Ｂｒａｄｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９８４）Ｎａｔｕｒｅ　３０９：２５５－２５８；Ｇｒｏｓｓｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９８６）ＰＮＡＳ　８３：９０６５－９０６９；およびＲｏｂｅｒｔｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ　３２２：４４５－４４８）。トランスジーンを、ＤＮＡトランスフェクションによるか、もしくはレトロウイルスにより媒介される形質導入によりＥＳ細胞内に効率的に導入することができる。このような形質転換化ＥＳ細胞をその後に非ヒト動物からの胚胞と合わせることができる。その後にこのＥＳ細胞は胚内に混ざり合い、そして得られるキメラ動物の生殖系列の一員となる。総説については例えば、Ｊａｅｎｉｓｃｈ，Ｒ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４０：１４６８－１４７４、を参照されたい。

ノックアウトすなわち破壊形質転換動物を作製する方法も一般的に知られている。例えば、Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ　ｔｈｅ　Ｍｏｕｓｅ　Ｅｍｂｒｙｏ（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．、１９８６、を参照されたい）。リコンビナーゼ依存的ノックアウト体も、リコンビナーゼ標的配列を挿入するための例えば相同組換えにより作製することができ、その結果、ＲＡＰ－ＢＰ遺伝子の不活化の組織特異的および／または一過性制御が先の要領で制御され得る。

本発明の他の態様は、「おとり」用の蛋白質／薬剤複合体と物理的に相互作用を行う蛋白質をコードする遺伝子の単離のための新規のインビボ方法に関する。この方法は薬剤の存在下での転写活性化因子の再構築を検出することを頼みとしており、特にこの場合、そのような薬剤は非－ペプチド性の小有機分子（例えば＜２５００Ｋ）、例えばマクロライド、例えばラパマイシン、ＦＫ５０６、もしくはシクロスポリンである。具体的にはこの方法はハイブリッド蛋白質を発現するキメラ遺伝子を利用する。第一のハイブリッド蛋白質はおとり用蛋白質に融合された転写活性化因子のＤＮＡ－結合性ドメインを含む。第二ハイブリッド蛋白質は、「魚」役の蛋白質（例えば、ｃＤＮＡライブラリーに由来する検査用蛋白質）に融合される転写活性化ドメインを含む。これらの魚役とおとり用の蛋白質が薬剤－依存的様式で相互作用を行うことが可能である場合には、それらはその転写活性化因子のその２つのドメインに非常に近接するようになる。この近接の度合いは転写活性化因子に応答する転写調節部位に操作的に連結されるレポーター遺伝子の転写を生じるに十分なものであり、そしてマーカー遺伝子の発現を検出し、そして他の蛋白質と、このおとり用蛋白質／薬剤複合体との相互作用の評定を行うのに用いることができる。

この方法の一つの利点は、複数の蛋白質を同時に検査して、薬剤／蛋白質複合体とのいずれかの相互作用が存在するかどうかを決定することができることがある。例えば、ＤＮＡ－結合性ドメインをコードするＤＮＡ断片を、一つのハイブリッドを提供する目的でおとり用蛋白質をコードするＤＮＡ断片に融合させることができる。このハイブリッドはマーカー遺伝子を保持する細胞内に組込まれ、そしてそしてその細胞を、おとり用蛋白質と結合することが知られている薬剤に接触させる。第二ハイブリッドのためには、例えば活性化ドメインをコードするＤＮＡ配列に融合される哺乳類の全相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）を含むことがあるプラスミドのライブラリーを構築することができる。このライブラリーを第一ハイブリッドを保持する細胞内に組込ませる。検査用ライブラリーからのいずれかの個々のプラスミドが薬剤／蛋白質複合体と相互作用することが可能な蛋白質をコードする場合には、レポーター遺伝子の発現を検出することにより陽性シグナルが取得されること

がある。それに加え、薬剤複合体と新規の蛋白質との間に相互作用が生じる場合には、この新規に同定された蛋白質のための遺伝子を簡便に取得することができる。
本明細書に説明されるように、本相互作用捕獲アッセイは、特別な蛋白質／薬剤複合体の直ぐ上流もしくは下流に存在する所定のシグナル変換経路の地点で作用する蛋白質をコードする新規の遺伝子の同定の際の貴重な道具となる。例えば、表題アッセイを用いてＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体か、もしくはＦＫＢＰ／ＦＫ５０６複合体か、もしくはシクロフィリン／シクロスポリン複合体の直ぐ下流の標的を同定することができる。薬剤－依存的様式でそのような複合体の内の一つと相互作用する蛋白質を同定することができるかもしれず、そしてそれらの蛋白質は診断的および治療的の上での両方の価値を有するものであり得る。
宿主細胞、好ましくはイースト細胞、最も好ましくはサッカロミセス　ケレビシアエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）もしくはシゾサッカロミセス　ポムベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）内で発現されることが可能な第一キメラ遺伝子が提供される。宿主細胞は転写活性因子のＤＮＡ－結合性ドメインのための結合性部位を有する検出可能な遺伝子を含み、その結果、その遺伝子はマーカー遺伝子が転写的に活性化された際にはマーカー蛋白質を発現する。このような活性化は、転写活性化因子の転写活性化ドメインが転写活性化因子のＤＮＡ－結合性ドメインに十分に近接してきた際に生じる。この第一キメラ遺伝子は宿主細胞の染色体内に存在することがある。この遺伝子は、宿主細胞内のマーカー遺伝子上の結合性部位を認識するＤＮＡ結合性ドメインを含むキメラ蛋白質、およびおとり用蛋白質（このおとり用蛋白質は第二検査用蛋白質もしくは蛋白質断片との薬剤媒介性相互作用について検査される予定のものである）をコードする。
宿主細胞内で発現されることが可能な第二キメラ遺伝子が提供される。ある態様では、第一および第二の両キメラ遺伝子がプラスミドの形態で宿主細胞内に取り込まれる。しかしながら、この第一キメラ遺伝子が宿主細胞の染色体内に存在し、かつ第二キメラ遺伝子がプラスミドの部分として宿主細胞内に取り込まれることが好ましい。第二キメラ遺伝子は、第二ハイブリッド蛋白質をコードするＤＮＡ配列を含む。この第二ハイブリッド蛋白質は転写活性化ドメインを含む。この第二ハイブリッド蛋白質は更に、第一検査用蛋白質もしくは蛋白質断片との相互作用について検査される予定の第二検査用蛋白質もしくは蛋白質断片をも含む。第一ハイブリッド蛋白質のＤＮＡ－結合性ドメインおよび第二ハイブリッド蛋白質の転写活性化ドメインが、離れて存在するＤＮＡ－結合性ドメインおよび転写活性化ドメインを有する転写活性化因子に由来することが好ましい。これらの離れて存在するＤＮＡ－結合性ドメインおよび転写活性性ドメインはイーストＧＡＬ４蛋白質内に見いだされることが知られており、かつイーストＧＣＮ４およびＡＤＲ１蛋白質内にも見いだされることが知られている。転写に関与する多くの他の蛋白質も、離れて存在する結合性活性化ドメインおよび転写活性化ドメインを有し、そのことによりそれらの蛋白質は本発明にとって有用なものとなっている。他の態様ではＤＮＡ－結合性ドメインおよび転写活性化ドメインは異なる転写活性化因子からのものであることがあるかもしれない。第二ハイブリッド蛋白質が、転写活性化ドメインをコードするＤＮＡ配列に融合されるゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、もしくは合成的に作製されたＤＮＡの配列を含むプラスミドのライブラリー上にコードされることが好ましい。
従って、宿主細胞内の第一検査用蛋白質と第二検査用蛋白質との間の薬剤媒介性相互作用により、その転写活性化ドメインが検出可能な遺伝子の転写を活性化させるようになる。この方法は、第一キメラ遺伝子および第二キメラ遺伝子を宿主細胞内に組込ませ、そしてその細胞を目的の薬剤と接触させることにより実施される。宿主細胞は、その第一ハイブリッド蛋白質および第二ハイブリッド蛋白質が活性化予定の検出可能な遺伝子について十分な量で発現される条件に供される条件下に供される。その後にこの細胞を、検出可能な遺伝子の薬剤－依存的発現について検査する。
従って、第一蛋白質と蛋白質のライブラリーとの間の相互作用を、そのライブラリーの内のどのメンバーがその第一蛋白質と第二蛋白質との間の薬剤－依存的複合体の形成に関与

するかを決定する目的で、目的の薬剤の存在下での検査を行うことができる。例えば、おとり役の蛋白質は、ＦＫ５０６、ラパマイシン、もしくはシクロスポリンに結合する蛋白質であることがある（例えば、ＦＫＢＰもしくはシクロフィリンであることができる）。第二検査用蛋白質はｃＤＮＡライブラリーに由来することがある。

実施例

本発明は目下のところ一般的に記載されているが、本発明の所定の特徴および態様の単なる説明の目的のみで包括され、かつ本発明を制約することを意図するのではない以下の実施例を参照することにより本発明が更に容易に理解されるであろう。

実施例１

二重ハイブリッドスクリーニングのためのおとり用プラスミドの構築

Ａ．　ＬｅｘＡ－ＦＫＢＰ１２おとり：

本薬剤－依存的相互作用捕獲アッセイに用いられるこのおとり用蛋白質および魚役蛋白質構築物は、本質的には、他の二重ハイブリッドアッセイ（例えば、米国特許第５，２８３，３１７号；Ｚｅｒｖｏｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）　Ｃｅｌｌ　７２：２２３－２３２；Ｍａｄｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２６８：１２０４６－１２０５４；Ｂａｒｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ（１９９３）　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１４：９２０－９２４；およびＩｗａｂｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）　Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　８：１６９３－１６９６、を参照されたい）。以下のオリゴヌクレオチド：

コーディング鎖

G GGT TTG GAA TTC CTA ATA ATG TCT GTA CAA GTA GAA ACC

（配列番号３）

非コーディング鎖

GGG TTT CGG GAT CCC GTC ATT CCA GTT TTA GAA G

（配列番号４）

を用いてＰＣＲ増幅をリンパ球ｃＤＮＡライブラリーから実施して、ＦＫＢＰ１２蛋白質のためのコーディング配列を単離した。クローン化されたヒトＦＫＢＰ１２の配列は：

ATGTCCGTACAAGTAGAAACCATCTcCCCAGGAGACGGGCGCACCTTcCCCA
AGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTACACCGGgATGCTTGAAGATGGAAA
GAAATTTGATTCCTCCCGTGACCGTAACAAGCCCTTTAAGTTtATgCTAGGC
aAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAagGGGTTGcCCAGATGAGTGTGG
gTCAGCGTGCCAAaCTgACTAtAtCTCcAGaTtATgCcTATGgTGCCACTGG
GCAccCAGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTT
CTAAAACTGGAATGA（配列番号５）

として確認された。

ヒトＦＫＢＰ１２コーディング配列を含む、得られるＰＣＲ産物をその後にＥｃｏＲＩおよびＢａｍＨＩで消化し、そしてｐＢＴＭ１１６のＥｃｏＲＩ＋ＢａｍＨＩ部位内にクローン化させてＬｅｘＡおよびＦＫＢＰ１２との間のインフレーム融合物を作製した。得られるプラスミドを今後ｐｌＣ５０４として引用する。

Ｂ．　ＬｅｘＡ－（ｇｌｙ）$_6$－ＦＫＢＰ１２おとり

６つのグリシン残基から離れて存在するＬｅｘＡとＦＫＢＰ１２との間のインフレーム融合物を作製する目的で、ヒトＦＫＢＰ１２からのコーディング配列を先の要領でＰＣＲによりクローン化したが、例外はセンスオリゴヌクレオチドにより追加的な１８のオリゴヌクレオチドが提供されることであり、それらのオリゴヌクレオチドには６つのグリシンが融合蛋白質の読み取り枠内に挿入されている。ＰＣＲに用いたオリゴヌクレオチドは：

コーディング鎖

TCG CCC GAA TTC GGG GGC GGA GGT GGA GGA GTA CAA

GTA GAA ACC ATC （配列番号７）

非コーディング鎖
GGG TTT CGG GAT CCC GTC ATT CCA GTT TTA GAA G

（配列番号８）

であった。
ヒトＦＫＢＰ１２コーディング配列を含むＰＣＲ産物をその後にＥｃｏＲＩおよびＢａｍＨＩで消化し、そして先の要領でｐＢＴＭ１１６のＥｃｏＲＩ＋ＢａｍＨＩ部位内にクローン化させた。得られるプラスミドをこれ以降、ｐＩＣ５０６として引用する。
実施例２
ＦＫＢＰ１２欠損株の構築
ＦＫＢ１（ＦＫＢＰ１２のＳ．ケレビシアエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）相同体）を含む１．８ｋｂのＨｉｎｄＩＩＩ－ＥｃｏＲＩイーストゲノム断片をｐＳＰ７２（Ｐｒｏｍｅｇａ社）のＨｉｎｄＩＩＩ＋ＥｃｏＲＩ内にクローン化した。
一段回ＰＣＲ手法を用いて、ＡＴＧ開始コドンからＴＧＡ停止コドンにまで伸展するＦＫＢ１コーディング配列の厳密な欠損を作製した。同時に非反復のＢａｍＨＩ部位をＦＫＢ１コーディング配列の代わりに導入した。ＦＫＢ１欠損の作製および非反復のＨｉｎｄＨＩ部位の導入に用いたオリゴヌクレオチドは：
CGCGGATCCGCGCATTATTACTTGTTTTGATTGATTTTTTG

（配列番号９）

CGCGGATCCGCGTAAAAGCAAAGTACTATCAATTGAGCCG

（配列番号１０）

であった。
その後に３．６ｋｂのＢａｍＨＩ断片上のイーストＡＤＥ２遺伝子を先に記載されるプラスミドの非反復ＢａｍＨＩ部位内にクローン化させてプラスミドｐＶＢ１７２を作製した。ＸｈｏＩ部位が、ＦＫＢ１の５’および３’非コーディング配列内のｐＶＢ１７２のＡＤＥ２破壊マーカーをフランクしている。ｐＶＢ１７２をＸｈｏＩで消化させて、ＦＫＢ１非コーディング配列によりフランクされるＡＤＥ２を含む直線配列を放出させた。この直線配列を用いてイースト株Ｌ４０（Ｍａｔ　ａ　ｈｉｓ３　Δ２００　ｔｒｐｌ－９０１　ｌｅｕ２－３．１１２　ａｄｅ２　ＬＹＳ２：：（ｌｅｘＡｐｏ）４－ＨＩＳ３　ＵＲＡ３：：（ｌｅｘＡｏｐ）$_8$－ＬａｃＺ　ＧＡＬ４　ｇａｌ８０）を形質転換させて、アデニン原栄養性についての選択にかけた。
ＡＤＥ＋イースト形質転換体をラパマイシン耐性について検査して、野生型ＦＫＢ１対立遺伝子がＡＤＥ２に置き換わっていることを確認した。ＦＫＢ１のこの破壊対立遺伝子はＬ４０－ＦＫＢＬ－２と表示される。
実施例３
哺乳類ラパマイシン標的遺伝子のクローニング
我々は先の実施例１に記載される薬剤－依存的相互作用捕獲アッセイを、おとりとしてのＬｅｘＡ結合性－ドメイン融合構築物と共に用いて、ＶＰ１６活性化－ドメイン融合物を含むｃＤＮＡライブラリーからのクローンとの相互作用を検出した。この系内での「読みだし」シグナル伝達相互作用として用いられるレポーターは、Ｓ．　ケレビシアエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＨＩＳ３および大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ）ＬａｃＺ遺伝子である。ベクターｐＶＰ１６中のイースト株Ｌ４０、おとり用ベクタープラスミドｐＢＴＭ１

１６、およびマウス胎仔ＰＣＲライブラリーを用いてｃＤＮＡ融合蛋白質ライブラリーを構築した。
先の実施例２に記載される株Ｌ４０－ｆｋｂ１－２を、２つのおとり用プラスミドの各々、すなわちｐｌＣ５０４（ＬｅｘＡ－ＦＫＢＰ１２融合蛋白質をコードする）もしくはｐｌＣ５０６（ＬｅｘＡ－（ｇｌｙ）$_6$－ＦＫＢＰ１２融合蛋白質をコードする）で形質転換させた。形質転換体Ｌ４０－ｆｋｂ１－２／ｐＩＣ５０４（ＩＣＹ９９と称される）およびＬ４０－ｆｋｂ１－２／ｐＩＣ５０６（ＩＣＹ１０１と称される）をトリプトファンを欠損するイースト培地上で維持した（その培地により、そのおとり用プラスミドを保持する細胞についての選択が行われる）。
性交後１０．５日目のＣＤ１マウス胎仔のポリＡ＋ＲＮＡのランダム－プライム合成を用いる標準的プロトコールにより作製され、かつ３５０ｂｐと７００ｂｐとの間の長さの挿入断片についてサイズ選択してある、ｐＶＰ１６（ｐＳＨ１０．５と表示される）中のマウス胎仔ＰＣＲライブラリーを用いてイーストＩＣＹ９９およびＩＣＹ１０１を形質転換させた。この形質転換化イースト細胞を、トリプトファンおよびロイシンを含まない培地でプレート培養した。各株からの約10^7の形質転換体を合わせ、完全に混合させ、そして－８０℃下で５０％グリセロール中の水溶液として凍結保存した。
スクリーニングの前に細胞を解凍し、液体培地中で５時間成長させ、そして選択的培地上でプレート培養した。約１．５×10^7のＩＣＹ９９／ｐＳＨ１０．５を、（ｉ）トリプトファン、ロイシン、およびヒスチジンを除く全アミノ酸、（ｉｉ）１２５ｎｇ／ｍｌのラパマイシン、（ｉｉｉ）１００ｎｇ／ｍｌの色素産生性基質Ｘ－ｇａｌ、ならびに（ｉｖ）炭素源としての２％グルコースを含むリン酸緩衝化（ｐＨ７）合成アガー培地上に、１５ｃｍのプレート当たり約10^6のプレート培養密度でプレート培養した。低めのラパマイシン濃度（１５．６ｎｇ／ｍｌ）を用いたことを例外としては同一のプロトコールを、ＩＣＹ１０１／ｐＳＨ１０．５形質転換体のスクリーニングのために用いた。
選択培地上で成長し、かつ青色を示すことの両者を行うコロニーを更に詳細な検査用に拾いあげた。これらは成長のためにヒスチジンを必要とはせず、かつβ－ガラクトシダーゼレポーターを発現している細胞を意味する。候補となるコロニーはプレート培養後４～１１日の間に出現し、そして青色の範囲は、非常に薄い青色から暗い青色の範囲にまでわたっていた。その後にこれらのコロニーを後続の検査に供した。
ｉ）ラパマイシン－依存性
各候補物を、ヒスチジンを含まず、かつ１２５ｎｇ／ｍｌ（ＩＣＹ９９／ｐＳＨ１０．５候補物について）、１５．６ｎｇ／ｍｌ（ＩＣＹ１０１／ｐＳＨ１０．５候補物について）のいずれかのラパマイシンを含むか、もしくはラパマイシンを含まない（両候補物について）培地上に線状塗布した。ラパマイシンの存在下で成長し、かつラパマイシンを含まない培地上では成長しない候補クローンを次の検査用に選択した。
ＩＣＹ９９／ｐＳＨ１０．５のスクリーニングについては、ヒスチジンを含まない培地上での増殖についてのスクリーニングにかけた１０７のＨｉｓ＋およびＬａｃＺ＋候補物の内の２４がラパマイシン－依存性であった。ＩＣＹ１０１／ｐＳＨ１０．５については、スクリーニングにかけた１０１のＨｉｓ＋およびＬａｃＺ＋候補物の内の２０がラパマイシン－依存性であった。
ｉｉ）プラスミド－関連作用
染色体突然変異により生じる偽陽性物を除去するために、各候補物を非選択的培地（ＹＰＤ）中で成長させて、おとり（Ｔｒｐ＋＋）およびｃＤＮＡ（Ｌｅｕ＋）プラスミドの喪失を可能にさせた。おとり用プラスミド（Ｔｒｐ－）、ｃＤＮＡ（Ｌｅｕ－）プラスミド、もしくはその両プラスミド（Ｔｒｐ－およびＬｅｕ－）を喪失している細胞、ならびに両プラスミドを保持している細胞（Ｔｒｐ＋およびＬｅｕ＋）を、ラパマイシンは含むがヒスチジンは含まない培地上に線条塗布した。両プラスミドを含む誘導体のみについての候補物（Ｔｒｐ＋およびＬｅｕ＋）は成長する一方で、他の３つの誘導体は成長を示さず、先の候補物を更に詳細な分析のために選択した。
ＩＣＹ９９／ｐＳＨ１０．５のスクリーニングについては２４の内の２３が検査で陽性と

認められた。ＩＣＹ１０１／ｐＳＨ１０．５のスクリーニングについては２０全てが検査で陽性と認められた。

ｉｉｉ）対照のおとりとの陽性および陰性相互作用

従来の検査が、相互作用（おとり用構築物と魚役構築物）のいずれかもしくは両方のメンバーが喪失された際に、その相互作用が消失するかどうかを問題にしていたのに対し、本検査は候補ｃＤＮＡプラスミド（＋Ｌｅｕ）が、様々なおとりを保持するイースト株内に形質転換された際に相互作用を生じさせることができるかどうかを問題にしている。ＤＮＡ試料を各候補物から調製し、そしてそれを用いて大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ）株Ｂ２９０（トリプトファンおよびロイシンについての両栄養性）を形質転換させた。イーストＴＲＰ１およびＬＥＵ２遺伝子が各々その細菌の両栄養性を補うことができるため、おとり用プラスミドを含むＢ２９０細胞はＴｒｐ＋となり、かつトリプトファンを含まない培地上で成長することができる一方で、ｃＤＮＡプラスミドを含むＢ２９０細胞はＬｅｕ＋となり、かつロイシンを含まない培地中で成長することができる。プラスミドＤＮＡ試料は各々以下の様々なおとりを含み、それらは：ｉ）ＩＣＹ９９（スクリーニングに用いられるもともとの株であって、ＬｅｘＡ：：ＦＫＢＰ１２おとり用融合物を含む）；ｉｉ）ＩＣＹ１０１（ＬｅｘＡ：：（ｇｌｙ）$_6$：：ＦＫＢＰ１２おとり用融合物を含む）；およびｉｉｉ）ＩＣＹ１０２（本調査には無関係であり、かつ陰性対照として作用するＬｅｘＡ融合物おとりを含む）、であった。理想的な候補物は、ラパマイシン－依存的様式でＩＣＹ９９およびＩＣＹ１０１にＨｉｓ＋およびＬａｃＺ＋を付与するが、ＩＣＹ１０２にはそのような付与は行わないはずである。

ＩＣＹ９９／ｐＳＨ１０．５のスクリーニングについては２３候補物の内の１１が既述の基準を満たした。ＩＣＹ１０１／ｐＳＨ１０．５のスクリーニングについては２０の候補物の内の１０が既述の基準を満たした。

これらの候補物クローンのｃＤＮＡ挿入断片については、ＡＢＩ蛍光配列決定系を用いて両方の鎖での配列決定を行った。ＩＣＹ９９／ｐＳＨ１０．５のスクリーニングからの全１１の候補物および、ＩＣＹ１０１／ｐＳＨ１０．５のスクリーニングからの１０の候補物の内の少なくとも４つが同一配列の重複性断片を含む。これらの１４のクローンは、各クローンの挿入断片／ベクター境界により判定したところ、ライブラリーからの少なくとも５回の独立したクローニング現象を表している。最長挿入断片と最短挿入断片とはアミノ末端で約７０ｂｐの差があり、そしてアミノ末端では約１０ｂｐの差がある。マウスのラパマイシン／ＦＫＢＰ１２結合性蛋白質（ＲＡＰＴ１）から単離された部分的ヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が配列番号１および配列番号２にそれぞれ示されている。

驚くべきことに、プログラムＢＬＡＳＴを用いるＧｅｎＢａｎｋデータベースの検索により、先の配列によりコードされるペプチドはイーストから既に単離されているＳ．ケレビシアエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のＴＯＲ１（およびＤＲＲ１）、ならびにＴＯＲ２遺伝子産物に対して、６０を下回るパーセントの絶対的相同性ではあるものの、幾分かの相同性を共有することが判明した。

実施例４

ラパマイシン標的遺伝子のヒト相同物のクローニング

マウスライブラリーからラパマイシン－標的－蛋白質をコードする遺伝子のための部分的配列を単離したことで、我々はプローブとしてそのマウス配列を用いてヒト遺伝子を単離する作業に取りかかった。ＲＡＰＴ１クローンの最長挿入断片を含むプラスミドクローンｐＩＣ９９．１．５をハイブリダイゼーション用のプローブとして選択した。この挿入断片（５００ｂｐ）はＮｏｔＩ制限エンドヌクレアーゼでの消化、ならびにその後のアガロースゲル電気泳動および断片精製によりプラスミドＤＮＡから分離された。この断片を、ＤＮＡポリメラーゼのクレノウ（Ｋｌｅｎｏｗ）断片を用いるランダム取り込みによりα－Ｐ^{32}－放射ラベル化ｄＤＮＡで放射ラベル化した。放射ラベル化ＤＮＡプローブをＧ５０カラムにより遊離ヌクレオチドから単離し、アルカリ性変性させ、そして２×１０^{6}ｃｐｍ／ｍｌでハイブリダイゼーションミックスに添加した。

λ－ｐＡＣＴ中のヒトＢ細胞ｃＤＮＡライブラリーの約３×１０^{6}ファージ（図１）を、既述のプローブを用いる、３０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ、５×デンハート溶液（Ｄｅｎｈａｒｄｔｓ）、２０μｇ／ｍｌの変性化サケ精子ＤＮＡ、および１％ＳＤＳ中、３７℃下でのフィルターハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。ハイブリダイゼーション後にそのフィルターを、０．５×ＳＳＣおよび０．１％ＳＤＳ、５０℃下で洗浄した。これらはマウス対ヒトの交差種ハイブリダイゼーションに適切な培地緊縮性の条件を表す。多数の陽性クローンが取得され、そして幾つかを分析した。多数の単離されたクローンは同一遺伝子あるいは非常に密接に関与する遺伝子の様々な３’断片であることが判明し、そしてこの遺伝子は配列分析後に、ヒトＲＡＰＴ１遺伝子であることが決定された。最長のコーディング配列断片を含むクローンは、全長蛋白質の大まかな半分（Ｃ－末端）と考えられるものを含み、かつＦＫＢＰ／ラパマイシン結合性部位および仮想的ＰＩ－キナーゼ活性を含み、このクローンはプラスミドｐＩＣ５２４として表示される。ｐＩＣ５２４からのｐＡＣＴプラスミドの寄託は、ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）において１９９４年５月２７日に、ブダペスト条約（Ｂｕｄａｐｅｓｔ Ｔｒｅａｔｙ）の基に実施された。その寄託物はＡＴＣＣ受託番号７５７８となった。

図１はｐＩＣ５２４のヒトＲＡＰＴ１クローン（ＸｈｏＩ部位での挿入）のマップである。この挿入断片は長さが約３．７４ｋｂあり、そしてその挿入断片からのヌクレオチドＲＡＰＴ１コーディング配列が既に取得され、かつ配列番号１１のヌクレオチド残基４７１７－７７４６により表される。対応するアミノ酸配列は配列番号１２のＨｉｓ１５４１－Ｔｒｐ２５４９により表される。マウスＲＡＰＴ１断片に相当するヒトＲＡＰＴ１クローンの領域は、アミノ酸レベルでは９５％を上回る相同性を示し、そしてヌクレオチドレベルでは９０％の相同性を示す。ｐＩＣ５２４クローンに加え、ヒトＲＡＰＴ１遺伝子の更に別の５’配列が他の重複性クローンから取得され、約５．４ｋｂの部分的遺伝子の３’末端の配列が配列番号１１に示されている。それに加え、配列番号１９により、ＲＡＰＴ１コーディング配列をフランクする追加的３’非コーディング配列（他のクローンから取得された）が提供される。

本配列情報が与えられるとすると、ｐＩＣ５２４中に提供されるＲＡＰＴ１遺伝子配列の全部もしくは所定の断片を増幅するためのＰＣＲプライマーを設計することができることは当業者に明白であろう。例えば、プライマーＴＧＡＡＧＡＴＡＣＣＣＣＡＣＣＡＡＡＣＣＣ（配列番号２１）およびＴＧＣＡＣＡＧＴＴＧＡＡＧＴＧＡＡＣ（配列番号２２）はＸｈｏＩ部位をフランクするｐＡＣＴ配列に相当し、そしてこれらのプライマーを用いてｐＩＣ５２４から全ＲＡＰＴ１配列をＰＣＲ増幅することができる。別法では、配列番号１１の核酸配列に基づくプライマーを用いてｐＩＣ５２４内のＲＡＰＴ１遺伝子の断片を増幅することができる。その後にＰＣＲプライマーを発現ベクター内にサブクローン化し、そしてそれを用いて表題ＲＡＰＴ１蛋白質の組換え形態を産生することができる。従って本方法により、ＡＴＣＣ受託番号７５７８７からのＲＡＰＴ１ヌクレオチド配列を含む組換え遺伝子によりコードされる組換えＲＡＰＴ１蛋白質が提供される。それに加え、既知の配列に基づくＰＣＲプライマーを単純に提供することにより、配列決定が未だに行われていないｐＩＣ５２４の部分さえも含むプライマー／プローブを作製することができることは明白である。

その上、我々の初期データにより、ＲＡＰＴ１に関連する他の蛋白質（例えば、ＲＡＰＴ１相同体）も本アッセイから取得することができることが示され、このことによりＲＡＰＴ１が関連する蛋白質の巨大ファミリーの内の一メンバーであることが示唆される。

実施例５

新規のヒトユビキチン複合体形成性酵素のクローニング

薬剤－依存性相互作用捕獲アッセイについて既述されるものに類似の構築物を用いてｐＧＡＤＧＨ（ＸｈｏＩ挿入断片、Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ社）内のＷＩ３８（G_0期および分裂性繊維芽細胞の混合物）のｃＤＮＡライブラリー（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ社、Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ、ＣＡ）をスクリーニングした。簡潔に述べると、二重ハイブリッドアッセイを既

述の要領で、ＬｅｘＡの代わりにＧＡＬ４構築物を用い、そしてＦＫＢ１遺伝子が破壊されたＨＦ７Ｃイースト細胞（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ社）内で実施した。単離されたクローンの内、新規のヒトユビキチン－複合体形成性酵素（ｒａｐ－ＵＢＣ）が同定された。ｐＧＡＤＧＨプラスミド（クローン「ＳＭＲ４－１５」）の寄託は、ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）において１９９４年5月２７日に、ブダペスト条約（Ｂｕｄａｐｅｓｔ Ｔｒｅａｔｙ）の基に実施された。その寄託物はＡＴＣＣ受託番号７５７８６となった。この挿入断片は約１ｋＢである。

ＳＭＲ４－１５挿入断片の配列ＵＢＣ－コーディング部分が配列番号２３（ヌクレオチド）および配列番号２４（アミノ酸）により示される。このクローンの３’部分のための配列が配列番号２５により提供される。先に示されるように、配列番号２３（および２５）の核酸配列に基づくプライマーを用いてＳＭＲ４－１５からｒａｐ－ＵＢＣ遺伝子の断片を増幅することができる。その後にＰＣＲプライマーを発現ベクター内にサブクローン化し、そしてそれを用いて表題蛋白質の組換え形態を産生することができる。従って、本方法により、ＡＴＣＣ受託番号７５７８６からのｒａｐ－ＵＢＣヌクレオチド配列を含む組換え遺伝子によりコードされる組換えｒａｐ－ＵＢＣ蛋白質が提供される。

実施例６

セリンからアルギニンへのＲＡＰＴ１突然変異体の構築

ＦＫＢＰ１２／ラパマイシン複合体と相互作用を行う最小のｍＲＡＰＴ１クローンは３９９ｂｐであり、このクローンがラパマイシン結合性ドメインを特定する。ＲＡＰＴ１結合性ドメインは脂質キナーゼ共通配列の直ぐ上流ではあるがその配列の外側に位置するイーストＴＯＲ１／ＴＯＲ２内の領域に相当する。この領域は、イーストＴＯＲ内で突然変異を生じる際にはラパマイシンに対する耐性を付与するセリン残基を含む（Ｃａｆｆｅｒｋｅｙ ｅｔ ａｌ.（１９９３） Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １３：６０１２－６０２３）。マウスおよびヒトの両方のＲＡＰＴ１のセリンからアルギニンへの突然変異体をオリゴヌクレオチド突然変異誘発により作製した。ｍＲＡＰＴ１突然変異体の事例では、突然変異を含むコーディングおよび非コーディング鎖オリゴヌクレオチドは：ＧＡＡＧＡＧＧＣＡＡＧＡＣＧＣＴＴＧＴＡＣ（配列番号２６）およびＧＴＡＣＡＡＧＣＧＴＣＴＴＧＣＣＴＣＴＴＣ（配列番号２７）であった。ＰＣＲ反応を、これらのオリゴヌクレオチドをオリゴヌクレオチドＧＡＧＴＴＴＧＡＧＣＡＧＡＴＧＴＴＴＡ（配列番号２８）およびＭ１３万能プライマー（これらは各々、ｐＶＰ１６ベクター、ｍＲＡＰＴ１挿入断片の５’および３’内の配列である）と組み合わせて用いて実施した。ｍＲＡＰ１を含むｐＶＰ１６をＰＣＲ用の鋳型として用いた。ＢａｍＨＩおよびＥｃｏＲＩで消化させたこのＰＣＲ断片をｐＶＰ１６内のＢａｍＨＩおよびＥｃｏＲＩ部位内にクローン化した。得られるクローンの配列決定を行って、そのクローンがセリンからアルギニンへの突然変異を含み、かつ他の突然変異は含まないことを確認した。

ＦＫＢＰ１２／ラパマイシン複合体と相互作用を行う最小のｍＲＡＰＴ１クローンは３９９ｂｐであり、このクローンがＲＡＰＴ１結合性ドメインを特定する。このＲＡＰＴ１結合性ドメインは脂質キナーゼ共通配列の直ぐ上流であるがその配列の外側に位置するイーストＴＯＲ内の領域に相当する。この領域は、イーストＴＯＲ１（ＤＲＲ１とも称される）内で突然変異を生じる際にはラパマイシンに対する耐性を付与するセリン残基を含む（Ｃａｆｆｅｒｋｅｙ ｅｔ ａｌ.（１９９３） Ｍｏｌ.Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ. １３：６０１２－６０２３；Ｈｅｌｌｉｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ.（１９９４） Ｍｏｌ.Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ. ５：１０５－１１８）。対応する突然変異体をｍＲＡＰＴ１内に構築した。セリンからアルギニンへの突然変異により、ＦＫＢＰ１２／ラパマイシン複合体とのｍＲＡＰＴ１の相互作用が解除され（図３を参照されたい）、二重ハイブリッドアッセイにおけるＨＩＳ３もしくはＬａｃＺのいずれの発現も活性化されず、このことによりセリンがｍＲＡＰＴ１とのＦＫＢＰ１２／ラパマイシン複合体の結合に関与することが示される。

実施例７

ノザン分析
複数組織用のノザンブロット（レーン当たりに２μｇのヒトＲＮＡを含む）をＣｌｏｎｅｔｅｃｈ　Ｌａｂｓ．、Ｉｎｃ．社から取得した。ハイブリダイゼーションは、４２℃下、５×ＳＳＰＥ、５×デンンハート溶液（Ｄｅｎｈａｒｄｔ’ｓ）、３０％ホルムアミド、１％ＳＤＳ、および２００μｇ／ｍｌの変性化サケ精子ＤＮＡ中で実施した。洗浄は、５５℃下、０．１×ＳＳＣおよび０．１％　ＳＤＳ中で実施した。このブロットをオートラジオグラフィーにかける前に５日間露出させた。各レーンにかけられたＲＮＡのレベルをヒトＧ３ＰＤＨプローブで同一ブロットをハイブリダイズすることにより独立にモニターし、そしてそのレベルを骨格筋を例外として（これは約２～３０％倍のシグナルを示した）全レーンで類似することが見いだされた。
ＲＡＰＴ１は調査した全組織中に存在する約９ｋｂの単一転写物を特定し、睾丸で最高レベルを示した。この転写物はイーストＴＯＲのサイズ（これは２８４ｋＤａである）に等しい蛋白質をコードするのに十分である。ＲＡＰＴ１がより小さいサイズのものであると仮定して、１３３アミノ酸の小断片が大きな蛋白質内から既にクローン化されているが、この断片はＦＫＢＰ１２／ラパマイシン複合体を結合するのに十分なものである。
実施例８
新規のラパマイシンアナログを同定するための二重ハイブリッド系に基づく高処理量アッセイ
二重ハイブリッド系に基づく高処理量スクリーニング法を開発するために、我々は小分子により媒介される蛋白質－蛋白質相互作用を定量化するための方法を考案した。二重ハイブリッド系内での蛋白質－蛋白質相互作用がｌａｃＺレポーター遺伝子の転写を刺激化するため、このアッセイは、開裂を受けた際には定量化することができる化学ルミネセントシグナルを産生するβ－ガラクトシダーゼ（ｌａｃＺ遺伝子産物）の基質を利用する。このアッセイはマイクロタイタープレート内で実施することができ、このことにより一週間当たり数千の化合物をスクリーニングすることが可能となる。このアッセイは以下の段階を含む：
１．　単一コロニーから５０ｍｌの増殖用培地、すなわちロイシンおよびトリプトファンを含まない合成完全培地（Ｓｈｅｒｍａｎ，Ｆ．（１９９１）　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１９４：３－２０）内へイースト細胞を接種されよ。そのフラスコを一晩、３０℃下で、震盪しながらインキュベートされよ（～２００ｒｐｍ）。
２．　増殖培地中で最終A_{600}が０．０２になるまでそのオーバーナイト培養物を希釈し、そして段階１に記載される要領で一晩インキュベートされよ。
３．　増殖培地中で最終A_{600}が０．０５になるまでその第二オーバーナイト培養物を希釈されよ。Ｑｕａｄｒａ９６ピペッター（ＴｏｍＴｅｃ．Ｉｎｃ社）を用いて、その細胞懸濁物の１３５μｌアリコートを、様々な濃度での検査予定の化合物（１５μｌ／ウエル）を予め充填してある丸底マイクロタイタープレートのウエル内に分配されよ。（これらの化合物は５％のジメチルスルホキシド内に溶解され、そのため細胞に添加される最終ＤＭＳＯ濃度は０．５％となり、この濃度はイースト細胞の成長を不安定にさせることはない）。マイクロタイタープレートに蓋をかぶせ、そして３０℃下で４時間、３００ｒｐｍで震盪させながらインキュベートされよ。
４．　マイクロタイタープレートを１０分間、２０００ｒｐｍで遠心されよ。上清をＱｕａｄｒａ９６ピペッターで除去し、そして２２５μｌのリン酸緩衝化食塩水で洗浄されよ。
５．　１００μｌの溶解用緩衝液（１００ｍＭ　Na_2HPO_4　ｐＨ７．８；０．２％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００；１．０ｍＭ　ジチオスレイトール）を各ウエル内に分配し、蓋をかぶせ、そして室温で３０分間、３００ｒｐｍで震盪させながらインキュベートされよ。
６．　Ｍｉｃｒｏｆｌｕｏｒプレート（Ｄｙｎａｔｅｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社、Ｃｈａｎｔｉｌｌｙ、ＶＡ）の各ウエル内に希釈液（１００ｍＭ　Na_2HPO_4、１ｍＭ　$MgCl_2$、ｐＨ８．０）中の５０μｌの化学ルミネセンス基質Ｇａｌａｃｔｏｎ

Ｐｌｕｓ（商標）（Ｔｒｉｏｐｉｘ，Ｉｎｃ．社、Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡ）を分配されよ。これらのウエルに２０μｌの細胞溶解物を移し入れ、そして暗所で６０分間、室温でインキュベートされよ。

７．　各ウエルに７５μｌのＥｍｅｒａｌ（商標）促進剤を添加されよ。プレートに蓋をかぶせ、そしてＴｏｐｃｏｕｎｔシンチレーション計測器（Ｐａｃｋａｒｄ，Ｉｎｃ．社）内で０．０１分／ウエル間計数されよ。

既述の要領で単離されるラパマイシン標的蛋白質をその定量用アッセイに取り込ませ、そして様々なＦＫＢＰも同様にそのアッセイに取り込ませた。スクリーニング作業に含まれるＦＫＢＰはヒトＦＫＢＰ１２、ならびに病原性真菌類ＦＫＢＰ１３（Ｊｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．　８８：６６７７）およびＦＫＢＰ２５（Ｊｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）　Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．　２６７：２９４２；Ｇａｌａｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）　Ｂｉｏｃｈｅｍ　３１：２４２７－２４３４）からのＦＫＢＰであった。様々なＦＫＢＰ－標的対を含むイースト株をラパマイシンおよびＦＫ５０６アナログのライブラリーに対して検査することができる。このようなスクリーニングにより、（ｉ）特異的標的と一つを上回るＦＫＢＰとの間の相互作用を媒介する標的特異的化合物、（ｉｉ）特別なＦＫＢＰと一つを上回る標的との間の相互作用を媒介するＦＫＢＰ－特異的化合物、および最も理想的には（ｉｉｉ）特別なＦＫＢＰと標的との間の相互作用を媒介するＦＫＢＰ／標的－特異的化合物、を初めとする様々なクラスの化合物を生じることができる。検査用化合物により媒介され、そしてこのアッセイにおいて測定される蛋白質相互作用は免疫抑制性特性、抗－真菌性特性、抗－増殖性特性、および毒性特性、ならびにＦＫＢＰ　ＰＰＩａｓｅ活性の阻害についてのＫｉ値と相関し得る。

既述の定量的化学ルミネセンスアッセイを用いてヒトＬｅｘＡ－ＦＫＢＰ１２およびＶＰ１６－ＲＡＰＴ１の相互作用をラパマイシンの存在および非存在下で分析した。ＦＫＢＰ１２とＲＡＰＴ１との間の相互作用を薬剤濃度の関数として測定した。０～５００ｎｇ／ｍｌのラパマイシンの添加によりβ－ガラクトシダーゼ活性が約千倍増加した。この効果はラパマイシンに特異的であり；同一の濃度範囲にわたるＦＫ５０６はバックグラウンドレベルと比較して顕著にはβ－ガラクトシダーゼ活性を増加させはしなかった。ｌｅｘＡ－ｄａ（対照構築物）をｌｅｘＡ－ＦＫＢＰ１２に置き換える場合には、β－ガラクトシダーゼ活性はラパマイシン添加の関数としては上昇しない。陰性対照でのβ－ガラクトシダーゼの基本レベルは、ＦＫＢＰ１２およびＲＡＰＴ１構築物を含むイースト株（これは、５００ｎｇ／ｍｌのラパマイシンを含む培地中で成長させた）中で検出される最大レベルの０．１パーセントとなる。図２に説明されるこれらの結果により、二重ハイブリッド系内で小分子により媒介される蛋白質相互作用を、高処理量スクリーニングに利用することができるマイクロタイターフォーマット内で定量化およびアッセイすることができることが示される。この二重ハイブリッドフォーマット内で様々なＦＫＢＰおよびＲＡＰＴ１蛋白質を利用することで（図３）ラパマイシンにより媒介される相互作用をこの定量アッセイにおいて測定した。

実施例９

ラパマイシンにより媒介されるインビトロ蛋白質相互作用

ＦＫ５０６－結合性蛋白質およびＲＡＰＴ１蛋白質の薬剤媒介性相互作用はグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）に融合された精製化ＦＫＢＰ１２、ならびにインビトロでの転写および翻訳により調製された^{35}Ｓ－ラベル化ＲＡＰＴ１蛋白質を用いてインビトロで分析される。この目的のためにはＦＫＢＰ１２をｐＧＥＸ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）中のＧＳＴの枠内に融合させる。ＧＳＴ－ＦＫＢＰ１２融合蛋白質は大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ）から発現および精製される（Ｖｏｊｔｅｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）　Ｃｅｌｌ　７４：２０５－２１４）。ＲＡＰＴ１コーディング配列は哺乳類発現ベクターｐＸ（Ｓｕｐｅｒｔｉ－Ｆｕｒｇａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）　Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｓ．　１５１：２３７－２４４）中のＣＭＶおよびＴ７プロモーターの後ろにクローン化される。ＲＡＰＴ１配列はＴ７プロモーターから転写

され、そして^{35}Ｓ－メチオニンを含む反応物で商品として入手可能な試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ社、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）を用いてインビトロで転写される。インビトロ結合のためには（Ｔｏｙｏｓｈｉｍａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９４）　Ｃｅｌｌ　７８：６７－７４）、５～２０μｌのインビトロ転写／翻訳反応物が２００μｌの結合用緩衝液（２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ［ｐＨ７．４］、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０％　グリセロール、０．０５％　ＮＰ－４０）に添加される。グルタチオン－アガロースビーズに連結された１０μｌのＧＳＴ－ＦＫＢＰ１２の添加後に、この反応物を４℃で２時間、回転させながらインキュベートする。様々な濃度の薬剤を、例えば、モルを基準にするとＦＫＢＰ１２のモル濃度の０．１～１０倍で反応物に添加する。対照用反応物には薬剤は全く添加しない。その後にこれらのアガロースビーズを沈殿させ、そして結合用緩衝液で４回洗浄する。結合した蛋白質をレムリ（Ｌａｅｍｍｌｉ）試料用緩衝液中で沸騰させることにより単離し、４～２０％の密度勾配ＳＤＳポリアクリルアミドゲル上で分離させ、そしてオートラジオグラフィーにより可視化させる。薬剤を含む結合性反応物からの^{35}Ｓ－ラベル化ＲＡＰＴ１蛋白質の検出により、薬剤の関数としてＦＫＢＰ１２に対する直接結合が証明される。

実施例１０

複合体形成およびラパマイシン感受性についてのＲＡＰＴ１突然変異の影響

ＲＡＰＴ１のラパマイシン－結合性ドメインを一層具体的にマッピングするためには、ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体に結合しない突然変異体の単離が必要である。先の実施例に記載されるように、ＦＫＢＰ／ラパマイシンとの結合を、ＦＫＢＰ１２がＬｅｘＡへの融合物として発現され、かつＲＡＰＴ１蛋白質がＶＰ１６活性化ドメインへの融合物として発現されるＬｅｘＡ二重ハイブリッド系内で検査することができる。従って突然変異体ＲＡＰＴ１蛋白質のライブラリーが、ＰＣＲにより作製されるランダム突然変異誘発を通すコーディング配列の突然変異により作製される（Ｃａｄｗｅｌｌ　ａｎｄ　Ｊｏｙｃｅ（１９９２）　ＰＣＲ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ａｐｐｌ　２：２８－３３）。ＰＣＲのための５’および３’オリゴヌクレオチドは各々ＢａｍＨＩおよびＥｃｏＲＩ制限部位を含み、これらの制限部位によりその後のＰＣＲ産物のｐＶＰ１６のクローニングが可能となり、そのことによりインフレーム融合物が作製される。それに加え、３’オリゴヌクレオチドは２７ｂｐのＨＡエピトープ配列およびその後に続くインフレーム停止コドンを含む。この融合蛋白質のＣ－末端へのＨＡエピトープ標識の添加により、突然変異体ＲＡＰＴ１蛋白質の特徴決定が可能となる（下記を参照されたい）。

突然変異誘発を完結させる際に、ＥｃｏＲＩ－ＢａｍＨＩ消化させたＰＣＲ産物をｐＶＰ１６内に挿入する。突然変異体ＲＡＰＴ１蛋白質のライブラリーを大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ）内への形質転換により増幅させる。ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体と相互作用するＲＡＰＴ１の能力を損なっているこれらの突然変異体を同定するために、突然変異誘発させたＲＡＰＴ１ライブラリーを、ＬｅｘＡ－ＦＫＢＰおとり用蛋白質を含むイースト株内に組込ませる。各形質転換化細胞は、転写活性化因子ＶＰ１６に融合された個々の一つの突然変異体ＲＡＰＴ１を保持する。ＦＫＢＰと野生型ＲＡＰＴ１との間の相互作用は、その細胞がラパマイシンを含む培地中で成長する際に生じ、その相互作用によりｌａｃＺ発現が誘導され、そしてＸ－ＧＡＬインディケータープレート上でコロニーが青色に変化する。ＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体とＲＡＰＴ１突然変異体との間の相互作用が損なわれているコロニーは、明青色もしくは白色となる。２種類の突然変異体がこの表現型を生じることができ：それらはすなわち、ＲＡＰＴ１の切断異形をもたらすナンセンス突然変異体、もしくはＦＫＢＰ／ラパマイシン複合体へのＲＡＰＴ１の結合性に影響を及ぼすセンス突然変異体である。これら２種類の突然変異体の間を識別するためには、これらのコロニーから作製された全蛋白質抽出物を抗－ＨＡ抗体を用いるウエスタン（Ｗｅｓｔｅｒｎ）ブロット分析に供する。より短めで切断された蛋白質を生じるナンセンス突然変異体はそれらのＣ－末端にＨＡエピトープは含まず、つまり抗－ＨＡ抗体によっては検出されない。それとは逆に、センス突然変異を取り込んでいる全長蛋白質はこの抗体で検出される。ＨＡエピトープを保持する全長ＲＡＰＴ１蛋白質を発現する明青色もしくは白色のコロニーからのライブラリープラスミドは、大腸菌（（Ｅ．　ｃｏｌｉ）内への形質転換により

救済される。この突然変異の位置を配列分析により決定し、そして表現型を、ＬｅｘＡ－ＦＫＢＰ１２を含むイースト株内へこれらのプラスミドを戻す再形質転換により確認する。

再検査を通過した突然変異体を哺乳類発現ベクターｐＸ内にクローン化することができる。その後にｐＸ－ＲＡＰＴ１もしくはｐＸ欠損性ＲＡＰＴ１配列を、ラパマイシンに対する感受性を示すリンパ球系（ＣＴＬＬおよびＫｉｔ２２５）および非リンパ球系（ＭＧ６３およびＲＨ３０）の細胞内に導入する。ラパマイシン感受性に対するこの突然変異の効果を、ＢｒｄＵ取り込みによりモニターされるＤＮＡ合成の阻害に関して測定する。ＦＫＢＰ１２／ラパマイシン複合体に結合することが不可能であることによるラパマイシンの耐性を付与する突然変異体により、そのような突然変異がリンパ球系および非リンパ球系の細胞内での薬剤感受性を媒介することが示される。異なるＲＡＰＴ１が異なるタイプの細胞内での薬剤耐性を媒介するかどうかが特に興味の対照となるところである。

実施例１１

カンジダ　アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）からのＲＡＰＴ１－様ポリペプチドのクローニング

ヒト病原体カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）からＲＡＰＴ１遺伝子の相同体をクローン化する目的で、ＲＡＰＴ１およびＴＯＲ蛋白質の保存化領域に基づく縮重オリゴヌクレオチドを設計し、そしてこれを使用してλＺＡＰ（株３１３５Ａ）内でＣ．アルビカンス（Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓ）　ｃＤＮＡを増幅した。この増幅作業は、９４℃下１分間、５５℃下１分間、および７２℃下１分間の３０周期分からできており、ＰＣＲアンプリマーＧＧＮＡＡＲＧＣＮＣＡＹＣＣＮＣＡＲＧＣおよびＡＴＮＧＣＮＧＧＲＴＡＹＴＧＹＴＧＤＡＴＮＴＣを用いた。このＰＣＲ反応物を２．５％の低融解性アガロースゲル上で分離させ、そのことによりかなり大きめの断片が同定された。この断片を溶出し、そしてｐＣＲＩＩ（ＴＡクローニングシステム、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ社）内にクローン化させた。

このＣ．アルビカンス（Ｃ．　ａｌｂｉｃａｎｓ）　ＤＮＡプローブをニック翻訳により^{32}Ｐ－ラベル化し、そしてこれをサザン（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ）ブロットに用いてその断片の種同一性を確認し、そして更にＣ．アルビカンス（Ｃ．　ａｌｂｉｃａｎｓ）　ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングした。大きめのｃＤＮＡの配列決定によりそれらのクローンの同一性が確認された。Ｃ．アルビカンス（Ｃ．　ａｌｂｉｃａｎｓ）　ＲＡＰＴ１－様ポリペプチドの部分配列が配列番号１３および１４により提供され、その配列内では読み取り枠の表示が行われている。

先に引用される全引用文献および刊行物は、引用により本明細書に取り込まれる。

配　列　表

（１）一般情報：

（ｉ）出願人：

（Ａ）氏名：Ｍｉｔｏｔｉｘ，Ｉｎｃ．

（Ｂ）街路名：Ｏｎｅ　Ｋｅｎｄａｌｌ　Ｓｑｕａｒｅ、Ｂｕｉｌｄｉｎｇ　６００

（Ｃ）市：Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ

（Ｄ）州：ＭＡ

（Ｅ）国：ＵＳＡ

（Ｆ）郵便コード番号（ＺＩＰ）：０２１３９

（Ｇ）電話番号：（６１７）２２５－０００１

（Ｈ）ファックス番号：（６１７）２２５－０００５

（ｉｉ）発明の表題：免疫抑制剤標的蛋白質

（ｉｉｉ）配列数：２５

（ｉｖ）コンピューター解読可能形態：

（Ａ）媒質の種類：フロッピーディスク

（Ｂ）コンピューター：ＩＢＭ　ＰＣ　ｃｏｍｐａｔｉｂｌｅ

（Ｃ）操作システム：ＰＣ－ＤＯＳ／ＭＳ－ＤＯＳ

（Ｄ）ソフトウエアー：ＡＳＣＩＩ（ｔｅｘｔ）
（ｖｉ）これまでの出願データ：
（Ａ）出願番号：米国特許第０８／２５０，７９５号
（Ｂ）出願日：１９９４年５月２７日
（ｖｉ）これまでの出願データ：
（Ａ）出願番号：米国特許第０８／２５０，７９５号
（Ｂ）出願日：１９９４年１２月２０日
（２）配列番号１
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：４８６
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖および二本鎖の両方
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：ｃＤＮＡ
（ｉｘ）配列の特徴：
（Ａ）特徴を表す記号：ＣＤＳ
（Ｂ）存在位置：１．．４８６
（ｘｉ）配列：

```
CTC ACC CGT CAC AAT GCA GCC AAC AAG ATC TTG AAG AAC ATG TGT GAA          48
Leu Thr Arg His Asn Ala Ala Asn Lys Ile Leu Lys Asn Met Cys Glu
  1               5                  10                  15

CAC AGC AAC ACG CTG GTC CAG CAG GCC ATG ATG GTG AGT GAA GAG CTG          96
His Ser Asn Thr Leu Val Gln Gln Ala Met Met Val Ser Glu Glu Leu
            20                  25                  30

ATT CGG GTA GCC ATC CTC TGG CAT GAG ATG TGG CAT GAA GGC CTG GAA         144
Ile Arg Val Ala Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu
        35                  40                  45

GAG GCA TCT CGC TTG TAC TTT GGG GAG AGG AAC GTG AAA GGC ATG TTT         192
Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe
    50                  55                  60

GAG GTG CTG GAG CCC CTG CAT GCT ATG ATG GAA CGG GGT CCC CGG ACT         240
Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Arg Thr
65                  70                  75                  80

CTG AAG GAA ACA TCC TTT AAT CAG GCA TAT GGC CGA GAT TTA ATG GAG         288
Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu
                85                  90                  95

GCA CAA GAA TGG TGT CGA AAG TAC ATG AAG TCG GGG AAC GTC AAG GAC         336
Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp
            100                 105                 110

CTC ACG CAA GCC TGG GAC CTC TAC TAT CAC GTG TTC AGA CGG ATC TCA         384
Leu Thr Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser
        115                 120                 125

AAG CAG CTA CCC CAG CTC ACA TCC CTG GAG CTG CAG TAT GTG TCC CCC         432
Lys Gln Leu Pro Gln Leu Thr Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro
    130                 135                 140

AAA CTT CTG ATG TGC CGA GAC CTT GAG TTG GCT GTG CCA GGA ACA TAC         480
Lys Leu Leu Met Cys Arg Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr
145                 150                 155                 160

GAC CCC                                                                 486
Asp Pro
```

（２）配列番号２
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：１６２
（Ｂ）配列の型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：蛋白質
（ｘｉ）配列：

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

His Ser Asn Thr Leu Val Gln Gln Ala Met Met Val Ser Glu Glu Leu
            20                  25                  30

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

Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe

    50                  55                  60

Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Arg Thr
65                  70                  75                  80

Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu
                85                  90                  95

Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp
            100                 105                 110

Leu Thr Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser
        115                 120                 125

Lys Gln Leu Pro Gln Leu Thr Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro
    130                 135                 140

Lys Leu Leu Met Cys Arg Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Asp Pro
```

（２）配列番号３
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：４０
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：他の核酸
（ｘｉ）配列：

```
GGGTTTGGAA TTCCTAATAA TGTCTGTACA AGTAGAAACC                    40
```

（２）配列番号４
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：３４
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：他の核酸
（ｘｉ）配列：

```
GGGTTTCGGG ATCCCGTCAT TCCAGTTTTA CAAC                          34
```

（２）配列番号５
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：３４８
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：ｃＤＮＡ
（ｉｘ）配列の特徴：
（Ａ）特徴を表す記号：ＣＤＳ
（Ｂ）存在位置：１４．．３２５
（ｘｉ）配列：

```
GGAATTCCTA ATA ATG TCC GTA CAA GTA GAA ACC ATC TCC CCA GGA GAC        49
               Met Ser Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp
                 1               5                  10

GGG CGC ACC TTC CCC AAG CGC GGC CAG ACC TGC GTG GTG CAC TAC ACC        97
Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr
         15                  20                  25

GGG ATG CTT GAA GAT GGA AAG AAA TTT GAT TCC TCC CGT GAC CGT AAC       145
Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn
     30                  35                  40

AAG CCC TTT AAG TTT ATG CTA GGC AAG CAG GAG GTG ATC CGA GGC TGG       193
Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp
 45                  50                  55                  60

GAA GAA GGG GTT GCC CAG ATG AGT GTG GGT CAG CGT GCC AAA CTG ACT       241
Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr
                 65                  70                  75

ATA TCT CCA GAT TAT GCC TAT GGT GCC ACT GGG CAC CCA GGC ATC ATC       289
Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile
             80                  85                  90

CCA CCA CAT GCC ACT CTC GTC TTC GAT GTG GAG CTT CTAAAACTGG            335
Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu
         95                  100

AATGACGGGA TCC                                                       348
```

（２）配列番号６
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：１０４
（Ｂ）配列の型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：蛋白質
（ｘｉ）配列：

Met Ser Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe
1 5 10 15

Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu
20 25 30

Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys
35 40 45

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

Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp
65 70 75 80

Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala
85 90 95

Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu
100

（２）配列番号７
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：４８
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：他の核酸
（ｘｉ）配列：
TCGCCGGAAT TCGGGGGCGG AGGTGGAGGA GTACAAGTAG AAACCATC 48

（２）配列番号８
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：３４
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：他の核酸
（ｘｉ）配列：
GGGTTTCGGG ATCCCGTCAT TCCAGTTTTA GAAG 34

（２）配列番号９
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：４１
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：他の核酸
（ｘｉ）配列：
CGCGGATCCG CGCATTATTA CTTGTTTTGA TTGATTTTTT G 41

（２）配列番号１０
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：４０
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：他の核酸

（ｘｉ）配列：
CGCGGATCCG CGTAAAAGCA AAGTACTATC AATTGAGCCG 40

（２）配列番号１１
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：７８２４
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖および二本鎖の両方
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：ｃＤＮＡ
（ｉｘ）配列の特徴：
（Ａ）特徴を表す記号：ＣＤＳ
（Ｂ）存在位置：９７．．７７４３
（ｘｉ）配列：

```
AAGGCGGGCG GTGGGGCACG GGGCCTGAAG CGGCGGTACC GGTGCTGGCG GCGGCAGCTG      60

AGGCCTTGGC CGAAGCCGCG CGAACCTCAG GGCAAG ATG CTT GGA ACC GGA CCT       114
                                        Met Leu Gly Thr Gly Pro
                                          1               5

GCC GCC GCC ACC ACC GCT GCC ACC ACA TCT AGC AAT GTG AGC GTC CTG       162
Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ser Ser Asn Val Ser Val Leu
             10                  15                  20

CAG CAG TTT GCC AGT GGC CTA AAG AGC CGG AAT GAG GAA ACC AGG GCC       210
Gln Gln Phe Ala Ser Gly Leu Lys Ser Arg Asn Glu Glu Thr Arg Ala
```

```
          25                  30                  35

AAA GCC GCC AAG GAG CTC CAG CAC TAT GTC ACC ATG GAA CTC CGA GAG      258
Lys Ala Ala Lys Glu Leu Gln His Tyr Val Thr Met Glu Leu Arg Glu
     40                  45                  50

ATG AGT CAA GAG GAG TCT ACT CGC TTC TAT GAC CAA CTG AAC CAT CAC      306
Met Ser Gln Glu Glu Ser Thr Arg Phe Tyr Asp Gln Leu Asn His His
 55                  60                  65                  70

ATT TTT GAA TTG GTT TCC AGC TCA GAT GCC AAT GAG AGG AAA GGT GGC      354
Ile Phe Glu Leu Val Ser Ser Ser Asp Ala Asn Glu Arg Lys Gly Gly
                 75                  80                  85

ATC TTG GCC ATA GCT AGC CTC ATA GGA GTG GAA GGT GGG AAT GCC ACC      402
Ile Leu Ala Ile Ala Ser Leu Ile Gly Val Glu Gly Gly Asn Ala Thr
             90                  95                 100

CGA ATT GGC AGA TTT GCC AAC TAT CTT CGG AAC CTC CTC CCC TCC AAT      450
Arg Ile Gly Arg Phe Ala Asn Tyr Leu Arg Asn Leu Leu Pro Ser Asn
        105                 110                 115

GAC CCA GTT GTC ATG GAA ATG GCA TCC AAG GCC ATT GGC CGT CTT GCC      498
Asp Pro Val Val Met Glu Met Ala Ser Lys Ala Ile Gly Arg Leu Ala
    120                 125                 130

ATG GCA GGG GAC ACT TTT ACC GCT GAG TAC GTG GAA TTT GAG GTG AAG      546
Met Ala Gly Asp Thr Phe Thr Ala Glu Tyr Val Glu Phe Glu Val Lys
135                 140                 145                 150

CGA GCC CTG GAA TGG CTG GGT GCT GAC CGC AAT GAG GGC CGG AGA CAT      594
Arg Ala Leu Glu Trp Leu Gly Ala Asp Arg Asn Glu Gly Arg Arg His
                155                 160                 165

GCA GCT GTC CTG GTT CTC CGT GAG CTG GCC ATC AGC GTC CCT ACC TTC      642
Ala Ala Val Leu Val Leu Arg Glu Leu Ala Ile Ser Val Pro Thr Phe
            170                 175                 180

TTC TTC CAG CAA GTG CAA CCC TTC TTT GAC AAC ATT TTT GTG GCC GTG      690
Phe Phe Gln Gln Val Gln Pro Phe Phe Asp Asn Ile Phe Val Ala Val
        185                 190                 195

TGG GAC CCC AAA CAG GCC ATC CGT GAG GGA GCT GTA GCC GCC CTT CGT      738
Trp Asp Pro Lys Gln Ala Ile Arg Glu Gly Ala Val Ala Ala Leu Arg
    200                 205                 210

GCC TGT CTG ATT CTC ACA ACC CAG CGT GAG CCG AAG GAG ATG CAG AAG      786
Ala Cys Leu Ile Leu Thr Thr Gln Arg Glu Pro Lys Glu Met Gln Lys
215                 220                 225                 230

CCT CAG TGG TAC AGG CAC ACA TTT GAA GAA GCA GAG AAG GGA TTT GAT      834
Pro Gln Trp Tyr Arg His Thr Phe Glu Glu Ala Glu Lys Gly Phe Asp
                235                 240                 245

GAG ACC TTG GCC AAA GAG AAG GGC ATG AAT CGG GAT GAT CGG ATC CAT      882
Glu Thr Leu Ala Lys Glu Lys Gly Met Asn Arg Asp Asp Arg Ile His
            250                 255                 260
```

```
GGA GCC TTG TTG ATC CTT AAC GAG CTG GTC CGA ATC AGC AGC ATG GAG        930
Gly Ala Leu Leu Ile Leu Asn Glu Leu Val Arg Ile Ser Ser Met Glu
        265                 270                 275

GGA GAG CGT CTG AGA GAA GAA ATG GAA GAA ATC ACA CAG CAG CAG CTG        978
Gly Glu Arg Leu Arg Glu Glu Met Glu Glu Ile Thr Gln Gln Gln Leu
    280                 285                 290

GTA CAC GAC AAG TAC TGC AAA GAT CTC ATG GGC TTC GGA ACA AAA CCT       1026
Val His Asp Lys Tyr Cys Lys Asp Leu Met Gly Phe Gly Thr Lys Pro
295                 300                 305                 310

CGT CAC ATT ACC CCC TTC ACC AGT TTC CAG GCT GTA CAG CCC CAG CAG       1074
Arg His Ile Thr Pro Phe Thr Ser Phe Gln Ala Val Gln Pro Gln Gln
                315                 320                 325

TCA AAT GCC TTG GTG GGG CTG CTG GGG TAC AGC TCT CAC CAA GGC CTC       1122
Ser Asn Ala Leu Val Gly Leu Leu Gly Tyr Ser Ser His Gln Gly Leu
            330                 335                 340

ATG GGA TTT GGG ACC TCC CCC AGT CCA GCT AAG TCC ACC CTG GTG GAG       1170
Met Gly Phe Gly Thr Ser Pro Ser Pro Ala Lys Ser Thr Leu Val Glu
        345                 350                 355

AGC CGG TGT TGC AGA GAC TTG ATG GAG GAG AAA TTT GAT CAG GTG TGC       1218
Ser Arg Cys Cys Arg Asp Leu Met Glu Glu Lys Phe Asp Gln Val Cys
    360                 365                 370

CAG TGG GTG CTG AAA TGC AGG AAT AGC AAG AAC TCG CTG ATC CAA ATG       1266
Gln Trp Val Leu Lys Cys Arg Asn Ser Lys Asn Ser Leu Ile Gln Met
375                 380                 385                 390

ACA ATC CTT AAT TTG TTG CCC CGC TTG GCT GCA TTC CGA CCT TCT GCC       1314
Thr Ile Leu Asn Leu Leu Pro Arg Leu Ala Ala Phe Arg Pro Ser Ala
                395                 400                 405

TTC ACA GAT ACC CAG TAT CTC CAA GAT ACC ATG AAC CAT GTC CTA AGC       1362
Phe Thr Asp Thr Gln Tyr Leu Gln Asp Thr Met Asn His Val Leu Ser
            410                 415                 420

TGT GTC AAG AAG GAG AAG GAA CGT ACA GCG GCC TTC CAA GCC CTG GGG       1410
Cys Val Lys Lys Glu Lys Glu Arg Thr Ala Ala Phe Gln Ala Leu Gly
        425                 430                 435

CTA CTT TCT GTG GCT GTG AGG TCT GAG TTT AAG GTC TAT TTG CCT CGC       1458
Leu Leu Ser Val Ala Val Arg Ser Glu Phe Lys Val Tyr Leu Pro Arg
    440                 445                 450

GTG CTG GAC ATC ATC CGA GCG GCC CTG CCC CCA AAG GAC TTC GCC CAT       1506
Val Leu Asp Ile Ile Arg Ala Ala Leu Pro Pro Lys Asp Phe Ala His
455                 460                 465                 470

AAG AGG CAG AAG GCA ATG CAG GTG GAC GCC ACA GTC TTC ACT TGC ATC       1554
Lys Arg Gln Lys Ala Met Gln Val Asp Ala Thr Val Phe Thr Cys Ile
                475                 480                 485

AGC ATG CTG GCT CGA GCA ATG GGG CCA GGC ATC CAG CAG GAT ATC AAG       1602
Ser Met Leu Ala Arg Ala Met Gly Pro Gly Ile Gln Gln Asp Ile Lys
```

```
                490                 495                 500

GAG CTG CTG GAG CCC ATG CTG GCA GTG GGA CTA AGC CCT GCC CTC ACT      1650
Glu Leu Leu Glu Pro Met Leu Ala Val Gly Leu Ser Pro Ala Leu Thr
        505                 510                 515

GCA GTG CTC TAC GAC CTG AGC CGT CAG ATT CCA CAG CTA AAG AAG GAC      1698
Ala Val Leu Tyr Asp Leu Ser Arg Gln Ile Pro Gln Leu Lys Lys Asp
    520                 525                 530

ATT CAA GAT GGG CTA CTG AAA ATG CTG TCC CTG GTC CTT ATG CAC AAA      1746
Ile Gln Asp Gly Leu Leu Lys Met Leu Ser Leu Val Leu Met His Lys
535                 540                 545                 550

CCC CTT CGC CAC CCA GGC ATG CCC AAG GGC CTG GCC CAT CAG CTG GCC      1794
Pro Leu Arg His Pro Gly Met Pro Lys Gly Leu Ala His Gln Leu Ala
                555                 560                 565

TCT CCT GGC CTC ACG ACC CTC CCT GAG GCC AGC GAT GTG GGC AGC ATC      1842
Ser Pro Gly Leu Thr Thr Leu Pro Glu Ala Ser Asp Val Gly Ser Ile
            570                 575                 580

ACT CTT GCC CTC CGA ACG CTT GGC AGC TTT GAA TTT GAA GGC CAC TCT      1890
Thr Leu Ala Leu Arg Thr Leu Gly Ser Phe Glu Phe Glu Gly His Ser
        585                 590                 595

CTG ACC CAA TTT GTT CGC CAC TGT GCG GAT CAT TTC CTG AAC AGT GAG      1938
Leu Thr Gln Phe Val Arg His Cys Ala Asp His Phe Leu Asn Ser Glu
    600                 605                 610

CAC AAG GAG ATC CGC ATG GAG GCT GCC CGC ACC TGC TCC CGC CTG CTC      1986
His Lys Glu Ile Arg Met Glu Ala Ala Arg Thr Cys Ser Arg Leu Leu
615                 620                 625                 630

ACA CCC TCC ATC CAC CTC ATC AGT GGC CAT GCT CAT GTG GTT AGC CAG      2034
Thr Pro Ser Ile His Leu Ile Ser Gly His Ala His Val Val Ser Gln
                635                 640                 645

ACC GCA GTG CAA GTG GTG GCA GAT GTG CTT AGC AAA CTG CTC GTA GTT      2082
Thr Ala Val Gln Val Val Ala Asp Val Leu Ser Lys Leu Leu Val Val
            650                 655                 660

GGG ATA ACA GAT CCT GAC CCT GAC ATT CGC TAC TGT GTC TTG GCG TCC      2130
Gly Ile Thr Asp Pro Asp Pro Asp Ile Arg Tyr Cys Val Leu Ala Ser
        665                 670                 675

CTG GAC GAG CGC TTT GAT GCA CAC CTG GCC CAG GCG GAG AAC TTG CAG      2178
Leu Asp Glu Arg Phe Asp Ala His Leu Ala Gln Ala Glu Asn Leu Gln
    680                 685                 690

GCC TTG TTT GTG GCT CTG AAT GAC CAG GTG TTT GAG ATC CGG GAG CTG      2226
Ala Leu Phe Val Ala Leu Asn Asp Gln Val Phe Glu Ile Arg Glu Leu
695                 700                 705                 710

GCC ATC TGC ACT GTG GGC CGA CTC AGT AGC ATG AAC CCT GCC TTT GTC      2274
Ala Ile Cys Thr Val Gly Arg Leu Ser Ser Met Asn Pro Ala Phe Val
                715                 720                 725
```

```
ATG CCT TTC CTG CGC AAG ATG CTC ATC CAG ATT TTG ACA GAG TTG GAG      2322
Met Pro Phe Leu Arg Lys Met Leu Ile Gln Ile Leu Thr Glu Leu Glu
            730                 735                 740

CAC AGT GGG ATT GGA AGA ATC AAA GAG CAG AGT GCC CGC ATG CTG GGG      2370
His Ser Gly Ile Gly Arg Ile Lys Glu Gln Ser Ala Arg Met Leu Gly
        745                 750                 755

CAC CTG GTC TCC AAT GCC CCC CGA CTC ATC CGC CCC TAC ATG GAG CCT      2418
His Leu Val Ser Asn Ala Pro Arg Leu Ile Arg Pro Tyr Met Glu Pro
    760                 765                 770

ATT CTG AAG GCA TTA ATT TTG AAA CTG AAA GAT CCA GAC CCT GAT CCA      2466
Ile Leu Lys Ala Leu Ile Leu Lys Leu Lys Asp Pro Asp Pro Asp Pro
775                 780                 785                 790

AAC CCA GGT GTG ATC AAT AAT GTC CTG GCA ACA ATA GGA GAA TTG GCA      2514
Asn Pro Gly Val Ile Asn Asn Val Leu Ala Thr Ile Gly Glu Leu Ala
                795                 800                 805

CAG GTT AGT GGC CTG GAA ATG AGG AAA TGG GTT GAT GAA CTT TTT ATT      2562
Gln Val Ser Gly Leu Glu Met Arg Lys Trp Val Asp Glu Leu Phe Ile
            810                 815                 820

ATC ATC ATG GAC ATG CTC CAG GAT TCC TCT TTG TTG GCC AAA AGG CAG      2610
Ile Ile Met Asp Met Leu Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Lys Arg Gln
        825                 830                 835

GTG GCT CTG TGG ACC CTG GGA CAG TTG GTG GCC AGC ACT GGC TAT GTA      2658
Val Ala Leu Trp Thr Leu Gly Gln Leu Val Ala Ser Thr Gly Tyr Val
    840                 845                 850

GTA GAG CCC TAC AGG AAG TAC CCT ACT TTG CTT GAG GTG CTA CTG AAT      2706
Val Glu Pro Tyr Arg Lys Tyr Pro Thr Leu Leu Glu Val Leu Leu Asn
855                 860                 865                 870

TTT CTG AAG ACT GAG CAG AAC CAG GGT ACA CGC AGA GAG GCC ATC CGT      2754
Phe Leu Lys Thr Glu Gln Asn Gln Gly Thr Arg Arg Glu Ala Ile Arg
                875                 880                 885

GTG TTA GGG CTT TTA GGG GCT TTG GAT CCT TAC AAG CAC AAA GTG AAC      2802
Val Leu Gly Leu Leu Gly Ala Leu Asp Pro Tyr Lys His Lys Val Asn
            890                 895                 900

ATT GGC ATG ATA GAC CAG TCC CGG GAT GCC TCT GCT GTC AGC CTG TCA      2850
Ile Gly Met Ile Asp Gln Ser Arg Asp Ala Ser Ala Val Ser Leu Ser
        905                 910                 915

GAA TCC AAG TCA AGT CAG GAT TCC TCT GAC TAT AGC ACT AGT GAA ATG      2898
Glu Ser Lys Ser Ser Gln Asp Ser Ser Asp Tyr Ser Thr Ser Glu Met
    920                 925                 930

CTG GTC AAC ATG GGA AAC TTG CCT CTG GAT GAG TTC TAC CCA GCT GTG      2946
Leu Val Asn Met Gly Asn Leu Pro Leu Asp Glu Phe Tyr Pro Ala Val
935                 940                 945                 950

TCC ATG GTG GCC CTG ATG CGG ATC TTC CGA GAC CAG TCA CTC TCT CAT      2994
Ser Met Val Ala Leu Met Arg Ile Phe Arg Asp Gln Ser Leu Ser His
```

```
                955                 960                 965

CAT CAC ACC ATG GTT GTC CAG GCC ATC ACC TTC ATC TTC AAG TCC CTG      3042
His His Thr Met Val Val Gln Ala Ile Thr Phe Ile Phe Lys Ser Leu
            970                 975                 980

GGA CTC AAA TGT GTG CAG TTC CTG CCC CAG GTC ATG CCC ACG TTC CTT      3090
Gly Leu Lys Cys Val Gln Phe Leu Pro Gln Val Met Pro Thr Phe Leu
        985                 990                 995

AAT GTC ATT CGA GTC TGT GAT GGG GCC ATC CGG GAA TTT TTG TTC CAG      3138
Asn Val Ile Arg Val Cys Asp Gly Ala Ile Arg Glu Phe Leu Phe Gln
    1000                1005                1010

CAG CTG GGA ATG TTG GTG TCC TTT GTG AAG AGC CAC ATC AGA CCT TAT      3186
Gln Leu Gly Met Leu Val Ser Phe Val Lys Ser His Ile Arg Pro Tyr
1015                1020                1025                1030

ATG GAT GAA ATA GTC ACC CTC ATG AGA GAA TTC TGG GTC ATG AAC ACC      3234
Met Asp Glu Ile Val Thr Leu Met Arg Glu Phe Trp Val Met Asn Thr
                1035                1040                1045

TCA ATT CAG AGC ACG ATC ATT CTT CTC ATT GAG CAA ATT GTG GTA GCT      3282
Ser Ile Gln Ser Thr Ile Ile Leu Leu Ile Glu Gln Ile Val Val Ala
            1050                1055                1060

CTT GGG GGT GAA TTT AAG CTC TAC CTG CCC CAG CTG ATC CCA CAC ATG      3330
Leu Gly Gly Glu Phe Lys Leu Tyr Leu Pro Gln Leu Ile Pro His Met
        1065                1070                1075

CTG CGT GTC TTC ATG CAT GAC AAC AGC CCA GGC CGC ATT GTC TCT ATC      3378
Leu Arg Val Phe Met His Asp Asn Ser Pro Gly Arg Ile Val Ser Ile
    1080                1085                1090

AAG TTA CTG GCT GCA ATC CAG CTG TTT GGC GCC AAC CTG GAT GAC TAC      3426
Lys Leu Leu Ala Ala Ile Gln Leu Phe Gly Ala Asn Leu Asp Asp Tyr
1095                1100                1105                1110

CTG CAT TTA CTG CTG CCT CCT ATT GTT AAG TTG TTT GAT GCC CCT GAA      3474
Leu His Leu Leu Leu Pro Pro Ile Val Lys Leu Phe Asp Ala Pro Glu
                1115                1120                1125

GCT CCA CTG CCA TCT CGA AAG GCA GCG CTA GAG ACT GTG GAC CGC CTG      3522
Ala Pro Leu Pro Ser Arg Lys Ala Ala Leu Glu Thr Val Asp Arg Leu
            1130                1135                1140

ACG GAG TCC CTG GAT TTC ACT GAC TAT GCC TCC CGG ATC ATT CAC CCT      3570
Thr Glu Ser Leu Asp Phe Thr Asp Tyr Ala Ser Arg Ile Ile His Pro
        1145                1150                1155

ATT GTT CGA ACA CTG GAC CAG AGC CCA GAA CTG CGC TCC ACA GCC ATG      3618
Ile Val Arg Thr Leu Asp Gln Ser Pro Glu Leu Arg Ser Thr Ala Met
    1160                1165                1170

GAC ACG CTG TCT TCA CTT GTT TTT CAG CTG GGG AAG AAG TAC CAA ATT      3666
Asp Thr Leu Ser Ser Leu Val Phe Gln Leu Gly Lys Lys Tyr Gln Ile
1175                1180                1185                1190
```

```
TTC ATT CCA ATG GTG AAT AAA GTT CTG GTG CGA CAC CGA ATC AAT CAT      3714
Phe Ile Pro Met Val Asn Lys Val Leu Val Arg His Arg Ile Asn His
                1195                1200                1205

CAG CGC TAT GAT GTG CTC ATC TGC AGA ATT GTC AAG GGA TAC ACA CTT      3762
Gln Arg Tyr Asp Val Leu Ile Cys Arg Ile Val Lys Gly Tyr Thr Leu
            1210                1215                1220

GCT GAT GAA GAG GAG GAT CCT TTG ATT TAC CAG CAT CGG ATG CTT AGG      3810
Ala Asp Glu Glu Glu Asp Pro Leu Ile Tyr Gln His Arg Met Leu Arg
        1225                1230                1235

AGT GGC CAA GGG GAT GCA TTG GCT AGT GGA CCA GTG GAA ACA GGA CCC      3858
Ser Gly Gln Gly Asp Ala Leu Ala Ser Gly Pro Val Glu Thr Gly Pro
    1240                1245                1250

ATG AAG AAA CTG CAC GTC AGC ACC ATC AAC CTC CAA AAG GCC TGG GGC      3906
Met Lys Lys Leu His Val Ser Thr Ile Asn Leu Gln Lys Ala Trp Gly
1255                1260                1265                1270

GCT GCC AGG AGG GTC TCC AAA GAT GAC TGG CTG GAA TGG CTG AGA CGG      3954
Ala Ala Arg Arg Val Ser Lys Asp Asp Trp Leu Glu Trp Leu Arg Arg
                1275                1280                1285

CTG AGC CTG GAG CTG CTG AAG GAC TCA TCA TCG CCC TCC CTG CGC TCC      4002
Leu Ser Leu Glu Leu Leu Lys Asp Ser Ser Ser Pro Ser Leu Arg Ser
            1290                1295                1300

TGC TGG GCC CTG GCA CAG GCC TAC AAC CCG ATG GCC AGG GAT CTC TTC      4050
Cys Trp Ala Leu Ala Gln Ala Tyr Asn Pro Met Ala Arg Asp Leu Phe
        1305                1310                1315

AAT GCT GCA TTT GTG TCC TGC TGG TCT GAA CTG AAT GAA GAT CAA CAG      4098
Asn Ala Ala Phe Val Ser Cys Trp Ser Glu Leu Asn Glu Asp Gln Gln
    1320                1325                1330

GAT GAG CTC ATC AGA AGC ATC GAG TTG GCC CTC ACC TCA CAA GAC ATC      4146
Asp Glu Leu Ile Arg Ser Ile Glu Leu Ala Leu Thr Ser Gln Asp Ile
1335                1340                1345                1350

GCT GAA GTC ACA CAG ACC CTC TTA AAC TTG GCT GAA TTC ATG GAA CAC      4194
Ala Glu Val Thr Gln Thr Leu Leu Asn Leu Ala Glu Phe Met Glu His
                1355                1360                1365

AGT GAC AAG GGC CCC CTG CCA CTG AGA GAT GAC AAT GGC ATT GTT CTG      4242
Ser Asp Lys Gly Pro Leu Pro Leu Arg Asp Asp Asn Gly Ile Val Leu
            1370                1375                1380

CTG GGT GAG AGA GCT GCC AAG TGC CGA GCA TAT GCC AAA GCA CTA CAC      4290
Leu Gly Glu Arg Ala Ala Lys Cys Arg Ala Tyr Ala Lys Ala Leu His
        1385                1390                1395

TAC AAA GAA CTG GAG TTC CAG AAA GGC CCC ACC CCT GCC ATT CTA GAA      4338
Tyr Lys Glu Leu Glu Phe Gln Lys Gly Pro Thr Pro Ala Ile Leu Glu
    1400                1405                1410

TCT CTC ATC AGC ATT AAT AAT AAG CTA CAG CAG CCG GAG GCA GCG GCC      4386
Ser Leu Ile Ser Ile Asn Asn Lys Leu Gln Gln Pro Glu Ala Ala Ala
```

```
1415                1420                1425                1430

GGA GTG TTA GAA TAT GCC ATG AAA CAC TTT GGA GAG CTG GAG ATC CAG      4434
Gly Val Leu Glu Tyr Ala Met Lys His Phe Gly Glu Leu Glu Ile Gln
                1435                1440                1445

GCT ACC TGG TAT GAG AAA CTG CAC GAG TGG GAG GAT GCC CTT GTG GCC      4482
Ala Thr Trp Tyr Glu Lys Leu His Glu Trp Glu Asp Ala Leu Val Ala
            1450                1455                1460

TAT GAC AAG AAA ATG GAC ACC AAC AAG GAC GAC CCA GAG CTG ATG CTG      4530
Tyr Asp Lys Lys Met Asp Thr Asn Lys Asp Asp Pro Glu Leu Met Leu
        1465                1470                1475

GGC CGC ATG CGC TGC CTC GAG GCC TTG GGG GAA TGG GGT CAA CTC CAC      4578
Gly Arg Met Arg Cys Leu Glu Ala Leu Gly Glu Trp Gly Gln Leu His
    1480                1485                1490

CAG CAG TGC TGT GAA AAG TGG ACC CTG GTT AAT GAT GAG ACC CAA GCC      4626
Gln Gln Cys Cys Glu Lys Trp Thr Leu Val Asn Asp Glu Thr Gln Ala
1495                1500                1505                1510

AAG ATG GCC CGG ATG GCT GCT GCA GCT GCA TGG GGT TTA GGT CAG TGG      4674
Lys Met Ala Arg Met Ala Ala Ala Ala Ala Trp Gly Leu Gly Gln Trp
                1515                1520                1525

GAC AGC ATG GAA GAA TAC ACC TGT ATG ATC CCT CGG GAC ACC CAT GAT      4722
Asp Ser Met Glu Glu Tyr Thr Cys Met Ile Pro Arg Asp Thr His Asp
            1530                1535                1540

GGG GCA TTT TAT AGA GCT GTG CTG GCA CTG CAT CAG GAC CTC TTC TCC      4770
Gly Ala Phe Tyr Arg Ala Val Leu Ala Leu His Gln Asp Leu Phe Ser
        1545                1550                1555

TTG GCA CAA CAG TGC ATT GAC AAG GCC AGG GAC CTG CTG GAT GCT GAA      4818
Leu Ala Gln Gln Cys Ile Asp Lys Ala Arg Asp Leu Leu Asp Ala Glu
    1560                1565                1570

TTA ACT GCA ATG GCA GGA GAG AGT TAC AGT CGG GCA TAT GGG GCC ATG      4866
Leu Thr Ala Met Ala Gly Glu Ser Tyr Ser Arg Ala Tyr Gly Ala Met
1575                1580                1585                1590

GTT TCT TGC CAC ATG CTG TCC GAG CTG GAG GAG GTT ATC CAG TAC AAA      4914
Val Ser Cys His Met Leu Ser Glu Leu Glu Glu Val Ile Gln Tyr Lys
                1595                1600                1605

CTT GTC CCC GAG CGA CGA GAG ATC ATC CGC CAG ATC TGG TGG GAG AGA      4962
Leu Val Pro Glu Arg Arg Glu Ile Ile Arg Gln Ile Trp Trp Glu Arg
            1610                1615                1620

CTG CAG GGC TGC CAG CGT ATC GTA GAG GAC TGG CAG AAA ATC CTT ATG      5010
Leu Gln Gly Cys Gln Arg Ile Val Glu Asp Trp Gln Lys Ile Leu Met
        1625                1630                1635

GTG CGG TCC CTT GTG GTC AGC CCT CAT GAA GAC ATG AGA ACC TGG CTC      5058
Val Arg Ser Leu Val Val Ser Pro His Glu Asp Met Arg Thr Trp Leu
    1640                1645                1650
```

```
AAG TAT GCA AGC CTG TGC GGC AAG AGT GGC AGG CTG GCT CTT GCT CAT      5106
Lys Tyr Ala Ser Leu Cys Gly Lys Ser Gly Arg Leu Ala Leu Ala His
1655                 1660                 1665                 1670

AAA ACT TTA GTG TTG CTC CTG GGA GTT GAT CCG TCT CGG CAA CTT GAC      5154
Lys Thr Leu Val Leu Leu Leu Gly Val Asp Pro Ser Arg Gln Leu Asp
                1675                 1680                 1685

CAT CCT CTG CCA ACA GTT CAC CCT CAG GTG ACC TAT GCC TAC ATG AAA      5202
His Pro Leu Pro Thr Val His Pro Gln Val Thr Tyr Ala Tyr Met Lys
            1690                 1695                 1700

AAC ATG TGG AAG AGT GCC CGC AAG ATC GAT GCC TTC CAG CAC ATG CAG      5250
Asn Met Trp Lys Ser Ala Arg Lys Ile Asp Ala Phe Gln His Met Gln
        1705                 1710                 1715

CAT TTT GTC CAG ACC ATG CAG CAA CAG GCC CAG CAT GCC ATC GCT ACT      5298
His Phe Val Gln Thr Met Gln Gln Gln Ala Gln His Ala Ile Ala Thr
    1720                 1725                 1730

GAG GAC CAG CAG CAT AAG CAG GAA CTG CAC AAG CTC ATG GCC CGA TGC      5346
Glu Asp Gln Gln His Lys Gln Glu Leu His Lys Leu Met Ala Arg Cys
1735                 1740                 1745                 1750

TTC CTG AAA CTT GGA GAG TGG CAG CTG AAT CTA CAG GGC ATC AAT GAG      5394
Phe Leu Lys Leu Gly Glu Trp Gln Leu Asn Leu Gln Gly Ile Asn Glu
                1755                 1760                 1765

AGC ACA ATC CCC AAA GTG CTG CAG TAC TAC AGC GCC GCC ACA GAG CAC      5442
Ser Thr Ile Pro Lys Val Leu Gln Tyr Tyr Ser Ala Ala Thr Glu His
            1770                 1775                 1780

GAC CGC AGC TGG TAC AAG GCC TGG CAT GCG TGG GCA GTG ATG AAC TTC      5490
Asp Arg Ser Trp Tyr Lys Ala Trp His Ala Trp Ala Val Met Asn Phe
        1785                 1790                 1795

GAA GCT GTG CTA CAC TAC AAA CAT CAG AAC CAA GCC CGC GAT GAG AAG      5538
Glu Ala Val Leu His Tyr Lys His Gln Asn Gln Ala Arg Asp Glu Lys
    1800                 1805                 1810

AAG AAA CTG CGT CAT GCC AGC GGG GCC AAC ATC ACC AAC GCC ACC ACT      5586
Lys Lys Leu Arg His Ala Ser Gly Ala Asn Ile Thr Asn Ala Thr Thr
1815                 1820                 1825                 1830

GCC GCC ACC ACG GCC GCC ACT GCC ACC ACC ACT GCC AGC ACC GAG GGC      5634
Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ala Thr Thr Thr Ala Ser Thr Glu Gly
                1835                 1840                 1845

AGC AAC AGT GAG AGC GAG GCC GAG AGC ACC GAG AAC AGC CCC ACC CCA      5682
Ser Asn Ser Glu Ser Glu Ala Glu Ser Thr Glu Asn Ser Pro Thr Pro
            1850                 1855                 1860

TCG CCG CTG CAG AAG AAG GTC ACT GAG GAT CTG TCC AAA ACC CTC CTG      5730
Ser Pro Leu Gln Lys Lys Val Thr Glu Asp Leu Ser Lys Thr Leu Leu
        1865                 1870                 1875

ATG TAC ACG GTG CCT GCC GTC CAG GGC TTC TTC CGT TCC ATC TCC TTG      5778
Met Tyr Thr Val Pro Ala Val Gln Gly Phe Phe Arg Ser Ile Ser Leu
```

```
1880                1885                1890

TCA CGA GGC AAC AAC CTC CAG GAT ACA CTC AGA GTT CTC ACC TTA TGG      5826
Ser Arg Gly Asn Asn Leu Gln Asp Thr Leu Arg Val Leu Thr Leu Trp
1895                1900                1905                1910

TTT GAT TAT GGT CAC TGG CCA GAT GTC AAT GAG GCC TTA GTG GAG GGG      5874
Phe Asp Tyr Gly His Trp Pro Asp Val Asn Glu Ala Leu Val Glu Gly
                1915                1920                1925

GTG AAA GCC ATC CAG ATT GAT ACC TGG CTA CAG GTT ATA CCT CAG CTC      5922
Val Lys Ala Ile Gln Ile Asp Thr Trp Leu Gln Val Ile Pro Gln Leu
            1930                1935                1940

ATT GCA AGA ATT GAT ACG CCC AGA CCC TTG GTG GGA CGT CTC ATT CAC      5970
Ile Ala Arg Ile Asp Thr Pro Arg Pro Leu Val Gly Arg Leu Ile His
        1945                1950                1955

CAG CTT CTC ACA GAC ATT GGT CGG TAC CAC CCC CAG GCC CTC ATC TAC      6018
Gln Leu Leu Thr Asp Ile Gly Arg Tyr His Pro Gln Ala Leu Ile Tyr
    1960                1965                1970

CCA CTG ACA GTG GCT TCT AAG TCT ACC ACG ACA GCC CGG CAC AAT GCA      6066
Pro Leu Thr Val Ala Ser Lys Ser Thr Thr Thr Ala Arg His Asn Ala
1975                1980                1985                1990

GCC AAC AAG ATT CTG AAG AAC ATG TGT GAG CAC AGC AAC ACC CTG GTC      6114
Ala Asn Lys Ile Leu Lys Asn Met Cys Glu His Ser Asn Thr Leu Val
                1995                2000                2005

CAG CAG GCC ATG ATG GTG AGC GAG GAG CTG ATC CGA GTG GCC ATC CTC      6162
Gln Gln Ala Met Met Val Ser Glu Glu Leu Ile Arg Val Ala Ile Leu
            2010                2015                2020

TGG CAT GAG ATG TGG CAT GAA GGC CTG GAA GAG GCA TCT CGT TTG TAC      6210
Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr
        2025                2030                2035

TTT GGG GAA AGG AAC GTG AAA GGC ATG TTT GAG GTG CTG GAG CCC TTG      6258
Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu
    2040                2045                2050

CAT GCT ATG ATG GAA CGG GGC CCC CAG ACT CTG AAG GAA ACA TCC TTT      6306
His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe
2055                2060                2065                2070

AAT CAG GCC TAT GGT CGA GAT TTA ATG GAG GCC CAA GAG TGG TGC AGG      6354
Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg
                2075                2080                2085

AAG TAC ATG AAA TCA GGG AAT GTC AAG GAC CTC ACC CAA GCC TGG GAC      6402
Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Thr Gln Ala Trp Asp
            2090                2095                2100

CTC TAT TAT CAT GTG TTC CGA CGA ATC TCA AAG CAG CTG CCT CAG CTC      6450
Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Gln Leu Pro Gln Leu
        2105                2110                2115
```

```
ACA TCC TTA GAG CTG CAA TAT GTT TCC CCA AAA CTT CTG ATG TGC CGG      6498
Thr Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro Lys Leu Leu Met Cys Arg
    2120                2125                2130

GAC CTT GAA TTG GCT GTG CCA GGA ACA TAT GAC CCC AAC CAG CCA ATC      6546
Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr Asp Pro Asn Gln Pro Ile
2135                2140                2145                2150

ATT CGC ATT CAG TCC ATA GCA CCG TCT TTG CAA GTC ATC ACA TCC AAG      6594
Ile Arg Ile Gln Ser Ile Ala Pro Ser Leu Gln Val Ile Thr Ser Lys
                2155                2160                2165

CAG AGG CCC CGG AAA TTG ACA CTT ATG GGC AGC AAC GGA CAT GAG TTT      6642
Gln Arg Pro Arg Lys Leu Thr Leu Met Gly Ser Asn Gly His Glu Phe
            2170                2175                2180

GTT TTC CTT CTA AAA GGC CAT GAA GAT CTG CGC CAG GAT GAG CGT GTG      6690
Val Phe Leu Leu Lys Gly His Glu Asp Leu Arg Gln Asp Glu Arg Val
        2185                2190                2195

ATG CAG CTC TTC GGC CTG GTT AAC ACC CTT CTG GCC AAT GAC CCA ACA      6738
Met Gln Leu Phe Gly Leu Val Asn Thr Leu Leu Ala Asn Asp Pro Thr
    2200                2205                2210

TCT CTT CGG AAA AAC CTC AGC ATC CAG AGA TAC GCT GTC ATC CCT TTA      6786
Ser Leu Arg Lys Asn Leu Ser Ile Gln Arg Tyr Ala Val Ile Pro Leu
2215                2220                2225                2230

TCG ACC AAC TCG GGC CTC ATT GGC TGG GTT CCC CAC TGT GAC ACA CTG      6834
Ser Thr Asn Ser Gly Leu Ile Gly Trp Val Pro His Cys Asp Thr Leu
                2235                2240                2245

CAC GCC CTC ATC CGG GAC TAC AGG GAG AAG AAG AAG ATC CTT CTC AAC      6882
His Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Arg Glu Lys Lys Lys Ile Leu Leu Asn
            2250                2255                2260

ATC GAG CAT CGC ATC ATG TTG CGG ATG GCT CCG GAC TAT GAC CAC TTG      6930
Ile Glu His Arg Ile Met Leu Arg Met Ala Pro Asp Tyr Asp His Leu
        2265                2270                2275

ACT CTG ATG CAG AAG GTG GAG GTG TTT GAG CAT GCC GTC AAT AAT ACA      6978
Thr Leu Met Gln Lys Val Glu Val Phe Glu His Ala Val Asn Asn Thr
    2280                2285                2290

GCT GGG GAC GAC CTG GCC AAG CTG CTG TGG CTG AAA AGC CCC AGC TCC      7026
Ala Gly Asp Asp Leu Ala Lys Leu Leu Trp Leu Lys Ser Pro Ser Ser
2295                2300                2305                2310

GAG GTG TGG TTT GAC CGA AGA ACC AAT TAT ACC CGT TCT TTA GCG GTC      7074
Glu Val Trp Phe Asp Arg Arg Thr Asn Tyr Thr Arg Ser Leu Ala Val
                2315                2320                2325

ATG TCA ATG GTT GGG TAT ATT TTA GGC CTG GGA GAT AGA CAC CCA TCC      7122
Met Ser Met Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Asp Arg His Pro Ser
            2330                2335                2340

AAC CTG ATG CTG GAC CGT CTG AGT GGG AAG ATC CTG CAC ATT GAC TTT      7170
Asn Leu Met Leu Asp Arg Leu Ser Gly Lys Ile Leu His Ile Asp Phe
```

```
        2345                2350                2355

GGG GAC TGC TTT GAG GTT GCT ATG ACC CGA GAG AAG TTT CCA GAG AAG      7218
Gly Asp Cys Phe Glu Val Ala Met Thr Arg Glu Lys Phe Pro Glu Lys
    2360                2365                2370

ATT CCA TTT AGA CTA ACA AGA ATG TTG ACC AAT GCT ATG GAG GTT ACA      7266
Ile Pro Phe Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr Asn Ala Met Glu Val Thr
2375                2380                2385                2390

GGC CTG GAT GGC AAC TAC AGA ATC ACA TGC CAC ACA GTG ATG GAG GTG      7314
Gly Leu Asp Gly Asn Tyr Arg Ile Thr Cys His Thr Val Met Glu Val
                2395                2400                2405

CTG CGA GAG CAC AAG GAC AGT GTC ATG GCC GTG CTG GAA GCC TTT GTC      7362
Leu Arg Glu His Lys Asp Ser Val Met Ala Val Leu Glu Ala Phe Val
            2410                2415                2420

TAT GAC CCC TTG CTG AAC TGG AGG CTG ATG GAC ACA AAT ACC AAA GGC      7410
Tyr Asp Pro Leu Leu Asn Trp Arg Leu Met Asp Thr Asn Thr Lys Gly
        2425                2430                2435

AAC AAG CGA TCC CGA ACG AGG ACG GAT TCC TAC TCT GCT GGC CAG TCA      7458
Asn Lys Arg Ser Arg Thr Arg Thr Asp Ser Tyr Ser Ala Gly Gln Ser
    2440                2445                2450

GTC GAA ATT TTG GAC GGT GTG GAA CTT GGA GAG CCA GCC CAT AAG AAA      7506
Val Glu Ile Leu Asp Gly Val Glu Leu Gly Glu Pro Ala His Lys Lys
2455                2460                2465                2470

ACG GGG ACC ACA GTG CCA GAA TCT ATT CAT TCT TTC ATT GGA GAC GGT      7554
Thr Gly Thr Thr Val Pro Glu Ser Ile His Ser Phe Ile Gly Asp Gly
                2475                2480                2485

TTG GTG AAA CCA GAG GCC CTA AAT AAG AAA GCT ATC CAG ATT ATT AAC      7602
Leu Val Lys Pro Glu Ala Leu Asn Lys Lys Ala Ile Gln Ile Ile Asn
            2490                2495                2500

AGG GTT CGA GAT AAG CTC ACT GGT CGG GAC TTC TCT CAT GAT GAC ACT      7650
Arg Val Arg Asp Lys Leu Thr Gly Arg Asp Phe Ser His Asp Asp Thr
        2505                2510                2515

TTG GAT GTT CCA ACG CAA GTT GAG CTG CTC ATC AAA CAA GCG ACA TCC      7698
Leu Asp Val Pro Thr Gln Val Glu Leu Leu Ile Lys Gln Ala Thr Ser
    2520                2525                2530

CAT GAA AAC CTC TGC CAG TGC TAT ATT GGC TGG TGC CCT TTC TGG          7743
His Glu Asn Leu Cys Gln Cys Tyr Ile Gly Trp Cys Pro Phe Trp
2535                2540                2545

TAACTGGAGG CCCAGATGTG CCCATCACGT TTTTTCTGAG GCTTTTGTAC TTTAGTAAAT   7803

GCTTCCACTA AACTGAAAAA A                                             7824
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

（２）配列番号１２

（ｉ）配列の性質：

（Ａ）配列の長さ：２５４９

（Ｂ）配列の型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｉｉ）配列の種類：蛋白質

（ｘｉ）配列：

```
Met Leu Gly Thr Gly Pro Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ser
 1               5                  10                  15

Ser Asn Val Ser Val Leu Gln Gln Phe Ala Ser Gly Leu Lys Ser Arg
            20                  25                  30

Asn Glu Glu Thr Arg Ala Lys Ala Ala Lys Glu Leu Gln His Tyr Val
        35                  40                  45

Thr Met Glu Leu Arg Glu Met Ser Gln Glu Glu Ser Thr Arg Phe Tyr
    50                  55                  60

Asp Gln Leu Asn His His Ile Phe Glu Leu Val Ser Ser Ser Asp Ala
65                  70                  75                  80

Asn Glu Arg Lys Gly Gly Ile Leu Ala Ile Ala Ser Leu Ile Gly Val
                85                  90                  95

Glu Gly Gly Asn Ala Thr Arg Ile Gly Arg Phe Ala Asn Tyr Leu Arg
            100                 105                 110

Asn Leu Leu Pro Ser Asn Asp Pro Val Val Met Glu Met Ala Ser Lys
        115                 120                 125

Ala Ile Gly Arg Leu Ala Met Ala Gly Asp Thr Phe Thr Ala Glu Tyr
    130                 135                 140

Val Glu Phe Glu Val Lys Arg Ala Leu Glu Trp Leu Gly Ala Asp Arg
145                 150                 155                 160

Asn Glu Gly Arg Arg His Ala Ala Val Leu Val Leu Arg Glu Leu Ala
                165                 170                 175

Ile Ser Val Pro Thr Phe Phe Phe Gln Gln Val Gln Pro Phe Phe Asp
            180                 185                 190

Asn Ile Phe Val Ala Val Trp Asp Pro Lys Gln Ala Ile Arg Glu Gly
        195                 200                 205

Ala Val Ala Ala Leu Arg Ala Cys Leu Ile Leu Thr Thr Gln Arg Glu
    210                 215                 220

Pro Lys Glu Met Gln Lys Pro Gln Trp Tyr Arg His Thr Phe Glu Glu
225                 230                 235                 240

Ala Glu Lys Gly Phe Asp Glu Thr Leu Ala Lys Glu Lys Gly Met Asn
                245                 250                 255

Arg Asp Asp Arg Ile His Gly Ala Leu Leu Ile Leu Asn Glu Leu Val
            260                 265                 270
```

```
Arg Ile Ser Ser Met Glu Gly Glu Arg Leu Arg Glu Glu Met Glu Glu
        275                 280                 285

Ile Thr Gln Gln Gln Leu Val His Asp Lys Tyr Cys Lys Asp Leu Met
    290                 295                 300

Gly Phe Gly Thr Lys Pro Arg His Ile Thr Pro Phe Thr Ser Phe Gln
305                 310                 315                 320

Ala Val Gln Pro Gln Gln Ser Asn Ala Leu Val Gly Leu Leu Gly Tyr
                325                 330                 335

Ser Ser His Gln Gly Leu Met Gly Phe Gly Thr Ser Pro Ser Pro Ala
            340                 345                 350

Lys Ser Thr Leu Val Glu Ser Arg Cys Cys Arg Asp Leu Met Glu Glu
        355                 360                 365

Lys Phe Asp Gln Val Cys Gln Trp Val Leu Lys Cys Arg Asn Ser Lys
    370                 375                 380

Asn Ser Leu Ile Gln Met Thr Ile Leu Asn Leu Leu Pro Arg Leu Ala
385                 390                 395                 400

Ala Phe Arg Pro Ser Ala Phe Thr Asp Thr Gln Tyr Leu Gln Asp Thr
                405                 410                 415

Met Asn His Val Leu Ser Cys Val Lys Lys Glu Lys Glu Arg Thr Ala
            420                 425                 430

Ala Phe Gln Ala Leu Gly Leu Leu Ser Val Ala Val Arg Ser Glu Phe
        435                 440                 445

Lys Val Tyr Leu Pro Arg Val Leu Asp Ile Ile Arg Ala Ala Leu Pro
    450                 455                 460

Pro Lys Asp Phe Ala His Lys Arg Gln Lys Ala Met Gln Val Asp Ala
465                 470                 475                 480

Thr Val Phe Thr Cys Ile Ser Met Leu Ala Arg Ala Met Gly Pro Gly
                485                 490                 495

Ile Gln Gln Asp Ile Lys Glu Leu Leu Glu Pro Met Leu Ala Val Gly
            500                 505                 510

Leu Ser Pro Ala Leu Thr Ala Val Leu Tyr Asp Leu Ser Arg Gln Ile
        515                 520                 525

Pro Gln Leu Lys Lys Asp Ile Gln Asp Gly Leu Leu Lys Met Leu Ser
    530                 535                 540

Leu Val Leu Met His Lys Pro Leu Arg His Pro Gly Met Pro Lys Gly
545                 550                 555                 560

Leu Ala His Gln Leu Ala Ser Pro Gly Leu Thr Thr Leu Pro Glu Ala
                565                 570                 575
```

```
Ser Asp Val Gly Ser Ile Thr Leu Ala Leu Arg Thr Leu Gly Ser Phe
            580                 585                 590

Glu Phe Glu Gly His Ser Leu Thr Gln Phe Val Arg His Cys Ala Asp
        595                 600                 605

His Phe Leu Asn Ser Glu His Lys Glu Ile Arg Met Glu Ala Ala Arg
    610                 615                 620

Thr Cys Ser Arg Leu Leu Thr Pro Ser Ile His Leu Ile Ser Gly His
625                 630                 635                 640

Ala His Val Val Ser Gln Thr Ala Val Gln Val Val Ala Asp Val Leu
                645                 650                 655

Ser Lys Leu Leu Val Val Gly Ile Thr Asp Pro Asp Pro Asp Ile Arg
            660                 665                 670

Tyr Cys Val Leu Ala Ser Leu Asp Glu Arg Phe Asp Ala His Leu Ala
        675                 680                 685

Gln Ala Glu Asn Leu Gln Ala Leu Phe Val Ala Leu Asn Asp Gln Val
    690                 695                 700

Phe Glu Ile Arg Glu Leu Ala Ile Cys Thr Val Gly Arg Leu Ser Ser
705                 710                 715                 720

Met Asn Pro Ala Phe Val Met Pro Phe Leu Arg Lys Met Leu Ile Gln
                725                 730                 735

Ile Leu Thr Glu Leu Glu His Ser Gly Ile Gly Arg Ile Lys Glu Gln
            740                 745                 750

Ser Ala Arg Met Leu Gly His Leu Val Ser Asn Ala Pro Arg Leu Ile
        755                 760                 765

Arg Pro Tyr Met Glu Pro Ile Leu Lys Ala Leu Ile Leu Lys Leu Lys
    770                 775                 780

Asp Pro Asp Pro Asp Pro Asn Pro Gly Val Ile Asn Asn Val Leu Ala
785                 790                 795                 800

Thr Ile Gly Glu Leu Ala Gln Val Ser Gly Leu Glu Met Arg Lys Trp
                805                 810                 815

Val Asp Glu Leu Phe Ile Ile Ile Met Asp Met Leu Gln Asp Ser Ser
            820                 825                 830

Leu Leu Ala Lys Arg Gln Val Ala Leu Trp Thr Leu Gly Gln Leu Val
        835                 840                 845

Ala Ser Thr Gly Tyr Val Val Glu Pro Tyr Arg Lys Tyr Pro Thr Leu
    850                 855                 860

Leu Glu Val Leu Leu Asn Phe Leu Lys Thr Glu Gln Asn Gln Gly Thr
865                 870                 875                 880

Arg Arg Glu Ala Ile Arg Val Leu Gly Leu Leu Gly Ala Leu Asp Pro
```

885 890 895

Tyr Lys His Lys Val Asn Ile Gly Met Ile Asp Gln Ser Arg Asp Ala
900 905 910

Ser Ala Val Ser Leu Ser Glu Ser Lys Ser Ser Gln Asp Ser Ser Asp
915 920 925

Tyr Ser Thr Ser Glu Met Leu Val Asn Met Gly Asn Leu Pro Leu Asp
930 935 940

Glu Phe Tyr Pro Ala Val Ser Met Val Ala Leu Met Arg Ile Phe Arg
945 950 955 960

Asp Gln Ser Leu Ser His His His Thr Met Val Val Gln Ala Ile Thr
965 970 975

Phe Ile Phe Lys Ser Leu Gly Leu Lys Cys Val Gln Phe Leu Pro Gln
980 985 990

Val Met Pro Thr Phe Leu Asn Val Ile Arg Val Cys Asp Gly Ala Ile
995 1000 1005

Arg Glu Phe Leu Phe Gln Gln Leu Gly Met Leu Val Ser Phe Val Lys
1010 1015 1020

Ser His Ile Arg Pro Tyr Met Asp Glu Ile Val Thr Leu Met Arg Glu
1025 1030 1035 1040

Phe Trp Val Met Asn Thr Ser Ile Gln Ser Thr Ile Ile Leu Leu Ile
1045 1050 1055

Glu Gln Ile Val Val Ala Leu Gly Gly Glu Phe Lys Leu Tyr Leu Pro
1060 1065 1070

Gln Leu Ile Pro His Met Leu Arg Val Phe Met His Asp Asn Ser Pro
1075 1080 1085

Gly Arg Ile Val Ser Ile Lys Leu Leu Ala Ala Ile Gln Leu Phe Gly
1090 1095 1100

Ala Asn Leu Asp Asp Tyr Leu His Leu Leu Leu Pro Pro Ile Val Lys
1105 1110 1115 1120

Leu Phe Asp Ala Pro Glu Ala Pro Leu Pro Ser Arg Lys Ala Ala Leu
1125 1130 1135

Glu Thr Val Asp Arg Leu Thr Glu Ser Leu Asp Phe Thr Asp Tyr Ala
1140 1145 1150

Ser Arg Ile Ile His Pro Ile Val Arg Thr Leu Asp Gln Ser Pro Glu
1155 1160 1165

Leu Arg Ser Thr Ala Met Asp Thr Leu Ser Ser Leu Val Phe Gln Leu
1170 1175 1180

Gly Lys Lys Tyr Gln Ile Phe Ile Pro Met Val Asn Lys Val Leu Val
1185 1190 1195 1200

Arg His Arg Ile Asn His Gln Arg Tyr Asp Val Leu Ile Cys Arg Ile
1205 1210 1215

Val Lys Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Glu Glu Glu Asp Pro Leu Ile Tyr
1220 1225 1230

Gln His Arg Met Leu Arg Ser Gly Gln Gly Asp Ala Leu Ala Ser Gly
1235 1240 1245

Pro Val Glu Thr Gly Pro Met Lys Lys Leu His Val Ser Thr Ile Asn
1250 1255 1260

Leu Gln Lys Ala Trp Gly Ala Ala Arg Arg Val Ser Lys Asp Asp Trp
1265 1270 1275 1280

Leu Glu Trp Leu Arg Arg Leu Ser Leu Glu Leu Leu Lys Asp Ser Ser
1285 1290 1295

Ser Pro Ser Leu Arg Ser Cys Trp Ala Leu Ala Gln Ala Tyr Asn Pro
1300 1305 1310

Met Ala Arg Asp Leu Phe Asn Ala Ala Phe Val Ser Cys Trp Ser Glu
1315 1320 1325

Leu Asn Glu Asp Gln Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ser Ile Glu Leu Ala
1330 1335 1340

Leu Thr Ser Gln Asp Ile Ala Glu Val Thr Gln Thr Leu Leu Asn Leu
1345 1350 1355 1360

Ala Glu Phe Met Glu His Ser Asp Lys Gly Pro Leu Pro Leu Arg Asp
1365 1370 1375

Asp Asn Gly Ile Val Leu Leu Gly Glu Arg Ala Ala Lys Cys Arg Ala
1380 1385 1390

Tyr Ala Lys Ala Leu His Tyr Lys Glu Leu Glu Phe Gln Lys Gly Pro
1395 1400 1405

Thr Pro Ala Ile Leu Glu Ser Leu Ile Ser Ile Asn Asn Lys Leu Gln
1410 1415 1420

Gln Pro Glu Ala Ala Ala Gly Val Leu Glu Tyr Ala Met Lys His Phe
1425 1430 1435 1440

Gly Glu Leu Glu Ile Gln Ala Thr Trp Tyr Glu Lys Leu His Glu Trp
1445 1450 1455

Glu Asp Ala Leu Val Ala Tyr Asp Lys Lys Met Asp Thr Asn Lys Asp
1460 1465 1470

Asp Pro Glu Leu Met Leu Gly Arg Met Arg Cys Leu Glu Ala Leu Gly
1475 1480 1485

Glu Trp Gly Gln Leu His Gln Gln Cys Cys Glu Lys Trp Thr Leu Val
1490 1495 1500

Asn Asp Glu Thr Gln Ala Lys Met Ala Arg Met Ala Ala Ala Ala Ala
1505 1510 1515 1520

Trp Gly Leu Gly Gln Trp Asp Ser Met Glu Glu Tyr Thr Cys Met Ile
1525 1530 1535

Pro Arg Asp Thr His Asp Gly Ala Phe Tyr Arg Ala Val Leu Ala Leu
1540 1545 1550

His Gln Asp Leu Phe Ser Leu Ala Gln Gln Cys Ile Asp Lys Ala Arg
1555 1560 1565

Asp Leu Leu Asp Ala Glu Leu Thr Ala Met Ala Gly Glu Ser Tyr Ser
1570 1575 1580

Arg Ala Tyr Gly Ala Met Val Ser Cys His Met Leu Ser Glu Leu Glu
1585 1590 1595 1600

Glu Val Ile Gln Tyr Lys Leu Val Pro Glu Arg Arg Glu Ile Ile Arg
1605 1610 1615

Gln Ile Trp Trp Glu Arg Leu Gln Gly Cys Gln Arg Ile Val Glu Asp
1620 1625 1630

Trp Gln Lys Ile Leu Met Val Arg Ser Leu Val Val Ser Pro His Glu
1635 1640 1645

Asp Met Arg Thr Trp Leu Lys Tyr Ala Ser Leu Cys Gly Lys Ser Gly
1650 1655 1660

Arg Leu Ala Leu Ala His Lys Thr Leu Val Leu Leu Leu Gly Val Asp
1665 1670 1675 1680

Pro Ser Arg Gln Leu Asp His Pro Leu Pro Thr Val His Pro Gln Val
1685 1690 1695

Thr Tyr Ala Tyr Met Lys Asn Met Trp Lys Ser Ala Arg Lys Ile Asp
1700 1705 1710

Ala Phe Gln His Met Gln His Phe Val Gln Thr Met Gln Gln Gln Ala
1715 1720 1725

Gln His Ala Ile Ala Thr Glu Asp Gln Gln His Lys Gln Glu Leu His
1730 1735 1740

Lys Leu Met Ala Arg Cys Phe Leu Lys Leu Gly Glu Trp Gln Leu Asn
1745 1750 1755 1760

Leu Gln Gly Ile Asn Glu Ser Thr Ile Pro Lys Val Leu Gln Tyr Tyr
1765 1770 1775

Ser Ala Ala Thr Glu His Asp Arg Ser Trp Tyr Lys Ala Trp His Ala
1780 1785 1790

Trp Ala Val Met Asn Phe Glu Ala Val Leu His Tyr Lys His Gln Asn
1795 1800 1805

Gln Ala Arg Asp Glu Lys Lys Lys Leu Arg His Ala Ser Gly Ala Asn

1810 1815 1820

Ile Thr Asn Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ala Thr Thr
1825 1830 1835 1840

Thr Ala Ser Thr Glu Gly Ser Asn Ser Glu Ser Glu Ala Glu Ser Thr
1845 1850 1855

Glu Asn Ser Pro Thr Pro Ser Pro Leu Gln Lys Lys Val Thr Glu Asp
1860 1865 1870

Leu Ser Lys Thr Leu Leu Met Tyr Thr Val Pro Ala Val Gln Gly Phe
1875 1880 1885

Phe Arg Ser Ile Ser Leu Ser Arg Gly Asn Asn Leu Gln Asp Thr Leu
1890 1895 1900

Arg Val Leu Thr Leu Trp Phe Asp Tyr Gly His Trp Pro Asp Val Asn
1905 1910 1915 1920

Glu Ala Leu Val Glu Gly Val Lys Ala Ile Gln Ile Asp Thr Trp Leu
1925 1930 1935

Gln Val Ile Pro Gln Leu Ile Ala Arg Ile Asp Thr Pro Arg Pro Leu
1940 1945 1950

Val Gly Arg Leu Ile His Gln Leu Leu Thr Asp Ile Gly Arg Tyr His
1955 1960 1965

Pro Gln Ala Leu Ile Tyr Pro Leu Thr Val Ala Ser Lys Ser Thr Thr
1970 1975 1980

Thr Ala Arg His Asn Ala Ala Asn Lys Ile Leu Lys Asn Met Cys Glu
1985 1990 1995 2000

His Ser Asn Thr Leu Val Gln Gln Ala Met Met Val Ser Glu Glu Leu
2005 2010 2015

Ile Arg Val Ala Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu
2020 2025 2030

Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe
2035 2040 2045

Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr
2050 2055 2060

Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu
2065 2070 2075 2080

Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp
2085 2090 2095

Leu Thr Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser
2100 2105 2110

Lys Gln Leu Pro Gln Leu Thr Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro
2115 2120 2125

Lys Leu Leu Met Cys Arg Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr
2130 2135 2140

Asp Pro Asn Gln Pro Ile Ile Arg Ile Gln Ser Ile Ala Pro Ser Leu
2145 2150 2155 2160

Gln Val Ile Thr Ser Lys Gln Arg Pro Arg Lys Leu Thr Leu Met Gly
2165 2170 2175

Ser Asn Gly His Glu Phe Val Phe Leu Leu Lys Gly His Glu Asp Leu
2180 2185 2190

Arg Gln Asp Glu Arg Val Met Gln Leu Phe Gly Leu Val Asn Thr Leu
2195 2200 2205

Leu Ala Asn Asp Pro Thr Ser Leu Arg Lys Asn Leu Ser Ile Gln Arg
2210 2215 2220

Tyr Ala Val Ile Pro Leu Ser Thr Asn Ser Gly Leu Ile Gly Trp Val
2225 2230 2235 2240

Pro His Cys Asp Thr Leu His Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Arg Glu Lys
2245 2250 2255

Lys Lys Ile Leu Leu Asn Ile Glu His Arg Ile Met Leu Arg Met Ala
2260 2265 2270

Pro Asp Tyr Asp His Leu Thr Leu Met Gln Lys Val Glu Val Phe Glu
2275 2280 2285

His Ala Val Asn Asn Thr Ala Gly Asp Asp Leu Ala Lys Leu Leu Trp
2290 2295 2300

Leu Lys Ser Pro Ser Ser Glu Val Trp Phe Asp Arg Arg Thr Asn Tyr
2305 2310 2315 2320

Thr Arg Ser Leu Ala Val Met Ser Met Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu
2325 2330 2335

Gly Asp Arg His Pro Ser Asn Leu Met Leu Asp Arg Leu Ser Gly Lys
2340 2345 2350

Ile Leu His Ile Asp Phe Gly Asp Cys Phe Glu Val Ala Met Thr Arg
2355 2360 2365

Glu Lys Phe Pro Glu Lys Ile Pro Phe Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr
2370 2375 2380

Asn Ala Met Glu Val Thr Gly Leu Asp Gly Asn Tyr Arg Ile Thr Cys
2385 2390 2395 2400

His Thr Val Met Glu Val Leu Arg Glu His Lys Asp Ser Val Met Ala
2405 2410 2415

Val Leu Glu Ala Phe Val Tyr Asp Pro Leu Leu Asn Trp Arg Leu Met
2420 2425 2430

```
Asp Thr Asn Thr Lys Gly Asn Lys Arg Ser Arg Thr Arg Thr Asp Ser
        2435                2440                2445

Tyr Ser Ala Gly Gln Ser Val Glu Ile Leu Asp Gly Val Glu Leu Gly
    2450                2455                2460

Glu Pro Ala His Lys Lys Thr Gly Thr Thr Val Pro Glu Ser Ile His
2465                2470                2475                2480

Ser Phe Ile Gly Asp Gly Leu Val Lys Pro Glu Ala Leu Asn Lys Lys
                2485                2490                2495

Ala Ile Gln Ile Ile Asn Arg Val Arg Asp Lys Leu Thr Gly Arg Asp
            2500                2505                2510

Phe Ser His Asp Asp Thr Leu Asp Val Pro Thr Gln Val Glu Leu Leu
        2515                2520                2525

Ile Lys Gln Ala Thr Ser His Glu Asn Leu Cys Gln Cys Tyr Ile Gly
    2530                2535                2540

Trp Cys Pro Phe Trp
2545
```

（２）配列番号１３

（ｉ）配列の性質：

（Ａ）配列の長さ：１７９４

（Ｂ）配列の型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖および二本鎖の両方

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｉｉ）配列の種類：ｃＤＮＡ

（ｉｘ）配列の特徴：

（Ａ）特徴を表す記号：ＣＤＳ

（Ｂ）存在位置：１．．１６８６

（ｘｉ）配列：

```
TTG GTT TAC CCT TTG ACA GTT GCT ATT ACT TCC GAA TCA ACG AGC CGT        48
Leu Val Tyr Pro Leu Thr Val Ala Ile Thr Ser Glu Ser Thr Ser Arg
  1               5                  10                  15

AAA AAG GCA GCT CAA TCC ATT ATT GAA AAA ATG CGA GTA CAT TCT CCT        96
Lys Lys Ala Ala Gln Ser Ile Ile Glu Lys Met Arg Val His Ser Pro
            20                  25                  30

AGC TTG GTG GAT CAA GCA GAA TTA GTG AGT CGA GAA CTC ATC CGA GTT       144
Ser Leu Val Asp Gln Ala Glu Leu Val Ser Arg Glu Leu Ile Arg Val
        35                  40                  45

GCA GTT TTA TGG CAC GAA CAA TGG CAC GAT GCT TTG GAA GAT GCT AGC       192
Ala Val Leu Trp His Glu Gln Trp His Asp Ala Leu Glu Asp Ala Ser
    50                  55                  60
```

```
AGG TTT TTC TTT GGT GAA CAC AAC ACA GAA AAG ATG TTT GAA ACA TTG        240
Arg Phe Phe Phe Gly Glu His Asn Thr Glu Lys Met Phe Glu Thr Leu
 65                  70                  75                  80

GAA CCA TTA CAT CAA ATG TTG CAA AAG GGA CCA GAA ACG ATG AGG GAA        288
Glu Pro Leu His Gln Met Leu Gln Lys Gly Pro Glu Thr Met Arg Glu
                 85                  90                  95

CAA GCC TTT GCA AAT GCT TTT GGC AGG GAG TTG ACA GAT GCA TAC GAG        336
Gln Ala Phe Ala Asn Ala Phe Gly Arg Glu Leu Thr Asp Ala Tyr Glu
            100                 105                 110

TGG GTG CTC AAC TTT AGA AGA ACT AAA GAC ATA ACC AAT TTG AAT CAA        384
Trp Val Leu Asn Phe Arg Arg Thr Lys Asp Ile Thr Asn Leu Asn Gln
        115                 120                 125

GCA TGG GAT ATA TAC TAC AAT GTC TTT AGA AGA GTA AGC AAA CAG GTG        432
Ala Trp Asp Ile Tyr Tyr Asn Val Phe Arg Arg Val Ser Lys Gln Val
    130                 135                 140

CAG CTG TTA GCT AGT CTT GAG TTG CAG TAT GTA TCT CCG GAC TTA GAG        480
Gln Leu Leu Ala Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro Asp Leu Glu
145                 150                 155                 160

CAT GCT CAA GAT TTG GAA TTG GCT GTA CCA GGT ACT TAC CAA GCA GGC        528
His Ala Gln Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr Gln Ala Gly
                165                 170                 175

AAA CCT GTG ATC AGA ATA ATC AAA TTT GAT CCT ACT TTT TCG ATT ATT        576
Lys Pro Val Ile Arg Ile Ile Lys Phe Asp Pro Thr Phe Ser Ile Ile
            180                 185                 190

TCA TCT AAA CAA AGA CCG AGA AAA TTA TCG TGC AGA GGA AGT GAT GGT        624
Ser Ser Lys Gln Arg Pro Arg Lys Leu Ser Cys Arg Gly Ser Asp Gly
        195                 200                 205

AAA GAC TAC CAA TAT GCG TTG AAA GGA CAT GAA GAT ATC AGA CAA GAT        672
Lys Asp Tyr Gln Tyr Ala Leu Lys Gly His Glu Asp Ile Arg Gln Asp
    210                 215                 220

AAC TTA GTG ATG CAA TTG TTT GGT TTG GTT AAT ACG TTG TTG GTA AAT        720
Asn Leu Val Met Gln Leu Phe Gly Leu Val Asn Thr Leu Leu Val Asn
225                 230                 235                 240

GAT CCG GTA TGT TTC AAG AGA CAT TTG GAT ATA CAA CAA TAT CCT GCT        768
Asp Pro Val Cys Phe Lys Arg His Leu Asp Ile Gln Gln Tyr Pro Ala
                245                 250                 255

ATT CCA TTA TCA CCA AAA GTG GGA TTG CTT GGT TGG GTT CCA AAT AGT        816
Ile Pro Leu Ser Pro Lys Val Gly Leu Leu Gly Trp Val Pro Asn Ser
            260                 265                 270

GAC ACT TTC CAT GTA TTG ATC AAA GGC TAT CGC GAA TCA AGA AGT ATA        864
Asp Thr Phe His Val Leu Ile Lys Gly Tyr Arg Glu Ser Arg Ser Ile
        275                 280                 285

ATG TTG AAT ATT GAA CAC AGG CTT TTG TTG CAA ATG GCA CCT GAT TAT        912
```

```
Met Leu Asn Ile Glu His Arg Leu Leu Leu Gln Met Ala Pro Asp Tyr
    290                 295                 300

GAT TTC TTG ACA TTA TTG CAA AAA GTT GAA GTG TTC ACA AGT GCA ATG      960
Asp Phe Leu Thr Leu Leu Gln Lys Val Glu Val Phe Thr Ser Ala Met
305                 310                 315                 320

GAT AAT TGT AAG GGA CAG GAT TTG TAC AAA GTG TTA TGG CTC AAA TCT     1008
Asp Asn Cys Lys Gly Gln Asp Leu Tyr Lys Val Leu Trp Leu Lys Ser
                325                 330                 335

AAA TCA TCC GAG GCG TGG TTG GAC CGT AGA ACA ACA TAC ACG AGA TCA     1056
Lys Ser Ser Glu Ala Trp Leu Asp Arg Arg Thr Thr Tyr Thr Arg Ser
            340                 345                 350

TTA GCT GTA ATG TCT ATG GTT GGG TAT ATA TTA GGT TTG GGG GAT AGG     1104
Leu Ala Val Met Ser Met Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Asp Arg
        355                 360                 365

CAC CCA TCA AAT TTG ATG TTG GAC CGT ATT ACT GGG AAA GTC ATC CAT     1152
His Pro Ser Asn Leu Met Leu Asp Arg Ile Thr Gly Lys Val Ile His
    370                 375                 380

ATT GAT TTC GGA GAC TGT TTT GAA GCA GCA ATA TTA CGT GAG AAG TAT     1200
Ile Asp Phe Gly Asp Cys Phe Glu Ala Ala Ile Leu Arg Glu Lys Tyr
385                 390                 395                 400

CCA GAG AGA GTT CCG TTT AGA TTG ACG AGA ATG CTT AAT TAT GCC ATG     1248
Pro Glu Arg Val Pro Phe Arg Leu Thr Arg Met Leu Asn Tyr Ala Met
                405                 410                 415

GAA GTT AGT GGA ATA GAG GGC TCG TTC AGA ATC ACA TGT GAA CAT GTT     1296
Glu Val Ser Gly Ile Glu Gly Ser Phe Arg Ile Thr Cys Glu His Val
            420                 425                 430

ATG AGG GTG TTG CGT GAT AAT AAA GAG TCT TTA ATG GCA ATA TTA GAG     1344
Met Arg Val Leu Arg Asp Asn Lys Glu Ser Leu Met Ala Ile Leu Glu
        435                 440                 445

GCC TTT GCT TAC GAT CCC TTG ATA AAT TGG GGG TTT GAT TTC CCA ACA     1392
Ala Phe Ala Tyr Asp Pro Leu Ile Asn Trp Gly Phe Asp Phe Pro Thr
    450                 455                 460

AAG GCG TTG GCT GAA TCA ACG GGT ATA CGT GTT CCA CAA GTC AAC ACT     1440
Lys Ala Leu Ala Glu Ser Thr Gly Ile Arg Val Pro Gln Val Asn Thr
465                 470                 475                 480

GCA GAA TTA TTA CGC AGA GGA CAG ATT GAC GAA AAA GAA GCT GTA AGA     1488
Ala Glu Leu Leu Arg Arg Gly Gln Ile Asp Glu Lys Glu Ala Val Arg
                485                 490                 495

TTG CAA AAG CAA AAT GAA TTG GAA ATA AGA AAC GCT AGA GCT GCA TTA     1536
Leu Gln Lys Gln Asn Glu Leu Glu Ile Arg Asn Ala Arg Ala Ala Leu
            500                 505                 510

GTG TTG AAA CGT ATT ACC GAT AAG TTA ACT GGT AAC GAT ATC AAA CGG     1584
Val Leu Lys Arg Ile Thr Asp Lys Leu Thr Gly Asn Asp Ile Lys Arg
        515                 520                 525
```

```
TTG AGA GGA TTA GAT GTG CCT ACT CAA GTC GAT AAA TTG ATT CAA CAA      1632
Leu Arg Gly Leu Asp Val Pro Thr Gln Val Asp Lys Leu Ile Gln Gln
    530                 535                 540

GCC ACC AGT GTT GAG AAT TTG TGT CAG CAT TAC ATT GGT TGG TGT TCG      1680
Ala Thr Ser Val Glu Asn Leu Cys Gln His Tyr Ile Gly Trp Cys Ser
545                 550                 555                 560

TGT TGG TAGGTTGATT ATCGTCATGT GTCGATAAGT ATGGTATTGT GGTAACTATT      1736
Cys Trp

TTATAAAGGG AAATATTAAA GAATTGTATA TTATTAAAAA AAAAAAAAAA AACTCGAG      1794
```

（２）配列番号１４

（ｉ）配列の性質：

（Ａ）配列の長さ：５６２

（Ｂ）配列の型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｉｉ）配列の種類：蛋白質

（ｘｉ）配列：

```
Leu Val Tyr Pro Leu Thr Val Ala Ile Thr Ser Glu Ser Thr Ser Arg
 1               5                  10                  15

Lys Lys Ala Ala Gln Ser Ile Ile Glu Lys Met Arg Val His Ser Pro
            20                  25                  30

Ser Leu Val Asp Gln Ala Glu Leu Val Ser Arg Glu Leu Ile Arg Val
        35                  40                  45

Ala Val Leu Trp His Glu Gln Trp His Asp Ala Leu Glu Asp Ala Ser
    50                  55                  60

Arg Phe Phe Phe Gly Glu His Asn Thr Glu Lys Met Phe Glu Thr Leu
65                  70                  75                  80

Glu Pro Leu His Gln Met Leu Gln Lys Gly Pro Glu Thr Met Arg Glu
                85                  90                  95

Gln Ala Phe Ala Asn Ala Phe Gly Arg Glu Leu Thr Asp Ala Tyr Glu
            100                 105                 110
```

```
Trp Val Leu Asn Phe Arg Arg Thr Lys Asp Ile Thr Asn Leu Asn Gln
        115                 120                 125

Ala Trp Asp Ile Tyr Tyr Asn Val Phe Arg Arg Val Ser Lys Gln Val
    130                 135                 140

Gln Leu Leu Ala Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro Asp Leu Glu
145                 150                 155                 160

His Ala Gln Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr Gln Ala Gly
                165                 170                 175

Lys Pro Val Ile Arg Ile Ile Lys Phe Asp Pro Thr Phe Ser Ile Ile
            180                 185                 190

Ser Ser Lys Gln Arg Pro Arg Lys Leu Ser Cys Arg Gly Ser Asp Gly
        195                 200                 205

Lys Asp Tyr Gln Tyr Ala Leu Lys Gly His Glu Asp Ile Arg Gln Asp
    210                 215                 220

Asn Leu Val Met Gln Leu Phe Gly Leu Val Asn Thr Leu Leu Val Asn
225                 230                 235                 240

Asp Pro Val Cys Phe Lys Arg His Leu Asp Ile Gln Gln Tyr Pro Ala
                245                 250                 255

Ile Pro Leu Ser Pro Lys Val Gly Leu Leu Gly Trp Val Pro Asn Ser
            260                 265                 270

Asp Thr Phe His Val Leu Ile Lys Gly Tyr Arg Glu Ser Arg Ser Ile
        275                 280                 285

Met Leu Asn Ile Glu His Arg Leu Leu Leu Gln Met Ala Pro Asp Tyr
    290                 295                 300

Asp Phe Leu Thr Leu Leu Gln Lys Val Glu Val Phe Thr Ser Ala Met
305                 310                 315                 320

Asp Asn Cys Lys Gly Gln Asp Leu Tyr Lys Val Leu Trp Leu Lys Ser
                325                 330                 335

Lys Ser Ser Glu Ala Trp Leu Asp Arg Arg Thr Thr Tyr Thr Arg Ser
            340                 345                 350

Leu Ala Val Met Ser Met Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Asp Arg
        355                 360                 365

His Pro Ser Asn Leu Met Leu Asp Arg Ile Thr Gly Lys Val Ile His
    370                 375                 380

Ile Asp Phe Gly Asp Cys Phe Glu Ala Ala Ile Leu Arg Glu Lys Tyr
385                 390                 395                 400

Pro Glu Arg Val Pro Phe Arg Leu Thr Arg Met Leu Asn Tyr Ala Met
                405                 410                 415

Glu Val Ser Gly Ile Glu Gly Ser Phe Arg Ile Thr Cys Glu His Val
            420                 425                 430
```

```
Met Arg Val Leu Arg Asp Asn Lys Glu Ser Leu Met Ala Ile Leu Glu
        435                 440                 445

Ala Phe Ala Tyr Asp Pro Leu Ile Asn Trp Gly Phe Asp Phe Pro Thr
    450                 455                 460

Lys Ala Leu Ala Glu Ser Thr Gly Ile Arg Val Pro Gln Val Asn Thr
465                 470                 475                 480

Ala Glu Leu Leu Arg Arg Gly Gln Ile Asp Glu Lys Glu Ala Val Arg
                485                 490                 495

Leu Gln Lys Gln Asn Glu Leu Glu Ile Arg Asn Ala Arg Ala Ala Leu
            500                 505                 510

Val Leu Lys Arg Ile Thr Asp Lys Leu Thr Gly Asn Asp Ile Lys Arg
        515                 520                 525

Leu Arg Gly Leu Asp Val Pro Thr Gln Val Asp Lys Leu Ile Gln Gln
    530                 535                 540

Ala Thr Ser Val Glu Asn Leu Cys Gln His Tyr Ile Gly Trp Cys Ser
545                 550                 555                 560

Cys Trp
```

（２）配列番号１５

（ｉ）配列の性質：

（Ａ）配列の長さ：３９９

（Ｂ）配列の型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｉｉ）配列の種類：ｃＤＮＡ

（ｉｘ）配列の特徴：

（Ａ）特徴を表す記号：ＣＤＳ

（Ｂ）存在位置：１．．３９９

（ｘｉ）配列：

```
GTT AGT CAC GAG TTG ATC AGA GTA GCC GTT CTA TGG CAC GAA TTA TGG          48
Val Ser His Glu Leu Ile Arg Val Ala Val Leu Trp His Glu Leu Trp
  1               5                  10                  15

TAT GAA GGA CTG GAA GAT GCG AGC CGC CAA TTT TTC GTT GAA CAT AAC          96
Tyr Glu Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Gln Phe Phe Val Glu His Asn
             20                  25                  30

ATA GAA AAA ATG TTT TCT ACT TTA GAA CCT TTA CAT AAA CAC TTA GGC         144
Ile Glu Lys Met Phe Ser Thr Leu Glu Pro Leu His Lys His Leu Gly
         35                  40                  45

AAT GAG CCT CAA ACG TTA AGT GAG GTA TCG TTT CAG AAA TCA TTT GGT         192
Asn Glu Pro Gln Thr Leu Ser Glu Val Ser Phe Gln Lys Ser Phe Gly
     50                  55                  60

AGA GAT TTG AAC GAT GCC TAC GAA TGG TTG AAT AAC TAC AAA AAG TCA         240
Arg Asp Leu Asn Asp Ala Tyr Glu Trp Leu Asn Asn Tyr Lys Lys Ser
 65                  70                  75                  80

AAA GAC ATC AAT AAT TTG AAC CAA GCT TGG GAT ATT TAT TAT AAC GTC         288
Lys Asp Ile Asn Asn Leu Asn Gln Ala Trp Asp Ile Tyr Tyr Asn Val
             85                  90                  95

TTC AGA AAA ATA ACA CGT CAA ATA CCA CAG TTA CAA ACC TTA GAC TTA         336
Phe Arg Lys Ile Thr Arg Gln Ile Pro Gln Leu Gln Thr Leu Asp Leu
            100                 105                 110

CAG CAT GTT TCT CCC CAG CTT CTG GCT ACT CAT GAT CTC GAA TTG GCT         384
Gln His Val Ser Pro Gln Leu Leu Ala Thr His Asp Leu Glu Leu Ala
        115                 120                 125

GTT CCT GGG ACA TAT                                                     399
Val Pro Gly Thr Tyr
    130
```

（２）配列番号１６

（ｉ）配列の性質：

（Ａ）配列の長さ：１３３

（Ｂ）配列の型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｉｉ）配列の種類：蛋白質

（ｘｉ）配列：

```
Val Ser His Glu Leu Ile Arg Val Ala Val Leu Trp His Glu Leu Trp
 1               5                  10                  15

Tyr Glu Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Gln Phe Phe Val Glu His Asn
            20                  25                  30

Ile Glu Lys Met Phe Ser Thr Leu Glu Pro Leu His Lys His Leu Gly
        35                  40                  45

Asn Glu Pro Gln Thr Leu Ser Glu Val Ser Phe Gln Lys Ser Phe Gly
    50                  55                  60

Arg Asp Leu Asn Asp Ala Tyr Glu Trp Leu Asn Asn Tyr Lys Lys Ser
65                  70                  75                  80

Lys Asp Ile Asn Asn Leu Asn Gln Ala Trp Asp Ile Tyr Tyr Asn Val
                85                  90                  95

Phe Arg Lys Ile Thr Arg Gln Ile Pro Gln Leu Gln Thr Leu Asp Leu
            100                 105                 110

Gln His Val Ser Pro Gln Leu Leu Ala Thr His Asp Leu Glu Leu Ala
        115                 120                 125

Val Pro Gly Thr Tyr
    130
```

（２）配列番号１７
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：３９９
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：ｃＤＮＡ
（ｉｘ）配列の特徴：
（Ａ）特徴を表す記号：ＣＤＳ
（Ｂ）存在位置：１．．３９９
（ｘｉ）配列：

```
GTC AGC CAC GAA TTG ATA CGT ATG GCG GTG CTT TGG CAT GAG CAA TGG          48
Val Ser His Glu Leu Ile Arg Met Ala Val Leu Trp His Glu Gln Trp
  1               5                  10                  15

TAT GAG GGT CTG GAT GAC GCC AGT AGG CAG TTT TTT GGA GAA CAT AAT          96
Tyr Glu Gly Leu Asp Asp Ala Ser Arg Gln Phe Phe Gly Glu His Asn
            20                  25                  30

ACC GAA AAA ATG TTT GCT GCT TTA GAG CCT CTG TAC GAA ATG CTG AAG         144
Thr Glu Lys Met Phe Ala Ala Leu Glu Pro Leu Tyr Glu Met Leu Lys
        35                  40                  45

AGA GGA CCG GAA ACT TTG AGG GAA ATA TCG TTC CAA AAT TCT TTT GGT         192
Arg Gly Pro Glu Thr Leu Arg Glu Ile Ser Phe Gln Asn Ser Phe Gly
    50                  55                  60

AGG GAC TTG AAT GAC GCT TAC GAA TGG CTG ATG AAT TAC AAA AAA TCT         240
Arg Asp Leu Asn Asp Ala Tyr Glu Trp Leu Met Asn Tyr Lys Lys Ser
65                  70                  75                  80

AAA GAT GTT AGT AAT TTA AAC CAA GCG TGG GAC ATT TAC TAT AAT GTT         288
Lys Asp Val Ser Asn Leu Asn Gln Ala Trp Asp Ile Tyr Tyr Asn Val
                85                  90                  95

TTC AGG AAA ATT GGT AAA CAG TTG CCA CAA TTA CAA ACT CTT GAA CTA         336
Phe Arg Lys Ile Gly Lys Gln Leu Pro Gln Leu Gln Thr Leu Glu Leu
            100                 105                 110

CAA CAT GTG TCG CCA AAA CTA CTA TCT GCG CAT GAT TTG GAA TTG GCT         384
Gln His Val Ser Pro Lys Leu Leu Ser Ala His Asp Leu Glu Leu Ala
        115                 120                 125

GTC CCC GGG ACC CGT                                                     399
Val Pro Gly Thr Arg
    130
```

（２）配列番号１８

（ｉ）配列の性質：

（Ａ）配列の長さ：１３３

（Ｂ）配列の型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｉｉ）配列の種類：蛋白質

（ｘｉ）配列：

```
Val Ser His Glu Leu Ile Arg Met Ala Val Leu Trp His Glu Gln Trp
 1               5                  10                  15

Tyr Glu Gly Leu Asp Asp Ala Ser Arg Gln Phe Phe Gly Glu His Asn
            20                  25                  30

Thr Glu Lys Met Phe Ala Ala Leu Glu Pro Leu Tyr Glu Met Leu Lys
        35                  40                  45

Arg Gly Pro Glu Thr Leu Arg Glu Ile Ser Phe Gln Asn Ser Phe Gly
    50                  55                  60

Arg Asp Leu Asn Asp Ala Tyr Glu Trp Leu Met Asn Tyr Lys Lys Ser
65                  70                  75                  80

Lys Asp Val Ser Asn Leu Asn Gln Ala Trp Asp Ile Tyr Tyr Asn Val
                85                  90                  95

Phe Arg Lys Ile Gly Lys Gln Leu Pro Gln Leu Gln Thr Leu Glu Leu
            100                 105                 110

Gln His Val Ser Pro Lys Leu Leu Ser Ala His Asp Leu Glu Leu Ala
        115                 120                 125

Val Pro Gly Thr Arg
    130
```

（２）配列番号１９

（ｉ）配列の性質：

（Ａ）配列の長さ：５３１

（Ｂ）配列の型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖および二本鎖の両方

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｉｉ）配列の種類：ｃＤＮＡ

（ｘｉ）配列：

```
TGACCCTCAC CCCTTCCACC TATCCCAAAA ACCTCACTGG GTCTGTGGAC AAACAACANA      60

AATNTTTTCC ANANAGGCCC CAAATGAGNC CCANGGGTCT NTCTTCCATC AGACCCAGTG     120

ATTCTGCGAC TCACACNCTT CAATTCAAGA CCTGACCNCT AGTAGGGAGG TTTANTCAGA     180

TCGCTGGCAN CCTCGGCTGA NCAGATNCAN AGNGGGGNTC GCTGTTCAGT GGGNCCACCC     240

TCNCTGGCCT TCTTCANCAG GGGTCTGGGA TGTTTTCAGT GGNCCNAANA CNCTGTTTAG     300

AGCCAGGGCT CAGNAAACAG AAAANCTNTC ATGGNGGTTC TGGACACAGG GNAGGTCTGG     360

NACATATTGG GGATTATGAN CAGNACCAAN ACNCCACTAA ATNCCCCAAG NANAAAGTGT     420

AACCATNTCT ANACNCCATN TTNTATCAGN ANAAATTTTN TTCCNATAAA TGACATCAGN     480

ANTTTNAACA TNAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAANAAAAA AAAAAAAAAA A              531
```

（２）配列番号２０

（ｉ）配列の性質：

（Ａ）配列の長さ：２３１

（Ｂ）配列の型：核酸

（Ｃ）鎖の数：二本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｉｉ）配列の種類：ｃＤＮＡ

（ｉｘ）配列の特徴：

（Ａ）特徴を表す記号：ｍｉｓｃ＿主要点
（Ｂ）存在位置：１２８
（Ｄ）他の情報：／ラベル＝ＸｈｏＩ
（ｘｉ）配列：

GCGTATAACG CGTTTGGAAT CACTACAGGG ATGTTTAATA CCACTACAAT GGATGATGTA 60

TATAACTATC TATTCGATGA TGAAGATACC CCACCAAACC CAAAAAAAGA GATCTGGAAT 120

TCGGATCCTC GAGAGATCTA TGAATCGTAG ATACTGAAAA ACCCCGCAAG TTCACTTCAA 180

CTGTGCATCG TGCACCATCT CAATTTCTTT CATTTATACA TCGTTTTGCC T 231

（２）配列番号２１
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：２１
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：他の核酸
（ｘｉ）配列：

TGAAGATACC CCACCAAACC C 21

（２）配列番号２２
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：１８
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：他の核酸
（ｘｉ）配列：

TGCACAGTTG AAGTGAAC 18

（２）配列番号２３
（ｉ）配列の性質：
（Ａ）配列の長さ：９０７
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ｉｉ）配列の種類：ｃＤＮＡ
（ｉｘ）配列の特徴：
（Ａ）特徴を表す記号：ＣＤＳ
（Ｂ）存在位置：３４．．５０７
（ｘｉ）配列：

```
GCCGGGGCTG CGGCCGCCCG AGGGACTTTG AAC ATG TCG GGG ATC GCC CTC AGC        54
                                      Met Ser Gly Ile Ala Leu Ser
                                        1               5

AGA CTC GCC CAG GAG AGG AAA GCA TGG AGG AAA GAC CAC CCA TTT GGT        102
Arg Leu Ala Gln Glu Arg Lys Ala Trp Arg Lys Asp His Pro Phe Gly
          10                  15                  20

TTC GTG GCT GTC CCA ACA AAA AAT CCC GAT GGC ACG ATG AAC CTC ATG        150
Phe Val Ala Val Pro Thr Lys Asn Pro Asp Gly Thr Met Asn Leu Met
     25                  30                  35

AAC TGG GAG TGC GCC ATT CCA GGA AAG AAA GGG ACT CCG TGG GAA GGA        198
Asn Trp Glu Cys Ala Ile Pro Gly Lys Lys Gly Thr Pro Trp Glu Gly
 40                  45                  50                  55

GGC TTG TTT AAA CTA CGG ATG CTT TTC AAA GAT GAT TAT CCA TCT TCG        246
Gly Leu Phe Lys Leu Arg Met Leu Phe Lys Asp Asp Tyr Pro Ser Ser
                 60                  65                  70

CCA CCA AAA TGT AAA TTC GAA CCA CCA TTA TTT CAC CCG AAT GTG TAC        294
Pro Pro Lys Cys Lys Phe Glu Pro Pro Leu Phe His Pro Asn Val Tyr
            75                  80                  85

CCT TCG GGG ACA GTG TGC CTG TCC ATC TTA GAG GAG GAC AAG GAC TGG        342
Pro Ser Gly Thr Val Cys Leu Ser Ile Leu Glu Glu Asp Lys Asp Trp
          90                  95                  100

AGG CCA GCC ATC ACA ATC AAA CAG ATC CTA TTA GGA ATA CAG GAA CTT        390
Arg Pro Ala Ile Thr Ile Lys Gln Ile Leu Leu Gly Ile Gln Glu Leu
    105                 110                 115

CTA AAT GAA CCA AAT ATC CAA GAC CCA GCT CAA GCA GAG GCC TAC ACG        438
Leu Asn Glu Pro Asn Ile Gln Asp Pro Ala Gln Ala Glu Ala Tyr Thr
120                 125                 130                 135

ATT TAC TGC CAA AAC AGA GTG GAG TAC GAG AAA AGG GTC CGA GCA CAA        486
Ile Tyr Cys Gln Asn Arg Val Glu Tyr Glu Lys Arg Val Arg Ala Gln
                140                 145                 150

GCC AAG AAG TTT GCG CCC TCA TAAGCAGCGA CCTTGTGGCA TCGTCAAAAG           537
Ala Lys Lys Phe Ala Pro Ser
            155

GAAGGGATTG GTTTGGCAAG AACTTGTTTA CAACATTTTT GGCAAATCTA AAGTTGCTCC      597

ATACAATGAC TAGTCACCTG GGGGGGTTGG GCGGGCGCCA TCTTCCATTG CCGCCGCGGG      657

TGTGCGGTCT CGATTCGCTG AATTGCCCGT TTCCATACAG GGTCTCTTCC TTCGGTCTTT      717

TGGTATTTTT GGATTGTTAT GTAAAACTCG CTTTTATTTT AATATTGATG TCAGTATTTC      777

AACTGCTGTA AAATTATAAA CTTTTATACT GGGTAAGTCC CCCAGGGGCG AGTTNCCTCG      837

CTCTGGGATG CAGGCATGCT TCTCACCGTG CAGAGCTGCA CTTGNCCTCA GCTGNCTGNA      897

TGGAAATGCA                                                             907
```

（２）配列番号２４

（ｉ）配列の性質：

（Ａ）配列の長さ：１５８

（Ｂ）配列の型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｉｉ）配列の種類：蛋白質

（ｘｉ）配列：

```
Met Ser Gly Ile Ala Leu Ser Arg Leu Ala Gln Glu Arg Lys Ala Trp
 1               5                  10                  15

Arg Lys Asp His Pro Phe Gly Phe Val Ala Val Pro Thr Lys Asn Pro
            20                  25                  30

Asp Gly Thr Met Asn Leu Met Asn Trp Glu Cys Ala Ile Pro Gly Lys
        35                  40                  45

Lys Gly Thr Pro Trp Glu Gly Gly Leu Phe Lys Leu Arg Met Leu Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Asp Tyr Pro Ser Ser Pro Pro Lys Cys Lys Phe Glu Pro Pro
65                  70                  75                  80

Leu Phe His Pro Asn Val Tyr Pro Ser Gly Thr Val Cys Leu Ser Ile
                85                  90                  95

Leu Glu Glu Asp Lys Asp Trp Arg Pro Ala Ile Thr Ile Lys Gln Ile
            100                 105                 110

Leu Leu Gly Ile Gln Glu Leu Leu Asn Glu Pro Asn Ile Gln Asp Pro
        115                 120                 125

Ala Gln Ala Glu Ala Tyr Thr Ile Tyr Cys Gln Asn Arg Val Glu Tyr
    130                 135                 140

Glu Lys Arg Val Arg Ala Gln Ala Lys Lys Phe Ala Pro Ser
145                 150                 155
```

（２）配列番号２５

（ｉ）配列の性質：

（Ａ）配列の長さ：２０７

（Ｂ）配列の型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖および二本鎖の両方

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｉｉ）配列の種類：他の核酸

（ｘｉ）配列：

```
CCCTCCCTCC TGCCGCTCCT CTCTAGAACC TTCTAGAACC TGGGCTGTGC TGCTTTTGAG      60

CCTCAGACCC CAGGGCAGCA TCTCGGTTCT GCGCCACTTC CTTTGTGTTT ANATGGCGTT     120

TTGTCTGTGT TGCTGTTTAG AGTAGATNAA CTGTTTANAT AAAAAAAAAA NAAAATTNAC     180

TNGAGGGGGC NTGNAGGCAT GCNNAAC                                         207
```

【図１】

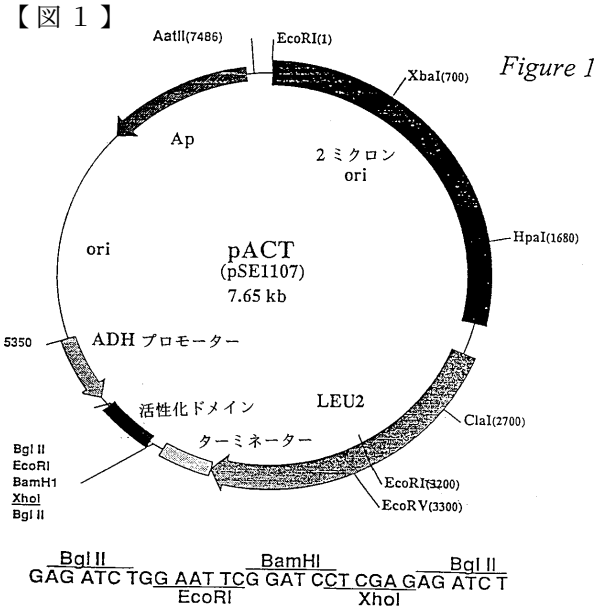


Figure 1

cDNAがＸｈｏＩ部位内に挿入されている。

【図２】

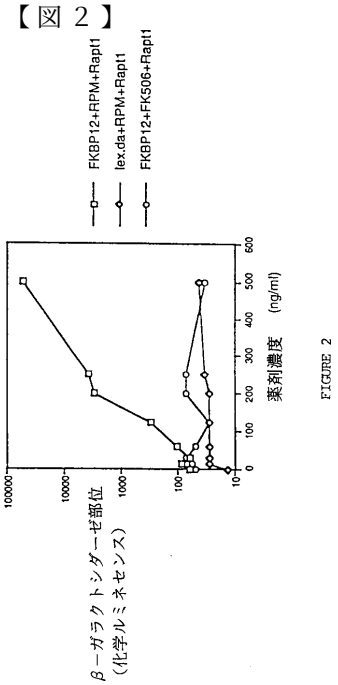


FIGURE 2

【図３】

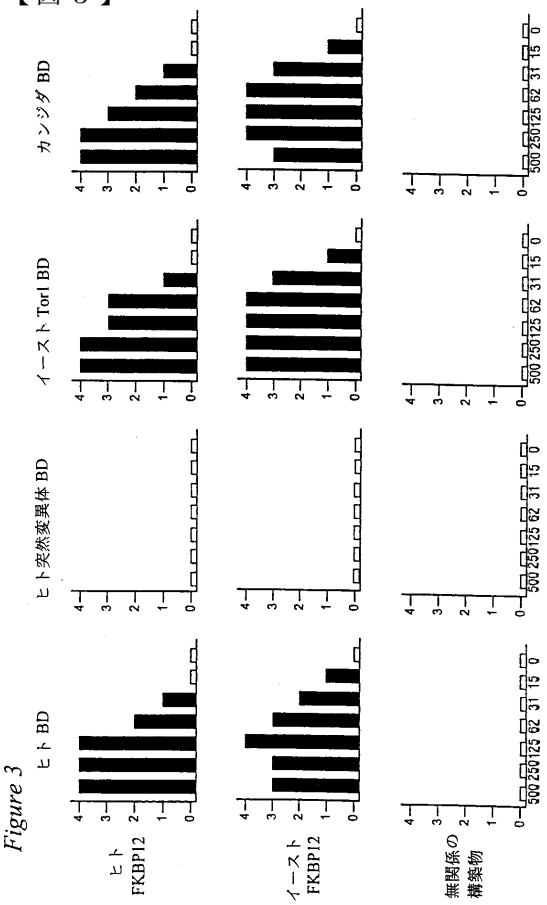


Figure 3

フロントページの続き

微生物の受託番号 ATCC 75787

(72)発明者 チウ, マリー・イザベル
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０２１０９ボストン・コモンウエルスアベニユー２８８・アパートメントナンバー３
(72)発明者 コタレル, ギヨーム
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０２１３２ウエストロクスバリー・リカーヒルロード１５
(72)発明者 ダマグネス, ベロニク
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０２１４１ケンブリツジ・ナンバー３・サイアラツパストリート１１９

合議体
審判長 種村 慈樹
審判官 鈴木 恵理子
審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 特開平８－５９６９６（ＪＰ，Ａ）
Ｎａｔｕｒｅ（１９９４）Ｖｏｌ．３６９，ｐ．７５６－７５８
Ｃｅｌｌ（１９９４）Ｖｏｌ．７８，ｐ．３５－４３

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N15/00
C07K14/00
GENBANK
MEDLINE
BIOSIS