

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4458551号
(P4458551)

(45) 発行日 平成22年4月28日(2010.4.28)

(24) 登録日 平成22年2月19日(2010.2.19)

(51) Int.Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

C O 7 K 14/47 (2006.01)

C O 7 K 14/47

C O 7 K 16/18 (2006.01)

C O 7 K 16/18

請求項の数 27 (全 96 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-508277
 (86) (22) 出願日 平成8年8月5日(1996.8.5)
 (65) 公表番号 特表平11-511013
 (43) 公表日 平成11年9月28日(1999.9.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB1996/001022
 (87) 国際公開番号 W01997/006255
 (87) 国際公開日 平成9年2月20日(1997.2.20)
 審査請求日 平成15年8月5日(2003.8.5)
 (31) 優先権主張番号 08/511, 485
 (32) 優先日 平成7年8月4日(1995.8.4)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 08/576, 956
 (32) 優先日 平成7年12月22日(1995.12.22)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 597133341
 ユニバーシティ オブ オタワ
 University of Ottawa
 カナダ国 オンタリオ州 オタワ キャン
 パーランド 550
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳類アポトーシス抑制性蛋白質遺伝子ファミリー、プライマー、プローブおよび検出法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：4、6、8、10、40、または42を含むポリペプチドをコードする実質的に純粋な核酸。

【請求項2】

核酸が、配列番号：3、5、7、9、39、または41に記載の核酸配列を含む、請求項1記載の核酸。

【請求項3】

核酸がゲノムDNAまたはcDNAである、請求項1または2に記載の核酸。

【請求項4】

核酸がポリペプチドの発現のための調節配列と機能的に結合しており、該調節配列がプロモーターを含む、請求項1～3のいずれかに記載の核酸。

【請求項5】

プロモーターが構成的プロモーターであるか、1つまたはそれ以上の外部因子によって誘導可能であるか、または細胞種特異的である、請求項4記載の核酸。

【請求項6】

請求項1～5のいずれかに記載の核酸を含み、該核酸にコードされるペプチドの発現をベクター含有細胞において指向する能力を有するベクター。

【請求項7】

請求項1～5のいずれかに記載の核酸を含む単離された細胞。

【請求項 8】

線維芽細胞、ニューロン、グリア細胞、昆虫細胞、胚幹細胞およびリンパ球からなる群より選択される、請求項7記載の単離された細胞。

【請求項 9】

請求項1～5のいずれかに記載の核酸を含むトランスジェニック細胞であって、該核酸が該トランスジェニック細胞内で発現する、トランスジェニック細胞。

【請求項 10】

実質的に純粋な配列番号：4、6、8、10、40、または42を含むポリペプチド。

【請求項 11】

請求項1～5のいずれかに記載の核酸によってコードされる、ポリペプチド。

10

【請求項 12】

生理学的に許容される担体中に処方されている活性成分として、請求項10または11記載のポリペプチドを含む治療的組成物。

【請求項 13】

動物細胞における配列番号：4、6、8、10、40、または42を含むポリペプチドをコードするIAP遺伝子を検出する方法であって、請求項1記載の核酸または長さが約18ヌクレオチドを超えるその一部を、該動物細胞からのゲノムDNA調製物と接触させる段階を含む、方法。

【請求項 14】

以下の段階を含む、IAPポリペプチドを得るための方法：

20

- (a) 細胞内で発現するための位置に置かれた、配列番号：4、6、8、10、40、または42を含むポリペプチドをコードする核酸を有する細胞を提供する段階、
- (b) 該核酸が発現するための条件下で該細胞を培養する段階、および
- (c) 該IAPポリペプチドを単離する段階。

【請求項 15】

核酸が、1つまたはそれ以上の外部因子によって誘導可能なプロモーターをさらに含む、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

以下の段階を含む、組換えDNAライブラリーから配列番号：4、6、8、10、40、または42を含むポリペプチドをコードするIAP遺伝子を単離する方法：

30

- (a) 組換えDNAライブラリーを提供する段階、
- (b) 配列番号：4、6、8、10、40、または42を含むポリペプチドをコードするIAP遺伝子を検出できるようなハイブリダイゼーション条件下において、該組換えDNAライブラリーと、検出可能な標識がなされた長さが約18ヌクレオチドを超える配列番号：4、6、8、10、40、または42をコードする核酸の断片とを接触させる段階、および
- (c) 該検出可能な標識との会合によりIAP遺伝子のメンバーを単離する段階。

【請求項 17】

配列番号：4、6、8、10、40、または42を含むポリペプチドと特異的に結合する精製抗体。

【請求項 18】

40

- (a) 配列番号：4、6、8、10、40、または42を含むポリペプチドを発現している細胞を提供する段階と、
- (b) 配列番号：4、6、8、10、40、または42を含むポリペプチドをコードするIAP遺伝子の発現レベルの変化からアポトーシスを調節する化合物の存在が示されるような、該細胞と候補化合物とを接触させ、IAP遺伝子の発現をモニターする段階とを含む、アポトーシスを調節する化合物を同定する方法。

【請求項 19】

IAP遺伝子が、配列番号：3、5、7、9、39、または41を含むDNAを含む、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

50

細胞がリンパ球であって、IAPが、配列番号：6および8を含むポリペプチドからなる群より選択され、調節が、配列番号：6または8を含むポリペプチドの発現の増強である、請求項18または19記載の方法。

【請求項21】

IAP遺伝子の発現が蛋白質検出によってモニターされる、請求項18記載の方法。

【請求項22】

アポトーシス性疾患の存在またはアポトーシス性疾患を発症する可能性が高いか否かに関して哺乳動物を診断するためのキットであって、配列番号：4、6、8、10、40、または42を含むポリペプチドと特異的に結合する実質的に純粋な抗体を含む、キット。

【請求項23】

抗体の配列番号：4、6、8、10、40、または42を含むポリペプチドとの結合を検出するための手段をさらに含む、請求項22記載のキット。

【請求項24】

アポトーシスの抑制に用いるための請求項1～5のいずれかに記載の核酸。

【請求項25】

アポトーシスの抑制に用いるための請求項10または11記載のポリペプチド。

【請求項26】

アポトーシスを抑制するための医薬品の製造を目的とする請求項10または11記載のポリペプチドの使用。

【請求項27】

アポトーシスを抑制するための医薬品の製造を目的とする請求項1～5のいずれかに記載の核酸の使用。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

本発明はアポトーシスに関する。

細胞の死滅には2つの一般的な様式がある。最もよく認識されている様式は壊死によるものであり、これは通常は細胞のホメオスタシスを破壊するのに十分な重度の損傷によって引き起こされる。典型的には、細胞の浸透圧が乱され、その結果として細胞が膨張し、続いて破裂する。細胞内容物が周囲の組織空間に漏出した場合には、しばしば炎症反応が引き続いて起こる。

細胞が死滅する第2の一般的な様式は、アポトーシスまたはプログラム細胞死と呼ばれる。アポトーシスは非常に迅速に起こるため、検出が難しい場合が少なくない。これは、幅広いさまざまな生物的過程におけるアポトーシスの関与が、ごく最近になるまで認識されなかった理由の説明となると思われる。

アポトーシス経路は、進化の過程を通じて高度に保存されており、胚発生、ウイルスの病原性、癌、自己免疫疾患および神経変性疾患において重要な役割を果たしている。例えば、過剰なアポトーシスは、AIDS、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、色素性網膜炎および他の網膜疾患、骨髄異形成症候群（再生不良性貧血など）、アルコール中毒症などの中毒性肝障害、ならびに虚血性損傷（例えば、心筋梗塞、脳卒中および再灌流障害など）を引き起こしたり、その一因となる場合がある。逆に、アポトーシス性反応の不全は、特に濾胞性リンパ腫、p53を介した癌（p53-mediated carcinoma）およびホルモン依存性腫瘍などの癌、エリテマトーデスおよび多発性硬化症などの自己免疫疾患、ならびにヘルペスウイルス、ボックスウイルスおよびアデノウイルスなどに起因するウイルス感染症の発生に関係するとされている。

HIV-1に感染した患者では、マイトジェンまたはスーパー抗原による刺激に成熟CD4⁺Tリンパ球が反応してアポトーシスを生じる。しかし、これらの細胞の大多数はウイルスには感染しない。したがって、HIV感染の初期に免疫系のこの極めて重要な部分が破壊される原因は不適切な抗原誘発性アポトーシスであると考えられる。

バキュロウイルスは、昆虫細胞がウイルスに感染した場合に通常ならば起こるはずのアポトーシスを抑制することからアポトーシス蛋白質抑制因子と呼ばれている蛋白質をコード

10

20

30

40

50

する。これらの蛋白質は、他のウイルス蛋白質とは独立した様式で作用すると考えられている。バキュロウイルスのIAP遺伝子は、DNA結合に直接関与すると推定されているリングジンクフィンガー様モチーフ（RZF）、およびBIRドメインと呼ばれる70アミノ酸反復モチーフ（バキュロウイルスIAP反復部）からなる2つのN端ドメインを含む。

発明の概要

一般に、本発明は、哺乳類IAPポリペプチドをコードするゲノム、cDNAまたは合成DNA分子などの実質的に純粋なDNA分子を特徴とする。このDNAは、ベクター内に、哺乳類、酵母もしくは細菌などの細胞内に、またはトランスジェニック動物もしくはその胚内に組み込まれたものでもよい。好ましい態様において、このDNA分子はマウス遺伝子（例えば、m-xiap、m-hiap-1またはm-hiap-2）またはヒト遺伝子（例えば、xiap、hiap-1またはhiap-2）である。最も好ましい態様において、IAP遺伝子はヒトIAP遺伝子である。その他のさまざまな好ましい態様において、細胞は形質転換細胞である。関連した局面において、本発明は、アポトーシスを通常起こす能力を有する組織、すなわちアポトーシスの導入または抑制のいずれかによって損傷を受ける組織において発現する、またはそのような組織に送達されるIAPポリペプチドをコードする導入遺伝子を含むトランスジェニック動物を特徴とする。さらにもう1つの態様において、本発明は、本明細書で提供されるBIRドメインおよびRZFドメインを含むIAPポリペプチドの断片をコードするDNAを特徴とする。

特殊な態様において、本発明は、図1～6に示した配列またはその断片と実質的に同一なDNA配列を特徴とする。もう1つの局面において、本発明は、本明細書で説明するDNAによってコードされるRNAも特徴とする。好ましくは、このRNAはmRNAである。別の態様において、このRNAはアンチセンスRNAである。

もう1つの局面において、本発明は、図1～6に示したIAPアミノ酸配列の1つと実質的に同一な配列を有する実質的に純粋なポリペプチドを特徴とする。

第2の局面において、本発明は、アポトーシスを起こす能力を有する細胞内でIAP遺伝子を発現する能力を有するプロモーターを含む実質的に純粋なDNAを特徴とする。好ましい態様において、このIAP遺伝子はxiap、hiap-1またはhiap-2である。最も好ましくは、この遺伝子はヒトまたはマウスの遺伝子である。hiap-2をコードする遺伝子は、図3に示したような完全長の遺伝子でも、または図3の枠で囲まれた配列が欠失した変異体などの切断型変異体でもよい。

好ましい態様において、プロモーターはIAP遺伝子に固有のプロモーターである。また、転写および翻訳に関する調節領域は、好ましくはIAP遺伝子に固有のものである。もう1つの態様において、本発明は、遺伝子組換え細胞系およびトランスジェニック動物を提供する。本発明の遺伝子組換え細胞は、好ましくはそのアポトーシス反応が改変された細胞である。好ましい態様において、この遺伝子組換え細胞は、線維芽細胞、神経細胞、リンパ球、グリア細胞、胚幹細胞または昆虫細胞である。最も好ましくは、ニューロンは運動ニューロンであり、リンパ球はCD4⁺T細胞である。

もう1つの局面において、本発明は、IAPポリペプチドをコードする導入遺伝子を有する遺伝子組換え細胞の作製を含む、アポトーシス抑制の方法を特徴とする。この導入遺伝子は、発現を可能とするような様式で細胞のゲノムに組み込まれる。さらに、細胞内での発現のレベルはアポトーシスを抑制するのに十分である。

関連した局面において、本発明は、少なくとも1つのIAP遺伝子のコピーが増えるような形でゲノム内に挿入された（変異型または野生型）、またはゲノム内の少なくとも1つのIAP遺伝子がノックアウトされたトランスジェニック動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくは齧歯類、最も好ましくはマウスを特徴とする。このトランスジェニック動物は、用いた構築物およびゲノム改変の性質に応じて、増加または減少した量のIAPポリペプチドを発現すると考えられる。例えば、IAPの全体または一部をコードする核酸分子を用いてIAP遺伝子中にノックアウト変異を生じるように操作することによって、対応するIAPポリペプチドの全体または一部の発現が低下した動物が作製される。これに対して、好ましくは活性のある調節性およびプロモーター性の要素の制御下において、IAP遺伝子の全体または一部の外因性コピーをゲノム中に挿入することは、対応するIAPポリペプチドの発現の

10

20

30

40

50

増強をもたらすと考えられる。

もう1つの局面において、本発明は、細胞からのゲノムDNAの調製物を用いてのIAP遺伝子またはその一部（これは9ヌクレオチド長を超え、好ましくは18ヌクレオチド長を超える）との接触により、細胞内のIAP遺伝子を検出する方法を特徴とする。IAP遺伝子およびゲノムDNAは、HIAP-1、HIAP-2またはXIAPポリペプチドをコードするDNAとの同一性が少なくとも50%であるDNA配列のハイブリダイゼーション（およびその結果としての検出）を可能とする条件下において接触させられる。

もう1つの局面において、本発明はIAPポリペプチドを産生する方法を特徴とする。この方法には、IAPポリペプチドの全体または一部をコードするDNA（これは細胞内で発現するための位置に置かれている）を有する細胞の提供、DNAの発現を可能とする条件下における細胞の培養、およびIAPポリペプチドの単離が含まれる。好ましい態様において、IAPポリペプチドは、構成的または誘導可能なプロモーターの制御下にあるDNAによって発現される。本明細書で説明する通り、プロモーターは異種プロモーターであってもよい。

もう一つの局面において、本発明は実質的に純粋な哺乳類IAPポリペプチドを特徴とする。好ましくは、このポリペプチドは、図1~4のいずれか1つに示されたアミノ酸配列の全体またはその断片と実質的に同一なアミノ酸配列を含む。最も好ましくは、このポリペプチドは、XIAP、HIAP-1、HIAP-2、M-XIAP-1またはM-HIAPのポリペプチドである。また、BIRドメイン（RZFは含まない）、RZFドメイン（BIRドメインは含まない）、および本明細書で提供される少なくとも1つのBIRドメインを有するRZFドメイン、の1つまたはそれ以上を含む断片も本発明の一部である。

もう1つの局面において、本発明は、アポトーシスを調節する能力を有する組換え哺乳類ポリペプチドを特徴とする。このポリペプチドは、本明細書で定義するように、少なくとも1つのリングジンクフィンガードメインおよびBIRドメインを含む。好ましい態様において、本発明は、（a）実質的に純粋な1つのポリペプチド、および（b）そのポリペプチドをコードする1つのオリゴヌクレオチドを特徴とする。このポリペプチドがリングジンクフィンガードメインを含む場合には、このリングジンクフィンガードメインは以下の配列と一致する配列を有すると考えられる：Glu-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa2-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Cys-Lys-Xaa3-Cys-Met-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa3-Xaa1-Phe-Xaa1-Pro-Cys-Gly-His-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Cys-Xaa1-Xaa1-Cys-Ala-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Cys-Pro-Xaa1-Cys、ここでXaa1は任意のアミノ酸であり、Xaa2はGluまたはAsp、Xaa3はValまたはIleである（配列番号：1）；また、ポリペプチドは少なくとも1つのBIRドメインを含み、BIRドメインは以下の配列を有すると考えられる：Xaa1-Xaa1-Xaa1-Arg-Leu-Xaa1-Thr-Phe-Xaa1-Xaa1-Trp-Pro-Xaa2-Xaa1-Xaa1-Xaa2-Xaa2-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Leu-Ala-Xaa1-Ala-Gly-Phe-Tyr-Tyr-Xaa1-Gly-Xaa1-Xaa1-Asp-Xaa1-Val-Xaa1-Cys-Phe-Xaa1-Cys-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Trp-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Asp-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-His-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Pro-Xaa1-Cys-Xaa1-Phe-Val、ここでXaa1は任意のアミノ酸であり、Xaa2は任意のアミノ酸であっても欠失していてもよい（配列番号：2）。

さまざまな好ましい態様において、このポリペプチドは少なくとも2つ、またはより好ましくは少なくとも3つのBIRドメインを有し、RZFドメインは図6に示したIAP配列の1つを有し、BIRドメインは図5に示したBIRドメインから構成される。その他の好ましい態様において、BIRドメインは、RZFドメインと比較して蛋白質のアミノ末端に位置しており、RZFドメインはポリペプチドのカルボキシル末端またはその近傍に位置している。

もう1つの局面において、本発明は、（a）DNAの試料を提供する段階、（b）IAP性疾患抵抗性遺伝子の保存領域との配列相同性を有する1対のオリゴヌクレオチドを提供する段階、（c）ポリメラーゼ連鎖反応を介したDNA増幅に適した条件下において、1対の該オリゴヌクレオチドと細胞DNA試料とを混合する段階、および（d）増幅されたIAP遺伝子またはその断片を単離する段階、を含む方法に従って単離されたIAP遺伝子を特徴とする。

好ましい態様において、増幅は逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、例えばRACE法を用いて実施される。もう1つの局面において、本発明は、（a）DNAの調製物を提供する段階、（b）IAP遺伝子の保存領域との相同性を有する、検出可能な標識がなされたDNA配列を提供する段

10

20

30

40

50

階、(c)ヌクレオチド配列の同一性が50%またはそれ以上である遺伝子が検出できるようなハイブリダイゼーション条件下において、DNA調製物と検出可能な標識がなされたDNA配列とを接触させる段階、および(d)検出可能な標識とのその会合によりIAP遺伝子を同定する段階、を含む方法に従って単離されたIAP遺伝子を特徴とする。

もう1つの局面において、本発明は、(a)細胞試料を提供する段階、(b)形質転換により細胞試料へ候補IAP遺伝子を導入する段階、(c)細胞試料内において候補IAP遺伝子を発現させる段階、および(d)その反応によってIAP遺伝子が同定されるよう改変されたアポトーシス反応をその細胞試料が呈するか否かを判定する段階、を含む方法に従って単離されたIAP遺伝子を特徴とする。

もう1つの局面において、本発明は、(a)細胞DNAの調製物(例えば、ヒトゲノムまたはcDNAライブラリー(アポトーシスを起こす細胞種から単離されたcDNAライブラリーなど)からのもの)を提供する段階、(b)IAP遺伝子の保存領域との相同性を有する、検出可能な標識がなされたDNA配列(例えば、本発明の方法によって調製されたもの)を提供する段階、(c)ヌクレオチドの配列の同一性が50%またはそれ以上である遺伝子を検出できるようなハイブリダイゼーション条件下において、細胞DNAの調製物と検出可能な標識がなされたDNA配列とを接触させる段階、および(d)検出可能な標識との会合によりIAP遺伝子を同定する段階を含む、細胞内のIAP遺伝子を同定する方法を特徴とする。

もう1つの局面において、本発明は、(a)組換えライブラリーを提供する段階、(b)ヌクレオチドの配列の同一性が50%またはそれ以上である遺伝子を検出できるようなハイブリダイゼーション条件下において、該ライブラリーと、本発明のPCR法に従って産生された検出可能な標識がなされた遺伝子断片とを接触させる段階、および(c)検出可能な標識との会合によりIAP遺伝子を単離する段階を含む、組換えライブラリーからIAP遺伝子を単離する方法を特徴とする。もう1つの局面において、本発明は、(a)細胞組織の試料を提供する段階、(b)形質転換により該細胞試料へ候補IAP遺伝子を導入する段階、(c)細胞試料内において候補IAP遺伝子を発現させる段階、および(d)アポトーシスにおける変化(すなわち、調節など)によってIAP遺伝子が同定される、細胞試料がアポトーシスの抑制を示すか否かの決定を含む、IAP遺伝子を同定する方法を特徴とする。好ましくは、この細胞試料は、アポトーシスについてアッセイが可能と考えられる細胞種である(例えば、T細胞、B細胞、神経細胞、バキュロウイルスに感染した昆虫細胞、グリア細胞、胚幹細胞、および線維芽細胞)。候補IAP遺伝子は例えばcDNA発現ライブラリーから入手したものであり、アッセイされる反応はアポトーシスの抑制である。

もう1つの局面において、本発明は、哺乳動物におけるアポトーシスを抑制する方法であって、(a)アポトーシスを起こしやすい細胞へ少なくとも1つのIAPポリペプチドをコードするDNAを提供する段階であって、そのDNAが細胞のゲノムに組み込まれて細胞内で発現するための位置に置かれており、IAP遺伝子が遺伝子の制御された発現に適した調節配列の制御下にあり、そのIAP導入遺伝子がIAP導入遺伝子を欠く細胞と比較してアポトーシスを抑制するのに十分なレベルで発現するようなDNAを提供する段階、を含む方法の特徴とする。ゲノム内に組み込まれるDNAは、IAPポリペプチドの全体または一部をコードするものでもよい。それは、例えば、1つのリングジンクフィンガーおよび1つまたはそれ以上のBIRドメインをコードするものでもよい。これに対して、それは、リングジンクフィンガーのみ、または1つもしくはそれ以上のBIRドメインのみのいずれかをコードするものでもよい。当業者には、望ましくないアポトーシスを抑制するためにIAPポリペプチドが直接投与されてもよいことが認識されると思われる。

関連した局面において、本発明は、IAP遺伝子またはその断片を含む導入遺伝子がゲノムに組み込まれた細胞を作製することによってアポトーシスを抑制する方法を特徴とする。このIAP遺伝子は、IAP遺伝子の構成的発現を提供するプロモーターの制御下にある位置に置かれてもよい。または、IAP導入遺伝子は、環境刺激によって調節されるような遺伝子の発現を可能とするプロモーターの制御下にある位置に置かれてもよい。例えば、IAP遺伝子は、組織特異的もしくは細胞種特異的なプロモーターを用いて、または化学的信号もしくは試薬などの外来性信号もしくは外来性因子の導入によって活性化されるプロモータ

10

20

30

40

50

ーによって発現されてもよい。好ましい態様において、この細胞は、リンパ球、神経細胞、グリア細胞または線維芽細胞である。その他の態様において、それはHIVに感染したヒト、または神経変性疾患、虚血性損傷、中毒性肝障害もしくは骨髄異形成性症候群に罹患した哺乳動物の細胞である。

関連した局面において、本発明は、アポトーシス抑制量のIAPポリペプチドを提供することによって哺乳動物におけるアポトーシスを抑制する方法を提供する。IAPポリペプチドは完全長のポリペプチドであってもよく、本明細書に記載するその断片の1つであってもよい。

もう1つの局面において、本発明は、IAPファミリー蛋白質と特異的に結合する精製抗体を特徴とする。このような抗体は、IAPポリペプチドの同定のための任意の標準的な免疫検出法において用いることができる。好ましくは、この抗体はXIAP、HIAP-1またはHIAP-2と特異的に結合する。さまざまな態様において、この抗体は、他のIAPポリペプチドと反応してもよく、1つまたは少数のIAPポリペプチドに特異的であってもよい。抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。好ましくは、抗体はIAPポリペプチドの1つのみと特異的に反応し、例えばマウスおよびヒトのxiapとは反応するが、他の哺乳動物種のhiap-1またはhiap-2とは反応しない。

本発明の抗体はさまざまな方法によって調製することができる。例えば、ポリクローナル抗体の産生を誘発させるために、動物にIAPポリペプチドまたはその抗原性断片を投与してもよい。または、本明細書で記載するように使用される抗体は、ハイブリドーマ技術を用いて調製されるモノクローナル抗体であってもよい（例えば、Kohlerら、Nature 256:495、1975；Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6:511、1976；Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6:292、1976；Hammerlingら、モノクローナル抗体およびT細胞ハイブリドーマ（Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridoma）、Elsevier、NY、1981）。本発明は、ヒトもしくはマウスのIAPポリペプチドまたはその断片と特異的に結合する抗体を特徴とする。特に本発明は「中和」抗体を特徴とする。「中和」抗体とは、IAPポリペプチドの任意の生物活性、特にIAPがアポトーシスを抑制する能力を阻害する抗体を意味する。中和抗体は、IAPポリペプチドがポリペプチドを阻害する能力を、好ましくは50%、より好ましくは70%、最も好ましくは90%またはそれ以上低下させると考えられる。中和抗体の評価には、本明細書で説明するものを含め、アポトーシスの任意の標準的なアッセイを用いることができる。

本来のモノクローナルおよびポリクローナルの抗IAP抗体のほかに、本発明は、さまざまな遺伝的に操作された抗体、ヒト化抗体ならびにF(ab')₂、Fab'、Fab、FvおよびsFv断片を含む抗体断片を特徴とする。抗体は、当技術分野で公知の方法によってヒト化することができ、例えば所望の結合特異性を有するモノクローナル抗体を商業的にヒト化することができる（Scotgene、Scotland；Oxford Molecular、Palo Alto、CA）。また、トランスジェニック動物で発現されるような完全なヒト抗体も本発明の特徴である（Greenら、Nature Genetics 7:13~21、1994）。

ラドナー（Ladner）（米国特許第4,946,778号および第4,704,692号）は、単一ポリペプチド鎖抗体を調製する方法を記載している。ワード（Ward）ら（Nature 341:544~546、1989）は、重鎖可変領域の調製物を記載しており、高い抗原結合親和性を有するそれらを「単一領域抗体」と命名している。マッカファーティ（MacCafferty）ら（Nature 348:552~554、1990）は、完全な抗体V領域がfdバクテリオファージの表面に提示され、このファージが抗原と特異的に結合し、ファージのごく一部（100万個のうち1個）をアフニティークロマトグラフィーの後に単離することができることを示している。ボス（Boss）ら（米国特許第4,816,397号）は、免疫グロブリン、および単一宿主細胞において少なくとも重鎖および軽鎖の可変領域を含んでおり免疫機能を有するその断片を産生するためのさまざまな方法を記載している。キャビリー（Cabilly）ら（米国特許第4,816,567号）はキメラ抗体を調製するための方法を記載している。

もう1つの局面において、本発明は、アポトーシスを調節する化合物を同定するための方法の特徴とする。この方法は、IAPポリペプチドを発現する細胞の提供、その細胞と候補

10

20

30

40

50

化合物との接触、およびIAP遺伝子の発現の観測を含む。IAP遺伝子の発現レベルにおける変化により、アポトーシスを調節する化合物が存在することが示される。この化合物はアポトーシスの抑制因子でも増強因子でもよい。さまざまな好ましい態様において、この細胞は、線維芽細胞、神経細胞、グリア細胞、リンパ球（T細胞またはB細胞）または昆虫細胞であり、その発現が観測されるポリペプチドは、XIAP、HIAP-1、HIAP-2、M-XIAP、M-HIAP-1またはM-HIAP-2（すなわち、ヒトまたはマウス）である。

関連した局面において、本発明は、相互作用トラップ（interaction trap）技術、およびおとり（bait）の要素としてIAPポリペプチドまたはその断片を用いてアポトーシスを調節する化合物を検出する方法を特徴とする。好ましい態様において、アポトーシスの調節因子として試験される化合物はポリペプチドでもある。

10

もう1つの局面において、本発明は、IAP核酸プローブまたは抗体を用いて、細胞増殖性疾患、またはそのような疾患の易発症性（increased likelihood）を診断するための方法の特徴とする。好ましくは、この疾患は癌である。最も好ましくは、この疾患は、前骨髄球性白血病、Hela型癌、慢性骨髄性白血病（好ましくはxiapまたはhiap-2に関連したプローブを用いる）、リンパ芽球性白血病（好ましくはxiapに関連したプローブを用いる）、パーキットリンパ腫（好ましくはhiap-1に関連したプローブを用いる）、結腸直腸腺癌、肺癌および悪性黒色腫（好ましくはxiapプローブを用いる）からなる群より選択される。好ましくは診断は、発現または活性が2倍に増強することによって示され、より好ましくは、発現または活性が少なくとも10倍に増強することによってなされる。

当業者には、哺乳類IAPまたはその断片（本明細書で説明するようなもの）が、治療的組成物における活性成分として機能すると考えられることが認識されることが思われる。この組成物は、それに含まれるIAPまたは断片に応じて、アポトーシスを調節し、それによってアポトーシスの障害によって引き起こされる任意の状態を治療するために用いることができる。と考えられる。

20

このほか、IAP依存的な抗アポトーシス経路の負の調節因子を細胞に投与することによって、該細胞においてアポトーシスが誘導されるとも考えられる。この負の調節因子は無制限的に、リングジンクフィンガーを含むIAPポリペプチド、およびリングジンクフィンガーを含むが少なくとも1つのBIRドメインを欠失したIAPポリペプチドであってもよい。または、以上の2つのポリペプチドなどのIAPポリペプチドをコードする遺伝子を投与することによって、細胞にアポトーシスを誘導させることもできる。さらにもう1つの方法では、負の調節因子は、IAPポリペプチドと特異的に結合する精製抗体またはその断片であってもよい。例えば、この抗体は、少なくとも1つのBIRドメインを含むがリングジンクフィンガードメインは欠失したIAPポリペプチドの約26KDaの切断産物と結合するものでもよい。また、負の調節因子はIAPアンチセンスmRNA分子であってもよい。

30

以上に概要を示した通り、アポトーシスを調節するために、IAP核酸またはIAPポリペプチドを用いることができる。さらに、アポトーシスを調節するための医薬品の製造において、IAP核酸またはIAPポリペプチドを用いることもできる。

「IAP遺伝子」とは、その他の細胞内または細胞外送達法によって提供された場合に細胞または組織においてアポトーシスを調節する（抑制する、または増強する）ことのできる、少なくとも1つのBIRドメインおよびリングジンクフィンガードメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子を意味する。好ましい態様において、IAP遺伝子は、図1~4に示した少なくとも一つのIAPアミノ酸コード配列またはその一部とのヌクレオチド配列との同一性が約50%またはそれ以上である遺伝子である。好ましくは、同一性を評価する配列の領域は、少なくとも1つのBIRドメインおよびリングジンクフィンガードメインをコードする領域である。哺乳類IAP遺伝子は、任意の哺乳動物の供給源から単離されたヌクレオチド配列を含む。好ましくは、この哺乳動物はヒトである。

40

「IAP遺伝子」という用語は、アポトーシスを調節する能力によって特徴づけられるアポトーシス抑制性遺伝子ファミリーのあらゆるメンバーを包含することを意味する。IAP遺伝子は、本明細書に記載するIAPのメンバー（すなわち、ヒトまたはマウスのxiap、hiap-1およびhiap-2からのBIRまたはリングジンクフィンガードメイン）の中の1つの保存領域

50

の少なくとも1つとのアミノ酸配列の同一性が少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、最も好ましくは少なくとも50%であるポリペプチドをコードするものであってよい。IAP遺伝子ファミリーの代表的なメンバーには、無制限的にヒトおよびマウスのxiap、hiap-1およびhiap-2の遺伝子が含まれる。

「IAP蛋白質」または「IAPポリペプチド」とは、IAP遺伝子によってコードされるポリペプチドまたはその断片を意味する。

「BIRドメイン」とは、以下の共通配列のアミノ酸配列を有するドメインを意味する：Xaa1-Xaa1-Xaa1-Arg-Leu-Xaa1-Thr-Phe-Xaa1-Xaa1-Trp-Pro-Xaa2-Xaa1-Xaa1-Xaa2-Xaa2-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Leu-Ala-Xaa1-Ala-Gly-Phe-Tyr-Tyr-Xaa1-Gly-Xaa1-Xaa1-Asp-Xaa1-Val-Xaa1-Cys-Phe-Xaa1-Cys-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Trp-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Asp-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-His-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Pro-Xaa1-Cys-Xaa1-Phe-Val、ここでXaa1は任意のアミノ酸であり、Xaa2は任意のアミノ酸であっても欠失していてもよい（配列番号：2）。好ましくは、この配列は、本明細書でxiap、hiap-1およびhiap-2に関して提供されるBIRドメインの1つと実質的に同一である。

「リングジンクフィンガー」または「RZF」とは、以下の共通配列のアミノ酸配列を有するドメインを意味する：Glu-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa2-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Cys-Lys-Xaa3-Cys-Met-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa3-Xaa1-Phe-Xaa1-Pro-Cys-Gly-His-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Cys-Xaa1-Xaa1-Cys-Ala-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Xaa1-Cys-Pro-Xaa1-Cys、ここでXaa1は任意のアミノ酸であり、Xaa2はGluまたはAsp、Xaa3はValまたはIleである（配列番号：1）。

好ましくは、この配列は、本明細書中でヒトまたはマウスのxiap、hiap-1およびhiap-2に関して提供されるRZFドメインと実質的に同一である。

「アポトーシスを調節する」または「アポトーシスを変化させる」とは、特定の細胞集団において、当該行為を行わなかった場合と比べて、アポトーシスを起こす細胞数が増加または減少することを意味する。好ましくは、この細胞集団には、T細胞、神経細胞、線維芽細胞、または一定の実験条件においてアポトーシスを起こすことが知られているその他のあらゆる細胞系（例えば、バキュロウイルスが感染した昆虫細胞）が含まれる。所与のアッセイにおいてIAPまたは調節性化合物によって提供される調節の程度がさまざまに異なりうることは認識されると思われるが、当業者には、IAPまたはIAPを調節する化合物が同定されるアポトーシスのレベルにおける統計学的に有意な変化を判定することが可能である。

「アポトーシスを抑制する」とは、処置を施していない対照と比べてアポトーシスを起こす細胞数がいづらか減少することを意味する。好ましくは、この減少は少なくとも25%、より好ましくはこの減少は50%であり、最も好ましくは、この減少は100%である。

「ポリペプチド」とは、グリコシル化またはリン酸化などの翻訳後修飾の有無にかかわらず、2つ以上のアミノ酸からなるあらゆる鎖を意味する。

「実質的に同一」とは、参照アミノ酸配列または核酸配列との相溶性が少なくとも50%、好ましくは85%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%であるポリペプチドまたは核酸を意味する。ポリペプチドについては、比較する配列の長さが一般に、少なくとも16アミノ酸、好ましくは少なくとも20アミノ酸であり、より好ましくは少なくとも25アミノ酸であり、最も好ましくは35アミノ酸である。核酸については、比較する配列の長さが一般に、少なくとも50ヌクレオチド、好ましくは少なくとも60ヌクレオチドであり、より好ましくは少なくとも75ヌクレオチドであり、最も好ましくは110ヌクレオチドである。

配列の同一性は、典型的には配列解析ソフトウェアを用い、デフォルト設定のパラメータにした条件で測定される（例えば、Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705のSequence Analysis Software Packageなど）。このソフトウェア・プログラムは、種々の置換、欠失、およびその他の修飾に関する相溶性の程度を割り当てることにより、類似した配列を比較するものである。保存的置換には、一般に以下の各群内における置換が含まれる：グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパ

ラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。

「実質的に純粋なポリペプチド」とは、天然の状態で付随している成分から分離されたポリペプチドを意味する。典型的には、ポリペプチドは、天然の状態で伴っている蛋白質および天然の有機分子を除いた割合が重量にして少なくとも60%であれば実質的に純粋である。好ましくは、ポリペプチドは、重量にして少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも99%純粋なIAPポリペプチドである。実質的に純粋なIAPポリペプチドは、例えば、天然の供給源（例えば、線維芽細胞、神経細胞、またはリンパ球）からの抽出、IAPポリペプチドをコードする組換え核酸の発現、または蛋白質の化学合成によって得ることができる。純度は、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアク

10

リルアミドゲル電気泳動またはHPLC解析などの任意の適当な方法を用いて測定することができる。

蛋白質は、天然の状態で付随している汚染物質から分離されている場合に、天然の状態で伴う成分を実質的に含まない。このため、化学的に合成された蛋白質、または天然に由来する細胞と異なる無細胞系において産生された蛋白質は、天然の状態で伴う成分を実質的に含まないと考えられる。したがって、実質的に純粋なポリペプチドには、真核生物に由来するが大腸菌またはその他の原核生物において合成されたものも含まれる。「実質的に純粋なDNA」とは、本発明のDNAが由来する生物体の天然のゲノムにおいて、その遺伝子の近傍に位置する遺伝子を含まないDNAを意味する。従って、この用語には、例えば、ベクター、自律複製性プラスミドもしくはウイルス、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれる組換えDNA、またはその他の配列から独立した分離分子（例えば、PCRまたは制限エンドヌクレアーゼ消化によって産生されたcDNAまたはゲノムもしくはcDNAの断片）として存在する組換えDNAが含まれる。また、付加的なポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAもこれに含まれる。

20

「形質転換細胞」とは、その内部（またはその前駆細胞の内部）に、組換えDNA技術の手段によって、（本明細書で用いるように）IAPポリペプチドをコードするDNA分子が導入された細胞を意味する。

「導入遺伝子」とは、操作によって細胞内に挿入され、その細胞から発生する生物体のゲノムの一部となる、DNAのあらゆる断片を意味する。このような導入遺伝子には、トランスジェニック生物体に対して、部分的にまたは完全に異種由来（すなわち、外来性）である遺伝子が含まれてもよく、または生物体の内因性遺伝子と相同な遺伝子を示していてもよい。

30

「トランスジェニック」とは、操作によって細胞に挿入され、その細胞から発生する生物体のゲノムの一部となったDNA配列を含むあらゆる細胞を意味する。本明細書で用いるように、トランスジェニック生物体は一般にトランスジェニック哺乳動物（例えば、ラットまたはマウスなどの齧歯類）であり、DNA（導入遺伝子）は操作によって核ゲノム内に挿入される。

「形質転換」とは、外来分子を細胞に導入するためのあらゆる方法を意味する。リポフェクション、リン酸カルシウム沈澱法、レトロウイルス投与、電気穿孔、および遺伝子銃による形質転換は、用いることができる教示例のごく一部である。例えば、遺伝子銃による形質転換は、高速で射出されたタングステンまたは金の粒子などの微小弾丸を用いて、細胞に外来分子を導入する方法である。このような高速射出法は、本来はヘリウム、圧縮空気、および火薬を原動力とする技術が無制限的に含む圧力性射出に由来する。遺伝子銃による形質転換は、細胞内小器官（例えば、ミトコンドリアおよび葉緑体）、細菌、酵母、真菌、藻類、動物組織、および培養細胞を無制限的に含む非常にさまざまな種類の細胞および完全な組織に対する形質転換またはトランスフェクションに適用することができる。

40

「発現のための位置に置かれた」とは、DNA分子が、その配列の転写および翻訳を指向する（すなわち、例えばIAPポリペプチド、組換え蛋白質またはRNA分子の産生を促進するような）DNA配列と隣接した位置に置かれていることを意味する。

「レポーター遺伝子」とは、その発現をアッセイすることができる遺伝子を意味する。こ

50

のような遺伝子には、グルクロニダーゼ（GUS）、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールトランスアセチラーゼ（CAT）および β -ガラクトシダーゼが無制限的に含まれる。

「プロモーター」とは、転写を指向するのに十分な最小の配列を意味する。また、本発明では、細胞種特異的、組織特異的、または外来性の信号もしくは因子によって誘導可能である点で制御可能であるプロモーター依存的遺伝子発現を引き起こすために十分なそれらのプロモーター要素も含まれる。このような要素は、本来の遺伝子の5'もしくは3'領域に位置していてもよい。

「機能的に結合した」とは、ある遺伝子と1つまたはそれ以上の調節配列とが、適当な分子が調節配列に結合した時に遺伝子発現が可能となるような様式で連結していることを意味する（例えば、転写活性化蛋白質は調節配列と結合している）。 10

「保存領域」とは、IAPファミリーのメンバーの2つまたはそれ以上の間（例えば、ヒトHIAP-1、HIAP-2およびXIAPの間）でアミノ酸配列の同一性が少なくとも30%、好ましくは50%、最も好ましくは70%であるような、6個またはそれ以上の連続したアミノ酸からなるあらゆる連続部分を意味する。好ましい保存領域の例は（枠で囲まれた、または明示された配列として）図5～7ならびに表1および2に示し、無制限的にBIRドメインおよびリングジンクフィンガードメインを含む。

「検出可能な標識がなされた」とは、例えば、オリゴヌクレオチドプローブもしくはプライマー、遺伝子もしくはその断片、またはcDNA分子などの、ある分子の存在を示したり同定するためのあらゆる手段を意味する。分子に検出可能な標識をする方法は、当業者には周知であり、放射性標識（例えば、 ^{32}P または ^{35}S などの放射性同位元素を用いる）および 20 非放射性標識（例えば、フルオレセイン標識などの化学発光標識）を無制限的に含む。本明細書で核酸に関して用いる「アンチセンス」とは、その長さとは無関係に、遺伝子のコード鎖に対して相補的な核酸配列を意味する。

「精製抗体」とは、天然の状態で伴っている蛋白質および天然の有機分子を除いた割合が、重量にして少なくとも60%である抗体を意味する。好ましくは、この調製物は、重量にして少なくとも75%、より好ましくは90%、最も好ましくは少なくとも99%の抗体、例えばIAP特異的抗体である。精製抗体は、例えば、組換えによって産生された蛋白質または保存モチーフのペプチドおよび標準的手法を用いるアフィニティクロマトグラフィーによって得ることができる。

「特異的に結合する」とは、ある蛋白質を認識して結合するが、蛋白質が通常含まれる試料、生物試料中のその他の分子は実質的に認識せず結合もしない抗体を意味する。 30 本発明のその他の特徴および利点は、その好ましい態様に関する以下の詳細な説明、および請求の範囲から明らかになると思われる。

【図面の簡単な説明】

図1は、ヒトxiapのcDNA配列（配列番号：3）およびXIAPポリペプチド配列（配列番号：4）である。

図2は、ヒトhiap-1のcDNA配列（配列番号：5）およびHIAP-1ポリペプチド配列（配列番号：6）である。

図3は、ヒトhiap-2のcDNA配列（配列番号：7）およびHIAP-2ポリペプチド配列（配列番号：8）である。hiap-2- Δ 変異体で欠失している部分は枠で囲んだ。 40

図4は、マウスxiapのcDNA配列（配列番号：9）およびコードされるマウスXIAPポリペプチド配列（配列番号：10）である。

図5は、マウスhiap-1のcDNA配列（配列番号：39）およびコードされるマウスHIAP-1ポリペプチド配列（配列番号：40）である。

図6は、マウスhiap-2のcDNA配列（配列番号：41）およびコードされるマウスHIAP-2ポリペプチド配列（配列番号：42）である。

図7は、IAP蛋白質のBIRドメインのアライメント（配列番号：11および14～31）を図示したものである。

図8は、ヒトIAPポリペプチドのアライメントを、diap、cp-iapおよびIAP共通配列とともに図示したものである（配列番号：4、6、8、10、12および13）。 50

図9は、IAP蛋白質のリングジンクフィンガードメインのアライメントを図示したものである（配列番号：32～38）。

図10は、ヒト組織におけるヒトhiap-1およびhiap-2のmRNAの発現を示したノーザンブロットの写真である。

図11は、ヒト組織におけるヒトhiap-2のmRNAの発現を示したノーザンブロットの写真である。

図12は、ヒト組織におけるヒトxiapのmRNAの発現を示したノーザンブロットの写真である。

図13Aおよび13Bは、HIV感染T細胞におけるアポトーシス性DNAラダー（ladder）およびRT-PCR産物をhiap-1およびhiap-2に特異的なプローブを用いて示したアガロースゲルの写真である。

10

図14A～14Dは、XIAP、HIAP-1、HIAP-2、bcl-2、smnおよび6-mycによるアポトーシスの抑制を描いたグラフである。

図15A～Bは、表示したcDNA構築物による一時的遺伝子導入および引き続いて血清除去を行った後の生存CHO細胞の比率を描いた棒グラフである。

図16A～16Bは、表示したcDNA構築物による一時的遺伝子導入および引き続いてメナジオン（図16A=10 μ M メナジオン、図16B=20 μ M メナジオン）曝露を行った後の生存CHO細胞の比率を描いた棒グラフである。

図17は、ラジ（Raji）、ラモス（Ramos）、B-3およびジヨーエ（Jiyoye）細胞ならびに正常胎盤から得たRNAからのhiap-1特異的プライマーを用いて増幅したcDNA断片を含むアガロースゲルの写真である。

20

図18は、ジャーカットおよび星状細胞腫細胞から抽出し、抗XIAP抗体を用いて染色した蛋白質を含むウェスタンブロットの写真である。一連のマーカー蛋白質の位置およびサイズを示した。

図19は、実施例XIIに記載した処置に続いてジャーカット細胞から抽出した蛋白質を含むウェスタンブロットの写真である。ブロットは、ウサギポリクローナル抗XIAP抗体によって染色した。レーン1は陰性対照、レーン2は抗Fas抗体、レーン3は抗Fas抗体およびシクロヘキシミド、レーン4はTNF- α 、レーン5はTNF- α およびシクロヘキシミドを示す。

図20は、抗Fas抗体への曝露に続いてヒーラ（Hela）細胞から抽出した蛋白質を含むウェスタンブロットの写真である。ブロットは、ウサギポリクローナル抗XIAP抗体によって染色した。レーン1は陰性対照、レーン2はシクロヘキシミド、レーン3は抗Fas抗体、レーン4は抗Fas抗体およびシクロヘキシミド、レーン5はTNF- α 、レーン6はTNF- α およびシクロヘキシミドを示す。

30

図21A～21Bは、ウサギポリクローナル抗XIAP抗体によって染色したウェスタンブロットの写真である。蛋白質は、抗Fas抗体への曝露の直後、1、2、3、5、10および22時間後にヒーラ細胞（図21A）およびジャーカット細胞（図21B）から抽出した。

図22Aおよび22Bは、抗CPP32抗体（図22A）またはウサギポリクローナル抗XIAP抗体（図22B）によって染色したウェスタンブロットの写真である。蛋白質は、抗Fas抗体への曝露の直後、3時間後または7時間後にジャーカット細胞から抽出した。総蛋白質のほかに細胞質および核抽出物も示した。

40

図23は、インビトロXIAP切断アッセイの産物に対する電気泳動後のポリアクリルアミドゲルの写真である。

詳細な説明

I. IAP遺伝子およびポリペプチド

アポトーシスを調節する新たなクラスの哺乳類蛋白質（IAP）、およびこれらの蛋白質をコードする遺伝子が発見されている。IAP蛋白質は1つのリングジンクフィンガードメイン（RZF；図9）、ならびに図7および8に枠で囲んだ共通配列を示し、表1および2に配列ドメインの一覧を挙げることによって定義したBIRドメインが少なくとも1つ存在することによって特徴づけられる。新規なIAP遺伝子および蛋白質の例として、ヒトIAP（HIAP-1、HIAP-2およびXIAP）ならびに新規なマウスアポトーシス抑制因子であるXIAPのcDNA配列および

50

アミノ酸配列を提供した。哺乳類IAPファミリーのほかのメンバー（他の種からの相同体および変異型配列を含む）を、標準的なクローニング技法ならびに本明細書で提供し、当技術分野では公知である保存アミノ酸配列、プライマーおよびプローブを用いて単離してもよい。さらにIAPには、以下でさらに説明するような、リングジंकフィンガーを欠いた蛋白質も含まれる。

表1

保存ドメインのヌクレオチドの位置*

	BIR-1	BIR-2	BIR-3	リングジंकフィンガー
h-xiap	109-312	520-723	826-1023	1348-1485
m-xiap	202-405	613-816	916-1113	1438-1575
h-hiap-1	273-476	693-893	951-1154	1824-1961
m-hiap-1	251-453	670-870	928-1131	1795-1932
h-hiap-2	373-576	787-987	1042-1245	1915-2052
m-hiap-2	215-418	608-808	863-1066	1763-1876

*各位置は図1～4に示した位置と対応させて示した。

表2

保存ドメインのアミノ酸の位置*

	BIR-1	BIR-2	BIR-3	リングジंकフィンガー
h-XIAP	26-93	163-230	265-330	439-484
m-XIAP	26-93	163-230	264-329	438-483
h-HIAP1	29-96	169-235	255-322	546-591
m-HIAP1	29-96	169-235	255-322	544-589
h-HIAP2	46-113	184-250	269-336	560-605
m-HIAP2	25-92	156-222	241-308	541-578

*各位置は図1～4に示した位置と対応させて示した。

哺乳類IAPファミリーが認識されたことにより、非常に新たなパターンの蛋白質構造がもたらされた。このパターンの認識に伴って、既知の相同配列を有するが機能は不明であった蛋白質を、推定上のアポトーシス抑制因子として分類することが可能になった。今日ではdiapと呼ばれている1つのショウジョウバエ遺伝子はこのような仕方でも分類された（配列情報についてはジェンバンク寄託番号（Genbank Accession Number）M96581および図6を参照）。これらの蛋白質が種を超えて保存されていることは、アポトーシスのシグナル伝達経路が進化過程を通じて保存されてきたことを示す。

IAP蛋白質は、数多くの疾患過程または障害の一部として生じるアポトーシスを抑制するために用いることができると思われる。例えば、IAPポリペプチドまたはIAPポリペプチドをコードする核酸を、AIDS、神経変性疾患、虚血性損傷、中毒性肝障害および骨髄異形成症候群の一部として生じるアポトーシスの治療または予防のために投与することが可能と

考えられる。また、IAPポリペプチドをコードする核酸はアポトーシスの抑制のためにも提供されうると考えられる。

II. IAP遺伝子のクローニング

A. xiap

アポトーシスに関与するヒト遺伝子を探索した結果、アポトーシスを抑制することが知られる2種のバキュロウイルス遺伝子であるCpIAPおよびOpIAP (Clemら、Mol. Cell Biol. 14:5212~5222、1994; Birnbaumら、J. Virol. 68:2521~8、1994) の保存RZFドメインと高い相同性を示す、X連鎖性配列タグ部位 (X-linked sequence tag site) (STS) がジェンバンク (GenBank) データベースにあることが同定された。このSTSによるヒト胎児脳ZapII cDNAライブラリー (Stratagene, La Jolla, CA) のスクリーニングによって、xiap (X連鎖性アポトーシス抑制蛋白質遺伝子の略) の同定およびクローニングがなされた。このヒト遺伝子は1.5kbのコード配列を有し、そこに3つのBIRドメイン (Crookら、J. Virol. 67:2168~74、1993; Clemら、Science 254:1388~90、1991; Birnbaumら、J. Virol. 68:2521~8、1994) および1つのジンクフィンガーを含む。xiapに関するノーザンブロット解析により、7kbを超える大きさのメッセージ (mRNA) が存在し、それがさまざまな組織、特に肝臓および腎臓で発現していることが明らかになった (図12)。転写物のサイズが大きいことは、5' および3' 非翻訳領域が長いことを反映する。

10

B. ヒトhiap-1およびhiap-2

hiap-1およびhiap-2の遺伝子のクローニングは、全xiapコード領域を含むプローブによるヒト肝臓ライブラリー (Stratagene Inc., La Jolla, CA) の厳密性の低い条件 (最終洗浄は40℃の2X SSC、10%SDSを用いて実施した; 図2および3) でのスクリーニングによって実施した。また、BIRドメインの一部を含む発現配列タグ (expressed sequence tag) (EST; GenBank寄託番号 (Accession No.) T96284) に由来するプローブを用いて、hiap-1およびhiap-2の遺伝子の独立した検出も行った。EST配列はポリメラーゼ連鎖反応によってまず単離した。その際にはテンプレートとしてcDNAライブラリーを用い、EST特異的プライマーを用いて増幅した。続いて、DNA増幅由来 (amplidrive) プローブを用いて、完全長のhiapコード配列に関してヒト肝臓cDNAライブラリーをスクリーニングした。引き続いて、hiap-2配列は含むが、おそらくは選択的mRNAスプライシングのために1つのエクソンを欠失していると思われる第3のDNAを検出した (図3の枠で囲まれた領域を参照)。ノーザンブロット解析によってアッセイしたヒト組織におけるhiap-1およびhiap-2の発現を図8および9に示した。

20

30

C. m-xiap

xiapのcDNAプローブを用いて、マウス胚λgt11 cDNAライブラリー (Clontech, Palo Alto, CA) およびマウスFIX IIゲノムライブラリーのスクリーニングを行うことにより、14種のcDNAおよび2種のゲノムのクローンをそれぞれ同定した。一部が重複する12種のマウスクローンを用いて、8.0kbにわたるcDNAコンティグを構築した。塩基配列解析により、約1.5kbのコード配列の存在が明らかになった。このマウス遺伝子m-xiapは、ヒトXIAPとの間で開始メチオニン、終止コドン、3つのBIRドメインおよびRZFドメインの箇所およびその周囲において著しい相同性を有するポリペプチドをコードする。ヒト遺伝子の場合と同じく、このマウス相同体は長い5' および3' UTRを含んでおり、それによって7~8kbの長さ

40

に及ぶ転写物が産生されると考えられる。
m-xiapの配列および制限地図に関する解析を行うことにより、m-xiapの構造およびゲノムの構成がさらに明らかに示された。エクソンのマッピングおよびエクソン-イントロン境界部の定義のためには、サザンブロット解析および逆PCR法 (Grodénら、Cell 66:589~600) を使用することができる。

例えば大腸菌などの細菌発現系を用いて、得られたm-xiap融合蛋白質に対する抗血清を産生させることができる。結果として得られた抗血清は、マウス体内におけるm-xiapの空間的および時間的発現の解析のためにノーザンブロット解析とともに用いることが可能である。

D. m-hiap-1およびm-hiap-2

50

ヒトhiap-1およびhiap-2の配列をプローブとして用いて、m-xiapの場合と同じ一般的な様式で、hiap-1およびhiap-2のマウスでの相同体のクローニングおよびシーケンシングを行った。m-hiap-1およびm-hiap-2のクローニングにより、本明細書で提供する技法および分子生物学の分野における当業者に公知である技法を用いて、異なる種からの相同体を単離することが可能と思われることがさらに示された。

III. ほかのIAP遺伝子の同定

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびDNAハイブリダイゼーションなどの標準的な技法を用いて、ほかのヒトIAP遺伝子および他の種におけるそれらの相同体のクローニングを行うことが可能と思われる。厳密性の低い条件でxiap、hiap-1およびhiap-2に特異的なプローブとハイブリダイズさせたヒトゲノムDNAのサザンブロットから、その他の既知のヒトIAP配列に対応するバンドのほかに、既知のIAP配列とは対応しない付加的なバンドがあることが明らかになった。したがって、厳密性の低いハイブリダイゼーションを用いて、ほかのIAP配列を容易に同定することができると考えられる。付加的な遺伝子のクローニングに用いることができると思われる、マウスならびにヒトのxiap、hiap-1およびhiap-2に特異的なプライマーの例を表5に示した。

IV. IAP活性の特徴分析および細胞内局在に関する試験

推定上のIAPがアポトーシスを調節する能力は、その中でアポトーシスの変化を検出することができるインビトロ系において規定することができる。完全長または切断型のIAPのcDNAを載せた哺乳類の発現構築物を、CHO、NIH 3T3、HL60、Rat-1またはジャーカット細胞などの細胞系に導入することができる。さらに、SF21昆虫細胞を用いてもよく、この場合にはIAP遺伝子は好ましくは昆虫の熱ショックプロモーターを用いて発現させられる。遺伝子導入の後には、血清除去またはスタウロスポリン、メナジオン（これはフリーラジカルの形成を介してアポトーシスを誘導する）もしくは抗Fas抗体の適用を含む標準的な方法によってアポトーシスを誘導することができる。対照として、アポトーシスを起こすように誘導される細胞と同じ条件下において細胞を培養し、これには遺伝子導入を行わないか、IAP挿入物を含まないベクターによる遺伝子導入を行った。それぞれのIAP構築物が発現した際にアポトーシスを抑制する能力は、細胞の生存指標、すなわち生存している遺伝子導入細胞と生存している対照細胞との比を算出することによって定量化することができる。これらの実験は、アポトーシス抑制活性の存在に関する確認を可能とするほか、以下に説明するように、IAPの機能性領域の決定に用いることもできる。また、これらのアッセイは、IAPの発現を介してアポトーシスを調節する化合物を同定するために、ほかの化合物の適用と併用して実施することもできる。

A. 完全長IAP構築物によるトランスフェクション後の細胞の生存、およびアポトーシスの誘導

さまざまなアポトーシス抑制アッセイを実施することによって得た結果の具体例を図14Aから14Dに示した。例えば、6種の構築物のうち1種による遺伝子導入を行い、引き続いて血清除去を行った後のCHO細胞の生存の様子を図14Aに示した。以下の組換えプラスミドのうち1つを2μg用いるとともにリポフェクターセ（Lipofectace（登録商標））を用いて細胞に遺伝子導入を施した：pCDNA36myc-xiap（xiap）、pCDNA3-6myc-hiap-1（hiap-1）、pCDNA3-6myc-hiap-2（hiap-2）、pCDNA3-bcl-2（bcl-2）、pCDNA3-HA-smn（smn）およびpCDNA3-6myc（6-myc）。xiap、hiap-1およびhiap-2のORFのPCR増幅およびpCDNA3（Invitrogen）へのクローニングを可能とするためにオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。それぞれの構築物に改変を施してペプチド配列MEQKLISEEDL〔（配列番号：__）〕の6回反復物をコードする合成mycタグを組み込み、これによってモノクローナル抗myc抗血清（Eganら、Nature 363:45～51、1993）を介したmyc-IAP融合蛋白質の検出が可能となるようにした。3シリーズ分の細胞系の試料を24穴皿に入れて無血清培地で5回洗い、実験の間は無血清条件を維持した。トリパンブルーを排出した細胞、すなわち生きていた細胞を、血清除去の直後、24時間、48時間および72時間後に血球算定板を用いて算定した。生存率は最初の生存細胞数に対する比率として算出した。この実験ならびに図14Bおよび14Dに提示した実験に関して表示した生存細胞の比率は、3回に分けて実施した3つの別々の実験での平均

±平均偏差を表す。

遺伝子導入（上記の6種の構築物のそれぞれ1種による）およびメナジオンへの曝露の後のCHO細胞の生存率を図14Bに示した。細胞を24穴皿に播いた後、一晚増殖させ、続いて20 μ Mメナジオン（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）に1.5時間曝露させた。3シリーズ分の試料をメナジオンへの曝露時および24時間後に採取し、トリパンブルーの排出によって生存率を評価した。

遺伝子導入（上記の6種の構築物のそれぞれ1種による）およびスタウロスポリンへの曝露の後のRat-1細胞の生存率を図14Cに示した。Rat-1細胞に遺伝子導入を施した後、800 μ g/mlのG418を含む培地中に2週間置いて選択した。この細胞系を、5時間にわたるスタウロスポリン誘発性アポトーシス（1 μ M）に対する抵抗性に関して評価した。スタウロスポリンへの曝露から24時間後にトリパンブルーの排出によって生存細胞を算定した。表示した生存細胞の比率は、2回の実験での平均±平均偏差を表す。

Rat-1細胞系は、これらの細胞に上記の6種の構築物のそれぞれによる遺伝子導入を施した後のメナジオンに対する抵抗性を試験する目的にも用いた（図14D）。細胞を10 μ Mメナジオンに1.5時間曝露させ、18時間後に生存細胞数を算定した。

B. 完全長および部分的IAP構築物による遺伝子導入後の細胞生存率の比較

XIAP、HIAP-1およびHIAP-2を含むヒトIAPが細胞死に対する防御をもたらす機序を調べるために、（1）完全長のIAP cDNA（上記のもの）、（2）BIRドメインをコードするがRZFはコードしないIAP遺伝子の一部、または（3）RZFをコードするがBIRドメインはコードしないIAP遺伝子の一部、のいずれかを含む発現ベクターを構築した。ヒーラ、ジャークットおよびCHO細胞系における一時的または安定的発現により、ヒトおよびマウスのxiapまたはm-xiapを検討した。遺伝子導入後には、血清除去、メナジオンの適用、または抗Fas抗体の適用によってアポトーシスが誘導された。続いて上記のようにトリパンブルー排出によって細胞死を評価した。遺伝子導入の効率に関する対照として、細胞に β -gal発現構築物による同時遺伝子導入を施した。典型的には、首尾よく遺伝子導入がなされたのは細胞の約20%であった。

CHO細胞に一時的遺伝子導入を施した場合には、完全長のxiapまたはm-xiapのcDNAを含む構築物によってもたらされた細胞死の防御はわずかであった（図15A）。これに対して、BIRドメインのみをコードした構築物（すなわち、RZFドメインを含まないもの）による遺伝子導入を受けたCHO細胞の生存率は、血清除去から72時間後では著明に高値であった。さらに、BIRドメインを発現している細胞の大部分は96時間後にも生存しており、この時点では対照、すなわち遺伝子導入を受けていない細胞培養物には生存細胞は残っておらず（図15Aの「CHO」参照）、ベクターのみ、すなわちcDNA挿入物を含まないものによる遺伝子導入を受けた細胞の中で生存していたものは5%未満であった（図15Aの「pcDNA3」参照）。いずれのBIRドメインの欠失によっても、血清除去から72時間以内の対照レベルに対しての生存CHO細胞の比率の低下に反映されるように、アポトーシス抑制の完全損失がもたらされた（図15B；72時間後における「xiap Δ 1」（XIAP（配列番号：4）のアミノ酸89～497をコードする）、「xiap Δ 2」（XIAP（配列番号：4）のアミノ酸246～497をコードする）および「xiap Δ 3」（XIAP（配列番号：4）のアミノ酸342～497をコードする）を参照）。

G418による選択下において数カ月維持された遺伝子導入CHO細胞の安定プール（stable pool）に対して10 μ Mメナジオンを2時間曝露させることにより、アポトーシスを起こすように誘導した。検討したCHO細胞は、（1）完全長m-xiapのcDNA（miap）、（2）完全長xiapのcDNA（xiap）（3）完全長bcl-2のcDNA（Bcl-2）、（4）m-xiapの3つのBIRドメインをコードする（しかしRZFはコードしない）cDNA（BIR）、および（5）m-xiapのRZFをコードする（しかしBIRドメインはコードしない）cDNA（RZF）、による安定的な遺伝子導入を受けたものである。非遺伝子導入細胞（CHO）またはベクターのみによる遺伝子導入を受けた細胞（pcDNA3）を本実験における対照として用いた。10 μ Mメナジオンへの曝露の後に、遺伝子導入細胞をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗い、メナジオンを含まない培地中にさらに24時間培養した。細胞死は、上記のようにトリパンブルー排出によって評価した

10

20

30

40

50

。非遺伝子導入細胞およびベクターのみによる遺伝子導入を受けた細胞ともに24時間の生存試験期間の後に生存していたのは10%未満であった。RZFを発現している細胞に関して有意に優れた経過は認められなかった。しかし、完全長のm-xiap、xiapまたはbcl-2の発現、およびBIRドメインの発現によって細胞の生存率は高まった（図16A）。メナジオンの濃度を10 μ Mから20 μ Mに高めた場合（その他のすべての実験条件は10 μ Mメナジオンを適用した際と同じにした）には、BIRドメインのcDNA構築物を発現した生存CHO細胞の比率は、完全長のm-xiapまたはbcl-2のいずれかを発現した生存細胞の比率よりも高かった（図16B）。

C. 発現されたRZFおよびBIRドメインの細胞下局在の分析

上記の細胞死に関するアッセイから、RZFがIAPの抗アポトーシス機能の負の調節因子として作用する可能性が示された。RZF、およびおそらくはその他のIAPドメインが、その調節性作用を発揮する1つの仕方は、その産物がアポトーシス経路において機能する遺伝子の発現を変化させることによると考えられる。

発現されたRZFおよびBIRドメインの細胞下配置が核内調節因子としての役割と一致しているか否かを判定するために、COS細胞に以下の4種の構築物による一時的遺伝子導入を施し、発現されたポリペプチドの位置を免疫蛍光顕微鏡によって調べた：（1）配列番号：4の497個のアミノ酸全部をコードするpcDNA3-6myc-xiap、（2）マウスxiap（配列番号：10）の497個のアミノ酸全部をコードするpcDNA3-6myc-m-xiap、（3）m-xiap（配列番号：10）のアミノ酸1～341をコードするpcDNA3-6myc-mxiap-BIR、（4）m-xiap（配列番号：10）のアミノ酸342～497をコードするpcDNA3-6myc-mxiap-RZF。細胞をマルチウェル組織培養スライド上にて12時間増殖させた後に固定し、メタノールによる透過化処理を行った。用いた構築物（本試験および細胞死アッセイにおいて使用）には、N末端にヒトMycエピトープタグによるタグ付加を施した。このため、FITCを共役させた抗Mycモノクローナル抗体およびヤギ抗マウス二次抗体を用いて、一時的遺伝子導入を受けたCHO細胞における発現産物の位置を調べることができると考えられた。完全長のXIAPおよびMIAPは細胞質に位置しており、核周辺領域で特に発現が顕著であった。RZFドメインをコードする（しかしBIRドメインはコードしない）構築物を発現する細胞の場合にも同じ配置パターンが認められた。しかし、BIRドメイン（RZFは含まない）を発現する細胞は主に核の染色を呈した。BIRドメインの構築物によって発現された蛋白質は、核への移行のさまざまな段階にあると考えられた。

以上の観察は、以下に説明するように、抗Fas抗体（これはアポトーシスの強力な誘導因子である）によって処理したT細胞内ではXIAPが切断され、そのN端領域が核に移動しているとの事実と一致する。

D. 付加的なアポトーシスアッセイの例

アポトーシスアッセイの具体例は以下の参考文献でも提供されている。リンパ球におけるアポトーシスに関するアッセイは以下に開示されている：リ（Li）ら、「非感染リンパ球における、HIV-1 Tat蛋白質によるアポトーシスの誘導（Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein）」、Science 268:429～431；ジベリーニ（Gibellini）ら、「Tatを発現するジャーカット細胞は、急性ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）の感染を含むさまざまなアポトーシス刺激に対する抵抗性の増加を示す（Tat-expressing Jurkat cells show an increased resistance to different apoptotic stimuli, including acute human immunodeficiency virus-type 1）」、Br. J. Haematol. 89:24～33、1995；マーチン（Martin）ら、「インビトロでのヒトCD4⁺T細胞のHIV-1への感染。これらの細胞における特異なアポトーシス誘導（HIV-1 infection of human CD4⁺ T cells in vitro. Differential induction of apoptosis in these cells）」、J. Immunol. 152:330～42、1994；テライ（Terai）ら、「HIV-1に急性感染した培養Tリンパ芽球における細胞死の機序としてのアポトーシス（Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T Lymphoblasts acutely infected with HIV-1）」、J. Clin. Invest. 87:1710～5、1991；デイン（Dhein）ら、「APO-1/（Fas/CD95）11を介した自己分泌T細胞の自殺（Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/（Fas/CD95）11）」、Nature 373:438

～441、1995；カチキス (Katsikis) ら、「Fas抗原刺激はヒト免疫不全ウイルス感染者におけるTリンパ球の著明なアポトーシスを誘発する (Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals)」、J. Exp. Med. 181:2029～2036、1995；ウェステンドープ (Westendorp) ら、「HIV-1 Tatおよびgp120による、CD95を介したアポトーシスに対するT細胞の感作 (Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120)」、Nature 375:497、1995；デロッシ (DeRossi) ら、Virology 198:234～44、1994。

線維芽細胞におけるアポトーシスに関するアッセイは以下に開示されている：フォスベック (Vossbeck) ら、「ラット線維芽細胞に対するTGF- β の直接的な形質転換作用 (Direct transforming activity of TGF-beta on rat fibroblast)」、Int. J. Cancer 61:92～97、1995；ゴルッピ (Goruppi) ら、「NIH3T3線維芽細胞のS期誘導に関与するc-mycドメインの精査 (Dissection of c-myc domains involved in S phase induction of NIH3T3 fibroblasts)」、Oncogene 9:1537～44；フェルナンデス (Fernandez) ら、「正常およびHa-ras形質転換C3Hマウス胚線維芽細胞の腫瘍壊死因子に対する感受性の差異：抵抗性細胞におけるbcl-2、c-mycおよびマンガンスーパーオキシドジスムターゼの誘導 (Differential sensitivity of normal and Ha-ras transformed C3H mouse embryo fibroblasts to tumor necrosis factor: induction of bcl-2, c-myc, and manganese superoxide dismutase in resistant cells)」、Oncogene 9:2009～17、1994；ハリントン (Harrington) ら、「線維芽細胞におけるc-Myc誘発性アポトーシスは特異的サイトカインによって阻害される (c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines)」、EMBO J. 13:3286～3295、1994；イトウ (Itoh) ら、「アポトーシスに必要な新規な蛋白質ドメイン．ヒトFas抗原の変異分析 (A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen)」、J. Biol. Chem. 268:10932～7、1993。

神経細胞におけるアポトーシスに関するアッセイは以下に開示されている：メリノ (Melino) ら、「組織トランスグルタミナーゼおよびアポトーシス：ヒト神経芽腫細胞を用いたセンスおよびアンチセンス遺伝子導入試験 (Tissue transglutaminase and apoptosis: sense and antisense transfection studies with human neuroblastoma cells)」、Mol. Cell. Biol. 14:6584～6596、1994；ローゼンバウム (Rosenbaum) ら、「低酸素誘発性の培養細胞のプログラム細胞死に関する証拠 (Evidence for hypoxia-induced, programmed cell death of cultured neurons)」、Ann. Neurol. 36:864～870、1994；サトウ (Sato) ら、「bcl-2による細胞死の防止の結果としてのPC12細胞の神経分化 (Neuronal differentiation of PC12 cells as a result of prevention of cell death by bcl-2)」、J. Neurobiol. 25:1227～1234、1994；フェラーリ (Ferrari) ら、「N-アセチルシステインのD-およびL-立体異性体は神経細胞のアポトーシス性細胞死を防止する (N-acetylcysteine D- and L-stereoisomers prevents apoptosis death of neuronal cells)」、J. Neurosci. 15:2857～2866、1995；タレー (Talley) ら、「ヒト神経細胞における腫瘍壊死因子 α 誘発性アポトーシス：抗酸化剤N-アセチルシステインならびに遺伝子bcl-2およびcrmaによる防御 (Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crma)」、Mol. Cell. Biol. 15:2359～2366、1995；タレーら、「ヒト神経細胞における腫瘍壊死因子 α 誘発性アポトーシス：抗酸化剤N-アセチルシステインならびに遺伝子bcl-2およびcrmaによる防御 (Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Apoptosis in Human Neuronal Cells: Protection by the Antioxidant NAcetylcysteine and the Genes bcl-2 and crma)」、Mol. Cell. Biol. 15:2359～2366、1995；ウォルキンショー (Walkinshaw) ら、「L-DOPAによるカテコールアミン作働性PC12細胞におけるアポトーシスの誘導．パーキンソン病の治療との関連 (Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implication for the treatment of Parkinson's disease)」、J. Clin. Invest. 95:2458～2464、1995。

昆虫細胞におけるアポトーシスに関するアッセイは以下に開示されている：クレム (Clem

10

20

30

40

50

）ら、「昆虫細胞の感染期間におけるバキュロウイルス遺伝子によるアポトーシスの防止 (Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells)」、Science 254:1388~90、1991；クルーク (Crook) ら、「ジンクフィンガー様モチーフを有するアポトーシス抑制性バキュロウイルス遺伝子」、J. Virol. 67:2168~74、1993；ラビザデー (Rabizadeh) ら、「バキュロウイルスp35遺伝子の発現は哺乳類神経細胞死を抑制する (Expression of the baculovirus p35 gene inhibits mammalian neural cell death)」、J. Neurochem. 61:2318~21、1993、バーンバウム (Birnbaum) ら、「Cys/His配列モチーフを有するポリペプチドをコードする核多角体病ウイルスからのアポトーシス抑制性遺伝子 (An apoptosis inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs)」、J. Virol. 68:2521~8、1994；クレムら、「バキュロウイルス遺伝子p35およびIAPによるプログラム細胞死の制御 (Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and IAP)」、Mol. Cell. Biol. 14:5212~5222、1994。

V. トランスジェニック動物の作出

IAP遺伝子の特徴分析によって、相同組換えによってIAPノックアウト動物モデルを作り出すために必要な情報が提供される。好ましくは、このモデルは哺乳動物であり、最も好ましくはマウスである。同じく、標準的な組換え技法に従ってゲノム内に1つまたはそれ以上のIAP配列を組み込むことによってIAPを過剰産生する動物モデルを作製することができると考えられる。

ノックアウトモデルの作出に用いられる置換型のターゲティングベクター (targeting vector) は、例えば129/Sv (Stratagene Inc., LaJolla, CA) などのマウス系統からの同質遺伝子のゲノムクローンを用いて構築することができる。このターゲティングベクターを、電気穿孔法によって適切な由来を有する胚幹 (ES) 細胞の系列に導入することにより、著しく切断された形態のIAPを保持するES細胞系が作製されることが考えられる。キメラ型ファウンダーマウスを作製するには、標的となる細胞系に対してマウス胎胚期胚を注入するとよい。ヘテロ接合性の子孫を交雑させることによってホモ接合が得られる。ノックアウトマウスによって、IAP依存的な経路を介してアポトーシスを調節する治療的化合物のスクリーニングを行うためのインビボでの手段が提供されることが考えられる。

VI. IAP蛋白質の発現

IAP遺伝子は原核生物および真核生物の両方の細胞種において発現すると考えられる。IAPがアポトーシスを増悪させることによってそれを調節する場合には、その蛋白質は誘導可能なプロモーターの制御下において発現されることが望ましいと考えられる。

一般に、本発明によるIAPは、適切な発現ベクター内に配置されたIAPをコードするcDNA断片の全体または一部を有する適切な宿主細胞の形質転換によって産生することが可能である。

分子生物学の分野における当業者は、組換え蛋白質を産生させるためにさまざまに異なる種類の発現系を用いることを理解すると考えられる。厳密にどの宿主細胞を用いるかは本発明にとって本質的ではない。IAP蛋白質の産生には、原核生物の宿主 (大腸菌など) を用いてもよく、真核生物の宿主 (例えば、ビール酵母菌、Sf21細胞などの昆虫細胞、もしくはCOS-1、NIH 3T3またはヒーラ (Hela) 細胞などの哺乳類細胞) を用いてもよい。これらの細胞は、例えばアメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection)、Rockville, MDなどから広く入手可能である。アウスユーベル (Ausubel) ら、分子生物学の最近のプロトコル (Current Protocols in Molecular Biology) (John Wiley & Sons, New York, 1994) も参照されたい。形質導入の方法および発現用媒介物 (expression vehicle) の選択は、選択される宿主系に依存すると考えられる。形質転換および遺伝子導入の方法は、例えばアウスユーベルら (前記) に記載されており、発現用媒介物は、例えばクローニングベクター：実験マニュアル (Cloning Vector: A Laboratory Manual) (P. H. Pouwelsら、1985, Supp. 1987) に提供されているものから選択してもよい。

好ましい発現系の一つは、例えばクローンテック (Clontech) 社から入手可能なベクターで

あるpBacPAK9を用いるバキュロウイルス系である。必要に応じてこの系を、例えばエヴァン (Evan) ら (Mol. Cell. Biol. 5:3610~3616, 1985) に記載されたmycタグ付加法などのその他の蛋白質発現法と併用して用いてもよい。

または、安定的な遺伝子導入がなされた哺乳類細胞系によってIAPを産生させることもできる。哺乳類細胞の安定的な遺伝子導入に適した数多くのベクターは広く入手することができ、例えばパウエル (Pouwel) ら (前記) に記載があり、このような細胞系を構築する方法も同様である (例えばAusubelら (前記) を参照)。1つの例においては、IAPをコードするcDNAを、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子を含む発現ベクター内にクローニングする。このプラスミドの組み込み、すなわちIAPをコードする遺伝子の宿主細胞の染色体への組み込みが起こったものは、細胞培養液に0.01~300 μ Mメソトレキセートを添加することによって選択される (Ausubelら、前記に記載された方法による)。この優性選択法は大部分の細胞種において可能である。組換え蛋白質の発現は、導入された遺伝子のDHFRを介した増幅によって増強させることができる。

遺伝子増幅を行う細胞系の選別の方法は、アウスユーベル (Ausubel) ら (前記) に記載されている。このような方法には一般に、培地中のメソトレキセートの量を徐々に増加させていく持続培養が含まれる。最も使用される頻度の高いDHFR含有性の発現ベクターは、pCVSEII-DHFRおよびpAdD26SV (A) (Ausubelら、前記に記載) である。上記の宿主細胞、または好ましくはDHFR欠損CHO細胞系 (例えば、CHO DHFR-細胞、ATCC寄託番号CRL 9096など) は、安定的な形質移入がなされた細胞系またはDHFRを介した遺伝子増幅に関するDHFRによる選択を行うために最も好ましいものである。

いったん組換え蛋白質が発現されれば、例えばアフィニティクロマトグラフィーなどを用いてそれを単離する。1つの例においては、本明細書に説明した方法によって産生されたものなどの抗IAP抗体をカラムに結合させ、それを用いてIAPを単離することができる。アフィニティクロマトグラフィーの前に行うIAPを含有する細胞の溶解および分画化は、標準的方法に従って実施する (例えば、Ausubelら、前記を参照)。いったん単離されれば、必要に応じて、この組換え蛋白質を例えば高速液体クロマトグラフィー (HPLC; 例えば、フィッシャー (Fisher)、生化学および分子生物学における実験テクニック (Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology)、WorkおよびBurdon編、Elsevier, 1980を参照) などによってさらに精製することができる。

本発明のポリペプチド、特にIAPの短い断片は、化学合成によっても生成することができる (例えば、固相ペプチド合成 (Solid Phase Peptide Synthesis) 第2版、1984に記載されている方法による。The Pierce Chemical Co., Rockford, IL)。ポリペプチドの発現および精製に関するこれらの一般的な技法は、本明細書に記載したように、有用なIAP断片またはその類似体の産生および単離に用いることもできる。

VII. 抗IAP抗体

IAP特異的抗体を作製するために、IAPコード配列 (すなわち、アミノ酸180~276) を、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST; Smithら、Gene 67:31~40、1988) とのC端融合体として発現させることができる。この融合蛋白質は、グルタチオン-セファロースビーズ上にて精製し、グルタチオンによって溶出させ、トロンビンによって切断し (操作によって作成した切断部位において)、ウサギを首尾よく免疫化するために必要な程度まで精製することができる。一次免疫化はフロイント完全アジュバントによって実施することができ、その後の免疫化はフロイント不完全アジュバントを用いて実施することができる。抗体価の観測は、GST-IAP融合蛋白質のトロンビン切断IAP断片を用いるウェスタンブロットおよび免疫沈降分析によって行う。免疫血清には、CNBr-セファロースを連結したIAP蛋白質を用いてアフィニティ精製を行う。抗血清の特異性は、一連の非関連GST蛋白質 (GST p53、Rb、HPV-16 E6およびE6-APを含む) およびGST-トリプシン (既知の配列を用いるPCRによって作製されたもの) を用いて決定する。

GST融合蛋白質に対する代替的または付属的な免疫原として、例えばIAPの比較的ユニークな親水性領域に対応するペプチドを作製し、導入したC端リジンを介してキーホールリンペット・ヘモシアニン (KLH) と連結させることもできる。これらのペプチドのそれぞれ

に対する抗血清をBSAと共役させたペプチド上で同様にアフィニティ精製し、ペプチド共役体を用いるELISAおよびウェスタンブロット法、ならびに発現したIAPをGST融合蛋白質として用いるウェスタンブロット法および免疫沈降法によって特異性を検討する。

または、上記のIAPおよび標準的なハイブリドーマ技術を用いてモノクローナル抗体を作製することもできる（例えば、Kohlerら、Nature 256: 495、1975；Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6: 511、1976；Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6: 292、1976；Hammerlingら、モノクローナル抗体およびT細胞ハイブリドーマ (Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas)、Elsevier, New York, NY, 1981、Ausubelら、前記を参照）。いったん産生されたモノクローナル抗体を、ウェスタンブロット法または免疫沈降分析によって（Ausubelら、前記に記載された方法による）、IAPの特異的認識に関して検討することもできる。1つまたはそれ以上のBIRドメインを含む（しかしリングジンクフィンガードメインは含まない）または1つのリングジンクフィンガードメインを含む（しかしBIRドメインは含まない）本明細書に記載されたものなどのIAPまたはIAPの断片を認識する抗体は、本発明において有用であると考えられる。それらは例えば、IAPの発現レベルを観測するためのイムノアッセイ、または哺乳動物によって産生されるIAPもしくはIAP断片の細胞下配置を決定するために用いることができる。本明細書で説明する26kDaのIAP切断産物（少なくとも1つのBIRドメインを含む）を抑制する抗体は、望ましくない増殖を起こしている細胞におけるアポトーシスの誘導に特に有用であると考えられる。

好ましくは、本発明の抗体は、高度に保存された領域内に位置しておらず、ジェームソン（Jameson）およびウルフ（Wolf）のアルゴリズム（CABIOS 4: 181, 1988）を用いてペプチド構造プログラム（Genetics Computer Group Sequence Analysis Package, Program Manual for the GCG Package, Version 7, 1991）によって示される基準などによる解析などで抗原性を有する可能性が高いと考えられるIAP配列を用いて産生される。具体的には、すべてのIAPのBIR1とBIR2との間に見いだされるこれらの領域は以下の通りである：hiap-1のアミノ酸99からアミノ酸170まで、hiap-2のアミノ酸123からアミノ酸184まで、およびxiapまたはm-xiapのアミノ酸116からアミノ酸133まで。これらの断片は、PCRなどの標準的手法によって作製し、pGEX発現ベクターにクローニングすることができる（Ausubelら、前記）。融合蛋白質は大腸菌で発現され、アウスユーベル（Ausubel）ら（前記）に記載されたように、グルタチオンアガロースアフィニティマトリックスを用いて精製される。IAPに対して非特異的または低親和性の結合を示す抗血清が得られる可能性を極めて少なくするためには、それぞれの蛋白質について2種類または3種類の融合体を作製し、それぞれの融合体を少なくとも2匹のウサギに注入する。抗血清は、一連の連続注入、好ましくは少なくとも3回のブースター注入によって産生される。

VIII. IAP蛋白質の発現を調節する分子の同定

IAPのcDNAの単離により、IAPの発現を増強または低下させる分子の同定も容易となる。1つの手法においては、候補となる分子を、IAP mRNAを発現する細胞を含む培地に種々の濃度で添加する。続いてIAPの発現を、例えばハイブリダイゼーション用プローブとしてIAPのcDNAまたはcDNAの断片を用いる標準的なノーザンブロット分析（Ausubelら、前記）によって測定する（表5も参照のこと）。候補分子の存在下におけるIAPの発現レベルを、その他のすべての因子（例えば細胞種および培養条件など）を同一にした候補分子の非存在下におけるIAPの発現レベルと比較する。

その代わりに、IAPを介したアポトーシスに対する候補分子の影響を、IAP特異的抗体（例えば、本明細書で説明するIAP抗体）を用いるウェスタンブロット法または免疫沈降法などの標準的な蛋白質検出法とともに上記の一般的な手法を用いることによって、翻訳のレベルで測定してもよい。

IAPのレベルを調節する化合物は、精製されたもの、もしくは実質的に精製されたものでも、または細胞からの抽出物または上清などの化合物の混合体の1つの成分であってもよい（Ausubelら、前記）。化合物の混合体の1つのアッセイでは、化合物プール（例えば、HPLCまたはFPLCなどの標準的な精製法によって作成されたもの）のサブセットの大きさを段階的に小さくしていきながら、IAPの発現を調節する単一の化合物または効力のある最

小数の化合物が示されるまで、IAPの発現の検討を続ける。

化合物を、それがIAPのアポトーシス抑制活性を調節する能力に基づいてスクリーニングすることもできる。この手法では、候補化合物の存在下におけるアポトーシスの程度と、その非存在下におけるアポトーシスの程度とを同一条件下で比較する。さらにまた、候補化合物のプールを用いてスクリーニングを開始し、そこから1つまたはそれ以上の有用な調節性化合物を段階的なやり方で単離してもよい。アポトーシス活性は、例えば、本明細書で説明するものなどの任意の標準的アッセイ法によって測定することができる。

IAPの活性を調節する化合物を検出するためのもう1つの方法は、ある任意のIAPポリペプチドと物理的に相互作用する化合物をスクリーニングすることである。これらの化合物は、当業者に周知の相互作用トラップ発原系を適合させることによって検出された。これらの系は、転写活性化アッセイを用いて蛋白質の相互作用を検出することができ、ギュリス (Gyuris) ら (Cell 75: 791-803, 1993) およびフィールド (Field) ら (Nature 340: 245-246, 1989) にその概ねが記載されており、Clontech社 (Palo Alto, CA) から商業的に入手可能である。さらに、特許協力条約刊行物 (PCT Publication) ・国際公開公報第95/28497号には、相互作用トラップアッセイが記載されており、そこではアポトーシスに関与する蛋白質がBcl-2との相互作用を利用して検出される。IAPと相互作用する蛋白質およびその他の化合物を同定するために、同様の方法を用いることもできる。

IAPを介した細胞死の調節因子として機能する化合物または分子には、細胞抽出物、哺乳動物の血清、または哺乳類細胞を培養していた増殖培地に存在するようなペプチドおよび非ペプチド分子を含めてもよい。

IAPの発現またはIAPの活性の増強を促進する分子は、本発明において特に有用と考えられる。このような分子は、例えば、IAPの細胞レベルを高め、それによってアポトーシスを抑制するIAPポリペプチドの能力を引き出す治療薬として用いることができると思われる。

。

IAP活性を低下させる化合物 (例えば、IAP遺伝子の発現またはポリペプチド活性の低下による) は、細胞増殖を低下させるために用いることもできる。これは、腫瘍 (以下の表3参照) または他の細胞増殖性疾患の治療に有用と考えられる。

10

20

表3

ノーザンブロットによる癌細胞中のIAP RNAレベル*

	xiap	hiap1	hiap2
前骨髄球性白血病 HL-60	+	+	+
ヒーラ (Hela) S-3	+	+	+
慢性骨髄性白血病 K-562	+++	+	+++
リンパ芽球性リンパ腫 MOLT-4	+++	+	+
バーキットリンパ腫 ラジ (Raji)	+	+(×10)	+
結腸直腸腺癌 SW-480	+++	+++	+++
肺癌 A-549	+	+	+
悪性黒色腫 G-361	+++	+	+

*レベルは(+)によって示し、非癌対照細胞系からのRNAのノーザンブロットと比較したRNAレベルのおおよその増加を示す。1つの+は増加の推計値が少なくとも1倍であることを示す。

上記の方法によって、IAP遺伝子の発現またはポリペプチド活性を効果的に調節することが見いだされた分子を、さらに動物モデルで検討してもよい。それらがインビボの状況でも引き続いてうまく機能する場合には、それらを、必要に応じてアポトーシスの抑制または増強のいずれかのための治療薬として用いることができると考えられる。

IX. IAPによる治療

IAP遺伝子の発現レベルはアポトーシスのレベルと相関関係にある。このため、IAP遺伝子には抗アポトーシス性の遺伝子治療における用途も見いだされる。特に、機能性IAP遺伝子は、神経変性疾患の経過においてアポトーシスを起こす神経細胞、リンパ球（すなわちT細胞およびB細胞）または虚血によって損傷を受けた細胞の維持のために用いることができると考えられる。

治療的なIAP遺伝子構築物のための遺伝子移入到達系としては、アポトーシスに関与すると考えられる細胞（例えば上皮細胞）に対する親和性を有する、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、またはその他のウイルスベクターを用いることができる。この目的に使用することができる多数のベクターは公知である（Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; EglitisおよびAnderson, BioTechniques 6:608-614, 1988; TolstoshevおよびAnderson, current opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991; Cornettaら、Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987; Anderson, Science 224:401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991; Millerら、BioTechniques 7:980-990, 1989; Le Gai La Salleら、Science 259:988-990, 1993; およびJohnson, Chest 107:77S-83S, 1995）。レトロウイルスベクターは特に開発が進んでおり、臨床の間でも使用されている（Rosenbergら、N.Engl. J. Med 323:370, 1990; Andersonら、米国特許第5,399,346号）。そのままではアポトーシスを起こすと予想される細胞内に治療的DNAを導入するために、非ウイルス的手法を用いることもできる。例えば、リポフェクション（Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987; Onoら、Neurosci. Lett. 117:259, 1990; Brighamら、Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; St

aubingerら、Meth. Enz. 101:512, 1983)、アシアロソヌコイド-ポリリジン抱合(Wuら、J. Biol. Chem. 263:14621, 1988; Wuら、J. Biol. Chem. 264:16985, 1989)、または、好ましさは落ちるが、外科的状況下におけるマイクロインジェクション(Wolffら、Science 247:1465, 1990)によって、神経細胞またはT細胞にIAPを導入することもできる。

上記の適用方法のいずれについても、治療的なIAP DNA構築物は、好ましくはアポトーシス現象が予想される部位に対して適用される(例えば注入による)。しかし、アポトーシス現象が予想される部位の近傍の組織、またはアポトーシスが起これば予想される細胞に供給される血管に対してそれを適用してもよい。

上記の構築物において、IAP cDNAの発現は任意の適したプロモーターによって指向させることができ(例えば、ヒト・サイトメガロウイルス(CMV)、シミアンウイルス40(SV40)またはメタロチオネインのプロモーター)、任意の適切な哺乳類調節要素によって調節することができる。例えば、必要であれば、IAPを発現させるために、神経細胞、T細胞またはB細胞における遺伝子発現を優先的に指向することが知られているエンハンサーを用いてもよい。使用するエンハンサーは、その発現が組織または細胞に特異的であると特徴づけられたものを無制限に含む。または、IAPゲノムのクローンを治療的構築物として用いる場合(例えば、上記のIAP cDNAとのハイブリダイゼーションによって単離した後)には、コグネイト調節配列、または、必要であれば、上記の任意のプロモーターもしくは調節要素を含む異種供給源に由来する調節配列を介して調節することもできる。

あまり好ましくはないが、IAPの遺伝子治療は、アポトーシスを起こすと予想される細胞への、IAP mRNAまたはアンチセンスIAP mRNAの直接投与によって達成される。このmRNAは任意の標準的手法によって作製および単離されたものでよいが、高効率プロモーター(例えばT7プロモーター)の制御下にあるIAP cDNAを用いるin vivo転写によって最も容易に産生される。悪性腫瘍細胞へのIAP mRNAの投与は、上記の直接的な核酸投与の方法のいずれによっても実施することができる。

理想的には、任意の遺伝子治療の手法によるIAP蛋白質の産生は、少なくとも非罹患細胞における正常なIAPの細胞内レベルと等しいIAPの細胞内レベルをもたらすと考えられる。IAPを介した任意の遺伝子治療の手法による治療は、より伝統的な治療法と併用することができる。

本発明の範囲内にあるもう1つの治療的手法には、組換えIAP蛋白質の、アポトーシス現象が予想される部位への直接的(例えば注入による)または全身的(例えば、任意の従来の組換え蛋白質の投与法)のいずれかによる投与が含まれる。IAPの用量は、個々の患者のサイズおよび健康状態を含む多くの因子に依存するが、一般的には何らかの薬学的に許容しうる製剤の形で成人に対して1日当たり0.1mgから100mgの範囲で投与される。

X. IAPポリペプチド、IAP遺伝子またはIAPの合成もしくは機能の調節因子の投与

IAPの蛋白質、遺伝子または調節因子は、1回量を含む形で、薬学的に許容しうる希釈液、担体または賦形剤中に含めて投与することができる。過剰なアポトーシスによって引き起こされる疾患に罹患した患者に対するIAPポリペプチドの投与に適した製剤または組成物を提供するために、従来の薬学的行為を用いてもよい。投与は患者に症候が現れる前に行ってもよい。投与経路には任意の適切なものを採用することができ、例えば投与は、非経口的、静脈内、動脈内、皮下、筋肉内、頭蓋内、眼窩内、眼部、脳室内、関節包内、髄腔内、槽内、腹腔内、鼻腔内、エアロゾルまたは経口投与であってもよい。治療的製剤は液性溶液または懸濁液の形態をとることもでき、経口投与用であれば製剤は錠剤またはカプセル剤の形態をとることもでき、鼻腔内投与用であれば粉末剤、点鼻薬またはエアロゾル剤の形態をとることもできる。

製剤を製造するための当技術分野において周知の方法は、例えば、「レミントン薬学」(Reminton's Pharmaceutical Sciences)に記載されている。非経口投与用の製剤は、例えば、賦形剤、滅菌水もしくは生理食塩水、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、植物由来の油、または水素化ナフタレンを含むことができる。化合物の放出の制御のために、生体適合性で生分解性のラクチド重合体、ラクチド/グリコリド共重合体、またはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体を用いてもよい。その

10

20

30

40

50

他の利用可能と考えられるIAP調節性化合物の非経口的送達系には、エチレン-酢酸ビニル共重合体の粒子、浸透圧性ポンプ、埋め込み可能な注入系およびリポソームが含まれる。吸入用の製剤は、例えばラクトースなどの賦形剤を含んでも、もしくは例えばポリエチレン-9-ラウリルエーテル、グリココール酸塩およびデオキシコール酸塩などを含む水性溶液であってもよく、または点鼻剤の剤形として投与するための油性溶液、またはゲルであってもよい。

必要に応じて、IAPの蛋白質、遺伝子または調節性化合物による処置を、自己免疫疾患に対する外科手術、ステロイド療法または化学療法、AIDSに対する抗ウイルス療法および虚血性損傷に対する組織プラスミノゲンアクチベーター (TPA) などのより伝統的な治療法と併用してもよい。

10

XI. アポトーシスの変調が関与する状態の検出

IAPのポリペプチドおよび核酸には、アポトーシスのレベルの異常が関与する状態の検出または観測における診断的用途も見いだされる。例えば、IAPポリペプチドの発現の低下は、ヒトにおけるアポトーシスの亢進と関連している可能性がある（以下のXIIを参照）。したがって、IAP産生レベルの低下または上昇は、有害な状態の徴候を提供する可能性がある。IAPの発現レベルは、任意の標準的な技法によってアッセイすることができる。例えば、生物試料（生検材料など）におけるIAPポリペプチドの発現は標準的なノーザンブロット分析によって観測してもよく、PCRによる補助も可能である（例えば、Ausubelら、前記およびPCR Technology: DNA増幅の原理および応用 (Principles and Applications for DNA Amplification)、H.A. Ehrlich編, Stcokton Press, NY; Yapら、Nucl. Acids . Res. 19:4294、1991を参照）。

20

または、ミスマッチ検出法を用いて、患者から採取した生物試料を、IAP配列における1つまたはそれ以上の変異に関して分析することもできる。一般にこれらの技法には、患者の試料から得た核酸のPCR増幅、および引き続いて行われるハイブリダイゼーションの変化、電気泳動ゲル移動の異常、ミスマッチ結合蛋白質を介した結合もしくは切断、または直接的な核酸塩基配列の決定のいずれかによる変異（すなわちミスマッチ）の同定が含まれる。変異型IAPの検出を容易にするためにこれらの任意の技法を用いることができ、それぞれは本技術分野において周知である。特殊な技法の例は、オリタ (Orita) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766~2770、1989；シェフィールド (Sheffield) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:232~236に無制限的に記載されている。

30

さらにもう1つの手法では、生物試料中のIAP蛋白質の検出または観測のためにイムノアッセイが用いられる。IAPポリペプチドのレベルの測定には、任意の標準的なイムノアッセイ形式（例えば、ELISA、ウェスタンブロット法またはRIA）において、IAP特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いることもできる。これらのレベルは野生型IAPのレベルと比較され、IAP産生に低下がみられれば、アポトーシスの亢進が関与する状態であることが示される。イムノアッセイの例は例えばアウスユーベル (Ausubel) ら、前記に記載されている。IAPの検出のために免疫組織化学的な技法を用いてもよい。例えば、患者から組織試料を採取し、切片化して、抗IAP抗体および任意の標準的な検出系（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼと共役させた二次抗体を含むもの）を用いてIAPの有無に関して染色することもできる。このような技法に関する一般的な指導は、例えばバンクロフト (Bancroft) およびスティーブンス (Stevens) (組織学的テクニックの理論および実践 (Theory and Practice of Histological Techniques)、Churchill Livingstone, 1982) およびアウスユーベルら（前記）に見いだすことができる。

40

1つの好ましい例では、IAP蛋白質の産生の評価（例えば、免疫学的技法または蛋白質切断試験 (Hogerrorstら、Nature Genetics 10:208~212、1995)）に始まり、より微妙なIAPの変異（例えば点変異）を同定するように設計された核酸に基づく検出法も含む、複合的な診断法を使用することができる。上記の通り、当業者には多数のミスマッチ検出アッセイが利用可能であり、任意の好ましい技法を用いることが可能である。IAPにおける変異としては、IAPの発現の消失またはIAPの生物活性の消失のいずれかを引き起こすものを検出することができる。この複合的な診断法の変法では、任意の適切なプロテアーゼアッセ

50

イ系（例えば上記のもの）を用いて、IAPの生物活性がプロテアーゼ活性として測定される。

ミスマッチ検出アッセイによって、不適切なアポトーシスによってもたらされるIAPを介した疾患素因を診断する機会も提供される。例えば、IAPの変異に関してヘテロ接合性である患者は何ら臨床症状を示さないものの、1つまたはそれ以上の種類の神経変性性、脊髄形成異常性または虚血性の疾患を発症する可能性は正常例よりも高いと考えられる。この診断を受けた場合、患者は有害な環境因子（例えば、紫外線照射または化学的突然変異誘発物質）に対する曝露を最小限にし、自らの医学的状態を慎重に監視する（例えば、頻回の身体検査を通じて）ように予防策を講じると考えられる。この種のIAPの診断手法を、出生前スクリーニングにおいてIAPの変異を検出するために用いることもできる。上記のIAP診断アッセイは、その内部でIAPが通常発現される任意の生物試料（例えば、生検試料、または体液もしくは組織）を用いて実施することができる。被験試料に関するこれらの供給源を用いて、変異型IAP遺伝子の同定に関するアッセイを行うこともできる。

または、特にIAPに関連した変性疾患に対する素因を診断する一環として、IAPの変異を、任意の細胞からのDNA試料を用いて、例えばミスマッチ検出法によって検討することもできる。好ましくは、このDNA試料は分析に先立ってPCR増幅にかけられる。

癌の診断法および予後判定法としてのIAP遺伝子の有用性を示すために、ヒト癌細胞系複数組織ノーザンブロット（Clontech, Palo Alto, CA; #7757-1）をプローブ標識した。このノーザンブロットの各レーンには、以下の8種の異なるヒト細胞系からのポリA+RNAが約2 µg含まれている：（1）前骨髄球性白血病 L-60、（2）ヒーラ（Hela）細胞 S-3、（3）慢性骨髄性白血病 K-562、（4）リンパ芽球性リンパ腫 MOLT-4、（5）バーキットリンパ腫 ラジ（Raji）、（6）結腸直腸腺癌 SW480、（7）肺癌 A549、および（8）悪性黒色腫 G361。対照として、ヒト複数組織ノーザンブロット（Clontech, Palo Alto, CA; #7759-1）のプローブ標識も行った。このノーザンブロットには、以下の8つの異なるヒト組織からのポリA+RNAが約2 µg含まれている：（1）脾臓、（2）胸腺、（3）前立腺、（4）精巣、（5）卵巣、（6）小腸、（7）大腸、および（8）末梢血白血球。

ノーザンブロットには以下のものを連続的にハイブリダイズさせた：（1）xiapコード領域に対する1.6kbのプローブ、（2）3' 非翻訳領域に対応する375bpのhiap-2特異的プローブ、（3）hiap-2と交差反応する、hiap-1のコード領域に対数RZFドメイン1.3kbのプローブ、（4）bcl-2のコード領域に由来する1.0kbのプローブ、（5）製造者によって提供されたβ-アクチンに対するプローブ。ハイブリダイゼーションは、製造者の意見に従って50℃で一晩実施した。ブロットには室温の2X SSC、0.1% SDSによる15分間の洗浄を2回行い、続いて50℃の2X SSC、0.1% SDSによる洗浄を行った。

検討した癌細胞系のすべてにおいて、非癌対照組織からの試料と比較してIAPの発現の増加が示された（表3）。xiapの発現は、ヒーラ（S-3）、慢性骨髄性白血病（K-562）、結腸直腸腺癌（SW480）および悪性黒色腫（G361）で特に高度であった。hiap-1の発現はバーキットリンパ腫で著しく高度であり、結腸直腸腺癌でも上昇が認められた。hiap-2の発現は、慢性骨髄性白血病（K-562）および結腸直腸腺癌（SW480）で特に高度であった。Bcl-2の発現にアップレギュレーションが認められたのはHL-60白血病細胞のみであった。

以上の観察から、抗アポトーシス性IAP遺伝子のアップレギュレーションは広範にみられる現象であって、おそらくBcl-2のアップレギュレーションよりも高い頻度で起こっていることが示唆された。さらに、アップレギュレーションは、癌性細胞の形質転換状態の確立または維持のために必要であると考えられる。

上記の観察を追究するために、すなわちラジ・バーキットリンパ腫細胞系においてhiap-1が過剰発現されるように、複数のバーキットリンパ腫細胞系においてRT-PCR分析を実施した。ラジ（Raji）、ラモス（Ramos）、EB-3およびジヨーエ（Jiyoye）細胞系の細胞、ならびに陽性対照として正常胎盤組織から全RNAを抽出した。RNAを逆転写させ、以下のオリゴヌクレオチドの組を用いるPCRによって増幅した：

5' -AGTGGCGGTTTTTATTATGTG-3'（配列番号：__）および

5' -AGATGACCACAAGGAATAAACACTA-3'（配列番号：__）、これらはhiap-1のcDNA断片を選

10

20

30

40

50

挾的に増幅する。RT-PCRはパーキンエルマー480サーモサイクラー (PerkinElmer 480 The rmocycler) を用いて行い、以下のプログラムを35サイクル実施した：94℃を1分間、50℃を1.5分間、および72℃を1分間。PCR反応産物をアガロースゲル上で電気泳動し、臭化エチジウムによって染色した。適切なサイズの増幅されたcDNA断片は、パーキットリンパ腫の試料を含むすべてのレーンで明らかに可視化されたが、正常胎盤組織の試料を含むレーンでは認められず、テンプレートDNAを反応に加えなかった陰性対照を含むレーンでも認められなかった (図17)。

XII. 星状細胞腫細胞における26kDa切断産物の蓄積

A. 26kDa切断産物の同定

ジャーカット (Jurkat) 細胞および星状細胞腫細胞に対して、50mM Tris-HCl (pH8.0)、150mM NaCl、1mM PMSF、1 μg/ml アプロチニン、および5mMベンザミジン中にて超音波処理 (×3回、4℃で15分間) を施すことにより、それらの細胞から全蛋白抽出物を調製した。超音波処理の後、試料に5分間の遠心処理を行った (遠心管中にて14,000RPM)。10%SDS-ポリアクリルアミドゲルの各ウェルに蛋白質20 μgを載せて電気泳動を行い、標準的な方法によってPVDF膜に対するエレクトロブロット法 (electroblot) を行った。すでに記載した方法の通りにウェスタンブロット分析を実施した結果、星状細胞腫細胞系 (CCF-ST TG1) が、アポトーシスの誘因となるイベントがなかったにもかかわらず、抗xiap反応性の約26kDaのバンドを大量に発現したことが明らかになった (図18)。実際に、この細胞系が標準的なアポトーシス誘因に対して特に抵抗性を有するという特徴はすでに分析されている。

26kDaのxiap反応性バンドは以下の実験条件下でも認められた。ジャーカット細胞 (形質転換ヒトT細胞系) は、抗Fas抗体 (1 μg/ml) への曝露によって誘導されてアポトーシスを起こした。ジャーカット細胞の同一培養物に対して以下のいずれかを暴露させた：(1) 抗Fas抗体およびシクロヘキシミド (20 μg/ml)、(2) 腫瘍壊死因子 α (TNF- α、1000 U/ml) または (3) TNF- α およびシクロヘキシミド (20 μg/ml)。投与開始から6時間後にすべての細胞を収集した。このほかに陰性対照として、細胞を収集した後の抽出物に抗Fas抗体を添加した。細胞はSDS試料緩衝液中に収集し、12.5%SDSポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、標準的な方法を用いてPVDF膜へのエレクトロブロッティングを行った。この膜に、1:1000としたウサギ抗XIAPポリクローナル抗体による免疫染色を1時間行った。15分間洗浄した後に、西洋ワサビペルオキシダーゼと共役させたヤギ抗ウサギ抗体を室温で1時間適用した。非結合型の二次抗体を洗い流し、化学発光によるXIAP蛋白質の検出を実施した。このウェスタンブロットにより、非処置および処置細胞の両方に完全長の55 kDaのXIAP蛋白質が存在することが明らかになった。さらに、アポトーシス性細胞の抽出物には約26kDaの新規なxiap反応性バンドも認められたが、対照の非処置細胞の抽出物ではこれは認められなかった (図19)。

XIAPの切断は、ヒーラ (Hela) などの他の癌細胞系を含むさまざまな細胞種で起こる。26 kDaのXIAP切断産物の発現は、ヒーラ細胞では以下のようにして示されている。ヒーラ細胞に以下のいずれかの処置を行った：(1) シクロヘキシミド (20 μg/ml)、(2) 抗Fas抗体 (1 μg/ml)、(3) 抗Fas抗体 (1 μg/ml) およびシクロヘキシミド (20 μg/ml)、(4) TNF α (1,000U/ml)、または (5) TNF α (1,000U/ml) およびシクロヘキシミド (20 μg/ml)。処置開始から18時間後にすべての細胞を収集した。上記の通りに細胞を収集した後の抽出物に抗Fas抗体を添加した。ヒーラ細胞を収集し、ジャーカット細胞の試料からのxiap反応性バンドの可視化に用いたものと同一の条件下でウェスタンブロットのプローブ標識を行った。アポトーシス性細胞調製物では同じく26kDaのXIAPのバンドが認められた (図20)。さらに、XIAPの切断の度合いとアポトーシスの程度との間には正の相関が認められた。ヒーラ細胞にシクロヘキシミドまたはTNF α のいずれかのみを投与した場合にはわずかなアポトーシスが引き起こされたのみであり、切断産物はほとんど認められなかった。細胞に抗Fas抗体を投与した場合には、より多量の切断産物が明らかに認められた。これらのデータは、XIAPが1種を超える細胞種において、1種を超えるアポトーシス誘因に反応して切断されることを示している。

B. 発現の時間経過

ヒーラおよびジャーカット細胞に抗Fas抗体 (1 µg/ml) を投与して、投与の直後または1、2、3、5、10もしくは22時間後のいずれかに収集することにより、26kDa切断産物の蓄積に関する時間経過を検討した。上記の通りに、蛋白質抽出物を調製してウェスタンブロット分析を実施した。検討した時間経過の範囲にわたって、26kDa切断産物の蓄積量は両方の種類の細胞で増加した (図21Aおよび21B)。

C. 26kDaのXIAP切断産物の細胞下局在

26kDa切断産物の細胞下配置を決定するために、抗Fas抗体 (1 µg/ml) への曝露によってジャーカット細胞がアポトーシスを起こすように誘導し、続いてその直後、3時間後または6時間後に細胞を収集した。上記の通りに、それぞれの時点で収集した細胞から全蛋白質抽出物を調製した。核および細胞質の細胞抽出物を調製するために、アポトーシス性ジャーカット細胞を等張トリス (Tris) 緩衝生理食塩水 (pH7.0) で洗い、細胞抽出緩衝液 (50mM PIPES、50mM KCl、5mM EGTA、2mM MgCl₂、1mM DTTおよび20 µMサイトカラシンB) 中での凍結解凍を5回行うことによって溶解した。核は遠心処理によってペレット化し、等張トリス緩衝液 (pH7.0) 中に再懸濁させて-80℃で凍結した。抽出物の細胞質分画は、TA 100.3ローターに入れて60,000RPMでの遠心処理をさらに30分間施した。上清を除去し、-80℃で凍結した。核および細胞質の両方の分画の試料を12.5%SDS-ポリアクリルアミドゲル上に載せた後、PVDF膜へのエレクトロブロッティングを行った。続いて、抗CPP32抗体 (Transduction Laboratories Lexington, KY; 図22A) または上記のウサギ抗XIAP抗体 (図22B) のいずれかを用いてウェスタンブロット分析を実施した。

CPP32プロテアーゼを認識する抗CPP32抗体 (YAMAまたはアポパイン (Apopain) としても知られる) は、ほぼ独占的に細胞質分画中に分配された。55kDaのXIAP蛋白質は独占的にアポトーシス性細胞の細胞質中に位置しており、これは、正常で健全なCOS細胞でXIAPが細胞質に位置することが免疫蛍光顕微鏡法によって示した上記の研究の結果と一致する。これに対して、アポトーシス性ジャーカット細胞では、核分画に独占的に26kDa切断産物が位置していた。以上を総合すると、これらの観察から、XIAPの抗アポトーシス成分は26kDa切断産物であって、それは核内に作用を及ぼすと考えられることが示唆される。

D. XIAP蛋白質のインビトロでの切断、および切断産物の特徴分析

この一連の実験のために、プラスミドpcDNA3-6myc-XIAP、T7 RNAポリメラーゼ、および一対の転写／翻訳キット (Promega) を製造者の指示に従って用いて、XIAP蛋白質にS35による標識を施した。セファデックス (Sephadex) G-50を用いるカラムクロマトグラフィーにより、放射性標識が施されたXIAP蛋白質を、取り込まれなかったメチオニンから分離した。さらに、抗Fas抗体 (1 µg/ml) による処置を3時間行った後、アポトーシス性ジャーカット細胞の抽出物を調製した。抽出物を調製するために、細胞をTriton X-100緩衝液 (1 % Triton X-100、25mM Tris HCl) 中にて氷上に2時間置いて溶解し、続いて5分間のマイクロ遠心処理 (microcentrifuge) を行った。可溶性抽出物を残した (これはTX100と表記した)。細胞抽出緩衝液中にて凍結／解凍を行って細胞を溶解した。可溶性の細胞質分画は別にまとめた (これはCEBと表記した)。CEB細胞質分画の調製物から得た核ペレットは、Triton X-100緩衝液によって可溶化し、マイクロ遠心処理を行って、主に核DNAを含む可溶性分画を残した (これはCEB-TX100と表記した)。可溶性細胞抽出物は細胞をNP-40緩衝液によって溶解することによって調製し、続いてマイクロ遠心処理を5分間実施した (これはNP-40と表記した)。インビトロでの切断は、それぞれの抽出物 (CEB、TX-100、CEB-TX100およびNP-40) 16 µlを、インビトロで翻訳されたXIAP蛋白質とともに37℃で7時間インキュベートすることによって実施した。TX100緩衝液またはCEB緩衝液のみを含む陰性対照も含めた。蛋白質は10%SDS-ポリアクリルアミド上で分離し、乾燥させた後にX線フィルムに一晩露光させた。

XIAPのインビトロでの切断は、CEB抽出物では明らかであった。切断産物の分子量の観測値は約36kDaであった (図23)。切断産物のサイズに10kDaの差があったことは、観察された産物が、mycエピトープの6つのコピー (10kDa) を含む組換え蛋白質のアミノ末端に由来することを示している。このため、この切断産物は少なくとも2つのBIRドメインを有し

ており、核内に位置していると考えられる。

XIII. HIVに感染した個体の治療

hiap-1およびhiap-2の発現は、HIVに感染したヒト細胞では著明に低下する。さらに、この低下はアポトーシスに先行する。したがって、HIAP-1、HIAP-2、これらの蛋白質をコードする遺伝子、またはこれらの遺伝子をアップレギュレートする化合物の投与を、HIVに感染した患者におけるT細胞の消耗を予防するために用いることができる。以下のアッセイを、hiap-1またはhiap-2の発現を変化させ、同時にアポトーシスを予防する化合物をスクリーニングするために用いることもできる。

培養成熟リンパ球CD-4⁺T細胞系（H9、「a」と表記；CEM/CM-3、「b」と表記；6T-CEM、「c」と表記；およびジャーカット、「d」と表記。いずれも図13Aおよび図13B）をマイトジェンまたはHIV感染に曝露させた後、アポトーシスの徴候（図13A）およびhiap遺伝子の発現（図13B）に関して検討した。アポトーシスの存在はゲル電気泳動上のDNAの「梯子状分布（laddering）」の出現によって示され、遺伝子の発現はPCRによって評価された。正常の（感染もマイトジェン刺激も受けていない）細胞から得た結果は、図13Aおよび13Bに「1」と表記した各レーンに示した。PHA/PMA（フィトヘマグルチニン／ホルボールエステル）刺激から24時間後に得た結果は、「2」と表記した各レーンに示した。HIV III_B株の感染から24時間後に得た結果は、「3」と表記した各レーンに示した。「M」は標準的DNAマーカーを指す（図13Bにおける123bpのラダー、および図13AにおけるラムダHindIIIラダー（いずれもGibco-BRL））。アポトーシスの存在を示すDNAのラダー（Prigentら、J. Immunol. Methods、160:139～140、1993）は、上記の試料から得たDNAをアガロースゲル上で電気泳動して臭化エチジウム染色を施した場合には明らかであった（図13A）。検討した4種のT細胞系のアポトーシスに対する感受性およびその程度は、マイトジェン刺激およびHIV感染の後に変化した。

hiap遺伝子の発現を検討するために、培養細胞から全RNAを調製し、オリゴdTプライミングを用いて逆転写を行った。hiap-2a、hiap-2bおよびhiap-1を検出するために、特異的プライマー（表5に示した）を用いるPCRによってRT cDNA産物を増幅した。PCRは、パーキンエルマー480サーモサイクラー（PerkinElmer 480 thermocycler）を用いて行い、以下のプログラムを35サイクル実施した：94℃を1分間、55℃を2分間および72℃を1.5分間。RT-PCR反応産物を1%アガロースゲル上で電気泳動し、臭化エチジウムで染色した。HIVの感染から24時間後では4種の細胞系のすべてにおいてhiap-2の転写物は認められなかった。4種の細胞系のうち3種（すべてH9以外）では、HIV感染後にhiap-1遺伝子も劇的にダウンレギュレートされた。PHA/PMAマイトジェン刺激によってもhiap遺伝子の発現は低下するよう思われ、これは特にhiap-2で強く、程度は落ちるがhiap-1でも認められた。これらの実験で得られたデータの概要を表5に示した。β-アクチンの発現は検討したすべての細胞系で一貫して認められ、このことから、hiap遺伝子の発現の低下はRT-PCRアッセイの欠陥によるものではないことが示された。

10

20

30

表4

固有のIAP遺伝子の特異的RT-PCR増幅に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

IAP遺伝子	前方プライマー (ヌクレオチド位置*)	逆プライマー (ヌクレオチド位置*)	産物のサイズ (bp)
h-xiap	p2415 (876~896)	p2449 (1291~1311)	435
m-xiap	p2566 (458~478)	p2490 (994~1013)	555
h-hiap1	p2465 (827~847)	p2464 (1008~1038)	211
m-hiap1	p2687 (747~767)	p2684 (1177~1197)	450
hiap2	p2595 (1562~1585)	p2578 (2339~2363)	801 ^a 618 ^b
m-hiap2	p2693 (1751~1772)	p2734 (2078~2100)	349

*それぞれのIAP遺伝子に関する図1~4から決定されたヌクレオチドの位置

a hiap2aのPCR産物のサイズ

b hiap2bのPCR産物のサイズ

表5

培養T細胞におけるマイトジェン刺激またはHIV感染後のアポトーシス
およびHIAP遺伝子の発現

細胞系	状態	アポトーシス	hiap1	hiap2
H9	刺激せず	—	+	±
	PHA/PMA刺激	+++	+	±
	HIV感染	++	+	—
CEM/CM-3	刺激せず	—	+	±
	PHA/PMA刺激	±	+	—
	HIV感染	±	—	—
6T-CEM	刺激せず	—	+	+
	PHA/PMA刺激	±	—	—
	HIV感染	+	—	—
ジャーカット	刺激せず	—	+	++
	PHA/PMA刺激	+	+	+
	HIV感染	±	—	—

XIV. 蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) によるxiap、hiap-1およびhiap-2の染色体Xq25および11q22-23への割り当て

蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) を用いてxiap、hiap-1およびhiap-2の染色体上の位置を同定した。用いたプローブはプラスミドベクター中にクローニングしたcDNAである：2.4kbのxiapクローンは1493bpのコード配列、34bpの5' UTR (非翻訳領域) および913bpの3' UTRを含み、hiap-1のcDNAクローンは3.1kb長であって1812のコード配列および1300bpの3' UTRを含み、hiap-2クローンは1856bpのコード配列および1200bpの5' UTRからなる。合計1 μgのプローブDNAをニックトランスレーション (BRL) によってビオチン標識した。正常末梢血培養物から調製した染色体展開物 (chromosome spread) を70°Cの50%ホルムアルデヒド/2X SSC中に2分間置いて変性させ、続いて、2X SSC/70%ホルムアルデヒド/10%硫酸デキストランからなる溶液中にて、ビオチン標識したDNAプローブと37°Cで18時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションの後に展開物を2X SSC/50%ホルムアルデヒドで洗い、続いて42°Cの2X SSCで洗った。ビオチン標識したDNAを、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 共役アビジン抗体および抗アビジン抗体 (ONCOR検出キット) により、製造者の指示に従って検出した。染色体はヨウ化プロピジウムによって対比染色し、オリンパス (Olympus) BX60間接蛍光顕微鏡を用いて検査した。染色体の同定のために、記録および標識された分裂中期展開物を載せたスライドに脱染、脱水、乾燥、トリプシンによる30秒間の消化、および4%ギムザ染色による2分間の染色を行った。染色体展開物の位置を再び捉えて、画像を比較した。

上記のようにして、合計101個の分裂中期展開物をxiapプローブを用いて検討した。分析した細胞の74%では、Xq25染色体の相同体の1つまたは両方のいずれかに対称的な蛍光信号が認められた。hiap-1およびhiap-2のプローブで染色した後に56個の細胞を分析したところ、検討した細胞の83%で11q22-23領域に対となる信号が認められた。xiap遺伝子はXq25にマッピングされ、hiap-1およびhiap-2遺伝子は11q22および11q23バンドの境界部にマッピングされた。

以上の実験により、xiap遺伝子の位置が染色体Xq25上にあることが裏づけられた。これまでのところ、いずれの悪性腫瘍についてもバンドXq25が関与する高度に一貫した染色体異常は報告されていない。しかし、この領域内の欠失は、伴性劣性リンパ増殖症候群を含む多数の免疫系欠損症と関連している (Wuら、Genomics 17:163~170、1993)。

小児白血病の50%を超える割合で、表現型とは無関係にバンド11q23の細胞遺伝学的異常が同定されている (Martinez-Climetら、Leukemia 9:1299~1304、1995)。MLL遺伝子 (混合連鎖白血病 (mixed lineage leukemia) または骨髓系リンパ球性白血病; Ziemin Van der Poelら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10735~10739) の再配列は、11q23の転座を有する症例の80%以上で検出されているが、MLL遺伝子以外の領域が明らかに再配列に関与している患者も報告されている (Kobayashiら、Blood 82:547~551、1993)。このため、IAP遺伝子はBcl-2のパラダイムに従うと考えられ、したがって癌の形質転換において重要な役割を果たすと考えられる。

XV. 予防的な抗アポトーシス療法

IAPの変異に関してヘテロ接合的である、またはIAPの変異を起こしやすい (その変異がIAPの生物活性の変調または消失をもたらさないものであっても) と診断された患者、またはHIV陽性であると診断された患者には、疾患の表現型が現れる前に上記の治療法のいずれかを投与することができると考えられる。例えばこの治療法は、HIV陽性であるが現時点ではT細胞数の減少またはその他の明白な徴候を有していない患者に対して提供される。特にIAPの発現またはIAPの生物活性を増強させることが示された化合物は、任意の標準的な用量および経路の投与 (上記参照) によって投与することができると考えられる。または、IAP発現構築物を用いる遺伝子治療を行って変性疾患の発症の前に細胞欠損の回復または予防を行うこともできると考えられる。

本発明の方法は、例えばヒト、家庭内ペットまたは家畜などの任意の哺乳動物において本明細書で説明した疾患の低減または診断に用いることができると思われる。非ヒト哺乳動物に治療または診断を受けた場合、使用したIAPのポリペプチド、核酸または抗体は好ま

しくはその種に特異的である。

その他の態様

その他の態様において、本発明は、哺乳類IAPポリペプチド（図1～6、配列番号：1～42）と実質的に同一な任意の蛋白質を含む。このような相同体は、その他の実質的に純粋な天然の哺乳類IAP蛋白質のほか、対立遺伝子変異体、天然変異体、誘導変異体、蛋白質をコードしておりかつ高度に厳密な条件、または好ましさは落ちるが厳密性の低い条件（例えば、少なくとも40ヌクレオチド長のプローブとともに40℃で2X SSCにより洗浄）において図1～6のIAPのDNA配列（配列番号：1～42）とハイブリダイズするDNA配列、およびIAPを指向する抗血清と特異的に結合する蛋白質を含む。また、この用語は、IAPの一部を含むキメラ蛋白質を含む。

10

本発明はさらに、任意の天然のIAPの類似体を含む。類似体は天然のIAPとは、アミノ酸配列の違い、翻訳後修飾のいずれかまたはその両方の点で異なる。一般に本発明の類似体は、天然のIAPの配列の全体または一部と少なくとも85%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%またはさらに99%の同一性を示す。比較する配列の長さは、少なくとも15アミノ酸残基であり、好ましくは25アミノ酸残基、より好ましくは35アミノ酸残基を上回る。修飾には、インビボおよびインビトロでのポリペプチドの化学的誘導体化、例えばアセチル化、カルボキシル化、リン酸化、またはグリコシル化などが含まれる。このような修飾は、ポリペプチドの合成もしくはプロセッシングの間、または単離された修飾酵素による処置後にも起こる。また、類似体は、天然のIAPとは一次配列に変化を生じている点でも異なる。これらには、天然型および誘導型の両方（例えば、Sambrook, FritschおよびManiatis、分子クローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）第2版、CSH Press、1989またはAusubelら、前記に記載された方法による、放射線照射もしくはエタンメチルスルホネート曝露によるランダム変異誘発または部位特異的変異誘発によって生じたもの）による遺伝的変異体が含まれる。また、環状化ペプチド分子、および例えばD-アミノ酸またはβもしくはγアミノ酸などの非天然型もしくは合成アミノ酸などの、L-アミノ酸以外の残基を含む類似体も含まれる。完全長のポリペプチドのほかに、本発明にはIAPの断片も含まれる。本明細書で用いる「断片」という用語は、少なくとも20個の隣接アミノ酸、好ましくは30個の隣接アミノ酸、より好ましくは50個の隣接アミノ酸、最も好ましくは60から80個またはそれ以上の隣接アミノ酸を意味する。IAPの断片は当業者に周知の方法によって作製することができるが、通常の蛋白質プロセッシング（例えば、新生ポリペプチドからの生物活性に必要なでないアミノ酸の除去、または選択的mRNAスプライシングもしくは選択的蛋白質プロセッシング過程によるアミノ酸の除去）によって得られたものでもよい。

20

30

本発明による好ましい断片または類似体は、診断対象となる試料におけるIAPの核酸またはアミノ酸配列の特異的な検出を容易にするものである。この目的に特に有用なIAP断片には、表2に示したアミノ酸断片が無制限的に含まれる。

請求内容は以下の通りである。

配列表

(1) 一般情報：

(i) 出願人：University of Ottawa

40

Korneluk, Robert G.

Mackenzie, Alexander E.

Baird, Stephen

Liston, Peter

(ii) 発明の名称：MAMMALIAN IAP GENE FAMILY, PRIMERS, PROBES, AND DETECTION METHODS

(iii) 配列数：45

(iv) 文書通信情報：

(A) 宛名：Fish & Richardson P.C.

(B) 街路名：225 Franklin Street

50

- (C) 市名：Boston
- (D) 州名：MA
- (E) 国名：USA
- (F) 郵便番号：02110-2804
- (v) コンピューター読取りフォーム：
 - (A) メディア形式：Floppy disk
 - (B) コンピューター：IBM PC compatible
 - (C) 運転システム：PC-DOS/MS-DOS
 - (D) ソフトウェア：PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (vi) 現出願データ：10
 - (A) 出願番号：
 - (B) 出願日：
 - (C) 分類：
- (vi) 現出願データ：
 - (A) 出願番号：PCT/IB96/----
 - (B) 出願日：05-AUG-1996
 - (C) 分類：
- (vii) 親出願データ：
 - (A) 出願番号：US 08/511,485
 - (B) 出願日：04-AUG-199520
 - (C) 分類：
- (vii) 親出願データ：
 - (A) 出願番号：US 08/576,956
 - (B) 出願日：22-DEC-1995
 - (C) 分類：
- (viii) 弁理士／代理人情報：
 - (A) 氏名：Clark, Paul T.
 - (B) 登録番号：30,162
 - (C) 参照／明細書番号：07891/003W01
- (ix) 電気通信情報：30
 - (A) 電話：617/542-5070
 - (B) ファックス：617/542-8906
 - (C) テレックス：200154
- (2) 配列番号：1 の情報：
 - (i) 配列の特性：
 - (A) 配列の長さ：46アミノ酸
 - (B) 配列の型：アミノ酸
 - (C) 鎖の数：不明
 - (D) トポロジー：両形態
 - (ii) 配列の種類：タンパク質40
- (ix) 配列の特徴：
 - (D) 他の情報：Xaa at positons 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 30, 31, 32, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 42, and 45 may be any amino acid. Xaa at positon 8 is Glu or Asp. Xaa at positions 14 & 22 is Val or Ile.
- (xi) 配列の記載：配列番号：1：

Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Lys Xaa Cys Met
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Pro Cys Gly His Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Cys Xaa Xaa Cys Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Pro Xaa Cys
 35 40 45

10

(2) 配列番号：2 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：68アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(ix) 配列の特徴：

(D) 他の情報：Xaa at positions 1, 2, 3, 6, 9, 10, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 24, 30, 32, 33, 35, 37, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 64 and 66 may be any amino acid. Xaa at positions 13, 16 and 17 may be any amino acid or may be absent.

(xi) 配列の記載：配列番号：2：

Xaa Xaa Xaa Arg Leu Xaa Thr Phe Xaa Xaa Trp Pro Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ala Xaa Ala Gly Phe Tyr Tyr Xaa Gly Xaa
 20 25 30
 Xaa Asp Xaa Val Xaa Cys Phe Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa
 50 55 60

30

Cys Xaa Phe Val

65

(2) 配列番号：3 の情報：

40

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：2540塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：両形態

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：3：

GAAAAGGTGG ACAAGTCCTA TTTTCAAGAG AAGATGACTT TTAACAGTTT TGAAGGATCT	60	
AAAAC TTGTG TACCTGCAGA CATCAATAAG GAAGAAGAAT TTGTAGAAGA GTTTAATAGA	120	
TTAAAACTT TTGCTAATTT TCCAAGTGGT AGTCCTGTTT CAGCATCAAC ACTGGCACGA	180	
GCAGGGTTTC TTTATACTGG TGAAGGAGAT ACCGTGCGGT GCTTTAGTTG TCATGCAGCT	240	
G TAGATAGAT GGCAATATGG AGACTCAGCA GTTGGAAGAC ACAGGAAAGT ATCCCCAAAT	300	
TGCAGATTTA TCAACGGCTT TTATCTTGAA AATAGTGCCA CGCAGTCTAC AAATTCTGGT	360	
ATCCAGAATG GTCAGTACAA AGTTGAAAAC TATCTGGGAA GCAGAGATCA TTTTGCCTTA	420	10
GACAGGCCAT CTGAGACACA TGCAGACTAT CTTTTGAGAA CTGGGCAGGT TG TAGATATA	480	
TCAGACACCA TATACCCGAG GAACCCTGCC ATGTATTGTG AAGAAGCTAG ATTAAAGTCC	540	
TTTCAGAACT GGCCAGACTA TGCTCACCTA ACCCCAAGAG AGTTAGCAAG TGCTGGACTC	600	
TACTACACAG GTATTGGTGA CCAAGTGCAG TGCTTTTGTT GTGGTGAAAA ACTGAAAAAT	660	
TGGGAACCTT GTGATCGTGC CTGGTCAGAA CACAGGCGAC ACTTTCCTAA TTGCTTCTTT	720	
GTTTTGGGCC GGAATCTTAA TATTCGAAGT GAATCTGATG CTGTGAGTTC TGATAGGAAT	780	20
TTCCCAAATT CAACAAATCT TCCAAGAAAT CCATCCATGG CAGATTATGA AGCACGGATC	840	
TTTACTTTTG GGACATGGAT ATACTCAGTT AACAAGGAGC AGCTTGCAAG AGCTGGATTT	900	

TATGCTTTAG GTGAAGGTGA TAAAGTAAAG TGCTTTTCACT GTGGAGGAGG GCTAACTGAT	960	
TGGAAGCCCA GTGAAGACCC TTGGGAACAA CATGCTAAAT GGTATCCAGG GTGCAAATAT	1020	
CTGTTAGAAC AGAAGGGACA AGAATATATA AACAATATTC ATTTAACTCA TTCACTTGAG	1080	
GAGTGTCTGG TAAGAACTAC TGAGAAAACA CCATCACTAA CTAGAAGAAT TGATGATACC	1140	
ATCTTCCAAA ATCCTATGGT ACAAGAAGCT ATACGAATGG GGTTCAGTTT CAAGGACATT	1200	
AAGAAAATAA TGGAGGAAAA AATTCAGATA TCTGGGAGCA ACTATAAATC ACTTGAGGTT	1260	10
CTGGTTGCAG ATCTAGTGAA TGCTCAGAAA GACAGTATGC AAGATGAGTC AAGTCAGACT	1320	
TCATTACAGA AAGAGATTAG TACTGAAGAG CAGCTAAGGC GCCTGCAAGA GGAGAAGCTT	1380	
TGCAAAATCT GTATGGATAG AAATATTGCT ATCGTTTTTG TTCCTTGTGG ACATCTAGTC	1440	
ACTTGTAAC AATGTGCTGA AGCAGTTGAC AAGTGTCCCA TGTGCTACAC AGTCATTACT	1500	
TTCAAGCAAA AAATTTTTAT GTCTTAATCT AACTCTATAG TAGGCATGTT ATGTTGTTCT	1560	
TATTACCCTG ATTGAATGTG TGATGTGAAC TGACTTTAAG TAATCAGGAT TGAATTCCAT	1620	
TAGCATTTGC TACCAAGTAG GAAAAAAAT GTACATGGCA GTGTTTTAGT TGGCAATATA	1680	20
ATCTTTGAAT TTCTTGATTT TTCAGGGTAT TAGCTGTATT ATCCATTTTT TTTACTGTTA	1740	
TTTAATTGAA ACCATAGACT AAGAATAAGA AGCATCATAC TATAACTGAA CACAATGTGT	1800	
ATTCATAGTA TACTGATTTA ATTTCTAAGT GTAAGTGAAT TAATCATCTG GATTTTTTAT	1860	
TCTTTTCAGA TAGGCTTAAC AAATGGAGCT TTCTGTATAT AAATGTGGAG ATTAGAGTTA	1920	
ATCTCCCCAA TCACATAATT TGTTTTGTGT GAAAAAGGAA TAAATTGTTT CATGCTGGTG	1980	
GAAAGATAGA GATTGTTTTT AGAGGTTGGT TGTTGTGTTT TAGGATTCTG TCCATTTTTCT	2040	30
TGTAAAGGGA TAAACACGGA CGTGTGCGAA ATATGTTTGT AAAGTGATTT GCCATTGTTG	2100	
AAAGCGTATT TAATGATAGA ATACTATCGA GCCAACATGT ACTGACATGG AAAGATGTCA	2160	
GAGATATGTT AAGTGTAATA TGCAAGTGCG GGGACACTAT GTATAGTCTG AGCCAGATCA	2220	
AAGTATGTAT GTTGTTAATA TGCATAGAAC GAGAGATTTG GAAAGATATA CACCAAAGTG	2280	
TTAAATGTGG TTTCTCTTCG GGGAGGGGGG GATTGGGGGA GGGGCCCCAG AGGGGTTTTA	2340	
GAGGGGCCCTT TTCACTTTCG ACTTTTTTCA TTTTGTTCCTG TTCGGATTTT TTATAAGTAT	2400	
GTAGACCCCG AAGGGTTTTA TGGGAACATA CATCAGTAAC CTAACCCCG TGACTATCCT	2460	40
GTGCTCTTCC TAGGGAGCTG TGTTGTTTCC CACCCACCAC CCTTCCCTCT GAACAAATGC	2520	
CTGAGTGCTG GGGCACTTN	2540	

(2) 配列番号：4 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：497アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：4：

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

10

20

30

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

10

20

30

40

Gly Ser Asn Tyr Lys Ser Leu Glu Val Leu Val Ala Asp Leu Val Asn
405 410 415
Ala Gln Lys Asp Ser Met Gln Asp Glu Ser Ser Gln Thr Ser Leu Gln
420 425 430
Lys Glu Ile Ser Thr Glu Glu Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu Lys
435 440 445
Leu Cys Lys Ile Cys Met Asp Arg Asn Ile Ala Ile Val Phe Val Pro
450 455 460
Cys Gly His Leu Val Thr Cys Lys Gln Cys Ala Glu Ala Val Asp Lys
465 470 475 480
Cys Pro Met Cys Tyr Thr Val Ile Thr Phe Lys Gln Lys Ile Phe Met
485 490 495

10

Ser

20

(2) 配列番号：5 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：2676塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：両形態

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：5：

TCCTTGAGAT GTATCAGTAT AGGATTTAGG ATCTCCATGT TGGAACCTCTA AATGCATAGA 60
AATGGAAATA ATGGAAATTT TTCATTTTGG CTTTTCAGCC TAGTATTAAA ACTGATAAAA 120
GCAAAGCCAT GCACAAAACCT ACCTCCCTAG AGAAAGGCTA GTCCCTTTTC TTCCCCATTC 180
ATTTTCATTAT GAACATAGTA GAAAACAGCA TATTCTTATC AAATTTGATG AAAAGCGCCA 240
ACACGTTTGA ACTGAAATAC GACTTGTCAT GTGAACTGTA CCGAATGTCT ACGTATTCCA 300
CTTTTCCTGC TGGGGTTCCT GTCTCAGAAA GGAGTCTTGC TCGTGCTGGT TTCTATTACA 360
CTGGTGTGAA TGACAAGGTC AAATGCTTCT GTTGTGGCCT GATGCTGGAT AACTGGAAAA 420

30

40

GAGGAGACAG TCCTACTGAA AAGCATAAAA AGTTGTATCC TAGCTGCAGA TTCGTTTCAGA	480	
GTCTAAATTC CGTTAACAAC TTGGAAGCTA CCTCTCAGCC TACTTTTCCT TCTTCAGTAA	540	
CACATTCCAC AACTCATT CTTCCGGGTA CAGAAAACAG TGGATATTTT CGTGGCTCTT	600	
ATTCAAATC TCCATCAAAT CCTGTAACT CCAGAGCAAA TCAAGAATTT TCTGCCTTGA	660	
TGAGAAGTTC CTACCCCTGT CCAATGAATA ACGAAAATGC CAGATTACTT ACTTTTCAGA	720	
CATGGCCATT GACTTTTCTG TCGCCAACAG ATCTGGCACG AGCAGGCTTT TACTACATAG	780	10
GACCTGGAGA CAGAGTGGCT TGCTTTGCCT GTGGTGGAAA ATTGAGCAAT TGGGAACCGA	840	
AGGATAATGC TATGTCAGAA CACCTGAGAC ATTTTCCCAA ATGCCCATTT ATAGAAAATC	900	
AGCTTCAAGA CACTTCAAGA TACACAGTTT CTAATCTGAG CATGCAGACA CATGCAGCCC	960	
GCTTTAAAAC ATTCTTTAAC TGGCCCTCTA GTGTTCTAGT TAATCCTGAG CAGCTTGCAA	1020	
GTGCGGGTTT TTATTATGTG GGTAAACAGT ATGATGTCAA ATGCTTTTGC TGTGATGGTG	1080	
GACTCAGGTG TTGGGAATCT GGAGATGATC CATGGGTTC AATGCCAAG TGGTTTCCAA	1140	
GGTGTGAGTA CTTGATAAGA ATTAAGGAC AGGAGTTCAT CCGTCAAGTT CAAGCCAGTT	1200	20
ACCTCATCT ACTTGAACAG CTGCTATCCA CATCAGACAG CCCAGGAGAT GAAAATGCAG	1260	
AGTCATCAAT TATCCATTG GAACCTGGAG AAGACCATT AGAAGATGCA ATCATGATGA	1320	
ATACTCCTGT GATTAATGCT GCCGTGGAAA TGGGCTTTAG TAGAAGCCTG GTAAAACAGA	1380	
CAGTTCAGAG AAAAATCCTA GCAACTGGAG AGAATTATAG ACTAGTCAAT GATCTTGTGT	1440	
TAGACTTACT CAATGCAGAA GATGAAATAA GGGAAGAGGA GAGAGAAAGA GCAACTGAGG	1500	
AAAAAGAATC AAATGATTTA TTATTAATCC GGAAGAATAG AATGGCACTT TTTCAACATT	1560	30
TGACTTGTGT AATCCAATC CTGGATAGTC TACTAACTGC CGGAATTATT AATGAACAAG	1620	
AACATGATGT TATTAAACAG AAGACACAGA CGTCTTTACA AGCAAGAGAA CTGATTGATA	1680	
CGATTTTAGT AAAAGGAAAT ATTGCAGCCA CTGTATTCAG AACTCTCTG CAAGAAGCTG	1740	
AAGCTGTGTT ATATGAGCAT TTATTTGTGC AACAGGACAT AAAATATATT CCCACAGAAG	1800	
ATGTTTCAGA TCTACCAGTG GAAGAACAAT TGCGGAGACT ACCAGAAGAA AGAACATGTA	1860	
AAGTGTGTAT GGACAAAGAA GTGTCCATAG TGTTTATTCC TTGTGGTCAT CTAGTAGTAT	1920	40
GCAAAGATTG TGCTCCTTCT TTAAGAAAGT GTCCTATTTG TAGGAGTACA ATCAAGGGTA	1980	
CAGTTCGTAC ATTTCTTTCA TGAAGAAGAA CAAAACATC GTCTAACTT TAGAATTAAT	2040	
TTATTAAATG TATTATAACT TTAACTTTTA TCCTAATTTG GTTTCCTTAA AATTTTTATT	2100	
TATTTACAAC TCAAAAAACA TTGTTTTGTG TAACATATTT ATATATGTAT CTAAACCATA	2160	

TGAACATATA TTTTITAGAA ACTAAGAGAA TGATAGGCTT TTGTTCTTAT GAACGAAAAA 2220
 GAGGTAGCAC TACAAACACA ATATTCAATC CAAATTTTCAG CATTATTGAA ATTGTAAGTG 2280
 AAGTAAAACT TAAGATATTT GAGTTAACCT TTAAGAATTT TAAATATTTT GGCATTGTAC 2340
 TAATACCGGG AACATGAAGC CAGGTGTGGT GGTATGTACC TGTAGTCCCA GGCTGAGGCA 2400
 AGAGAATTAC TTGAGCCCAG GAGTTTGAAT CCATCCTGGG CAGCATACTG AGACCCTGCC 2460
 TTTAAAAACN AACAGNACCA AANCCAAACA CCAGGGACAC ATTTCTCTGT CTTTTTTGAT 2520
 CAGTGTCTTA TACATCGAAG GTGTGCATAT ATGTTGAATC ACATTTTAGG GACATGGTGT 2580
 TTTTATAAAG AATTCTGTGA GNAAAAATTT AATAAAGCAA CCAAATTACT CTAAAAAAA 2640
 AAAAAAAAAA AAAAACTCG AGGGGCCCCGT ACCAAT 2676

10

(2) 配列番号：6 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：604アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

20

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：6：

Met Asn Ile Val Glu Asn Ser Ile Phe Leu Ser Asn Leu Met Lys Ser

1 5 10 15

Ala Asn Thr Phe Glu Leu Lys Tyr Asp Leu Ser Cys Glu Leu Tyr Arg

20 25 30

Met Ser Thr Tyr Ser Thr Phe Pro Ala Gly Val Pro Val Ser Glu Arg

35 40 45

Ser Leu Ala Arg Ala Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Val Asn Asp Lys Val

50 55 60

Lys Cys Phe Cys Cys Gly Leu Met Leu Asp Asn Trp Lys Arg Gly Asp

65 70 75 80

Ser Pro Thr Glu Lys His Lys Lys Leu Tyr Pro Ser Cys Arg Phe Val

40

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

10

20

30

40

Tyr Leu Ile Arg Ile Lys Gly Gln Glu Phe Ile Arg Gln Val Gln Ala
 325 330 335
 Ser Tyr Pro His Leu Leu Glu Gln Leu Leu Ser Thr Ser Asp Ser Pro
 340 345 350
 Gly Asp Glu Asn Ala Glu Ser Ser Ile Ile His Leu Glu Pro Gly Glu
 355 360 365
 Asp His Ser Glu Asp Ala Ile Met Met Asn Thr Pro Val Ile Asn Ala
 370 375 380
 Ala Val Glu Met Gly Phe Ser Arg Ser Leu Val Lys Gln Thr Val Gln
 385 390 395 400
 Arg Lys Ile Leu Ala Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Leu Val Asn Asp Leu
 405 410 415
 Val Leu Asp Leu Leu Asn Ala Glu Asp Glu Ile Arg Glu Glu Glu Arg
 420 425 430
 Glu Arg Ala Thr Glu Glu Lys Glu Ser Asn Asp Leu Leu Leu Ile Arg
 435 440 445
 Lys Asn Arg Met Ala Leu Phe Gln His Leu Thr Cys Val Ile Pro Ile
 450 455 460
 Leu Asp Ser Leu Leu Thr Ala Gly Ile Ile Asn Glu Gln Glu His Asp
 465 470 475 480
 Val Ile Lys Gln Lys Thr Gln Thr Ser Leu Gln Ala Arg Glu Leu Ile
 485 490 495
 Asp Thr Ile Leu Val Lys Gly Asn Ile Ala Ala Thr Val Phe Arg Asn
 500 505 510
 Ser Leu Gln Glu Ala Glu Ala Val Leu Tyr Glu His Leu Phe Val Gln
 515 520 525
 Gln Asp Ile Lys Tyr Ile Pro Thr Glu Asp Val Ser Asp Leu Pro Val
 530 535 540
 Glu Glu Gln Leu Arg Arg Leu Pro Glu Glu Arg Thr Cys Lys Val Cys

10

20

30

40

545 550 555 560
 Met Asp Lys Glu Val Ser Ile Val Phe Ile Pro Cys Gly His Leu Val
 565 570 575
 Val Cys Lys Asp Cys Ala Pro Ser Leu Arg Lys Cys Pro Ile Cys Arg
 580 585 590
 Ser Thr Ile Lys Gly Thr Val Arg Thr Phe Leu Ser
 595 600

10

(2) 配列番号：7 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：2580塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：両形態

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：7：

TTAGGTTACC TGAAAGAGTT ACTACAACCC CAAAGAGTTG TGTTCCTAAGT AGTATCTTGG	60	20
TAATTCAGAG AGATACTCAT CCTACCTGAA TATAAACTGA GATAAATCCA GTAAAGAAAG	120	
TGTAGTAAAT TCTACATAAG AGTCTATCAT TGATTTCTTT TTGTGGTGGA AATCTTAGTT	180	
CATGTGAAGA AATTTTCATGT GAATGTTTTA GCTATCAAAC AGTACTGTCA CCTACTCATG	240	
CACAAAACCTG CCTCCCAAAG ACTTTTCCCA GGTCCCTCGT ATCAAAACAT TAAGAGTATA	300	
ATGGAAGATA GCACGATCTT GTCAGATTGG ACAAACAGCA ACAAACAAA AATGAAGTAT	360	
GACTTTTCCT GTGAACTCTA CAGAATGTCT ACATATTCAA CTTTCCCCGC CGGGGTGCCT	420	30
GTCTCAGAAA GGAGTCTTGC TCGTGCTGGT TTTTATTATA CTGGTGTGAA TGACAAGGTC	480	
AAATGCTTCT GTTGTGGCCT GATGCTGGAT AACTGGAAAC TAGGAGACAG TCCTATTCAA	540	
AAGCATAAAC AGCTATATCC TAGCTGTAGC TTTATTCAGA ATCTGGTTTC AGCTAGTCTG	600	
GGATCCACCT CTAAGAATAC GTCTCCAATG AGAAACAGTT TTGCACATTC ATTATCTCCC	660	
ACCTTGGAAC ATAGTAGCTT GTTCAGTGGT TCTTACTCCA GCCTTCCTCC AAACCCTCTT	720	
AATTCTAGAG CAGTTGAAGA CATCTCTTCA TCGAGGACTA ACCCCTACAG TTATGCAATG	780	40

AGTACTGAAG AAGCCAGATT TCTTACCTAC CATATGTGGC CATTAACTTT TTTGTCACCA	840	
TCAGAATTGG CAAGAGCTGG TTTTATTAT ATAGGACCTG GAGATAGGGT AGCCTGCTTT	900	
GCCTGTGGTG GGAAGCTCAG TAACTGGGAA CCAAAGGATG ATGCTATGTC AGAACACCGG	960	
AGGCATTTTC CCAACTGTCC ATTTTTGGAA AATTCTCTAG AACTCTGAG GTTTAGCATT	1020	
TCAAATCTGA GCATGCAGAC ACATGCAGCT CGAATGAGAA CATTTATGTA CTGGCCATCT	1080	
AGTGTTCCAG TTCAGCCTGA GCAGCTTGCA AGTGCTGGTT TTTATTATGT GGGTCGCAAT	1140	
GATGATGTCA AATGCTTTGG TTGTGATGGT GGCTTGAGGT GTTGGGAATC TGGAGATGAT	1200	10
CCATGGGTAG AACATGCCAA GTGGTTTCCA AGGTGTGAGT TCTTGATACG AATGAAAGGC	1260	
CAAGAGTTTG TTGATGAGAT TCAAGGTAGA TATCCTCATC TTCTTGAACA GCTGTTGTCA	1320	
ACTTCAGATA CCACTGGAGA AGAAAATGCT GACCCACCAA TTATTCATTT TGGACCTGGA	1380	
GAAAGTTCTT CAGAAGATGC TGTCATGATG AATACACCTG TGGTTAAATC TGCCTTGGA	1440	
ATGGGCTTTA ATAGAGACCT GGTGAAACAA ACAGTTCTAA GTAAAATCCT GACAACTGGA	1500	
GAGAACTATA AAACAGTTAA TGATATTGTG TCAGCACTTC TTAATGCTGA AGATGAAAA	1560	20
AGAGAAGAGG AGAAGGAAAA ACAAGCTGAA GAAATGGCAT CAGATGATTT GTCATTAATT	1620	
CGGAAGAACA GAATGGCTCT CTTTCAACAA TTGACATGTG TGCTTCCTAT CCTGGATAAT	1680	
CTTTTAAAGG CCAATGTAAT TAATAACAG GAACATGATA TTATTAAACA AAAACACAG	1740	
ATACCTTTAC AAGCGAGAGA ACTGATTGAT ACCATTTGGG TTAAAGGAAA TGCTGCGGCC	1800	
AACATCTTCA AAAACTGTCT AAAAGAAAT GACTCTACAT TGTATAAGAA CTTATTTGTG	1860	
GATAAGAATA TGAAGTATAT TCCAACAGAA GATGTTTCAG GTCTGTCACT GGAAGAACAA	1920	
TTGAGGAGGT TGCAAGAAGA ACGAACTTGT AAAGTGTGTA TGGACAAAGA AGTTTCTGTT	1980	30
GTATTTATTC CTTGTGGTCA TCTGGTAGTA TGCCAGGAAT GTGCCCCTTC TCTAAGAAAA	2040	
TGCCCTATTT GCAGGGGTAT AATCAAGGGT ACTGTTGTA CATTTCTCTC TTAAAGAAAA	2100	
ATAGTCTATA TTTTAACCTG CATAAAAAGG TCTTTAAAT ATTGTTGAAC ACTTGAAGCC	2160	
ATCTAAAGTA AAAAGGGAAT TATGAGTTTT TCAATTAGTA ACATTCATGT TCTAGTCTGC	2220	
TTTGGTACTA ATAATCTTGT TTCTGAAAAG ATGGTATCAT ATATTTAATC TTAATCTGTT	2280	
TATTTACAAG GGAAGATTTA TGTTTGGTGA ACTATATTAG TATGTATGTG TACCTAAGGG	2340	40
AGTAGCGTCN CTGCTTGTTA TGCATCATTT CAGGAGTTAC TGGATTTGTT GTTCTTTCAG	2400	
AAAGCTTTGA ANACTAAAT ATAGTGTAGA AAAGAACTGG AAACCAGGAA CTCTGGAGTT	2460	
CATCAGAGTT ATGGTGCCGA ATTGTCTTTG GTGCTTTTCA CTTGTGTTTT AAAATAAGGA	2520	
TTTTTCTCTT ATTTCTCCCC CTAGTTTGTG AGAAACATCT CAATAAAGTG CTTTAAAAAG	2580	

(2) 配列番号：8 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：618 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：8：

Met His Lys Thr Ala Ser Gln Arg Leu Phe Pro Gly Pro Ser Tyr Gln

1 5 10 15

Asn Ile Lys Ser Ile Met Glu Asp Ser Thr Ile Leu Ser Asp Trp Thr

20 25 30

Asn Ser Asn Lys Gln Lys Met Lys Tyr Asp Phe Ser Cys Glu Leu Tyr

35 40 45

Arg Met Ser Thr Tyr Ser Thr Phe Pro Ala Gly Val Pro Val Ser Glu

50 55 60

Arg Ser Leu Ala Arg Ala Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Val Asn Asp Lys

65 70 75 80

Val Lys Cys Phe Cys Cys Gly Leu Met Leu Asp Asn Trp Lys Leu Gly

85 90 95

Asp Ser Pro Ile Gln Lys His Lys Gln Leu Tyr Pro Ser Cys Ser Phe

100 105 110

Ile Gln Asn Leu Val Ser Ala Ser Leu Gly Ser Thr Ser Lys Asn Thr

115 120 125

Ser Pro Met Arg Asn Ser Phe Ala His Ser Leu Ser Pro Thr Leu Glu

130 135 140

His Ser Ser Leu Phe Ser Gly Ser Tyr Ser Ser Leu Pro Pro Asn Pro

10

20

30

145	150	155	160	
Leu Asn Ser Arg Ala Val Glu Asp Ile Ser Ser Ser Arg Thr Asn Pro				
	165	170	175	
Tyr Ser Tyr Ala Met Ser Thr Glu Glu Ala Arg Phe Leu Thr Tyr His				
	180	185	190	
Met Trp Pro Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ser Glu Leu Ala Arg Ala Gly				10
	195	200	205	
Phe Tyr Tyr Ile Gly Pro Gly Asp Arg Val Ala Cys Phe Ala Cys Gly				
	210	215	220	
Gly Lys Leu Ser Asn Trp Glu Pro Lys Asp Asp Ala Met Ser Glu His				
225	230	235	240	
Arg Arg His Phe Pro Asn Cys Pro Phe Leu Glu Asn Ser Leu Glu Thr				20
	245	250	255	
Leu Arg Phe Ser Ile Ser Asn Leu Ser Met Gln Thr His Ala Ala Arg				
	260	265	270	
Met Arg Thr Phe Met Tyr Trp Pro Ser Ser Val Pro Val Gln Pro Glu				
	275	280	285	
Gln Leu Ala Ser Ala Gly Phe Tyr Tyr Val Gly Arg Asn Asp Asp Val				30
	290	295	300	
Lys Cys Phe Gly Cys Asp Gly Gly Leu Arg Cys Trp Glu Ser Gly Asp				
305	310	315	320	
Asp Pro Trp Val Glu His Ala Lys Trp Phe Pro Arg Cys Glu Phe Leu				
	325	330	335	
Ile Arg Met Lys Gly Gln Glu Phe Val Asp Glu Ile Gln Gly Arg Tyr				
	340	345	350	40
Pro His Leu Leu Glu Gln Leu Leu Ser Thr Ser Asp Thr Thr Gly Glu				
	355	360	365	
Glu Asn Ala Asp Pro Pro Ile Ile His Phe Gly Pro Gly Glu Ser Ser				
	370	375	380	

Ser Glu Asp Ala Val Met Met Asn Thr Pro Val Val Lys Ser Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Met Gly Phe Asn Arg Asp Leu Val Lys Gln Thr Val Leu Ser Lys
 405 410 415
 Ile Leu Thr Thr Gly Glu Asn Tyr Lys Thr Val Asn Asp Ile Val Ser
 420 425 430
 Ala Leu Leu Asn Ala Glu Asp Glu Lys Arg Glu Glu Glu Lys Glu Lys
 435 440 445
 Gln Ala Glu Glu Met Ala Ser Asp Asp Leu Ser Leu Ile Arg Lys Asn
 450 455 460
 Arg Met Ala Leu Phe Gln Gln Leu Thr Cys Val Leu Pro Ile Leu Asp
 465 470 475 480
 Asn Leu Leu Lys Ala Asn Val Ile Asn Lys Gln Glu His Asp Ile Ile
 485 490 495
 Lys Gln Lys Thr Gln Ile Pro Leu Gln Ala Arg Glu Leu Ile Asp Thr
 500 505 510
 Ile Trp Val Lys Gly Asn Ala Ala Ala Asn Ile Phe Lys Asn Cys Leu
 515 520 525
 Lys Glu Ile Asp Ser Thr Leu Tyr Lys Asn Leu Phe Val Asp Lys Asn
 530 535 540
 Met Lys Tyr Ile Pro Thr Glu Asp Val Ser Gly Leu Ser Leu Glu Glu
 545 550 555 560
 Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu Arg Thr Cys Lys Val Cys Met Asp
 565 570 575
 Lys Glu Val Ser Val Val Phe Ile Pro Cys Gly His Leu Val Val Cys
 580 585 590
 Gln Glu Cys Ala Pro Ser Leu Arg Lys Cys Pro Ile Cys Arg Gly Ile
 595 600 605
 Ile Lys Gly Thr Val Arg Thr Phe Leu Ser
 610 615

(2) 配列番号：9 の情報：

(i) 配列の特性：

10

20

30

40

50

(A) 配列の長さ：2100塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：両形態

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：9：

GACACTCTGC TGGGCGGCGG GCCGCCCTCC TCCGGGACCT CCCCTCGGGA ACCGTCGCCC	60	
GCGGCGCTTA GTTAGGACTG GAGTGCTTGG CGCGAAAAGG TGGACAAGTC CTATTTTCCA	120	
GAGAAGATGA CTTTAAACAG TTTTGAAGGA ACTAGAACTT TTGTACTTGC AGACACCAAT	180	10
AAGGATGAAG AATTTGTAGA AGAGTTTAAT AGATTAAAAA CATTGCTAA CTTCCCAAGT	240	
AGTAGTCCTG TTTCAGCATC AACATTGGCG CGAGCTGGGT TTCTTTATAC CGGTGAAGGA	300	
GACACCGTGC AATGTTTCAG TTGTCATGCG GCAATAGATA GATGGCAGTA TGGAGACTCA	360	
GCTGTTGGAA GACACAGGAG AATATCCCCA AATTGCAGAT TTATCAATGG TTTTTATTTT	420	
GAAAATGGTG CTGCACAGTC TACAAATCCT GGTATCCAAA ATGGCCAGTA CAAATCTGAA	480	
AACTGTGTGG GAAATAGAAA TCCTTTTGCC CCTGACAGGC CACCTGAGAC TCATGCTGAT	540	20
TATCTCTTGA GAACTGGACA GGTGTAGAT ATTTGAGACA CCATATACCC GAGGAACCCT	600	
GCCATGTGTA GTGAAGAAGC CAGATTGAAG TCATTTGAGA ACTGGCCGGA CTATGCTCAT	660	
TTAACCCCCA GAGAGTTAGC TAGTGCTGGC CTCTACTACA CAGGGGCTGA TGATCAAGTG	720	
CAATGCTTTT GTTGTGGGGG AAAACTGAAA AATTGGGAAC CCTGTGATCG TGCCTGGTCA	780	
GAACACAGGA GACACTTTCC CAATTGCTTT TTTGTTTTGG GCCGGAACGT TAATGTTTCA	840	
AGTGAATCTG GTGTGAGTTC TGATAGGAAT TTCCCAAATT CAACAACTC TCCAAGAAAT	900	
CCAGCCATGG CAGAATATGA AGCACGGATC GTTACTTTTG GAACATGGAT ATACTCAGTT	960	30
AACAAGGAGC AGCTTGCAAG AGCTGGATTT TATGCTTTAG GTGAAGGCGA TAAAGTGAAG	1020	
TGCTTCCACT GTGGAGGAGG GCTCACGGAT TGGAAGCCAA GTGAAGACCC CTGGGACCAG	1080	
CATGCTAAGT GCTACCCAGG GTGCAAATAC CTATTGGATG AGAAGGGGCA AGAATATATA	1140	

AATAATATTC ATTTAACCCA TCCACTTGAG GAATCTTTGG GAAGAACTGC TGAAAAAACA	1200
CCACCGCTAA CTAAAAAAAT CGATGATACC ATCTTCCAGA ATCCTATGGT GCAAGAAGCT	1260
ATACGAATGG GATTTAGCTT CAAGGACCTT AAGAAAAACA TGGAAGAAAA AATCCAAACA	1320
TCCGGGAGCA GCTATCTATC ACTTGAGGTC CTGATTGCAG ATCTTGTGAG TGCTCAGAAA	1380
GATAATACGG AGGATGAGTC AAGTCAAAC TCAATTGCAGA AAGACATTAG TACTGAAGAG	1440
CAGCTAAGGC GCCTACAAGA GGAGAAGCTT TCCAAAATCT GTATGGATAG AAATATTGCT	1500
ATCGTTTTTTT TTCCTTGTGG ACATCTGGCC ACTTGTAAC AGTGTGCAGA AGCAGTTGAC	1560
AAATGTCCCA TGTGCTACAC CGTCATTACG TTCAACCAAA AAATTTTAT GTCTTAGTGG	1620
GGCACCACAT GTTATGTTCT TCTTGCTCTA ATTGAATGTG TAATGGGAGC GAACTTTAAG	1680
TAATCCTGCA TTTGCATTCC ATTAGCATCC TGCTGTTTCC AAATGGAGAC CAATGCTAAC	1740
AGCACTGTTT CCGTCTAAAC ATTCAATTC TGGATCTTC GAGTTATCAG CTGTATCATT	1800
TAGCCAGTGT TTTACTCGAT TGAAACCTTA GACAGAGAAG CATTTTATAG CTTTTCACAT	1860
GTATATTGGT AGTACACTGA CTTGATTTCT ATATGTAAGT GAATTCATCA CCTGCATGTT	1920
TCATGCCTTT TGCATAAGCT TAACAAATGG AGTGTTCTGT ATAAGCATGG AGATGTGATG	1980
GAATCTGCCC AATGACTTTA ATTGGCTTAT TGTAACACG GAAAGAACTG CCCCACGCTG	2040
CTGGGAGGAT AAAGATTGTT TTAGATGCTC ACTTCTGTGT TTTAGGATTC TGCCCATTTA	2100

10

20

(2) 配列番号：10の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：496アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：10：

30

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

260	265	270	
Thr Trp Ile Tyr Ser Val Asn Lys Glu Gln Leu Ala Arg Ala Gly Phe			
275	280	285	
Tyr Ala Leu Gly Glu Gly Asp Lys Val Lys Cys Phe His Cys Gly Gly			
290	295	300	
Gly Leu Thr Asp Trp Lys Pro Ser Glu Asp Pro Trp Asp Gln His Ala			
305	310	315	320
Lys Cys Tyr Pro Gly Cys Lys Tyr Leu Leu Asp Glu Lys Gly Gln Glu			
325	330	335	
Tyr Ile Asn Asn Ile His Leu Thr His Pro Leu Glu Glu Ser Leu Gly			
340	345	350	
Arg Thr Ala Glu Lys Thr Pro Pro Leu Thr Lys Lys Ile Asp Asp Thr			
355	360	365	
Ile Phe Gln Asn Pro Met Val Gln Glu Ala Ile Arg Met Gly Phe Ser			
370	375	380	
Phe Lys Asp Leu Lys Lys Thr Met Glu Glu Lys Ile Gln Thr Ser Gly			
385	390	395	400
Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Glu Val Leu Ile Ala Asp Leu Val Ser Ala			
405	410	415	
Gln Lys Asp Asn Thr Glu Asp Glu Ser Ser Gln Thr Ser Leu Gln Lys			
420	425	430	
Asp Ile Ser Thr Glu Glu Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu Lys Leu			
435	440	445	
Ser Lys Ile Cys Met Asp Arg Asn Ile Ala Ile Val Phe Phe Pro Cys			
450	455	460	
Gly His Leu Ala Thr Cys Lys Gln Cys Ala Glu Ala Val Asp Lys Cys			
465	470	475	480
Pro Met Cys Tyr Thr Val Ile Thr Phe Asn Gln Lys Ile Phe Met Ser			
485	490	495	

(2) 配列番号：11の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：67アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

10

20

30

40

50

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：1 1：

Lys Ala Ala Arg Leu Gly Thr Tyr Thr Asn Trp Pro Val Gln Phe Leu

1 5 10 15

Glu Pro Ser Arg Met Ala Ala Ser Gly Phe Tyr Tyr Leu Gly Arg Gly

20 25 30

Asp Glu Val Arg Cys Ala Phe Cys Lys Val Glu Ile Thr Asn Trp Val

35 40 45

Arg Gly Asp Asp Pro Glu Thr Asp His Lys Arg Trp Ala Pro Gln Cys

50 55 60

Pro Phe Val

65

(2) 配列番号：1 2 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：275アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：1 2：

10

20

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

Val Pro Cys Gly His Val Val Ala Cys Ala Lys Cys Ala Leu Ser Val
 245 250 255
 Asp Lys Cys Pro Met Cys Arg Lys Ile Val Thr Ser Val Leu Lys Val
 260 265 270

Tyr Phe Ser

275

(2) 配列番号：1 3 の情報：

10

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：498アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：1 3：

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

20

30

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

10

20

30

40

340	345	350	
Leu Asp Glu Leu Leu His Asp Ile Phe Asp Asp Ala Gly Ala Gly Ala			
355	360	365	
Ala Leu Glu Val Arg Glu Pro Pro Glu Pro Ser Ala Pro Phe Ile Glu			
370	375	380	
Pro Cys Gln Ala Thr Thr Ser Lys Ala Ala Ser Val Pro Ile Pro Val			10
385	390	395	400
Ala Asp Ser Ile Pro Ala Lys Pro Gln Ala Ala Glu Ala Val Ser Asn			
405	410	415	
Ile Ser Lys Ile Thr Asp Glu Ile Gln Lys Met Ser Val Ser Thr Pro			
420	425	430	
Asn Gly Asn Leu Ser Leu Glu Glu Glu Asn Arg Gln Leu Lys Asp Ala			20
435	440	445	
Arg Leu Cys Lys Val Cys Leu Asp Glu Glu Val Gly Val Val Phe Leu			
450	455	460	
Pro Cys Gly His Leu Ala Thr Cys Asn Gln Cys Ala Pro Ser Val Ala			
465	470	475	480
Asn Cys Pro Met Cys Arg Ala Asp Ile Lys Gly Phe Val Arg Thr Phe			
485	490	495	30

Leu Ser

(2) 配列番号：14の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：67アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

Glu Glu Val Arg Leu Asn Thr Phe Glu Lys Trp Pro Val Ser Phe Leu

1 5 10 15

Ser Pro Glu Thr Met Ala Lys Asn Gly Phe Tyr Tyr Leu Gly Arg Ser

20 25 30

Asp Glu Val Arg Cys Ala Phe Cys Lys Val Glu Ile Met Arg Trp Lys

35 40 45

10

Glu Gly Glu Asp Pro Ala Ala Asp His Lys Lys Trp Ala Pro Gln Cys

50 55 60

Pro Phe Val

65

(2) 配列番号：1 5 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：67アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

20

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：1 5：

Glu Ala Asn Arg Leu Val Thr Phe Lys Asp Trp Pro Asn Pro Asn Ile

1 5 10 15

Thr Pro Gln Ala Leu Ala Lys Ala Gly Phe Tyr Tyr Leu Asn Arg Leu

20 25 30

30

Asp His Val Lys Cys Val Trp Cys Asn Gly Val Ile Ala Lys Trp Glu

35 40 45

Lys Asn Asp Asn Ala Phe Glu Glu His Lys Arg Phe Phe Pro Gln Cys

50 55 60

Pro Arg Val

65

40

(2) 配列番号：1 6 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：68アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：1 6：

Glu Phe Asn Arg Leu Lys Thr Phe Ala Asn Phe Pro Ser Ser Ser Pro
 1 5 10 15
 Val Ser Ala Ser Thr Leu Ala Arg Ala Gly Phe Leu Tyr Thr Gly Glu
 20 25 30
 Gly Asp Thr Val Gln Cys Phe Ser Cys His Ala Ala Ile Asp Arg Trp
 35 40 45
 Gln Tyr Gly Asp Ser Ala Val Gly Arg His Arg Arg Ile Ser Pro Asn
 50 55 60

10

Cys Arg Phe Ile

65

(2) 配列番号：17の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：68アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：17：

Glu Phe Asn Arg Leu Lys Thr Phe Ala Asn Phe Pro Ser Gly Ser Pro
 1 5 10 15
 Val Ser Ala Ser Thr Leu Ala Arg Ala Gly Phe Leu Tyr Thr Gly Glu
 20 25 30
 Gly Asp Thr Val Arg Cys Phe Ser Cys His Ala Ala Val Asp Arg Trp
 35 40 45
 Gln Tyr Gly Asp Ser Ala Val Gly Arg His Arg Lys Val Ser Pro Asn
 50 55 60

20

30

Cys Arg Phe Ile

65

(2) 配列番号：18の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：68アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：18：

40

Glu Leu Tyr Arg Met Ser Thr Tyr Ser Thr Phe Pro Ala Gly Val Pro
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Arg Ser Leu Ala Arg Ala Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Val
 20 25 30
 Asn Asp Lys Val Lys Cys Phe Cys Cys Gly Leu Met Leu Asp Asn Trp
 35 40 45
 Lys Arg Gly Asp Ser Pro Thr Glu Lys His Lys Lys Leu Tyr Pro Ser
 50 55 60
 Cys Arg Phe Val

65

(2) 配列番号：19の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：68アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：19：

Glu Leu Tyr Arg Met Ser Thr Tyr Ser Thr Phe Pro Ala Gly Val Pro
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Arg Ser Leu Ala Arg Ala Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Val
 20 25 30
 Asn Asp Lys Val Lys Cys Phe Cys Cys Gly Leu Met Leu Asp Asn Trp
 35 40 45
 Lys Leu Gly Asp Ser Pro Ile Gln Lys His Lys Gln Leu Tyr Pro Ser
 50 55 60
 Cys Ser Phe Ile

65

(2) 配列番号：20の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：68アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：20：

Glu Glu Ala Arg Leu Lys Ser Phe Gln Asn Trp Pro Asp Tyr Ala His
 1 5 10 15
 Leu Thr Pro Arg Glu Leu Ala Ser Ala Gly Leu Tyr Tyr Thr Gly Ala
 20 25 30
 Asp Asp Gln Val Gln Cys Phe Cys Cys Gly Gly Lys Leu Lys Asn Trp
 35 40 45
 Glu Pro Cys Asp Arg Ala Trp Ser Glu His Arg Arg His Phe Pro Asn
 50 55 60
 Cys Phe Phe Val

65

(2) 配列番号：21の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：68アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：21：

Glu Glu Ala Arg Leu Lys Ser Phe Gln Asn Trp Pro Asp Tyr Ala His
 1 5 10 15
 Leu Thr Pro Arg Glu Leu Ala Ser Ala Gly Leu Tyr Tyr Thr Gly Ile
 20 25 30
 Gly Asp Gln Val Gln Cys Phe Cys Cys Gly Gly Lys Leu Lys Asn Trp
 35 40 45
 Glu Pro Cys Asp Arg Ala Trp Ser Glu His Arg Arg His Phe Pro Asn
 50 55 60
 Cys Phe Phe Val

65

(2) 配列番号：22の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：67アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：22：

Glu Asn Ala Arg Leu Leu Thr Phe Gln Thr Trp Pro Leu Thr Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Pro Thr Asp Leu Ala Arg Ala Gly Phe Tyr Tyr Ile Gly Pro Gly
 20 25 30
 Asp Arg Val Ala Cys Phe Ala Cys Gly Gly Lys Leu Ser Asn Trp Glu
 35 40 45
 Pro Lys Asp Asn Ala Met Ser Glu His Leu Arg His Phe Pro Lys Cys
 50 55 60

Pro Phe Ile

65

(2) 配列番号：2 3 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：67アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：2 3：

Glu Glu Ala Arg Phe Leu Thr Tyr His Met Trp Pro Leu Thr Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Pro Ser Glu Leu Ala Arg Ala Gly Phe Tyr Tyr Ile Gly Pro Gly
 20 25 30
 Asp Arg Val Ala Cys Phe Ala Cys Gly Gly Lys Leu Ser Asn Trp Glu
 35 40 45
 Pro Lys Asp Asp Ala Met Ser Glu His Arg Arg His Phe Pro Asn Cys
 50 55 60

Pro Phe Leu

65

(2) 配列番号：2 4 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：66アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：2 4：

10

20

30

40

Tyr Glu Ala Arg Ile Val Thr Phe Gly Thr Trp Ile Tyr Ser Val Asn
 1 5 10 15
 Lys Glu Gln Leu Ala Arg Ala Gly Phe Tyr Ala Leu Gly Glu Gly Asp
 20 25 30
 Lys Val Lys Cys Phe His Cys Gly Gly Gly Leu Thr Asp Trp Lys Pro
 35 40 45
 Ser Glu Asp Pro Trp Asp Gln His Ala Lys Cys Tyr Pro Gly Cys Lys
 50 55 60

10

Tyr Leu

65

(2) 配列番号：25の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：66アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：25：

Tyr Glu Ala Arg Ile Phe Thr Phe Gly Thr Trp Ile Tyr Ser Val Asn
 1 5 10 15
 Lys Glu Gln Leu Ala Arg Ala Gly Phe Tyr Ala Leu Gly Glu Gly Asp
 20 25 30
 Lys Val Lys Cys Phe His Cys Gly Gly Gly Leu Thr Asp Trp Lys Pro
 35 40 45
 Ser Glu Asp Pro Trp Glu Gln His Ala Lys Trp Tyr Pro Gly Cys Lys
 50 55 60

20

30

Tyr Leu

65

(2) 配列番号：26の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：68アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：26：

40

His Ala Ala Arg Phe Lys Thr Phe Phe Asn Trp Pro Ser Ser Val Leu
 1 5 10 15
 Val Asn Pro Glu Gln Leu Ala Ser Ala Gly Phe Tyr Tyr Val Gly Asn
 20 25 30
 Ser Asp Asp Val Lys Cys Phe Cys Cys Asp Gly Gly Leu Arg Cys Trp
 35 40 45
 Glu Ser Gly Asp Asp Pro Trp Val Gln His Ala Lys Trp Phe Pro Arg
 50 55 60
 Cys Glu Tyr Leu

10

65

(2) 配列番号：27の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：68アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：27：

20

His Ala Ala Arg Met Arg Thr Phe Met Tyr Trp Pro Ser Ser Val Pro
 1 5 10 15
 Val Gln Pro Glu Gln Leu Ala Ser Ala Gly Phe Tyr Tyr Val Gly Arg
 20 25 30
 Asn Asp Asp Val Lys Cys Phe Gly Cys Asp Gly Gly Leu Arg Cys Trp
 35 40 45
 Glu Ser Gly Asp Asp Pro Trp Val Glu His Ala Lys Trp Phe Pro Arg
 50 55 60

30

Cys Glu Phe Leu

65

(2) 配列番号：28の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：68アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：28：

40

Glu Ala Ala Arg Leu Arg Thr Phe Ala Glu Trp Pro Arg Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 Gln Arg Pro Glu Glu Leu Ala Glu Ala Gly Phe Phe Tyr Thr Gly Gln
 20 25 30
 Gly Asp Lys Thr Arg Cys Phe Cys Cys Asp Gly Gly Leu Lys Asp Trp
 35 40 45
 Glu Pro Asp Asp Ala Pro Trp Gln Gln His Ala Arg Trp Tyr Asp Arg
 50 55 60
 Cys Glu Tyr Val

10

65

(2) 配列番号：29の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：68アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：29：

Glu Ala Ala Arg Val Lys Ser Phe His Asn Trp Pro Arg Cys Met Lys

1 5 10 15
 Gln Arg Pro Glu Gln Met Ala Asp Ala Gly Phe Phe Tyr Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Asp Asn Thr Lys Cys Phe Tyr Cys Asp Gly Gly Leu Lys Asp Trp
 35 40 45
 Glu Pro Glu Asp Val Pro Trp Glu Gln His Val Arg Trp Phe Asp Arg
 50 55 60

20

30

Cys Ala Tyr Val

65

(2) 配列番号：30の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：68アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：30：

40

Val Asp Ala Arg Leu Arg Thr Phe Thr Asp Trp Pro Ile Ser Asn Ile
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ala Leu Ala Gln Ala Gly Leu Tyr Tyr Gln Lys Ile
 20 25 30
 Gly Asp Gln Val Arg Cys Phe His Cys Asn Ile Gly Leu Arg Ser Trp
 35 40 45
 Gln Lys Glu Asp Glu Pro Trp Phe Glu His Ala Lys Trp Ser Pro Lys
 50 55 60
 Cys Gln Phe Val

10

65

(2) 配列番号：3 1 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：66アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：3 1：

Glu Ser Val Arg Leu Ala Thr Phe Gly Glu Trp Pro Leu Asn Ala Pro
 1 5 10 15
 Val Ser Ala Glu Asp Leu Val Ala Asn Gly Phe Phe Gly Thr Trp Met
 20 25 30
 Glu Ala Glu Cys Asp Phe Cys His Val Arg Ile Asp Arg Trp Glu Tyr
 35 40 45
 Gly Asp Leu Val Ala Glu Arg His Arg Arg Ser Ser Pro Ile Cys Ser
 50 55 60

20

30

Met Val

65

(2) 配列番号：3 2 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：46アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：3 2：

40

Glu Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu Arg Thr Cys Lys Val Cys Met
 1 5 10 15
 Asp Lys Glu Val Ser Val Val Phe Ile Pro Cys Gly His Leu Val Val
 20 25 30
 Cys Gln Glu Cys Ala Pro Ser Leu Arg Lys Cys Pro Ile Cys
 35 40 45

(2) 配列番号：3 3 の情報：

10

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：46アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：3 3：

Glu Gln Leu Arg Arg Leu Pro Glu Glu Arg Thr Cys Lys Val Cys Met
 1 5 10 15
 Asp Lys Glu Val Ser Ile Val Phe Ile Pro Cys Gly His Leu Val Val
 20 25 30
 Cys Lys Asp Cys Ala Pro Ser Leu Arg Lys Cys Pro Ile Cys
 35 40 45

(2) 配列番号：3 4 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：46アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：3 4：

Glu Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu Lys Leu Ser Lys Ile Cys Met
 1 5 10 15
 Asp Arg Asn Ile Ala Ile Val Phe Phe Pro Cys Gly His Leu Ala Thr
 20 25 30
 Cys Lys Gln Cys Ala Glu Ala Val Asp Lys Cys Pro Met Cys
 35 40 45

(2) 配列番号：3 5 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：46アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

20

30

40

50

(xi) 配列の記載：配列番号：35：

Glu Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu Lys Leu Cys Lys Ile Cys Met

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Lys Gln Cys Ala Glu Ala Val Asp Lys Cys Pro Met Cys

35 40 45

10

(2) 配列番号：36の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：46アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：36：

Glu Glu Asn Arg Gln Leu Lys Asp Ala Arg Leu Cys Lys Val Cys Leu

1 5 10 15

20

Asp Glu Glu Val Gly Val Val Phe Leu Pro Cys Gly His Leu Ala Thr

20 25 30

Cys Asn Gln Cys Ala Pro Ser Val Ala Asn Cys Pro Met Cys

35 40 45

(2) 配列番号：37の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：46アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：37：

Glu Lys Glu Pro Gln Val Glu Asp Ser Lys Leu Cys Lys Ile Cys Tyr

1 5 10 15

Val Glu Glu Cys Ile Val Cys Phe Val Pro Cys Gly His Val Val Ala

20 25 30

40

Cys Ala Lys Cys Ala Leu Ser Val Asp Lys Cys Pro Met Cys

35 40 45

(2) 配列番号：38の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：46アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

50

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：38：

Ala Val Glu Ala Glu Val Ala Asp Asp Arg Leu Cys Lys Ile Cys Leu

1

5

10

15

Gly Ala Glu Lys Thr Val Cys Phe Val Pro Cys Gly His Val Val Ala

20

25

30

Cys Gly Lys Cys Ala Ala Gly Val Thr Thr Cys Pro Val Cys

35

40

45

10

(2) 配列番号：39の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：2474塩基対

(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：DNA (genomic)

20

(xi) 配列の記載：配列番号：39：

GAATTCGGG AGACCTACAC CCCC GGAGAT CAGAGGTCAT TGCTGGCGTT CAGAGCCTAG 60

GAAGTGGGCT GCGGTATCAG CCTAGCAGTA AAACCGACCA GAAGCCATGC AAAAACTAC 120

ATCCCCAGAG AAAGACTTGT CCCTTCCCCT CCCTGTCATC TCACCATGAA CATGGTTCAA 180

GACAGCGCCT TTCTAGCCAA GCTGATGAAG AGTGCTGACA CCTTTGAGTT GAAGTATGAC 240

TTTTCCTGTG AGCTGTACCG ATTGTCCACG TATTCAGCTT TTCCCAGGGG AGTTCCTGTG 300

TCAGAAAGGA GTCTGGCTCG TGCTGGCTTT TACTACACTG GTGCCAATGA CAAGGTCAAG 360 30

TGCTTCTGCT GTGGCCTGAT GCTAGACAAC TGGAAACAAG GGGACAGTCC CATGGAGAAG 420

CACAGAAAGT TGTACCCCAG CTGCAACTTT GTACAGACTT TGAATCCAGC CAACAGTCTG 480

GAAGCTAGTC CTCGGCCTTC TCTTCCTTCC ACGGCGATGA GCACCATGCC TTTGAGCTTT 540

GCAAGTTCTG AGAATACTGG CTATTTCACT GGCTCTTACT CGAGCTTTCC CTCAGACCCT 600

GTGAACTTCC GAGCAAATCA AGATTGTCCT GCTTTGAGCA CAAGTCCCTA CCACTTTGCA 660

ATGAACACAG AGAAGGCCAG ATTACTCACC TATGAAACAT GGCCATTGTC TTTTCTGTCA 720 40

CCAGCAAAGC TGGCCAAAGC AGGCTTCTAC TACATAGGAC CTGGAGATAG AGTGGCCTGC 780

TTTGCGTGCG ATGGGAAACT GAGCAACTGG GAACGTAAGG ATGATGCTAT GTCAGAGCAC 840

CAGAGGCATT TCCCCAGCTG TCCGTTCTTA AAAGACTTGG GTCAGTCTGC TTCGAGATAC 900

ACTGTCTCTA ACCTGAGCAT GCAGACACAC GCAGCCCGTA TTAGAACATT CTCTAACTGG 960

CCTTCTAGTG CACTAGTTCA TTCCCAGGAA CTTGCAAGTG CGGGCTTTTA TTATACAGGA 1020

CACAGTGATG ATGTCAAGTG TTTATGCTGT GATGGTGGGC TGAGGTGCTG GGAATCTGGA 1080

50

GATGACCCCT GGGTGAACA TGCCAAGTGG TTTCCAAGGT GTGAGTACTT GCTCAGAATC	1140
AAAGGCCAAG AATTTGTCAG CCAAGTTCAA GCTGGCTATC CTCATCTACT TGAGCAGCTA	1200
TTATCTACGT CAGACTCCCC AGAAGATGAG AATGCAGACG CAGCAATCGT GCATTTTGGC	1260
CCTGGAGAAA GTTCGGAAGA TGTCGTCATG ATGAGCACGC CTGTGGTTAA AGCAGCCTTG	1320
GAAATGGGCT TCAGTAGGAG CCTGGTGAGA CAGACGGTTC AGTGGCAGAT CCTGGCCACT	1380
GGTGAGAACT ACAGGACCGT CAGTGACCTC GTTATAGGCT TACTCGATGC AGAAGACGAG	1440
ATGAGAGAGG AGCAGATGGA GCAGGCGGCC GAGGAGGAGG AGTCAGATGA TCTAGCACTA	1500
ATCCGGAAGA ACAAATGGT GCTTTTCCAA CATTTGACGT GTGTGACACC AATGCTGTAT	1560
TGCCTCCTAA GTGCAAGGGC CATCACTGAA CAGGAGTGCA ATGCTGTGAA ACAGAAACCA	1620
CACACCTTAC AAGCAAGCAC ACTGATTGAT ACTGTGTTAG CAAAAGGAAA CACTGCAGCA	1680
ACCTCATTCA GAAACTCCCT TCGGGAAATT GACCCTGCGT TATACAGAGA TATATTTGTG	1740
CAACAGGACA TTAGGAGTCT TCCCACAGAT GACATTGCAG CTCTACCAAT GGAAGAACAG	1800
TTGCGGCCCC TCCCGGAGGA CAGAATGTGT AAAGTGTGTA TGGACCGAGA GGTATCCATC	1860
GTGTTTCATTC CCTGTGGCCA TCTGGTCGTG TGCAAAGACT GCGCTCCCTC TCTGAGGAAG	1920
TGTCCCATCT GTAGAGGGAC CATCAAGGGC ACAGTGCGCA CATTTCTCTC CTGAACAAGA	1980
CTAATGGTCC ATGGCTGCAA CTTCAGCCAG GAGGAAGTTC ACTGTCACTC CCAGTTCCAT	2040
TCGGAAC TTG AGGCCAGCCT GGATAGCACG AGACACCGCC AAACACACAA ATATAACAT	2100
GAAAACTTT TGTCTGAAGT CAAGAATGAA TGAATTACTT ATATAATAAT TTTAATTGGT	2160
TTCCTTAAAA GTGCTATTTG TTCCCAACTC AGAAAATTGT TTTCTGTAAA CATATTTACA	2220
TACTACCTGC ATCTAAAGTA TTCATATATT CATATATTCA GATGTCATGA GAGAGGGTTT	2280
TGTTCTTGTT CCTGAAAAGC TGGTTTATCA TCTGATCAGC ATATACTGCG CAACGGGCAG	2340
GGCTAGAATC CATGAACCAA GCTGCAAAGA TCTCACGCTA AATAAGGCGG AAAGATTTGG	2400
AGAAACGAAA GGAAATTCTT TCCTGTCCAA TGTATACTCT TCAGACTAAT GACCTCTTCC	2460
TATCAAGCCT TCTA	2474

10

20

30

(2) 配列番号：40の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：602アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：40：

40

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

195	200	205
Asp Gly Lys Leu Ser Asn Trp Glu Arg Lys Asp Asp Ala Met Ser Glu		
210	215	220
His Gln Arg His Phe Pro Ser Cys Pro Phe Leu Lys Asp Leu Gly Gln		
225	230	235
Ser Ala Ser Arg Tyr Thr Val Ser Asn Leu Ser Met Gln Thr His Ala		
245	250	255
Ala Arg Ile Arg Thr Phe Ser Asn Trp Pro Ser Ser Ala Leu Val His		
260	265	270
Ser Gln Glu Leu Ala Ser Ala Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly His Ser Asp		
275	280	285
Asp Val Lys Cys Leu Cys Cys Asp Gly Gly Leu Arg Cys Trp Glu Ser		
290	295	300
Gly Asp Asp Pro Trp Val Glu His Ala Lys Trp Phe Pro Arg Cys Glu		
305	310	315
Tyr Leu Leu Arg Ile Lys Gly Gln Glu Phe Val Ser Gln Val Gln Ala		
325	330	335
Gly Tyr Pro His Leu Leu Glu Gln Leu Leu Ser Thr Ser Asp Ser Pro		
340	345	350
Glu Asp Glu Asn Ala Asp Ala Ala Ile Val His Phe Gly Pro Gly Glu		
355	360	365
Ser Ser Glu Asp Val Val Met Met Ser Thr Pro Val Val Lys Ala Ala		
370	375	380
Leu Glu Met Gly Phe Ser Arg Ser Leu Val Arg Gln Thr Val Gln Trp		
385	390	395
Gln Ile Leu Ala Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Thr Val Ser Asp Leu Val		
405	410	415
Ile Gly Leu Leu Asp Ala Glu Asp Glu Met Arg Glu Glu Gln Met Glu		
420	425	430

10

20

30

40

Gln Ala Ala Glu Glu Glu Glu Ser Asp Asp Leu Ala Leu Ile Arg Lys
 435 440 445
 Asn Lys Met Val Leu Phe Gln His Leu Thr Cys Val Thr Pro Met Leu
 450 455 460
 Tyr Cys Leu Leu Ser Ala Arg Ala Ile Thr Glu Gln Glu Cys Asn Ala
 465 470 475 480
 Val Lys Gln Lys Pro His Thr Leu Gln Ala Ser Thr Leu Ile Asp Thr
 485 490 495
 Val Leu Ala Lys Gly Asn Thr Ala Ala Thr Ser Phe Arg Asn Ser Leu
 500 505 510
 Arg Glu Ile Asp Pro Ala Leu Tyr Arg Asp Ile Phe Val Gln Gln Asp
 515 520 525
 Ile Arg Ser Leu Pro Thr Asp Asp Ile Ala Ala Leu Pro Met Glu Glu
 530 535 540
 Gln Leu Arg Pro Leu Pro Glu Asp Arg Met Cys Lys Val Cys Met Asp
 545 550 555 560
 Arg Glu Val Ser Ile Val Phe Ile Pro Cys Gly His Leu Val Val Cys
 565 570 575
 Lys Asp Cys Ala Pro Ser Leu Arg Lys Cys Pro Ile Cys Arg Gly Thr
 580 585 590
 Ile Lys Gly Thr Val Arg Thr Phe Leu Ser
 595 600

10

20

30

(2) 配列番号：41の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：2416塩基対

(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：DNA (genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：41：

40

CTGTGGTGGG	GATCTATTGT	CCAAGTGGTG	AGAAACTTCA	TCTGGAAGTT	TAAGCGGTCA	60	
GAAATACTAT	TACTACTCAT	GGACAAAAC	GTCTCCCAGA	GACTCGCCCA	AGGTACCTTA	120	
CACCCAAAAA	CTTAAACGTA	TAATGGAGAA	GAGCACAATC	TTGTCAAATT	GGACAAAGGA	180	
GAGCGAAGAA	AAAATGAAGT	TTGACTTTTC	GTGTGAACTC	TACCGAATGT	CTACATATTC	240	
AGCTTTTCCC	AGGGGAGTTC	CTGTCTCAGA	GAGGAGTCTG	GCTCGTGCTG	GCTTTTATTA	300	
TACAGGTGTG	AATGACAAAG	TCAAGTGCTT	CTGCTGTGGC	CTGATGTTGG	ATAACTGGAA	360	
ACAAGGGGAC	AGTCCTGTTG	AAAAGCACAG	ACAGTTCTAT	CCCAGCTGCA	GCTTTGTACA	420	10
GACTCTGCTT	TCAGCCAGTC	TGCAGTCTCC	ATCTAAGAAT	ATGTCTCCTG	TGAAAAGTAG	480	
ATTTGCACAT	TCGTCACCTC	TGGAACGAGG	TGGCATTAC	TCCAACCTGT	GCTCTAGCCC	540	
TCTTAATTCT	AGAGCAGTGG	AAGACTTCTC	ATCAAGGATG	GATCCCTGCA	GCTATGCCAT	600	
GAGTACAGAA	GAGGCCAGAT	TTCTTACTTA	CAGTATGTGG	CCTTTAAGTT	TTCTGTCACC	660	
AGCAGAGCTG	GCCAGAGCTG	GCTTCTATTA	CATAGGGCCT	GGAGACAGGG	TGGCCTGTTT	720	
TGCCTGTGGT	GGGAAACTGA	GCAACTGGGA	ACCAAAGGAT	TATGCTATGT	CAGAGCACCG	780	20
CAGACATTTT	CCCCACTGTC	CATTTCTGGA	AAATACTTCA	GAAACACAGA	GGTTTAGTAT	840	
ATCAAATCTA	AGTATGCAGA	CACACTCTGC	TCGATTGAGG	ACATTTCTGT	ACTGGCCACC	900	
TAGTGTTCCCT	GTTCAGCCCG	AGCAGCTTGC	AAGTGCTGGA	TTCTATTACG	TGGATCGCAA	960	
TGATGATGTC	AAGTGCCTTT	GTTGTGATGG	TGGCTTGAGA	TGTTGGGAAC	CTGGAGATGA	1020	
CCCCTGGATA	GAACACGCCA	AATGGTTTCC	AAGGTGTGAG	TTCTTGATA	GGATGAAGGG	1080	
TCAGGAGTTT	GTTGATGAGA	TTCAAGCTAG	ATATCCTCAT	CTTCTTGAGC	AGCTGTTGTC	1140	30
CACTTCAGAC	ACCCAGGAG	AAGAAAATGC	TGACCCTACA	GAGACAGTGG	TGCATTTTGG	1200	
CCCTGGAGAA	AGTTCGAAAG	ATGTCGTCAT	GATGAGCACG	CCTGTGGTTA	AAGCAGCCTT	1260	
GGAAATGGGC	TTAGTAGGA	GCCTGGTGAG	ACAGACGGTT	CAGCGGCAGA	TCCTGGCCAC	1320	
TGGTGAGAAC	TACAGGACCG	TCAATGATAT	TGTCTCAGTA	CTTTTGAATG	CTGAAGATGA	1380	
GAGAAGAGAA	GAGGAGAAGG	AAAGACAGAC	TGAAGAGATG	GCATCAGGTG	ACTTATCACT	1440	
GATTCGGAAG	AATAGAATGG	CCCTCTTTCA	ACAGTTGACA	CATGTCCTTC	CTATCCTGGA	1500	40
TAATCTTCTT	GAGGCCAGTG	TAATTACAAA	ACAGGAACAT	GATATTATTA	GACAGAAAAC	1560	
ACAGATACCC	TTACAAGCAA	GAGAGCTTAT	TGACACCGTT	TTAGTCAAGG	GAAATGCTGC	1620	

AGCCAACATC TTCAAAAACCT CTCTGAAGGG AATTGACTCC ACGTTATATG AAAACTTATT 1680
 TGTGGAAAAG AATATGAAGT ATATTCCAAC AGAAGACGTT TCAGGCTTGT CATTGGAAGA 1740
 GCAGTTGCGG AGATTACAAG AAGAACGAAC TTGCAAAGTG TGTATGGACA GAGAGGTTTC 1800
 TATTGTGTTC ATTCCGTGTG GTCATCTAGT AGTCTGCCAG GAATGTGCCC CTTCTCTAAG 1860
 GAAGTGCCCC ATCTGCAGGG GGACAATCAA GGGGACTGTG CGCACATTTC TCTCATGAGT 1920
 GAAGAATGGT CTGAAAGTAT TGTGGACAT CAGAAGCTGT CAGAACAAAG AATGAACTAC 1980
 TGATTTTCAGC TCTTCAGCAG GACATTCTAC TCTCTTTCAA GATTAGTAAT CTTGCTTTAT 2040
 GAAGGGTAGC ATTGTATATT TAAGCTTAGT CTGTTGCAAG GGAAGGTCTA TGCTGTTGAG 2100
 CTACAGGACT GTGTCTGTTC CAGAGCAGGA GTTGGGATGC TTGCTGTATG TCCTTCAGGA 2160
 CTTCTTGGGA TTTGGGAATT TGGGGAAAGC TTTGGAATCC AGTGATGTGG AGCTCAGAAA 2220
 TCCTGGAACC AGTGA CTCTG GTACTCAGTA GATAGGGTAC CCTGTACTTC TTGGTGCTTT 2280
 TCCAGTCTGG GAAATAAGGA GGAATCTGCT GCTGGTAAAA ATTTGCTGGA TGTGAGAAAT 2340
 AGATGAAAGT GTTTCGGGTG GGGGCGTGCA TCAGTGTAGT GTGTGCAGGG ATGTATGCAG 2400
 GCCAAACACT GTGTAG 2416

10

20

(2) 配列番号：42の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：591アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：42：

30

Met Glu Lys Ser Thr Ile Leu Ser Asn Trp Thr Lys Glu Ser Glu Glu

1 5 10 15

Lys Met Lys Phe Asp Phe Ser Cys Glu Leu Tyr Arg Met Ser Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

40

275 280 285
 Glu Pro Gly Asp Asp Pro Trp Ile Glu His Ala Lys Trp Phe Pro Arg
 290 295 300
 Cys Glu Phe Leu Ile Arg Met Lys Gly Gln Glu Phe Val Asp Glu Ile
 305 310 315 320
 Gln Ala Arg Tyr Pro His Leu Leu Glu Gln Leu Leu Ser Thr Ser Asp
 325 330 335
 Thr Pro Gly Glu Glu Asn Ala Asp Pro Thr Glu Thr Val Val His Phe
 340 345 350
 Gly Pro Gly Glu Ser Ser Lys Asp Val Val Met Met Ser Thr Pro Val
 355 360 365
 Val Lys Ala Ala Leu Glu Met Gly Phe Ser Arg Ser Leu Val Arg Gln
 370 375 380
 Thr Val Gln Arg Gln Ile Leu Ala Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Thr Val
 385 390 395 400
 Asn Asp Ile Val Ser Val Leu Leu Asn Ala Glu Asp Glu Arg Arg Glu
 405 410 415
 Glu Glu Lys Glu Arg Gln Thr Glu Glu Met Ala Ser Gly Asp Leu Ser
 420 425 430
 Leu Ile Arg Lys Asn Arg Met Ala Leu Phe Gln Gln Leu Thr His Val
 435 440 445
 Leu Pro Ile Leu Asp Asn Leu Leu Glu Ala Ser Val Ile Thr Lys Gln
 450 455 460
 Glu His Asp Ile Ile Arg Gln Lys Thr Gln Ile Pro Leu Gln Ala Arg
 465 470 475 480
 Glu Leu Ile Asp Thr Val Leu Val Lys Gly Asn Ala Ala Ala Asn Ile
 485 490 495
 Phe Lys Asn Ser Leu Lys Gly Ile Asp Ser Thr Leu Tyr Glu Asn Leu
 500 505 510

10

20

30

40

Phe Val Glu Lys Asn Met Lys Tyr Ile Pro Thr Glu Asp Val Ser Gly
 515 520 525
 Leu Ser Leu Glu Glu Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu Arg Thr Cys
 530 535 540
 Lys Val Cys Met Asp Arg Glu Val Ser Ile Val Phe Ile Pro Cys Gly
 545 550 555 560
 His Leu Val Val Cys Gln Glu Cys Ala Pro Ser Leu Arg Lys Cys Pro
 565 570 575
 Ile Cys Arg Gly Thr Ile Lys Gly Thr Val Arg Thr Phe Leu Ser
 580 585 590

10

(2) 配列番号：4 3 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：11アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

20

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号：4 3：

Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu**1****5****10**

(2) 配列番号：4 4 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：21塩基対

30

(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：DNA (genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：4 4：

AGTGC GGGTT TTTATTATGT G**21**

(2) 配列番号：4 5 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：25塩基対

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：DNA (genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：4 5：

AGATGACCAC AAGGAATAAA CACTA**25**

ヒト hiap-1

1081 GACTCAGGTGTTGGGAATCTGGAGATGATCCATGGGTTCAACATGCCAAGTGGTTTCCAA 1140
 L R C W E S G D D P W V Q H A K W F P R -
 1141 GGTGTGAGTACTTGATAGAAATTAAAGCAGAGGTTTCATCCGTCAAGTTCAGCCAGTT 1200
 C E Y L I R I K G Q E F I R Q V Q A S Y -
 1201 ACCTCATCTACTTGAACAGCTGTATCCACATCAGACAGCCAGGAGATGAAATCAG 1260
 P H L L E Q L L S T S D S P G D E N A E -
 1261 AGTCATCAATTATCCATTTTGGAACTCGGAGAGACCATTCAGAGATGCAATCATGATGA 1320
 S S I I H L E P G E D H S E D A I M M N -
 1321 ATACTCTGTGATTAAATGCTGCCGTGGAATGGCTTTAGTAGAAGCCTGGTAAACAGA 1380
 T P V I N A A V E M G F S R S L V K Q T -
 1381 CAGTTCAGAGAAAATCCTAGCACTGGAGAGAAATTATAGACTAGTCAATGATCTTGTGT 1440
 V Q R K I L A T G E N Y R L V N D L V L -
 (4/8ベ-ジ)
 ヒト hiap-1
 1441 TAGACTTACTCAATGCAGAGATGAAATTAAGGAGAGAGAGAGAGAAAGCACTGAGG 1500
 D L L N A E D E I R E E E R E R A T E E -
 1501 AAAAGAATCAATGATTTTATTATTCGGAGAAATAGAAATGGCACTTTTTCACATT 1560
 K E S N D L L I R K N R M A L F Q H L -
 1561 TGACTTGTGTAATTCCATCTCGATAGTCTACTAATCGCGGAATTATTATGAACAAG 1620
 T C V I P I L D S L L T A G I I N E Q E -
 1621 AACATGATGTTATTAAACAGAGACACAGACGTCTTTACAGCAAGCAAGCACTGATTGATA 1680
 H D V I K Q K T Q T S L Q A R E L I D T -
 1681 CGATTTAGTAAAGGAAATATTCAGCCACTGTATTTCAGAAACTCTCTGCAAGACCTG 1740
 I L V K G N I A A T V F R N S L Q E A E -
 1741 AAGCTGTGTTATATGAGCAATTTATTTGTGCAACAGGACATPAAATATATTTCCACAGAAG 1800
 A V L Y E H L F V Q Q D I K Y I P T E D -
 (5/8ベ-ジ)

ヒト hiap-1

351 CTGGTGTGAATGACAAGGTCAAATGCTTCTGTGTGGCTGATCTGGATAACTCGAAAA 420
 G V N D K V K C F C C G L M L D N W K R -
 421 GAGAGACAGTCTTACTGAAAAAGCATAAAAAGTTGTATCTTAGCTGCAGATTCGTTTCTG 480
 G D S P T E K H K K L Y P S C R F V Q S -
 481 GTCTAAATTCGGTTAACTTGAAGCTACCTCTCACGCTACTTTTCTCTCTCTCACTAA 540
 L N S V N N L E A T S Q P T F P S S V T -
 541 CACATTTCCACACACTCATTTACTTCCGGGTACAGAAAAACAGTGGATATTTCCGTGGCTCTT 600
 H S T H S L L P G T E N S G Y F R G S Y -
 601 ATTCAAACCTCTCCATCAAACTCTCTAAACTCCAGAGCAAAATCAAGAAATTTTCTGCCTTGA 660
 S N S P S N P V N S R A N Q E F S A L M -
 661 TGAGAAGTTCTTACCCCTGTCCCAATGAATPACGAAAAATGCGCAGATTACTTACTTTTTCAGA 720
 R S S Y P C P M N N E N A R L L T F Q T -
 (2/8ベ-ジ)
 ヒト hiap-1
 721 CATGCCATTGACTTTTCTGTGCCCAACAGATCTGGCAGCAGCAGCGCTTTTACTACATAG 780
 W P L T F L S P T D L A R A G F Y I G -
 781 GACCTGAGACAGAGTGGCTTTGCTGTGGTGGAAAAATTTGAGCAATTTGGGAACCGA 840
 P G D R V A C F A C G G K L S N W E P K -
 841 AGGATAATGCTATGTCAGAACACCTGACAGATTTTCCCAAATGCCCAATTTATAGAAAATC 900
 D N A M S E H L R H F P K C P F I E N Q -
 901 AGCTTCAAGACACTTCAAGATACAGATTTCTAATCTGAGCATGCGACATGCGAGCCC 960
 L Q D T S R Y T V S N L S M Q T H A A R -
 961 GCTTTAAACATTTTAACTGGCCCTCTAGTGTCTAGTTAATCTCTGAGCAGCTTGCAT 1020
 F K T F F N W P S S V L V N P E Q L A S -
 1021 GTCCGGTTTTTATTATGTGGGTAAACAGTATGATGTCATAATGCTTTTGTGTGATGGTG 1080
 A G F Y Y V G N S D D V K C F C C D G G -
 (3/8ベ-ジ)

ヒト hiap-1

ヒト hiap-1

1801 ATGTTTCAGATCTACCGAGTGGGAAGAACAATTCGGGAGACTACCGAAGAAGAAACATGTA 1860
 C V S D L P V E Q L R R L P E E R T C K -
 1861 AAGTGTGTATGGACAAAGAAGTGTCCATAGTGTATTTCCTTGGTGGTCATCTAGTAGTAT 1920
 C V C M D K E V S I V F I P C G H L V V C -
 1921 GCAAAGATTGTGCTCCTTTTAAAGAAAGTGTCTTATTGTAGGAGTACAAATCAAGGTA 1980
 C K D C A P S L R K C P I C R S T I K G T -
 1981 CAGTTCGTACATTTCTTTCATGAAGAAGAACCAACATCGTCTAAACTTTTGAATTAAT 2040
 C V R T F L S *
 2041 TTATTAATGCTATTATACTTTTAACTTTTATCTCTAAATTTGTTTCTCTTAAAAATTTTATT 2100
 C
 2101 TATTTACAACTCAAAAAACAATTGTTTGTGTACATATTTATATATGTATCTTAAACCATTA 2160
 C
 (6/8 ページ)

ヒト hiap-2

ヒト hiap-1

2521 CAGTGTCTATACATCGAAGTGTGCATATATGTTGAATCACATTTTAGGGACATGGTGT 2580
 C
 2581 TTTTATAAGAATTCTGTGAGXAAAAATTTAATAAGCAACCAATTAATCTCTTAAAAAA 2640
 C
 2641 AAAAAAATAAATACTCGAGGGCCCGTACCAAT 2676
 C
 (8/8 ページ)

1 TTAGGTACCTGAAGAGTTACTACAAACCCCAAGAGTTGCTTCTTAAGTAGTATCTTGG 60
 a
 61 TAATTCAGAGAGATCTATCTCTACCTGAATATATAAACTCGAGATAAATCCAGTAAAGAAAG 120
 a
 121 TGTAGTAAATCTACATAGAGCTATCATTTGATTTCTTTTGTGGTGGAAATCTTAGTT 180
 a
 181 CATGTGAAGAAATTTATGTGAAATGTTTATAGCTATCAACAGTACTGTCCACTACTCATG 240
 a
 241 CACAAACTGCCTCCCAAGACTTTTCCAGGTCCCTCGTATCAAAACATTAAAGAGTATA 300
 H K T A S Q R L F P G P S Y Q N I K S I -
 301 ATGGAAGATAGCAGCATCTTGTGAGATTGGACAAACAGCAACCAACAAAAATGAAGTAT 360
 a
 M E D S T I L S D W T N S N K Q K M K Y -
 (1/7 ページ)

配列番号:7
 配列番号:8

ヒト hiap-2

a	361	GACTTTTCCTGTGAACCTCTACAGAATGCTACATATTCACACTTTTCCCGCGCGGGGCGCT	420
		D F S C E L Y R M S T Y S T F P A G V P -	
	421	GTCTCAGAAAGGAGTCTTGCTGCTCGTTTTATATATCTGCTGTGGAATGACAAGGTC	480
a		V S E R S L A R A G F Y Y T G V N D K V -	
	481	AAATGCTTCTGTTGTGGCTGATGCTGGATAAAGTGAAGACTGAGAGACAGTCTATTCAA	540
a		K C F C C G L M L D N W K L G D S P I Q -	
	541	AAGCATAAACAGCTATATCTAGCTAGCTGTTTATTCAGAACTGGTTTCACGTAGTCTG	600
a		K H K Q L Y P S C S F I Q N L V S A S L -	
	601	GGATCCACCTCTAAGAAATACGCTCCAAAGAGAAGACAGTTTTCGACATTATCTCCCC	660
a		G S T S K N T S P M R N S F A H S L S P -	
	661	ACCTTGGAAACATAGTAGCTTGTTCAGTGGTCTTACTCCAGCCTTCTCCAAACCCCTCTT	720
		T L E H S S L F S G S Y S S L P P N P L -	

ヒト hiap-2

a	A A T T C T A G A C A G T T G A G A C A T C T C T T C A T C G A G A C T A A C C C C T A C A G T T A T G C A A T G	721
a	N S R A V E D I S S S R T N P Y S Y A M -	
	A G T A C T G A A G A G C A G A T T C T T A C C T A C C A T A T G T G C C A T T A A C T T T T T G T C A C C A	781
a	S T E E A R F L T Y H M W P L T F L S P -	
	T C A A A T T G C A A G A C T G C T T T A T A T A T A G G A C C T G G A G A T A G G G T A C C T G C T T T	841
a	S E L A R A G F Y Y I G P G D R V A C F -	
	G C T G T G T G G G A A G C T C A G T A A C T G G A A C C A A A G G A T G A T C T A T G T C A G A A C A C C G G	901
a	A C G G K L S N W E P K D D A M S E H R -	
	A G G C A T T T C C C A A C T G C C A T T T T T T G A A A A T T C T T A G A A A C T C T A G G T T T A G C A T T	961
a	R H F P N C P F L E N S L E T L R F S I -	
	T C A A A T C T G A G C A T G C A C A C A T G C A G T C G A A T G A A C A C A T T A T G T A C T G G C C A T C T	1021

(3/7ページ)

(5/7ページ)

マウス **xiap**

1441 CAGCTAAGCGCCTACAAGAGGAGAGCTTTCCAAATCTGTATGGATAGAAATATGCTG
 a Q L R R L Q E E K L S K I C M D R N I A -
 1501 ATCGTTTTTTTCCTTGTGGACATCTGCCACCTTGTAACAGTGTGCAGAGCAGTTGAC
 a I V F P C G H L A T C K Q C A E A V D -
 1561 AAATGTCCCATGTGCTACACGTCATTTACGTTCAACCAAAAATTTTATGTCTAGTGG
 a K C P M C Y T V I T F N Q K I F M S *
 1621 GGCACCACATGTTATGTTCTTCTCTCAATTGAATGTGTAATGGGAGCGAAGTTAAG
 a -
 1681 TAATCTGCAATTTGCATTCATTCAGCATCTGCTGTTTCCAAATGGAGACCAATGCTAAC
 a -
 1741 AGCACTGTTTCGCTAAACATTCATTTCTGGATCTTTCGAGTTATCAGCTGTATCATTT
 a -
 1801 TAGCCAGTGTTTTACTCGATTGAACCTTAGACAGAGAGCATTTTATAGCTTTTCACAT
 a -
 1861 GTATATTGGTAGTACACTGACTTGATTCTATATGTAAGTGAATTCATCACCTGCGATGTT
 a -
 1921 TCATGCCCTTTGCAATAAGCTTAACAAATGGAGTGTCTGTATAGCATGGAGATGTGATG
 a -
 1981 GAATCTGCCCAATGACTTTAATTGGCTTATTGTAACACGGGAAGAACTGCCCCACGCTG
 a -
 2041 CTGGAGGATAAAGATTGTTTAGATGCTCACTTCTGTGTTTATAGGATTCGCCCATTTA
 a -
 2100

(6/6 ページ)

マウス **xiap**

721 CAATGCTTTTCTGTTGGGGAACCTGAAATAATTTGGGAACCTCTGTGATCGTGCCTGCTCA
 a Q C F C C G K L K N W E P C D R A W S -
 781 GAACACAGGACACACTTCCCAATTCCTTTTGTGGGCCGGAAGCTTAATGTTGCA
 a E H R R H F P N C F F V L G R N V N V R -
 841 AGTGAATCTGTTGTGAGTTCTGTAGGAATTTCCCAATTTCAACAACTCTCCACAGAAAT
 a S E S G V S D R N F P N S T N S P R N -
 901 CCAGCATGGCAGAAATATGAACGCGATGTTACTTTTGGAAACATGGATATACACTGATT
 a P A M A E Y E A R I V T F G T W I Y S V -
 961 AACAGGAGCAGCTTCCAGAGCTGGATTTTATGCTTTAGGTGAAGCGCATAAAGTGAAG
 a N K E Q L A R A G F Y A L G E G D K V K -
 1021 TGCTTCCACTGTGGAGGGCTCAGCGATTGGAAGCCAAGTGAAGACCCCTGGGACCAG
 a C F H C G G L T D W K P S E D P W D Q -
 1081 CATGCTAAGTGTACCCAGGTGCAAAATACCTATTGGATGACAGGGGCAAGAAATATA
 a H A K C Y P G C K Y L L D E K G Q E Y I -
 1141 AATAATATTCTATTAAACCCATCCACTTGAAGAAATCTTTGGGAAGAACTGCTGAAAAACA
 a N N I H L T H P L E E S L G R T A E K T -
 1201 CCACCGCTAACTAAAAAATTCGATGATACCATCTTCCAGAACTCTATGTTGCAAGAAGCT
 a P P L T K K I D D T I F Q N P M V Q E A -
 1261 ATACGAATGGGATTTAGCTTCAAGGACCTTAAGAAAACAACTGGAAGAAAAATCCAAACA
 a I R M G F S F K D L K K T M E K I Q T -
 1321 TCCGGAGCAGCTATCTATCTGAGTCTCTGATGTCAGATCTTGTGAGTCTTCAGAAA
 a S G S Y L S L E V L I A D L V S A Q K -
 1381 GATAATACGGAGGATGAGTCAAGTCAAACTTCATTTGCAGAAAGACATTTAGTACTGAAGAG
 a D N T E D E S S Q T S L Q K D I S T E E -
 1440

(3/6 ページ)

マウス **xiap**

(4/6 ページ)

M-hiap-1

TTTTGCTGCGATGGGAAACTGAGCAACTGGGAACTGAAGGATGATGCTATGTGACAGCAC
781 - - - - -
F A C D G K L S N W E R K D D A M S E H - 840
CAGAGCATTTCCCCAGCTGTCGTTCTTTAAAGACTTGGTTCAGTCTGCTTCGAGATAC
841 - - - - -
Q R H F P S C P F L K D L G Q S A S R Y - 900
ACTGTCCTTAACCTGAGTCAGACACAGCGCCCGTATTAGACATTCTCTAACTGG
901 - - - - -
T V S N L S M Q T H A A R I R T F S N W - 960
CCTTCTAGTGCCTAGTTCAATCCAGGAACCTGCAAGTGGGGCTTTTATTATACAGGA
961 - - - - -
P S S A L V H S Q E L A S A G F Y Y T G - 1020
CACAGTGATGATCAAGTGTTTATGCTGTGATGGTGGCTGAGGTGCTGGGAATCTGGA
1081 - - - - -
H S D D V K C L C C D G G L R C W E S G - 1080
GATGACCCCTGGGTGGAACTCCCAAGTGGTTTCCAAAGGTGTGAGTACTTGTCTCAGAATC
1141 - - - - -
D D P W V E H A K W F P R C E Y L L R I - 1140
AAAGCCCAAGAAATTTGTACGCCAAGTTCAAGCTGGCTATCCTCATCTACTTTGACGAGCTA
1141 - - - - -
K G Q E F V S Q V Q A G Y P H L L E Q L - 1200
(3/6^へ—ジ)

M-hiap-1

TTATCTACCTCAGACTCCCAGACAGATCAGAACTCCAGCCAGCAATCGTGCATTTTGGC
1201 - - - - -
L S T S D S P E D E N A D A A I V H F G - 1260
CCTGGAGAAAGTTCGGAAGATGCTGTCATGATGAGCAGCGCTGTGGTTAAAGCAGCCTTG
1261 - - - - -
P G E S S E D V V M M S T P V V K A A L - 1320
GAAATGGGCTTCAGTAGGAGCTGGTGAGACAGACGGTTTCAGTGGCAGATCCTGGCCACT
1321 - - - - -
E M G F S R S L V R Q T V Q W Q I L A T - 1380
GGTGAGAACTACAGACCGTCACTGACCTCGTTATAGGCTTACTCGATCCAGAACAGCAG
1381 - - - - -
G E N Y R T V S D L V I G L L D A E D E - 1440
ATGAGAGGAGCAGATGGAGCGCGCGCAGGAGGAGTGCAGATGATCTAGCACTA
1441 - - - - -
M R E E Q M E Q A A E E E S D D L A L - 1500
ATCCGGAGAACAAATGGTCTTTTCCACATTTTCAAGTGTGTGACACCAATGCTGTAT
1501 - - - - -
I R K N K M V L F Q H L T C V T P M L Y - 1560
(4/6^へ—ジ)

M-hiap-1

GAATTCGGGAGACCTACACCCCGGAGATCAGAGGTCAATTGCTGGGCTTCAGAGCCTAG
1 - - - - -
GAAGTGGGCTGGGGTATTCAGCCTAGCAGTAAACCCGACAGAGCCATGCACAAACTAC
61 - - - - -
ATCCCCAGAGAAGACTTTGTCCCTTCCCTGTCATCTCACCATGAACATGGTTCAA
121 - - - - -
M N M V Q - 180
GACAGCCCTTTTCTAGCAAGCTGATGAAGAGTGTGACACCTTTGAGTTGAAGTATGAC
181 - - - - -
D S A F L A K L M K S A D T F E L K Y D - 240
TTTTCTGTGAGCTGTACCGATTTCACGTATTACAGCTTTTCCAGGGGAGTTCTCTGTG
241 - - - - -
F S C E L Y R L S T Y S A F P R G V P V - 300
TCAGAAAGAGTCTGGCTCGCTGGCTTTTACTACTGCTGTCGCAATGACAAGGTCAAG
301 - - - - -
S E R S L A R A G F Y Y T G A N D K V K - 360
TGCTTCGTGTGGCCTGATGTGCTAGACACTGGAACAGGGGACAGTCCCATGGAGAG
361 - - - - -
C F C C G L M L D N W K Q G D S P M E K - 420
(1/6^へ—ジ)

M-hiap-1

CACAGAAAGTTGTACCCAGCTGCAACTTTGTACAGACTTTGAATCCAGCCACAGCTGTG
421 - - - - -
H R K L Y P S C N F V Q T L N P A N S L - 480
GAAGCTAGTCTCGGCTTCTCTTCCCTTCCAGCGGATGAGCACCATGCTTTGAGCTTT
481 - - - - -
E A S P R P S L P S T A M S T M P L S F - 540
GCAAGTTCTGAGAACTACTGGCTATTTCAGTGGCTCTTACTCGAGCTTTCCCTCAGACCTT
541 - - - - -
A S S E N T G Y F S G S Y S S F P S D P - 600
GTGAACCTCCGAGCAAACTCAAGATTGTCTGCTTTGAGCACAAGTCCCTTACCACCTTTGCA
601 - - - - -
V N F R A N Q D C P A L S T S P Y H F A - 660
ATGAACACAGAGAAGCCAGATTACTCACCTATGAACATGGCCATTGTCTTTCTGTGCA
661 - - - - -
M N T E K A R L L T Y E T W P L S F L S - 720
CCAGAAAGCTGGCCAAAGCAGGCTTCTACTACATAGGACCTGGAGATAGAGTGGCCTGC
721 - - - - -
P A K L A K A G F Y Y I G P G D R V A C - 780
(2/6^へ—ジ)

M-hiap-2

【図6】

配列番号:41 CTGTGGTGGAGATCTATTGTCCAAAGTGGTGAGAAACTTCATCTCGAAGTTTAAGCGGTCA 60
 1 GAAATACTATTACTACTGACAAACTGTCTCCAGAGACTCGCCCAAGGTACCTTA 120
 61 CACCCAAAACCTTAACGTTAATGAGAGAGACACAATCTTGTCAAATTGGACAAAAGGA 180
 121 M E K S T I L S N W T K E -
 配列番号:42

GAGCAAGAAAATGAAGTTTGACTTTTCGTGTGAACTCTACCCGAATGCTACATATTC 240
 181 S E E K M K F D F S C E L Y R M S T Y S -
 241 AGCTTTCCAGGGAGTTCTCTCTCAGAGAGAGTCTGGCTCGTGTGGCTTTTATTTA 300
 A F R G V P V S E R S L A R A G F Y Y -
 301 TACAGGTGTGAATGACAAAGTCAAGTCTTCTGTGTGGCTGTGATGTTGGATAACTGAA 360
 T G V N D K V K C F C C G L M L D N W K -
 361 ACAAGGGACAGTCCCTTTGAAAAGCACAGACAGTTCTATCCAGCTGCAGCTTTTGTACA 420
 Q G D S P V E K H R Q F Y P S C S F V Q -
 (1/6ベ-ジ)

M-hiap-2

GACTGTGTTTCAGCCAGTCTGCAGTCTCCATCTAAGAATATGTCTCCTGTGAAAGTAG 480
 421 T L L S A S L Q S P S K N M S P V K S R -
 481 ATTTGCACATTCGTCACTCTGGNACGAGGTGGCATTCACCTCCACCTGTGCTCTAGCCC 540
 F A H S S P L E R G G I H S N L C S S P -
 541 TCTTAATCTAGACAGCTGGAAGACTTCTCATCAAGATGGATCCCTGCAGCTATGCCAT 600
 L N S R A V E D F S S R M D P C S Y A M -
 601 GAGTACAGAAGAGGCCAGATTCTTACTTACAGTATGTGGCCTTTAAGTTTCTGTCAAC 660
 S T E A R F L T Y S M W P L S F L S P -
 661 AGCAGCTGGCCAGAGCTGGCTTCTATTACATAGGCTTGAGACAGGTTGGCCTGTTT 720
 A E L A R A G F Y Y I G P G D R V A C F -
 721 TGCCTGTGGGAAAACAGCACTGAGCACTGGGAACCAAGGATTATGCTATGTCAGAGCACCG 780
 A C G G K L S N W E P K D Y A M S E H R -
 (2/6ベ-ジ)

M-hiap-1

TGCTCTCTAAGTGCAGGGCCATCACTGAACAGGAGTGCAATGCTGTGAACAGAAACCA 1561
 C L L S A R A I T E Q E C N A V K Q K P - 1620
 CACACTTACAAGCAAGCACACTGATTGATAGTCTGTGTAGCAAAAGAAACACTGTCAGCA 1621
 H T L Q A S T L I D T V L A K G N T A A - 1680
 1681 ACCTCATTCAGAAACTCCCTTCGGGAAATTGACCTCGGTTATACAGAGATATATTGTG 1740
 T S F R N S L R E I D P A L Y R D I F V -
 1741 CAACAGGACATTAGGAGTCTTCCACAGATGACATTGACGCTCTACCAATGGAAGAACAG 1800
 Q Q D I R S L P T D D I A A L P M E E Q -
 1801 TTGCGGCCCTCCCGGAGSACAGAAATGTFAAGTGTGTATGACCGAGAGGTATCCATC 1860
 L R P L P E D R M C K V C M D R E V S I -
 1861 GTGTTCAATCCCTGTGGCCATCTGGTGTGTGCAAGACTGGCGTCCCTCTCTGAGGAAG 1920
 V F I P C G H L V V C K D C A P S L R K -
 (5/6ベ-ジ)

M-hiap-1

TGTCCCATCTGTAGAGGGACCATCAAGGGCACAGCTGGCGACATTTCTCTCCTGAACAAGA 1921
 C P I C R G T I K G T V R T F L S * - 1980
 CTAATGCTCCATGGCTGCCAATTCAGCCAGGAGGAAGTTCACTGTCACTCCCAGTTCCAT 1981
 TCGGAATGTAGGCGAGCCTGGATAGCACAGACACCGCAACACACAAATATAACAT 2041
 GAAAACTTTTGTCTGAAGTCAAGAATGAATGAAATTACTTATATAATAATTTAATTGGT 2101
 TTCTTAAAAGTGTATTGTTCACCAACTCAGAAAATGTTTCTGTAAACATATTACA 2161
 TACTACCTGCATCTAAAGTATTATATATTATATATTCAGATGTTCATGAGAGGGTTT 2221
 TGTCTTGTTCCTGAAAAGCTGGTTTATCATCTGATCAGCATATACGCGCAACGGGAG 2281
 GGTAGAATCCATGAACCAAGTGAAGATCTCAGCTAAATAAGCGGAAAGATTGG 2341
 AGAAACCAAGGAAATTTCTTCTGTCCAATGTATACTTTCAGACTTAATGACCTCTTCC 2401
 TATCAAGCCTTCTA 2474
 (6/6ベ-ジ)

M-hiap-2

```

781  CAGACATTTTCCCCACACTGTCGATTTCTGGANAATACTTCAGAAACACAGAGGTTTAGTAT
      R H F P H C P F L E N T S E T Q R F S I - 840
841  ATCAATCTAAGTATGAGACACACTCTGCTCGATTGAGGACATTTCTGTACTGCCACCC
      S N L S M Q T H S A R L R T F L Y W P P - 900
901  TAGTGTTCCTGTTACGCCCGAGCAGCTTGCAGTCTCGATTCTTACGTGGATCGCAA
      S V P V Q P E Q L A S A G F Y Y V D R N - 960
961  TGATGATGTCAGTGCCTTTGTTGTGATGGTGGCTTGAGATGTTGGGAACCTGGAGATGA
      D D V K C L C C D G G L R C W E P G D D - 1020
1021 CCCTGGATAGAACACGCCAAATGGTTTCCAAGGTGTGAGTCTTGATACGGATGAAGG
      P W I E H A K W F P R C E F L I R M K G - 1080
1081 TCAGGAGTTTGTGATGAGATTCAGCTAGATATCCTCATCTTCTTGAGCAGCAGCTGTTGTC
      Q E F V D E I Q A R Y P H L L E Q L L S - 1140

```

(3/6 ページ)

M-hiap-2

CACTTCAGACCCCGAGGAGAAATACTGACCCCTACAGACAGACAGTGGTCAATTTGG
 1141
 T S D T P G E E N A D P T E T V V H F G -
 CCTTGAGAAAGTTGAAAGATGTCGTATGATGACGACGGCTGTGGTTAAACAGCCCTT
 1201
 P G E S S K D V V M M S T P V V K A A L -
 GGAAATGGGCTTCAGTAGGACCTGGTGAGACACACGGTTCAGGGCAGATCCTGGCCAC
 1261
 E M G F S R S L V R Q T V Q R Q I L A T -
 TGGTGAGAACTACAGGACCGTCAATGATATTGCTCAGTACTTTTGAATGCTGAAGATGA
 1321
 G E N Y R T V N D I V S V L L N A E D E -
 GAGAAGAGAAGGAGAGAAAGACAGCTGAAGAGATGGCATCAGGTGACCTTATCACT
 1381
 R R E E E K E R Q T E E M A S G D L S L -
 GATTCGGAGAATAAGATGGCCCTCTTTCAACAGTTGACACATGCTCTTCCTATCCTGGA
 1441
 I R K N R M A L F Q Q L T H V L P I L D -
 (4/6 べーシ)

【図 7】

BIR (ハキキュロウイスLAP反復) トメインの整列化

ハキキュロウイス
Op_lap
Op_lap
ヒト
xlap
hiap1, hiap2
マウス
m-xlap
昆虫
diap

コドリシガ (Cydya pomonella)
ダグラスモミガ (Orgyia pseudotsugata)

X染色体上のLAP
2種類の異なるヒトLAP遺伝子

ヒトxiap遺伝子のマウスでの相同体

xiapまたはhiapの相同体であるかは明らかでない、ショウジョウバエLAP遺伝子

共通配列の直線は、19種類のうち4種類のBIR配列の各部位に存在する
アミノ酸または非常に類似したアミノ酸を示す。
大文字で示した残基は、共通配列における残基である。

151
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

151
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

BIR 2

201
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

201
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

BIR 3

251
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

251
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

(2 / 5 ページ)

BIR 3

301
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

301
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

351
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

351
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

401
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

401
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

(3 / 5 ページ)

【図 8】

BIR 1

51
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

51
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

101
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

101
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

(1 / 5 ページ)

1

cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

50
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

100
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

100
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

150
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

150
cp-lap
diap
m-xlap
xiap
hiap1
hiap2
共通配列

バキエロウイルス

コドリシガ (*Cydia pomonella*)
ダグラスモミガ (*Orgyia pseudotsugata*)

xiap
hiap1, hiap2

m-xiao ヒトxiao遺伝子のマウスでの相同体

diap xiapまたはhiapの相同体であるかは明らかでない、シヨウジヨウバエIAP遺伝子

共通配列に関する注記： 共通配列の直線は、7種類のうち6種類のRZF配列の各部位に存在するアミノ酸または非常に類似したアミノ酸を示す。
大文字で示した残基は、共通配列における残基である。

【图 9】

451		500	
cp-lap	fdadagaal	..nttvstaa pvpseipe..	501
diap	vsnqkDnteD E.	..psapie pcqatqtskaa svpiipvadi	cp-lap
m-xlap	vnaqKXdsmqD E.	..ssotsl Q.	diap
xlap	lnAedEireE Ereerateeke sndlilrkn rmalfghtc vipildsilt	..ssotsl Q.	n-xlap
hiap1	lnAedEKreE Ekexqaema sddlsirkn rmalfqitc vipildnlk	aglineqehd vikqtQtsl Qarelditi	xiap
hiap2	-A-	anvinkgeh d iikqtQtpL Qareliditiw vkgnaanif knckikeidst	hiap1
共通配列	E	-Q--L Q-	hiap2
		(4 / 5 ページ)	共通配列

(90)

JP 4458551 B2 2010.4.28

```

551      ...tkl..... Ekepq vedakLCKIC yveSciVcFv 600
      sniskitdei qkmsvstpng nlsIEBenRq LkDarLCKVC lDeSVGVVf1
      .....k eiStEBQLRR LqEEkLSKIC MDnriaiVfVf
      .....k eiStEBQLRR LqEEkLCKIC MDnriaiVfVf
      lyehlffvqdd ikypitedvs dlpvEBQLRR LpEEr-tCKVC MDkEVSvVf1
      lyxnlfvdvkn mkyiptedvs glStEBQLRR LpEEr-tCKVC MDkEVSvVf1
      .....--s-EBQLRR L-EEr-LCK-C MD-EV--vVf-
      共通配列
501      PCGHVvVaCak CAISvdKCPM CRkIVsvlk vYFS. 635
      PCGHtLatCnq CapSvanCPM CRaIlkgfvr tFLS*
      PCGHtLatCkq CAeavDKCPM CyvIffnqk iFWS*
      PCGHlLVtCkq CAeavDKCPM CyvIffkqk iFWS*
      PCGHlLVcckd CapSlrKCPi CRstIkgtvr tFLS*
      PCGHlLVcckd CapSlrKCPi CRstIkgtvr tFLS.
      PCGHlLVcC- CA-SV-KCPM CR-I----- tFLS.
      共通配列

```

【図 10】

【図 1 1】

A

心療	腎	肺症	肝臓	骨格筋	腎臓	腎臓	腎臓
----	---	----	----	-----	----	----	----

hiap-2

β -アクチン

A

胎盤
前立腺
精囊
卵巢
小腸
結腸
未胎血白血球

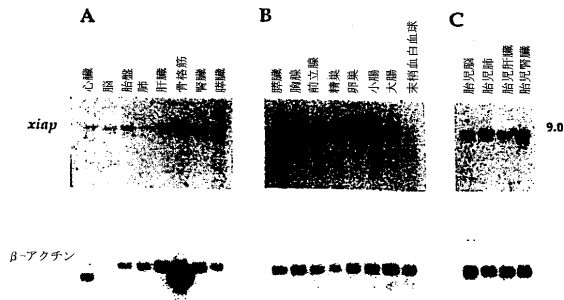
4.5

B

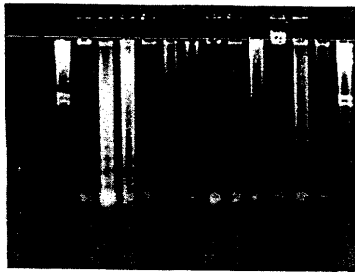
胎盤
前立腺
精囊
卵巢
小腸
結腸
未胎血白血球

4.5

A



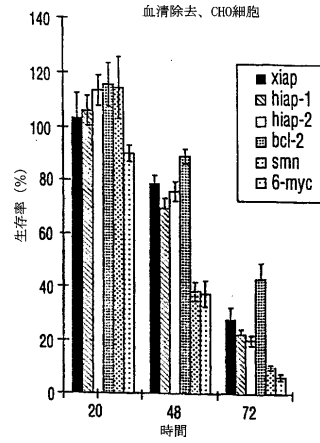
インキュベーション：一晚

[illegible]

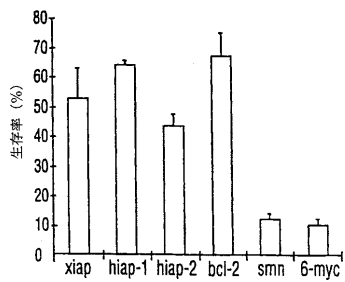
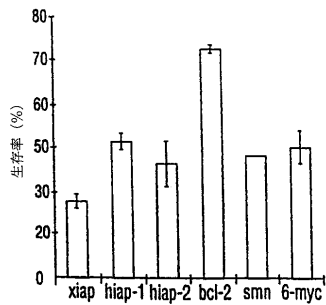
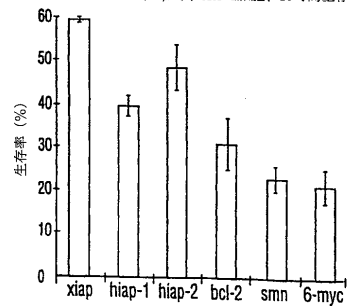
1



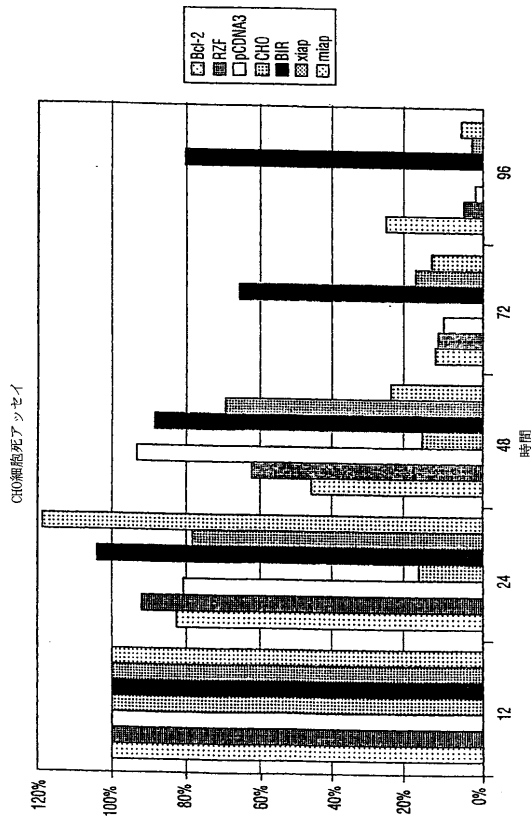
血清除去、CHO細胞



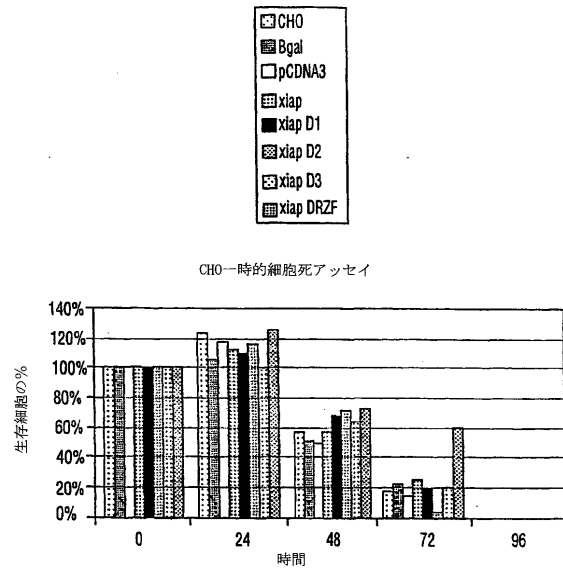
メナジオン(20 μ M)、CHO細胞、24時間生存率

スタウロスポリン(1 μ M)、CHO細胞、24時間生存率メナジオン(10 μ M)、RAT-1細胞、18時間生存率

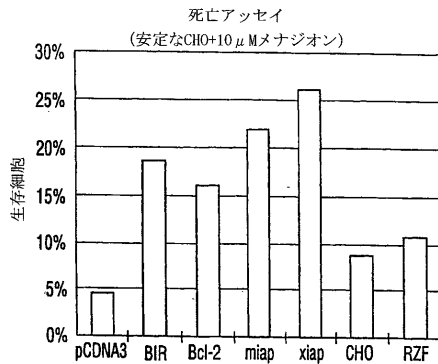
【図 15 A】



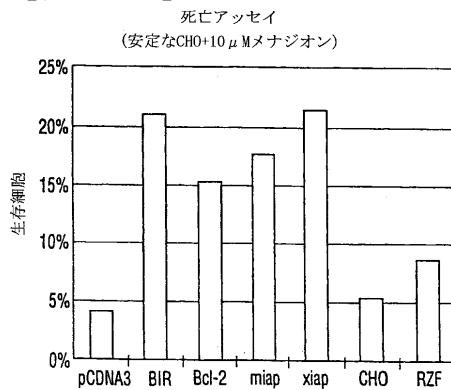
【図 15 B】



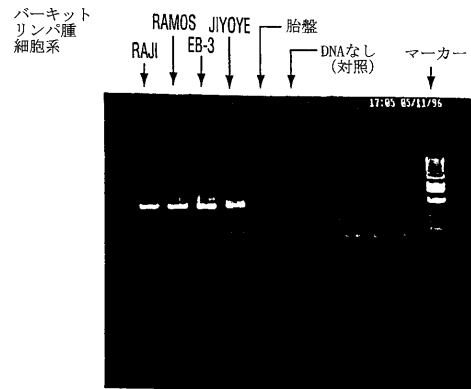
【図 16 A】



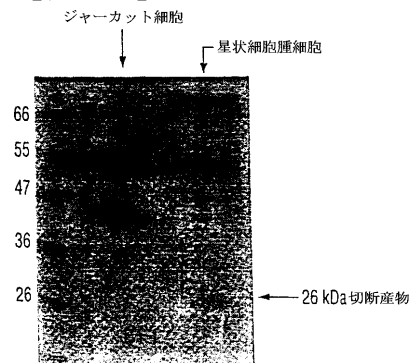
【図 16 B】



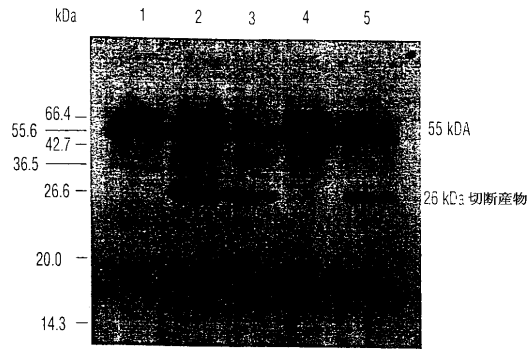
【図 17】



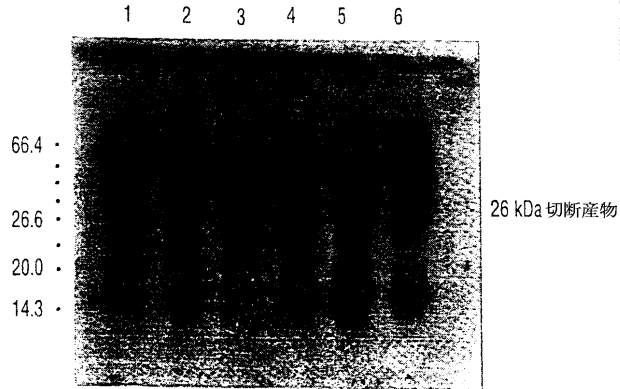
【図 18】



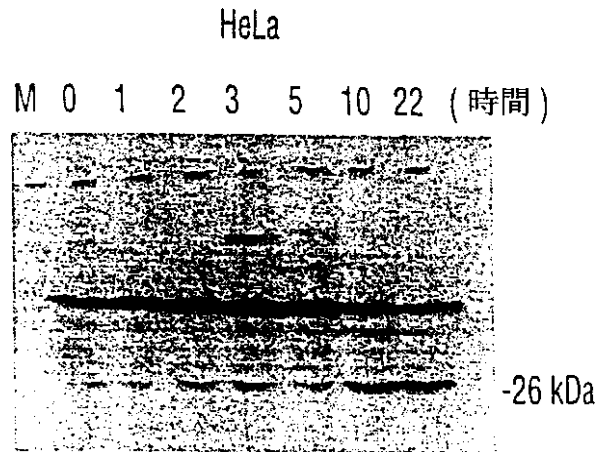
【図 19】



【図 20】

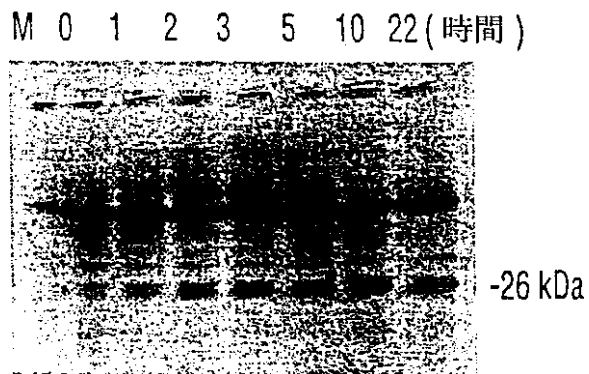


【図 21 A】

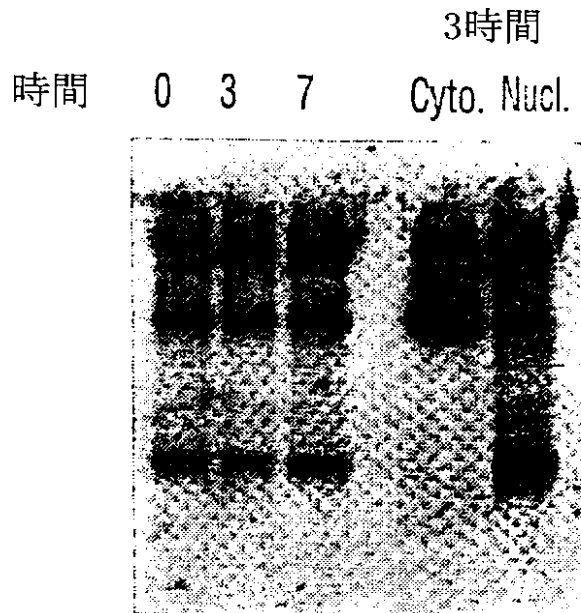


【図 21 B】

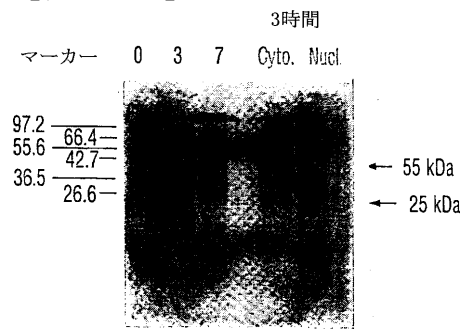
ジャーカット



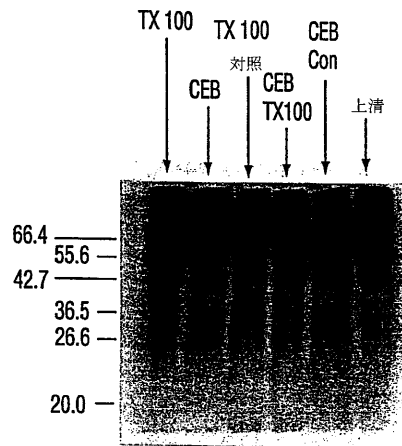
【図 22 A】



【図 2 2 B】



【図 2 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	T
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/566	(2006.01)	G 0 1 N	33/566	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 1 2 R	1/91	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
			C 1 2 P	21/02	
			C 1 2 R	1:91	

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 コルネラック ロバート ジー.

カナダ国 オンタリオ州 オタワ ツイード アベニュー 1901

(72)発明者 マッケンジー アレクサンダー イー.

カナダ国 オンタリオ州 オタワ ロッククリフ ウェイ 35

(72)発明者 バード ステファン

カナダ国 オンタリオ州 オタワ ジュリアン アベニュー 20

(72)発明者 リストン ピーター

カナダ国 オンタリオ州 オタワ スミス 401 チルドレンズ ホスピタル オブ イースタ
ン オンタリオ

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 特表平10-509305 (JP, A)

Cell 80 p.167-178 (1995)

J Virol 68(4) p.2521-2528 (1994)

Nature 379 p.349-353 (1996)

Endocrinology 139 p.1321-1328 (1998)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 ~ 15/90

PubMed