

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3778545号
(P3778545)

(45) 発行日 平成18年5月24日(2006.5.24)

(24) 登録日 平成18年3月10日(2006.3.10)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
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	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C

請求項の数 7 (全 72 頁)

(21) 出願番号	特願2000-510859 (P2000-510859)	(73) 特許権者	000003311
(86) (22) 出願日	平成10年9月7日(1998.9.7)		中外製薬株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP1998/004009		東京都北区浮間5丁目5番1号
(87) 国際公開番号	W01999/013072	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成11年3月18日(1999.3.18)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成17年3月10日(2005.3.10)	(74) 代理人	100128048
(31) 優先権主張番号	特願平9-260972		弁理士 新見 浩一
(32) 優先日	平成9年9月8日(1997.9.8)	(72) 発明者	根津 淳一
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		茨城県新治郡新治村永井153番地2 株
(31) 優先権主張番号	特願平10-156660		式会社中外分子医学研究所内
(32) 優先日	平成10年5月20日(1998.5.20)	(72) 発明者	奥 飛鳥
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		茨城県新治郡新治村永井153番地2 株
早期審査対象出願			式会社中外分子医学研究所内
前置審査		審査官	斎藤 真由美
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスポーター遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(a)～(c)のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。

(a) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列

(b) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列において10アミノ酸以内のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は付加したアミノ酸配列

(c) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列

【請求項2】

以下の(a)または(b)に記載のDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。

(a) 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

【請求項3】

請求項1または2に記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項4】

請求項3に記載のDNAが挿入されたベクター。

【請求項5】

10

20

請求項 3 に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換体。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 7】

請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合する抗体。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、細胞外から細胞内へ、あるいは細胞内から細胞外への物質の輸送に関与するタンパク質であるトランスポーターに関する。

10

背景技術

栄養素や内因性物質の細胞内への取り込み機構において、生体膜に存在する多種の輸送担体（トランスポーター）の関与と、その輸送機構が最近明らかになりつつある（Tsujii, A. and Tamai, I., Pharm. Res., 13, 963-977, 1996.）。これらのトランスポーターには、輸送される物質の構造認識能が備わっており、物質を選択的に輸送するが、比較的その構造認識が広いトランスポーターの場合、本来は生体異物である医薬品などについても誤認識し、積極的に細胞内へ輸送してしまうと考えられる。基本的に薬物の生体膜透過は、その分子サイズ、脂溶性、水素結合能などの物理化学的特性に依存する単純拡散に従っており、特にイオン性薬物の場合には、非解離型分子のみが pH-分配仮説に従って生体膜を透過すると考えられていた。しかし、細胞内外の効率的な物質交換活性が必要な小腸、腎尿細管、胎盤、脳脈絡叢の上皮細胞や、肝実質細胞、血液脳関門などでは、多くの薬物は単純拡散以外の特異的機構、つまりトランスポーターによる能動的な輸送により細胞膜を透過することが明らかとなってきた（玉井郁巳、辻彰：ファルマシア、31、493-497、1995.、齋藤秀之、乾賢一：医学のあゆみ、179、393-397、1996.、玉井郁巳：薬物動態、11、642-650、1996.）。例えば、非エステル型の経口用β-ラクタム抗生物質は生理的 pH においては両性または負に荷電し、脂溶性は極めて低いにも関わらず、腸管からの吸収は良好であることが知られている。単離膜小胞系を用いた輸送研究により、これらの薬物の吸収過程には、刷子縁膜に局在する H⁺ 駆動型ペプチドトランスポーターが関与していることが示されるようになった（Tsujii, A. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 241, 594-601, 1987.）。ペプチド輸送系は、ジあるいはトリペプチドを認識するが、テトラペプチド以上は認識できず、ペプチドサイズについては極めて厳密であるものの、非天然のアミノ酸からなるペプチドは認識するといった比較的広い基質認識性を持つ。β-ラクタム抗生物質のペプチドトランスポーターによる輸送も、やはりこの広い基質認識性ゆえの誤認識による輸送であり、臨床的にはそれを図らずも利用していたことになる（Tsujii, A., American Chemical Society (eds. Taylor, M. D., Amidon, G. L.), Washington, D. C., 101-134, 1995.）。さらには、脂溶性の高い脂肪酸のような物質の生体膜透過においても、トランスポーターが関与している可能性が報告されている（Schaffer, J. and Lodish, H., Cell 1, 79, 427-436, 1994.）。

20

30

40

ところで、様々なトランスポーターは各臓器、細胞が持つ生理的役割に応じて備わっているはずであり、その分布や機能には臓器特異性が期待される。従って、薬物動態に臓器選択性をもたらす手法としてトランスポーターを利用することが期待できる。すなわち、トランスポーターを利用した臓器特異的薬物デリバリー（DDS）が可能であると考えられる。また、脂溶性をあげることによる単純拡散に頼った薬物の吸収性改善は、肝臓における初回通過効果を増大させたり、臓器移行性を非特異的に増大させる可能性が高い。しかし、トランスポーターの基質特異性を利用したドラッグデザインを行うことにより、脂溶性とは無関係に薬物の吸収性を高めることも可能であると考えられる（林喜代美 他：Drug Delivery System、11、205-213、1996.）。この

50

ような目的のためには、多くのトランスポーターを分子レベルで同定し、その性質についての詳細な解析を行うことが必須であるが、トランスポーターはその生化学的な取り扱いの難しさと、機能測定の複雑さから、膜生理学的な研究の多さに比較し、分子レベルでの同定が非常に遅れている。

最近になり、外来遺伝子発現系であるアフリカツメガエル (*Xenopus*) 卵母細胞を用いた発現クローニング法によりいくつかのトランスポーターの cDNA がクローニングされるようになり、構造上の類似性が存在することが明らかになってきた (Fei, Y.-J. et al., *Nature*, 368, 563-566, 1994.)。例えば、1994年に Koepsell らによって、基底模型と推定される有機カチオントランスポーター OCT1 が発現クローニング法によってクローニングされた (Grundemann, D. et al., *Nature*, 372, 549-552, 1994.)。その後、OCT1 の配列をもとにしたホモロジークローニングによって OCT2 が同定された (Okuda, M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 500-507, 1996.)。OCT1 と OCT2 はお互いに 67% という非常に高い相同性を示す (Grundemann, D. et al., *J. Biol. Chem.* 272, 10408-10413, 1997.)。両者とも腎臓に強い発現が見られるが、OCT1 の場合はそれ以外にも肝臓、結腸、小腸に発現が存在するのに対し、OCT2 は腎臓に特異的であり、組織分布も異なっている。

トランスポーターについての分子レベルでの同定については、これら報告例を含めわずかであり、いまだ臨床上有用な多くの未知のトランスポーターが存在していると考えられる。

発明の開示

本発明は、新規なトランスポーター遺伝子ファミリーおよびそれら遺伝子がコードするタンパク質、並びにそれらの用途を提供することを課題とする。

本発明者等は、胎児組織に特異的、あるいはより強く発現している遺伝子 (fetal gene) の中には、癌をはじめとする各種疾患に関与する遺伝子が存在するとの作業仮説のもと、サブトラクション法によって作製した胎児遺伝子 (fetal gene) ライブラリーのランダムシークエンシングによるスクリーニングを行ってきた。本発明者等は、この過程において、有機カチオントランスポーター OCT1 および OCT2 と有意な相同性を示す未知の遺伝子の存在を見いだした。この遺伝子が新規のトランスポーターをコードしていることが予想されたことから、本発明者等は、その単離を試みた。その結果、ヒト胎児由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより目的の遺伝子を単離することに成功した。さらに、本発明者等は、単離したヒト遺伝子がコードするタンパク質のトランスポーター活性につき検討を行った。その結果、該タンパク質が実際に種々の有機カチオンのトランスポーターとして機能することを見いだした。また、本発明者らは、単離したヒト遺伝子に対応するマウス遺伝子を単離することにも成功した。

本発明は、新規なトランスポーター遺伝子ファミリーおよびそれら遺伝子がコードするタンパク質、並びにそれらの用途に関し、より具体的には、

(1) 配列番号：1、3、22 若しくは 27 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、またはこれらタンパク質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、

(2) 配列番号：2、4、23 若しくは 28 に記載の塩基配列からなる DNA にハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、

(3) (1) または (2) に記載のタンパク質をコードする DNA、

(4) (3) に記載の DNA が挿入されたベクター、

(5) (3) に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換体、

(6) (5) に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1) または (2) に記載のタンパク質の製造方法、

10

20

30

40

50

(7) (1) または (2) に記載のタンパク質に結合する抗体、

(8) 配列番号：2、4、23若しくは28に記載の塩基配列からなるDNAに特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNA、に関する。

本発明者等が単離した新規なヒトトランスポーターcDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：2（「ヒトOCTN1」と命名した）および配列番号：4（「ヒトOCTN2」と命名した）に示す。また、これらcDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：1および配列番号：3に示す。本発明のトランスポータータンパク質に含まれるこれら2つのタンパク質のアミノ酸配列は全体に渡り、76%程度という非常に高い相同性を示し、ともにグルコーストランスポーターなど様々なタイプのトランスポーターに存在するコンセンサス配列 [Leu, Ile, Val, Met, Ser, Thr, Ala, Gly] - [Leu, Ile, Val, Met, Phe, Ser, Ala, Gly] - Xaa<2>- [Leu, Ile, Val, Met, Ser, Ala] - [Asp, Glu] - Xaa- [Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Trp, Ala] - Gly-Arg- [Arg, Lys] - Xaa<4-6>- [Gly, Ser, Thr, Ala] (Maiden, M. C. et al., Nature, 325, 641-643, 1987.) を保持していた。実際に、これらタンパク質は、様々な有機カチオンを輸送する活性を有していた（実施例6から8参照）。

また、本発明者らは、上記「ヒトOCTN1」および「ヒトOCTN2」に対応するマウス遺伝子を単離した。単離したcDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：23（「マウスOCTN1」と命名した）と配列番号：28（「マウスOCTN2」と命名した）に、これらcDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：22と配列番号：27に示す。

本発明のトランスポータータンパク質としては、有機カチオンを輸送する活性を有すれば足り、該活性を有する限り有機カチオン以外の他の物質を輸送する活性をさらに有するものも含まれる。有機カチオンとしては、これらに制限されないが、例えば、TEA、カルニチン、キニジン、ピリラミンが挙げられる。また、抗がん剤であるアクチノマイシンD、エトポシド、ビンブラスチン、ダウノマイシンなどが挙げられる。本発明のトランスポータータンパク質としては、細胞外から細胞内へ有機カチオンを輸送する活性を有するもののみならず、細胞内から細胞外へ有機カチオンを輸送する活性を有するものも含まれる。

本発明のトランスポータータンパク質は、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することができる。組換えタンパク質は、例えば、後述するように本発明のタンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。一方、天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば、後述の本発明の抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、本発明のタンパク質の発現の高い腎臓やHeLa S3などの癌細胞株から単離することが可能である。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体であれば、例えば、本発明のタンパク質をウサギなどの小動物に免疫し血清を得て、これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティークラムなどにより精製することで調製することが可能である。また、モノクローナル抗体であれば、本発明のタンパク質をマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞にし、マウスミエロマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、本発明のタンパク質に対する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティークラムなどにより精製することで調製することが可能である。なお、得られた抗体を人体に投与する目的で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト型化抗体また

10

20

30

40

50

はヒト抗体を用いると有効である。抗体をヒト型化する方法としては、モノクローナル抗体生産細胞から抗体遺伝子をクローニングし、その抗原決定部位を既存のヒト抗体に移植するCDRグラフト法などが挙げられる。また、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウスを免疫して、通常モノクローナル抗体と同様に直接ヒト抗体を作製することもできる。

また、当業者であれば、公知の方法を用いて上記本発明のトランスポータータンパク質（「ヒトOCTN1」、「ヒトOCTN2」、「マウスOCTN1」、「マウスOCTN2」）中のアミノ酸の置換などを適宜行い、これらと同等の機能を有するタンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加により上記本発明のトランスポータータンパク質に対してアミノ酸配列が改変された改変体であって、これらタンパク質と同等の機能を有するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。ここで「同等の機能を有する」とは、タンパク質が有機カチオンを輸送する活性を有することを指す。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、PCRによる部位特異的変異誘発システム（GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland）、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発法（Kramer, W. and Fritz, HJ (1987) *Methods in Enzymol.*, 154:350-367）、Kunkel法（*Methods Enzymol.* 85, 2763-2766 (1988)）などが挙げられる。なお、アミノ酸の置換は、通常、10アミノ酸以内であり、好ましくは6アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。置換、欠失、付加がなされる部位は本発明のタンパク質の活性が保持される限り特に制限はない。タンパク質のトランスポーター活性は、例えば、後述の実施例6に記載の方法により検出することが可能である。

また、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術（Sambrook, J et al., *Molecular Cloning* 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989）などを用いて、上記本発明のトランスポータータンパク質（「ヒトOCTN1」、「ヒトOCTN2」、「マウスOCTN1」、「マウスOCTN2」）をコードするDNA配列またはその一部を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから本発明のトランスポータータンパク質と同等の機能を有するタンパク質を得ることも常套手段である。これら本発明のトランスポータータンパク質と同等の機能を有するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。ここで「同等の機能を有する」とは、タンパク質が有機カチオンを輸送する活性を有することを指す。ハイブリダイズするDNAを他の生物から単離する場合には、ヒトやマウス以外に、例えば、ラット、ウサギ、ウシなどが用いられ、特に腎臓などの組織が単離に適している。このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離されるDNAは、通常、上記本発明のトランスポータータンパク質をコードするDNAと高い相同性を有する。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて、少なくとも70%以上、好ましくは少なくとも80%以上、さらに好ましくは少なくとも90%以上の配列の同一性を指す。配列の相同性を決定するには、文献（Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) 80, 726-730）に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

このようなDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件の例を示せば、以下の如くである。即ち、「ExpressHyb Hybridization Solution」（CLONTECH社製）を用い、55℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、37℃から55℃で1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1xSSC、0.1% SDS中、37℃で20分の洗浄を1回行う。より好ましい条件としては、「ExpressHyb Hybridization Solution」（CLONTECH社製）を用い、60℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、60℃で1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1%

SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1xSSC、0.1% SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行う。さらに好ましい条件としては、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH社製)を用い、68℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、68℃で1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、0.1xSSC、0.1% SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行う。

また、本発明は、上記本発明のトランスポータータンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、cDNAであっても、ゲノムDNAでもよく、また合成DNAであってもよい。本発明のDNAは、例えば、本発明のタンパク質を組換えタンパク質として生産するために利用しうる。即ち、本発明のタンパク質をコードするDNA(例えば、配列番号: 2、4、23、28に記載の塩基配列からなるDNA)を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製することにより本発明のタンパク質を組換えタンパク質として調製することが可能である。組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、NIH3T3細胞などの哺乳類細胞、Sf9細胞などの昆虫細胞、酵母細胞、大腸菌(E. coli)が挙げられる。また、細胞内で組換えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、哺乳類細胞のベクターとしてはpcDNA3(Invitrogen社製)やpEF-BOS(Nucleic Acid Res. 1990, 18(17), p5322)などが、昆虫細胞のベクターとしては「BAC-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL社製)などが、酵母細胞のベクターとしては「Pichia Expression Kit」(Invitrogen社製)などが、大腸菌のベクターとしてはpGEX-5X-1(Pharmacia社製)、「QIAexpress system」(Qiagen社製)などが挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリポソームDOTAP(ベーリンガー・マンハイム社製)を用いた方法、エレクトロポレーション法、塩化カルシウム法などを用いて行うことができる。得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、常法、例えば、文献「The Qiaexpressionist handbook, Qiagen, Hilden, Germany」記載の方法を用いて行うことが可能である。

また、本発明は、本発明のタンパク質をコードするDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNAに関する。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他のタンパク質をコードするDNAとクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを指す。このようなDNAは、本発明のタンパク質をコードするDNAを検出、単離するためのプローブとして、また増幅するためのプライマーとして利用可能である。

本発明の応用としては、本発明のトランスポータータンパク質を利用した、薬物の体内吸収、体内動態の制御が挙げられる。本発明のトランスポータータンパク質の基質特異性を詳細に解析することにより、このトランスポーターによって輸送され得る薬剤のドラッグデザインが可能であり、これにより本発明のトランスポータータンパク質を介して薬物の体内吸収を高めることができると考えられる。デザインされる薬物には従来の脂溶性をあげるような修飾は不要であるため、水溶性の扱いやすい薬物が迅速かつ効率的に開発できるようになると考えられる。また開発された薬物の吸収は基本的に本発明のトランスポータータンパク質の生体内分布に従うと考えられるため、臓器特異的な薬物の送達が可能である。特に本発明のトランスポータータンパク質の体内分布が、標的臓器と一致するような薬物の場合、理想的なドラッグデリバリーシステム(DDS)となると考えられる。また、他のトランスポーターによる薬物の吸収を期待しているが、本発明のトランスポータータンパク質による吸収は望ましくない場合、本発明のトランスポータータンパク質の基

10

20

30

40

50

質特異性を考慮に入れたドラッグデザインを行うことにより、他のトランスポータータンパク質に選択的な薬物の創造が行えると考えられる。本発明のトランスポータータンパク質は腎臓に存在するため、逆に本発明のトランスポータータンパク質によって体外へ排出されやすい薬物を設計することにより、腎毒性等を軽減することも可能である。

また、他の本発明の応用としては、本発明のトランスポータータンパク質を標的とした薬物の開発が考えられる。栄養物質や薬物の吸収機構として、あるいは薬物や生体内代謝物の排泄機構としてのトランスポーターの重要性を考えると、その機能が損なわれること、または異常に亢進することによって起因する疾患が存在すると考えられる。そのような疾患に対しては、本発明のトランスポータータンパク質の機能を阻害、あるいは亢進する化合物や、本発明のトランスポーター遺伝子の発現量や、タンパク量を調節するような化合物を薬剤として用いると効果的であると考えられる。さらに、本発明のDNAを利用して、本発明のタンパク質の活性異常や発現量異常に起因する疾患に対する遺伝子治療を行うことも考えられる。遺伝子治療に用いる場合には、本発明のDNAをアデノウイルスベクター（例えば、pADEXLcw）やレトロウィルスベクター（例えば、pZIPneo）などに挿入して、生体内に投与する。投与方法は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。また、アンチセンス合成DNAを生体内に直接、または上記ベクターに挿入して投与して治療を行うことも考えられる。

特に、本発明のトランスポータータンパク質に含まれる「OCTN2」は、カルニチンを効率よく輸送する活性を有するため、低カルニチン血症を原因とする脂肪肝、心筋症、骨格筋症などの病態に対し、「OCTN2」の活性を制御する化合物による治療、あるいは「OCTN2」遺伝子を用いた遺伝子治療等が有効であると考えられる。

本発明のトランスポータータンパク質は種々の癌細胞株において発現しており、腫瘍細胞において本発明のトランスポータータンパク質が薬物を細胞内へ輸送し得る可能性がある。この場合には、本発明のトランスポータータンパク質によってより吸収されやすい抗腫瘍薬が創造できると考えられる。あるいは逆に、本発明のトランスポータータンパク質による物質の細胞外へ輸送、排出する機構が、腫瘍細胞においては抗腫瘍剤の排出として働き、腫瘍細胞が薬剤に対する抵抗性を獲得する可能性も考えられる。本発明のトランスポータータンパク質が腫瘍の薬剤耐性機構に関与しているならば、本発明のトランスポータータンパク質阻害剤を抗腫瘍剤と併用することにより、抗腫瘍効果を強化できると考えられる。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] サブトラクションライブラリーの作製

サブトラクションライブラリーはPCR-SelectTM cDNA Subtraction kit (CLONTECH社製)を用い、Luda Diatchenkoらの方法(Diatchenko, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 6025-6030, 1996.)に基本的に従って作製した。

まずヒト胎児肝臓由来polyA⁺ RNA及びヒト成人肝臓由来polyA⁺ RNAよりMMLV逆転写酵素を用いた標準的な方法で二本鎖cDNAを合成した。つぎにT4

DNAポリメラーゼによりこのcDNA末端を平滑化し、さらにRsaIにより切断した。胎児肝臓由来cDNA（テスター）の一部を2分割し、アダプター1とアダプター2（表1）をそれぞれ別々にライゲートした。これにそれぞれ120倍量の成人肝臓由来cDNA（ドライバ）を加え、熱変性を行ったあと68℃で8時間の1次ハイブリダイゼーションを行った。つぎにこれを熱変性せずに混合し、さらに熱変性した過剰量のドライバを加え68℃で約16時間の2次ハイブリダイゼーションを行った。これを希釈用バッファーにて希釈し、75℃で7分インキュベートし、アダプターの短い方の鎖を取り除いたものをPCRの鋳型として用いた。アダプターに対応するプライマーであるPCRプライマー1（5'-CTAATACGACTCAGTATAGGGC-3'／配列番号：5）、2（5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAA-3'／配列番号：6）

を用いたPCRを行うことにより、両端に異なるアダプターを持ったcDNA（サブトラクトされたcDNA）のみを選択的に増幅した（サブプレッションPCR）。この一部を鋳型とし、PCRプライマー1、2のさらに内側に位置するプライマーであるNested PCRプライマー1（5'-TCGAGCGGGCCGCCCGGGCAGGT-3'／配列番号：7）と2（5'-AGGGCGTGTTGCGGAGGGCGGT-3'／配列番号：8）を用いたPCRを行うことにより、さらに選択性を増した生成物を得た。この生成物をQIAquick PCR Purification kit（QIAGEN社製）を用いて精製し、pT7Blue-Tベクター（Novagen社製）にTAクローニング法によりクローニングし、サブトラクションライブラリーとした。

【表1】

10

アダプター1 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3'
3'-GGCCCGTCCA-5'

アダプター2 5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGCAGGGCGGT-3'
3'-GCCTCCCGCCA-5'

20

【実施例2】 cDNAクローニング

胎児遺伝子の解析を目的に、胎児肝臓由来サブトラクションライブラリーの、ランダムシーケンシングによるスクリーニングを行った。得られたEST（Expressed Sequence Tag）のホモロジーサーチ（Blastx）による解析から、既知の有機カチオントランスポーターであるOCT1（Grundemann, D. et al., Nature, 372, 549-552, 1994.）、OCT2（Okuda, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 224, 500-507, 1996.）と有意な相同性を示すアミノ酸配列をコードするクローン、「OCTN1（fls631）」（292bp）が見いだされた。このクローンの配列は新規なものであり、新規のトランスポーター遺伝子由来の断片である可能性が推測されたことから、この遺伝子の全オープンリーディングフレーム（ORF）を含むcDNAのクローニングを行った。

30

胎児肝臓由来サブトラクションライブラリーより得られた「OCTN1」オリジナルクローンをプローブとし、human fetal liver 5'-stretch cDNAライブラリー（CLONTECH社製）のスクリーニングを行った。「OCTN」オリジナルクローンのインサートを、M13 P4-22とM13 P5-22を用いたPCRにより増幅し、これをReady-to-Go DNA labelling beads（Pharmacia社製）を用いたランダムプライマー法により $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPでラベルし、プローブとした。ハイブリダイゼーションはExpressHyb Hybridization Solution（CLONTECH社製）中、68℃で、メーカー推奨の方法に従い行った。また、最終的な洗浄は、0.1 X SSC, 0.1% SDS、50℃で行った。約 5×10^5 個のファージクローンをスクリーニングしたところ、最終的に7個の陽性クローンが単離された。これらのクローンのインサートcDNAをλgt10ベクターの配列より設計したベクタープライマー（GT10 S1 5'-CTTTTGAAGCAAGTTCAGCCT-3'／配列番号：9, GT10 A1 5'-AGAGGTGGCTTATGAGTATTTCTT-3'／配列番号：10）、あるいは解読されたcDNAの配列より設計したプライマーを用いたPCRによって増幅し、その産物を直接シーケンシングすることにより、塩基配列を決定した。一部の増幅が困難な領域については7-deaza dGTPを基質塩基として用いたPC

40

50

Rによる増幅を行った (McConlogue, L. et al., *Nucleic Acids Res.* 16, 9869, 1988.)。

これらのクローンのインサートcDNAの塩基配列を決定した結果、「ヒトOCTN1」遺伝子は、551アミノ酸(推定分子量約62,000)からなるORFをコードし得る配列を持つことが明らかとなった。この全アミノ酸配列を用いてデータベースサーチを行ったところ、全体に渡ってOCT1及びOCT2と有意な相同性(約34%)を示すことが確認された。また、Kyte & Doolittleの計算式(Kyte, J. and Doolittle, R. F., *J. Mol. Biol.* 157, 105-132, 1982.)によって得られる疎水性プロファイルは、OCT1およびOCT2のものと非常に類似しており、11-12個の膜貫通領域と思われる疎水性領域が認められた(図1)。

また、この配列中には1個の糖トランスポーターのコンセンサス配列([Leu, Ile, Val, Met, Ser, Thr, Ala, Gly] - [Leu, Ile, Val, Met, Phe, Ser, Ala, Gly] - Xaa<2> - [Leu, Ile, Val, Met, Ser, Ala] - [Asp, Glu] - Xaa - [Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Trp, Ala] - Gly - Arg - [Arg, Lys] - Xaa<4-6> - [Gly, Ser, Thr, Ala])が存在した(160-175)。このコンセンサス配列は、哺乳類細胞におけるグルコースのトランスポーターであるGLUT1~GLUT7に存在するコンセンサス配列であり、グルコーストランスポーター以外にも、様々なタイプのトランスポーターに存在することが知られている(Maiden, M. C. et al., *Nature*, 325, 641-643, 1987.)。

「ヒトOCTN1」のアミノ酸配列中には、さらに、N型糖鎖が付加され得る配列(N-X-[ST])が4箇所(57-59, 64-66, 91-93, 304-306)見られる。また、プロテインキナーゼCによるリン酸化を受け得るサイト([ST]-X-[RK])も5箇所(164-166, 225-227, 280-282, 286-288, 530-532)存在した。さらに、ATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列([Ala, Gly]-Xaa(4)-Gly-Lys-[Ser, Thr])も存在する。このATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列はキナーゼやrasファミリータンパク等のATP結合タンパク、あるいはGTP結合タンパク質に存在し、この部位にATP, GTPが結合することが知られている(Walker, J. E. et al., *EMBO J.*, 1, 945-951, 1982)。また、ABC(ATP Binding Cassette)型トランスポーターと呼ばれるトランスポーターにはこの配列が存在し、ATPを加水分解することによるエネルギーを用いて物質を輸送していることが示されている(Higgins, C. F. et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, 22, 571-592, 1990; Urbatsch, I. L. et al., *J. Biol. Chem.*, 270, 26956-26961, 1995)。

このコンセンサス配列の存在により、「OCTN1」タンパク質がATPあるいはGTP依存的な輸送を行うトランスポーターである可能性も考えられる。

なお、塩基配列の決定は、アルカリSDS法によって調製したプラスミドDNA、またはコロニーPCRなどによるPCR産物を鋳型とし、ABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit With AmplyTaq DNA Polymerase, FSを用いたサイクルシーケンシング法により行い、ABI 377 DNA Sequencer(PerkinElmer社製)により解読した。コロニーPCRは、ベクタープライマーであるM13 P4-22(5'-CCAGGGTTTTCCTCCAGTCACGAC-3'/配列番号:11)及びM13 P5-22(5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'/配列番号:12)を含むPCR反応溶液の中に、組み換え体を持つコロニーを直接懸濁することにより行った。PCR反応後、増幅されたインサートDNAから、ゲル濾過法などにより未反応のプライマー、ヌクレオチド等を除き、シーケンシングの鋳型として用いた。

[実施例3] ノーザン解析

10

20

30

40

50

「ヒトOCTN1」の組織分布をノーザン解析により調べた(図2)。「ヒトOCTN1」の3'側断片(約1,100番目の塩基より後半)を、Ready-to-Go DNA Labelling beads (Pharmacia社製)を用いたランダムプライマー法により $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ でラベルし、プローブとして用いた。Multiple Tissue Northern (MTN) Blot-Human, Human I II, Human IV, Human Fetal I I, Human Cell line (CLONTECH社製)を用い、ExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH社製)中で、メーカー推奨の方法に従い、68℃でハイブリダイゼーションを行った。最終的な洗浄は、0.1 X SSC, 0.1% SDS、50℃で行った。その結果、胎児では肝臓に、そして成人由来の臓器では、腎臓、骨髄、気管に約2.5 kbの強い発現が観察された。それ以外には胎児の腎臓、肺、そして成人の骨格筋、肺、胎盤、前立腺、脾臓、脊髄に弱い発現が見られた。また、腫瘍細胞株においてもHeLa S3、K562、SW480、A549に発現が認められ、特にHeLa S3においては非常に強く発現していることが明らかとなった。

[実施例4] 「ヒトOCTN2」のcDNAクローニング

「ヒトOCTN1」の全塩基配列を用いたデータベースサーチより、ヒト5番染色体q領域由来P1ファージクローン(P1 H24クローン。GenBank accession No. L43407, L43408, L46907, L81773, L43409)の塩基配列の一部に、「ヒトOCTN1」の配列と非常に類似した配列が含まれていることを見いだした。「ヒトOCTN1」の塩基配列と類似性がある部分は、全く類似性を持たない配列によって分断されているが、これを「ヒトOCTN1」の配列を参考にするにより連結してみると、「ヒトOCTN1」と広い領域に渡って高い相同性を持つ配列になることがわかった。このことから、「OCTN1」ホモログが存在することが示唆された。しかしデータベースに登録されているゲノム配列は全コーディング領域をカバーしていない不完全なものであったため、この配列からだけでは、そこにコードされるタンパク質の完全な構造を知ることは不可能であった。そこでこの「OCTN1」ホモログ遺伝子(「OCTN2」)のcDNAクローニングを行い、コードされるタンパクの構造を決定した。まず、これらのP1ファージクローンの配列より631R S4プライマー(5'-GTGCTGTTGGGCTCCTTCAATTTCA-3' / 配列番号: 13)及び631R A1プライマー(5'-AGCTGCATGAAGAGAAGGACACTG-3' / 配列番号: 14)を作製し、ヒト成人腎臓由来polyA⁺ RNA (CLONTECH社製)より合成したcDNAを鋳型に、94℃で3分、「94℃で30秒、58℃で1分、72℃で2分」を35サイクル、72℃で10分という条件によるPCRを行ったところ、約900 bpの断片が増幅された。この断片をpT7Blue-Tベクター(Novagen社製)にTAクローニング法によりサブクローニングし、塩基配列を決定したところ、全体に渡り「ヒトOCTN1」と非常に高い相同性を有することが明らかとなった。そこでこの遺伝子を「ヒトOCTN2」と命名し、さらに長いcDNAのクローニングを行った。

このクローンのインサートをプローブとして用い、「ヒトOCTN1」cDNAクローニングの場合と同様な方法でヒト腎臓由来cDNAライブラリーをスクリーニングし、より長いクローンを単離していく操作、及びRACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法(Chenchik, A., Moqadam, F., and Siebert, P. (1995) CLONTECHniques X, 5-8)等により、「ヒトOCTN2」の全コーディング領域を含むcDNAをクローニングしその構造を決定した(配列番号: 4)。RACE法は具体的には、次のように行った。631R S6プライマー(5'-AGCATCCTGTCTCCCTACTTCTCGTT-3' / 配列番号: 15)を作製し、ヒト成人腎臓由来Marathon-ReadyTM cDNA (CLONTECH社製)を鋳型として、94℃で2分、「94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分」を35サイクル、72℃で10分という条件のPCRを行ったところ、約1.7 kbの3'側cDNA断片が増幅され、これをpT7Blue

10

20

30

40

50

ーTベクターにTAクローニング法によりサブクローニングし、構造を決定した。

「ヒトOCTN2」は557アミノ酸からなるORFをコードしていることが明らかとなった。「ヒトOCTN1」と「ヒトOCTN2」のアミノ酸配列の比較を図3に示す。両者は全体に渡り、約76%という非常に高い相同性を示した。また「ヒトOCTN2」アミノ酸配列中には「ヒトOCTN1」と同様に1個の糖トランスポーターのコンセンサス配列(160-176)が存在した。これらのことより、「OCTN2」は「OCTN1」と構造上の関連を持った新規トランスポーターである可能性が示唆された。また、「ヒトOCTN2」アミノ酸配列中にも、「ヒトOCTN1」と同様にATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列(218-225)が存在した。

[実施例5] ノーザン解析

631R S4プライマー(5'-GTGCTGTTGGGCTCCTTCAATTTCA-3' / 配列番号: 13)及び631R A1プライマー(5'-AGCTGCATGAAGAGAAAGGACACTG-3' / 配列番号: 14)を用いたPCRによって得られた約900bpの「ヒトOCTN2」cDNAをプローブとし、「ヒトOCTN1」と同様にノーザン解析を行った。その結果を図4に示す。発現パターンは「ヒトOCTN1」のパターンと重複している部分があるが、胎児組織において腎臓に非常に強い発現が見られる点が特に異なっていた。また、「ヒトOCTN2」もまたK-562, HeLaS3, SW480等の癌細胞株で強く発現していることが判明した。これらの癌細胞において、「OCTN1」、「OCTN2」が抗癌剤などの物質の輸送に関与している可能性が示唆される。

[実施例6] 「ヒトOCTN1」のヒト胎児腎臓細胞(HEK293)での強制発現と活性測定

プラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングによって得られた陽性ファージクローンより、QIAGEN Lambda Kit (QIAGEN社製)を用いてファージDNAを抽出した。インサートDNAをpUC18ベクターにサブクローニングした後、SmaI及びEcoRIで切り出される全ORFを含むcDNAを、哺乳類細胞用の発現ベクターであるpcDNA3 (Invitrogen社製)のEcoRIサイトと、平滑末端化したHindIIIサイトとの間へ組み込み、発現用プラスミドDNA、「pcDNA3/OCTN1」を得た。プラスミドDNAは、QIAGEN PLASMID MAXI Kit (QIAGEN社製)を用いたアルカリ-SDS法で調製した。

pcDNA3/OCTN1、及びコントロールとしてインサートを含まないpcDNA3ベクターを、リン酸カルシウム法によりヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293細胞に導入した。すなわち、プラスミドDNA10µg、Hepes緩衝液(137mM NaCl, 5mM KCl, 0.7mM Na₂HPO₄, 36mM Dextrose, 21mM Hepes pH7.1)1ml、2M CaCl₂ 62.5µlを混合し、30分以上室温で静置することによりリン酸カルシウム共沈物を生成させた。10cmプレート1枚あたり1.5x10⁶個の細胞を蒔き、24時間培養した後、先のリン酸カルシウム共沈物を加え24時間培養し、その後PBS (Phosphate buffered saline)でプレートを洗浄し、培地を加えさらに24時間培養した。

プラスミドDNAを導入した細胞、あるいは未処理の細胞を用いて以下の手順に従ってトランスポート実験を行った。プレートからラバーポリスマンを用いて細胞をはがし、トランスポート緩衝液(125mM NaCl, 4.8mM KCl, 5.6mM (+)-glucose, 1.2mM CaCl₂, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄, 25mM Hepes pH7.4)に懸濁し、20分間プレインキュベーションを行った。ついで各種基質のラベル体([¹⁴C]TEA<テトラエチルアンモニウム>(NEN)、[³Hカルニチン<L-カルニチン ヒドロクロリド>(Amersham社製)、[³H]PCG<ベンジルペニシリン>(Amersham)、[³H]キニジン(ARC)、[³H]ピリラミン<メピラミン>(Amersham社製))を適量添加し、37℃にて一定時間インキュベーションを行った。これを、3M KCl層の上にシリコンオイルと液体パラフィンの混合物(比重=1.022)を重層して作製したシリ

10

20

30

40

50

コンレイヤー上に重層し、遠心することにより細胞を分離した。細胞の放射活性を測定し、細胞内へのトランスポート能とした。なお、この際、 1×10^6 個の細胞を1ポイントとして用いた。また、HEK293細胞の培養は、ダルベッコMEM、10% FCS（ウシ胎児血清）を培地とし、5% 二酸化炭素中、37℃で行った。

まず、TEAを基質として用い、p c DNA 3/OCTN1を導入した細胞と、未処理の細胞におけるトランスポート能を測定した（図5）。その結果、反応時間に依存した明らかな「ヒトOCTN1」導入細胞内へのTEAの取り込みが観察された。この取り込みは、未処理細胞においては見られなかった。次に、この系にラベル体ではないTEAを追加することによるコールドインヒビションの実験を行った（図6）。加えるコールドのTEAの濃度に応じて明らかな見かけ上の取り込みの低下が観察された。この実験においてはインサートを含まないp c DNA 3ベクターを導入した細胞（Mock）をコントロールとしたが、未処理の細胞を用いた場合と同様に、ほとんど細胞内への基質の取り込みは認められず、この取り込み現象が「ヒトOCTN1」を導入したことによることが明らかとなった。次に、「ヒトOCTN1」のTEAに対するKm（ミカエリス定数）値を求めるために、様々な濃度の $[^{14}\text{C}]$ TEAを加えた場合の取り込み量を測定した（図7）。「ヒトOCTN1」を導入した細胞における取り込み量からMockの取り込み量を差し引いた正味の取り込み量をLineweaver-Burk逆数プロットすることにより、Km値は $0.44 \pm 0.04 \text{ mM}$ であることが求められた。また反応の最大速度Vmaxは $6.68 \pm 0.34 \text{ (nmol/3 min/mg)}$ であることが求められた。次に、TEA以外の物質に対する輸送能を検討した（図8）。有機カチオンであるカルニチン、キニジン、ピリラミンのラベル体を用い輸送能を測定したところ、Mockに対し明らかに有意な取り込み量の増加が観察され、これらの有機カチオンは「ヒトOCTN1」の基質になりうるということが明らかとなった。しかし、有機アニオンであるPCG（ベンジルペニシリン）に対しては取り込み量の有意な増加は認められなかった。

〔実施例7〕 Xenopus卵母細胞を用いた「ヒトOCTN1」の活性測定
p c DNA 3/OCTN1を鋳型とし、T7 RNAポリメラーゼによりcRNAをin vitroで合成した。これを 0.3 ng/nl に希釈し、 50 nl （ 15 ng ）を一つの卵母細胞にインジェクションした。対照としては、蒸留水 50 nl をインジェクションした。この卵母細胞を3日間培養し、トランスポート実験に用いた。アップテイク緩衝液（ 0.05% Tween 80, 100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM Hepes pH7.4）中、25℃で20分卵母細胞をプレインキュベートした後、 0.5 ml のラベル体を含むアップテイク緩衝液中に移し、取り込みを開始した。25℃、1時間インキュベートした後、氷冷したアップテイク緩衝液で3回洗浄することにより反応を止めた。5% SDSで卵母細胞を可溶化した後、クリアゾルI（液体シンチレーションカウンター用カクテル） 3 ml と混合し、放射活性を測定した。また、インキュベーション時のラベル体を含んだアップテイク緩衝液（外部液） $10 \mu\text{l}$ の放射活性も同様に測定した。卵母細胞中の放射活性（dpm値）と、外部液中の放射活性（dpm値）の比を取り込み活性とした。

Xenopus卵母細胞を用いたトランスポート実験の結果、この系においても「ヒトOCTN1」はTEAの輸送能を示すことが明らかとなった（図9）。また、TEA以外にもキニジン、メピラミン、カルニチンといった有機カチオンを輸送する能力があることが判明した。

次に、抗癌剤などに対する輸送能を検討した。その結果、「ヒトOCTN1」はアクチノマイシンD、エトポシド、ビンブラスチン、ダウノマイシンを輸送する活性があることが明らかとなった（図10）。これらは実際に臨床において抗癌剤として使用されている薬剤であるが、これらの薬剤の細胞内への移行メカニズム（細胞への吸収メカニズム）において「OCTN1」が関与している可能性があることが強く示唆される。このことから、「OCTN1」により認識されやすいといった、このトランスポートの基質特異性を利用した薬剤を設計、スクリーニングすることにより、より細胞内への吸収性が高い、有用な薬剤を効率よく開発することが可能になると考えられる。

10

20

30

40

50

〔実施例 8〕 「ヒト OCTN2」の HEK 細胞での強制発現と活性測定

「ヒト OCTN2」の哺乳類細胞における発現用プラスミド DNA は以下のようにして作製した。ヒト胎児腎臓由来 polyA⁺ RNA (CLONTECH 社製) より、SuperScriptTM II (GIBCO BRL 社製) 逆転写酵素を用い、一本鎖 cDNA を合成した。これを鋳型とし、以下の条件で PCR を行い、それぞれ「ヒト OCTN2」の 5' 側断片、及び 3' 側断片を増幅した。

「ヒト OCTN2」の 5' 側断片 (約 800 bp) の増幅には、OCN2-3 プライマー (5'-GATGGATCCCGGACGGTCTTGGGTCGCCCTGCTG-3' / 配列番号: 16) および OCN2-4 プライマー (5'-GATGGATCCAAATGCTGCCACATAGTTGGAGAT-3' / 配列番号: 17) を用いた。DNA ポリメラーゼ ExTaq (TaKaRa) および dNTP として「150 μM 7-deaza dGTP, 50 μM dGTP, 200 μM dATP, 200 μM dTTP, 200 μM dCTP」を用い、94℃で2分、「94℃で30秒、63℃で1分、72℃で2分」を35サイクル、72℃で10分の条件で PCR を行った。また、「ヒト OCTN2」3' 側断片 (約 1.2 kbp) の増幅には、OCN2-7 プライマー (5'-GATGGATCCATGGGCATGCAGACAGGCTTCAGC-3' / 配列番号: 18) および OCN2-8 プライマー (5'-GATGGATCCTTCTCTCTCAGTTTCTCCCTTACT-3' / 配列番号: 19) を用いた。DNA ポリメラーゼ ExTaq (TaKaRa 社製) および dNTP として「200 μM dGTP, 200 μM dATP, 200 μM dTTP, 200 μM dCTP」を用い、94℃で2分、「94℃で30秒、63℃で30秒、72℃で2分」を35サイクル、72℃で10分の条件で PCR を行った。

これらの断片をアガロースゲル電気泳動後にゲルから切り出して精製し、それぞれ pT7Blue-T ベクターにサブクローニングした。シークエンシングすることにより PCR エラーのないクローンを選び、両クローンを、重複する領域に存在する PstI サイトによって連結した。これを最終的に pcDNA3 ベクターの BamHI サイトに組み込み、発現用プラスミド DNA 「pcDNA3/OCTN2」とした。

pcDNA3/OCTN2 を、インサートを含まない pcDNA3 ベクター (Mock) 及び pcDNA3/OCTN1 と共に実施例 6 で示した方法により HEK 細胞に導入し、トランスポート実験を行った。その結果、「ヒト OCTN2」はカルニチンを非常に効率よく輸送する活性を持つことが判明した (図 11)。一方「ヒト OCTN2」は、「ヒト OCTN1」が効率よく輸送する TEA をほとんど輸送せず、両者には明らかな基質特異性があることが明らかとなった。

次にトランスポート緩衝液中の Na イオンを K に変更した緩衝液を用い、「ヒト OCTN2」のカルニチン輸送における Na 依存性を調べた (図 12)。その結果、「ヒト OCTN2」のカルニチンの輸送は完全に Na の存在に依存していることが明らかとなった。このことから、「OCTN2」は Na と基質を共輸送するタイプのトランスポーターであることが示唆された。

〔実施例 9〕 「マウス OCTN1」のクローニング

「ヒト OCTN1」cDNA 配列を用いデータベースサーチを行ったところ、これと非常に高い相同性を有するいくつかのマウス由来 EST (Expressed Sequence Tags) が見いだされた。これらの EST の配列から MONL-1 プライマー (5'-CGCGCCGAATCGCTGAATCCTTTTC-3' / 配列番号: 20) および MONA-4 プライマー (5'-AGGCTTTTGTGATTTGTTCTGTTGAG-3' / 配列番号: 21) を作製し、マウス腎臓由来 polyA⁺ RNA より作製した cDNA を鋳型として PCR を行った。その結果、約 2 kbp の断片が増幅され、これをアガロース電気泳動後切り出して精製し、pT7Blue-T ベクター (Novagen 社製) に TA-cloning 法によってサブクローニングした。複数のクローンをシークエンシングし、「マウス OCTN1」の配列を決定した。決定した cDNA の塩基配列を配列番号: 23 に、該 cDNA がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:

22に示す。

【実施例10】 「マウスOCTN2」のクローニング

まず、「ヒトOCTN2」cDNAの配列よりMONB 20プライマー（5'-CCCATGCCAAACAAGGACAAAAAGC-3'／配列番号：24）を作製し、マウス腎臓由来Marathon-ReadyTM cDNA（CLONTECH社製）を鋳型とした5'-RACE（Rapid Amplification of cDNA Ends）により、このプライマーより5'側上流をクローニングした。次に、「ヒトOCTN2」配列を用いデータベースサーチをすることにより、これと非常に高い相同性を有するマウス由来ESTをいくつか見いだし、これらのESTの配列からMONB 26プライマー（5'-ACAGAACAGAAAAAGCCCTCAGTCA-3'／配列番号：25）を作製した。5'-RACEによって得られた配列からMONB 6プライマー（5'-TGTTTTTCGTGGGTGTGCTGATGG-3'／配列番号：26）を作製し、これとMONB 26プライマーを用いたPCRにより、3'側断片をマウス腎臓由来polyA⁺ RNAより作製したcDNAより増幅した。それぞれの断片をサブクローニングした後、あるいは直接にシーケンシングすることにより「マウスOCTN2」の配列を決定した。決定したcDNAの塩基配列を配列番号：28に、該cDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：27に示す。

10

【実施例11】 「マウスOCTN1」および「マウスOCTN1」の組織発現解析

「マウスOCTN1」および「マウスOCTN2」遺伝子の各組織における発現量をマウスMTC（Multiple Tissue cDNA）パネル（CLONTECH社製）を用いたRT-PCR法により調べた（図13）。用いたプライマーは、「マウスOCTN1」については「MONL 1」および「MONA 4」、「マウスOCTN2」については「MONB 6」および「MONB 26」である。その結果、「マウスOCTN1」は腎臓や肝臓に、「マウスOCTN2」は腎臓、肝臓および7日目の胚に高い発現が認められた。

20

産業上の利用の可能性

本発明により、有機カチオンを輸送する新規なトランスポーター遺伝子ファミリーおよびこれら遺伝子がコードするタンパク質が提供された。本発明のトランスポータータンパク質は、これを介して輸送される新規なデザインの薬物の開発や、その機能異常などに起因する疾患の治療薬の開発などに有用である。

30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

株式会社 中外分子医学研究所

<120> TRANSPORTER GENES

10

トランスポーター遺伝子

<130> C2-906DP1PCT

<140>

<141>

20

<150> JP 9-260972

JP 10-156660

<151> 1997-9-8

1998-5-20

30

<160> 28

<210> 1

<211> 551

<212> PRT

40

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Ile Ala

1

5

Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu

10

15

20

25

10

Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn Gly Phe Asn Gly Met Ser Val Val Phe

30

35

40

Leu Ala Gly Thr Pro Glu His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn

45

50

55

20

Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn Asn Ser Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp

60

65

70

Gly Arg Glu Val Pro His Ser Cys Ser Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile

75

80

85

30

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

90

95

100

105

Gly Gln Leu Glu Gln Glu Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln

110

115

120

40

Asp Val Tyr Leu Ser Thr Val Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu

125

130

135

Asp Asn Trp Lys Val Pro Leu Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val

140

145

150

10

Leu Leu Gly Ser Phe Val Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg

155

160

165

Lys Asn Val Leu Phe Ala Thr Met Ala Val Gln Thr Gly Phe Ser Phe

170

175

180

185

20

Leu Gln Ile Phe Ser Ile Ser Trp Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val

190

195

200

Ile Val Gly Met Gly Gln Ile Ser Asn Tyr Val Val Ala Phe Ile Leu

205

210

215

30

Gly Thr Glu Ile Leu Gly Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu

220

225

230

Gly Val Cys Thr Phe Phe Ala Val Gly Tyr Met Leu Leu Pro Leu Phe

235

240

245

40

Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val

250

255

260

265

Pro Gly Val Leu Cys Val Pro Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro

270

275

280

Arg Trp Leu Ile Ser Gln Arg Arg Phe Arg Glu Ala Glu Asp Ile Ile

285

290

295

10

Gln Lys Ala Ala Lys Met Asn Asn Thr Ala Val Pro Ala Val Ile Phe

300

305

310

Asp Ser Val Glu Glu Leu Asn Pro Leu Lys Gln Gln Lys Ala Phe Ile

315

320

325

20

Leu Asp Leu Phe Arg Thr Arg Asn Ile Ala Ile Met Thr Ile Met Ser

330

335

340

345

Leu Leu Leu Trp Met Leu Thr Ser Val Gly Tyr Phe Ala Leu Ser Leu

350

355

360

30

Asp Ala Pro Asn Leu His Gly Asp Ala Tyr Leu Asn Cys Phe Leu Ser

365

370

375

Ala Leu Ile Glu Ile Pro Ala Tyr Ile Thr Ala Trp Leu Leu Leu Arg

380

385

390

40

Thr Leu Pro Arg Arg Tyr Ile Ile Ala Ala Val Leu Phe Trp Gly Gly

395	400	405	
Gly Val Leu Leu Phe Ile Gln Leu Val Pro Val Asp Tyr Tyr Phe Leu			
410	415	420	425
Ser Ile Gly Leu Val Met Leu Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Phe			10
	430	435	440
Ser Met Leu Tyr Val Phe Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Leu Val Arg			
	445	450	455
Asn Met Ala Val Gly Val Thr Ser Thr Ala Ser Arg Val Gly Ser Ile			20
	460	465	470
Ile Ala Pro Tyr Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asn Arg Met Leu Pro			
	475	480	485
Tyr Ile Val Met Gly Ser Leu Thr Val Leu Ile Gly Ile Phe Thr Leu			30
490	495	500	505
Phe Phe Pro Glu Ser Leu Gly Met Thr Leu Pro Glu Thr Leu Glu Gln			
	510	515	520
Met Gln Lys Val Lys Trp Phe Arg Ser Gly Lys Lys Thr Arg Asp Ser			40
	525	530	535

Met Glu Thr Glu Glu Asn Pro Lys Val Leu Ile Thr Ala Phe

540

545

550

<210> 2

<211> 2135

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> CDS

<222> (147)..(1799)

<400> 2

20

ccccggttc ggeccccaat tttaacagc ctgectgtcc cccgggaacg tttaacatc 60

cttggggagc gccccageta caagacactg tctgagaac getgtcatca cccgtagttg 120

caagtttcgg agcggcagtg ggaagc atg cgg gac tac gac gag gtg atc gcc 173

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Ile Ala

30

1

5

ttc ctg ggc gag tgg ggg ccc ttc cag cgc etc atc ttc ttc ctg etc 221

Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu

10

15

20

25

agc gcc agc atc atc ccc aat ggc ttc aat ggt atg tca gtc gtg ttc 269

40

Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn Gly Phe Asn Gly Met Ser Val Val Phe

30

35

40

ctg gcg ggg acc ccg gag cac cgc tgt cga gtg ccg gac gcc gcg aac 317

Leu Ala Gly Thr Pro Glu His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn

45

50

55

10

ctg agc agc gcc tgg cgc aac aac agt gtc ccg ctg cgg ctg cgg gac 365

Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn Asn Ser Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp

60

65

70

ggc cgc gag gtg ccc cac agc tgc agc cgc tac cgg ctc gcc acc atc 413

Gly Arg Glu Val Pro His Ser Cys Ser Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile

75

80

85

20

gcc aac ttc tgc gcg ctc ggg ctg gag ccg ggg cgc gac gtg gac ctg 461

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

90

95

100

105

ggg cag ctg gag cag gag agc tgc ctg gat ggc tgg gag ttc agc cag 509

Gly Gln Leu Glu Gln Glu Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln

110

115

120

30

gac gtc tac ctg tcc acc gtc gtg acc gag tgg aat ctg gtg tgt gag 557

Asp Val Tyr Leu Ser Thr Val Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu

125

130

135

40

gac aac tgg aag gtg ccc ctc acc acc tcc ctg ttc ttc gta ggc gtg 605

Asp Asn Trp Lys Val Pro Leu Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val

140

145

150

ctc ctc ggc tcc ttc gtg tcc ggg cag ctg tca gac agg ttt ggc agg 653

Leu Leu Gly Ser Phe Val Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg

155

160

165

10

aag aac gtt ctc ttc gca acc atg gct gta cag act ggc ttc agc ttc 701

Lys Asn Val Leu Phe Ala Thr Met Ala Val Gln Thr Gly Phe Ser Phe

170

175

180

185

ctg cag att ttc tcc atc agc tgg gag atg ttc act gtg tta ttt gtc 749

Leu Gln Ile Phe Ser Ile Ser Trp Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val

190

195

200

20

atc gtg ggc atg ggc cag atc tcc aac tat gtg gta gcc ttc ata cta 797

Ile Val Gly Met Gly Gln Ile Ser Asn Tyr Val Val Ala Phe Ile Leu

205

210

215

30

gga aca gaa att ctt ggc aag tca gtt cgt att ata ttc tct aca tta 845

Gly Thr Glu Ile Leu Gly Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu

220

225

230

gga gtg tgc aca ttt ttt gca gtt ggc tat atg ctg ctg cca ctg ttt 893

Gly Val Cys Thr Phe Phe Ala Val Gly Tyr Met Leu Leu Pro Leu Phe

235

240

245

gct tac ttc atc aga gac tgg cgg atg ctg ctg ctg gcg ctg acg gtg 941

Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val

250

255

260

265

10

ccg gga gtg ctg tgt gtc ccg ctg tgg tgg ttc att cct gaa tct ccc 989

Pro Gly Val Leu Cys Val Pro Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro

270

275

280

cga tgg ctg ata tcc cag aga aga ttt aga gag gct gaa gat atc atc 1037

Arg Trp Leu Ile Ser Gln Arg Arg Phe Arg Glu Ala Glu Asp Ile Ile

285

290

295

20

caa aaa gct gca aaa atg aac aac aca gct gta cca gca gtg ata ttt 1085

Gln Lys Ala Ala Lys Met Asn Asn Thr Ala Val Pro Ala Val Ile Phe

300

305

310

gat tct gtg gag gag cta aat ccc ctg aag cag cag aaa gct ttc att 1133

Asp Ser Val Glu Glu Leu Asn Pro Leu Lys Gln Gln Lys Ala Phe Ile

315

320

325

30

ctg gac ctg ttc agg act cgg aat att gcc ata atg acc att atg tct 1181

Leu Asp Leu Phe Arg Thr Arg Asn Ile Ala Ile Met Thr Ile Met Ser

330

335

340

345

40

ttg ctg cta tgg atg ctg acc tca gtg ggt tac ttt gct ctg tct ctg	1229	
Leu Leu Leu Trp Met Leu Thr Ser Val Gly Tyr Phe Ala Leu Ser Leu		
350 355 360		
gat gct cct aat tta cat gga gat gcc tac ctg aac tgt ttc ctc tct	1277	
Asp Ala Pro Asn Leu His Gly Asp Ala Tyr Leu Asn Cys Phe Leu Ser		
365 370 375		10
gcc ttg att gaa att cca gct tac att aca gcc tgg ctg cta ttg cga	1325	
Ala Leu Ile Glu Ile Pro Ala Tyr Ile Thr Ala Trp Leu Leu Leu Arg		
380 385 390		
acg ctg ccc agg cgt tat atc ata gct gca gta ctg ttc tgg gga gga	1373	
Thr Leu Pro Arg Arg Tyr Ile Ile Ala Ala Val Leu Phe Trp Gly Gly		20
395 400 405		
ggt gtg ctt ctc ttc att caa ctg gta cct gtg gat tat tac ttc tta	1421	
Gly Val Leu Leu Phe Ile Gln Leu Val Pro Val Asp Tyr Tyr Phe Leu		
410 415 420 425		30
tcc att ggt ctg gtc atg ctg gga aaa ttt ggg atc acc tct gct ttc	1469	
Ser Ile Gly Leu Val Met Leu Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Phe		
430 435 440		
tcc atg ctg tat gtc ttc act gct gag ctc tac cca acc ctg gtc agg	1517	

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

445

450

455

aac atg gcg gtg ggg gtc aca tcc acg gcc tcc aga gtg ggc agc atc 1565

Asn Met Ala Val Gly Val Thr Ser Thr Ala Ser Arg Val Gly Ser Ile

460

465

470

10

att gcc ccc tac ttt gtt tac ctc ggt gct tac aac aga atg ctg ccc 1613

Ile Ala Pro Tyr Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asn Arg Met Leu Pro

475

480

485

tac atc gtc atg ggt agt ctg act gtc ctg att gga atc ttc acc ctt 1661

Tyr Ile Val Met Gly Ser Leu Thr Val Leu Ile Gly Ile Phe Thr Leu

490

495

500

505

20

ttt ttc cct gaa agt ttg gga atg act ctt cca gaa acc tta gag cag 1709

Phe Phe Pro Glu Ser Leu Gly Met Thr Leu Pro Glu Thr Leu Glu Gln

510

515

520

30

atg cag aaa gtg aaa tgg ttc aga tct ggg aaa aaa aca aga gac tca 1757

Met Gln Lys Val Lys Trp Phe Arg Ser Gly Lys Lys Thr Arg Asp Ser

525

530

535

atg gag aca gaa gaa aat ccc aag gtt cta ata act gca ttc 1799

Met Glu Thr Glu Glu Asn Pro Lys Val Leu Ile Thr Ala Phe

540

545

550

40

tgaaaaaata tctaccccat ttggtgaagt gaaaaacaga aaaataagac cctgtggaga 1859

aattcgttgt tcccactgaa atggactgac tgtaacgatt gacaccaaaa tgaaccttgc 1919

tatcaagaaa tgctcgteat acagtaaact ctggatgatt cttccagata atgtccttgc 1979

tttacaacc aaccatttct agagagtctc cttactcatt aattcaatga aatggattgg 2039

10

taagatgtct tgaaaacatg ttagtcaagg actggtaaaa tacatataaa gattaacact 2099

catttccaat catacaaata ctatccaaat aaaaat 2135

<210> 3

20

<211> 557

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly

1

5

10

15

30

Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro

20

25

30

Asn Gly Phe Thr Gly Leu Ser Ser Val Phe Leu Ile Ala Thr Pro Glu

35

40

45

His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg

50

55

60

Asn His Thr Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp Gly Arg Glu Val Pro His

65

70

75

10

Ser Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Ala Leu

80

85

90

95

Gly Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gln Glu

100

105

110

20

Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln Asp Val Tyr Leu Ser Thr

115

120

125

Ile Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu Asp Asp Trp Lys Ala Pro

130

135

140

30

Leu Thr Ile Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Leu Gly Ser Phe Ile

145

150

155

40

Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Val

160

165

170

175

Thr Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Ile Phe Ser Lys

180

185

190

Asn Phe Glu Met Phe Val Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln

195

200

205

10

Ile Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Gly

210

215

220

Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr

225

230

235

20

Ala Phe Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp

240

245

250

255

Trp Arg Met Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Pro Gly Val Leu Cys Val

260

265

270

30

Ala Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln

275

280

285

Gly Arg Phe Glu Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ala

290

295

300

40

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

305

310

315

Asp Leu Ser Ser Lys Lys Gln Gln Ser His Asn Ile Leu Asp Leu Leu
320 325 330 335

Arg Thr Trp Asn Ile Arg Met Val Thr Ile Met Ser Ile Met Leu Trp
340 345 350

Met Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn
355 360 365

Leu His Gly Asp Ile Phe Val Asn Cys Phe Leu Ser Ala Met Val Glu
370 375 380

Val Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg
385 390 395

Arg Tyr Ser Met Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu
400 405 410 415

Phe Met Gln Leu Val Pro Pro Asp Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Val Leu
420 425 430

Val Met Val Gly Lys Phe Gly Val Thr Ala Ala Phe Ser Met Val Tyr
435 440 445

Val Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val

10

20

30

40

450

455

460

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

465

470

475

Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met

10

480

485

490

495

Gly Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Leu Pro Glu

500

505

510

Ser Phe Gly Thr Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val

20

515

520

525

Lys Gly Met Lys His Arg Lys Thr Pro Ser His Thr Arg Met Leu Lys

530

535

540

Asp Gly Gln Glu Arg Pro Thr Ile Leu Lys Ser Thr Ala Phe

30

545

550

555

<210> 4

<211> 1831

<212> DNA

40

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (124)..(1794)

<400> 4

cggacggtct tgggtcgct gctgcctggc ttgcctggc ggcggggggt gccccgcgcg 60

cacgcgcaaa gccccgcgcg ttcccagacc ccaggccgcg ctctgtgggc ctctgagggc 120

10

ggc atg cgg gac tac gac gag gtg acc gcc ttc ctg ggc gag tgg ggg 168

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly

1 5 10 15

ccc ttc cag cgc etc atc ttc ttc ctg etc agc gcc agc atc atc ccc 216

20

Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro

20 25 30

aat ggc ttc acc ggc ctg tcc tcc gtg ttc ctg ata gcg acc ccg gag 264

Asn Gly Phe Thr Gly Leu Ser Ser Val Phe Leu Ile Ala Thr Pro Glu

35 40 45

30

cac cgc tgc cgg gtg ccg gac gcc gcg aac ctg agc agc gcc tgg cgc 312

His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg

50 55 60

aac cac act gtc cca ctg cgg ctg cgg gac ggc cgc gag gtg ccc cac 360

Asn His Thr Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp Gly Arg Glu Val Pro His

40

65	70	75		
agc tgc cgc cgc tac cgg ctc gcc acc atc gcc aac ttc tgc gcg ctc			408	
Ser Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Ala Leu				
80	85	90	95	
ggg ctg gag ccg ggg cgc gac gtg gac ctg ggg cag ctg gag cag gag			456	10
Gly Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gln Glu				
	100	105	110	
agc tgt ctg gat ggc tgg gag ttc agt cag gac gtc tac ctg tcc acc			504	
Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln Asp Val Tyr Leu Ser Thr				
	115	120	125	20
att gtg acc gag tgg aac ctg gtg tgt gag gac gac tgg aag gcc cca			552	
Ile Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu Asp Asp Trp Lys Ala Pro				
	130	135	140	
ctc aca atc tcc ttg ttc ttc gtg ggt gtg ctg ttg ggc tcc ttc att			600	30
Leu Thr Ile Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Leu Gly Ser Phe Ile				
	145	150	155	
tca ggg cag ctg tca gac agg ttt ggc cgg aag aat gtg ctg ttc gtg			648	
Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Val				
160	165	170	175	

acc atg ggc atg cag aca ggc ttc agc ttc ctg cag atc ttc tgc aag 696
 Thr Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Ile Phe Ser Lys
 180 185 190

aat ttt gag atg ttt gtc gtg ctg ttt gtc ctt gta ggc atg ggc cag 744
 Asn Phe Glu Met Phe Val Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln
 195 200 205

10

atc tcc aac tat gtg gca gca ttt gtc ctg ggg aca gaa att ctt ggc 792
 Ile Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Gly
 210 215 220

aag tca gtt cgt ata ata ttc tct acg tta gga gtg tgc ata ttt tat 840
 Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr
 225 230 235

20

gca ttt ggc tac atg gtg ctg cca ctg ttt gct tac ttc atc cga gac 888
 Ala Phe Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp
 240 245 250 255

30

tgg cgg atg ctg ctg gtg gcg ctg acg atg ccg ggg gtg ctg tgc gtg 936
 Trp Arg Met Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Pro Gly Val Leu Cys Val
 260 265 270

gca ctc tgg tgg ttc atc cct gag tcc ccc cga tgg etc atc tct cag 984
 Ala Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln

40

275	280	285		
gga cga ttt gaa gag gca gag gtg atc atc cgc aag gct gcc aaa gcc			1032	
Gly Arg Phe Glu Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ala				
290	295	300		
aat ggg att gtt gtg cct tcc act atc ttt gac cgc agt gag tta caa			1080	10
Asn Gly Ile Val Val Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln				
305	310	315		
gac cta agt tcc aag aag cag cag tcc cac aac att ctg gat ctg ctt			1128	
Asp Leu Ser Ser Lys Lys Gln Gln Ser His Asn Ile Leu Asp Leu Leu				
320	325	330	335	20
cga acc tgg aat atc cgg atg gtc acc atc atg tcc ata atg ctg tgg			1176	
Arg Thr Trp Asn Ile Arg Met Val Thr Ile Met Ser Ile Met Leu Trp				
340	345	350		
atg acc ata tca gtg ggc tat ttt ggg ctt tcg ctt gat act cct aac			1224	30
Met Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn				
355	360	365		
ttg cat ggg gac atc ttt gtg aac tgc ttc ctt tca gcg atg gtt gaa			1272	
Leu His Gly Asp Ile Phe Val Asn Cys Phe Leu Ser Ala Met Val Glu				
370	375	380		

gtc cca gca tat gtg ttg gcc tgg ctg ctg ctg caa tat ttg ccc cgg	1320	
Val Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg		
385 390 395		
cgc tat tcc atg gcc act gcc ctc ttc ctg ggt ggc agt gtc ctt ctc	1368	
Arg Tyr Ser Met Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu		
400 405 410 415		10
ttc atg cag ctg gta ccc cca gac ttg tat tat ttg gct aca gtc ctg	1416	
Phe Met Gln Leu Val Pro Pro Asp Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Val Leu		
420 425 430		
gtg atg gtg ggc aag ttt gga gtc acg gct gcc ttt tcc atg gtc tac	1464	20
Val Met Val Gly Lys Phe Gly Val Thr Ala Ala Phe Ser Met Val Tyr		
435 440 445		
gtg tac aca gcc gag ctg tat ccc aca gtg gtg aga aac atg ggt gtg	1512	
Val Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val		
450 455 460		30
gga gtc agc tcc aca gca tcc cgc ctg ggc agc atc ctg tct ccc tac	1560	
Gly Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr		
465 470 475		
ttc gtt tac ctt ggt gcc tac gac cgc ttc ctg ccc tac att ctc atg	1608	
Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met		40

480	485	490	495		
gga agt ctg acc atc ctg aca gcc atc ctc acc ttg ttt ctc cca gag				1656	
Gly Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Leu Pro Glu					
	500	505	510		
agc ttc ggt acc cca ctc cca gac acc att gac cag atg cta aga gtc				1704	10
Ser Phe Gly Thr Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val					
	515	520	525		
aaa gga atg aaa cac aga aaa act cca agt cac aca agg atg tta aaa				1752	
Lys Gly Met Lys His Arg Lys Thr Pro Ser His Thr Arg Met Leu Lys					
	530	535	540		20
gat ggt caa gaa agg ccc aca atc ctt aaa age aca gcc ttc				1794	
Asp Gly Gln Glu Arg Pro Thr Ile Leu Lys Ser Thr Ala Phe					
	545	550	555		
taacatcgct tccagtaagg gagaaactga agaggaa				1831	30
<210> 5					
<211> 22					
<212> DNA					
<213> Artificial Sequence					
<220>					40

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 5

ctaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 6

10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

20

<400> 6

tgtagcgtga agacgacaga a 21

<210> 7

30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

40

<400> 7

tcgagcggcc gcccgggcag gt

22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 8

agggcgtggt gcggaggcg gt

20

22

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 9

cttttgagca agttcagcct

20

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 10

agaggtggct tatgagtatt tctt

24

20

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 11

ccagggtttt ccagtcacg ac

22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

10

<400> 12

tcacacagga aacagctatg ac

22

<210> 13

20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

30

<400> 13

gtgctgttgg gctccttcat ttca

24

<210> 14

<211> 24

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

10

<400> 14

agctgcatga agagaaggac actg

24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

30

<400> 15

agcatcctgt ctcctactt cggt

24

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 16

gatggatccc ggacggtctt gggtcgcctg ctg 33

10

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 17

gatggatcca aatgctgcca catagttgga gat 33

30

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 18

gatggatcca tgggcatgca gacaggettc agc 33

<210> 19

10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

20

<400> 19

gatggatcct tcctctteag tttctccctt act 33

<210> 20

30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer

40

Sequence

<400> 20

cgcgccgaat cgctgaatcc ttcc 24

<210> 21

<211> 24 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer

Sequence 20

<400> 21

agcttttga ttgtttctgt tgag 24

<210> 22

<211> 553 30

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Ile Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro

1

5

10

15

Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn
20 25 30

Gly Phe Asn Gly Met Ser Val Val Phe Leu Ala Gly Thr Pro Glu His
35 40 45

Arg Cys Leu Val Pro Asp Thr Val Asn Leu Ser Ser Ser Trp Arg Asn
50 55 60

His Ser Ile Pro Leu Glu Thr Lys Asp Gly Arg Gln Val Pro Gln Ser
65 70 75 80

Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Ala Met Gly
85 90 95

Leu Glu Pro Gly Gln Asp Val Asp Leu Glu Gln Leu Glu Gln Glu Ser
100 105 110

Cys Leu Asp Gly Trp Glu Tyr Asp Lys Asp Ile Phe Leu Ser Thr Ile
115 120 125

Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu Asp Asp Trp Lys Thr Pro Leu
130 135 140

Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Cys Gly Ser Phe Val Ser
145 150 155 160

10

20

30

40

Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Lys Val Leu Phe Ala Thr
165 170 175

Met Ala Val Gln Thr Gly Phe Ser Phe Val Gln Ile Phe Ser Thr Asn
180 185 190

Trp Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Val Gly Met Gly Gln Ile
195 200 205

Ser Asn Tyr Val Val Ala Phe Ile Leu Gly Thr Glu Ile Leu Ser Lys
210 215 220

Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Thr Phe Phe Ala
225 230 235 240

Ile Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp
245 250 255

Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Leu Pro Gly Leu Phe Cys Val Pro
260 265 270

Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Arg
275 280 285

Arg Phe Ala Glu Ala Glu Gln Ile Ile Gln Lys Ala Ala Lys Met Asn

10

20

30

40

290	295	300	
Ser Ile Val Ala Pro Ala Gly Ile Phe Asp Pro Leu Glu Leu Gln Glu			
305	310	315	320
Leu Asn Ser Leu Lys Gln Gln Lys Val Ile Ile Leu Asp Leu Phe Arg			10
	325	330	335
Thr Arg Asn Ile Ala Thr Ile Thr Val Met Ala Val Met Leu Trp Met			
	340	345	350
Leu Thr Ser Val Gly Tyr Phe Ala Leu Ser Leu Asn Val Pro Asn Leu			20
	355	360	365
His Gly Asp Val Tyr Leu Asn Cys Phe Leu Ser Gly Leu Ile Glu Val			
	370	375	380
Pro Ala Tyr Phe Thr Ala Trp Leu Leu Leu Arg Thr Leu Pro Arg Arg			30
	385	390	395
			400
Tyr Ile Ile Ala Gly Val Leu Phe Trp Gly Gly Gly Val Leu Leu Leu			
	405	410	415
Ile Gln Val Val Pro Glu Asp Tyr Asn Phe Val Ser Ile Gly Leu Val			40
	420	425	430

Met Leu Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Phe Ser Met Leu Tyr Val

435

440

445

Phe Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Leu Val Arg Asn Met Ala Val Gly

450

455

460

10

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

465

470

475

480

Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asn Arg Leu Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly

485

490

495

20

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

500

505

510

Phe Gly Val Thr Leu Pro Glu Asn Leu Glu Gln Met Gln Lys Val Arg

515

520

525

30

Gly Phe Arg Cys Gly Lys Lys Ser Thr Val Ser Val Asp Arg Glu Glu

530

535

540

Ser Pro Lys Val Leu Ile Thr Ala Phe

545

550

40

<210> 23

<211> 2083

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (122)..(1780)

10

<400> 23

attcggcaca ggacggcgtg tttagcagc caccataggaa gatccccctca gcgcgcgcgaa 60

tcgctgaatc ctttctctcc acccaacctcc ctcacgcaag ctgaggagga gaggtggaaa 120

20

c atg cgg gac tac gac gag gtg atc gcc ttc ctg ggc gag tgg ggg ccc 169

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Ile Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro

1 5 10 15

ttc cag cgc etc atc ttc ttt ctg etc agc gcc agc atc atc ccc aat 217

Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn

20 25 30

30

ggc ttc aat ggt atg tca gtc gtg ttc ctg gcg ggg acc ccc gag cac 265

Gly Phe Asn Gly Met Ser Val Val Phe Leu Ala Gly Thr Pro Glu His

35 40 45

40

cgt tgc ctg gtt cct gac act gtg aac ctg agc agc tcc tgg cgc aac 313

Arg Cys Leu Val Pro Asp Thr Val Asn Leu Ser Ser Ser Trp Arg Asn

50 55 60

cac agc atc ccc ttg gag acg aag gac gga cga cag gtg cct cag agc	361	
His Ser Ile Pro Leu Glu Thr Lys Asp Gly Arg Gln Val Pro Gln Ser		
65 70 75 80		
tgc cgc cgc tac cga ctg gcc acc atc gcc aac ttc tct gcg atg ggg	409	
Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Ala Met Gly		10
85 90 95		
ctg gag cca gga cag gac gtg gat ctg gag cag ctg gag cag gag agc	457	
Leu Glu Pro Gly Gln Asp Val Asp Leu Glu Gln Leu Glu Gln Glu Ser		
100 105 110		
tgc ctg gat ggc tgg gag tac gac aag gac atc ttc ctg tcc acc atc	505	
Cys Leu Asp Gly Trp Glu Tyr Asp Lys Asp Ile Phe Leu Ser Thr Ile		
115 120 125		
gtg aca gag tgg aat ctg gtg tgt gag gat gac tgg aag aca ccc ctc	553	
Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu Asp Asp Trp Lys Thr Pro Leu		30
130 135 140		
acc acc tcc ctg ttc ttc gta ggc gtt ctc tgc ggc tcc ttc gtg tct	601	
Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Cys Gly Ser Phe Val Ser		
145 150 155 160		40
ggg cag ctg tca gac agg ttt ggc agg aag aaa gtc ctc ttt gca acc	649	

Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Lys Val Leu Phe Ala Thr

165

170

175

atg gct gtg cag act gga ttc agc ttc gtg cag att ttc tca acc aac 697

Met Ala Val Gln Thr Gly Phe Ser Phe Val Gln Ile Phe Ser Thr Asn

180

185

190

10

tgg gag atg ttc act gtg ttg ttt gcc att gtg ggc atg ggc cag atc 745

Trp Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Val Gly Met Gly Gln Ile

195

200

205

tcc aac tac gtg gtg gcc ttc ata cta gga act gaa atc ctg agc aag 793

Ser Asn Tyr Val Val Ala Phe Ile Leu Gly Thr Glu Ile Leu Ser Lys

210

215

220

20

tcg gtt cgc atc atc ttc tcc aca tta gga gtc tgt aca ttt ttt gca 841

Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Thr Phe Phe Ala

225

230

235

240

30

atc ggc tac atg gtc ctg ccg ctg ttt gca tac ttc atc aga gac tgg 889

Ile Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp

245

250

255

40

agg atg ctg ctg ctg gcc ctg aca ctg cct ggc ctg ttc tgt gtt ccc 937

Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Leu Pro Gly Leu Phe Cys Val Pro

260

265

270

ctg tgg tgg ttt att cca gaa tct ccc cgg tgg ctg ata tcc cag agg 985

Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Arg

275

280

285

aga ttt gca gag gcc gaa cag atc atc cag aaa gcc gca aag atg aac 1033

Arg Phe Ala Glu Ala Glu Gln Ile Ile Gln Lys Ala Ala Lys Met Asn

10

290

295

300

agc atc gtg gcg cca gca ggg ata ttc gat cct cta gag cta cag gag 1081

Ser Ile Val Ala Pro Ala Gly Ile Phe Asp Pro Leu Glu Leu Gln Glu

305

310

315

320

20

cta aac tcc ttg aag cag cag aaa gtc ata atc ctg gac ctg ttc agg 1129

Leu Asn Ser Leu Lys Gln Gln Lys Val Ile Ile Leu Asp Leu Phe Arg

325

330

335

act cgg aac att gcc acc ata acc gtg atg gct gtg atg ctg tgg atg 1177

Thr Arg Asn Ile Ala Thr Ile Thr Val Met Ala Val Met Leu Trp Met

30

340

345

350

cta acc tca gtg ggt tac ttt gct ctg tct ctc aat gtt cct aat tta 1225

Leu Thr Ser Val Gly Tyr Phe Ala Leu Ser Leu Asn Val Pro Asn Leu

355

360

365

40

cat gga gat gtc tac ctg aac tgc ttc ctc tct ggc ctg att gaa gtt 1273

His Gly Asp Val Tyr Leu Asn Cys Phe Leu Ser Gly Leu Ile Glu Val

370

375

380

cca gct tac ttc aca gcc tgg ctg cta ctg cga acc ctg cca cgg aga 1321

Pro Ala Tyr Phe Thr Ala Trp Leu Leu Leu Arg Thr Leu Pro Arg Arg

385

390

395

400

10

tat att ata gct ggg gtg cta ttc tgg gga gga ggt gtg ctt ctc ttg 1369

Tyr Ile Ile Ala Gly Val Leu Phe Trp Gly Gly Gly Val Leu Leu Leu

405

410

415

atc caa gtg gta cct gaa gat tat aac ttt gtg tcc att gga ctg gtg 1417

Ile Gln Val Val Pro Glu Asp Tyr Asn Phe Val Ser Ile Gly Leu Val

420

425

430

20

atg ctg ggg aaa ttt ggg atc acc tct gcc ttc tcc atg ttg tat gtc 1465

Met Leu Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Phe Ser Met Leu Tyr Val

435

440

445

30

ttc act gcg gag ctc tac cca acc ctg gtc agg aac atg gct gtg ggc 1513

Phe Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Leu Val Arg Asn Met Ala Val Gly

450

455

460

40

atc acc tcc atg gcc tct cgg gtg ggc agc atc att gcc ccc tat ttc 1561

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

465

470

475

480

gtt tac ctg ggc gcc tat aac aga ctc cta ccc tac atc ctc atg ggc 1609

Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asn Arg Leu Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly

485

490

495

agt ctg act gtc ctc att gga atc atc acg ctt ttt ttc cct gaa agt 1657

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

10

500

505

510

ttt gga gtg act cta cca gag aac ttg gag cag atg cag aaa gtg aga 1705

Phe Gly Val Thr Leu Pro Glu Asn Leu Glu Gln Met Gln Lys Val Arg

515

520

525

20

ggg ttc aga tgt ggg aaa aaa tca aca gtc tca gtg gac aga gaa gaa 1753

Gly Phe Arg Cys Gly Lys Lys Ser Thr Val Ser Val Asp Arg Glu Glu

530

535

540

agc ccc aag gtt cta ata act gca ttc taacgagggtt tccaaggcac 1800

Ser Pro Lys Val Leu Ile Thr Ala Phe

30

545

550

ttggcaaact gaaaagcaga tgtatacaat gagcagggtg tgatagagca agcctgcaat 1860

cccagcgctc ttgggggtgga gacagaagat caggagttca aggtcctcct tggetacagc 1920

40

aggagtgtaa gaccagcctg tcttaccaca agcaaccctg tctcaacaga acaaatcaaa 1980

agccttttct gctgaaaggg attaacagaa acaatgagca ccaaactgga cttgtggaga 2040

aatgcacact atctcatgaa ttctgggcca ctcttcagaa tgg 2083

<210> 24

<211> 24

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

20

<400> 24

cccatgccaa caaggacaaa aagc 24

<210> 25

<211> 24

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

40

<400> 25

acagaacaga aaagccctca gtca

24

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

20

<400> 26

tgttttttcgt ggggtgtgctg atgg

24

<210> 27

<211> 557

30

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro

1

5

10

15

40

Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn

20

25

30

Gly Phe Asn Gly Met Ser Ile Val Phe Leu Ala Gly Thr Pro Glu His

35

40

45

Arg Cys Leu Val Pro His Thr Val Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn

50

55

60

10

His Ser Ile Pro Leu Glu Thr Lys Asp Gly Arg Gln Val Pro Gln Lys

65

70

75

80

Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Glu Leu Gly

85

90

95

20

Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Glu Gln Leu Glu Gln Glu Ser

100

105

110

Cys Leu Asp Gly Trp Glu Tyr Asp Lys Asp Val Phe Leu Ser Thr Ile

115

120

125

30

Val Thr Glu Trp Asp Leu Val Cys Lys Asp Asp Trp Lys Ala Pro Leu

130

135

140

Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Met Gly Ser Phe Ile Ser

145

150

155

160

40

Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Leu Thr

165	170	175	
Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Val Phe Ser Val Asn			
180	185	190	
Phe Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln Ile			10
195	200	205	
Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Ser Lys			
210	215	220	
Ser Ile Arg Ile Ile Phe Ala Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr Ala			20
225	230	235	240
Phe Gly Phe Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp			
245	250	255	
Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val Pro Gly Val Leu Cys Gly Ala			30
260	265	270	
Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Gly			
275	280	285	
Arg Ile Lys Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ile Asn			40
290	295	300	

Gly Ile Val Ala Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln Asp
305 310 315 320

Leu Asn Ser Thr Lys Pro Gln Leu His His Ile Tyr Asp Leu Ile Arg
325 330 335

Thr Arg Asn Ile Arg Val Ile Thr Ile Met Ser Ile Ile Leu Trp Leu
340 345 350

Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn Leu
355 360 365

His Gly Asp Ile Tyr Val Asn Cys Phe Leu Leu Ala Ala Val Glu Val
370 375 380

Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg Arg
385 390 395 400

Tyr Ser Ile Ser Ala Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu Phe
405 410 415

Met Gln Leu Val Pro Ser Glu Leu Phe Tyr Leu Ser Thr Ala Leu Val
420 425 430

Met Val Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Tyr Ser Met Val Tyr Val
435 440 445

10

20

30

40

Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val Gly

450

455

460

Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr Phe

465

470

475

480

10

Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly

485

490

495

Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Phe Pro Glu Ser

500

505

510

20

Phe Gly Val Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val Lys

515

520

525

Gly Ile Lys Gln Trp Gln Ile Gln Ser Gln Thr Arg Met Gln Lys Asp

530

535

540

30

Gly Glu Glu Ser Pro Thr Val Leu Lys Ser Thr Ala Phe

545

550

555

<210> 28

<211> 1888

40

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (60)..(1730)

<400> 28

ctcccgcgcc acggtgtccc cttattecca tacggggegct gtgggaggct gaggacggc 59 10

atg cgg gac tac gac gag gtg acc gcc ttc cta ggc gag tgg ggg ccc 107
 Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro
 1 5 10 15

ttc cag cgc ctc atc ttc ttc ctg ctc agc gcc agc atc atc ccc aat 155 20
 Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn
 20 25 30

ggc ttc aat ggt atg tcc atc gtg ttc ctg gcg ggg acc ccg gag cac 203
 Gly Phe Asn Gly Met Ser Ile Val Phe Leu Ala Gly Thr Pro Glu His
 35 40 45 30

cgt tgc ctt gtg cct cac acc gtg aac ctg agc agc gcg tgg cgc aac 251
 Arg Cys Leu Val Pro His Thr Val Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn
 50 55 60

cac agt atc ccg ttg gag acg aag gac gga cga cag gtg cct cag aaa 299
 His Ser Ile Pro Leu Glu Thr Lys Asp Gly Arg Gln Val Pro Gln Lys

40

65	70	75	80	
tgc cgc cgc tac cga ctg gcc acc atc gcc aac ttc tct gag cta ggg				347
Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Glu Leu Gly				
	85	90	95	
ctg gag ccg ggg cgg gac gtg gac ctg gag cag ctg gag cag gag agc				395
Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Glu Gln Leu Glu Gln Glu Ser				
	100	105	110	
tgc ctg gat ggc tgg gag tac gac aag gac gtc ttc ctg tcc acc atc				443
Cys Leu Asp Gly Trp Glu Tyr Asp Lys Asp Val Phe Leu Ser Thr Ile				
	115	120	125	
gtg aca gag tgg gac ctg gtg tgt aag gat gac tgg aaa gcc cca ctc				491
Val Thr Glu Trp Asp Leu Val Cys Lys Asp Asp Trp Lys Ala Pro Leu				
	130	135	140	
acc acc tcc ttg ttt ttc gtg ggt gtg ctg atg ggc tcc ttc att tca				539
Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Met Gly Ser Phe Ile Ser				
145	150	155	160	
gga cag ctc tca gac agg ttt ggt cgc aag aat gtg ctg ttt ttg acc				587
Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Leu Thr				
	165	170	175	

10

20

30

40

atg ggc atg cag act ggc ttc agc ttc ctg cag gtc ttc tct gtg aac	635	
Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Val Phe Ser Val Asn		
180	185	190
ttc gag atg ttt aca gtg ctt ttt gtc ctt gtt ggc atg ggt cag atc	683	
Phe Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln Ile		10
195	200	205
tcc aac tac gtg gca gca ttt gtc ctg gga aca gaa att ctt tcc aag	731	
Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Ser Lys		
210	215	220
tca att cga att ata ttc gcc acc tta gga gtt tgc ata ttt tat gcg	779	
Ser Ile Arg Ile Ile Phe Ala Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr Ala		
225	230	235
240		
ttt ggc ttc atg gtg ctg cca ctg ttt gca tac ttc atc aga gac tgg	827	
Phe Gly Phe Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp		30
245	250	255
agg atg ctg ctg ctg gcg ctc act gtg cca ggg gtg cta tgt ggg gct	875	
Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val Pro Gly Val Leu Cys Gly Ala		
260	265	270
ctc tgg tgg ttc atc cct gag tcc cca cga tgg ctc atc tct caa ggc	923	
Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Gly		40

275	280	285	
cga att aaa gag gca gag gtg atc atc cgc aaa gct gcc aaa atc aat			971
Arg Ile Lys Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ile Asn			
290	295	300	
ggg att gtt gca cct tcc act atc ttc gat cca agt gag tta caa gac			1019
Gly Ile Val Ala Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln Asp			
305	310	315	320
tta aat tct acg aag cct cag ttg cac cac att tat gat ctg atc cga			1067
Leu Asn Ser Thr Lys Pro Gln Leu His His Ile Tyr Asp Leu Ile Arg			20
325	330	335	
aca egg aat atc agg gtc atc acc atc atg tct ata atc ctg tgg ctg			1115
Thr Arg Asn Ile Arg Val Ile Thr Ile Met Ser Ile Ile Leu Trp Leu			
340	345	350	
acc ata tca gtg ggc tat ttt gga cta tct ctt gac act cct aac ttg			1163
Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn Leu			
355	360	365	
cat ggg gac atc tat gtg aac tgc ttc cta ctg gcg gct gtt gaa gtc			1211
His Gly Asp Ile Tyr Val Asn Cys Phe Leu Leu Ala Ala Val Glu Val			40
370	375	380	

cca gcc tat gtg ctg gcc tgg ctg ttg ttg cag tac ttg ccc cgg cga 1259

Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg Arg

385 390 395 400

tat tct atc tgc gct gcc ctt ttc ctg ggt ggc agt gtc ctt etc ttc 1307

Tyr Ser Ile Ser Ala Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu Phe

405 410 415

10

atg cag ctg gtg cct tca gaa ttg ttt tac ttg tcc act gcc ctg gtg 1355

Met Gln Leu Val Pro Ser Glu Leu Phe Tyr Leu Ser Thr Ala Leu Val

420 425 430

20

atg gtg ggg aag ttt gga atc acc tct gcc tac tcc atg gtc tat gtg 1403

Met Val Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Tyr Ser Met Val Tyr Val

435 440 445

tac aca gct gag ctg tac ccc act gtg gtc aga aac atg ggt gtg ggg 1451

Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val Gly

450 455 460

30

gtc agc tcc aca gca tcc cgc ctt ggc agc atc ctg tct ccc tac ttt 1499

Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr Phe

465 470 475 480

40

gtt tac cta ggt gcc tat gat cgc ttc ctg cct tat att etc atg gga 1547

Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly

485

490

495

agt ctg acc atc ctg aca gct atc ctc acc ttg ttc ttc cct gag agc 1595

Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Phe Pro Glu Ser

500

505

510

10

ttt ggt gtc cct ctc cca gat acc att gac cag atg cta agg gtc aaa 1643

Phe Gly Val Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val Lys

515

520

525

gga ata aaa cag tgg caa atc caa agc cag aca aga atg caa aaa gat 1691

Gly Ile Lys Gln Trp Gln Ile Gln Ser Gln Thr Arg Met Gln Lys Asp

530

535

540

20

ggt gaa gaa agc cca aca gtc cta aag agc aca gcc ttc taacaccctg 1740

Gly Glu Glu Ser Pro Thr Val Leu Lys Ser Thr Ala Phe

545

550

555

30

tccagaaggc aaaaaactga ttggaaacct tcatgttgctc agaaatgctc tccatgactg 1800

agggtttttc tgtttctgtta accttggtgc taacatgctc atggattggg gcattctgtcc 1860

tggagagtca ccttctctcta gggacacc

1888

40

【図面の簡単な説明】

図1は、「ヒトOCTN1」と「ヒトOCTN2」の疎水性プロットを示す。Kyte & Doolittleの計算式による。Windowサイズは9アミノ酸である。数字は予想される膜貫通領域を示す。

図2は、「ヒトOCTN1」のノーザン解析の結果を示す電気泳動像である。

図3は、「ヒトOCTN1」と「ヒトOCTN2」のアミノ酸配列の比較を示す。一致するアミノ酸は影付きで表す。糖トランスポーターのコンセンサス配列に一致する配列を「+」で、ATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列に一致する配列を「*」で示す。

図4は、「ヒトOCTN2」のノーザン解析の結果を示す電気泳動像である。

50

図5は、「ヒトOCTN1」のTEAの吸収活性を示す。白丸は未処理の細胞、黒丸は「ヒトOCTN1」を導入した細胞を示す。

図6は、図5の実験系に対するコールドTEAの添加による影響を示す。図中の黒丸は「ヒトOCTN1」を導入した細胞、白丸はインサートを含まないベクターを導入した細胞、白三角は黒丸の値から白丸の値を差し引いた、正味の「ヒトOCTN1」による取り込み量を指す。

図7は、「ヒトOCTN1」におけるTEA吸収活性のTEA濃度依存性を示す。

図8は、「ヒトOCTN1」を導入した細胞におけるTEA以外の物質の吸収活性を示す図である。

図9は、Xenopus 卵母細胞を用いたトランスポート実験の結果を表す。「OCTN1」、「Water」と示したバーはそれぞれ、「ヒトOCTN1」cRNAをインジェクトした場合、及びcRNAを含まない水をインジェクトした場合の取り込み活性を示す。10
「ヒトOCTN1」cRNAをインジェクトした卵母細胞へのTEA、カルニチン、メピラミン、及びキニジン及びアクチノマイシンDの取り込みが観察された。一方、cRNAを含まない水をインジェクトした卵母細胞はほとんど取り込み活性を示さなかった。

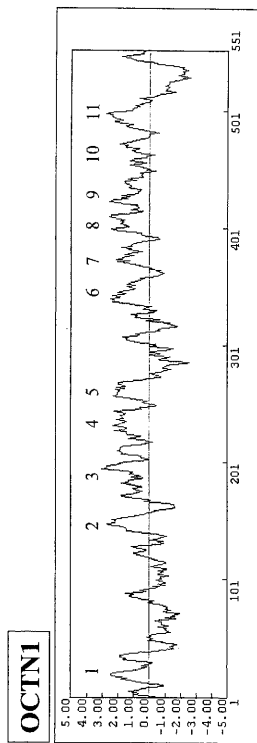
図10は、Xenopus 卵母細胞を用いた抗癌剤のトランスポート実験の結果を表す。「OCTN1」、「Water」と示したバーはそれぞれ、「ヒトOCTN1」cRNAをインジェクトした場合、及びcRNAを含まない水をインジェクトした場合の取り込み活性を示す。20
「ヒトOCTN1」cRNAをインジェクトした卵母細胞へのアクチノマイシンD、エトポシド、ビンブラスチン、及びダウノマイシンの取り込みが観察された。

図11は、HEK293細胞における「ヒトOCTN1」と「ヒトOCTN2」のトランスポート実験の結果を表す。「ヒトOCTN1」はTEAを、また「ヒトOCTN2」はカルニチンを効率よく輸送する活性を持つことがわかる。

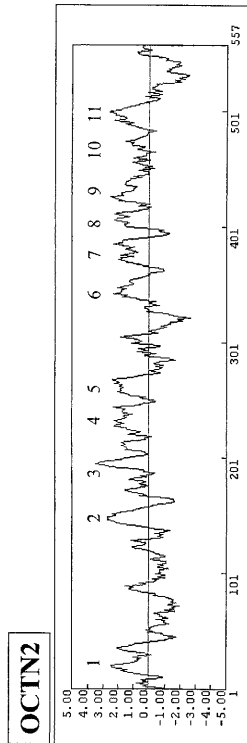
図12は、「ヒトOCTN2」のカルニチン輸送活性に対するNaの依存性を調べた結果を示す。「ヒトOCTN2」はNa存在下、時間に依存したカルニチンの輸送活性を示す（白丸）が、この活性はNa非存在下には全く見られず（黒丸）、「ヒトOCTN2」のカルニチン輸送活性はNaの存在に依存していることがわかる。

図13は、「マウスOCTN1」および「マウスOCTN2」遺伝子の発現を各組織においてRT-PCRによって検出した図である。G3PDHはコントロールであり、各cDNA量がそろっていることを示す。30

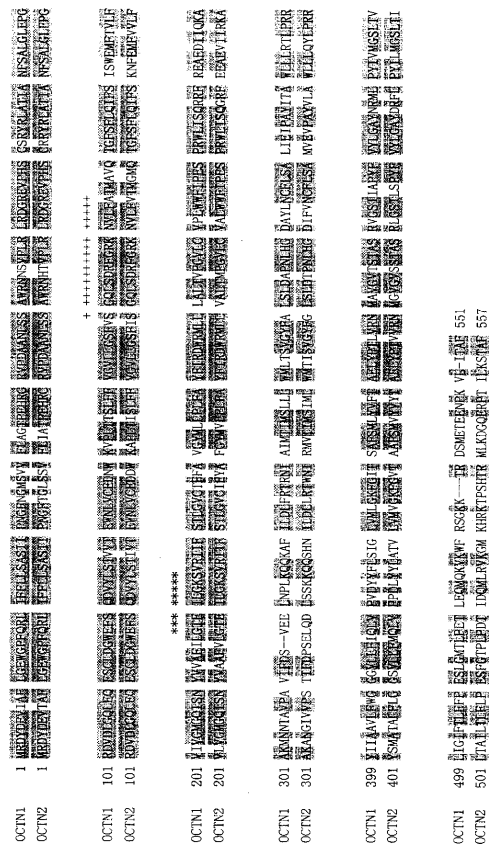
【図 1】
図 1



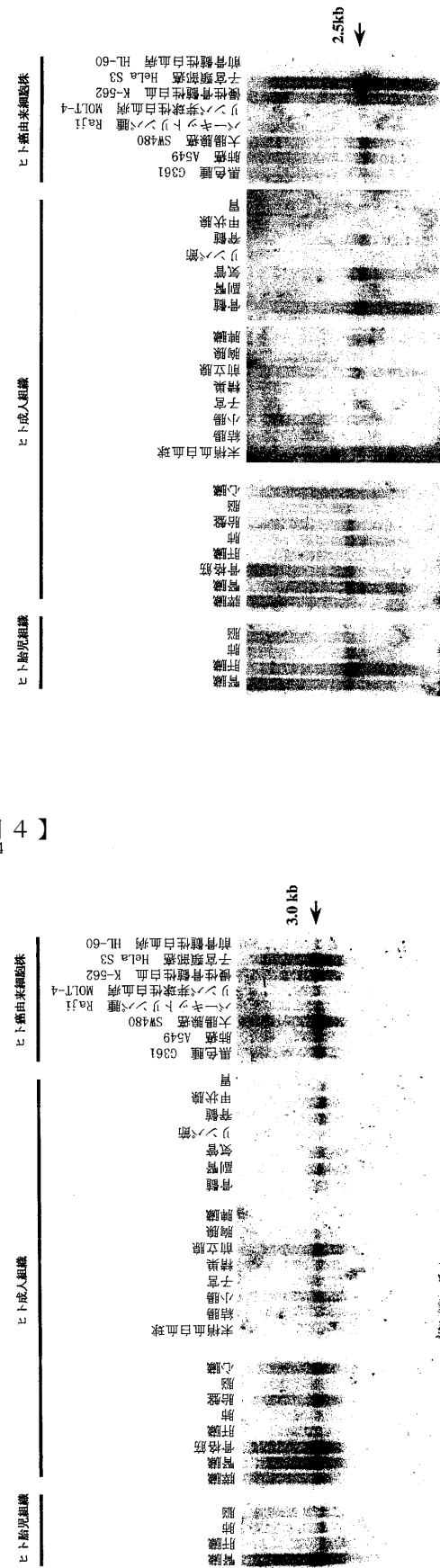
【 図 2 】
図 2

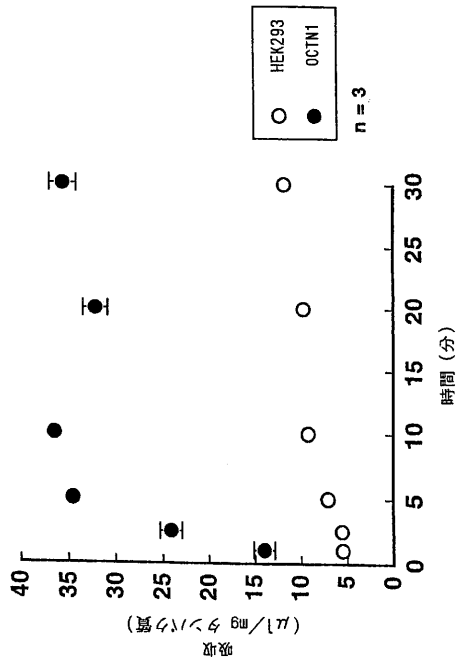
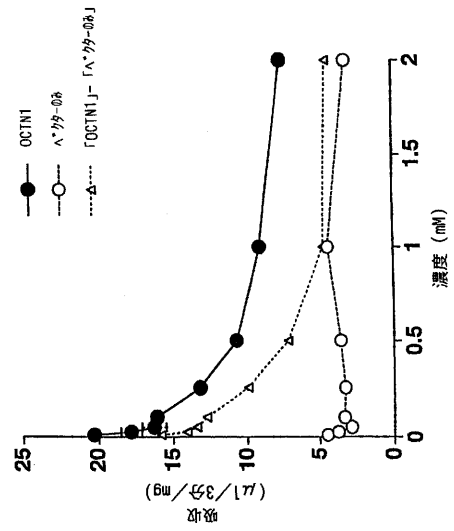
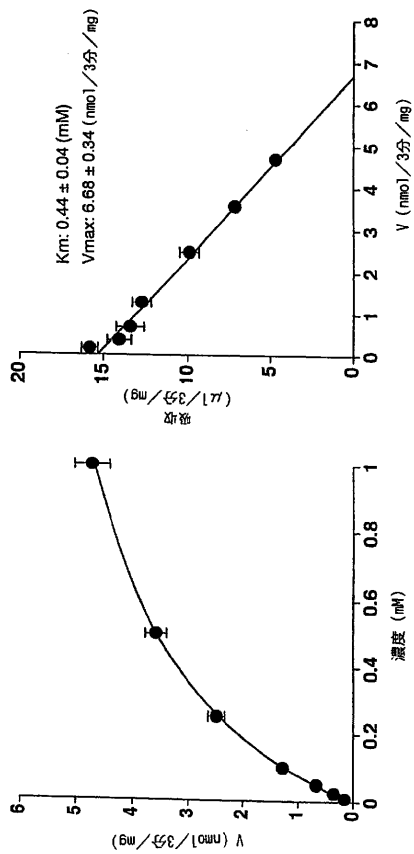
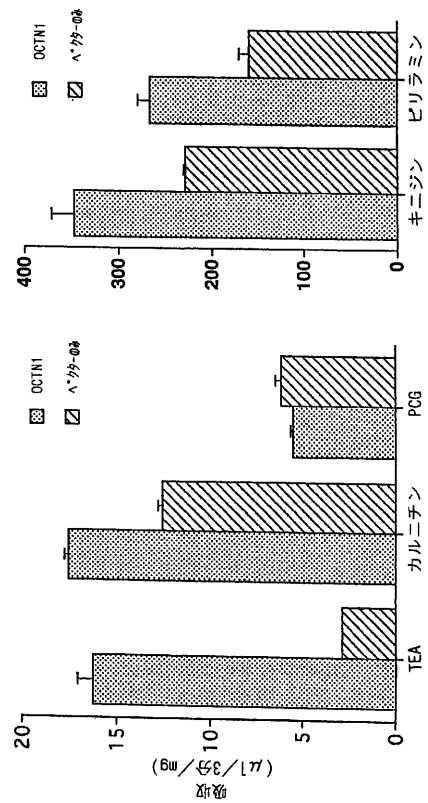


【 図 3 】
図 3

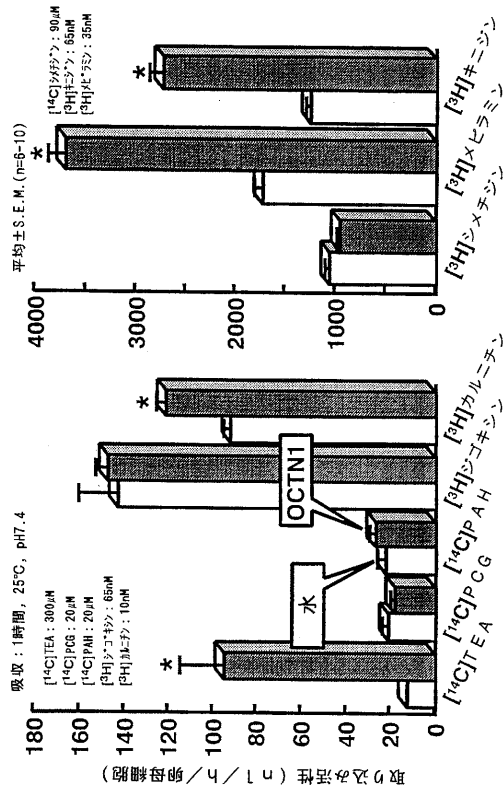


【 図 4 】
図 4

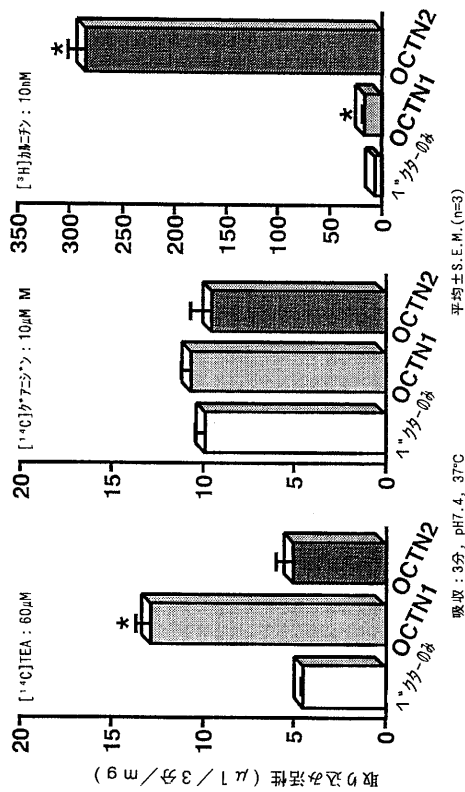


【図5】
図5【図6】
図6【図7】
図7【図8】
図8

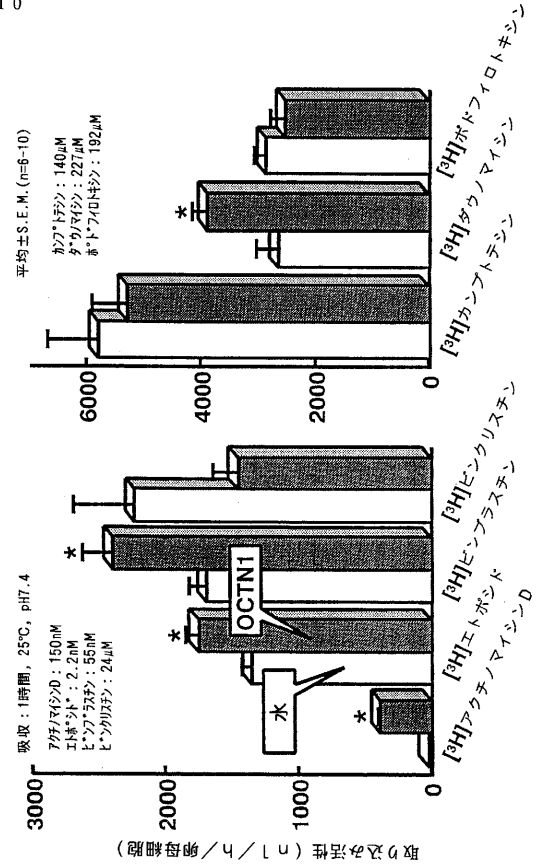
【図 9】



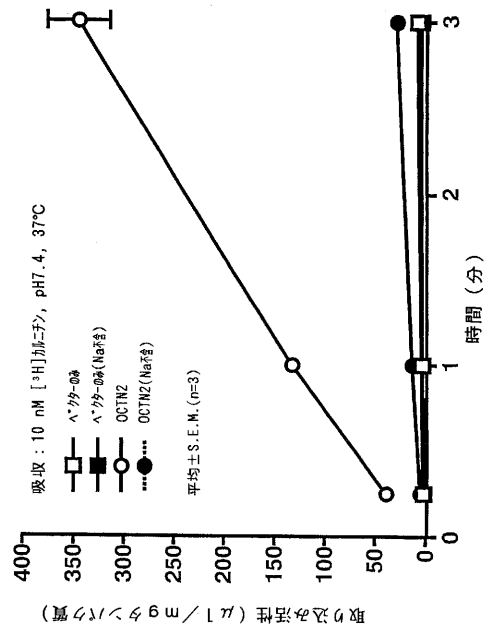
【図 11】



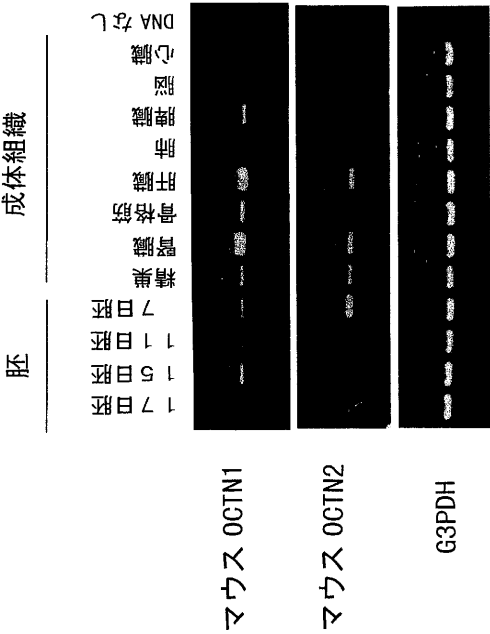
【図 10】



【図 12】



【図 13】
図 13



フロントページの続き

- (56)参考文献 Nature, 1994年, 372(6506), p.549-552
J. Biol. Chem., 1997年 4月, 272(16), p.10408-10413
FEBS Letters, 1997年12月, 419(1), p.107-111

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90
C07K 14/00-16/46
JICSTファイル(JOIS)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed