

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006 年 8 月 24 日 (24.08.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/088219 A1

(51) 国際特許分類:

<i>C12N 15/09</i> (2006.01)	<i>A61P 15/00</i> (2006.01)
<i>A61K 45/00</i> (2006.01)	<i>A61P 21/04</i> (2006.01)
<i>A61P 1/04</i> (2006.01)	<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
<i>A61P 3/06</i> (2006.01)	<i>A61P 43/00</i> (2006.01)
<i>A61P 9/04</i> (2006.01)	<i>C12Q 1/02</i> (2006.01)
<i>A61P 11/00</i> (2006.01)	<i>G01N 33/50</i> (2006.01)
<i>A61P 13/12</i> (2006.01)	<i>A61K 39/395</i> (2006.01)
<i>A61P 19/02</i> (2006.01)	<i>A61P 1/00</i> (2006.01)
<i>A61P 29/00</i> (2006.01)	<i>A61P 3/04</i> (2006.01)
<i>A61P 37/08</i> (2006.01)	<i>A61P 9/00</i> (2006.01)
<i>C12N 5/10</i> (2006.01)	<i>A61P 9/10</i> (2006.01)
<i>G01N 33/15</i> (2006.01)	<i>A61P 13/00</i> (2006.01)
<i>A61K 31/7088</i> (2006.01)	<i>A61P 17/00</i> (2006.01)
<i>A61K 48/00</i> (2006.01)	<i>A61P 27/16</i> (2006.01)
<i>A61P 1/16</i> (2006.01)	<i>A61P 37/02</i> (2006.01)
<i>A61P 3/10</i> (2006.01)	<i>C12N 5/06</i> (2006.01)
<i>A61P 9/06</i> (2006.01)	<i>C12Q 1/48</i> (2006.01)
<i>A61P 11/06</i> (2006.01)	<i>G01N 33/53</i> (2006.01)

介 (KIKUKAWA, Yusuke) [JP/JP]; 〒3004247 茨城県つくば市和台 10 番地 武田薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP). 周郷 司 (SUGO, Tsukasa) [JP/JP]; 〒3004247 茨城県つくば市和台 10 番地 武田薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP). 篠原 徳之 (SHINOHARA, Tokuyuki) [JP/JP]; 〒3004247 茨城県つくば市和台 10 番地 武田薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/303099

(22) 国際出願日: 2006 年 2 月 15 日 (15.02.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2005-038859 2005 年 2 月 16 日 (16.02.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大儀 和宏 (OGI, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒3004247 茨城県つくば市和台 10 番地 武田薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP). 菊川 裕

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: IL-13 PRODUCTION INHIBITOR

(54) 発明の名称: IL-13 産生抑制剤

(57) Abstract: A method/kit for screening an IL-13 production inhibitor using (a) a protein comprising an amino acid sequence identical or substantially identical to the amino acid sequence depicted in SEQ ID No:1 or a partial peptide of the protein or a salt thereof; and (b) a ligand capable of specifically binding to the protein; an IL-13 production inhibitor given by the screening; and the like. The IL-13 production inhibitor which can be given by the screening is useful as a prophylactic/therapeutic agent for a respiratory disease or the like.

(57) 要約: 本発明は、(a) 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを用いることを特徴とする、IL-13 産生阻害剤のスクリーニング方法/スクリーニング用キット、該スクリーニングによって得られる IL-13 産生阻害剤などを提供する。本発明のスクリーニングによって得られる IL-13 産生阻害剤は、例えば、呼吸器疾患などの予防・治療剤などとして有用である。

WO 2006/088219 A1

明細書

I L - 1 3 産生抑制剤

技術分野

- 5 本発明は、GPR34または肥満細胞とGPR34のリガンドとを用いるインターロイキン-13産生抑制剤などのスクリーニング方法およびスクリーニング用キット、該スクリーニング方法またはキットによって得られうるインターロイキン-13産生抑制剤などに関する。また、本発明は、GPR34または肥満細胞とGPR34のリガンドとを用いるエイコサノイド産生抑制剤、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤などのスクリーニング方法およびスクリーニング用キット、該スクリーニング方法またはキットによって得られうるエイコサノイド産生抑制剤、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤などに関する。さらに、本発明は、ミクログリア細胞およびGPR34のリガンドを用いる、中枢疾患の予防・治療剤の
- 10 スクリーニング方法またはスクリーニング用キット、該スクリーニング方法またはキットによって得られうる中枢疾患の予防・治療剤などに関する。

背景技術

- 20 G蛋白質共役型受容体GPR34のリガンドとして、脂質（例、エーテルリン脂質、ホスホノエーテル脂質、グリセロリン脂質、ホスホグリセロ脂質、スフィンゴ脂質、スフィンゴリン脂質、ホスホスフィンゴ脂質など）が報告されている（WO 03/052414号公報）。

- 25 グリセロリン脂質のひとつであるリゾホスファチジルセリン（以下、lyso-PSと略称することがある）は、抗原またはコンカナバリンAで刺激したラットマスト細胞に対するヒスタミン遊離活性（Nature、279巻、250-252頁、1979年；FEBS Lett.、105巻、58-62頁、1979年）、ラットマスト細胞に対して神経成長因子と共働的（synergistic）に作用してヒスタミンを放出させる活性（FEBS Lett.、138巻、190-192頁、1982年）、ヒトT細胞に対する増殖調節活性（FEBS Lett.、316巻、1-4頁、1993年）、

NGFの示すPC12細胞に対する分化誘導能の増強活性 (Neurosci. Lett., 248巻、77-80頁、1998年) を有することが知られている。

肥満細胞は、抗体に感作された後、抗原刺激を受けると脱顆粒を起こし、ヒスタミン、ロイコトリエン、セロトニンなどのケミカルメディエーターを放出し、I型アレルギー反応に深く関与している。一方で、肥満細胞は抗原刺激後、種々のサイトカインを分泌し、T細胞や好酸球の機能に影響を与え、免疫調節細胞としても重要である。

サイトカインの一種インターロイキン-13 (以下、IL-13) は、近年アレルギー疾患の病態において、IL-4以上に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。IL-13 mRNAは、アトピー性皮膚炎患者の苔癬化病変部、気管支喘息患者の気道上皮細胞、慢性アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜などの局所で発現しており、IgE 産生に関わっていると考えられている。気管支喘息などにおいては気道粘膜下組織や気道上皮内に好酸球、肥満細胞が集積していることから、ここで発現している IL-13は主に肥満細胞によるものと考えられ、IL-13は気管支喘息において、気管支上皮細胞や平滑筋に直接作用し、気道過敏症や粘膜産生の増強を引き起こすことが明らかとなっている。また、アレルギー疾患に限らず Hodgkin病、潰瘍性大腸炎、肺線維症、肉芽種などの原因として注目を集めている。

20 発明の開示

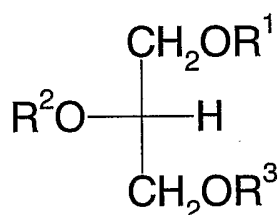
上記状況において、優れたIL-13産生抑制活性を有する化合物のスクリーニングの開発が望まれていた。

本発明者らは上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、GPR34が肥満細胞において非常に多く発現していること、肥満細胞を LysoPSで刺激することにより、IL-13の発現が増大すること、LysoPSは GPR34を介して脱顆粒反応を促進することを見出し、さらに新規モルモットGPR34、サルGPR34も見出した。本発明者らは、さらにGPR34は中枢においてミクログリア細胞に発現しLysoPS刺激により抗炎症作用を示すことを見出した。これらの知見に基づいて、本発明者らは、GPR34アンタゴニ

- ストがIL-13産生抑制剤となり、かつIL-13産生抑制剤の簡便な探索法を提供すること、肥満細胞とGPR34のリガンドとを用いるスクリーニング法がエイコサノイド産生抑制剤、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤などの探索に有効であること、ミクログリア細胞及びGPR34のリガンドは中枢疾患の予防・治療剤の探索に有効であることなどを見出し、
- 5 鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

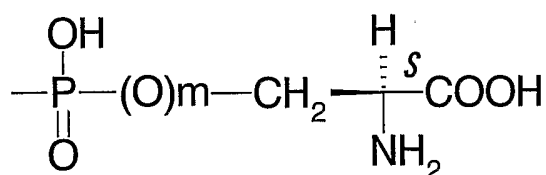
本発明は、

- 〔1〕 (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) 式
- 10



〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、

- 15 R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：



- (式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。)で表される基を示す。)で表される化合物またはその塩〔以下、リガンドAと略称する〕を用いることを特徴とする、IL-13産生抑制剤のスクリーニング方法、
- 20

〔2〕 化合物が、リゾホスファチジル-L-セリンである上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

〔３〕 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質が、配列番号：１９、配列番号：２２、配列番号：３１または配列番号：３５で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記〔１〕記載のスクリーニング方法、

５ 〔４〕 配列番号：１で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質またはその塩およびリゾホスファチジル－Ｌ－セリンを用いる上記〔１〕記載のスクリーニング方法、

〔５〕 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたは
10 その塩を介した細胞刺激活性を測定し、指標とする上記〔１〕～〔４〕記載のスクリーニング方法、

〔６〕 ＩＬ－１３産生抑制剤が、免疫疾患、呼吸器疾患、泌尿器疾患または循環器疾患の予防・治療剤である上記〔１〕記載のスクリーニング方法、

15 〔７〕 （ａ）配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および（ｂ）リガンドＡを含有することを特徴とする、ＩＬ－１３産生抑制剤のスクリーニング用キット、

〔８〕 肥満細胞およびリガンドＡを用いることを特徴とする、ＩＬ－
20 １３産生抑制剤のスクリーニング方法、

〔９〕 肥満細胞およびリガンドＡを含有することを特徴とする、ＩＬ－１３産生抑制剤のスクリーニング用キット、

〔１０〕 （ａ）配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチド
25 またはその塩、または（ｂ）リガンドＡの活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなるＩＬ－１３産生抑制剤、

〔１０ａ〕 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアンタゴニストを含有してなるＩＬ－１３産生抑制剤、

30 〔１１〕 （ａ）配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実

質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、または (b) リガンド A の活性を阻害することを特徴とする IL-13 産生抑制方法、

5 [12] 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる IL-13 産生抑制剤、

[13] 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチドを含有してなる
10 IL-13 産生抑制剤、

[14] 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに対する siRNA または sh
15 RNA を含有してなる IL-13 産生抑制剤、

[15] 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストに対する抗体を含有してなる IL-13 産生抑制剤、

20 [16] (a) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) リガンド A を用いることを特徴とする、エイコサノイド産生抑制剤のスクリーニング方法、

[16a] エイコサノイドが、ロイコトリエンである上記 [16] 記載のスクリーニング方法、
25

[16b] エイコサノイドが、プロスタグランジンである上記 [16] 記載のスクリーニング方法、

[17] 化合物が、リゾホスファチジル-L-セリンである上記 [16] 記載のスクリーニング方法、

30 [18] エイコサノイド産生抑制剤が、免疫性疾患、炎症性疾患、呼

吸器疾患、泌尿器疾患または循環器疾患の予防・治療剤である上記〔16〕記載のスクリーニング方法、

〔19〕 (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチド
5 またはその塩および (b) リガンドAを含有することを特徴とする、エイコサノイド産生抑制剤のスクリーニング用キット、

〔20〕 肥満細胞およびリガンドAを用いることを特徴とする、エイコサノイド産生抑制剤のスクリーニング方法、

〔21〕 肥満細胞およびリガンドAを含有することを特徴とする、エイ
10 コサノイド産生抑制剤のスクリーニング用キット、

〔22〕 (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチド
またはその塩、または (b) リガンドAの活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる、エイコサノイド産生抑制剤、

15 〔22a〕 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアンタゴニストを含有してなるエイコサノイド産生抑制剤、

〔23〕 (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチド
20 またはその塩、または (b) リガンドAの活性を阻害することを特徴とする、エイコサノイド産生抑制方法、

〔24〕 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる、エイコサノイド産生抑制剤、

25 〔25〕 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチドを含有してなる、エイコサノイド産生抑制剤、

30 〔26〕 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的

に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに対する s i R N A または s h R N A を含有してなる、エイコサノイド産生抑制剤、

〔27〕 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストに対する抗体を含有してなる、エイコサノイド産生抑制剤、

〔28〕 (a) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) リガンド A を用いることを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング方法、

〔29〕 化合物が、リゾホスファチジル-L-セリンである上記〔28〕記載のスクリーニング方法、

〔30〕 肥満細胞の脱顆粒抑制剤が、免疫性疾患、炎症性疾患、呼吸器疾患、泌尿器疾患または循環器疾患の予防・治療剤である上記〔28〕記載のスクリーニング方法、

〔31〕 (a) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) リガンド A を含有することを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング用キット、

〔32〕 肥満細胞およびリガンド A を用いることを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング方法、

〔33〕 肥満細胞およびリガンド A を含有することを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング用キット、

〔34〕 (a) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、または (b) リガンド A の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、

〔34a〕 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドま

たはその塩のアンタゴニストを含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤、

〔35〕 (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、または (b) リガンドAの活性を阻害することを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制方法、

〔36〕 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、

〔37〕 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチドを含有してなる、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、

〔38〕 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに対する siRNA または shRNA を含有してなる、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、

〔39〕 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストに対する抗体を含有してなる、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、

〔40〕 (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) リガンドAを用い、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を介したERK1(extracellular signal-regulated kinase 1) または (および) ERK2(extracellular signal-regulated kinase 2) の活性を測定し、指標とすることを特徴とする、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性化を促進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

〔41〕 (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実

質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチド
またはその塩および (b) リガンド A を用い、上記蛋白質もしくはその部
分ペプチドまたはその塩を介した ERK1 (extracellular signal-regulated
kinase 1) または (および) ERK2 (extracellular signal-regulated kinase
5 2) の活性を測定し、指標とすることを特徴とする、肥満細胞増殖または
分化抑制剤のスクリーニング方法、

〔42〕 (a) ミクログリア細胞および (b) リガンド A を用いることを
特徴とする、中枢疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法、

〔43〕 リガンド A が、リゾホスファチジル-L-セリンである上記
10 〔42〕記載のスクリーニング方法、

〔44〕 中枢疾患が、神経変性疾患 (例、アルツハイマー病 [家族性
アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病
など] など) などである上記〔42〕記載のスクリーニング方法、

〔45〕 (a) ミクログリア細胞および (b) リガンド A を含有するこ
15 とを特徴とする、中枢疾患の予防・治療剤のスクリーニング用キット、

〔46〕 (a) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実
質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチド
またはその塩の活性を阻害する、または (b) リガンド A の活性を阻害す
る化合物またはその塩を含有してなる、中枢疾患の予防・治療剤、

20 〔46a〕 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質
的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドま
たはその塩のアンタゴニストを含有してなる中枢疾患の予防・治療剤、

〔47〕 (a) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実
質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチド
25 またはその塩の活性を阻害する、または (b) リガンド A の活性を阻害す
ることを特徴とする、中枢疾患の予防・治療方法、

〔48〕 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的
に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまた
はその塩に対する抗体を含有してなる、中枢疾患の予防・治療剤、

30 〔49〕 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的

に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチドを含有してなる、中枢疾患の予防・治療剤、

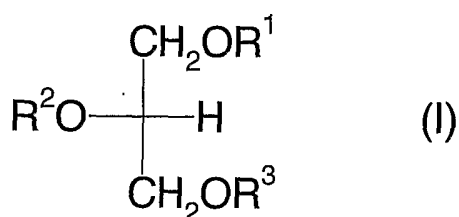
- 5 〔50〕 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに対する s i R N A または s h R N A を含有してなる、中枢疾患の予防・治療剤、

- 10 〔51〕 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストに対する抗体を含有してなる、中枢疾患の予防・治療剤
 などを提供する。

さらに本発明は、

- 15 (1) (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) 該蛋白質またはその塩と特異的に結合する能力を有するリガンドを用いることを特徴とする、I L - 1 3 産生抑制剤のスクリーニング方法、
 20 (2) リガンドが脂質である上記 (1) 記載のスクリーニング方法、
 (3) リガンドが、エーテルリン脂質、ホスホノエーテル脂質、またはグリセロリン脂質、ホスホノグリセロ脂質である上記 (1) 記載のスクリーニング方法、
 (4) リガンドが、下式：

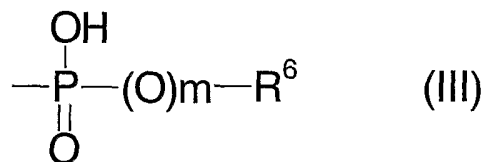
25



〔式中、R¹は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはア

シルを、

R^2 および R^3 は、それぞれ、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：

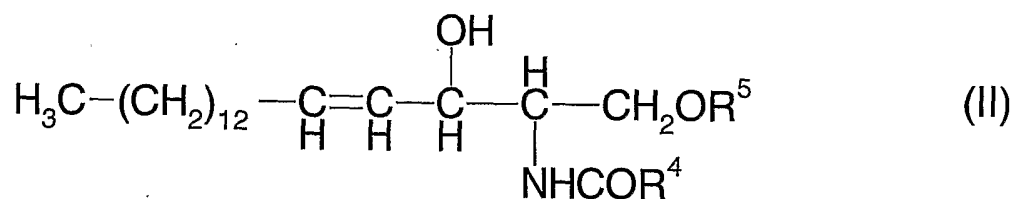


5

(式中、 R^6 は水素原子、置換基を有していてもよいアルキルまたは置換基を有していてもよいシクロアルキルを、 m は0または1を示す。) で表される基(以下、基(III)と略記する場合もある)を示す。) で表される化合物またはその塩(以下、化合物(I)と略記する場合もある)である上記(1)記載のスクリーニング方法、

- (5) R^1 がアシルである上記(4)記載のスクリーニング方法、
 (6) R^2 が水素原子またはアシルである上記(4)記載のスクリーニング方法、
 (7) R^3 が基(III)である上記(4)記載のスクリーニング方法、
 (8) リガンドが、下式：

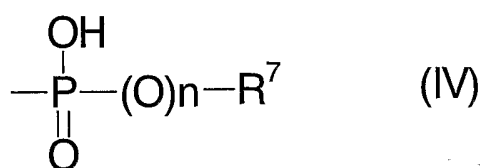
15



[式中、 R^4 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、

- R^5 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：

20



- (式中、 R^7 は水素原子、置換基を有していてもよいアルキルまたは置換基を有していてもよいシクロアルキルを、 n は0または1を示す。) で表される基 (以下、基 (IV) と略記する場合もある) を示す。]
- 5 表される化合物またはその塩である上記 (1) 記載のスクリーニング方法、
- (9) リガンドがリゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリンである上記 (1) 記載のスクリーニング方法、
- (10) 配列番号: 31 で表されるアミノ酸配列を含有してなる蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、
- 10 (11) 配列番号: 35 で表されるアミノ酸配列を含有してなる蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩なども提供する。

- 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその部分ペプチドもしくはその塩
- 15 (本発明の受容体) または本発明の受容体と特異的に結合する能力を有するリガンド (本発明のリガンド) の活性・機能を阻害する化合物 (例、本発明の受容体アンタゴニスト) は、低毒性で安全な優れた IL-13 産生抑制剤、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド (例、ロイコトリエン、プロスタグランジンなど) 産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤などとして、
- 20 例えば、免疫疾患 [例、炎症性疾患 (下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー (例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど)、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など]、呼吸器疾患 [例、慢性閉塞
- 25

- 性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など）、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、P T C A 後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、消化器疾患〔例、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症、中枢疾患〔例、神経変性疾患（例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病（クロイツフェルトーヤコブ病）、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）、精神疾患（例、統合失調症、うつ病、双極性障害、不安障害、注意欠陥・多動性障害、パニック障害など）、脳血管障害（例、脳血栓症、脳塞栓症、一過性脳虚血発作など）など〕の予防・治療剤などとして有用である。
- 25 また、本発明の受容体と本発明のリガンドを用いるスクリーニング方法またはスクリーニング用キットにより、IL-13産生抑制作用、肥満細胞の脱顆粒抑制作用、エイコサノイド産生抑制作用、肥満細胞増殖抑制作用などを有する化合物またはその塩が効率よく取得できる。

また、本発明の受容体と本発明のリガンドを用い、本発明の受容体を

介したextracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) または／およびextracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) の活性を測定し、指標とすることにより、本発明の受容体の活性化を促進または抑制する化合物またはその塩が効率よくスクリーニングでき、該化合物は、肥満細胞増殖または分化抑制剤として有用である。

さらに、ミクログリア細胞と本発明のリガンドを用いるスクリーニング方法またはスクリーニング用キットにより、中枢疾患の予防・治療剤のスクリーニングも可能となる。

10 図面の簡単な説明

図 1 は、DNP-BSAまたはlysoPS刺激時におけるラット腹腔肥満細胞を用いたラットIL-13発現量に対する作用を示す図である。図中、白棒は非刺激時におけるIL-13発現量のGAPDH発現量に対する割合を、斜線棒はDNP-BSA刺激時のIL-13発現のGAPDH発現量に対する割合を、黒棒はDNP-BSAおよびlysoPS刺激時のIL-13発現のGAPDH発現量に対する割合を示す。

図 2 は、ラット各組織および細胞におけるGPR34の発現量を示す図である。図中の％はラット各組織および細胞から抽出したRNAを用いてTaqMAN PCR 法にGPR34、GAPDHの発現量を測定し、GPR34発現量のGAPDH発現量に対する割合を示す。

図 3 は、マウス各組織および細胞におけるGPR34の発現量を示す図である。図中の％はマウス各組織および細胞から抽出した RNAを用いてTaqMAN PCR法にGPR34、GAPDHの発現量を測定し、GPR34発現量のGAPDH発現量に対する割合を示す。

図 4 は、リゾホスファチジルセリンおよびホスファチジルセリンのGPR34発現CHO細胞に対するcAMP産生抑制活性を示す図である。図中、 $\bigcirc$ は、リゾホスファチジルセリンを投与した場合を、 $\square$ は、ホスファチジルセリンを投与した場合を示す。

図 5 は、リゾホスファチジルセリンのGPR34発現CHO細胞に対する遊走

刺激活性を示す図である。

図 6 は、LysoPS刺激時における、ヒトGPR34発現CHO細胞を用いた、
ERK1/2 (p42/p44 MAP Kinase) のリン酸化に対するlysoPS濃度依存性を
示す図である。図中の矢印はそれぞれの抗体によって検出されたp44 MAPK
5 またはp42 MAPKのバンドの位置を示す。

図 7 は、LysoPS刺激時における、ヒトGPR34発現CHO細胞を用いた、
ERK1/2 (p42/p44 MAP Kinase) のリン酸化の経時変化を示す図である。
図中の矢印はそれぞれの抗体によって検出されたp44 MAPKまたはp42
MAPKのバンドの位置を示す。

10 図 8 は、LysoPS刺激時における、ヒトGPR34発現CHO細胞を用いた、百
日咳毒素 (PTX) で細胞を処理した時のERK1/2 (p42/p44 MAP Kinase) のリ
ン酸化に対する作用を示す図である。図中の矢印はそれぞれの抗体によ
って検出されたp44 MAPKまたはp42 MAPKのバンドの位置を示す。

図 9 は、LysoPS刺激時における、マウス骨髄肥満細胞を用いた、ERK1/2
15 (p42/p44 MAP Kinase) のリン酸化に対するlysoPS濃度依存性を示す図
である。図中の矢印はそれぞれの抗体によって検出されたp44 MAPKまた
はp42 MAPKのバンドの位置を示す。

図 10 は、LysoPS刺激時における、マウス骨髄肥満細胞を用いた、
ERK1/2 (p42/p44 MAP Kinase) のリン酸化の経時変化を示す図である。
20 図中の矢印はそれぞれの抗体によって検出されたp44 MAPKまたはp42
MAPKのバンドの位置を示す。

図 11 は、LysoPS刺激時における、マウス骨髄肥満細胞を用いた、百
日咳毒素 (PTX) で細胞を処理した時のERK1/2 (p42/p44 MAP Kinase) のリ
ン酸化に対する作用を示す図である。図中の矢印はそれぞれの抗体によ
25 って検出されたp44 MAPKまたはp42 MAPKのバンドの位置を示す。

図 12 は、LysoPS刺激時における、ラット腹腔肥満細胞を用いた、百
日咳毒素 (PTX) で細胞を処理した時のERK1/2 (p42/p44 MAP Kinase) のリ
ン酸化に対する作用を示す図である。図中の矢印はそれぞれの抗体によ
って検出されたp44 MAPKまたはp42 MAPKのバンドの位置を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、「配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその部分ペプチドもしくは
5 はその塩」を「本発明の受容体」と略記する場合がある。さらに、「本発明の受容体と特異的に結合する能力を有するリガンド」を「本発明のリガンド」と略記する場合がある。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、
10 ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、
15 軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳
20 皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巢、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例、MEL、M1、CTLL-2、HT-2、WEHI-3、HL-60、JOSK-1、K562、
25 ML-1、MOLT-3、MOLT-4、MOLT-10、CCRF-CEM、TALL-1、Jurkat、CCRT-HSB-2、KE-37、SKW-3、HUT-78、HUT-102、H9、U937、THP-1、HEL、JK-1、CMK、KO-812、MEG-01、LAD 1、LAD 2など）に由来する蛋白質であってもよく、合成蛋白質であってもよい。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列

としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列
5 含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：19、配列番号：22、配列番号：31、配列
10 番号：35で表されるアミノ酸配列などが挙げられる。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが
15 好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するリガ
20 ンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明の蛋白質としては、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したア
25 ミノ酸配列、(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～10

0 個程度、好ましくは 1 ～ 50 個程度、好ましくは 1 ～ 30 個程度、より好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個（1 ～ 5 個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、（iv）配列番号：1 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（例えば 1 ～ 100 個程度、好ましくは 1 ～ 50 個程度、好ましくは 1 ～ 30 個程度、より好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個（1 ～ 5 個））のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、または（v）それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本発明の受容体の部分ペプチド（以下、本発明の部分ペプチドと称する場合がある）としては、後述の医薬等のスクリーニング方法に用いることのできる部分ペプチドであれば、いかなるものであってもよく、例えば、本発明の蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、実質的に同質のリガンド結合活性などを有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでもよい。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、本発明の蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも 20 個以上、好ましくは 50 個以上、より好ましくは 100 個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、（i）上記アミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個（1 ～ 5 個））のアミノ酸が欠失し、（ii）上記アミノ酸配列に 1 または 2 個以上（好ましくは、1 ～ 20 個程度、より好ましくは 1 ～ 10 個程度、

さらに好ましくは数個（１～５個）のアミノ酸が付加し、または（iii）上記アミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～１０個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは１～５個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

- 5 具体例としては、配列番号：１で表される配列の第１～５３番目、第１１４～１２８番目、第１９７～２１６番目、または第２９３～３１０番目のアミノ酸配列を含む部分ペプチド、配列番号：１９で表される配列の第１～４６番目、第１０７～１２１番目、第１９０番目～２０９番目、または第２８６番目～３０３番目のアミノ酸配列を含む部分ペプチドなどが用いられる。

本発明の受容体および本発明の部分ペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がＮ末端（アミノ末端）、右端がＣ末端（カルボキシル末端）である。Ｃ末端はカルボキシ（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

- 15 ここでエステルにおけるＲとしては、例えば、メチル、エチル、 n －プロピル、イソプロピルもしくは n －ブチルなどの C_{1-6} アルキル、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル、例えば、フェニル、 α －ナフチルなどの C_{6-12} アリール、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル－ C_{1-2} アルキルもしくは α －ナフチルメチルなどの α －ナフチル－ C_{1-2} アルキルなどの C_{7-14} アラルキルのほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルなどが用いられる。

- 本発明の受容体および本発明の部分ペプチドがＣ末端以外にカルボキシ（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシがアミド化またはエステル化されているものも本発明の受容体および本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したＣ末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の受容体および本発明の部分ペプチドには、Ｎ末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル、アセチルなどの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシルなど）で保

護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル、アセチルなどのC₁₋₆アルカノイルなどのC₁₋₆アシルなど）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明の受容体または本発明の部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のリガンドとしては、本発明の受容体と特異的に結合するものであれば、何れの物であってもよい。例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩との結合の解離定数が10 μ M以下、好ましくは2 μ M以下、さらに好ましくは1 μ M以下、特に好ましくは200 nM以下、最も好ましくは100 nM以下である物などが挙げられる。

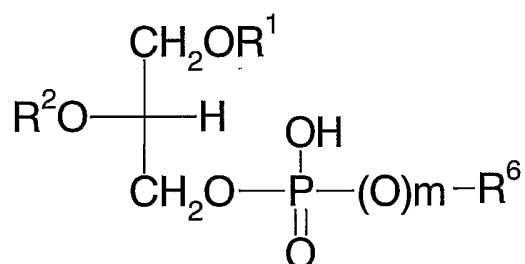
本発明のリガンドとしては、例えば、脂質などが用いられる。具体的にはホスホノ脂質などのリン脂質なども用いられる。好ましくは、エーテルリン脂質、ホスホノエーテル脂質、グリセロリン脂質、ホスホノグリセロ脂質、スフィンゴ脂質、スフィンゴリン脂質、ホスホノスフィンゴ脂質などが用いられる。なかでも、エーテルリン脂質、ホスホノエーテル脂質、グリセロリン脂質、ホスホノグリセロ脂質が好ましい。さらにグリセロリン脂質が好ましい。

エーテルリン脂質、ホスホノエーテル脂質、グリセロリン脂質、ホスホノグリセロ脂質、スフィンゴ脂質、スフィンゴリン脂質およびホスホ

ノスフィンゴ脂質などから選ばれる２種以上の混合物も、本発明のリガンドに含まれる。

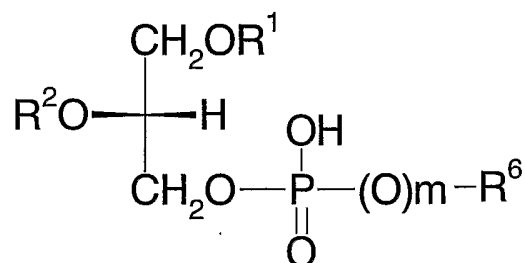
エーテルリン脂質、ホスホノエーテル脂質、グリセロリン脂質およびホスホグリセロ脂質としては、例えば化合物 (I) などが挙げられる。

5 化合物 (I) は、好ましくは、下式：



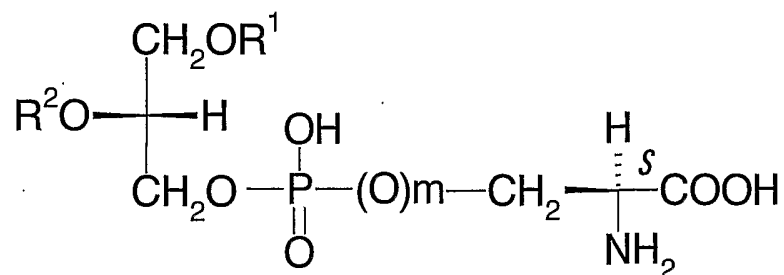
〔式中、各記号は上記と同意義を示す〕で表される化合物またはその塩である。

10 さらに好ましくは、下式：



〔式中、各記号は上記と同意義を示す〕で表される化合物またはその塩である。

15 さらに好ましくは、下式：



〔式中、各記号は上記と同意義を示す〕で表される化合物またはその塩である。

各式中、 R^1 、 R^2 または R^3 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「炭化水素基」としては、例えば、アルキル、アルケニル、
5 アルキニル、シクロアルキルなどが挙げられる。炭素数は1～30個が好ましい。

「アルキル」としては、例えば C_{1-30} アルキル（例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウン
10 デシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、イコシル、ヘニコシル、ドコシル、トリコシル、テトラコシル、ペンタコシル、ヘキサコシル、ヘプタコシル、オクタコシル、ノナコシル、トリアコンチルなど）
などが挙げられる。好ましくは C_{9-30} アルキルなどである。さらに好ましくはトリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタ
15 デシル、オクタデシル、ノナデシルなどの C_{13-19} アルキルなどである。

「アルケニル」としては、例えば C_{2-30} アルケニル（例、ビニル、アリル、イソプロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、2-メチル-2-プロペニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-
20 -1-プロペニル、ヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、ノネニル、デセニル、ウンデセニル、ドデセニル、トリデセニル、テトラデセニル、テトラデカジエニル、ペンタデセニル、ペンタデカジエニル、ヘキサデセニル、ヘキサデカジエニル、ヘプタデセニル、ヘプタデカジエニル、ヘプタデカトリエニル、オクタデセニル、オクタデカジエニル、ノナデ
25 セニル、ノナデカジエニル、ノナデカトリエニル、ノナデカテトラエニル、イコセニル、イコサジエニル、ヘニコセニル、ドコセニル、トリコセニル、テトラコセニル、ペンタコセニル、ヘキサコセニル、ヘプタコセニル、オクタコセニル、ノナコセニル、トリアコンテニルなど）などが挙げられる。好ましくは C_{13-19} アルケニルである。

「アルキニル」としては、例えばC₂₋₃₀アルキニル（例、エチニル、プロパルギル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-ヘキシニル、テトラデシニル、ペンタデシニル、ヘキサデシニル、ヘプタデシニル、オクタデシニル、ノナデシニル、イコシニル、ヘニコシニル、ドコシニル、トリコシニル、テトラコシニル、ペンタコシニル、ヘキサコシニル、ヘプタコシニル、オクタコシニル、ノナコシニル、トリアコンチニルなど）などが挙げられる。好ましくはC₁₅₋₁₇アルキニルである。

「シクロアルキル」としては、例えばC₃₋₆シクロアルキル（例、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなど）などが挙げられる。

R¹、R²またはR³で示される「アシル」としては、式： $-\text{CO}-\text{R}^8$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{OR}^8$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^8\text{R}^9$ 、 $-\text{SO}-\text{R}^{10}$ 、または $-\text{SO}_2-\text{R}^{10}$ 〔式中、R⁸は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基または置換基を有していてもよい複素環基を、R⁹は水素原子またはC₁₋₆アルキルを、R¹⁰は置換基を有していてもよい炭化水素基または置換基を有していてもよい複素環基を示す〕で表される基などが挙げられる。好ましくは、式： $-\text{CO}-\text{R}^8$ で表される基である。

R⁸またはR¹⁰で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「炭化水素基」としては、上記R¹、R²またはR³で示される「炭化水素基」などが挙げられる。

本明細書中の「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「置換基」としては、例えばハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）、C₁₋₃アルキレンジオキシ（例、メチレンジオキシ、エチレンジオキシなど）、ニトロ、シアノ、ハロゲン化されていてもよいC₁₋₆アルキル（例、メチル、クロロメチル、ジフルオロメチル、トリクロロメチル、トリフルオロメチル、エチル、2-ブロモエチル、2, 2, 2-トリフルオロエチル、ペンタフルオロエチル、プロピル、3, 3, 3-トリフルオロプロピル、イソプロピル、ブチル、4, 4, 4-トリフルオロブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオ

ペンチル、5, 5, 5-トリフルオロペンチル、ヘキシル、6, 6, 6-トリフルオロヘキシルなど)、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、ハロゲン化されていてもよい C_{3-6} シクロアルキル(例、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、4, 4-ジクロロシクロヘキシル、2, 2, 3, 3-テトラフルオロシクロペンチル、4-クロロシクロヘキシルなど)、 C_{6-14} アリール(例、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、2-ビフェニリル、3-ビフェニリル、4-ビフェニリル、2-アンスリルなど)、ハロゲン化されていてもよい C_{1-8} アルコキシ(例、メトキシ、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ、エトキシ、2, 2, 2-トリフルオロエトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、4, 4, 4-トリフルオロブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシなど)、ヒドロキシ、 C_{6-14} アリールオキシ(例、フェニルオキシ、1-ナフチルオキシ、2-ナフチルオキシなど)、 C_{7-16} アラルキルオキシ(例、ベンジルオキシ、フェネチルオキシなど)、メルカプト、ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキルチオ(例、メチルチオ、ジフルオロメチルチオ、トリフルオロメチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、ブチルチオ、4, 4, 4-トリフルオロブチルチオ、ペンチルチオ、ヘキシルチオなど)、 C_{6-14} アリールチオ(例、フェニルチオ、1-ナフチルチオ、2-ナフチルチオなど)、 C_{7-16} アラルキルチオ(例、ベンジルチオ、フェネチルチオなど)、アミノ、モノ- C_{1-6} アルキルアミノ(例、メチルアミノ、エチルアミノなど)、モノ- C_{6-14} アリールアミノ(例、フェニルアミノ、1-ナフチルアミノ、2-ナフチルアミノなど)、ジ- C_{1-6} アルキルアミノ(例、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、エチルメチルアミノなど)、ジ- C_{6-14} アリールアミノ(例、ジフェニルアミノなど)、ホルミル、カルボキシ、 C_{1-6} アルキル-カルボニル(例、アセチル、プロピオニルなど)、 C_{3-6} シクロアルキル-カルボニル(例、シクロプロピルカルボニル、シクロペンチルカルボニル、シクロヘキシルカルボニルなど)、 C_{1-6} アルコキシ-カルボニル(例、メトキシカルボニル、エ

トキシカルボニル、プロボキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニルなど)、 C_{6-14} アリールカルボニル(例、ベンゾイル、1-ナフトイル、2-ナフトイルなど)、 C_{7-16} アラルキルカルボニル(例、フェニルアセチル、3-フェニルプロピオニルなど)、 C_{6-14} アリールオキシカルボニル(例、フェノキシカルボニルなど)、 C_{7-16} アラルキルオキシカルボニル(例、ベンジルオキシカルボニル、フェネチルオキシカルボニルなど)、5 5ないし6員複素環カルボニル(例、ニコチノイル、イソニコチノイル、テノイル、フロイル、モルホリノカルボニル、チオモルホリノカルボニル、ピペラジーン-1-イルカルボニル、ピロリジン-1-イルカルボニルなど)、カルバモイル、モノ- C_{1-6} アルキルカルバモイル(例、メチルカルバモイル、エチルカルバモイルなど)、ジ- C_{1-6} アルキルカルバモイル(例、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、エチルメチルカルバモイルなど)、 C_{6-14} アリールカルバモイル(例、フェニルカルバモイル、1-ナフチルカルバモイル、2-ナフチルカルバモイルなど)、15 5ないし6員複素環カルバモイル(例、2-ピリジルカルバモイル、3-ピリジルカルバモイル、4-ピリジルカルバモイル、2-チエニルカルバモイル、3-チエニルカルバモイルなど)、 C_{1-6} アルキルスルホニル(例、メチルスルホニル、エチルスルホニルなど)、 C_{6-14} アリールスルホニル(例、フェニルスルホニル、1-ナフチルスルホニル、2-ナフチルスルホニルなど)、ホルミルアミノ、 C_{1-6} アルキルカルボニルアミノ(例、アセチルアミノなど)、 C_{6-14} アリールカルボニルアミノ(例、ベンゾイルアミノ、ナフトイルアミノなど)、 C_{1-6} アルコキシカルボニルアミノ(例、メトキシカルボニルアミノ、エトキシカルボニルアミノ、プロボキシカルボニルアミノ、ブトキシカルボニルアミノなど)、25 C_{1-6} アルキルスルホニルアミノ(例、メチルスルホニルアミノ、エチルスルホニルアミノなど)、 C_{6-14} アリールスルホニルアミノ(例、フェニルスルホニルアミノ、2-ナフチルスルホニルアミノ、1-ナフチルスルホニルアミノなど)、 C_{1-6} アルキルカルボニルオキシ(例、アセトキシ、プロピオニルオキシなど)、 C_{6-14} アリー

ルーカルボニルオキシ（例、ベンゾイルオキシ、ナフチルカルボニルオ
 キシなど）、 C_{1-6} アルコキシーカルボニルオキシ（例、メトキシカルボ
 ニルオキシ、エトキシカルボニルオキシ、プロポキシカルボニルオキシ、
 ブトキシカルボニルオキシなど）、モノー C_{1-6} アルキルーカルバモイル
 5 オキシ（例、メチルカルバモイルオキシ、エチルカルバモイルオキシな
 ど）、ジー C_{1-6} アルキルーカルバモイルオキシ（例、ジメチルカルバモ
 イルオキシ、ジエチルカルバモイルオキシなど）、 C_{6-14} アリールーカル
 バモイルオキシ（例、フェニルカルバモイルオキシ、ナフチルカルバモ
 イルオキシなど）、ニコチノイルオキシ、5ないし7員飽和環状アミノ
 10 （例、ピロリジン-1-イル、ピペリジノ、ピペラジン-1-イル、モ
 ルホリノ、チオモルホリノ、テトラヒドロアゼピン-1-イルなど）、
 5ないし10員芳香族複素環基（例、2-チエニル、3-チエニル、2-
 ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-キノリル、3-キノリ
 ル、4-キノリル、5-キノリル、8-キノリル、1-イソキノリル、
 15 3-イソキノリル、4-イソキノリル、5-イソキノリル、1-インド
 リル、2-インドリル、3-インドリル、2-ベンゾチアゾリル、2-
 ベンゾ[b]チエニル、3-ベンゾ[b]チエニル、2-ベンゾ[b]
 フラニル、3-ベンゾ[b]フラニルなど）、スルホなどが挙げられる。

該「炭化水素基」は、例えば上記置換基を、置換可能な位置に1ない
 20 し5個、好ましくは1ないし3個有していてもよく、置換基数が2個以
 上の場合、各置換基は同一または異なってもよい。

R^8 または R^{10} で示される「置換基を有していてもよい複素環基」の「複
 素環基」としては、例えば、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および
 酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む
 25 5ないし14員（単環、2環または3環式）複素環、好ましくは(i) 5
 ないし14員（好ましくは5ないし10員）芳香族複素環、(ii) 5な
 いし10員非芳香族複素環または(iii) 7ないし10員複素架橋環から
 任意の1個の水素原子を除いてできる1価基などが挙げられる。

上記「5ないし14員（好ましくは5ないし10員）の芳香族複素環」

としては、例えば、チオフエン、ベンゾ [b] チオフエン、ベンゾ [b] フラン、ベンズイミダゾール、ベンズオキサゾール、ベンゾチアゾール、ベンズイソチアゾール、ナフト [2, 3-b] チオフエン、フラン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、
 5 ピリダジン、インドール、イソインドール、1H-インダゾール、プリン、4H-キノリジン、イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、カルバゾール、 β -カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、フェナジン、チアゾール、イソチアゾール、フェノチアジン、イソオキサゾール、フラザン、フェ
 10 ノキサジンなどの芳香族複素環、またはこれらの環（好ましくは単環）が1ないし複数個（好ましくは1または2個）の芳香環（例、ベンゼン環等）と縮合して形成された環などが挙げられる。

上記「5ないし10員非芳香族複素環」としては、例えば、ピロリジン、イミダゾリン、ピラゾリジン、ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、
 15 モルホリン、チオモルホリン、ジオキサゾール、オキサジアゾリン、チアジアゾリン、トリアゾリン、チアジアゾール、ジチアゾールなどが挙げられる。

上記「7ないし10員複素架橋環」としては、例えば、キヌクリジン、7-アザピシクロ [2. 2. 1] ヘプタンなどが挙げられる。

20 該「複素環基」として好ましくは、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる1または2種、好ましくは、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし14員（好ましくは5ないし10員）の（単環または2環式）複素環基である。具体的には、例えば2-チエニル、3-チエニル、2-フリル、3-フリル、2-ピリジル、3-ピリ
 25 ジル、4-ピリジル、2-キノリル、3-キノリル、4-キノリル、5-キノリル、8-キノリル、1-イソキノリル、3-イソキノリル、4-イソキノリル、5-イソキノリル、ピラジニル、2-ピリミジニル、4-ピリミジニル、3-ピロリル、2-イミダゾリル、3-ピリダジニル、3-イソチアゾリル、3-イソオキサゾリル、1-インドリル、2

ーインドリル、3-インドリル、2-ベンゾチアゾリル、2-ベンゾ [b] チエニル、3-ベンゾ [b] チエニル、2-ベンゾ [b] フラニル、3-ベンゾ [b] フラニルなどの芳香族複素環基、例えば1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル、2-ピラゾリジニル、3-ピラゾリジニル、4-ピラゾリジニル、ピペリジノ、2-ピペリジル、3-ピペリジル、4-ピペリジル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノなどの非芳香族複素環基などである。

このうち、例えば炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる1ないし3個のヘテロ原子を含む5ないし6員の複素環基等がさらに好ましい。具体的には、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-フリル、3-フリル、ピラジニル、2-ピリミジニル、3-ピロリル、3-ピリダジニル、3-イソチアゾリル、3-イソオキサゾリル、1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル、2-ピラゾリジニル、3-ピラゾリジニル、4-ピラゾリジニル、ピペリジノ、2-ピペリジル、3-ピペリジル、4-ピペリジル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノなどが挙げられる。

該「置換基を有していてもよい複素環基」の「置換基」としては、例えば上記R⁸またはR¹⁰で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「置換基」と同様のものなどが挙げられる。

該「複素環基」は、例えば上記置換基を、置換可能な位置に1ないし5個、好ましくは1ないし3個有していてもよく、置換基数が2個以上の場合、各置換基は同一または異なってもよい。

R⁹で示される「C₁₋₆アルキル」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどのC₁₋₆アルキルが挙げられる。

R⁶で示される「置換基を有していてもよいアルキル」の「アルキル」

としては、例えばC₁₋₃₀アルキル（例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、イコシル、ヘニコシル、ドコシル、トリコシル、テトラコシル、ペンタコシル、ヘキサコシル、ヘプタコシル、オクタコシル、ノナコシル、トリアコンチルなど）などが挙げられる。好ましくはC₁₋₆アルキルなどである。

R⁶で示される「置換基を有していてもよいアルキル」の「置換基」としては、例えば、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、アルキルアンモニオ（例、トリメチルアンモニオなど）などが1～30個挙げられる。

R⁶で示される「置換基を有していてもよいシクロアルキル」の「シクロアルキル」としては、例えばC₃₋₆シクロアルキル（例、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなど）などが挙げられる。

R⁶で示される「置換基を有していてもよいシクロアルキル」の「置換基」としては、例えば、ホスホノを有していてもよいヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、アルキルアンモニオ（例、トリメチルアンモニオなど）などが1～30個挙げられる。

R⁶の好ましい例としては、R⁶-OHで表される化合物が、例えば、アルコール（例、エタノールなどのC₁₋₆アルコールなど）、多価アルコール（例、グリセロールなどの三価アルコールなど）、多価アルコールリン酸付加体（例、グリセロール-3-リン酸など）、アミノアルコール（例、エタノールアミンなどのC₁₋₆アルコールアミンなど）、アルキルアンモニオアルコール（例、コリンなど）、ヒドロキシを有するアミノ酸（例、セリン、スレオニン、ホモセリン、3-ヒドロキプロリン、4-ヒドロキプロリン、ヒドロキシリジン、チロシンなど；好ましくはセリン）、糖アルコール（例、イノシトールなど）、糖アルコールリン酸付加体（例、イノシトール-リン酸、イノシトールニリン酸、イノシト

ール三リン酸など)、単糖(例、グルコースなど)、単糖リン酸付加体(例、グルコース 6-リン酸、グルコース 1-リン酸など)などを形成する場合が挙げられる。

中でも好ましくは、ヒドロキシを有するアミノ酸などが挙げられる。

5 中でもL体が好ましい。最も好ましくはL-セリンなどである。

R¹およびR²は、それぞれ、水素原子、アルキル(例、C₁₄₋₁₈アルキルなど)、アルケニル(例、C₂₋₃アルケニルなど)、アシル(例、C₁₋₃₀アルキル-カルボニル、C₂₋₃₀アルケニル-カルボニルなど)などが好ましい。さらに好ましくはC₁₋₃₀アルキル-カルボニル、C₂₋₃₀アルケニル-カルボニルなどのアシルである。

R³は基(III)などが好ましい。

R⁶は(a)水素原子または(b)ヒドロキシ、カルボキシ、アミノおよびアルキルアンモニオから選ばれる置換基をそれぞれ有していてもよいアルキルまたはシクロアルキルが好ましい。具体例としては、C₁₋₆アルキル、ジヒドロキシプロピル、アミノエチル、トリメチルアンモニオエチル、2-アミノ-2-カルボキシエチル、ヘキサヒドロキシシクロヘキシルなどが挙げられる。

mは1が好ましい。

化合物(I)中、以下の化合物などが好ましく用いられる。

20 (1a) 血小板活性化因子(platelet activating factor)〔R¹がC₁₆アルキル(ヘキサデシル)および/またはC₁₈アルキル(オクタデシル)、R²がアセチル、R³が基(III)、R⁶がトリメチルアンモニオエチル、mが1である化合物(I)〕、

25 (1b) リゾ血小板活性化因子〔R¹がヘキサデシルおよび/またはオクタデシル、R²が水素原子、R³が基(III)、R⁶がトリメチルアンモニオエチル、mが1である化合物(I)〕、

(1c) プラズマローゲン類〔R¹が1-アルケニル、R²がC₁₋₂₉アルキル-カルボニルまたはC₂₋₂₉アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)、R³が基(III)、R⁶がトリメチルアンモニオエチル、ア

ミノエチルまたは2-アミノ-2-カルボキシエチル、 m が1である化合物 (I) 〕、

(1d) リゾプラスマローゲン類〔 R^1 が1-アルケニル、 R^2 が水素原子、 R^3 が基 (III)、 R^6 がトリメチルアンモニオエチル、アミノエチルまたは
5 は2-アミノ-2-カルボキシエチル、 m が1である化合物 (I) 〕などのエーテルリン脂質；

(2a) ホスファチジン酸類〔 R^1 が C_{10-28} アルキル-カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル-カルボニル (1から5個の二重結合を有する) (例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-
10 ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9, 12-オクタデカジエノイル、9, 12, 15-オクタデカトリエノイル、6, 9, 12-オクタデカトリエノイル、9, 11, 13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11-イコサジエノイル、5, 8, 11-イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14-イコサテトラ
15 エノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が C_{10-28} アルキル-カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル-カルボニル (1から5個の二重結合を有する) (例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オク
20 タデセノイル、11-オクタデセノイル、9, 12-オクタデカジエノイル、9, 12, 15-オクタデカトリエノイル、6, 9, 12-オクタデカトリエノイル、9, 11, 13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11-イコサジエノイル、5, 8, 11-イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、
25 15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^3 が基 (III)、 R^6 が水素原子、 m が1である化合物 (I) 〕、

(2b) リゾホスファチジン酸類〔 R^1 が水素原子または C_{10-28} アルキル-カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル-カルボニル (1から5個の二重結合を有する) (例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘ

- キサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、
- 5 8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が水素原子または C_{13-23} アルキル-カルボニルもしくは C_{13-23} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、
- 10 ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,
- 15 8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^3 が基(III)、 R^6 が水素原子、 m が1である(ただし R^1 が水素原子の場合、 R^2 は水素原子以外)化合物(I)]、
- 20 (2c) ホスファチジルコリン類 [R^1 が C_{10-28} アルキル-カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-
- 25 オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が C_{13-23} アル

キル-カルボニルまたは C_{13-23} アルケニル-カルボニル（1 から 5 個の二重結合を有する）（例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど）、 R^3 が基（III）、 R^6 がトリメチルアンモニオエチル、 m が 1 である化合物（I）】、

（2d）リゾホスファチジルコリン類〔 R^1 が水素原子または C_{10-28} アルキル-カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル-カルボニル（1 から 5 個の二重結合を有する）（例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど）、 R^2 が水素原子または C_{10-28} アルキル-カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル-カルボニル（1 から 5 個の二重結合を有する）（例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラ

エノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど）、 R^3 が基（III）、 R^6 がトリメチルアンモニオエチル、 m が1である（ただし R^1 が水素原子の場合、 R^2 は水素原子以外）化合物（I）〕、

- 5 (2e) ホスファチジルエタノールアミン類〔 R^1 が C_{10-28} アルキル-カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル-カルボニル（1から5個の二重結合を有する）（例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど）、 R^2 が
- 10 C_{10-28} アルキル-カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル-カルボニル（1から5個の二重結合を有する）（例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど）、 R^3 が基（III）、 R^6 がアミノエチル、 m が1である化
- 20 合物（I）〕、
- 25

(2f) リゾホスファチジルエタノールアミン類〔 R^1 が水素原子または C_{10-28} アルキル-カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル-カルボニル（1から5個の二重結合を有する）（例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノ

イル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど）、 R^2 が水素原子または C_{10-28} アルキル-カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル-カルボニル（1から5個の二重結合を有する）（例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど）、 R^3 が基（III）、 R^6 がアミノエチル、 m が1である（ただし R^1 が水素原子の場合、 R^2 は水素原子以外）化合物（I）〕、

（2g）ホスファチジルセリン類〔 R^1 が C_{10-28} アルキル-カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル-カルボニル（1から5個の二重結合を有する）（例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど）、 R^2 が C_{10-28} アルキル-カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル-カルボニル（1から5個の二

重結合を有する) (例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9, 12-オクタデカジエノイル、9, 12, 15-オクタデカトリエノイル、6, 9, 12-オクタデカトリエノイル、9, 11, 13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11-イコサジエノイル、5, 8, 11-イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^3 が基(III)、 R^6 が2-アミノ-2-カルボキシエチル、 m が1である化合物(I)]、

(2h) リゾホスファチジルセリン類 [R^1 が水素原子または C_{10-28} アルキル-カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する) (例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9, 12-オクタデカジエノイル、9, 12, 15-オクタデカトリエノイル、6, 9, 12-オクタデカトリエノイル、9, 11, 13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11-イコサジエノイル、5, 8, 11-イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が水素原子または C_{10-28} アルキル-カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する) (例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9, 12-オクタデカジエノイル、9, 12, 15-オクタデカトリエノイル、6, 9, 12-オクタデカトリエノイル、9, 11, 13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11-イコサジエノイル、5, 8, 11-イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、

ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^3 が基(III)、 R^6 が2-アミノ-2-カルボキシエチル、 m が1である(ただし R^1 が水素原子の場合、 R^2 は水素原子以外)化合物(I)]、

(2i) ホスファチジルイノシトール類 [R^1 が C_{10-28} アルキル-カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が C_{10-28} アルキル-カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^3 が基(III)、 R^6 がヘキサヒドロキシシクロヘキシル、 m が1である化合物(I)]、

(2j) リゾホスファチジルイノシトール類 [R^1 が水素原子または C_{10-28} アルキル-カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカ

ジエノイル、9, 12, 15-オクタデカトリエノイル、6, 9, 12-オクタデカトリエノイル、9, 11, 13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11-イコサジエノイル、5, 8, 11-イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど）、 R^2 が水素原子または C_{10-28} アルキル-カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル-カルボニル（1から5個の二重結合を有する）（例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9, 12-オクタデカジエノイル、9, 12, 15-オクタデカトリエノイル、6, 9, 12-オクタデカトリエノイル、9, 11, 13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11-イコサジエノイル、5, 8, 11-イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど）、 R^3 が基（III）、 R^6 がヘキサヒドロキシシクロヘキシル、 m が1である（ただし R^1 が水素原子の場合、 R^2 は水素原子以外）化合物（I）]などのグリセロリン脂質など。

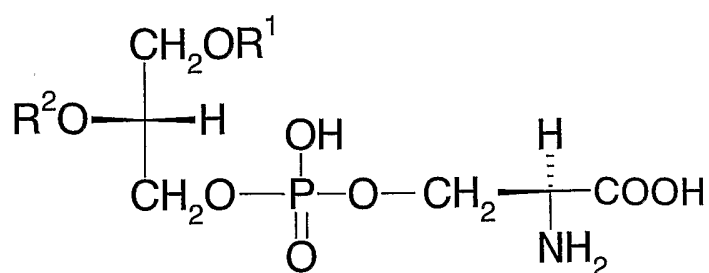
なかでも好ましくは、

- 20 (i) ホスファチジルセリン [R^1 がデカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9, 12-オクタデカジエノイル、9, 12, 15-オクタデカトリエノイル、6, 9, 12-オクタデカトリエノイル、9, 11, 13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11-イコサジエノイル、5, 8, 11-イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイルまたはオクタコサノイル、 R^2 がデカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オク
- 25

タデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイルまたはオクタコサノイル、
 5 R^3 が基(III)、 R^6 が2-アミノ-2-カルボキシエチル、 m が1である化合物(I)」、

(ii) リゾホスファチジルセリン [R^1 がデカノイル、ドデカノイル、
 10 テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、
 15 テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイルまたはオクタコサノイル、 R^2 がデカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイルまたはオクタコサノイル、
 20 R^3 が基(III)、 R^6 が2-アミノ-2-カルボキシエチル、 m が1である化合物(I)] などである。

好ましくは、下式で表される化合物などである。

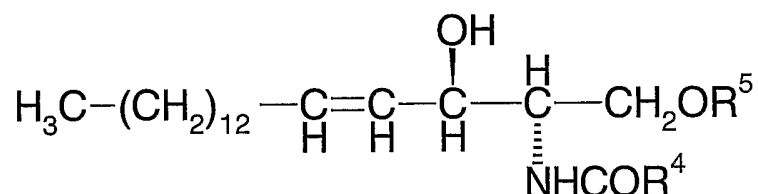


- 〔式中、各記号は上記と同意義を示す。〕ここで、 R^1 および R^2 は、好ましくは水素原子、アルキル（例、 C_{14-18} アルキルなど）、アルケニル（例、 C_{2-3} アルケニルなど）、またはアシル（例、 C_{1-30} アルキル-カルボニル、 C_{2-30} アルケニル-カルボニルなど）などである。

R^1 として好ましくは、 C_{1-30} アルキル-カルボニルなどである。 R^2 として好ましくは、水素原子である。 R^1 と R^2 の組み合わせとして好ましいものは R^1 は水素原子であり、 R^2 として好ましくは、 C_{1-30} アルキル-カルボニルなどである。

- 10 具体的には、1-ステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン、1-パルミトイル-s n-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン、または1-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン、2-アラキドニル-s n-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン、2-リノレイル-s n-グリセロ-3-ホスホ-L-セリンなどが挙げられる。
- 15 スフィンゴ脂質、スフィンゴリン脂質およびホスホノスフィンゴ脂質としては、例えば化合物（II）などが挙げられる。

化合物（II）は、好ましくは、下式：



- 20 〔式中、各記号は上記と同意義を示す〕で表される化合物またはその塩である。

上記式中、 R^4 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」としては、上記の R^1 、 R^2 または R^3 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」と同様のものが挙げられる。

5 R^4 で示される「アシル」としては、上記の R^1 、 R^2 または R^3 で示される「アシル」と同様のものが挙げられる。

R^5 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」としては、上記 R^1 、 R^2 または R^3 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」と同様のものが挙げられる。

10 R^5 で示される「アシル」としては、上記 R^1 、 R^2 または R^3 で示される「アシル」と同様のものが挙げられる。

R^7 で示される「置換基を有していてもよいアルキル」および「置換基を有していてもよいシクロアルキル」としては、上記 R^6 で示される「置換基を有していてもよいアルキル」および「置換基を有していてもよいシクロアルキル」がそれぞれ挙げられる。

15 R^4 は、水素原子、アシル（例、 C_{1-30} アルキル-カルボニル、 C_{2-30} アルケニル-カルボニルなど）などが好ましい。

R^5 は水素原子または基（IV）などが好ましい。

R^7 はアミノを有していてもよいアルキルなどが好ましい。

n は1が好ましい。

20 化合物（II）中、以下の化合物などが好ましく用いられる。

（3a）スフィンゴシン〔 R^4 が水素原子、 R^5 が水素である化合物（II）〕、

（3b）セラミド類〔 R^4 が C_{2-24} アルキル-カルボニルまたは C_{2-24} アルケニル-カルボニル（1から5個の二重結合を有する）、 R^5 が水素原子である化合物（II）〕などのスフィンゴ脂質、

25 （4a）スフィンゴミエリン類〔 R^4 が C_{2-24} アルキル-カルボニルまたは C_{2-24} アルケニル-カルボニル（1から5個の二重結合を有する）、 R^5 が基（IV）、 R^7 がトリメチルアンモニオエチル、 n が1である化合物（IV）〕、

（4b）スフィンゴシル1-リン酸〔 R^4 が水素原子、 R^5 が基（IV）、 R^7 が水素原子、 n が1である化合物（II）〕、

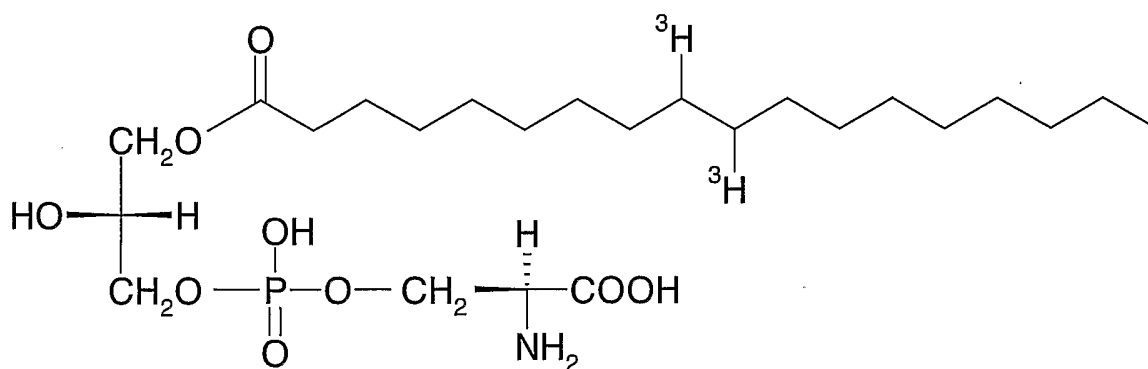
(4c) スフィンゴシルホスホリルコリン〔 R^4 が水素原子、 R^5 が基(IV)、 R^7 がトリメチルアンモニオエチル、 n が1である化合物(II)〕などのスフィンゴリン脂質など。

式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物またはそれらの塩を標識したものも、本発明のリガンドに含まれる。

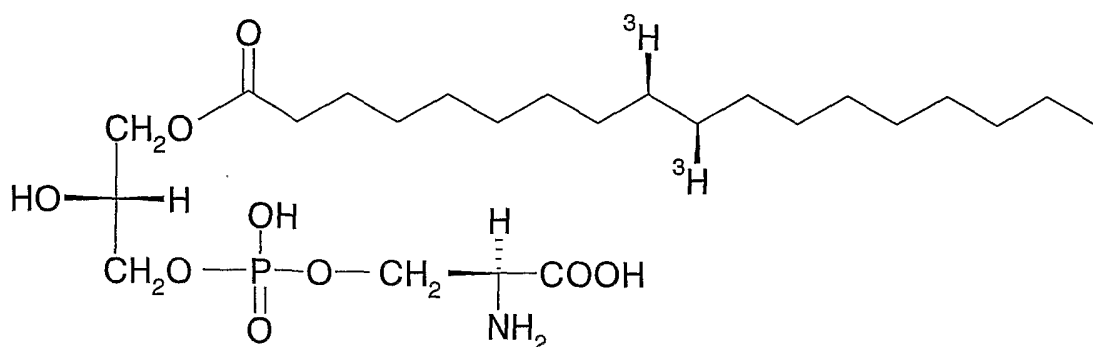
標識物質としては、放射性同位元素(例、 $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{32}P]$ 、 $[^{33}P]$ 、 $[^{35}S]$ など)、蛍光物質(例、フルオレセインなど)、発光物質(例、ルミノールなど)、酵素(例、ペルオキシダーゼなど)、ランタニド元素などがあげられる。中でも、放射性同位元素が好ましい。さらに、トリチウムが好ましい。

標識したリガンドとして好ましくは、放射性同位元素で標識された式(I)で表される化合物またはその塩、さらに好ましくは、放射性同位元素で標識されたグリセロリン脂質、さらに好ましくは放射性同位元素(好ましくはトリチウム)で標識されたリゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリン、さらに好ましくはトリチウムで標識されたリゾホスファチジルセリンなどが挙げられる。

トリチウムで標識されたリゾホスファチジルセリンの具体例としては、下式の1-[9, 10- 3H_2]-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリンなどが挙げられる。

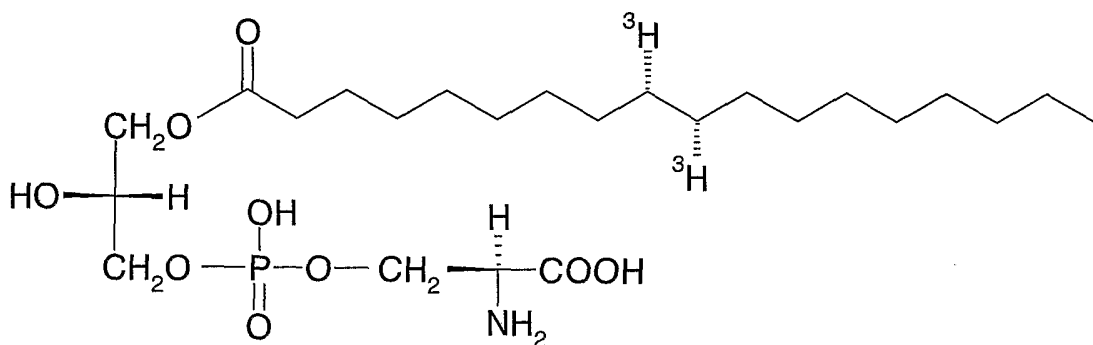


好ましくは、下式の1-[9(S), 10(R)- 3H_2]-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン、または



下式の 1 - [9 (R) , 1 0 (S) - $^3\text{H}_2$] - ステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリンなどである。

5



式 (I) で表される化合物の塩、および式 (II) で表される化合物の塩としては、例えば金属塩、アンモニウム塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。金属塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩などのアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6 - エルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N' - ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例

としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタン
スルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などとの
塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばア
5 ルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸と
の塩の好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸など
の塩が挙げられる。

このうち、薬学的に許容し得る塩が好ましい。例えば、化合物内に酸
性官能基を有する場合にはアルカリ金属塩（例、ナトリウム塩、カリウ
10 ム塩など）、アルカリ土類金属塩（例、カルシウム塩、マグネシウム塩、
バリウム塩など）などの無機塩、アンモニウム塩など、また、化合物内
に塩基性官能基を有する場合には、例えば臭化水素酸、硝酸、硫酸、リ
ン酸など無機酸との塩、または酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、
酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、p-ト
15 ルエンスルホン酸などの有機酸との塩が挙げられる。

本発明の受容体および本発明の部分ペプチドは、前述したヒトや温血
動物の細胞または組織から自体公知のポリペプチドの精製方法によって
製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAで
形質転換された形質転換体を培養することによっても製造することがで
20 きる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。例
えば、Genomics、56巻、12-21頁、1999年、Biochim. Biophys. Acta、1446
巻、57-70頁、1999年などに記載の方法またはこれに準じた方法により、
製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物
25 の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽
出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどの
クロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができ
る。

本発明の受容体または部分ペプチドもしくはそれらの塩の合成には、

- 通常、市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM
5 樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチド、受容体、部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。
- 15 上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

- 25 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリ

ジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 -20°C ～ 50°C の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、ア

セチル基などの低級 (C_{1-6}) アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロ
イル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭
酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基と
しては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基
5 などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、*Bz* 1、
 Cl_2 -*Bz* 1、2-ニトロベンジル、*Br-Z*、*t*-ブチルなどが用い
られる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、*Tos*、4-
10 メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、*DNP*、ベン
ジルオキシメチル、*Bum*、*Boc*、*Trt*、*Fmoc*などが用いられ
る。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応す
る酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロ
15 ロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロ
フェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、*HONB*、*N*-ヒドロキシスクシミド、*N*-ヒドロキシフタルイミド、*HOBT*）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化された
ものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

20 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、*Pd*-黒あるいは*Pd*-
炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水
フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリ
フルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロ
ピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどに
25 による塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用い
られる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃~40℃の温
度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノー
ル、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスル
フィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどの

ようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる 2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の 1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

本発明の受容体または部分ペプチドを得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖の N 末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドと C 末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の受容体またはその部分ペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明の受容体または部分ペプチドもしくはそれらの塩のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、受容体またはその部分ペプチドのアミド体と同様にして、所望の受容体またはその部分ペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明の受容体または部分ペプチドは、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは受容体の部分ペプチドについては、受容体を適当な

ペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明受容体または部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の

5 (i) ~ (v) に記載された方法があげられる。

- (i) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- 10 (ii) SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(iii) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(iv) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

- 15 (v) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店
- また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて本発明の受容体または部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる受容体または部分ペプチドが遊離体である場合は、公知
- 20 の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明の受容体または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明の受容体または部分ペプチドをコードする塩基

25 配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。このうちDNAが好ましく、該DNAは、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミ

ド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR 法と略称する) によって増幅することもできる。

- 5 本発明の受容体をコードする DNA としては、例えば配列番号：2 で表される塩基配列を含有する DNA、または配列番号：2 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する受容体をコードする DNA などであれば何れの
10 ものもよい。

- 配列番号：2 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる DNA としては、例えば、配列番号：2 で表される塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、さらに好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配
15 列を含有する DNA などが用いられる。

- ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリン
20 ジェントな条件に従って行なうことができる。

- ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 °C、好ましくは約 60 ~ 65 °C の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 1
25 9 mM で温度が約 65 °C の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を含有する受容体をコードする DNA としては、配列番号：2 で表される塩基配列を含有する DNA などが、配列番号：19 で表されるアミノ酸配列を含有する受容体をコードする DNA としては、配列番号：20 で表される塩

基配列を含有するDNAなどが、配列番号：22で表されるアミノ酸配列を含有する受容体をコードするDNAとしては、配列番号：23で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：31で表されるアミノ酸配列を含有する受容体をコードするDNAとしては、配列番号：32で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：35で表されるアミノ酸配列を含有する受容体をコードするDNAとしては、配列番号：36で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、本発明の受容体の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。具体的には、配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する受容体をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

本発明の受容体または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA）は、自体公知の方法で標識化されていてもよい。標識物質としては、放射性同位元素、蛍光物質（例、フルオレセインなど）、発光物質、酵素、ビオチン、ランタニド元素などがあげられる。

本発明の受容体または部分ペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明の受容体または部分ペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自体公知のPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明の

受容体または部分ペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km (宝酒造 (株))、MutanTM-K (宝酒造 (株)) 等を用いて、
10 ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された受容体をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、
15 TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明の受容体または部分ペプチドの発現ベクターは、例えば、(a)
20 本発明の受容体または部分ペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(b) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、
25 pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウィルス、ワクシニアウィルス、バキュロウィルスなどの動物ウィルスなどの他、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、HIV・LTRプロモーター、CMVプロモーター、
5 HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウィルス）プロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーター
10 などが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

15 発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neor^rと略称する場合がある、G418耐性）等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する
20 場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明の受容体のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグ

ナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC 2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

- 5 このようにして構築された本発明の受容体または部分ペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

- 10 エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K 1 2・DH 1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60 巻, 160 (1968)], JM 1 0 3 [Nucleic Acids Research, 9巻, 309 (1981)], JA 2 2 1 [Journal of Molecular Biology, 120巻, 517 (1978)], HB 1 0 1 [Journal of Molecular Biology, 41巻, 459 (1969)], C 6 0 0
15 [Genetics, 39巻, 440 (1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) MI 1 1 4 [Gene, 24巻, 255 (1983)], 2 0 7-2 1 [Journal of Biochemistry, 95巻, 87 (1984)] などが用いられる。

- 酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces
20 cerevisiae) AH 2 2, AH 2 2 R⁻, NA 8 7-1 1 A, DKD-5 D, 2 0 B-1 2、シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC 1 9 1 3, NCYC 2 0 3 6、ピキア パストリス (Pichia pastoris) KM 7 1 などが用いられる。

- 昆虫細胞としては、例えば、ウィルスがAcNPVの場合は、ヨトウ
25 ガの幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG 1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウィルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該S

f細胞としては、例えば、S f 9細胞(ATCC CRL1711)、S f 2 1細胞(以上、Vaughn, J. L. ら、In Vivo, 13, 213-217, (1977))などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、
5 Nature, 315巻, 592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7(COS7), Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。
10

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69巻, 2110(1972)やGene, 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General
15 Genetics, 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, 194巻, 182-187(1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

20 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール 263-267(1995)(秀潤社発行)、Virology, 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

25 このようにして、受容体または部分ペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せし

められる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、
5 例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、成長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [Miller, Journal of Experiments in
10 Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～
15 24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、パークホルダー(Burkholder)最小培地 [Bostian, K. L. ら、Proc. Natl.
20 Acad. Sci. USA, 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81巻, 5330 (1984)] があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

25 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., Nature, 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔Science, 122巻, 501(1952)〕, D MEM培地〔Virology, 8巻, 396(1959)〕, RPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association 199巻, 519(1967)〕, 199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73巻, 1(1950)〕などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外などに
10 本発明の受容体または部分ペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明の受容体または部分ペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明の受容体または部分ペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを
15 適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる受容体または部分ペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの

疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる受容体または部分ペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する受容体または部分ペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

本発明の受容体と特異的に結合する能力を有するリガンドは、市販されている場合には市販品をそのまま用いることもでき、自体公知の方法またはこれらに準じた方法に従って抽出または製造することもできる。

15 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、単に本発明の抗体と称する場合がある）は、本発明の受容体に対する抗体を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明の受容体に対する抗体としては、受容体のシグナル伝達を不活性化する抗体、受容体のシグナル伝達を活性化する抗体などが挙げられる。

本発明の受容体に対する抗体は、本発明の受容体を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

25 (a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明の受容体は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、

計 2 ～ 10 回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の 2 ～ 5 日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくは PEG が用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、APP-1 などの温血動物の骨髓腫細胞があげられるが、P3U1 が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は 1 : 1 ～ 20 : 1 程度であり、PEG（好ましくは PEG 1000 ～ PEG 6000）が 10 ～ 80 % 程度の濃度で添加され、20 ～ 40 °C、好ましくは 30 ～ 37 °C で 1 ～ 10 分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド（蛋白質）抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテイン A を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体ま

たはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（ポリペプチド抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明の受容体に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

配列番号：1または配列番号：19で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド（例、DNA）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド（例、DNA）としては、該ポリヌクレオチドに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該ポリヌクレオチドの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれの

ポリヌクレオチド（アンチセンスポリヌクレオチド）であってもよい。

具体的には、本発明の受容体をコードするポリヌクレオチド（例、DNA）（以下、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有する
5 アンチセンスDNA（以下、これらのDNAをアンチセンスDNAと略記する場合がある）が挙げられ、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

- 10 本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明のDNAの相補鎖
15 の全塩基配列うち、本発明の受容体のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用い
20 て製造することができる。

- 具体的には、配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。好ましくは例えば、配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAの塩基配列
25 に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセ

ンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基(ホスフェート)は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造
5 することができる。

本発明に従えば、本発明の受容体遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンスポリヌクレオチド(核酸)を、クローン化した、あるいはアミノ酸が決定された蛋白質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるポリヌクレオチド(核酸)
10 は、本発明の受容体遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明の受容体関連RNAとの相互作用を介して本発明の受容体遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明の受容体関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明の受容体関連RNA
15 と特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明の受容体遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド(蛋白質)との間で「対応する」
20 とは、ヌクレオチド(核酸)の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド(蛋白質)のアミノ酸を通常指している。蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、蛋白質翻訳終止コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳終止
25 コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチ

ドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレート化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化された

プリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンスヌクレオチドは次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンスヌクレオチドをより安定なものにする、アンチセンスヌクレオチドの細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンスヌクレオチドの毒性をより小さなものにする。

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核

酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止
5 するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンスヌクレオチドの阻害活性は、本発明の形質転換体、本発
10 明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明の受容体の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

以下に、(i) 本発明の受容体、(ii) 本発明の受容体をコードするポリヌクレオチド（本発明のポリヌクレオチド）、(iii) 本発明の受容体
15 に対する抗体（本発明の抗体）、(iv) 本発明の受容体のアンチセンスポリヌクレオチド（例、本発明のアンチセンスDNA）、(v) 本発明の受容体に特異的に結合する能力を有するリガンド（本発明のリガンド）などの用途を説明する。

〔1〕 IL-13産生抑制作用、肥満細胞の脱顆粒抑制作用、エイコサノイド
20 産生抑制作用、肥満細胞増殖抑制作用などを有する医薬候補化合物、中枢疾患の予防・治療用医薬候補化合物などのスクリーニング

本発明のリガンドは、肥満細胞に対してIL-13産生促進活性、肥満細胞の脱顆粒促進作用、肥満細胞のエイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジンなど）産生促進作用、およびミクログリア細胞に対してIL-10産生促進作用、IL-6産生抑制作用ならびにTNF- α 産生抑制作用
25 などを有する。

本発明のリガンドや本発明の受容体の機能・活性（例、肥満細胞のIL-13産生促進活性、脱顆粒促進作用、エイコサノイド産生促進作用ならびに肥満細胞増殖促進作用、およびミクログリア細胞のIL-10産生促進作用、

- IL-6産生抑制作用ならびにTNF- α 産生抑制作用など）を阻害する化合物またはその塩は、例えば、IL-13産生抑制剤、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤、IL-10産生抑制剤、IL-6産生促進剤、TNF- α 産生促進剤などとして有用であり、例えば、免疫疾患
- 5 患〔例、炎症性疾患（下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、PTCA後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、
- 10 消化器疾患〔例、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に
- 15 起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症、中枢疾患〔例、神経変性疾患（例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病
- 20
- 25

など)、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病(クロイツフェルトーヤコブ病)、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など)、精神疾患(例、統合失調症、うつ病、双極性障害、不安障害、注意欠陥・多動性障害、パニック障害など)、脳血管障害(例、脳血栓症、脳塞栓症、一過性脳虚血発作など)など]の予防・治療剤などとして使用できる。

「本発明のリガンドの機能・活性を阻害する化合物」としては、例えば、本発明のリガンドに結合するタンパク質、本発明のリガンドに特異的に結合する抗体などが挙げられる。「本発明の受容体の機能・活性を阻害する化合物」としては、例えば、本発明の受容体のアンタゴニスト、本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を阻害する化合物、本発明の受容体に特異的に結合する抗体、本発明の受容体(タンパク質、遺伝子)の発現を阻害する化合物(例えば、本発明の受容体をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA〔本発明の受容体に対する siRNA、shRNA、本発明の受容体をコードするRNAの一部を含有するリボザイム、本発明の受容体をコードするDNAに対するアンチセンスDNA)などが挙げられる。

IL-13産生抑制剤として、好ましくは、呼吸器疾患などの予防・治療剤が挙げられる。

肥満細胞の脱顆粒抑制剤として、好ましくは、免疫疾患、泌尿器疾患、循環器疾患などの予防・治療剤が挙げられる。

エイコサノイド産生抑制剤として、好ましくは、免疫疾患などの予防・治療剤が挙げられる。

なお、本発明のリガンドや本発明の受容体の機能・活性を促進する化合物またはその塩(例えば、本発明の受容体のアゴニスト)は、中枢における該リガンドや該受容体の機能活性(例、ミクログリア細胞に対するIL-10産生促進活性、IL-6産生抑制活性、TNF- α 産生抑制活性など)を促進することができるので、例えば、IL-10産生促進剤、IL-6産生抑制剤、TNF- α 産生抑制剤などとして有用であり、例えば、中枢疾患〔例、神経

変性疾患（例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病（クロイツフェルトーヤコブ病）、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）、

5 精神疾患（例、統合失調症、うつ病、双極性障害、不安障害、注意欠陥・多動性障害、パニック障害など）、脳血管障害（例、脳血栓症、脳塞栓症、一過性脳虚血発作など）など〕の予防・治療剤などとして使用できる。

本発明の受容体を用い、または組換え型本発明の受容体の発現系を用

10 いたりガンドレセプターアッセイ系を用いることにより、本発明の受容体と、本発明のリガンドとの結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

該化合物またはその塩には、（i）本発明の受容体を介して細胞刺激活

15 性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP産生抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP γ S結合活性、cAMP依存性プロテインキナーゼの活性化、cGMP依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキ

20 ナーゼの活性化、微小管結合蛋白質リン酸化酵素（MAPキナーゼ）（例、ERK1/2（p42/44 MAP キナーゼ）、p38 MAPK、JNK/SAPK、ERK5など）の活性化などを促進する活性など）を有する化合物（アゴニスト）、（ii）上記細胞刺激活性を有しない化合物（アンタゴニスト）、（iii）本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を促進する化合物、（iv）本発

25 明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を阻害する化合物などが含まれる。

具体的には、（i）本発明の受容体に、本発明のリガンドを接触させた場合と（ii）本発明の受容体に、本発明のリガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なう。比較は、例えば、本発明の受容体に

対する本発明のリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して行う。

本発明のスクリーニング方法としての具体例としては、例えば、

- (a) 本発明のリガンドを本発明の受容体に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体に接触させた場合における、
5 本発明のリガンドの本発明の受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (b) 本発明のリガンドを、本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本
10 発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、本発明のリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および
- 15 (c) 本発明の受容体が、本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体である上記 (b) 記載のスクリーニング方法、
- (d) 本発明のリガンドが、標識したリガンドである上記 (a) ~ (c) のスクリーニング方法などのレセプター結合アッセイ系、
- 20 (e) 本発明のリガンドを本発明の受容体に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- 25 (f) 本発明のリガンドを本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させ

る化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

- (g) 本発明の受容体が、本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体である上記(f)のスクリーニング方法などの細胞刺激アッセイ系などが
5 挙げられる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

- 本発明の受容体としては、ヒトや温血動物の臓器の膜画分などが好適に用いられる。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大
10 量発現させた本発明の受容体などが適している。

本発明の受容体を製造するには、前述の本発明の受容体の製造方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、本発明の受容体を含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

- 15 本発明の受容体を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

- 本発明の受容体を含有する細胞としては、本発明の受容体を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、
20 昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。製造方法は前述と同様である。

- 膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、
Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリング
ブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による
25 破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500rpm~3000rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000rpm~30000rpm) で

通常 30 分～2 時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明の受容体と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

- 該本発明の受容体を含有する細胞や膜画分中の本発明の受容体の量は、
- 5 1 細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。
- 10 前記のレセプター結合アッセイ系や細胞刺激アッセイ系などのスクリーニング方法を実施するためには、例えば、本発明の受容体画分と、本発明のリガンド（例、標識した本発明のリガンド）などが用いられる。本発明の受容体画分としては、天然型の本発明の受容体画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型本発明の受容体画分などが望ましい。
- 15 ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、例えば、放射性同位元素（例、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{33}\text{P}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ など）、蛍光物質（例、フルオレセインなど）、発光物質（例、ルミノールなど）、酵素（例、ペルオキシダーゼなど）またはランタニド元素などで標識されたリガンドなどを用いることができる。
- 20

- 具体的には、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、本発明の受容体を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4～1
- 25 0（望ましくは pH 6～8）のリン酸バッファー、トリスー塩酸バッファーなどのリガンドと受容体との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王ーアトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロ

テアーゼによる本発明の受容体の分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01~10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000~500000cpm）の標識した本発明の
5 リガンドを添加し、同時に 10^{-10} ~ 10^{-7} Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の本発明のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃~50℃、望ましくは4℃~37℃で20分~24時間、望ましくは30分~3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、
10 ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ B_0 ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ B_0 -NSB）を100%とした時、特異的結合量（ B -NSB）が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。
15 できる。

さらに、表面プラズモンセンサー技術を利用することによって、本発明の受容体に結合する化合物をスクリーニングすることもできる。

具体的には、ピアコア3000（ピアコア社）のセンサーチップ表面に、本発明の受容体を固定化後、チップ表面にリン酸緩衝液（PBS）
20 などに溶解した試験化合物を流したときの表面プラズモンの変化を測定することにより、本発明の受容体に結合する試験化合物を選択する。例えば、表面プラズモンの変化の測定値が5レゾナンスユニット以上与える試験化合物を本発明の受容体に結合性を有する物質として選択する。

前記の細胞刺激アッセイ系のスクリーニング方法を実施するためには、
25 本発明の受容体を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP産生抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTPγS結合活性、cAMP依存性プロテインキナーゼの活性化、c

GMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、微小管結合蛋白質リン酸化酵素（MAPキナーゼ）の活性化などを促進する活性または抑制する活性など）（例、ERK1/2（p42/44 MAP キナーゼ）、p38 MAPK、JNK/SAPK、ERK5 など）を、自体

5 公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明の受容体を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。

10 細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

15

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明の受容体を発現した細胞が必要である。本発明の受容体を発現した細胞としては、前述の本発明の受容体発現細胞株などが望ましい。

20 試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられる。

上記細胞刺激アッセイ系のスクリーニング方法について、さらに具体的に以下（１）～（１２）に記載する。

25 （１）受容体発現細胞が受容体アゴニストによって刺激されると細胞内のG蛋白質が活性化されてGTPが結合する。この現象は受容体発現細胞の膜画分においても観察される。通常、GTPは加水分解されてGDPへと変化するが、このとき反応液中にGTPγSを添加しておくと、GTPγSはGTPと同様にG蛋白質に結合するが、加水分解されずに

G蛋白質を含む細胞膜に結合した状態が維持される。標識したGTP γ Sを用いると細胞膜に残存した標識されたGTP γ Sを測定することにより、受容体アゴニストの受容体発現細胞刺激活性を測定することができる。

- 5 この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

この方法は、本発明の受容体を含む膜画分を用いて行う。本測定法において本発明の受容体膜画分へのGTP γ S結合促進活性を示す物質は
10 アゴニストである。

具体的には、標識したGTP γ Sの存在下、本発明のリガンドを本発明の受容体細胞膜画分に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体細胞膜画分に接触させた場合における、本発明の受容体細胞膜画分へのGTP γ S結合促進活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。
15

本方法において、本発明のリガンドによる本発明の受容体細胞膜画分へのGTP γ S結合促進活性を抑制する活性を示す試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

- 20 一方、試験化合物のみを本発明の受容体細胞膜画分に接触させ、本発明の受容体細胞膜画分へのGTP γ S結合促進活性を測定することにより、アゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

公知の方法に従って調製した本発明の受容体を含む細胞膜画分を、膜
25 希釈緩衝液（50mM Tris、5mM MgCl₂、150mM NaCl、1 μ M GDP、0.1% BSA；pH7.4）で希釈する。希釈率は、受容体の発現量により異なる。これをFalcon 2053に0.2mlずつ分注し、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を加え、さらに終濃度200pMとなるように [³⁵S]GT

P γ Sを加える。25℃で1時間保温した後、氷冷した洗浄用緩衝液（50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.1% BSA, 0.05% CHAPS; pH 7.4）1.5 mlを加えて、ガラス繊維ろ紙GF/Fでろ過する。65℃、30分保温して乾燥後、
5 液体シンチレーションカウンターでろ紙上に残った膜画分に結合した [³⁵S] GTP γ Sの放射活性を測定する。本発明のリガンドのみを加えた実験区の放射活性を100%、本発明のリガンドを加えなかった実験区の放射活性を0%とし、本発明のリガンドによるGTP γ S結合促進活性に対する試験化合物の影響を算出する。GTP γ S結合促進活性が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として
10 選択することができる。

（2）本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、細胞内cAMPの産生が抑制される。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、
15 本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、細胞内cAMP量を増加させる物質の存在下、本発明のリガンドを本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、該細胞の細胞内cAMPの産生抑制活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

細胞内cAMP量を増加させる物質としては、例えば、フォルスコリン、カルシトニンなどが用いられる。

25 本発明の受容体発現細胞内のcAMP産生量は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウシなどを免疫して得られた抗cAMP抗体と [¹²⁵I] 標識cAMP（ともに市販品）を使用することによるRIA系、または抗cAMP抗体と標識cAMPとを組み合わせたEIA系で測定することができる。また、抗cAMP抗体を、protein Aまたは抗cAMP

P抗体産生に用いた動物のIgGなどに対する抗体などを使用して固定したシンチラントを含むビーズと $[^{125}\text{I}]$ 標識cAMPとを使用するSPA (Scintillation Proximity Assay) 法による定量も可能である (アマシャムファルマシアバイオテック社製のキットを使用する)。

- 5 本方法において、本発明のリガンドによる本発明の受容体発現細胞のcAMP産生抑制活性を阻害する活性を示す試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させて、cAMP産生抑制活性を調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうことができる。

10

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

- 本発明の受容体発現細胞 (例、CHO細胞などの動物細胞) を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.2 mM 3-イソブチルメチルキサンチン、0.05% BSAおよび20 mM HEPESを含むハンクスバッファー (pH 7.4) で洗浄する (以下、反応用バッファーと略記する)。その後、0.5 mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新たに0.25 mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、1 μ Mの本発明のリガンドまたは1 μ Mの本発明のリガンドおよび
- 15
- 試験化合物を添加した2 μ M フォルスコリンを含む0.25 mlの反応用バッファーを、細胞に加え、37℃で24分間反応させる。100 μ lの20%過塩素酸を加えて反応を停止させ、その後氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出する。抽出液中のcAMP量を、cAMP EIAキット (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いて測定
- 20
- する。フォルスコリンの刺激によって産生されたcAMP量を100%とし、1 μ Mの本発明のリガンドの添加によって抑制されたcAMP量を0%として、本発明のリガンドによるcAMP産生抑制活性に対する試験化合物の影響を算出する。本発明のリガンドの活性を阻害して、cAMP産生活性が例えば50%以上になる試験化合物を、拮抗阻害能力
- 25

のある候補物質として選択することができる。

また、本発明のリガンドの刺激により、細胞内 c A M P 量が増加する性質を示す本発明の受容体発現細胞を使用する場合、本発明のリガンドを本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、該細胞の細胞内 c A M P の産生促進活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

本方法において、本発明のリガンドによる本発明の受容体発現細胞の c A M P 産生促進活性を阻害する活性を示す試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させて c A M P 産生促進活性を調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうことができる。

c A M P 産生促進活性は、上記のスクリーニング法においてフォルスコリンを添加せずに本発明の受容体発現細胞（例、C H O 細胞などの動物細胞）に本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加して産生された c A M P を上記の方法で定量して測定する。

(3) C R E - レポーター遺伝子ベクターを用いて、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

C R E (cAMP response element) を含む D N A を、ベクターのレポーター遺伝子上流に挿入し、C R E - レポーター遺伝子ベクターを得る。

C R E - レポーター遺伝子ベクターを導入した本発明の受容体発現細胞において、c A M P の上昇を伴う刺激は、C R E を介したレポーター遺伝子発現と、それに引き続くレポーター遺伝子の遺伝子産物（蛋白質）の産生を誘導する。つまり、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定することにより、C R E - レポーター遺伝子ベクター導入細胞内の c A

M P 量の変動を検出することができる。

具体的には、細胞内 c A M P 量を増加させる物質の存在下、本発明のリガンドを、C R E－レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、C R E－レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

細胞内 c A M P 量を増加させる物質としては、例えば、フォルスコリン、カルシトニンなどが用いられる。

ベクターとしては、例えば、ピッカジーン ベイシックベクター、ピッカジーン エンハンサーベクター（東洋インキ製造（株））などが用いられる。C R Eを含むDNAを、上記ベクターのレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクロニングサイトに挿入し、C R E－レポーター遺伝子ベクターとする。

本方法において、本発明のリガンドによるレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性抑制を回復させる試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させて、フォルスコリン刺激によって上昇した発光量の本発明のリガンドと同様な抑制を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼを利用する例を用いて、このスクリーニング方法の具体例を以下に述べる。

C R E－レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）を導入した本発明の受容体発現細胞を、24穴プレートに 5×10^3 c e l l / w e l l で播種し、48時間培養する。細胞を0.2 mM 3－イソブチル－メチルキサンチン、0.05% B S Aおよび20 mM H E P E Sを含むハンクスバッファー（p H 7.4）で洗浄する（以下、反应用バッファーと略

記する)。その後0.5 mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新たに0.25 mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、1 μ Mの本発明のリガンドまたは1 μ Mの本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した2 μ M フォルスコリンを含む0.25 mlの反応用バッファーを、細胞に加え、37℃で24分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。本発明のリガンド単独を添加した場合と、1 μ Mの本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した場合のルシフェラーゼによる発光量を測定して、比較する。

本発明のリガンドは、フォルスコリン刺激に基づくルシフェラーゼによる発光量の増加を抑制する。該抑制を回復させる化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

レポーター遺伝子として、例えば、アルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（chloramphenicol acetyltransferase）、 β -ガラクトシダーゼなどの遺伝子を用いてもよい。これらのレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性は、公知の方法に従い、または市販の測定キットを用いて測定する。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530を用いて、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kitを用いて、 β -ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-XEを用いて測定する。

（4）本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、アラキドン酸代謝物を細胞外に放出する。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

あらかじめ、標識したアラキドン酸を、本発明の受容体発現細胞に取り込ませておくことによって、アラキドン酸代謝物放出活性を、細胞外に放出された標識されたアラキドン酸代謝物を測定することによって測定することができる。

- 5 具体的には、本発明のリガンドを、標識したアラキドン酸を含有する本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、標識したアラキドン酸を含有する本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、アラキドン酸代謝物の放出活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を
10 変化させる化合物をスクリーニングする。

本方法において、本発明のリガンドによるアラキドン酸代謝物放出活性を阻害する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

- また、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明
15 の受容体発現細胞のアラキドン酸代謝物放出活性を公知の方法で調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

- 本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに 5×10^4 cell/well
20 11で播種し、24時間培養後、 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸を $0.25 \mu\text{Ci}$ /wellとなるよう添加し、16時間後、細胞を0.05% BSAおよび20 mM HEPESを含むハンスバッファー (pH 7.4)
(以下、反応用バッファーと略記する) で洗浄する。終濃度 $10 \mu\text{M}$ の本発明のリガンドまたは終濃度 $10 \mu\text{M}$ の本発明のリガンドおよび試験
25 化合物を含む反応用バッファー $500 \mu\text{l}$ を、各wellに添加する。
37℃で60分間インキュベートした後、反応液 $400 \mu\text{l}$ をシンチレーターに加え、反応液中に遊離した $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンターにより測定する。

反応用バッファー $500 \mu\text{l}$ のみを添加した場合 (本発明のリガンド

非添加・試験化合物非添加)の遊離 ^3H アラキドン酸代謝物の量を0%、
10 μM の本発明のリガンドを含む反応用バッファーを添加した場合
(試験化合物非添加)の遊離 ^3H アラキドン酸代謝物の量を100%
として、試験化合物を添加した場合の遊離 ^3H アラキドン酸代謝物の
5 量を算出する。

アラキドン酸代謝物放出活性が、例えば50%以下になる試験化合物
を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

(5) 本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、細
胞内のCa濃度が上昇する。この反応を利用して、本発明のリガンドの
10 本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発
明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリ
ーニングすることができる。本発明の受容体発現細胞としては、上述し
た、本発明の受容体または部分ペプチドをコードするDNAを含有する
発現ベクターによって形質転換された細胞、肥満細胞、ミクログリア細
15 胞(例えば、ラット初代培養ミクログリア細胞)などを用いることがで
きる。

具体的には、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞(例えば、
ミクログリア細胞)に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験
化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞内
20 カルシウム濃度上昇活性を測定し、比較することにより、本発明のリガ
ンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニング
する。測定は公知の方法に従って行う。

本方法において、本発明のリガンドによる細胞内カルシウム濃度の上
昇を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択す
25 ることができる。

一方、試験化合物のみの添加による蛍光強度の上昇を測定することに
よってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を、滅菌した顕微鏡用カバーガラス上に播き、

2日後、培養液を、 $4\text{ }\mu\text{M}$ Fura-2 AM（同仁化学研究所）を懸濁したHBSSに置換し、室温で2時間30分おく。HBSSで洗浄した後、キュベットにカバーガラスをセットし、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加し、励起波長340nmおよび380nmでの、505nmの蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。

また、FLIPR（モレキュラーデバイス社製）を使って行ってもよい。本発明の受容体発現細胞懸濁液にFluo-3 AM（同仁化学研究所製）を添加し、細胞に取り込ませた後、上清を遠心により数度洗浄後、96穴プレートに細胞を播く。FLIPR装置にセットし、Fura-2の場合と同様に、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加し、蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。

さらに、本発明の受容体発現細胞に、細胞内Caイオンの上昇によって発光するような蛋白質の遺伝子（例、aequorinなど）を共発現させておき、細胞内Caイオン濃度の上昇によって、該遺伝子蛋白質（例、aequorinなど）がCa結合型となり発光することを利用して、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることもできる。

細胞内Caイオンの上昇によって発光するような蛋白質の遺伝子を共発現させた本発明の受容体発現細胞を、96穴プレートに播き、上記と同様に、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加し、蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。

本発明のリガンドによる蛍光強度の上昇を、抑制する試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

本発明の受容体は中枢においてミクログリア細胞に発現し、lysoPS刺激により抗炎症作用を示すことが明らかになったので（後述の実施例15参照）、ミクログリア細胞を用いたスクリーニング方法は中枢疾患の予防・治療剤のスクリーニングに有効である。

(6) 受容体を発現する細胞に、受容体アゴニストを添加すると、細胞内イノシトール三リン酸濃度は上昇する。本発明のリガンドの、本発明の受容体発現細胞における細胞内イノシトール三リン酸産生活性を利用することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化
5 させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、標識したイノシトールの存在下、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、イ
10 ノシトール三リン酸産生活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。測定は公知の方法に従って行う。

本方法において、イノシトール三リン酸産生活性を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、イノシ
15 トール三リン酸産生上昇を測定することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播き、1日間培養する。その後、myo-[2-³H]inositol (2.5 μCi/well)
20 1) を添加した培地で1日間培養し、細胞を放射活性を有するイノシトールを無添加の培地でよく洗浄する。本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加後、10%過塩素酸を加え、反応を止める。1.5 M 水酸化カリウムおよび60 mM HEPES溶液で中和し、0.5 mlのAG1x8樹脂(Bio-Rad)を詰めたカラムに通し、5
25 mM 四ホウ酸ナトリウム(Na₂B₄O₇)および60 mM ギ酸アンモニウムで洗浄した後、1 M ギ酸アンモニウムおよび0.1 M ギ酸で溶出した放射活性を、液体シンチレーションカウンタで測定する。本発明のリガンドを添加しない場合の放射活性を0%、本発明のリガンドを添加した場合の放射活性を100%とし、試験化合物の、本発明のリガ

ドと本発明の受容体の結合に対する影響を算出する。

イノシトール三リン酸産生活性が、例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

- (7) TRE-レポーター遺伝子ベクターを用いて、本発明のリガンド
5 の本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

- TRE (TPA response element) を含むDNAを、ベクターのレポーター遺伝子上流に挿入し、TRE-レポーター遺伝子ベクターを得る。
10 TRE-レポーター遺伝子ベクターを導入した本発明の受容体発現細胞において、細胞内カルシウム濃度の上昇を伴う刺激は、TREを介したレポーター遺伝子発現と、それに引き続くレポーター遺伝子の遺伝子産物(蛋白質)の産生を誘導する。つまり、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定することにより、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入
15 細胞内のカルシウム量の変動を検出することができる。

- 具体的には、本発明のリガンドを、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子蛋白質の
20 酵素活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

- ベクターとしては、例えば、ピッカジーン ベイシックベクター、ピッカジーン エンハンサーベクター(東洋インキ製造(株))などが用いられる。TREを含むDNAを、上記ベクターのレポーター遺伝子、
25 例えばルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトに挿入し、TRE-レポーター遺伝子ベクターとする。

本方法において、本発明のリガンドによるレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみをTRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のリガンドと同様な発光量の増加を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

- 5 レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼを利用する例を用いて、このスクリーニング方法の具体例を以下に述べる。

TRE-レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）を導入した本発明の受容体発現細胞を、24穴プレートに 5×10^3 cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハンクスバッファー（pH 7.4）で洗浄した後、10 nMの本発明のリガンドまたは10 nMの本発明のリガンドおよび試験化合物を添加し、37℃で60分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミ
10 ノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。本発明のリガンドを添加した場合と、10 nMの本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した場合のルシフェラーゼによる発光量を測定して、比較する。

本発明のリガンドによる細胞内カルシウムの上昇によって、ルシフェ
20 ラーゼによる発光量が増加する。この増加を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

レポーター遺伝子として、例えば、アルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（chloramphenicol acetyltransferase）、 β -ガラクトシダーゼなどの遺伝子を用いてもよい。これらのレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性は、公知の方法に従い、
25 または市販の測定キットを用いて測定する。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530を用いて、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chrolamphenicol Acetyltransferase Assay Kitを用いて、 β -ガラクト

シダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-XEを用いて測定する。

(8) 本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、MAPキナーゼ（例、ERK1、ERK2など）が活性化され、増殖する。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物、本発明の受容体の活性化を促進または抑制する化合物などをスクリーニングすることができる。

具体的には、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞増殖を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物、本発明の受容体の活性化を促進または抑制する化合物などをスクリーニングする。

本発明の受容体発現細胞の増殖は、例えば、MAPキナーゼ活性（例、ERK1、ERK2など）、チミジン取り込み活性、細胞数などを測定すればよい。

具体例としては、MAPキナーゼ活性については、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に添加した後、細胞溶解液から抗MAPキナーゼ抗体を用いた免疫沈降によりMAPキナーゼ分画を得た後、公知の方法、例えば和光純薬製MAP Kinase Assay Kitおよび γ -[^{32}P]-ATPを使用してMAPキナーゼ活性を測定し、比較する。

あるいは、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に添加し、細胞溶解液を得た後、公知の方法、例えばポリアクリルアミドゲルを用いて細胞溶解液を分離し、フィルターに転写後、MAPキナーゼ特異的な抗体および化学発光試薬を用いてイメージアナライザー等で検出し、発光の強度を比較する。

チミジン取り込み活性については、本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播種し、培養し、本発明のリガンドまたは本発明のリガンド

および試験化合物を添加した後、放射活性により標識したチミジン（例、
[m e t h y l -³H] -チミジンなど）を加え、その後、細胞を溶解し、
細胞内に取り込まれたチミジンの放射活性を、液体シンチレーションカ
ウンターで計数することにより、チミジン取り込み活性を測定し、比較
5 する。

細胞数の測定については、本発明の受容体発現細胞を24穴プレート
に播種し、培養し、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試
験化合物を添加した後、MTT
(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium
10 bromide) を添加する。細胞内に取り込まれてMTTが変化したMTTホ
ルマザンを、塩酸にて酸性としたイソプロパノール水溶液で細胞を溶解
した後、570 nmの吸収によって測定し、比較する。

本方法において、本発明の受容体発現細胞の増殖を抑制する試験化合
物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。
15 一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明
のリガンドと同様な細胞増殖活性を測定することによりアゴニストのス
クリーニングを行なうこともできる。

チミジン取り込み活性を利用するスクリーニング法の一具体例を以下
に述べる。
20 本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに5000個／ウェル播き、
1日間培養する。次に血清を含まない培地で2日間培養し、細胞を飢餓
状態にする。本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合
物を、細胞に添加して24時間培養した後、[m e t h y l -³H] -チ
ミジンをウェル当たり0.015 MBq添加し、6時間培養する。細胞
25 をPBSで洗った後、メタノールを添加して10分間放置する。次に5%
トリクロロ酢酸を添加して15分間放置後、固定された細胞を蒸留水で
4回洗う。0.3 N水酸化ナトリウム溶液で細胞を溶解し、溶解液中の
放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。

本発明のリガンドを添加した場合の放射活性の増加を抑制する試験化

合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

(9) 本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、カリウムチャネルが活性化し、細胞内にあるKイオンが、細胞外に流出する。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞
5 に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

Kイオンと同族元素であるRbイオン（ルビジウムイオン）は、Kイオンと区別無く、カリウムチャネルを通して細胞外に流出する。よって、
10 本発明の受容体発現細胞に、放射活性同位体であるRb（ ^{86}Rb ）を取り込ませておいた後、本発明のリガンドの刺激によって流出する ^{86}Rb の流れ（流出活性）を測定することにより、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定する。

具体的には、 ^{86}Rb の存在下、本発明のリガンドを、本発明の受容体発
15 現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、 ^{86}Rb の流出活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本方法において、本発明のリガンド刺激による ^{86}Rb の流出活性の上昇
20 を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のリガンドと同様な ^{86}Rb の流出活性の上昇を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

25 スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播き、2日間培養する。その後、 1 mCi/ml の $^{86}\text{RbCl}$ を含む培地中で2時間保温する。細胞を培地でよく洗浄し、外液中の $^{86}\text{RbCl}$ を完全に除く。本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を細胞に添加し、30分

後外液を回収し、 γ カウンターで放射活性を測定し、比較する。

本発明のリガンド刺激による ^{86}Rb の流出活性の上昇を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

(10) 本発明の受容体発現細胞が本発明のリガンドに反応し、細胞外のpHが変化する。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞外のpH変化を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

細胞外pH変化は、例えば、Cytosensor装置（モレキュラーデバイス社）を使用して測定する。

本方法において、本発明のリガンドによる細胞外pH変化を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のリガンドと同様な細胞外pH変化を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞をCytosensor装置用のカプセル内で終夜培養し、装置のチャンバーにセットして細胞外pHが安定するまで約2時間、0.1% BSAを含むRPMI 1640培地（モレキュラーデバイス社製）を灌流させる。pHが安定した後、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を含む培地を細胞上に灌流させる。灌流によって生じた培地のpH変化を測定し、比較する。

本発明のリガンドによる細胞外pH変化を抑制する化合物を拮抗阻害

能力のある候補物質として選択することができる。

(11) 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の haploid α -mating Type (MAT α) の性フェロモン受容体 S t e 2 は、G 蛋白質 G p a 1 と共役しており、性フェロモン α -mating factor に応答して M A P キナーゼを活性化し、これに引き続き、F a r 1 (cell-cycle arrest) および転写活性化因子 S t e 1 2 が活性化される。S t e 1 2 は、種々の蛋白質（例えば、接合に関与する F U S 1）の発現を誘導する。一方、制御因子 S s t 2 は上記の過程に抑制的に機能する。この系において、受容体遺伝子を導入した酵母を作製し、受容体アゴニストの刺激により酵母細胞内のシグナル伝達系を活性化し、その結果生じる増殖などを指標として用いる、受容体アゴニストと受容体との反応の測定系の試みが行なわれている (Trends in Biotechnology, 15巻, 487-494頁, 1997年)。上記の受容体遺伝子導入酵母の系を利用して、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

15 具体例を以下に示す。

MAT α 酵母の S t e 2 および G p a 1 をコードする遺伝子を除去し、代わりに、本発明の受容体遺伝子および G p a 1 - G a i 2 融合蛋白質をコードする遺伝子を導入する。F a r をコードする遺伝子を除去して cell-cycle arrest が生じないようにし、また、S s t をコードする遺伝子を除去して本発明のリガンドに対する応答の感度を向上させておく。さらに、F U S 1 にヒスチジン生合成遺伝子 H I S 3 を結合した F U S 1 - H I S 3 遺伝子を導入する。この遺伝子組換え操作は、例えば、Molecular and Cellular Biology, 15巻, 6188-6195頁, 1995年に記載の方法において、ソマトスタチン受容体タイプ2 (SSTR2) 遺伝子を、本発明の受容体に置き換えて実施することができる。

25 このように構築された形質変換酵母は、本発明のリガンドに高感度で反応し、その結果、M A P キナーゼの活性化が起き、ヒスチジン生合成酵素が合成されるようになり、ヒスチジン欠乏培地で生育可能になる。

従って、上記の本発明の受容体発現酵母 (S t e 2 遺伝子および G p

a 1 遺伝子が除去され、本発明の受容体遺伝子および G p a 1 - G a i
2 融合蛋白質コード遺伝子が導入され、F a r 遺伝子および S s t 遺伝
子が除去され、F U S 1 - H I S 3 遺伝子が導入された M A T α 酵母)
を、ヒスチジン欠乏培地で培養し、本発明のリガンドまたは本発明のリ
5 ガンドおよび試験化合物を接触させ、該酵母の生育を測定し、比較する
ことにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させ
る化合物をスクリーニングすることができる。

本方法において、該酵母の生育を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

10 一方、試験化合物のみを上記の本発明の受容体発現酵母に接触させ、
本発明のリガンドと同様な酵母の生育を測定することによりアゴニスト
のスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

上記の本発明の受容体発現酵母を完全合成培地の液体培地で終夜培養
15 し、その後、ヒスチジンを除去した溶解寒天培地に、 2×10^4 c e l l
/ m l の濃度になるように加える。ついで、 9×9 c m の角形シャーレ
に播く。寒天が固化した後、本発明のリガンドまたは本発明のリガンド
および試験化合物をしみこませた滅菌濾紙を寒天表面におき、 30°C で
3 日間培養する。試験化合物の影響は、濾紙の周囲の酵母の生育を、本
20 発明のリガンドのみをしみこませた滅菌濾紙を用いた場合と比較する。
また、あらかじめ、ヒスチジンを除去した寒天培地に本発明のリガンド
を添加しておき、滅菌濾紙に試験化合物のみをしみこませて酵母を培養
し、シャーレ全面での酵母の生育が濾紙の周囲で影響を受けることを観
察してもよい。

25 酵母の生育を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選
択することができる。

(12) 本発明の受容体遺伝子 R N A をアフリカツメガエル卵母細胞に
注入し、本発明のリガンドによって刺激すると細胞カルシウム濃度が上
昇して、calcium-activated chloride currentが生じる。これは、膜電

位の変化としてとらえることができる（Kイオン濃度勾配に変化がある場合も同様）。本発明のリガンドによって生じる本発明の受容体導入アフリカツメガエル卵母細胞における上記反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、
5 本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、本発明のリガンドを、本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させた場合における、細胞膜電位の変化を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。
10

本方法において、細胞膜電位変化を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

15 一方、試験化合物のみを本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させ、本発明のリガンドと同様な細胞膜電位変化を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

20 氷冷して動けなくなった雌のアフリカツメガエルから取り出した、卵母細胞塊を、MBS液（88mM NaCl, 1mM KCl, 0.41mM CaCl₂, 0.33mM Ca(NO₃)₂, 0.82mM MgSO₄, 2.4mM NaHCO₃, 10mM HEPES; pH7.4）に溶かしたコラーゲナーゼ（0.5mg/ml）で卵塊がほぐれるまで19℃、1～6時間、150rpmで処理する。外液をMBS液に置換することで3度洗浄し、
25 マイクロマニピュレーターで本発明の受容体遺伝子poly A付加cRNA（50ng/50nl）を卵母細胞にマイクロインジェクションする。

本発明の受容体遺伝子mRNAは、組織や細胞から調製してもよく、プラスミドからin vitroで転写してもよい。本発明の受容体遺伝子mR

NAをMBS液中で20℃で3日培養し、これをRinger液を流している voltage clamp装置のくぼみに置き、電位固定用ガラス微小電極および電位測定用ガラス微小電極を細胞内に刺入し、(－)極は細胞外に置く。電位が安定したら、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を含むRinger液を流して電位変化を記録する。試験化合物の影響は、本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞の細胞膜電位変化を、本発明のリガンドのみ含むRinger液を流した場合と比較することによって測定することができる。

細胞膜電位変化を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

上記の系において、電位の変化量を増大させると、測定しやすくなるため、各種のG蛋白質遺伝子のpoly A付加RNAを導入してもよい。また、カルシウム存在下で発光を生じるような蛋白質（例、aequorinなど）の遺伝子のpoly A付加RNAを共インジェクションすることにより、膜電位変化ではなく発光量を測定することもできる。

さらに、哺乳動物由来の肥満細胞、ミクログリア細胞を使用したスクリーニング方法について、以下に述べる。

哺乳動物（好ましくはヒト、モルモット、ラット、マウス）由来の肥満細胞（肥満細胞株、脂肪組織も含む）、好ましくは腹腔、皮膚、肺などの由来の肥満細胞を用いて以下の方法などによりIL-13産生抑制作用、肥満細胞の脱顆粒抑制作用、エイコサノイド産生抑制作用、肥満細胞増殖抑制作用などを有する化合物をスクリーニングすることができる。この際肥満細胞に対してリガンドの添加前後に共刺激を行ってもよい。共刺激としては、コンカナバリンA、小麦胚芽レクチン、レンズ豆レクチン、インゲン豆レクチン、アメリカヤマゴボウレクチン、シロバナチャウセンアサガオレクチン等のレクチン、神経ペプチド、神経成長因子、幹細胞増殖因子などが用いられ、肥満細胞を抗体で感作した場合は抗原を用いてもよい。

(1) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞

に接触させ、細胞からRNAを調製し、IL-13 RNA量を（例、RT-PCR、Quantitative real-time-PCRなどにより）測定し、比較することにより、IL-13産生抑制剤（IL-13産生抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

- 5 (2) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞に接触させ、培養上清中のIL-13タンパク質量を（例、EIA、RIAなどにより）測定し、比較することにより、IL-13産生抑制剤（IL-13産生抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

- 10 (3) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞に接触させ、IL-13産生細胞数を（例、ELISPOT法により）測定し、比較することにより、IL-13産生抑制剤（IL-13産生抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

- 15 (4) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明の受容体をコードするポリヌクレオチドに対するsiRNAを含むsiRNAベクター（例、siRNAベクター、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド発現ベクターなど）を多数作製し、siRNAライブラリーを作製後、肥満細胞にトランスフェクションし、本発明のリガンドと接触させ、細胞におけるIL-13の発現量（例、IL-13 RNA量、IL-13タンパク質量など）を測定し、発現量の低下を誘導するsiRNAの塩基配列を調べることにより、
20 IL-13産生抑制剤（IL-13産生抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。リガンドと接触させる際、例えば肥満細胞を能動または受動感作した場合は、抗IgE 抗体、抗体特異的抗原などを、その他の場合は、NGF、Stem Cell Factor (SCF)、サイトカイン、レクチンなどを用いて共刺激してもよい。

- 25 (5) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを、放射標識したアラキドン酸を取り込ませた肥満細胞に接触させ、培養上清中の放射活性を測定し、比較することにより、エイコサノイド産生抑制作用（エイコサノイド産生抑制作用を有する化合物など）のある化合物をスクリーニングする。

(6a) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞に接触させ、培養上清中の顆粒含有物（例、ヒスタミン、セロトニン、 β -ヘキソサミニダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、トリプターゼ、キマーゼ、カルボキシペプチダーゼなど）量を測定し、比較することにより、
5 脱顆粒抑制作用（脱顆粒抑制作用を有する化合物など）のある化合物をスクリーニングする。顆粒含有物の量は、公知の方法、例えばEIA、RIA、HPLC、酵素活性測定等で定量できる。あるいは、肥満細胞を視覚化し（例、ビデオ装置など）、脱顆粒した細胞を数えてもよい。

(6b) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを、放射
10 標識した顆粒含有物を取り込ませた肥満細胞に接触させ、培養上清中の放射活性を測定し、比較することにより、脱顆粒抑制剤（脱顆粒抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

(6c) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞に接触させ、アネキシンVの肥満細胞への結合量を測定（例、FACSなど）
15 し、比較することにより、脱顆粒抑制剤（脱顆粒抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

(6d) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドをIFN- γ およびLPS で刺激したミクログリア細胞に接触させ、細胞におけるIL-10の発現量（例、IL-10 RNA量、IL-10タンパク質量など）を測定し、比較
20 することにより、IL-10産生促進作用またはIL-10産生抑制作用を有する化合物をスクリーニングする。

(6e) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドをIFN- γ およびLPS で刺激したミクログリア細胞に接触させ、細胞におけるIL-6の発現量（例、IL-6 RNA量、IL-6タンパク質量など）を測定し、比較
25 することにより、IL-6産生抑制作用を有する化合物をスクリーニングする。

(6f) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドをIFN- γ およびLPS で刺激したミクログリア細胞に接触させ、細胞におけるTNF- α の発現量（例、TNF- α RNA量、TNF- α タンパク質量など）を測定し、比較することにより、TNF- α 産生抑制作用を有する化合物をスクリーニ

ングする。

(7) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞に接触させ、細胞溶解液をポリアクリルアミドゲルで分離し、フィルターに転写後、MAPキナーゼ特異的な抗体および化学発光試薬を用いて
5 イメージアナライザー等で検出し、発光の強度を比較することにより、MAPキナーゼ活性化抑制剤（MAPキナーゼ活性化抑制作用を有する化合物）をスクリーニングする。

(8) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞（例、24穴プレートに播種後培養された肥満細胞）に接触させ、放射活
10 性により標識したチミジン（例、[methyl-³H]-チミジンなど）を添加後、細胞を溶解し、細胞内に取り込まれたチミジンの放射活性を、液体シンチレーションカウンタで計数することにより、チミジン取り込み活性を測定し、比較することにより、肥満細胞増殖抑制剤（肥満細胞増殖抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

(9) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞（例、24穴プレートに播種後培養された肥満細胞）に接触させ、MTT
15 (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) を添加後、細胞内に取り込まれてMTTが変化したMTTホルマザンを、塩酸にて酸性としたイソプロパノール水溶液で細胞を溶解した後、
20 570nmの吸収によって測定して比較することにより、肥満細胞増殖抑制剤（肥満細胞増殖抑制作用を有する化合物）をスクリーニングする。

本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の受容体または本発明
25 の受容体を含有する細胞もしくは細胞の膜画分、および本発明のリガンドを含有する。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

(i) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径 0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、また
5 は用時調製しても良い。

(ii) 本発明の受容体標品

本発明の受容体を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5% CO_2 、95% air で2日間培養したもの。

10 (iii) 標識リガンド

$[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{33}\text{P}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などの放射性同位元素で標識した本発明のリガンドを適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを、4℃または-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μM に希釈する。

15 (iv) リガンド標準液

本発明のリガンドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

(i) 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の受容体を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μl の測定用緩衝液を各穴に加える。
20

(ii) $10^{-3} \sim 10^{-10}\text{M}$ の試験化合物溶液を5 μl 加えた後、標識した本発明のリガンドを5 μl 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3}M の本発明のリガンド
25 を5 μl 加えておく。

(iii) 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識された本発明のリガンドを0.2N NaOH-1% SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

(iv) 液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放

射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次式で求める。

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

5 NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩は、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合を変化させる化合物あるいは本発明の受容体の活性を促進または
10 は阻害する化合物であり、具体的には、(i) 本発明の受容体を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩(本発明の受容体アゴニスト)、
(ii) 該刺激活性を有しない化合物(本発明の受容体アンタゴニスト)、
(iii) 本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を促進する化合物、
(iv) 本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を阻害する化合物
15 などである。該化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該化合物の塩としては、前記した本発明の受容体の塩と同様のものが
20 用いられる。

上記本発明の受容体アゴニストであるか、またはアンタゴニストであるかの評価方法は、例えば、以下の(i)または(ii)に従えばよい。

(i) 前記(i)～(iii)のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる(特に、結合を阻害する)化合物を得た後、該化合物が上記
25 した本発明の受容体を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニスト(アゴニスト)であり、該活性を有しない化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニスト(アンタゴニスト)である。

(ii) (a) 試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させ、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニストである。

(b) 本発明のリガンドを本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。本発明の受容体を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニストである。

10 本発明の受容体アンタゴニストは、本発明のリガンドが有する生理活性（例、IL-13産生促進活性、肥満細胞の脱顆粒促進活性、エイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジンなど）促進活性、肥満細胞増殖促進活性など）を抑制することができるので、低毒性で安全な優れたIL-13産生抑制剤、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド（例、
15 ロイコトリエン、プロスタグランジンなど）産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、
20 滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、
25 泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、PTCA後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺

- 乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、消化器疾患〔例、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍
- 5 （例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘
- 10 膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症、中枢疾患〔例、神経変性疾患（例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病（クロイツフェルトーヤコブ病）、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）、精神
- 15 疾患（例、統合失調症、うつ病、双極性障害、不安障害、注意欠陥・多動性障害、パニック障害など）、脳血管障害（例、脳血栓症、脳塞栓症、一過性脳虚血発作など）など〕の予防・治療剤などとして使用できる。

本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を阻害する化合物は、本発明の受容体アンタゴニストと同様に用いられる。

- 20 本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を促進する化合物は、本発明の受容体アゴニストと同様に用いられる。

また、本発明は、本発明の受容体をコードする本発明のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする本発明の受容体の遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法なども提供する。

- 25 具体的には、（i）本発明の受容体を産生する能力を有する細胞を培養した場合と（ii）本発明の受容体を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行い、本発明の受容体の遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする。

上記スクリーニング方法においては、例えば、（i）と（ii）の場合に

おける、本発明の受容体の遺伝子の発現量（具体的には、本発明の受容体量または本発明の受容体をコードするmRNA量など）を測定して、比較する。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明ポリペプチドまたは本発明の受容体を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明の受容体の活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

本発明の受容体を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明の受容体をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）などが用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明の受容体を細胞膜上に発現させた形質転換体などが好ましく用いられる。

本発明の受容体の蛋白質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明の抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記ポリペプチドまたは受容体を、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

本発明の受容体の遺伝子の発現量は、公知の方法、例えば、ノーザンブロッティングやReverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)、リアルタイムPCR解析システム（ABI社製、TaqMan polymerase chain reaction）などの方法あるいはそれに準じる方法にしたがって測定することができる。

例えば、上記(ii)の場合における本発明の受容体の遺伝子の発現を、

上記 (i) の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上促進する試験化合物を本発明の受容体の遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

例えば、上記 (ii) の場合における本発明の受容体の遺伝子の発現を、
5 上記 (i) の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上阻害する試験化合物を本発明の受容体の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

本発明の受容体の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、本発明の受容体アンタゴニストと同様に用いられる。

10 本発明の受容体の遺伝子の発現を促進（発現量を増加）する化合物またはその塩は、本発明の受容体アゴニストと同様に用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合性を変化させる化合物、本発明の受容体の活性または機能を促進または阻害する化合物、本発明の受容体の遺伝子の発現を促進または阻害（発現量を増加または減少）する化合物などである。

20 該化合物の塩としては、前記した本発明の受容体の塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬（予防・治療剤など）として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。

25 該化合物またはその塩は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実

施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、
5 ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位
10 形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。
- 15 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活
20 性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、該化合物またはその塩を、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザ
25 ルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒ

トまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

- 該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、
5 投与ルートなどにより差異はある。

例えば、間質性膀胱炎患者（体重 60 kg 当たり）に、一日につきアンタゴニストを約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg 経口投与する。非経口的に投与する場合、例えば、アンタゴニストを注射剤の形で間質性膀胱炎患者（60
10 kg 当たり）に投与する場合、一日につきアンタゴニストを約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

15 [2] 本発明の受容体の定量

本発明の受容体に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明の受容体を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明の受容体の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

20 すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明の受容体とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明の受容体の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明の受容体の定量法、および

25 （ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明の受容体の定量法を提供する。

上記（ii）の定量法においては、一方の抗体が本発明の受容体の N 端

部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明の受容体のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明の受容体に対するモノクローナル抗体を用いて本発明の受容体の定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、
5 また、抗体分子のF(a b')₂、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明の受容体の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ポリペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。
10 例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、
20 β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さら
25 に、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ポリペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキス

トラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の受容体量を定量することができる。

１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明の受容体の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明の受容体の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明の受容体のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ，Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用地第２抗体として固相化抗体を用い

る固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明の受容体の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」 Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することが

できる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明の受容体を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明の受容体の濃度を定量することによって、本発明の受容体の濃度の増加が検出された場合、例えば、
5 IL-13産生促進活性、肥満細胞の脱顆粒促進作用、エイコサノイド産生促進作用、肥満細胞増殖促進作用が亢進し、例えば免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、
10 肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、P T
20 C A後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、消化器疾患〔例、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性
25 直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊

髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症、中枢疾患〔例、神経変性疾患（例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病（クロイツフェルトーヤコブ病）、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）、精神疾患（例、統合失調症、うつ病、双極性障害、不安障害、注意欠陥・多動性障害、パニック障害など）、脳血管障害（例、脳血栓症、脳塞栓症、一過性脳虚血発作など）など〕などに将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

10 また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明の受容体を検出するために使用することができる。また、本発明の受容体を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明の受容体の検出、被検細胞内における本発明の受容体の挙動の分析などのために使用することができる。

15 〔3〕遺伝子診断薬

本発明のポリヌクレオチド（DNA）は、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトや温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明の受容体をコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

25 本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（Genomics, 第5巻, 874～879頁, 1989年、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第86巻, 2766～2770頁, 1989年）などにより実施することができる。

例えば、本発明の受容体の遺伝子の発現過多が検出された場合は、例えば、IL-13産生促進活性、肥満細胞の脱顆粒促進作用、エイコサノイド

産生促進作用、肥満細胞増殖促進作用が亢進し、例えば免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、PTCA後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、消化器疾患〔例、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症、中枢疾患〔例、神経変性疾患（例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病（クロイツフェルトーヤコブ病）、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）、精神疾患（例、統合失調症、うつ病、双極性障害、

不安障害、注意欠陥・多動性障害、パニック障害など)、脳血管障害(例、脳血栓症、脳塞栓症、一過性脳虚血発作など)など]に将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

〔4〕アンチセンスポリヌクレオチド(例、DNA)を含有する医薬

- 5 本発明のポリヌクレオチド(例、DNA)に相補的に結合し、該ポリヌクレオチド(例、DNA)の発現を抑制することができるアンチセンスポリヌクレオチド(例、アンチセンスDNA)は、例えば、IL-13産生抑制剤、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド(例、ロイコトリエン、プロスタグランジンなど)産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患(下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー(例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど)、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など)、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患(例、慢性気管支炎、肺気腫)、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など)、泌尿器疾患(例、腎尿細管間質障害(繊維化)、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など)、循環器疾患(例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、PTCA後再狭窄など)、眼科疾患(例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど)、癌(例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カボジ肉腫、肥満細胞種など)、消化器疾患〔例、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍(例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など)、胃炎、逆流性食道炎、NUD(Non Ulcer Dyspepsia)、胃MALTリンパ腫、非ステロ
- 10
- 15
- 20
- 25

イド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症、中枢疾患〔例、神経変性疾患（例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病（クロイツフェルトーヤコブ病）、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）、精神疾患（例、統合失調症、うつ病、双極性障害、不安障害、注意欠陥・多動性障害、パニック障害など）、脳血管障害（例、脳血栓症、脳塞栓症、一過性脳虚血発作など）など〕の予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

例えば、上記アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、アデノウィルスアソシエーテッドウィルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明の受容体をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA〔本発明の受容体に対するsiRNA (small (short) interfering RNA)、shRNA (small (short) hairpin RNA)、本発明の受容体をコードするRNAの一部を含有するリボザイムなども、本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制することができ、生体内における本発明の受容体または本発明のポリヌクレオチドの機能を抑制することができるので、例えば、IL-13産生抑制剤、肥満細胞

の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジンなど）産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、泌尿器疾患（例、腎尿管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、P T C A後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、消化器疾患〔例、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症、中枢疾患〔例、神経変性疾患（例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病（クロイツフェルトーヤコブ病）、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパ

チー、多発性硬化症など）、精神疾患（例、統合失調症、うつ病、双極性障害、不安障害、注意欠陥・多動性障害、パニック障害など）、脳血管障害（例、脳血栓症、脳塞栓症、一過性脳虚血発作など）など〕の予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

- 5 二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計
10 して製造することができる。例えば、本発明の受容体をコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明の本発明の受容体をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げられる。

- 15 上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

〔5〕本発明の抗体を含有する医薬

- 本発明の受容体の抗体（例、本発明の受容体を中和する作用を有する
20 抗体、シグナル伝達を不活性化する抗体など）は、例えば、IL-13産生抑制剤、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジンなど）産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エ
25 リテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞

- 性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など）、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、P T C A後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、消化器疾患〔例、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症、中枢疾患〔例、神経変性疾患（例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病（クロイツフェルトーヤコブ病）、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）、精神疾患（例、統合失調症、うつ病、双極性障害、不安障害、注意欠陥・多動性障害、パニック障害など）、脳血管障害（例、脳血栓症、脳塞栓症、一過性脳虚血発作など）など〕の予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

本発明の抗体を含有する上記医薬は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトや温血動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、

投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の間質性膀胱炎の患者の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、
5 1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と
10 薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、
15 丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、
20 乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水
25 性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤（例、ポリソルベート

80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)]などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適
5 当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、
10 坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

15 [6] DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明の受容体をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

20 (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、

(2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記(1)記載の動物、

(3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記(2)記載の動物、
および

25 (4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターなどを提供する。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非

ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAEーデキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。

また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明の受容体を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明の受容体の機能を抑制するポリペプチド

を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

本発明の受容体の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウィルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(i) ウィルス（例、シミアンウィルス、サイトメガロウィルス、モロニー白血病ウィルス、JCウィルス、乳癌ウィルス、ポリオウィルスなど）に由来するDNAのプロモーター、(ii) 各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存蛋白質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、

心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般に T i e 2 と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン 3 リン酸化酵素（N a , K - A T P a s e）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネイン I および I I A、メタロプロティナーゼ 1 組織インヒビター、M H C クラス I 抗原（H - 2 L）、H - r a s、レニン、ドーパミン β - 水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（T P O）、ポリペプチド鎖延長因子 1 α （E F - 1 α ）、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖 1 および 2、ミエリン基礎蛋白質、チログロブリン、T h y - 1、免疫グロブリン、H 鎖可変部（V N P）、血清アミロイド P コンポーネント、ミオグロビン、トロポニン C、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリン A、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウィルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子 1 α （E F - 1 α ）のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

15 上記ベクターは、DNA 転移哺乳動物において目的とするメッセンジャー RNA の転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウィルス由来および各種哺乳動物由来の各 DNA の配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウィルスの S V 4 0 ターミネターなどが用いられる。

20 その他、目的とする外来性 DNA をさらに高発現させる目的で各 DNA のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核 DNA のイントロンの一部などをプロモーター領域の 5' 上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の 3' 下流 に連結することも目的により可能である。

25 正常な本発明の受容体の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来 DNA および市販の各種ゲノム DNA ライブラリーよりゲノム DNA の全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来 RNA より公

知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

- 5 該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA
10 A転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

- 15 本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。
20 DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

- 25 導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することに

より最終的に本発明の受容体の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明の受容体の機能亢進症や、本発明の受容体が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明の受容体の増加症状を有することから、例えば、IL-13産生抑制剤、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジンなど）産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、PTCA後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、消化器疾患〔例、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症

剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症、中枢疾患〔例、神経変性疾患（例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病（クロイツフェルトーヤコブ病）、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）、精神疾患（例、統合失調症、うつ病、双極性障害、不安障害、注意欠陥・多動性障害、パニック障害など）、脳血管障害（例、脳血栓症、脳塞栓症、一過性脳虚血発作など）など〕

5 予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

10

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする

15 外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において

20 本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を

25 交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明の受容体の機能不活性型不応症となることがあり、

その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明の受容体の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

- 5 また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明の受容体の機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドまたは本発明の異常受容体による正常ポリペプチドまたは受容体の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

10 また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明の受容体の増加症状を有することから、本発明の受容体の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- (i) 組織培養のための細胞源としての使用、
- 15 (ii) 本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたポリペプチドまたは受容体組織を分析することによる、本発明の受容体により特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドまたは受容体との関連性についての解析、
- (iii) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、こ
- 20 れらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- (iv) 上記(iii)記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- (v) 本発明の変異ポリペプチドまたは受容体を単離精製およびその抗体
- 25 などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明の受容体の機能不活性型不応症などを含む、本発明の受容体に関連する疾患〔例、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン

5 舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症、悪性神経鞘腫など）
など〕の臨床症状を調べることができ、また、本発明の受容体に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明の受容体産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明の受容体およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明の受容体の機能不活性型不応症を含む、本発明の受容体に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明の受容体に関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

20 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

25 DNA : デオキシリボ核酸
cDNA : 相補的デオキシリボ核酸
A : アデニン
T : チミン
G : グアニン

	C	: シトシン
	I	: イノシン
	R N A	: リボ核酸
	m R N A	: メッセンジャーリボ核酸
5	d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸
	d T T P	: デオキシチミジン三リン酸
	d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸
	d C T P	: デオキシシチジン三リン酸
	A T P	: アデノシン三リン酸
10	E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
	S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
	B H A	: ベンズヒドリルアミン
	p M B H A	: p-メチルベンズヒドリルアミン
	T o s	: p-トルエンスルフォニル
15	B z l	: ベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
	B o c	: t-ブチルオキシカルボニル
	D C M	: ジクロロメタン
	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
20	D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
	T F A	: トリフルオロ酢酸
	D I E A	: ジイソプロピルエチルアミン
	G l y 又は G	: グリシン
	A l a 又は A	: アラニン
25	V a l 又は V	: バリン
	L e u 又は L	: ロイシン
	I l e 又は I	: イソロイシン
	S e r 又は S	: セリン
	T h r 又は T	: スレオニン

	C y s 又は C	: システイン
	M e t 又は M	: メチオニン
	G l u 又は E	: グルタミン酸
	A s p 又は D	: アスパラギン酸
5	L y s 又は K	: リジン
	A r g 又は R	: アルギニン
	H i s 又は H	: ヒスチジン
	P h e 又は F	: フェニルアラニン
	T y r 又は Y	: チロシン
10	T r p 又は W	: トリプトファン
	P r o 又は P	: プロリン
	A s n 又は N	: アスパラギン
	G l n 又は Q	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
15	T y r (I)	: 3-ヨードチロシン
	D M F	: N, N-ジメチルホルムアミド
	F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	T r t	: トリチル
	P b f	: 2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベン
20	ゾ	
		フラン-5-スルホニル
	C l t	: 2-クロロトリチル
	B u ^t	: t-ブチル
	M e t (O)	: メチオニンスルフォキシド
25	D N P	: ジニトロフェノール

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

ヒトGPR34のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

ヒトGPR34をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

- 以下の参考例1（1－1）におけるPCR反応で使用したプライマー1の
5 塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

以下の参考例1（1－1）におけるPCR反応で使用したプライマー2の
塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

- 10 以下の参考例1（1－3）におけるPCR反応で使用したプライマー3の
塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

以下の参考例1（1－3）におけるPCR反応で使用したプライマー4の
塩基配列を示す。

- 15 〔配列番号：7〕

以下の参考例1（1－3）におけるPCR反応で使用したプローブの塩基
配列を示す。5'末端にリポーター色素としてFAM

(6-carboxy-fluorescein)を、3'末端にはクエンチャーとしてTAMRA

(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine)を標識した。

- 20 〔配列番号：8〕

以下の参考例2におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を
示す。

〔配列番号：9〕

- 以下の参考例2におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を
25 示す。

〔配列番号：10〕

ラットGPR34の一部をコードするcDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

以下の参考例3におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を

示す。

〔配列番号：12〕

以下の参考例3におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す。

5 〔配列番号：13〕

ラットGPR34をコードするcDNAの3'側部分配列の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

以下の参考例4におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す。

10 〔配列番号：15〕

以下の参考例4におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

ラットGPR34をコードするcDNAの5'側部分配列の塩基配列を示す。

15 〔配列番号：17〕

以下の参考例5におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

20 以下の実施例5におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

ラットGPR34のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：20〕

ラットGPR34をコードするcDNAの塩基配列を示す。

25 〔配列番号：21〕

以下の実施例5において得られたラットGPR34をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕

マウスGPR34のアミノ酸配列を示す。(Accession No. AAD50550)

〔配列番号：23〕

マウスGPR34をコードするcDNAの塩基配列を示す。(Accession No. AF081916)

〔配列番号：24〕

- 5 以下の実施例1におけるPCR反応で使用したプライマーrIL-13-tFの塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

以下の実施例1におけるPCR反応で使用したプライマーrIL-13-tRの塩基配列を示す。

- 10 〔配列番号：26〕

以下の実施例1におけるPCR反応で使用したプローブrIL-13-tPの塩基配列を示す。5'末端にリポーター色素としてFAM

(6-carboxy-fluorescein)を、3'末端にはクエンチャーとしてTAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine)を標識した。

- 15 〔配列番号：27〕

以下の実施例1におけるPCR反応で使用したスタンダードrIL-13 standardの塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

- 20 以下の実施例1におけるPCR反応で使用したスタンダードrGAPDH standardの塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

以下の実施例2におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

- 25 以下の実施例2におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

モルモットGPR34のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：32〕

モルモット GPR34 をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号： 3 3 〕

以下の実施例 3 における PCR 反応で使用したプライマー 1 の塩基配列を示す。

5 〔配列番号： 3 4 〕

以下の実施例 3 における PCR 反応で使用したプライマー 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 3 5 〕

カニクイザル GPR34 のアミノ酸配列を示す。

10 〔配列番号： 3 6 〕

カニクイザル GPR34 をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号： 3 7 〕

以下の実施例 4、実施例 5 及び実施例 1 3 における PCR 反応で使用したプライマー 1 の塩基配列を示す。

15 〔配列番号： 3 8 〕

以下の実施例 4 及び実施例 1 3 における PCR 反応で使用したプライマー 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 3 9 〕

以下の実施例 4、実施例 5 及び実施例 1 3 における PCR 反応で使用した
20 TaqMan プローブの塩基配列を示す。5' 末端にリポーター色素として FAM
 (6-carboxy-fluorescein) を、3' 末端にはクエンチャーとして TAMRA
 (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) を標識した。

〔配列番号： 4 0 〕

以下の実施例 4 における PCR 反応で使用したプライマー 4 の塩基配列を
25 示す。

〔配列番号： 4 1 〕

以下の実施例 9 における PCR 反応で使用したプライマー 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 4 2 〕

以下の実施例 9 における PCR 反応で使用したプライマー 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：43〕

以下の実施例 9 における PCR 反応で使用したプローブの塩基配列を示す。5' 末端にリポーター色素として FAM (6-carboxy-fluorescein) を、3' 末端にはクエンチャーとして TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) を標識した。

〔配列番号：44〕

以下の実施例 15 における PCR 反応で使用した、rat IL-6 定量用プライマー rIL-6-tF の塩基配列を示す。

〔配列番号：45〕

以下の実施例 15 における PCR 反応で使用した、rat IL-6 定量用プライマー rIL-6-tR の塩基配列を示す。

〔配列番号：46〕

以下の実施例 15 における PCR 反応で使用した、rat IL-6 定量用プローブ rIL-6-tP の塩基配列を示す。5' 末端にリポーター色素として FAM (6-carboxy-fluorescein) を、3' 末端にはクエンチャーとして TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) を標識した。

〔配列番号：47〕

以下の実施例 15 における PCR 反応で使用した、rat IL-6 定量用スタンダード rIL-6 の塩基配列を示す。

〔配列番号：48〕

以下の実施例 15 における PCR 反応で使用した、rat TNF- α 定量用プライマー rTNF- α -tF の塩基配列を示す。

〔配列番号：49〕

以下の実施例 15 における PCR 反応で使用した、rat TNF- α 定量用プライマー rTNF- α -tR の塩基配列を示す。

〔配列番号：50〕

以下の実施例 15 における PCR 反応で使用した、rat TNF- α 定量用プロ

ープ rTNF- α -tP の塩基配列を示す。5' 末端にリポーター色素としてFAM (6-carboxy-fluorescein) を、3' 末端にはクエンチャーとしてTAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) を標識した。

〔配列番号：51〕

- 5 以下の実施例15におけるPCR反応で使用した、rat TNF- α 定量用スタンダードの塩基配列を示す。

〔配列番号：52〕

以下の実施例15におけるPCR反応で使用した、rat IL-10定量用プライマー rIL-10-tFの塩基配列を示す。

- 10 〔配列番号：53〕

以下の実施例15におけるPCR反応で使用した、rat IL-10定量用プライマー rIL-10-tRの塩基配列を示す。

〔配列番号：54〕

- 15 以下の実施例15におけるPCR反応で使用した、rat IL-10定量用プローブ rIL-10-tP の塩基配列を示す。5' 末端にリポーター色素としてFAM (6-carboxy-fluorescein) を、3' 末端にはクエンチャーとしてTAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) を標識した。

〔配列番号：55〕

- 20 以下の実施例15におけるPCR反応で使用した、rat IL-13定量用スタンダードの塩基配列を示す。

以下に実施例および参考例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

- 25 試薬類は特に断らない限り、和光純薬社製を用いた。遠心分離は特に断らない限り、4℃で行った。Wistarラット（オス、12週齢）は日本エスエルシー社より購入した。

実施例1

LysoPSのラット腹腔由来肥満細胞に対するIL-13の発現亢進作用

ラット腹腔由来肥満細胞（以下、RPMC）は以下のように採取した。ラ

ット腹腔内に、氷冷したMast cell medium (以下、MCM; 150mM NaCl, 3.7mM KCl, 3.0mM NaH₂PO₄, 3.5mM KH₂PO₄, 5.6mM (D)-Glucose, 0.1% Bovine serum albumin (以下、BSA), 0.1% gelatin, 10U/ml heparin, pH6.8) を1匹あたり約40ml注入し、約2分間腹部をマッサージした後、腹部を正中線に沿って切開し、腹水を採取した。採取した腹水をセルストレイナー (ベクトン・ディッキンソン社) を用いてろ過し、50×gで7分間遠心分離後、沈殿した細胞をMCMに懸濁して、もう一度50×gで7分間遠心分離した。沈殿した細胞を5mlのMCMに懸濁後、2mlの32% (w/v) BSA溶液 (0.9% NaClに溶解) に重層し、室温で20分間静置した。室温で×300g、15分間遠心分離を行い、MCMとBSA溶液の間にある細胞を捨て、沈殿している細胞をMCMに懸濁して、×300gで5分間遠心分離することにより2回洗浄した。沈殿した細胞をAssay buffer (RPMI1640 medium (インビトロジェン社), 0.1% BSA) に懸濁後、この細胞を以下の実験に用いた。このようにして得られた細胞の一部をとってアルシアンブルー溶液で染色したところ、95%以上の細胞がRPMCであった。RPMCの活性化は以下のように行った。Assay bufferに懸濁したRPMCを、10 μ g/mlのモノクローナルマウス抗DNP-IgE (ヤマサ) を加えて、氷上で30分間静置することにより受動感作させた。×300gで5分間遠心分離後、沈殿した細胞をAssay bufferを用いて3回洗浄した。Assay buffer に懸濁したRPMCを、96ウェルV底プレートに、1ウェルあたり2×10⁵個ずつ分注した。アッセイはそれぞれの反応条件についてn=3で行った。プレートを37℃で5分間保温後、最終容量が200 μ lになるように、アッセイ条件に応じて終濃度3 μ MのlysoPS (シグマ社) または終濃度100ng/mlのDNP-BSA (カルビオフェム社) を添加し、37℃、5% CO₂のインキュベーター内に静置した。2、4、6、および8時間後に、プレートを氷冷してRPMCの活性化を停止させ、×300gで5分間遠心分離を行い、沈殿した細胞からRNeasy Mini Kit (キアゲン社) を用いて、添付のプロトコールに従ってtotal RNA を抽出した。得られたtotal RNA を、Ethachinmateを用いて、添付のプロトコールに従って濃縮し、RNase-free H₂Oに溶解した。次に、total RNA 250ng分を用いて、

SuperScript II Reversetranscriptase (インビトロジェン社)により、
以下の方法で逆転写反応を行い、一本鎖cDNAを作成した。Total RNA溶液
にOligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (インビトロジェン社) 0.5 μ g、10mM dNTP (イ
ンビトロジェン社) 1 μ lを加え、RNase-free H₂Oを加えて全量を12 μ l
5 とした後、70℃で10分間インキュベーションし、1分間氷冷した。

5×First-Strand Buffer (SuperScript II Reversetranscriptaseに添付)
4 μ l、0.1M DTT (SuperScript II Reversetranscriptaseに添付) 2 μ l、
RNaseOUT (インビトロジェン社) 1 μ lおよびSuperScript II
Reversetranscriptase 1 μ lを加えて、42℃で50分間インキュベーション
10 後、70℃で15分間インキュベーションし、5分間氷冷した。このようにし
て得られたcDNAを、Ethachinmateを用いて、添付のプロトコールに従っ
て精製し、Tris-EDTA Buffer(フルカ社)に溶解した。

以下のTaqMan PCRにおいて、ラットIL-13 (Interleukin-13) 定量用の
プライマーとして、rIL-13-tF (配列番号：24) およびrIL-13-tR (配
15 列番号：25) を、プローブとしてrIL-13-tP (配列番号：26) を、ス
タANDARDとしてrIL-13 standard (配列番号：27) を用いた。GAPDH
定量用のプライマーおよびプローブは、TaqMan Rodent GAPDH Control
Reagents VIC Probe (アプライドバイオシステムズ社)を使用し、スタン
ダードはrGAPDH standard (配列番号：28) を用いた。

20 TaqMan PCRは、それぞれのサンプルについてn=2で行い、2.5ng total RNA
を鋳型に用いて25 μ lの液量で行った。反応液の組成は、プライマー
900nM、プローブ 250nM、TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライ
ドバイオシステムズ社) 1/2 volumeとした。反応および解析はABI PRISM
7700 Sequence Detection System (アプライドバイオシステムズ社)によ
25 り行った。反応サイクルは、50℃で2分間保温し、次に95℃で10分間保温
した後、95℃・15秒間 60℃・1分間のサイクルを40回行った。遺伝子発
現量は、標準曲線のY-Slope値が38.5-41.5、Correlation Coeff値が0.995
以上になるように解析を行ない、算出した。

結果を図1に示す。

これより、IL-13の発現量は、無刺激、抗原単独刺激の場合には発現変動は見られなかったが、抗原+lysoPS刺激の場合において、著しい発現上昇が認められた。抗原+lysoPS刺激時におけるGAPDH補正後のIL-13発現量は、刺激後4時間において、無刺激の場合と比較して約27倍、抗原単独刺激の場合と比較して約36倍であった。また、抗原+lysoPS刺激時におけるGAPDH補正後のIL-13発現量は、刺激後6時間において、無刺激の場合と比較して約13倍、抗原単独刺激の場合と比較して約19倍であった。また、抗原+lysoPS刺激時におけるGAPDH補正後のIL-13発現量は、刺激後8時間において、無刺激の場合と比較して約13倍、抗原単独刺激の場合と比較して約27倍であった。

実施例 2

モルモット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34の全長をコードするcDNA断片のクローニング

15 モルモット (ハートレー) 10週齢 オス 5匹に、Mast cell medium (150mM NaCl, 3.7mM KCl, 3.0mM リン酸2ナトリウム, 3.5mM リン酸1カリウム, 5.6mM グルコース, 0.1% ゼラチン, 0.1%ウシ血清アルブミン pH6.8) 45mlを腹腔内注射した後、腹腔浸出細胞を回収し、細胞画分を37℃ 1時間シャーレで保温する間、接着したmacrophageからtotalRNAを調製し、
20 1μgを、SuperScript II reversetranscriptaseのプロトコールに従って random 9merを用いて逆転写した。反応温度は、30℃ 10分, 42℃ 60分, 51℃ 30分, 70℃ 15分で行った。

モルモットGPR34の一部をコードするcDNAを取得するため、マウス GPR34の塩基配列に基づいてプライマー1 (配列番号: 29) およびプライマー2 (配列番号: 30) を設定してPCR反応を行なった。PCR条件は、
25 逆転写したcDNAのうち、10 ng totalRNA 相当分を鋳型に、20μlの液量で行った。反応液は、添付の緩衝液にプライマー 0.5μM、dNTP 0.2mM、Z-Taq (TaKaRa社) 0.5unitsを含むように調製した。増幅のため、94℃で2分保温した後、98℃ 1秒、55℃ 15秒、72℃ 15秒のサイクルを35回繰り返す。

返した後、72℃で10分保温した。反応物を1.2% Seakem GTG Agarose (宝酒造)で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した時に見える1400 bp 付近のバンドをGeneClean Spin kit (バイオ101 社)で抽出し、TOP0 TA cloning kit for sequencing (インビトロジェン社)を用いてプラスミドベクターpCR4-TOP0へサブクローニングし、大腸菌TOP10へ導入した。生じた形質転換体からQIAwell 8 Ultra Plasmid Kit (キアゲン社)を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社)を用いて行ない、ABI PRISM 377蛍光式自動シーケンサーを用いて解析した。その結果、モルモットGPR34 (配列番号: 3 1) をコードする塩基配列 (配列番号: 3 2) が含まれていた。上記プラスミドを用いて大腸菌TOP10を形質転換し、Escherichia coli TOP10/pcr4-caviaGPR34を得た。モルモットGPR34のアミノ酸配列とヒトGPR34のアミノ酸配列との相同性は90.2%であった。

15

実施例 3

カニクイザル由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34の全長をコードするcDNA断片のクローニング

カニクイザル視床下部からISOGEN (ニッポンジーン社)のプロトコールに従って、polyA+RNAを調製し、2 μ gを、SuperScript II reverse transcriptaseのプロトコールに従ってrandom 9merを用いて逆転写した。反応温度は、30℃ 10分、42℃ 60分、51℃ 30分、70℃ 15分で行った。

カニクイザルGPR34の一部をコードするcDNAを取得するため、ヒトGPR34の塩基配列に基づいてプライマー1 (配列番号: 3 3) およびプライマー2 (配列番号: 3 4) を設定してPCR反応を行なった。PCR条件は、逆転写したcDNAのうち、10 ng polyA+RNA 相当分を鋳型に、20 μ lの液量で行った。反応液は、添付の緩衝液にプライマー濃度各0.5 μ M、dNTP 0.2mM、Z-Taq (TaKaRa社) 0.5units を含むように調製した。増幅のため

25

の、94℃で2分保温した後、98℃ 1秒、55℃ 15秒、72℃ 15秒のサイクルを35回繰り返した後、72℃で10分保温した。反応物を1.2% Seakem GTG Agarose (宝酒造) で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した時に見える1200 bp付近のバンドをGeneClean Spin kit (バイオ101) で抽出し、TOP0 TA cloning kit for sequencing (インビトロジェン社) を用いてプラスミドベクターpCR4-TOP0へサブクローニングし、大腸菌 TOP10へ導入した。得られた形質転換体からQIAwell 8 Ultra Plasmid Kit (キアゲン社) を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、ABI PRISM 377蛍光式自動シーケンサーを用いて解析した。その結果、カニクイザルGPR34 (配列番号: 35) をコードする塩基配列 (配列番号: 36) が含まれていた。上記プラスミドを用いて大腸菌TOP10を形質転換し、*Escherichia coli* TOP10/pcr4-monGPR34を得た。カニクイザルGPR34のアミノ酸配列とヒトのアミノ酸配列との相同性は98.7% であった。

実施例 4

ラット各部位でのラットGPR34遺伝子の発現分布および発現量の定量

Wister ラットから、全脳、下垂体、脊髄、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、肝臓、胸腺、脾臓、腹部周囲脂肪、腎周囲脂肪、精巣周囲脂肪、前立腺、精巣、卵巣、子宮、精包、心臓、背筋、肺、腎臓、副腎、腹腔macrophage、腹腔肥満細胞を取り出し、RNeasy (キアゲン社) を用いてtotal RNA画分を調製した。得られたRNAは、プロテインナーゼK (インビトロジェン社) 消化によりRNaseを分解後、Message Clean Kit (GenHunter社) を用いてゲノムDNAをDNase I消化した後、各部位のtotal RNA 1 μ gを鋳型に、SuperScript II reversetranscriptase (インビトロジェン社) を用い、添付のマニュアルにしたがってランダムプライマーを用いて逆転写を行ない、cDNAを作製した。得られたtotal RNA 25 ng相当の逆転写産物または後に述べるようにして作製した標準cDNA、1 x

Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社)、配列番号：37で表されるプライマー1および配列番号：38で表されるプライマー2 各100 nM、および配列番号：39で表されるTaqManプローブ100 nMを含む反応混合液25 μ lについてABI PRISM 7700 Sequence Detector (ア
5 プライドバイオシステムズ社)を用いてPCRを行なった。PCRは、50℃・2分、95℃・10分で処理後、95℃・15秒、60℃・60秒のサイクルを40回繰り返すことにより行なった。

標準cDNAは、ラットGPR34の全長を含むプラスミドpcr2.1-ratGPR34 50 pgを鋳型に、プライマー1およびプライマー2 (配列番号：37および配
10 列番号：38)を用いて200 μ lの液量でPCR反応を行ない作製した。組成は、プライマー1および2、0.5 μ M、2.5 mM MgCl₂、dNTP 0.2 mM, AmpliTaq Gold (アプライドバイオシステムズ社) 1/100 volume、10倍濃縮AmpliTaq Gold Buffer 1/10 volumeで行った。反応は、95℃で10分保温した後、95℃・15秒、60℃・15秒、72℃・10秒のサイクルを40回繰り返した。反応液か
15 ら増幅産物を精製し、260 nmの吸光度を測定して濃度を算出して正確なコピー数を算出した後、蒸留水で希釈し、1コピーから1x10⁷コピーの標準cDNA溶液を調製した。また、TaqMan PCR用プローブおよびプライマーはPrimer Express (Version1.0) (アプライドバイオシステムズ社)により設計した。

20 発現量はABI PRISM 7700 SDSソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、また標準cDNAの初期濃度の対数値を横軸にとって標準曲線を作成した。標準曲線より各逆転写産物の初期濃度を算出し、各部位のtotal RNA 25 ng当たりのラットGPR34遺伝子発現量を求めた。さらに各々のサンプルのラ
25 ットGAPDH遺伝子発現量をrodent GAPDH 測定キット (アプライドバイオシステムズ社)を用いてラットGPR34遺伝子発現量の解析と同様にしてTaqMan PCR法により求め、ラットGPR34遺伝子発現量の補正を行なった。

その結果、ラットGAPDH遺伝子に対するラットGPR34遺伝子の発現量は、全脳 0.65%、下垂体 0.59%、脊髄 1.14%、胃 0.32%、十二指腸 0.39%、

空腸 0.38%、回腸 0.69%、盲腸 1.00%、結腸 0.32%、肝臓 0.09%、胸腺 0.84%、脾臓 3.02%、腹部周囲脂肪 0.64%、腎周囲脂肪 0.81%、精巣周囲脂肪 1.35%、前立腺 1.13%、精巣 0.74%、卵巣 0.45%、子宮 0.83%、精包 0.81%、心臓 0.08%、背筋 0.01%、肺 0.67%、腎臓 0.11%、副腎 0.26%、
5 腹腔macrophage 2.80%、腹腔肥満細胞 44.0%であった。以上より、ラットGPR34遺伝子は、ラット腹腔肥満細胞において特に多く発現していることがわかった〔図2〕。

実施例 5

- 10 マウス各部位でのマウスGPR34遺伝子の発現分布および発現量の定量
Balb/c マウスから、脳、胃、小腸、肝臓、脾臓、前立腺、心臓、肺、腎臓、macrophage、骨髓、骨髓由来肥満細胞を取り出し、RNeasy（キアゲン社）を用いてtotal RNA画分を調製した。同様にWEHI-3、BAF/3、MC3T3-E1細胞についても同様に total RNAを調製した。得られたRNAは、
15 プロテイナーゼK（インビトロジェン社）消化によりRNaseを分解後、Message Clean Kit（GenHunter社）を用いてゲノムDNAをDNase I消化した後、各部位のtotal RNA 1 μ gを鋳型に、SuperScript II
reversetranscriptase（インビトロジェン社）を用い、添付のマニュアルにしたがってランダムプライマーを用いて逆転写を行ない、cDNAを作
20 製した。得られたtotal RNA 25 ng相当の逆転写産物または後に述べるようにして作製した標準cDNA、1 x Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社）、配列番号：37で表されるプライマー1および配列番号：40で表されるプライマー4、各100 nM、および配列番号：39で表されるTaqManプローブ100 nMを含む反応混合液25 μ lについて
25 ABI PRISM 7700 Sequence Detector（アプライドバイオシステムズ社）を用いてPCRを行なった。PCRは、50 $^{\circ}$ C・2分、95 $^{\circ}$ C・10分で処理後、95 $^{\circ}$ C・15秒、60 $^{\circ}$ C・60秒のサイクルを40回繰り返すことにより行なった。

標準cDNAは、NCBIのアクセッション番号NM_011823の配列をを元に取得したプラスミドpcr2.1-mouseGPR34 50 pgを鋳型に、プライマー1お

よび4（配列番号：37および配列番号：40）を用いて200 μ lの液量でPCR反応を行ない作成した。組成は、プライマー1および4、0.5 μ M、2.5 mM MgCl₂、dNTP 0.2 mM, AmpliTaq Gold（アプライドバイオシステムズ社）1/100 volume、10倍濃縮AmpliTaq Gold Buffer 1/10 volumeで行った。

5 反応は、95℃で10分保温した後、95℃・15秒、60℃・15秒、72℃・10秒のサイクルを40回繰り返した。反応液から増幅産物を精製し、260 nmの吸光度を測定して濃度を算出して正確なコピー数を算出した後、蒸留水で希釈し、1コピーから1x10⁷コピーの標準cDNA溶液を調製した。また、TaqMan PCR用プローブおよびプライマーはPrimer Express (Version1.0)

10 （アプライドバイオシステムズ社）により設計した。

発現量はABI PRISM 7700 SDSソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、また標準cDNAの初期濃度の対数値を横軸にとって標準曲線を作成した。標準曲線より各逆転写産物の初期濃度を算出し、各部位のtotal RNA 25 ng

15 当たりのマウスGPR34遺伝子発現量を求めた。さらに各々のサンプルのマウスGAPDH遺伝子発現量をrodent GAPDH 測定キット（アプライドバイオシステムズ社）を用いてマウスGPR34遺伝子発現量の解析と同様にし、TaqMan PCR法により求め、マウスGPR34遺伝子発現量の補正を行なった。

その結果、マウスGAPDH遺伝子に対するマウスGPR34遺伝子の発現量は、

20 脳 2.58%, 胃 2.00%, 小腸 2.28%, 肝臓 0.27%, 前立腺 0.49%, 心臓 0.97%, 肺 3.81%, 腎臓 0.63%, 脾臓 4.60%, 脾臓 B 細胞 2.71%, 脾臓 T 細胞 0.95%, macrophage 0.79%, 骨髄 1.23%, MC3T3-E1細胞 0.008%, WEHI-3細胞 0.05%, BAF/3細胞 0.16%, MC/9 細胞 4.73%, IC-2 細胞 8.65%, 骨髄由来肥満細胞 37.1%であった。

25 以上より、マウスGPR34遺伝子は、マウス骨髄由来肥満細胞において特に多く発現していることがわかった〔図3〕。

実施例 6

LysoPS依存的肥満細胞の脱顆粒促進

実施例 1 に示した方法で取得したラット腹腔肥満細胞 (RPMC) を氷上で抗DNP IgE (ヤマサ、 $10 \mu\text{g/ml}$) を用いて30分受動感作後、洗浄し、反応液中の最終細胞濃度が $100,000 \text{ cells/well}$ になるように96穴プレートに撚いた。LysoPSとDNP-BSA (カルビオフェム社) でRPMCを刺激し、20
5 分後にプレートを遠心し、反応液の上清の β -ヘキソサミニダーゼ活性を、4-メチルウンベリフェレル-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシド (和光純薬) の分解活性を指標に測定した。

その結果、自発的脱顆粒は3.1%であった。LysoPSが存在しない場合、 100ng/ml のDNP-BSA刺激によるRPMCの脱顆粒は4.4%であった。 100ng/ml
10 のDNP-BSA刺激による脱顆粒はlysoPSを $0.1 \mu\text{M}$ 同時添加した場合、8.4%、lysoPSを $0.3 \mu\text{M}$ 同時添加した場合、14.7%、lysoPSを $1 \mu\text{M}$ 同時添加した場合、26.0%、lysoPSを $3 \mu\text{M}$ 同時添加した場合、36.7%、lysoPSを $10 \mu\text{M}$ 同時添加した場合、45.2%とlysoPSの濃度依存的に増強された。

これより、lysoPSの濃度依存的に、肥満細胞の脱顆粒促進が増強され
15 ることがわかった。

実施例 7

LysoPS依存的ヒトGPR34発現CHO細胞増殖促進

参考例 1 に記載した方法と同様に作製したヒトGPR34発現CHO細胞を
20 $20,000\text{cells/well}$ の密度となるよう無血清培地で96穴プレートに撚き、4時間静置後、0、0.1、0.3、1および $3 \mu\text{M}$ のlysoPSをそれぞれ添加し、16時間培養した。トリチウム標識チミジン (アマシャム TRK120) を $1 \mu\text{Ci/well}$ 添加し、4時間標識した後、10% トリクロロ酢酸で固定、水酸化ナトリウム水溶液で可溶化した後、トリクロロ酢酸で中和し、セルハ
25 ーベスターでDNAを回収し、フィルター上の放射活性をDNA合成活性として測定した。

ヒトGPR34発現CHO細胞のDNA合成活性は、lysoPS非添加の場合に比べてlysoPS $0.1 \mu\text{M}$ を添加した場合は1.1倍、lysoPS $0.3 \mu\text{M}$ を添加した場合は1.2倍、lysoPS $1 \mu\text{M}$ を添加した場合は2.0倍、lysoPS $3 \mu\text{M}$ を添加した場

合は3.2倍にそれぞれ上昇した。これによりlysoPS濃度依存的にヒトGPR34発現CHO細胞のDNA合成活性が増大することがわかった。

実施例 8

5 LysoPS依存的エイコサノイド産生促進活性の測定

米国National Institute of Healthから入手したヒト肥満細胞株LAD2細胞を抗DNP IgE（ヤマサ、 $1\mu\text{g/ml}$ ）を用いて一晩受動感作後、洗浄し、反応液中の最終細胞濃度が100,000 cells/well になるように96 穴プレートに撚いた。LysoPSとDNP-BSAでLAD2細胞を刺激し、20分後にプレートを遠心し、反応液上清のロイコトリエンを、ロイコトリエンEIAキット（アマシャム）で測定した。

LysoPSが存在しない場合、300ng/ml のDNP-BSA刺激によるLAD 2 細胞のロイコトリエン産生は218 pg/ml であった。300ng/ml のDNP-BSA刺激にlysoPSを $0.1\mu\text{M}$ 同時添加するとロイコトリエン産生は382 pg/ml、
15 lysoPSを $0.3\mu\text{M}$ 同時添加すると529pg/ml、 lysoPSを $1\mu\text{M}$ 同時添加すると638 pg/ml、 lysoPSを $3\mu\text{M}$ 同時添加すると750pg/ml、 lysoPSを $10\mu\text{M}$ 同時添加すると 792 pg/mlであった。

これより、lysoPSの濃度依存的にエイコサノイド産生促進が増強されることがわかった。

20

実施例 9

ヒト各部位でのヒトGPR34遺伝子の発現分布および発現量の定量

ヒトcDNAパネルはクロンテック社から購入した。また、米国National Institute of Healthから入手したヒト肥満細胞株 LAD 2 細胞からRNeasy
25 およびDNase I セット（キアゲン社）を用いてtotal RNA画分を調製した。Total RNA $1\mu\text{g}$ を鋳型に、SuperScript II reversetranscriptase（インビトロジェン社）を用い、添付のマニュアルにしたがってランダムプライマーを用いて逆転写を行ない、cDNAを作製した。得られたtotal RNA 25 ng相当の逆転写産物または後述の作製した標準cDNA、1 x Universsal PCR

Master Mix (アプライドバイオシステムズ社)、プライマー1 (配列番号 : 4 1) およびプライマー2 (配列番号 : 4 2) 各100 nM、およびTaqManプローブ (配列番号 : 4 3) 100 nMを含む反応混合液25 μ lについてABI PRISM 7700 Sequence Detector (アプライドバイオシステムズ社) を用いてPCR
5 を行なった。PCRは、50℃・2分、95℃・10分で処理後、95℃・15秒、60℃・60秒のサイクルを40回繰り返すことにより行なった。

標準cDNAは、参考例1に記載した方法で調製したヒトGPR34の全長を含むプラスミドpAKK0-hGPR34 50 pgを鋳型に、プライマー1 (配列番号 : 4 1) およびプライマー2 (配列番号 : 4 2) を用いて200 μ lの液量で PCR
10 反応を行ない作製した。組成は、プライマー1およびプライマー2、0.5 μ M、2.5 mM MgCl₂、dNTP 0.2 mM、AmpliTaq Gold (アプライドバイオシステムズ社) 1/100 volume、10倍濃縮AmpliTaq Gold Buffer 1/10 volumeで行った。反応は、95℃で10分保温した後、95℃・15秒、60℃・15秒、72℃・10秒のサイクルを40回繰り返した。反応液から増幅産物を精製し、260 nm
15 の吸光度を測定して濃度を算出して正確なコピー数を算出した後、蒸留水で希釈し、1コピーから1x10⁷コピーの標準cDNA溶液を調製した。また、TaqMan PCR用プローブおよびプライマーはPrimer Express (Version1.0) (アプライドバイオシステムズ社) により設計した。

発現量はABI PRISM 7700 SDSソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、
20 また標準cDNAの初期濃度の対数値を横軸にとって標準曲線を作成した。標準曲線より各逆転写産物の初期濃度を算出し、各部位のtotal RNA 25 ng当たりのヒトGPR34遺伝子発現量を求めた。さらに各々のサンプルのヒトGAPDH遺伝子発現量をhuman GAPDH 測定キット (アプライドバイオシステムズ社) を用いてヒトGPR34遺伝子発現量の解析と同様にしてTaqMan PCR
25 法により求め、ヒトGPR34遺伝子発現量の補正を行なった。

その結果、ヒトGAPDH遺伝子に対するヒトGPR34遺伝子の発現量は、全脳 0.8%、心臓 0.31%、腎臓 0.33%、肝臓 0.59%、肺 1.32%、膵臓 0.88%、胎盤 5.05%、骨格筋 0.01%、脾臓 3.61%、胸腺 2.69%、前立腺 0.57%、

精巣 0.56%, 卵巣 1.86%, 小腸 0.75%, 大腸 0.54%, 白血球 0.58%, 肥満細胞株 LAD 2 細胞 14.1%であった。

以上より、ヒトGPR34遺伝子は、ヒト肥満細胞株において特に多く発現していることがわかった。

5

実施例 10

LysoPSのヒトGPR34発現CHO細胞に対するMAPK活性化作用

参考例 1 に記載した方法と同様に作製したヒト由来GPR34発現CHO細胞に対するリゾホスファチジルセリン（以下、lysoPS）のMAPK活性化作用を、以下のようにして検出した。

細胞の調製は以下のように行った。ヒトGPR34発現CHO細胞を0.05% Trypsin-EDTA (GIBCO) で剥がし、培地 (MEM- α (GIBCO), 10% FBS (GIBCO), ペニシリン/ストレプトマイシン (BIOWHITTAKER)) で懸濁して遠心分離後、沈殿した細胞を培地で 2×10^5 cells/ml に懸濁して1mLずつ35mmの細胞培養用ディッシュに播いた。一晩CO₂インキュベーター内で培養後、培地をアスピレーションしPBSで洗浄後、無血清培地 (MEM- α (GIBCO), ペニシリン/ストレプトマイシン (BIOWHITTAKER)) を1mL添加し、CO₂インキュベーター内で培養した。百日咳毒素 (pertussis toxin; 以下、PTX) は最終濃度が0.1 μ g/mL になるようにアッセイの20時間前に添加した。

細胞の活性化は以下のように行った。培地をアスピレーションしPBSで洗浄後、アッセイバッファー (HBSS (GIBCO), 10mM HEPES (同仁化学研究所)) を500 μ L添加し、15分間37℃でプレインキュベーションした。LysoPS溶液およびポジティブコントロールである β ECGF (β -endothelial cell growth factor)溶液を500 μ L添加し、37℃でインキュベーションした後、急冷により反応を停止させた。アッセイバッファーをアスピレーションしPBSで洗浄後、1×SDSサンプルバッファー/DTTを細胞に添加して回収し、15秒間超音波処理後、95℃で5分間加熱し急冷させた。

SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングによる検出は以下のように行った。10% Bis-Tris gel (Invitrogen) を用いて分離後、Immune-Blot PVDF

Membrane (BIO-RAD) に転写させた。メンブレンをBlock Ace (大日本製薬) でブロッキングし、一次抗体 (Phospho-p42/p44 MAP Kinase (Thr202/Thr204) Antibody (CST) または p42/p44 MAP Kinase Antibody (CST)) を用いて室温において1時間インキュベーションした後、
5 二次抗体 (Anti-rabbit IgG (CST)) を用いて室温において1時間インキュベーションした。抗体反応後のメンブレンを、ECL PLUS (Amersham Biosciences) で化学発光させ、LAS1000 (FUJI FILM) を用いて検出および画像解析を行った。

その結果、ヒトGPR34発現CHO細胞を、lysoPSで刺激すると、lysoPS濃度依存的にERK1/2 (p42/p44 MAP Kinase) のリン酸化が認められた。一方、ヒトGPR7発現CHO細胞をlysoPSで刺激した場合は、ERK1/2 (p42/p44 MAP Kinase) のリン酸化は検出されなかった (図6)。ヒトGPR34発現CHO細胞のlysoPSによるERK1/2 ERK1/2 (p42/p44 MAP Kinase) のリン酸化は、刺激後5分前後で最大反応を示し、刺激後30分においてもリン酸化は認め
10 られた (図7)。また、ヒトGPR34発現CHO細胞のlysoPSによるERK1/2 (p42/p44 MAP Kinase) のリン酸化は、PTXを前処理することにより検出限界以下に減弱した (図8)。

実施例 1 1

20 LysoPSのマウス骨髄由来肥満細胞に対するMAPK活性化作用

マウス骨髄肥満細胞 (以下、BMSC) に対する lysoPS の MAPK 活性化作用を以下のようにして検出した。

BMSCは、オスのBALB/cマウス (日本エスエルシー) の大腿骨から骨髄液を採取してRPMI1640 (日研生物医学研究所) で洗浄後、培地 (RPMI1640, 50% WEHI-3培養上清, 10% FBS (GIBCO), ペニシリン/ストレプトマイシン (BIOWHITTAKER), Non-Essential amino acids (GIBCO)) で4週間培養することにより樹立し、アッセイ直前までCO₂インキュベーター内で培養した。
25 百日咳毒素 (pertussis toxin; 以下、PTX) を最終濃度が0.1 μg/mLとなるようにアッセイの4時間前に添加した。BMSCを、氷冷したアッセイバッフ

ァー (Tyrode Buffer, 0.01% fatty acid free-BSA (SIGMA), 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂) で洗浄後、2 x 10⁶ cells/mlに懸濁して1.5mLチューブに分注し、15分間、37℃でプレインキュベーションした。LysoPS溶液およびポジティブコントロールであるA23187溶液 (和光純薬) を等量添加し、37℃で
5 インキュベーションした後、急冷により反応を停止させた。遠心により細胞を沈殿させてアッセイバッファーをアスピレーションし、PBSで洗浄後、1×SDSサンプルバッファー/DTTを細胞に添加して細胞を溶解させ、サンプルを15秒間超音波処理後、95℃で5分間加熱し急冷させた。

SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングによる検出は以下のように
10 行った。10% Bis-Tris gel (Invitrogen) を用いて分離後、Immune-Blot PVDF Membrane (BIO-RAD) に転写させた。メンブレンをBlock Ace (大日本製薬) でブロッキングし、一次抗体 (Phospho-p42/p44 MAP
Kinase (Thr202/Thr204) Antibody (CST) またはp42/p44 MAP Kinase
Antibody (CST)) を用いて4℃において一晩インキュベーションした後、二
15 次抗体 (Anti-rabbit IgG (CST)) を用いて室温において1時間インキュベーションした。抗体反応後のメンブレンを、ECL PLUS (Amersham
Biosciences) で化学発光させ、LAS1000 (FUJI FILM) を用いて検出および画像解析を行った。

その結果、BMMCをlysoPSで刺激すると、lysoPS濃度依存的にERK1/2
20 (p42/p44 MAP Kinase) のリン酸化が認められた〔図9〕。BMMCのlysoPSによるERK1/2 (p42/p44 MAP Kinase) のリン酸化は、刺激後2分前後で最大反応を示し、刺激後30分においてもリン酸化は認められた〔図10〕。また、BMMCのlysoPSによるERK1/2 (p42/p44 MAP Kinase) のリン酸化は、PTXを前処理することにより検出限界以下に減弱した〔図11〕。

25

実施例 1 2

LysoPSのラット腹腔由来肥満細胞に対するMAPK活性化作用

実施例 1 に記載した方法と同様に採取したラット腹腔由来肥満細胞 (以下、RPMC) に対するlysoPSのMAPK活性化作用を以下のようにして検

出した。

百日咳毒素 (pertussis toxin; 以下、PTX) を最終濃度が $0.1 \mu\text{g/mL}$ となるようにアッセイの4時間前に添加した。RPMCを、氷冷したアッセイバッファー (Tyrode Buffer, 0.01% fatty acid free-BSA (SIGMA), 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2) で洗浄後、 $2 \times 10^6 \text{cells/mL}$ に懸濁して1.5mLチューブに分注し、15分間、 37°C でプレインキュベーションした。LysoPS溶液を等量添加し、 37°C でインキュベーションした後、急冷により反応を停止させた。遠心により細胞を沈殿させてアッセイバッファーをアスピレーションし、PBSで洗浄後、 $1 \times \text{SDS}$ サンプルバッファー/DTTを細胞に添加して細胞を溶解させ、15秒間超音波処理後、 95°C で5分間加熱し急冷させた。

SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングによる検出は以下のように行った。 10% Bis-Tris gel (Invitrogen) を用いて分離後、Immune-Blot PVDF Membrane (BIO-RAD) に転写させた。メンブレンをBlock Ace (大日本製薬) でブロッキングし、一次抗体 (Phospho-p42/p44 MAP Kinase (Thr202/Thr204) Antibody (CST) あるいはp42/p44 MAP Kinase Antibody (CST)) を用いて4度において一晩インキュベーションした後、二次抗体 (Anti-rabbit IgG (CST)) を用いて室温において1時間インキュベーションした。抗体反応後のメンブレンを、ECL PLUS (Amersham Biosciences) で化学発光させ、LAS1000 (FUJI FILM) を用いて検出および画像解析を行った。

その結果、RPMCをlysoPSで刺激すると、lysoPS濃度依存的にERK1/2 (p42/p44 MAP Kinase) のリン酸化が認められた。また、RPMCのlysoPSによるERK1/2 (p42/p44 MAP Kinase) のリン酸化は、PTXを前処理することにより検出限界以下に減弱した〔図12〕。

参考例 1

(1-1) ヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34をコードするcDNAのクローニングおよび動物細胞発現ベクターの作製

ヒトゲノム (クロンテック社) を鋳型とし、SalI認識配列を付加した

プライマー 1（配列番号：3）およびSpeI認識配列を付加したプライマー 2（配列番号：4）を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記ゲノム100ngを鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase（STRATAGENE社）2.5U、プライマー 1（配列番号：3）およびプライマー 2（配列番号：4）を各1.0 μ M、dNTPsを200 μ M、および酵素に2XGC Buffer I（TaKaRa社）を25 μ l加え、50 μ lの液量とした。PCR反応は、94℃・1分の後、94℃・30秒、54℃・15秒、72℃・1.5分のサイクルを38回繰り返した。該PCR反応産物をPCR Purification Kit（QIAGEN社）にて精製し、同キットに添付のBuffer EB 30 μ lにて溶出を行い、そのうち10 μ lを制限酵素SalI およびSpeIで切断した。次に制限酵素反応産物をアガロースゲル電気泳動後、アガロースゲルより切り出し、Gel Extraction Kit（QIAGEN社）を用いて回収した。この反応産物をSalIおよびSpeIで切断した動物細胞発現用ベクタープラスミドpAKK0-111H（Biochim. Biophys. Acta, 1219巻、251-259頁、1994年記載のpAKK01.11Hと同一のベクタープラスミド）に加え、DNA Ligation Kit Ver. 2（TaKaRa社）を用いてライゲーション反応を行なった。これを大腸菌TOP10（Invitrogen社）に導入し、GPR34のcDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、GPR34（配列番号：1）をコードするcDNAの塩基配列（配列番号：2）を含むプラスミド（pAKK0-GPR34と命名）を保持する大腸菌を得た。このpAKK0-GPR34で形質転換した大腸菌TOP10を培養後、Plasmid Miniprep Kit（BIORAD社）を用いてpAKK0-GPR34のプラスミドDNAを調製した。得られたGPR34のアミノ酸配列は、Genomics、56巻、12-21頁、1999年に記載されているGPR34のアミノ酸配列と同一で、アミノ酸配列の181番目はLeuであった。Biochim. Biophys. Acta、1446巻、57-70頁、1999年に記載されているGPR34のアミノ酸配列の181番目はValである。

（1-2）GPR34発現CHO細胞株の作製

ハムスターCHO/dhfr⁻細胞を10%ウシ胎児血清を含む α -MEM培地（GIBCO社 Cat. No. 12571）を用いファルコンディッシュ（直径3.5cm）に 1×10^5

個播種し、5% CO₂ インキュベーターで37℃にて一晩培養した。上記（1 - 1）で得られた発現プラスミド pAKK0-GPR34 2 μg を Transfection Reagent FuGENE6（Roche社）を用い、添付説明書記載の方法に従ってトランスフェクトし、18時間培養後新鮮な増殖培地に交換した。さらに10時間培養
5 を続けたのち、トランスフェクトした細胞をトリプシン-EDTA処理により集め、選択培地（10% 透析牛胎児血清を含む α-MEM 培地（GIBCO社 Cat. No. 12561））を用いて平底96穴プレートに播種した。3~4日ごとに選択培地を交換しながら培養を続け、2~3週間後にコロニー状に増殖してきた DHFR⁺ 細胞クローンを76個取得した。

10 （1 - 3） TaqMan PCR法を用いたGPR34発現CHO細胞株のGPR34発現量の定量

上記（1 - 2）で得たGPR34発現CHO細胞株76クローンを、96ウェルプレートにて培養し、RNeasy 96 Kit（QIAGEN社）を用いてtotal RNAを調製した。得られたtotal RNA 1~200ngをTaqMan Reverse Transcription
15 Reagents（アプライドバイオシステムズ社）を用いて、逆転写反応を行った。得られたtotal RNA 0.1~20ng相当の逆転写産物、または逆転写反応を行っていないtotal RNA 0.1~20ng、または後に述べるようにして作製した標準cDNA、および2個のプライマー〔プライマー3（配列番号：5）およびプライマー4（配列番号：6）〕を各0.5 μM、およびプローブ
20 1（配列番号：7；5'端がFam（6-carboxy-fluorescein）により、3'端がTamra（6-carboxy-tetramethyl-rhodamine）によりそれぞれ標識されている）を0.1 μM、およびTaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社）25 μlを加え、50 μlの液量としPCR反応を行った。PCR反応は、ABI7700（アプライドバイオシステムズ社）を用いて50℃・2
25 分、95℃・10分の後、95℃・15秒、60℃・1分のサイクルを40回繰り返し行った。

標準cDNAは、上記（1 - 1）で得られたプラスミド pAKK0-GPR34の260nmの吸光度を測定して濃度を算出し、正確なコピー数を算出した後、1mM EDTA含む10mM Tris-HCl（pH8.0）溶液で希釈し、1コピーから1x10⁶コピー

の標準cDNA溶液を調製した。また、TaqMan PCR用プローブおよびプライマーはPrimer Express Ver. 1.0（アプライドバイオシステムズ社）により設計した。

発現量はABI PRISM 7700 SDSソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、標準cDNAの初期濃度の対数値を横軸にとり、標準曲線を作成した。標準曲線より各逆転写産物、および逆転写反応を行っていないtotal RNA中のコピー数を算出し、逆転写産物のPCR反応産物より得られた値から、逆転写反応を行っていないPCR反応産物より得られた値を差し引くことにより、各クローンのtotal RNA 1ng当たりのGPR34遺伝子の発現量を求めた。その結果、GPR34の発現が高かったCHO細胞株12個を選択し、24ウェルプレートに培養した。これらの細胞について、GPR34の発現量を再検した。RNeasy Mini Kit（QIAGEN社）を用いてtotal RNAを調製した後、上記と同様に逆転写反応を行い、TaqMan PCR法で各クローンのtotal RNA 1ng当たりのGPR34遺伝子の発現量を求めた。その結果、GPR34発現CHO細胞株クローン#1-5および#1-9が高い発現量を示すことがわかった。

以後の参考例では、これら2つのクローンの発現細胞を用いた。

(1-4) GPR34発現CHO細胞を用いた細胞内cAMP産生抑制活性の測定

上記(1-2)で作製し、上記(1-3)で選択したGPR34発現CHO細胞を24穴プレートに 6×10^4 cells/wellで播種し、48時間培養した。細胞を0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、0.05% BSAおよび20mM HEPESを含む α MEM培地（pH7.5）で洗浄した（以下、0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、0.05% BSAおよび20mM HEPESを含む α MEM培地（pH7.5）を反応用バッファーと記す）。その後、0.5mLの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温した。反応用バッファーを除き、新たに0.25mLの反応用バッファーを細胞に加えた後、試料と2 μ Mフォルスコリンを含む0.25mLの反応用バッファーを細胞に加え、37℃で30分間反応させた。反応液を除き、cAMP EIAキット（アプライドバイオシステム）付属の細胞溶解液を0.5mL添加して細胞内のcAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は同

キットを用いて定量した。この測定値をもとにしてcAMP産生抑制活性を以下に示した式で計算し、対照に対する百分率で表した。なお、試料添加群の活性はそれぞれ同一プレートに設置した対照の値を用いて算出した。

$$5 \quad \% \text{ of control} = (X - C) / (T - C) \times 100$$

X：試料添加群のcAMP量

T：試料無添加、フォルスコリン刺激群の3wellのcAMP量の平均値

C：試料無添加、フォルスコリン無刺激群の2wellのcAMP量の平均値

(1 - 5) リゾホスファチジルセリンおよびホスファチジルセリンの
10 GPR34発現CHO細胞に対するcAMP産生抑制活性

GPR34のアミノ酸配列は血小板活性化因子受容体あるいはウリジン二リン酸配糖体受容体のアミノ酸配列に低い相同性を示すことが知られている。そこで、これらのGPR34に相同性を示す受容体のリガンドである血小板活性化因子およびウリジン二リン酸配糖体を含めた種々の化合物を
15 GPR34発現CHO細胞に投与し、上記(1 - 4)に示す方法によりそれらの化合物のGPR34発現CHO細胞に対するcAMP産生抑制活性を調べた。

その結果、リゾホスファチジルセリン(Sigma, L 5772)およびより高い濃度においてホスファチジルセリン(Sigma, P 7769)の2つの化合物が顕著な活性を示した。また、その作用は、他の受容体発現細胞では認められず、受容体特異的であった。以上からGPR34はこれら2化合物をリ
20 ガンドとすることが結論された。図4に種々の濃度のリゾホスファチジルセリンおよびホスファチジルセリンをGPR34発現CHO細胞に投与したときのcAMP産生抑制活性を示す。

(1 - 6) GPR34とリゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリンとの結合性を変化させる化合物のスクリーニング
25

上記(1 - 2)で作製し、上記(1 - 3)で選択したGPR34発現CHO細胞を24穴プレートに 1×10^5 cells/wellで播種し、24時間培養した。細胞を0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、20mM HEPESを含む α MEM培地(pH7.5)で洗浄した(以下、0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、

20mM HEPESを含む α MEM培地 (pH7.5) を反应用バッファーと記す) 後、
0.5mLの反应用バッファーを加えて30分間培養器で保温した。反应用バッ
ファーを除き、新たに0.25mLの反应用バッファーを細胞に加えた後、(a)
1 μ Mのリゾホスファチジルセリンまたは10 μ Mのホスファチジルセリン
5 を添加した2.5 μ Mフォルスコリンを含む0.25mLの反应用バッファー、ま
たは (b) 1 μ Mのリゾホスファチジルセリンまたは10 μ Mのホスファチジ
ルセリンおよび試験化合物を添加した2.5 μ Mフォルスコリンを含む
0.25mLの反应用バッファーを細胞に加え、37℃で30分間反応した。反応
液を除き、cAMP EIAキット (アプライドバイオシステム) 付属の細胞溶
10 解液を0.5mL添加して細胞内のcAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は同キ
ットを用いて定量した。この測定値をもとにしてcAMP産生抑制活性を以
下に示した式で計算し、対照に対する百分率で表す。なお、試料添加群
の活性はそれぞれ同一プレートに設置した対照の値を用いて算出した。

$$\% \text{ of control} = (X - C) / (T - C) \times 100$$

15 X: 試料添加群のcAMP量

T: 試料無添加、フォルスコリン刺激群の3wellのcAMP量の平均値

C: 試料無添加、フォルスコリン無刺激群の2wellのcAMP量の平均値

リゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリンによるcAMP
P産生抑制活性に対する試験化合物の影響を、リゾホスファチジルセリ
ンまたはホスファチジルセリンを細胞に添加した時のcAMP産生抑制活性
20 と、リゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリンおよび試験
化合物を細胞に添加した時のcAMP産生抑制活性とを比較することによっ
て調べる。

リゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリンによるcAMP産
25 生抑制活性を減弱させる試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質と
して、また、リゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリンに
よるcAMP産生抑制活性を増強させる試験化合物を、結合力 (リゾホ
スファチジルセリンまたはホスファチジルセリンとGPR34との結
合) を促進する能力のある候補物質として選択する。

参考例 2

ラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34の一部をコードするcDNA断片のクローニング

- 5 ラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34の一部をコードするcDNAを取得するため、ヒトGPR34とマウスGPR34の共通配列に基づいてプライマー1（配列番号：8）およびプライマー2（配列番号：9）を設定してPCR反応を行なった。PCR反応の液量は20 μ lとし、組成は、鋳型としてラット全脳 Marathon ready cDNA（クロンテック社）
- 10 を1 μ l、プライマー各0.2 μ M、dNTP 0.2 mM、GC-Melt 0.5 M、Advantage-GC 2 Polymerase Mix（クロンテック社）1/50 volumeおよび5倍濃縮Buffer 1/5 volumeとした。増幅のためのサイクルは、96℃で2分保温した後、96℃・30秒、54℃・30秒、72℃・1分のサイクルを35回繰り返した後、72℃で10分保温した。得られた反応液をTOP0 TA cloning kit（インビトロジェン
- 15 社）を用いてプラスミドベクターpCR2.1-TOP0へサブクローニングし、大腸菌DH5 α -T1へ導入した。生じた形質転換体からQIAwell 8 Ultra Plasmid Kit（キアゲン社）を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit（パーキンエルマー社）を用いて行なった。蛍光式自動シーケンサーを
- 20 用いて解読した結果、ラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34の一部をコードするcDNA断片の配列である配列番号：10に示す塩基配列が得られた。

参考例 3

- 25 3' RACE法によるラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34をコードするcDNAの3'側部分配列のクローニング

3' RACE用の鋳型はラット全脳 Marathon ready cDNA（クロンテック社）を用いた。RACE PCR反応に用いたプライマーセットは、1回目のPCR反応ではキットに添付のアダプタープライマー1とプライマー1（配列番

号：11）、2回目のPCR反応ではキットに添付のアダプタープライマー2とプライマー2（配列番号：12）を用いた。1回目のPCR反応では、PCR反応の液量は50 μ lとし、組成は鋳型のcDNAを5 μ l、プライマー各0.2 μ M、dNTP 0.2 mM、Advantage2 Polymerase Mix（クロンテック社）1/50 volume、10倍濃縮Buffer 1/10 volumeとした。増幅のためのサイクルは94℃で2分保温した後、94℃・30秒、68℃・2分のサイクルを30回繰り返した後、72℃で10分保温した。2回目のPCR反応では、PCR反応の液量は50 μ lとし、組成は鋳型として1回目のPCR反応液の10倍希釈液を5 μ l、プライマー各0.2 μ M、dNTP 0.2 mM、Advantage2 Polymerase Mix 1/50 volume、10倍濃縮Buffer 1/10 volumeとした。増幅のためのサイクルは94℃で2分保温した後、94℃・30秒、69℃・2分のサイクルを20回繰り返した後、72℃で10分保温した。反応物を0.8% Seakem LE Agarose（宝酒造）で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した時に見える800 bp付近のバンドをQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社）で抽出し、TOPO TA cloning kit（インビトロジェン社）を用いてプラスミドベクターpCR2.1-TOPOへサブクローニングし、大腸菌DH5 α -T1へ導入した。生じた形質転換体からQIAwell 8 Ultra Plasmid Kit（キアゲン社）を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit（パーキンエルマー社）を用いて行なった。蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した結果、ラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34をコードするcDNAの3'側部分配列である配列番号：13で表される塩基配列が得られた。

参考例 4

25 5' RACE法によるラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34をコードするcDNAの3'側部分配列のクローニング

5' RACE用の鋳型はラット脾臓 Marathon ready cDNA（クロンテック社）を用いた。RACE PCR反応に用いたプライマーセットは、1回目のPCR反応ではキットに添付のアダプタープライマー1およびプライマー1（配列

番号：14)を、2回目のPCR反応ではキットに添付のアダプタープライマー2およびプライマー2（配列番号：15）をそれぞれ用いた。1回目のPCR反応では、PCR反応の液量は50 μ lとし、組成は鋳型のcDNAを5 μ l、プライマー各0.2 μ M、dNTP 0.2 mM、Advantage2 Polymerase Mix（クロンテック社）1/50 volume、10倍濃縮Buffer 1/10 volumeとした。増幅のためのサイクルは94℃で30秒保温した後、94℃・5秒、72℃・3分のサイクルを5回、94℃・5秒、70℃・3分のサイクルを5回、94℃・5秒、68℃・3分のサイクルを25回繰り返した後、72℃で10分保温した。2回目のPCR反応では、PCR反応の液量は50 μ lとし、組成は鋳型として1回目のPCR反応液の10倍希釈液を5 μ l、プライマー各0.2 μ M、dNTP 0.2 mM、Advantage2 Polymerase Mix 1/50 volume、10倍濃縮Buffer 1/10 volumeとした。増幅のためのサイクルは94℃で2分保温した後、94℃・30秒、69℃・2分のサイクルを30回繰り返した後、72℃で10分保温した。得られた反応液をTOP0 TA cloning kit（インビトロジェン社）を用いてプラスミドベクターpCR2.1-TOP0へサブクローニングし、大腸菌DH5 α -T1へ導入した。生じた形質転換体からQIAwell 8 Ultra Plasmid Kit（キアゲン社）を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit（パーキンエルマー社）を用いて行なった。蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した結果、ラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34をコードするcDNAの5'側部分配列である配列番号：16で表される塩基配列が得られた。

参考例 5

ラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34をコードするcDNAの全長配列のクローニング

5'および3'RACE法の結果から予想されるラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34をコードするcDNAの全長を含む配列を得るためプライマー1（配列番号：17）およびプライマー2（配列番号：18）を設定してPCR反応を行なった。PCR反応の液量は50 μ lとし、組成は、

鑄型としてラット脾臓 Marathon ready cDNA (クロンテック社) を $3\mu\text{l}$ 、
プライマー各 $0.2\mu\text{M}$ 、dNTP 0.2 mM 、GC-Melt 0.5 M 、Advantage-GC 2
Polymerase Mix (クロンテック社) $1/50\text{ volume}$ および5倍濃縮Buffer $1/5$
volumeとした。増幅のためのサイクルは、 96°C で2分保温した後、 96°C ・
5 30秒 、 54°C ・ 30秒 、 72°C ・ 60秒 のサイクルを35回繰り返した後、 72°C で
10分保温した。得られた反応液をTOP0 TA cloning kit (インビトロジェ
ン社) を用いてプラスミドベクターpCR2.1-TOP0へサブクローニングし、
大腸菌DH5 α -T1へ導入した。生じた形質転換体からQIAwell 8 Ultra
Plasmid Kit (キアゲン社) を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配
10 列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequence Ready
Reaction Kit (パーキンエルマー社) を用いて行なった。蛍光式自動シ
ーケンサーを用いて解読した結果、配列番号：21に示す塩基配列が得
られた。この配列にはラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR
R34の全アミノ酸配列 (配列番号：19) をコードするcDNAの塩基配
15 列 (配列番号：20) が含まれていた。このプラスミドを用いて大腸菌
DH5 α -T1を形質転換し、Escherichia coli
DH5 α -T1/pCR2.1-TOP0-ratGPR34を得た。

参考例 6

20 リゾホスファチジルセリンによるヒト由来GPR34発現CHO細胞の遊走刺
激活性

参考例1に記載した方法と同様に作製したヒト由来GPR34発現C
HO細胞に対するリゾホスファチジルセリンの遊走刺激活性を以下のよ
うにして測定した。

25 遊走アッセイは96穴ケモタキシスチャンバー (Neuro Probe) を用いて
行った。ポアサイズ $5\mu\text{m}$ のポリカーボネートフレームフィルター (Neuro
Probe) をPBSで希釈した $10\mu\text{g/ml}$ のウシフィブロネクチン (ヤガイ中央
研究所) 溶液に室温で10分間浸漬した後、風乾することにより前処理を
施した。ヒトGPR34発現CHO細胞をTrypsin-EDTA (GIBCO) で剥が

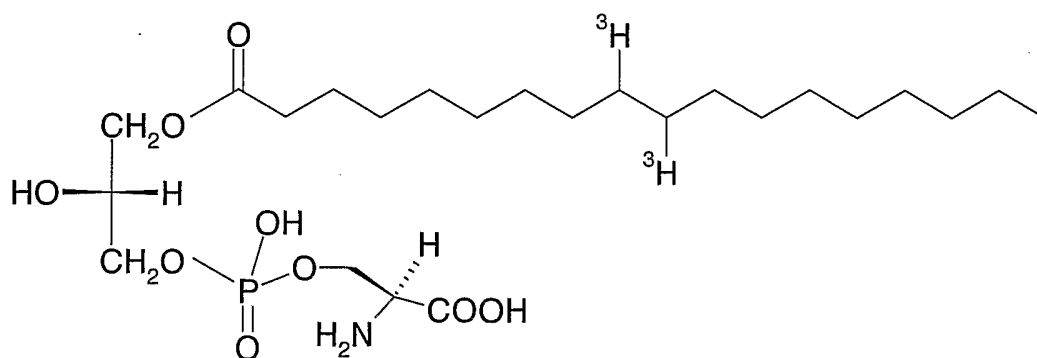
し、DMEM(日研生物医学研究所)にて置換および再懸濁し、 1×10^6 cells/ml
 の細胞浮遊液を調製した。96穴ケモタキシスチャンバーの下室に、DMEM
 に溶解した $37 \mu\text{l}$ の種々の濃度のリゾホスファチジルセリン溶液を添加
 し、上室には、 1×10^6 cells/mlに調製したヒト由来GPR34発現CHO
 5 O細胞浮遊液を1 wellあたり $200 \mu\text{l}$ (2×10^5 cells/well) 添加した。 CO_2
 インキュベーター内で5時間インキュベーションした後、遊走しなかった
 フィルター上面の細胞をキムワイプ(クレシア)で拭いとり、フィルタ
 ー下面に遊走したCHO細胞をDiff-Quick(国際試薬)で固定染色し、
 プレートリーダーで595 nmの吸光度を測定した。

10 図5に、ヒト由来GPR34発現CHO細胞に対する0、0.3、1、3 お
 よび $10 \mu\text{M}$ でのリゾホスファチジルセリンの遊走刺激活性を595 nmの吸光
 度として示す。

これより、ヒト由来GPR34発現CHO細胞は、リゾホスファチジ
 ルセリンに応答して遊走活性を示すことが明らかである。遊走活性は
 15 $1 \mu\text{M}$ から確認され、リゾホスファチジルセリンの濃度依存的に増大し、
 $10 \mu\text{M}$ で最大遊走活性を示した。遊走活性の EC_{50} 値は、約 $2.5 \mu\text{M}$ であった。

参考例 7

(7-1) 1-[9, 10- $^3\text{H}_2$]-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリ
 20 ン(1-[9, 10- $^3\text{H}_2$]-ステアロイル-リゾホスファチジルセリン)の合成



リゾホスファチジルセリンおよびGPR34発現CHO細胞膜画分を
 用いた結合実験を参考するために ^3H 標識したリゾホスファチジルセリン

を以下のようにして合成した。

初めに、接触還元によって ^3H 標識するため、二重結合を有する1-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン（1-オレオイル-リゾホスファチジルセリン）を合成した。

- 5 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリンナトリウム塩（シグマ、P1060）（85 mg）を、蒸留水（25 ml）に溶解し、200 mM トリスー塩酸緩衝液（pH8.0）（1.5 ml）および100 mM 塩化カルシウム（1.5ml）を添加し、さらにホスホリパーゼA 2（0.3 ml）（10mg/ml、5 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0））を添加した。室温で20時間反応させ、5 M 塩
- 10 酸を用いてpHを2から3にして反応を終了させた。反応液を濃縮乾固した後、クロロホルム-メタノール混合溶媒に溶解してシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させた。クロロホルム-メタノール混合溶媒にて溶出し、1-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリンを得た。ついで、公知の方法（例えば、R. F. Glascock, Isotopic Gas Analysis for
- 15 Biochemists, 227頁、Academic Press, New York, 1954年、に記載の方法）に従い、1-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリンをパラジウムの存在下にトリチウムガス（ $^3\text{H}_2$ ）によって接触還元して二重結合にトリチウムを導入し、目的物である1-[9, 10- $^3\text{H}_2$]-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリンを得た。

20 (7-2) ヒト由来GPR34発現CHO細胞膜画分の調製

- 参考例1に記載した方法に準じて作製したヒト由来GPR34発現CHO細胞を培養し、 1×10^8 個の細胞に10mlのホモジネートバッファー（10mM NaHCO_3 、5mM EDTA（エチレンジアミン四酢酸）、0.5mM PMSF（フェニルメタンスルホニルフルオリド）、 $1 \mu\text{g/ml}$ ペプスタチン、 $4 \mu\text{g/ml}$ E64、 $20 \mu\text{g/ml}$
- 25 ロイペプチン）を添加し、ポリトロン（12,000rpm、1分間）を用いて破碎する。細胞破碎液を遠心（1,000g、15分間）して上清を得る。次にこの上清を超遠心分離（Beckman type 30ローター、30,000rpm、1時間）し、ヒト由来GPR34発現CHO細胞膜画分を沈殿物として得る。

(7-3) 1-[9, 10- $^3\text{H}_2$]-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン

(以下、 $[^3\text{H}]$ -lysoPSと略記する) およびヒト由来GPR34発現CHO細胞膜画分とを用いた受容体結合実験

上記(7-2)で調製された細胞膜画分を、アッセイ用バッファー(25mM Tris-HCl、5mM EDTA、0.05% CHAPS (3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン硫酸)、0.1% BSA、0.5mM PMSF、 $1\mu\text{g/ml}$ ペプスタチン、 $20\mu\text{g/ml}$ ロイペプチン、 $4\mu\text{g/ml}$ E-64、pH7.4) で各種濃度に希釈後、ポリプロピレン製試験管 (Falcon 2053) に $200\mu\text{l}$ ずつ分注する。最大結合量を測定するために $2\mu\text{l}$ のDMSOと80nMの $[^3\text{H}]$ -lysoPS $2\mu\text{l}$ を膜画分溶液に添加する。また、非特異的結合を測定するために10mMリゾホスファチジルセリンのDMSO溶液 $2\mu\text{l}$ と80nMの $[^3\text{H}]$ -lysoPS $2\mu\text{l}$ を膜画分溶液に添加する。25℃で75分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマングラスフィルター (GF-F) を用いて反応液を吸引ろ過し、さらにフィルターを洗浄用バッファー (25mM Tris-HCl、5mM EDTA、0.05% CHAPS、0.1% BSA、pH7.4) 1.5ml で2回洗浄する。ろ過後、シンチレーションカウンターを用いてろ紙上に残った放射活性を測定し、最大結合量を与える放射活性 (TB) から非特異的結合量を与える放射活性を減じて特異的結合量 (SB) を見積る。

(7-4) 受容体結合実験によるGPR34とリゾホスファチジルセリンとの結合性を変化させる化合物のスクリーニング

上記(7-3)において、 $2\mu\text{l}$ の試験化合物のDMSO溶液と80nMの $[^3\text{H}]$ -lysoPS $2\mu\text{l}$ を膜画分溶液に添加し、25℃で75分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマングラスフィルター (GF-F) を用いて反応液を吸引ろ過し、さらにフィルターを洗浄用バッファー (25mM Tris-HCl、5mM EDTA、0.05% CHAPS、0.1% BSA、pH7.4) 1.5ml で2回洗浄する。ろ過後、シンチレーションカウンターを用いてろ紙上に残った放射活性を測定する。この放射活性をXとすると試験化合物の結合阻害活性は、 $(\text{TB}-\text{X})/\text{SB} \times 100 (\%)$ として表される。

結合阻害活性を示した試験化合物について、種々の濃度に調製した試験化合物を用いて結合阻害活性を測定し、50%阻害濃度 (IC_{50} 値) を求め

ることができる。より低い IC_{50} 値を与える化合物をGPR34とリゾホスファチジルセリンとの結合をより強く阻害する化合物として選択する。

一方、結合阻害活性の値として負の値が得られる化合物をGPR34とリゾホスファチジルセリンとの結合を促進する化合物として選択する。

5

実施例 1 3

(1) ラット脳・脊髄組織切片におけるGPR34遺伝子の発現細胞の同定

ラット中枢における発現解析を行うためにGPR34 cRNA probeと脳・脊髄の凍結切片を作製し、*in situ* Hybridization (ISH) 解析を行った。まず、次のようにGPR34 cRNA probeを作製した。Full length rat GPR34をDual promotorを持つPlasmid (pGEM-9Zf(-), Promega)にTAクローニングした。インサートはすべて逆向きに挿入されていることをチェックした。M13プライマーによりSp6/T7プロモーターを含むインサートをAdvantage cDNA PCR-Kit (クロンテック)を用いてPCR反応を行い、エタノール沈殿により精製した。このうち1 μ gを鋳型として*In vitro* transcription Kit (Roche)により逆転写反応を行い(40 μ lスケール、37 $^{\circ}$ C・2hr)、エタノール沈殿後100 μ lの蒸留水に溶解することによりcRNAプローブを得た。この場合、T7による逆転写物がAnti-Senseプローブ、Sp6による逆転写物がSenseプローブとした。凍結切片は次のように作製した。Wistar系雄性成熟ラットより脳・脊髄を摘出し、O.C.T.コンパウンド(SAKURA)中に液体窒素にて凍結包埋した。その後、MASコートスライド(松浪)上にクライオスタットCM3050(Leica)にて12 μ mの凍結切片を作製した。作製した凍結切片を4% PFAを含む1/15M Phosphate Buffer pH7.4(和光純薬)で室温10分固定した。PBSで3回洗浄した後、0.25% 無水酢酸(Acetic anhydride)を含む0.1M Triethanolamineに室温10分間浸漬した。PBSで3回洗浄した後、85度で10分変性後氷冷したProbe/Hybridization buffer(1/200)をTotal 60 μ l滴下し(パラフィルムでカバー)、50%ホルムアミドを敷いたモイスチャーチャンバー内にて60 $^{\circ}$ Cで一晩ハイブリダーゼーション反応を行った。引き続き、非特

10

15

20

25

異的にHybridizationしたプローブを洗浄するため以下の操作を行った。

- 1) 2×SSC (SSC; 1×SSC = 150mM NaCl, 15mMクエン酸ナトリウム, pH7.0)/50%ホルムアミド処理 (60℃・30分 1回)、 2) 2×SSC処理 (60℃・20分 1回)、 3) 0.1×SSC処理 (60℃・20分 2回)。以上の
- 5 操作を行った後、DIGラベルプローブを検出するための免疫組織化学を行った。まず、DIG-1 (100mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween20) で洗浄した後、1.5% Blocking reagent (Roche)を含む DIG-1による処理 (室温・1時間) にて非特異反応のブロッキングを行い、アルカリ・ホスファターゼと複合化された抗DIG fab断片抗体 (Anti-DIG fab-fragment
- 10 antibody conjugated with alkaline phosphatase: Roche)を含む DIG-1 (1:1000) を室温で1時間反応させた。DIG-1で十分洗浄した後、DIG-3 (100mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂) でリンスし、0.63 μg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) および 1.53 μg/ml 4-nitroblue tetrazolium (NBT)を含む3% Polyvinyl Alcohol (和光純
- 15 薬 #165-17915) / DIG-3によって、室温にて一晩発色反応を行った。適時に発色を流水洗浄により止めた後、90%Glycerol/PBSにて封入し、光学顕微鏡で観察した。

- その結果、脳・脊髄全体において散在する陽性シグナルが認められた。GPR34陽性細胞は散在具合が約50 μm間隔であり、また神経細胞が存在し
- 20 ない脳の分子層や脊髄の白質にも認められることからミクログリアである可能性が考えられた。

(2) ラット初代培養ミクログリア細胞 (PMGC) におけるGPR34遺伝子の発現解析

ラットPMGCの調製

- 25 Wistar rat新生仔 (生後1-2日) (日本チャールスリバー) を断頭し、摘出した脳について氷冷PBS (-) 中、実体顕微鏡下で髄膜を剥離した。脳をハサミでミンスし50mL falcon tube/PBS (-) (invitrogen 14190-144) に移し10mLピペットで塊が見えなくなるまでピペッティング後セルストレイナー (falcon 352360) でこした。遠心 (1000 rpm, 10min) を行った

後、上清を除去し、培養液を加え軽くピペティングした。培養液の組成はDMEM(invitrogen 11995-073)に penisilin-streptomycin(invitrogen)を1/100量、FCS(invitrogen 16140-071) 終濃度10%になるように加えた。75cm² pol-D-Lysin coat flask (falcon 356537) に2brain/20mL/faskで分注し37℃、5%CO₂インキュベーターで10-20日間培養した。約3日おきに培地交換を行った。10-20日後にフラスコを軽くたたき、遊離細胞を含んだ培養液を50mL falcon tubeに移し遠心 (1000 rpm, 10min) で回収 (3日おきに同様に再回収)。細胞数をカウントし24-well plate(falcon 353047)に 5E+5cells/wellでまいた。30min後に上清を除去し培養液を加える (接着性の高いマイクログリアを残す)。O/N培養培地で培養後、RNA抽出やアッセイに用いた。得られた細胞からRNeasy Mini Kit(キアゲン社)を用いて、添付のプロトコールに従ってtotal RNA を抽出した。得られたtotal RNAを、Ethachinmateを用いて、添付のプロトコールに従って濃縮し、RNase-free H₂Oに溶解した。次に、total RNA0.1μg分を用いて、SuperScript II Reversetranscriptase (インビトロジェン社)により、以下の方法で逆転写反応を行い、一本鎖cDNAを作成した。Total RNA溶液にrandom primer (インビトロジェン社) 0.05μg、RNase-free H₂Oを加えて全量を11μLとした後、70℃で10分間インキュベーションし、1分間氷冷した。

5×First-Strand Buffer (SuperScript II Reversetranscriptaseに添付) 4μL、10mM dNTP (インビトロジェン社) 1μL、0.1M DTT (SuperScript II Reversetranscriptaseに添付) 2μL、RNaseOUT (インビトロジェン社) 1μLおよびSuperScript II Reversetranscriptase 1μLを加えて、42℃で50分間インキュベーション後、70℃で15分間インキュベーションし、5分間氷冷した。このようにして得られたcDNAを、Ethachinmateを用いて、添付のプロトコールに従って精製し、Tris-EDTA Buffer(フルカ社)に溶解した。TaqMan PCRにはGPR34定量用のプライマー(配列番号: 37および38)とスタンダード(配列番号: 39)を用いた。TaqMan PCRは、それぞれのサンプルについてn=2で行い、1.25ng total RNAを鋳型に用いて

15 μ Lの液量で行った。反応液の組成は、プライマー 900nM、プローブ 250nM、TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社) 1/2 volumeとした。反応および解析はABI PRISM 7700 Sequence Detection System (アプライドバイオシステムズ社) により行った。反応
5 サイクルは、50℃で2分間保温し、次に95℃で10分間保温した後、95℃・15秒間 60℃・1分間のサイクルを40回行った。遺伝子発現量は、標準曲線のY-Slope値が38~42、Correlation Coeff値が0.995以上になるように解析を行い算出した。

その結果、25ng total RNAあたりのラットGPR34遺伝子の発現量は、全
10 脳で3990コピーであったのに対してPMGCでは74625コピーであった。この結果とISHの結果を合わせてGPR34は中枢では主にミクログリア細胞に発現していることが明らかになった。

実施例 1 4

15 LysoPS添加に対するミクログリア細胞の反応性

ラット初代培養ミクログリア細胞 (PMGC) のlysoPSに対する反応性をFLIPRを用いて調べた。PMGCは、特に記載が無い限り10% 牛胎児血清

(Invitrogen) を含むDMEM (Invitrogen) を用いて培養した。アッセイの前日に1日齢ラットの脳から調製したPMGCをBlack walled 96-well
20 plate (Costar) に1穴あたり 5.0×10^4 個の細胞を播き、5% CO₂濃度に調整された CO₂培養器にて37℃で一晩培養した。このPMGCにlysoPSを添加し、この際の細胞内カルシウム濃度の変動をFLIPR (Molecular Device) を用いて測定した。FLIPRにて細胞内カルシウム濃度の変動を測定するために、以下の前処置を施した。まず、細胞に蛍光色素Fluo-3AM (DOJIN) を添加
25 するため、あるいはFLIPRアッセイを行う直前に細胞を洗浄するためのアッセイバッファーを作成した。HBSS (Invitrogen) 1000mlに1M HEPES (pH7.4) (DOJIN) 20mlを加えた溶液 (以下、HBSS/HEPES溶液) に、プロベネシド (Sigma) 710mgを1N NaOH 5mlに溶解後さらにHBSS/HEPES溶液 5mlを加え混合した溶液10mlを添加し、この溶液をアッセイバッファーと

した。次にFluo-3AM 50 μ gを21 μ l DMSO (DOJIN) に溶解し、さらに等量の20% プルロン酸 (Molecular Device) を加え混合後、105 μ lの牛胎児血清を添加した10.6mlのアッセイバッファーに加え、蛍光色素溶液を調製した。トランスフェクション処理を施したPMGCの培地を除き、直ちに
5 蛍光色素溶液を96-well plateに1穴あたり100 μ lずつ分注後、CO₂培養器にて1時間培養し、細胞に蛍光色素を取り込ませた。培養後の細胞は上記のアッセイバッファーを用いて洗浄した後、FLIPRにセットした。また、PMGCに添加する試験サンプルはアッセイバッファーを用いて調製し、同時にFLIPRにセットした。以上の前処置を施した後、FLIPRにて各種試験
10 サンプル添加後の細胞内カルシウム濃度の変動を測定した。

その結果、lysoPSを0.2-10 μ M加えたときに、PMGCが濃度依存的に応答（細胞内カルシウム濃度の上昇）することを発見した。GPR34のアンタゴニストを加えた条件下では、このような応答は見られなかった。すなわち、PMGCにおいてlysoPSはGPR34を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させる作用を有することが明らかになった。また肥満細胞でも認められた
15 ERK1/2のリン酸化反応もPMGCで認められた。この結果よりlysoPS刺激によりミクログリア細胞の増殖・分化に関与する何らかの機能が活性化されていることが強く示唆される。

20 実施例 15

PMGCにおけるlysoPSの抗炎症作用

LysoPSがミクログリアの活性化に対しての作用を検討するためにIFN- α 存在下でLPS刺激により活性化したPMGCにおけるlysoPS添加による影響を調べた。前日に1日齢ラット脳から調製したPMGCを24-well
25 plate (falcon 353047) に一穴あたり50000個で播き、6時間後にIFN- α (1ng/ml, Biovision) を添加した。次の日にLPS刺激 (1 μ g/ml) 時にlysoPS (5 μ M) を添加、非添加でサイトカイン産生への影響を比較した。RNAはLPS+lysoPS (5 μ M) を添加、非添加後2, 8時間で実施例4と同様の方法で調製した。TaqManに用いたprimer, probeおよびstandardの配列情

報は上述のとおりである。サイトカイン産生はTaqMan PCRによりサイトカイン遺伝子の発現量の変化で比較した。

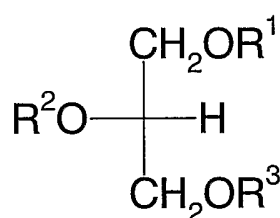
- その結果、添加2時間後に炎症性サイトカインのIL-6およびTNF- α の発現抑制傾向が認められたのに対し、抗炎症性サイトカインのIL-10については8時間後に発現上昇傾向が認められた。この傾向はINF- α (1ng/ml) と LPS (1 μ g/ml) を同時添加した場合のlysoPS (5 μ M) 添加、非添加でも同様であった。これらの結果より、lysoPSは抗炎症作用を持つことが示された。

産業上の利用可能性

- 10 本発明は、GPR34または肥満細胞とGPR34のリガンドとを用いるインターロイキン-13産生抑制剤などのスクリーニング方法およびスクリーニング用キット、該スクリーニング方法またはキットによって得られうるインターロイキン-13産生抑制剤などを提供する。本発明のスクリーニングによって得られうるIL-13産生阻害剤は、例えば、呼吸器疾患などの予防・治療剤などとして有用である。また、本発明は、GPR34または肥満細胞とGPR34のリガンドとを用いるエイコサノイド産生抑制剤、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤などのスクリーニング方法およびスクリーニング用キット、該スクリーニング方法またはキットによって得られうるエイコサノイド産生抑制剤、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤なども提供する。さらに、本発明は、ミクログリア細胞およびGPR34のリガンドを用いる、中枢疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法またはスクリーニング用キット、該スクリーニング方法またはキットによって得られうる中枢疾患の予防・治療剤なども提供する。

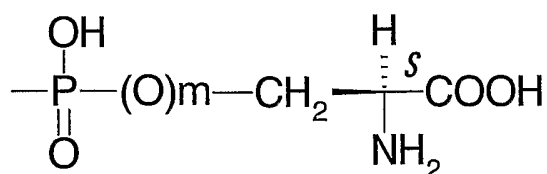
請求の範囲

1. (a) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたは
5 その塩および (b) 式



〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、

- 10 R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：



- (式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。) で表される基を示す。〕 で表される化合物またはその塩を用いることを特徴とする、IL-13産生抑制剤のスクリーニング方法。

2. 化合物が、リゾホスファチジル-L-セリンである請求項1記載のスクリーニング方法。

3. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質が、配列番号：19、配列番号：22、配列番号：31または配列番号：35で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質である請求項1記載のスクリーニング方法。

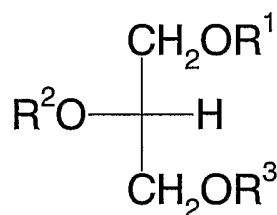
4. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質またはその

塩およびリゾホスファチジル-L-セリンを用いる請求項1記載のスクリーニング方法。

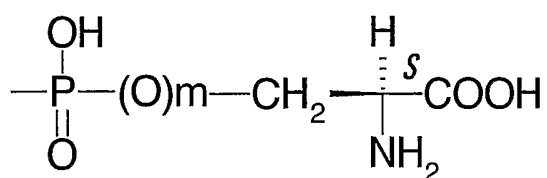
- 5 5. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を介した細胞刺激活性を測定し、指標とする請求項1～4記載のスクリーニング方法。

6. IL-13産生抑制剤が、免疫疾患、呼吸器疾患、泌尿器疾患または循環器疾患の予防・治療剤である請求項1記載のスクリーニング方法。

- 10 7. (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) 式



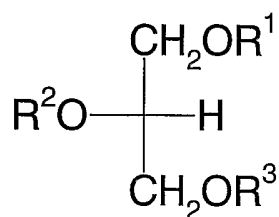
- 15 [式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、
 R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：



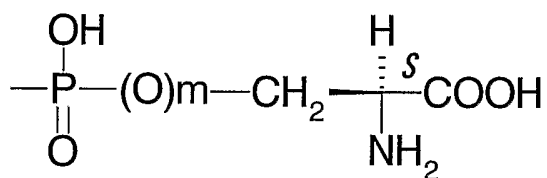
20

(式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。)で表される基を示す。]で表される化合物またはその塩を含有することを特徴とする、IL-13産生抑制剤のスクリーニング用キット。

8. 肥満細胞および式

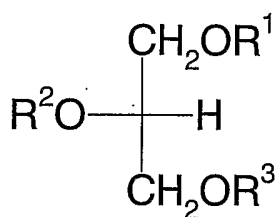


- 〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、
 5 R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：



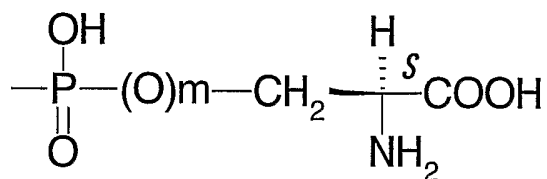
- 10 〔式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。〕で表される基を示す。〕で表される化合物またはその塩を用いることを特徴とする、IL-13産生抑制剤のスクリーニング方法。

9. 肥満細胞および式



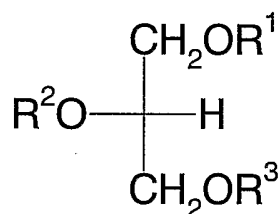
15

- 〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、
 R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：

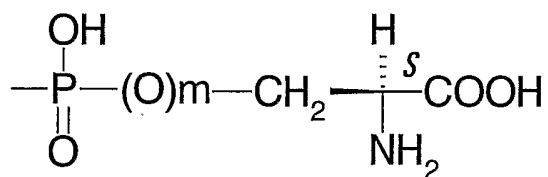


(式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。)で表される基を示す。]で表される化合物またはその塩を含有することを特徴とする、IL-13産生抑制剤のスクリーニング用キット。

- 5 10. (a) 配列番号: 1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、または (b) 式



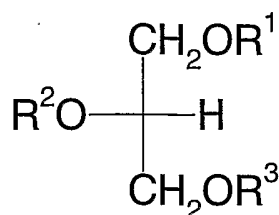
- 10 [式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、
 R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式:



15

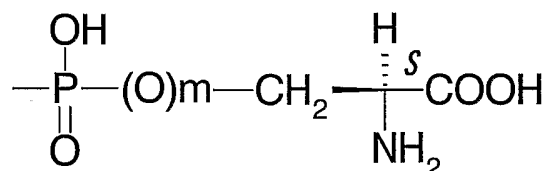
(式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。)で表される基を示す。]で表される化合物またはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなるIL-13産生抑制剤。

11. (a) 配列番号: 1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、または (b) 式
- 20



〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、

- 5 R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：



- 10 (式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。)で表される基を示す。〕で表される化合物またはその塩の活性を阻害することを特徴とするIL-13産生抑制方法。

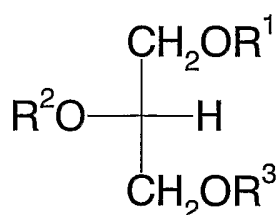
12. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなるIL-13産生抑制剤。

- 15 13. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチドを含有してなるIL-13産生抑制剤。

- 20 14. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに対するsiRNAまたはshRNAを含有してなるIL-13産生抑制剤。

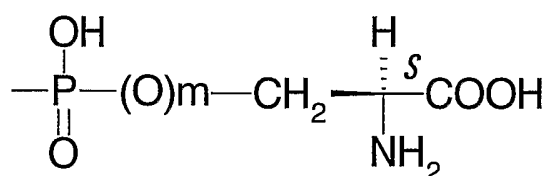
15. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストに対する抗体を含有してなる IL-13 産生抑制剤。

16. (a) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) 式



〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、

R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：



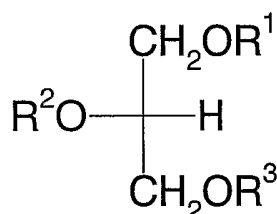
15. (式中、 m は 0 または 1 を、 S は絶対配置を示す。) で表される基を示す。〕で表される化合物またはその塩を用いることを特徴とする、エイコサノイド産生抑制剤のスクリーニング方法。

17. 化合物が、リゾホスファチジル-L-セリンである請求項 16 記載のスクリーニング方法。

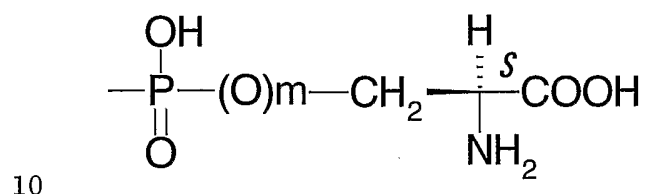
20. 18. エイコサノイド産生抑制剤が、免疫性疾患、炎症性疾患、呼吸器疾患、泌尿器疾患または循環器疾患の予防・治療剤である請求項 16 記載のスクリーニング方法。

19. (a) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質

的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) 式



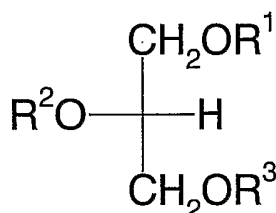
- 5 〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、
 R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：



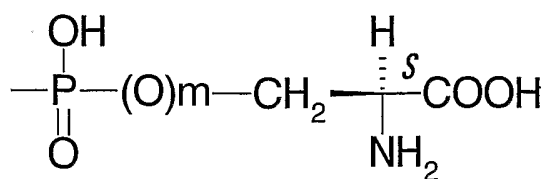
(式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。) で表される基を示す。〕 で表される化合物またはその塩を含有することを特徴とする、エイコサノイド産生抑制剤のスクリーニング用キット。

20. 肥満細胞および式

15

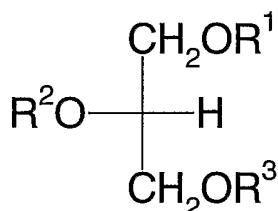


- 〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、
 R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、
 20 アシルまたは下式：

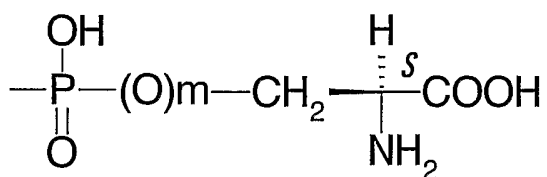


- (式中、mは0または1を、Sは絶対配置を示す。)で表される基を示す。)で表される化合物またはその塩を用いることを特徴とする、エイ
5 コサノイド産生抑制剤のスクリーニング方法。

21. 肥満細胞および式

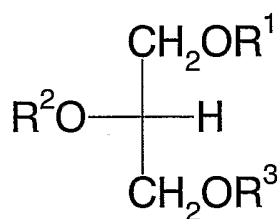


- 〔式中、R¹は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはア
10 シルを、
R²およびR³は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、
アシルまたは下式：



- (式中、mは0または1を、Sは絶対配置を示す。)で表される基を示
す。)で表される化合物またはその塩を含有することを特徴とする、エイ
15 コサノイド産生抑制剤のスクリーニング用キット。

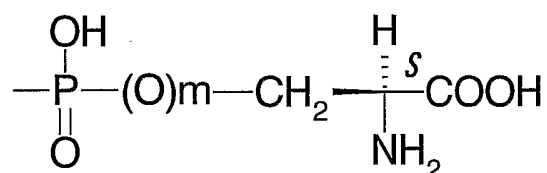
22. (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質
的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドま
20 たはその塩、または (b) 式



〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、

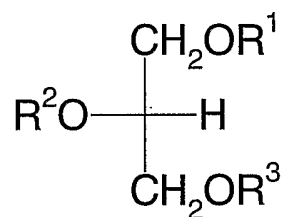
R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、

5 アシルまたは下式：



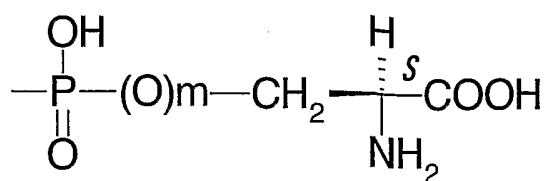
（式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。）で表される基を示す。〕で表される化合物またはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる、エイコサノイド産生抑制剤。

23. (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、または (b) 式



〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、

R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：



(式中、mは0または1を、Sは絶対配置を示す。)で表される基を示す。]で表される化合物またはその塩の活性を阻害することの特徴とする、エイコサノイド産生抑制方法。

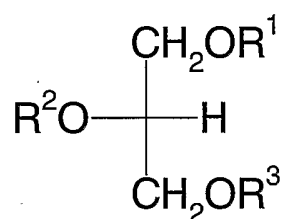
- 5 24. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる、エイコサノイド産生抑制剤。

25. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたは
10 その塩をコードするポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチドを含有してなる、エイコサノイド産生抑制剤。

26. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたは
15 その塩をコードするポリヌクレオチドに対する siRNA または shRNA を含有してなる、エイコサノイド産生抑制剤。

27. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストに対する抗体を含有してなる、エイコサノイド産生抑
20 制剤。

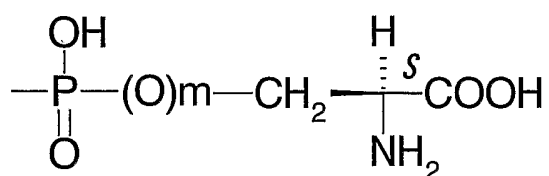
28. (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) 式



〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、

R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、

5 アシルまたは下式：



（式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。）で表される基を示す。〕で表される化合物またはその塩を用いることを特徴とする、肥満

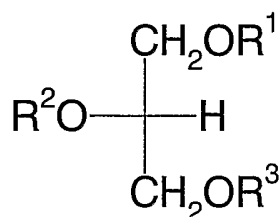
10 細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング方法。

29. 化合物が、リゾホスファチジル-L-セリンである請求項28記載のスクリーニング方法。

30. 肥満細胞の脱顆粒抑制剤が、免疫性疾患、炎症性疾患、呼吸器疾患、泌尿器疾患または循環器疾患の予防・治療剤である請求項16記

15 載のスクリーニング方法。

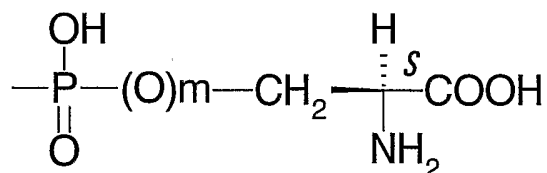
31. (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) 式



〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、

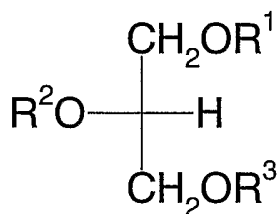
R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：

5



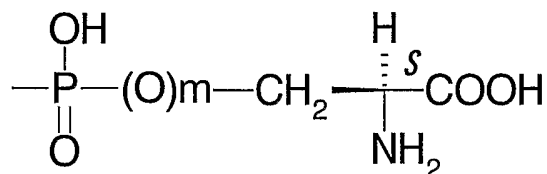
（式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。）で表される基を示す。〕で表される化合物またはその塩を含有することを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング用キット。

10 32. 肥満細胞および式



〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、

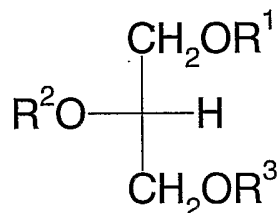
15 R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：



（式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。）で表される基を示す。〕で表される化合物またはその塩を用いることを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング方法。

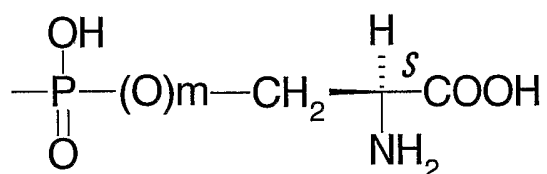
20

3 3. 肥満細胞および式



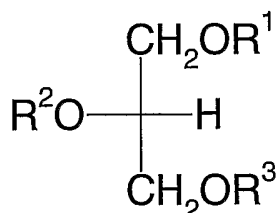
〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、

R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：



10 〔式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。〕で表される基を示す。〕で表される化合物またはその塩を含有することを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング用キット。

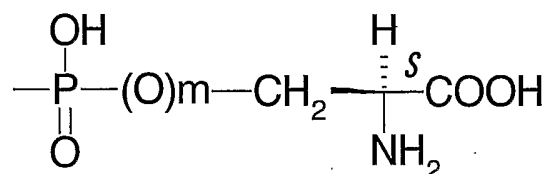
3 4. (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、または (b) 式



〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、

20 R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、

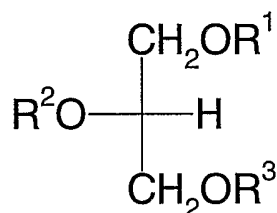
アシルまたは下式：



(式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。) で表される基を示す。) で表される化合物またはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる、肥満細胞の脱顆粒抑制剤。

35. (a) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、または (b) 式

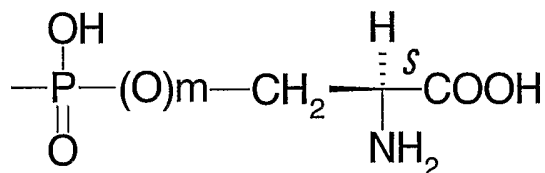
10



[式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、

R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、

15 アシルまたは下式：



(式中、 m は0または1を、 S は絶対配置を示す。) で表される基を示す。) で表される化合物またはその塩の活性を阻害することを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制方法。

20

36. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に

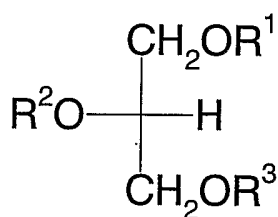
同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる、肥満細胞の脱顆粒抑制剤。

37. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチドを含有してなる、肥満細胞の脱顆粒抑制剤。

38. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに対する siRNA または shRNA を含有してなる、肥満細胞の脱顆粒抑制剤。

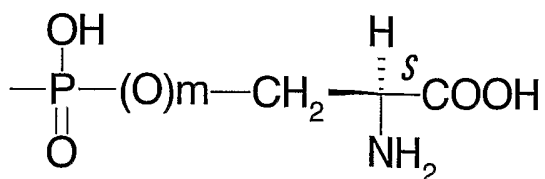
39. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストに対する抗体を含有してなる、肥満細胞の脱顆粒抑制剤。

40. (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) 式



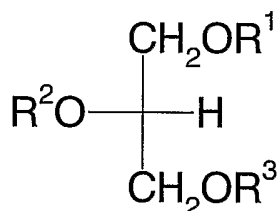
〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、

R^2 および R^3 は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：



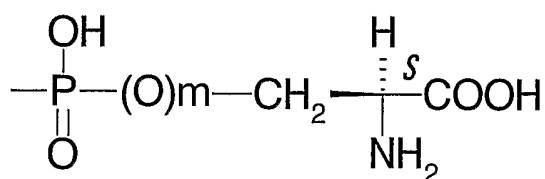
(式中、mは0または1を、Sは絶対配置を示す。) で表される基を示す。] で表される化合物またはその塩を用い、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を介した ERK1 (extracellular
5 signal-regulated kinase 1) または (および) ERK2 (extracellular signal-regulated kinase 2) の活性を測定し、指標とすることを特徴とする、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性化を促進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

4 1. (a) 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) 式



〔式中、R¹は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはア
15 シルを、

R²およびR³は、それぞれ水素、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式:

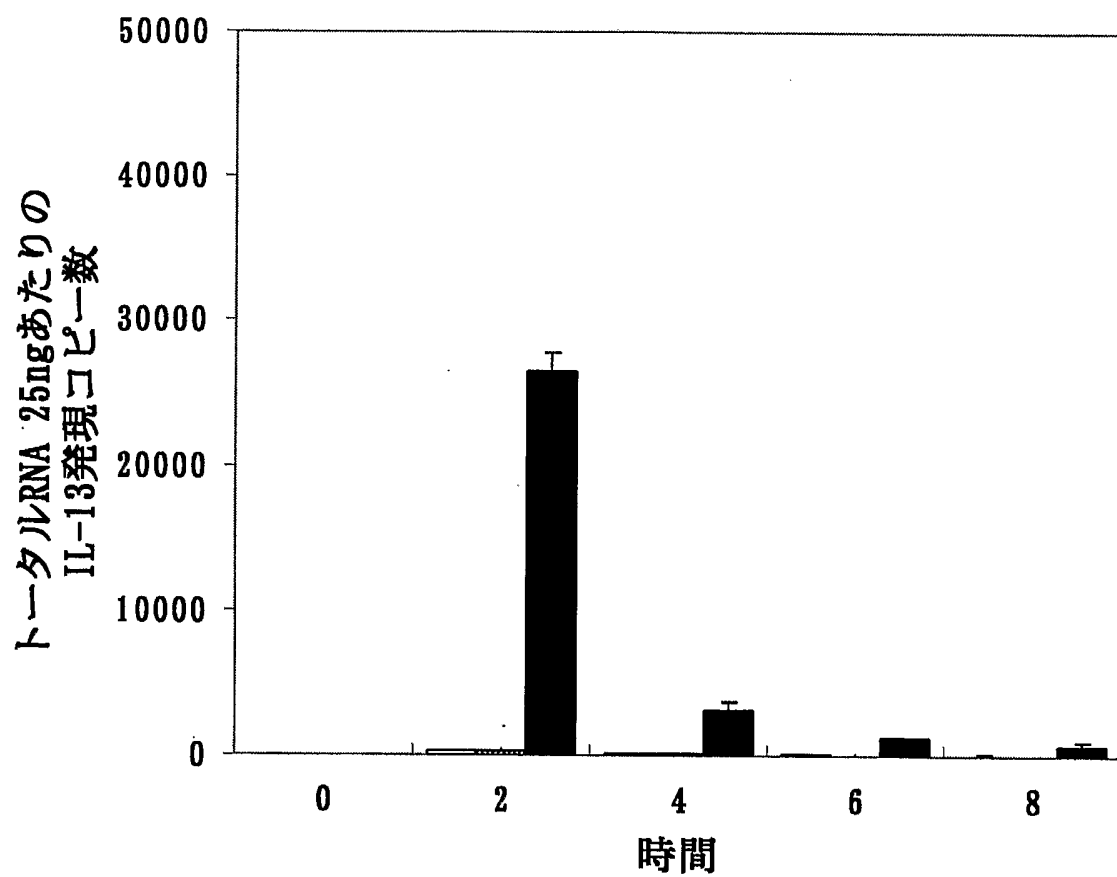


20 (式中、mは0または1を、Sは絶対配置を示す。) で表される基を示す。] で表される化合物またはその塩を用い、上記蛋白質もしくはその

部分ペプチドまたはその塩を介した ERK1 (extracellular signal-regulated kinase 1) または (および) ERK2 (extracellular signal-regulated kinase 2) の活性を測定し、指標とすることを特徴とする、肥満細胞増殖または分化抑制剤のスクリーニング方法。

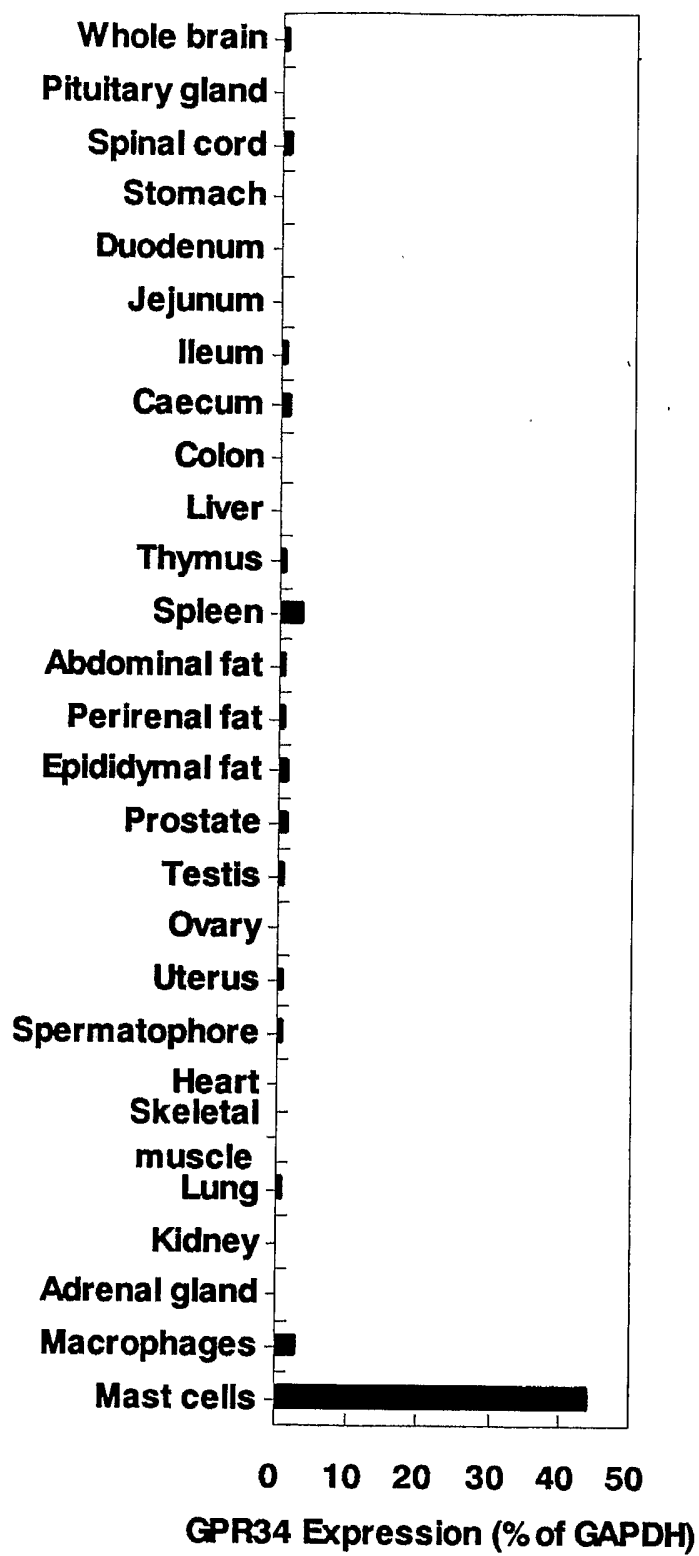
1/9

図 1



2/9

図 2



3/9

図 3

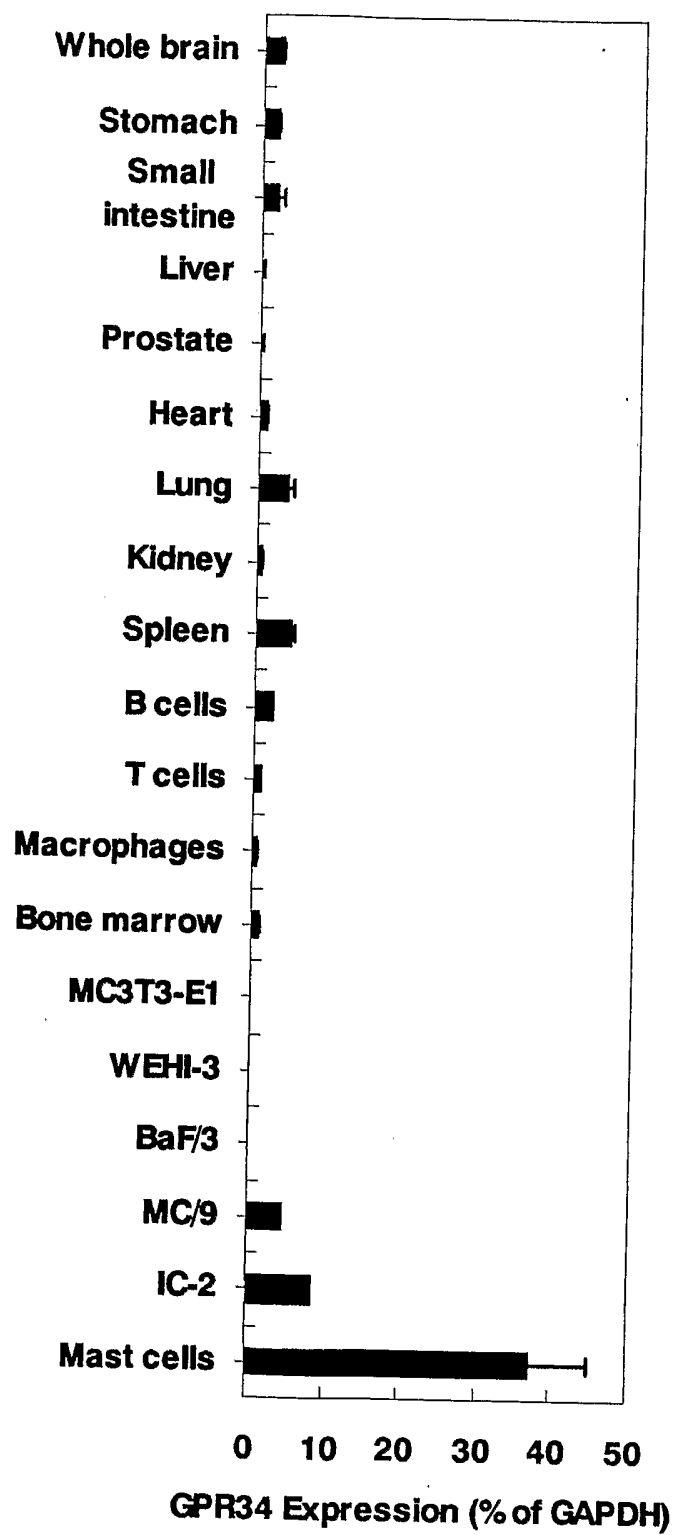


図 4

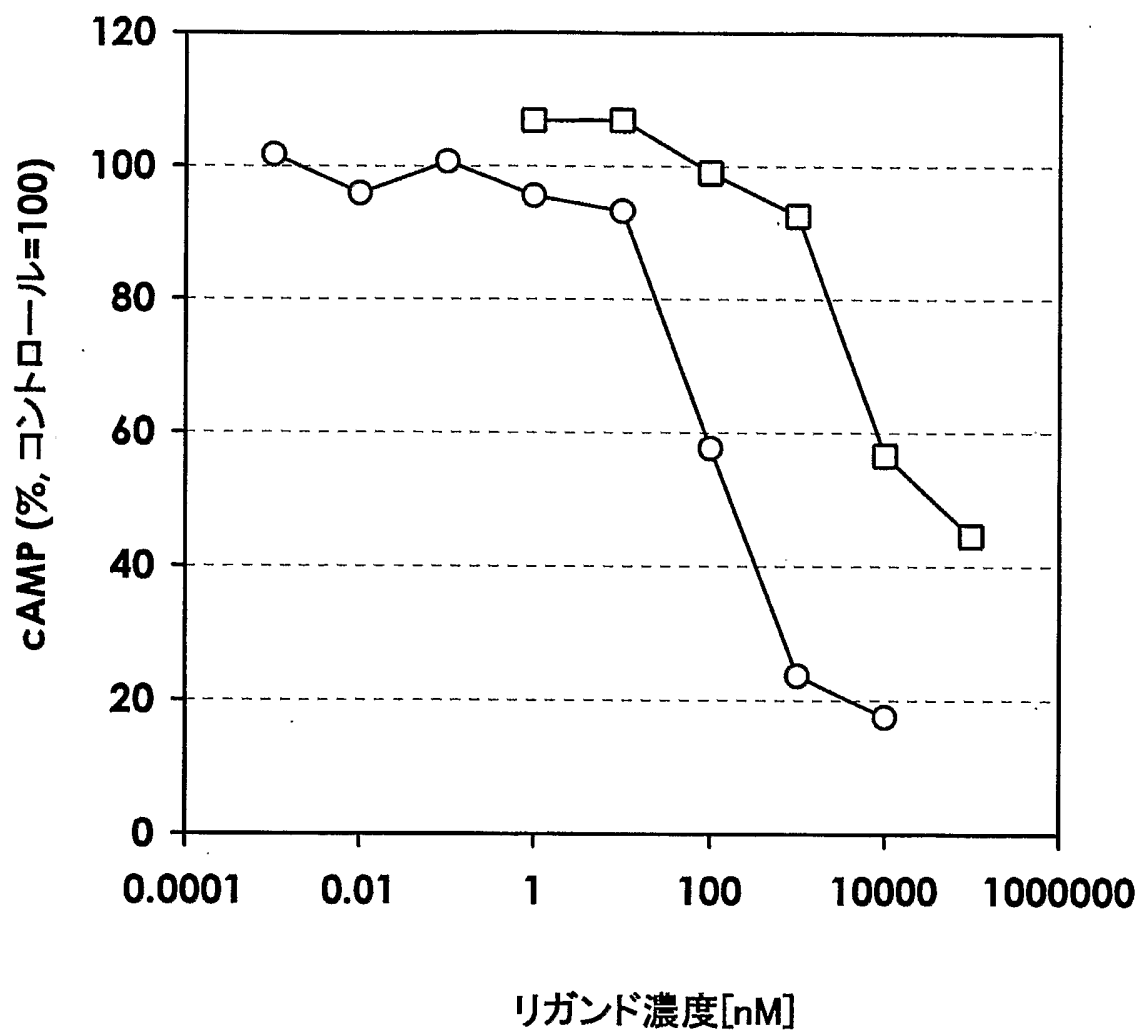


図 5

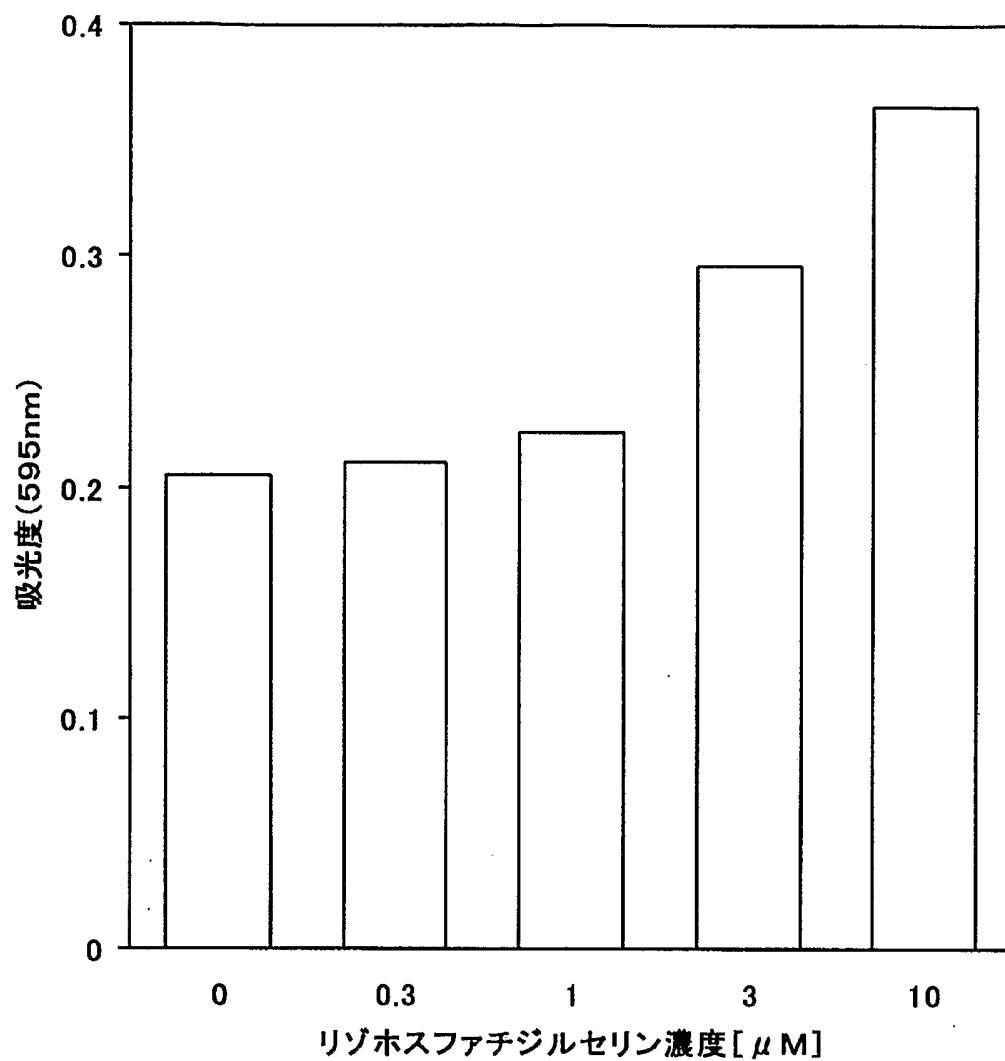


図 6

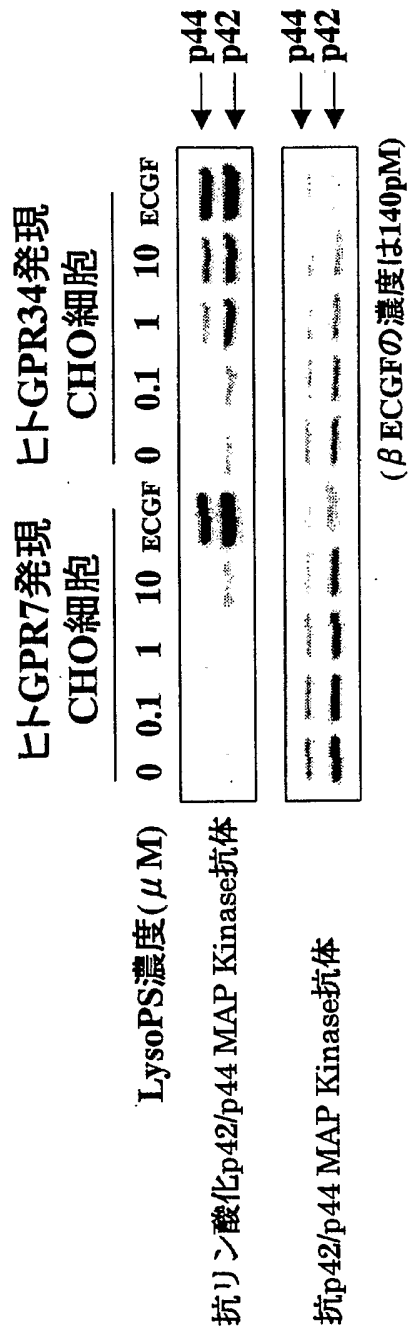


図 7

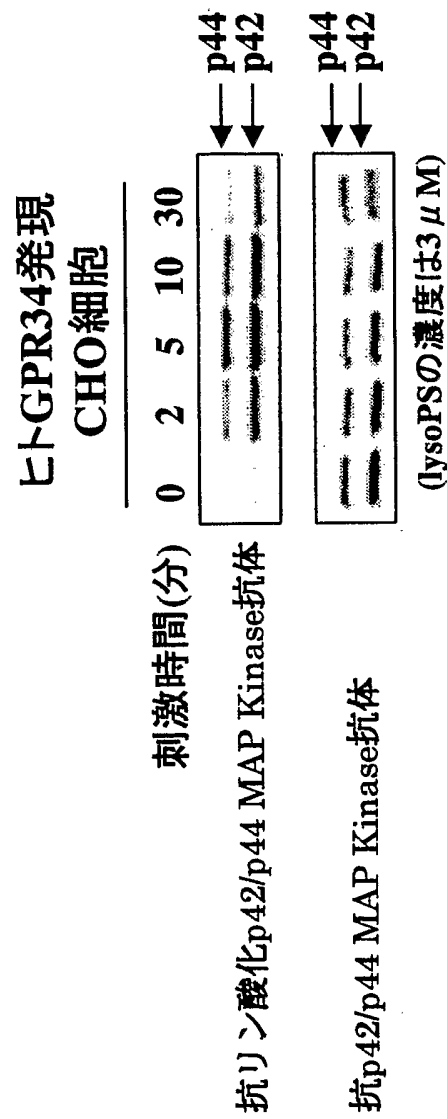


図 8

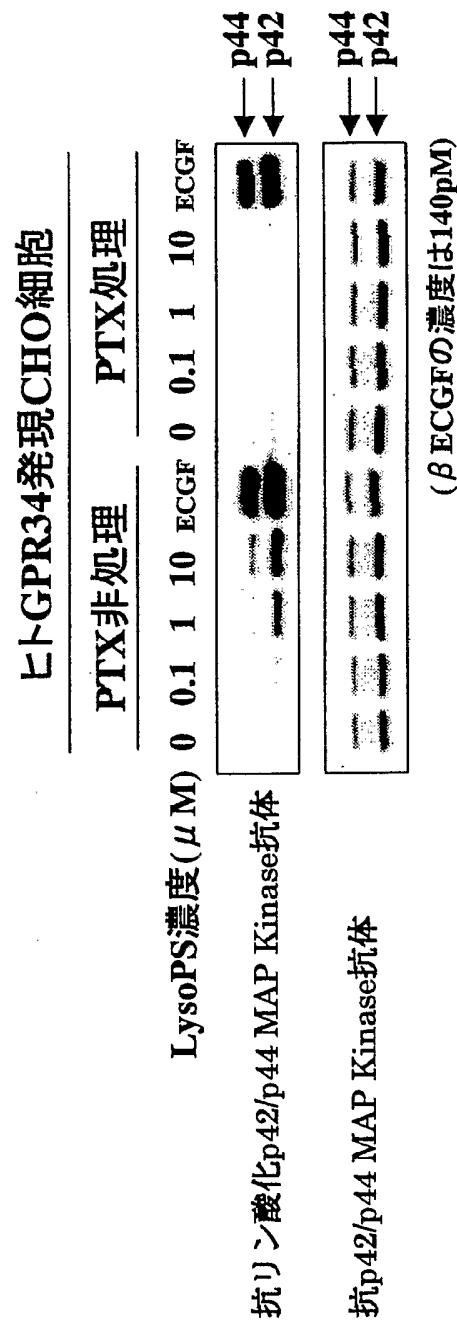


図 9

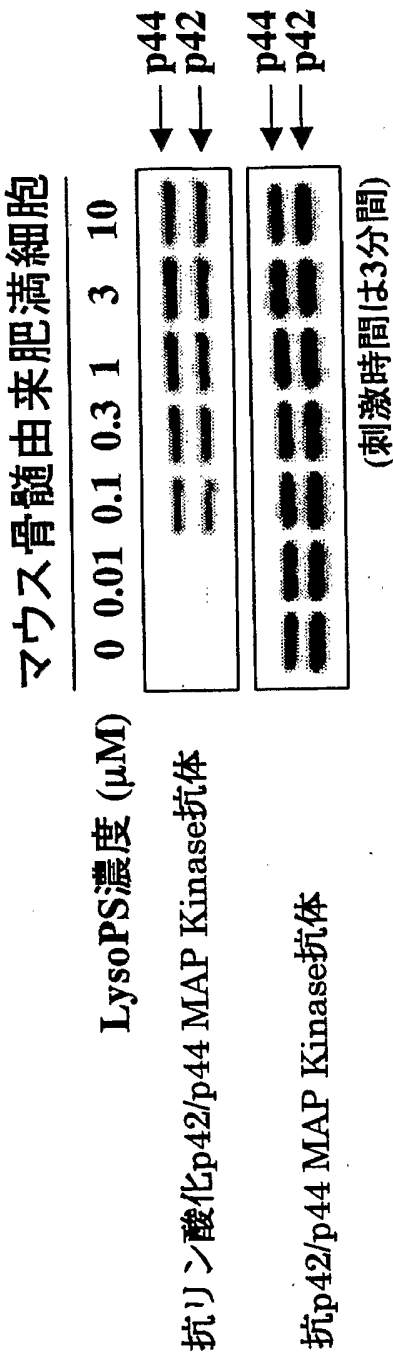


図 1 0

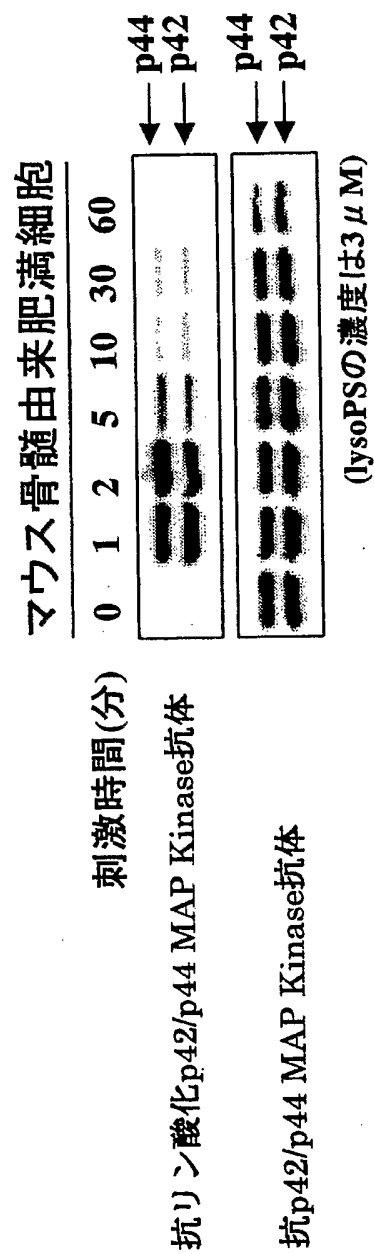


図 1 1

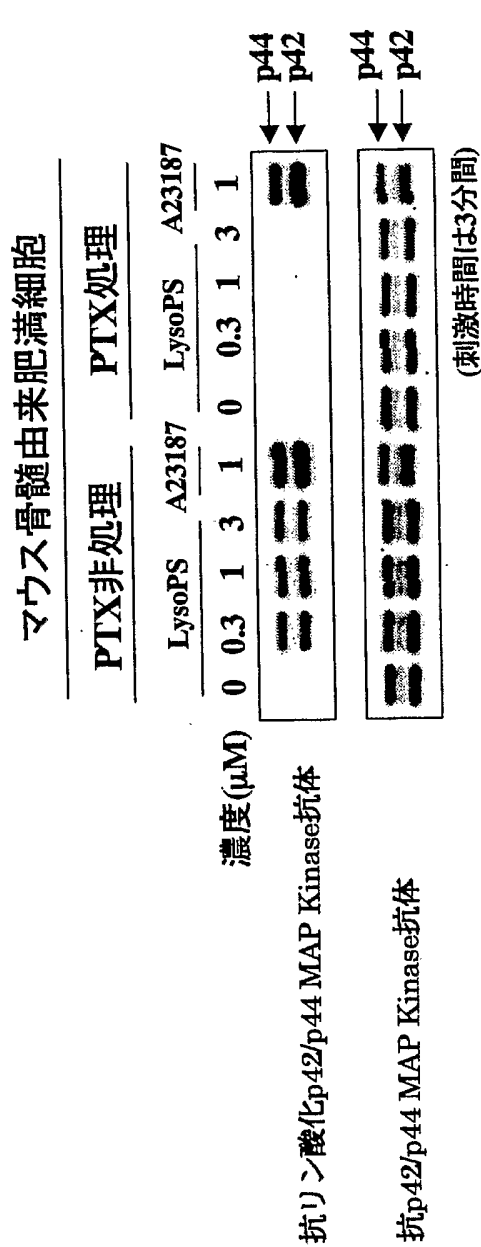
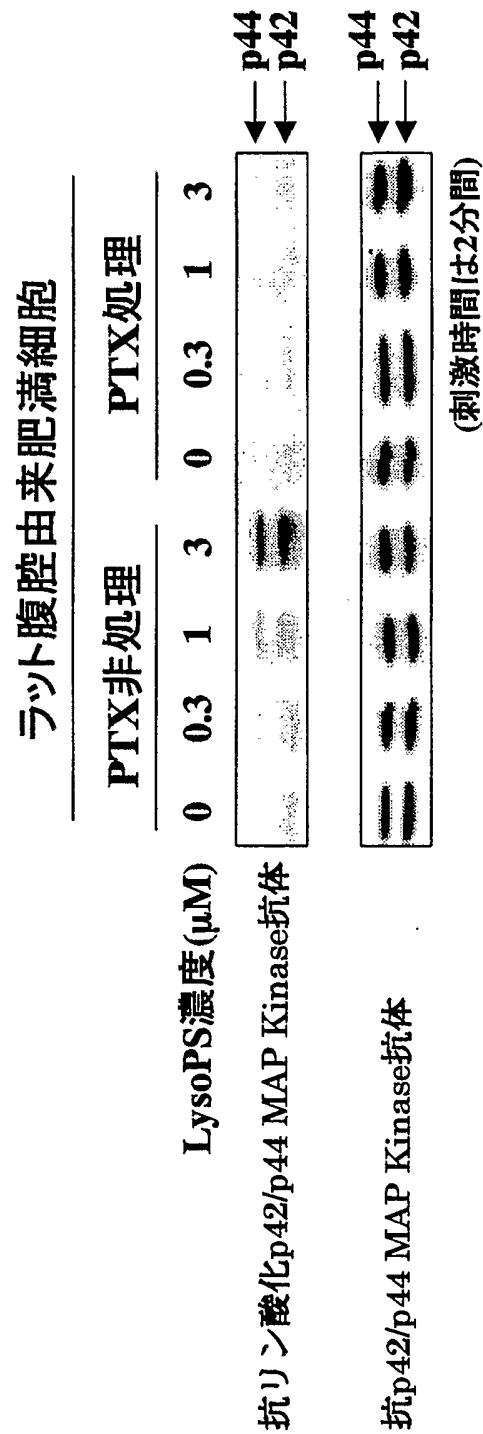


図 1 2



1/32

Sequence Listing

<110> Takeda Pharmaceutical Company Limited

<120> Suppressing medicine of the IL-13 production

<130> PCT05-0096

<150> JP2005-38859

<151> 2005-02-16

<160> 55

<210> 1

<211> 381

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

2/32

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

3/32

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

<210> 2

<211> 1143

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

atgagaagtc ataccataac aatgacgaca acttcagtcg gcagctggcc ttactcctcc      60
cacagaatgc gcctttataac caatcatatgc gaccaaccgc cacaaaactt ctcagcaaca    120
ccaaatggtt ctacctgtcc catggatgaa aaattgctat ctactgtgtt aaccacatcc    180
tactctgtta ttttcatcgt gggactgggt gggaacataa tcgccctcta tgtatttctg    240
ggatttcacc gtaaaagaaa ttccattcaa atttatctac ttaacgtatc cattgcagac    300
ctcctactca tcttctgcct ccttttcgga ataatgtatc atattaacca aaacaagtgg    360
acactagggtg tgattctgtg caaggttggt ggaacactgt tttatatgaa catgtacatt    420
agcattatit tgcttggatt catcagtttg gatcgctata taaaaattaa tcggctctata    480
cagcaacgga aggcaataac aaccaaacaa agtatattatg tctgttgtat agtatggatg    540
cttgctcttg gtggattcct aactatgatt attttaacac ttaagaaagg agggcataat    600
tccacaatgt gtttcatta cagagataag cataacgcaa aaggagaagc catitttaac    660
ttcattcttg tggtaatgtt ctggctaatt ttcttactaa taatcctttc atatattaag    720
attgggaaga atctattgag gattttctaa aggaggtcaa aatttcctaa ttctggtaaa    780
tatgccacta cagctcgtaa ctccttttatt gtacttatca tttttactat atgttttgtt    840
ccctatcatg cttttcgatt catctacatt tcttcacagc taaatgtatc atcttgctac    900
tggaagaaa ttgttcacaa aaqcaatgag atcatgctgg ttctctcatc ttccaatagt    960

```

4/32

tgcttagatc cagtcattgta tttcctgatg tccagtaaca ttcgcaaaat aatgtgccaa 1020
cttcttttta gacgatttca aggtgaacca agtaggagtg aaagcacttc agaatttaaa 1080
ccaggatact cccatgatga tacatctgtg gcagtgaata tacagtctag ttctaaaagt 1140
act 1143

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding GPR34

<400> 3

atctgtcgac atgagaagtc ataccat 27

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding GPR34

<400> 4

tatgactagt tcaagtactt ttagaactag 30

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding GPR34

<400> 5

tcagtcagca gctggcctta

20

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding GPR34

<400> 6

ggcggttggg cgctatga

18

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide probe (labeled with FAM and TAMRA)

<400> 7

tcctcccaca gaatgcgctt tataacca

28

6/32

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

<400> 8

taaattctga agtgctttca 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

<400> 9

attcacgta aaagaaattc 20

<210> 10

<211> 749

<212> DNA

<213> Norvegicus rattus

<400> 10

ggctgttgca gaccttctac tcattctctg cctccctttc cgcataatgt atcacatcaa 60

ccaaaatagg tggacactag gtgtgattct ttgcaaagtt gtggggacac tatttiacat 120

7/32

```

gaacatgtac attagttatta ttctgcttgg gtttatcagt ttggatcgat atataaaaat 180
caaccgggtct atacaacaaa gaagggcaat aaccaccaag caaagtgttt acgtttgctg 240
tgtagtctgg acagttgctc tagctggatt tttacaatg atcatttga cactgaagaa 300
gggagggcac aattccacaa tgggtttcca ttacagagat aagcataatg caaagggaga 360
agcgatcttt aactttgctc ttgtagtaat gtcttggtc attttcttac tgataatcct 420
ttcatatatt aagattggca agaatttact gaggatttct aaaaggaggt caaaatttcc 480
taactctggc aaatatgccg cgacagcccg gaactccttc attgtactaa tcatttttac 540
tatatgcttc gtgccttata atgcctttcg attcatttac atttcttcac agctaaatgc 600
atcttcttgc tactggaagg aaatcattca taaaaccaat gagatcatgt tggttctctc 660
ctctttcaac agctgcttgg atcctgtcat gtatttctta atgtccagta atattcgcaa 720
aatcatgtgt caacttcttt ttagaagat 749

```

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

<400> 11

```

gttctgtgcc ttatcatgcc tttcg 25

```

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

<400> 12

ctctcctctt tcaacagctg cttgg

25

<210> 13

<211> 300

<212> DNA

<213> Norvegicus rattus

<400> 13

ttcaaagtga cacaagcaga agtgaaagca cticagaatt taagccagga tttccttgc 60

atgatctatc tgtgacggtc aaaatgcagt acagcactaa gggtaactga ggcacatgca 120

gtaaaatgaa caacataaac cagcctcttc attccttgag gttggtaaaa ttatggaaca 180

aattcctagc atgttcaaaa accagatctt tagaagtggc ctttcacttg ctttaactgca 240

aaatagtcca aggcaaagaa aagcttacac taatccctag attttagaac tatatgtaga 300

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

<400> 14

gcccttcttt gtgtataga ccgg

24

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

9/32

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

<400> 15

gcaaagaatc acacctagtgc tccacc 26

<210> 16

<211> 500

<212> DNA

<213> Norvegicus rattus

<400> 16

cggaatggaag agtccagctg acacgacctg gtcgagggag ctttgggttt cctcctttac	60
ttcagcaaag cctcaactca gtccctgtga ctctgaagt atggcctgaa tagattcaat	120
cattattagt ccattatcat ataggaaaat ctgaagacac caagaagiat aaaaagcatg	180
tcatttagca cctgtcctg atagttacag aagacattga gaagttacag tgtaacaatg	240
acgactacag ttgacagctg gctttgctcc tctcctggaa tgcactttat aactaatgac	300
agtgaccaag tctcacaaaa tttctcagga gtgtcaaagtc tctactagctg tccaatggat	360
gaaaaattac tgtctactgt gttacaact tctactctg tgatattcat cgtgggactg	420
gttggaaca tcattgccct ttatgtatct ctgggcatcc accgcaaaag aaattccatt	480
caaatttatc tacttaatgt	500

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10/32

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

<400> 17

tcagttaccc ttagtgctgt 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

<400> 18

atgacgacta cagttgacag 20

<210> 19

<211> 373

<212> PRT

<213> Norvegicus rattus

<400> 19

Met Thr Thr Thr Val Asp Ser Trp Leu Cys Ser Ser Pro Gly Met His

5

10

15

Phe Ile Thr Asn Asp Ser Asp Gln Val Ser Gln Asn Phe Ser Gly Val

20

25

30

Ser Asn Val Thr Ser Cys Pro Met Asp Glu Lys Leu Leu Ser Thr Val

35

40

45

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

50

55

60

11/32

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

12/32

Leu Val Leu Ser Ser Phe Asn Ser Cys Leu Asp Pro Val Met Tyr Phe
 305 310 315 320
 Leu Met Ser Ser Asn Ile Arg Lys Ile Met Cys Gln Leu Leu Phe Arg
 325 330 335
 Arg Phe Gln Ser Asp Thr Ser Arg Ser Glu Ser Thr Ser Glu Phe Lys
 340 345 350
 Pro Gly Tyr Ser Leu His Asp Leu Ser Val Thr Val Lys Met Gln Tyr
 355 360 365
 Ser Thr Lys Gly Asn
 370

<210> 20

<211> 1119

<212> DNA

<213> Norvegicus rattus

<400> 20

atgacgacta cagttgacag ctggctttgc tcctctcctg gaatgcactt tataactaat 60
 gacagtgacc aagtctcaca aaattttctca ggagtgtcaa atgtcactag ctgtccaatg 120
 gatgaaaaat tactgtctac tgtgttaaca actttctact ctgtgatatt catcgtggga 180
 ctggttggaa acatcattgc cctttatgta tttctgggca tccaccgcaa aagaaattcc 240
 attcaaattt atctacttaa tgtggctggt gcagaccttc tactcatctt ctgcctccct 300
 ttccgcataa tgtatcacat caacccaaaat aggtggacac taggtgtgat tctttgcaaa 360
 gttgtgggga cactatttta catgaacaig tacattagta ttattctgct tgggtttatc 420
 agtttggatc gatataataa aatcaaccgg tctatacaac aaagaagggc aataaccacc 480
 aagcaaagtg ttacgtttg ctgtgtagtc tggacagttg ctctagctgg atttttaaca 540
 atgatcattt tgacactgaa gaaggagggg cacaattcca caatgtgttt ccattacaga 600
 gataagcata atgcaaaggg agaagcgatc tttaactttg ctcttgtagt aatgttctgg 660
 ctcatitttc tactgataat cctttcataat attaagattg gcaagaatct actgaggatt 720
 tctaaaagga ggtcaaaaatt tcctaaactct ggcaaataig ccacgacagc ccggaactcc 780

13/32

```

ttcattgtac taatcatttt tactataatgc ttcgtgcctt atcatgcctt tcgattcatt 840
tacatttcctt cacagctaaa tgcatcttct tgctactgga aggaaatcat tcataaaacc 900
aatgagatca tgitggttct ctcctctttc aacagctgct tggatcctgt catgtatttc 960
ctaagtcca gtaatatcgc caaaatcatg tgtcaacttc tttttagaag atttcaaagt 1020
gacacaagca gaagtgaag cacttcagaa ttttaagccag gatattcctt gcatgatcta 1080
tctgtgacgg tcaaaatgca gtacagcact aagggtaac 1119

```

<210> 21

<211> 1122

<212> DNA

<213> Norvegicus rattus

<400> 21

```

atgacgacta cagttgacag ctggctttgc tcctctcctg gaatgcactt tataactaat 60
gacagtgacc aagtcctaca aaatttctca ggagtgctaa atgtcactag ctgtccaatg 120
gatgaaaaat tactgtctac tigtgttaaca actttctact ctgtgataat catcgtggga 180
ctggttggaa acatcattgc cctttatgta tttctgggca tccaccgcaa aagaaattcc 240
attcaaattt atctacttaa tgtggctgtt gcagaccttc tactcatctt ctgcctccct 300
ttccgcataa tgtatcacat caaccaaatt aggtggacac taggtgtgat tctttgcaa 360
gttgtgggga cactatttta catgaacatg tacattagta ttattctgct tgggtttatc 420
agtttggatc gatataataa aatcaaccgg tctatacaac aaagaagggc aataaccacc 480
aagcaaagtg tttaagtttg ctgtgtagtc tggacagttg ctctagctgg atttttaaca 540
atgatcattt tgacactgaa gaaggagggg cacaattcca caatgtgitt ccattacaga 600
gataagcata atgcaaaggg agaagcgatc tttaactttg ctcttgtagt aatgttctgg 660
ctcattttcc tactgataat cctttcatat attagattg gcaagaatct actgaggatt 720
tctaaaagga ggtcaaaatt tcctaactct ggcaaataatg ccacgacagc ccggaactcc 780
ttcattgtac taatcatttt tactataatgc ttcgtgcctt atcatgcctt tcgattcatt 840
tacatttcctt cacagctaaa tgcatcttct tgctactgga aggaaatcat tcataaaacc 900
aatgagatca tgitggttct ctcctctttc aacagctgct tggatcctgt catgtatttc 960
ctaagtcca gtaatatcgc caaaatcatg tgtcaacttc tttttagaag atttcaaagt 1020

```

14/32

gacacaagca gaagtgaaag cacttcagaa ttttaagccag gatatttcctt gcatgatcta 1080
 tctgtgacgg tcaaaatgca gtacagcact aagggttaact ga 1122

<210> 22

<211> 375

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

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

15/32

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

<210> 23

<211> 1125

16/32

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 23

```

atgactacta cttcagttga cagctggctt tgctectctc atggaatgca ctttataact    60
aattatagtg accaagcctc acaaaatttc tcaggagtgc caaatgtcac tagctgtcca    120
atggatgaaa aattactatc tactgtgtta acaaccttct actctgttat attcctcgtg    180
ggactggttg gaaacatcat tgccctctat gtatttctgg gcattcaccg taaaagaaat    240
tccattcaaa tttatctact taatgtggct gttgcagacc ttctactcat cttctgcctc    300
cctttccgca taatgtatca catcaaccaa aacaagtgga cactaggtgt gattctttgt    360
aaagttgtgg ggacactatt tiacatgaac atgtacatta gcattatfff gcttgggttt    420
atcagtttgg atcgtatata aaaaatcaat cggctctatac acaaagaag ggcaataacc    480
accaagcaaa gtatttatgt ttgctgtata gtatggacgg ttgctcttgc tggatttcta    540
actatgatca ttttgacact gaagaaggga ggtcataatt ccacaatgtg tttccattac    600
agagacagac ataatgcaaa gggagaagca atttttaact ttgttcttgt agtaatgttc    660
tggcttattt tcctactgat aatcctctca tatattaaga ttggcaagaa tctactgagg    720
atttctaaac ggaggtcaaa atttccaaac tctggcaaat atgctacaac agcccggaac    780
tcctttattg tactgatcat ttttactata tgcttttgtc cttaccatgc ctttcggttc    840
atttacattt cttcacagct aaatgtgtcc tcttgttatt ggaaggaaat cattcacaaa    900
actaacgaga tcatgctggt tttctcctct ttcaacagtt gcctggatcc tgtcatgtat    960
ttcctgatgt ccagtaatat tcgcaaaatc atgtgtcaac ttcttttttag aaggtttcaa   1020
agtgaagcaa gcagaagtga aagcacttca gaatttaagc caggacattc cttgcatgat   1080
ctgtccgiga cagtcaaaat gccccagtac agcactaagg gtaat                      1125

```

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

gcaacatcac acaagaccag aag

23

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25

tgtcaggtcc acgctccat

19

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 26

cttcctgtg caacagcagc atgg

24

<210> 27

<211> 78

<212> DNA

18/32

<213> Norvegicus rattus

<400> 27

gctgagcaac atcacacaag accagaagac ttcctgtgc aacagcagca tggtatggag 60
 cgtggacctg acagctgg 78

<210> 28

<211> 582

<212> DNA

<213> Norvegicus rattus

<400> 28

ggagcgagat cccgctaaca tcaaattgggg tgatgctggt gctgagtatg tcgtggagtc 60
 tactggcgtc ttaccacca tggagaaggc tggggctcac ctgaagggtg gggccaaaag 120
 ggatcatc tccgcccctt ccgctgatgc ccccatgttt gtgatgggtg tgaaccacga 180
 gaaatatgac aactccctca agattgtcag caatgcatcc tgcaccacca actgcttagc 240
 ccccttgccc aaggatcatc atgacaactt tggcatcgtg gaagggtc taccacagt 300
 ccatgccatc actgccactc agaagactgt ggatggcccc tctggaaagc tgtggcgatg 360
 tggccgtggg gcagcccaga acatcatccc tgcattccact ggtgctgcca aggctgtggg 420
 caaggatc ccagagctga acgggaagct cactggcatg gccttccgtg ttctacccc 480
 caatgtatcc gttgtggatc tgacatgccg cctggagaaa cctgccaagt atgatgacat 540
 caagaagggt gtgaagcagg cggccgaggg ccactaaag gg 582

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

19/32

<400> 29

caaagaagta caaagagcat gtcatttagc

30

<210> 30

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 30

gaagagactg ttttataatca ttcatttttag ta

32

<210> 31

<211> 368

<212> PRT

<213> Guinea pig

<400> 31

Met Ala Thr Thr Ser Val Gly Gly Leu Ser Cys Ser Ser Asp Gly Met

5

10

15

Arg Phe Val Thr Asn His Ser Asp Gln Ala Pro Gln Asn Phe Ser Glu

20

25

30

Ala Ala Asn Val Thr Ser Cys Tyr Met Glu Glu Gln Leu Leu Ser Thr

35

40

45

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

50

55

60

Asn Ile Ile Ala Leu Tyr Val Phe Leu Gly Ile His Arg Lys Arg Asn

20/32

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

21/32

305	310	315	320												
Phe	Leu	Met	Ser	Ser	Asn	Ile	Arg	Lys	Ile	Met	Cys	Gln	Leu	Leu	Phe
	325		330		335										
Arg	Arg	Phe	Gln	Gly	Glu	Ala	Ser	Arg	Ser	Glu	Ser	Thr	Ser	Glu	Phe
	340		345		350										
Lys	Pro	Gly	Tyr	Ser	Leu	His	Asp	Thr	Ser	Val	Ala	Ala	Lys	Leu	Gln
	355		360		365										

<210> 32

<211> 1107

<212> DNA

<213> Guinea pig

<400> 32

```

atggcaacta cttcagtagg gggcttgtct tgctcctccg atgggatgcg ctttgtaact    60
aatcacagtg accaagcccc acagaacttc tcagaagcgg caaatgttac tagctgttac    120
atggaggaac aactgctgtc tactgtgtta acaatattct actctgttat tticattgtg    180
ggactgggtg gaaacataat tgccctctac gtatttcttg gcatccatcg caagagaaat    240
tccattcaga ttacctact taatgtagcc atgcagacc ttctactcat tttctgcctt    300
cctttccgaa taatgtatca tattaaccaa aacaagtgga cattaggtgt gatcctttgc    360
aaggttgtag gaacactatt ttatatgaac atgtacatca gcattatttt gcitggattc    420
atcagtttgg atcgctacat aaaaattaat cggctctatac aacaacggag ggcaataaca    480
accaagcaaa gtatttataat ttgctgtata gtaigggcaa ttgctcttgc tgtattttta    540
actatgatta ttttaacact taagaaagga gggcataatt ctacaatgtg ttttcattac    600
agagataagc ataatgcaaa aggagaagca ttttttaacc ttgttcttgt ggtaatgttc    660
tggctgattt tcctactgat aatccittca tatattaaga ttggcaaaaa tctactgagg    720
atttctaaaa ggaggtcaaa atttcctaatt tctggtaaat atgccattac agcacgaaat    780
tcctttatig tactgatcat ttttaccata tgttttgtcc cttaccatgg ctttcgattc    840
atatacatit cttcacagtt aaatgaatca ttatgttatt ggaaggaaat cgttcacaaa    900
accaatgaga tcatgctggg tctctcatct ttcaatagct gcttagaccc agtcatgtat    960

```

22/32

tttctgatgt ccagtaatat tgcgaaaata atgtgtcaac ttttttttag acgatttcaa 1020
ggtagaagcaa gcagaagtga aagcattca gaatttaaac caggatattc cctgcatgat 1080
acatctgtag cagctaaact gcagtag 107

<210> 33

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 33

gaggaatatg tcatttagca ctttcactt 29

<210> 34

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 34

agaggctgca ttatataatt catttttagta tggtt 34

<210> 35

<211> 381

<212> PRT

<213> Monkey

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

24/32

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

<210> 36

<211> 1146

<212> DNA

<213> Monkey

<400> 36

```

atgagaagtc acaccataac aatgacgaca acttcagtca gcagctggcc ttactcctcc      60
cacagaatgc gcittataac cagtcatagc gaccaaccgc cacaaaactt ctcaggaaca      120
ccaaatgtta ctacctgtcc catggatgaa aaattactat ctactgtgtt aacaacatct      180

```

25/32

tactctgtta ttttcattgt gggactgggt gggaacataa tcgccctcta tgiatttctg 240
 ggtattcacc gcaaaagaaa ttccattcaa atttatctac ttaatgtagt cattgcagac 300
 ctctactca tcttctgcct ccttttcga ataatgtatc acattaacca aaacaagtgg 360
 acactagggtg tgattctgtg caaggttgtg ggaacactat tttatatgaa caigtacatt 420
 agcattatit tgcttggatt catcagtttg gatcgctata taaaaattaa tcggctctata 480
 cagcaacgga aggcaataac aaccaaacaa agtatttatg tctgttgtat agtaiggaig 540
 ctgtctcttg gtggattcct aactatgatt attttaacac ttaagaaagg ggggcataat 600
 tccacaatgt gtttccatta tagagataag cataatgcaa aaggagaagc catttttaac 660
 ttcatctctg tggtaatgtt ctggctaatt ttcttactaa taatcctttc atatattaag 720
 attgggaaga atctattgag gatttctaaa aggaggtcaa aatttcctaa ttctggtaaa 780
 tatgccacta cagcccgga ctcctttatt gtacttatca tttttactat atgttttgtt 840
 ccctatcatg cctttcgatt catctacatt tcttcacagc taaatgtatc gtcttgctac 900
 tggaaagaaa ttgttcacaa aaccaatgag atcatgctgg ttctctcatc tttcaatagt 960
 tgcttagatc cagtcatgta tttcctgatg tccagtaaca ttcgcaaaat aatgtgccaa 1020
 cttcttttta gacgatttca aggtgaacca agtaggagtg aaagcacttc agaatttaaa 1080
 ccaggatact ccttgcatga tacatctgtg gcagcaaaaa tacactctag ttctaaaagt 1140
 acctga 1146

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 37

atgtggctgt tgcagacctt cta

23

<210> 38

26/32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 38

cacacctagt gtccacctat tttagg

25

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 39

tcacctttctg cctccctttc cgca

24

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 40

27/32

acacctagtg tccacttggt ttgg

24

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 41

cgacaacttc agtcagcagc tg

22

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 42

ggttggtcgc tatgattggt ta

22

<210> 43

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 43

ccttactcct cccacagaat gcgcctt

26

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 44

ccaacttcca atgctctcct aatg

24

<210> 45

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 45

gccgagtaga cctcatagtg acct

24

<210> 46

29/32

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Probe

<400> 46

tggctaagga ccaagacat ccaactcatc

30

<210> 47

<211> 137

<212> DNA

<213> Norvegicus rattus

<400> 47

ctaccccaac ttccaatgct ctccaatgg agaagttaga gtcacagaag gagtggctaa 60

ggaccaagac catccaactc atcttgaaag cacttgaaga atttctaaag gtcactatga 120

ggtctactcg gcaaacc 137

<210> 48

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 48

tccgagatgt ggaactggc

19

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 49

agacaccgcc tggagtctg

20

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Probe

<400> 50

aggaggcgct ccccaaaaag atgg

24

<210> 51

<211> 83

<212> DNA

<213> Norvegicus rattus

<400> 51

31/32

catgatccga gatgtggaac tggcagagga ggcgctcccc aaaaagatgg ggggcctcca 60
gaactccagg cgggtgtctgt gcc 83

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 52

cgacgctgtc atcgatttct cccct 25

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 53

gaagctgaag accctctgga taca 24

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

32/32

<220>

<223> Probe

<400> 54

ctccactgcc ttgcitttat tctc

24

<210> 55

<211> 90

<212> DNA

<213> Norvegicus rattus

<400> 55

gggagagaag ctgaagacc tctggataca gctgcgacgc tgcacgat ttctccccctg 60

tgagaataaa agcaaggcag tggagcaggt 90

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/303099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00 (2006.01) - **C12N15/90** (2006.01) , **A61K31/00** (2006.01) - **A61K48/00** (2006.01) , **A61P1/00** (2006.01) - **A61P43/00** (2006.01) , **C12N1/00** (2006.01) - **C12N7/08** (2006.01) , **C12Q1/00** (2006.01) - **C12Q1/70** (2006.01) ,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) , GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2003/052414 A1 (TAKEDA CHEM. IND. LTD.) , 26 June, 2003 (26.06.03) , & JP 2004-089176 A & EP 1455186 A1 & US 2005/0154190 A1	1-41
P, A	WO 2005/028667 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KABUSHIKI KAISHA et al.) , 31 March, 2005 (31.03.05) , (Family: none)	1-41
P, A	JP 2005-325055 A (PEPUTAIDODOA KABUSHIKI KAISHA) , 24 November, 2005 (24.11.05) , & WO 2005/111071 A1	1-41

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 May, 2006 (26.05.06)

Date of mailing of the international search report
13 June, 2006 (13.06.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/303099

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2003/052414 A1 (TAKEDA CHEM IND. LTD.), 26 June, 2003 (26.06.03), & JP 2004-089176 A & EP 1455186 A1 & US 2005/0154190 A1	1-41
T	SUGO, T. et al., "Identification of a lysophosphatidylserine receptor on mast cells", Biochem.Biophys.Res.Comm., Vol.341, No.4, 24 March, 2006 (24.03.06), pages 1078 to 1087	1-41
A	SCHULZ A et al., "The structural evolution of a P2Y-like G-protein-coupled receptor", J.Biol. Chem., Vol.278, No.37, (2003), pages 35531 to 35541	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/303099

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (International Patent Classification (IPC))

C12N15/09(2006.01), *A61K31/7088*(2006.01), *A61K39/395*(2006.01),
A61K45/00(2006.01), *A61K48/00*(2006.01), *A61P1/00*(2006.01),
A61P1/04(2006.01), *A61P1/16*(2006.01), *A61P3/04*(2006.01),
A61P3/06(2006.01), *A61P3/10*(2006.01), *A61P9/00*(2006.01),
A61P9/04(2006.01), *A61P9/06*(2006.01), *A61P9/10*(2006.01),
A61P11/00(2006.01), *A61P11/06*(2006.01), *A61P13/00*(2006.01),
A61P13/12(2006.01), *A61P15/00*(2006.01), *A61P17/00*(2006.01),
A61P19/02(2006.01), *A61P21/04*(2006.01), *A61P27/16*(2006.01),
A61P29/00(2006.01), *A61P35/00*(2006.01), *A61P37/02*(2006.01),
A61P37/08(2006.01), *A61P43/00*(2006.01), *C12N5/06*(2006.01),
C12N5/10(2006.01), *C12Q1/02*(2006.01), *C12Q1/48*(2006.01),
G01N33/15(2006.01), *G01N33/50*(2006.01), *G01N33/53*(2006.01)

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

G01N33/00(2006.01) - *G01N33/98*(2006.01)

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. (特別ページ参照)			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N15/00 (2006. 01) ~ C12N15/90 (2006. 01), A61K31/00 (2006. 01) ~ A61K48/00 (2006. 01), A61P1/00 (2006. 01) ~ A61P43/00 (2006. 01), C12N1/00 (2006. 01) ~ C12N7/08 (2006. 01), C12Q1/00 (2006. 01) ~ C12Q1/70 (2006. 01), G01N33/00 (2006. 01) ~ G01N33/98 (2006. 01)			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2006年 日本国実用新案登録公報 1996-2006年 日本国登録実用新案公報 1994-2006年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） BIOSIS / MEDLINE / WPIDS (STN), GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	WO 2003/052414 A1 (TAKEDA CHEM. IND. LTD.) 2003.06.26 & JP 2004-089176 A & EP 1455186 A1 & US 2005/0154190 A1	1-41	
PA	WO 2005/028667 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO K.K. 外1名) 2005.03.31 (ファミリーなし)	1-41	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 26. 05. 2006		国際調査報告の発送日 13. 06. 2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 齊藤 真由美 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	JP 2005-325055 A (PEPUTAIDODOA K.K.) 2005.11.24 & WO 2005/111071 A1	1-41
A	WO 2003/052414 A1 (TAKEDA CHEM IND. LTD.) 2003.06.26 & JP 2004-089176 A & EP 1455186 A1 & US 2005/0154190 A1	1-41
T	SUGO T., et al., "Identification of a lysophosphatidylserine receptor on mast cells." Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.341, No.4, (24.03.2006), p. 1078-1087	1-41
A	SCHULZ A, et al., "The structural evolution of a P2Y-like G-protein-coupled receptor." J. Biol. Chem., Vol.278, No.37, (2003), p.35531-35541	1-41

*C12N15/09(2006.01),
A61K45/00(2006.01),
A61P1/04(2006.01),
A61P3/06(2006.01),
A61P9/04(2006.01),
A61P11/00(2006.01),
A61P13/12(2006.01),
A61P19/02(2006.01),
A61P29/00(2006.01),
A61P37/08(2006.01),
C12N5/10(2006.01),
G01N33/15(2006.01),*

*A61K31/7088(2006.01),
A61K48/00(2006.01),
A61P1/16(2006.01),
A61P3/10(2006.01),
A61P9/06(2006.01),
A61P11/06(2006.01),
A61P15/00(2006.01),
A61P21/04(2006.01),
A61P35/00(2006.01),
A61P43/00(2006.01),
C12Q1/02(2006.01),
G01N33/50(2006.01),*

*A61K39/395(2006.01),
A61P1/00(2006.01),
A61P3/04(2006.01),
A61P9/00(2006.01),
A61P9/10(2006.01),
A61P13/00(2006.01),
A61P17/00(2006.01),
A61P27/16(2006.01),
A61P37/02(2006.01),
C12N5/06(2006.01),
C12Q1/48(2006.01),
G01N33/53(2006.01)*