(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2003 年8 月14 日 (14.08.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/066860 A1

(51) 国際特許分類[7]: C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12N 5/10, C12P 21/02, C12Q 1/68, A61K 31/7088, 39/395, 45/00, 48/00, A61P 15/08, 35/00, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/01057

(22) 国際出願日: 2003 年2 月3 日 (03.02.2003)

(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2002-27299 2002 年2 月4 日 (04.02.2002) 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 CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 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): 大瀧 徹也 (OHTAKI,Tetsuya) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日１丁目７番地９−８０２号 Ibaraki (JP). 増田 安司 (MASUDA,Yasushi) [JP/JP]; 〒305-0032 茨城県 つくば市 竹園１丁目８番地１４−９０６−２１０ Ibaraki (JP). 高津 吉広 (TAKATSU,Yoshihiro) [JP/JP]; 〒305-0032 茨城県 つくば市 竹園１丁目６番地２−９０５−５０５ Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 高橋 秀一, 外(TAKAHASHI,Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町２丁目１７番８５号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (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

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: ANGIOGENESIS INHIBITORS

(54) 発明の名称: 血管新生阻害剤

(57) Abstract: It is intended to provide a method of screening a compound or its salt promoting or inhibiting the activity of a novel protein, etc.; a screening kit therefor; compounds or salts thereof obtained by the screening; drugs containing these compounds or salts thereof; and so on. These drugs are usable as, for example, angiogenesis inhibitors in preventives/remedies for cancer, ovary diseases, inflammatory diseases, diabetic retinopathy, etc.

(57) 要約:

本発明は、新規蛋白質等の活性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／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化合物またはその塩、該化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。該医薬は、例えば、血管新生阻害剤などとして、癌、卵巣疾患、炎症性疾患、糖尿病性網膜症などの予防・治療剤として使用することができる。

WO 03/066860 A1

明 細 書

血管新生阻害剤

技術分野

本発明は、（１）（i）配列番号：２１、配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩、および（ii）オーファンレセプター蛋白質である配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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を用いる血管新生阻害剤として有用な化合物またはその塩などのスクリーニング方法／キット、（２）配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性を阻害する血管新生阻害剤、（３）配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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、その製造法および用途などに関する。

背景技術

各種の分泌蛋白質を集めたライブラリーからウシ副腎毛細血管内皮細胞に対する新たな増殖因子が見出された（Nature、412巻、877-884頁、2001年）。上記物質は、既知の血管内皮細胞増殖因子VEGFとは異なり、内分泌性組織由来の内皮細胞に特異的な増殖因子であり、この性質からEG-VEGFと名づけられた。EG-VEGFは生理的には内分泌組織を特徴づける透過性の高い内皮構造（fenestrate）の形成に関与することが示唆されている。また、その遺伝子の転写制御領域には低酸素下での発現誘導に関わるhypoxia-inducible factor-1（HIF-1）の認識部位が存

在し、実際に副腎由来の癌細胞では、低酸素下でのEG-VEGF遺伝子発現誘導が確認された。さらに、ヒト多嚢胞性卵巣症候群（polycystic ovary syndrome）ではEG-VEGFの強発現が認められたとの記載がなされている。

一方、EG-VEGF（ZAQリガンドペプチドとも記載する）はオーファン受容体であるZAQに結合し、ZAQを活性化する（WO 01/16309号公報）。回腸収縮活性を有するZAQリガンドペプチド（WO 02/6483号公報）はヘビから単離されたMIT1（FEBS Letters 461巻、183-188頁、1999年）に配列上の類似性が高く、その哺乳類型ペプチドであり、ヒト型ZAQリガンドペプチドのみならず、ヘビ毒MIT1およびそのヒト型ホモログペプチドもZAQに結合し、これを活性化する。

現在、VEGF受容体の作用を抑制する化合物が、その血管新生阻害作用に基づいて抗癌剤として開発されつつあるものの、EG-VEGFが発見されて以来、VEGF作用の遮断のみでは、十分な血管新生阻害効果が現れない症例もあり得ると考えられるようになってきている。また、今後の医学研究の進展によっては、VEGFよりはむしろEG-VEGFが病態の増悪因子として作用している症例が見出される可能性があり、そのような場合にはEG-VEGF阻害剤が単体として使用されることも期待される。これまでの研究では、EG-VEGFが内皮細胞の増殖を引き起こす過程においてもZAQなどの受容体が関与しているのかどうか、または、全く異なる受容体が関与しているのか、といった点について全く明らかにされていなかった。しかしながら、EG-VEGF拮抗薬の開発には、拮抗薬探索法の簡便化および作用メカニズムの記述などの点から、その受容体について明らかにすることが必須である。また、安全で、優れた癌の血管新生阻害剤も望まれている。

発明の開示

本発明者らは、ウシ副腎毛細血管内皮細胞（BACE）を用いて研究を行い、BACEには、ZAQおよびその類縁受容体であるI5Eが発現されていることを見出した。さらに、BACEがヒト型ZAQリガンドペプチド、ヘビ毒MIT1およびそのヒト型ホモログ（ヒトBv8ペプチド）に応答して細胞内カルシウムイオンの上昇、MAPキナーゼの活性化、チミジン取り込み量の増大、細胞増殖能の増大を起こすことも見出した。これらの検討結果より、ヒト型ZAQリガンドペプチドの内皮細胞増殖因子活

性は、ZAQおよび（または）I5Eを介して引き起こされるものと結論した。このような知見に基づいて、本発明者らは、ZAQまたはI5Eの作用を遮断する化合物がEG-VEGFまたはBv8ペプチドの阻害剤となり、かつEG-VEGFまたはBv8ペプチドの阻害剤の簡便な探索法を提供することを見出し、鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

（１）　配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド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血管新生阻害剤、

（１ａ）　配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９もしくは配列番号：１３８で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド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血管新生阻害剤、

（１ｂ）　配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド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血管新生阻害剤、

（２）　配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤、

（３）　(a) 配列番号：２１、配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と (b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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を阻害する化合物またはその塩を含有し

てなる血管新生阻害剤、

（３ａ） (a) 配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と (b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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を阻害する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤、

（３ｂ） (a) 配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９もしくは配列番号：１３８で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と (b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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を阻害する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤、

（３ｃ） (a) 配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と (b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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を阻害する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤、

（４） 配列番号：２１、配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩の、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性化作用を阻害する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤、

（４ａ） 配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩の、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性化作用を阻害する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤、

（４ｂ） 配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９もしくは配列番号：１３８で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩の、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性化作用を阻害する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤、

（４ｃ） 配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩の、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性化作用を阻害する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤、

（５） 配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその部分ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列に相補的もしく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アンチセンスヌクレオチドを含有してなる血管新生阻害剤、

（６） 配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまた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血管新生阻害剤、

（７） 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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をコードするＤＮＡの塩基配列に相補的もしく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アンチセンスヌクレオチドを含有してなる血管新生阻害剤、

（８） 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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またはその塩に対する抗体を含有してなる血管新生阻害剤、

（９） 癌、多嚢胞性卵巣症候群または卵巣過剰刺激症候群の予防・治療剤である上記（１）～（８）記載のいずれかの血管新生阻害剤、

（９ａ） 癌が、内分泌組織の癌である上記（９）記載の血管新生阻害剤、

（９ｂ） 多嚢胞性卵巣症候群の予防・治療剤である上記（１）～（８）記載のいずれかの血管新生阻害剤、

（１０） (a) 配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、または (b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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をコードするポリヌクレオチドを含有してなる癌、多嚢胞性卵巣症候群または卵巣過剰刺激症候群の診断薬、

（１１） 内皮細胞を用いることを特徴とする、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（１２）　上記（１１）記載のスクリーニング方法で得られる化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤、

（１３）　(a) 配列番号：２１、配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩、および（または）(b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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を用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法、

（１３ａ）　(a) 配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩、および（または）(b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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を用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法、

（１３ｂ）　(a) 配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９もしくは配列番号：１３８で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩、および（または）(b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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を用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法、

（１３ｃ）　(a) 配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩、および（または）(b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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を用いることを特徴とする血管新生阻害剤

のスクリーニング方法、

（１４） (a) 配列番号：２１、配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩、および（または） (b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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を含有することを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング用キット、

（１５） (a) 配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、および（または） (b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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をコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法、

（１５ａ） (a) 配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９もしくは配列番号：１３８で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、および（または） (b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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をコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法、

（１５ｂ） (a) 配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、および（または） (b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５

４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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をコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法、

（１６） (a) 配列番号：２１、配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、および（または） (b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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またはその塩に対する抗体を用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法、

（１７） 上記（１３）、（１５）もしくは（１６）記載のスクリーニング方法または上記（１４）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる血管新生阻害剤、

（１８） 内皮細胞増殖阻害作用を有する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤、

（１９） 配列番号：１７１もしくは配列番号：１３７で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩、

（２０） 配列番号：１７１で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質またはその塩、

（２１） 配列番号：１３７で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質またはその塩、

（２２） 上記（１９）記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、

（２３） 上記（１９）記載の蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

（２４） ＤＮＡである上記（２３）記載のポリヌクレオチド、

（２５） 配列番号：１７２または配列番号：１７４で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド、

（２６） 上記（２４）記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

（２７） 上記（２６）記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

（２８） 上記（２７）記載の形質転換体を培養し、上記（１９）記載の蛋白質を生成・蓄積せしめることを特徴とする上記（１９）記載の蛋白質またはその塩の製造法、

（２９） 上記（１９）記載の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、

（３０） 上記（２９）記載の抗体を含有してなる医薬、

（３１） 上記（２９）記載の抗体を含有してなる診断薬、

（３２） 上記（１９）記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記（１９）記載の蛋白質またはその塩の活性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、

（３３） 上記（１９）記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、上記（１９）記載の蛋白質またはその塩の活性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用キット、

（３４） 上記（３２）記載のスクリーニング方法または上記（３３）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記（１９）記載の蛋白質またはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

（３５） 上記（３４）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（３６） 哺乳動物に対して、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする血管新生阻害方法、

（３７） 血管新生阻害剤を製造するための、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一または実

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の活性を阻害する化合物またはその塩の使用、

（３８） 哺乳動物に対して、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする癌、多嚢胞性卵巣症候群または卵巣過剰刺激症候群の予防・治療方法、

（３９） 癌、多嚢胞性卵巣症候群または卵巣過剰刺激症候群の予防・治療剤を製造するための、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性を阻害する化合物またはその塩の使用などを提供する。

図面の簡単な説明

図１は、参考例４で行われたヒト型Bv8ペプチドおよびMIT1のZAQ受容体活性化作用の測定結果を示す。図中、－○－はヒト型Bv8ペプチドを、－●－はMIT1を示す。

図２は、参考例４で行われたヒト型Bv8ペプチドおよびMIT1のI5E受容体活性化作用の測定結果を示す。図中、－○－はヒト型Bv8ペプチドを、－●－はMIT1を示す。

図３は、参考例１１（３）で行われた、精製ZAQリガンドペプチドのZAQ活性化作用の測定結果を示す。

図４は、参考例１３（３）で行われたヒト型ZAQリガンドペプチドおよびMIT1のZAQ受容体活性化作用の測定結果を示す。図中、－○－はヒト型ZAQリガンドペプチドを、－●－はＭＩＴ１を示す。

図５は、参考例１３（３）で行われたヒト型ZAQリガンドペプチドおよびMIT1のI5E受容体活性化作用の測定結果を示す。図中、－○－はヒト型ZAQリガンドペ

プチドを、－●－はMIT1を示す。

図６は、実施例２で行われたウシ副腎毛細血管内皮細胞（BACE）およびウシ大動脈血管内皮細胞（BAE）におけるウシ型ZAQおよびウシ型I5E mRNAのTaqMan PCR法による定量結果を示す。図中、□はtotal RNA 1 ngあたりのウシ型ZAQ mRNAのコピー数を、また、■は同様にウシ型I5E mRNAのコピー数を示す。

図７は、実施例３で行われたBACEを用いたFLIPRによる細胞内カルシウムイオン濃度上昇活性の測定の結果を示す。図中、－●－は、ヒト型ZAQリガンドペプチドを、－▲－はヒト型Bv8ペプチドを、－■－はMIT1を示す。

図８は、実施例３で行われたBACEにおけるp42 MAPキナーゼおよびp44 MAPキナーゼの活性化に及ぼすZAQ関連ペプチドの用量反応性の結果を示す。図中、Cはリガンド（溶液）を投与しないコントロールを、MはMIT1を、L1はヒト型ZAQリガンドペプチドを、L2はヒト型Bv8ペプチドをそれぞれ図中に示した濃度で添加したことを示す。また、p44 MAPK-Pはリン酸化されたp44 MAPキナーゼのバンドを、またp42 MAPK-Pはリン酸化されたp42 MAPキナーゼのバンドを示す。

図９は、実施例３で行われたBACEにおけるp38 MAPキナーゼの活性化に及ぼすZAQ関連ペプチドの用量反応性の結果を示す。図中、Cはリガンド（溶液）を投与しないコントロールを、MはMIT1を、L1はヒト型ZAQリガンドペプチドを、L2はヒト型Bv8ペプチドをそれぞれ図中に示した濃度で添加したことを示す。また、p38 MAPK-Pはリン酸化されたp38 MAPキナーゼのバンドを示す。

図１０は、BACEにおける[^{3}H]チミジン取り込みに及ぼすペプチドの用量反応性の結果を示す。図中、－●－は、ヒト型ZAQリガンドペプチドを、－▲－はヒト型Bv8ペプチドを、－■－はMIT1を示す。

図１１は、BACEの増殖に及ぼすヒト型ZAQリガンドペプチドおよびヒト型Bv8ペプチドの影響を示す。縦軸は、１ウエルあたりのBACEの細胞数を示す。横軸のZAQL-1は、ヒト型ZAQリガンドペプチドを、ZAQL-2は、ヒト型Bv8ペプチドを示す。＊はStudent's t test 検定から得られたp値が0.05より小さいことを、＊＊は同様に、p値が0.001より小さいことを示す。

発明を実施するための最良の形態

配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩（以下、本発明のペプチドと略記することがある）は、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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（以下、本発明の蛋白質と略記することがある）と結合する能力を有するペプチドまたはその塩であり、本発明の蛋白質と結合し、本発明の蛋白質を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩である。本発明のペプチドの本発明の蛋白質と結合する能力および本発明の蛋白質を活性化する能力は、後述の方法により測定することができる。

本発明のペプチドは、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、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、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、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞（例えば、MEL、M1、CTLL-2、HT-2、WEHI-3、HL-60、JOSK-1、K562、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など）、また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、嗅球、扁頭核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳染、黒質）、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、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来するペプチドであってもよく、また合成ペプチドで

あってもよい。

本発明のペプチドがシグナル配列を有している場合は、該ペプチドを効率良く細胞外に分泌させることができる。

配列番号：８１または配列番号：８２で表わ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：８１または配列番号：８２で表されるアミノ酸配列と約６０％以上（好ましくは約７０％以上、さらに好ましくは約８０％以上、より好ましくは約８５％以上、特に好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上）の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：８１または配列番号：８２で表わ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ペプチドとしては、例えば、配列番号：８１または配列番号：８２で表わ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し、配列番号：８１または配列番号：８２で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の性質を有するペプチドなどが好ましい。

以下、配列番号：８１または配列番号：８２で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドと記載することがある。

配列番号：８１または配列番号：８２で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとしては、例えば、配列番号：８１または配列番号：８２で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：８１または配列番号：８２で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ましく、具体的には配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：８３または配列番号：８４で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチド等が挙げられる。

以下、配列番号：８３または配列番号：８４で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドと記載することがある。

配列番号：１０９で表わ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：１０９で表されるアミノ酸配列と９５％以上（好ましくは約９７％以上、さらに好ましくは約９９％以上）の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：１０９で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を

含有するペプチドとしては、例えば、配列番号：１０９で表わ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し、配列番号：１０９で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ましい。

以下、配列番号：１０９で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをマウス型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドと記載することがある。

配列番号：１０９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとしては、例えば、配列番号：１０９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：１０９で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ましく、具体的には配列番号：１０９または配列番号：１０７で表わされるアミノ酸配列を有するペプチド等が挙げられる。

以下、配列番号：１０７で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをマウス型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドと記載することがある。

配列番号：１３８で表わ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：１３８で表されるアミノ酸配列と９５％以上（好ましくは約９７％以上、さらに好ましくは約９９％以上）の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：１３８で表わ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ペプチドとしては、例えば、配列番号：１３８で表わ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し、配列番号：１３８で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ましい。配列番号：１３８で表わ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ペプチドとして具体的には、配列番号：１４０で表されるアミノ酸配列を含有するペプチド、配列番号：１４２で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドなどが挙げられる。

以下、配列番号：１３８、配列番号：１４０または配列番号：１４２で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをラット型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドと記載することがある。

配列番号：１３８で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとして具体的には配列番号：１３２、配列番号：１３４または配列番号：１３６で表わされるアミノ酸配列を有するペプチド等も挙げられる。

以下、配列番号：１３２、配列番号：１３４または配列番号：１３６で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをラット型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドと記載することがある。

配列番号：１９または配列番号：３９で表わ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または配列番号：３９で表されるアミノ酸配列と約６０％以上（好ましくは約７０％以上、さらに好ましくは約８０％以上、より好ましくは約８５％以上、特に好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上）の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：１９または配列番号：３９で表わ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ペプチドとしては、例えば、配列番号：１９または配列番号：３９で表わ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し、配列番号：１９または配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ましい。

以下、配列番号：１９で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをヒト型Ｂｖ８成熟体ペプチド、配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをラット型Ｂｖ８成熟体ペプチドまたはマウス型Ｂｖ８成熟体ペプチドと記載することがある。

配列番号：１９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとしては、例えば、配列番号：１９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：１９で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ましく、具体的には配列番号：１７または配列番号：１９で表わされるアミノ酸配列を有するペプチド等が挙げられる。

配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとしては、例えば、配列番号：３９で表わされるアミ

ノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ましく、具体的には配列番号：３７、配列番号：３９または配列番号：５５で表わされるアミノ酸配列を有するペプチド等が挙げられる。

以下、配列番号：１７で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをヒト型Ｂｖ８前駆体ペプチドと記載することがある。配列番号：３７で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをラット型Ｂｖ８前駆体ペプチドと記載することがある。配列番号：５５で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをマウス型Ｂｖ８前駆体ペプチドと記載することがある。

配列番号：２１で表わ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：２１で表されるアミノ酸配列と約６０％以上（好ましくは約７０％以上、さらに好ましくは約８０％以上、より好ましくは約８５％以上、特に好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上）の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：２１で表わ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ペプチドとしては、例えば、配列番号：２１で表わ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し、配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ましい。

以下、配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをＭＩＴ１と記載することがある。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明の蛋白質に対する結合活性、本発明の蛋白質を介する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、本発明の蛋白質に対する結合活性、本発明の蛋白質を介するシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約０．５～２倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やペプチドの分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

これらの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法などに従って測定することができる。

また、本発明のペプチドとしては、（ｉ）配列番号：８１、配列番号：８２、

配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９または配列番号：３９で表されるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～２０個程度）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、（ii）配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９または配列番号：３９で表されるアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～４０個程度、より好ましくは１～３０個程度、なかでも好ましくは１～２０個程度）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、（iii）配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９または配列番号：３９で表されるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～４０個程度、より好ましくは１～３０個程度、なかでも好ましくは１～２０個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または（iv）それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するペプチドなども用いられる。

本発明のペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：８１で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来のペプチド、配列番号：８２で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来のペプチド、配列番号：１０９で表わされるアミノ酸配列を含有するマウス由来のペプチド、配列番号：１３８で表わされるアミノ酸配列を含有するラット由来のペプチド、配列番号：１４０で表わされるアミノ酸配列を含有するラット由来のペプチド、配列番号：１４２で表わされるアミノ酸配列を含有するラット由来のペプチド、配列番号：１９で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来のペプチド、配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列を含有するラット由来またはマウス由来のペプチドなどがあげられる。

本発明のペプチドの部分ペプチドとしては、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ものであれば、いかなるものであってもよく、本発明のペプチドと実質的に同質の活性を有していればよい。該部分ペプチドのアミノ酸の数は、本発明のペプチドの構成アミノ酸配列のうち少なくとも１０個以上、好ましくは２０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。

該部分ペプチドとしては、（i）上記アミノ酸配列中の１または２個以上（好

ましくは数個（１～４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（好ましくは数個（１～４個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

以下、本発明のペプチドとの本発明のペプチドの部分ペプチドとをまとめて本発明のペプチドと称することがある。

本発明の蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、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、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、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞（例えば、MEL、M1、CTLL-2、HT-2、WEHI-3、HL-60、JOSK-1、K562、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など）、また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、嗅球、扁頭核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳染、黒質）、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、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

本発明の蛋白質がシグナル配列を有している場合は該ペプチドまたは蛋白質を効率良く細胞外に分泌させることができる。

配列番号：１で表わ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：１で表わされるアミノ酸配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：１で表わ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としては、例えば、配列番号：１で表わ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し、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

本発明の配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：１で表わ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。具体的にはＷＯ ０１／１６３０９に記載の蛋白質などが挙げられる。

以下、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質をＺＡＱまたはヒトＺＡＱと記載することがある。

配列番号：４４で表わ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：４４で表わされるアミノ酸配列と約９７％以上、好ましくは約９８％以上、より好ましくは約９９％以上、最も好ましくは約９９．５％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：４４で表わ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する蛋白質としては、例えば、配列番号：４４で表わ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：４４で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質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：４４で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：４４で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：４４で表わ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：５１で表わ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：５１で表わされるアミノ酸配列と約９５％以上、好ましくは約９６％以上、より好ましくは約９７％以上、最も好ましくは約９８％以

上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：５１で表わ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する蛋白質としては、例えば、配列番号：５１で表わ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：５１で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質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：５１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：５１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：５１で表わ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：５２で表わ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：５２で表わされるアミノ酸配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：５２で表わ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する蛋白質としては、例えば、配列番号：５２で表わ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：５２で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質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：５２で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：５２で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：５２で表わ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く、具体的にはＷＯ ９８／４６６２０に記載の蛋白質などが挙げられる。

以下、配列番号：５２で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質をＩ５Ｅまたはヒト型Ｉ５Ｅなどと記載することがある。

配列番号：５３で表わ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：５３で表わされるアミノ酸配列と約９５％以上、好ましくは約９６％以上、より好ましくは約９７％以上、最も好ましくは約９８％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：５３で表わ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

する蛋白質としては、例えば、配列番号：５３で表わ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：５３で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質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：５３で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：５３で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：５３で表わ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く、具体的には、Biochem. Biophys. Acta, 1491巻, 369-375頁, 2000年に記載の蛋白質などが挙げられる。

配列番号：５４で表わ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：５４で表わされるアミノ酸配列と約９５％以上、好ましくは約９６％以上、より好ましくは約９７％以上、最も好ましくは約９８％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：５４で表わ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する蛋白質としては、例えば、配列番号：５４で表わ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：５４で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質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：５４で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：５４で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：５４で表わ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く、具体的にはＷＯ ９８／４６６２０に記載の蛋白質などが挙げられる。

配列番号：１７１で表わ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：１７１で表わされるアミノ酸配列と９５％以上、好ましくは約９７％以上、より好ましくは約９９％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：１７１で表わ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としては、例えば、配列番号：１７１で表わ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し、配列番号：１７１で表わされるアミノ

酸配列を有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

本発明の配列番号：１７１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：１７１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：１７１で表わ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。

以下、配列番号：１７１で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質をウシ型ＺＡＱと記載することがある。

配列番号：１７３で表わ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：１７３で表わされるアミノ酸配列と９５％以上、好ましくは約９７％以上、より好ましくは約９９％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：１７３で表わ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としては、例えば、配列番号：１７３で表わ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し、配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

本発明の配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：１７３で表わ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。

以下、配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質をウシ型Ｉ５Ｅと記載することがある。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のペプチドに対する結合活性、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、本発明のペプチドに対する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０．５～２倍）であることが好ましいが、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いてもよい。

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。

さらに、本発明の蛋白質としては、（i）配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１または配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（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または２個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、（ii）配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１または配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列に１または２個以上（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または２個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、（iii）配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１または配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（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または２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、または（iv）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。

本発明の蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：１または配列番号：５２で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト脳由来）の蛋白質、配列番号：４４または配列番号：５１で表わされるアミノ酸配列を含有するラット由来の蛋白質、配列番号：５３または配列番号：５４で表わされるアミノ酸配列を含有するマウス由来の蛋白質、配列番号：１７１または配列番号：１７３で表されるアミノ酸配列を含有するウシ由来の蛋白質などがあげられる。

本発明の蛋白質の部分ペプチド（以下、本発明の部分ペプチドと略記する場合がある）としては、前記した本発明の蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、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を有するものなどが用いられる。

具体例として、本発明の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良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した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。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約５０％以上、好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上、さらに好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質のリガンド結合活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質のリガンド結合活性」の測定は自体公知の方法に準じて行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１または配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列中の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または２個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に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または２個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の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１～５個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、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、蓚酸、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。

本明細書におけるペプチドおよび蛋白質は、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。配列番号：４７で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をはじめとする本発明の蛋白質は、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート(-COO^-）、アミド（-$CONH_2$）またはエステル（-COOR）であってもよい。

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}アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC_{3-8}シクロアルキル基、例えば、フェニル、α－ナフチルなどのC_{6-12}アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル－C_{1-2}アルキル基もしくはα－ナフチルメチルなどのα－ナフチル－C_{1-2}アルキル基などのC_{7-14}アラルキル基のほか、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基などが用いられる。

本発明のペプチドおよび本発明の蛋白質（本発明のペプチド・蛋白質）がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基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ペプチド・蛋白質に含まれる。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、本発明のペプチド・蛋白質には、上記したペプチド・蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC_{2-6}アルカノイル基などのC_{1-6}アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル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、ホルミル基、アセチル基などのC_{2-6}アルカノイル基などのC_{1-6}アシル基など）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ペプチド・糖蛋白質などの複合ペプチド・複合蛋白質なども含まれる。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が、カルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO^-）、アミド（-$CONH_2$）またはエステル（-COOR）であってもよい。本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレ

ート）を有している場合、カルボキシル基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、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明の蛋白質と同様に、Ｎ末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、Ｎ端側が生体内で切断され生成したＧｌｎ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が適当な保護基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ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のペプチドもしくは蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のペプチド・蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１４０、配列番号：１４２、配列番号：１９、配列番号：３９、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１または配列番号：１７３で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド・蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。さらに、配列番号：５３で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質またはその塩は、Biochem. Biophys. Acta, 1491巻, 369-375頁, 2000年に記載の方法に準じて製造できる。配列番号：５２または配列番号：５４で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質またはその塩は、WO 98/46620に記載の方法に準じて製造できる。

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。

本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはそれらのアミド体またはそれらの塩の合成には、通常市販のペプチド・蛋白質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挙げることができる。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、目的とするペプチド・蛋白質の配列通りに、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ペプチド・蛋白質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、目的のペプチド・蛋白質またはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ペプチド・蛋白質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。

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、ペプチド・蛋白質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。反応温度は蛋白質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℃～５０℃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ができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Ｂｏｃ、ターシャリー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。

カルボキシル基は、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、ターシャリーブチル、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、ターシャリー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、Ｂｚｌ、Cl_2－Ｂｚｌ、２－ニトロベンジル、Ｂｒ－Z、ターシャリー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－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。

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。

ペプチド・蛋白質のアミド体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ペプチド・蛋白質とＣ末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したペプチド・蛋白質とを製造し、この両ペプチド・両蛋白質を上記し

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ペプチド・保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチド・粗蛋白質を得ることができる。この粗ペプチド・粗蛋白質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ペプチド・蛋白質のアミド体を得ることができる。

ペプチド・蛋白質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、ペプチド・蛋白質のアミド体と同様にして、所望のペプチド・蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明のペプチドおよび本発明の蛋白質は、自体公知のペプチドの合成法に従って製造することができる。また、本発明の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質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、本発明のペプチドもしくは本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドまた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（i）～（v）に記載された方法が挙げられる。

（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)

（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、 蛋白質の化学IV、205、(1977年)

（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、反応後は通常の精製法、たとえば、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ペプチ

ドまたは本発明の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ペプチドまたは部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の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、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質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。好ましくはＤＮＡである。ＤＮＡとしては、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。

具体的には、配列番号：８１で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：８７で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：８７で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡを有し、配列番号：８１で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性（例、本発明の蛋白質に対する結合活性、本発明の蛋白質を介するシグナル情報伝達作用など）を有するペプチドをコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：８７で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとしては、配列番号：８７または配列番号：８９で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ等が挙げられる。

配列番号：８７で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配列番号：８７で表わされる塩基配列と約６０％以上、好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

具体的には、配列番号：８２で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコ

ードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：８８で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：８８で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡを有し、配列番号：８２で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性（例、本発明の蛋白質に対する結合活性、本発明の蛋白質を介するシグナル情報伝達作用など）を有するペプチドをコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：８８で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとしては、配列番号：８８または配列番号：９０で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ等が挙げられる。

配列番号：８８で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配列番号：８８で表わされる塩基配列と約６０％以上、好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

具体的には、配列番号：１０９で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：１１０で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：１１０で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡを有し、配列番号：１０９で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性（例、本発明の蛋白質に対する結合活性、本発明の蛋白質を介するシグナル情報伝達作用など）を有するペプチドをコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：１１０で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとしては、配列番号：１１０または配列番号：１０８で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ等が挙げられる。

配列番号：１１０で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配列番号：１１０で表わされる塩基配列と９５％以上、好ましくは約９７％以上、より好ましくは約９９％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

具体的には、配列番号：１３８、配列番号：１４０または配列番号：１４２で

表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：１３９、配列番号：１４１または配列番号：１４３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：１３９、配列番号：１４１または配列番号：１４３で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡを有し、配列番号：１３８、配列番号：１４０または配列番号：１４２で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性（例、本発明の蛋白質に対する結合活性、本発明の蛋白質を介するシグナル情報伝達作用など）を有するペプチドをコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：１３９、配列番号：１４１または配列番号：１４３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとしては、配列番号：１３３、配列番号：１３５、配列番号：１３７、配列番号：１３９、配列番号：１４１または配列番号：１４３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ等が挙げられる。

配列番号：１３９、配列番号：１４１または配列番号：１４３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配列番号：１３９、配列番号：１４１または配列番号：１４３で表わされる塩基配列と９５％以上、好ましくは約９７％以上、より好ましくは約９９％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

具体的には、配列番号：１９で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２０で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：２０で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡを有し、配列番号：１９で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性（例、本発明の蛋白質に対する結合活性、本発明の蛋白質を介するシグナル情報伝達作用など）を有するペプチドをコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：２０で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとしては、配列番号：２０または配列番号：１８で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ等が挙げられる。

配列番号：２０で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２０で表わされる塩基配列と９５％以上、好ましくは約９７％以上、より好ましくは約９９％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

具体的には、配列番号：３９で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：４０または配列番号：５７で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：４０または配列番号：５７で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡを有し、配列番号：３９で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性（例、本発明の蛋白質に対する結合活性、本発明の蛋白質を介するシグナル情報伝達作用など）を有するペプチドをコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：４０または配列番号：５７で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとしては、配列番号：３８、配列番号：４０、配列番号：５６または配列番号：５７で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ等が挙げられる。

配列番号：４０または配列番号：５７で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配列番号：４０または配列番号：５７で表わされる塩基配列と９５％以上、好ましくは約９７％以上、より好ましくは約９９％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

また、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡ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（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配

列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

配列番号：４４で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：４３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：４３で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡを有し、配列番号：４４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（例、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：４３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配列番号：４３で表わされる塩基配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

配列番号：５１で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：５０で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：５０で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡを有し、配列番号：５１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（例、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：５０で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配列番号：５０で表わされる塩基配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

配列番号：５２で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：６で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：６で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡを有し、配列番号：６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（例、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：６で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配列番号：６で表わされる塩基配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

配列番号：５３で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：６３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：６３で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡを有し、配列番号：６３で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と実質的に同質の活性（例、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：６３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配列番号：６３で表わされる塩基配列と約９５％以上、好ましくは約９７％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

配列番号：５４で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：６４で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：６４で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡを有し、配列番号：６４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（例、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：６４で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配列番号：６４で表わされる塩基配列と約９５％以上、好ましくは約９７％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

配列番号：１７１で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：１７２で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：１７２で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡを有し、配列番号：１７１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（例、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：１７２で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配列番号：１７２で表わされる塩基配列と９５％以上、好ましくは約９７％以上、より好ましくは約９９％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

配列番号：１７３で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：１７４で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：１７４で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡを有し、配列番号：１７３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（例、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：１７４で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配列番号：１７４で表わされる塩基配列と９５％以上、好ましくは約９７％以上、より好ましくは約９９％以上の相同性を有する塩基配列を含有する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、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。より好ましくは、ハイストリン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１９～４０ｍ

M、好ましくは約１９～２０mMで、温度が約５０～７０℃、好ましくは約６０～６５℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約１９mMで温度が約６５℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：８１で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：８７で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：８２で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：８８で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：８３で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：８９で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：８４で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：９０で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：１０９で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：１１０で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：１０７で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：１０８で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：１３８で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：１３９で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：１４０で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：１４１で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：１４２で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：１４３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：１３２で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：１３３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：１３４で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：１３５で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：１３６で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：１３７で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：１９で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードす

るＤＮＡとしては、配列番号：２０で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：１７で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：１８で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：４０または配列番号：５７で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：３７で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：３８で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：５５で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：５６で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられる。

また、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：４４で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、配列番号：４３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：５１で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、配列番号：５０で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：５２で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、配列番号：６で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：５３で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、配列番号：６３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：５４で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、配列番号：６４で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：１７１で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、配列番号：１７２で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするＤＮＡとしては、配列番号：１７４で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられる。

本発明のペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるヌクレオチド（オリゴヌクレオチド）とは、本発明のペプ

チドをコードするＤＮＡを包含するだけではなく、ＲＮＡをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、本発明のペプチドの遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・（オリゴ）ヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定されたペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうした（オリゴ）ヌクレオチド（核酸）は、本発明のペプチドの遺伝子のＲＮＡとハイブリダイズすることができ、該ＲＮＡの合成又は機能を阻害することができるか、あるいは本発明のペプチド関連ＲＮＡとの相互作用を介して本発明のペプチドの遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のペプチド関連ＲＮＡの選択された配列に相補的な（オリゴ）ヌクレオチド、及び本発明のペプチド関連ＲＮＡと特異的にハイブリダイズすることができる（オリゴ）ヌクレオチドは、生体内及び生体外で本発明のペプチドの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又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、塩基配列又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、塩基配列又は核酸とペプチドとの間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチドのアミノ酸を通常指している。本発明のペプチドの遺伝子の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、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ＯＲＦ翻訳終止コドン、３’端非翻訳領域、３’端パリンドローム領域、及び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、本発明のペプチドの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（オリゴ）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（オリゴ）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・（オリゴ）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デオキシヌクレオチド、Ｄ－リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又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、市販の蛋白質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又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ナ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、２本鎖ＤＮＡ、１本鎖ＤＮＡ、２本鎖ＲＮＡ、１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又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、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（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、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）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」及び「核酸」とは、プリン及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及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、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及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核酸は、ＲＮＡ、ＤＮＡ、あるいは修飾された核酸である。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核酸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核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸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核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして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核酸は、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うる。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、ホスホリピッド、コレステロールなど）といった粗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うる。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。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは蛋白質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。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明の部分ペプチドをコードするＤＮＡとしては、前述した本発明の部分ペ

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。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ｍＲＮＡ画分を調製したものを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reactionによって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２、配列番号：３、配列番号：４３、配列番号：５０、配列番号：６、配列番号：６３、配列番号：６４、配列番号：１７２または配列番号：１７４で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡの部分塩基配列を有するＤＮＡ、または（ii）配列番号：２、配列番号：３、配列番号：４３、配列番号：５０、配列番号：６、配列番号：６３、配列番号：６４、配列番号：１７２または配列番号：１７４で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ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ＤＮＡを有し、本発明の蛋白質と実質的に同質の活性（例、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードする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、配列番号：３、配列番号：４３、配列番号：５０、配列番号：６、配列番号：６３、配列番号：６４、配列番号：１７２または配列番号：１７４で表わされる塩基配列を有するＤＮＡ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ＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２、配列番号：３、配列番号：４３、配列番号：５０、配列番号：６、配列番号：６３、配列番号：６４、配列番号：１７２または配列番号：１７４で表わされる塩基配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

本発明の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、本発明のペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列の部分塩基配列を有する合成ＤＮＡプライマーを用いて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と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。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチド（以下、本発明の蛋白質と略記する）を完全にコードするＤＮＡのクローニングも本発明のペプチドを完全にコードするＤＮＡのクローニングと同様にして行うことができる。

ＤＮＡの塩基配列の変換は、ＰＣＲや公知のキット、例えば、Mutan™-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan™-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法、Gupped duplex法、Kunkel法等の自体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。

クローン化されたペプチド・蛋白質をコードする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、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。

本発明のペプチド・蛋白質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のペプチド・蛋白質をコードするＤＮＡから目的とするＤＮＡ断片を切り出し、（ロ）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、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、レトロウイルス，ワクシニアウイルス，バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、ｐＡ１－１１、ｐＸＴ１、ｐＲｃ／ＣＭＶ、ｐＲｃ／ＲＳＶ、ｐｃＤＮＡＩ／Ｎｅｏ、ｐｃＤＮＡ３．１、ｐＲ

ｃ／ＣＭＶ２、ｐＲｃ／ＲＳＶ（Invitrogen社）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、ＳＲα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、ＨＳＶ-ＴＫプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、ＣＭＶプロモーター、ＳＲα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、λP_Lプロモーター、ｌｐｐプロモーターなどが、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。

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、Ｎｅｏ^{r}と略称する場合がある、Ｇ４１８耐性）等が挙げられる。特に、ＣＨＯ（ｄｈｆｒ$^-$）細胞を用いてｄｈｆｒ遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、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、本発明の蛋白質の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、ＭＦα・シグナル配列、ＳＵＣ２・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。

このようにして構築された本発明のペプチド・蛋白質をコードする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。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）Ｋ１２・ＤＨ１〔プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. . Sci. USA），６０巻，１６０（１９６８）〕，ＪＭ１０３〔ヌクイレック・アシッズ・リサーチ（Nucleic Acids Research），９巻，３０９（１９８１）〕，ＪＡ２２１〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Journal of Molecular Biology），１２０巻，５１７（１９７８）〕，ＨＢ１０１〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー，４１巻，４５９（１９６９）〕，Ｃ６００〔ジェネティックス（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・サチルス（Bacillus subtilis）ＭＩ１１４〔ジーン，２４巻，２５５（１９８３）〕，２０７－２１〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（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 cerevisiae）ＡＨ２２，ＡＨ２２Ｒ⁻，ＮＡ８７－１１Ａ，ＤＫＤ－５Ｄ，２０Ｂ－１２、シゾサッカロマイセス　ポンベ（Schizosaccharomyces pombe）ＮＣＹＣ１９１３，ＮＣＹＣ２０３６、ピキア　パストリス（Pichia pastoris）などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがＡｃＮＰＶの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞（Spodoptera frugiperda cell；Ｓｆ細胞）、Trichoplusia niの中腸由来のＭＧ１細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five™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。ウイルスがＢｍＮＰＶの場合は、蚕由来株化細胞（Bombyx mori N；ＢｍＮ細胞）などが用いられる。該Ｓｆ細胞としては、例えば、Ｓｆ９細胞（ATCC CRL1711）、

Ｓｆ２１細胞（以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ（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、ネイチャー（Nature），３１５巻，５９２(１９８５)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞ＣＯＳ－７，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。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA），６９巻，２１１０(１９７２)やジーン（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、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス（Molecular & General 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、メッソズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymology），１９４巻，１８２－１８７（１９９１）、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（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。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー（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．２６３２-６７（１９９５）（秀潤社発行）、ヴィロロジー（Virology），５２巻，４５６(１９７３)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、G蛋白質共役型蛋白質をコードする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が得られる。

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、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挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生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〔ミラー（Miller），ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス（Journal of Experiments in 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３～２４時間行ない、必要により、通気や撹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、必要により通気や撹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、バークホールダー（Burkholder）最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. 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、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. . Sci. USA），８１巻，５３３０（１９８４）〕が挙げられる。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撹拌を加える。

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., ネイチャー (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撹拌を加える。

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〔サイエンス (Science), １２２巻, ５０１(１９５２)〕, ＤＭＥＭ培地〔ヴィロロジー (Virology), ８巻, ３９６(１９５９)〕, ＲＰＭＩ １６４０培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) １９９巻, ５１９(１９６７)〕, １９９培地〔プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (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撹拌を加える。

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に本発明のペプチド・蛋白質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のペプチド・蛋白質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。

本発明のペプチド・蛋白質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蛋白質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。培養液中にペプチド・蛋白質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ペプチド・蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に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。

かくして得られるペプチド・蛋白質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ペプチド・蛋白質を、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、ペプチド・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。

かくして生成する本発明のペプチドの活性は、標識した本発明のペプチドと本発明の蛋白質との結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

また、生成する本発明の蛋白質の活性は、標識した本発明のペプチドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

また、本発明のペプチドは、遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、レドックスバッファー中でリフォールディングして活性型のペプチドとして製造してもよい。詳細を以下に述べる。

本発明のペプチドが宿主原核細胞中で不溶成分（封入体）を形成する場合には、培養後、遠心分離等の方法により集菌した後、細胞を破砕し、封入体を変性剤を

用いて可溶化することによって、本発明のペプチドを抽出することができる。

細胞の破砕は、常法で、たとえば超音波処理により実施できる。懸濁媒体として中性付近のｐＨ値（ｐＨ６．５～７．５）に調整した好適な緩衝液（例えばリン酸緩衝液等）を用いることが好ましい。この際、細胞の破砕を促進させるためＥＤＴＡを添加してもよい。このようにして細胞を破砕した後に、不溶成分（封入体）を任意の方法で、遠心分離するか、濾過することにより分取する。原核細胞由来の蛋白質をできる限り除去するため、たとえば水、リン酸緩衝液を用いて洗浄することが好ましいが、場合により４Ｍ程度の尿素で洗浄してもよい。

得られた沈殿（ペレット）を変性剤を用いて可溶化する際の変性剤としては、公知の変性剤、特にグアニジンまたは尿素等を使用することができる。変性剤は通常水溶液として用いられ、水溶液中の変性剤の濃度は、グアニジンでは４～８モル／リットル、好ましくは約６～７モル／リットル、尿素では５～９モル／リットル、好ましくは約８モル／リットルである。グアニジンは通常グアニジン塩酸塩等のグアニジンの酸付加塩として用いられる。

本発明のペプチドが宿主原核細胞中で封入体を形成しない場合には、培養後、遠心分離等の方法により集菌した後、細胞を変性剤を用いて可溶化するか、あるいは細胞を破砕後変性剤で可溶化することによって本発明のペプチドを抽出することができる。

集菌した細胞の可溶化に用いられる変性剤としては、例えばグアニジンまたは尿素などが挙げられる。変性剤は通常水溶液として用いられ、水溶液中の変性剤の濃度は、グアニジンでは通常４～８モル／リットル、好ましくは約６～７モル／リットルである。グアニジンは通常グアニジン塩酸塩等のグアニジンの酸付加塩として用いられる。

細胞の破砕は、常法で、たとえば超音波処理、フレンチ・プレスにより実施できる。破砕された細胞の可溶化に用いられる変性剤としては、公知の変性剤を使用してよく、好ましくは、グアニジンまたは尿素などを使用する。変性剤は通常、水溶液として用いられ、水溶液中の変性剤の濃度は、グアニジンでは４～８モル／リットル、好ましくは約６～７モル／リットル、尿素では５～９モル／リットル、好ましくは約８モル／リットルである。グアニジンは通常グアニジン塩酸塩

等のグアニジンの酸付加塩として用いられる。

上記のようにして封入体の可溶化を行うか、菌体を変性剤で直接可溶化するか、または細胞を破砕後変性剤で可溶化した後、遠心分離等で不純物を除去し、得られた上澄液を必要により精製工程に付した後、本発明のペプチドのリフォールディング（活性化、再生化）を行う。

リフォールディングは、精製した本発明のペプチドにレドックスバッファーを添加するか、または本発明のペプチドを含有する上澄液をレドックスバッファーで希釈することにより行われる。

レドックスバッファーとしては、酸化型グルタチオン（ＧＳＳＧ）および還元型グルタチオン（ＧＳＨ）を含有する緩衝液、システインおよびシスチンを含有する緩衝液、システアミンおよびシスタミンを含有する緩衝液などが挙げられる。中でもＧＳＳＧおよびＧＳＨを含有する緩衝液が好ましい。上記緩衝液としては、例えば、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液等が挙げられ、中でもトリス緩衝液等が好ましい。

レドックスバッファー中の酸化剤（酸化型物質）および還元剤（還元型物質）の濃度は、例えば、それぞれ０．０１～１００ミリモル／リットルおよび０．０１～１００ミリモル／リットルである。より具体的には、ＧＳＳＧおよびＧＳＨを用いる場合、レドックスバッファー中のＧＳＳＧの濃度は０．０１～１００ミリモル／リットル、好ましくは０．１～１０ミリモル／リットル、好ましくは０．１～１．０ミリモル／リットルが用いられ、ＧＳＨの濃度は０．０１～１００ミリモル／リットル、好ましくは０．１～１０ミリモル／リットル、好ましくは０．２～２．０ミリモル／リットルが用いられる。

この際、たとえばメルカプト基を有さないアミノ酸などをレドックスバッファーにさらに含有させておくことが好ましい。本発明のペプチドを含有する上澄液をレドックスバッファーで希釈する場合、変性剤の濃度を活性化に適した中性ｐＨにおいて不作用濃度まで希釈することが好ましい。たとえば変性剤としてグアジニンを使用する場合、希釈液中のグアニジンの濃度を０～２．０モル／リットル、好ましくは約１モル／リットル以下まで、変性剤として尿素を使用する場合、希釈液中の尿素の濃度を０～４．０モル／リットル、好ましくは約２モル／リッ

トル以下まで希釈することが望ましい。

上記メルカプト基を有さないアミノ酸としては、例えばアルギニン、アスパラギン酸、バリン、リジン、アラニン、シトルリン等が挙げられる。アルギニン等が収率の点で好ましい。レドックスバッファー中の該アミノ酸の添加濃度は、０．１～１．０モル／リットル、好ましくは０．２～０．８モル／リットルである。

上記リフォールディングに当っての温度は０～３０℃、好ましくは４～１５℃である。ｐＨは７～９、好ましくはｐＨ７．５～８．５である。リフォールディングに要する時間は通常０．５～７日間、好ましくは１～３日間、さらに好ましくは１～２日間である。

なお、可溶化後かつリフォールディングの前に、例えば抽出、塩析、透析、分配、結晶化、再結晶、ゲルろ過、クロマトグラフィー等の公知で常用の精製工程を導入することができ、好ましくは、たとえば０．１モル／リットル　リン酸緩衝液中セファデックス（Sephadex）Ｇ－２５（アマシャム　ファルマシア　バイオテク（株））にかけることにより精製することができる。変性剤の分離は場合により０．１モル／リットル　リン酸緩衝液に対して透析することによっても可能である。

精製工程はリフォールディングに続いて行うこともできる。一般にそのような精製としては例えば抽出、塩析、透析、分配、結晶化、再結晶、ゲルろ過、クロマトグラフィー等が挙げられ、好ましい例として透析や、たとえばＳＰ－セファロース（アマシャム　ファルマシア　バイオテク（株））、ＣＭ－５ＰＷ（トーソー（株））、ＤＥＡＥ－５ＰＷ（トーソー（株））などを介したイオン交換クロマトグラフィー、たとえばＣ４Ｐ－５０（昭和電工（株））を用いた逆相クロマトグラフィー等による精製法が挙げられる。

本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩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。

本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のペプチド・蛋白質と略記することもある）に対する抗体

は、本発明のペプチド・蛋白質を抗原として用い、自体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〕

（ａ）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のペプチド・蛋白質は、哺乳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回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、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、抗原を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骨髄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、後記の標識化した本発明のペプチド・蛋白質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なうことができる。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巻、４９５頁（１９７５年）〕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挙げられるが、好ましくはＰＥＧが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、ＮＳ－１、Ｐ３Ｕ１、ＳＰ２／０などが挙げられるが、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）数と骨髄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、ＰＥＧ１０００～ＰＥＧ６０００）が１０～８０％程度の濃度で添加され、約２０～４０℃、好ましくは約３０～３７℃で約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、本発明のペプチド・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本発明のペプチド・蛋白質を加え、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挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体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が、通常は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など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））また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、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に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、抗原結合固相またはプロテイン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、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（本発明のペプチド・蛋白質

の抗原）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哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のペプチド・蛋白質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できる。

哺乳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、どの様なものをどの様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、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・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、ジチオピ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回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、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。

本発明のペプチド、配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩（以下、ＭＩＴ１類と略記する場合がある）もしくは本発明の蛋白質、それらをコードするポリヌクレオチドまたはそれらに対する抗体は、血管新生阻害剤を得るための簡便な探索

法（スクリーニング）に有用である。特に、本発明の蛋白質のアンタゴニストは、優れた血管新生阻害剤として有用である。

さらに、本発明の蛋白質、本発明の蛋白質をコードするＤＮＡ（以下、本発明のＤＮＡと略記する場合がある）、本発明のアンチセンスＤＮＡおよび本発明のペプチドに対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、（i）本発明の蛋白質が関与する各種疾病の予防・治療剤、（ii）本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、（iii）本発明の蛋白質の定量、（iv）遺伝子診断薬、（v）アンチセンスＤＮＡを含有する医薬、（vi）本発明の抗体を含有する医薬および診断薬、（vii）本発明のＤＮＡを有する非ヒト動物の作製、（viii）構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインなどの実施のために有用である。特に、本発明の組換え蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的な本発明の蛋白質に対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

これら用途について、以下に具体的に説明する。

（1）（i）本発明のペプチドの活性を阻害する化合物またはその塩、（ii）本発明の蛋白質の活性を阻害する化合物またはその塩、（iii）本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類と本発明の蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩、または（iv）本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類の、本発明の蛋白質の活性化作用を阻害する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤

（i）本発明のペプチドの活性を阻害する化合物としては、本発明のペプチドの活性を阻害する化合物であればよく、例えば、血管内皮細胞増殖活性、腸管収縮制御活性、本発明の蛋白質に対する結合活性、本発明の蛋白質を介するシグナル情報伝達作用などを阻害する化合物などが挙げられる。

（ii）本発明の蛋白質の活性を阻害する化合物としては、本発明の蛋白質の活性を阻害する化合物であればよく、例えば、本発明のペプチドに対する結合活性、

シグナル情報伝達作用などを阻害する化合物などが挙げられる。

（iii）本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類と本発明の蛋白質との結合を阻害する化合物としては、本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類と本発明の蛋白質との結合を阻害する化合物であればよい。

（iv）本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類の、本発明の蛋白質の活性化作用を阻害する化合物としては、本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類の、本発明の蛋白質の活性化作用を阻害する化合物であればよく、例えば、本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類による、本発明の蛋白質の本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用などを阻害する化合物などが挙げられる。

上記（i）～（iv）の化合物またはその塩は、例えば、後述の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ることにより得られうる。

該塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、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あげられる。無機塩基との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、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。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－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などがあげられる。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、硫酸、リン酸などとの塩があげられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、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、安息香酸などとの塩があげられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルチニンなどとの塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩があげられる。

上記化合物またはその塩は、血管新生阻害剤として用いられ、例えば、血管新

生を伴う疾患〔例、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫など）、卵巣疾患（例、多嚢胞性卵巣症候群（卵巣多嚢胞症）、卵巣過剰刺激症など）、炎症性疾患（例、関節リューマチなど）、糖尿病性網膜症など〕等の予防・治療剤などの医薬として安全に用いられる。

このような医薬として使用する場合、後述の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ることにより得られる化合物を医薬として実施する場合と同様にして実施することができる。

（2）本発明のペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列に相補的もしく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アンチセンスヌクレオチドを含有してなる血管新生阻害剤

上記アンチセンスヌクレオチド（アンチセンスＤＮＡ等）は、生体内における本発明のペプチドまたはそのＤＮＡの機能を抑制することができるので、血管新生阻害剤として、例えば、血管新生を伴う疾患〔例、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫など）、卵巣疾患（例、多嚢胞性卵巣症候群（卵巣多嚢胞症）、卵巣過剰刺激症など）、炎症性疾患（例、関節リューマチなど）、糖尿病性網膜症など〕等の予防・治療剤などの医薬として安全に用いられる。

例えば、該アンチセンスＤＮＡを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクター等の適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って投与することができる。該アンチセンスＤＮＡは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤等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。

（3）本発明のペプチドに対する抗体または本発明の蛋白質に対する抗体を含有してなる血管新生阻害剤

上記抗体は、例えば、本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質の発現過多に起因する疾患、例えば血管新生阻害剤として、例えば、血管新生を伴う疾患〔例、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫など）、卵巣疾患（例、多嚢胞性卵巣症候群（卵巣多嚢胞症）、卵巣過剰刺激症など）、炎症性疾患（例、関節リューマチなど）、糖尿病性網膜症など〕等の予防・治療剤などの医薬として安全に用いられる。

このような医薬として使用する場合、後述の本発明の抗体を含有する医薬を実施する場合と同様にして実施することができる。

（4）本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有してなる癌、卵巣疾患、炎症性疾患、糖尿病性網膜症などの診断薬

上記ポリヌクレオチドは、例えばプローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（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、サル等）における本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質をコードする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等の遺伝子診断薬として有用である。

上記遺伝子診断は、例えば、自体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））、ＤＮＡマイクロアレイ等により実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションやＤＮＡマイクロアレイにより発現低下が検出された場合やＰＣＲ－ＳＳＣＰ法やＤＮＡマイクロアレイによりＤＮＡの突然変異が検出された場合は、例えば、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫など）、卵巣疾患（例、多嚢胞性卵巣症候群（卵巣多

嚢胞症）、卵巣過剰刺激症など）、炎症性疾患（例、関節リューマチなど）、糖尿病性網膜症などに罹患している可能性が高いと診断することができる。

（５）本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類と本発明の蛋白質とを用いるスクリーニング

本発明のペプチド（その部分ペプチドも含む）またはＭＩＴ１類および本発明の蛋白質（本発明の蛋白質の部分ペプチドも含む）を用いることを特徴とするスクリーニング方法、または本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類および本発明の蛋白質を用いることを特徴とするスクリーニング用キット（以下、本発明のスクリーニング方法、本発明のスクリーニング用キットと略記する場合もある）により、例えば、本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類と本発明の蛋白質との結合性を変化させる化合物、好ましくは、

（ｉ）本発明のペプチドの活性を阻害する化合物またはその塩、

（ｉｉ）本発明の蛋白質の活性を阻害する化合物またはその塩、

（ｉｉｉ）本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類と本発明の蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩、

（ｉｖ）本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類の、本発明の蛋白質の活性化作用を阻害する化合物またはその塩などが得られる。

上記（ｉ）～（ｉｖ）の化合物またはその塩は、血管新生阻害作用を有しており、血管新生阻害剤として有用である。

本発明のスクリーニング方法または本発明のスクリーニング用キットについて、以下に詳述する。

本発明の蛋白質を用いるか、または組換え型本発明の蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いた本発明のペプチドとの結合アッセイ系（リガンド・レセプターアッセイ系）を用いることによって、本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類と本発明の蛋白質との結合性を変化させる化合物、本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類と本発明の蛋白質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）またはその塩をスクリーニングすることができる。

このような化合物には、本発明の蛋白質を介して細胞刺激活性（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の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（アゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（アンタゴニスト）などが含まれる。「本発明のペプチドと本発明の蛋白質との結合性を変化させる」とは、本発明のペプチドと本発明の蛋白質との結合を阻害する場合と促進する場合の両方を包含するものである。

本発明は、（i）本発明の蛋白質に、本発明のペプチドを接触させた場合と（ii）上記した本発明の蛋白質に、本発明のペプチ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ことを特徴とする本発明のペプチドと本発明の蛋白質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を提供する。

本スクリーニングにおいては、ＭＩＴ１類は、本発明のペプチドと同様に使用すればよい。

本発明のスクリーニング方法においては、（i）上記した本発明の蛋白質に本発明のペプチドを接触させた場合と（ii）上記した本発明の蛋白質に本発明のペプチドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば該本発明の蛋白質に対する本発明のペプチドの結合量、細胞刺激活性などを測定して比較する。

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) 本発明のペプチドを本発明の蛋白質に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の蛋白質に接触させた場合における、本発明のペプチドの本発明の蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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) 本発明のペプチドを、本発明の蛋白質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、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の蛋白質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、本発明のペプチ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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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

(c) 本発明の蛋白質が、本発明の蛋白質をコードする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蛋白質である上記(b) 記載のスクリーニング方法、

(d) 本発明のペプチドが、標識したペプチドである上記 (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、

(e) 本発明のペプチドを本発明の蛋白質に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の蛋白質に接触させた場合における、本発明の蛋白質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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、

(f) 本発明のペプチドを本発明の蛋白質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、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の蛋白質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、本発明の蛋白質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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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) 本発明の蛋白質が、本発明の蛋白質をコードする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蛋白質である上記(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。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明の蛋白質としては、上記の本発明の蛋白質を含有するものであれば何れのものであってもよい。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量発現させた本発明の蛋白質などが適している。また、哺乳動物由来の内皮細胞も使用できる。

本発明の蛋白質を製造するには、前述の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、本発明の蛋白質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。

本発明の蛋白質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。

本発明の蛋白質を含有する細胞としては、本発明の蛋白質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、昆虫細胞、動物細胞などがあげられる。

膜画分としては、細胞を破砕した後、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。細胞の破砕方法としては、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）による破砕、超音波による破砕、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砕などがあげられる。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、細胞破砕液を低速（500～3000rpm）で短時間（通常、約1～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000～30000rpm）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、発現した本発明の蛋白質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。

該本発明の蛋白質を含有する細胞や膜画分中の本発明の蛋白質の量は、１細胞当たり10^3～10^8分子であるのが好ましく、10^5～10^7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。

上記の哺乳動物由来の内皮細胞としては、例えば、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ラット、マウスなどの内皮細胞（例、動脈血管内皮細胞、毛細血管内皮細胞など）が挙げられる。

例えば、哺乳動物由来の毛細血管内皮細胞の一つであるウシ毛細血管内皮細胞は、以下の方法で調製することができる。また、同様の方法で、哺乳動物の脳、卵巣などからも毛細血管内皮細胞を調製することができる。

先ず、ウシ副腎の表面についている脂質をはさみで除去後、副腎を20％イソジンを含む生理食塩水に5分間浸し消毒する。その後、生理食塩水で副腎を洗浄し

てから半分に切断し副腎髄質を除去する。残った副腎皮質を内側からメスとはさみで採取し細かく切断する。続いて、副腎皮質半分を用いて以下の操作を実施する。すなわち、細片に0.5%コラゲナーゼ（和光純薬）と0.1% bovine serum albumin (BSA)を含むMinimum essential medium (MEM) 20 mlを加え、37℃で30分間インキュベーションする。その後、ピペッティングして組織塊を崩した後、1～600 rpmで5分間遠心し、得られた沈殿に25% BSAを含むMEMを25 ml添加し再度2,700rpmで20分間遠心する。得られた沈殿に上述のコラゲナーゼを含むMEMを加えて懸濁し37℃で15分間インキュベーションした後、コラゲナーゼ消化物をナイロンガーゼ（100ミクロン）で濾過し濾液を回収する。この濾液を再度ナイロンガーゼ（50ミクロン）で濾過し、ガーゼに捕集されたくずを10% fetal bovine serum (FBS)を含むMEMを用いてゼラチンコートした6穴プレートに洗いこむ。4時間後、10% FBS/MEMでプレートを穏やかに洗浄後、2 ng/ml basic fibroblast growth factorと10% FBSを含むMEMを添加し5%CO_2下37℃で培養する。以後、培地は3日毎に全量交換する。5～6日後に目的とする細胞のコロニーを残して不要細胞を顕微鏡下でパスツールピペットを用いて除去する。9～10日後に目的コロニーにクローニングリングをかけ、トリプシン処理により細胞を回収し24穴プレートに移して培養する。得られた細胞を適当なスケールになるまで培養し実験に使用する。

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、本発明の蛋白質画分と、本発明のペプチド（例、標識した本発明のペプチド）などが用いられる。本発明の蛋白質画分としては、天然型の本発明の蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型本発明の蛋白質画分などが望ましい。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。標識した本発明のペプチドとしては、例えば、放射性同位元素（例、〔^{125}I〕、〔^{131}I〕、〔^{3}H〕、〔^{14}C〕、〔^{32}P〕、〔^{33}P〕、〔^{35}S〕など）、蛍光物質〔例、シアニン蛍光色素（例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャムバイオサイエンス社製）など）、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〕、酵素（例、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）、

発光物質（例、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）、ビオチン、ランタニド元素などで標識された本発明のペプチド、好ましくは放射性同位元素で標識された本発明のペプチドなどを用いることができる。また、ボルトン－ハンター試薬を用いて公知の方法で調製した本発明のペプチドの標識体を利用することもできる。

具体的には、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、まず本発明の蛋白質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本発明の蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス－塩酸バッファーなどの本発明のペプチドと本発明の蛋白質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-80™（花王－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蛋白質や本発明のペプチド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の該本発明の蛋白質溶液に、一定量（5000～500000cpm）の標識した本発明のペプチドを添加し、同時に10^{-4}～10^{1}μM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ペプチ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、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。

また、本発明の蛋白質と本発明のペプチドとの結合を測定する方法として、BIAcore（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）を用いることもできる。この方法では、本発明のペプチドを装置に添付のプロトコールに従ったアミノカ

ップリング法によってセンサーチップに固定し、本発明の蛋白質を含有する細胞または本発明の蛋白質をコードするＤＮＡを含有する形質変換体から精製した本発明の蛋白質または本発明の蛋白質を含む膜画分、あるいは精製した本発明の蛋白質または本発明の蛋白質を含む膜画分および試験化合物を含むリン酸バッファーまたはトリスバッファーなどの緩衝液をセンサーチップ上を毎分2～20μlの流量で通過させる。 センサーチップ上の本発明のペプチドと本発明の蛋白質とが結合することによって生じる表面プラズモン共鳴の変化を共存する試験化合物が変化させることを観察することによって本発明の蛋白質と本発明のペプチドとの結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。この方法は、本発明の蛋白質をセンサーチップに固定し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を含むリン酸バッファーまたはトリスバッファーなどの緩衝液をセンサーチップ上を通過させる方法を用いても同様に測定することができる。試験化合物としては、上記と同様のものなどがあげられる。

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、本発明の蛋白質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の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を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、本発明の蛋白質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。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。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明の蛋白質

を発現した細胞が用いられる。本発明の蛋白質を発現した細胞としては、前述の組換え型本発明の蛋白質発現細胞株などが望ましい。形質転換体である本発明の蛋白質発現細胞は安定発現株でも一過性発現株でも構わない。また、動物細胞の種類は上記と同様のものが用いられる。

試験化合物としては、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、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

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。

〔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GTPγSを用いると細胞膜に残存した標識されたGTPγS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。

この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明の蛋白質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、本発明の蛋白質を含む膜画分を用いて行う。本測定法において本発明の蛋白質膜画分へのGTPγS結合促進活性を示す物質はアゴニストである。

具体的には、標識したGTPγSの存在下、本発明のペプチドを本発明の蛋白質細胞膜画分に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の蛋白質細胞膜画分に接触させた場合における、本発明の蛋白質細胞膜画分へのGTPγS結合促進活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、本発明のペプチドによる本発明の蛋白質細胞膜画分へのGTPγS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。

一方、試験化合物のみを本発明の蛋白質細胞膜画分に接触させ、本発明の蛋白質細胞膜画分へのＧＴＰγＳ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例についてより具体的に以下に述べる。

公知の方法に準じて調製した本発明の蛋白質を含む細胞膜画分を、膜希釈緩衝液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、５ｍＭ $MgCl_2$、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、１μＭ 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Ｆａｌｃｏｎ２０５３に０．２ｍｌずつ分注し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチ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［^{35}S］ＧＴＰγＳを加える。２５℃で１時間保温した後、氷冷した洗浄用緩衝液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ，５ｍＭ $MgCl_2$，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，０．１％　ＢＳＡ，０．０５％　ＣＨＡＰＳ；ｐＨ７．４）１．５ｍｌ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、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［^{35}S］ＧＴＰγＳの放射活性を測定する。本発明のペプチドのみを加えた実験区の放射活性を１００％、本発明のペプチドを加えなかった実験区の放射活性を０％とし、本発明のペプチドによるＧＴＰγＳ結合促進活性に対する試験化合物の影響を算出する。ＧＴＰγＳ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選択することができる。

〔２〕本発明の蛋白質発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、細胞内ｃＡＭＰの産生が抑制される。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明の蛋白質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、本発明のペプチドを本発明の蛋白質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の蛋白質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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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。

本発明の蛋白質発現細胞内の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〔^{125}Ｉ〕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}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ク社製のキットを使用する）。

本方法において、本発明のペプチドによる本発明の蛋白質発現細胞の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蛋白質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。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の蛋白質発現細胞（例、ＣＨＯ細胞などの動物細胞）（ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞；後述の参考例２）を２４穴プレートに５ｘ１０^{4}ｃｅｌｌ／ｗｅｌｌで播種し、４８時間培養する。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を含むハンクスバッファー（ｐＨ７．４）で洗浄する（以下、反応用バッファーと略記する）。その後、０．５ｍｌ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０．２５ｍｌの反応用バッファーを細胞に加えた後、１μＭの本発明のペプチドまたは１μＭの本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した２μＭ 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２４分間反応させる。１００μｌ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ク）を用いて測定する。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、１μＭの本発明のペプチドの添加によって抑制されたｃＡＭＰ量を０％として、本発明のペプチドによるｃＡＭＰ産生抑制活性に対する試験化合物の影響を算出する。本発明のペプチ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、本発明のペプチドの刺激により、細胞内ｃＡＭＰ量が増加する性質を示す本発明の蛋白質発現細胞を使用する場合、本発明のペプチドを本発明の蛋白質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の蛋白質発現細胞に接触させた場合における、該細胞の細胞内ｃＡＭＰの産生促進活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、本発明のペプチドによる本発明の蛋白質発現細胞のｃＡＭＰ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蛋白質発現細胞に接触させてｃＡＭＰ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。

ｃＡＭＰ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蛋白質発現細胞（例、ＣＨＯ細胞などの動物細胞）に本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加して産生されたｃＡＭＰを上記の方法で定量して測定する。

〔３〕ＣＲＥ－レポーター遺伝子ベクターを用いて、本発明のペプチドの本発明の蛋白質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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。

ＣＲＥ（cAMP 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、ＣＲＥ－レポーター遺伝子ベクターを得る。ＣＲＥ－レポーター遺伝子ベクターを導入した本発明の蛋白質発現細胞において、ｃＡＭＰの上昇を伴う刺激は、ＣＲＥ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、ＣＲＥ－レポーター遺伝子ベクター導入細胞内のｃＡＭＰ量の変動を検出することができる。

具体的には、細胞内ｃＡＭＰ量を増加させる物質の存在下、本発明のペプチドを、ＣＲＥ－レポーター遺伝子ベクター導入本発明の蛋白質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、ＣＲＥ－レポーター遺伝子ベクター導入本発明の蛋白質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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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。

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。ＣＲＥ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ーニングサイトに挿入し、ＣＲＥ－レポーター遺伝子ベクターとする。

本方法において、本発明のペプチ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蛋白質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ペプチ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。

ＣＲＥ－レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）を導入した本発明の蛋白質発現細胞を、２４穴プレートに5×10^3ｃｅｌｌ／ｗｅｌｌで播種し、４８時間培養する。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を含むハンクスバッファー（ｐＨ７．４）で洗浄する（以下、反応用バッファーと略記する）。その後０．５ｍｌ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０．２５ｍｌの反応用バッファーを細胞に加えた後、１μＭの本発明のペプチドまたは１μＭの本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した２μＭ 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。本発明のペプチド単独を添加した場合と、１μＭの本発明のペプチ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。

本発明のペプチドは、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 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。

〔４〕本発明の蛋白質発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、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、本発明のペプチドの本発明の蛋白質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、本発明の蛋白質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。

具体的には、本発明のペプチドを、標識したアラキドン酸を含有する本発明の蛋白質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチ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蛋白質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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、本発明のペプチ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蛋白質発現細胞に接触させ、本発明の蛋白質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。

本発明の蛋白質発現細胞を２４穴プレートに５ｘ１０^{4}ｃｅｌｌ／ｗｅｌｌで播種し、２４時間培養後、［^{3}H］アラキドン酸を０．２５μＣｉ／ｗｅｌｌとなるよう添加し、１６時間後、細胞を０．０５％　ＢＳＡおよび２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳを含むハンクスバッファー（ｐＨ７．４）（以下、反応用バッファーと略記する）で洗浄する。終濃度１０μＭの本発明のペプチドまたは終濃度１０μＭの本発明のペプチドおよび試験化合物を含む反応用バッファー　５００μｌ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４００μｌをシンチレーターに加え、反応液中に遊離した［^{3}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　５００μｌのみを添加した場合（本発明のペプチド非添加・試験化合物非添加）の遊離［^{3}H］アラキドン酸代謝物の量を０％、１０μＭの本発明のペプチ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［^{3}H］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［^{3}H］アラキドン酸代謝物の量を算出する。

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〕本発明の蛋白質発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、細胞内の

Ｃａ濃度が上昇する。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明の蛋白質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、本発明のペプチドを、本発明の蛋白質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明の蛋白質発現細胞に接触させた場合における、細胞内カルシウム濃度上昇活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、本発明のペプチ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。

本発明の蛋白質発現細胞を、滅菌した顕微鏡用カバーグラス上に播き、２日後、培養液を、４ｍＭ 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グラスをセットし、本発明のペプチドまたは本発明のペプチ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。本発明の蛋白質発現細胞懸濁液に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、本発明のペプチドまたは本発明のペプチ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、本発明の蛋白質発現細胞に、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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質との結合性

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蛋白質発現細胞を、９６穴プレートに播き、上記と同様に、本発明のペプチドまたは本発明のペプチ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。

本発明のペプチ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。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

対照としてＥＴＡ（エンドセリンＡレセプター）発現ＣＨＯ細胞２４番クローン（以後ＥＴＡ２４細胞と略称する。Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 279巻、675-685頁、1996年参照）を用い、アッセイ用サンプルについて、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞（後述の参考例２）およびＥＴＡ２４細胞における細胞内Ｃａイオン濃度上昇活性の測定をＦＬＩＰＲ（モレキュラーデバイス社製）を用いて行う。ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞、ＥＴＡ２４細胞共に１０％透析処理済ウシ胎児血清（以後ｄ　ＦＢＳとする）を加えたＤＭＥＭで継代培養しているものを用いる。ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞、ＥＴＡ２４細胞をそれぞれ15×10^4cells/mlとなるように培地（10% d FBS-DMEM）に懸濁し、ＦＬＩＰＲ用９６穴プレート(Black plate clear bottom、Coster社)に分注器を用いて各ウェルに200 μlずつ植え込み（3.0×10^4cells/200μl/ウェル）、5% CO_2インキュベーター中にて37℃で一晩培養した後用いる（以後、細胞プレートとする）。H/HBSS（ニッスイハンクス２（日水製薬株式会社） 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77 g 、水酸化ナトリウム溶液で pH7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理）20 ml、250 mM Probenecid 200 μl、ウシ胎児血清(FBS) 200 μlを混合する。また、Fluo 3-AM（同仁化学研究所） 2バイアル(50 μg)をジメチルスルフォキサイド 40 μl、20% Pluronic acid (Molecular Probes社) 40 μlに溶解し、これを上記H/HBSS－Probenecid－FBS に加え、混和後、8連ピペットを用いて培養液を除いた細胞プレートに各ウェル 100 μlずつ分注し、5% CO_2インキュベーター中にて37℃で1時間インキュベートする（色素ローディング）。アッセイ用サンプル（各フラクション）に、2.5 mM Probenecid、0.1% CHAPSを含む

H/HBSS 150 μlを加えて希釈し、ＦＬＩＰＲ用９６穴プレート（V-Bottomプレート、Coster社）へ移す（以後、サンプルプレートとする）。細胞プレートの色素ローディング終了後、H/HBSSに2.5 mM Probenecidを加えた洗浄バッファーでプレートウォッシャー(Molecular Devices社)を用いて細胞プレートを４回洗浄し、洗浄後100 μlの洗浄バッファーを残す。この細胞プレートとサンプルプレートをFLIPRにセットしアッセイを行う（FLIPRにより、サンプルプレートから50 μlのサンプルが細胞プレートへと移される）。

〔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。本発明のペプチドの、本発明の蛋白質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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、標識したイノシトールの存在下、本発明のペプチドを、本発明の蛋白質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明の蛋白質発現細胞に接触させた場合における、イ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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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蛋白質発現細胞に接触させ、イノシ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。

本発明の蛋白質発現細胞を２４穴プレートに播き、１日間培養する。その後、myo-[2-^{3}H]inositol (2.5μCi/well) 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。本発明のペプチドまたは本発明のペプチ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。１．５M 水酸化カリウムおよび６０mM ＨＥＰＥＳ溶液で中和し、０．５ｍｌのＡＧ１ｘ８樹脂（Bio-Rad）を詰めたカラムに通し、５mM 四ホウ

酸ナトリウム（$Na_2B_4O_7$）および６０ｍＭ ギ酸アンモニウムで洗浄した後、１Ｍ ギ酸アンモニウムおよび０．１Ｍ 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ーで測定する。本発明のペプチドを添加しない場合の放射活性を０％、本発明のペプチドを添加した場合の放射活性を１００％とし、試験化合物の、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、本発明のペプチドの本発明の蛋白質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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。ＴＲＥ－レポーター遺伝子ベクターを導入した本発明の蛋白質発現細胞において、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、本発明のペプチドを、ＴＲＥ－レポーター遺伝子ベクター導入本発明の蛋白質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチ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蛋白質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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、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、本発明のペプチ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蛋白質発現細胞に接触させ、本発明のペプチ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。

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蛋白質発現細胞を、２４穴プレートに5×10^3ｃｅｌｌ／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（ｐＨ７．４）で洗浄した後、１０ｎＭの本発明のペプチドまたは１０ｎＭの本発明のペプチ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。本発明のペプチドを添加した場合と、１０ｎＭの本発明のペプチ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。

本発明のペプチドによる細胞内カルシウムの上昇によって、ルシフェ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、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〕本発明の蛋白質発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、ＭＡＰキナーゼが活性化され、増殖する。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明の蛋白質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、本発明のペプチドを、本発明の蛋白質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明の蛋白質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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本発明の蛋白質発現細胞の増殖は、例えば、ＭＡＰキナーゼ活性、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、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明の蛋白質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。

チミジン取り込み活性については、本発明の蛋白質発現細胞を２４穴プレートに播種し、培養し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチ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、[methyl-^{3}H]-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、比較する。

細胞数の測定については、本発明の蛋白質発現細胞を２４穴プレートに播種し、培養し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチ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 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、本発明の蛋白質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。

一方、試験化合物のみを本発明の蛋白質発現細胞に接触させ、本発明のペプチ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。

本発明の蛋白質発現細胞を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。本発明のペプチドまたは本発明のペプチ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、[methyl-^{3}H]-チミジンをウェル当たり０．０１５ＭＢｑ添加し、６時間培養する。細胞を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。０．３Ｎ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。

本発明のペプチ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〕本発明の蛋白質発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、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、本発明のペプチドの本発明の蛋白質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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って細胞外に流出する。よって、本発明の蛋白質発現細胞に、放射活性同位体であるＲｂ（[^{86}Ｒｂ]）を取り込ませておいた後、本発明のペプチ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、本発明のペプチドの本発明の蛋白質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、本発明のペプチドを、本発明の蛋白質発現細胞

に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明の蛋白質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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、本発明のペプチド刺激による^{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。

一方、試験化合物のみを本発明の蛋白質発現細胞に接触させ、本発明のペプチドと同様な^{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。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の蛋白質発現細胞を２４穴プレートに播き、２日間培養する。その後、１ｍＣｉ／ｍｌの^{86}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}ＲｂＣｌを完全に除く。本発明のペプチドまたは本発明のペプチ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。

本発明のペプチド刺激による^{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〕本発明の蛋白質発現細胞が本発明のペプチドに反応し、細胞外のｐＨが変化する。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明の蛋白質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、本発明のペプチドを、本発明の蛋白質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明の蛋白質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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、本発明のペプチドによる細胞外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蛋白質発現細胞に接触させ、本発明のペプチドと同様な細胞外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。

本発明の蛋白質発現細胞を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ＲＰＭＩ１６４０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、本発明のペプチドまたは本発明のペプチ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。

本発明のペプチドによる細胞外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haploidα-mating Type（MATα）の性フェロモン受容体ＳＴｅ２は、Ｇ蛋白質Ｇｐａ１と共役しており、性フェロモンα-mating factorに応答してＭＡＰキナーゼを活性化し、これに引き続き、Ｆａｒ１（cell-cycle arrest）および転写活性化因子Ｓｔｅ１２が活性化される。Ｓｔｅ１２は、種々の蛋白質（例えば、接合に関与するＦＵＳ１）の発現を誘導する。一方、制御因子Ｓｓｔ２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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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。

具体例を以下に示す。

ＭＡＴα酵母のＳｔｅ２およびＧｐａ１をコードする遺伝子を除去し、代わりに、本発明の蛋白質遺伝子およびＧｐａ１－Ｇａｉ２融合蛋白質をコードする遺伝子を導入する。Ｆａｒ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、Ｓｓｔをコードする遺伝子を除去して本発明のペプチド

に対する応答の感度を向上させておく。さらに、ＦＵＳ１にヒスチジン生合成遺伝子ＨＩＳ３を結合したＦＵＳ１－ＨＩＳ３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、本発明の蛋白質に置き換えて実施することができる。

このように構築された形質変換酵母は、本発明のペプチドに高感度で反応し、その結果、ＭＡＰ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、上記の本発明の蛋白質発現酵母（Ｓｔｅ２遺伝子およびＧｐａ１遺伝子が除去され、本発明の蛋白質遺伝子およびＧｐａ１－Ｇａｉ２融合蛋白質コード遺伝子が導入され、Ｆａｒ遺伝子およびＳｓｔ遺伝子が除去され、ＦＵＳ１－ＨＩＳ３遺伝子が導入されたＭＡＴα酵母）を、ヒスチジン欠乏培地で培養し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチ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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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。

一方、試験化合物のみを上記の本発明の蛋白質発現酵母に接触させ、本発明のペプチ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。

上記の本発明の蛋白質発現酵母を完全合成培地の液体培地で終夜培養し、その後、ヒスチジンを除去した溶解寒天培地に、$２ｘ１０^{４}ｃｅｌｌ／ｍｌ$の濃度になるように加える。ついで、９ｘ９ｃｍの角形シャーレに播く。寒天が固化した後、本発明のペプチドまたは本発明のペプチ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℃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、本発明のペプチ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ペプチドを添加しておき、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。

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〕本発明の蛋白質遺伝子ＲＮＡをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、本発明のペプチ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）。本発明のペプチドによって生じる本発明の蛋白質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、本発明のペプチドの本発明の蛋白質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、本発明のペプチドを、本発明の蛋白質遺伝子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、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明の蛋白質遺伝子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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、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。

一方、試験化合物のみを本発明の蛋白質遺伝子ＲＮＡ導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させ、本発明のペプチ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。

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 $CaCl_2$, 0.33mM $Ca(NO_3)_2$, 0.82mM $MgSO_4$, 2.4mM $NaHCO_3$, 10mM HEPES； pH7.4）に溶かしたコラゲナーゼ（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、マイクロマニピュレーターで本発明の蛋白質遺伝子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。

本発明の蛋白質遺伝子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。本発明の蛋白質遺伝子ｍＲＮＡ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、本発明のペプチドまたは本発明のペプチ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、本発明の蛋白質遺伝子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、本発明のペプチドのみ含む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、哺乳動物由来の内皮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。

哺乳動物由来の血管内皮細胞、好ましくは大動脈血管内皮細胞、より好ましくは毛細血管内皮細胞、さらに好ましくはの内分泌組織（例、副腎、卵巣、精巣など）由来の毛細血管内皮細胞を用いて以下の方法などにより血管新生阻害作用を有する化合物をスクリーニングすることができる。

１）試験化合物の存在下および非存在下、培養用プレートに培養した内皮細胞または内皮細胞由来の膜画分に、本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類の放射性ヨード標識体を接触させ、放射性ヨード標識体の内皮細胞または膜画分への結合を測定し、比較することにより、放射性ヨード標識体の内皮細胞または膜画分への結合を阻害する化合物をスクリーニングする。

２）試験化合物の存在下および非存在下、本発明のペプチドまたはＭＩＴ類で

内皮細胞刺激し、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇反応を測定し、比較することにより、本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類に依存した細胞内カルシウムイオン濃度上昇を抑制する化合物をスクリーニングする。

３）試験化合物の存在下および非存在下、本発明のペプチドまたはＭＩＴ類で内皮細胞を刺激し、ＭＡＰキナーゼ量、チミジン取り込み反応量または細胞増殖速度を測定し、比較することにより、本発明のペプチドあるいはＭＩＴに依存したＭＡＰキナーゼ量、チミジン取り込み反応量または細胞増殖速度上昇を抑制する化合物ををスクリーニングする。

血管新生阻害剤をスクリーニングするには、直接上記３）の方法を実施してもよく、上記１）、２)、３）の順に従い、または上記２)、３）の順に従い実施してもよい。上記１）、２)、３）の順、または上記２)、３）の順で実施すると、効率的にスクリーニングを行うことができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明の蛋白質、本発明の蛋白質を含有する細胞、本発明の蛋白質を含有する細胞の膜画分、または哺乳動物（例、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ラット、マウスなど）由来の内皮細胞および本発明のペプチドを含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものがあげられる。

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０．４５μｍのフィルターで濾過滅菌し、４℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

（ii）本発明の蛋白質の標品

本発明の蛋白質を発現させたＣＨＯ細胞、または哺乳動物（例、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ラット、マウスなど）由来の内皮細胞を、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。

（iii）標識リガンド

〔^{3}H〕、〔^{125}Ｉ〕、〔^{14}Ｃ〕、〔^{35}Ｓ〕などで標識した本発明のペプチド。

適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを４℃あるいは－２０℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて１μＭに希釈する。

（iv）リガンド標準液

本発明のペプチドを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蛋白質を発現させた細胞または哺乳動物（例、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ラット、マウスなど）由来の内皮細胞を、測定用緩衝液１ｍｌで２回洗浄した後、４９０μｌの測定用緩衝液を各穴に加える。

（ii）10^{-3}～10^{-10}Ｍの試験化合物溶液を５μｌ加えた後、標識した本発明のペプチドを５μｌ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かわりに10^{-3}Ｍの本発明のペプチドを５μｌ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した本発明のペプチドを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）を次の式で求める。

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

ＰＭＢ：Percent Maximum Binding

Ｂ　　：検体を加えた時の値

ＮＳＢ：Non-specific Binding（非特異的結合量）

B_0　：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る化合物またはその塩は、本発明のペプチドと本発明の蛋白質との結合を変化させる（結合を阻害または促進する）化合物であり、具体的には本発明の蛋白質を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆる本発明の蛋白質のアゴニスト）、または該刺激活性を有しない化合物（いわゆる本発明の蛋白質のアンタゴニスト）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、発酵生産物などがあげられ、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。

上記の化合物が、本発明の蛋白質のアゴニストであるか、アンタゴニストであるかの具体的な評価方法は、例えば以下の（A）または（B）に従えばよい。

（A）前記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、本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、該化合物が上記した本発明の蛋白質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蛋白質のアゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩は本発明の蛋白質のアンタゴニストである。

（B）(a)試験化合物を本発明の蛋白質を含有する細胞に接触させ、上記本発明の蛋白質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蛋白質のアゴニストである。

(b) 本発明の蛋白質を活性化する化合物を本発明の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、本発明の蛋白質を活性化する化合物および試験化合物を本発明の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、本発明の蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。本発明の蛋白質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蛋白質のアンタゴニストである。

該本発明の蛋白質のアゴニストは、本発明の蛋白質に対する本発明のペプチドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、本発明のペプチドと同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明の蛋白質アンタゴニストは、 本発明の蛋白質に対する本発明のペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、該受容体活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明の蛋白質アンタゴニストとして、例えば、本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類と本発明の蛋白質との結合性を変化させる化合物、好ましくは、

（i）本発明のペプチドの活性を阻害する化合物またはその塩、

（ii）本発明の蛋白質の活性を阻害する化合物またはその塩、

（iii）本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類と本発明の蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩、

（iv）本発明のペプチドまたはＭＩＴ１類の、本発明の蛋白質の活性化作用を阻害する化合物またはその塩などが挙げられる。

本発明のペプチドは血管内皮細胞の増殖などを制御する活性などを有するため、例えば、本発明の蛋白質のアゴニストは、例えば、血管造成剤などの医薬として用いることができる。

また、本発明の蛋白質のアンタゴニストは、血管新生阻害剤として、例えば血管新生を伴う疾患〔例、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫など）、卵巣疾患（例、多嚢胞性卵巣症候群（卵巣多嚢胞症）、卵巣過剰刺激症など）、炎症性疾患（例、関節リューマチなど）、糖尿病性網膜症など〕などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として用いることができる。

上記の化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、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あげられる。

無機塩基との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、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。

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－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などがあげられる。

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、硫酸、リン酸などとの塩があげられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、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、安息香酸などとの塩があげられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オル

チニンなどとの塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩があげられる。

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述の医薬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。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、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、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、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したがって処方することができる。

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（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、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート８０™、ＨＣＯ－５０）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、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、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、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、例えば哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、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。

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の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重６０ｋｇとして）においては、一日につき約0.1～1000mg、好ましくは約1.0～300mg、より好ましくは約3.0～50mgである。非経口的に投与する場合は、その１回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人の癌患者（体重60kgとして）への投与においては、一日につき約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与する。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

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、他の薬剤、例えば化学療法剤〔例、イホスファミド（Ifosfamide）、アドリアマイシン（Adriamycin）、ペプロマイシン（Peplomycin）、シスプラチン（Cisplatin）、シクロフォスファミド（Cyclophosphamide）、５－ＦＵ、ＵＦＴ、メトレキセート（Methotrexate）、マイトマイシンＣ（Mitomycin C）、マイトキサントロン（Mitoxantrone）など〕などと併用してもよい。

（６）本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド、または本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いる血管新生阻害剤のスクリーニング方法

具体的には、例えば、（a）本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と（iv）本発明のペプチドまたは本発明の蛋

白質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、血管新生阻害剤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、（a）と（b）の場合における、本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質の遺伝子の発現量（具体的には、蛋白質量または該蛋白質をコードするｍＲＮＡ量）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、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。

本スクリーニング方法を実施するには、本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質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が用いられる。

本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質をコードする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）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、本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質を発現させた形質転換体が好ましく用いられる。

本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質の蛋白量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記蛋白質を、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。

本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質の遺伝子発現量は、自体公知の方法、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（b）の場合における蛋白質の遺伝子発現量を、上記（a）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、血管新生阻害剤として選択することができる。

（７）本発明のペプチド、ＭＩＴ１類または本発明の蛋白質に対する抗体を用いる血管新生阻害剤のスクリーニング方法

具体的には、例えば、（a）本発明のペプチド、ＭＩＴ１類または本発明の蛋白質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と（b）本発明のペプチド、ＭＩＴ１類または本発明の蛋白質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、本発明のペプチド、ＭＩＴ１類または本発明の蛋白質に対する抗体を用いて行い、血管新生阻害剤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、（a）と（b）の場合における、本発明のペプチド、ＭＩＴ１類または本発明の蛋白質の発現量（具体的には、蛋白質量）を上記抗体を用いて測定して、比較する。

試験化合物としては、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、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、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。

本スクリーニング方法を実施するには、本発明のペプチド、ＭＩＴ１類または本発明の蛋白質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が用いられる。

本発明のペプチド、ＭＩＴ１類または本発明の蛋白質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のペプチド、ＭＩＴ１類または本発明の蛋白質をコードする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）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、本発明のペプチド、ＭＩＴ１類または本発明の蛋白質を発現させた形質転換体が好ましく用いられる。

例えば、上記（b）の場合における蛋白質の発現量を、上記（a）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、血管新生阻害剤として選択することができる。

（８）内皮細胞増殖阻害作用を有する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤。

内皮細胞増殖阻害作用を有する化合物またはその塩としては、内皮細胞増殖阻害作用を有する化合物またはその塩であれば、いずれのものでもよい。

該化合物またはその塩は、血管新生阻害剤として用いられ、例えば、血管新生を伴う疾患〔例、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫など）、卵巣疾患（例、多嚢胞性卵巣症候群（卵巣多嚢胞症）、卵巣過剰刺激症など）、炎症性疾患（例、関節リューマチなど）、糖尿病性網膜症など〕等の予防・治療剤などの医薬として安全に用いられる。

このような医薬として使用する場合、前述の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ることにより得られる化合物を医薬として実施する場合と同様にして実施することができる。

（９）本発明の蛋白質または本発明のペプチドの定量

本発明の抗体は、本発明の蛋白質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蛋白質または本発明のペプチド（以下、（９）項では本発明の蛋白質と略記する）の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量等に使用することができる。

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蛋白質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蛋白質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蛋白質の定量法、および

（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蛋白質の定量法を提供する。

また、本発明の蛋白質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明の蛋白質の定量を行なえるほか、

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、また、抗体分子のF(ab')$_2$、Fab'またはFab画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明の蛋白質の定量法は、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、本発明のペプチド量）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。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、ランタニド元素等が用いられる。放射性同位元素としては、例えば、〔^{125}I〕、〔^{131}I〕、〔^{3}H〕、〔^{14}C〕、〔^{32}P〕、〔^{33}P〕、〔^{35}S〕等が用いられる。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、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等が用いられる。蛍光物質としては、例えば、シアニン蛍光色素（例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャムバイオサイエンス社製）など）、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等が用いられる。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、ルシゲニン等が用いられる。さらに、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あたっては、物理吸着を用いてもよく、また通常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、セルロース等の不溶性多糖類、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挙げられる。

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

被検液中の本発明のペプチド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ペプチド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、本発明のペプチド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、本発明のペプチドの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等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抗体等を用いる液相法、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い第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等

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蛋白質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、成書等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)等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、本発明の蛋白質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蛋白質の濃度を定量することによって、本蛋白質は卵巣や精巣などの毛細血管内皮細胞に発現量が高いため、本発明の蛋白質の濃度の増多が検出された場合、これらの臓器での毛細血管内皮細胞の増殖を伴う疾患、例えば、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫など）、卵巣疾患（例、多嚢胞性卵巣症候群（卵巣多嚢胞症）、卵巣過剰刺激症など）、炎症性疾患（例、関節リューマチなど）、糖尿病性網膜症などに罹患している、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織等の被検体中に存在する本発明の蛋白質を

検出するために使用することができる。また、本発明の蛋白質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蛋白質の検出、被検細胞内における本発明の蛋白質の挙動の分析等のために使用することができる。

（１０）遺伝子診断薬

本発明のＤＮＡは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（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、サル等）における本発明の蛋白質または本発明のペプチド（以下、（１０）項では本発明の蛋白質と略記する）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等の遺伝子診断薬として有用である。

本発明のＤＮＡを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体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）、 ＤＮＡマイクロアレイ等により実施することができる。

本発明の蛋白質は卵巣や精巣などの毛細血管内皮細胞に発現量が高いため、例えば、ノーザンハイブリダイゼーションやＤＮＡマイクロアレイにより発現増大が検出された場合やＰＣＲ－ＳＳＣＰ法やＤＮＡマイクロアレイによりＤＮＡの突然変異が検出された場合は、例えば、毛細血管内皮細胞の増殖を伴う疾患、例えば、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫など）、卵巣疾患（例、多嚢胞性卵巣症候群（卵巣多嚢胞症）、卵巣過剰刺激症など）、炎症性疾患（例、関節リューマチなど）、糖尿病性網膜症などに罹患している可能性が高いと診断することができる。

（１１）アンチセンスＤＮＡを含有する医薬

本発明のＤＮＡに相補的に結合し、該ＤＮＡの発現を抑制することができるア

ンチセンスＤＮＡは、生体内における本発明の蛋白質もしくは本発明のペプチド（以下、（１１）項では本発明の蛋白質と略記する）または本発明のＤＮＡの機能を抑制することができるので、例えば、本発明の蛋白質の発現過多に起因する疾患、例えば癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫など）、卵巣疾患（例、多嚢胞性卵巣症候群（卵巣多嚢胞症）、卵巣過剰刺激症など）、炎症性疾患（例、関節リューマチなど）、糖尿病性網膜症などの予防・治療剤として使用することができる。

上記アンチセンスＤＮＡを上記の予防・治療剤として、前記した本発明のＤＮＡを含有する各種疾病の予防・治療剤と同様に使用することができる。

例えば、該アンチセンスＤＮＡを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクター等の適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って投与することができる。該アンチセンスＤＮＡは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤等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。

さらに、本発明は、

（ｉ）本発明の蛋白質をコードするＲＮＡの一部を含有する二重鎖ＲＮＡ、

（ｉｉ）前記二重鎖ＲＮＡを含有してなる医薬、

（ｉｉｉ）本発明の蛋白質をコードするＲＮＡの一部を含有するリボザイム、

（ｉｖ）前記リボザイムを含有してなる医薬も提供する。

上記アンチセンスヌクレオチドと同様に、二重鎖ＲＮＡ（RNAi；RNA interference法）、リボザイムなども、本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチド（例、ＤＮＡ）の発現を抑制することができ、生体内における本発明の蛋白質またはＤＮＡの機能、およびそれに依存した本発明のペプチドの機能を抑制することができるので、例えば、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小

細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫など）、卵巣疾患（例、多嚢胞性卵巣症候群（卵巣多嚢胞症）、卵巣過剰刺激症など）、炎症性疾患（例、関節リューマチなど）、糖尿病性網膜症などの予防・治療剤などとして使用することができる。

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して製造することができる。例えば、本発明の蛋白質をコードする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。本発明の蛋白質をコードする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。

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。

（１２）本発明の抗体を含有する医薬および診断薬

本発明の蛋白質または本発明のペプチド（以下、（１２）項では本発明の蛋白質と略記する）の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、本発明の蛋白質の発現過多に起因する疾患、例えば、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫など）、卵巣疾患（例、多嚢胞性卵巣症候群（卵巣多嚢胞症）、卵巣過剰刺激症など）、炎症性疾患（例、関節リューマチなど）、糖尿病性網膜症などの予防・治療剤等の医薬として、あるいは本発明の蛋白質を発現する内皮細胞の増殖を伴う疾患、例えば、多嚢胞性卵巣症候群、卵巣過剰刺激症候群などの診断薬として使用することができる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤は、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、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル等）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、投与ルート等によ

っても異なるが、例えば、癌治療の目的で本発明の抗体を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、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）、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、懸濁剤等があげられる。かかる組成物は自体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、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウム等が用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含する。かかる注射剤は、自体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等が用いられ、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）〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、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等を併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。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）、坐剤等が例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5～500mg程度、とりわけ注射剤では5～100mg程度、その他の剤形では10～250mg程度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。

例えば、前記した各血管新生阻害剤は、例えば化学療法剤（例、イホスファミド（Ifosfamide）、アドリアマイシン（Adriamycin）、ペプロマイシン（Peplomycin）、シスプラチン（Cisplatin）、シクロフォスファミド（Cyclophosphamide）、５－ＦＵ、ＵＦＴ、メトレキセート（Methotrexate）、マイトマイシンＣ（Mitomycin C）、マイトキサントロン（Mitoxantrone）など）などと併用してもよい。

（１３）本発明のＤＮＡを有する非ヒト動物の作製

本発明のＤＮＡを用いて、本発明の蛋白質または本発明のペプチドを発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する）が挙げられるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

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遺伝子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、ウサギ由来の本発明のＤＮＡを転移させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明のＤＮＡを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ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蛋白質または本発明のペプチドを高産生するＤＮＡ転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例

えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するＮＧＦ遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

受精卵細胞段階における本発明のＤＮＡの転移は、対象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本発明の蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明の蛋白質または本発明のペプチドを有することを意味する。遺伝子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蛋白質または本発明のペプチドを有する。

本発明のＤＮＡ転移動物は、交配により遺伝子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飼育継代を行うことができる。さらに、目的ＤＮＡを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子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を有するように繁殖継代することができる。

本発明のＤＮＡが転移された動物は、本発明の蛋白質または本発明のペプチドが高発現させられているので、本発明の蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニスト、本発明のペプチドの活性を阻害する化合物のスクリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のＤＮＡ転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のＤＮＡ転移マウスの組織中のＤＮＡもしくはＲＮＡを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明の蛋白質または本発明のペプチドが存在する組織を分析することにより、本発明の蛋白質について分析することができる。本発明の蛋白質または本発明のペプチドを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明の蛋白質または本発明のペプチドを単離精製することも可能である。

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。

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
Ｙ　：チミンまたはシトシン
Ｎ　：チミン、シトシン、アデニンまたはグアニン
Ｒ　：アデニンまたはグアニン
Ｍ　：シトシンまたはアデニン
Ｗ　：チミンまたはアデニン
Ｓ　：シトシンまたはグアニン
Ｂ　；グアニン、チミンまたはシトシン
ＲＮＡ　：リボ核酸
ｍＲＮＡ　：メッセンジャーリボ核酸
ｄＡＴＰ　：デオキシアデノシン三リン酸
ｄＴＴＰ　：デオキシチミジン三リン酸
ｄＧＴＰ　：デオキシグアノシン三リン酸
ｄＣＴＰ　：デオキシシチジン三リン酸
ＡＴＰ　：アデノシン三リン酸
ＧｌｙまたはＧ　：グリシン
ＡｌａまたはＡ　：アラニン
ＶａｌまたはＶ　：バリン
ＬｅｕまたはＬ　：ロイシン

ＩｌｅまたはＩ　：イソロイシン
ＳｅｒまたはＳ　：セリン
ＴｈｒまたはＴ　：スレオニン
ＣｙｓまたはＣ　：システイン
ＭｅｔまたはＭ　：メチオニン
ＧｌｕまたはＥ　：グルタミン酸
ＡｓｐまたはＤ　：アスパラギン酸
ＬｙｓまたはＫ　：リジン
ＡｒｇまたはＲ　：アルギニン
ＨｉｓまたはＨ　：ヒスチジン
ＰｈｅまたはＦ　：フェニルアラニン
ＴｙｒまたはＹ　：チロシン
ＴｒｐまたはＷ　：トリプトファン
ＰｒｏまたはＰ　：プロリン
ＡｓｎまたはＮ　：アスパラギン
ＧｌｎまたはＱ　：グルタミン
ｐＧｌｕ　：ピログルタミン酸
Ｘａａ　：未同定アミノ酸残基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬等を下記の記号で表記する。

Ｍｅ　：メチル基
Ｅｔ　：エチル基
Ｂｕ　：ブチル基
Ｐｈ　：フェニル基
Ａｃ　：アセチル基
ＴＣ　：チアゾリジン－４（Ｒ）－カルボキサミド基
Ｂｏｍ　：ベンジルオキシメチル
Ｂｚｌ　：ベンジル

Z ：ベンジルオキシカルボニル
Ｂｒ－Ｚ ：２－ブロモベンジルオキシカルボニル
Ｃｌ－Ｚ ：２－クロルベンジルオキシカルボニル
Cl_2Bzl ：2-6－ジクロロベンジル
Ｂｏｃ ：t－ブチルオキシカルボニル
ＨＯＢｔ ：１－ヒドロキシベンズトリアゾール
ＨＯＯＢｔ ：３，４－ジヒドロ－３－ヒドロキシ－４－オキソ－１，２，３－ベンゾトリアジン
ＰＡＭ ：フェニルアセトアミドメチル
Ｔｏｓ ：ｐ－トルエンスルフォニル
Ｆｍｏｃ ：Ｎ－９－フルオレニルメトキシカルボニル
ＤＮＰ ：ジニトロフェニル
Ｂｕｍ ：ターシャリーブトキシメチル
Ｔｒｔ ：トリチル
Ｂｏｍ ：ベンジルオキシメチル
Ｚ ：ベンジルオキシカルボニル
ＭｅＢｚｌ ：４－メチルベンジル
ＤＣＣ ：N,N'－ジシクロヘキシルカルボジイミド
ＨＯＮＢ ：1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
ＮＭＰ ：Ｎ－メチルピロリドン
ＨＯＮＢ ：Ｎ－ヒドロキシ－５－ノルボルネン－２，３－ジカルボキシイミド
ＮＭＰ ：Ｎ－メチルピロリドン
ＴＦＡ ：トリフルオロ酢酸
ＣＨＡＰＳ ：３－[（３－コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ]－１－プロパンスルホナート
ＰＭＳＦ ：フェニルメチルスルホニルフルオリド
ＧＤＰ ：グアノシン－５'－二リン酸
Ｆｕｒａ－２ＡＭ ：１－［６－アミノ－２－（５－カルボキシ－２－オキサ

ゾリル）－５－ベンゾフラニロキシ］－２－（２－アミノ－５メチルフェノキシ）－エタン－Ｎ，Ｎ，Ｎ'，Ｎ'－四酢酸ペンタアセトキシメチルエステル

Ｆｌｕｏ－３ＡＭ　：１－［２－アミノ－５－（２，７－ジクロロ－６－ヒドロキシ－３－オキシ－９－キサンテニル）フェノキシ］－２－（２－アミノ－５－メチルフェノキシ）エタン－Ｎ，Ｎ，Ｎ'，Ｎ'－四酢酸ペンタアセトキシメチルエステル

ＨＥＰＥＳ　：２－［４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジニル］エタンスルホン酸

ＥＤＴＡ　：エチレンジアミン四酢酸

ＳＤＳ　：ドデシル硫酸ナトリウム

ＢＳＡ　：ウシ血清アルブミン

ＨＢＳＳ　：ハンクス平衡塩液

ＥＩＡ　：エンザイムイムノアッセイ

ＣＨＡＰＳ　：3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamino]-1-propanesulfate

本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〕

ヒト脳由来蛋白質ＺＡＱのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２〕

ヒト脳由来蛋白質ＺＡＱをコードするＤＮＡの塩基配列を示す（ＺＡＱＣ）。

〔配列番号：３〕

ヒト脳由来蛋白質ＺＡＱをコードするＤＮＡの塩基配列を示す（ＺＡＱＴ）。

〔配列番号：４〕

後述の参考例３で用いられたプライマー１の塩基配列を示す。

〔配列番号：５〕

後述の参考例３で用いられたプライマー２の塩基配列を示す。

〔配列番号：６〕

ヒト型Ｉ５Ｅレセプター蛋白質をコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：７〕

後述の参考例３で用いられたプライマーｈＢｖ８－Ｆ１の塩基配列を示す。

〔配列番号：８〕

後述の参考例３で用いられたプライマーｈＢｖ８－Ｒ１の塩基配列を示す。

〔配列番号：９〕

後述の参考例３で得られたＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：１０〕

後述の参考例３で用いられたプライマーｈＢｖ８－Ｒ２の塩基配列を示す。

〔配列番号：１１〕

後述の参考例３で得られたヒト型Ｂｖ８ペプチドをコードするＤＮＡの５’端塩基配列を示す。

〔配列番号：１２〕

後述の参考例３で用いられたプライマーｈＢｖ８－ＷＦの塩基配列を示す。

〔配列番号：１３〕

後述の参考例３で用いられたプライマーｈＢｖ８－ＷＲの塩基配列を示す。

〔配列番号：１４〕

後述の参考例３で用いられたプライマーｈＢｖ８－ＣＦの塩基配列を示す。

〔配列番号：１５〕

後述の参考例３で用いられたプライマーｈＢｖ８－ＳＲの塩基配列を示す。

〔配列番号：１６〕

後述の参考例３で得られたＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：１７〕

ヒト型Ｂｖ８前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：１８〕

ヒト型Ｂｖ８前駆体ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：１９〕

ヒト型Ｂｖ８成熟体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２０〕

ヒト型Ｂｖ８成熟体ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：２１〕

ヘビ毒ＭＩＴ１のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２２〕

ヒト型Ｂｖ８成熟体ペプチドのＣ末端のＬｙｓ欠損体のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２３〕

後述の参考例５で用いられたプライマーＢＦ２の塩基配列を示す。

〔配列番号：２４〕

後述の参考例５で用いられたプライマーＢＲ１の塩基配列を示す。

〔配列番号：２５〕

後述の参考例５で得られたＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：２６〕

後述の参考例５で用いられたプライマーＲＢ５－１の塩基配列を示す。

〔配列番号：２７〕

後述の参考例５で用いられたプライマーＲＢ５－３の塩基配列を示す。

〔配列番号：２８〕

後述の参考例５で得られたラット型Ｂｖ８をコードするＤＮＡの５’端塩基配列を示す。

〔配列番号：２９〕

後述の参考例５で用いられたプライマーＲＢ３－１の塩基配列を示す。

〔配列番号：３０〕

後述の参考例５で用いられたプライマーＲＢ３－２の塩基配列を示す。

〔配列番号：３１〕

後述の参考例５で得られたラット型Ｂｖ８をコードするＤＮＡの３’端塩基配列を示す。

〔配列番号：３２〕

後述の参考例５で用いられたプライマーＲＢｖ８－ＷＦ１の塩基配列を示す。

〔配列番号：３３〕

後述の参考例５で用いられたプライマーＲＢｖ８－ＷＦ２の塩基配列を示す。

〔配列番号：３４〕

後述の参考例５で用いられたプライマーＲＢｖ８－ＷＲ１の塩基配列を示す。

〔配列番号：３５〕

後述の参考例５で用いられたプライマーＲＢｖ８－ＷＲ２の塩基配列を示す。

〔配列番号：３６〕

後述の参考例５で得られたＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：３７〕

ラット型Ｂｖ８前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：３８〕

ラット型Ｂｖ８前駆体ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：３９〕

ラット型Ｂｖ８成熟体ペプチドおよびマウス型Ｂｖ８成熟体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：４０〕

ラット型Ｂｖ８成熟体ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：４１〕

後述の参考例６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：４２〕

後述の参考例６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：４３〕

新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質（ｒＺＡＱ１）をコードするｃＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：４４〕

新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質（ｒＺＡＱ１）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：４５〕

後述の参考例７で用いられたプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：４６〕

後述の参考例７で用いられたプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：４７〕

後述の参考例７で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：４８〕

後述の参考例７で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：４９〕

後述の参考例７で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：５０〕

新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質（ｒＺＡＱ２）をコードするｃＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：５１〕

新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質（ｒＺＡＱ２）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：５２〕

ヒト型Ｉ５Ｅレセプター蛋白質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：５３〕

マウス由来Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質（ＧＰＲ７３）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：５４〕

マウス由来Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質（ｍＩ５Ｅ）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：５５〕

マウス型Ｂｖ８前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：５６〕

マウス型Ｂｖ８前駆体ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：５７〕

マウス型Ｂｖ８成熟体ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：５８〕

後述の参考例１で用いられたプライマー３の塩基配列を示す。

〔配列番号：５９〕

後述の参考例１で用いられたプライマー４の塩基配列を示す。

〔配列番号：６０〕

後述の参考例１で用いられたＺＡＱｐｒｏｂｅの塩基配列を示す。

〔配列番号：６１〕

後述の参考例１で用いられたプライマーＺＡＱＣ　Ｓａｌの塩基配列を示す。

〔配列番号：６２〕

後述の参考例４で用いられたプライマーＺＡＱＣ　Ｓｐｅの塩基配列を示す。

〔配列番号：６３〕

マウス由来Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質（ＧＰＲ７３）をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：６４〕

マウス由来Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質（ｍＩ５Ｅ）をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：６５〕

参考例８で用いられたＤＮＡ断片＃１の塩基配列を示す。

〔配列番号：６６〕

参考例８で用いられたＤＮＡ断片＃２の塩基配列を示す。

〔配列番号：６７〕

参考例８で用いられたＤＮＡ断片＃３の塩基配列を示す。

〔配列番号：６８〕

参考例８で用いられたＤＮＡ断片＃４の塩基配列を示す。

〔配列番号：６９〕

参考例８で用いられたＤＮＡ断片＃５の塩基配列を示す。

〔配列番号：７０〕

参考例８で用いられたＤＮＡ断片＃６の塩基配列を示す。

〔配列番号：７１〕

配列番号：３０で表わされるヒト型Ｂｖ８をコードする合成ＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：７２〕

後述の参考例９（８）で精製されたＺＡＱ活性化ペプチドのＮ末端のアミノ酸

配列を示す。

〔配列番号：７３〕

後述の参考例９（II）で用いられたプライマーＺＦ１の塩基配列を示す。

〔配列番号：７４〕

後述の参考例９（II）で用いられたプライマーＺＦ２の塩基配列を示す。

〔配列番号：７５〕

後述の参考例９（II）で用いられたプライマーＺＦ３の塩基配列を示す。

〔配列番号：７６〕

後述の参考例９（II）で得られたヒト型ＺＡＱリガンドペプチドをコードするＤＮＡの３’端塩基配列を示す。

〔配列番号：７７〕

後述の参考例９（II）で用いられたプライマーＺＡＱＬ－ＣＦの塩基配列を示す。

〔配列番号：７８〕

後述の参考例９（II）で用いられたプライマーＺＡＱＬ－ＸＲ１の塩基配列を示す。

〔配列番号：７９〕

後述の参考例９（II）で得られたＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：８０〕

後述の参考例９（II）で得られたＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：８１〕

ヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：８２〕

ヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：８３〕

ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：８４〕

ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：８５〕

配列番号：８９で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするＤＮＡを含有するＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：８６〕

配列番号：９０で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするＤＮＡを含有するＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：８７〕

配列番号：８１で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：８８〕

配列番号：８２で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド成熟ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：８９〕

配列番号：８３で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：９０〕

配列番号：８４で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：９１〕

後述の参考例１０（１）で用いられたＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：９２〕

後述の参考例１１（２）で分析された、ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドのＮ末端アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：９３〕

後述の参考例１２で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：９４〕

後述の参考例１２で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：９５〕

参考例１で用いられたＤＮＡ断片＃１の塩基配列を示す。

〔配列番号：９６〕

参考例１で用いられたＤＮＡ断片＃２の塩基配列を示す。

〔配列番号：９７〕

参考例１で用いられたＤＮＡ断片＃３の塩基配列を示す。

〔配列番号：９８〕

参考例１で用いられたＤＮＡ断片＃４の塩基配列を示す。

〔配列番号：９９〕

参考例１で用いられたＤＮＡ断片＃５の塩基配列を示す。

〔配列番号：１００〕

参考例１で用いられたＤＮＡ断片＃６の塩基配列を示す。

〔配列番号：１０１〕

配列番号：８２で表わされるヒト型ＺＡＱリガンドをコードする合成ＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：１０２〕

後述の参考例１５で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１０３〕

後述の参考例１５で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１０４〕

後述の参考例１５で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１０５〕

後述の参考例１５で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１０６〕

後述の参考例１５で得られたＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：１０７〕

マウス型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：１０８〕

マウス型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：１０９〕

マウス型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：１１０〕

マウス型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：１１１〕

マウス型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするＤＮＡを含有するＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：１１２〕

後述の参考例１６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１１３〕

後述の参考例１６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１１４〕

後述の参考例１６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１１５〕

後述の参考例１６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１１６〕

後述の参考例１６で得られたＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：１１７〕

後述の参考例１６で得られたＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：１１８〕

後述の参考例１６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１１９〕

後述の参考例１６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１２０〕

後述の参考例１６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１２１〕

後述の参考例１６で得られたラット型ＺＡＱリガンドペプチドをコードするＤＮＡの５’端塩基配列を示す。

〔配列番号：１２２〕

後述の参考例１６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１２３〕

後述の参考例１６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１２４〕

後述の参考例１６で得られたラット型ＺＡＱリガンドペプチドをコードするＤＮＡの５’端塩基配列を示す。

〔配列番号：１２５〕

後述の参考例１６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１２６〕

後述の参考例１６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１２７〕

後述の参考例１６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１２８〕

後述の参考例１６で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１２９〕

後述の参考例１６で得られたＤＮＡ断片の塩基配列を示す（ノーマルタイプ）。

〔配列番号：１３０〕

後述の参考例１６で得られたＤＮＡ断片の塩基配列を示す（Ｙタイプ）。

〔配列番号：１３１〕

後述の参考例１６で得られたＤＮＡ断片の塩基配列を示す（Ｑタイプ）。

〔配列番号：１３２〕

ラット型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド（ノーマルタイプ）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：１３３〕

ラット型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド（ノーマルタイプ）をコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：１３４〕

ラット型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド（Ｙタイプ）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：１３５〕

ラット型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド（Ｙタイプ）をコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：１３６〕

ラット型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド（Ｑタイプ）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：１３７〕

ラット型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド（Ｑタイプ）をコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：１３８〕

ラット型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（ノーマルタイプ）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：１３９〕

ラット型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（ノーマルタイプ）をコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：１４０〕

ラット型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（Ｙタイプ）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：１４１〕

ラット型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（Ｙタイプ）をコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：１４２〕

ラット型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（Ｑタイプ）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：１４３〕

ラット型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（Ｑタイプ）をコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：１４４〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１４５〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１４６〕

後述の実施例１で得られたウシ型ＺＡＱの部分配列の塩基配列を示す。

〔配列番号：１４７〕

後述の実施例１で得られたウシ型Ｉ５Ｅの部分配列の塩基配列を示す。

〔配列番号：１４８〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１４９〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１５０〕

後述の実施例１で得られたウシ型ＺＡＱの５’部分配列（ｔｙｐｅ１）の塩基配列を示す。

〔配列番号：１５１〕

後述の実施例１で得られたウシ型ＺＡＱの５’部分配列（ｔｙｐｅ２）の塩基配列を示す。

〔配列番号：１５２〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１５３〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１５４〕

後述の実施例１で得られたウシ型ＺＡＱの３’部分配列（ｔｙｐｅ２）の塩基配列を示す。

〔配列番号：１５５〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１５６〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１５７〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１５８〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１５９〕

後述の実施例１で得られたウシ型ＺＡＱ全長をコードする２０３８ｂｐのＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：１６０〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１６１〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１６２〕

後述の実施例１で得られたウシ型Ｉ５Ｅの５’部分配列の塩基配列を示す。

〔配列番号：１６３〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１６４〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１６５〕

後述の実施例１で得られたウシ型Ｉ５Ｅの３’部分配列の塩基配列を示す。

〔配列番号：１６６〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１６７〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１６８〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１６９〕

後述の実施例１で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１７０〕

後述の実施例１で得られたウシ型Ｉ５Ｅ全長をコードする１６２３ｂｐのＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：１７１〕

後述の実施例１で得られたウシ型ＺＡＱのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：１７２〕

ウシ型ＺＡＱをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：１７３〕

後述の実施例１で得られたウシ型Ｉ５Ｅのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：１７４〕

ウシ型Ｉ５Ｅをコードするの塩基配列を示す。

〔配列番号：１７５〕

後述の実施例２で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１７６〕

後述の実施例２で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１７７〕

後述の実施例２で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１７８〕

後述の実施例２で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１７９〕

後述の実施例２で用いられたプローブの塩基配列を示す。配列中、ＦＡＭは、6-carboxyfluoresceinを、ＴＡＭＲＡは6-carboxy-tetramethylrhodamineをそれぞれ示す。）

〔配列番号：１８０〕

後述の実施例２で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１８１〕

後述の実施例２で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１８２〕

後述の実施例２で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１８３〕

後述の実施例２で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１８４〕

後述の実施例２で用いられたプローブの塩基配列を示す。配列中、FAMは、6-carboxyfluoresceinを、TAMRAは6-carboxy-tetramethylrhodamineをそれぞれ示す。）

後述の実施例１で得られた形質転換体大腸菌（Escherichia coli）DH5α/pBZAQは、平成14（2002）年1月9日から、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7845として、2001年12月18日から、日本国大阪府大阪市淀川

区十三本町2丁目17番85号（郵便番号532-8686）財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16740として寄託されている。

後述の実施例１で得られた形質転換体大腸菌（Escherichia coli）TOP10/pBI5Eは、平成14（2002）年1月9日から、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7844として、2001年12月18日から、財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16739として寄託されている。

後述の参考例１で得られた形質転換体エシェリヒア コリ（Escherichia coli）DH5α/pCR2.1-ZAQCは、平成11（1999）年8月23日から、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧NIBH）に受託番号FERM BP-6855として、平成11（1999）年8月4日から、財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16301として寄託されている。

後述の参考例１で得られた形質転換体エシェリヒア コリ（Escherichia coli）DH5α/pCR2.1-ZAQTは、平成11（1999）年8月23日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧NIBH）に受託番号FERM BP-6856として、平成11（1999）年8月4日から財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16302として寄託されている。

後述の参考例５で得られた形質転換体エシェリヒア コリ（Escherichia coli）TOP10/pRBvは、平成13（2001）年1月11日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧NIBH）に受託番号FERM BP-7427として、2000年12月22日から財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16522として寄託されている。

後述の参考例６で得られた形質転換体エシェリヒア コリ（Escherichia coli）DH5α/pCR2.1-rZAQ1は、平成12（2000）年8月21日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧NIBH）に受託番号FERM BP-7275として、平成12（2000）年8月1日から財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16459として寄託されている。

後述の参考例７で得られた形質転換体エシェリヒア コリ（Escherichia coli）DH10B/pCMV-rZAQ2は、平成12（2000）年8月21日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧NIBH）に受託番号FERM BP-7276として、

平成12（2000）年8月1日から財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16460として寄託されている。

後述の参考例８で得られたエシェリヒア　コリ（Escherichia coli）MM294(DE3)/pTCh2ZAQは、平成13（2001）年4月27日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7572として、2001年3月15日から財団法人発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16587として寄託されている。

後述の参考例９で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）TOP10/pHMITAは、平成12（2000）年7月13日から独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（旧NIBH）に寄託番号FERM BP-7219として、平成12年5月26日から財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16440として寄託されている。

後述の参考例９で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）TOP10/pHMITGは、平成12（2000）年7月13日から独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（旧NIBH）に寄託番号FERM BP-7220として、平成12（2000)年5月26日から財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16441として寄託されている。

後述の参考例１４で取得されたエシェリヒア・コリ（Escherichia coli）MM294(DE3)/pTCh1ZAQは、平成13（2001）年4月27日から、独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7571として、2001年1月16日から、財団法人発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16527として寄託されている。

後述の参考例１５で得られた形質転換体エシェリヒア　コリ（Escherichia coli）TOP10/pMMITは、平成13（2001）年1月11日から、独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（旧NIBH）に受託番号FERM BP-7425として、2000年12月22日から、財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16520として寄託されている。

後述の参考例１６で得られた形質転換体エシェリヒア　コリ（Escherichia coli）TOP10/pRMITは、平成13（2001）年1月11日から、独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（旧NIBH）に受託番号FERM BP-7426として、

2000年12月22日から、財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16521として寄託されている。

〔実施例〕

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。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング（Molecular cloning）に記載されている方法に従った。

実施例１　ウシ型ＺＡＱおよびウシ型Ｉ５Ｅレセプターｃ ＤＮＡのクローニング

ウシ副腎毛細血管内皮細胞（BACE）およびウシ大動脈血管内皮細胞（BAE）より、RNeasy Mini Kit（QIAGEN社）を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってBACE 由来total RNA(BACE tRNA)およびBAE由来total RNA(BAE tRNA)を取得した。これを鋳型として、SUPERSCRIPT First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit（GIBCO BRL社）を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってBACE 由来cDNA(BACE cDNA)およびBAE 由来cDNA(BAE cDNA)を取得した。続いてBACE cDNAを鋳型としてヒトZAQ、マウスZAQ、ラットZAQ、ヒトI5E、マウスI5EおよびGPR73の情報よりdegenerateプライマー ZAQ-B1F（配列番号：１４４）、ZAQ-B1R（配列番号：１４５）を作成し、以下に記したPCR反応を実施した。

ZAQ-B1F: 5'-ATYGTSTGCTGCCCCTTYGAGATG-3'　（配列番号：１４４）

ZAQ-B1R: 5'-TAGTAGAGCTGCTGRTCCACBGRCC-3'　（配列番号：１４５）

PCR反応液はAmpliTaq Gold (Applied Biosystems社)を0.5 μl、添付の10x PCR buffer II (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl)を5μl、25 mM $MgCl_2$を4μl、dNTP mixture (2.0 mM each, Applied Biosystems社)を5μl、12.5μM プライマーZAQ-B1FおよびZAQ-B1Rを 2.5μl、鋳型cDNAを1μl、および蒸留水を29.5 μlを混合して作製した。反応条件は、95℃·10分の初期変性後、95℃·20秒-66℃·30秒のサイクル反応を35回、および66℃·10分の最終伸長反応とした。

得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA配

列をABI3100 DNA sequencerを用いて解読し、ウシ型ＺＡＱの部分配列（配列番号：１４６）およびウシ型Ｉ５Ｅの部分配列（配列番号：１４７）の塩基配列を得た。

ウシ副腎毛細血管内皮細胞（BACE）より、TRIzol Reagent（GIBCO BRL社）を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってBACE 由来total RNA(BACE tRNA)を取得した。これを鋳型として、mRNA Purification Kit（Amersham pharmacia biotech社）を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってBACE 由来mRNA(BACE mRNA)を取得した。BACE mRNAを鋳型として、Marathon cDNA Amplification Kit（CLONTECH社）を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってBACE 由来Library of adaptor-ligated ds cDNA(BACE AL ds cDNA)を作成した。

配列番号：１４６の情報より、プライマー bZAQ5-2（配列番号：１４８）とbZAQ5-3（配列番号：１４９）を作成し、BACE AL ds cDNAを鋳型として以下に記した5'RACE実験を実施した。

bZAQ5-2: 5'-GGCCAGCAGGGCGTTGGTGGAGA-3' （配列番号：１４８）

bZAQ5-3: 5'-GTGCGCAGGTAGTTGACAGAGGCGCACA-3' （配列番号：１４９）

5'RACEのPCR反応液は50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix（CLONTECH社）を0.5μl、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer （200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM $Mg(OAc)_2$, 25% Dimethyl Sulfoxide, 18.75μg/ml BSA, 0.025%Tween-20, 0.025% Nonidet-P40)を5μl、dNTP mixture（2.5 mM each, 宝酒造）を2μl、10μMプライマーbZAQ5-2を 0.5μl、10μMプライマーAP1（プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を0.5μl、鋳型cDNA（BACE AL ds cDNAの50倍希釈液）を2.5μl、および蒸留水を14μlを混合して作製した。反応条件は94℃・30秒の初期変性後、94℃・5秒-72℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-70℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-68℃・4分のサイクル反応を25回行った。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix（CLONTECH社）を0.5μl、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer (200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM $Mg(OAc)_2$, 25%

Dimethyl Sulfoxide,18.75μg/ml BSA, 0.025%Tween-20, 0.025% Nonidet-P40)を5μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を2.0μl、10μMプライマーbZAQ5-3を 0.5μl、10μMプライマーAP2 (プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの) を0.5 μl、鋳型DNA (該PCR反応液50倍希釈液) を2.5μl、および蒸留水を14μlを混合して作製した。反応条件は94℃・30秒の初期変性後、94℃・5秒-72℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-70℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-68℃・4分のサイクル反応を25回行った。

得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA配列をABI3100 DNA sequencerを用いて解読し、2種類のウシZAQの5'部分配列（type1：配列番号：１５０；type2：配列番号：１５１）の配列を得た。

配列番号：１５０の情報より、プライマー bZAQa-F1 (配列番号：１５２）とbZAQa-F2 (配列番号：１５３）を作成し、以下に記した3'RACE実験を実施した。

bZAQa-F1: 5'-TCATCAGCCCGACCGCCCACTCTGGC-3' (配列番号：１５２)

bZAQa-F2: 5'-TAGGATGAAGCTTGGATTCTGGACGCCA-3' (配列番号：１５３)

3'RACEのPCR反応液は、PfuTurbo DNA polymerase (Stratagene社)を1μl、添付の10x PCR bufferを5μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4μl、10μMプライマーbZAQa-F1および10μMプライマーAP1 (プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの) を各2.5μl 、鋳型cDNA (BACE AL ds cDNAの50倍希釈液) を1μl、および蒸留水を34μlを混合して作製した。反応条件は94℃・30秒の初期変性後、94℃・5秒-72℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-70℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-68℃・4分のサイクル反応を25回行った。

続いて、該PCR反応の反応液を蒸留水で50倍に希釈したものをを鋳型としてnested PCRを行った。PCR反応液は、PfuTurbo DNA polymerase (Stratagene社)を1μl、添付の10x PCR bufferを5μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4μl、10μMプライマーbZAQa-F2および10μMプライマーAP1 (プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの) を各2.5μl 、鋳型DNAを1μl、および蒸留水を34μlを混合して作製した。反応条件は94℃・30秒の初期変

性後、94℃・5秒-72℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-70℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-68℃・4分のサイクル反応を25回行った。

得られたDNA断片をZaro Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA配列をABI3100 DNA sequencerを用いて解読し、ウシZAQの3'端の塩基配列（配列番号：１５４）を得た。

5'RACEおよび3'RACEの情報より、プライマーbZAQa-EF1（配列番号：１５５）、bZAQa-IF1（配列番号：１５６）、bZAQa-IR1（配列番号：１５７）およびbZAQa-ER1（配列番号：１５８）を作成し、BACE AL ds cDNAの50倍希釈液を鋳型として、以下に記したPCR反応を実施した。

bZAQa-EF1: 5'-TTTGAGTCGCTCCCAGTGTGTCCT-3' （配列番号：１５５）

bZAQa-IF1: 5'-GCTCCTCCCGGTTCTTTGAAATC-3' （配列番号：１５６）

bZAQa-IR1: 5'-TGTAGTCTCTGAATCTCACTGGTGCC-3' （配列番号：１５７）

bZAQa-ER1: 5'-GGTGGATTAAAAAGGCCCTCAATAAGCC-3' （配列番号：１５８）

PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase(Stratagene社)を1 μl、添付の10x PCR bufferを5μl、2.5 mM dNTP mixtureを4μl、10μMプライマーbZAQa-EF1およびbZAQa-ER1を各2.5μl 、鋳型DNAを1μl、および蒸留水を34μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-60℃・30秒-72℃・3分のサイクル反応を35回、および72℃・10分の最終伸長反応とした。

続いて、該PCR反応の反応液を蒸留水で50倍に希釈したものを鋳型としてnested PCRを行った。PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase (Stratagene社)を1μl、添付の10x PCR bufferを5μl、2.5 mM dNTP mixtureを4μl、10μMプライマーbZAQa-IF1およびbZAQa-IR1を各2.5μl 、鋳型DNAを1μl、および蒸留水を34μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-60℃・30秒-72℃・3分のサイクル反応を35回、および72℃・10分の最終伸長反応とした。

得られたDNA断片をZaro Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA配列をABI3100 DNA sequencerを用いて解読し、ウシ型ＺＡＱ全長をコードする2038 bpのDNA断片（配列番号：１５９）を有するｐＢＺＡＱを得ること

ができた。該プラスミドによりトランスフォームさせた大腸菌ＤＨ５αを、大腸菌ＤＨ５α／ｐＢＺＡＱと命名した。

配列番号：１５９で表される塩基配列を有するｃＤＮＡ断片には、３９３個のアミノ酸配列（配列番号：１７１）がコードされており（配列番号：１７２）、該アミノ酸配列を有する蛋白質をウシ型ＺＡＱと命名した。

配列番号：１４７の情報より、プライマー bI5E5-1（配列番号1-60）および bI5E5-3（配列番号：１６１）を作成し、BACE AL ds cDNAを鋳型として以下に記した5'RACE実験を実施した。

bI5E5-1: 5'-GTAGGCTGATGGGATGGAGATGAGAATGGA-3' （配列番号：１６０）

bI5E5-3: 5'-GCAGGTAGTTGATACAGGCACAGAGCACAT-3' （配列番号：１６１）

5'RACEのPCR反応液は50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を0.5μl、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer (200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM $Mg(OAc)_2$, 25% Dimethyl Sulfoxide, 18.75μg/ml BSA, 0.025%Tween-20, 0.025% Nonidet-P40)を5μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を2μl、10μMプライマーbI5E5-1を 0.5μl、10μMプライマーAP1（プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を0.5μl、鋳型cDNA（BACE AL ds cDNAの50倍希釈液）を2.5μl、および蒸留水を14μlを混合して作製した。反応条件は94℃・30秒の初期変性後、94℃・5秒-72℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-70℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-68℃・4分のサイクル反応を25回行った。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を0.5μl、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer (200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM $Mg(OAc)_2$, 25% Dimethyl Sulfoxide, 18.75μg/ml BSA, 0.025%Tween-20, 0.025% Nonidet-P40)を5μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を2.0μl、10μMプライマーbI5E5-3を 0.5μl、10μMプライマーAP2（プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を0.5μl、鋳型DNA（該PCR反応液50倍希釈液）を2.5μl、および蒸留水を14μlを混合して作製した。反応条件は94℃・30秒の初期変性後、94℃・5秒-72℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-70℃・4

分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-68℃・4分のサイクル反応を25回行った。

得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA配列をABI3100 DNA sequencerを用いて解読し、ウシI5Eの5'部分配列（配列番号：１６２）を得た。

配列番号：１４７の情報より、プライマーbI5E3-1（配列番号：１６３）およびbI5E3-3（配列番号：１６４）を作成し、以下に記した3'RACE実験を実施した。

bI5E3-1: 5'-AGCCTCCTTCCTGATCGCTCTGGTCTG-3' （配列番号：１６３）

bI5E3-3: 5'-CCCATCAGCCTACTTCACAAAGGAAACCG-3' （配列番号：１６４）

3'RACEのPCR反応液は50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を0.5μl、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer (200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM $Mg(OAc)_2$, 25% Dimethyl Sulfoxide, 18.75μg/ml BSA, 0.025%Tween-20, 0.025% Nonidet-P40)を5μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を2μl、10μMプライマーbI5E3-1を 0.5μl、10μMプライマーAP1（プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を0.5μl、鋳型cDNA（BACE AL ds cDNAの50倍希釈液）を2.5μl、および蒸留水を14μlを混合して作製した。反応条件は94℃・30秒の初期変性後、94℃・5秒-72℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-70℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-68℃・4分のサイクル反応を25回行った。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を0.5μl、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer (200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM $Mg(OAc)_2$, 25% Dimethyl Sulfoxide, 18.75μg/ml BSA, 0.025%Tween-20, 0.025% Nonidet-P40)を5μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を2.0μl、10μMプライマーbI5E3-3を 0.5μl、10μMプライマーAP2（プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を0.5μl、鋳型DNA（該PCR反応液50倍希釈液）を2.5μl、および蒸留水を14μlを混合して作製した。反応条件は94℃・30秒の初期変性後、94℃・5秒-72℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-70℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-68℃・4分のサイクル反応を25回行った。

得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA配列をABI3100 DNA sequencerを用いて解読し、ウシI5Eの3'部分配列 (配列番号1-65) を得た。

5'RACEおよび3'RACEの情報より、プライマーbZAQb-F (配列番号：１６６)、bZAQb-F2 (配列番号：１６７)、bZAQb-R (配列番号：１６８) およびbZAQb-R2 (配列番号：１６９) を作成し、BACE AL ds cDNAの50倍希釈液を鋳型として、以下に記したPCR反応を実施した。

bZAQb-F: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (配列番号：１６６)

bZAQb-F2: 5'-GCTGGGTGAGAAGGAATAGGGA-3' (配列番号：１６７)

bZAQb-R: 5'-GCAGGTGCCAATTCATTTTGC-3' (配列番号：１６８)

bZAQb-R2: 5'-TGCTCTTTAATCTCGCTGGTGGT-3' (配列番号：１６９)

PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase(Stratagene社)を1μl、添付の10x PCR bufferを5μl、2.5 mM dNTP mixtureを4μl、10μMプライマーbZAQb-FおよびbZAQb-Rを各2.5μl 、鋳型DNAを1μl、および蒸留水を34μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-58℃・30秒-72℃・3分のサイクル反応を40回、および72℃・10分の最終伸長反応とした。

続いて、該PCR反応の反応液を蒸留水で50倍に希釈したものを鋳型としてnested PCRを行った。PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase (Stratagene社)を1μl、添付の10x PCR bufferを5μl、2.5 mM dNTP mixtureを4μl、10μMプライマーbZAQb-F2およびbZAQb-R2を各2.5μl 、鋳型DNAを1μl、および蒸留水を34μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-58℃・30秒-72℃・3分のサイクル反応を40回、および72℃・10分の最終伸長反応とした。

得られたDNA断片をZaro Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA配列をABI3100 DNA sequencerを用いて解読し、ウシ型Ｉ５Ｅ全長をコードする1623 bpのDNA断片 (配列番号：１７０) を有するｐＢＩ５Ｅを得ることができた。該プラスミドによりトランスフォームさせた大腸菌ＴＯＰ１０を、大腸菌ＴＯＰ１０／ｐＢＩ５Ｅと命名した。

配列番号：１７０で表される塩基配列を有するｃＤＮＡ断片には、３８４個のアミノ酸配列（配列番号：１７３）がコードされており（配列番号：１７４）、該アミノ酸配列を有する蛋白質をウシ型Ｉ５Ｅと命名した。

実施例２　ウシ副腎毛細血管内皮細胞（ＢＡＣＥ）およびウシ大動脈血管内皮細胞（ＢＡＥ）に発現しているウシ型ＺＡＱおよびウシ型Ｉ５Ｅレセプターの同定

pBZAQを鋳型としてウシ型ZAQの情報より、プライマー bZAQa-IF1（配列番号：１７５）およびbZAQa-tempIR（配列番号：１７６）を作成し、以下に記した方法でZAQ用標準DNA断片を作製した。

bZAQa-IF1: 5'-GCTCCTCCCGGTTCTTTGAAATC-3'　（配列番号：１７５）

bZAQa-tempIR: 5'-TGGTGAGGTTGCGTAGCTTCTTG-3'　（配列番号：１７６）

PCR反応液はPfuTurbo hotstart DNA polymerase (Stratagene社)を4μl、添付の10x PCR bufferを20μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を16μl、10μMプライマーbZAQa-IF1およびbZAQa-tempIRを各10μl 、鋳型cDNA (pBZAQ) を4μl、および蒸留水を136μlを混合して作製した。反応条件は95℃･1分の初期変性後、95℃･30秒-60℃･30秒-72℃･1分のサイクル反応を40回行った。得られたDNA断片をウシ型ZAQ用標準DNA断片とした。

ウシ型ZAQの情報よりPrimer Expressソフトウェアを用いて、ウシ型ZAQ用forwardおよびreverse TaqMan primer、bZAQa-taqF（配列番号：１７７）およびbZAQa-taqR（配列番号：１７８）、ウシ型ZAQ用TaqMan probe、bZAQa-probe（配列番号：１７９）を作製した。

bZAQa-taqF: 5'-AACCAACTATTTCCCTCTGCTTGAC-3'　（配列番号：１７７）

bZAQa-taqR: 5'-TCACCGTAGCTGAAGTTGAAGG-3'　（配列番号：１７８）

bZAQa-probe: 5'-FAM-CCTCGGAGCCCAAGCTGCTTCTTT-TAMRA-3'　（配列番号：１７９）

ウシ型ZAQ遺伝子に対するTaqMan ProbeとTaqMan Primerとの組合せで、BACE由来cDNA(BACE cDNA)およびBAE 由来cDNA(BAE cDNA)を鋳型としてTaqMan PCR解析によるウシ型ZAQ遺伝子転写産物の定量を行った。反応液は2xTaqMan PCR Master Mix 12.5μl、5μMプライマーbZAQa-taqFおよびbZAQa-taqRを各1.5μl 、

5μMプローブbZAQa-probeを各1μl、希釈濃度の異なるウシ型ZAQ用標準DNA断片あるいは鋳型cDNAを4μl（200ng tRNA由来）、および蒸留水を4.5μlを混合して作製した。

TaqMan PCR反応は、50℃・2分95℃・10分の初期反応、95℃・15秒-60℃・1分のサイクル反応を50回という条件で、SDS7700（Sequence Detection System、ABI）を用いて行った。 反応終了後、ソフトウェア上で各希釈濃度の標準DNA断片に対する蛍光強度より標準曲線をプロットし、鋳型cDNAサンプル中のウシ型ZAQ遺伝子転写産物を定量した。

pBI5Eを鋳型としてウシ型I5Eの情報よりプライマー bZAQb-F2（配列番号：１８０）およびbZAQb-tempIR（配列番号：１８１）を作成し、以下に記した方法でZAQ用標準DNA断片を作製した。

bZAQb-F2: 5'-GCTGGGTGAGAAGGAATAGGGA-3' （配列番号：１８０）

bZAQb-tempIR: 5' -GGAGAGCTGATGCACCACATAGTAG-3' （配列番号：１８１）

PCR反応液はPfuTurbo hotstart DNA polymerase（Stratagene社）を4μl、添付の10x PCR bufferを20μl、dNTP mixture（2.5 mM each, 宝酒造）を16μl、10μMプライマーbZAQb-F2およびbZAQb-tempIRを各10μl、鋳型cDNA（pBI5E）を4μl、および蒸留水を136μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-60℃・30秒-72℃・1分のサイクル反応を40回行った。得られたDNA断片をウシ型I5E用標準DNA断片とした。

ウシ型I5Eの情報よりPrimer Expressソフトウェアを用いて、ウシ型I5E用forwardおよびreverse TaqMan primer、bZAQb-taqF（配列番号：１８２）およびbZAQb-taqR（配列番号：１８３）、ウシ型I5E用TaqMan probe、bZAQb-probe（配列番号：１８４）を作製した。

bZAQb-taqF: 5'-TCATGAGAGCAGAAGGTCTGGA-3' （配列番号：１８２）

bZAQb-taqR: 5' -TGGCTGGAAAACTAGCATTTCC-3' （配列番号：１８３）

bZAQb-probe: 5'-FAM-CACACACCGCTCACTGGAAAGCTTCA-TAMRA-3'（配列番号：１８４）

ウシ型I5E遺伝子に対するTaqMan ProbeとTaqMan Primerとの組合せで、BACE由来cDNA(BACE cDNA)およびBAE 由来cDNA(BAE cDNA)を鋳型としてTaqMan PCR解

析によるウシ型I5E遺伝子転写産物の定量を行った。反応液は2xTaqMan PCR Master Mix 12.5μl、5μMプライマーbZAQb-taqFおよびbZAQb-taqRを各1.5μl、5μMプローブbZAQb-probeを各1μl、希釈濃度の異なるウシ型I5E用標準DNA断片あるいは鋳型cDNAを4μl（200ng tRNA由来）、および蒸留水を4.5μlを混合して作製した。

TaqMan PCR反応は、50℃・2分95℃・10分の初期反応、95℃・15秒-60℃・1分のサイクル反応を50回という条件で、SDS7700（Sequence Detection System、ABI）を用いて行った。 反応終了後、ソフトウェア上で各希釈濃度の標準DNA断片に対する蛍光強度より標準曲線をプロットし、鋳型cDNAサンプル中のウシ型I5E遺伝子転写産物を定量した。

結果を〔図６〕に示す。これより、ウシ副腎毛細血管内皮細胞にはウシ型ＺＡＱおよびウシ型Ｉ５Ｅが発現されていることがわかる。また、ウシ大動脈血管内皮細胞にはウシ型Ｉ５Ｅが発現されていることがわかる。

実施例３

（１）ウシ副腎毛細血管内皮細胞（ＢＡＣＥ）を用いたＦＬＩＰＲによる細胞内カルシウムイオン濃度上昇活性の測定

BACEはGospodarowicz等が報告している方法を用いて単離した（Journal of Cellular Physiology 127, 121-136, 1986）。増殖用培地(10% ウシ胎児血清（FBS）、100 units/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycinを含むDMEM）に分散したBACEを3×10^4 cells/200 μl/wellになるようにFLIPR用96穴プレート(Black plate clear bottom、Coster社)に播種し、5% CO_2インキュベーター中にて37℃で一晩培養後実験に用いた(以後細胞プレートとする)。FLIPRアッセイバッファー（ニッスイハンクス２（日水製薬株式会社） 9.8 g、炭酸水素ナトリウム 0.35 g、HEPES 4.77 g、6 M水酸化ナトリウム溶液で pH 7.4に合わせた後、1リットルにフィルアップ後フィルター滅菌）10 ml、250 mM Probenecid 100 μl、FBS 100 μlを混合した。また、Fluo 3-AM（同人化学研究所） 1バイアル(25 μg)にdimethyl sulfoxideを20 μlと20% Pluronic acid (Molecular Probes社) 20 μlを添加し溶解後、これを上記Hanks'/HBSS－Probenecid－FBS に加え、

培養上清を除いた細胞プレートに各ウエル100 μlずつ分注し、5% CO_2インキュベーター中にて37℃で1時間インキュベートした。

一方、参考例１４、８および１３に示した方法で調製したヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、ヒト型Ｂｖ８ペプチドまたはヘビ毒ＭＩＴ１を、2.5 mM Probenecid、0.2% bovine serum albumin (BSA), 0.1% CHAPSを含むHanks'/HBSSで希釈し、96穴プレートに分注した(サンプルプレート)。細胞プレートの色素ローディング終了後、細胞プレートを2.5 mM Probenecidを含むFLIPRアッセイバッファー（洗浄用バッファー）でプレートウォッシャー(Molecular Devices社)を用いて４回洗浄後、100 μlの洗浄バッファーを残した。この細胞プレートとサンプルプレートをFLIPRにセットしアッセイを行った（FLIPRにより、サンプルプレートから50 μlのサンプルが細胞プレートへと移される）。

結果を〔図7〕に示す。

これより、ウシ毛細血管内皮細胞（ＢＡＣＥ）はヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、ヒト型Ｂｖ８ペプチドおよびヘビ毒ＭＩＴ１に応答して細胞内カルシウムイオンの上昇を起こすことが明らかである。

従って、試験化合物の存在下または非存在下、ヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、ヒト型Ｂｖ８ペプチドおよびヘビ毒ＭＩＴ１などの本発明のペプチドを用いてウシ毛細血管内皮細胞を刺激することにより、試験化合物にＺＡＱまたはＩ５Ｅのシグナル情報伝達を阻害する活性があるのか否かを知ることができ、血管新生阻害剤を得ることができる。

（2）リン酸化ｐ４２ ＭＡＰキナーゼおよびリン酸化ｐ４４ ＭＡＰキナーゼのウエスタンブロッティングによる検出

増殖用培地に分散したBACEを2×10^5 cells/ml/wellになるように12穴プレートに播種し一晩5% CO_2、37℃で培養後実験に用いた。10 nM、100 nM、1,000 nMのリガンド溶液を10 μl添加し37℃で5分間インキュベーションした。

このリガンド溶液として、参考例１４、８および１３に示した方法で調製したヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、ヒト型Ｂｖ８ペプチドまたはヘビ毒ＭＩＴ１を、0.2% BSAと0.1% CHAPSを含むH/HBSSに溶解したものを用いた。

その後、培養上清を除去しLysis Buffer (50 mM Tris、150 mM NaCl、1 mM EDTA、2 mM Na_3VO_4、50 mM NaF、4 mM $Na_4P_2O_7$、1% NP 40、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、20 μg/ml、leupeptin、10 μg/ml pepstatin A、pH 7.4) を100 μl添加した。氷上で30分間放置後、上清を15,000 rpmで10分間遠心し得られた上清にSDS-PAGE用サンプルバッファー(300 mM Tris、10% sodium dodesylsulfate、0.025% bromophenolblue、50% glycerol、pH 6.8)を20 μl添加し3分間煮沸した。このうち18 μlを12.5%のゲル (BIO-RAD社) を用いてSDS-PAGEで分離した。電気泳動後、ゲルをトランスファー用バッファー (25 mM Tris、192 mM Glycine、10% MeOH) 中で15分間しんとうした後、ゲル中の蛋白をPVDF膜 (MiniProBlot、Applied Biosystems) にトランスファーした。トランスファーした膜 (ブロット) をブロッキングバッファー (50 mM Tris、150 mM NaCl、0.1% Tween 20、1% BSA、pH 7.4) を用いて一晩4℃でブロッキングした。この後、ブロットに一次抗体溶液 (Cell Signaling TECHNOLOGY社のPhospho p42/44 MAP Kinase Antibodyを前述のブロッキングバッファーで5,000倍希釈したもの) を30 ml添加し室温で2時間インキュベートした。この後、ブロットを洗浄用バッファー (50 mM Tris、150 mM NaCl、0.1% Tween 20、pH 7.4) で洗浄後 (20分間×3) 、ブロットに二次抗体溶液 (KPL社のAnti Rabbit IgG HRP-linked (Goat)を前述のブロッキングバッファーで1,000倍希釈したもの) 30 ml添加し室温で1時間反応させた。この後、ブロットを洗浄用バッファーで洗浄し (20分間×3) 、さらにバッファー (50 mM Tris、150 mM NaCl、pH 7.4) で洗浄後 (2分間×2) 、ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech)を用いてリン酸化p42/44 MAP Kinaseを検出した。

結果を〔図８〕に示す。

図８より、リガンドを添加しないコントロールに比べ、ヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、ヒト型Ｂｖ８ペプチドまたはヘビ毒ＭＩＴ１を添加した場合にはリン酸化されたＭＡＰキナーゼ（ＭＡＰＫ－Ｐ）のバンドの染色強度が増強していることを読み取ることができる。また、ヘビ毒ＭＩＴ１は０．１ｎＭという低濃度からこの増強効果を現すことができ、ヒト型Ｂｖ８ペプチドは１ｎＭ から、ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドは１０　ｎＭからこの効果を現した。

ウシ毛細血管内皮細胞（ＢＡＣＥ）はヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、ヒト型Ｂｖ８ペプチドおよびヘビ毒ＭＩＴ１などのペプチドの添加によりＭＡＰキナーゼの活性化が起こることが明らかである。

従って、試験化合物の存在下または非存在下、ヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、ヒト型Ｂｖ８ペプチドおよびヘビ毒ＭＩＴ１などの本発明のペプチドを用いてウシ毛細血管内皮細胞を刺激することにより、試験化合物にＺＡＱまたはＩ５Ｅのシグナル情報伝達を阻害する活性を有しているのか否かを知ることができ、血管新生阻害剤を得ることができる。

（３）リン酸化ｐ３８　ＭＡＰキナーゼのウエスタンブロッティングによる検出

増殖用培地に分散したBACEを2×10^5 cells/ml/wellになるように12穴プレートに播種し一晩5% CO_2、37℃で培養後実験に用いた。10 nM、100 nM、1,000 nMのリガンド溶液を10 μl添加し37℃で5分間インキュベーションした。

このリガンド溶液は、参考例１４、８および１３に示した方法で調製したヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、ヒト型Ｂｖ８ペプチドまたはヘビ毒ＭＩＴ１を、0.2% BSAと0.1% CHAPSを含むH/HBSS に溶解したものを用いた。

その後、培養上清を除去しLysis Buffer（50 mM Tris、150 mM NaCl、1 mM EDTA、2 mM Na_3VO_4、50 mM NaF、4 mM $Na_4P_2O_7$、1% NP 40、1 mM PMSF、20 μg/ml、leupeptin、10 μg/ml pepstatin A、pH 7.4）を100 μl添加した。氷上で30分間放置後、上清を15,000 rpmで10分間遠心し得られた上清にSDS-PAGE用サンプルバッファー20μl添加し3分間煮沸した。このうち18 μlを12.5%のゲル（BIO-RAD社）を用いてSDS-PAGEで分離した。電気泳動後、ゲルをトランスファー用バッファー（25 mM Tris、192 mM Glycine、10% MeOH）中で15分間しんとうした後、ゲル中の蛋白をPVDF膜（MiniProBlot、Applied Biosystems）にトランスファーした。トランスファーした膜（ブロット）をブロッキングバッファー（50 mM Tris、150 mM NaCl、0.1% Tween 20、1% BSA、pH 7.4）を用いて室温で1時間ブロッキングした。この後、ブロットに一次抗体溶液（Cell Signaling TECHNOLOGY社のPhospho p38 MAP Kinase（Thr180/Tyr182）Antibodyを前述のブロッキング溶液で1,000倍希釈したもの）を30 ml添加し4℃で一晩インキュベー

トした。この後、ブロットを洗浄用バッファーで洗浄後（20分間×3）、ブロットに二次抗体溶液（Cell Signaling TECHNOLOGY社のAnti Rabbit IgG, HRP-linked Antibodyを前述のブロッキングバッファーで1,000倍希釈したもの）30 ml添加し室温で1時間反応させた。この後、ブロットを洗浄用バッファー（50 mM Tris、150 mM NaCl、0.1% Tween 20、pH 7.4）で洗浄し（20分間×3）、さらにバッファー（50 mM Tris、150 mM NaCl、pH 7.4）で洗浄後（2分間×2）、ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech)を用いてリン酸化p38 MAP Kinaseを検出した。

結果を〔図９〕に示す。

図９より、リガンドを添加しないコントロールに比べてヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、ヒト型Ｂｖ８ペプチドまたはヘビ毒ＭＩＴ１などのペプチドを添加した場合にはリン酸化されたＰ３８ ＭＡＰキナーゼ（ｐ３８ ＭＡＰＫ－Ｐ）のバンドの染色強度が増強していることを読み取ることができる。また、ヘビ毒ＭＩＴ１は０．１ｎＭという低濃度からこの増強効果を現すことができ、ヒト型Ｂｖ８ペプチドは１ｎＭ から、ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドは１０ｎＭからこの効果を現した。

ウシ毛細血管内皮細胞（ＢＡＣＥ）はヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、ヒト型Ｂｖ８ペプチドおよびヘビ毒ＭＩＴ１などのペプチドの添加により ｐ３８ ＭＡＰキナーゼの活性化が起こることが明らかである。

従って、試験化合物の存在下または非存在下、ヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、ヒト型Ｂｖ８ペプチドおよびヘビ毒ＭＩＴ１などの本発明のペプチドを用いてウシ毛細血管内皮細胞を刺激することにより、試験化合物にＺＡＱまたはＩ５Ｅのシグナル情報伝達を阻害する活性を有しているのか否かを知ることができ、血管新生阻害剤を得ることができる。

（４）［^{3}H］チミジン取り込みアッセイ

増殖用培地に分散したBACEを1.5×10^{4} cells/200 μl/wellになるように48ウエルプレートに播種し一晩培養後、培養上清を除去しアッセイバッファー（0.5% BSA、0.1% FBSを含むDMEM）495 μlとリガンド溶液5 μlを添加し、さらに15-

18時間培養した。

このリガンド溶液としては、参考例１４、８および１３に示した方法で調製したヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、ヒト型Ｂｖ８ペプチドまたはヘビ毒ＭＩＴ１を、0.2% BSAと0.1% CHAPSを含むH/HBSS に溶解したものを用いた。

その後、各ウエルに[^{3}H]Thymidine溶液（NEN社、NET-027を血清不含DMEMで100倍希釈したもの）を50 μl添加しさらに6時間培養した。この後、培養上清を除去し各ウエルに洗浄バッファー500 μlを添加し洗浄後、メタノール500 μlを添加し氷上で15分間放置した。その後、各ウエルの上清を除去し5%トリクロロ酢酸（TCA）500 μlを添加し氷上で15分間放置後、TCAを除去し水500 μlを添加し洗浄した。最後に0.3 M NaOHを200μl添加し溶解後、液体シンチレーターを3 ml添加し放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

結果を〔図１０〕に示す。

図１０より、リガンドを添加しないコントロールに比べてヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、ヒト型Ｂｖ８ペプチドまたはヘビ毒ＭＩＴ１を添加した場合にはウシ副腎毛細血管内皮細胞の［^{3}H］チミジン取り込み量が増加していることがわかる。

従って、試験化合物の存在下または非存在下、ヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、ヒト型Ｂｖ８ペプチドおよびヘビ毒ＭＩＴ１などの本発明のペプチドを用いてウシ毛細血管内皮細胞を刺激することにより、試験化合物にＺＡＱまたはＩ５Ｅのシグナル情報伝達を阻害する活性を有しているのか否かを知ることができ、血管新生阻害剤を得ることができる。

（５）細胞増殖アッセイ

増殖用培地に分散したBACEを5×10^3 cells/ml/wellになるように24穴プレートに播種し一晩培養した後、参考例１４および８に示した方法で調製したヒト型ＺＡＱリガンドペプチドまたはヒト型Ｂｖ８ペプチドを、0.2% BSAと0.1% CHAPSを含むH/HBSS に溶解したものを10 μl添加し、さらに4-5日間培養した。その後、培養上清を除去しPBS1mlをウエルに添加し細胞を洗浄後、トリプシン溶液200 μlを添加し細胞をピペッティングで回収し、細胞数を血球計算版で測定した。

結果を〔図１１〕に示す。

図１１より、上記ペプチドを添加しないコントロールに比べてヒト型ＺＡＱリガンドペプチドまたはヒト型Ｂｖ８ペプチドを添加した場合にはウシ副腎毛細血管内皮細胞の細胞数が増加していることがわかる。

従って、試験化合物の存在下または非存在下、ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドおよびヒト型Ｂｖ８ペプチドなどの本発明のペプチドを用いてウシ毛細血管内皮細胞を刺激することにより、試験化合物にＺＡＱまたはＩ５Ｅのシグナル情報伝達を阻害する活性を有しているのか否かを知ることができ、血管新生阻害剤を得ることができる。

参考例１　Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質ＺＡＱをコードするｃＤＮＡのクローニングと塩基配列の決定およびＺＡＱの発現分布の解析

（１）Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質ＺＡＱをコードするｃＤＮＡのクローニングと塩基配列の決定

ヒト脳下垂体ｃＤＮＡ（CLONTECH社）を鋳型とし、２個のプライマー、プライマー１（5'- GTC GAC ATG GAG ACC ACC ATG GGG TTC ATG G -3'；配列番号：４）及びプライマー２（5'- ACT AGT TTA TTT TAG TCT GAT GCA GTC CAC CTC TTC -3'；配列番号：５）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ｃＤＮＡの１０分の１量を鋳型として使用し、Advantage2 Polymerase Mix（CLONTECH社）１／５０量、プライマー１及びプライマー２を各0.2μM, dNTPs 200μM、及び酵素に添付のバッファーを加え、25μlの液量とした。ＰＣＲ反応は、９４℃・２分の後、９４℃・２０秒、７２℃・１００秒のサイクルを３回、９４℃・２０秒、６８℃・１００秒のサイクルを３回、９４℃・２０秒、６４℃・２０秒、６８℃・１００秒のサイクルを３８回繰り返し、最後に６８℃・７分の伸長反応を行った。該ＰＣＲ反応後の反応産物をＴＡクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌ＤＨ５αに導入し、ｃＤＮＡをも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後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白

質をコードする２種類のｃＤＮＡ配列ＺＡＱＣ（配列番号：２）及びＺＡＱＴ（配列番号：３）を得た。このｃＤＮＡより導き出されるアミノ酸配列を有する蛋白質はいずれも同一配列（配列番号：１）を有したためＺＡＱと命名し、配列番号：２で表されるＤＮＡを含有する形質転換体を大腸菌（Escherichia coli）ＤＨ５α／ｐＣＲ２．１－ＺＡＱＣと、配列番号：３で表されるＤＮＡを含有する形質転換体を大腸菌ＤＨ５α／ｐＣＲ２．１－ＺＡＱＴと命名した。

（２）Ｔａｑｍａｎ ＰＣＲによるＺＡＱの発現分布の解析

Taqman PCRに用いるプライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 1.0 (PEバイオシステムスジャパン)を用いて検索し、プライマー３(5'-TCATGTTGCTCCACTGGAAGG-3'（配列番号：５８），プライマー４（5'-CCAATTGTCTTGAGGTCCAGG-3'（配列番号：２９），ZAQprobe（5'-TTCTTACAATGGCGGTAAGTCCAGTGCAG-3'（配列番号：６０））を選択した。プローブのリポーター色素として、FAM（6-carboxyfluorescein）を付加した。

スタンダードDNAとして、pAK－ZAQCを鋳型に、プライマーZAQC Sal（5'-GTCGACATGGAGACCACCATGGGGTTCATGG- 3'（配列番号：６１））およびZAQC Spe(5'-ACTAGTTTATTTTAGTCTGATGCAGTCCACCTCTTC-3'（配列番号：６２））を用いて増幅したPCR断片を、CHROMA SPIN200（CLONTECH Laboratories, Inc.（CA, USA））を用いて精製し、10^0－10^6コピー/ μlに調整して使用した。各組織のcDNAソースとして、Human Multiple Tissue cDNA Panel IおよびPanel II（CLONTECH Laboratories, Inc.）を 使用した。プライマー、プローブ、鋳型に、Taqman Universal PCR Master Mix（PEバイオシステムスジャパン）を添付書類記載の規定量加え、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System（PEバイオシステムズジャパン）でPCR反応および解析をおこなった。

結果を表１に示す。主に精巣、ついで肺、脳等の部位でZAQの発現がみられた。

〔表１〕

組　織	ZAQ（コピー/μl）
Brain	6.1
Heart	2.9
Kidney	2.8
Liver	2.6
Lung	7.0
Pancreas	2.1
Placenta	3.2
Skeletal Muscle	2.6
Colon	1.8
Ovary	3.4
Leukocyte	0.0
Prostate	0.7
Small Intestine	2.2
Spleen	2.1
Testis	28.0
Thymus	1.1

参考例２ レセプター安定発現ＣＨＯ細胞の作製

（２－１）ＺＡＱ安定発現細胞株の作製

ZAQ安定発現細胞株は以下のようにして調製した。すなわち、参考例１で得たDH5α／pCR2.1－ZAQCの１クローンを、アンピシリンを含むLB培地で振とう培養し、プラスミドpCR2.1－ZAQCを得た。これを制限酵素Sal IおよびSpe Iで処理し、ZAQCをコードするインサート部分を切り出した。同様に制限酵素Sal IおよびSpe Iで処理したpAKKO－1.11H（Biochemica et Biophysica Acta 1219（1994）251-259）と、該インサート部分をLigation Express Kit （CLONTECH Laboratories, Inc. （CA, USA））を用いて連結し、大腸菌DH10Bにエレクトロポーレーション

法にて導入した。得られたクローンの有するプラスミドの構造を、制限酵素処理ならびに配列解析で確認し、正しい構築のものをCHO細胞発現用プラスミドpAK－ZAQCとして使用した。

このプラスミドpAK－ZAQCをCHO/dhfr$^-$細胞（American Type Culture Collection）にCellPhect Transfection kit（Amersham Pharmacia Biotech社）を用いて形質導入することにより取得した。まず、蒸留水120 μlに溶解したプラスミドDNA 4 μgに対してBuffer A（CellPhect Transfection Kitに添付）120 μlを添加し、撹拌し、10分間静置後、Buffer B（CellPhect Transfection Kitに添付）240 μlを添加し、激しく撹拌し該DNAを含有するＤＮＡ－リン酸カルシウム複合体を形成させた。5 x 10^5個のCHO/ dhfr$^-$ 細胞を60 mmシャーレに播き、10％のウシ胎児血清（BIO WHITTAKER 社）を含む Ham's F-12培地（日水製薬株式会社）中で37℃、5％炭酸ガス中で１日間培養した後、該ＤＮＡ－リン酸カルシウム複合体の懸濁液480 μl をシャーレの該細胞上に滴下させた。これを、37℃、5％炭酸ガス中にて６時間培養した後、血清を含まない Ham's F-12培地で２回細胞を洗浄し、シャーレの該細胞上に15％グリセロールを含む緩衝液（140 mM NaCl, 25 mM HEPES, 1.4 mM Na_2PO_4, pH7.1）1.2mlを添加し２分間処理した。これを、再度、血清を含まないHam's F-12培地で２回洗浄した後、10％のウシ胎児血清を含む Ham's F-12培地中で37℃、5％炭酸ガス中で一晩培養した。該細胞をトリプシン処理により分散させてシャーレから回収し、2 x 10^4 個ずつ6-well plateに植え込み、透析済み10％ウシ胎児血清（JRH BIOSCIENCES 社）、1 mM MEM非必須アミノ酸溶液（大日本製薬株式会社）、100 units/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycinを含む Dulbecco's modified Eagle medium（DMEM）培地（日水製薬株式会社）中にて37℃、5％炭酸ガス中にて培養を開始した。プラスミドの導入された形質転換CHO細胞は該培地中で生育するが、非導入細胞は次第に死滅していくので、培養開始１日目、および２日目に培地を交換して死滅細胞を除去した。培養開始８－１０日後に生育してきた形質転換CHO細胞のコロニーを約21個選んだ。 それぞれ選択された細胞からRNAを市販のRNA単離用キットを用いて回収し、以降、公知のＲＴ－ＰＣＲ法によりZAQを高発現するZAQ発現CHO細胞B-1番クローン（以後、ZAQC-B1細胞と略称する）を選別した。

（２－２）Ｉ５Ｅ安定発現細胞株の作製

ヒトI5Eレセプターc DNA（配列番号：６）を公知のＰＣＲ法によりクローニングし、pAKK01.11H発現ベクターに組み込んだ。該発現ベクターを（２－１）に記載した方法によりCHO/dhfr-細胞（American Type Culture Collection）に形質導入した。培養開始１０－１４日後に生育してきた形質転換CHO細胞のコロニーを約20個選んだ。 選択した細胞を3×10^{4}個/wellで96穴プレートに植え込み、ヘビ毒MIT1（配列番号：２１）に対する反応性を、後述の（２－３）に記載する試験方法により検討し、反応性の良いI5E発現CHO細胞4番クローン（以後、I5E-4細胞と略称する）を選別した。

（２－３）受容体活性化作用の測定

上記（２－１）で得られたZAQC-B1細胞、および上記（２－２）で得られたI5E-4細胞を、それぞれ15×10^{4}cells/mlとなるように培地（10% d FBS-DMEM）に懸濁し、FLIPR用96穴プレート(Black plate clear bottom、Coster社)に分注器を用いて各ウェルに200 μlずつ植え込み（3.0×10^{4}cells/200μl/ウェル）、5% CO_2インキュベーター中にて37℃で一晩培養した後用いた（以後、細胞プレートとする）。H/HBSS（ニッスイハンクス２（日水製薬株式会社） 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77 g、6 M水酸化ナトリウム溶液で pH7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理）20 ml、250 mM Probenecid 200 μl、ウシ胎児血清(FBS) 200 μlを混合した。また、Fluo 3-AM（同仁化学研究所）2バイアル（50 μg）をジメチルスルフォキサイド 40 μl、20% Pluronic acid (Molecular Probes社) 40 μlに溶解し、これを上記H/HBSS－Probenecid－FBS に加え、混和後、８連ピペットを用いて培養液を除いた細胞プレートに各ウェル 100 μlずつ分注し、5% CO_2インキュベーター中にて37℃で1時間インキュベートした（色素ローディング）。ヘビ毒MIT1を2.5 mM Probenecid、0.2% BSAを含むH/HBSS 150 μlを加えて希釈し、FLIPR用96穴プレート(V-Bottomプレート、Coster社)へ移した(以後、サンプルプレートとする)。細胞プレートの色素ローディング終了後、H/HBSSに2.5 mM Probenecidを加えた洗浄バッファーでプレートウォッシャー(Molecular Devices社)を用いて細胞プレートを４回洗浄し、洗浄後100 μlの洗浄バッファーを残した。この細胞プレートとサンプルプレートをFLIPRにセッ

トし（FLIPRにより、サンプルプレートから50 μlのサンプルが細胞プレートへと移される）、蛍光強度変化を継時的に測定することにより、細胞内Ｃａイオン濃度上昇活性を測定した。

参考例３ ヒト型Ｂｖ８ペプチドの作製

（３－１）ヒト型Ｂｖ８ペプチド ｃＤＮＡのクローニング

ヒト精巣Marathon-Ready cDNA (CLONTECH社)を鋳型として、プライマー hBv8-F1（配列番号：７）及びプライマー hBv8-R1（配列番号：８）を作成し、以下に記したＰＣＲ反応を実施した。

hBv8-F1: 5'-CTACTTCTGCTGCTGCCGCTGCTGTT-3' （配列番号：７）

hBv8-R1: 5'-TTGGAAAGTTGAGGAAGCAAGAGCATTT-3' (配列番号：８)

PCR反応液は50X Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1μl、添付の10x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5 μg/ml BSA, 0.05% Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4μl、10μMプライマーhBv8-F1及びhBv8-R1を 1μl、鋳型cDNAを5μl、及び蒸留水を33μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-68℃・1分のサイクル反応を35回、および68℃・1分の最終伸長反応とした。

得られたDNA断片を、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、配列番号：９で表される配列を得た。

ヒト精巣Marathon-Ready cDNA (CLONTECH社)を鋳型として、プライマー hBv8-R2（配列番号：１０）を作成し、以下に記した5'RACE実験を実施した。

hBv8-R2: 5'-TGTCTCCCAGTTTGCCCATAGGTGTGC-3' （配列番号：１０）

5'RACEのPCR反応液は50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1μl、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer (200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM $Mg(OAc)_2$, 25% Dimethyl Sulfoxide, 18.75μg/ml BSA, 0.025%Tween-20, 0.025% Nonidet-P40)を10 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4

μl、10 μMプライマーhBv8-R1を 1 μl、10 μMプライマーAP1（プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を1 μl、鋳型cDNA（CLONTECH社、ヒト精巣Marathon-Ready cDNA）を5 μl、及び蒸留水を28 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・1分の初期変性後、94℃・30秒-72℃・3分のサイクル反応を10回、94℃・30秒-70℃・3分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-68℃・3分のサイクル反応を25回行った。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix（CLONTECH社）を1 μl、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer（200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM $Mg(OAc)_2$, 25% Dimethyl Sulfoxide, 18.75μg/ml BSA, 0.025%Tween-20, 0.025% Nonidet-P40）を10 μl、dNTP mixture（2.5 mM each, 宝酒造）を4 μl、10 μMプライマーhBv8-R2を 1 μl、10 μMプライマーAP2（プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を1 μl、鋳型DNA（該PCR反応液50倍希釈液）を5 μl、及び蒸留水を28 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・1分の初期変性後、94℃・30秒-68℃・3分のサイクル反応を35回行った。

得られたDNA断片を、TOPO TA Cloning Kit（Invitrogen社）を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、5'端の配列（配列番号：１１）を得た。

得られた配列番号：９及び配列番号：１１の情報より、プライマー hBv8-WF（配列番号：１２）、プライマー hBv8-WR（配列番号：１３）、プライマー hBv8-CF（配列番号：１４）及びプライマー hBv8-SR（配列番号：１５）を作成し、以下に記したPCR反応を実施した。

hBv8-WF: 5'-CCATGAGGAGCCTGTGCTGCGCC-3' （配列番号：１２）

hBv8-WR: 5'-CTATTCACATTTGGTTTCTACTC-3' （配列番号：１３）

hBv8-CF: 5'-GTCGACCACCATGAGGAGCCTGTGCTGCG-3' （配列番号：１４）

hBv8-SR: 5'-ACTAGTCGATTACTTTTGGGCTAAAC-3' （配列番号：１５）

PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase(Stratagene社)を1 μl、添付の10x PCR bufferを5 μl、2.5 mM dNTP mixtureを4 μl、10 μMプライマーhBv8-WF及び

hBv8-WRを各2.5 μl 、鋳型DNA（ヒト精巣Marathon-Ready cDNA、CLONTECH社）を鋳型として5μl、及び蒸留水を30 μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃1分-65℃・1分-72℃・1分のサイクル反応を35回、および72℃・5分の最終伸長反応とした。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを行った。PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase (Stratagene社)を1 μl、添付の10x PCR bufferを5 μl、2.5 mM dNTP mixtureを4 μl、10 μMプライマーhBv8-CF及びhBv8-SRを各2.5 μl 、鋳型DNAを1μl、及び蒸留水を34 μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・1分-65℃・1分-72℃・1分のサイクル反応を35回、および72℃・5分の最終伸長反応とした。

得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、配列番号：１６で表される346bpの塩基配列を有していることが明らかとなった。配列番号：１６で表わされる塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをpHBvと命名した。プラスミドpHBvにより大腸菌（Escherichia coli）をトランスフォームさせ、エシェリヒア　コリ（Escherichia coli）TOP10/pHBvと命名した。

このDNA断片の塩基配列を解析した結果、配列番号1-6で表わされるDNA断片は、配列番号：１７で表わされるヒト型Ｂｖ８前駆体ペプチド(108アミノ酸残基）をコードするDNA（配列番号：１８）を含んでいることが明らかとなった。

また、配列番号：１８で表わされる塩基配列は典型的なシグナル配列を有しており、配列番号：１８で表わされる塩基配列を有するDNAは、配列番号：１９で表わされるヒト型Ｂｖ８成熟体ペプチド（81アミノ酸残基）をコードする243塩基対からなるDNA（配列番号：２０）を含んでいることが明らかとなった。

（３－２）ヒト型Ｂｖ８ペプチド発現ＣＨＯ細胞の樹立

上記（３－１）に記載したプラスミドpHBvから、インサートcDNAをSal I及びSpe I制限酵素を用いて切り出しpAKK01.11H発現ベクターに組み込んだ。該プラスミドをCHO/dhFr-細胞（American Type Culture Collection）にCellPhect Transfection kit（Amersham Pharmacia Biotech社）を用いて形質導入すること

により取得した。はじめに、蒸留水300 μlに溶解したプラスミドDNA 10 μgに対してBuffer A (CellPhect Transfection Kitに添付) 120 μlを添加後撹拌した。10分間静置後、Buffer B (CellPhect Transfection Kitに添付) 240 μlを添加し、激しく撹拌し該DNAを含有するDNA－リン酸カルシウム複合体を形成させた。 4 x 10^5個のCHO/ $dhFr^-$ 細胞を60 mmシャーレに植え込み、10％のウシ胎児血清 (BIO WHITTAKER 社) とMEM用非必須アミノ酸を含む Ham's F-12培地 (日水製薬株式会社) 中で37℃、5％炭酸ガス中で１日間培養した後、該複合体をシャーレの該細胞上に滴下させた。これを、37℃、5％炭酸ガス中にて7時間培養した後、血清を含まない Ham's F-12培地で２回細胞を洗浄し、シャーレの該細胞上に15％グリセロール3 mlを添加し2分間処理した。これを、再度、血清を含まないHam's F-12培地で２回洗浄した後、10％のウシ胎児血清を含む Ham's F-12培地中で37℃、5％炭酸ガス中で15時間培養した。該細胞をトリプシン処理により分散させてシャーレから回収し、1.25 x 10^4個ずつ6穴プレートに植え込み、透析済み10％ウシ胎児血清 (JRH BIOSCIENCES 社) 、1 mM MEM非必須アミノ酸溶液、100 units/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycinを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地 (日水製薬株式会社) 中にて37℃、5％炭酸ガス中にて培養を開始した。プラスミドの導入された形質転換CHO細胞は該培地中で生育するが、非導入細胞は次第に死滅していくので、2日毎に培地を交換して死滅細胞を除去した。培養開始10-14日後に生育してきた形質転換CHO細胞のコロニーを29個選択した。それぞれ選択された細胞を24穴プレートに植え込み、細胞がコンフルエントになった後、培地を10％ウシ胎児血清 (JRH BIOSCIENCES 社) 、1 mM MEM非必須アミノ酸溶液、100 units/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycinを含む Dulbecco's modified Eagle medium 培地 (Phenol Red不含、GIBCO社) に交換し3日間培養した。その後、培養上清を回収し、上記（２－３）の方法に従って、ZAQ発現CHO細胞でFLIPRによるカルシウムアッセイでZAQ活性化能を測定した。これによりヒト型Bv8を高発現するZAQL-2発現CHO細胞クローンNo.2 (以後、ZAQL-2/CHO No.4と略称する) を選別した。

（３－３）ヒト型Ｂｖ８ペプチド発現ＣＨＯ細胞無血清培養上清の調製

透析済み10％ウシ胎児血清 (JRH BIOSCIENCES 社) 、1 mM MEM非必須アミノ酸

溶液、100 units/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycinを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地（日水製薬株式会社）でSingle Tray(Nunc社)4枚コンフルエントまで培養した ZAQL-2/CHO No.4をトリプシン処理して分散後、遠心して回収した。上記Single Tray 1枚分の細胞を上記培地 1.5 Lに懸濁後、Cell Factories 10 (Nunc社) に植え込み、4基のCell Factories 10について37℃で5％炭酸ガス中にて3日間培養した。培養上清を除いた後、前述のH/HBSS 1 Lで 1基のCell Factories 10の細胞を洗浄した。H/HBSSを除いた後、1基のCell Factories 10あたり2 Lの無血清培地（1 mM MEM非必須アミノ酸溶液、100 units/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycinを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium培地）を加えさらに2日間培養した。回収した培養上清を日立高速遠心機で1,000 rpmで10分間遠心後、ガーゼを用いてろ過し、清澄な上清を得た。これに酢酸を最終濃度1 Mになるように添加し、以下の操作を行った。

（３－４）ヒト型Ｂｖ８ペプチド発現ＣＨＯ細胞無血清培養上清のオクタドデシル逆相クロマトグラフィーによる粗分画

オクタドデシル基を固定したシリカゲルを充填したPrepC18（Waters社）をメタノールで膨潤後、ガラス製カラムに充填した（BioRad社製；内径5cm，高さ10cm）。その後、1 M 酢酸で平衡化したカラムに、上記（３－３）で調製した抽出液を添着した。次にこのカラムを800 mlの1 M 酢酸で洗浄した。次に、このカラムに1000 mlの60% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸を流し、目的とする粗ペプチド成分を溶出した。得られた溶出液を、エバポレーターを用いて濃縮した後、凍結乾燥機（12EL； VirTis社）にて凍結乾燥した。

（３－５）Ｗａｋｏｓｉｌ－ＩＩ ５Ｃ１８ＨＧ Ｐｒｅｐ逆相高速液体クロマトグラフィーによる分離

Wakosil-II 5C18HG Prep逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（和光純薬、20mm×250mm）を、40℃にて、流速 5 ml/minでＡ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量91.7%/Ｂ液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量8.3%を流し平衡化した。上記（３－４）で得られた凍結乾燥物についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、凍結乾燥物を1 M 酢酸36 mlを加えて溶解し遠心後、その内の1/3を該カラムに添着した後、流速 5 ml/minで、1分間かけ

てＡ液容量66.7%/Ｂ液容量33.3% まで上昇させ、次いで120分間かけてＡ液容量16.7%/Ｂ液容量83.3%まで、Ｂ液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。溶出液を5 mlずつフラクション番号をつけて分取した。この操作を３回実施し、上記（３－４）の凍結乾燥物を処理した。分取フラクションより各3 μl を0.2% BSA 150 μl と混合し、凍結乾燥機（12EL； VirTis社）で凍結乾燥した。この乾燥物に、アッセイバッファー〔H/HBSS（ニッスイハンクス２（日水製薬株式会社） 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77 g 、水酸化ナトリウム溶液で pH7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理）に、2.5 mM Probenecid および0.1% CHAPS を添加したもの〕150 μlを加えて溶解し、この溶液50 μl を用いて上記（２－３）の方法に準じ、ZAQ受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQ受容体活性化作用を有する成分は、主としてフラクションNo.73-74に溶出されていることが判明した。

（３－６）ＴＳＫｇｅｌ ＣＭ－２ＳＷイオン交換高速液体クロマトグラフィーによる分離

TSKgel CM-2SWイオン交換高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー、4.6 mm×250 mm）を25℃にて、流速 1 ml/minでＡ液（4 Mギ酸アンモニウム：蒸留水：アセトニトリル = 1 : 299 : 100）容量100%、Ｂ液（4 Mギ酸アンモニウム：蒸留水：アセトニトリル = 1 : 2 : 1）容量0%を流し平衡化した。上記（３－５）で得られたフラクションNo.73-74を凍結乾燥したものをＡ液4 mlに溶解し、TSKgel CM-2SWイオン交換カラムに添着した後、流速 2 ml/minで120分間かけてＡ液容量25%／Ｂ液容量75%まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液を2 mlずつフラクション番号をつけて分取し、分取フラクションより各2 μl を0.2% BSA 100 μl と混合し凍結乾燥機（12EL； VirTis社）で凍結乾燥した。この乾燥物に上記アッセイバッファー 100 μl を加えて溶解しこれをさらに同バッファーで100倍希釈し、上記（２－３）の方法に準じ、ZAQ受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQ受容体活性化作用を有する成分はフラクションNo.83-85に溶出されていることが判明した。

（３－７）ＴＳＫｇｅｌ ＯＤＳ－８０Ｔｓ逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel ODS-80Ts逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー、4.6 mm x 100 mm）を、40℃にて、流速 1 ml/minでA液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量91.7%/B液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量8.3%を流し平衡化した。上記（3－6）で得られたフラクションNo.83-85の凍結乾燥物についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、凍結乾燥物を 1 M酢酸 2 mlを加えて溶解し該カラムに添着した後、流速 1 ml/minで、1分間かけてA液容量75%/B液容量25% まで上昇させ、次いで60分間かけてA液容量25%/B液容量75%までB液濃度を直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液を0.5 mlずつフラクション番号をつけて分取した。フラクションNo.121-130について各1μlを採取し、上記アッセイバッファーで100倍希釈し、上記（2－3）の方法に準じ、ZAQ受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQ受容体活性化作用を有する成分はフラクションNo.123-125に溶出されていることが判明した。

（3－8）ＴＳＫｇｅｌ Ｓｕｐｅｒ－Ｐｈｅｎｙｌ逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel Super-Phenyl逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー、4.6 mm x 100 mm）を、40℃にて、流速 1 ml/minでA液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量91.7%/B液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量8.3%を流し平衡化した。上記（3－7）で得られたフラクションNo.123-125についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、フラクション溶液を直接ロードし、該カラムに添着した後、流速 1 ml/minで、1分間かけてA液容量75%/B液容量25% まで上昇させ、次いで60分間かけてA液容量25%／B液容量75%までB液濃度を直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液を0.5 mlずつフラクション番号をつけて分取した。フラクションNo.91-100について各1μlを採取し、上記アッセイバッファーで100倍希釈し、上記（2－3）の方法に準じ、ZAQ受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQ受容体活性化作用を有する成分はフラクションNo.97-98に溶出されていることが判明した。

（3－9）ＴＳＫｇｅｌ Ｓｕｐｅｒ－Ｐｈｅｎｙｌ逆相高速液体クロマトグラフィーによる再精製

TSKgel Super-Phenyl逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー、4.6 mm x 100 mm）を、40℃にて、流速 1 ml/minでA液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量91.7%/B液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量8.3%を流し平衡化した。上記（３－８）で得られたフラクションNo.97-98についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、フラクション溶液を直接ロードし該カラムに添着した後、流速 1 ml/minで、1分間かけてA液容量75%/B液容量25% まで上昇させ、次いで60分間かけてA液容量25%／B液容量75%までB液濃度を直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。その結果、目的とするZAQ受容体活性化作用を有する成分は単一なピークとして溶出された。

（３－１０）精製されたヒト型Ｂｖ８ペプチドの構造解析

上記（３－９）で得られたZAQ活性化主成分について、以下の方法で構造決定を実施した。精製したヒト型Ｂｖ８ペプチドを凍結乾燥機（12EL；VirTis社）にて凍結乾燥した。得られたペプチド凍結乾燥物を、ＤＭＳＯ（ジメチルスルフォキシド）に溶解した。この溶液の一部をプロテインシークエンサー(パーキンエルマー社、PE Biosystems Procise 491cLC)を用いたＮ末端からのアミノ酸配列解析に供した。その結果、予想されるヒト型Ｂｖ８成熟体ペプチド、配列番号：１９で表されるアミノ酸配列と一致するＮ端アミノ酸配列を得た。また、Finnigan LCQ LC/MS装置を用いて、エレクトロンスプレーイオン化法により質量分析を行い、分子量が8664.34であると算定した。本測定値はヒト型Ｂｖ８成熟体ペプチド（配列番号：１９）の理論値8792.54に比べて128.2小さな値となっており、成熟体ペプチドからさらにＣ末端のLys残基が脱落したペプチド（配列番号：２２）が取得できたことが確認された。

参考例４ ヒト型Ｂｖ８ペプチドの反応性の測定

参考例３で得られた精製ヒト型Ｂｖ８ペプチドの、ＺＡＱ及びＩ５Ｅ受容体活性化作用を、上記（２－３）に記載した方法に準じ、測定した。

その結果、ＺＡＱレセプター発現ＣＨＯ細胞及びＩ５Ｅレセプター発現ＣＨＯ細胞において、ヒト型Ｂｖ８ペプチドは濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇を惹起した。また、ヘビ毒ＭＩＴ１は、ヒト型Ｂｖ８ペプチドに比べて１０倍

程度低い濃度よりＩ５Ｅ受容体活性化作用を現した。結果を〔図１〕および〔図２〕に示す。

参考例５　ラット型Ｂｖ８ペプチド　ｃＤＮＡのクローニング

ラット精巣Marathon-Ready cDNA (CLONTECH社)を鋳型として、degenerateプライマー BF2（配列番号：２３）とプライマー BR1（配列番号：２４）を作成し、以下に記したPCR反応を実施した。

BF2:　5'-GCTTGYGACAAGGACTCYCA-3'　（配列番号：２３）

BR1:　5'-GTTYCTACTYCAGAGYGAT-3'　（配列番号：２４）

PCR反応液は50X Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を0.4 μl、添付の10x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を2μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を1-6μl、10μMプライマーBF2及びBR1を 0.4μl、鋳型cDNAを2μl、及び蒸留水を13.2μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-55℃・1分-68℃・1分のサイクル反応を40回、および68℃・5分の最終伸長反応とした。

得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、配列番号：２５で表される部分配列を得た。

この配列情報よりプライマー RB5-1（配列番号：２６） とプライマー RB5-3（配列番号：２７）を作成し、以下に記した5'RACE実験を実施した。

RB5-1:　5'-GTGCATCCTCCGCCCCCAAAATGGAA-3'　（配列番号：２６）

RB5-3:　5'-GACAGCGCAGCACATTCCTCCTCCACAC-3'　（配列番号：２７）

5'RACEのPCR反応液は50X Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1μl、添付の10x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5 μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μl、10 μMプライマーRB5-1を 1 μl、10μMプライマーAP1（プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに

添付のもの）を1 μl、鋳型cDNA（CLONTECH社、ラット精巣Marathon-Ready cDNA）を5 μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・1分の初期変性後、94℃・30秒-72℃・3分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-70℃・3分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-68℃・3分のサイクル反応を25回行った。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50X Advantage 2 Polymerase Mix（CLONTECH社）を1μl、添付の10x Advantage 2 PCR buffer（400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40）を5 μl、dNTP mixture（2.5 mM each, 宝酒造）を4 μl、10 μMプライマーRB5-3を 1 μl、10μMプライマーAP2（プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を1 μl、鋳型cDNA（該PCR反応液50倍希釈液）を5 μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・1分の初期変性後、94℃・30秒-68℃・3分のサイクル反応を35回行った。

得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit（Invitrogen社）を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、5'端の配列（配列番号：２８）を得た。

配列番号：２５の情報より、プライマー RB3-1（配列番号：２９）とプライマーRB3-2（配列番号：３０）を作成し、以下に記した3'RACE実験を実施した。

RB3-1: 5'-GAGACAGCTGCCACCCCCTGACTCGGAA-3' （配列番号：２９）

RB3-2: 5'-GGCGGAGGATGCACCACACTTGTCCCTG-3' （配列番号：３０）

3' RACEのPCR反応液は50X Advantage 2 Polymerase Mix（CLONTECH社）を1 μl、添付の10x Advantage 2 PCR buffer（400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5 μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40）を5 μl、dNTP mixture（2.5 mM each, 宝酒造）を4 μl、10 μMプライマーRB3-1を 1 μl、10 μMプライマーAP1（プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を1 μl、鋳型cDNA（CLONTECH社、ラット精巣Marathon-Ready cDNA）を5 μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・1分の初期変性後、94℃・30秒-72℃・3分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-70℃・3分

のサイクル反応を5回、94℃・30秒-68℃・3分のサイクル反応を25回行った。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50X Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1μl、添付の10x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μl、10 μMプライマーRB3-2を 1 μl、10 μMプライマーAP2 (プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの) を1 μl、鋳型cDNA (該PCR反応液50倍希釈液) を5 μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・1分の初期変性後、94℃・30秒-68℃・3分のサイクル反応を35回行った。

得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、3'端の配列 (配列番号：３１) を得た。

ラット脳Marathon-Ready cDNA (CLONTECH社)を鋳型として、上記5'RACE及び3'RACEの情報より、プライマーRBv8-WF1 (配列番号：３２)、プライマー RBv8-WF2 (配列番号：３３)、プライマー RBv8-WR1 (配列番号：３４) およびプライマー RBv8-WR2 (配列番号：３５) を作成し、以下に記したPCR反応を実施した。

RBv8-WF1: 5'-TAACCGCCACCGCCTCCT-3' (配列番号：３２)

RBv8-WF2: 5'-GGGACGCCATGGAGGAC-3' (配列番号：３３)

RBv8-WR1: 5'-CGAGACTTGACAGACATTGTTCAGTG-3' (配列番号：３４)

RBv8-WR2: 5'-TTTCCAGCTCCTGCTTCAGA-3' (配列番号：３５)

PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase(Stratagene社)を0.6 μl、添付の10x PCR bufferを3 μl、2.5 mM dNTP mixtureを2.4 μl、10 μMプライマーRBv8-WF1及びRBv8-WR1を各1.5 μl 、鋳型DNAを3μl、及び蒸留水を18 μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-55℃・30秒-72℃・1分のサイクル反応を35回、および72℃・5分の最終伸長反応とした。

続いて、該PCR反応の反応液を蒸留水で50倍に希釈したものをを鋳型としてnested PCRを行った。PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase (Stratagene社)を

0.6 μl、添付の10x PCR bufferを3 μl、2.5 mM dNTP mixtureを2.4 μl、10 μMプライマーRBv8-WF2及びRBv8-WR2を各1.5 μl 、鋳型DNAを3 μl、及び蒸留水を18 μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-55℃・30秒-72℃・1分のサイクル反応を35回、および72℃・5分の最終伸長反応とした。

得られたDNA断片をZero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、配列番号：３６で表される356bpの塩基配列を有していることが明らかとなった。配列番号：３６で表わされる塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをpRBvと命名した。プラスミドpRBvにより大腸菌（Escherichia coli）をトランスフォームさせ、エシェリヒア　コリ（Escherichia coli）TOP10/ pRBvと命名した。

このDNA断片の塩基配列を解析した結果、配列番号：３６で表わされるDNA断片は、配列番号：３７で表わされるラット型Ｂｖ８前駆体ペプチド(107アミノ酸残基）をコードするDNA（配列番号：３８）を含んでいることが明らかとなった。

また、配列番号：３８で表わされる塩基配列は典型的なシグナル配列を有しており、配列番号：３８で表わされる塩基配列を有するDNAは、配列番号：３９で表わされるラット型Ｂｖ８成熟体ペプチド（81アミノ酸残基）をコードする243塩基対からなるDNA（配列番号：４０）を含んでいることが明らかとなった。

参考例６　ラット脳ｃＤＮＡ由来新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質（ｒＺＡＱ１）をコードするｃＤＮＡのクローニングと塩基配列の決定

ラット全脳cDNAライブラリー（CLONTECH社）を鋳型とし、２種類のプライマー（配列番号：４１および配列番号：４２）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cDNAを10分の１量鋳型として使用し、 Advantage-2 cDNApolymerase Mix （CLONTECH社）1/50量、プライマー各0.2μM、dNTPs 200μM、および酵素に添付のバッファーを加え、25μｌの液量とした。PCR反応は、(i) 94℃・2分の後、（ii）94℃・20秒、72℃・１分30秒のサイクルを3回、(iii) 94℃・20秒、68℃・１分30秒のサイクルを3回、（iv）94℃・20秒、62℃・

20秒、68℃１分のサイクルを36回繰り返し、最後に68℃・7分の伸長反応を行った。該ＰＣＲ反応後の反応産物をTOPO－TAクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1－TOPO（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌DH5αに導入し、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、新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA（配列番号：４３）を得た。該cDNAの塩基配列から導き出されるアミノ酸配列（配列番号：４４）には、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と83.7％の相同性がみられた。このアミノ酸配列を含有する新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質をrZAQ1と命名した。また配列番号：４３で表わされる塩基配列を有するDNAを含有する形質転換体（大腸菌）については、エシェリヒア　コリ（Escherichia coli)DH5α / pCR2.1－rZAQ1と命名した。

参考例７　ラット脳ｃＤＮＡ由来　新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質（ｒＺＡＱ２）をコードするｃＤＮＡのクローニングと塩基配列の決定

rZAQ2をコードするクローンは、genetrapper法で取得した。すなわち、プローブ（配列番号：４５および配列番号：４６）をビオチン化したのち、一本鎖にしたラット全脳cDNAライブラリー（GIBCO－BRL社）とハイブリダイゼーションし、得られた一本鎖遺伝子をプライマー（配列番号：４７および配列番号：４８）を用いて二本鎖に修復した。この遺伝子を大腸菌DH10Bにエレクトロポーレーションし、アンピシリン耐性を指標として形質転換体を得た。さらに、プローブ（配列番号：４５）とプライマー（配列番号：４９）を用いたコロニーPCRで、目的とする塩基配列をコードするクローンを選択した。このクローンの塩基配列から予測されるORF（open reading frame）の塩基配列（配列番号：５０）より導き出されるアミノ酸配列（配列番号：５１）は、rZAQ1と80.6％の相同性がみられた。このアミノ酸配列を有する新規Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質をrZAQ2と命名した。また、このgenetrapper法で取得した形質転換体（大腸菌）を、エシェリヒア　コリ（Escherichia coli）DH10B /pCMV-rZAQ2と命名した。

参考例８　大腸菌でのヒト型Ｂｖ８ペプチド（配列番号：１９）の製造

（１）大腸菌でのヒト型Ｂｖ８ペプチド発現プラスミドの構築

(a) ヒト型Ｂｖ８の構造遺伝子の調製

６種のＤＮＡ断片＃１～＃６（配列番号：６５～配列番号：７０）を用いて、ヒト型Ｂｖ８の構造遺伝子を調製した。

(b)ＤＮＡオリゴマーのリン酸化

５’側になるべき上記＃１および＃６を除いた４種のＤＮＡオリゴマー（＃２～＃５）各々を、２５μｌのリン酸化反応液〔ＤＮＡオリゴマー１０μｇ，５０mM Tris－HCl，pH７．６，１０mM $MgCl_2$，１mMスペルミジン，１０mM ジチオスレイトール（以後ＤＴＴと略記），０．１ｍｇ／ｍｌウシ血清アルブミン（以後ＢＳＡと略記），１mM ＡＴＰ，１０ユニットＴ４ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）〕中で３７℃・１時間反応させ、各オリゴマーの５’末端をリン酸化した。フェノール処理を行った後、２倍量のエタノールを加え、－７０℃に冷却した後、遠心でＤＮＡを沈殿させた。

(c)ＤＮＡフラグメントの連結

上記（b）で得られたＤＮＡフラグメントと上記#1および＃６を合わせ、１２０μｌとした。この混合液を９０℃で１０分間保持した後、室温まで徐冷しアニーリングを行った後、TaKaRa DNA Ligation Kit ver.2（宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液３０μｌにキットに付属のＩＩ液３０μｌを加え、よく混合した後、キットに付属のＩ液６０μｌを加え、３７℃・１時間反応させ、ライゲーションを行った。その後、フェノール処理を行ない、水層を回収して２倍量のエタノールを加え、－７０℃に冷却した後、遠心でＤＮＡを沈殿させた。この様にして得られたＤＮＡフラグメントをＴ４ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）によるリン酸化を行った後、以下の工程(d)に供した。

(d) ヒト型Ｂｖ８発現ベクターの構築

発現用ベクターとしてはｐＴＣＩＩ（特開2000-178297号公報に記載）をＮｄｅＩおよびＢａｍＨＩ（宝酒造）で３７℃・２時間消化した後、１％アガロースゲル電気泳動により４．３kbのＤＮＡ断片をQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社）を用いて抽出し、２５μｌのＴＥ緩衝液に溶解した。このｐＴＣＩＩの

ＮｄｅＩ、ＢａｍＨＩ断片と上記により調製したヒト型Ｂｖ８の構造遺伝子（配列番号：７１）をTaKaRa DNA ligation kit ver.2 （宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。この反応液を１０μｌ用いて大腸菌ＪＭ１０９コンピテントセル（東洋紡）を形質転換し、１０μｇ／ｍｌのテトラサイクリンを含むＬＢ寒天培地上に播き、３７℃で１晩培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニー選んだ。この形質転換体をＬＢ培地で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit（キアゲン社）を用いてプラスミドpＴＣｈ２ＺＡＱを調製した。このヒト型Ｂｖ８ＤＮＡの塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル３７７ＤＮＡシーケンサーを用いて確認した。プラスミドpＴＣｈ２ＺＡＱを大腸菌（Escherichia coli）ＭＭ２９４（ＤＥ３）に形質転換し、ヒト型Ｂｖ８発現株Escherichia coli MM294(DE3)/ pTCh2ZAQを得た。

（２）ヒト型Ｂｖ８ペプチドの製造

上記のEscherichia coli MM294(DE3)/ pTCh2ZAQを５．０ｍｇ／Ｌのテトラサイクリンを含むＬＢ培地・１Ｌ（１％ペプトン、０．５％酵母エキス、０．５％塩化ナトリウム）を用いて２Ｌ容フラスコ中で３７℃、８時間振とう培養した。得られた培養液を１９Ｌの主発酵培地（1-68％リン酸１水素ナトリウム、０．３％リン酸２水素カリウム、０．１％塩化アンモニウム、０．０５％塩化ナトリウム、０．０５％硫酸マグネシウム、０．０２％消泡剤、０．０００２５％硫酸第１鉄、０．０００５％塩酸チアミン、１．５％ブドウ糖、１．５％ハイケースアミノ）を仕込んだ５０Ｌ容発酵槽へ移植して、３０℃で通気攪拌を開始した。培養液の濁度が５００クレット単位になったところで、イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシドの最終濃度が１２ｍｇ／Ｌになるように添加し、さらに４時間培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、約５００ｇの湿菌体を取得し、－８０℃で保存した。

（３）ヒト型Ｂｖ８ペプチドの活性化

上記（２）で得られた菌体４００ｇに、２００ｍＭトリス／ＨＣｌ、７Ｍグアニジン塩酸塩（ｐＨ８．０）８００ｍｌを加えて菌体を溶解した後、遠心分離（１００００ｒｐｍ、１時間）を行った。上澄液に０．４Ｍアルギニン、５０ｍＭトリス／ＨＣｌ、０．２ｍＭ　ＧＳＳＧ（酸化型グルタチオン）、１ｍＭ　Ｇ

ＳＨ（還元型グルタチオン）（ｐＨ８．０）２０リットルを加えて、４℃で一晩活性化を行った。

（４）ヒト型Ｂｖ８ペプチドの精製

上記（３）で活性化の終了した再生液をｐＨ６．０に調整し、５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ６．０）で平衡化したＳＰ－セファロースカラム（１１．３ｃｍ×１５ｃｍ）に吸着させた後、６００ｍＭ ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ６．０）で溶出し、ヒト型Ｂｖ８を含むフラクションをプールした。この画分を５０ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ６．０）で平衡化したＳＰ－５ＰＷ（２１．５ｍｍ×１５０ｍｍＬ）に通液し、吸着、洗浄した後、０－１００％Ｂ（Ｂ＝５０ｍＭ リン酸緩衝液＋１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ６．０５）の段階勾配（６０分）で溶出を行いヒト型Ｂｖ８画分（溶出時間約４０分）を得た。この画分を、さらに０．１％トリフルオロ酢酸で平衡化したＣ４Ｐ－５０（２１．５ｍｍＩＤ×３００ｍｍＬ、昭和電工）に通液し、吸着、洗浄した後、２５－５０％Ｂ（Ｂ：８０％アセトニトリル／ ０．１％トリフルオロ酢酸）の段階勾配（６０分）で溶出を行い、ヒト型Ｂｖ８画分（溶出時間約３０分）をプールした後、凍結乾燥を行い、ヒト型Ｂｖ８凍結乾燥粉末約２５ｍｇを得た。

（５）ヒト型Ｂｖ８ペプチドの特徴決定

(a) ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析

上記（４）で得られたヒト型Ｂｖ８を１００ｍＭ ＤＴＴを添加したSample buffer [Laemmli, Nature, 227, 680 (1979)] に懸濁し、９５℃で１分間加熱した後、マルチゲル１５／２５（第一化学薬品）で電気泳動を行った。泳動後のゲルをクーマシー・ブリリアント・ブルー（Coomassie brilliant blue）で染色した結果、９ｋＤａの位置に単一の蛋白バンドが認められた。このことから、上記（４）で得られた大腸菌由来の組換え型ヒト型Ｂｖ８の標品は極めて高純度であることが分かった。

(b) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計（日立Ｌ－８５００Ａ Amino Acid Analyzer）を用いて決定した。その結果、ヒト型Ｂｖ８（配列番号：１９で表されるアミノ酸配列からなるペプチド）のＤＮＡの塩基配列から推定されるアミノ

酸組成と一致した（表２）。

〔表２〕

アミノ酸	１モル当たりの残　基　数	ヒト型Ｂｖ８の塩基配列から予測される値
Ａｓｘ	４．０	４
Ｔｈｒ[1)]	４．６	５
Ｓｅｒ[1)]	４．３	５
Ｇｌｘ	２．３	２
Ｐｒｏ	５．２	５
Ｇｌｙ	７．８	８
Ａｌａ	５．０	５
Ｃｙｓ[2)]	Ｎ．Ｄ．	１０
Ｖａｌ	３．８	４
Ｍｅｔ	２．８	３
Ｉｌｅ	４．２	５
Ｌｅｕ	６	６
Ｔｙｒ	０	０
Ｐｈｅ	３．７	４
Ｈｉｓ	２．９	３
Ｌｙｓ	４．９	５
Ａｒｇ	５．８	６
Ｔｒｐ	０．９．	１

酸加水分解（６Ｎ　ＨＣｌ－４％チオグリコール酸、１１０℃、２４および４８時間加水分解の平均値）

1）０時間に外挿した値

2）未検出

（c）Ｎ末端アミノ酸配列分析

Ｎ末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー（ＰＥアプライドバイオシステムズ　モデル４９２）を用いて決定した。その結果、得られたヒト型Ｂｖ８のＤＮＡの塩基配列から推定されたヒト型Ｂｖ８のＮ末端アミノ酸配列と一致した（表３）。

〔表３〕

残基 Ｎｏ.	検出された PTH-アミノ酸[1)] (pmol)	ヒト型Ｂｖ８の塩基配列から予測されるアミノ酸
1	Ａｌａ(103)	Ａｌａ
2	Ｖａｌ(99)	Ｖａｌ
3	Ｉｌｅ(88)	Ｉｌｅ
4	Ｔｈｒ(54)	Ｔｈｒ
5	Ｇｌｙ(66)	Ｇｌｙ
6	Ａｌａ(79)	Ａｌａ
7	Ｎ．Ｄ．	Ｃｙｓ
8	Ａｓｐ(47)	Ａｓｐ
9	Ｌｙｓ(62)	Ｌｙｓ
１０	Ａｓｐ(50)	Ａｓｐ
１１	Ｓｅｒ(36)	Ｓｅｒ
１２	Ｇｌｎ(52)	Ｇｌｎ
１３	Ｎ．Ｄ．	Ｃｙｓ
１４	Ｇｌｙ(44)	Ｇｌｙ
１５	Ｇｌｙ(55)	Ｇｌｙ
１６	Ｇｌｙ(56)	Ｇｌｙ
１７	Ｍｅｔ(50)	Ｍｅｔ
１８	Ｎ．Ｄ．	Ｃｙｓ
１９	Ｎ．Ｄ．	Ｃｙｓ
２０	Ａｌａ(33)	Ａｌａ

l) ＰＴＨ（フェニールチオヒダントイン）誘導体として検出した。

ヒト型Ｂｖ８を１５０ｐｍｏｌ用いて分析を行った。

Ｎ．Ｄ．は未検出を示す。

(d) Ｃ末端アミノ酸分析

Ｃ末端アミノ酸をアミノ酸分析計（日立Ｌ－８５００Ａ Amino Acid Analyzer）を用いて決定した。得られたヒト型Ｂｖ８はＤＮＡの塩基配列から推定されたＣ末端アミノ酸と一致した（表４）。

〔表４〕

Ｃ末端アミノ酸	回収率（％）
Ｌｙｓ	１８．９

気相ヒドラジン分解法（１００℃，３．５時間）

（６）ヒト型Ｂｖ８ペプチドの活性測定（ＦＬＩＰＲを用いた細胞内Ｃａイオン濃度上昇活性の測定）

上記（４）で得られた純化された大腸菌由来の組換え型ヒト型Ｂｖ８標品を参考例２（２－３）の方法を用いて、活性測定（ＦＬＩＰＲを用いた細胞内Ｃａイオン濃度上昇活性の測定）を行った。その結果、ＣＨＯ細胞由来の組換え型標品（ヒト型Ｂｖ８の精製品：参考例３）と同等の活性を有していた。

参考例９　ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドのｃＤＮＡのクローニング

（Ｉ）ＺＡＱを活性化するペプチドの単離

（１）牛乳抽出液の調製

市販の低温殺菌牛乳を用いて、以下の操作を行い抽出液を調製した。牛乳2 literを高速遠心機（CR26H、R10A型ローター：日立株式会社）を用いて、10,000 rpm、１５分間、４℃で遠心し、得られた上清をガーゼでろ過し、脂質片を取り除いた。上清に最終濃度1 Mになるように酢酸を加え、４℃にて３０分間攪拌し、次いで高速遠心機（CR26H、R10A型ローター：日立株式会社）を用いて10,000

rpm、１５分間遠心し上清をガーゼでろ過し不溶物を除去した。上清に撹拌しながら２倍容のアセトンを加え４℃にて３時間攪拌した。次いで高速遠心機（CR26H、R10A型ローター：日立株式会社）を用いて10,000 rpm、１５分間遠心後、得られた上清をガーゼでろ過し不溶物を除去した。得られた上清をロータリーエバポレーターにかけ、アセトンを除去し、最終的に１３５０ｍｌまで濃縮した。得られた濃縮液を、６７５ｍｌごとに３３８ｍｌのジエチルエーテルと混合し、分液ロート中にて激しく混和し、２相分離後、水相を得た。得られた水相について同じ操作をさらに１回繰り返し、清澄な水相を得た。得られた水相を、ロータリーエバポレーターを用いて８００ｍｌまで濃縮し、最終的な抽出液を得た。

（２）牛乳抽出液のＣ１８逆相クロマトグラフィーによる粗分画

オクタデシル基を固定したシリカゲルを充填したカラムSep-Pak C18（Waters社）１０ｇをメタノールで膨潤後、1 M 酢酸で平衡化した。このカラムに、上記（１）で調製した抽出液（牛乳2 liter分）を添着した。続いて、このカラムに、１００ｍｌの1 M 酢酸を流しゲルを洗浄した。次に、このカラムに２００ｍｌの６０％アセトニトリル/０．１％トリフルオロ酢酸を流し、目的とする粗ペプチド成分を溶出した。得られた溶出液を、エバポレーターを用いて濃縮した後、凍結乾燥機（12EL； VirTis社）にて凍結乾燥した。

（３）牛乳抽出液のスルホプロピルイオン交換クロマトグラフィーによる粗分画

ポリプロピレン製のカラムに100 mM塩酸中で膨潤させたSP Sephadex C-25（Amersham Pharmacia Biotech 社）を、容量が２ｍｌになるよう充填し、蒸留水及び2 M ギ酸アンモニウム(pH 4.0)で洗浄した後、Ｉ液（2 M ギ酸アンモニウム：アセトニトリル：水＝1:25:74）で平衡化した。上記（２）で得られた凍結乾燥物をＩ液２０ｍｌに溶解し、SP Sephadex C-25 2 mlにロードした。Ｉ液１０ｍｌで洗浄後、ＩＩ液（2 M ギ酸アンモニウム：アセトニトリル：水＝1:2.5:6.5）、ＩＩＩ液（2 M ギ酸アンモニウム：アセトニトリル：水＝1:1:2）、ＩＶ液（2 M ギ酸アンモニウム：アセトニトリル：水＝1:0.5:0.5）各１０ｍｌで順次溶出した。得られたＩ液からＩＶ液を、それぞれ凍結乾燥機（12EL； VirTis社）にて凍結乾燥した。

（４）牛乳抽出液のＴＳＫｇｅｌ ＯＤＳ８０Ｔｓ逆相高速液体クロマトグラフ

ィーによる分画

TSKgel ODS-80Ts逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、4.6 mm x 25 cm）を、４０℃にて、流速１ｍｌ／ｍｉｎでA液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量91.7%/B液（0.1%トリフルオロ酢酸/60%アセトニトリル）容量8.3%を流し、平衡化した。上記（３）で得られたＩ液からＩＶ液の凍結乾燥物を、それぞれ1 M 酢酸４ｍｌに溶解しクロマトグラフィー操作に処した。即ち、凍結乾燥物の溶液４ｍｌを当該カラムに添着した後、流速１ｍｌ／ｍｉｎで、1分間かけてA液容量６７％／B液容量３３％まで上昇させ、次いで４０分間かけてA液容量６７％／B液容量３３％からA液容量０％／B液容量１００％まで、B液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。

溶出液を、１ｍｌずつフラクション番号をつけて分取し、各フラクション2 μlを150 μl の0.2% Bovine Serum Albumin (BSA) /蒸留水と混合し凍結乾燥した。この乾燥物を後述の（５）に記した細胞内Ca^{2+}イオン濃度上昇活性測定用のアッセイ用サンプルとした。

（５）ＦＬＩＰＲを用いた細胞内Ca^{2+}イオン濃度上昇活性の測定

ＺＡＱ安定発現細胞株は以下のようにして調製した。すなわち、実施例１で得たDH5α／pCR2.1－ZAQCの１クローンを、アンピシリンを含むＬＢ培地で振とう培養し、プラスミドpCR2.1－ZAQCを得た。これを制限酵素ＳａｌＩおよびＳｐｅＩで処理し、ＺＡＱＣをコードするインサート部分を切り出した。同様に制限酵素ＳａｌＩおよびＳｐｅＩで処理したpAKKO－1.11H (Biochemica et Biophysica Acta 1219 (1994) 251-259) と、当該インサート部分をLigation Express Kit (CLONTECH Laboratories, Inc. (CA, USA)) を用いて連結し、大腸菌ＤＨ１０Ｂにエレクトロポーレーション法にて導入した。得られたクローンの有するプラスミドの構造を、制限酵素処理ならびに配列解析で確認し、正しい構築のものをＣＨＯ細胞発現用プラスミドpAK－ZAQCとして使用した。

このプラスミドpAK－ZAQCをCHO/dhfr$^-$細胞 (American Type Culture Collection) にCellPhect Transfection kit (Amersham Pharmacia Biotech社) を用いて形質導入することにより取得した。まず、蒸留水120 μlに溶解したプラスミドＤＮＡ 4 μgに対してBuffer A (CellPhect Transfection Kitに添付)

120 μlを添加し、撹拌し、１０分間静置後、Buffer B (CellPhect Transfection Kitに添付) 240 μlを添加し、激しく撹拌し当該ＤＮＡを含有するＤＮＡ－リン酸カルシウム複合体を形成させた。 5 x 10^5個のCHO/ $dhfr^-$ 細胞を６０mmシャーレに播き、１０％のウシ胎児血清（BIO WHITTAKER 社）を含むHam's F-12培地（日水製薬株式会社）中で３７℃、５％炭酸ガス中で１日間培養した後、当該ＤＮＡ－リン酸カルシウム複合体の懸濁液480 μl をシャーレの当該細胞上に滴下させた。これを、３７℃、５％炭酸ガス中にて６時間培養した後、血清を含まないHam's F-12培地で２回細胞を洗浄し、シャーレの当該細胞上に１５％グリセロールを含む緩衝液(140 mM NaCl, 25 mM HEPES, 1.4 mM Na_2HPO_4, pH7.1) 1.2mlを添加し２分間処理した。これを、再度、血清を含まないHam's F-12培地で２回洗浄した後、１０％のウシ胎児血清を含むHam's F-12培地中で３７℃、５％炭酸ガス中で一晩培養した。当該細胞をトリプシン処理により分散させてシャーレから回収し、2 x 10^4 個ずつ6-well plateに植え込み、透析済み１０％ウシ胎児血清（JRH BIOSCIENCES 社）、1 mM MEM非必須アミノ酸溶液（大日本製薬株式会社）、100 units/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycinを含むDulbecco's modified Eagle medium（ＤＭＥＭ）培地（日水製薬株式会社）中にて３７℃、５％炭酸ガス中にて培養を開始した。プラスミドの導入された形質転換ＣＨＯ細胞は当該培地中で生育するが、非導入細胞は次第に死滅していくので、培養開始後２日毎に培地を交換して死滅細胞を除去した。培養開始８－１０日後に生育してきた形質転換ＣＨＯ細胞のコロニーを約２１個選んだ。それぞれ選択された細胞からＲＮＡを市販のＲＮＡ単離用キットを用いて回収し、以降公知のＲＴ－ＰＣＲ法によりＺＡＱを高発現するＺＡＱ発現ＣＨＯ細胞Ｂ－１番クローン（以後、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞と略称する）を選別した。

また、対照としてＥＴＡ（エンドセリンＡ受容体）発現ＣＨＯ細胞２４番クローン（以後ＥＴＡ２４細胞と略称する。Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 279巻、675-685頁、1996年参照）を用いた。

上記（４）で得られたアッセイ用サンプルについて、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞及びＥＴＡ２４細胞における細胞内Ca^{2+}イオン濃度上昇活性の測定をＦＬＩＰＲ(Molecular Devices社)を用いて行った。ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞、ＥＴＡ２４細胞

共に１０％透析処理済ウシ胎児血清(以後d FBSとする)を加えたＤＭＥＭで継代培養しているものを用いた。ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞、ＥＴＡ２４細胞をそれぞれ15×10^4cells/mlとなるように培地(10％ d FBS-DMEM)に懸濁し、ＦＬＩＰＲ用96穴プレート(Black plate clear bottom、Coster社)に分注器を用いて各ウェルに200 μlずつ植え込み(3.0×10^4cells/200μl/ウェル)、５％ CO_2インキュベーター中にて３７℃で一晩培養した後用いた(以後細胞プレートとする)。H/HBSS（ニッスイハンクス２（日水製薬株式会社） 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77ｇ、水酸化ナトリウム溶液で pH7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理） 20 ml、250 mM Probenecid 200 μl、ウシ胎児血清(FBS) 200 μlを混合した。また、Fluo 3-AM（同仁化学研究所） ２バイアル(50 μg)をジメチルスルフォキサイド 40 μl、20% Pluronic acid (Molecular Probes社) 40 μlに溶解し、これを上記H/HBSS－Probenecid－FBS に加え、混和後、８連ピペットを用いて培養液を除いた細胞プレートに各ウェル 100 μlずつ分注し、５％ CO_2インキュベーター中にて３７℃で１時間インキュベートした(色素ローディング)。上記（４）で得られたアッセイ用サンプルについて、各フラクションに、2.5 mM Probenecid、0.1% CHAPSを含むH/HBSS 150 μlを加えて希釈し、ＦＬＩＰＲ用９６穴プレート(V-Bottomプレート、Coster社)へ移した(以後、サンプルプレートとする)。細胞プレートの色素ローディング終了後、H/HBSSに2.5 mM Probenecidを加えた洗浄バッファーでプレートウォッシャー(Molecular Devices社)を用いて細胞プレートを４回洗浄し、洗浄後100 μlの洗浄バッファーを残した。この細胞プレートとサンプルプレートをＦＬＩＰＲにセットしアッセイを行った(ＦＬＩＰＲにより、サンプルプレートから50 μlのサンプルが細胞プレートへと移される)。

その結果、上記（３）IV液を上記（４）逆相高速液体クロマトグラフィー分離して得られたフラクションNo.53にＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に特異的な細胞内Ca^{2+}イオン濃度上昇活性が見られた。

（６）ＴＳＫｇｅｌ Ｓｕｐｅｒ－Ｐｈｅｎｙｌ逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel Super-Phenyl逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式

会社、 0.46 cm x 10 cm）を、４０℃にて、流速１ｍｌ／ｍｉｎでA液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量91.7%/Ｂ液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量8.3%を流し平衡化した。上記（４）で得られたフラクションNo.53についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、フラクションNo.53の溶液１ｍｌを当該カラムに添着した後、流速１ｍｌ／ｍｉｎで、１分間かけてＡ液容量７５%／Ｂ液容量２５%まで上昇させ、次いで７５分間かけてＡ液容量６７%／Ｂ液容量３３%まで、Ｂ液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。

溶出液を、500 μlずつフラクションNo.をつけて分取した。分取フラクションより各25 μlづつ0.2% BSA 150 μlと混合し凍結乾燥機（12EL； VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物に、2.5 mM Probenecid、 0.1% CHAPSを含むH/HBSS 150 μl を加えて溶解し、この溶液50 μlを用いて上記（５）の試験法により、細胞内Ca^{2+}イオン濃度上昇活性を測定することにより、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を有する成分、すなわち、ＺＡＱ活性化成分は、主としてフラクションNo.103-105に溶出されていることが判明した。

（７）μＲＰＣ Ｃ２／Ｃ１８ ＳＴ ４．６／１００逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

μRPC C2/C18 ST 4.6/100逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（Amersham Pharmacia Biotech社、 0.46 cm x 10 cm）を、４０℃にて、流速１ｍｌ／ｍｉｎでA液（ヘプタフルオロ酪酸/蒸留水）容量９５%/Ｂ液（0.1%ヘプタフルオロ酪酸/100% アセトニトリル）容量５%を流し平衡化した。

上記（６）で得られたTSKgel Super-Phenyl逆相高速液体クロマトグラフィー分取フラクションのうちフラクションNo.103-105をそのままμRPC C2/C18 ST 4.6/100逆相カラムに添着した後、流速１ｍｌ／ｍｉｎで１分間でＡ液（0.1% ヘプタフルオロ酪酸/蒸留水）容量９５%／Ｂ液（0.1% ヘプタフルオロ酪酸/100% アセトニトリル）容量５%からＡ液容量６５%／Ｂ液容量３５%まで急速に上昇させ、これを次に、流速１ｍｌ／ｍｉｎで、６０分間かけてＡ液容量５０%／Ｂ液容量５０%まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液は、２１０ｎｍの紫外吸収では単一なピークとして検出された。

溶出液を、500 μlずつフラクション番号をつけて分取し、分取フラクションより各10 μlづつを0.2% BSA 150 μlと混合し凍結乾燥機（12EL；VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物に、2.5 mM Probenecid、 0.1% CHAPSを含むH/HBSS 75 μlを加えて溶解し、この溶液50 μlを用いて上記（５）の試験法により、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を有する成分、すなわち、ＺＡＱ活性化成分は、フラクションNo.82-84に溶出されていることが判明した。この活性ピークは、２１０ｎｍの紫外吸収ピークに完全に一致し、単一ペプチドにまで精製されたものと判断した。

（８）精製されたＺＡＱ活性化ペプチドの構造解析

上記（７）で得られたＺＡＱ活性化成分について以下の方法で構造決定を実施した。ＺＡＱ活性化成分精製標品を凍結乾燥し、得られた凍結乾燥物を溶媒ＤＭＳＯ（ジメチルサルフォキシド）に溶解した。この溶液の一部をプロテインシークエンサー(パーキンエルマー社、PE Biosystems Procise 491cLC)を用いたＮ末端からのアミノ酸配列解析に供した。その結果、Ｎ末端のアミノ酸残基から１６番目のアミノ酸残基のうち、１４残基を同定することができた（Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp Val Gln Xaa Arg Ala Gly （配列番号：７２；Xaaは未同定残基））。

(II) ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドのｃＤＮＡのクローニング

上記（Ｉ）で得られた牛乳から精製されたＺＡＱを活性化するペプチドのＮ末端アミノ酸配列（配列番号：７２）をクエリーとしてデータベースをＢｌａｓｔ検索したところ、配列番号：７２で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列と同等な配列を含むヒトＥＳＴ（Ｘ４０４６７）を見出した。本配列は完全長のオープンリーディング・フレームを有していなかったので、以下にＲＡＣＥ法により未確定部分の配列を明らかにし、引き続いて完全長のオープンリーディング・フレームを有するｃＤＮＡクローンを取得した。

ＥＳＴ（Ｘ４０４６７）の情報よりプライマーＺＦ１（配列番号：７３）、ＺＦ２（配列番号：７４）とＺＦ３（配列番号：７５）を作成し、ヒト精巣Marathon-Ready cDNA （CLONTECH社）を鋳型として以下に記した3'RACE実験を実

施した。

ZF1: 5'-GGTGCCACGCGAGTCTCAATCATGCTCC-3' (配列番号：７３)

ZF2: 5'-GGGGCCTGTGAGCGGGATGTCCAGTGTG-3' (配列番号：７４)

ZF3: 5'-CTTCTTCAGGAAACGCAAGCACCACACC-3' (配列番号：７５)

3'RACEのＰＣＲ反応液は50 x Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社) を1 μl、添付の10 x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μl、10 μMプライマーZF1を 1 μl、10 μMプライマーAP1 (プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの) を1 μl、鋳型ｃＤＮＡ (CLONTECH社、ヒト精巣Marathon-Ready cDNA) を5 μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・60秒の初期変性後、94℃・30秒-72℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-70℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-68℃・44分のサイクル反応を25回行った。

続いて、当該ＰＣＲ反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50 x Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社) を1 μl、添付の10 x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μl、10 μMプライマーZF2を 1 μl、10 μMプライマーAP2 (プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの) を1 μl、鋳型ＤＮＡ (当該ＰＣＲ反応液５０倍希釈液) を5 μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・60秒の初期変性後、94℃・30秒-72℃・４分のサイクル反応を５回、94℃・30秒-70℃・４分のサイクル反応を５回、94℃・30秒-68℃・44分のサイクル反応を２５回行った。

さらに続いて、当該ＰＣＲ反応の反応液を鋳型として2回目のnested PCRを実施した。反応液は50 x Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社) を1 μl、添付の10 x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μl、10 μMプライマーZF3を 1 μl、

10 μMプライマーAP2（プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のものを用いた。）を1 μl、鋳型ＤＮＡ（当該ＰＣＲ反応液50倍希釈液）を5 μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・60秒の初期変性後、94℃・30秒-72℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-70℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-68℃・44分のサイクル反応を25回行った。得られたＤＮＡ断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたＤＮＡの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、3'端配列（配列番号：７６）を得た。

配列番号：７６で表わされる塩基配列及びＥＳＴ（Ｘ４０４６７）の情報によりプライマーZAQL-CF（配列番号：７７）及びZAQL-XR1（配列番号：７８）を作成した。ヒト精巣Marathon-Ready cDNA （CLONTECH社）を鋳型としてプライマーZAQL-CF とZAQL-XR1を用いてＰＣＲを実施した。

ZAQL-CF: 5'-CCACCATGAGAGGTGCCACG-3' （配列番号：７７）

ZAQL-XR1: 5'-CTCGAGCTCAGGAAAAGGATGGTG-3' （配列番号：７８）

ＰＣＲ反応液はPfuTurbo DNA polymerase(Stratagene社)を1 μl、添付の10 x PCR bufferを5 μl、2.5 mM dNTP mixtureを4 μl、10 μMプライマーZAQL-CF及びZAQL-XR1を各2.5 μl、鋳型ＤＮＡを5μl、及び蒸留水を30 μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・1分-60℃・1分-72℃・1分のサイクル反応を40回、および72℃・10分の最終伸長反応とした。得られたＤＮＡ断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたＤＮＡ断片の塩基配列をABI 377 DNA sequencerを用いて解読した結果、３７１ｂｐの、それぞれ配列番号：７９および配列番号：８０で表わされる塩基配列を有していることが明らかとなった。配列番号：７９で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ断片を有するプラスミドをpHMITAと、配列番号：８０で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ断片を有するプラスミドをpHMITGと命名した。

プラスミドpHMITA及びpHMITGにより大腸菌（Escherichia coli）を形質転換し、それぞれエシェリヒア・コリ（Escherichia coli）TOP10/pHMITAおよびエシェリ

ヒア・コリ（Escherichia coli）TOP10/pHMITGと命名した。

これらのＤＮＡ断片の塩基配列を解析した結果、配列番号：７９で表わされるＤＮＡ断片は、配列番号：８３で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド(Aタイプ、105アミノ酸残基)をコードするＤＮＡ（配列番号：８９）を含んでおり、配列番号：８０で表わされるＤＮＡ断片は、配列番号：８４で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド(Gタイプ、１０５アミノ酸残基)をコードするＤＮＡ（配列番号：９０）を含んでいることが明らかとなった。

また、配列番号：８９および配列番号：９０で表わされる塩基配列は典型的なシグナル配列を有しており、配列番号：８９で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡは、配列番号：８１で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド(Aタイプ、８６アミノ酸残基)をコードする２５８塩基対からなるＤＮＡ（配列番号：８７）を含んでおり、配列番号：９０で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡは、配列番号：８２で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド(Gタイプ、８６アミノ酸残基)をコードする２５８塩基対からなるＤＮＡ（配列番号：８８）を含んでいることが明らかとなった。

参考例１０　ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドの哺乳動物細胞での産生（１）

（１）ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド哺乳動物細胞発現ベクターの構築

参考例９（II）において取得したプラスミドpHMITGからＥｃｏＲＩ、ＸｈｏＩ制限酵素消化によってヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするｃＤＮＡを含む３８２ｂｐのＤＮＡ断片（配列番号：９１）を切出した。

すなわち、プラスミドpHMITGをＥｃｏＲＩおよびＸｈｏＩで酵素消化し、得られたＤＮＡを１．５％アガロースゲルを用いて電気泳動し、サイバーグリーン染色される約３８２ｂｐのバンドを含むゲル片を剃刀で切り取った。当該ゲル片よりGene Clean spin DNA抽出キット（BIO 101社）を用いてＤＮＡ断片を回収した。得られたＤＮＡ断片をCMV-IEエンハンサーおよびchicken beta-actin promoterを発現プロモーターとする哺乳動物細胞発現ベクターpCAN618に対してＥｃｏＲＩ、ＸｈｏＩ制限酵素切断部位に定法に従ってクローニングした。クローニングされたＤＮＡ断片の塩基配列を前述の方法により解読した結果、配列番号：９１

で表わされる塩基配列を有していることが確認された。このヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするＤＮＡを含有する哺乳動物細胞発現ベクターをpCANZAQLg2と命名した。

（２）ＣＯＳ７細胞への発現ベクターの導入

ＣＯＳ７細胞はＡＴＣＣより購入し、ＤＭＥＭ培地（１０％ FBSを加えたもの）を用いて継代培養しているものを用いた。ＤＭＥＭ培地を用いてＣＯＳ７細胞を1.5×10^6cells/dishとなるよう１０ｃｍシャーレにまき、３７℃、５％ CO_2インキュベーター中で一晩培養した。ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド発現プラスミド（pCANZAQLg2）２μｇ（２μｌのTEバッファーに溶解）にバッファーＥＣ（Effectene transfection reagent、QIAGEN）298μｌを加え、さらにEnhancer 16μｌを加え、１秒間混和後室温で３分間放置した。さらにEffectene Transfection Reagent 60μｌを加え、１０秒間混和後室温で１０分間放置した。前日にまいた細胞の上清を除き、ＤＭＥＭ培地１０ｍｌで１回洗浄し、ＤＭＥＭ培地を９ｍｌを加えた。プラスミド溶液にＤＭＥＭ培地１ｍｌを加えて混和後細胞に滴下し、全体を混ぜた後３７℃、５％ CO_2インキュベーター中で一晩培養した。ＤＭＥＭ培地１０ｍｌで２回洗浄し、ＤＭＥＭ培地１０ｍｌを加え、３７℃、５％ CO_2インキュベーター中で一晩培養した。２日後、培養上清を回収した。

（３）ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド発現ＣＯＳ７細胞培養上清からのＺＡＱを活性化するペプチドの部分精製

（３－１）ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド発現ＣＯＳ７細胞培養上清抽出液の調製

ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド発現ＣＯＳ７細胞培養上清を回収し、以下の操作を行い抽出液を調製した。先ず、細胞培養上清（約18.5ml）に終濃度が１ Mになるように酢酸１．１ｍｌを滴下し、一時間攪拌した。さらにその２倍容量のアセトンを加え、４℃にて３０分間攪拌し、次いで高速遠心機（CR26H、23型ローター：日立株式会社）を用いて15,000 rpm、３０分間遠心し上清を得た。得られた上清をエバポレーターにかけ、アセトンを除去した後、凍結乾燥機（１２ＥＬ； VirTis社）にて凍結乾燥した。

（３－２）ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド発現ＣＯＳ７細胞培養上清のＳ

ｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ５０ゲルろ過クロマトグラフィー及びＳｅｐＰａｋカラムクロマトグラフィー

上記（３－１）で得られた凍結乾燥粉末を１Ｍ酢酸２ｍｌに溶解後、１Ｍ酢酸で平衡化したSephadex G15（直径３cm、35ml、Pharmacia Biotech 社)カラムに吸着させた後、１Ｍ酢酸をカラムに流し、溶出液を５ｍｌづつフラクションNo.をつけて分取し、凍結乾燥機（１２ＥＬ；VirTis社）で凍結乾燥させた。

SepPak C18-5gカラム（10ml）を、メタノールにて膨潤後、0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水を流し、平衡化した。Sephadex G50ゲルろ過クロマトグラフィー分取フラクションのうちフラクションNo.1-16の凍結乾燥品をまとめて0.1%トリフルオロ酢酸/蒸留水 3mlに溶解し、SepPak C18-5gカラムに添着した後、0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水 24mlで洗浄後、0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル20mlで溶出した。得られた溶出液をサーバントにかけた。

（３－３）Ｓｕｐｅｒ　ＯＤＳ逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel Super ODS逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、0.46 cm x 10 cm）を、40℃にて、流速1 ml/minでＡ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）を流し、平衡化した。（５－３－２）で得られたSepPak C18-5gカラムフラクションをサーバントにかけた後、Super ODS逆相高速液体クロマトグラフィーに添着し、流速 1ml/minで60分間で Ａ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量100%／Ｂ液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量0%からＡ液容量0%／Ｂ液容量100%まで直線的グラジエントで上昇させ、溶出液を回収した。

溶出液を、1 mlずつフラクションNo.をつけて分取し、分取フラクション全量を凍結乾燥機（１２ＥＬ；VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物にH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2% BSAを加えたもの150μlを加えて溶解し、この溶液を用いて下記（３－４）の試験法により、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を測定した。

（３－４）ＦＬＩＰＲを用いた細胞内Ca^{2+}イオン濃度上昇活性の測定

上記（３－３）で得られたサンプルについて、参考例９（Ｉ）(５）で得られたＺＡＱ発現細胞（ＺＡＱＣ－Ｂ１）における細胞内Ca^{2+}イオン濃度上昇活性の

測定をＦＬＩＰＲを用いて行った。また、対照としてhOT7T175発現細胞(hOT7T175-16；ＷＯ００／２４８９０に記載)を用いた。

ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞、hOT7T1751-6細胞共に１０％透析処理済ウシ胎児血清(以後d FBSとする)を加えたＤＭＥＭで継代培養しているものを用いた。ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞、hOT7T1751-6細胞をそれぞれ15×10^4cells/mlとなるように培地(10% dFBS-DMEM)に懸濁し、ＦＬＩＰＲ用96穴プレート(Black plate clear bottom、Coster社)に分注器を用いて各ウェルに200μlずつ播き(3.0×10^4cells/200μl/ウェル)、５％ CO_2インキュベーター中で３７℃で一晩培養した後、用いた(以後細胞プレートとする)。H/HBSS(HANKS' 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77ｇ、水酸化ナトリウムで pH7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理)21ml、250mM Probenecid 210μl、ウシ胎児血清（ＦＢＳ） 210μlを混合した。また、Fluo3-AM 2バイアル(50μg)をジメチルスルフォキサイド 42μl、20% Pluronic acid 42μlに溶解し、これを上記H/HBSS－Probenecid－FBS に加え、混和後、8連ピペットを用いて培養液を除いた細胞プレートに各ウェル 100μlずつ分注し、５％ CO_2インキュベーター中で３７℃で１時間インキュベートした(色素ローディング)。上記（５－３－３）で得られたアッセイ用サンプルについて、各フラクションにH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2% BSAを加えたもの150μlを加えて溶解し、ＦＬＩＰＲ用96穴プレート(V-Bottomプレート、Coster社)へ移した(以後、サンプルプレートとする)。細胞プレートの色素ローディング終了後、H/HBSSに2.5mM Probenecidを加えた洗浄バッファーでプレートウォッシャー(Molecular Devices社)を用いて細胞プレートを４回洗浄し、洗浄後100μlの洗浄バッファーを残した。この細胞プレートとサンプルプレートをＦＬＩＰＲにセットし、アッセイを行った(ＦＬＩＰＲにより、サンプルプレートから0.05mlのサンプルが細胞プレートへと移される)。フラクションNo.48-68にＺＡＱＣ－Ｂ１細胞特異的な細胞内Ca^{2+}イオン濃度上昇活性が見られた。このことから、目的とするＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を有する成分、すなわち、ＺＡＱ活性化成分は、フラクションNo.48-68に溶出されていることが判明した。

参考例１１　ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドの哺乳動物細胞での産生（２）

（1）培養上清の調製

参考例１０に記載した方法でＣＯＳ７細胞にヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド発現プラスミド（pCANZAQLg2）を導入した。すなわち、ＤＭＥＭ培地を用いてＣＯＳ７細胞を3.0×10^6cells/dishとなるよう15cmシャーレにまき、３７℃、５％ CO_2インキュベーター中で一晩培養した。ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド発現プラスミド（pCANZAQLg2）４μg（４μlのＴＥバッファーに溶解）にバッファーＥＣ（Effectene transfection reagent、QIAGEN）600μlを加え、さらにEnhancer 32μlを加え、１秒間混和後室温で３分間放置した。さらにEffectene Transfection Reagent 120μlを加え、１０秒間混和後室温で１０分間放置した。前日にまいた細胞の上清を除き、ＤＭＥＭ培地１０ｍｌで１回洗浄し、ＤＭＥＭ培地を３０ｍｌを加えた。プラスミド溶液にＤＭＥＭ培地１ｍｌを加えて混和後細胞に滴下し、全体を混ぜた後３７℃、５％ CO_2インキュベーター中で一晩培養した。ＤＭＥＭ培地１０ｍｌで１回洗浄し、ＤＭＥＭ培地２０ｍｌを加え、３７℃、５％ CO_2インキュベーター中で一晩培養した。１日後、培養上清を回収し、さらにＤＭＥＭ培地２０ｍｌを加え、３７℃、５％ CO_2インキュベーター中で一晩培養した後培養上清を回収した。

（2）培養上清からのヒト型ＺＡＱリガンドペプチドの精製

上記（1）に記載した方法で１５ｃｍシャーレ８０枚分の培養上清を回収し、これに酢酸を終濃度１Ｍになるように添加した。１時間攪拌した後、２倍容のアセトンを添加し蛋白質を析出させた。４℃にて３０分間攪拌し、次いで高速遠心機（CR26H、RR10A 型ローター：日立株式会社）を用いて10,000 rpm、３０分間遠心し上清を得た。得られた上清をエバポレーターにかけアセトンを除去し、あらかじめ0.1％トリフルオロ酢酸/蒸留水で平衡化した逆相カラム（Waters社C18、100 g）に流した。0.1％トリフルオロ酢酸/蒸留水 1000ml、次いで0.1％トリフルオロ酢酸/20％アセトニトリル1000mlでカラムを洗浄した後、0.1％トリフルオロ酢酸/60％アセトニトリル1000mlでペプチドを溶出した。得られた溶出液をエバポレーターにかけた後、凍結乾燥器（１２ＥＬ； VirTis社）にて凍結乾燥した。

TSKgel ODS80TM逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、

21.5 mm x 30 cm）を、４０℃にて、流速４ｍｌ／ｍｉｎでA液（0.1%トリフルオロ酢酸/蒸留水）を流し、平衡化した。得られた凍結乾燥粉末をA液に溶解した後、当該ODS80TMカラムに添着し、流速４ｍｌ／ｍｉｎで１２０分間に A液（0.1%トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量６０%／B液（0.1%トリフルオロ酢酸/60%アセトニトリル）容量４０%からA液容量０%／B液容量１００%まで直線的グラジエントで上昇させて、ペプチドを溶出させた。

溶出液を、８ｍｌずつフラクションNo.をつけて分取し、分取フラクションから50 μlを取り凍結乾燥機（１２ＥＬ； VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物にH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2% BSAを加えたもの200μlを加えて溶解し、この溶液を用いて上記（５－３－４）の試験法により、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を有する成分、すなわち、ＺＡＱ活性化成分は、フラクションNo. 32に溶出されていることが判った。

TSKgel CM-2SWイオン交換高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、4.6 mm x 25 cm）を、２５℃にて、流速１ｍｌ／ｍｉｎでA液（10 mMぎ酸アンモニウム/10%アセトニトリル）を流し、平衡化した。上記フラクションNo.32を当該CM-2SWカラムに添着し、流速１ｍｌ／ｍｉｎで60分間にA液（10 mMぎ酸アンモニウム/10% アセトニトリル）容量１００%／B液（1000 mMぎ酸アンモニウム/10% アセトニトリル）容量０%からA液容量０%／B液容量１００%まで直線的グラジエントで上昇させて、ペプチドを溶出させた。

溶出液を、１ｍｌずつフラクションNo.をつけて分取し、分取フラクションから1.5 μlを取り、これをH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2% BSA 200μl希釈し、この溶液を用いて上記（５－３－４）の試験法により、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を有する成分、すなわち、ＺＡＱ活性化成分は、フラクションNo. 56および57に溶出されていることが判った。

TSKgel Super phenyl逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、4.6 mm x 10 cm）を、４０℃にて、流速１ｍｌ／ｍｉｎでA液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）を流し、平衡化した。上記フラクション No.56および

57を当該Super phenylカラムに添着し、流速１ｍｌ／ｍｉｎで６０分間にＡ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量７０％／Ｂ液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量３０％からＡ液容量５０％／Ｂ液容量５０％まで直線的グラジエントで上昇させて、ペプチドを溶出させた。

溶出液を、１ｍｌずつフラクションNo.をつけて分取し、分取フラクションから1.5 μlを取り、これをH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2% BSA 200μl希釈し、この溶液を用いて参考例１０の試験法により、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を有する成分、すなわち、ＺＡＱ活性化成分は、フラクションNo. 54、 55および56に溶出されていることが判った。本活性は単一な紫外吸収ピークと一致し、活性成分が単一にまで精製されたものと判断した。

ＺＡＱ活性化成分精製標品中の溶媒を凍結乾燥して除去し、得られた凍結乾燥物を溶媒ＤＭＳＯ（ジメチルサルフォキシド）に溶解した。この溶液の一部（約7.5 pmol）をプロテインシークエンサー(パーキンエルマー社、PE Biosystems Procise 491cLC)を用いたＮ末端アミノ酸配列解析に供した。その結果、Ｎ末端のアミノ酸残基から１０番目のアミノ酸残基のうち、９残基を同定することができた（Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp （配列番号：９２；Xaaは未同定残基））。得られたアミノ酸配列は、予想されるヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドのＮ端アミノ酸配列と一致した。また、ＺＡＱ活性化成分精製標品の質量分析を Finnigan LCQ LC/MS装置(Thermoquest, San Jose, CA)を用いて、エレクトロスプレーイオン化法により実施し、分子量が9657.6であることを確認した。これは１０個のシステイン残基がすべてジスルフィド結合を形成した８６残基のヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（配列番号：８２）の理論値9657.3に良く一致し、ＺＡＱ活性化成分精製標品が、配列番号：８２で表わされるアミノ酸配列を有するヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドを有していることが確認された。

（３）精製ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドのＺＡＱ活性化作用の測定

上記（２）で精製したヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドのＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を参考例１０の試験法により測定した。その結果、

ＺＡＱ発現ＣＨＯ細胞（ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞）においてヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドは濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇を惹起した。$ＥＣ_{50}$値は96 pMで、ヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドは非常に強いアゴニスト活性を示すことが明らかとなった。結果を〔図３〕に示す。

参考例１２　ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドの哺乳動物細胞での産生（３）

（１）ヒト型ＺＡＱリガンドペプチド安定発現ＣＨＯ細胞株の樹立

参考例９（II）に記載したプラスミドpHMITGを鋳型として下記のプライマー

5’ GTCGACCACCATGAGAGGTGCCACGC 3’　（配列番号：９３）

5’ ACTAGTCGCAGAACTGGTAGGTATGG 3’　（配列番号：９４）

を用いてヒト型ＺＡＱリガンドｃＤＮＡをＰＣＲ増幅し、pCR Blunt IIベクター（Invitrogen社）にクローニングした。得られた正しい配列を有するクローンからインサートｃＤＮＡをＳａｌＩ及びＳｐｅＩ制限酵素を用いて切り出し、pAKK01.11H発現ベクターに組み込んだ。当該プラスミドをCHO/dhFr⁻細胞（American Type Culture Collection）に、参考例９に記載したCellPhect Transfection kit（Amersham Pharmacia Biotech社）を用いた方法に従って形質導入した。形質導入株数クローンから培養上清を回収し、参考例９に記載した試験方法により、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞の細胞内$Ｃａ^{2+}$イオン濃度を上昇させるＺＡＱリガンド活性を測定した。これによりＺＡＱリガンドを高発現するＺＡＱＬ－１発現ＣＨＯ細胞クローンNo.4を選別した。

（２）ヒト型ＺＡＱリガンド（ＺＡＱＬ－１）発現ＣＨＯ細胞無血清培養上清の調製

透析済み10％ウシ胎児血清（JRH BIOSCIENCES 社）、1 mM MEM非必須アミノ酸溶液、100 units/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycinを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium（ＤＭＥＭ）培地（日水製薬株式会社）でSingle Tray(Nunc社)４枚コンフルエントまで培養したＺＡＱＬ－１発現ＣＨＯ細胞クローンNo.4を、トリプシン処理して分散後、遠心して回収した。上記Single Tray 1枚分の細胞を上記培地1.5 Lに懸濁後Cell Factories 10（Nunc社）に植え込み、４基のCell Factories 10について37℃で5％炭酸ガス中にて３日間培養した。培

養上清を除いた後、前述のH/HBSS 1 Lで1基のCell Factories 10の細胞を洗浄した。H/HBSSを除いた後、1基のCell Factories 10あたり2 Lの無血清培地（1 mM MEM非必須アミノ酸溶液、100 units/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycinを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium培地）を加えさらに2日間培養した。回収した培養上清を日立高速遠心機で1,000 rpmで１０分間遠心後、ガーゼを用いてろ過し清澄な上清を得た。これに酢酸を最終濃度1 Mになるように添加し以下の操作を行った。

（３）ＺＡＱＬ－１発現ＣＨＯ細胞無血清培養上清のオクタドデシル逆相クロマトグラフィーによる粗分画

オクタドデシル基を固定したシリカゲルを充填したPrepC18（Waters社）をメタノールで膨潤後、ガラス製カラムに充填した（50 mm×100 mm）。その後、１Ｍ酢酸で平衡化したカラムに、参考例１１（２）で調製した抽出液を添着した。次にこのカラムを８００ｍｌの１M酢酸で洗浄した。次に、このカラムに１０００ｍｌの６０％アセトニトリル／０．１％トリフルオロ酢酸を流し、目的とする粗ペプチド成分を溶出した。得られた溶出液を、エバポレーターを用いて濃縮した後、凍結乾燥機（12EL； VirTis社）にて凍結乾燥した。

（４）Ｗａｋｏｓｉｌ－ＩＩ ５Ｃ１８ＨＧ Ｐｒｅｐ逆相高速液体クロマトグラフィーによる分離

Wakosil-II 5C18HG Prep逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（和光純薬、20mm×250mm）を、４０℃にて、流速５ｍｌ／ｍｉｎでA液（0.1％トリフルオロ酢酸／蒸留水）容量91.7％/Ｂ液（0.1％トリフルオロ酢酸／６０％アセトニトリル）容量8.3％を流し平衡化した。上記（３）で得られた凍結乾燥物についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、凍結乾燥物を１M酢酸３６ｍｌを加えて溶解し遠心後、その内の１／３を当該カラムに添着した後、流速５ｍｌ／ｍｌで、１分間かけてＡ液容量66.7％／Ｂ液容量33.3％ まで上昇させ、次いで１２０分間かけてＡ液容量16.7％Ｂ液容量83.3％まで、Ｂ液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。溶出液を５ｍｌずつフラクション番号をつけて分取した。分取フラクションより各3 μlづつ0.2％ BSA 150 μl と混合し凍結乾燥機（12EL； VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物に、アッセイバッファー〔H/HBSS（ニ

ッスイハンクス２（日水製薬株式会社） 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77 g 、水酸化ナトリウム溶液で pH7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理）に、2.5 mM Probenecid およびO.1% CHAPS を添加したもの〕150 μlを加えて溶解し、この溶液50 μl を用いて参考例９の試験法に従い、ＺＡＱ－Ｂ１受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱ－Ｂ１受容体活性化作用を有する成分は、主としてフラクションNo.73-75に溶出されていることが判明した。

（５）ＴＳＫｇｅｌ ＣＭ－２ＳＷイオン交換高速液体クロマトグラフィーによる分離

TSKgel CM-2SWイオン交換高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー、7.8×300mm）を25℃にて、流速2 ml/minでＡ液（4 Mギ酸アンモニウム：蒸留水：アセトニトリル = 1 : 299 : 100）容量100%、Ｂ液（4 Mギ酸アンモニウム：蒸留水：アセトニトリル = 1 : 2 : 1）容量0%を流し平衡化した。上記（４）で得られたWakosil-II 5C18HG Prep逆相高速液体クロマトグラフィー分取フラクションのうちフラクションNo.73-75を凍結乾燥したものをＡ液4 mlに溶解しTSKgel CM-2SWイオン交換カラムに添着した後、流速１ｍｌ／ｍｉｎで１２０分間かけてＡ液容量２５％／Ｂ液容量７５％ まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液を２ｍｌずつフラクション番号をつけて分取し、分取フラクションより各10 μlづつを0.2% BSA 100 μl 混合し凍結乾燥機（12EL ; VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物に上記アッセイバッファー100 μl を加えて溶解しこれをさらに同バッファーで１００倍希釈し上記（３－５）の試験法に従い、ＺＡＱ受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱ受容体活性化作用を有する成分はフラクションNo.95-100に溶出されていることが判明した。

（６）ＴＳＫｇｅｌ ＯＤＳ－８０Ｔｓ逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel ODS-80Ts 逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー、4.6 mm x 100 mm）を、４０℃にて、流速１ｍｌ／ｍｉｎでＡ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量91.7%/Ｂ液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）

容量8.3％を流し平衡化した。上記（５）で得られたフラクションNo.95-100の凍結乾燥物についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、凍結乾燥物を1 M酢酸4 mlを加えて溶解し当該カラムに添着した後、流速１ｍｌ／ｍｉｎで、１分間かけてＡ液容量７５％/Ｂ液容量２５％まで上昇させ、次いで６０分間かけてＡ液容量２５％Ｂ液容量７５％までＢ液濃度を直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液を１ｍｌずつフラクション番号をつけて分取した。参考例９に記載した方法に従いＺＡＱリガンド活性を測定し、当該活性が単一な紫外吸収ピークと一致するフラクションに溶出されていることを確認した。これよりＺＡＱリガンドが単一に精製されたものと判断した。

（７）精製されたＺＡＱリガンドペプチドの構造解析

上記（６）で得られたＺＡＱリガンドペプチドについて以下の方法で構造決定を実施した。ＺＡＱ活性化主成分精製標品中の凍結乾燥機（12EL； VirTis社）にて凍結乾燥した。得られた凍結乾燥物を溶媒DMSO(ジメチルサルフォキシド)に溶解した。この溶液の一部をプロテインシークエンサー(パーキンエルマー社、PE Biosystems Procise 491cLC)を用いたＮ末端からのアミノ酸配列解析に供した。その結果、予想されるヒト方ＺＡＱリガンドペプチド成熟体(配列番号：８２)と一致するN端アミノ酸配列を得た。また、Finnigan LCQ LC/MS装置を用いて、エレクトロンスプレーイオン化法により質量分析を行い、分子量が9658.0であると算定した。本測定値はヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド(配列番号：８２)の理論値9657.3にと良く一致し、目的とする配列番号：８２で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドが取得できたことが確認された。

参考例１３　ヘビ毒ＭＩＴ１およびヒト型ＺＡＱリガンドとＺＡＱおよびＩ５Ｅとの反応性

（１）ヘビ毒ＭＩＴ１の単離

（１－１）Ｗａｋｏｓｉｌ－ＩＩ　５Ｃ１８ＨＧ　Ｐｒｅｐ逆相高速液体クロマトグラフィーによる分離

Wakosil-II 5C18HG Prep逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（和光純薬、20mm×250mm）を、40℃にて、流速5 ml/minでＡ液（0.1％ トリフルオロ酢酸/蒸

留水）容量91.7%/B液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量8.3%を流し平衡化した。Black Mamba毒液（Sigma社）凍結乾燥品50 mgに1 M AcOH 4 mlを加え溶解し、15,000 rpmで10分間遠心して得られた上清についてクロマトグラフィー操作を行った。サンプルを当該カラムに添着した後、流速5 ml/minで、1分間かけてA液容量91.7%/B液容量8.3% まで上昇させ、次いで120分間かけてA液容量33.4%B液容量66.6%まで、B液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。溶出液を20分後から10 mlずつフラクション番号をつけて分取した。各フラクションから1 μlを採取し、前述のアッセイバッファーで10,000倍希釈後、参考例９の試験法に従い、ＺＡＱ－Ｂ１受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQ-B1受容体活性化作用を有する成分は、主としてフラクションNo.21-23に溶出されていることが判明した。

（１－２）ＴＳＫｇｅｌ ＣＭ－２ＳＷイオン交換高速液体クロマトグラフィーによる分離

TSKgel CM-2SWイオン交換高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー、4.6×250 mm）を25℃にて、流速1 ml/minでA液（4 Mギ酸アンモニウム：蒸留水：アセトニトリル = 1 : 299 : 100）容量100%、B液（4 Mギ酸アンモニウム：蒸留水：アセトニトリル = 1 : 2 : 1）容量0%を流し平衡化した。参考例１２で得られたWakosil-II 5C18HG Prep逆相高速液体クロマトグラフィー分取フラクションのうちフラクションNo.21-23を凍結乾燥したものをA液4 mlに溶解しTSKgel CM-2SWイオン交換カラムに添着した後、流速 1 ml/minで90分間かけてA液容量0%／B液容量100%まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液を1 mlずつフラクション番号をつけて分取した。各フラクションから1 μlを採取し、前述のアッセイバッファーで10,000倍希釈後、参考例９の試験法に従い、ZAQ-B1受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQ-B1受容体活性化作用を有する成分は、主としてフラクションNo.50-51に溶出されていることが判明した。

（１－３）Ｖｙｄａｃ２３８ＴＰ３４１０逆相高速液体クロマトグラフィーによる分離

Vydac238TP3410逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（Vydac、 4.6mm×

100 mm）を、40℃にて、流速1 ml/minでＡ液（0.1％ トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量91.7％/Ｂ液（0.1％ トリフルオロ酢酸/60％ アセトニトリル）容量8.3％を流し平衡化した。上記（１－２）で得られたTSKgel CM-2SWイオン交換高速液体クロマトグラフィー分取フラクションのうちフラクションNo.50-51を直接当該カラムに添着した後、流速1 ml/minで、1分間かけてＡ液容量75％/Ｂ液容量25％ まで上昇させ、次いで75分間かけてＡ液容量41.7％Ｂ液容量58.3％まで、Ｂ液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。溶出液を0.5 mlずつフラクション番号をつけて分取した。各フラクションから1 μlを採取し、前述のアッセイバッファーで10,000倍希釈後、参考例９の試験法により、ＺＡＱ－Ｂ１受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱ－Ｂ１受容体活性化作用を有する成分は、主としてフラクションNo.108-115に溶出されていることが判明した。

（１－４）精製されたヘビ毒ＭＩＴ１の構造解析

上記（１－３）で得られたヘビ毒ＭＩＴ１について以下の方法で構造決定を実施した。精製したＭＩＴ１を凍結乾燥機（12EL；VirTis社）にて凍結乾燥した。得られたペプチド凍結乾燥物を溶媒ＤＭＳＯ（ジメチルサルフォキシド）に溶解した。この溶液の一部をプロテインシークエンサー(パーキンエルマー社、PE Biosystems Procise 491cLC)を用いたＮ末端からのアミノ酸配列解析に供した。その結果、予想されるヘビ毒ＭＩＴ１（配列番号：２１）と一致するＮ端アミノ酸配列を得た。また、Finnigan LCQ LC/MS装置を用いて、エレクトロンスプレーイオン化法により質量分析を行い、分子量が8506.8であると算定した。本測定値はヘビ毒ＭＩＴ１の理論値8506.4に良く一致し、目的とする配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドが取得できたことが確認された。

（２）Ｉ５Ｅ安定発現細胞株の樹立

ヒト型Ｉ５Ｅ受容体ｃＤＮＡ（配列番号：６）を公知のＰＣＲ法によりクローニングし、pAKK01.11H発現ベクターに組み込んだ。当該発現ベクターを参考例９に記載した方法に従い、CHO/dhFr⁻細胞（American Type Culture Collection）に形質導入した。培養開始10-14日後に生育してきた形質転換ＣＨＯ細胞のコロニーを約20個選んだ。 選択した細胞を3×10^4個/wellで96穴プレートに植え込み、参考例９に記載した試験法に従い、ＭＩＴ１に対する反応性を検討した。反応性

の良いＩ５Ｅ発現ＣＨＯ細胞4番クローン（Ｉ５Ｅ－４細胞と略称する）を選別した。配列番号：６で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号：５２に示す。

（３）ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドおよびＭＩＴ１のＺＡＱ受容体およびＩ５Ｅ受容体活性化作用の測定

参考例１２に記載した方法で精製したヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、及び上記（１）に記載した方法で精製したヘビ毒ＭＩＴ１について、それらのＺＡＱ受容体活性化作用、及びＩ５Ｅ受容体活性化作用を参考例９に記載した方法に従い測定した。結果を〔図４〕および〔図５〕に示す。

その結果、ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドおよびヘビ毒ＭＩＴ１は濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇を惹起した。ヘビ毒ＭＩＴ１のＺＡＱ受容体活性化作用はヒト型ＺＡＱリガンドペプチドのそれに比べて１０倍強かった。また、ヘビ毒ＭＩＴ１のヒト型Ｉ５Ｅ受容体活性化作用はヒト型ＺＡＱリガンドペプチドのそれに比べて１００倍程度強いものであった。

参考例１４　大腸菌でのヒトＺＡＱリガンド（配列番号：８２）の製造

（１）　大腸菌でのヒトＺＡＱリガンド発現プラスミドの構築

(a) ６種のＤＮＡ断片＃１～＃６（配列番号：９５～１００）を用いて、ＺＡＱリガンドの構造ＤＮＡを調製した。

(b)ＤＮＡオリゴマーのリン酸化

５’側になるべき上記＃１および＃６を除いた４種のＤＮＡオリゴマー（＃２～＃５）各々を、２５μlのリン酸化反応液〔ＤＮＡオリゴマー１０μg，５０mM Tris－HCl，pH７.６，１０mM $MgCl_2$，１mMスペルミジン，１０mM ジチオスレイトール（以後ＤＴＴと略記），０.１mg／mlウシ血清アルブミン（以後ＢＳＡと略記），１mM ＡＴＰ，１０ユニットＴ４ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）〕中で３７℃・１時間反応させ、各オリゴマーの５’末端をリン酸化した。フェノール処理を行った後、２倍量のエタノールを加え、－７０℃に冷却した後、遠心でＤＮＡを沈殿させた。

(c)ＤＮＡフラグメントの連結

上記（ｂ）で得られたＤＮＡフラグメントと上記＃1および＃６を合わせ、１２０μｌとした。この混合液を９０℃で１０分間保持した後、室温まで徐冷しアニーリングを行った後、TaKaRa DNA Ligation Kit ver.2（宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液３０μｌにキットに付属のＩＩ液３０μｌを加え、よく混合した後、キットに付属のＩ液６０μｌを加え、３７℃・１時間反応させ、ライゲーションを行った。その後、フェノール処理を行ない、水層を回収して２倍量のエタノールを加え、－７０℃に冷却した後、遠心でＤＮＡを沈殿させた。この様にして得られたＤＮＡフラグメントをＴ４ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）によるリン酸化を行った後、以下の工程(ｄ)に供した。

(d) ＺＡＱリガンド発現ベクターの構築

発現用ベクターとしてはｐＴＣＩＩ（特開2000-178297号に記載）をＮｄｅＩおよびＢａｍＨＩ（宝酒造）で３７℃・２時間消化した後、１％アガロースゲル電気泳動により４．３kbのＤＮＡ断片をQIAquick Gel Extraction Kit （キアゲン社）を用いて抽出し、２５μｌのＴＥ緩衝液に溶解した。このｐＴＣＩＩのＮｄｅＩ、ＢａｍＨＩ断片と上記により調製したＺＡＱリガンドの構造遺伝子（配列番号：１０１）をTaKaRa DNA ligation kit ver.2 （宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。この反応液を１０μl用いて大腸菌ＪＭ１０９コンピテントセル（東洋紡）を形質転換し、１０μｇ／ｍｌのテトラサイクリンを含むＬＢ寒天培地上に播き、３７℃で１晩培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニー選んだ。この形質転換体をＬＢ培地で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit（キアゲン社）を用いてプラスミドｐＴＣｈ１ＺＡＱを調製した。このＺＡＱリガンドＤＮＡの塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル３７７ＤＮＡシーケンサーを用いて確認した。プラスミドｐＴＣｈ１ＺＡＱを大腸菌（Escherichia coli）ＭＭ２９４（ＤＥ３）に形質転換し、ＺＡＱリガンド発現株Escherichia coli MM294(DE3)/ pTCh1ZAQを得た。

（２）ＺＡＱリガンドの製造

上記のEscherichia coli MM294(DE3)/ pTCh1ZAQを５．０ｍｇ／Ｌのテトラサイクリンを含むＬＢ培地・１Ｌ（１％ペプトン、０．５％酵母エキス、０．５％塩化ナトリウム）を用いて２Ｌ容フラスコ中で３７℃、８時間振とう培養した。

得られた培養液を１９Ｌの主発酵培地（1-68％リン酸１水素ナトリウム、０．３％リン酸２水素カリウム、０．１％塩化アンモニウム、０．０５％塩化ナトリウム、０．０５％硫酸マグネシウム、０．０２％消泡剤、０．０００２５％硫酸第１鉄、０．０００５％塩酸チアミン、１．５％ブドウ糖、１．５％ハイケースアミノ）を仕込んだ５０Ｌ容発酵槽へ移植して、３０℃で通気攪拌を開始した。培養液の濁度が５００クレット単位になったところで、イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシドの最終濃度が１２ｍｇ／Ｌになるように添加し、さらに４時間培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、約２００ｇの湿菌体を取得し、－８０℃で保存した。

この形質転換大腸菌ＭＭ２９４（ＤＥ３）／ｐＴＣｈ１ＺＡＱは、受託番号ＩＦＯ1-6５２７として財団法人発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託されている。

（３）ＺＡＱリガンドの活性化

上記（２）で得られた菌体２００ｇに、２００ｍＭトリス／ＨＣｌ、７Ｍグアニジン塩酸塩（ｐＨ８．０）４００ｍｌを加えて菌体を溶解した後、遠心分離（１００００ｒｐｍ、１時間）を行った。上澄液に０．４Ｍアルギニン、５０ｍＭトリス／ＨＣｌ、０．２ｍＭ　ＧＳＳＧ、１ｍＭ　ＧＳＨ（ｐＨ８．０）１０リットルを加えて、４℃で一晩活性化を行った。

（４）ＺＡＱリガンドの精製

上記（３）で活性化の終了した再生液をｐＨ６．０に調整し、５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ６．０）で平衡化したＳＰ－セファロースカラム（１１．３ｃｍ×１５ｃｍ）に吸着させた後、６００ｍＭ ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ６．０）で溶出し、ＺＡＱリガンドを含むフラクションをプールした。この画分を５０ｍＭ　リン酸緩衝液（ｐＨ６．０）で平衡化したＣＭ－５ＰＷ（２１．５ｍｍ×１５０ｍｍＬ）に通液し、吸着、洗浄した後、０－１００％Ｂ（Ｂ＝５０ｍＭリン酸緩衝液＋１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ６．０５）の段階勾配（６０分）で溶出を行いＺＡＱリガンド画分（溶出時間約４０分）を得た。この画分を、さらに０．１％トリフルオロ酢酸で平衡化したＣ４Ｐ－５０（２１．５ｍｍＩＤ×３００ｍｍＬ、昭和電工）に通液し、吸着、洗浄した後、２５－５０％Ｂ（Ｂ：８０％アセトニトリル／０．１％トリフルオロ酢酸）の段階勾配（６０分）で溶出を行い、ＺＡＱ

リガンド画分（溶出時間約４０分）をプールした後、凍結乾燥を行い、ＺＡＱリガンド凍結乾燥粉末約８０mgを得た。

（５）ＺＡＱリガンドの特徴決定

(a) ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析

上記（４）で得られたＺＡＱリガンドを１００mM ＤＴＴを添加したＳａｍｐｌｅ ｂｕｆｆｅｒ [Laemmli, Nature, 227, 680 (1979)] に懸濁し、９５℃で１分間加熱した後、マルチゲル１５／２５（第一化学薬品）で電気泳動を行った。泳動後のゲルをクーマシー・ブリリアント・ブルー（Coomassie brilliant blue）で染色した結果、参考例１０で得られたＣＯＳ７細胞由来の組換え型ＺＡＱリガンド標品と同じ位置に、単一の蛋白質バンドが認められた。このことから、上記（４）で得られた大腸菌由来の組換え型ＺＡＱリガンド標品は極めて高純度であり、ＣＯＳ７細胞から調製した組換え型ＺＡＱリガンドと分子量的に同一であることが分かった。

(b) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計（日立Ｌ－８５００Ａ Amino Acid Analyzer）を用いて決定した。その結果、ＺＡＱリガンド（配列番号：８２で表されるアミノ酸配列からなるペプチド）のＤＮＡの塩基配列から推定されるアミノ酸組成と一致した（表５）。

〔表５〕

アミノ酸	１モル当たりの残基数	ＺＡＱリガンドの塩基配列から予測される値
Ａｓｘ	５．７	６
Ｔｈｒ[1)]	３．３	４
Ｓｅｒ[1)]	３．４	４
Ｇｌｘ	５．０	５
Ｐｒｏ	５．６	６
Ｇｌｙ	７．７	８
Ａｌａ	３．９	４
Ｃｙｓ[2)]	Ｎ．Ｄ．	１０
Ｖａｌ	２．９	３
Ｍｅｔ	１．９	２
Ｉｌｅ	２．６	３
Ｌｅｕ	８	８
Ｔｙｒ	１．０	１
Ｐｈｅ	３．７	４
Ｈｉｓ	３．８	４
Ｌｙｓ	３．８	４
Ａｒｇ	８．５	９
Ｔｒｐ	０．９．	１

酸加水分解（６Ｎ　ＨＣｌ－１％フェノール、１１０℃、２４および４８時間加水分解の平均値）

1）０時間に外挿した値

2）未検出

(c) Ｎ末端アミノ酸配列分析

Ｎ末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー（ＰＥアプライドバイオシステムズ　モデル４９２）を用いて決定した。その結果、得られたＺＡＱリガン

ドのＤＮＡの塩基配列から推定されたＺＡＱリガンドのＮ末端アミノ酸配列と一致した（表６）。

〔表６〕

残基 Ｎｏ.	検出された PTH-アミノ酸[1)] (pmol)	ＺＡＱリガンドの塩基配列から予測されるアミノ酸
1	Ａｌａ(99)	Ａｌａ
2	Ｖａｌ(100)	Ｖａｌ
3	Ｉｌｅ(91)	Ｉｌｅ
4	Ｔｈｒ(57)	Ｔｈｒ
5	Ｇｌｙ(70)	Ｇｌｙ
6	Ａｌａ(89)	Ａｌａ
7	Ｎ．Ｄ．	Ｃｙｓ
8	Ｇｌｕ(60)	Ｇｌｕ
9	Ａｒｇ(49)	Ａｒｇ
１０	Ａｓｐ(54)	Ａｓｐ
１１	Ｖａｌ(79)	Ｖａｌ
１２	Ｇｌｎ(67)	Ｇｌｎ
１３	Ｎ．Ｄ．	Ｃｙｓ
１４	Ｇｌｙ(54)	Ｇｌｙ
１５	Ａｌａ(65)	Ａｌａ
１６	Ｇｌｙ(47)	Ｇｌｙ
１７	Ｔｈｒ(32)	Ｔｈｒ
１８	Ｎ．Ｄ．	Ｃｙｓ
１９	Ｎ．Ｄ．	Ｃｙｓ
２０	Ａｌａ(36)	Ａｌａ

1) フェニールチオヒダントイン１５０ｐｍｏｌを用いて分析を行った。

Ｎ．Ｄ．は未検出を示す。

(d) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計（日立L－８５００A Amino Acid Analyzer）を用いて決定した。得られたＺＡＱリガンドはＤＮＡの塩基配列から推定されたC末端アミノ酸と一致した（表７）。

〔表７〕

C末端アミノ酸	回収率（%）
Ｐｈｅ	４９．８

気相ヒドラジン分解法（１００℃，３．５時間）

(e) 質量分析

質量分析をnanoESIイオン源を装着したLCQイオントラップ質量分析計（サーモクエスト社製）を用いて行った。その結果、分子量9657.55±0.89が得られ、配列番号：８２の、しかも配列番号：８２が含有する１０残基のＣｙｓが５対のジスルフィド結合を形成したＺＡＱリガンドの理論分子量(9657.3)と良く一致していた。

（６）ＺＡＱリガンドの活性測定（ＦＬＩＰＲを用いた細胞内Ｃａイオン濃度上昇活性の測定）

上記（４）で得られた純化された大腸菌由来の組換え型ＺＡＱリガンド標品を参考例１０の方法を用いて、活性測定（ＦＬＩＰＲを用いた細胞内Ｃａイオン濃度上昇活性の測定）を行った。その結果、参考例１０で得られたＣＯＳ７細胞由来の組換え型標品（ＺＡＱリガンドの精製品）と同等の活性を有していた。

参考例１５　マウス型ＺＡＱリガンドペプチドｃＤＮＡのクローニング

マウスMultiple Tissue cDNA Panel（CLONTECH社）のbrainを鋳型としてプライマーmMIT1-F3（配列番号：１０２）、mMIT1-R3（配列番号：１０３）、mMIT1-F4（配列番号：１０４）およびmMIT1-R4（配列番号：１０５）を作成し、以下に記したPCR反応を実施した。

mMIT1-F3: 5'-CTTGGCCTTCTCGGCTTGTCTAG-3'　（配列番号：１０２）

mMIT1-R3: 5'-GGTGTAAAGCAAGAGGTCACCCAGT-3' (配列番号：１０３)

mMIT1-F4: 5'-ACAAGGCAGCGCAGAAGGAAGT-3' (配列番号：１０４)

mMIT1-R4: 5'-GGCTCCAGTACAGAGTCCAGACAA-3' (配列番号：１０５)

PCR反応液は、50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を0.6 μl、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer (200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM $Mg(OAc)_2$, 25% Dimethyl Sulfoxide, 18.75μg/ml BSA, 0.025%Tween-20, 0.025% Nonidet-P40) を6 μl、2.5 mM dNTP mixtureを2.4 μl、10 μMプライマーmMIT1-F3およびmMIT1-R3を各0.6 μl 、鋳型DNAを3μl、および蒸留水を16.8 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・3分の初期変性後、94℃・30秒-68℃・3分のサイクル反応を35回、および68℃・3分の最終伸長反応とした。

続いて、該PCR反応の反応液を蒸留水で50倍に希釈したものをを鋳型としてnested PCRを行った。50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を0.6 μl、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer (200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM $Mg(OAc)_2$, 25% Dimethyl Sulfoxide, 18.75μg/ml BSA, 0.025%Tween-20, 0.025% Nonidet-P40)を6 μl、2.5 mM dNTP mixtureを2.4 μl、10 μMプライマーmMIT1-F4およびmMIT1-R4を各0.6 μl 、鋳型DNAを3μl、および蒸留水を16.8 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・3分の初期変性後、94℃・30秒-68℃・3分のサイクル反応を35回、および68℃・3分の最終伸長反応とした。

得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、マウスZAQリガンド全長ペプチドをコードする410 bpのDNA断片（配列番号：１０６）を有するプラスミドを取得し、これをpMMITと命名した。また、該塩基配列からプライマーにより規定される部分の配列を差し引いた配列をcDNA塩基配列として確定した(配列番号：１１１)。該プラスミドにより大腸菌 (Escherichia coli) TOP10をトランスフォームさせ、大腸菌TOP10/pMMITと命名した。

このDNA断片の塩基配列を解析した結果、配列番号：１０６で表わされるDNA断片は、配列番号：１０７で表わされるマウス型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド(105アミノ酸残基）をコードするDNA（配列番号：１０８）を含んでいることが

明らかとなった。

また、配列番号：１０８で表わされる塩基配列は典型的なシグナル配列を有しており、配列番号：１０８で表わされる塩基配列を有するDNAは、配列番号：１０９で表わされるマウス型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（86アミノ酸残基）をコードする258塩基対からなるDNA（配列番号：１１０）を含んでいることが明らかとなった。

参考例１６　ラット型ＺＡＱリガンドペプチドｃＤＮＡのクローニング

ラット脳QUICK-clone cDNA (CLONTECH社)を鋳型として、degenerateプライマー MF1（配列番号：１１２)、MR1（配列番号：１１３)、MF2（配列番号：１１４)およびMR2（配列番号：１１５)を作成し、以下に記したPCR反応を実施した。

MF1:　5'-TCACCYCAAGTGAYCATGAGAGG-3'　（配列番号：１１２）

MR1:　5'-CTAAAARTTGRYRTTCTTCAAGTCC-3'　（配列番号：１１３）

MF2:　5'-ATCACAGGGGCCTGTGARCG-3'　（配列番号：１１４）

MR2:　5'-AGCAGCGGTACCTGCCGTCC-3'　（配列番号：１１５）

PCR反応液は50X Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を0.6 μl、添付の10x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を3 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造）を2.4 μl、10 μMプライマーMF1およびMR1を 0.6 μl、鋳型cDNAを1 μl、および蒸留水を20.6 μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-55℃・1分-68℃・1分のサイクル反応を35回、および68℃・5分の最終伸長反応とした。

続いて、該PCR反応の反応液を蒸留水で15倍希釈したものを鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50X Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を0.6 μl、添付の10x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を3 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を2.4 μl、10 μMプライマーMF1およびMR1を 0.6 μl、鋳型cDNAを1 μl、および蒸留水を20.6 μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-55℃・1分-68℃・1分のサイク

ル反応を35回、および68℃・5分の最終伸長反応とした。

得られたDNA断片をZaro Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、配列番号：１１６（Tタイプ）および配列番号：１１７（Cタイプ）で表される部分配列を得た。

上記配列の情報よりプライマー RM3-1（配列番号：１１８）、RM3-2（配列番号：１１９）およびRM3-3（配列番号：１２０）を作成し、以下に記した5'RACE実験を実施した。

RM3-1: 5'-GTGGCACTCCTCTCCTTCCCGCCCCAGA-3' （配列番号：１１８）

RM3-2: 5'-CAGGCCCCGCAGCCACAGGCTGATAGCA-3' （配列番号：１１９）

RM3-3: 5'-AGCAGGTGCCAGCCCCACACTGGACATC-3' （配列番号：１２０）

5'RACEのPCR反応液は50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を0.6 μl、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer (200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM $Mg(OAc)_2$, 25% Dimethyl Sulfoxide, 18.75μg/ml BSA, 0.025%Tween-20, 0.025% Nonidet-P40)を6 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を2.4 μl、10 μMプライマーRM3-1を 0.6 μl、10 μMプライマーAP1（プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を0.6 μl、鋳型cDNA (CLONTECH社、ラット脳Marathon-Ready cDNA) を3 μl、および蒸留水を16.8 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・30秒の初期変性後、94℃・5秒-72℃・3分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-70℃・3分のサイクル反応を5回、94℃・5秒-68℃・3分のサイクル反応を25回行った。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を0.6 μl、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer (200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM $Mg(OAc)_2$, 25% Dimethyl Sulfoxide, 18.75μg/ml BSA, 0.025%Tween-20, 0.025% Nonidet-P40)を6 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を2.4 μl、10 μMプライマーRM3-2またはRM3-3を 0.6 μl、10 μMプライマーAP2（プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を0.6 μl、鋳型DNA（該PCR反応液50倍希釈液）を3 μl、および蒸留水を16.8 μlを混合して作製した。

反応条件は94℃・30秒の初期変性後、94℃・5秒-68℃・3分のサイクル反応を30回行った。

得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、5'端の配列（配列番号：１２１）を得た。

配列番号：１１６および配列番号：１１７の情報よりプライマー RM5-1（配列番号：１２２）とRM5-4（配列番号：１２３）を作成し、以下に記した3'RACE実験を実施した。

RM5-1: 5'-GGAAGGAGAGGAGTGCCACCCTGGAAG-3' （配列番号：１２２）

RM5-4: 5'-ACCATACCTGTCCCTGTTCACCCAGCCT-3' （配列番号：１２３）

3'RACEのPCR反応液は50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を0.6 μl、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer (200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM $Mg(OAc)_2$, 25% Dimethyl Sulfoxide, 18.75μg/ml BSA, 0.025%Tween-20, 0.025% Nonidet-P40)を6 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を2.4 μl、10 μMプライマーRM5-1を 0.6 μl、10 μMプライマーAP1（プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を0.6 μl、鋳型cDNA（CLONTECH社、ラット脳Marathon-Ready cDNA）を3 μl、および蒸留水を16.8 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・1分の初期変性後、94℃・30秒-72℃・3分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-70℃・3分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-68℃・3分のサイクル反応を25回、および68℃・3分の最終伸長反応とした。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を0.6 μl、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer (200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM $Mg(OAc)_2$, 25% Dimethyl Sulfoxide, 18.75μg/ml BSA, 0.025%Tween-20, 0.025% Nonidet-P40)を6 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を2.4 μl、10 μMプライマーRM5-4またはRM3-3を 0.6 μl、10 μMプライマーAP2（プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を0.6 μl、鋳型DNA（該PCR反応液50倍希釈液）を3 μl、および蒸留水を16.8 μlを混合して作製した。

反応条件は94℃・1分の初期変性後、94℃・30秒-68℃・3分のサイクル反応を35回、および68℃・3分の最終伸長反応とした。

得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、3'端の配列（配列番号：１２４）を得た。

ラット脳QUICK-clone cDNA (CLONTECH社) またはラット脳cDNA (Wistar rat)を鋳型として5'RACEおよび3'RACEの情報よりプライマーRBv8-WF1（配列番号：１２５)、RBv8-WF2 （配列番号：１２６)、RBv8-WR1 （配列番号：１２７）およびRBv8-WR2（配列番号：１２８）を作成し、以下に記したPCR反応を実施した。

RMIT-WF1: 5'-ATTCCAGAGTGGACAGTGTTTGCCTTCACC-3' （配列番号：１２５）

RMIT-WF2: 5'-GATCATGAGAGGTGCTGTGCAAGTCTTC-3' （配列番号：１２６）

RMIT-WR1: 5'-CTCTCTGCACGCTGCTGGACTGTTCC-3' （配列番号：１２７）

RMIT-WR2: 5'-CAGATGTAACACAAGAGGTCACCCAGTAGG-3' （配列番号：１２８）

PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase(Stratagene社)を0.6 μl、添付の10x PCR bufferを3 μl、2.5 mM dNTP mixtureを2.4 μl、10 μMプライマーRMIT-WF1およびRMIT-WR1を各1.5 μl 、鋳型DNAを1μl、および蒸留水を20 μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-55℃・30秒-72℃・1分のサイクル反応を35回、および72℃・5分の最終伸長反応とした。

続いて、該PCR反応の反応液を蒸留水で50倍に希釈したものをを鋳型としてnested PCRを行った。PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase (Stratagene社)を0.6 μl、添付の10x PCR bufferを3 μl、2.5 mM dNTP mixtureを2.4 μl、10 μMプライマーRMIT-WF2およびRMIT-WR2を各1.5 μl 、鋳型DNAを3μl、および蒸留水を18 μlを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-55℃・30秒-72℃・1分のサイクル反応を35回、および72℃・5分の最終伸長反応とした。

得られたDNA断片をZaro Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、ラットZAQリガンド全長

ペプチドをコードする3種の375bpのDNA断片（配列番号：１２９、配列番号：１３０および配列番号：１３１；塩基置換が起こっているそれぞれをノーマルタイプ、Yタイプ、Qタイプとする）を有するプラスミドを、pRMIT、pRMITYおよびpHMITQとそれぞれ命名した。該プラスミドにより大腸菌（Escherichia coli）TOP10をトランスフォームさせ、大腸菌TOP10/pRMIT、大腸菌TOP10/pRMITYおよび大腸菌TOP10/pRMITQとそれぞれ命名した。

これらのDNA断片の塩基配列を解析した結果、配列番号：１２９で表わされるDNA断片は、配列番号：１３２で表わされるラット型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド(105アミノ酸残基）をコードするDNA（配列番号：１３３）を含んでいることが、配列番号：１３０で表わされるDNA断片は、配列番号：１３４で表わされるラット型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド(105アミノ酸残基）をコードするDNA（配列番号：１３５）を含んでいることが、配列番号：１３１で表わされるDNA断片は、配列番号：１３６で表わされるラット型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド(105アミノ酸残基）をコードするDNA（配列番号：１３７）を含んでいることが明らかとなった。

また、配列番号：１３２、配列番号：１３４または配列番号：１３６で表わされる塩基配列は典型的なシグナル配列を有しており、配列番号：１３２で表わされる塩基配列を有するDNAは、配列番号：１３８で表わされるラット型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（86アミノ酸残基）をコードする258塩基対からなるDNA（配列番号：１３９）を含んでいることが、配列番号：１３４で表わされる塩基配列を有するDNAは、配列番号：１４０で表わされるラット型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（86アミノ酸残基）をコードする258塩基対からなるDNA（配列番号：１４１）を含んでいることが、配列番号：１３６で表わされる塩基配列を有するDNAは、配列番号：１４２で表わされるラット型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（86アミノ酸残基）をコードする258塩基対からなるDNA（配列番号：１４３）を含んでいることが明らかとなった。

配列番号：１３８のアミノ酸配列において、配列番号：１４０では４６番目のＨｉｓがＴｙｒに、配列番号：１４２では３６番目のＡｒｇがＧｌｎにそれぞれ置換されている。

産業上の利用可能性

本発明のペプチド、ＭＩＴ１類または本発明の蛋白質、それらに対する抗体、および本発明のペプチドまたは本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、血管新生阻害剤を得るための簡便な探索法（スクリーニング）に有用である。特に、本発明の蛋白質のアンタゴニストは、優れた血管新生阻害剤として有用である。また、本発明のスクリーニング方法は、哺乳動物由来の内皮細胞を用いて行うことにより、より生理的な条件下での血管新生阻害剤のスクリーニングが可能となる。

さらに、本発明の蛋白質、本発明のＤＮＡ、本発明のアンチセンスＤＮＡおよび本発明の抗体は、（i）本発明の蛋白質が関与する各種疾病の予防・治療剤、（ii）本発明のペプチドと本発明の蛋白質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、（iii）本発明の蛋白質の定量、（iv）遺伝子診断薬、（v）アンチセンスＤＮＡを含有する医薬、（vi）本発明の抗体を含有する医薬および診断薬、（vii）本発明のＤＮＡを有する非ヒト動物の作製、（viii）構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインなどの実施のために有用である。特に、本発明の組換え蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的な本発明の蛋白質に対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病、例えば血管新生を伴う疾患〔例、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫など）、卵巣疾患（例、多嚢胞性卵巣症候群（卵巣多嚢胞症）、卵巣過剰刺激症など）、炎症性疾患（例、関節リューマチなど）、糖尿病性網膜症など〕等の予防・治療剤などとして安全に使用することができる。

請 求 の 範 囲

1. 配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド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血管新生阻害剤。

2. 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤。

3. (a) 配列番号：２１、配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と (b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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を阻害する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤。

4. 配列番号：２１、配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩の、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性化作用を阻害する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤。

5. 配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または

実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその部分ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列に相補的もしく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アンチセンスヌクレオチドを含有してなる血管新生阻害剤。

６．　配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまた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血管新生阻害剤。

７．　配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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をコードするＤＮＡの塩基配列に相補的もしく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アンチセンスヌクレオチドを含有してなる血管新生阻害剤。

８．　配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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またはその塩に対する抗体を含有してなる血管新生阻害剤。

９．　癌、多嚢胞性卵巣症候群または卵巣過剰刺激症候群の予防・治療剤である請求項１～８記載のいずれかの血管新生阻害剤。

１０．　(a) 配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、または (b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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をコードするポリヌクレオチドを含有してなる癌、多嚢胞性卵巣症候群または卵巣過剰刺激症候群の診断薬。

１１．　内皮細胞を用いることを特徴とする、配列番号：１、配列番号：４４、

配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

１２．　請求項１１記載のスクリーニング方法で得られる化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤。

１３．　(a) 配列番号：２１、配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩、および（または）(b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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を用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法。

１４．　(a) 配列番号：２１、配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩、および（または）(b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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を含有することを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング用キット。

１５．　(a) 配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、および（または）(b) 配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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をコードするポリ

ヌクレオチドを用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法。

１６．　(a) 配列番号：２１、配列番号：８１、配列番号：８２、配列番号：１０９、配列番号：１３８、配列番号：１９もしくは配列番号：３９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、および（または）(b) 配列番号：1、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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またはその塩に対する抗体を用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法。

１７．　請求項１３、１５もしくは１６記載のスクリーニング方法または請求項１４記載のスクリーニング用キットを用いて得られる血管新生阻害剤。

１８．　内皮細胞増殖阻害作用を有する化合物またはその塩を含有してなる血管新生阻害剤。

１９．　配列番号：１７１もしくは配列番号：１３７で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩。

２０．　配列番号：１７１で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質またはその塩。

２１．　配列番号：１３７で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質またはその塩。

２２．　請求項１９記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。

２３．　請求項１９記載の蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

２４．　ＤＮＡである請求項２３記載のポリヌクレオチド。

２５．　配列番号：１７２または配列番号：１７４で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド。

２６．　請求項２４記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

２７．　請求項２６記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

２８．　請求項２７記載の形質転換体を培養し、請求項１９記載の蛋白質を生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項１９記載の蛋白質またはその塩の製造法。

２９．　請求項１９記載の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。

３０．　請求項２９記載の抗体を含有してなる医薬。

３１．　請求項２９記載の抗体を含有してなる診断薬。

３２．　請求項１９記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項１９記載の蛋白質またはその塩の活性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。

３３．　請求項１９記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、請求項１９記載の蛋白質またはその塩の活性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用キット。

３４．　請求項３２記載のスクリーニング方法または請求項３３記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項１９記載の蛋白質またはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

３５．　請求項３４記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

３６．　哺乳動物に対して、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする血管新生阻害方法。

３７．　血管新生阻害剤を製造するための、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性を阻害する化合物またはその塩の使用。

３８．　哺乳動物に対して、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは

配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする癌、多嚢胞性卵巣症候群または卵巣過剰刺激症候群の予防・治療方法。

３９．　癌、多嚢胞性卵巣症候群または卵巣過剰刺激症候群の予防・治療剤を製造するための、配列番号：１、配列番号：４４、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：１７１もしくは配列番号：１７３で表わされるアミノ酸配列と同一また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の活性を阻害する化合物またはその塩の使用。

図 1

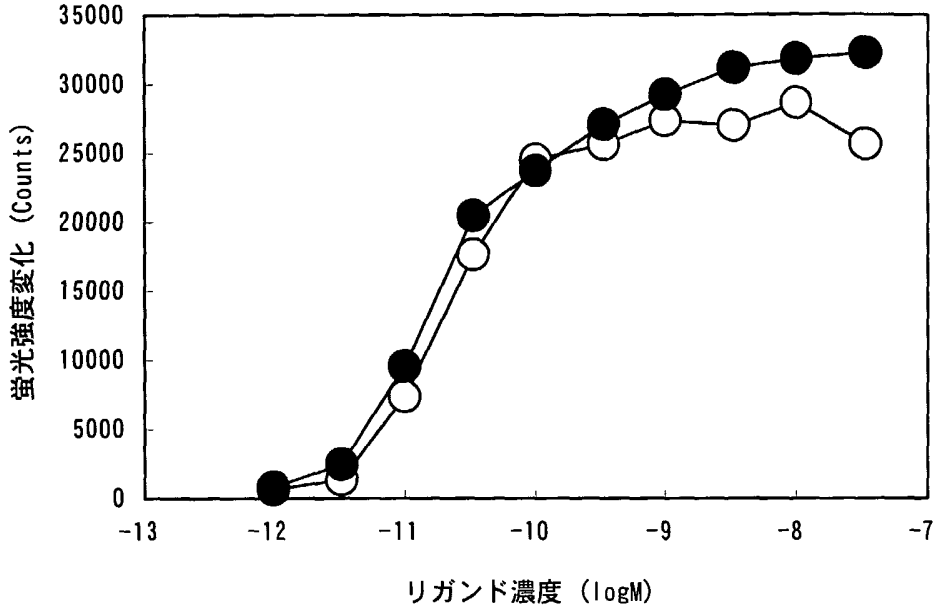

35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
蛍光強度変化（Counts）
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
リガンド濃度（logM）

図 2

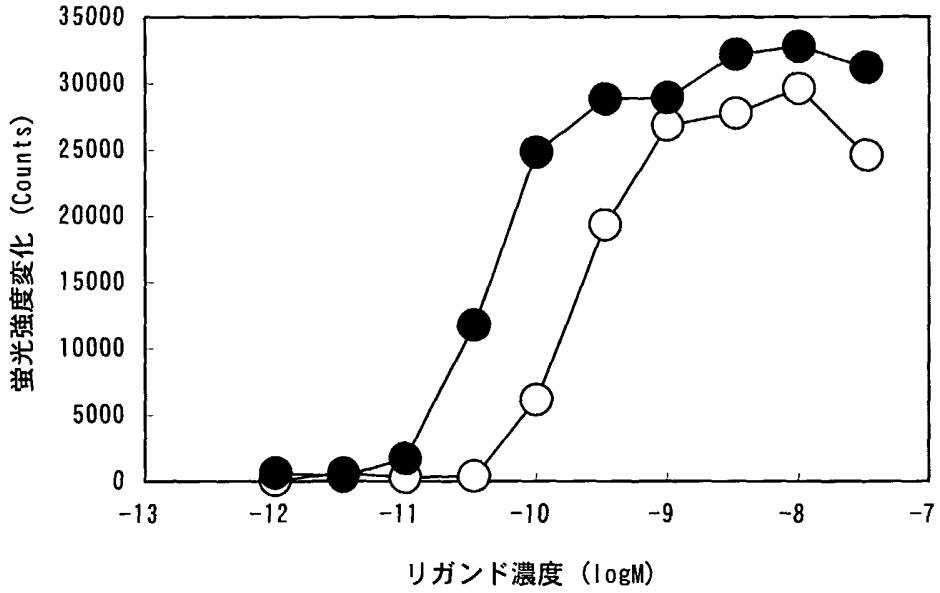

35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
蛍光強度変化（Counts）
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
リガンド濃度（logM）

図 3

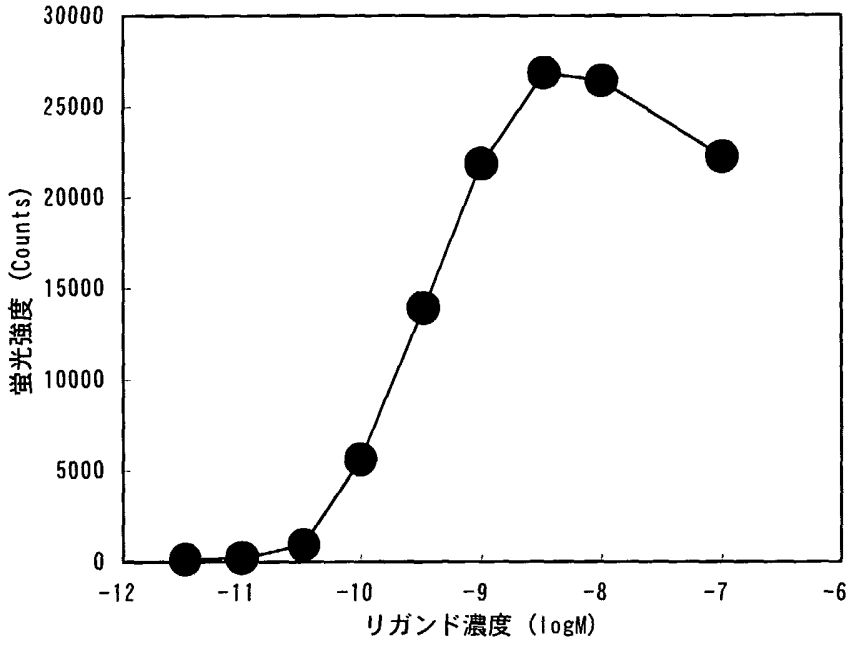

30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
蛍光強度（Counts）
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
リガンド濃度（logM）

図 4

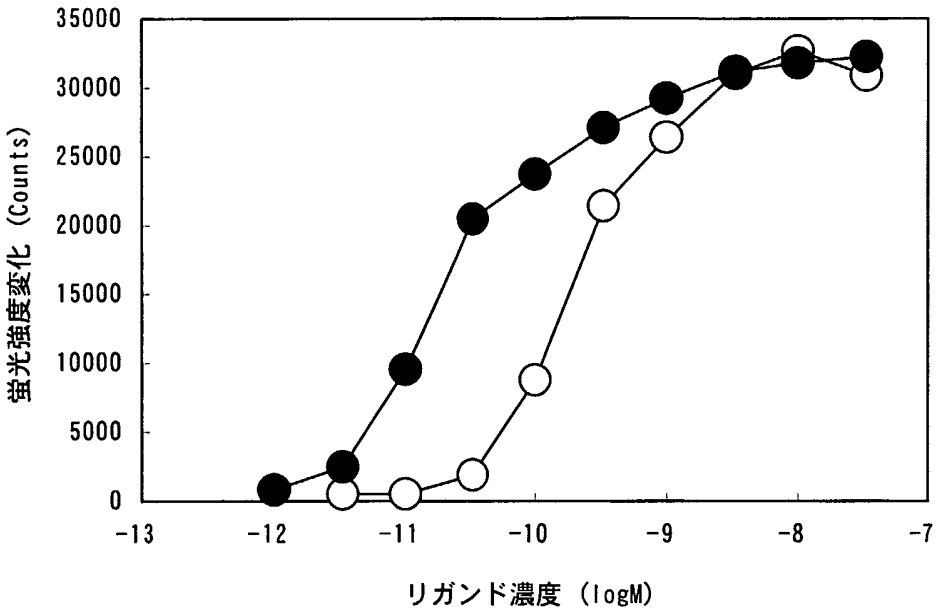

35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
蛍光強度変化（Counts）
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
リガンド濃度（logM）

図 5

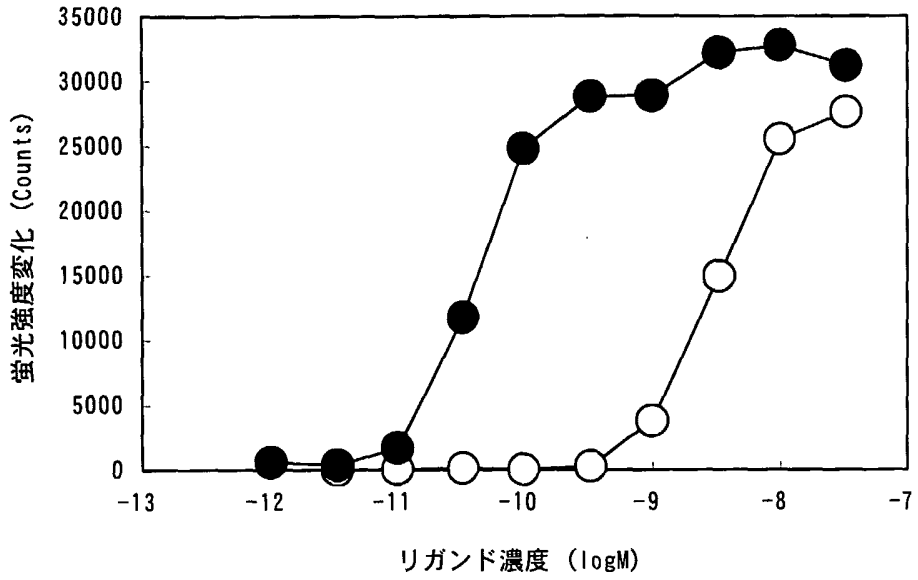

35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
蛍光強度変化（Counts）
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
リガンド濃度（logM）

図 6

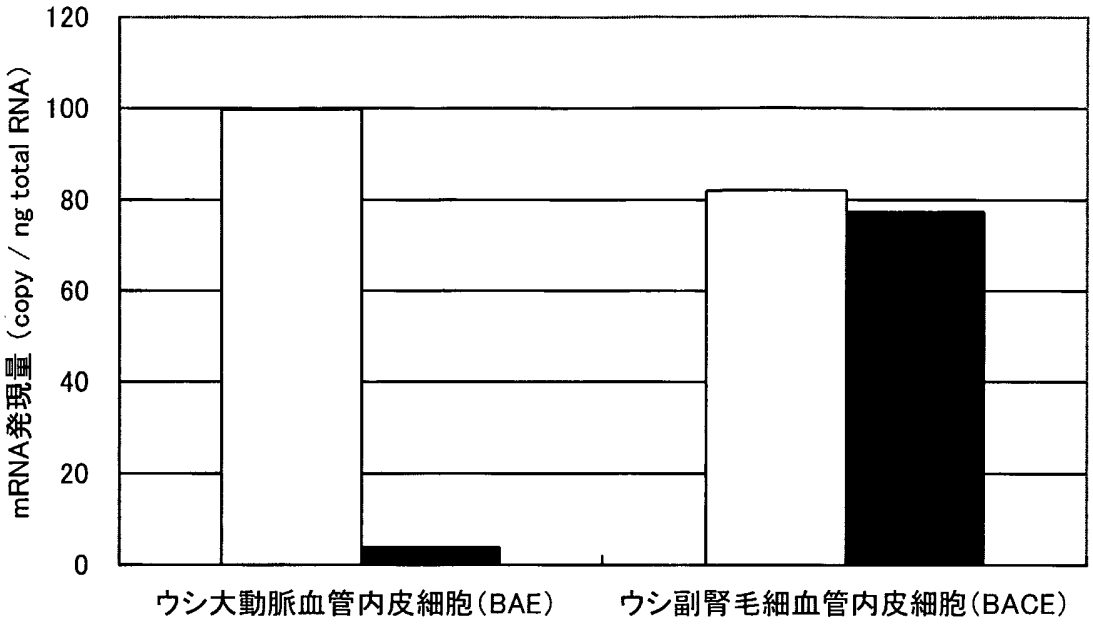

120
100
80
60
40
20
0
mRNA発現量（copy / ng total RNA）
ウシ大動脈血管内皮細胞（BAE）
ウシ副腎毛細血管内皮細胞（BACE）

図 7

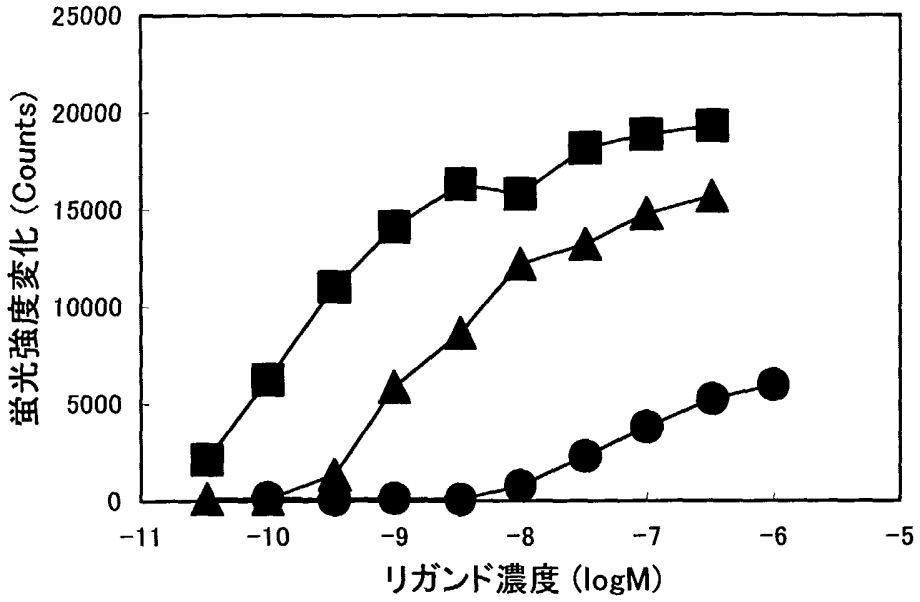

25000
20000
15000
10000
5000
0
蛍光強度変化 (Counts)
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
リガンド濃度 (logM)

図 8

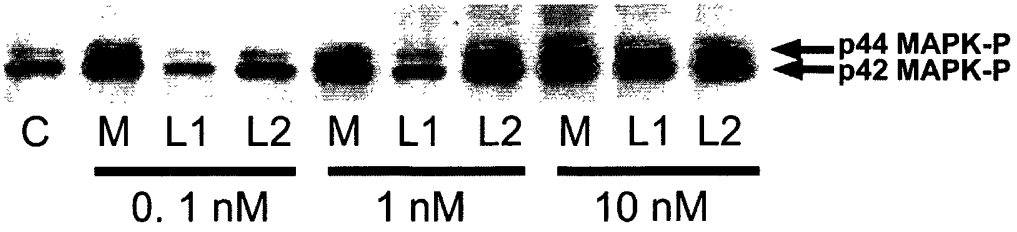


図 9

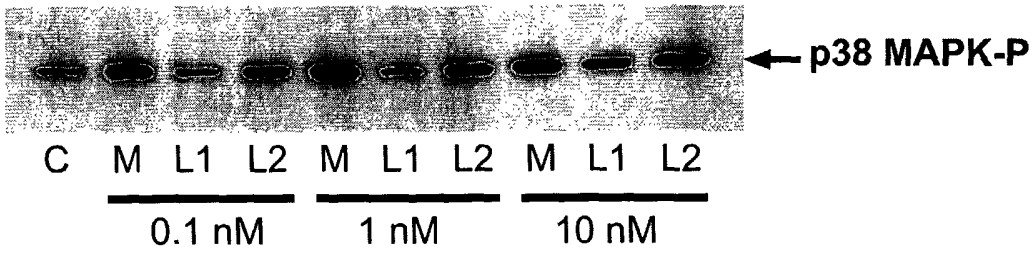


図１０

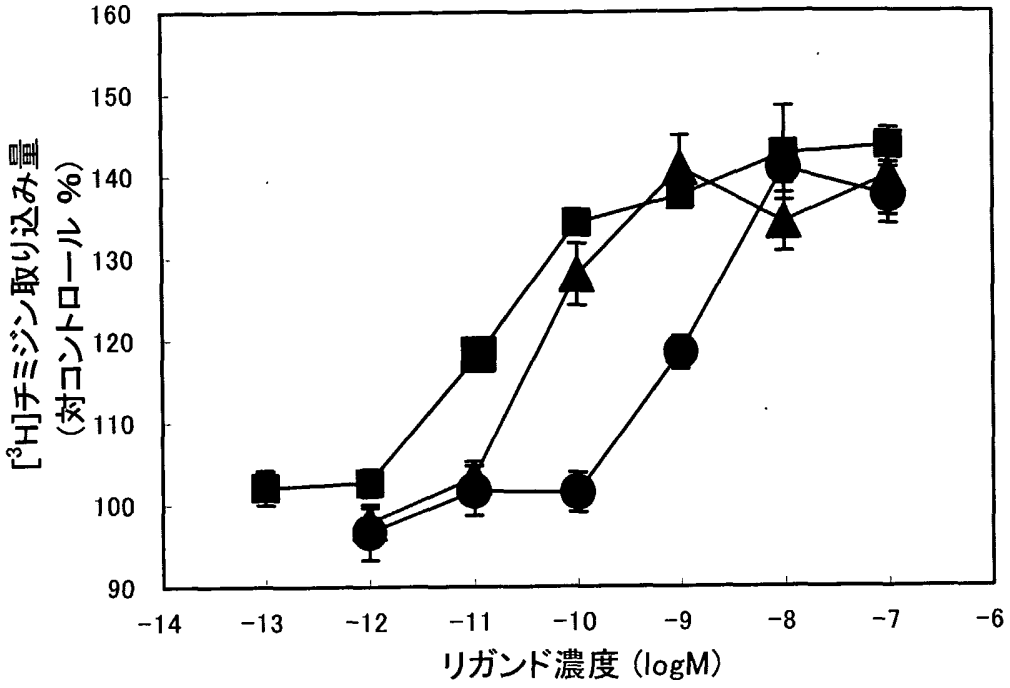
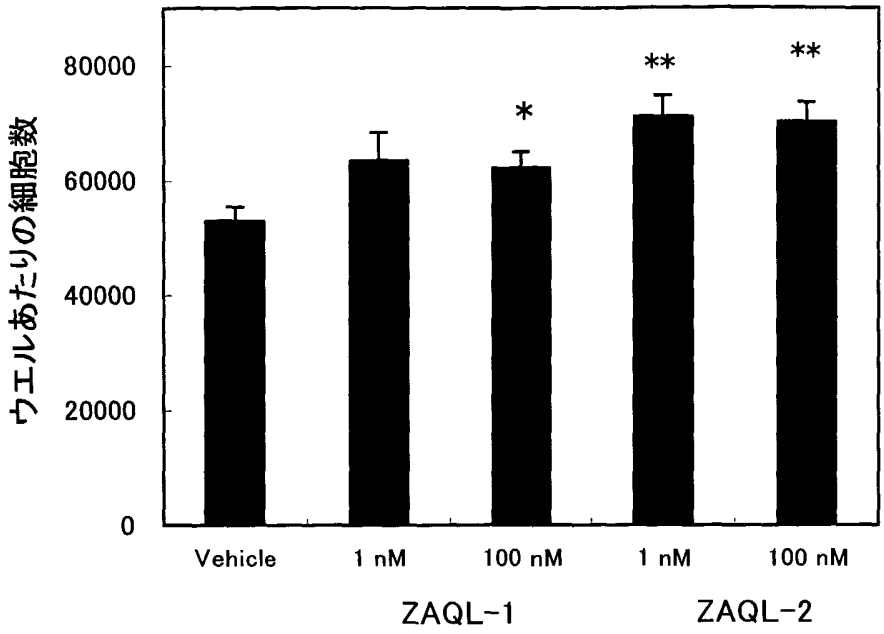

160
150
140
130
120
110
100
90
[3H]チミジン取り込み量
(対コントロール %)
−14
−13
−12
−11
−10
−9
−8
−7
−6
リガンド濃度 (logM)

図１１


ウエルあたりの細胞数
80000
60000
40000
20000
0
*
**
**
Vehicle
1 nM
100 nM
1 nM
100 nM
ZAQL-1
ZAQL-2

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Anti-angiogenesis agent

<130> 3021WOOP

<150> JP2002-27299

<151> 2002-2-4

<160> 184

<210> 1

<211> 393

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

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

130 135 140

Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
145 150 155 160

Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
165 170 175

Gln Thr Ala Thr Gly Leu Ile Ala Leu Val Trp Thr Val Ser Ile Leu
180 185 190

Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile
195 200 205

Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp
210 215 220

Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Ile Phe Gly Ile Glu
225 230 235 240

Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser
245 250 255

Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile
260 265 270

Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Val Leu Met Cys
275 280 285

Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr
290 295 300

Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr
305 310 315 320

Leu Thr Ala Phe Tyr Ile Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met
325 330 335

Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asp Thr Val Lys Tyr
340 345 350

Phe Lys Lys Ile Met Leu Leu His Trp Lys Ala Ser Tyr Asn Gly Gly
355 360 365

Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ile Gly Met Pro Ala Thr
370 375 380

Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
385 390

<210> 2

<211> 1179

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

atggagacca ccatggggtt catggatgac aatgccacca acacttccac cagcttcctt 60
tctgtgctca accctcatgg agcccatgcc acttccttcc cattcaactt cagctacagc 120
gactatgata tgcctttgga tgaagatgag gatgtgacca attccaggac gttctttgct 180
gccaagattg tcattgggat ggccctggtg ggcatcatgc tggtctgcgg cattggaaac 240
ttcatcttta tcgctgccct ggtccgctac aagaaactgc gcaacctcac caacctgctc 300
atcgccaacc tggccatctc tgacttcctg gtggccattg tctgctgccc ctttgagatg 360
gactactatg tggtgcgcca gctctcctgg gagcacggcc acgtcctgtg cacctctgtc 420
aactacctgc gcactgtctc tctctatgtc tccaccaatg ccctgctggc catcgccatt 480
gacaggtatc tggctattgt ccatccgctg agaccacgga tgaagtgcca aacagccact 540
ggcctgattg ccttggtgtg gacggtgtcc atcctgatcg ccatcccttc cgcctacttc 600
accaccgaga cggtcctcgt cattgtcaag agccaggaaa agatcttctg cggccagatc 660
tggcctgtgg accagcagct ctactacaag tcctacttcc tctttatctt tggcatagaa 720
ttcgtgggcc ccgtggtcac catgaccctg tgctatgcca ggatctcccg ggagctctgg 780
ttcaaggcgg tccctggatt ccagacagag cagatccgca agaggctgcg ctgccgcagg 840
aagacggtcc tggtgctcat gtgcatcctc accgcctacg tgctatgctg ggcgcccttc 900
tacggcttca ccatcgtgcg cgacttcttc cccaccgtgt tcgtgaagga gaagcactac 960
ctcactgcct tctacatcgt cgagtgcatc gccatgagca acagcatgat caacactctg 1020
tgcttcgtga ccgtcaagaa cgacaccgtc aagtacttca aaaagatcat gttgctccac 1080
tggaaggctt cttacaatgg cggtaagtcc agtgcagacc tggacctcaa gacaattggg 1140
atgcctgcca ccgaagaggt ggactgcatc agactaaaa 1179

<210> 3

<211> 1179

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

atggagacca ccatggggtt catggatgac aatgccacca acacttccac cagcttcctt 60

tctgtgctca accctcatgg agcccatgcc acttccttcc cattcaactt cagctacagc 120

gactatgata tgcctttgga tgaagatgag gatgtgacca attccaggac gttctttgct 180

gccaagattg tcattgggat ggccctggtg ggcatcatgc tggtctgcgg cattggaaac 240

ttcatcttta tcgctgccct ggtccgctac aagaaactgc gcaacctcac caacctgctc 300

atcgccaacc tggccatctc tgacttcctg gtggccattg tctgctgccc ctttgagatg 360

gactactatg tggtgcgcca gctctcctgg gagcacggcc acgtcctgtg cacctctgtc 420

aactacctgc gcactgtctc tctctatgtc tccaccaatg ccctgctggc catcgccatt 480

gacaggtatc tggctattgt ccatccgctg agaccacgga tgaagtgcca aacagccact 540

ggcctgattg ccttggtgtg gacggtgtcc atcctgatcg ccatcccttc cgcctacttc 600

accaccgaga cggtcctcgt cattgtcaag agccaggaaa agatcttctg cggccagatc 660

tggcctgtgg accagcagct ctactacaag tcctacttcc tctttatctt tggcatagaa 720

ttcgtgggcc ccgtggtcac catgaccctg tgctatgcca ggatctcccg ggagctctgg 780

ttcaaggcgg tccctggatt ccagacagag cagatccgca agaggctgcg ctgccgcagg 840

aagacggtcc tggtgctcat gtgcatcctc accgcctacg tgctatgctg ggcgcccttc 900

tacggcttca ccatcgtgcg cgacttcttc cccaccgtgt ttgtgaagga gaagcactac 960

ctcactgcct tctacatcgt cgagtgcatc gccatgagca acagcatgat caacactctg 1020

tgcttcgtga ccgtcaagaa cgacaccgtc aagtacttca aaaagatcat gttgctccac 1080

tggaaggctt cttacaatgg cggtaagtcc agtgcagacc tggacctcaa gacaattggg 1140

atgcctgcca ccgaagaggt ggactgcatc agactaaaa 1179

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 4

gtcgacatgg agaccaccat ggggttcatg g 31

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 5

actagtttat tttagtctga tgcagtccac ctcttc 36

<210> 6

<211> 1152

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

atggcagccc agaatggaaa caccagtttc acacccaact ttaatccacc ccaagaccat 60

gcctcctccc tctcctttaa cttcagttat ggtgattatg acctccctat ggatgaggat 120

gaggacatga ccaagacccg gaccttcttc gcagccaaga tcgtcattgg cattgcactg 180

gcaggcatca tgctggtctg cggcatcggt aactttgtct ttatcgctgc cctcacccgc 240

tataagaagt tgcgcaacct caccaatctg ctcattgcca acctggccat ctccgacttc 300

ctggtggcca tcatctgctg ccccttcgag atggactact acgtggtacg gcagctctcc 360

tgggagcatg gccacgtgct ctgtgcctcc gtcaactacc tgcgcaccgt ctccctctac 420

gtctccacca atgccttgct ggccattgcc attgacagat atctcgccat cgttcacccc 480

ttgaaaccac ggatgaatta tcaaacggcc tccttcctga tcgccttggt ctggatggtg 540

tccattctca ttgccatccc atcggcttac tttgcaacag aaaccgtcct ctttattgtc 600

aagagccagg agaagatctt ctgtggccag atctggcctg tggatcagca gctctactac 660

aagtcctact tcctcttcat ctttggtgtc gagttcgtgg gccctgtggt caccatgacc 720

ctgtgctatg ccaggatctc ccgggagctc tggttcaagg cagtccctgg gttccagacg 780

gagcagattc gcaagcggct gcgctgccgc aggaagacgg tcctggtgct catgtgcatt 840

ctcacggcct atgtgctgtg ctgggcaccc ttctacggtt tcaccatcgt tcgtgacttc 900

ttccccactg tgttcgtgaa ggaaaagcac tacctcactg ccttctacgt ggtcgagtgc 960

atcgccatga gcaacagcat gatcaacacc gtgtgcttcg tgacggtcaa gaacaacacc 1020

atgaagtact tcaagaagat gatgctgctg cactggcgtc cctcccagcg ggggagcaag 1080

tccagtgctg accttgacct cagaaccaac ggggtgccca ccacagaaga agtggactgt 1140

atcaggctga ag 1152

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 7

ctacttctgc tgctgccgct gctgtt 26

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 8

ttggaaagtt gaggaagcaa gagcattt 28

<210> 9

<211> 359

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

cacgccccgc gctggggacg ccgccgtgat caccggggct tgtgacaagg actcccaatg 60
tggtggaggc atgtgctgtg ctgtcagtat ctgggtcaag agcataagga tttgcacacc 120
tatgggcaaa ctgggagaca gctgccatcc actgactcgt aaagttccat tttttgggcg 180
gaggatgcat cacacttgcc catgtctgcc aggcttggcc tgtttacgga cttcatttaa 240
ccgatttatt tgtttagccc aaaagtaatc gctctggagt agaaaccaaa tgtgaatagc 300
cacatcttac ctgtaaagtc ttacttgtga ttgtgccaaa caaaaaatgt gccagaaag 359

<210> 10
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>
<400> 10
tgtctcccag tttgcccata ggtgtgc 27

<210> 11
<211> 184
<212> DNA
<213> Human
<400> 11
cccgagggcg ccatgaggag cctgtgctgc gccccactcc tgctcctctt gctgctgccg 60
ccgctgctgc tcacgccccg cgctggggac gccgccgtga tcaccggggc ttgtgacaag 120
gactcccaat gtggtggagg catgtgctgt gctgtcagta tctgggtcaa gagcataagg 180
attt 184

<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>

<400> 12

ccatgaggag cctgtgctgc gcc 23

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 13

ctattcacat ttggtttcta ctc 23

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 14

gtcgaccacc atgaggagcc tgtgctgcg 29

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 15

actagtcgat tacttttggg ctaaac 26

<210> 16

<211> 346

<212> DNA

<213> Human

<400> 16

gtcgaccacc atgaggagcc tgtgctgcgc cccactcctg ctcctcttgc tgctgccgcc 60

gctgctgctc acgccccgcg ctggggacgc cgccgtgatc accggggctt gtgacaagga 120

ctcccaatgt ggtggaggca tgtgctgtgc tgtcagtatc tgggtcaaga gcataaggat 180

ttgcacacct atgggcaaac tgggagacag ctgccatcca ctgactcgta aagttccatt 240

ttttgggcgg aggatgcatc acacttgccc atgtctgcca ggcttggcct gtttacggac 300

ttcatttaac cgatttattt gtttagccca aaagtaatcg actagt 346

<210> 17

<211> 108

<212> PRT

<213> Human

<400> 17

Met Arg Ser Leu Cys Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro
5 10 15

Pro Leu Leu Leu Thr Pro Arg Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly
20 25 30

Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val
35 40 45

Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Lys Leu
50 55 60

Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val Pro Phe Phe Gly Arg
65 70 75 80

Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg
85 90 95

Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln Lys
100 105

<210> 18

<211> 324

<212> DNA

<213> Human

<400> 18

atgaggagcc tgtgctgcgc cccactcctg ctcctcttgc tgctgccgcc gctgctgctc 60

acgccccgcg ctggggacgc cgccgtgatc accggggctt gtgacaagga ctcccaatgt 120

ggtggaggca tgtgctgtgc tgtcagtatc tgggtcaaga gcataaggat ttgcacacct 180

atgggcaaac tgggagacag ctgccatcca ctgactcgta aagttccatt ttttgggcgg 240

aggatgcatc acacttgccc atgtctgcca ggcttggcct gtttacggac ttcatttaac 300

cgatttattt gtttagccca aaag 324

<210> 19

<211> 81

<212> PRT

<213> Human

<400> 19

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly
5 10 15

Met Cys Cys Ala Val Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr
20 25 30

Pro Met Gly Lys Leu Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val
35 40 45

Pro Phe Phe Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly
50 55 60

Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln
65 70 75 80

Lys

<210> 20

<211> 243

<212> DNA

<213> Human

<400> 20

gccgtgatca ccggggcttg tgacaaggac tcccaatgtg gtggaggcat gtgctgtgct 60

gtcagtatct gggtcaagag cataaggatt tgcacaccta tgggcaaact gggagacagc 120

tgccatccac tgactcgtaa agttccattt tttgggcgga ggatgcatca cacttgccca 180

tgtctgccag gcttggcctg tttacggact tcatttaacc gatttatttg tttagcccaa 240

aag 243

<210> 21

<211> 80

<212> PRT

<213> Dendroaspip polylepis

<400> 21

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Leu Gln Cys Gly Lys Gly
5 10 15

Thr Cys Cys Ala Val Ser Leu Trp Ile Lys Ser Val Arg Val Cys Thr
20 25 30

Pro Val Gly Thr Ser Gly Glu Asp Cys His Pro Ala Ser His Lys Ile
35 40 45

Pro Phe Ser Gly Gln Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Ala Pro Asn
50 55 60

Leu Ala Cys Val Gln Thr Ser Pro Lys Lys Phe Lys Cys Leu Ser Lys
65 70 75 80

<210> 22

<211> 80

<212> PRT

<213> Human

<400> 22

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly
5 10 15

Met Cys Cys Ala Val Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr

20 25 30

Pro Met Gly Lys Leu Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val

35 40 45

Pro Phe Phe Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 23

gcttgygaca aggactcyca 20

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 24

gttyctacty cagagygat 19

<210> 25

<211> 210

<212> DNA

<213> Human

<400> 25

gtgtggagga ggaatgtgct gcgctgtcag tatctgggtt aagagcataa ggatctgcac 60

acctatgggc caagtgggag acagctgcca ccccctgact cggaaagttc cattttgggg 120

gcggaggatg caccacactt gtccctgcct gccaggtttg gcatgtttaa ggacttcttt 180

caaccgtttt atttgtttgg cccggaagtg 210

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 26

gtgcatcctc cgcccccaaa atggaa 26

<210> 27

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 27

gacagcgcag cacattcctc ctccacac 28

<210> 28

<211> 148

<212> DNA

<213> Human

<400> 28

cgcgtcccta accgccaccg cctcctcggg acgccatgga ggacccgcgc tgtgccccgc 60

tactgctact tttgctgcta ccgctgctgc tcacaccgcc cgccggggat gccgcggtca 120

tcaccggggc ttgcgacaag gactctca 148

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 29

gagacagctg ccacccccctg actcggaa 28

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 30

ggcggaggat gcaccacact tgtccctg 28

<210> 31

<211> 150

<212> DNA

<213> Rat

<400> 31

cctgcctgcc aggtttggca tgtttaagga cttctttcaa ccgttttatt tgtttggccc 60

ggaagtgatc actctgaagc aggagctgga aatgtgaacc tctactcact gaacaatgtc 120

tgtcaagtct cgcttgtaat tgtgtcaaag 150

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 32

taaccgccac cgcctcct 18

<210> 33

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 33

gggacgccat ggaggac 17

<210> 34

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 34

cgagacttga cagacattgt tcagtg 26

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 35

tttccagctc ctgcttcaga 20

<210> 36

<211> 356

<212> DNA

<213> Rat

<400> 36

gggacgccat ggaggacccg cgctgtgccc cgctactgct acttttgctg ctaccgctgc 60

tgctcacacc gcccgccggg gatgccgcgg tcatcaccgg ggcttgcgac aaggactctc 120

agtgtggagg aggaatgtgc tgcgctgtca gtatctgggt taagagcata aggatctgca 180

cacctatggg ccaagtggga gacagctgcc acccccctgac tcggaaagtt ccattttggg 240

ggcggaggat gcaccacact tgtccctgcc tgccaggttt ggcatgttta aggacttctt 300

tcaaccgttt tatttgtttg gcccggaagt gatcactctg aagcaggagc tggaaa 356

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Rat

<400> 37

Met Glu Asp Pro Arg Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro
5 10 15

Leu Leu Leu Thr Pro Pro Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly Ala
20 25 30

Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val Ser
35 40 45

Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Gln Val Gly
50 55 60

Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val Pro Phe Trp Gly Arg Arg
65 70 75 80

Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg Thr
85 90 95

Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Arg Lys
100 105

<210> 38

<211> 321

<212> DNA

<213> Rat

<400> 38

atggaggacc cgcgctgtgc cccgctactg ctacttttgc tgctaccgct gctgctcaca 60

ccgcccgccg gggatgccgc ggtcatcacc ggggcttgcg acaaggactc tcagtgtgga 120

ggaggaatgt gctgcgctgt cagtatctgg gttaagagca taaggatctg cacacctatg 180

ggccaagtgg gagacagctg ccacccccctg actcggaaag ttccattttg ggggcggagg 240

atgcaccaca cttgtccctg cctgccaggt ttggcatgtt taaggacttc tttcaaccgt 300

tttatttgtt tggcccggaa g 321

<210> 39

<211> 81

<212> PRT

<213> Rat or Mouse

<400> 39

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly

5 10 15

Met Cys Cys Ala Val Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr

20 25 30

Pro Met Gly Gln Val Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val

35 40 45

Pro Phe Trp Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys

<210> 40

<211> 243

<212> DNA

<213> Rat

<400> 40

gcggtcatca ccggggcttg cgacaaggac tctcagtgtg gaggaggaat gtgctgcgct 60

gtcagtatct gggttaagag cataaggatc tgcacaccta tgggccaagt gggagacagc 120

tgccaccccc tgactcggaa agttccattt tgggggcgga ggatgcacca cacttgtccc 180

tgcctgccag gtttggcatg tttaaggact tctttcaacc gttttatttg tttggcccgg 240

aag 243

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 41

gtcgacatgg agaccactgt ggggaccctg 30

<210> 42

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 42

actagtttat ttcagtcgga tgcagtccac 30

<210> 43

<211> 1179

<212> DNA

<213> Rat

<400> 43

atggagacca ctgtggggac cctgggcgag aataccacaa acactttcac cgacttcttt 60

tctgcacgtg atggcagtgg agccgaaacc tccccttgc cattcacttt cagctatggt 120

gactatgaca tgccctcgga tgaagaggag gatgtgacca actctcggac tttctttgct 180

gccaagattg tcattggcat ggctttggtg ggcatcatgc tggtgtgtgg catcggcaac 240

ttcatcttca tcactgcgct ggcccgctac aaaaagcttc gcaacctcac caacctgctt 300

atcgccaacc tggccatttc ggacttcctg gtagccatcg tgtgctgccc ctttgagatg 360

gactactatg tggtacgcca gctctcctgg gagcacggcc atgtcctgtg cgcctccgtc 420

aactacttgc gcaccgtctc cctctacgtg tccactaacg ccctactggc cattgccatt 480

gacaggtatc tggccattgt gcacccgctg agaccgcgga tgaagtgtca aacggctgca 540

ggcctgatct tcctggtgtg gtctgtgtcc atcctcatcg ccatcccagc cgcctacttc 600

accactgaga cggtgttggt catcgtggaa agccaggaga agatcttctg cggccagatc 660

tggccggtgg atcagcagtt ctactacagg tcctatttcc ttttggtctt cggcctcgag 720

ttcgtgggtc ctgtaatcgc catgaccctg tgctatgcca gggtgtcccg agagctctgg 780

ttcaaggcgg tgcccggctt ccagacagag cagatccgcc ggaggctgcg ctgtcgccga 840

cggacggtac tggggctcgt gtgcgtcctt tccgcctatg tgctgtgctg ggctcccttc 900

tatggcttca ccatcgtgcg tgacttcttc ccctccgtgt ttgtgaaaga gaagcactac 960

ctcaccgcct tttatgtggt ggagtgcatc gccatgagca acagtatgat caatacgctg 1020

tgctttgtga ctgtcaggaa taacaccagt aagtacctca agaggatcct gcggctccag 1080

tggagggcct ctcctagcgg gagcaaggcc agcgctgacc tcgacctcag gaccacgggg 1140

attcctgcca cggaggaggt ggactgcatc cgactgaaa 1179

<210> 44

<211> 393

<212> PRT

<213> Rat

<400> 44

Met Glu Thr Thr Val Gly Thr Leu Gly Glu Asn Thr Thr Asn Thr Phe
5 10 15

Thr Asp Phe Phe Ser Ala Arg Asp Gly Ser Gly Ala Glu Thr Ser Pro
20 25 30

Leu Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Met Pro Ser Asp Glu
35 40 45

Glu Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val

50 55 60

Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn
65 70 75 80

Phe Ile Phe Ile Thr Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu
85 90 95

Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
100 105 110

Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu
115 120 125

Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg
130 135 140

Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
145 150 155 160

Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
165 170 175

Gln Thr Ala Ala Gly Leu Ile Phe Leu Val Trp Ser Val Ser Ile Leu
180 185 190

Ile Ala Ile Pro Ala Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile
195 200 205

Val Glu Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp
210 215 220

Gln Gln Phe Tyr Tyr Arg Ser Tyr Phe Leu Leu Val Phe Gly Leu Glu
225 230 235 240

Phe Val Gly Pro Val Ile Ala Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Val Ser
245 250 255

Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile
260 265 270

Arg Arg Arg Leu Arg Cys Arg Arg Arg Thr Val Leu Gly Leu Val Cys
275 280 285

Val Leu Ser Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr
290 295 300
Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Ser Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr
305 310 315 320
Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met
325 330 335
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Arg Asn Asn Thr Ser Lys Tyr
340 345 350
Leu Lys Arg Ile Leu Arg Leu Gln Trp Arg Ala Ser Pro Ser Gly Ser
355 360 365
Lys Ala Ser Ala Asp Leu Asp Leu Arg Thr Thr Gly Ile Pro Ala Thr
370 375 380
Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
385 390

<210> 45
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>
<400> 45
cctcaccaay ctgctyatyg ccaacctggc c 31

<210> 46
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>
<400> 46

gtggtrcgsc agctctcctg ggagca 26

<210> 47

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 47

tcccgggagc tctggttcaa ggc 23

<210> 48

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 48

gagtgcatcg ccatgagcaa cagcatg 27

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 49

ggcttgaacc agagctcccg gga 23

<210> 50

<211> 1263

<212> DNA

<213> Rat

<400> 50

atggtatcag ttctgtccaa cagggacctc cacacactgg ccccagctga agtgctgaac 60

tccacgtggg cctatctccc tgacacatac cagcctacct gccacatcat caacatggga 120

gaccagaacg gaaacacaag ctttgcacca gacttgaacc caccccaaga ccacgtctcc 180

ttgctcccct taaactacag ttatggagat tatgacatcc ccctggatga cgatgaggat 240

gtgaccaaga cacagacctt ctttgcagcc aaaatcgtca ttggcgtagc cctggcaggc 300

atcatgctag tctgcggcgt tggcaacttt gtcttcattg ctgccctcgc ccgctacaag 360

aagctgcgca accttaccaa cctcctcatc gctaacctgg ccatctctga cttcctggtg 420

gcgatcgtct gctgcccctt tgagatggac tactacgtag tacgtcagct ttcctgggag 480

catggtcacg tgctttgtgc ctccgtcaac taccttcgta cagtctccct gtacgtctcc 540

accaatgctc tgctggccat cgctattgac agatatctcg ctattgtcca ccccttaaaa 600

cggatgaatt accagaccgc ctccttcctg atcgctttgg tctggatggt ctccatcctc 660

atcgccatcc catctgccta cttcaccaca gaaaccatcc ttgttatcgt caagaatcag 720

gaaaagctct tctgtggtca gatctggccc gtggaccagc agctctacta caaatcctac 780

ttcctcttcg tcttcgggct tgagttcgtg ggtcccgtgg tcactatgac cctgtgctat 840

gccaggatct cccaggagct ctggttcaag gctgtacctg gtttccagac ggagcagatc 900

cgcaagcgac tgcgctgccg ccgaaagaca gtgctattgc tcatgggtat cctcacagcc 960

tacgtgctgt gctgggcgcc tttctatggc tttaccatag tgcgagactt cttccccacg 1020

ctggttgtga aggagaagca ctacctcacc gccttctatg tcgtcgagtg catcgccatg 1080

agcaacagca tgatcaatac tatatgcttc gtgacggtca agaacaacac catgaaatac 1140

ttcaagaaga tgctgctgct gcactggcgg ccctctcact acgggagtaa gtccagcgcg 1200

gacctcgacc tcaaaaccag tggggttcct gccaccgaag aggtggactg tatcaggcta 1260

aag 1263

<210> 51

<211> 421

<212> PRT

<213> Rat

<400> 51

Met Val Ser Val Leu Ser Asn Arg Asp Leu His Thr Leu Ala Pro Ala

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

Glu Lys Leu Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp Gln Gln Leu Tyr
245 250 255

Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Val Phe Gly Leu Glu Phe Val Gly Pro
260 265 270

Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser Gln Glu Leu Trp
275 280 285

Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu
290 295 300

Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Leu Leu Met Gly Ile Leu Thr Ala
305 310 315 320

Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp
325 330 335

Phe Phe Pro Thr Leu Val Val Lys Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe
340 345 350

Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Ile
355 360 365

Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asn Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met
370 375 380

Leu Leu Leu His Trp Arg Pro Ser His Tyr Gly Ser Lys Ser Ser Ala
385 390 395 400

Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ser Gly Val Pro Ala Thr Glu Glu Val Asp
405 410 415

Cys Ile Arg Leu Lys
420

<210> 52

<211> 384

<212> PRT

<213> Human

<400> 52

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

225 230 235 240

Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro

245 250 255

Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys

260 265 270

Thr Val Leu Val Leu Met Cys Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp

275 280 285

Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val

290 295 300

Phe Val Lys Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys

305 310 315 320

Ile Ala Met Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Val Cys Phe Val Thr Val

325 330 335

Lys Asn Asn Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met Met Leu Leu His Trp

340 345 350

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

355 360 365

Thr Asn Gly Val Pro Thr Thr Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys

370 375 380 384

<210> 53

<211> 393

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 53

Met Glu Thr Thr Val Gly Ala Leu Gly Glu Asn Thr Thr Asp Thr Phe

5 10 15

Thr Asp Phe Phe Ser Ala Leu Asp Gly His Glu Ala Gln Thr Gly Ser

20 25 30

Leu Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Met Pro Leu Asp Glu

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

Arg Arg Thr Val Arg Cys Arg Arg Arg Thr Val Leu Gly Leu Val Cys
275 280 285
Val Leu Ser Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr
290 295 300
Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Ser Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr
305 310 315 320
Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met
325 330 335
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Arg Asn Asn Thr Ser Lys Tyr
340 345 350
Leu Lys Arg Ile Leu Arg Leu Gln Trp Arg Ala Ser Pro Ser Gly Ser
355 360 365
Lys Ala Ser Ala Asp Leu Asp Leu Arg Thr Thr Gly Ile Pro Ala Thr
370 375 380
Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
385 390 393

<210> 54
<211> 381
<212> PRT
<213> Mouse
<400> 54

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

Gly Ile Gly Asn Phe Val Phe Ile Ala Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys
65 70 75 80

Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp
85 90 95

Phe Leu Val Ala Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val
100 105 110

Val Arg Gln Leu Ser Trp Ala His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val
115 120 125

Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu
130 135 140

Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Lys Pro
145 150 155 160

Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser Phe Leu Ile Ala Leu Val Trp Met
165 170 175

Val Ser Ile Leu Ile Ala Val Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr
180 185 190

Ile Leu Val Ile Val Lys Asn Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile
195 200 205

Trp Ser Val Asp Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Val
210 215 220

Phe Gly Leu Glu Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr
225 230 235 240

Ala Arg Ile Ser Gln Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln
245 250 255

Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu
260 265 270

Leu Leu Met Gly Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe
275 280 285

Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Val Val Lys

290 295 300

Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met

305 310 315 320

Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Ile Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asn

325 330 335

Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met Leu Arg Leu His Trp Arg Pro Ser

340 345 350

His Tyr Gly Ser Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ser Gly

355 360 365

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

370 375 380

<210> 55

<211> 107

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 55

Met Gly Asp Pro Arg Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro

5 10 15

Leu Leu Phe Thr Pro Pro Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly Ala

20 25 30

Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val Ser

35 40 45

Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Gln Val Gly

50 55 60

Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val Pro Phe Trp Gly Arg Arg

65 70 75 80

Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg Thr

85 90 95

Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Arg Lys

100 105

<210> 56

<211> 321

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 56

atgggggacc cgcgctgtgc cccgctactg ctacttctgc tgctaccgct gctgttcaca 60

ccgcccgccg gggatgccgc ggtcatcacc ggggcttgcg acaaggactc tcagtgcgga 120

ggaggcatgt gctgtgctgt cagtatctgg gttaagagca taaggatctg cacacctatg 180

ggccaagtgg gcgacagctg ccacccccctg actcggaaag ttccattttg ggggcggagg 240

atgcaccaca cctgcccctg cctgccaggc ttggcgtgtt taaggacttc tttcaaccgg 300

tttatttgct tggcccggaa a 321

<210> 57

<211> 243

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 57

gcggtcatca ccggggcttg cgacaaggac tctcagtgcg gaggaggcat gtgctgtgct 60

gtcagtatct gggttaagag cataaggatc tgcacaccta tgggccaagt gggcgacagc 120

tgccaccccc tgactcggaa agttccattt tgggggcgga ggatgcacca cacctgcccc 180

tgcctgccag gcttggcgtg tttaaggact tctttcaacc ggtttatttg cttggcccgg 240

aaa 243

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 58

tcatgttgct ccactggaag g 21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 59

ccaattgtct tgaggtccag g 21

<210> 60

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 60

ttcttacaat ggcggtaagt ccagtgcag 29

<210> 61

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 61

gtcgacatgg agaccaccat ggggttcatg g 31

<210> 62

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 62

actagtttat tttagtctga tgcagtccac ctcttc 36

<210> 63

<211> 1179

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 63

atggagacca ctgtcggggc tctgggtgag aataccacag acaccttcac cgacttcttt 60
tctgcactcg atggccatga agcccaaacc ggctcgttac cattcacttt cagctacggt 120
gactatgaca tgcccctgga tgaagaggaa gatgtgacca attctcggac tttctttgct 180
gccaagattg tcattggcat ggctttggtg ggtatcatgc tagtgtgtgg catcggcaac 240
ttcatcttta tcactgccct ggcccgctac aaaaagctcc gcaacctcac caacctgctt 300
atcgccaacc tggccatttc agacttcctc gtggccatcg tgtgctgccc ctttgagatg 360
gactactatg tggtgcgcca gctctcctgg gagcatggtc atgtcctgtg cgcctctgtc 420
aactacttgc gtaccgtctc cctctacgtc tccactaacg ccctactggc cattgccatt 480
gacaggtatc tggccattgt gcacccgctg agaccgcgga tgaagtgtca aacagccgcc 540
ggcctgatct tcctggtgtg gtcagtatcc atcctcatcg ccattccagc tgcctacttc 600
accactgaga ccgtgctggt catcgtggag agacaggaga agatcttctg tggtcagatc 660
tggccggtgg atcagcagtt ctactacagg tcctatttcc ttttggtttt cggcctcgag 720
ttcgtgggcc ccgtagtcgc catgacctig tgctatgcca gggtgtcccg ggagctctgg 780
ttcaaggcgg tgccaggctt ccagacagag cagatccgcc ggacggtgcg ctgccgccgc 840
aggacggtgc tggggctcgt gtgcgtcctc tctgcctatg tgctgtgctg ggctcccttc 900
tatggcttca ctatcgtgcg tgacttcttc ccctccgtgt ttgtgaagga gaagcactac 960
ctcaccgcct tctatgtggt ggagtgcatc gccatgagca acagcatgat caatacgctc 1020
tgctttgtga ctgtcaggaa taacaccagt aagtacctca agaggatcct gcggcttcag 1080
tggagggcct ctcccagcgg gagcaaggcc agcgctgacc tcgacctcag gaccacggga 1140
atacctgcca ccgaggaggt ggactgcatc cgactgaaa 1179

<210> 64

<211> 1143

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 64

atgggacccc agaacagaaa cactagcttt gcaccagact tgaatccacc ccaagaccat 60

gtctccttaa actacagtta tggtgattat gacctccccc tgggtgagga tgaggatgtg 120

accaagacac agaccttctt tgcagccaaa attgtcattg gcgtggcact ggcaggcatc 180

atgctggtct gcggcattgg caactttgtc ttcattgctg ccctcgcccg ctacaagaag 240

ctgcgcaacc ttaccaacct cctcattgct aacctggcca tctctgactt cctggtggcg 300

atcgtctgct gccccttga gatggactat tatgtagtac ggcagctttc ctgggcgcat 360

ggtcacgtgc tttgtgcctc cgtcaactac cttcgtacgg tctccctgta cgtctccacc 420

aacgctctgc tggccatcgc tattgacaga tacctcgcta ttgtccaccc tttgaaacca 480

cggatgaatt atcagaccgc ttccttcctg atcgctttgg tctggatggt ctccatcctc 540

atcgctgtcc catctgccta cttcaccaca gaaaccatcc tcgttatcgt caagaatcaa 600

gaaaaaatct tctgtggtca gatctggtcg gtggaccagc agctctacta caaatcctac 660

ttcctcttcg tcttcgggct tgagttcgtg ggtcccgtgg tcactatgac cctgtgctat 720

gccaggatct cccaagagct ctggttcaag gctgtacctg gcttccagac ggagcaaatc 780

cgcaagcggc tgcgttgccg ccgcaagaca gtgctactgc tcatgggcat cctcacagcc 840

tacgtgctgt gctgggcgcc gttctatggc tttaccatag tgcgagactt cttccccacg 900

gtagttgtga aggagaagca ctacctcacc gccttctacg tcgtggagtg cattgccatg 960

agcaacagca tgatcaatac tatatgcttc gtgacggtca agaacaacac catgaaatac 1020

ttcaagaaga tgctgcggct ccactggcgg ccctctcact acgggagtaa gtccagcgct 1080

gacctcgacc tcaaaaccag cggggtgcct gccactgaag aggtggattg tatcagacta 1140

aag 1143

<210> 65

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 65

tatggcggtg attaccggtg cgtgcgataa agatagccag tgcggtggcg gtatgtgctg 60

tgcggtgagc atttgggtga aa 82

<210> 66

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 66

agcattcgta tttgcacccc gatgggcaaa ctgggcgata gctgccatcc gctgacccgt 60

aaagtgccgt tttttggccg cc 82

<210> 67

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 67

gtatgcatca tacctgcccg tgcctgccgg gcctggcgtg cctgcgcacc agctttaacc 60

gctttatttg cctggcgcag aaatagg 87

<210> 68

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 68

cgaatgcttt tcacccaaat gctcaccgca cagcacatac cgccaccgca ctggctatct 60

ttatcgcacg caccggtaat caccgcca 88

<210> 69

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 69

atgatgcata cggcggccaa aaaacggcac tttacgggtc agcggatggc agctatcgcc 60

cagtttgccc atcggggtgc aaata 85

<210> 70

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 70

gatccctatt tctgcgccag gcaaataaag cggttaaagc tggtgcgcag gcacgccagg 60

cccggcaggc acgggcaggt 80

<210> 71

<211> 243

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 71

gcggtgatta ccggtgcgtg cgataaagat agccagtgcg gtggcggtat gtgctgtgcg 60

gtgagcattt gggtgaaaag cattcgtatt tgcaccccga tgggcaaact gggcgatagc 120

tgccatccgc tgacccgtaa agtgccgttt tttggccgcc gtatgcatca tacctgcccg 180

tgcctgccgg gcctggcgtg cctgcgcacc agctttaacc gctttatttg cctggcgcag 240

aaa 243

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 72

Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp Val Gln Xaa Arg Ala Gly

5 10 15

<210> 73

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 73

ggtgccacgc gagtctcaat catgctcc 28

<210> 74

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 74

ggggcctgtg agcgggatgt ccagtgtg 28

<210> 75

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 75

cttcttcagg aaacgcaagc accacacc 28

<210> 76

<211> 409

<212> DNA

<213> Human

<400> 76

cttcttcagg aaacgcaagc accacacctg tccttgcttg cccaacctgc tgtgctccag 60

gttcccggac ggcaggtacc gctgctccat ggacttgaag aacatcaatt tttaggcgct 120

tgcctggtct caggataccc accatccttt tcctgagcac agcctggatt tttatttctg 180

ccatgaaacc cagctcccat gactctccca gtccctacac tgactaccct gatctctctt 240

gtctagtacg cacatatgca cacaggcaga catacctccc atcatgacat ggtccccagg 300

ctggcctgag gatgtcacag cttgaggctg tggtgtgaaa ggtggccagc ctggttctct 360

tccctgctca ggctgccaga gaggtggtaa atggcagaaa ggacattcc 409

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 77

ccaccatgag aggtgccacg 20

<210> 78

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 78

ctcgagctca ggaaaaggat ggtg 24

<210> 79

<211> 371

<212> DNA

<213> Human

<400> 79

ccaccatgag aggtgccacg cgagtctcaa tcatgctcct cctagtaact gtgtctgact 60

gtgctgtgat cacaggggcc tgtgagcggg atgtccagtg tggggcaggc acctgctgtg 120

ccatcagcct gtggcttcga gggctgcgga tgtgcacccc gctggggcgg gaaggcgagg 180

agtgccaccc cggcagccac aagatcccct tcttcaggaa acgcaagcac cacacctgtc 240

cttgcttgcc caacctgctg tgctccaggt tcccggacgg caggtaccgc tgctccatgg 300

acttgaagaa catcaatttt taggcgcttg cctggtctca ggatacccac catcctttc 360

ctgagctcga g 371

<210> 80

<211> 371

<212> DNA

<213> Human

<400> 80

ccaccatgag aggtgccacg cgagtctcaa tcatgctcct cctagtaact gtgtctgact 60

gtgctgtgat cacaggggcc tgtgagcggg atgtccagtg tggggcaggc acctgctgtg 120

ccatcagcct gtggcttcga gggctgcgga tgtgcacccc gctggggcgg gaaggcgagg 180

agtgccaccc cggcagccac aaggtcccct tcttcaggaa acgcaagcac cacacctgtc 240

cttgcttgcc caacctgctg tgctccaggt tcccggacgg caggtaccgc tgctccatgg 300

acttgaagaa catcaatttt taggcgcttg cctggtctca ggatacccac catcctttc 360

ctgagctcga g 371

<210> 81

<211> 86

<212> PRT

<213> Human

<400> 81

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly
5 10 15

Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr
20 25 30

Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Ile
35 40 45

Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn
50 55 60

Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp
65 70 75 80

Leu Lys Asn Ile Asn Phe
85

<210> 82

<211> 86

<212> PRT

<213> Human

<400> 82

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly
5 10 15

Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr
20 25 30

Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Val
35 40 45

Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn

50 55 60

Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp

65 70 75 80

Leu Lys Asn Ile Asn Phe

85

<210> 83

<211> 105

<212> PRT

<213> Human

<400> 83

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

5 10 15

Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys

20 25 30

Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg

35 40 45

Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser

50 55 60

His Lys Ile Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys

65 70 75 80

Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys

85 90 95

Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe

100 105

<210> 84

<211> 105

<212> PRT

<213> Human

<400> 84

Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Val Thr Val
5 10 15

Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys
20 25 30

Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg
35 40 45

Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser
50 55 60

His Lys Val Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys
65 70 75 80

Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys
85 90 95

Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe
100 105

<210> 85

<211> 678

<212> DNA

<213> Human

<400> 85

aaggctgagc gggaggaagc gagaggcatc taagcaggca gtgttttgcc ttcaccccaa 60
gtgaccatga gaggtgccac gcgagtctca atcatgctcc tcctagtaac tgtgtctgac 120
tgtgctgtga tcacaggggc ctgtgagcgg gatgtccagt gtggggcagg cacctgctgt 180
gccatcagcc tgtggcttcg agggctgcgg atgtgcaccc cgctggggcg ggaaggcgag 240
gagtgccacc ccggcagcca caagatcccc ttcttcagga aacgcaagca ccacacctgt 300
ccttgcttgc ccaacctgct gtgctccagg ttcccggacg gcaggtaccg ctgctccatg 360
gacttgaaga acatcaattt ttaggcgctt gcctggtctc aggataccca ccatcctttt 420
cctgagcaca gcctggattt ttatttctgc catgaaaccc agctcccatg actctcccag 480
tccctacact gactaccctg atctctcttg tctagtacgc acatatgcac acaggcagac 540
atacctccca tcatgacatg gtccccaggc tggcctgagg atgtcacagc ttgaggctgt 600

ggtgtgaaag gtggccagcc tggttctctt ccctgctcag gctgccagag aggtggtaaa 660
tggcagaaag gacattcc 678

<210> 86
<211> 678
<212> DNA
<213> Human
<400> 86

aaggctgagc gggaggaagc gagaggcatc taagcaggca gtgttttgcc ttcaccccaa 60
gtgaccatga gaggtgccac gcgagtctca atcatgctcc tcctagtaac tgtgtctgac 120
tgtgctgtga tcacaggggc ctgtgagcgg gatgtccagt gtggggcagg cacctgctgt 180
gccatcagcc tgtggcttcg agggctgcgg atgtgcaccc cgctggggcg ggaaggcgag 240
gagtgccacc ccggcagcca caaggtcccc ttcttcagga aacgcaagca ccacacctgt 300
ccttgcttgc ccaacctgct gtgctccagg ttcccggacg gcaggtaccg ctgctccatg 360
gacttgaaga acatcaattt ttaggcgctt gcctggtctc aggataccca ccatcctttt 420
cctgagcaca gcctggattt ttatttctgc catgaaaccc agctcccatg actctcccag 480
tccctacact gactaccctg atctctcttg tctagtacgc acatatgcac acaggcagac 540
atacctccca tcatgacatg gtccccaggc tggcctgagg atgtcacagc ttgaggctgt 600
ggtgtgaaag gtggccagcc tggttctctt ccctgctcag gctgccagag aggtggtaaa 660
tggcagaaag gacattcc 678

<210> 87
<211> 258
<212> DNA
<213> Human
<400> 87

gctgtgatca caggggcctg tgagcgggat gtccagtgtg gggcaggcac ctgctgtgcc 60
atcagcctgt ggcttcgagg gctgcggatg tgcaccccgc tggggcggga aggcgaggag 120
tgccaccccg gcagccacaa gatcccctic ttcaggaaac gcaagcacca cacctgtcct 180
tgcttgccca acctgctgtg ctccaggttc ccggacggca ggtaccgctg ctccatggac 240
ttgaagaaca tcaatttt 258

<210> 88

<211> 258

<212> DNA

<213> Human

<400> 88

gctgtgatca caggggcctg tgagcgggat gtccagtgtg gggcaggcac ctgctgtgcc 60

atcagcctgt ggcttcgagg gctgcggatg tgcaccccgc tggggcggga aggcgaggag 120

tgccaccccg gcagccacaa ggtcccctte ttcaggaaac gcaagcacca cacctgtcct 180

tgcttgccca acctgctgtg ctccaggttc ccggacggca ggtaccgctg ctccatggac 240

ttgaagaaca tcaatttt 258

<210> 89

<211> 315

<212> DNA

<213> Human

<400> 89

atgagaggtg ccacgcgagt ctcaatcatg ctcctcctag taactgtgtc tgactgtgct 60

gtgatcacag gggcctgtga gcgggatgtc cagtgtgggg caggcacctg ctgtgccatc 120

agcctgtggc ttcgagggct gcggatgtgc accccgctgg ggcgggaagg cgaggagtgc 180

caccccggca gccacaagat ccccttcttc aggaaacgca agcaccacac ctgtccttgc 240

ttgcccaacc tgctgtgctc caggttcccg gacggcaggt accgctgctc catggacttg 300

aagaacatca atttt 315

<210> 90

<211> 315

<212> DNA

<213> Human

<400> 90

atgagaggtg ccacgcgagt ctcaatcatg ctcctcctag taactgtgtc tgactgtgct 60

gtgatcacag gggcctgtga gcgggatgtc cagtgtgggg caggcacctg ctgtgccatc 120

agcctgtggc ttcgagggct gcggatgtgc accccgctgg ggcgggaagg cgaggagtgc 180

cacccggca gccacaaggt ccccttcttc aggaaacgca agcaccacac ctgtccttgc 240

ttgcccaacc tgctgtgctc caggttcccg gacggcaggt accgctgctc catggacttg 300

aagaacatca atttt 315

<210> 91

<211> 382

<212> DNA

<213> Human

<400> 91

gaattcgccc ttccaccatg agaggtgcca cgcgagtctc aatcatgctc ctcctagtaa 60

ctgtgtctga ctgtgctgtg atcacagggg cctgtgagcg ggatgtccag tgtggggcag 120

gcacctgctg tgccatcagc ctgtggcttc gagggctgcg gatgtgcacc ccgctggggc 180

gggaaggcga ggagtgccac cccggcagcc acaaggtccc cttcttcagg aaacgcaagc 240

accacacctg tccttgcttg cccaacctgc tgtgctccag gttcccggac ggcaggtacc 300

gctgctccat ggacttgaag aacatcaatt tttaggcgct tgcctggtct caggataccc 360

accatccttt cctgagctcg ag 382

<210> 92

<211> 10

<212> PRT

<213> Human

<400> 92

Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp

5 10

<210> 93

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 93

gtcgaccacc atgagaggtg ccacgc 26

<210> 94

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 94

actagtcgca gaactggtag gtatgg 26

<210> 95

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 95

tatggcggtg attaccggtg cgtgcgaacg tgatgtgcag tgcggtgcgg gtacctgctg 60

cgcgattagc ctgtggctgc gtggtctg 88

<210> 96

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 96

cgtatgtgca ccccgctggg tcgtgaaggt gaagaatgcc atccgggtag ccataaagtg 60

ccgttcttcc gtaaacgtaa acatcatacc tg 92

<210> 97

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 97

cccgtgcctg ccgaacctgc tgtgcagccg tttcccggat ggtcgttatc gttgcagcat 60

ggatctgaaa aacattaact tttagg 86

<210> 98

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 98

cacatacgca gaccacgcag ccacaggcta atcgcgcagc aggtacccgc accgcactgc 60

acatcacgtt cgcacgcacc ggtaatcacc gcca 94

<210> 99

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 99

aggcacgggc aggtatgatg tttacgttta cggaagaacg gcactttatg gctacccgga 60

tggcattctt caccttcacg acccagcggg gtg 93

<210> 100

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 100

gatccctaaa agttaatgtt tttcagatcc atgctgcaac gataacgacc atccgggaaa 60

cggctgcaca gcaggttcgg c 81

<210> 101

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 101

gcggtgatta ccggtgcgtg cgaacgtgat gtgcagtgcg gtgcgggtac ctgctgcgcg 60

attagcctgt ggctgcgtgg tctgcgtatg tgcaccccgc tgggtcgtga aggtgaagaa 120

tgccatccgg gtagccataa agtgccgttc ttccgtaaac gtaaacatca tacctgcccg 180

tgcctgccga acctgctgtg cagccgtttc ccggatggtc gttatcgttg cagcatggat 240

ctgaaaaaca ttaacttt 258

<210> 102

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 102

cttggccttc tcggcttgtc tag 23

<210> 103

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 103

ggtgtaaagc aagaggtcac ccagt 25

<210> 104

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 104

acaaggcagc gcagaaggaa gt 22

<210> 105

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 105

ggctccagta cagagtccag acaa 24

<210> 106

<211> 410

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 106

acaaggcagc gcagaaggaa gtgaggggta ccaaagtaga ctgtgtttgt cgtcacctca 60

agtgatcatg agaggcgctg tgcatatctt catcatgctc cttctagcaa cggcgtccga 120

ctgtgcggtc atcacagggg cctgtgaacg agatatccag tgtggggccg gcacctgctg 180

cgctatcagt ctgtggctgc ggggcctgcg gttgtgtacc ccactggggc gtgaaggaga 240

ggagtgccac ccaggaagcc acaagatccc cttcttgagg aaacgccaac accatacctg 300

tccctgctca cccagcctgc tgtgctccag gttcccggac ggcaggtacc gctgcttccg 360

ggacttgaag aatgccaact tttagtttgt ctggactctg tactggagcc 410

<210> 107

<211> 105

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 107

Met Arg Gly Ala Val His Ile Phe Ile Met Leu Leu Leu Ala Thr Ala
1 5 10 15

Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Ile Gln Cys
20 25 30

Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg
35 40 45

Leu Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser
50 55 60

His Lys Ile Pro Phe Leu Arg Lys Arg Gln His His Thr Cys Pro Cys
65 70 75 80

Ser Pro Ser Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys
85 90 95

Phe Arg Asp Leu Lys Asn Ala Asn Phe
100 105

<210> 108

<211> 315

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 108

atgagaggcg ctgtgcatat cttcatcatg ctccttctag caacggcgtc cgactgtgcg 60

gtcatcacag gggcctgtga acgagatatc cagtgtgggg ccggcacctg ctgcgctatc 120

agtctgtggc tgcggggcct gcggttgtgt accccactgg ggcgtgaagg agaggagtgc 180
cacccaggaa gccacaagat ccccttcttg aggaaacgcc aacaccatac ctgtccctgc 240
tcacccagcc tgctgtgctc caggttcccg gacggcaggt accgctgctt ccgggacttg 300
aagaatgcca actt 315

<210> 109
<211> 86
<212> PRT
<213> Mouse
<400> 109

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

<210> 110
<211> 258
<212> DNA
<213> Mouse
<400> 110

gcggtcatca caggggcctg tgaacgagat atccagtgtg gggccggcac ctgctgcgct 60
atcagtctgt ggctgcgggg cctgcggttg tgtaccccac tggggcgtga aggagaggag 120
tgccacccag gaagccacaa gatcccctc ttgaggaaac gccaacacca tacctgtccc 180

tgctcaccca gcctgctgtg ctccaggttc ccggacggca ggtaccgctg cttccgggac 240
ttgaagaatg ccaacttt 258

<210> 111
<211> 364
<212> DNA
<213> Mouse
<400> 111
gaggggtacc aaagtagact gtgtttgtcg tcacctcaag tgatcatgag aggcgctgtg 60
catatcttca tcatgctcct tctagcaacg gcgtccgact gtgcggtcat cacaggggcc 120
tgtgaacgag atatccagtg tggggccggc acctgctgcg ctatcagtct gtggctgcgg 180
ggcctgcggt tgtgtacccc actggggcgt gaaggagagg agtgccaccc aggaagccac 240
aagatcccct tcttgaggaa acgccaacac catacctgtc cctgctcacc cagcctgctg 300
tgctccaggt tcccggacgg caggtaccgc tgcttccggg acttgaagaa tgccaacttt 360
tagt 364

<210> 112
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>
<400> 112
tcaccycaag tgaycatgag agg 23

<210> 113
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>
<400> 113

ctaaaarttg ryrttcttca agtcc 25

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 114

atcacagggg cctgtgarcg 20

<210> 115

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 115

agcagcggta cctgccgtcc 20

<210> 116

<211> 186

<212> DNA

<213> Rat

<400> 116

agatgtccag tgtggggctg gcacctgctg tgctatcagc ctgtggctgc ggggcctgag 60

gctgtgtacc cctctggggc gggaaggaga ggagtgccac cctggaagcc acaagatccc 120

tttctttagg aaacgccaac accatacctg tccctgttca cccagcctgc tgtgctccag 180

gttccc 186

<210> 117

<211> 186

<212> DNA

<213> Rat

<400> 117

agatgtccag tgtggggctg gcacctgctg tgctatcagc ctgtggctgc ggggcctgag 60

gctgtgcacc cctctggggc gggaaggaga ggagtgccac cctggaagcc acaagatccc 120

tttctttagg aaacgccaac accatacctg tccctgttca cccagcctgc tgtgctccag 180

gttccc 186

<210> 118

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 118

gtggcactcc tctccttccc gccccaga 28

<210> 119

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 119

caggccccgc agccacaggc tgatagca 28

<210> 120

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 120

agcaggtgcc agccccacac tggacatc 28

<210> 121

<211> 244

<212> DNA

<213> Rat

<400> 121

agagagatga ggcatttaga ggcagccctg gatccgacta tataaatctg aaggaggtaa 60

ggtaggacag cttggccttc ttagcttgtc tagtgcaagg cagtgcagaa ggaagtgagg 120

gattccagag tggacagtgt ttgccttcac cccaagtgat catgagaggt gctgtgcaag 180

tcttcatcat gctccttcta gcaactgtct ctgactgtgc ggtgatcaca ggggcctgtg 240

aacg 244

<210> 122

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 122

ggaaggagag gagtgccacc ctggaag 27

<210> 123

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 123

accatacctg tccctgttca cccagcct 28

<210> 124

<211> 464

<212> DNA

<213> Rat

<400> 124

ctgttcaccc agcctgctgt gctccaggtt cccagatggc aggtaccgct gctcccagga 60

cttgaagaat gtcaactttt agtttatctg gactctgtct gggtccctac tgggtgacct 120

cttgtgttac atctgtgtga cttagttccg tgcaacttct ccactcccca ccctgtccgt 180

gtgtgtgcag acaagcatat cttccactac ggaacagtcc agcagcgtgc agagaggagt 240

ttgcagcctt gagaagtggg ccagcctggc cttcctggcc agaccgcctg aagttgtgac 300

actgggacct cctcaattgt ctgcccttcc tgcatgtgcc cttctcccta aaccacacct 360

cccaggccct ggcctgtggg tgcgtcacta agtcacgggg tctatggggg gaagatcaac 420

attctcctca ttttctttca ttggctagct ccttgtttta ggag 464

<210> 125

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 125

attccagagt ggacagtgtt tgccttcacc 30

<210> 126

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 126

gatcatgaga ggtgctgtgc aagtcttc 28

<210> 127

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 127

ctctctgcac gctgctggac tgttcc 26

<210> 128

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 128

cagatgtaac acaagaggtc acccagtagg 30

<210> 129

<211> 375

<212> DNA

<213> Rat

<400> 129

gatcatgaga ggtgctgtgc aagtcttcat catgctcctt ctagcaactg tctctgactg 60

tgcggtgatc acaggggcct gtgaacgaga tgtccagtgt ggggctggca cctgctgtgc 120

tatcagcctg tggctgcggg gcctgaggct gtgtacccct ctggggcggg aaggagagga 180

gtgccaccct ggaagccaca agatcccttt ctttaggaaa cgccaacacc atacctgtcc 240

ctgttcaccc agcctgctgt gctccaggtt cccagatggc aggtaccgct gctcccagga 300

cttgaagaat gtcaactttt agtttatctg gactctgtct gggtccctac tgggtgacct 360

cttgtgttac atctg 375

<210> 130

<211> 375

<212> DNA

<213> Rat

<400> 130

gatcatgaga ggtgctgtgc aagtcttcat catgctcctt ctagcaactg tctctgactg 60
tgcggtgatc acaggggcct gtgaacgaga tgtccagtgt ggggctggca cctgctgtgc 120
tatcagcctg tggctgcggg gcctgaggct gtgtaccccc ctggggcggg aaggagagga 180
gtgccaccct ggaagctaca agatcccttt ctttaggaaa cgccaacacc atacctgtcc 240
ctgttcaccc agcctgctgt gctccaggtt cccagatggc aggtaccgct gctcccagga 300
cttgaagaat gtcaactttt agtttatctg gactctgtct gggtccctac tgggtgacct 360
cttgtgttac atctg 375

<210> 131

<211> 375

<212> DNA

<213> Rat

<400> 131

gatcatgaga ggtgctgtgc aagtcttcat catgctcctt ctagcaactg tctctgactg 60
tgcggtgatc acaggggcct gtgaacgaga tgtccagtgt ggggctggca cctgctgtgc 120
tatcagcctg tggctgcggg gcctgaggct gtgtaccccc ctggggcagg aaggagagga 180
gtgccaccct ggaagccaca agatcccttt ctttaggaaa cgccaacacc atacctgtcc 240
ctgttcaccc agcctgctgt gctccaggtt cccagatggc aggtaccgct gctcccagga 300
cttgaagaat gtcaactttt agtttatctg gactctgtct gggtccctac tgggtgacct 360
cttgtgttac atctg 375

<210> 132

<211> 105

<212> PRT

<213> Rat

<400> 132

Met Arg Gly Ala Val Gln Val Phe Ile Met Leu Leu Leu Ala Thr Val
5 10 15

Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys

20 25 30

Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg

35 40 45

Leu Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser

50 55 60

His Lys Ile Pro Phe Phe Arg Lys Arg Gln His His Thr Cys Pro Cys

65 70 75 80

Ser Pro Ser Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys

85 90 95

Ser Gln Asp Leu Lys Asn Val Asn Phe

100 105

<210> 133

<211> 315

<212> DNA

<213> Rat

<400> 133

atgagaggtg ctgtgcaagt cttcatcatg ctccttctag caactgtctc tgactgtgcg 60

gtgatcacag gggcctgtga acgagatgtc cagtgtgggg ctggcacctg ctgtgctatc 120

agcctgtggc tgcggggcct gaggctgtgt acccctctgg ggcgggaagg agaggagtgc 180

cacccctggaa gccacaagat ccctttcttt aggaaacgcc aacaccatac ctgtccctgt 240

tcacccagcc tgctgtgctc caggttccca gatggcaggt accgctgctc ccaggacttg 300

aagaatgtca acttt 315

<210> 134

<211> 105

<212> PRT

<213> Rat

<400> 134

Met Arg Gly Ala Val Gln Val Phe Ile Met Leu Leu Leu Ala Thr Val

5 10 15

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

<210> 135
<211> 315
<212> DNA
<213> Rat
<400> 135
atgagaggtg ctgtgcaagt cttcatcatg ctccttctag caactgtctc tgactgtgcg 60
gtgatcacag gggcctgtga acgagatgtc cagtgtgggg ctggcacctg ctgtgctatc 120
agcctgtggc tgcggggcct gaggctgtgt acccctctgg ggcgggaagg agaggagtgc 180
caccctggaa gctacaagat ccctttcttt aggaaacgcc aacaccatac ctgtccctgt 240
tcacccagcc tgctgtgctc caggttccca gatggcaggt accgctgctc ccaggacttg 300
aagaatgtca acttt 315

<210> 136
<211> 105
<212> PRT
<213> Rat
<400> 136
Met Arg Gly Ala Val Gln Val Phe Ile Met Leu Leu Leu Ala Thr Val

5 10 15

Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys

20 25 30

Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg

35 40 45

Leu Cys Thr Pro Leu Gly Gln Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser

50 55 60

His Lys Ile Pro Phe Phe Arg Lys Arg Gln His His Thr Cys Pro Cys

65 70 75 80

Ser Pro Ser Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys

85 90 95

Ser Gln Asp Leu Lys Asn Val Asn Phe

100 105

<210> 137

<211> 315

<212> DNA

<213> Rat

<400> 137

atgagaggtg ctgtgcaagt cttcatcatg ctccttctag caactgtctc tgactgtgcg 60

gtgatcacag gggcctgtga acgagatgtc cagtgtgggg ctggcacctg ctgtgctatc 120

agcctgtggc tgcggggcct gaggctgtgt acccctctgg ggcaggaagg agaggagtgc 180

caccctggaa gccacaagat ccctttcttt aggaaacgcc aacaccatac ctgtccctgt 240

tcacccagcc tgctgtgctc caggttccca gatggcaggt accgctgctc ccaggacttg 300

aagaatgtca acttt 315

<210> 138

<211> 86

<212> PRT

<213> Rat

<400> 138

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

<210> 139
<211> 258
<212> DNA
<213> Rat
<400> 139
gcggtgatca caggggcctg tgaacgagat gtccagtgtg gggctggcac ctgctgtgct 60
atcagcctgt ggctgcgggg cctgaggctg tgtacccctc tggggcggga aggagaggag 120
tgccaccctg gaagccacaa gatcctttc tttaggaaac gccaacacca tacctgtccc 180
tgttcaccca gcctgctgtg ctccaggttc ccagatggca ggtaccgctg ctcccaggac 240
ttgaagaatg tcaacttt 258
<210> 140
<211> 86
<212> PRT
<213> Rat
<400> 140
Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly
1 5 10 15

Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Leu Cys Thr
20 25 30

Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser Tyr Lys Ile
35 40 45

Pro Phe Phe Arg Lys Arg Gln His His Thr Cys Pro Cys Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Gln Asp
65 70 75 80

Leu Lys Asn Val Asn Phe
85

<210> 141

<211> 258

<212> DNA

<213> Rat

<400> 141

gcggtgatca caggggcctg tgaacgagat gtccagtgtg gggctggcac ctgctgtgct 60

atcagcctgt ggctgcgggg cctgaggctg tgtacccctc tggggcggga aggagaggag 120

tgccaccctg gaagctacaa gatcccttc tttaggaaac gccaacacca tacctgtccc 180

tgttcaccca gcctgctgtg ctccaggttc ccagatggca ggtaccgctg ctcccaggac 240

ttgaagaatg tcaacttt 258

<210> 142

<211> 86

<212> PRT

<213> Rat

<400> 142

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly
1 5 10 15

Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Leu Cys Thr
20 25 30

Pro Leu Gly Gln Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Ile
35 40 45

Pro Phe Phe Arg Lys Arg Gln His His Thr Cys Pro Cys Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Gln Asp
65 70 75 80

Leu Lys Asn Val Asn Phe
85

<210> 143

<211> 258

<212> DNA

<213> Rat

<400> 143

gcggtgatca caggggcctg tgaacgagat gtccagtgtg gggctggcac ctgctgtgct 60

atcagcctgt ggctgcgggg cctgaggctg tgtacccctc tggggcagga aggagaggag 120

tgccaccctg gaagccacaa gatcctttc tttaggaaac gccaacacca tacctgtccc 180

tgttcaccca gcctgctgtg ctccaggttc ccagatggca ggtaccgctg ctcccaggac 240

ttgaagaatg tcaacttt 258

<210> 144

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 144

atygtstgct gccccttyga gatg 24

<210> 145

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 145

tagtagagct gctgrtccac bgrcc 25

<210> 146

<211> 301

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 146

gactactacg tggtgcgcca gctctcctgg gagcacggcc acgtgctgtg cgcctctgtc 60

aactacctgc gcacggtctc tctctacgtc tccaccaacg ccctgctggc catcgccatc 120

gacagatatc tggccattgy ccacccgctg agaccccgga tgaagtacca aacagccacg 180

ggcttgattg ccttggtgtg ggtggtgtcc attcttgttg ccataccgtc agcctacttc 240

accactgaaa cggtcctcgt cattgtcaag agccaggaga agattttctg tggccagatc 300

t 301

<210> 147

<211> 301

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 147

gactactatg tggtgcatca gctctcctgg gagcatggcc atgtgctctg tgcctgtatc 60

aactacctgc gtaccgtctc actctacgtc tccaccaatg ccctgctggc cattgctatt 120

gacagatatc tcgctatcgt tcacccctig aaaccacgaa tgaattatca aacagcctcc 180

ttcctgatcg ctctggtctg gatggtatcc attctcatct ccatcccatc agcctacttc 240

acaaaggaaa ccgtcctctt cattgtcaaa aaccagaaaa agatcttctg cggccaggtc 300

t 301

<210> 148

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 148

ggccagcagg gcgttggtgg aga 23

<210> 149

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 149

gtgcgcaggt agttgacaga ggcgcaca 28

<210> 150

<211> 767

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 150

ctaacagcgg ggtcaaaggg ctgaaatgaa gctgaccccc gcgtccagtc gggcttgccc 60

gggggagcga cgtttgagtc gctcccagtg tgtcctgcga gggcggtgtg ggtagaaggg 120

aaggctcctc ccggttcttt gaaatctcgc cggctcatca gcccgaccgc ccactctggc 180

ggtggctcca gggcagacca ggcttaggat gaagcttgga ttctggacgc catggatgtt 240

tgcagggaca cactgactca tgaaggaaaa gctgagtttc agcagaaaag ggagacctca 300

gcctagcaac atcaccccag aggaattccc aagagtgtgg ctcaaggctt caaccagcca 360

gatggagatc accatggggg tcatggatga gaatgccacc aatacgtcaa ccaactattt 420

ccctctgctt gacccccctcg gagcccaagc tgcttctttc cccttcaact tcagctacgg 480

tgactatgat atgcccttgg atgaagatga ggatatgacc aattcccgga ccttctttgc 540

cgccaagatt gtcattggca tggcgctggt gggtattatg ctggtctgtg gtatcggcaa 600

cttcatcttc atcgctgccc tggcccgcta caagaagcta cgcaacctca ccaatctgct 660

catcgccaac ctggccatct ctgatttcct ggtggccatt gtctgctgcc ccttcgagat 720

ggactactac gtggtgcgcc agctctcctg ggagcacggc cacgtgc 767

<210> 151

<211> 720

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 151

gagagcaact cctgcagagc ccagccagga gaaagccccg agcggggacc gtgctcttcc 60

tgcgggcttc tgggagcagt ggctcgtgcc ctccgacccg ggctaaagag cccaggacct 120

cgtctgcctg gctggggact ccgggatgaa tcaggcttag gatgaagctt ggattctgga 180

cgccatggat gtttgcaggg acacactgac tcatgaagga aaagctgagt ttcagcagaa 240

aagggagacc tcagcctagc aacatcaccc cagaggaatt cccaagagtg tggctcaagg 300

cttcaaccag ccagatggag atcaccatgg gggtcatgga tgagaatgcc accaatacgt 360

caaccaacta tttccctctg cttgaccccc tcggagccca agctgcttct ttccccttca 420

acttcagcta cggtgactat gatatgccct tggatgaaga tgaggatatg accaattccc 480

ggaccttctt tgccgccaag attgtcattg gcatggcgct ggtgggtatt atgctggtct 540

gtggtatcgg caacttcatc ttcatcgctg ccctggcccg ctacaagaag ctacgcaacc 600

tcaccaatct gctcatcgcc aacctggcca tctctgattt cctggtggcc attgtctgct 660

gcccccttcga gatggactac tacgtggtgc gccagctctc ctgggagcac ggccacgtgc 720

<210> 152

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 152

tcatcagccc gaccgcccac tctggc 26

<210> 153

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 153

taggatgaag cttggattct ggacgcca 28

<210> 154

<211> 2051

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 154

tggatgtttg cagggacaca ctgactcatg aaggaaaagc tgagtttcag cagaaaaggg 60

agacctcagc ctagcaacat caccccagag gaattcccaa gagtgtggct caaggcttca 120

accagccaga tggagatcac catgggggtc atggatgaga atgccaccaa tacgtcaacc 180

aactatttcc ctctgcttga ccccctcgga gcccaagctg cttctttccc cttcaacttc 240

agctacggtg actatgatat gcccttggat gaagatgagg atatgaccaa ttcccggacc 300

ttctttgccg ccaagattgt cattggcatg gcgctggtgg gtattatgct ggtctgtggt 360

atcggcaact tcatcttcat cgctgccctg gcccgctaca agaagctacg caacctcacc 420

aatctgctca tcgccaacct ggccatctct gatttcctgg tggccattgt ctgctgcccc 480

ttcgagatgg actactacgt ggtgcgccag ctctcctggg agcacggcca cgtgctgtgc 540

gcctctgtca actacctgcg cacggtctct ctctacgtct ccaccaacgc cctgctggcc 600

atcgccatcg acagatatct ggccattgtc cacccgctga gaccccggat gaagtaccaa 660

acagccacgg gcttgattgc cttggtgtgg gtggtgtcca ttcttgttgc cataccgtca 720

gcctacttca ccactgaaac ggtcctcgtc attgtcaaga gccaggagaa gattttctgt 780

ggccagatct ggccagtaga ccagcagatc tactacaagt cctacttcct cttcatcttt 840

ggcatcgagt tcgtgggccc agtggtcacc atgaccctat gctatgccag gatctcccga 900

gagctctggt tcaaggccgt ccctggttic cagacggagc agatccggaa gcgactgcgc 960

tgtcgccgga agaccgtcct ggtgctcatg tgcatcctca cggcgtacgt gctgtgctgg 1020

gcgcccttct acggcttcgc catcgtgcgg gacttcttcc ccacagtgtt tgtgaaggag 1080

aaacactatc tcacggcctt ctacgtggtc gagtgcattg ccatgagcaa cagcatgatc 1140

aacaccgtgt gcttcgtgac tgtcaagaat aacaccatca agtacttcaa gaagattatg 1200

ctgctccact ggaaggcttc ttacaatggc agcaagtcca gtggggacct tgacctcaaa 1260

accacggggg tgcctgccac tgaagaggtg gactgcatcg ggctgaaata actccagaac 1320

aggacctttg ggcccctgac aatgtgctta agcccacact atcaaccaag aactctaggt 1380

ttgccacata gggcaaaaga aatggacaaa tatgtcagtg ctgtgttcag ggagctcaga 1440

atctctaaaa ctggtgtgac cacaccatca ccagtggccg acattcaatg aacatctaat 1500

ttgtgcaaag tgtaggcact ggtgatatct gtatctgttg atgatatttg attggcagaa 1560

agaaataggg attaaacaaa cacaaaaaaa tgatgggaca tagtgtggaa tgatgggttt 1620

tccagaaggg agcctgagta gtcacctaaa actgtggtct atatgtttgt agggtgaagt 1680

tctctctgga tcatctcagc tactcatcag acactgagat aacctgtctc tgggattgtt 1740

cttaggcttg agttcactcc taacacttgc tggcctgggg caagaataca aagcaggttc 1800

ctggctcttt ctgcaatctt cccttctatc cctggttctg actctcaccc tgggcaccca 1860

ggaaagaaag aaacatacaa ataggcggtg gggggtgggg gttggcacca gtgagattca 1920

gagactacag gcttattgag ggccttttta atccacctcc tttgtttggt ttttgaatt 1980

tggaaatttg gaaccagaag atacgaccca gccttggatc tatcacctgt atgggcctgg 2040

gtaaggcctc t 2051

<210> 155

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 155

tttgagtcgc tcccagtgtg tcct 24

<210> 156

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 156

gctcctcccg gttctttgaa atc 23

<210> 157

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 157

tgtagtctct gaatctcact ggtgcc 26

<210> 158

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 158

ggtggattaa aaaggccctc aataagcc 28

<210> 159

<211> 2038

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 159

gctcctcccg gttctttgaa atctcgccgg ctcatcagcc cgaccgccca ctctggcggt 60

ggctccaggg cagaccaggc ttaggatgaa gcttggattc tggacgccat ggatgtttgc 120

agggacacac tgactcatga aggaaaagct gagtttcagc agaaaaggga gacctcagcc 180

tagcaacatc accccagagg aattcccaag agtgtggctc aaggcttcaa ccagccagat 240

ggagatcacc atgggggtca tggatgagaa tgccaccaat acgtcaacca actatttccc 300

tctgcttgac cccctcggag cccaagctgc ttctttcccc ttcaacttca gctacggtga 360

ctatgatatg cccttggatg aagatgagga tatgaccaat tcccggacct tctttgccgc 420

caagattgtc attggcatgg cgctggtggg tattatgctg gtctgtggta tcggcaactt 480

catcttcatc gctgccctgg cccgctacaa gaagctacgc aacctcacca atctgctcat 540

cgccaacctg gccatctctg atttcctggt ggccattgtc tgctgcccct tcgagatgga 600

ctactacgtg gtgcgccagc tctcctggga gcacggccac gtgctgtgcg cctctgtcaa 660

ctacctgcgc acggtctctc tctacgtctc caccaacgcc ctgctggcca tcgccatcga 720

cagatatctg gccattgtcc acccgctgag accccggatg aagtaccaaa cagccacggg 780

cttgattgcc ttggtgtggg tggtgtccat tcttgttgcc ataccgtcag cctacttcac 840

cactgaaacg gtcctcgtca ttgtcaagag ccaggagaag attttctgtg gccagatctg 900

gccagtagac cagcagatct actacaagtc ctacttcctc ttcatctttg gcatcgagtt 960

cgtgggccca gtggtcacca tgaccctatg ctatgccagg atctcccgag agctctggtt 1020

caaggccgtc cctggtttcc agacggagca gatccggaag cgactgcgct gtcgccggaa 1080

gaccgtcctg gtgctcatgt gcatcctcac ggcgtacgtg ctgtgctggg cgcccttcta 1140

cggcttcgcc atcgtgcggg acttcttccc cacagtgttt gtgaaggaga aacactatct 1200

cacggccttc tacgtggtcg agtgcattgc catgagcaac agcatgatca acaccgtgtg 1260

cttcgtgact gtcaagaata acaccatcaa gtacttcaag aagattatgc tgctccactg 1320

gaaggcttct tacaatggca gcaagtccag tggggacctt gacctcaaaa ccacgggggt 1380

gcctgccact gaagaggtgg actgcatcgg gctgaaataa ctccagaaca ggacctttgg 1440

gcccctgaca atgtgcttaa gcccacacta tcaaccaaga actctaggtt tgccacatag 1500

ggcaaaagaa atggacaaat atgtcagtgc tgtgttcagg gagctcagaa tctctaaaac 1560

tggtgtgacc acaccatcac cagtggccga cattcaatga acatctaatt tgtgcaaagt 1620

gtaggcactg gtgatatctg tatctgttga tgatatttga ttggcagaaa gaaataggga 1680

ttaaacaaac acaaaaaaat gatgggacat agtgtggaat gatgggtttt ccagaaggga 1740

gcctgagtag tcacctaaaa ctgtggtcta tatgtttgta gggtgaagtt ctctctggat 1800

catctcagct actcatcaga cactgagata acctgtctct gggattgttc ttaggcttga 1860

gttcactcct aacacttgct ggcctggggc aagaatacaa agcaggttcc tggctctttc 1920

tgcaatcttc ccttctatcc ctggttctga ctctcaccct gggcacccag gaaagaaaga 1980

aacatacaaa taggcggtgg ggggtggggg ttggcaccag tgagattcag agactaca 2038

<210> 160

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 160

gtaggctgat gggatggaga tgagaatgga 30

<210> 161

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 161

gcaggtagtt gatacaggca cagagcacat 30

<210> 162

<211> 368

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 162

ccatcctaat acgactcact atagggctcg agcggccgcc cgggcaggtg ggaagggcgc 60

tgggtgagaa ggaataggga cacctccttc gaagcgcaag tccgggttcc cgggaccgct 120

ggtggggaga gcgcggaagc cggatcgagg atggcctgtt gactccccaa ggatgtgggc 180

agggtgctag gatctntgac ctcatgagag caggaggtct ggaccctanc tcanagtctg 240

cggaccctgg aatctcccac acaccgctca ctggaaagct tcaccatggc agtccanaat 300

ggaaatgcta gttttccagc caacttcagt ataccccaag aacatgcctn ctccctcccc 360

ttcaactt 368

<210> 163

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 163

agcctccttc ctgatcgctc tggtctg 27

<210> 164

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 164

cccatcagcc tacttcacaa aggaaaccg 29

<210> 165

<211> 911

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 165

tcctcttcat tgtcaaaaac cagaaaaaga tcttctgcgg ccaggtctgg ccagtggacc 60

agcarctcta ctataaatcc tacttcctct ttgtctttgg catcgagttc ctgggccccg 120

tgttcwccat gaccctgtgc tatgccagga tctcccgaga gctctggttc aaagcggtcc 180

cgggtttcca gactgagcaa atccggaaga ggctgcgctg ccgccggaag acggtactgg 240

tactcatgtg tatcctcacg gcctatgttc tgtgctgggc gcccttctat ggcctcacaa 300

tcgtgcgcga cttcttcccc actgtgttcg tgaaggaaaa acattacctc acagcctttt 360

atgttgtgga gtgcatcgcc atgagcaaca gcatgatcaa caccgtgtgc ttcgtgacag 420

tgaagaacag yaccatgaag tacttcaaga agatgctgct gctccattgg cggccctctc 480
accacgggag taagtccagt gccgacctcg acctcaaaac cagccgcctg ycagccacgg 540
aggaggtgga ttgtatcagg ctgaagtgac ccactggtac ttcacaatgg aaaacccaaa 600
agccagtact tggcgcacag tttatcaata accaagttca caggctgcat ggggaaaggg 660
caacagtttt cacacttcgc tgctgtcaag gagctggatg cttctgcagt cataaatgca 720
gtgtgacttg acacaaacca cagcagccaa catttactga tacgtgctcr acgtactgtg 780
cacaacacca ccagcgagat taaagagcaa caggagctga catttactga ttacctactg 840
tgtgtaaaaa tatttaaata gcaaaatgaa ttggcacctg cccgggcggc cgctcgagcc 900
ctatagtgag t 911

<210> 166
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 166
ccatcctaat acgactcact atagggc 27

<210> 167
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 167
gctgggtgag aaggaatagg ga 22

<210> 168
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 168

gcaggtgcca attcatttg c 21

<210> 169

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 169

tgctctttaa tctcgctggt ggt 23

<210> 170

<211> 1623

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 170

gctgggtgag aaggaatagg gacacctcct tcgaagcgca agtccgggtt cccgagaccg 60

ctggtgggga gagcgcggaa gccggatcga ggatggcctg ttgactcccc aaggatgtgg 120

gcagggtgct aggatctctg acctcatgag agcagaaggt ctggacccta gctcagagtc 180

tgcagaccct ggaatctccc acacaccgct cactggaaag cttcaccatg gcagcccaga 240

atggaaatgc tagttttcca gccaacttca gtatacccca agaacatgcc tcctccctcc 300

ccttcaactt cagttatgat gattatgacc tccctctgga tgaggatgag gatatgacca 360

agactcagac cttctttgca gccaagattg ttatcggggt ggcacttgtg ggtatcatgc 420

tgacttgtgg tattggcaac tttgtcttta tcactgccct cacccgctat aaaaagctgc 480

gcaacctcac caacctgctc attgctaacc tggccatctc cgacttcctg gtagccatca 540

tctgctgccc ctttgagatg gactactatg tggtgcatca gctctcctgg gagcatggcc 600

atgtgctctg tgcctgtatc aactacctgc gtaccgtctc actctacgtc tccaccaatg 660

ccctgctggc cattgctatt gacagatatc tcgctatcgt tcaccccttg aaaccacgaa 720

tgaattatca aacagcctcc ttcctgatcg ctctggtctg gatggtatcc attctcatct 780
ccatcccatc agcctacttc acaaaggaaa ccgtcctctt cattgtcaaa aaccagaaaa 840
agatcttctg cggccaggtc tggccagtgg accagcagct ctactataaa tcctacttcc 900
tctttgtctt tggcatcgag ttcctgggcc ccgtgttcac catgaccctg tgctatgcca 960
ggatctcccg agagctctgg ttcaaagcgg tcccgggttt ccagactgag caaatccgga 1020
agaggctgcg ctgccgccgg aagacggtac tggtactcat gtgtatcctc acggcctatg 1080
ttctgtgctg ggcgcccttc tatggcttca caatcgtgcg cgacttcttc cccactgtgt 1140
tcgtgaagga aaaacattac ctcacagcct tttatgttgt ggagtgcatc gccatgagca 1200
acagcatgat caacaccgtg tgcttcgtga cagtgaagaa cagcaccatg aagtacttca 1260
agaagatgct gctgctccat tggcggccct ctcaccacgg gagtaagtcc agtgctgacc 1320
tcgacctcaa aaccagccgc ctgccagcca cggaggaggt ggattgtatc aggctgaagt 1380
gacccactgg tacttcacaa tggaaaaccc aaaagccagt acttggcgca cagtttatca 1440
ataaccaagt tcacaggctg catggggaaa gggcaacagt tttcacactt cgctgctgtc 1500
aaggagctgg atgcttctgc agtcataaaa tgcagtgtga cttgacacaa accacagcag 1560
ctaacattta ctgatacgtg ctcaacgtac tgtgcacaac accaccagcg agattaaaga 1620
gca 1623

<210> 171
<211> 393
<212> PRT
<213> Bovine
<400> 171

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

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

290 295 300

Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr
305 310 315 320

Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met
325 330 335

Ile Asn Thr Val Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asn Thr Ile Lys Tyr
340 345 350

Phe Lys Lys Ile Met Leu Leu His Trp Lys Ala Ser Tyr Asn Gly Ser
355 360 365

Lys Ser Ser Gly Asp Leu Asp Leu Lys Thr Thr Gly Val Pro Ala Thr
370 375 380

Glu Glu Val Asp Cys Ile Gly Leu Lys
385 390

<210> 172

<211> 1179

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 172

atggagatca ccatgggggt catggatgag aatgccacca atacgtcaac caactatttc 60

cctctgcttg acccccctcgg agcccaagct gcttctttcc ccttcaactt cagctacggt 120

gactatgata tgcccttgga tgaagatgag gatatgacca attcccggac cttctttgcc 180

gccaagattg tcattggcat ggcgctggtg ggtattatgc tggtctgtgg tatcggcaac 240

ttcatcttca tcgctgccct ggcccgctac aagaagctac gcaacctcac caatctgctc 300

atcgccaacc tggccatctc tgatttcctg gtggccattg tctgctgccc cttcgagatg 360

gactactacg tggtgcgcca gctctcctgg gagcacggcc acgtgctgtg cgcctctgtc 420

aactacctgc gcacggtctc tctctacgtc tccaccaacg ccctgctggc catcgccatc 480

gacagatatc tggccattgt ccacccgctg agaccccgga tgaagtacca aacagccacg 540

ggcttgattg ccttggtgtg ggtggtgtcc attcttgttg ccataccgtc agcctacttc 600

accactgaaa cggtcctcgt cattgtcaag agccaggaga agattttctg tggccagatc 660

tggccagtag accagcagat ctactacaag tcctacttcc tcttcatctt tggcatcgag 720

ttcgtgggcc cagtggtcac catgacccta tgctatgcca ggatctcccg agagctctgg 780

ttcaaggccg tccctggttt ccagacggag cagatccgga agcgactgcg ctgtcgccgg 840

aagaccgtcc tggtgctcat gtgcatcctc acggcgtacg tgctgtgctg ggcgcccttc 900

tacggcttcg ccatcgtgcg ggacttcttc cccacagtgt ttgtgaagga gaaacactat 960

ctcacggcct tctacgtggt cgagtgcatt gccatgagca acagcatgat caacaccgtg 1020

tgcttcgtga ctgtcaagaa taacaccatc aagtacttca agaagattat gctgctccac 1080

tggaaggctt cttacaatgg cagcaagtcc agtggggacc ttgacctcaa aaccacgggg 1140

gtgcctgcca ctgaagaggt ggactgcatc gggctgaaa 1179

<210> 173

<211> 384

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 173

Met Ala Ala Gln Asn Gly Asn Ala Ser Phe Pro Ala Asn Phe Ser Ile
5 10 15

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

Tyr Asp Leu Pro Leu Asp Glu Asp Glu Asp Met Thr Lys Thr Gln Thr
35 40 45

Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val Ile Gly Val Ala Leu Val Gly Ile Met
50 55 60

Leu Thr Cys Gly Ile Gly Asn Phe Val Phe Ile Thr Ala Leu Thr Arg
65 70 75 80

Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala
85 90 95

Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala Ile Ile Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp
100 105 110

Tyr Tyr Val Val His Gln Leu Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys

115 120 125

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

130 135 140

Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro

145 150 155 160

Leu Lys Pro Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser Phe Leu Ile Ala Leu

165 170 175

Val Trp Met Val Ser Ile Leu Ile Ser Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Thr

180 185 190

Lys Glu Thr Val Leu Phe Ile Val Lys Asn Gln Lys Lys Ile Phe Cys

195 200 205

Gly Gln Val Trp Pro Val Asp Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro

245 250 255

Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys

260 265 270

Thr Val Leu Val Leu Met Cys Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp

275 280 285

Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val

290 295 300

Phe Val Lys Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys

305 310 315 320

Ile Ala Met Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Val Cys Phe Val Thr Val

325 330 335

Lys Asn Ser Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met Leu Leu Leu His Trp

340 345 350

Arg Pro Ser His His Gly Ser Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys
355 360 365

Thr Ser Arg Leu Pro Ala Thr Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
370 375 380

<210> 174

<211> 1152

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 174

atggcagccc agaatggaaa tgctagtttt ccagccaact tcagtatacc ccaagaacat 60
gcctcctccc tccccttcaa cttcagttat gatgattatg acctccctct ggatgaggat 120
gaggatatga ccaagactca gaccttcttt gcagccaaga ttgttatcgg ggtggcactt 180
gtgggtatca tgctgacttg tggtattggc aactttgtct ttatcactgc cctcacccgc 240
tataaaaagc tgcgcaacct caccaacctg ctcattgcta acctggccat ctccgacttc 300
ctggtagcca tcatctgctg ccccttgag atggactact atgtggtgca tcagctctcc 360
tgggagcatg gccatgtgct ctgtgcctgt atcaactacc tgcgtaccgt ctcactctac 420
gtctccacca atgccctgct ggccattgct attgacagat atctcgctat cgttcacccc 480
ttgaaaccac gaatgaatta tcaaacagcc tccttcctga tcgctctggt ctggatggta 540
tccattctca tctccatccc atcagcctac ttcacaaagg aaaccgtcct cttcattgtc 600
aaaaaccaga aaaagatctt ctgcggccag gtctggccag tggaccagca gctctactat 660
aaatcctact tcctctttgt ctttggcatc gagttcctgg gccccgtgtt caccatgacc 720
ctgtgctatg ccaggatctc ccgagagctc tggttcaaag cggtcccggg tttccagact 780
gagcaaatcc ggaagaggct gcgctgccgc cggaagacgg tactggtact catgtgtatc 840
ctcacggcct atgttctgtg ctgggcgccc ttctatggct tcacaatcgt gcgcgacttc 900
ttccccactg tgttcgtgaa ggaaaaacat tacctcacag cctttatgt tgtggagtgc 960
atcgccatga gcaacagcat gatcaacacc gtgtgcttcg tgacagtgaa gaacagcacc 1020
atgaagtact tcaagaagat gctgctgctc cattggcggc cctctcacca cgggagtaag 1080
tccagtgctg acctcgacct caaaaccagc cgcctgccag ccacggagga ggtggattgt 1140
atcaggctga ag 1152

<210> 175
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 175
gctcctcccg gttctttgaa atc 23

<210> 176
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 176
tggtgaggtt gcgtagcttc ttg 23

<210> 177
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 177
aaccaactat ttccctctgc ttgac 25

<210> 178
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Primer

<400> 178

tcaccgtagc tgaagttgaa gg 22

<210> 179

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 179

cctcggagcc caagctgctt cttt 24

<210> 180

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 180

gctgggtgag aaggaatagg ga 22

<210> 181

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 181

ggagagctga tgcaccacat agtag 25

<210> 182

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 182

tcatgagagc agaaggtctg ga 22

<210> 183

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 183

tggctggaaa actagcattt cc 22

<210> 184

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 184

cacacaccgc tcactggaaa gcttca 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/01057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/02, C12Q1/68, A61K31/7088, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P15/08, A61P35/00, A61P43/00
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)
Int.Cl[7] C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/02, C12Q1/68, A61K31/7088, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P15/08, A61P35/00, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/06483 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 24 January, 2002 (24.01.02), & JP 2002-335976 A & AU 200172735 A	5,6,10,13-16
A	WO 01/57190 A2 (HYSEQ, INC.), 09 August, 2001 (09.08.01), & US 2002/0128187 A1 & AU 200134847 A	5,6,10,13-16
A	WO 01/16309 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 08 March, 2001 (08.03.01), & EP 1207198 A1 & JP 2002-95474 A & AU 200067280 A	5,6,10,13-16

☐ 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 document 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	Date of mailing of the international search report
24 April, 2003 (24.04.03)	13 May, 2003 (13.05.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/01057

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 36, 38

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The method of inhibiting angiogenesis and the prevention/treatment method as set forth in claims 36 and 38 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the (continued to extra sheet)

2. [X] Claims Nos.: 1-4, 12, 17, 18, 34, 35, 37, 39

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The angiogenesis inhibitors and compounds as set forth in claims 1 to 4, 12, 17, 18, 34, 35, 37 and 39 are specified exclusively by a function or a screening method. However, the description presents neither any compounds having this function nor any compounds obtained by this screening method.

3. [ ] Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The amino acid sequences relating to SEQ ID NOS:81, 82, 109, 138, 19 and 39 as set forth in claim 5 are common to each other in being I5E receptor ligands.

However, the acquisition of a ZAQ ligand peptide had been publicly known as reported in the document WO 02/06483 A1. Thus, the above matter is not considered as a special technical feature in the meaning as described in the second sentence in PCT Rule 13.2.

Such being the case, these inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked a to form a single general inventive concept but consisting of six groups of inventions relating (continued to extra sheet)

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [X] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

In claims 5, 6, 10 and 13 to 16, inventions relating to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:81.

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iV) of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

to the peptides having six amino acid sequences respectively.

For the same reason, the whole claims are considered as consisting of 16 groups of inventions relating to the peptides having the amino acid sequences of SEQ ID NOS:81, 82, 109, 138, 19, 39, 21, 1, 44, 51, 52, 53, 54, 171, 173 and 137.

Accordingly, claims 1 to 4, 12, 17, 18, 34, 35, 37 and 39 are neither disclosed in the description in the meaning as described in PCT Article 5 nor supported thereby in the meaning as described in PCT Article 6. Even though the common technical knowledge at the point of the application is considered, it is completely unknown what specific compounds are involved and what are not. Therefore, the above claims are described in an extremely unclear manner and thus fail to fulfill the requirement of clearness as described in PCT Article 6.

Such being the case, no meaningful search can be made on the inventions as set forth in the above claims.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／０１０５７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12N 5/10, C12P 21/02, C12Q 1/68, A61K 31/7088, A61K 39/395, A61K 45/00, A61K 48/00, A61P 15/08, A61P 35/00, A61P 43/00

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.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12N 5/10, C12P 21/02, C12Q 1/68, A61K 31/7088, A61K 39/395, A61K 45/00, A61K 48/00, A61P 15/08, A61P 35/00, A61P 43/00

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

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）

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/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 02/06483 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 2002.1.24 & JP 2002-335976 A & AU 200172735 A	5, 6, 10, 13-16
A	WO 01/57190 A2 (HYSEQ, INC.) 2001.08.09 & US 2002/0128187 A1 & AU 200134847 A	5, 6, 10, 13-16
A	WO 01/16309 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 2001.03.08 & EP 1207198 A1 & JP 2002-95474 A & AU 200067280 A	5, 6, 10, 13-16

☐ 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の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	国際調査報告の発送日
２４．０４．０３	13.05.03

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	冨永　みどり	４Ｎ　９１５２
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８	

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

国際調査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／０１０５７

第Ⅰ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☒ 請求の範囲　３６、３８　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲３６、３８の、血管新生阻害方法及び予防・治療方法は、治療による人体の処置方法に関するものであるから、PCT第１７条(２)(a)(i)及びPCT規則３９．１(iV)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象にあるものである。

2．☒ 請求の範囲　1-4, 12, 17, 18, 34, 35, 37, 39　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲1-4, 12, 17, 18, 34, 35, 37, 39に記載の血管新生阻害剤及び化合物は、機能のみによって、又は、スクリーニング方法によって特定されている。しかしながら、明細書には、当該機能を有する化合物及び当該スクリーニング方法で得られる化合物として具体的なものが一切記載されていない。

3．☐ 請求の範囲　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲５に記載された配列番号８１、８２、１０９、１３８、１９、３９に係るアミノ酸配列は、ＺＡＱ又はＩ５Ｅ受容体のリガンドである点で共通する。
しかしながら、ＺＡＱリガンドペプチドが得られたことは、文献WO 02/06483 A1に記載されているように公知の事項であるから、当該事項はＰＣＴ規則１３．２の第２文の意味において、特別な技術的特徴ではない。
よって、これらの一群の発明は、単一の一般的概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、異なった６個のアミノ酸配列を含有するペプチドに関する６個の発明からなる発明群と認める。
同様の理由により、請求の範囲全体は、配列番号８１、８２、１０９、１３８、１９、３９、２１、１、４４、５１、５２、５３、５４、１７１、１７３、１３７に係るアミノ酸配列を含有するペプチドに連関する１６個の発明からなる発明群と認める。

1．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4．☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲5, 6, 10, 13-16のうち、配列番号８１に記載のアミノ酸配列に関する発明

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ｉ欄続き

したがって、請求の範囲1-4, 12, 17, 18, 34, 35, 37, 39は、ＰＣＴ５条の意味での開示を欠き、また、ＰＣＴ６条の意味での明細書の開示による裏付けを欠いている。さらに、出願時の技術常識を勘案しても、具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって、前記請求の範囲は、著しく不明確であり、ＰＣＴ６条における明確性の要件も欠いている。

したがって、前記請求の範囲に記載された発明について有意義な調査をすることができない。