

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 12 月 29 日 (29.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/113533 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 5/06, 1/15, 1/19, 1/21, C07K 14/705, 16/28, C12Q 1/02, 1/68, C12P 21/02, A61K 38/16, G01N 33/15, 33/50
- (74) 代理人: 榎本 雅之, 外(ENOMOTO, Masayuki et al.); 〒5418550 大阪府大阪市中央区北浜四丁目 5 番 3 3 号 住友化学知的財産センター株式会社内 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/009227
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2004 年 6 月 23 日 (23.06.2004)
- (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2003-179158 2003 年 6 月 24 日 (24.06.2003) JP
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友化学工業株式会社 (SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒5418550 大阪府大阪市中央区北浜四丁目 5 番 3 3 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): 内藤 義一 (NAITO, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒5610021 大阪府豊中市本町 8-7-20-320 Osaka (JP). 大江田 憲治 (OEDA, Kenji) [JP/JP]; 〒6038147 京都府京都市北区上御霊上江町 251-1-202 Kyoto (JP).
- 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: LIVER X RECEPTOR α SPLICING VARIANT PROTEIN, GENE CODING FOR THE SAME AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 肝臓 X 受容体 α スプライシング変異体タンパク質、その遺伝子及びそれらの利用

(57) Abstract: A liver X receptor α splicing variant protein being an isoform of liver X receptor α and comprising at least an amino acid sequence encoded at exon 5 of liver X receptor α gene wherein a partial region is deleted; the gene; and use thereof. These can be utilized in the development of a drug or method useful for the prevention, diagnosis, treatment, etc. of disease and disorder taking part in the inhibition of normal cholesterol metabolism by normal liver X receptor α .

(57) 要約: 本発明は、肝臓 X 受容体 α のアイソフォームであって、少なくとも肝臓 X 受容体 α 遺伝子のエクソン 5 にコードされるアミノ酸配列の一部領域が欠失してなる、肝臓 X 受容体 α スプライシング変異体タンパク質、その遺伝子及びそれらの利用等を提供しており、これらは、正常型肝臓 X 受容体 α による正常なコレステロール代謝の阻害に関与する疾患や異常の予防、診断、治療等に有用な方法や薬剤の開発に利用することができる。



WO 2004/113533 A1

明細書

肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質、その遺伝子及びそれらの利用

技術分野

- 5 本発明は、肝臓X受容体 α のアイソフォームである肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質、その遺伝子及びそれらの利用に関する。

背景技術

- 10 コレステロールは、生体内における重要な脂質であり、様々な脂質の構成成分でもある。コレステロールは、摂食により腸管から吸収されるか、又は肝臓においてアセチル-CoAから生合成される。生合成されたコレステロールは肝臓から排出された後、小腸において再吸収され、血液を介して肝臓に輸送され、再利用される。また、肝臓においては、コレステロールの一部は、胆汁酸へと代謝される。生体内におけるコレステロールレベルが何らかの異常により上昇すると、高コレステロール血症に由来する
- 15 高脂血症やアテローム性動脈硬化症の発症原因となる。これらの高コレステロールに由来する疾患の発症メカニズムについては十分に解明されていない。現在、高コレステロール血症に由来する疾患の治療薬としては、コレステロール合成阻害剤（スタチン系製剤）やフィブラート系薬剤が用いられている。しかし、これらの薬剤による治療は、場合によっては必ずしも十分に満足できるものではない。
- 20 コレステロールの再吸収や胆汁酸への変換（コレステロール代謝）はそれぞれの特定のトランスポーター又は酵素により行われている。さらにこれらのタンパク質をコードする遺伝子群の発現調節には核内レセプターの1つである肝臓X受容体が関与していることが知られている。

- 25 肝臓X受容体には、これまでに2種類のサブタイプ（肝臓X受容体 α 、肝臓X受容体 β ）が存在することが報告されている（例えば、Peet et al., Curr. Opin. Genet. Dev. 8; 571-575, 1998 参照。）。肝臓X受容体 α は、核内レセプターの1つであるレチノイドX受容体（RXR）とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子の転写制御領域に結合することにより、標的遺伝子の転写を制御することが知られている。肝臓X受

容体以外の核内レセプターにおいても、サブタイプやアイソフォームが見出されており、例えば、RAR、RXR 及び PPAR では 3 種類のサブタイプ並びにこれらによりコードされるタンパク質が変化した形のアイソフォームが見い出されている（例えば、Mangelsdorf and Evans, Cell, 83: 841-850, 1995 参照。）。RAR 及び PPAR のアイソフォームは、選択的スプライシング及び／又は異なるプロモーターの制御により生じると考えられており、その発現の組織特異性や役割が異なることが知られている（例えば、Takeyama et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 222; 395-400, 1996 参照。）。従って、核内レセプターのサブタイプ及びアイソフォームは、それぞれ異なる機能を有していると考えられる。コレステロールの代謝調節において重要な役割を担っている肝臓 X 受容体 α に関し、正常型肝臓 X 受容体 α による正常なコレステロール代謝を変化させるような機能を有するアイソフォームが存在するならば、かかるアイソフォームは、その機能が直接的又は間接的に関与する病的症状との関連性を解明し、そして、それら疾患の予防又は治療のための医薬品を開発するために重要である。

15

発明の開示

本発明は、正常型肝臓X受容体 α による正常なコレステロール代謝の阻害に関与する新規な肝臓X受容体 α のアイソフォームである肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質、その遺伝子及びそれらの利用を提供する。

20 より詳しくは、本発明は、

1. 肝臓X受容体 α のアイソフォームであって、少なくとも肝臓X受容体 α 遺伝子のエクソン5にコードされるアミノ酸配列の一部領域が欠失してなる、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質（以下、本発明スプライシング変異体タンパク質と記すこともある。）；

25

2. エクソン5以外のエクソンにコードされるアミノ酸配列は正常型肝臓X受容体 α と実質的に同一である、前項1記載の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質；

3. 下記のいずれかのアミノ酸配列を有することを特徴とする前項2記載の肝臓X受

容体 α スプライシング変異体タンパク質；

(1) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列

(2) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列

(3) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列に対して、95%以上のアミノ酸同一性を有

5 するアミノ酸配列

4. 正常型肝臓X受容体 α が有する、リガンドによる転写活性化能と比較して、その転写活性化能が低いことを特徴とする前項 1～3 のいずれかに記載の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質；

5. 前項 3 記載の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列を
10 コードする塩基配列、又は当該塩基配列に相補性を有する塩基配列、を有するポリヌクレオチド；

6. 配列番号 2 で示される塩基配列、又は当該塩基配列に相補性を有する塩基配列、を有するポリヌクレオチド；

7. 前項 1 記載の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の部分ポリペプチ
15 ドであって、前項 1 記載の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列のうち、少なくともエクソン 5 にコードされるアミノ酸配列の一部領域が欠失することにより新たに連結された 2 つのアミノ酸残基を含むアミノ酸配列からなるポリペプチド（以下、本発明ポリペプチドと記すこともある。）；

8. 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を有することを特徴とする前項 7 記載のポリ
20 ペプチド；

9. 前項 8 記載のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列、又は当該塩基配列に相補性を有する塩基配列、を有するポリヌクレオチド；

10. 配列番号 4 で示される塩基配列、又は当該塩基配列に相補性を有する塩基配列、を有するポリヌクレオチド；

25 11. 前項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、又は前項 5 もしくは 6 記載のポリヌクレオチド（以下、総じて、本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子と記すこともある。）、を含有する組換えベクター（以下、本発明組換え

ベクターと記すこともある。) ;

1 2. 前項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、又は前項 5 もしくは 6 記載のポリヌクレオチド、が宿主細胞に導入されてなる形質転換体 (以下、本
5 発明形質転換体と記すこともある。) ;

1 3. 前項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、又は前項 5 もしくは 6 記載のポリヌクレオチドを、宿主細胞中で自立複製可能なベクターに導入する工程を有するベクターの製造方法 ;

10 1 4. 前項 1 2 記載の形質転換体を培養して、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生させる工程を有する、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の製造方法 ;

1 5. 前項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、又は前項 5 もしくは 6 記載のポリヌクレオチド、を発現する能力を欠損させてなる遺伝子欠損動物 ;
15

1 6. 前項 7 もしくは 8 記載のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド (以下、本発明ポリペプチド遺伝子と記すこともある。) 、又は前項 9 もしくは 1 0 記載のポリヌクレオチド、を含有する組換えベクター ;

1 7. 前項 7 もしくは 8 記載のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を
20 有するポリヌクレオチド、又は前項 9 もしくは 1 0 記載のポリヌクレオチド、が宿主細胞に導入されてなる形質転換体 ;

1 8. 前項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に被験物質を接触させる工程、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の変化を測定する工程を有する、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質
25 に作用する物質のスクリーニング方法 (以下、本発明スクリーニング方法と記すこともある。) ;

1 9. 前項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生する細胞に被験物質を接触させる工程、前記細胞において当該肝臓X受容体

α スプライシング変異体タンパク質により発現調節を受ける他のタンパク質の産生量を測定する工程、及び前記産生量に基づき被験物質の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質タンパク質に対する作用性を評価する工程を有する、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に作用する物質のスクリーニング方法；

- 5 20. 前項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生する細胞に、前記肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のリガンドを接触させ、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質により発現調節を受ける他のタンパク質の産生量を測定する第一工程、前項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生する細胞に、前記肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のリガンド及び被験物質の両者を接触させ、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質により発現調節を受ける他のタンパク質の産生量を測定する第二工程、及び、前記第一工程と前記第二工程とで測定された前記他のタンパク質の産生量の差異に基づき被験物質の前記リガンドに対する拮抗作用性を評価する工程を有する、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に作用する物質のスクリーニング方法；
- 10 21. 前項18記載のスクリーニング方法により選択された肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に作用する物質；
22. 肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に作用する前項21記載の物質に対する拮抗物質；
- 15 23. 前項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を特異的に認識する抗体又は抗体の一部；

24. 前項5又は6記載のポリヌクレオチドに基づき設計されてなるプライマー；
25. 遺伝子治療のための、前項9又は10記載のポリヌクレオチドが有する塩基配列に対する特異的DNAプローブの使用；
- 20 26. 遺伝子治療のための、前項9又は10記載のポリヌクレオチドが有する塩基配列に対する特異的RNAプローブの使用；
27. 前項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の存在有無を検出する方法であって、生体試料中のメッセンジャーRNA (mRNA) か

ら相補的DNA (cDNA) を合成する第一工程、前項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質又は前項 7 もしくは 8 記載のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド或いは前項 9 記載のポリヌクレオチド、に対応する前記相補的DNA (cDNA) の部分領域を増幅する第二工程、及び増幅された部分領域を検出する第三工程を有する方法；

28. 第二工程において、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10 又は配列番号 11 で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドから選択される1つ又は複数をプライマーとして用いるPCR法により増幅する、前項 27 記載の方法；

10 29. 前項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質若しくは前項 7 又は 8 記載のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド或いは前項 9 記載のポリヌクレオチドが、配列番号 4 で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドである、前項 27 記載の方法；

30. 前項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の存在有無を検出する方法であって、前項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質又は前項 7 若しくは 8 記載のポリペプチドを特異的に検出することができる抗体を用いた抗原抗体反応に基づき前記肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を検出する工程を有する方法；

31. 前項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の存在有無を検出する方法であって、前項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質又は前項 7 若しくは 8 記載のポリペプチドを特異的に検出することができる第一抗体をマイクロタイターウェルに結合させる第一工程、生体試料中の前項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を、マイクロタイターウェル上の前記第一抗体に結合させる第二工程、第二工程後、マイクロタイターウェル内の全ての非結合状態にある生体試料を除去する第三工程、前記肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質における、第一抗体とは異なるエピトープに結合することができる標識された第二抗体を、第一抗体に結合された肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に結合させる第四工程

、第四工程後、マイクロタイターウェル内の全ての非結合状態にある第二抗体を除去する第五工程、第五工程後、第二抗体の存在有無を当該第二抗体が有する標識を指標にして検出する第六工程を有する方法；

3 2. コレステロール代謝異常を調べるためのマーカーとしての、前項 1 記載の肝臓
5 X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の使用；

3 3. 肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質が、前項 2 乃至 4 記載の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質であることを特徴とする前項 3 2 記載の使用；

3 4. コレステロール代謝異常を調べるためのマーカーとしての、前項 1 乃至 4 記載
10 の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドの使用；

3 5. 肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドが、前項 5、6 又は 1 0 記載のポリヌクレオチドであることを特徴とする前項 3 4 記載の使用；

15 等を提供するものである。

図面の簡単な説明

図 1 は、正常型肝臓X受容体 α 遺伝子と本発明により見出された肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質遺伝子の構造ドメインを図式的に示した図である。翻訳
20 領域は黒色で示した。

図 2 は、正常型肝臓X受容体 α の正常組織における発現を調べた結果を示した図である。当該図は、正常型肝臓X受容体 α を特異的に増幅するように設計された配列番号 9 で示される塩基配列からなるプライマー及び配列番号 1 0 で示される塩基配列からなるプライマーを用いて行った、30サイクルのPCRにより増幅されたPCR産物を示
25 したものである。正常型肝臓X受容体 α に由来するPCR産物は430塩基対を有するDNA断片である。PCR反応により得られたPCR産物は、TAクローニング後、その塩基配列の決定を行い、目的物が増幅されていることを確認した。

図 3 は、本発明により見出された肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質

の正常組織における発現を調べた結果を示した図である。当該図は、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を特異的に増幅するように設計された配列番号9で示される塩基配列からなるプライマー及び配列番号11で示される塩基配列からなるプライマーを用いて行った、30または35サイクルのPCRにより増幅されたPCR産物を示したものである。当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に由来するPCR産物は340塩基対を有するDNA断片である。PCR反応により得られたPCR産物は、TAクローニング後、その塩基配列の決定を行い、目的物が増幅されていることを確認した。

図4は、正常型肝臓X受容体の正常組織における発現を調べた結果を示した図である。当該図は、正常型肝臓X受容体 α を特異的に増幅するように設計された配列番号9で示される塩基配列からなるプライマー及び配列番号10で示される塩基配列からなるプライマーを用いて行った、30サイクルのPCRにより増幅されたPCR産物を示したものである。正常型肝臓X受容体 α に由来するPCR産物は430塩基対を有するDNA断片である。PCR反応により得られたPCR産物は、TAクローニング後、その塩基配列の決定を行い、目的物が増幅されていることを確認した。

図5は、本発明により見出された肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の正常組織における発現を調べた結果を示した図である。当該図は、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を特異的に増幅するように設計された配列番号9で示される塩基配列からなるプライマー及び配列番号11で示される塩基配列からなるプライマーを用いて行った、30または35サイクルのPCRにより増幅されたPCR産物を示したものである。当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に由来するPCR産物は340塩基対を有するDNA断片である。PCR反応により得られたPCR産物は、TAクローニング後、その塩基配列の決定を行い、目的物が増幅されていることを確認した。

図6は、HEK293細胞における一過性発現系におけるレポーターアッセイによる本発明により見出された肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の機能評価の結果を示した図である。TATA-LXREx2-luciferaseベクターと、正常型肝臓X受容体 α (LXR α WT) 発現ベクター又は当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質 (LXR

α V1) 発現ベクターとをHEK293細胞に導入し、肝臓X受容体 α 合成アゴニストT0901317を加えた時の転写活性化能を測定した結果を示している。グラフ下の数値は、添加されたT0901317の最終濃度を表す。また、各々の試験区では1 μ M の9-cis レチノイン酸を含む。誤差線は標準偏差を表す。

- 5 図7は、HEK293細胞において、正常型肝臓X受容体 α (LXR α WT) 発現ベクターと本発明により見出された肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質 (LXR α V1) 発現ベクターとを共存させた時の転写活性化能を測定した結果を示した図である。各々の試験区では1 μ M の 9-cis レチノイン酸を含む。ベクタープラスミドpFLAG-CMV2をトランスフェクトした細胞を用いたときのルシフェラーゼ活性の値を1として、各試験区におけるルシフェラーゼ活性の値を相対値として示した。図7の左図は細胞にエタノールを添加したときの結果を示し、図7の右図は細胞に5 μ g/mlのT0901317を添加したときの結果を示す。誤差線は標準偏差を表す。
- 10

発明を実施するための最良の形態

- 15 以下、本発明について詳細に説明する。

本発明は、肝臓X受容体 α のアイソフォームである肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質、その遺伝子及びそれらの利用に関する。

- 本発明スプライシング変異体タンパク質は、肝臓X受容体 α のアイソフォームであって、少なくともエクソン5にコードされるアミノ酸配列の一部領域が欠失したアミノ酸配列を有する。より詳しくは、本発明スプライシング変異体タンパク質は、少なくともエクソン5にコードされるアミノ酸配列に関して正常型肝臓X受容体 α と異なっており、エクソン5にコードされるアミノ酸配列のうちの一部領域を欠失し、当該一部領域以外のエクソン5にコードされるアミノ酸配列のうち少なくとも一部領域を含むアミノ酸配列を有する。好ましくは、エクソン5より下流の翻訳領域の読み枠は正常型と全く同じ読み枠である、即ち、エクソン5より下流の翻訳領域にコードされるアミノ酸配列は正常型肝臓X受容体 α と同じアミノ酸配列であることがよい。
- 20
- 25

代表的な例としては、肝臓X受容体 α 遺伝子のエクソン5の5'末端90塩基対が欠失してなる翻訳領域にコードされる肝臓X受容体 α のアイソフォーム等をあげること

ができる。

本発明スプライシング変異体タンパク質として、さらに具体的には、(1) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列、(2) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列、及び(3) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列に対して、95%
5 以上のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を有するものがあげられる

かかる本発明スプライシング変異体タンパク質は、正常型肝臓X受容体 α が有する、リガンドによる転写活性化能と比較して、その転写活性化能が低い。例えば、後述の実施例で記載されるように、上記(1)で示される肝臓X受容体 α スプライシング
10 変異体タンパク質が有する、肝臓X受容体 α のリガンドの1つであるT0901317(例えば、Repa et al., Science, 289; 1524-1529, 2000参照。)による転写活性化能は、正常型肝臓X受容体 α が有する当該転写活性化能と比較して極めて弱いレベルであった。さらに、正常型肝臓X受容体 α と当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タン
15 パク質を共発現させたところ、正常型肝臓X受容体 α のみを発現させたときに見られるリガンド依存的な転写活性化は著しく抑制された。以上の知見から、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質は、生体内においてドミナントネガティブ的に、正常型肝臓X受容体 α による正常なコレステロール代謝の阻害に関与することが明らかにされた。

20 「実質的に同一のアミノ酸配列」の定義に関して、一般に生理活性を有するタンパク質のアミノ酸配列が多少変更された場合には、例えば、当該アミノ酸配列中の1又は複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されるような変更があった場合でも、当該タンパク質の生理活性が維持される場合があることはよく知られた事実であり、従
25 って、本明細書でいう「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、特定のアミノ酸配列(即ち、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列)と実質的に同等の生物活性が保持される限り、当該アミノ酸配列中の1又は複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された(例えば、ヒト由来の)肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質も本発明の範囲に含まれることを意味する。前記で改変されるアミノ酸の数については、少なく

とも1残基、具体的には1若しくは数個（ここで「数個」とは、2～約10個程度である。）、又はそれ以上である。かかる改変の数は、当該タンパク質の生理活性が維持される範囲であればよい。より具体的には、配列番号1で示されるアミノ酸配列中の1個以上20個以下、好ましくは1個以上10個以下、さらに好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された（例えば、ヒト由来の）肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質である。このような変異は、例えば、蛋白質が細胞内で受けるプロセッシング、該蛋白質が由来する生物の種差、個体差、器官、組織間の差異等により天然に生じる変異であってもよいし、人為的なアミノ酸の変異（例えば、部位特異的変異導入法や突然変異処理等によって、天然の蛋白質をコードするDNAに変異を導入し発現させることにより作出された蛋白質が有するアミノ酸配列中に存在するアミノ酸の変異）であってもよい。

このようなアミノ酸の欠失、置換若しくは付加による変異体タンパク質は、保存的に置換されたアミノ酸配列を含んでいてもよい。これは特定のアミノ酸残基が物理化学的類似性（例えば、疎水性、電荷、pK、立体構造上における特徴等の類似した性質）を有する残基によって置換されていてもよいことを意味している。このような保存的置換の非限定的な例には、①グリシン、アラニン；②バリン、イソロイシン、ロイシン；③アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、④セリン、スレオニン；⑤リジン、アルギニン；⑥フェニルアラニン、チロシンのグループ内での置換のような、脂肪族鎖含有アミノ酸残基の間の置換や極性基の間の置換等が挙げられる。

アミノ酸の欠失、置換若しくは付加による変異体タンパク質は、例えば、そのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子に公知技術である部位特異的変異導入（例えば、Nelson and McClelland, *Methods Enzymol.*, 216; 279, 1992等、アンバー変異を利用する方法（ギャップド・デュプレックス法、*Nucleic Acids Res.*, 12, 9441-9456, 1984）、変異導入用プライマーを用いたPCRによる方法）を行うことにより得ることができる。

部位特異的変異導入は、導入したい変異を含む合成プライマーを用いて行うことができる。即ち、プライマーとして前記合成オリゴヌクレオチド及びその塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを用いて、正常型肝臓X受容体 α の遺伝子を含む
5 プラスミドを鋳型として、増幅反応を行う。次に、メチル化感受性制限酵素であるDpn Iで処理することにより、新たに形成された変異を有するDNAのみが残る。この反応液を用いて大腸菌XL1-Blue株を形質転換し、アンピシリン含有LB寒天培地に捲く。37℃で一晩培養し、増殖したコロニーからプラスミドを単離する。これにより、変異されたDNAを含むプラスミドを得ることができる。上記方法に基づくキットとしては
10 、例えば、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社製) 等が販売されており、これらを利用してもよい。目的の変異が導入されたことは、その塩基配列を決定することにより確認できる。

さらにまた、アミノ酸配列の欠失、置換若しくは付加を行う方法としては、前記の
15 部位特異的変異導入の他にも、遺伝子を変異原で処理する方法又は遺伝子を制限酵素で開裂し、選択した遺伝子断片を除去、付加若しくは置換し、次いで連結する方法等も挙げることができる。

ここで「正常型肝臓X受容体 α 」とは、同一種の生物由来の当該受容体タンパク質
20 のアミノ酸配列において、天然に最も高頻度に出現するアミノ酸配列からなる肝臓X受容体 α を意味する。例えば、ヒト由来正常型肝臓X受容体 α としては、公共データベースに登録されているアミノ酸配列 (GenBank Accession No. NM_005693) からなる肝臓X受容体 α を挙げることができる。

25 本発明において「アミノ酸同一性」、「塩基同一性」とは、2つの蛋白質又は2つのDNA間の配列の同一性及び相同性をいう。前記「同一性」は、比較対象の配列の全領域にわたって、最適な状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。ここで、比較対象の蛋白質又はDNAは、2つの配列の最適なアラ

インメントにおいて、付加又は欠失（例えばギャップ等）を有していてもよい。このような同一性に関しては、例えば、Vector NTIを用いて、ClustalWアルゴリズム (Nucleic Acid Res., 22(22):4673-4680(1994))を利用してアラインメントを作成することにより算出することができる。尚、当該同一性は、配列解析ソフト、具体的にはVector NTI、GENETYX-MACや公共のデータベースで提供される解析ツールを用いて測定される。前記公共データベースは、例えば、ホームページアドレス<http://www.ddbj.nig.ac.jp>において、一般的に利用可能である。

本発明における「アミノ酸同一性」はアミノ酸配列基準であって、例えば、約95%以上であることが好ましい。「塩基同一性」は塩基配列基準であって、例えば、約95%以上であることが好ましい。

本発明スプライシング変異体タンパク質は、ハイブリダイゼーション法やPCR法等の通常の遺伝子工学的的方法により取得することができる。

例えば、ヒト、サル、ウサギ、ラット、マウス等の哺乳類等の動物組織又はそれらの動物由来培養細胞から、Sambrook and Russell; モレキュラー クローニング第3版、コールドスプリング ハーバー ラボラトリー (2001年) 等に記載される遺伝子工学的的方法に準じてRNAを抽出し、一本鎖cDNAを合成する。具体的には、例えば、肝臓等の組織をチオシアン酸グアニジン等のタンパク質変性剤を含む溶液中で破碎し、さらに当該破碎物にクロロホルム等を加えることによりタンパク質を変性させる。変性タンパク質を遠心分離等により除去した後、回収された上清画分からフェノール、クロロホルム等を用いて全RNAを抽出する。尚、これらの方法に基づいた市販のキットとしては、例えば、ISOGEN (ニッポンジーン社製)、TRIZOL試薬 (インビトロジェン社製) がある。

得られた全RNAを鋳型としてオリゴdTプライマーをmRNAのポリA配列に結合させ、逆転写酵素、例えば、RNaseH- Superscript II Reverse Transcriptase (インビトロジェン社製) 及び添付されたバッファーとオリゴdTプライマーとを用いて、42 °Cで1時間反応させ、次いで99 °Cで5分間加熱することにより、逆転写酵素を失活させる。次

いで、RNaseHにより、mRNA鎖にニックを入れ、該1本鎖cDNAを鋳型にして大腸菌DNAポリメラーゼIにより2本鎖cDNAを合成する。得られた2本鎖cDNAの末端をT4 DNAポリメラーゼにより平滑化する。平滑化された2本鎖cDNAをpBluescript II vectorやバクテリオファージ、例えば、 λ gt11、EMBL3等のベクターにT4リガーゼにより挿入し、cDNAライブラリーを作成する。尚、これらの方法に基づいた市販のキットとしては、例えば、cDNA合成システムプラス（アマシャムバイオサイエンス社製）やTimeSaver cDNA合成キット（アマシャムバイオサイエンス社製）等が挙げられる。このようにして作製されたcDNAライブラリーから、例えば、配列番号2又は4で示される塩基配列の部分塩基配列を有するDNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションの条件としては、ストリンジेंटな条件下でハイブリダイズするような条件をあげることができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、Sambrook J.、Frisch E. F.、Maniatis T.著、モレキュラークローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行（Cold Spring Harbor Laboratory press）等に記載される通常の方法に準じて行うことができる。「ストリンジेंटな条件下」とは、例えば、6×SSC（1.5M NaCl、0.15M クエン酸三ナトリウムを含む溶液を10×SSCとする）を含む溶液中で45℃にてハイブリッドを形成させた後、2×SSCで50℃にて洗浄するような条件（Molecular Biology、John Wiley & Sons、N. Y.（1989）、6.3.1-6.3.6）や、50%ホルムアミド、6×SSC、5×デンハルト溶液、0.5%（w/v）SDS及び熱変性したサケ精子DNA（100 μ g/ml）を含む溶液中に、ランダムプライミング法により $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPで標識された前記プローブ（ 10×10^6 cpm/ml）を用いて、42℃にて一晩保温してハイブリッドを形成させた後、0.1%（w/v）SDSを含む2×SSC中、室温で10分間洗浄し、さらに0.1%（w/v）SDSを含む0.2×SSC中、55℃で10分間2回洗浄するような条件等を挙げることができる。尚、洗浄ステップにおける塩濃度は、例えば、2×SSCで約50℃程度の条件（低ストリンジエンシーな条件）から0.2×SSCで約50℃程度までの条件（高ストリンジエンシーな条件）から選択することができる。洗浄ステップにおける温度は、例えば、室温（低ストリンジエンシーな条件）から65℃（高ストリンジエンシーな条件）から選択することができる。また、塩濃度と温度の両方を変え

することもできる。

次いでX線フィルム（例えば、Hyperfilm-MP；アマシャムバイオサイエンス社製）又はバイオイメーシングシステム（BAS-2000；富士フイルム社製）によりシグナルを検出し、プローブと結合する塩基配列を有するベクターを含む組換え体を得ることが
5 できる。

PCR法のプライマーを設計する場合には、例えば、配列番号2又は4で示される塩基配列から、例えば、以下の条件を満たすように2つを選定すればよい。

- 1) プライマーの長さが15塩基から40塩基、好ましくは、20塩基から30塩基。
- 10 2) プライマーの中のグアニンとシトシンとの割合が、40%～60%、好ましくは45%～55%、より好ましくは50%～55%。
- 3) プライマー配列において、アデニン、チミン、グアニン、シトシンの分布が部分的に偏らないこと。例えば、グアニン、シトシンが繰り返すような領域は適切ではない。
- 15 4) 選定されるプライマーに対応する遺伝子の塩基配列上の距離が、好ましくは100塩基乃至3000塩基、さらに好ましくは、100塩基乃至500塩基。
- 5) 各プライマー自身又は2つのプライマー間に相補的な配列が存在しないこと。

プライマーの塩基配列が選定されれば、市販のDNA合成機により化学合成すればよい。

- 20 例えば、センスプライマーとして配列番号7で示される塩基配列からなるプライマーを、アンチセンスプライマーとして配列番号8で示される塩基配列からなるプライマーを使う組み合わせが挙げられる。PCRの条件としては、例えば、反応液中に、プライマーをそれぞれ200 nMになるように添加し、上記で合成した1本鎖cDNAを鋳型にして、例えば、LA Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）及び当該酵素に添付された反応緩衝液を用いてPCRを行う。かかるPCRとしては、例えば、95℃、3分間の熱変性後、94℃、30秒間、55℃、30秒間、72℃、1分間を1サイクルとして35サイクル程度行う。ここで、上記のようにして合成されたcDNAの代わりに、クロンテック社製クイッククローンcDNA等の市販の各種動物由来のcDNAを用いてもよい。得られた反応液
- 25

の一部を、アガロースゲル電気泳動により解析し、目的のバンドを、直接又はゲルから切り出した後、TAクローニングシステムによりpGEM-T Easyベクター（プロメガ社製）にクローニングする。挿入されたDNA断片の塩基配列は、ダイターミネーター法により決定し、確認することができる。

5

このようにして取得された本発明スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド（即ち、本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子）を、形質転換させる宿主細胞において利用可能なベクターに導入することができる。例えば、宿主細胞中で自立複製可能なベクターであって、宿主細胞からの単離、精製が可能であり、検出可能なマーカーをもつベクターに、本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子を通常の遺伝子工学的手法に準じて組み込むことにより本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子を含むベクターを構築することができる。本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子を組み込むベクターとしては、具体的には大腸菌を宿主細胞とする場合には、例えば、プラスミドpUC19（宝酒造社製）、pBluescript II（Stratagene社）等を挙げることができる。出芽酵母を宿主細胞とする場合には、プラスミドpACT2（クロンテック社製）、pYES2（インビトロジェン社製）等を挙げることができる。また、哺乳類動物細胞を宿主細胞とする場合にはpRc/RSV、pRc/CMV（インビトロジェン社）等のプラスミド等を挙げることができる。

20

本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子の上流に、宿主細胞で機能可能なプロモーターを機能可能な形で結合させ、これを上述のようなベクターに組み込むことにより、本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子を宿主細胞で発現させることが可能なベクターを構築することができる。ここで、「機能可能な形で結合させる」とは、本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子が導入される宿主細胞において、プロモーターの制御下に本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子が発現されるように、当該プロモーターと本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子とを結合させることを意味する。使用されるプロモーターは、形質転換する宿主細胞内でプ

25

ロモーター活性を示すものであって、例えば、宿主細胞が大腸菌である場合には、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター、tacプロモーター、T7プロモーター等のプロモーターを挙げることができる。宿主細胞が動物細胞である場合には、例えば、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、
5 シミアンウイルス(SV40)プロモーター等を挙げることができる。宿主細胞が出芽酵母である場合には、アルコール脱水素酵素(ADH)1遺伝子プロモーター、ガラクトース代謝酵素(GAL)1遺伝子プロモーター等を挙げることができる。

また、宿主細胞において機能するプロモーターをあらかじめ保有するベクターを使用する場合には、ベクター保有のプロモーターと本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子とが機能可能な形で結合するように、当該プロモーターの下流に本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子を挿入すればよい。例えば、前述のプラスミド
10 pRc/RSV、pRc/CMV等は、動物細胞で機能可能なプロモーターの下流にクローニング部位が設けられており、当該クローニング部位に本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子を挿入し動物細胞へ導入すれば、本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子を発現させることができる。また前述の出芽酵母用プラスミドpACT2はADH1プロモーターを有しており、当該プラスミド又はその誘導体のADH1プロモーターの下流に本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子を挿入すれば、本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子を、例えば、CG1945株(クロンテック社製)等の出芽酵母内で大量発現させることが可能な本発明組換えベクターが構築できる。

20 本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子又は本発明組換えベクター等を宿主細胞に導入することにより、本発明形質転換体を取得することができる。本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子又は本発明組換えベクター等を宿主細胞へ導入する方法としては、形質転換される宿主細胞に応じた通常の導入方法を適用することができる。例えば、微生物である大腸菌を宿主細胞とする場合には、モレキュラー・クローニング第3版(Sambrook and Russell、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、2001年)等に記載される塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法等の通常の方法を用いることができる。また、哺乳類動物細胞又は昆虫類細胞を宿

主細胞とする場合は、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法又は
リポフェクション法等の一般的な遺伝子導入法により前記細胞に導入することがで
きる。また、本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子を、酵母を宿主細胞とし
て発現させてもよい。この場合、好ましくは、出芽酵母（例えば、サッカロミセスセ
5 レビシエ）を用いるが、ピキア（*Pichia*）等の酵母を用いてもよい。酵母を形質転換
する方法としては、例えば、Itoらの方法（*J. Bacteriol.* 153; 163-168、1983）
等をあげることができる。

バキュロウイルスやワクシニアウイルス等のウイルスに本発明スプライシング変
異体タンパク質遺伝子を組み込むには、使用しようとするウイルスのゲノムと相同な
10 塩基配列を含有するトランスファーベクターを用いることができる。このようなトラ
ンスファーベクターの具体的例としては、pVL1392、pVL1393（インビトロジェン社製）
等のプラスミドを挙げることができる。本発明スプライシング変異体タンパク質遺
伝子を前記のようなトランスファーベクターに挿入し、当該トランスファーベクター
とウイルスゲノムとを同時に宿主細胞に導入すると、トランスファーベクターとウイ
15 ルスゲノムとの間で相同組換えが起こり、本発明スプライシング変異体タンパク質遺
伝子がゲノム上に組み込まれた組換えウイルスを得ることができる。ウイルスゲノム
としては、バキュロウイルス、アデノウイルス等のゲノムを用いることができる。尚
、ウイルスをベクターに用いる場合には、上述のように一般的な遺伝子導入法により
ウイルスDNAを宿主細胞に導入できるほか、組み換えウイルスを直接、宿主細胞へ感
20 染させることによってもウイルスDNAを宿主細胞に導入することができる。

本発明スプライシング変異体タンパク質は、天然に存在する生物体から抽出、精製
等の操作により、天然タンパク質として調製することができるし、又は、遺伝子工学
的手法を用いて組換えタンパク質として調製することもできる。例えば、ヒト由来の
25 細胞、組織から粗抽出液を調製し、種々のカラムを使うことにより、精製タンパク質
を調製することができる。ここでの細胞としては、本発明スプライシング変異体タン
パク質を産生・発現しているものであれば特に限定されず、例えば、肝臓由来細胞、
腎臓由来細胞等を用いることができる。また、本発明スプライシング変異体タンパク

質の中でヒト以外の生物において産生・発現されているものについては、当該生物から調製することができる。

本発明スプライシング変異体タンパク質を製造するには、上記のようにして本発明
5 スプライシング変異体タンパク質遺伝子又は本発明組換えベクター等を適当な宿主細胞に形質転換し、当該形質転換体（即ち、本発明形質転換体）を培養して、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生させればよい。産生された肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を通常の方法に従って回収する。回収された本発明スプライシング変異体タンパク質は、目的に応じて適当な方法により精製され
10 る。例えば、本発明形質転換体が微生物である場合には、当該形質転換体は、一般微生物における通常の培養に使用される炭素源や窒素源、有機塩、無機塩等を適宜含む各種の培地を用いて培養される。培養は一般微生物における通常の方法に準じて行い、固体培養、液体培養（試験管振とう式培養、往復式振とう培養、ジャーファーマンター（Jar Fermenter）培養、タンク培養等）等が可能である。培養温度は、微生物
15 が生育する範囲で適宜変更できるが、例えば、約15℃～約40℃の培養温度、pHが約6～約8の培地において培養するのが一般的である。培養時間は、培養条件によって異なるが、通常、約1時間～約24時間である。誘導型のプロモーターを用いている場合は、誘導時間は1日以内が望ましく、通常数時間である。

また、上記形質転換体が哺乳類、昆虫類等の動物細胞である場合には、当該形質転
20 換体は一般の培養細胞における通常の培養に使用される培地を用いて培養することができる。動物細胞の場合には、例えば、終濃度が約5% (v/v)～約10% (v/v)となるよう牛胎児血清（Fetal Bovine Serum; FBS）を添加した液体培地（インビトロジェン社製等）を用いて37℃、5% CO₂存在下等の条件で培養すればよい。細胞がコンフルエントになるまで増殖したら、例えば、0.25% (v/v)程度のトリプシン/PBS溶液を加えて
25 て個々の細胞に分散させ、数倍に希釈して新しいシャーレに播種し培養を続ける。昆虫類細胞の場合も同様に、例えば、10% (v/v) FBSを含むGrace培地等或いはSF-900（インビトロジェン社製）等の無血清培地を用いて培養温度約25℃～約30℃で培養すればよい。また、バキュロウイルス等の組換えウイルスベクターを用いる場合、感染

後、72時間以内に細胞を回収するのが望ましい。

- 本発明形質転換体により産生された本発明スプライシング変異体タンパク質の回収は、適宜、通常の単離、精製の方法を組み合わせればよく、例えば、培養終了後、形質転換体の細胞を遠心分離等で集め、集められた該細胞を通常のバッファー、
- 5 例えば、適当なプロテアーゼ阻害剤を含むPBSに懸濁した後、超音波処理、ダウンスホモジナイザー等で破碎し、破碎液を20,000 x gで数十分間から1時間程度遠心分離し、上清画分を回収することにより、目的である本発明スプライシング変異体タンパク質を含む画分を得ることができる。さらに、前記上清画分から通常のタンパク精製技術により各種クロマトグラフィーに供することにより、より精製された目的である
- 10 本発明スプライシング変異体タンパク質を回収することもできる。尚、本発明スプライシング変異体タンパク質の代わりに本発明ポリペプチドを前述と同様な方法により回収することができる。

- このようにして製造された本発明スプライシング変異体タンパク質は、例えば、被
- 15 験物質と本発明スプライシング変異体タンパク質との結合能や結合量等を評価するためのリガンド・レセプターバインディングアッセイ等に用いることができる。

- 例えば、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に作用する物質のスクリーニング方法は、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に被験物質を接触
- 20 させる工程及び当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の変化を測定する工程を有する。

肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質としては、例えば、本発明スプライシング変異体タンパク質を使用することができる。

- 25 尚、上記方法において、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質と接触させる被験物質の濃度は、通常、約0.1 μ M～約10 μ Mであればよく、1 μ M～10 μ Mが好ましい。肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質と被験物質とを接触させる時間は、通常、18時間以上60時間程度であり、好ましくは24時間か

ら40時間程度が挙げられる。

本発明スプライシング変異体タンパク質を用いたリガンド・レセプターバインディングアッセイは、当該タンパク質に対する化学物質の結合能の測定や結合量の定量的
5 ほか、結合特異性、結合力の分析等が可能な試験方法である。例えば、上述のようにして本発明形質転換体から回収された本発明スプライシング変異体タンパク質に標識されたりガンドが結合している状態において、これに被験物質を共存させると、被験物質と標識リガンドとの競合から、両者の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質への親和性に
10 質から遊離し、本発明スプライシング変異体タンパク質に結合した標識リガンドの量が減少し、よって本発明スプライシング変異体タンパク質に結合した標識量が減少する。従って、遊離型の標識リガンドの標識量又は結合型の標識リガンドの標識量をモニターすることにより、被験物質の本発明スプライシング変異体タンパク質への結合能が間接的に分かる。

15 標識リガンドとしては、例えば、トリチウム標識されたオキシコレステロール等を用いることができる。反応系は大きく3群に分けられる。1つの系は、本発明スプライシング変異体タンパク質に標識リガンドが結合しているところへ溶媒のみが添加される群であり、被験物質の濃度がゼロの系に相当し、この系から得られる結合型の標識リガンドの標識量は、標識リガンドの本発明スプライシング変異体タンパク質に対する
20 総結合量を示す。もう1つの系は、本発明スプライシング変異体タンパク質に標識リガンドが結合しているところへ、例えば、標識されていないオキシコレステロールが、本発明スプライシング変異体タンパク質を十分飽和し標識リガンドが結合できなくなるだけの濃度（例えば10 μ M）となるよう添加された系であり、この系から得られる結合型の標識リガンドの標識量は、標識リガンドの本発明スプライシング変異
25 体タンパク質に対する非特異的結合量と判断される。従って、本発明スプライシング変異体タンパク質への標識リガンドの特異的結合量は、前者の総結合量から後者の非特異的結合量を引いた値となる。3番目の系は、本発明スプライシング変異体タンパク質に標識リガンドが結合しているところへ、被験物質が、例えば、最終濃度10 μ M

(この濃度は目的により任意に変更する。)となるよう添加された系である。被験物質が本発明スプライシング変異体タンパク質への結合能を有する場合には、この系から得られる結合型の標識リガンドの標識量は、上記のようにして求めた被験物質の濃度がゼロの時の本発明スプライシング変異体タンパク質への標識リガンドの特異的結合量より小さくなる。このようにしてリガンド・レセプターバインディングアッセイを行うことにより、本発明スプライシング変異体タンパク質に対する被験物質の結合能を調べることができ、被験物質が複数の物質を含む場合にはその中に本発明スプライシング変異体タンパク質に親和性を示す物質が存在するかどうかを調べることもできる。さらに、本発明スプライシング変異体タンパク質に対する被験物質の結合能をより詳細に評価するには、例えば、前記の3番目の系における被験物質の添加濃度を変えて同様にアッセイを行い結合型の標識リガンドの標識量を測定する。当該測定値に基づき、各アッセイにおける結合型と遊離型のリガンド量を算出して、被験物質と本発明スプライシング変異体タンパク質との結合親和性、結合特異性、結合容量等を評価することができる。

また、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質が、肝臓X受容体 α の結合配列を含む転写制御領域の制御下にある遺伝子の転写を活性化するかどうかの評価は、例えば、肝臓X受容体 α の結合配列を含む転写制御領域の下流に連結されてなるレポーター遺伝子を使用して、後述のレポーターアッセイ等の試験方法により評価することができる。肝臓X受容体 α は、核内レセプターの1つであるレチノイドX受容体(RXR)とヘテロダイマーを形成し、肝臓X受容体 α の結合配列を含む転写制御領域に結合することにより、該転写制御領域の制御下にある遺伝子の転写を制御する。肝臓X受容体 α の結合配列としては、"AGGTCA" (又は関連の6ヌクレオチドからなるモチーフ)が同方向に2つ並んだ構造を有するコアモチーフを含む転写調節領域の特定配列(シス配列)をあげることができる。コアモチーフ間のスペーサーはヘテロダイマーの組み合わせにより異なっており、肝臓X受容体とレチノイド受容体とのヘテロダイマーの場合には4 bp (DR4)である(例えば、Lehman et al., J. Biol. Chem., 272; 3137-3140, 1997参照。)

本発明の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質、その遺伝子又はそれら部分領域は、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質とその機能が直接的又は間接的に関与する病的症状との関連性を解明し、そして、それら病的症状の予防又は診断・治療に有用な方法や薬剤を開発するために極めて有用である。上述のよう

5 　　ようなスクリーニング方法により、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に作用する物質や、前記物質に対する拮抗物質を探索することができ、これら物質を医薬品の候補として提供することが可能となる。

- 10 　　本発明スクリーニング方法により選抜される物質又は当該物質に対する拮抗物質を有効成分とする薬剤は、その有効量を経口的または非経口的にヒト等の哺乳動物に対し投与することができる。例えば、経口的に投与する場合には、当該薬剤は錠剤、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の通常の形態で使用する事ができる。また、非経口的に投与する場合には、前記薬剤を溶液、乳剤、懸濁液等の通常の液剤の形態で
- 15 　　使用することができる。前記形態の前記薬剤本脂肪蓄積調節剤を非経口的に投与する方法としては、例えば注射する方法、坐剤の形で直腸に投与する方法等を挙げることができる。

- 前記の適当な投与剤型は許容される通常の担体、賦型剤、結合剤、安定剤、希釈剤
- 20 　　等に本発明スクリーニング方法により選抜される物質又は当該物質に対する拮抗物質を配合することにより製造することができる。また注射剤型で用いる場合には、許容される緩衝剤、溶解補助剤、等張剤等を添加することもできる。

- 投与量は、投与される哺乳動物の年令、性別、体重、疾患の程度、前記薬剤の種類
- 25 　　、投与形態等によって異なるが、通常は経口の場合には成人で1日あたり有効成分量として約1mg～約2g、好ましくは有効成分量として約5mg～約1gを投与すればよく、注射の場合には成人で有効成分量として約0.1mg～約500mgを投与すればよい。また、前記の1日の投与量を1回または数回に分けて投与することがで

きる。

本発明スプライシング変異体タンパク質が直接的又は間接的に関与する病的症状との関連性は、まずリガンドを特定し、次いでリガンドと本発明スプライシング変異体タンパク質とにより転写制御される遺伝子群を特定することによって解明することができる。リガンドの特定は、本発明スプライシング変異体タンパク質又は本発明ポリペプチドに被験物質を接触させることにより、本発明スプライシング変異体タンパク質又は本発明ポリペプチドにより転写制御される遺伝子群の発現レベルの変化を検出することによって行うことができる。

- 10 また、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に作用する物質のスクリーニング方法は、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生する細胞に被験物質を接触させる工程、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質により発現調節を受ける他のタンパク質の産生量を測定する工程、及び前記産生量に基づき被験物質の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に対する作用性を評価
- 15 する工程を有する方法であってもよい。

- ここで、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生する細胞として、例えば、本発明スプライシング変異体タンパク質を産生する細胞を挙げることができる。肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生する細胞と接触させる被験物質の濃度は、通常、約0.1 μ M～約10 μ Mであればよく、1 μ M～10 μ M
- 20 が好ましい。肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生する細胞と被験物質とを接触させる時間は、通常、18時間以上60時間程度であり、好ましくは24時間から40時間程度が挙げられる。

- また、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に作用する物質のスクリー
- 25 ニング方法としては、例えば、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生する細胞に、前記肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のリガンドを接触させ、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質により発現調節を受ける他のタンパク質の産生量を測定する第一工程、本発明スプライシング変異体タンパ

ク質を産生する細胞に、前記肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のリガンド及び被験物質の両者を接触させ、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質により発現調節を受ける他のタンパク質の産生量を測定する第二工程、及び、前記第一工程と前記第二工程とで測定された前記他のタンパク質の産生量の差異に基づき被験物質の前記リガンドに対する拮抗作用性を評価する工程を有する方法もあげることができる。ここで、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質として、例えば、本発明スプライシング変異体タンパク質を挙げることができる。肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生する細胞と接触させるリガンド又は被験物質の濃度は、通常、約 $0.1\mu\text{M}$ ～約 $10\mu\text{M}$ であればよく、 $1\mu\text{M}$ ～ $10\mu\text{M}$ が好ましい。肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生する細胞とリガンド又は被験物質とを接触させる時間は、通常、18時間以上60時間程度であり、好ましくは24時間から40時間程度が挙げられる。

さらにまた、一般的に行われているバインディングアッセイ等においては、本発明スプライシング変異体タンパク質又はその断片を用いて行うことができる。また、本発明スプライシング変異体タンパク質と当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質が結合する標的遺伝子との発現系を構築し、リガンド添加による標的遺伝子産物であるタンパク質の増加を検出する方法もあげられる。例えば、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチル転移酵素、 β -ガラクトシダーゼ等のようなレポータータンパク質を標的遺伝子のプロモーターの制御下で発現するようなレポーター遺伝子を用いることにより、宿主細胞中での標的遺伝子の発現の有無を容易に検出することができる。さらに、本発明スプライシング変異体タンパク質の全長の代わりに、当該タンパク質のリガンド結合領域とDNA結合性タンパク質とのキメラ遺伝子を発現させ、レポーター遺伝子として、DNA結合性タンパク質が結合する塩基配列の下流に最小活性プロモーター及び前述のレポータータンパク質をコードする遺伝子を連結したプラスミドを用いることができる。DNA結合性タンパク質としては、例えば、GAL4、LexA等を用いることができる。本発明スプライシング変異体タンパク質と当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質が結合する標的遺伝子との発現系及び当該タンパク質のリガンド結合領域とDNA結合性タンパク質とのキメラ遺伝子を発

現させるプラスミドは、通常の遺伝子組換え技術により調製することができる。

さらにまた、細胞中で発現されたmRNAから標識化されたDNAを転写させ、得られた標識DNAをDNAライブラリーチップとハイブリダイズさせることにより本発明スプライシング変異体タンパク質により発現制御された遺伝子を特定することもできる。

5

本発明スプライシング変異体タンパク質が直接的又は間接的に関与する病的症状との関連性は、本発明スプライシング変異体タンパク質を発現する細胞に、アンタゴニスト又はアゴニストを接触させた時の標的遺伝子の発現量と、被験物質を接触させていない前記本発明スプライシング変異体タンパク質発現細胞における標的遺伝子の発現量とを比較することにより、活性化される遺伝子を特定することにより解明が可能である。

10

本発明スプライシング変異体タンパク質の存在有無を検出する方法としては、生体試料中のメッセンジャーRNA (mRNA) から相補的DNA (cDNA) を合成する第一工程、本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子又は本発明ポリペプチド遺伝子等に対応する前記相補的DNA (cDNA) の部分領域を増幅する第二工程、及び増幅された部分領域を検出する第三工程を有する方法をあげることができる。

15

本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子又は本発明ポリペプチド遺伝子等としては、具体的には、配列番号2又は4で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド等をあげることができる。

20

また、第二工程において、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10又は配列番号11で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドから選択される1つ又は複数をプライマーとして用いるPCR法により増幅するような工程を好ましくあげることができる。

25

また、本発明スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配

列を有するポリヌクレオチド等を発現する能力を欠損させてなる遺伝子欠損動物等の実験動物及びその利用に関しては、本発明スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子の機能を有する、実験動物由来の内在性スプライシング変異体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を破壊（不活性化）することによりモデル動物を作成し、このモデル動物の物理学的、生物学的、病理学的及び遺伝子的特徴を分析することにより、本発明スプライシング変異体タンパク質の機能と疾病との関連性を解明することも可能となる。

また、前述した内在性肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を破壊（不活性化）されたモデル動物に、本発明のヒト由来遺伝子を導入することにより、本発明のヒト由来遺伝子のみを有するモデル動物を作成し、導入されたヒト由来遺伝子をターゲットとした薬剤（化合物等）を投与することにより、その薬剤の治療学的効果を評価することも可能である。

本発明は、さらに、遺伝子治療法のための、本発明ポリペプチド遺伝子が有する塩基配列に対する特異的DNAプローブの使用や、遺伝子治療法のための、本発明ポリペプチド遺伝子が有する塩基配列に対する特異的RNAプローブの使用も提供する。このような本発明スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列（又は当該塩基配列に相補性を有する塩基配列）を有する遺伝子（DNA又はRNA）の全部又は一部よりなる、正常型肝臓X受容体 α による正常なコレステロール代謝の阻害に関与する疾患の診断用プローブ及び当該プローブを含有してなる当該障害を伴う疾患の診断薬をも提供するものである。例えば、病理切片に対して本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子のIn situハイブリダイゼーションを行うことにより、当該障害を伴う疾患の有無や進行具合を検出することができる。

ここで診断用プローブとしては、本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子（DNA、RNA、cDNA）のアンチセンス鎖の全部又は一部であり、プローブとして成立する程度の長さ（少なくとも20ベース以上）を有するものであれば特に制限されるものではない。当該プローブを診断薬の有効成分とするためには、プローブが

分解されないような適当なバッファー類や滅菌水に溶解することが好ましい。また、In situハイブリダイゼーションの方法としては、例えば、J. Neurobiol. 29、 1-17 (1996)に記載の手法が挙げられる。また、In situ PCRの方法を利用することも可能である。

- 5 前記診断においては、プローブのみならず、本発明スプライシング変異体タンパク質を特異的に認識する抗体（後述参照）を使用することができ、この場合には、免疫染色法により正常型肝臓X受容体 α による正常なコレステロール代謝の阻害に関与する疾患の有無や進行具合を検出することができる（Dev. Biol. 170、 207-222 (1995); J. Neurobiol. 29、 1-17 (1996)参照）。使用される抗体は、例えば、Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H.D. ら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press 出版 New York 1989等に記載の通常の方法により作製することができる。

- 本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子又は本発明ポリペプチド遺伝子は、それ自体、本発明スプライシング変異体タンパク質の機能を遺伝子レベルで制御する
15 アンチセンス医薬品として、遺伝子治療での使用において有用である。例えば、配列番号4に含まれる20塩基以上の塩基配列、好ましくは30塩基前後の塩基配列を用いることができる。

- 上述のアンチセンス医薬品には、DNAのみならずRNAも含まれる。また、塩基配列は、センス配列でもアンチセンス配列（即ち、センス配列に相補性を有する塩基配列）
20 でも構わない。

- ここで「本発明ポリペプチド」、「本発明ポリペプチド遺伝子」とは、前述の如く、本発明スプライシング変異体タンパク質の部分領域（部分ポリペプチド）又はこれに対応する本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子の部分領域（部分ポリヌクレオチド）であり、少なくともエクソン5にコードされるアミノ酸配列の一部領域が
25 欠失することにより新たに連結された2つのアミノ酸残基を含むアミノ酸配列からなるポリペプチド又はこれに対応するポリヌクレオチドを意味する。好ましくは、少なくとも6個の連続するアミノ酸又は少なくとも18個の連続する塩基を含むことが

よい。

代表的な例としては、肝臓X受容体 α 遺伝子のエクソン5の5'末端90塩基対が欠失してなる翻訳領域にコードされる肝臓X受容体 α のアイソフォームのアミノ酸配列のうち、正常型肝臓X受容体 α には存在しない領域からなるポリペプチド又はこれ

5 に対応するポリヌクレオチド等をあげることができる。

さらに具体的には、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド又はこれに対応する塩基配列（例えば、配列番号4で示される塩基配列）を有するポリヌクレオチド等があげられる。

また、上記のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド又は上記のポリヌクレオチドを含有する組換えベクターは、前述の本発明組換えベクター調製方法に準じて調製すればよい。さらにまた、このようにして調製された組換えベクターを前述の本発明形質転換体調製方法に準じて宿主細胞に導入することにより形質転換体を調製することもできる。

15 本発明スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列のうち、配列番号4で示される塩基配列は、プローブ又はプライマーとして本発明スプライシング変異体タンパク質以外のさらなる肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の探索ツールとして利用することが可能である。その長さは少なくとも15個の連続する塩基を含む塩基配列であることが望ましい。プローブは慣用方法により、
20 例えば、放射性同位元素、ジゴキシゲニン、ビオチン、検出可能な酵素等により標識できる。例えば放射能ラベルされたリンを用いる場合、cDNA断片を用いる場合には、ランダムプライミングラベルにより標識し、また、合成プライマーを使用する場合はリン酸化酵素により5'末端標識すると都合がよい。このように標識したプローブをcDNAライブラリーとハイブリダイゼーションしてクローニングを行う。ハイブリダイゼーションは、慣用された方法、条件により行うことができる。例えば、1XSSC、0.5% (w/v) SDS、65℃での洗浄である。cDNAライブラリーは、哺乳類を含む動物由来のものであってもよいが、特にヒトの組織・細胞由来のものが望ましい。

本発明スプライシング変異体タンパク質を特異的に認識する抗体又は抗体の一部を作製することができる。

配列番号 1 又は 3 で示されるアミノ酸配列を有する本発明スプライシング変異体タンパク質を特異的に認識する抗体は、例えば、前述の遺伝子組換えの通常の方法により得られた本発明スプライシング変異体タンパク質又はその部分領域（ポリペプチド）、或いは配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を有するペプチド断片を用いて、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、ヤギ又はヒツジ等の通常抗体作成に用いられる動物に免疫することにより得ることができる。また、免疫した哺乳動物の脾臓細胞とミエローマ細胞とを融合することによりモノクローナル抗体を得ることもできる。

これらの抗体を利用した、本発明スプライシング変異体タンパク質の存在有無を検出する方法としては、例えば、本発明スプライシング変異体タンパク質若しくは本発明ポリペプチドを特異的に検出することができる抗体を用いた抗原抗体反応に基づき前記肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を検出する工程を有する方法をあげることができる。さらに具体的には、例えば、本発明スプライシング変異体タンパク質若しくは本発明ポリペプチドを特異的に検出することができる第一抗体をマイクロタイターウェルに結合させる第一工程、生体試料中の本発明スプライシング変異体タンパク質を、マイクロタイターウェル上の前記第一抗体に結合させる第二工程、第二工程後、マイクロタイターウェル内の全ての非結合状態にある（即ち、遊離の）生体試料を除去する第三工程、前記肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質における、第一抗体とは異なるエピトープに結合することができる標識された第二抗体を、第一抗体に結合された肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に結合させる第四工程、第四工程後、マイクロタイターウェル内の全ての非結合状態にある（即ち、遊離の）第二抗体を除去する第五工程、第五工程後、第二抗体の存在有無を当該第二抗体が有する標識を指標にして検出する第六工程を有する本発明スプライシング変異体タンパク質の存在有無を検出する方法があげられる。

実施例

以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1 (本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子のクローニング)

- 5 ヒト肝臓由来cDNAライブラリー（インビトロジェン社製SUPERScript Human Liver cDNA Library）を鋳型として、ヒト肝臓X受容体 α 遺伝子のエクソン3からエクソン8までに相当する領域（リガンド結合領域を含む領域）を、プログラム可能なサーマルサイクラーを用いたPCR法により増幅した。プライマーは、ヒト肝臓X受容体 α 遺伝子の塩基配列（Willy et al., Genes Dev. 9: 1033-1045, 1995; GenBank Accessi
- 10 on number, NM_005693）に基づき、エクソン3のセンス鎖の塩基配列を有するプライマー（配列番号5、hLXR α F1）、及びエクソン8のアンチセンス鎖の塩基配列を有するプライマー（配列番号6、hLXR α R1）を設計し、化学合成した。PCR法の反応条件は、下記の通りであった。0.5 unitのKOD-Plus- DNA Polymerase（東洋紡績社製）、20 pmolのセンスプライマーhLXR α F1（配列番号5）、20 pmolのアンチセンスプライ
- 15 イマーhLXR α R1（配列番号6）及び鋳型である一本鎖cDNAを含む50 μ lの反応液（MgSO₄、デオキシリボヌクレオチド混合液を含む）を準備した。この反応液を、94 $^{\circ}$ Cで2分間熱変性した後、94 $^{\circ}$ Cで15秒間、55 $^{\circ}$ Cで30秒間及び68 $^{\circ}$ Cで90秒間を1サイクルとして30サイクルの反応に供した。得られたPCR産物を、1%アガロースゲルにて電気泳動し増幅されたDNA断片を回収した。回収されたDNA断片は、あらかじめ制限
- 20 酵素MluI及びXbaIで切断しておいたpM（クロンテック社製）にクローニングした。即ち、制限酵素MluI及びXbaIで切断しておいたpM（約100 ng）と上記のインサートDNA（約100 ng）とを混合した後、これにT4リガーゼを添加し、当該混合物を16 $^{\circ}$ Cで120分間保温した。ライゲーションは、用いたキットにより推奨される方法に従って行われた。得られたライゲーション反応液により、大腸菌DH5 α 株のコンピテントセル（東
- 25 洋紡績社製）が形質転換された。得られた菌体を、アンピシリンを含むLB寒天培地上にまき、これを37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。培養後、当該寒天培地上に形成されたアンピシリン耐性コロニーからプラスミドDNAを調製し、プラスミドに挿入されたDNA断片の塩基配列を決定した。塩基配列が正常型と異なり、エクソン5の5'末端90塩

基対が欠失したクローンが得られた。当該クローン（プラスミド）を、pM-hLXR α V1と命名した。このようにして、本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子の部分断片がクローニングされた。

5 実施例2 （エクソン5にコードされるアミノ酸配列の一部領域が欠失してなる肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の同定）

エクソン5にコードされるアミノ酸配列の一部領域が欠失してなる肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質をコードする翻訳領域全体を単離するために、翻訳領域全体を増幅できるようなプライマーを設計した。センスプライマーとしてhLXR α (ORF) -F/H(配列番号7)及びアンチセンスプライマーとしてhLXR α (ORF) -R/B(配列番号8)を用い、かつヒト大腸癌由来cDNA（クロンテック社製）を鋳型に用いてPCR法によりDNA断片を増幅を行った。PCR法の反応条件は、以下の通りであった。2.5 unitのEx Taq DNA Polymerase（宝酒造社製）、20 pmolのセンスプライマーhLXR α (ORF) -F/H(配列番号7)、20 pmolのアンチセンスプライマーhLXR α (ORF) -R/B(配列番号8)及び鋳型である一本鎖cDNA（クロンテック社製の大腸癌由来cDNA）を含む50 μ lの反応液（MgCl₂、デオキシリボヌクレオチド混合液を含む）を準備した。この反応液を、96℃で30秒間、59℃で30秒間及び72℃で165秒間を1サイクルとして40サイクルの反応に供した。得られたPCR産物の一部を、臭化エチジウムを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、DNA断片を増幅を確認した後、肝臓X受容体 α 遺伝子のエクソン5中に認識部位が存在する制限酵素Aor51AI（宝酒造社製）で処理することにより正常型肝臓X受容体 α 遺伝子由来のPCR産物を切断した。反応生成物をpGEM-T Easy vector（プロメガ社製）にTAクローニングシステムを用いてライゲーションした。ライゲーションは、用いたキットにより推奨される方法に従って行われた。得られたライゲーション反応液により、大腸菌DH5 α 株のコンピテントセル（東洋紡績社製）が形質転換された。得られた菌体を、X-gal及びイソプロピル β -D-ガラクトピラノシド（IPTG）が塗布されたアンピシリンを含むLB寒天培地上にまき、これを37℃で一晩培養した。培養後、当該寒天培地上にアンピシリン耐性白色コロニーを形成した形質転換体を用いてコロニーPCRを行うことにより、エクソン5にコードされるアミノ

酸配列の一部領域が欠失した肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質をコードする翻訳領域全体を含むクローンの検出を行った。コロニーPCR法の反応条件は以下の通りであった。KOD-Plus- DNA Polymerase (東洋紡績社製)、20 pmolのセンスプライマーhLXR α F1 (配列番号5)、20 pmolのアンチセンスプライマーhLXR α R1 (配列番号6) 及び鋳型である一本鎖cDNAを含む50 μ lの反応液(MgSO₄、デオキシリボヌクレオチド混合液を含む)を準備した。これに、プレートから採取されたわずかな量の上記の白色を呈する形質転換体を懸濁した後、この反応液を94 $^{\circ}$ Cで2分間熱変性した後、94 $^{\circ}$ Cで15秒間、59 $^{\circ}$ Cで30秒間及び68 $^{\circ}$ Cで45秒間を1サイクルとして35サイクルの反応に供した。得られたPCR産物を臭化エチジウムを含むアガロースゲルにて電気泳動し、DNA断片の増幅を確認した後、DNA断片の増幅が確認された形質転換体からプラスミドを抽出した。当該プラスミド中に挿入されたDNA断片の塩基配列を確認することにより、エクソン5の5'末端90塩基対が欠失してなる、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質をコードする翻訳領域全体を含むクローンを得た。図1は、ヒト正常型肝臓X受容体 α をコードする翻訳領域と、本実施例により得られた肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質コードする翻訳領域との比較を表している。ヒト正常型肝臓X受容体 α をコードする翻訳領域と比較して、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質をコードする翻訳領域における相違点は、エクソン5の5'末端90塩基対の欠失のみであり、その他の塩基配列には違いは認められなかった。エクソン5において欠失した塩基数が90個(30アミノ酸をコードする)、即ち3の倍数であることから、エクソン5より下流の翻訳領域の読み枠は正常型と全く同じであった。当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質をコードする翻訳領域は、417アミノ酸(1251塩基)からなるタンパク質のアミノ酸配列(配列番号1)をコードする。

25 実施例3 (ヒト組織における本発明スプライシング変異体タンパク質遺伝子の転写物の存在)

本発明により見い出された肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質遺伝子の転写物がヒト正常組織由来のRNA中に存在するのを確認した。正常型肝臓X受容体

α タンパク質遺伝子および当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質遺伝子
子の特異的に増幅させる、配列番号9、10又は11で示されるプライマーを用い
つヒト正常組織由来のcDNAを鋳型に用いてPCRを行った。当該PCRにおいて、プライマ
ーとしてhLXR α Ex3-F（配列番号9）及びhLXR α R2（配列番号10）を用いる場合に
5 は、正常型肝臓X受容体 α 遺伝子の転写物由来のDNA断片の増幅は430塩基対を有す
るDNA断片の増幅となる。一方、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパ
ク質遺伝子の特異的に増幅させるプライマーの組合せであるhLXR α Ex3-F（配列番号
9）及びhLXR α VIR1（配列番号11）を用い上記と同様にPCRを行うと、当該肝臓X受
容体 α スプライシング変異体タンパク質遺伝子の転写物由来のDNA断片の増幅は3
10 40塩基対を有するDNA断片の増幅となる。尚、コントロールとして、試薬中のDNA
混入をチェックするために、鋳型DNA無添加にてPCRを行った。その結果を図2～5に
示す。これらの図から明らかなように、

- 1) 正常型肝臓X受容体 α 遺伝子はいずれのヒト正常組織においても発現していた。
- 2) 当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質遺伝子は、心臓組織におい
15 て高レベルに発現していた。心臓組織中では特に左心室において高レベルに発現して
いた。

尚、コントロールは常に陰性であった。これらの結果は当該肝臓X受容体 α スプライ
シング変異体タンパク質遺伝子が、組織特異的に発現していることを示しており、特
異的な発現制御を受けていることが判明した。

20

実施例4 （本発明スプライシング変異体タンパク質を発現するベクターの構築）

正常型肝臓X受容体 α 遺伝子及び本発明により見出された肝臓X受容体 α スプライ
シング変異体タンパク質遺伝子が各々クローニングされたプラスミドを、製造者によ
り推奨された方法に従って、制限酵素Hind III及びBamH Iで切断した。当該酵素によ
25 る処理液をアガロースゲル電気泳動に供し、ゲルからインサートDNAに相当するDN
A断片を回収した。回収されたDNA断片は、あらかじめHind III及びBamH Iで切断
しておいたpFLAG-CMV2（シグマ）にクローニングした。Hind III及びBamH Iで切断し
ておいたpFLAG-CMV2（約300 ng）と上記のインサートDNA（約500 ng）とを混合した

後、これにT4リガーゼを添加し、当該混合物を16℃で30分間のライゲーションを行った。ライゲーションは、用いたキットにより推奨される方法に従って行われた。得られたライゲーション反応液により、大腸菌DH5 α 株のコンピテントセル（東洋紡績社製）が、製造者により推奨される方法に従って形質転換された。得られた菌体を、

5 アンピシリンを含むLB寒天培地上にまき、これを37℃で一晩培養した。培養後、当該寒天培地上に形成されたアンピシリン耐性コロニーからプラスミドDNAを調製し、プラスミドに挿入されたDNA断片の塩基配列を決定した。得られた塩基配列を、前述のダイレクトシーケンスで得られた塩基配列と比較して、翻訳領域の塩基配列が完全に一致していることが確認されたプラスミドを選択し、各々のプラスミドをpCMV

10 2-hLXR α WT、pCMV2-hLXR α V1と命名した。

実施例5 （肝臓X受容体 α の結合配列を有するルシフェラーゼレポーター遺伝子を含むプラスミドの作製）

マウスメタロチオネインI遺伝子のTATAボックス近傍の塩基配列とリーダー配列に

15 由来する塩基配列からなる2本のオリゴヌクレオチド、即ち、配列番号12で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号13で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをアニーリングさせて2本鎖DNAとし、これにT4ポリヌクレオチドキナーゼを作用させて、その両末端をリン酸化した（以下、当該DNAをTATA DNAと記す）。一方、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドpGL3-Basicベ

20 クター（プロメガ社製）を制限酵素Bgl II及びHind IIIで消化した後、これに細菌由来アルカリフォスファターゼ（BAP）を加えて65℃で1時間保温した。次いで、当該保温液を低融点アガロース（Agarose L；ニッポンジーン社製）を用いた電気泳動に供した後、検出されたバンド部分のゲルからDNA断片を回収した。回収された約100 ngのDNA断片と、約1 μ gの前記のTATA DNAとを混合し、T4リガーゼで結合させる

25 ことによりプラスミドpGL3-TATAを作製した。

肝臓X受容体 α の結合配列（LXRE）を含むコレステロール7 α -ヒドロキシラーゼ（CYP7A1）遺伝子上流の塩基配列（配列番号14）からなるオリゴヌクレオチド及び当該塩基配列と相補性を有する塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（配列番号15）

を合成し、これらをアニーリングさせて2本鎖DNA（以下、LXRE DNAと記す。）とした後、これにT4リガーゼを作用させることにより、LXRE DNAをタンデムに結合させた。得られたDNA断片にT4ポリヌクレオチドキナーゼを作用させてその両末端をリン酸化することにより、リン酸化タンデム結合型DNA断片を得た。

- 5 次に、pGL3-TATAを制限酵素Mlu Iで消化した後、大腸菌由来アルカリホスファターゼを加えて65℃で1時間保温した。当該保温液を低融点アガロースゲル電気泳動に供した後、検出されたバンド部分のゲルからDNA断片を回収した。回収された約100 ngのDNAと、約1 μ gの上記のリン酸化タンデム結合型DNA断片とを混合した後、これにT4リガーゼを添加し、当該混合物を16℃で30分間のライゲーションを行った。
- 10 ライゲーションは、用いたキットにより推奨される方法に従って行われた。得られたライゲーション反応液により、大腸菌DH5 α コンピテントセル（宝酒造社製）が、製造者により推奨される方法に従って形質転換された。得られた菌体を、X-gal及びイソプロピル β -D-ガラクトピラノシド（IPTG）が塗布されたアンピシリンを含むLB寒天培地上にまき、これを37℃で一晩培養した。培養後、当該寒天培地上に形成された
- 15 アンピシリン耐性白色コロニーからプラスミドDNAを調製した。さらに挿入されたDNA断片の塩基配列を決定した。得られた塩基配列から、pGL3-TATAのMlu I部位にLXRE DNAがタンデムに4つ結合されてなるDNA断片を有するプラスミドを選択し、これをプラスミドpGL3-TATA-LXREx4と命名した。

- 20 実施例6 （一過性発現系におけるレポーターアッセイによる肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の機能評価）

- ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞株（ATCC; CRL-1573）を、チャコールデキストランにより低分子物質を除去した牛胎児血清（FBS）10%と抗生物質としてペニシリン（100 unit/ml）とストレプトマイシン（100 μ g/ml）とを含み、フェノールレッドを含まないダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）において5% CO₂ 存在下37℃にて継代培養した。
- 25 継代培養されたHEK293細胞株を10cm細胞培養用ディッシュに約2 $\times$ 10⁶ 個になるように撚いた。これを37℃で1日間培養した後、当該細胞に、Lipofectamine（インビトロジェン社製）を用いて当該キットが推奨する方法に従って、実施例4で作製さ

れた正常型肝臓X受容体 α を発現するベクター及びヒト肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を発現するベクターと、実施例5で作製されたレポータープラスミドpGL3-TATA LXRE x4とを各々1 μ g導入した。これを37℃で24時間培養した後、当該細胞をピペッティングにより回収した。回収された細胞を均一懸濁した後、これを96穴プレートに播種した。さらに、当該プレートにエタノールで溶解しておいた各種の化合物が添加された。これを37℃でさらに約2日間培養した後、当該プレートに5倍に希釈された細胞溶解剤PGC50（ニッポンジーン社製）を50 μ l/wellずつ加えて、時々軽くゆすりながら室温で30分間放置することにより、細胞を溶解させた。このようにして調製された細胞溶解液を10 μ lずつ96穴白色サンプルプレート（ベルトール社製）に採取し、ルミノメーターLB96p（ベルトール社製）で50 μ l/wellずつ酵素基質液PGL100（ニッポンジーン社製）を添加し、直ちに発光量を5秒間測定した。

正常型肝臓X受容体 α 又は肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に対する各種肝臓X受容体 α リガンド（アゴニスト）の測定結果をそれぞれ図6及び7に示した。肝臓X受容体 α のリガンドの1つであるT0901317による転写活性化能は、正常型肝臓X受容体 α が有する当該転写活性化能と比較して極めて弱い又は認められないレベルであった（図6）。また、正常型肝臓X受容体 α と当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を共発現させたところ、正常型肝臓X受容体 α のみを発現させたときに見られるリガンド依存的な転写活性化が著しく抑制された（図7）。

産業上の利用の可能性

本発明により、正常型肝臓X受容体 α による正常なコレステロール代謝の阻害に関与する新規な肝臓X受容体 α のアイソフォームである肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質、その遺伝子及びそれらの利用が提供可能となる。

配列表フリーテキスト

配列番号5

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 6

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 7

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

5 配列番号 8

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 9

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 10

10 PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 11

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 12

プロモーターDNAを合成するために設計されたオリゴヌクレオチド

15 配列番号 13

プロモーターDNAを合成するために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 14

肝臓X受容体結合エレメントを合成するために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 15

20 肝臓X受容体結合エレメントを合成するために設計されたオリゴヌクレオチド

請求の範囲

1. 肝臓X受容体 α のアイソフォームであって、少なくとも肝臓X受容体 α 遺伝子のエクソン5にコードされるアミノ酸配列の一部領域が欠失してなる、肝臓X受容体 α ス
5 プライミング変異体タンパク質。

2. エクソン5以外のエクソンにコードされるアミノ酸配列は正常型肝臓X受容体 α と実質的に同一である、請求項1記載の肝臓X受容体 α スプライミング変異体タンパク質。

10

3. 下記のいずれかのアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項2記載の肝臓X受容体 α スプライミング変異体タンパク質。

(1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列

(2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列

15 (3) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対して、95%以上のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列

4. 正常型肝臓X受容体 α が有する、リガンドによる転写活性化能と比較して、その転写活性化能が低いことを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の肝臓X受容体
20 α スプライミング変異体タンパク質。

5. 請求項3記載の肝臓X受容体 α スプライミング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列、又は当該塩基配列に相補性を有する塩基配列、を有するポリヌクレオチド。

25

6. 配列番号2で示される塩基配列、又は当該塩基配列に相補性を有する塩基配列、を有するポリヌクレオチド。

7. 請求項1記載の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の部分ポリペプチドであって、請求項1記載の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列のうち、少なくともエクソン5にコードされるアミノ酸配列の一部領域が欠失することにより新たに連結された2つのアミノ酸残基を含むアミノ酸配列からなるポリペプチド。

8. 配列番号3で示されるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項7記載のポリペプチド。

9. 請求項8記載のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列、又は当該塩基配列に相補性を有する塩基配列、を有するポリヌクレオチド。

10. 配列番号4で示される塩基配列、又は当該塩基配列に相補性を有する塩基配列、を有するポリヌクレオチド。

11. 請求項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、又は請求項5もしくは6記載のポリヌクレオチド、を含有する組換えベクター。

12. 請求項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、又は請求項5もしくは6記載のポリヌクレオチド、が宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

13. 請求項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、又は請求項5もしくは6記載のポリヌクレオチドを、宿主細胞中で自立複製可能なベクターに導入する工程を有するベクターの製造方法。

1 4. 請求項 1 2 記載の形質転換体を培養して、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生させる工程を有する、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の製造方法。

5 1 5. 請求項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、又は請求項 5 もしくは 6 記載のポリヌクレオチド、を発現する能力を欠損させてなる遺伝子欠損動物。

10 1 6. 請求項 7 もしくは 8 記載のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、又は請求項 9 もしくは 1 0 記載のポリヌクレオチド、を含有する組換えベクター。

1 7. 請求項 7 もしくは 8 記載のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列
15 を有するポリヌクレオチド、又は請求項 9 もしくは 1 0 記載のポリヌクレオチド、が宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

1 8. 請求項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に被験物質を接触させる工程、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の変化を測定する工程を有する、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に作用する物質のスクリーニング方法。
20

1 9. 請求項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生する細胞に被験物質を接触させる工程、前記細胞において当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質により発現調節を受ける他のタンパク質の産生量を測定する工程、及び前記産生量に基づき被験物質の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質タンパク質に対する作用性を評価する工程を有する、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に作用する物質のスクリーニング方法。
25

20. 請求項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生する細胞に、前記肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のリガンドを接触させ、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質により発現調節を受ける他のタンパク質の産生量を測定する第一工程、請求項1乃至4記載のい
5 ずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を産生する細胞に、前記肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のリガンド及び被験物質の両者を接触させ、当該肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質により発現調節を受ける他のタンパク質の産生量を測定する第二工程、及び、前記第一工程と前記第二工程とで
10 測定された前記他のタンパク質の産生量の差異に基づき被験物質の前記リガンドに対する拮抗作用性を評価する工程を有する、肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に作用する物質のスクリーニング方法。

21. 請求項18記載のスクリーニング方法により選択された肝臓X受容体 α ス
15 プライシング変異体タンパク質に作用する物質。

22. 肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に作用する請求項21記載の物質に対する拮抗物質。

20 23. 請求項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を特異的に認識する抗体又は抗体の一部。

24. 請求項5又は6記載のポリヌクレオチドに基づき設計されてなるプライマー。

25 25. 遺伝子治療のための、請求項9又は10記載のポリヌクレオチドが有する塩基配列に対する特異的DNAプローブの使用。

26. 遺伝子治療のための、請求項9又は10記載のポリヌクレオチドが有する塩

基配列に対する特異的RNAプローブの使用。

27. 請求項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の存在有無を検出する方法であって、生体試料中のメッセンジャーRNA (mRNA)

- 5 から相補的DNA (cDNA) を合成する第一工程、請求項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質又は請求項7もしくは8記載のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド或いは請求項9記載のポリヌクレオチド、に対応する前記相補的DNA (cDNA) の部分領域を増幅する第二工程、及び増幅された部分領域を検出する第三工程を有する方法。

10

28. 第二工程において、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10又は配列番号11で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドから選択される1つ又は複数をプライマーとして用いるPCR法により増幅する、請求項27記載の方法。

15

29. 請求項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質若しくは請求項7又は8記載のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド或いは請求項9記載のポリヌクレオチドが、配列番号4で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドである、請求項27記載の方法。

20

30. 請求項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の存在有無を検出する方法であって、請求項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質又は請求項7若しくは8記載のポリペプチドを特異的に検出することができる抗体を用いた抗原抗体反応に基づき前記肝臓X受

25 容体 α スプライシング変異体タンパク質を検出する工程を有する方法。

31. 請求項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の存在有無を検出する方法であって、請求項1乃至4記載のいずれかの肝臓X受

- 容体 α スプライシング変異体タンパク質又は請求項 7 若しくは 8 記載のポリペプチドを特異的に検出することができる第一抗体をマイクロタイターウェルに結合させる第一工程、生体試料中の請求項 1 乃至 4 記載のいずれかの肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質を、マイクロタイターウェル上の前記第一抗体に結合させる
- 5 第二工程、第二工程後、マイクロタイターウェル内の全ての非結合状態にある生体試料を除去する第三工程、前記肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質における、第一抗体とは異なるエピトープに結合することができる標識された第二抗体を、第一抗体に結合された肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質に結合させる
- 10 第四工程、第四工程後、マイクロタイターウェル内の全ての非結合状態にある第二抗体を除去する第五工程、第五工程後、第二抗体の存在有無を当該第二抗体が有する標識を指標にして検出する第六工程を有する方法。

3 2. コレステロール代謝異常を調べるためのマーカーとしての、請求項 1 記載の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質の使用。

15

3 3. 肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質が、請求項 2 乃至 4 記載の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質であることを特徴とする請求項 3 2 記載の使用。

- 20 3 4. コレステロール代謝異常を調べるためのマーカーとしての、請求項 1 乃至 4 記載の肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドの使用。

- 25 3 5. 肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドが、請求項 5、6 又は 1 0 記載のポリヌクレオチドであることを特徴とする請求項 3 4 記載の使用。

1/3

図面

図 1

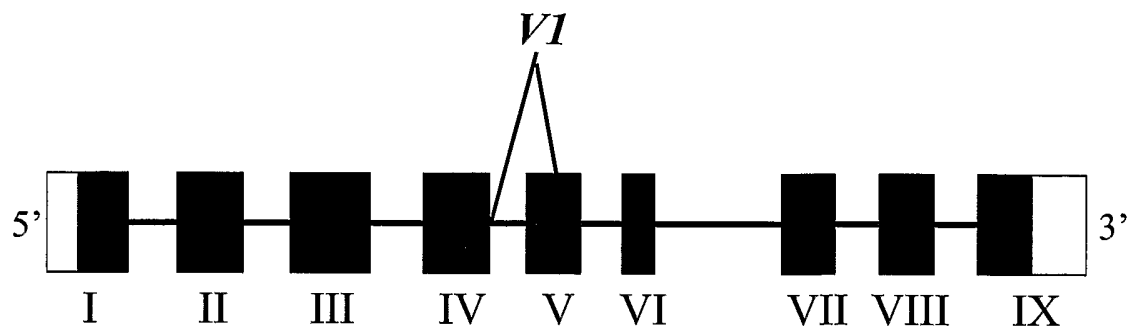


図 2

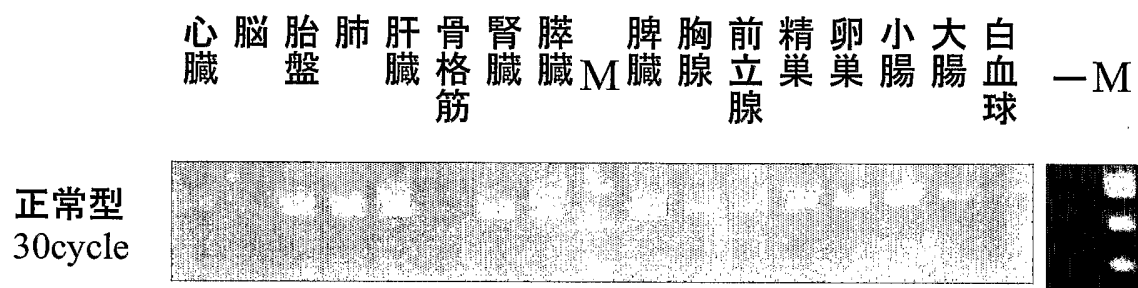
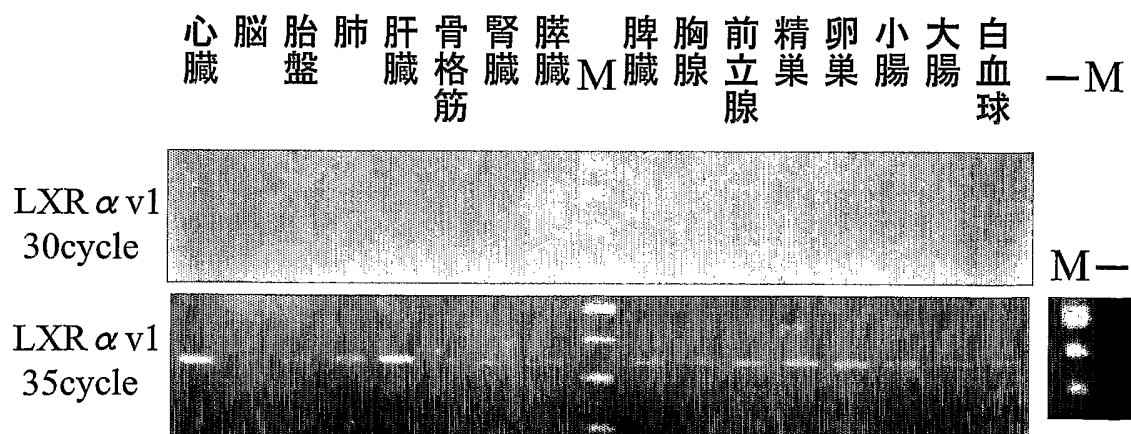


図 3



2/3

図 4

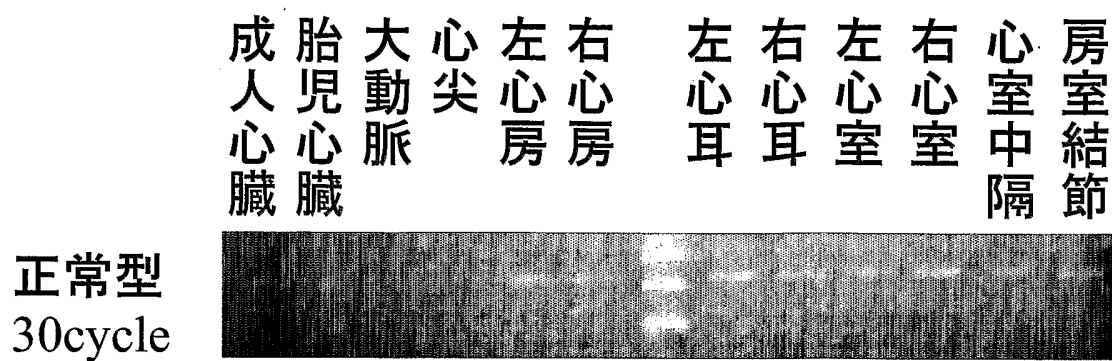


図 5

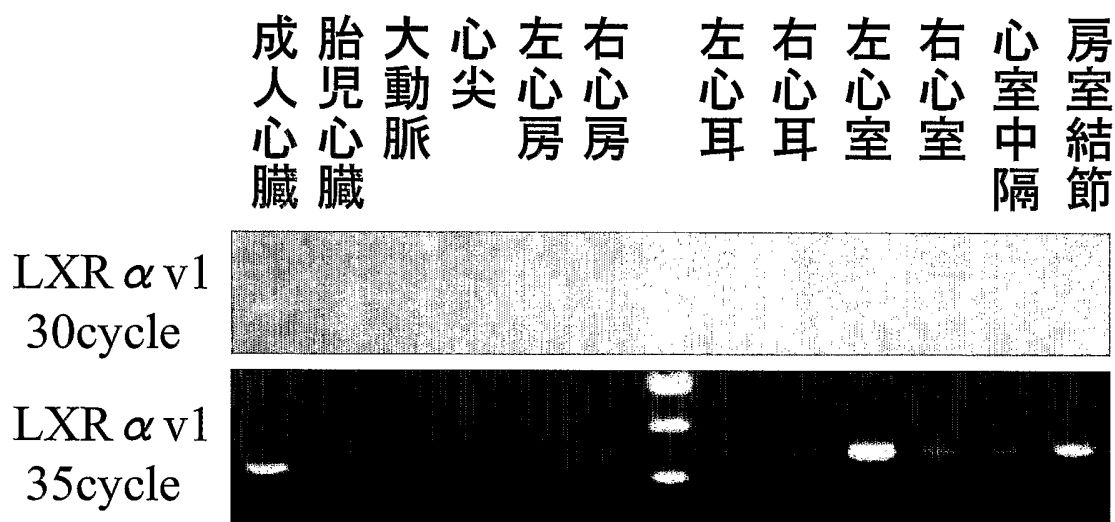


図 6

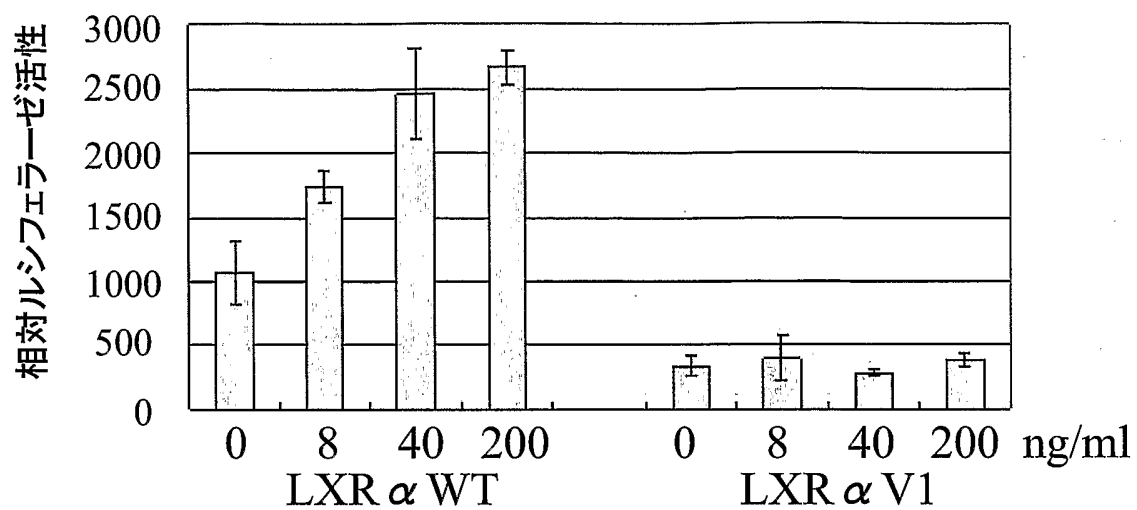
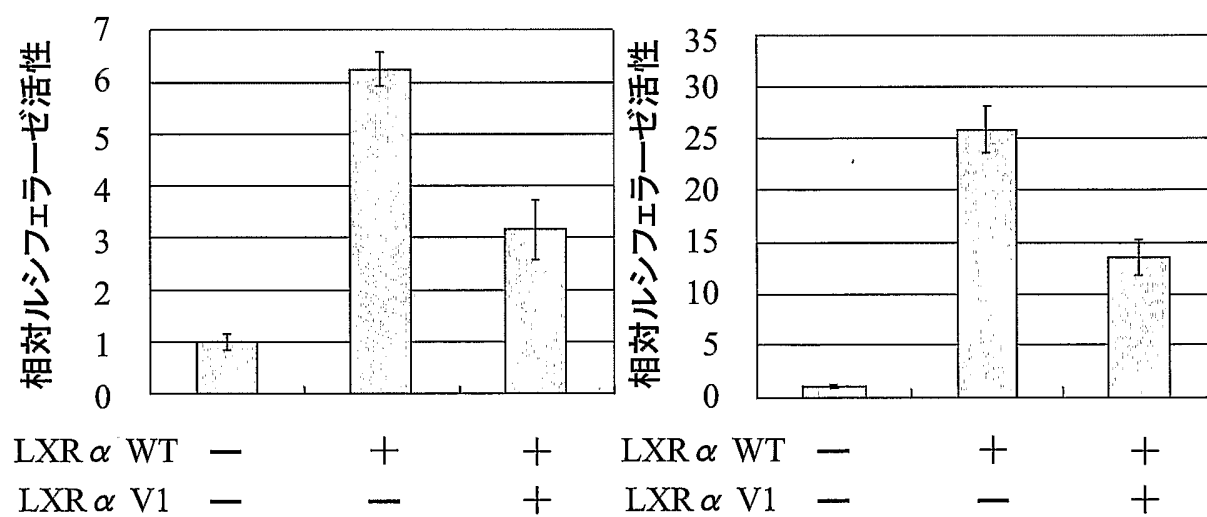


図 7



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Chemical Company Limited

<120> Splicing variants protein of Liver X receptor、 its gene and the use thereof

<130> S10308W001

<150> JP 2003-179158

<151> 2003-06-24

<160> 15

<210> 1

<211> 417

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Leu Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Asp Ile Pro Pro Asp Ser

1

5

10

15

Ala Val Glu Leu Trp Lys Pro Gly Ala Gln Asp Ala Ser Ser Gln Ala

20

25

30

Gln Gly Gly Ser Ser Cys Ile Leu Arg Glu Glu Ala Arg Met Pro His

35

40

45

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

2/9

50	55	60
Ala Leu Leu Thr Arg	Ala Glu Pro Pro Ser Glu Pro Thr Glu Ile Arg	
65	70	75
Pro Gln Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys Met Leu Gly Asn Glu		80
	85	90
Leu Cys Ser Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Asn Val		95
	100	105
Leu Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Ile Lys		110
	115	120
Gly Ala His Tyr Ile Cys His Ser Gly Gly His Cys Pro Met Asp Thr		125
	130	135
Tyr Met Arg Arg Lys Cys Gln Glu Cys Arg Leu Arg Lys Cys Arg Gln		140
145	150	155
Ala Gly Met Arg Glu Glu Cys Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Arg Leu		160
	165	170
Lys Lys Leu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Gln Ala His Ala Thr Ser Leu		175
	180	185
Pro Pro Arg Ala Ser Ser Pro Pro Gln Ile Leu Pro Gln Leu Ser Pro		190
	195	200
Glu Gln Leu Gly Met Ile Glu Lys Leu Val Ala Ala Gln Gln Gln Cys		205
	210	215
Asn Arg Arg Ser Phe Ser Asp Arg Leu Arg Val Thr Glu Ile Val Asp		220
225	230	235
Phe Ala Lys Gln Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Arg Glu Asp Gln		240
	245	250
Ile Ala Leu Leu Lys Thr Ser Ala Ile Glu Val Met Leu Leu Glu Thr		255
	260	265
Ser Arg Arg Tyr Asn Pro Gly Ser Glu Ser Ile Thr Phe Leu Lys Asp		270

3/9

275 280 285
 Phe Ser Tyr Asn Arg Glu Asp Phe Ala Lys Ala Gly Leu Gln Val Glu
 290 295 300
 Phe Ile Asn Pro Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Asn Glu Leu Gln
 305 310 315 320
 Leu Asn Asp Ala Glu Phe Ala Leu Leu Ile Ala Ile Ser Ile Phe Ser
 325 330 335
 Ala Asp Arg Pro Asn Val Gln Asp Gln Leu Gln Val Glu Arg Leu Gln
 340 345 350
 His Thr Tyr Val Glu Ala Leu His Ala Tyr Val Ser Ile His His Pro
 355 360 365
 His Asp Arg Leu Met Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu
 370 375 380
 Arg Thr Leu Ser Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu
 385 390 395 400
 Gln Asp Lys Lys Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His
 405 410 415
 Glu

<210> 2

<211> 1254

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgtccttgt ggctgggggc cctgtgcct gacattctc ctgactctgc ggtggagctg 60
 tggaagccag gcgcacagga tgcaagcagc cagggccagg gaggcagcag ctgcattctc 120
 agagaggaag ccaggatgcc ccactctgct gggggtactg caggggtggg gctggaggct 180

4/9

```

gcagagccca cagccctgct caccagggca gagccccctt cagaaccac agagatccgt 240
ccacaaaagc ggaaaaaggg gccagcccc aaatgtctgg ggaacgagct atgcagcgtg 300
tgtggggaca aggcctcggg ctccactac aatgttctga gctgcgagg ctgcaaggga 360
ttcttccgcc gcagcgtcat caaggagcg cactacatct gccacagtgg cggccactgc 420
cccatggaca cctacatgcg tcgcaagtgc caggagtgtc ggcttcgcaa atgccgtcag 480
gctggcatgc gggaggagtg tgtcctgtca gaagaacaga tccgcctgaa gaaactgaag 540
cggcaagagg aggaacaggc tcatgccaca tccttgcccc ccagggttc ctacaccccc 600
caaatcctgc ccagctcag ccggaacaa ctgggcatga tcgagaagct cgtcgtgcc 660
cagcaacagt gtaaccggcg ctcttttct gaccggcttc gattcacgga gatagttgac 720
tttgctaaac agctaccgg ctctctgcag ctacccggg aggaccagat tgccctgctg 780
aagacctctg cgtcgtggt gatgttctg gagacatct ggaggtacaa cctggggagt 840
gagagtatca ccttctcaa ggatttcagt tataaccggg aagactttgc caaagcaggg 900
ctgcaagtgg aattcatcaa cccatcttc gatttctca gggccatgaa tgagctgcaa 960
ctcaatgatg ccgagtttgc ctgtctatt gctatcagca tcttctctgc agaccggccc 1020
aacgtgcagg accagctcca ggtagagagg ctgcagaca catatgtgga agccctgcat 1080
gcctacgtct ccatccacca tccccatgac cgactgatgt tcccacggat gctaatgaaa 1140
ctggtagacc tccggacct gagcagcgt cactcagagc aagtgtttgc actgcgtctg 1200
caggacaaaa agtccacc gctgtctct gagatctggg atgtgcacga atga 1254

```

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Arg Ser Phe Ser Asp Arg Leu Arg Val Thr Glu Ile Val Asp Phe Ala

1

5

10

15

Lys Gln Leu Pro

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

cgctcctttt ctgaccggct tcgagtcacg gagatagttg actttgctaa acagctaccc 60

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 5

tatcagacgc gtcggcatgc gggaggagtg t 31

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

6/9

<400> 6

tcacgctctc gatcattcgt gcacatccca ga 32

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 7

cgaagcttgc caccatgtcc ttgtggctgg gggc 34

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 8

cgggatcctt cgtgcacatc ccaga 25

<210> 9

<211> 24

7/9

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 9

gagcgcacta catctgccac agtg 24

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 10

gcaaagtcaa ctatctcctg ca 22

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 11

gcaaagtcaa ctatctccgt ga 22

<210> 12

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to synthesize promoter DNA

<400> 12

gatctcgact ataaagaggg caggctgtcc tctaagcgtc accacgactt ca 52

<210> 13

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to synthesize promoter DNA

<400> 13

agcttgaagt cgtggtgacg cttagaggac agcctgccct ctttatagtc ga 52

<210> 14

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to synthesize liver X receptor binding element

<400> 14

cgcggtttgct ttggtcactc aagttcaagt tattga 46

<210> 15

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to synthesize liver X receptor binding element

<400> 15

cgcggtcaata acttgaactt gagtgaccaa agcaaa 46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009227

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, 5/06, 1/15, 1/19, 1/21, C07K14/705, 16/28,
C12Q1/02, 1/68, C12P21/02, A61K38/16, G01N33/15, 33/50

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.Cl⁷ C12N15/00-90, 1/00-7/08, C07K14/00-16/46, C12Q1/00-70,
C12P21/00-08, A61K38/16, G01N33/15, 33/50

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)

JICST FILE (JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS/CA (STN),
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2002/077229 A2 (LION BIOSCIENCE AG.), 03 October, 2002 (03.10.02), (Family: none)	1-20, 23, 24, 27-35
A	WO 2003/060078 A2 (X-CEPTOR THERAPEUTICS, INC.), 24 July, 2003 (24.07.03), & US 2003/0212111 A1	1-20, 23, 24, 27-35
A	WO 2003/082198 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 09 October, 2003 (09.10.03), (Family: none)	1-20, 23, 24, 27-35

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 August, 2004 (09.08.04)

Date of mailing of the international search report
24 August, 2004 (24.08.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009227

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Z. ZHANG et al., Genomic Analysis of the Nuclear Receptor Family: New Insights Into Structure, Regulation, and Evolution From the Rat Genome, Genome Research, April 2004, 14(4), pages 580 to 590	1-20, 23, 24, 27-35
A	A. FUJITA et al., Differential Regulation of Ligand-Dependent and Ligand-Independent Functions of the Mouse Retinoid X Receptor β by Alternative Splicing Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 255, pages 625 to 630	1-20, 23, 24, 27-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009227

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒ a sequence listing

☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐ in written format

☒ in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐ contained in the international application as filed

☒ filed together with the international application in computer readable form

☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009227

Box No. II 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. ☒ Claims Nos.: 25 and 26

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The method of these claims pertains to methods for treatment of a human body by therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to conduct international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).

2. ☒ Claims Nos.: (see below)

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:

Parts of claims 1-20, 23, 24 and 27-35 as well as claims 21 and 22 are not covered by this international search because the claims are not clearly defined or because they are not fully supported by the description and not clearly and fully disclosed in the description. For the reason, see extra sheet.

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 No. III 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:

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. ☐ 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.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009227

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

Claims 1, 2 and 7

The concrete structures of "protein" and "polypeptide" according to these claims are not clear. Consequently, these claims cannot be stated as being clearly defined.

With respect to the protein and polypeptide, what matter other than the proteins obtained in Examples falls under the "liver X receptor α splicing variant protein" of these claims is not clear. Therefore, the invention of these claims cannot be stated as being fully supported by the description and cannot be stated as being disclosed clearly and fully to such an extent that persons skilled in the art to which the invention pertains can carry out the same.

Claims 2 and 3

With respect to the terminology "substantially identical amino acid sequence" used in these claims, although defined in the description (see page 10 line 20 to page 11 line 11), the possibility that for example, protein having 20 amino acids deleted, substituted or added has substantially the same biological activity as that of protein free from such deletion, substitution and addition is low. Therefore, the proteins having "substantially identical amino acid sequence" according to these claims cannot be stated as being fully supported by the description and cannot be stated as being disclosed clearly and fully to such an extent that persons skilled in the art to which the invention pertains can carry out the same.

Claims 3, 5, 6, 8-13, 15-17, 27, 29, 34 and 35

Whether the terminology "having a sequence" and "sequence, having" used in these claims means "composed of a sequence" or "containing a sequence" is ambiguous. Therefore, these claims cannot be stated as being clearly defined.

Claims 7-10, 16 and 17

With respect to the "polypeptide" and "polynucleotide" of these claims, even if Examples, etc. are studied, the practicality thereof is not described. Therefore, the invention of these claims cannot be stated as being fully supported by the description and cannot be stated as being disclosed clearly and fully to such an extent that persons skilled in the art to which the invention pertains can carry out the same.

Claims 11-20, 23, 24 and 27-35

The invention of these claims is unclear because the concrete structures of "liver X receptor α splicing variant protein" and "polypeptide" according to the invention are not clear. Therefore, these claims cannot be stated as being clearly defined, and the invention of these claims cannot be stated as being fully supported by the description and cannot be stated as being disclosed clearly and fully to such an extent that persons skilled in the art to which the invention pertains can carry out the same.

Claims 21 and 22

The concrete structure of the substances of these claims is not clear even if Examples, etc. are studied. Therefore, these claims cannot be stated as being clearly defined, and the invention of these claims cannot be stated as being fully supported by the description and cannot be stated as being disclosed clearly and fully to such an extent that persons skilled in the art to which the invention pertains can carry out the same.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009227

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

Claims 32-35

The correlation between cholesterol metabolism abnormality and liver X receptor α splicing variant protein is not described even if Examples, etc. are studied. Therefore, the invention of these claims cannot be stated as being fully supported by the description and cannot be stated as being disclosed clearly and fully to such an extent that persons skilled in the art to which the invention pertains can carry out the same.

Any search has not been conducted on the above inventions not fully supported by the description and not clearly and fully disclosed in the description.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, 5/06, 1/15, 1/19, 1/21, C07K 14/705, 16/28, C12Q 1/02, 1/68,
C12P 21/02, A61K 38/16, G01N 33/15, 33/50

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 C12N15/00-90, 1/00-7/08, C07K 14/00-16/46, C12Q 1/00-70, C12P21/00-08,
A61K 38/16, G01N 33/15, 33/50

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)
JICSTファイル(JOIS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS/CA (STN),
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2002/077229 A2 (LION BIOSCIENCE AG) 2002.10.03 (ファミリーなし)	1-20, 23, 24, 27-35
A	WO 2003/060078 A2 (X-CEPTOR THERAPEUTICS, INC.) 2003.07.24 & US 2003/0212111 A1	1-20, 23, 24, 27-35
A	WO 2003/082198 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 2003.10.09 (ファミリーなし)	1-20, 23, 24, 27-35

☒ 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

09.08.2004

国際調査報告の発送日

24. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

阪野 誠司

4 N

9 2 8 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Z. ZHANG, et. al, Genomic Analysis of the Nuclear Receptor Family: New Insights Into Structure, Regulation, and Evolution From the Rat Genome, Genome Research, April 2004, 14 (4), p.580-90	1-20, 23, 24, 27-35
A	A. FUJITA, et. al, Differential Regulation of Ligand-Dependent and Ligand-Independent Functions of the Mouse Retinoid X Receptor β by Alternative Splicing, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 255, p.625-30	1-20, 23, 24, 27-35

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第Ⅱ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 (PCT 17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 25, 26 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、
上記請求の範囲に係る方法は、治療による人体の処置方法に関するものであって、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係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 (下記参照) 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1-20, 23, 24, 27-35の一部、並びに、請求の範囲21, 22は、請求の範囲が明確に記載されていないか、または、明細書に十分に裏付けられておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていないため、国際調査を行っていない。理由は、特別ページを参照。
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Ⅲ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。

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。

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。

請求の範囲 1、2、7

上記請求の範囲に係る「タンパク質」及び「ポリペプチド」は、その具体的な構造が不明である。したがって、該請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。

また、該タンパク質及びポリペプチドについて、実施例で得られたタンパク質以外、どのようなものが、該請求の範囲に係る「肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質」に該当するか不明である。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

請求の範囲 2、3

上記請求の範囲における「実質的に同一のアミノ酸配列」について、明細書中で定義されているが（第10頁第20行―第11頁第11行参照）、例えば、20個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたタンパク質が、欠失、置換若しくは付加のないタンパク質と実質的に同等の生物活性を有する蓋然性は低い。そうしてみると、上記請求の範囲の「実質的に同一のアミノ酸配列」を有するタンパク質について明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

請求の範囲 3、5、6、8―13、15―17、27、29、34、35

上記請求の範囲における「配列を有する」及び「配列、を有する」という記載は、「配列からなる」ことを意味するのか、「配列を含む」ことを意味するのか不明であり、該請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。

請求の範囲 7―10、16、17

上記請求の範囲に係る「ポリペプチド」及び「ポリヌクレオチド」は、実施例等を見ても、その有用性が示されていない。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

請求の範囲 11―20、23、24、27―35

上記請求の範囲に係る発明は、該発明における「肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質」及び「ポリペプチド」の具体的な構造が不明であるため、不明確である。したがって、上記請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。また、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

請求の範囲 21、22

上記請求の範囲に係る物質は、実施例等を見ても、その具体的な構造が不明である。したがって、上記請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。また、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

請求の範囲 3 2 - 3 5

実施例等を見ても、コレステロール代謝異常と肝臓X受容体 α スプライシング変異体タンパク質との相関関係が示されていない。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

なお、上記の如く、明細書に十分に裏付けられておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。