

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年10月18日 (18.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/77166 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 14/47, C12N 15/12, C07K 16/18, A61K 39/395, 38/17, 45/00, A61P 25/28, 3/04, 15/00, 13/12, 13/10, 15/08, 15/16, 21/00 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).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/03112 (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 武田春日ハイ ツ802号 Ibaraki (JP). 熊野 聡 (KUMANO, Satoshi) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代3丁目12番地1 武田松代レジデンス504号 Ibaraki (JP).
- (22) 国際出願日: 2001年4月11日 (11.04.2001)
- (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2000-109382 2000年4月11日 (11.04.2000) JP (74) 代理人: 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka (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,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 新規生理活性ペプチドおよびその用途

(57) Abstract: Peptides having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or a substantially the same amino acid sequence and being capable of binding to receptor proteins having the amino acid sequences represented by SEQ ID NO:11, 12 or 13 or a substantially the same amino acid sequence, and precursors, amides, esters and salts of these peptides. DNAs, etc. encoding these peptides are usable in: (i) developing receptor-binding assay systems and screening candidate compounds for drugs with the use of an expression system of a recombinant receptor protein; (ii) developing drugs with little side effect such as memory function improving agents, appetite improving agents and function controllers for uterus, kidney, prostate, testis or skeletal muscle, etc.

(57) 要約:

新規な生理活性ペプチドおよびその用途を提供する。該ペプチドは、配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、かつ配列番号: 1 1、配列番号: 1 2 または配列番号: 1 3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に結合する能力を有するペプチドであり、その前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩も包含する。該ペプチドをコードするDNA等は、(i) 組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、(ii) 副作用の少ない、記憶機能改善剤、食欲改善剤または子宮、腎臓、前立腺、精巣もしくは骨格筋における機能調節剤などの医薬の開発等に用いることができる。



WO 01/77166 A1



(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, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

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。

## 明 細 書

## 新規生理活性ペプチドおよびその用途

## 5 発明の分野

本発明は、ガラニン・レセプターに対する活性化因子（リガンドペプチド等）に関する。

## 従来の技術

10 ガラニン(galanin)は、ブタ小腸抽出液中に最初に見出された29アミノ酸残基からなる生理活性ペプチドであり〔フェブス・レター (FEBS Lett.) , 164, pp124-128 (1983)〕、ブタ以外にも、多くの哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類にわたって見出されている。ガラニンのアミノ酸配列は、ヒト (FEBS Lett., 283, pp189-194 (1991))、ウシ (FEBS Lett., 234, pp400-406 (1988))、ラット (J. Biol. Chem., 262, pp 16755-16758 (1987))、ヒツジ (Peptides, 12, pp855-859 (1991)) などで報告されており、N末端からの15アミノ酸残基は種間で保存されている。

ブタ・ガラニンには、123アミノ酸残基からなる前駆体蛋白質 [preprogalanin(1-123) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, pp6287-6291 (1986)]、また、ガラニンに比べてN端に9残基長い前駆体preprogalanin(24-61) amide、ガラニンのN端4残基を欠落したpreprogalanin(37-61) amideが知られている (Peptides, 13, pp1055-1060 (1992))。

ガラニンの生理作用としては、脳海馬でのアセチルコリン遊離阻害作用 (Brain Research, 709, pp81-87 (1996))、脳視床下部での節食中枢促進作用 (Obesity Research, 3, pp5735-5895 (1995))、脳下垂体での下垂体ホルモン放出促進作用 (Neuroscience Letter, 75, pp49-54 (1987); Endocrinology, 134, pp529-536 (1994); Peptides, 7, pp51-53, (1986))、膵臓でのインスリン分泌阻害作用 (Acta Physiol. Scand., 139, pp591-596 (1990)) などが知られており、その生理作用はガラニンレセプターを介して発揮されるものと考えら

れている。

ガラニン・レセプターには、3種類のサブタイプ (GALR1、GALR2、GALR3) が存在しており、GALR1についてはヒト、ラットおよびマウス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 90, pp3845-3849 (1993); J. Mol. Neurosci., 6, pp33-41 (1995); 5 FEBS Lett., 411, pp225-230 (1997))、GALR2 についてはラット (FEBS Lett., 405, pp285-290 (1997); Mol. Pharmacol., 52, pp337-343 (1997); J. Biol. Chem., 272, pp24612-24616 (1997))、GALR3についてはラット (J. Biol. Chem., 272, pp31949-31952 (1997))の各遺伝子がクローニングされている。また、これら3種類のガラニン・レセプターは、Gタンパク質共役型レセプターに特徴的な7  
10 個の疎水的領域 (膜貫通ドメイン) を有しており、Gタンパク質を活性化することにより細胞内情報伝達系を刺激するものと考えられる。

ガラニンは、これら3種類のいずれのサブタイプのガラニン・レセプターとも結合することが確認されている。ガラニンの結合親和性はGALR1に対して最も強く、次いでGALR2、GALR3の順に強く、GALR3に対する親和性はGALR1に対する親和性  
15 性に比べて約10倍弱い (J. Biol. Chem. 272, 31949-31952, 1997)。また、ガラニンは、GALR1発現細胞ではcAMPの産生阻害を引き起こすこと (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3845-3849, 1993)、GALR2発現細胞ではcAMPの産生阻害を引き起こすこと (Mol. Pharmacol., 52, pp337-343 (1997))、イノシトール・りん酸代謝系の亢進や細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を引き起こすこと (J.  
20 Biol. Chem. 272, 24612-24616, 1997) が報告されている。

#### 発明の目的

従来、G蛋白質共役型レセプターと生理活性物質 (即ち、リガンド) との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質 (即ち、リガンド) と同様なシグナル  
25 伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるG蛋白質共役型レセプター蛋白質を新規に見出し、その新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の特異的リガンドを見出すことは、アゴニスト、ア

ンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

さらにその際、レセプターの生理機構を明らかにするため、ヒトレセプター遺伝子あるいはリガンド遺伝子に対する例えばマウス等のカウンターパート遺伝子を取得し、その遺伝子産物の蛋白化学的諸性質、生物学的諸活性を検索し、また動物体内での質的、量的動態や生理機構を詳細に調べて、ヒトにおける機能を推定することは、有効な医薬を創製する上でも重要な事柄である。

さらに候補となるアゴニスト、アンタゴニストを選択する際に、種差の有無を認識しながら、候補化合物を選定、決定することは、医薬品の創製上欠くべからざる項目となっている。

- 10 本発明は、上記のように、有用なガラニンレセプターに対する特異的なヒト由来のリガンド (WO 99/48920号) の、マウスホモログリガンド (以下、「本発明のペプチド」と称する場合がある) を提供するものである。

#### 発明の概要

- 15 本発明者らは、ガラニン・レセプターGALR2発現細胞およびガラニン・レセプターGALR1発現細胞を構築し、これらを用いることにより、ガラニン・レセプターのそれぞれのサブタイプに対するアゴニスト活性を測定する簡便なアッセイ法、即ち、 $[^3\text{S}]$ GTP $\gamma$ S結合試験法を完成した。このアッセイ法により、GALR2アゴニストをスクリーニングした結果、ガラニン・レセプターのそれぞれのサブタイプに対する活性化作用がガラニンとは異なる、マウス由来の新規活性化因子を見出すことに成功した。さらに、本発明者らは、この知見に基づきこの新規活性化因子とガラニン・レセプターとの結合性を変化させる化合物のスクリーニングが可能であることを見出した。

すなわち、本発明は、

- 25 (1) 配列番号：1で表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ペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (2) 配列番号：2で表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上記(1)記載の前駆体、

- (3) 上記(1)記載のペプチドもしくは前駆体をコードするDNAを含有するDNA、
- (4) 配列番号：3または配列番号：20で表される塩基配列を含有する上記(3)記載のDNA、
- 5 (5) 上記(3)記載のDNAを含有する組み換えベクター、
- (6) 上記(5)記載の組み換えベクターで形質転換された形質転換体、
- (7) 上記(6)記載の形質転換体を培養し、上記(1)に記載のペプチドもしくは前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を生成・蓄積せしめることを特徴とする、上記(1)に記載のペプチドもしくは前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造方法、
- 10 (8) 上記(1)記載のペプチドもしくは前駆体に対する抗体、
- (9) 上記(8)記載の抗体を含有してなる医薬、
- (10) 上記(8)記載の抗体を含有してなる診断薬、
- (11) 上記(1)記載のペプチドもしくは前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、
- 15 (12) 記憶機能改善剤、食欲調節剤、子宮機能調節剤、腎臓機能調節剤、前立腺機能調節剤、精巣機能調節剤または骨格筋機能調節剤である上記(11)記載の医薬、
- (13) 上記(1)記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：11、配列番号：12または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、
- 20 (14) 上記(13)記載のスクリーニング方法によって得られる化合物またはその塩、
- 25 (15) 上記(14)記載の化合物またはその塩を含有する記憶機能改善剤、食欲調節剤、子宮機能調節剤、腎臓機能調節剤、前立腺機能調節剤、精巣機能調節剤または骨格筋機能調節剤、
- (16) 記憶機能改善作用、食欲調節作用、子宮機能調節作用、腎臓機能調節作用

用、前立腺機能調節作用、精巣機能調節作用または骨格筋機能調節作用を有する医薬を製造するための①上記（１）記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②上記（３）記載のDNA、または③上記（８）記載の抗体の使用、および

- 5      （１７）①上記（１）記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②上記（３）記載のDNA、または③上記（８）記載の抗体を哺乳動物に投与することを特徴とする記憶機能改善、食欲調節、子宮機能調節、腎臓機能調節、前立腺機能調節、精巣機能調節または骨格筋機能調節方法などに関する。

10

#### 図面の簡単な説明

図１は、ブタ小腸ガラニン（ガラニン）、ブタ型G a 1 R 2リガンド（P-GALR2L）、ラット型G a 1 R 2リガンド（R-GALR2L）、ヒト型G a 1 R 2リガンド（H-GALR2L）ならびに本発明のマウス型G a 1 R 2リガンドのアミノ酸配列を比較する図である。

15

#### 発明の詳細な説明

本明細書において、「実質的に同一」とは蛋白質の活性、例えばレセプターに対するアゴニスト活性、即ち、リガンドの有するレセプターを活性化させる活性、  
20      リガンドのレセプターへの結合活性などが、実質的に同じことを意味する。アミノ酸の置換、欠失、付加あるいは挿入は、しばしばペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化をもたらさないが、こうした場合その置換、欠失、付加あるいは挿入を施されたペプチドは、そうした置換、欠失、付加あるいは挿入の  
25      されていないものと実質的に同一であるとされるであろう。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、例えば、そのアミノ酸が属するクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができる。非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどがあげられる。極性（中性）アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、

グルタミンなどがあげられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどがあげられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などがあげられる。

5 本発明のペプチドは、ガラニンレセプターに対して結合能を有するペプチドである。好ましくはガラニンレセプターに対する活性化作用を有し、公知のガラニン以外のリガンドペプチドである。なお、ガラニンレセプターについては後述のとおりである。

10 本発明のペプチドとしては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、かつ配列番号：11、配列番号：12または配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に対する結合する能力（好ましくはレセプター蛋白質を活性化する能力など）を有するペプチド等があげられる。なお、配列番号：11はラット型のGALR1（ガラニンレセプター・タイプ1）の全アミノ酸配列を、配列番号：12はラット型のGALR2（ガラニンレセプター・タイプ2）の全アミノ酸配列を、配列番号：13はラット型のGALR3（ガラニンレセプター・タイプ3）の全アミノ酸配列を示す。

本発明のペプチド、その製造法および用途を以下にさらに詳細に説明する。

20 本発明の上記ペプチドの由来はマウスであり、その組織（例えば、下垂体、膵臓、脳、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、血管、心臓、精巣など）または細胞など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。

例えば、本発明のペプチドとしては、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95%以上、より好ましくは98%以上）の相同性を有するアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。

25 「実質的に同質の活性」としては、例えばガラニン・レセプターGALR1、GALR2またはGALR3に結合する活性、ガラニン・レセプターGALR1、GALR2またはGALR3を活性化する活性、またはそれに伴い引き起こされるアラキドン酸遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成阻害、イノシトールリン酸産生（阻害）、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、細胞内pHの変化などのシグナル伝達活性系を活性

化させる能力において同質であることを示す。従って、これら活性の強弱やペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

本発明のペプチドとして具体的には、次のようなものがあげられる。

5 配列番号：1で表されるアミノ酸配列もしくはその部分配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドもしくはその部分ペプチドに対して、1もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加あるいは挿入されているアミノ酸配列を含有するペプチド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あげられる。例えば、(1)配列番号：1で表されるアミノ酸配列もしくはその部分配列中の1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個以下、より  
10 好ましくは1個以上3個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2)配列番号：1で表されるアミノ酸配列もしくはその部分配列に1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個以下、より好ましくは1個以上3個以下のアミノ酸が付加した(または挿入された)アミノ酸配列、(3)配列番号：1で表されるアミノ酸配列もしくはその部分配列中の1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個  
15 以下、より好ましくは1個以上3個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。

「実質的に同質のアミノ酸配列」としては、その配列と90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列があげられる。

20 本明細書におけるペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。

本発明のペプチドは、C末端が通常カルボキシル基(-COOH)またはカルボキシレート(-COO<sup>-</sup>)であるが、C末端がアミド(-CONH<sub>2</sub>)またはエステル(-COOR)であってもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、  
25 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<sub>1-6</sub>アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル、もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキルなどのC<sub>7-14</sub>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あげられる。

本発明のペプチドが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、それらの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に含まれる。この時のエステルとしては、例えば上記したC末端のエ

5       エステルと同様なエステルなどが用いられる。

本発明のペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ

10       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、シュウ酸、安息香酸、メタンサルホン酸、ベンゼンサルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のペプチドは、ヒトや温血動物の組織または細胞からペプチドを精製する方法によって製造することもできるし、後述のペプチド合成法に準じて製造す

15       ることもできる。

また、本発明のペプチドは、それをコードする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。該ペプチドをコードするDNAは、公知のクローニング方法〔例えば、Molecular Cloning（2nd ed. ; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法など〕

20       に従って作成することができる。

該クローニング方法とは、（1）該ペプチドのアミノ酸配列に基づきデザインしたDNAプローブまたはDNAプライマーを用い、cDNAライブラリーからハイブリダイゼーション法により該ペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法、または（2）該ペプチドのアミノ酸配列に基づきデザインしたDNAプライマーを用い、PCR法により該ペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法があげられる。

25       

本発明のペプチドをヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸、またはアルコールなどで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、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、アフィニティー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。

上記したように本発明のペプチドは、（１）自体公知のペプチドの合成法に従って、または（２）本発明のペプチドを含有するペプチドを適当なペプチダーゼ  
5 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、本発明のペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離  
10 としてはたとえば、以下の①～②に記載された方法があげられる。

①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

15 また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて本発明の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、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。

20 本発明のペプチドのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM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  
25 アクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -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

チドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて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、目的のペプチドを取得する。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどがあげられる。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など）とともに保護された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されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護された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。たとえば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、ピリジンなどの三級アミン類、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。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～約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約1.5ないし約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して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、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などがあげられる。カルボキシ基の保護基としては、たとえばRとして上記したC<sub>1-6</sub>アルキル基、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、C<sub>7-14</sub>アラルキル基の他、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどがあげられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級(C<sub>1-6</sub>)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あげられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリー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、たとえばBzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどがあげられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、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などがあげられる。

原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル[アルコール(たとえば、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]などがあげられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドがあげられる。

保護基の除去(脱離)方法としては、たとえば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あげられる。上記酸処理による脱離反応は一般に-20°C~40°C

の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、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、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および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

本発明のペプチドのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化した後、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 $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明のペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -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、ペプチドのアミド体と同様にして所望のペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明のペプチドとしては、上記した配列番号：1で表されるアミノ酸配列もしくはその部分配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドと同様の作用（例、GALR1アゴニスト活性、GALR2アゴニスト活性またはGALR3アゴニスト活性など）を有しているものであれば、どのようなペプチドであってもよい。このようなペプチドとしてはたとえば、上記した配列番号：1で

表されるアミノ酸配列もしくはその部分配列、から1ないし5個以下のアミノ酸が欠失、付加（挿入）または置換したアミノ酸配列を有するペプチドをあげることができる。

5 本発明のペプチドの前駆体とは、本発明のリガンドペプチドをその部分配列としてコードするペプチドであればいかなるものであってもよい。

本発明のペプチドの前駆体として、具体的には、例えば、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド（またはポリペプチド）などがあげられる。

10 ここで、「実質的に同一のアミノ酸配列」としては、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

15 また、「実質的に同一のアミノ酸配列」としては、(i)配列番号：2で表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、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(ii)配列番号：2で表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、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(iii)配列番号：2で表されるアミノ酸配列に1個以上20個以下、好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が付加（または挿入）したアミノ酸配列などがあげられる。「置換、欠失、付加（または挿入）」の位置は本発明のリガンドペプチドをその部分配列として  
20 コードする領域以外であれば、特に限定はされない。

25 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド（またはポリペプチド）の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有し、(i)配列番号：2で表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、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(ii)配列番号：2で表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、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が欠失した

アミノ酸配列、(iii) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列に1個以上20個以下、好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が付加（または挿入）したアミノ酸配列を有するペプチド（またはポリペプチド）などがあげられる。

- 5 本発明のペプチドは、さらに抗リガンドペプチド抗体の調製のための抗原として用いることができる。このような抗原としてのペプチドは上記した本発明のペプチドの他に、例えば、上記本発明のペプチドのN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドなどの部分ペプチドなどが用いられる。

10 部分ペプチドとしては、本発明ペプチドの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。

また、上記の部分ペプチドは、抗リガンドペプチド抗体の調製のための抗原として用いることができればよい。ため、(i) 上記本発明のペプチドのN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドなどの部分ペプチドに1ないし数個（好ましくは1ないし5個、より好ましくは1または2個）の他のアミノ酸残基が付加（または挿入）した部分ペプチド、(ii) 上記本発明のペプチドのN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドなどの部分ペプチドから1ないし数個（好ましくは1ないし5個、より好ましくは1または2個）のアミノ酸残基が欠失した部分ペプチド、(iii) 上記本発明のペプチドのN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドなどの部分ペプチドの構成アミノ酸の1ないし数個（好ましくは1ないし5個、より好ましくは1または2個）が他のアミノ酸残基で置換された部分ペプチドなども含まれる。

25 上記の部分ペプチドとしてより具体的には、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第24番目（P r o）～第30番目（A s p）からなる部分アミノ酸配列、第32番目（G l y）～第37番目（S e r）からなる部分アミノ酸配列、第55番目（H i s）～第60番目（T h r）からなる部分アミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。

本明細書における部分ペプチドもC末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。ここでエステル基の例としては上記したペプチドの場合と同様である。該部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基またはカルボキシ

レート有している場合、それらの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。この時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。

5 本発明のペプチドの部分ペプチドはそれ自体で本発明のペプチドが有する活性（例えば、ガラニンレセプターに対する活性化作用など）を有していてもよい。本発明のペプチドまたはその部分ペプチドは、さらに、機能あるいは性質がよく知られているタンパク質との融合タンパク質であってもよい。

本発明のペプチドの部分ペプチドの塩としては、前述のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

10 本発明のペプチドの部分ペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩は、上記したペプチドの場合と同様の合成法に従って、あるいは本発明のペプチド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。

15 本発明のペプチドをコードするDNA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もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、好ましくは、さらに配列番号：11、配列番号：12または配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に対する結合する能力（好ましくはレセプター蛋白質を活性化する能力など）を有するペプチドなどをコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。

20 さらに上記に具体的に記載された本発明のペプチドをコードするDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。

25 また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した組織・細胞由来のcDNA、前記した組織・細胞由来の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、前記した組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

より具体的には、

(1) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAを含有するDNA (2) ストリンジエントな条件下で(1)で規定された配列とハイブリダイズする哺乳動物由来のDNA、(3) 遺伝コードの縮重のため(1)および(2)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつポリペプチドをコードする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た方法に従って行うことができる。上記ストリンジエントな条件としては、例えば42℃、50%ホルムアミド、4×SSPE(1×SSPE=150mM NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1mM EDTA pH7.4)、5×デンハート溶液、0.1% SDSである。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAを含有するDNAの具体例としては、配列番号：3で表される塩基配列を含有するDNAなどがあげられる。

また、本発明のペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAの中で例えば1個以上40個以下(好ましくは1個以上30個以下、さらに好ましくは1個以上20個以下)の部分塩基配列を含有するDNA断片はDNA検出プローブとしても好ましく用いられる。

本発明のペプチドの前駆体をコードするDNAとしては、上記の本発明のペプチドの前駆体、具体的には、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド(ポリペプチド)などをコードするDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。

配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド(ポリペプチド)をコードするDNAを含有するDNAの具体例としては、配列番号：20で表されるDNAを含有するDNAなどがあげられる。

本発明のペプチドなどをコードするDNAは、以下の遺伝子工学的手法によっても製造することができる。該遺伝子工学的手法は、例えば Molecular Cloning (2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などがあげられる。また、市販のライブラリーやキットを使

用する場合には、添付の使用説明書に記載の方法に従って行えばよい。

本発明のペプチドなどをコードするDNAは、そのペプチドのアミノ酸配列またはその一部に基づきDNA断片を合成し標識したプローブを、ゲノムDNAまたはcDNAのライブラリー等とハイブリダイゼーションにすることによって選別  
5 することができる。

本発明のペプチドなどを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて、自体公知のPCR法によってゲノムDNAまたはcDNAのライブラリー等から  
10 目的とするDNAを増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを例えば本発明のペプチドなどの一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものと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。

クローン化された本発明のペプチドなどをコードする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  
15 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。

本発明のペプチドなどの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のペプチドを  
20 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、  
25 pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、ス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。

形質転換する際の宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどが利用できる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、T7プロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ PL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、ADH1プロモーター、GAL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<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等があげられる。特に、CHO（dhfr<sup>-</sup>）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、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、ペプチドまたはその部分ペプチドのN末端側に付加する。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、 $\alpha$ -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、メイテイングファクター $\alpha$ （MF $\alpha$ ）・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -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ペプチドをコードするDNAを含有するベクターを

用いて、形質転換体を製造することができる。

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

エシェリヒア属菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K1  
2・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイ  
5 エンシイズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA),  
60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシズ・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)],  
10 120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、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*)  
MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナ  
15 ル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1  
984)] などが用いられる。

酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビスエ (*Saccharomyces*  
*cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20  
B-12などが用いられる。

20 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)]。

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<sup>TM</sup>細胞、  
25 *Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmene 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; B  
mN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・ヴィトロ (in  
Vitro), 13巻, 213-217頁 (1977年)] などが用いられる。

動物細胞としては、たとえばサルCOS-7細胞、Vero細胞、チャイニーズ  
ハムスター細胞CHO、DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO  
(CHO/dhfr<sup>-</sup>細胞)、マウスL細胞、マウス3T3細胞、マウスミエ  
ローマ細胞、ヒトHEK293細胞、ヒトFL細胞、293細胞、C127細胞、  
5 BALB3T3細胞、Sp-2/O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、たとえばプロシーディングズ・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), 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われる。

10 バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル  
・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111  
(1979)などに記載の方法に従って行われる。

酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・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.  
15 Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行な  
われる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、たとえばバイオ/テクノロジー  
(Bio/Technology), 6巻, 47-55頁(1988年)などに記載の方法に従  
って行なわれる。

20 動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology), 52巻,  
456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。

発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リポフェクション法  
[Felgner, P.L. et al. プロシーディングズ・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 (Proceedings of the  
25 National Academy of Sciences of the United States of America), 84巻,  
7413頁(1987年)]、リン酸カルシウム法 [Graham, F. L. and van  
der Eb, A. J. ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456-467頁(197  
3年)]、電気穿孔法 [Nuemann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.),  
1巻, 841-845頁(1982年)]等があげられる。

このようにして、本発明のペプチドなどをコードする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。

5       なお、動物細胞を用いて、本発明のペプチド等を安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しくローン選択を行なうことにより本発明のペプチド等の高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができる。また、d h f r 遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、  
10       耐性株を選択することにより、d h f r 遺伝子とともに、本発明のペプチドなどをコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。

15       上記の形質転換体を本発明のペプチドなどをコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、本発明のペプチド等を生成、蓄積せしめることによって、本発明のペプチド等を製造することができる。

20       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、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、  
20       たと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、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、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。

25       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、たとえば $\beta$ -インドルイ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 $15\sim 43^{\circ}\text{C}$ で約 $3\sim 24$ 時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

5 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ で約 $6\sim 24$ 時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

10 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、たとえばバークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (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、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] があげられる。培地のpHは約 $5\sim 8$ に調整するのが好ましい。培養は通常約 $20^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ で約 $24\sim 72$ 時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。  
15

20 宿主が昆虫細胞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)) に非働化した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 $6.2\sim 6.4$ に調整するのが好ましい。培養は通常約 $27^{\circ}\text{C}$ で約 $3\sim 5$ 日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

25 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、たとえば約 $5\sim 20\%$ 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 [ウイルス学 (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 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・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 $6\sim 8$ であるのが好ましい。培養は通常

約30℃～40℃で約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

特にCHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞およびdhfr遺伝子を選択マーカーとして用いる場合には、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用いるのが好ましい。

- 5 上記培養物から本発明のペプチドなど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。

本発明のペプチドなど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ペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100（登録商標。以下、TMと省略することがある。）などの界面活性剤が含まれていてもよい。

- 10 培養液中にペプチドが分泌される場合には、培養終了後、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本発明のペプチドなどの精製は、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、等電点電気泳動法やクロマトフォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

- 20 かくして得られる本発明のペプチドなど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、形質転換体が産生する本発明のペプチドなどを、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。

5       かくして生成する本発明のペプチドなどの存在は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。

10       本発明のペプチドなどをコードするDNAまたは本発明のペプチドは、①ガラニン・レセプター蛋白質のリガンドの一部、あるいは全長の合成、②本発明のペプチドなどの有する生理作用の探索、③合成オリゴヌクレオチドプローブあるいはPCRのプライマーの作成、④G蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドや前駆体蛋白質をコードするDNAの入手、⑤組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑥抗体および抗血清の入手、⑦DNA、RNA、抗体または抗血清を用いた診断薬の開発、⑧記憶機能改善剤（向知能薬）、食欲調節剤、糖尿病治療薬、下垂体機能改善薬、子宮機能調節剤、腎臓機能調節剤、前立腺機能調節剤、精巣機能調節剤または骨格筋機能調節剤（好ましくは、記憶機能改善剤（向知能薬）、食欲調節剤、子宮機能調節剤、腎臓機能調節剤、前立腺機能調節剤、精巣機能調節剤または骨格筋機能調節剤）などの医薬の開発、⑨遺伝子治療等に用いることができる。

20       特に、後述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニスト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。

25       また、上記⑧に関し、本発明のペプチドまたはそれをコードするDNAは、海馬、視床下部、子宮、腎臓、前立腺、骨格筋、膵臓、精巣、脾臓、心臓、下垂体などで発現しているガラニン・レセプター（GALR）蛋白質がリガンドとして認識するものであるので、安全で低毒性な医薬として有用であり、例えば、記憶機能改善剤（向知能薬）、食欲調節剤、糖尿病治療薬、下垂体機能改善薬、食欲

調節剤、子宮機能調節剤、腎臓機能調節剤、前立腺機能調節剤または骨格筋機能調節剤（好ましくは、記憶機能改善剤（向知能薬）、食欲調節剤、子宮機能調節剤、腎臓機能調節剤、前立腺機能調節剤または骨格筋機能調節剤）などとして用いることができる。

- 5           さらに、本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDNAは、血中LH濃度の特異的な上昇作用（LH分泌促進作用）を有し、本発明のポリペプチドと高い相同性を持つガラニンではLH分泌促進作用は見られないことから、LH分泌促進作用は、ガラニンにはない本発明のポリペプチド特異的な作用である。

- 10           本発明におけるペプチドまたはそれをコードするDNAは、LHの分泌促進作用を有するため、LH分泌不全に関係する各種疾患（具体的には、不妊症、月経不順、月経困難症、無月経症、月経前症候群、更年期障害、下垂体機能不全または肥満症など）の予防・治療薬として用いることができる。即ち、本発明のポリペプチドまたは本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するLH分泌調節剤は、LH分泌促進剤として、不妊症、月経不順、月経困難症、無月経症、月経前症候群、更年期障害、下垂体機能不全または肥満症などの予防・治療薬として用いることができる。また、本発明のポリペプチドまたは本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するLH分泌調節剤は、特に、レプチン受容体に異常に起因する各種疾患（具体的には、肥満症、不妊症など）の予防・治療薬として有効であると考えられる。

- 20           一方、本発明のポリペプチドは、そのレセプター蛋白質との親和性が高いため、本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDNAの投与量が増えるとLH分泌に対し脱感作が起こる結果、LH分泌を抑制する作用も有する。この場合、本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDNAを含有するLH分泌調節剤は、LH分泌抑制剤として、LH過剰分泌に関係する各種疾患（具体的には、前立腺癌、前立腺肥大症、思春期早発症またはLH産生下垂体腫瘍など）の予防・治療薬として用いることができる。

- 25           本発明のペプチドまたはそれをコードするDNA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製薬実施に要求される単位  
5 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容量が得られるようにするものである。

本発明のDNAを用いる場合は、該DNAを単独また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などの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。

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  
10 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  
15 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（TM）、HCO  
20 -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、例えばヒトや哺乳動物（例えば、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、など）に対して投与することができる。

本発明のペプチドまたはそれをコードするDNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、該ペプチドを経口投与する場合、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から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。該ペプチドを非経口的に投与する（例えば、静脈注射で投与する）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（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01から30mg程度、好ましくは約0.1から20mg程度、より好ましくは約0.1から10mg程度である。

他の動物の場合も、上記60kg当たりの投与量をその動物の体重に換算した量を投与することができる。

上記本発明において、ガラニン・レセプターとしては、ヒトや温血動物（例えば、哺乳温血動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ）など）のあらゆる組織（例えば、下垂体、膵臓、脳、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、血管、心臓など）または細胞などに由来するG蛋白質共役型レセプター蛋白質であって、GALR1としては配列番号：11、GALR2としては配列番号：12、GALR3としては配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。即ち、該レセプター蛋白質としては、配列番号：11、12または13で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質などの他に、配列番号：11、12または13で表わされるアミノ酸配列と約90～99.9%の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、配列番号：11、12または13で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的

に同質の活性を有する蛋白質などがあげられる。

これらの蛋白質が示す活性としては、例えばリガンド結合活性、シグナル伝達活性などがあげられる。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。従って、リガンド結合活性やシグナル伝達活性の強さなどの強弱、  
5 レセプター蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

さらに、該レセプター蛋白質には、N末端のMetが保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイル基など）で保護されているもの、N末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したものの分子内のアミノ酸の側鎖が適  
10 当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイル基など）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蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

該レセプター蛋白質の塩としては、上記したペプチドの塩と同様のものがあげられる。

該レセプター蛋白質またはその塩またはその部分ペプチドは、ヒトや温血動物  
15 の組織または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、前述のペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養する方法と同じ方法によっても製造することができる。また、前述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

該レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、G蛋白質共役型レセプ  
20 ター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。すなわちG蛋白質共役型レセプター蛋白質の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  
25 同時に含む部分のペプチドでも良い。

該レセプター蛋白質の部分ペプチドの塩としては、上記したペプチドの塩と同様のものが用いられる。

該ガラニン・レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：11、12または13のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含

有するガラニン・レセプター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。また、それらは、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、組織・細胞由来のcDNA、組織・細胞由来の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

5 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、組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接自体公知のRT-PCR法によって増幅することもできる。

配列番号：11、12および13のアミノ酸配列を含有するガラニン・レセプターをコードするDNAとして具体的には、それぞれ配列番号：17、18および

10 19で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。なお、配列番号：17はラット型のGALR1（ガラニンレセプター・タイプ1）のcDNAの塩基配列を、配列番号：18はラット型のGALR2（ガラニンレセプター・タイプ2）のcDNAの塩基配列を、配列番号：19はラット型のGALR3

（ガラニンレセプター・タイプ3）のcDNAの塩基配列を示す。

15 GALR2（ガラニン・レセプター・タイプ2）は海馬、視床下部、子宮、腎臓、前立腺、骨格筋などに多く分布しており、従って、GALR2活性化能を有するアゴニストである本発明のペプチド（あるいはGALR2に対するアンタゴニスト、及び本発明のペプチドに対する中和抗体）は記憶機能改善剤、食欲改善剤、または子宮、腎臓、前立腺もしくは骨格筋の機能改善剤として用いることが

20 できる。

GALR1（ガラニン・レセプター・タイプ1）は、視床下部、海馬、膵臓などに多く分布しており、従って、GALR1活性化能を有するアゴニストである本発明のペプチド（あるいはGALR1に対するアンタゴニスト、及び本発明のペプチドに対する中和抗体）は、抗肥満薬、向知能薬、インスリン分泌薬として

25 用いることができる。

GALR3（ガラニン・レセプター・タイプ3）は、精巣、脾臓、心臓、視床下部、下垂体などに分布しており、従って、GALR3活性化能を有するアゴニストである本発明のペプチド（あるいはGALR3に対するアンタゴニスト、及び本発明のペプチドに対する中和抗体）は、精巣、脾臓、心臓の機能改善剤とし

て用いることができる。

本発明は、(1) 上記のガラニン・レセプターをコードするDNAを含有する形質転換体(細胞)を培養して得られる該ガラニン・レセプターを発現している細胞膜画分に、① 被検物質を接触させる場合と、② 被検物質を接触させない場合における、例えば<sup>35</sup>S標識グアノシン-5'-0-3-チオ三リン酸の該細胞膜画分  
5 に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするガラニンレセプター活性化物質(アゴニスト)またはその塩のスクリーニング方法、および(2) 上記のガラニン・レセプターをコードするDNAを含有する形質転換体(細胞)を培養して得られる該ガラニン・レセプターを発現している細胞膜画分に、① ガラニン  
10 または本発明ペプチドを接触させる場合と、② ガラニンまたは本発明ペプチドを被検物質存在下で接触させる場合における、例えば<sup>35</sup>S標識グアノシン-5'-0-3-チオ三リン酸の該細胞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ガラニンレセプター活性化阻害物質(アンタゴニスト)またはその塩のスクリーニング方法などを提供する。

15 本発明のスクリーニング方法を以下に具体的に説明する。

上記ガラニン・レセプター蛋白質としては、GALR1、GALR2またはGALR3のいずれのガラニン・レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを含有し、そのレセプター機能を有するものであれば何れのものであってもよいが、形質転換体(細胞)を用いて該ガラニン・レセプター蛋白質を大量発現している培養細胞より調製した細胞膜画分(その調製法は後述する)などが好ましい。  
20

該ガラニン・レセプター蛋白質を含有する細胞としては、ガラニン・レセプター蛋白質を発現する宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、例えば、前述の酵母、昆虫細胞、動物細胞などがあげられるが、動物細胞が好ましい。

該膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン  
25 (Kinematica社製)による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画

法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500 rpm～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000 rpm～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分は主として膜蛋白質と細胞膜を構成するリン脂質から成り、  
5 発現したガラニン・レセプターと同時に該細胞が本来発現しているG蛋白も含まれている。

該ガラニン・レセプターを含有する細胞や膜画分中のガラニンレセプターの量は、膜画分蛋白質 1 mg 当たり1-100 pmolであるのが好ましく、5-20 pmolであるのがより好適である。該ガラニン・レセプターの発現量が多いほど膜画分当たりのレセプターを活性化する活性（リガンド結合活性、比活性）が高くなり、高  
10 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。

ガラニン・レセプターを活性化する化合物（アゴニスト）のスクリーニング方法として具体的には、まずガラニン・レセプターを含有する細胞の膜画分を、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該レセプター標品を調製する。該バッファーとしては、pH約4～約10（望ましくはpH約6～約8）の約1～5 mMのマグネシウムイオンを含むリン酸バッファーまたはトリス塩酸バッファーなどのいずれでも良く、さらにグアノシン三リン酸（GDP）を約  
15 0.1 nM～100 μM、好ましくは約0.1～1 μM添加するとよい。また、プロテアーゼによる該レセプターや被検物質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してもよい。約0.01～10 mlの該レセプター溶液に、一定量（5000 cpm～50000 cpm）の<sup>35</sup>S標識グアノシン-5'-0-3-チオ三リン酸、および被検物質を添加する。一方、被検化合物を加えず、<sup>35</sup>S標識グ  
20 アノシン-5'-0-3-チオ三リン酸のみを添加した反応系（対象群）も用意する。反応は約0～50℃、好ましくは約4℃～37℃で約20分～24時間、好ましくは約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<sup>35</sup>S標識グアノシン-5'-0-3-チオ三リン酸の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。被検化合  
25

物を加えない場合の放射活性に比べて被検化合物を加えた場合の放射活性の増加分の高い化合物であれば、それを該ガラニン・レセプターを活性化する能力のある候補化合物として選択することができる。

5 該ガラニン・レセプターの活性化を阻害する化合物（アンタゴニスト）のスクリーニングを行うには、上記アゴニストのスクリーニングの場合と同様に細胞膜画分を用意し、これに一定量（5000cpm～50000cpm）の<sup>35</sup>S標識グアノシン-5'-0-3-チオ三リン酸、および $10^{-4}$ ～ $10^{-6}$  Mのガラニンあるいは本発明によるペプチド、および被検物質を添加する。また、<sup>35</sup>S標識グアノシン-5'-0-3-チオ三リン酸とガラニンあるいは本発明によるペプチドを添加し  
10 被検化合物を加えない反応系（対象群）も用意する。上記と同様に反応を行い、被検化合物を加えない場合の放射活性に比べて被検化合物を加えた場合の放射活性の減少の大きい化合物であれば、それを該ガラニン・レセプターの活性化を阻害する能力のある候補化合物として選択することができる。

15 該被検物質としては、例えばペプチド、タンパク、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、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。

ガラニン・レセプター・アゴニストは、ガラニン・レセプター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。

20 逆に、ガラニン・レセプター・アンタゴニストは、ガラニン・レセプター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、該レセプター活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

上記のスクリーニング方法を用いて得られる物質の塩としては、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、  
25 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-ピリジン、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あげられる。

5 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、メタンカルボン酸、ベンゼンカルボン酸、安息香酸などとの塩があげられる。

10 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を用いて得られる物質またはその塩を上述の医薬として使用する場合、上記の本発明のペプチドを医薬として実施する場合と同様に実施することができる。

本発明のペプチドに対する抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明のペプチドを抗原として用い、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。

例えば、ポリクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

20 [ポリクローナル抗体の作製]

本発明のペプチドに対する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（ペプチド等抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、後述のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物（例えば、哺乳温血動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ）など）に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のペ

25 プチド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

5 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（本発明のペプチドまたはその部分ペプチド）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、キーホル・リンペット・ヘモシアニン等のキャリアー・タンパク質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 の割合でカップリングさせる方法が用いられる。

10 また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、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、上記温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 2～6 週毎に 1 回ずつ、計約 3～10 回程度行なわれる。

15 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される。

20 抗血清中の本発明のペプチドに対する抗体価の測定は、後述のハイブリドーマ培養上清の抗体価の測定と同様にして測定できる。抗体の分離精製は、後述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。

また、モノクローナル抗体は、後述の方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

25 本発明のペプチドは、温血動物（例えば、哺乳温血動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ）など）に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 2～6 週毎に 1 回ずつ、計 2～10 回程度行わ

れる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された上記の温血動物、たとえばマウスなど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髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識剤で標識化されたペプチドまたはその部分ペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、たとえばケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)]等に  
5  
10  
に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンドイウイルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。  
15

本発明のペプチドに対する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、たとえば本発明のペプチド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、固相に結合した本発明のペプチドに対する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を加え、固相に結合した本発明のペプチドに対するモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。  
20  
25

本発明のペプチドに対す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。通常HAT（ヒポキサンチン、ア

ミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日水製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の本発明のペプチドに対する抗体価の測定と同様に測定できる。

(b) モノクロナール抗体の精製

本発明のペプチドに対する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、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行われる。

上記の(a)および(b)の方法に従って製造させる本発明のペプチドに対する抗体は、それぞれ本発明のペプチド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ペプチドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、

(i) 本発明のペプチドに反応する抗体と、被検液および標識した本発明のペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識した本発明のペプチド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ペプチドの定量法、

(ii) 被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された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ペプチドの定量法において、一方の抗体が、本発明のペプチドのN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のペプチドのN端部以外の部位(例えば、C端部)に反応する抗体であることを特徴とする被検液中

の本発明のペプチドの定量法を提供する。

本発明のペプチドを認識するモノクローナル抗体を用いて本発明のペプチドの測定を行なえるほか、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(a b')<sub>2</sub>、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えばリガンドペプチド量）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、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などがあげられる。放射性同位元素としては、例えば [<sup>125</sup>I]、 [<sup>131</sup>I]、 [<sup>3</sup>H]、 [<sup>14</sup>C] などが、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、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセインイソチオシアネートなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれあげられる。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当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のペプチドに対する抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化された本発明のペプチドに対する抗体を反応させ（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。

5 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。

10 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ペプチドに対する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。即ち、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末端部以外、例えばN末端部を認識する抗体が用いられる。

15 本発明のペプチドに対する抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として  
20 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。

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

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降

物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定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  
5 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ペプチドまたはその部分ペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol.  
10 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。

20 以上のように、本発明のペプチドに対する抗体を用いることによって、本発明のペプチド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ペプチド等の濃度を定量することによって、診断薬として用いることもできる。即ち、

(1) 本発明のペプチド等の濃度の変化が検出された場合、例えば、肥満症、痴呆、糖尿病、または下垂体腫瘍などの疾病である、または将来罹患する可能性  
25 高いと、と診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のペプチド等を検出するために使用することができる。また、本発明のペプチド等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ペプチド等

の検出、被検細胞内における本発明のペプチドの挙動の分析などのために使用することができる。

本発明のDNAを用いて、本発明のペプチドを発現するトランスジェニック動物を作製することができる。動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、  
5 ラット、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）などが挙げられるが、特に、マウス、ラットなどが好適である。このような動物は本発明のペプチドの機能解析、それに関連する疾病の研究等に非常に有用である。

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  
10 のが一般に有利である。例えば、マウス由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相溶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、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のレセプター蛋白質を高産生  
15 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  
20 において本発明のペプチドが存在することは、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  
25 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、本発明のペプチドが高発現させられてい

るので、本発明のペプチドに対するアゴニストまたはアンタゴニスト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、本発明のペプチドについて分析することができる。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、本発明のペプチドを単離精製することも可能である。

また、上記した方法と同様の方法を用いて、本発明のペプチドをコードする遺伝子を破壊し、その機能を欠損させたノックアウト動物を作出することもできる。かかるノックアウト動物も、本発明のペプチドの機能解析等に非常に有用である。

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。

20	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
25	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
	I	: イノシン
	H	: アデニン、チミンまたはシトシン
5	D	: グアニン、アデニンまたはチミン
	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
10	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
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
15	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	EIA	: エンザイムイムノアッセイ
	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
20	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
25	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

- H i s または H : ヒスチジン  
 P h e または F : フェニルアラニン  
 T y r または Y : チロシン  
 T r p または W : トリプトファン  
 5 P r o または P : プロリン  
 A s n または N : アスパラギン  
 G l n または Q : グルタミン  
 p G l u : ピログルタミン酸  
 M e : メチル基  
 10 E t : エチル基  
 B u : ブチル基  
 P h : フェニル基  
 T C : チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基  
 また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記
- 15 する。
- T o s : p-トルエンスルフォニル  
 H O N B : N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド  
 B z l : ベンジル  
 C l<sub>2</sub>-B z l : ジクロルベンジル  
 20 Z : ベンジルオキシカルボニル  
 B r - Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル  
 C l - Z : 2-クロルベンジルオキシカルボニル  
 B o c : t-ブチルオキシカルボニル  
 H O B t : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール  
 25 D C C : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド  
 T F A : トリフルオロ酢酸  
 F m o c : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル  
 D N P : ジニトロフェニル  
 B u m : ターシャリーブトキシメチル

T r t : トリチル

P A M : フェニルアセトアミドメチル

B H A : ベンツヒドリルアミン

B o m : ベンジルオキシメチル

5 O c H e x : シクロヘキシルエステル

M e B z l : 4-メチルベンジル

C H O : ホルミル

N M P : N-メチルピロリドン

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

10 [配列番号：1]

本発明のマウス型のGALR2リガンド成熟体のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：2]

本発明のマウス型のGALR2リガンド前駆体のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：3]

15 本発明のマウス型のGALR2リガンドのcDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：4]

マウス型のGALR2リガンドのcDNAをクローニングするためのPCRに使用したプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：5]

20 マウス型のGALR2リガンドのcDNAをクローニングするためのPCRに使用したプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：6]

配列番号：4および5のプライマーを用いてクローニングされたcDNAの塩基配列を示す。

25 [配列番号：7]

マウス型のGALR2リガンドのcDNAをクローニングするための5' RACEに使用したプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：8]

マウス型のGALR2リガンドのcDNAをクローニングするための3' R

CEに使用したプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：9]

マウス型のGALR2リガンドのcDNAをクローニングするためのPCRに使用したプライマーの塩基配列を示す。

5 [配列番号：10]

マウス型のGALR2リガンドのcDNAをクローニングするためのPCRに使用したプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：11]

10 ラット型のGALR1（ガラニン・レセプター・タイプ1）の全アミノ酸配列を示す。

[配列番号：12]

ラット型のGALR2（ガラニン・レセプター・タイプ2）の全アミノ酸配列を示す。

[配列番号：13]

15 ラット型のGALR3（ガラニン・レセプター・タイプ3）の全アミノ酸配列を示す。

[配列番号：14]

ブタ型のガラニンレセプターリガンドのアミノ酸配列（WO99/48920号に記載）を示す。

20 [配列番号：15]

ラット型のガラニンレセプターリガンドのアミノ酸配列（WO99/48920号に記載）を示す。

[配列番号：16]

25 ヒト型のガラニンレセプターリガンドのアミノ酸配列（WO99/48920号に記載）を示す。

[配列番号：17]

ラット型のGALR1（ガラニン・レセプター・タイプ1）のcDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：18]

ラット型のGALR2（ガラニン・レセプター・タイプ2）のcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

5 ラット型のGALR3（ガラニン・レセプター・タイプ3）のcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

本発明のマウス型のGALR2リガンド前駆体のcDNAの塩基配列を示す。

10 後述の実施例1で得られた形質転換体 *Escherichia coli* TOP10/pGR2ML1 は、財団法人発酵研究所（IFO）に2000年2月2日から寄託番号 IFO 16361 として、また、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（IPOD、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に2000年3月16日から寄託番号 FERM BP-7092 として寄託されている。

以下に、実施例を示し、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。

15 実施例1 マウス型リガンドペプチドcDNAのクローニング

マウス精巣Marathon-Ready cDNA（BALB/c mouse由来、CLONTECH社）を鋳型としてプライマー F/R120とR/R120（WO 99/48920号に記載）を用いてPCRを実施した。

F/R120: 5'-AGGCTGGACCCTCAATAGTGCTGGTTAC-3'（配列番号：4）

20 R/R120: 5'-CCATCTATGGCCTTCCACAGGTCTAGGA-3'（配列番号：5）

PCR反応液組成はExTaq（宝酒造株式会社）を0.5  $\mu$ l、添付の10x PCR bufferを5  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mixtureを4  $\mu$ l、プライマーF/R120およびR/R120（それぞれ10  $\mu$ M）を各0.5  $\mu$ l、および鋳型cDNAを1  $\mu$ l、蒸留水を34.5  $\mu$ lを混合して作製し、反応条件は94°C・30秒の初期変性後、94°C・30秒-62°C・30秒-72°C・60秒のサイクル反応を35回、および72°C・10分の最終伸長反応とした。得られたDNA断片を

25 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の配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、配列番号：6の配列を得た。

AGGCTGGACC CTCAATAGTG CTGGTTACCT CCTGGGTCCT GTCCTCCCCG TTCCTCCAA 60

GGCCGACCAG GGCAGGAAGA GAGACTCAGC TCTTGAGATC CTAGACCTGT GGAAGGCCAT 120  
AGATGG 126

(配列番号：6)

5 得られた配列よりプライマー 1F/M120 (配列番号：7)、1R/M120 (配列番号：8) を作成し、以下に記した5'RACE及び3'RACE実験に用いた。

1F/M120: 5'-TCCAAGGCCGACCAGGGCAGGAAGAGAG -3' (配列番号：7)

1R/M120: 5'-GGTCTAGGATCTCAAGAGCTGAGTCTCT-3' (配列番号：8)

5'RACE及び3'RACEのPCR反応液はTaq(宝酒造株式会社)を0.5  $\mu$ l、添付の10x PCR buffer(500 mM KCl-25 mM MgCl<sub>2</sub>-100 mM Tris·HCl, pH 8.3)を5  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mixtureを4  $\mu$ l、25 mM MgCl<sub>2</sub>を3  $\mu$ l、10  $\mu$ Mプライマー F/R120(3'RACEの場合)あるいは10  $\mu$ MプライマーR/R120(5'RACEの場合)を1  $\mu$ l、10  $\mu$ M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  $\mu$ l、鋳型cDNA (CLONTECH社、マウス精巢Marathon-Ready cDNA)を5  $\mu$ l、及び蒸留水を31  $\mu$ lを混合して作製した。反応条件は94°C・60秒の初期変性後、94°C・30秒-72°C・120秒のサイクル反応を5回、94°C・30秒-70°C・120秒のサイクル反応を5回、94°C・30秒-68°C・120秒のサイクル反応を25回および68°C・10分の最終伸長反応とした。

20 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 Taq(宝酒造株式会社)を0.5  $\mu$ l、添付の10x PCR buffer(500 mM KCl-25 mM MgCl<sub>2</sub>-100 mM Tris·HCl, pH 8.3)を5  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mixtureを4  $\mu$ l、25 mM MgCl<sub>2</sub>を3  $\mu$ l、10  $\mu$ Mプライマー1F/M120(3'RACEの場合)あるいは10  $\mu$ Mプライマー1R/M120(5'RACEの場合)を1  $\mu$ l、10  $\mu$ M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  $\mu$ l、鋳型DNA (該 PCR反応液50倍希釈液)を5  $\mu$ l、及び蒸留水を31  $\mu$ lを混合して作製した。反応 25 条件は94°C・60秒の初期変性後、94°C・30秒-72°C・120秒のサイクル反応を5回、94°C・30秒-70°C・120秒のサイクル反応を5回、94°C・30秒-68°C・120秒のサイクル反応を25回および68°C・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

列を解読し、5'端、3'端の配列情報を得た。この配列情報よりプライマー1F/M650、1R/M650を作成した。

1F/H650: 5'-GAAAGACAGTCTCAAATCAAGGACCTGC-3' (配列番号: 9)

1R/H650: 5'-TGAGCTGGAAACGAAGGAGGAGTGAGGT-3' (配列番号: 10)

- 5 Balb/c mouse由来精巢poly(A)+RNA(ニッポンジーン社製)から定法により Superscript II reverse transcriptase(GIBCO/BRL社製)を用いてsingle strand DNAを合成した。本DNAを鋳型としてプライマー F/M650とR/M650を用いてPCRを実施した。PCR反応液はPfu DNA polymerase(Stratagene社)を1  $\mu$ l、添付の10x PCR bufferを5  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mixtureを4  $\mu$ l、10  $\mu$ MプライマーF/M650及びR/M650を各2.5  $\mu$ l、鋳型DNAを1  $\mu$ l、及び蒸留水を34.5  $\mu$ lを混合して作製した。反応条件は94°C・30秒の初期変性後、94°C・30秒-67°C・30秒-72°C・4分のサイクル反応を30回、および72°C・10分の最終伸長反応とした。得られたDNA断片を pCRII Blunt TOPO vector (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配列を定法によりシーケンシングし、マウスGALR2 ligand全長ペプチドをコードする180 bpの DNA断片(配列番号3)を有するpGR2ML1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、TOP10/pGR2ML1と命名した。この180塩基対の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号: 2に示す。また、その成熟部分を配列番号: 1に示す。該成熟部分のアミノ酸配列を、ブタ小腸ガラニン(ガラニン)、ブタ型G a 1 R 2リガンド(P-G A L R 2 L)、ラット型G a 1 R 2リガンド(R-G A L R 2 L)およびヒト型G a 1 R 2リガンド(H-G A L R 2 L)のアミノ酸配列と比較したところ、該成熟部分のアミノ酸配列はブタ型G a 1 R 2リガンド(P-G A L R 2 L)、ラット型G a 1 R 2リガンド(R-G A L R 2 L)およびヒト型G a 1 R 2リガンド(H-G A L R 2 L)に対して高い相同性を示した(図1参照)。

以上述べたごとく、本発明のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩は、ガラニン・レセプターを活性化する能力を有する。従って、ガラニン・レセプターが多く分布している視床下部、下垂体、子宮、腎臓、前立腺または骨格筋における、副作用の少ない機能調節剤などの医

薬の開発等に用いることができる。

本発明のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることによって、ガラニン・レセプターとの結合性を变化させる化合物のスクリーニングが可能になる。

5

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO. 4

Designed oligonucleotide Primer to amplify mouse GALR2 ligand.

SEQ ID NO. 5

10 Designed oligonucleotide Primer to amplify mouse GALR2 ligand.

SEQ ID NO. 7

Designed oligonucleotide Primer for 5' RACE to amplify mouse GALR2 ligand.

SEQ ID NO. 8

15 Designed oligonucleotide Primer for 3' RACE to amplify mouse GALR2 ligand.

SEQ ID NO. 9

Designed oligonucleotide Primer to amplify mouse GALR2 ligand.

SEQ ID NO. 10

20 Designed oligonucleotide Primer to amplify mouse GALR2 ligand.

## 請求の範囲

- 5 1. 配列番号：1で表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ペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
2. 配列番号：2で表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請求項1記載の前駆体。
- 10 3. 請求項1記載のペプチドもしくは前駆体をコードするDNAを含有するDNA。
4. 配列番号：3または配列番号：20で表される塩基配列を含有する請求項3記載のDNA。
5. 請求項3記載のDNAを含有する組み換えベクター。
6. 請求項5記載の組み換えベクターで形質転換された形質転換体。
- 15 7. 請求項6記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のペプチドもしくは前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を生成・蓄積せしめることを特徴とする、請求項1記載のペプチドもしくは前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造方法。
8. 請求項1記載のペプチドもしくは前駆体に対する抗体。
- 20 9. 請求項8記載の抗体を含有してなる医薬。
10. 請求項8記載の抗体を含有してなる診断薬。
11. 請求項1記載のペプチドもしくは前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。
12. 記憶機能改善剤、食欲調節剤、子宮機能調節剤、腎臓機能調節剤、前立腺機能調節剤、精巣機能調節剤または骨格筋機能調節剤である請求項11記載の医薬。
- 25 13. 請求項1記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：11、配列番号：12または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的

に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。

14. 請求項13記載のスクリーニング方法によって得られる化合物またはその塩。

5 15. 請求項14記載の化合物またはその塩を含有する記憶機能改善剤、食欲調節剤、子宮機能調節剤、腎臓機能調節剤、前立腺機能調節剤、精巣機能調節剤または骨格筋機能調節剤。

10 16. 記憶機能改善作用、食欲調節作用、子宮機能調節作用、腎臓機能調節作用、前立腺機能調節作用、精巣機能調節作用または骨格筋機能調節作用を有する医薬を製造するための①請求項1記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②請求項3記載のDNA、または③請求項8記載の抗体の使用。

15 17. ①請求項1記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②請求項3記載のDNA、または③請求項8記載の抗体を哺乳動物に投与することを特徴とする記憶機能改善、食欲調節、子宮機能調節、腎臓機能調節、前立腺機能調節、精巣機能調節または骨格筋機能調節方法。

図 1

配列比較

(ガラニン)	Gly Ser Pro Val Lys Glu Lys Arg Gly Tyr Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly	
(P-GALR2L)	Ala Pro Val His Arg Gly Arg Gly Tyr Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly	
(R-GALR2L)	Ala Pro Ala His Arg Gly Arg Gly Tyr Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly	
(H-GALR2L)	Ala Pro Ala His Arg Gly Arg Gly Tyr Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly	
マウス型	Ala Pro Ala His Arg Gly Arg Gly Tyr Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly	20
	1 5 10 15	
(ガラニン)	Pro His Ala Ile Asp Asn His Arg Ser Phe His Asp Lys Tyr Gly Leu Ala Gly Lys Arg	
(P-GALR2L)	Pro Val Leu His Pro Ser Arg Ala Glu Gly Gly Lys Gly Lys Thr Ala Leu Gly	
(R-GALR2L)	Pro Val Leu His Leu Ser Ser Lys Ala Asn Gln Gly Arg Lys Thr Asp Ser Ala Leu Glu	
(H-GALR2L)	Pro Val Leu His Leu Pro Gln Met Gly Asp Gln Asp Gly Lys Arg Glu Thr Ala Leu Glu	
マウス型	Pro Val Leu Pro Val Ser Ser Lys Ala Asp Gln Gly Arg Lys Arg Asp Ser Ala Leu Glu	40
	21 25 30 35	
(ガラニン)	Gly Lys Arg Glu Leu Glu Pro Glu Asp Glu Ala Arg Pro Gly Gly Phe Asp Arg Leu Gln	
(P-GALR2L)	Ile Leu Asp Leu Trp Lys Ala Ile Asp Gly Leu Pro Tyr Pro Gln Ser Gln Leu Ala Ser	
(R-GALR2L)	Ile Leu Asp Leu Trp Lys Ala Ile Asp Gly Leu Pro Tyr Ser Arg Ser Pro Arg Met Thr	
(H-GALR2L)	Ile Leu Asp Leu Trp Lys Ala Ile Asp Gly Leu Pro Tyr Ser His Pro Pro Gln Pro Ser	
マウス型	Ile Leu Asp Leu Trp Lys Ile Ile Asp Gly Leu Pro Tyr Ser His Ser Pro Arg Met Thr	60
	41 45 50 55	



Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro Val Leu Pro Val  
 35 40 45  
 Ser Ser Lys Ala Asp Gln Gly Arg Lys Arg Asp Ser Ala Leu Glu Ile  
 50 55 60  
 5 Leu Asp Leu Trp Lys Ile Ile Asp Gly Leu Pro Tyr Ser His Ser Pro  
 65 70 75 80  
 Arg Met Thr Lys Arg Thr Met Gly Glu Thr Phe Val lys Ala Asn Thr  
 85 90 95  
 Gly Asp Met His Ile Leu Asp Lys Asn Val Pro Lys Glu Glu Ala Thr  
 10 100 105 110  
 Leu Asp Ser Glu Ser  
 115

<210> 3

15 <211> 180

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 3

gcacctgctc acaggggacg aggaggctgg acctcaata gtgctggtta cctcctgggt 60  
 20 cctgtcctcc ccgtttcctc caaggccgac cagggcagga agagagactc agctcttgag 120  
 atcctagacc tgtggaagat cattgatgga cttccttatt cccactctcc aaggatgacc 180

<210> 4

<211> 28

25 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide Primer to amplify mouse GALR2 ligand

<400> 4

3 / 14

aggctggacc ctcaatagtg ctggttac 28

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 28

5 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide Primer to amplify mouse GALR2 ligand

&lt;400&gt; 5

10 ccatctatgg ccttccacag gtctagga 28

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; DNA

15 &lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 6

aggctggacc ctcaatagtg ctggttacct cctgggtcct gtctccccg tttctccaa 60

ggccgaccag ggcaggaaga gagactcagc tcttgagatc ctagacctgt ggaaggccat 120

agatgg 126

20

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

25 &lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide Primer for 5' RACE to amplify mouse GALR2  
ligand

&lt;400&gt; 7

tccaaggccg accagggcag gaagagag 28

4 / 14

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide Primer for 3' RACE to amplify mouse GALR2  
ligand

&lt;400&gt; 8

10 ggtctaggat ctcaagagct gagtctct 28

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

15 &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide Primer to amplify mouse GALR2 ligand

&lt;400&gt; 9

gaaagacagt ctcaaatcaa ggacctgc 28

20

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

25 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide Primer to amplify mouse GALR2 ligand

&lt;400&gt; 10

tgagctggaa acgaaggagg agtgaggt 28

<210> 11

<211> 346

<212> PRT

<213> Rat

5 <400> 11

Met Glu Leu Ala Pro Val Asn Leu Ser Glu Gly Asn Gly Ser Asp Pro

1 5 10 15

Glu Pro Pro Ala Glu Pro Arg Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu Asn

20 25 30

10 Phe Ile Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Met Gly Val Leu

35 40 45

Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly Lys

50 55 60

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

15 65 70 75 80

Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr Ala

85 90 95

Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His Tyr

100 105 110

20 Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala Met

115 120 125

Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser Ser

130 135 140

Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Phe Ile Trp Ala

25 145 150 155 160

Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr Tyr Gln Arg Leu Phe

165 170 175

His Arg Asp Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu His Trp Pro Asn Gln

180 185 190

Leu His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val Phe Gly Tyr Leu  
 195 200 205  
 Leu Pro Leu Leu Leu Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu Asn His  
 210 215 220  
 5 Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Lys Ser Glu Ala Ser Lys  
 225 230 235 240  
 Lys Lys Thr Ala Gln Thr Val Leu Val Val Val Val Val Phe Gly Ile  
 245 250 255  
 Ser Trp Leu Pro His His Val Ile His Leu Trp Ala Glu Phe Gly Ala  
 10 260 265 270  
 Phe Pro Leu Thr Pro Ala Ser Phe Phe Phe Arg Ile Thr Ala His Cys  
 275 280 285  
 Leu Ala Tyr Ser Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Leu  
 290 295 300  
 15 Ser Glu Asn Phe Arg Lys Ala Tyr Lys Gln Val Phe Lys Cys Arg Val  
 305 310 315 320  
 Cys Asn Glu Ser Pro His Gly Asp Ala Lys Glu Lys Asn Arg Ile Asp  
 325 330 335  
 Thr Pro Pro Ser Thr Asn Cys Thr His Val  
 20 340 345  
  
 <210> 12  
 <211> 372  
 <212> PRT  
 25 <213> Rat  
 <400> 12  
 Met Asn Gly Ser Gly Ser Gln Gly Ala Glu Asn Thr Ser Gln Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Gly Gly Trp Gln Pro Glu Ala Val Leu Val Pro Leu Phe Phe

7 / 14

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





Leu Val Tyr Ser Leu Ala Ser Arg His Phe Arg Ala Arg Phe Arg Arg  
 290 295 300  
 Leu Trp Pro Cys Gly Arg Arg Arg His Arg His His His Arg Ala His  
 305 310 315 320  
 5 Arg Ala Leu Arg Arg Val Gln Pro Ala Ser Ser Gly Pro Ala Gly Tyr  
 325 330 335  
 Pro Gly Asp Ala Arg Pro Arg Gly Trp Ser Met Glu Pro Arg Gly Asp  
 340 345 350  
 Ala Leu Arg Gly Gly Gly Glu Thr Arg Leu Thr Leu Ser Pro Arg Gly  
 10 355 360 365  
 Pro Gln  
 370  
 <210> 14  
 15 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> Porcine  
 <400> 14  
 Ala Pro Val His Arg Gly Arg Gly Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly  
 20 1 5 10 15  
 Tyr Leu Leu Gly Pro Val Leu His Pro Pro Ser Arg Ala Glu Gly Gly  
 20 25 30  
 Gly Lys Gly Lys Thr Ala Leu Gly Ile Leu Asp Leu Trp Lys Ala Ile  
 35 40 45  
 25 Asp Gly Leu Pro Tyr Pro Gln Ser Gln Leu Ala Ser  
 50 55 60

<210> 15

<211> 60

<212> PRT

<213> Rat

<400> 15

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

<210> 16

<211> 60

15 <212> PRT

<213> Human

<400> 16

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

<210> 17

<211> 1041

<212> DNA

<213> Rat

<400> 17

	atggaactgg ctccggtgaa cctcagtgaa gggaatggga gcgaccctga acctccagcg	60
	gaaccaggc cgctcttcgg catcggcgtg gagaacttca tcacgctggt ggtgtttggc	120
5	cttattttcg cgatgggcgt gctgggcaac agcctgggtga tcaccgtgct ggcgcgcagc	180
	aaaccgggca agccgcgcag caccaccaac ctgttcatcc tcaacctgag catcgcagac	240
	ctggcctacc tgctcttctg catcccttcc caggccaccg tgtacgcaact gcccaactgg	300
	gtgctgggcg cttcatctg caagtttata cactacttct tcaccgtgtc catgctcgtg	360
	agcatcttca ccctggccgc gatgtctgtg gatcgtatg tggccattgt gcattcacgg	420
10	cgctcctcct ccctcagggt gtcccgaac gcgctgctgg gcgtgggctt catctgggcg	480
	ctgtccatcg ctatggcctc gccggtggcc tactaccagc gcctttttca tcgggacagc	540
	aaccaaacct tctgctggga gcaactggccc aaccaactcc acaagaaggc ttacgtgggtg	600
	tgcactttcg tctttgggta ctttctgccc ttactgctca tctgcttttg ctatgccaag	660
	gtttctcaatc atctgcataa aaagttgaag aacatgtcaa aaaagtcaga ggcattccaag	720
15	aaaaagactg cacagactgt cctgggtggtc gttgtggat ttggcatatc atggctgccc	780
	catcatgtca tccacctctg ggctgagttc ggagcattcc cgctgacccc agcttccttc	840
	ttcttcagaa tcaactgcca ctgcctggca tacagcaact cctcgggtgaa ccccatcctc	900
	tacgccttcc tctcagaaaa cttccggaag gcgtacaagc aagtgttcaa gtgcctgtgt	960
	tgcaatgagt cgccgcacgg cgatgctaaa gaaaagaacc gaatagatac cccgcctcc	1020
20	accaactgca cccacgtgtg a	1041

<210> 18

<211> 1119

<212> DNA

25 <213> Rat

<400> 18

	atgaatggct ccggcagcca gggcgcggag aacacgagcc aggaaggcgg tagcggcggc	60
	tggcagcctg aggcggtcct tgtaccctta tttttcgcgc tcatcttctc cgtgggcacc	120
	gtgggcaacg cgctggtgct ggcggtgctg ctgcgcggcg gccaggcggt cagcaccacc	180

aacctgttca tcctcaacct gggcgtggcc gacctgtgtt tcacctctgtg ctgcgtgcct 240  
 ttccaggcca ccatctacac cctggacgac tgggtgttcg gctcgtctgt ctgcaaggct 300  
 gttcatttcc tcacttttct cactatgcaac gccagcagct tcacgttggc cgccgtctcc 360  
 ctggacaggt atctggccat ccgtaccgg ctgcactccc gagagttggc cacacctoga 420  
 5 aacgcgctgg ccgccatcgg gctcatctgg gggctagcac tgctcttctc cgggcccctac 480  
 ctgagctact accgtcagtc gcagctggcc aacctgacag tatgccacc agcatggagc 540  
 gcacctcgac gtcgagccat ggacctctgc accttctgtt ttagctacct gctgccagtg 600  
 ctagtccctca gtctgacct tgcgctgacc ctgcgctacc tctggcgcac agtcgaccgg 660  
 gtgactgcag gctcaggttc ccagcgcgcc aaacgcaagg tgacacggat gatcatcacc 720  
 10 gtggcgggtgc ttttctgcct ctgttggatg ccccaccacg cgcttaccct ctgcgtgtgg 780  
 tttggtcgtc tcccgtcac gcgtgccact tacgcgttgc gcatcctttc acacctagtt 840  
 tcctatgcca actcctgtgt caaccctacc gtttacgctc tggctctcaa gcatttccgt 900  
 aaagtttcc gcaaaatctg cgcgggcctg ctgcgcccctg ccccgaggcg agcttcgggc 960  
 cgagtgagca tcctggcgcc tgggaacct agtggcagca tgctggaaca ggaatccaca 1020  
 15 gacctgacac aggtgagcga ggcagccggg ccccttgtcc caccaccgc acttcccac 1080  
 tgcacagcct cgagtagaac cctggatccg gcttgtaa 1119

<210> 19

<211> 1113

20 <212> DNA

<213> Rat

<400> 19

atggctgaca tccagaacat ttcgctggac agcccaggga gcgtaggggc tgtggcagtg 60  
 cctgtgatct ttgccctcat cttcctgttg ggcattgggg gcaatgggct ggtgttggct 120  
 25 gtgctactgc agcctggccc aagtgcctgg caggagccaa gcagtaccac agatctcttc 180  
 atcctcaact tggccgtggc cgacctttgc ttcacctctgt gctgcgtgcc cttccaggca 240  
 gccatctaca cactggatgc ctggctcttt ggggctttcg tgtgcaagac ggtacatctg 300  
 ctcatctacc tcaccatgta tgccagcagc ttcaccctgg cggccgtctc cctggacagg 360  
 tacctggctg tgcggcacc actgcgctcc agagccctgc gcaccccgcg caacgcgcgc 420

gccgccgtgg ggctcgtgtg gctgctggcg gctctctttt ccgcgcccta cctaagctat 480  
 tacggcacgg tgcgctacgg cgcgctcgag ctctgcgtgc ccgcttggga ggacgcgcgg 540  
 cggcgcgcgc tggacgtggc caccttcgcc gcgggctacc tgctgccggt ggccgtggtg 600  
 agcctggcct acggacgcac gctatgtttc ctatgggccg ccgtgggtcc cgcgggcgcg 660  
 5 gcggcagcag aggcgcgcag acgggcgacc ggccgggcgg gacgcgccat gctggcagtg 720  
 gccgcgtctt acgcgctttg ctggggcccc caccacgcgc tcatectctg cttctggtag 780  
 ggccgcttcg ccttcagccc ggccacctac gcctgtgcc tggcctcgca ctgcctgcc 840  
 tacgccaact cctgccttaa cccgctcgtc tactcgtctg cctcgcgcca cttccgcgcg 900  
 cgcttcgcc gcctgtggcc ctgcggccgt cgccgccacc gccaccacca ccgcgtcat 960  
 10 cgagccctcc gtcgtgtcca gccggcgtct tcgggccccg ccggttatcc cggcgacgcc 1020  
 aggcctcgtg gttggagtat ggagcccaga ggggatgctc tgctgtgtgg tggagagact 1080  
 agactaaccc tgtccccag gggacctcaa taa 1113

<210> 20

15 <211> 351

<212> DNA

<213> Rat

<400> 20

atggcctgct ccgtacatct ggtcctcttc ctcaccatct tgctgagcct ggcagaaaca 60  
 20 ccggaatctg cacctgctca caggggacga ggaggctgga ccctcaatag tgctggttac 120  
 ctcttgggtc ctgtcctccc cgtttctctc aaggccgacc agggcaggaa gagagactca 180  
 gctcttgaga tcctagacct gtggaagatc attgatggac ttctttatcc cactctcca 240  
 aggatgacca aaaggacaat gggagaaacg tttgtcaaag cgaatactgg agatatgcac 300  
 atactggaca agaatgttcc caaggaagaa gccaccctgg actcagagag t 351

25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03112

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, A61K39/395, A61K38/17, A61K45/00, A61P25/28, A61P3/04, A61P15/00, A61P13/12, A61P13/10, A61P15/08, A61P15/16, A61P21/00 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 <sup>7</sup> C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, A61K39/395, A61K38/17, A61K45/00, A61P25/28, A61P3/04, A61P15/00, A61P13/12, A61P13/10, A61P15/08, A61P15/16, A61P21/00 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) Swissprot/PIR/GeneSeq, Genbank/DDBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 99/48920, A (TAKEDA CHEM IND LTD), 30 September, 1999 (30.09.99) & AU, 9929570, A & EP, 1065214, A1 & JP, 2000-157273, A	1-13
PX	JP, 2000-270871, A (TAKEDA CHEM IND LTD), 03 October, 2000 (03.10.00) (Family: none)	1-13
A	Ohtaki T., et.al., "Isolation and cDNA cloning of a novel galanin-like peptide (GALP) from porcine hypothalamus.", J.Biol.Chem. (1999), Vol.274, No.52, p.37041-37045	1-13, 16
A	Wang S., et. al., "Molecular cloning and pharmacological characterization of a new galanin receptor subtype.", Mol. Pharmacol. (1997), Vol.52, No.3, p.337-343	1-13, 16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 08 May, 2001 (08.05.01)		Date of mailing of the international search report 22 May, 2001 (22.05.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03112

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.: 17

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

Claim 17 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2.  Claims Nos.: 14,15

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:

Concerning the expressions "a compound or its salt obtained by a screening method" given in claim 14 and "a controlling agent containing a compound - - - obtained by a screening method" given in claim 15, it is completely unknown what compounds are involved and what compounds are not in the scope thereof. Namely, these claims are described in an extremely unclear manner.

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 2 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.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, A61K39/395, A61K38/17, A61K45/00, A61P25/28, A61P3/04, A61P15/00, A61P13/12, A61P13/10, A61P15/08, A61P15/16, A61P21/00		
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. Cl <sup>7</sup> C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, A61K39/395, A61K38/17, A61K45/00, A61P25/28, A61P3/04, A61P15/00, A61P13/12, A61P13/10, A61P15/08, A61P15/16, A61P21/00		
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)		
Swissprot/PIR/GeneSeq, Genbank/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
X	WO, 99/48920, A (TAKEDA CHEM IND LTD) 30. 9月. 1999 (30. 09. 99) & AU, 9929570, A & EP, 1065214, A1 & JP, 2000-157273, A	1-13, 16
P X	JP, 2000-270871, A (TAKEDA CHEM IND LTD) 3. 10月. 2000 (03. 10. 00) ファミリーなし	1-13, 16
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの		「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
「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		「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
「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)		「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
国際調査を完了した日	08. 05. 01	国際調査報告の発送日
		22.05.01
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) 上條 肇
		4N 9839
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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	Ohtaki T., et. al., "Isolation and cDNA cloning of a novel galanin-like peptide (GALP) from porcine hypothalamus.", J. Biol. Chem. (1999), Vol. 274, No. 52, p. 37041-37045	1-13, 16
A	Wang S., et. al., "Molecular cloning and pharmacological characterization of a new galanin receptor subtype.", Mol. Pharmacol. (1997), Vol. 52, No. 3, p. 337-343	1-13, 16

## 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 17 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17は、人の身体の治療による処置方法に該当するものであるから、  
PCT17条(2)(a)及びPCT規則39(iv)の規定により、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。
2.  請求の範囲 14, 15 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14に記載の「スクリーニング方法によって得られる化合物またはその塩」及び同第15項に記載の「スクリーニング方法によって得られた化合物・・・を含有する・・・調節剤」については、化合物として具体的にどの化合物が包含され、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、前記請求項の範囲の記載は著しく不明確である。
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ろ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ため、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ため、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。