

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号  
特許第4219404号  
(P4219404)

(45) 発行日 平成21年2月4日(2009.2.4)

(24) 登録日 平成20年11月21日(2008.11.21)

(51) Int.Cl. F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 38/00 (2006.01) A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1

C O 7 K 14/47 (2006.01) C O 7 K 14/47

C 1 2 N 1/15 (2006.01) C 1 2 N 1/15

請求項の数 30 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-540882	(73) 特許権者	アムジエン・インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成9年4月22日(1997.4.22)		アメリカ合衆国、カリフォルニア・913
(65) 公表番号	特表2001-517931(P2001-517931A)		20-1789、サウザンド・オークス、
(43) 公表日	平成13年10月9日(2001.10.9)		ワン・アムジエン・センター・ドライブ(
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/006853		番地なし)
(87) 国際公開番号	W01997/043412	(74) 代理人	弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開日	平成9年11月20日(1997.11.20)		
審査請求日	平成16年4月5日(2004.4.5)	(74) 代理人	弁理士 伏見 直哉
(31) 優先権主張番号	60/017,505		
(32) 優先日	平成8年5月10日(1996.5.10)	(74) 代理人	弁理士 田中 夏夫
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	08/757,541		
(32) 優先日	平成8年11月27日(1996.11.27)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なアグーティ関連遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリペプチドをコードする核酸分子であって、

- (a) 配列番号4の核酸分子；
- (b) 配列番号5の核酸分子；
- (c) 配列番号6の核酸分子；
- (d) 配列番号9の核酸分子；
- (e) 配列番号8のポリペプチドをコードする核酸分子；
- (f) 配列番号10のポリペプチドをコードする核酸分子；
- (g) 配列番号11のポリペプチドをコードする核酸分子；
- (h) 配列番号7、配列番号8、配列番号10又は配列番号11の各々のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸を置換、欠失若しくは付加することによって配列番号7、配列番号8、配列番号10又は配列番号11のポリペプチドから得られるポリペプチドであって、かつ哺乳動物において食物摂取を増大させる生物学的活性を有する前記ポリペプチド

をコードする核酸分子；及び

- (i) 上記(a)～(h)のいずれかの相補体である核酸分子
- からなる群から選択される前記核酸分子。

【請求項2】

配列番号4の核酸分子。

【請求項 3】 配列番号 5 の核酸分子。	
【請求項 4】 配列番号 6 の核酸分子。	
【請求項 5】 配列番号 9 の核酸分子。	
【請求項 6】 配列番号 7 のポリペプチドをコードする核酸分子。	
【請求項 7】 配列番号 8 のポリペプチドをコードする核酸分子。	10
【請求項 8】 配列番号 10 のポリペプチドをコードする核酸分子。	
【請求項 9】 配列番号 11 のポリペプチドをコードする核酸分子。	
【請求項 10】 請求項 1 に記載の核酸分子を含むベクター。	
【請求項 11】 請求項 2 に記載の核酸分子を含むベクター。	
【請求項 12】 請求項 3 に記載の核酸分子を含むベクター。	20
【請求項 13】 請求項 4 に記載の核酸分子を含むベクター。	
【請求項 14】 請求項 5 に記載の核酸分子を含むベクター。	
【請求項 15】 請求項 6 に記載の核酸分子を含むベクター。	
【請求項 16】 請求項 9 に記載の核酸分子を含むベクター。	
【請求項 17】 請求項 10 に記載のベクターを含む宿主細胞。	30
【請求項 18】 請求項 11 に記載のベクターを含む宿主細胞。	
【請求項 19】 請求項 12 に記載のベクターを含む宿主細胞。	
【請求項 20】 請求項 13 に記載のベクターを含む宿主細胞。	
【請求項 21】 請求項 14 に記載のベクターを含む宿主細胞。	
【請求項 22】 請求項 15 に記載のベクターを含む宿主細胞。	40
【請求項 23】 請求項 16 に記載のベクターを含む宿主細胞。	
【請求項 24】 ポリペプチドを製造する方法であって、 （a）適当な宿主中で、請求項 1 に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを発現させるステップ；及び （b）該ポリペプチドを分離するステップ を含む前記方法。	
【請求項 25】 ポリペプチドが、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 10 及び配列番号 11 からなる群か	50

ら選択される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

ポリペプチドであって、

( a ) 配列番号 7 のポリペプチド；

( b ) 配列番号 8 のポリペプチド；

( c ) 配列番号 1 0 のポリペプチド；

( d ) 配列番号 1 1 のポリペプチド；及び

( e ) 配列番号 7、配列番号 8、配列番号 1 0 又は配列番号 1 1 の各々のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸を置換、欠失若しくは付加することによって前記 ( a ) から ( d ) のいずれかから得られるポリペプチドであって、かつ哺乳動物において食物摂取を増大させる生物学的活性を有する前記ポリペプチド

からなる群から選択される前記ポリペプチド。

【請求項 2 7】

アミノ末端メチオニンを有していない、請求項 2 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 8】

アミノ末端メチオニンを有する、請求項 2 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 9】

有効量の請求項 2 6 に記載のポリペプチドを含む、哺乳動物の食物摂取を増大させるための医療用または農業用組成物。

【請求項 3 0】

哺乳動物に請求項 2 6 に記載のポリペプチドを投与することを含む、ヒト以外の哺乳動物の食物摂取を増大させる方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

発明の分野

本発明は、新規なヒト遺伝子配列及び該遺伝子配列によりコードされるタンパク質に関する。より特定の言え、本発明は、選択された組織で発現し、食物摂取を増大させる、「ART」と称される新規な遺伝子に関する。

関連技術の説明

1. アグーティ遺伝子

アグーティ遺伝子は殆どの哺乳動物に存在するが、げっ歯動物以外の哺乳動物におけるその機能は解明されていない。アグーティ遺伝子産物は、マウス、リス及びオオカミを含む多くの動物の被毛の黒色素又は黄色素の相対的産生を調節している [ A . G . S e a r l e , C o m p a r a t i v e G e n e t i c s o f C o a t C o l o r i n M a m m a l s , A c a d e m i c P r e s s , N e w Y o r k , N Y ( 1 9 6 8 ) ] 。

マウスのアグーティ遺伝子がクローン化され、配列決定された [ B u l t m a n ら , C e l l , 7 1 : 1 1 9 5 - 1 2 0 4 ( 1 9 9 2 ) ] 。該遺伝子は、分泌される 1 3 1 個のアミノ酸タンパク質をコードする。アグーティタンパク質は、メラニン細胞上で発現するメラノコルチン - 1 - 受容体 ( 「 M C 1 r 」 ) に対する拮抗物質として作用するようである [ T a k e u c h i , J . I n v e s t . D e r m a t o l . , 9 2 : 2 3 9 S - 2 4 2 S ( 1 9 8 9 ) ; J a c k s o n , N a t u r e , 3 6 2 : 5 8 7 - 5 8 8 ( 1 9 9 3 ) 参照 ] 。 M C 1 r は、メラニン細胞刺激ホルモン ( - M S H ) で占められると、メラニン細胞に黒色素を合成させる ( J a c k s o n , 前掲参照 ) 。従って、アグーティが - M S H の作用をブロックし、その結果、被毛が黄色素を有するようである [ L u ら , N a t u r e , 3 7 1 : 7 9 9 - 8 0 2 ( 1 9 9 4 ) ] 。

同様に、W i l l a r d ら [ B i o c h e m i s t r y , 3 4 : 1 2 3 4 1 - 1 2 3 4 6 ( 1 9 9 5 ) ] は、部分精製されたマウスのアグーティタンパク質が、B 1 6 F 1 0 マウスの黒色腫細胞培養の M C 1 受容体で - M S H の強力な拮抗物質として作用することを証明した。アミノ酸 8 3 でアグーティタンパク質をタンパク質分解切断すると、全長のア

10

20

30

40

50

グーティタンパク質と同等な活性を有するC末端断片が生成するが、これは、アグーティタンパク質の活性ドメインが該タンパク質のC末端内に存在することを示唆している〔Willardら, 前掲〕。このC末端断片は10個のシステインを有する(全長の分子は11個のシステインを有する)。

ヒトのアグーティ遺伝子は、皮膚、心臓、精巣、卵巣及び脂肪組織で発現する。このように広範な組織で発現するということは、アグーティが色素産生以外の生理過程に参与している可能性があることを示唆している〔Wilsonら, Human Mol. Gen., 4:233-230(1995); Kwonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:9760-9764(1994)〕。

トランスジェニックマウスにおいてアグーティの過発現に起因する数種の優性表現型が確認された。該表現型には、例えば、肥満症、インスリン過剰血症、糖尿病及び高腫瘍感受性が含まれる〔Manneら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:4721-4724(1995)参照〕。肥満症及びインスリン過剰血症の程度及び発症時期はアグーティ遺伝子の発現レベルと関連するようである(Manneら, 前掲)。さらに、これらの表現型は、褐色素の過剰産生とは関連がないようである。というのは、不活性MC1受容体を有するマウスも同じ表現型を示すからである。

アグーティ遺伝子産物を過発現する突然変異マウスは、骨格筋中に高レベルの細胞内カルシウムを有している〔Zemelら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:4728-4732(1995)〕。アグーティがこの作用を生み出すメカニズムは不明であるが、細胞内に貯蔵されたカルシウムの放出やカルシウムの流出速度の低下に起因するものではないようである。骨格筋はインスリンの取り込みに重要であり、且つ該プロセスは少なくとも部分的にカルシウムレベルにより調節されるので、この高レベルの細胞内カルシウムはアグーティ突然変異マウスに認められるインスリン過剰血症の原因の一部を明らかにし得る。

興味深いことには、マウスのアグーティは、特異的神経伝達物質受容体又はイオンチャンネルを標的とする特定のクモ及びヘビ毒とある程度のアミノ酸配列相同性を共有している〔Manneら, 前掲; Ichidaら, Neurochem. Res., 18:1137-1144(1993); Figueiredoら, Toxicol., 33:83-93(1995)〕。この相同性は主として、該毒素とアグーティが8個のシステイン残基を共有するアグーティタンパク質のC末端に限られている。毒素では、これらのシステイン残基は、毒素活性に決定的な4個のジスルフィド結合を形成している。三次元NMRを用いた構造活性関係の分析により、カルシウムチャンネルのブロックに必要な三次構造の形成にはジスルフィド結合が必要であることが予言される〔Kimら, J. Mol. Biol., 250:659-672(1995)〕。

アグーティとクモ及びヘビ毒素とのアミノ酸配列相同性や、アグーティを過発現する突然変異マウスから得られた結果から、アグーティがメラノコルチン受容体又は特定タイプのカルシウムチャンネルタンパク質の活性を調節する分子の新規クラスの一員であり得ることが示唆された(Manneら, 前掲)。

## 2. メラノコルチン受容体

ヒトには、現在、MC1r-MC5rとして知られている5種の既知メラノコルチン受容体が存在する。このうちの2種、MC1r及びMC2rは、それぞれリガンド-MSH及びACTHに対し相対的特異性を示す。MC1r及びMC2rはそれぞれメラニン細胞及び副腎で発現する〔Mountjoyら, Science, 257:1248-1251(1992)〕。MC3rは特定の脳領域で発現するが、MC4rはより広範に脳全体で発現し、MC5rは多くの末梢組織で発現する〔Roselli-Reyfuseら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:8856-8860(1993); Mountjoyら, Science, 前掲; Labbeら, Biochemistry, 33:4543-4549(1994)〕。MC3r、MC4r及びMC5rのリガンド及び生物学的機能は現在のところ不明である。

最近、メラニン濃縮ホルモン(MCH)をラットの脳に注入すると食事応答を刺激すると

10

20

30

40

50

いう観察により、肥満症の中枢性制御におけるメラノコルチン受容体の役割が示唆された〔Quら, Nature, 380: 243 - 247 (196)〕。MCHはアグーティとのアミノ酸配列相同性を有してはいないが、抗MCH抗体もアグーティ上のエピトープを認識し、さらにMCHはMC1受容体で拮抗活性を示す。

アグーティ及びMCHの関与が示唆されている生理的障害及び疾患（肥満症、インスリン過剰血症、糖尿病）の多様性や、アグーティ及びMCHがMC受容体を拮抗するという事実を考慮すると、上記障害に関与し得る関連遺伝子及びタンパク質を同定・分析する方法が当業界で必要とされる。

従って、本発明の目的は、直接又は間接に、メラノコルチン受容体シグナル伝達、細胞内カルシウムレベル、及び/又は体脂肪組成（例えば、脂肪組織のレベル及び/若しくは分布、循環性グルコースレベル、並びに/又はインスリンレベル）を調節し得る化合物を提供することである。

本発明の他の目的は、食物摂取を増大させ得る化合物を提供することである。

上記及び他の目的は当業者には容易に明らかであろう。

#### 発明の要旨

本発明は、1つの実施態様において、

- (a) 配列番号4の核酸配列；
- (b) 配列番号5の核酸配列；
- (c) 配列番号6の核酸配列；
- (d) 配列番号9の核酸配列；
- (e) 配列番号8のポリペプチドをコードする核酸分子；
- (f) 配列番号10のポリペプチドをコードする核酸分子；
- (g) 配列番号11のポリペプチドをコードする核酸分子；
- (h) 配列番号7、配列番号8、配列番号10、配列番号11のポリペプチドと少なくとも70%同一であるポリペプチドをコードする核酸分子；及び
- (i) 上記(a)～(h)のいずれかの相補体である核酸分子

からなる群から選択されるポリペプチドをコードする核酸分子を提供する。

本発明は、別の実施態様において、上記群から選択される核酸分子を含むベクター、及び該ベクターを含む宿主細胞を提供する。

本発明は、さらに別の実施態様において、ARTポリペプチドの製造方法を提供し、該方法は、

- (a) 上記群から選択される核酸（該核酸は適当な宿主中に挿入されている）によりコードされるポリペプチドを発現させるステップ；及び
  - (b) 該ポリペプチドを分離するステップ
- を含む。

本発明はさらに、

- (a) 配列番号7のポリペプチド；
  - (b) 配列番号8のポリペプチド；
  - (c) 配列番号10のポリペプチド；
  - (d) 配列番号11のポリペプチド；及び
  - (e) 上記(a)又は(b)のポリペプチドと70%相同であるポリペプチド
- からなる群から選択されるARTポリペプチドを提供し、該ポリペプチドは、アミノ末端メチオニンを有していても有していなくてもよい。

本発明は他の1つの実施態様において、哺乳動物にARTポリペプチドを投与することを含む、哺乳動物の食物摂取を増大させる方法を提供する。

#### 【図面の簡単な説明】

図1A及び1Bは、ヒトARTのゲノムDNA配列を示している（配列番号4）。

図2は、ヒト脳組織由来のART cDNAを示している（配列番号5）。

図3は、ヒト末梢組織由来のART cDNAを示している（配列番号6）。

図4は、ヒトART cDNAの翻訳された全長アミノ酸配列を示している（配列番号7）

10

20

30

40

50

)。

図5は、切断されたヒトARTポリペプチドを示している(配列番号8)。

図6は、示されている種々のヒト組織のノーザンプロットを示している。該プロットは、実施例に記載のようにART cDNAを用いてプローブ検出した。

図7は、エキソン2(最初のコードエキソン)で出発し、さらにエキソン3及び4並びに対応イントロンを含むマウスゲノムDNAを示している(配列番号9)。

図8は、マウスART cDNAの翻訳された全長アミノ酸配列を示している(配列番号10)。

図9は、ヒトART遺伝子多型性のアミノ酸配列を示している。該図で明らかなように、この多型性配列では、45位のアミノ酸(図4ではLeu)はProである。

図10は、ヒトARTポリペプチドを注射したラットの採食挙動パターンのグラフである。X軸は、ART注射後の食物の摂取を測定した時間を表し、Y軸は、消費された食物の累積量(g)を表す。ラットには、PBSのみ(対照)か、「非折りたたみ」ART(対照)か、約2 µl容量中0.075、0.3、3.0又は7.5 nmolの折りたたみARTのいずれかを注射した。標準誤差を表す棒が示されている。適合するところにはデータの統計的分析が、\* = p < 0.006 - 0.0001対PBS、及び# = p < 0.01 - 0.001対非折りたたみARTとして示されている。

#### 発明の詳細な説明

本明細書において、核酸分子の記載に用いられている用語「ART」とは、(a)配列番号4、配列番号5又は配列番号6に記載のヌクレオチド配列を有する核酸分子又はその断片；(b)配列番号4、配列番号5又は配列番号6のいずれかによってコードされるポリペプチドと、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上一致しているポリペプチドをコードする核酸配列を有する核酸分子又はその断片；(c)上記(a)又は(b)の天然対立遺伝子変異体である核酸分子又はその断片；及び/又は上記(a)~(d)に相補的な核酸分子又はその断片を指す。

配列一致率は、2種のポリペプチドのアミノ酸位置の類似性の比較に一般に用いられている標準法により決定し得る。BLAST又はFASTAなどのコンピュータプログラムを用い、2種のポリペプチドを(一方若しくは両方の配列の全長に沿って、又は一方若しくは両方の配列の所定部分に沿って)それぞれのアミノ酸の最適なマッチングが得られるように整列させる。該プログラムにより、「デフォルト」オープニングペナルティー及び「デフォルト」ギャップペナルティーが得られ、該コンピュータプログラムと連係して、PAM250などのスコアリングマトリックス〔標準スコアリングマトリックス；Dayhoffら, Atlas of Protein Sequence and Structure, 第5巻, supp. 3 (1978) 参照〕を用い得る。その場合、一致率は以下のように計算し得る：

一致しているマッチの総数

× 100

マッチしている範囲内の長い方の配列の長さ)

+ (2つの配列を整列させるために長い方の

配列中に導入されたギャップの数)

70%以上一致しているポリペプチドは、典型的には1個以上のアミノ酸の置換、欠失及び/又は挿入を有している。通常、置換は、タンパク質の全体的な実効電荷、極性又は疎水性に殆ど又は全く影響を与えないように保存性(conservative)である。保存性置換を以下の表Iに記載する。

## 表 I

保存性アミノ酸置換

塩基性：	アルギニン
	リシン
	ヒスチジン
酸性：	グルタミン酸
	アスパラギン酸
極性：	グルタミン
	アスパラギン
疎水性：	ロイシン
	イソロイシン
	バリン
芳香族性：	フェニルアラニン
	トリプトファン
	チロシン
小型：	グリシン
	アラニン
	セリン
	トレオニン
	メチオニン

10

20

用語「緊縮条件」とは、オリゴヌクレオチドなどの核酸分子又はcDNA分子のプロープと高度に相同性の配列との結合のみを可能にする条件下でのハイブリダイゼーション及び洗浄を指す。1種の緊縮洗浄溶液は、55～65の温度で用いられる、0.015M NaCl、0.005M クエン酸ナトリウム及び0.1% SDSである。別の緊縮洗浄溶液は、50～65の温度で用いられる、0.2×SSC及び0.1% SDSである。cDNA又はゲノムライブラリーのスクリーニングにオリゴヌクレオチドプロープを用いる場合、以下の緊縮洗浄条件を用い得る。第1のプロトコルでは、オリゴヌクレオチドプロープの長さに応じて、35～62の温度で0.05%ピロリン酸ナトリウムを含む6×SSCを用いる。例えば、14塩基対のプロープは35～40で、17塩基対のプロープは45～50で、20塩基対のプロープは52～57で、また23塩基対のプロープは57～63で洗浄する。バックグラウンドの非特異的結合が高度に出現する場合には、温度を2～3上げてよい。第2のプロトコルでは、オリゴヌクレオチドプロープの洗浄に塩化テトラメチルアンモニウム(TMAC)を用いる。1種の緊縮洗浄溶液は、3M TMAC、50mM Tris-HCl、pH 8.0、及び0.2% SDSである。該溶液を用いて洗浄する場合の温度は、プロープの長さの関数である。例えば、17塩基対のプロープは約45～50で洗浄する。

30

40

本明細書に用いられている用語「ARTタンパク質」又は「ARTポリペプチド」とは、本明細書でARTについて記載した特性を有する任意のタンパク質又はポリペプチドを指す。該ARTポリペプチドは、製造法によって、アミノ末端メチオニンを有していても有していなくてもよい。例えば、ARTタンパク質又はARTポリペプチドには、上記項目(a)～(e)のいずれかに記載の核酸分子及び該分子由来のペプチド若しくはポリペプチド断片によりコードされるアミノ酸配列、配列番号7若しくは8に記載のアミノ酸配列

50

、並びにノ又は本明細書に提供されているその化学修飾誘導体や核酸及びノ若しくはアミノ酸配列変異体を含む。

本明細書に用いられている用語「ART断片」とは、天然ARTタンパク質の全長アミノ酸配列より短い、上記ARTポリペプチド又はARTタンパク質と実質的に同じ生理活性を有するペプチド又はポリペプチドを指す。そのような断片は、アミノ末端、カルボキシ末端及びノ又は内部で切断し得、且つ化学修飾し得る。ART断片は少なくとも全10個のC末端システイン残基を保有するカルボキシ末端断片であるのが好ましい。そのようなART断片は、アミノ末端メチオニンを含むか又は含まずに作製し得る。好ましいART断片は配列番号8に記載のものである。

本明細書に用いられている用語「ART誘導体」又は「ART変異体」とは、(1)例えば、ポリエチレングリコール若しくは他の化合物を付加することにより化学修飾されたARTポリペプチド若しくはARTタンパク質並びにノ又は(2)1個以上の核酸又はアミノ酸配列の置換、欠失及びノ若しくは挿入を含むARTポリペプチド若しくはARTタンパク質を指す。

本明細書に用いられている用語「生理活性ポリペプチド」及び「生理活性断片」とは、ART活性を有する(即ち、メラノコルチン受容体のシグナル伝達活性を調節し得、細胞内カルシウムレベルを調節し得、且つノ又は脂質代謝を調節し得る)ペプチド又はポリペプチドを指す。

本明細書に用いられている用語「有効量」及び「治療上有効量」とは、上記のようなARTの1種以上の生理活性の支持に必要なARTの量を指す。

本発明の実施に用いられるARTポリペプチドは、天然の全長ポリペプチド、又は切断されたポリペプチド若しくはペプチド(即ち、「断片」)であってよい。該ポリペプチド又は断片は、以下に記載のように、化学修飾、即ち、グリコシル化、リン酸化し得、且つノ又はポリマーに結合し得、製造法に応じて、アミノ末端メチオニンを有し得る。さらに、該ポリペプチド又は断片は、天然ARTポリペプチドの変異体であってよい(即ち、天然ARTと比較して、1個以上のアミノ酸の欠失、挿入、及びノ又は置換を含み得る)。

全長ARTポリペプチド又はその断片は、Sambrookら[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)]及びノ又はAusubelら編[Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishers Inc. 及びWiley and Sons, NY (1994)]に記載のものなどの周知の組換えDNAテクノロジー法を用いて製造し得る。ARTタンパク質又はその断片をコードする遺伝子又はcDNAは、例えば、ゲノム若しくはcDNAライブラリーをスクリーニングするか、又はPCR増幅により得ることが出来る。あるいは、ARTポリペプチド又は断片は、Engelsら[Angew. Chem. Intl. Ed., 28: 716-734 (1989)]により記載のものなどの当業者には周知の方法を用い化学合成法に従って製造し得る。これらの方法には、特に、核酸を合成するためのホスホトリエステル法、ホスホロアミダイト法及びH-ホスホネート法が含まれる。そのような化学合成に好ましい方法は、標準ホスホロアミダイト化学を用いるポリマー支持合成法である。ARTポリペプチドをコードするDNAは、典型的には、数百個のヌクレオチドの長さである。約100ヌクレオチドより大きい核酸は、上記方法を用い、複数の断片として合成し得る。次いで、該断片を連結して、全長ARTポリペプチドを形成し得る。通常、ポリペプチドのアミノ末端をコードするDNA断片は、メチオニン残基をコードするATGを有する。このメチオニンは、宿主細胞中で産生されたポリペプチドが該細胞から分泌されるか否かによって、成熟形態のARTポリペプチド上に存在する場合も存在しない場合もあり得る。

天然ARTの核酸及びノ又はアミノ酸変異体を製造することが望ましい場合がある。(1個以上のヌクレオチドが野生型又は天然ARTとは異なるように設計されている)核酸変異体は、プライマーが所望の点変異を有する部位指向突然変異誘発又はPCR増幅を用い

10

20

30

40

50



て製造し得る（突然変異誘発法の説明については、S a m b r o o k ら，前掲、及び A u s u b e l ら，前掲を参照されたい）。そのような変異体の製造には、E n g e l s ら，前掲により記載された方法を利用することもできる。当業者には公知の他の方法を用いてもよい。好ましい核酸変異体は、A R T の産生に用いられる宿主細胞中でのコドン優先をもたらすヌクレオチド置換を含むものである。他の好ましい変異体は、野生型とは対比的に、保存性アミノ酸置換（例えば、天然アミノ酸側鎖の電荷又は極性が、別のアミノ酸で置換しても実質的に変わらない）をコードするもの、並びに／又は A R T 上で新規なグリコシル化及び／若しくはリン酸化部位を生成するように設計されたもの、又は、A R T 上に存在するグリコシル化及び／若しくはリン酸化部位を欠失させるように設計されたものである。

10

A R T 遺伝子又は c D N A は、宿主細胞中で発現させるために適切な発現ベクター中に挿入し得る。該ベクターは、用いられる特定の宿主細胞において機能性である（即ち、該ベクターは、A R T 遺伝子の増幅及び／又は該遺伝子の発現が生じ得るように宿主細胞機構と適合し得る）ように選択される。A R T ポリペプチド又はその断片は、原核生物、酵母、昆虫（バキュロウイルス系）及び／又は真核宿主細胞中で増幅／発現し得る。宿主細胞の選択は、少なくとも部分的には、A R T ポリペプチド又はその断片がグリコシル化されるか否かに依存する。グリコシル化される場合、酵母、昆虫又は哺乳動物宿主細胞が好ましい。酵母細胞は、ポリペプチドをグリコシル化し、昆虫及び哺乳動物細胞は、A R T ポリペプチド上で天然に生起するようにポリペプチドをグリコシル化及び／又はリン酸化（即ち、「天然」グリコシル化及び／又はリン酸化）し得る。

20

典型的には、どの宿主細胞にも用いられるベクターは、5' フランキング配列（「プロモーター」とも称される）や、エンハンサー、複製起点成分、転写終結成分、供与及び受容スプライス部位を含む完全イントロン配列、シグナルペプチド配列、リボソーム結合部位成分、ポリアデニル化配列、発現させるべきポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、及び選択マーカー成分などの他の調節成分を含む。各成分については以下で説明する。該ベクターは、場合によって、「標識」配列、即ち、ポリ H i s（例えばヘキサ H i s）をコードする A R T コード配列又は別の小さい免疫原性配列の 5' 末端又は 3' 末端に位置するオリゴヌクレオチド配列を含み得る。この標識はタンパク質と一緒に発現し、宿主細胞から A R T ポリペプチドを精製するための親和性標識としての役割を果たし得る。場合により、該標識は、その後で、例えば選択されたペプチダーゼを用いるものなどの種々の手段により精製された A R T ポリペプチドから除去し得る。

30

5' フランキング配列は、同種（即ち、宿主細胞と同種及び／又は同株由来）でも、異種（即ち、宿主細胞種又は株以外の種由来）でも、ハイブリッド（即ち、2 種以上の起源由来の 5' フランキング配列の組み合わせ）配列でも、合成配列であってもよいし、あるいは天然 A R T 5' フランキング配列であってもよい。従って、5' フランキング配列源は、該配列が宿主細胞機構において機能性であり且つ該機構により活性化され得る限り、いずれの単細胞原核若しくは真核生物でも、いずれの有脊椎又は無脊椎動物でも、いずれの植物であってもよい。

本発明のベクターにおいて有用な 5' フランキング配列は、当業界で周知のいくつかの方法のいずれによっても得ることができる。典型的には、A R T の 5' フランキング配列以外の本発明に有用な 5' フランキング配列は、マッピング及び／又は制限エンドヌクレアーゼ消化により既に同定されているであろうし、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを用いて適切な組織源から分離し得る。5' フランキング配列の全ヌクレオチド配列が公知である場合もあり得る。その場合、該 5' フランキング配列は、上記の核酸合成法又はクローニング法を用いて合成し得る。

40

5' フランキング配列の全部又は一部のみが知られている場合、該配列は、P C R を用いるか、並びに／あるいはゲノムライブラリーを適当なオリゴヌクレオチド及び／又は同種若しくは異種由来の 5' フランキング配列断片でスクリーニングすることにより得られる。

5' フランキング配列がわからない場合、5' フランキング配列を含む D N A の断片を、

50

例えば、コード配列又は別の1種若しくは複数種の遺伝子を含み得る大きいDNA断片から分離し得る。分離は、慎重に選択された1種以上の酵素を用いて制限エンドヌクレアーゼ消化して、適切なDNA断片を分離することにより実施し得る。消化後、アガロースゲル精製法、QiaGen<sup>®</sup> カラム又は当業者には公知の他の方法を用いて目的の断片を分離し得る。この操作に適した酵素の選択は、当業者には用意に明らかであろう。

複製起点成分は、典型的には、市販の原核生物発現ベクターの一部であり、宿主細胞中の該ベクターの増幅を促進する。該ベクターを特定のコピー数まで増幅することがARTポリペプチドの最適な発現に重要である場合がある。選択されたベクターが複製起点部位を含んでいない場合、該部位は、既知配列に基づいて化学合成し、該ベクター中に連結し得る。

10

転写終結成分は、典型的には、ARTポリペプチドコード配列の3'末端に位置し、ARTポリペプチドの転写を終結させる役割を果たす。通常、原核細胞中の転写終結成分はポリT配列が後に続くG-Cに富む断片である。該成分はライブラリーから容易にクローン化し得るし、ベクターの一部として市販されているものさえあるが、該成分は、先に記載のものなどの核酸合成法を用いて容易に合成することもできる。

選択マーカー遺伝子成分は、選択培地中で増殖される宿主細胞の生存及び増殖に必要なタンパク質をコードする。典型的な選択マーカー遺伝子は、(a) 原核宿主細胞に抗生物質又は他の毒素、例えば、アンピシリン、テトラサイクリン若しくはカナマイシンに対する耐性を付与するタンパク質、(b) 細胞の栄養要求性欠陥を補うタンパク質、又は(c) 複合培地からは得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、及びテトラサイクリン耐性遺伝子である。

20

一般にシャイン・ダルガーノ配列(原核生物)又はコザック配列(真核生物)と称されているリボソーム結合成分は、mRNAの翻訳開始に必要なものである。該成分は、典型的には、プロモーターに対して3'位置、合成すべきARTポリペプチドのコード配列に対して5'位置に存在する。シャイン・ダルガーノ配列は様々であるが、典型的には、ポリプリン(即ち、高A-G含量を有する成分)である。多くのシャイン・ダルガーノ配列が同定されているが、該配列はいずれも上記方法を用いて容易に合成し得、原核生物ベクター中で用い得る。

ARTを宿主細胞から分泌させるのが望ましい場合には、シグナル配列を用いてARTポリペプチドが合成される宿主細胞から該ポリペプチドを誘導し得る。シグナル配列は、典型的には、ART核酸配列のコード領域に位置するか、又は直接ARTコード領域の5'末端に位置し得る。多くのシグナル配列が同定されているが、選択される宿主細胞中で機能性であれば、どのシグナル配列でもART遺伝子と一緒に用い得る。従って、シグナル配列はARTポリペプチドに対して同種であっても異種であってもよく、上記方法を用いて化学修飾し得る。殆どの場合、シグナルペプチドの存在を介して宿主細胞からポリペプチドを分泌させると、ポリペプチドからアミノ末端メチオニンが除去される。

30

多くの場合、ベクター上に1個以上のイントロンが存在するとARTポリペプチドの転写が増強される。これは特に真核宿主細胞、特に哺乳動物宿主細胞の場合に当てはまる。イントロンは、特に用いられるART配列が全長のゲノム配列又はその断片である場合に、ART核酸配列内で自然に発生する。(殆どのcDNAの場合のように)イントロンがART DNA配列内で自然発生しない場合、イントロンは別の供給源から得ることができ、5'フランキング配列及びARTコード配列に関するイントロンの位置は、イントロンが効果的であるように転写されなければならないので重要である。従って、ART核酸配列がcDNA配列の場合、好ましいイントロンの位置は、転写開始部位に対して3'位置、且つポリA転写終結配列に対して5'位置である。ART cDNAの場合、イントロンはARTコード配列に干渉しないように、該コード配列のどちらか一方の末端(即ち、5'末端又は3'末端)に位置するのが好ましい。任意のウイルス性、原核性及び真核性(植物又は動物)生物を含めた任意の起源由来のどのイントロンも、該イントロンが挿入される宿主細胞と適合し得る限り、本発明の実施に用い得る。本発明には合成イントロ

40

50

ンも包含される。場合により、ベクター中に1個以上のイントロンを用い得る。

用いるべきベクター中に1種以上の上記成分がまだ存在していない場合、該成分を個別に得て、ベクターに連結し得る。それぞれの成分を得るのに用いられる方法は当業者には周知であり、上記方法（即ち、DNA合成法、ライブラリーのスクリーニング法など）と類似のものである。

本発明の実施に用いられる最終ベクターは、典型的には、市販のベクターなどの出発ベクターから構築する。そのようなベクターは、完成ベクターに含まれるべき成分の一部含んでいても含んでいなくてもよい。出発ベクター中に所望の成分が全く存在していない場合、連結すべき成分の末端とベクターの末端とが連結に適合し得るように、該ベクターを適切な制限エンドヌクレアーゼで切断して、各成分を個別にベクターに連結し得る。満足すべき連結が得られるように、連結すべき末端を「平滑にする」ことが必要な場合があり得る。平滑化は、先ず、全4個のヌクレオチドの存在下にクレノウDNAポリメラーゼ又はT4 DNAポリメラーゼを用いて「付着末端」を充填して行う。この手順は当業界では周知であり、例えば、Sambrookら、前掲に記載されている。

あるいは、先ず、ベクターに挿入すべき2種以上の成分を互いに連結し（該成分が互いに隣接するように配置される場合）、次いで、ベクターに連結し得る。

ベクターの他の構築法の1つは、1種の反応混合物中で種々の成分を全て同時に連結するものである。この場合、成分の不適切な連結又は挿入により、多くのナンセンス又は非機能性ベクターが生成するが、制限エンドヌクレアーゼ消化により、機能性ベクターを同定・選択し得る。

本発明の実施に好ましいベクターは、細菌、昆虫及び哺乳動物宿主細胞に適合し得るものである。そのようなベクターには、特に、pCRII (Invitrogen Company, San Diego, CA)、pBSII (Stratagen Company, La Jolla, CA) 及びpETL (BlueBacII; Invitrogen) が含まれる。

ベクターを構築し、ART核酸を該ベクターの適切な部位に挿入した後、完成したベクターを増幅及び/又はARTポリペプチド発現に適した宿主細胞に挿入し得る。

宿主細胞は、原核宿主細胞（例えば、大腸菌）でも、真核宿主細胞（例えば、酵母細胞、昆虫細胞又は有脊椎細胞）でもよい。宿主細胞は、適切な条件下に培養すると、ARTタンパク質を合成し得る。次いで、該タンパク質を培地から回収する（宿主細胞が培地中に該タンパク質を分泌する場合）か、又は直接該タンパク質を産生する宿主細胞から合成し得る（該タンパク質が分泌されない場合）。回収後、モレキュラーシーブ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方法を用い、ARTタンパク質を精製し得る。

宿主細胞の選択は、部分的には、ARTタンパク質がグリコシル化されるか又はリン酸化（この場合、真核宿主細胞が好ましい）されるか、また生理活性タンパク質が細胞によって産生されるように宿主細胞が該タンパク質をその天然の三次構造（例えば、ジスルフィド架橋の適切な配向など）に「折りたたみ」得る方式に依存する。しかし、宿主細胞が生理活性ARTを合成しない場合、以下に記載のような適切な化学条件を用いて合成後にARTを「折りたたみ」得る。

適当な細胞又は細胞系は、モルモット卵巢ホルモン（CHO）又は3T3細胞などの哺乳動物細胞であってよい。形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物の産生及び生成に適した哺乳動物宿主細胞及び方法の選択は当業界で公知である。他の適当な哺乳動物細胞系は、サルCOS-1及びCOS-7細胞系や、CV-1細胞系である。哺乳動物宿主細胞の他の例としては、形質転換細胞系を含めた、霊長類細胞系及びげっ歯動物細胞系が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のin vitro培養由来の細胞株及び初代外殖片も適当であり得る。候補細胞は、選択遺伝子中に遺伝子型の欠損があるか、又は優性に作用する選択遺伝子を含み得る。他の適当な哺乳動物細胞系には、HeLa、マウスL-929細胞、Swiss、Balb-c又はNTHマウス由来の3T3系、BHK又はHaKハムスター細胞系が含まれるがそれらには限定されない。

本発明に適した宿主細胞として同様に有用なものは細菌細胞である。例えば、種々の大腸菌株（例えば、HB101、DH5<sup>+</sup>、DH10及びMC1061）がバイオテクノロジーの分野における宿主細胞として周知である。種々の枯草菌株、シュードモナス属、他のバシラス属、ストレプトミセス属などの株もこの方法に用い得る。

当業者には公知の多くの酵母細胞株も、本発明のポリペプチドを発現させるための宿主細胞として利用し得る。さらに、所望の場合には、本発明の方法に宿主細胞として昆虫細胞を利用し得る〔Millerら, Genetic Engineering 8:277-298(1986)〕。

選択された宿主細胞へのベクターの挿入（「形質転換」又は「トランスフェクション」とも称される）は、塩化カルシウム法、電気穿孔法、マイクロインジェクション法、リポフ  
10  
ェクション法又はDEAE-デキストラン法などの方法を用いて実施し得る。選択される方法は、部分的には用いられる宿主細胞のタイプの関数である。上記方法及び他の適当な方法は当業者には周知であり、例えば、Sambrookら, 前掲に記載されている。

ベクターを含む宿主細胞（即ち、形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞）は、当業者には周知の標準培地を用いて培養し得る。該培地は、通常、細胞の増殖及び生存に必要な全ての栄養素を含む。大腸菌の培養に適した培地は、例えば、Luria Broth (LB) 及び/又はTerrific Broth (TB) である。真核細胞の培養に適した培地は、RPMI 1640、MEM、DMEMであり、該培地は全て、培養される特定の細胞系が要求する血清及び/又は増殖因子を補充し得る。昆虫培養に適した培地は、必要に応じ、イーストラート、ラクトアルブミン水解物、及び/又はウシ胎児血清を  
20  
補ったGraceの培地である。

典型的には、形質転換細胞のみの選択的増殖に有用な抗生物質又は他の化合物を培地の補充物質として加える。どの化合物を用いるかは、宿主細胞を形質転換したプラスミド上に存在する選択マーカー成分に応じて選択される。例えば、選択マーカー成分がカナマイシン耐性の場合、培地に加える化合物はカナマイシンである。

宿主細胞中で産生されるARTポリペプチドの量は、当業界で公知の標準法を用いて評価し得る。該方法には、ウエスタンブロット法、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、非変性ゲル電気泳動法、HPLC分離法、免疫沈降法、及び/又はDNA結合ゲルシフトアッセイなどの活性アッセイが含まれるがそれらには限定されない。

ARTポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計されている場合、大多数のポリ  
30  
ペプチドは細胞培地中に見出されるようである。このようにして製造されたポリペプチドは、典型的には、細胞からの分泌中に除去されるために、アミノ末端メチオニンを有していない。しかし、ARTポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合、該ポリペプチドは、細胞質中（真核生物、グラム陽性菌、及び昆虫宿主細胞の場合）に、又はペリプラズム中（グラム陰性菌宿主細胞の場合）に存在し、アミノ末端メチオニンを有し得る。

細胞内ARTタンパク質の場合、典型的には、先ず、機械的に又は浸透圧により宿主細胞を破壊して細胞質の内容物を緩衝溶液中に放出させる。次いで、該溶液からARTポリペ  
40  
プチドを分離し得る。

溶液からのARTポリペプチドの精製は、種々の方法を用いて実施し得る。該ポリペプチドがそのカルボキシル又はアミノ末端にヘキサヒスチジンなどの標識（ART/ヘキサヒ  
40  
スチジン）や他の小さいペプチドを含むように合成されている場合、該ポリペプチドは、該溶液を、カラムマトリックスが標識又は直接ポリペプチドに対し高親和性を有しているアフィニティークラム（即ち、特異的にARTを認識するモノクローナル抗体）に通して本質的に1ステッププロセスで精製し得る。例えば、ポリヒスチジンは、強力な親和力及び特異性をもってニッケルに結合し、従って、ニッケルのアフィニティークラム（例えば、Qiagenニッケルカラム）は、ART/ポリHisの精製に用い得る。〔例えば、Ausubelら編, Current Protocols in Molecular Biology, Section 10.11.8, John Wiley & Sons, New York (1993)を参照されたい〕。

ARTポリペプチドが標識を有しておらず且つ抗体が利用できない場合、他の周知の精製  
50

手順を用い得る。そのような手順には、イオン交換クロマトグラフィー、モレキュラーシーブクロマトグラフィー、HPLC、ゲル溶離を組み合わせた天然ゲル電気泳動及び分取等電点電気泳動（「Isoprime」機/技術, Hoefler Scientific）が含まれるがそれらには限定されない。これらの方法を2種以上組み合わせて高純度を得る場合もある。好ましい精製法には、分取等電点電気泳動と組み合わせたポリヒスチジン標識及びイオン交換クロマトグラフィーが含まれる。

ARTポリペプチドは、主として細菌の細胞周辺腔又は真核細胞の細胞質中に見出されると予測される場合、処理されるポリペプチドが封入体（例えば、グラム陰性菌）を含む複合体を形成している場合には、当業者には公知の任意の標準法を用いて、該封入体を含むペリプラズム又は細胞質の内容物を宿主細胞から抽出し得る。例えば、フレンチプレス、ホモジナイゼーション及び/又は音波処理により宿主細胞を溶解して、ペリプラズムの内容物を放出させ得る。次いで、ホモジネートを遠心分離し得る。

ARTポリペプチドがペリプラズム中の封入対を形成している場合、該封入体はしばしば内部及び/又は外部細胞膜に結合し得、従って、遠心分離後には主としてペレット物質として見出される。次いで、該ペレット物質を、グアニジン又は尿素などのカオトロピック物質で処理して、封入体を放出、破壊、可溶化し得る。次いで、可溶性形態となったARTポリペプチドを、ゲル電気泳動法、免疫沈降法などを用いて分析し得る。ARTポリペプチドの分離が望ましい場合には、以下に記載の方法及びMarstonら〔Meth. Enz., 182: 264-275 (1990)〕などの標準法を用いて分離し得る。

宿主細胞のペリプラズム中でARTポリペプチド封入体が有意には形成されていない場合、細胞ホモジネートを遠心分離した後では、ARTポリペプチドは主として上清中に見出され、以下に記載のものなどの方法を用い、上清から分離し得る。

ARTポリペプチドを部分的又は完全に分離することが望ましい状況では、当業者には周知の標準法を用い、精製を実施し得る。そのような精製法には、電気泳動及びその後の電気溶離による分離、種々のタイプのクロマトグラフィー（イムノアフィニティー、モレキュラーシーブ及び/若しくはイオン交換）、並びに/又は高性能液体クロマトグラフィーが含まれるがそれらには限定されない。精製を完全にするために、上記方法を1種以上用いることが好ましい場合もあり得る。

ARTポリペプチド、その断片及び/又は誘導体は、組換えDNA法を用いたARTポリペプチドの製造・精製に加えて、Merrifieldら〔J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1964)〕、Houghtenら〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 5132 (1985)〕や、Stewart及びYoung〔Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chem. Co, Rockford, IL (1984)〕により記載のものなどの当業界で公知の方法を用い、化学合成法（例えば、固相ペプチド合成法）によって製造し得る。そのようなポリペプチドは、アミノ末端上にメチオニンを有するか又は有さずに合成され得る。化学合成されたARTポリペプチド又はその断片を、上記文献に記載の方法を用いて酸化して、ジスルフィド架橋を形成し得る。ARTポリペプチド又はその断片は、天然の精製ARTポリペプチドの生理活性又は免疫学的置換体として治療法及び免疫法に利用し得る。

ARTポリペプチドがポリマーに結合している（「ART-ポリマー」）化学修飾ART組成物（即ち、「誘導体」）は本発明の範囲内に包含される。選択されるポリマーは、典型的には、結合対象のタンパク質が生理的環境などの水性環境中で沈降しないようにするために水溶性である。選択されるポリマーは、通常、アシル化する場合には活性エステル、アルキル化する場合にはアルデヒドなどの単一の反応性基を有するように修飾し、それによって、本発明の方法に用いられるように重合度を制御し得る。好ましい反応性アルデヒドは、水溶性のポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドか、そのモノC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルコキシ若しくはアリアルコキシ誘導体である（米国特許第5,252,714号参照）である。該ポリマーは分枝鎖のものでも非分枝鎖のものでもよい。ポリマー混合物もARTポリマーの範囲内に包含される。最終生成物製剤を治療に用いる場合、該ポリマーは

医薬上許容し得るものであるのが好ましい。水溶性ポリマー又はその混合物は、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、モノメトキシ・ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、又は他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ（N-ビニルピエロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）及びポリビニルアルコールからなる群から選択し得る。アシル化反応の場合に選択されるポリマーは、単一の反応性エステル基を有していなければならない。還元的アルキル化の場合に選択されるポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有している必要がある。該ポリマーは任意の分子量を有してよく、且つ分枝鎖であっても非分枝鎖であってもよい。

10

A R Tのペギル化〔PEG化（pegylation）〕は、例えば、以下の参考文献：Focus on Growth Factors 3（2）：4 - 10（1992）；EP0154316号；及びEP0401384号に記載されているような、当業界で公知のペギル化反応のいずれかを用いて実施し得る。ペギル化は、以下に記載の、反応性ポリエチレングリコール分子（又は類似の反応性水溶性ポリマー）を用いたアシル化反応又はアルキル化反応を介して行うのが好ましい。

アシル化を介したペギル化は、一般に、ポリエチレングリコール（PEG）の活性エステル誘導体とA R Tタンパク質とを反応させることを含む。A R Tのペギル化には、任意の公知又はその後で発見された反応性PEG分子を用い得る。好ましい活性化PEGエステルは、N-ヒドロキシスクシンイミド（「NHS」）にエステル化されたPEGである。「アシル化」は、本明細書では、A R Tと水溶性ポリマー（例えばPEG）との以下のタイプの結合体：Bioconjugate Chem. 5：133 - 140（1994）に記載されているような、アミド、カルバメート、ウレタンなどを含むがそれらには限定されないものとする。反応条件は、ペギル化法において公知のもの又はその後で開発されたものから選択し得るが、但し、修飾すべきA R T種を不活化するような温度、溶媒及びpHなどの条件は回避する。

20

アシル化を介してペギル化すると、通常、リシン - アミノ基はアシル結合基を介してペギル化されたポリペギル化A R T生成物が生成する。連結結合基はアミドであるのが好ましい。また、得られた生成物が、約95%以上、モノ -、ジ - 又はトリペギル化されているのが好ましい。しかし、通常、より高度に（A R Tの最大数のリシン - アミノ酸基 + A R Tのアミノ末端の1個の - アミノ基まで）ペギル化された種が、用いられる特定の反応条件に応じた量で形成される。所望なら、特に、透析、塩析、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー及び電気泳動を含めた標準的な精製法により、高度に精製されたペギル化種を、混合物、特に反応しなかった種から分離することができる。

30

アルキル化を介したペギル化は、一般に、PEGの末端アルデヒド誘導体とA R Tなどのタンパク質を還元剤の存在下に反応させることを含む。ペギル化の程度には関係なく、PEG基は - CH<sub>2</sub> - NH - 基を介してタンパク質に結合するのが好ましい。特に - CH<sub>2</sub> - 基に関して、このタイプの結合を、本明細書では「アルキル」結合と称する。

還元的アルキル化を介して誘導体化してモノペギル化生成物を製造することにより、A R Tの誘導体化に利用し得る異なるタイプの第1級アミノ基（リシン対N末端）が得られる。該反応は、典型的には、タンパク質のリシン残基の - アミノ基とN末端残基の - アミノ基とのpK<sub>a</sub>の差を利用し得るpH（以下参照）で行う。そのような選択的誘導体化により、アルデヒドなどの反応性基を含む水溶性ポリマーとタンパク質との結合が制御される。該ポリマーとの結合は、主としてタンパク質のN末端で、リシン側鎖アミノ基などの他の反応性基を有意に修飾することなく生起する。本発明は、〔ポリマー分子が実質的にA R Tタンパク質の単一位置においてのみ（即ち、約95%以上）結合しているA R Tタンパク質を意味する〕A R T - モノポリマータンパク質結合体分子を提供する。より特定の言え、ポリエチレングリコールを用いるならば、本発明はさらに、恐らく抗原性結合基を欠き、且つA R Tタンパク質に直接結合したポリエチレングリコール分子を有す

40

50

るペギル化 A R T タンパク質を提供する。

本発明に用いるのに特に好ましい水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（略号 P E G）である。本明細書において、ポリエチレングリコールとは、モノ - ( C <sub>1</sub> - C <sub>10</sub> ) アルコキシ - 又はアリアルオキシ - ポリエチレングリコールなどの、他のタンパク質の誘導体化に用いられている P E G の形態のいずれをも包含するものと解釈される。

一般に、化学誘導体化は、生理活性物質と活性化ポリマー分子との反応に用いられる任意の適当な条件下に実施し得る。ペギル化 A R T の製造法は、一般に、( a ) A R T と 1 個以上の P E G 基とが結合状態になるような条件下に、A R T ポリペプチドとポリエチレングリコール（例えば、P E G の反応性エステル又はアルデヒド誘導体）を反応させるステップ、及び ( b ) 反応生成物を得るステップを含む。一般に、アシル化反応に最適な反応条件は、既知パラメーターと所望の結果に基づいて決定される。例えば、P E G : タンパク質の比率が大きくなればなるほど、ポリペギル化生成物の比率も高くなる。

モノポリマー / A R T タンパク質結合体分子の実質的に均一な集団を生成するための還元的アルキル化は、一般に、( a ) 還元的アルキル化条件下に、A R T タンパク質のアミノ末端の - アミノ基の選択的修飾に適した p H で、A R T タンパク質と反応性 P E G 分子を反応させるステップ；及び ( b ) 反応生成物を得るステップを含む。

モノポリマー / A R T タンパク質結合体分子の実質的に均一な集団を得るための還元的アルキル化反応条件は、水溶性ポリマー部分が A R T の N 末端に選択的に結合し得るものである。そのような反応条件により、一般に、リシンアミノ基と、N 末端の - アミノ基との間に p K a の差が生じる（該 p K a はアミノ基の 5 0 % をプロトン化し、あとの 5 0 % はプロトン化しない p H である）。p H はさらに、用いられるポリマーとタンパク質との比率にも影響を与える。一般に、p H が低い場合には、タンパク質に対して大過剰のポリマーを用いるのが望ましい（即ち、最適な条件を得るには、反応性 N 末端 - アミノ基が少ないほど、より多くのポリマーが必要となる）。p H が高い場合には、ポリマー : タンパク質比をそれ程大きくする必要がない（即ち、より多くの反応性基が利用可能であれば、必要とされるポリマー分子の量が少なくなる）。本発明の場合、p H は一般に、3 ~ 9 の範囲、好ましくは 3 ~ 6 の範囲内に含まれる。

考慮すべき別の重要な点はポリマーの分子量である。一般に、ポリマーの分子量が高いほど、タンパク質に結合し得るポリマー分子の数が少なくなる。同様に、これらのパラメーターを最適化する際には、ポリマーの分岐度も考慮する必要がある。通常、分子量（又は分岐度）が高いほど、ポリマー : タンパク質比も高くなる。本発明が企図するペギル化反応に関して、一般に好ましい平均分子量は、約 2 k D a ~ 約 1 0 0 k D a（用語「約」とは ± 1 k D a を意味する）である。好ましい平均分子量は、約 5 k D a ~ 約 5 0 k D a であり、特に好ましいのは、約 1 2 k D a ~ 約 2 5 k D a である。水溶性ポリマーと A R T タンパク質の比率は、一般に、1 : 1 ~ 1 0 0 : 1、好ましくは、（ポリペギル化の場合は）1 : 1 ~ 2 0 : 1 であり、（モノペギル化の場合は）1 : 1 ~ 5 : 1 である。

上記条件を用いて還元的アルキル化を行うと、ポリマーとアミノ末端に - アミノ基を有する A R T タンパク質との選択的結合が得られ、且つモノポリマー / A R T タンパク質結合体の実質的に均一な調合物が得られる。本明細書に用いられている用語「モノポリマー / A R T タンパク質結合体」とは、A R T タンパク質分子と該分子に結合した単一のポリマー分子とからなる組成物を意味する。モノポリマー / A R T タンパク質結合体は、ポリマー分子がリシンアミノ側基上ではなく、N 末端に位置するのが好ましい。該調合物は、好ましくは、9 0 % を超えるモノポリマー / A R T タンパク質結合体、より好ましくは、9 5 % を超えるモノポリマー / A R T タンパク質結合体を含み、残りの観察可能な分子は反応しなかったもの（即ち、ポリマー部分を欠くタンパク質）である。以下の実施例は、約 9 0 % 以上がモノポリマー / タンパク質結合体であり、約 1 0 % が反応しなかったタンパク質である調合物を提供する。モノポリマー / タンパク質結合体は生理活性を有する。本発明の還元的アルキル化の場合、還元剤は水溶液中で安定である必要があり、且つ還元的アルキル化の初期過程で形成されるシッフ塩基のみを還元し得るのが好ましい。好ましい還元剤は、ホウ水素化ナトリウム、シアノホウ水素化ナトリウム、ジメチルアミンボラ

10

20

30

40

50

ン、トリメチルアミンボラン及びピリジンボランからなる群から選択し得る。特に好ましい還元剤はシアノホウ水素化ナトリウムである。

溶媒、反応時間、温度などの他の反応パラメーターや、生成物の精製法は、水溶性ポリマーを用いたタンパク質の誘導体化に関する公開情報に基づいて決定し得る。

ポリマー - A R Tタンパク質結合体分子の混合物は、上記のように、アシル化及び／又はアルキル化法に従って製造し得、混合物中に含まれるモノポリマー／タンパク質結合体の割合を選択し得る。従って、望ましい場合には、種々のタンパク質と該タンパク質に結合している種々の数（即ち、ジ - 、トリ - 、テトラ - など）のポリマー分子の混合物を製造し、本発明の方法を用いて製造したモノポリマー／A R Tタンパク質結合体物質と組み合わせ得る。

10

一般に、本発明のポリマー／A R Tを投与することにより軽減又は緩和し得る状態には、A R T分子について本明細書に一般的に記載されているものが含まれる。しかし、本明細書に開示されているポリマー／A R T分子は、非誘導体化分子に比べて、さらなる活性、亢進若しくは低減された活性、又は他の特性を有し得る。

それ自体では活性アッセイにおいて活性であるポリペプチドをコードしないA R T核酸分子、その断片および／又は誘導体は、哺乳動物組織又は体液試料中のA R T D N A又はR N Aの存在を質的又は量的にテストする診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

それ自体では活性アッセイにおいて活性ではないA R Tポリペプチド断片及び／又は誘導体は、*in vitro*又は*in vivo*でのA R T受容体のモジュレーター（例えば、阻害剤又は賦活剤）として、又はA R Tポリペプチドに対する抗体の産生に有用であり得る。

20

A R Tポリペプチド及びその断片は、化学修飾されているか否かに拘わらず、単独か、又は、例えば、神経栄養因子、サイトカイン、インターフェロン、インターロイキン、成長因子、抗生物質、抗炎症薬、神経伝達物質受容体作動薬若しくは拮抗薬、及び／又は抗体などの他の医薬組成物と組み合わせて、内分泌系障害の治療に用い得る。

A R Tポリペプチド及び／又はその断片は、標準法により産生される抗体の製造に用い得る。従って、A R Tポリペプチドと反応する抗体及び該抗体の反応性断片も本発明の範囲内に包含される。抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、組換え、キメラ、単鎖及び／又は二特異性などであってよい。抗体断片は、本発明のA R Tと反応し得る任意の断片、例えば、F<sub>ab</sub>、F<sub>ab</sub> などであってよい。また、本発明により、A R T又はその断片を抗原として選択された哺乳動物に提示し、次いで、公知方法に従って、動物の細胞（例えば、脾臓細胞）を特定のガン細胞と融合させて不死化細胞系を作出することにより得られるハイブリドーマも提供される。そのような細胞系及び本発明のヒトA R Tポリペプチドの全部又は一部に対して誘発される抗体の製造に用いられる方法も本発明の範囲内に包含される。

30

該抗体は、治療用にA R Tとその受容体との結合の阻害などに用い得る。該抗体はさらに、体液中のA R Tの存在を検出するために標識した形態などで*in vivo*及び*in vitro*診断用に用い得る。

#### 治療用組成物及び投与

40

種々の内分泌系及び／又は神経内分泌系障害、例えば、糖質コルチコイド耐性、（遺伝性又は下垂体腫瘍、小細胞肺ガン又は副腎腫瘍による転移性コルチコトロピン産生により引き起こされる）クッシング症候群、先天性副腎過形成、視床下部下垂体軸（H P A）の他の障害、及び／又は肥満症などを治療するための治療用組成物は本発明の範囲内に包含される。該組成物は、治療上有効量のA R Tポリペプチド又はその断片（いずれも化学修飾されていてよい）と医薬上許容し得る担体とを混合して含み得る。担体物質は、注射用水、好ましくは哺乳動物に投与するための溶剤に共通の他の物質を補った水であってよい。A R T治療用化合物は、典型的には、精製タンパク質（化学修飾されていてよい）と、1種以上の生理的に許容し得る担体、賦形剤又は希釈剤とを混合して含む組成物の形態で投与する。適切な担体の例には中性緩衝食塩液又は血清アルブミンと混合した生理食塩液が

50



ある。該生成物は、適切な賦形剤（例えば、スクロース）を用いた凍結乾燥体として製剤するのが好ましい。望ましい場合には、他の標準的な担体、希釈剤及び賦形剤を含み得る。他の組成物の例は、pH 約 7.0 ~ 8.5 の Tris 緩衝液又は pH 約 4.0 ~ 5.5 のアセテート緩衝液を含むものがあり、該組成物はさらにソルビトール又はその適当な代替体を含み得る。

A R T 組成物は、非経口的に全身性投与し得る。あるいは、該組成物は、静脈内又は皮下投与し得る。全身性投与の場合、本発明に用いられる治療用組成物は、発熱物質を含まない非経口的に許容し得る水溶液形態であってよい。pH、等張性、安定性などに留意してそのような医薬上許容し得るタンパク質溶液を製造することは当業界の技術の範囲内である。

本発明の実施に有用な A R T 組成物の治療用製剤は、選択された所望の純度を有する組成物と任意の生理的に許容し得る担体、賦形剤または安定剤〔Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, A. R. Gennaro 編, Mack Publishing Company (1990)〕とを混合して貯蔵用に凍結乾燥ケーキ又は水溶液の形態で製造し得る。許容し得る担体、賦形剤または安定剤は、受容者に対して無毒性であり且つ好ましくは用いられる用量及び濃度では不活性であり、リン酸、クエン酸又は他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸などの抗酸化剤；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン若しくはリシンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース若しくはデキストランを含めた他の炭水化物；E D T A などのキレート化剤；マンニトール若しくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；並びに / 又は Tween、Pluronic 若しくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン界面活性剤を含む。

i n v i v o 投与に用いられる A R T 組成物は、滅菌性でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。A R T 組成物を凍結乾燥する場合、上記方法を用いた滅菌は、凍結乾燥及び再構成の前か後に実施し得る。非経口投与用組成物は、通常、凍結乾燥形態又は溶液状で貯蔵される。

治療用組成物は、一般に、滅菌出入口を有する容器、例えば静注溶液嚢、又は皮下注射針で穿孔し得る栓を有するバイアル中に入れる。

該組成物の投与経路は、公知方法、例えば、経口、静脈内、腹腔内、大脳内（実質内）、脳質内、筋肉内、眼内、動脈内若しくは病巣内経路を介した注射若しくは注入、あるいは、持続性放出システム又は場合によってカテーテルの使用を含み得る埋没装置による。所望の場合には、該組成物は、注入、ボーラス注入又は埋没装置を介して連続的に投与し得る。あるいは又は上記方法に加えて、A R T は、罹患領域に、A R T ポリペプチドを吸収させた膜、海綿又は他の適切な物質を埋没させて局所的に投与し得る。

埋没装置を用いる場合、該装置は、例えば、脳室又は脳の実質中などの任意の適当な組織又は器官に埋め込み得、A R T は、ボーラス若しくは連続投与により、又はカテーテルを用いた連続注入により該装置を通して直接導入し得る。

A R T ポリペプチドは、持続性放出組成物又は製剤の形態で投与し得る。持続性放出製剤の適当な例としては、成形品形態の半透性ポリマーマトリックス、例えば、フィルム又はマイクロカプセルが挙げられる。持続性放出マトリックスには、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第 3,773,919 号、EP 58,481 号）、L - グルタミン酸と - エチル - L - グルタメートのコポリマー〔Sidman ら, Biopolymers, 22: 547 - 556 (1983)〕、ポリ(2 - ヒドロキシエチル - メタクリレート)〔Langer ら, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167 - 277 (1981) 及び Langer, Chem. Tech., 12: 98 - 105 (1982)〕、ビニル酢酸エチレン（Langer ら, 前掲）、又はポリ - D - (-) - 3 - ヒドロキシ酪酸（EP 133,988 号）が含まれる。持続性放出組成物にはさらにリポソームが含まれる。リポソームは、当業界で公知の方法〔例えば、DE 3,218

10

20

30

40

50

、121号；Epsteinら，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，82：3688-3692（1985）；Hwangら，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，77：4030-4034（1980）；EP52，322号；EP36，676号；EP88，046号；EP143，949号）のいずれによっても製造し得る。

ex vivoでART組成物を用いること、即ち、患者から取り出した細胞又は組織を処理し、次いで、患者に再移植することが望ましい場合があり得る。

（上記方法を用いた）遺伝子操作によりARTポリペプチドを発現・分泌するようにした特定の細胞を患者に移植することによりARTを導入する場合もあり得る。そのような細胞はヒト細胞であってよく、患者自身の組織由来、又はヒト若しくは非ヒトの別の起源由来であってよい。場合によって、細胞を不死化し得る。該細胞を、脳、副腎中に移植するか、又は他の体組織若しくは器官中に移植し得る。

特定の状況下には、特定の内分泌系及び／又は神経内分泌系の障害又は疾患、例えば、糖質コルチコイド耐性、（遺伝性又は下垂体腫瘍、小細胞肺癌又は副腎腫瘍による転移性コルチコトロピン産生により引き起こされる）クッシング症候群、先天性副腎過形成、視床下部下垂体軸（HPA）の他の障害、及び／又は肥満症などに罹患している患者にARTを投与するための遺伝子療法を用いることが望ましい場合がある。そのような状況下には、ART又はその断片若しくは変異体をコードするゲノムDNA、cDNA、及び／又は合成DNAを、組成物を注入する組織において活性である構成性又は誘発性プロモーターに作動可能に結合させ得る。このART DNA構築物をそのまま脳又は他の神経組織に注射して治療し得る。

あるいは、該ART DNA構築物は、該ART DNAが、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、又は筋肉クレアチンキナーゼプロモーターなどの筋肉組織中で活性であるプロモーターに作動可能に結合しているならば、該構築物が細胞内に取り込まれ、該細胞で発現し得る筋肉組織中に注射し得る。該DNA構築物は、典型的には、（ART DNA及びプロモーターの他に）、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、及び／又はヘルペスウイルスベクターなどのベクターから得られるベクター配列を含み得る。該ベクター／DNA構築物は、注射用の医薬上許容し得る担体と混合し得る。

治療に用いられるART組成物の有効量は、例えば、ARTが用いられる適応症などの治療目的、投与経路及び患者の状態に応じて異なる。従って、最適な治療効果が得られるように、療法士が必要に応じて用量を決めたり、投与経路を変えたりする必要がある。1日当たりの典型的な用量は、上記要素に応じて、約0.1 µg/kg～100 mg/kg以上の範囲であってよい。臨床医は、目的の効果が達成される用量に到達するまでART組成物を投与する。従って、ART組成物は、1回用量として、又は2回以上の用量（該用量は、同量のARTを含んでいても含んでいなくてもよい）として経時的に投与してもよいし、埋没装置又はカテーテルを介して連続注入してもよい。

さらに研究を進めるに従い、種々の患者における種々の状態の治療に要する適切な用量レベルに関する情報が出てくるであろうし、通常の技術を有するものであれば、治療状況、治療中の障害のタイプ、受容者の年齢及び全般的な健康を考慮して、適切な投薬量を決定し得るであろう。一般に、用量は、体重1 kg当たり、0.01 µg（化学修飾されていないタンパク質のみの量を計算した場合）～300 µg（同様な基準に基づく）の範囲であろう。

ARTタンパク質、その断片及び／又は誘導体は、ARTの発現パターンの改変に関連し得るか又はART若しくは抗ART抗体に暴露された場合に有利であり得る内分泌系の疾患又は障害の治療に用い得る。

ARTタンパク質、及び／又はその断片若しくは誘導体は、内分泌系及び／又は神経系の種々の細胞が変性しているか及び／又は先天性障害、外傷、手術、卒中、虚血、感染症、代謝性障害、栄養失調、悪性及び／又は毒性物質により損傷を受けた患者の治療に用い得る。

10

20

30

40

50

本発明の他の実施態様において、ARTタンパク質及び／又はその断片若しくは誘導体は、内分泌系及び／又は神経内分泌系の障害又は疾患、例えば、糖質コルチコイド耐性、(遺伝性又は下垂体腫瘍、小細胞肺癌又は副腎腫瘍による転移性コルチコトロピン産生により引き起こされた)クッシング症候群、先天性副腎過形成、視床下部下垂体軸(HPA)の他の障害、及び／又は肥満症などの治療に用い得る。さらに、ART組成物は、細胞内カルシウムレベルの調節にも有用であり得る。

さらに、ARTタンパク質又はそのペプチド断片若しくは誘導体は、組織移植が示唆される疾患の治療において、組織の移植手術と連係して用い得る。

以下の実施例は、本発明の例示を目的とするに過ぎず、本発明の範囲を限定するものと解釈してはならない。

10

#### 実施例

##### 実施例 1: ヒトART cDNAの同定

(マウスアグーティとヒトアグーティの第22アミノ酸で出発する)ヒトアグーティ遺伝子とマウスアグーティ遺伝子の配列整列と共に、PAM250アミノ酸置換表[Dayhoffら, Atlas of Protein Sequence and Structure, 第5巻, supp. 3 (1978)]とを用い、EST(Expressed Sequence Tag)データベースと称される一般に公開されているWashington University/Merck DNA配列データベースを、配列プロフィール[Gribskovら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84: 4355 (1987) 及びLuethyら, Protein Science, 3: 139-146 (1994)]に関して検索した。

20

該データベースで相同アミノ酸配列を検索するために、検索に先だって、先ずESTデータベースの各エントリーをコンピューターでDNAからアミノ酸配列に翻訳した。1つのESTデータベース提出物cDNAクローン、H63735はこのプロフィール配列と同一性を有することが判明した。このcDNAクローンの対向末端配列を含む提出物、H63298を調べたが、プロフィール配列との同一性は認められなかった。

Genome Systems Inc., St. Louis, MOから、H63735及びH63298に対応するcDNAクローンを含む大腸菌株(株番号208641)を得た。このクローン由来のDNAを、標準ミニプレプ法[Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)]を用いて作製した。該DNAを、製造業者のプロトコルに従ってQiagenカラム(Qiagen, Chatsworth, CA)に通して精製した。精製後、標準ジデオキシ鎖終結法を用いて該DNAの配列決定を行った。この精製DNAを制限エンドヌクレアーゼEcoRI及びHindIIIで消化すると、約1.2と0.3kbの2つの断片が得られたが、これは、該クローンが約1.5kbの挿入体を含むことを示している。配列決定ベクターのT3及びT7プライマー由来の配列から、提出された配列とほぼ一致する配列が得られたが、これは、クローン208641が提出物H63735とH63298の製造に用いたDNAを含んでいることを示している。

30

40

クローン208641の全cDNA配列を分析して、システインに富むカルボキシ末端にアグーティ遺伝子との同一性が存在することを確認した。クローン208641のcDNA配列とデータベースに提出されている元の配列(H63735)とを比較すると、提出されている配列にエラーがあることが判明した。具体的に言えば、H63735の164位に別のグアニンヌクレオチドが存在し、それによってH63735を翻訳するとフレームシフト変異及び早期フレーム内終結が生じた。このエラーを修正すると、プロフィール配列とH63735との間の同一性が増大することが判明した。このエラーの修正により、クローン208641とアグーティ遺伝子との間にもさらなる配列同一性が生じた。しかし、このフレームシフトを修正しても、読み取りフレームから予測される208641のタンパク質配列は、ヒトアグーティでは132アミノ酸であるのに対し、94アミノ酸

50

からなるタンパク質という結果となった。さらに、予測されるタンパク質相同性はアミノ末端に向かって劇的に低下した。これは、208641が実際には本当のcDNAではなく、むしろ部分的にスプライスされたゲノムイントロンDNA-cDNAハイブリッドであることを示唆しており、このことは、以下に記載のように、ヒトゲノムクローン配列(配列番号4)を得たときに確認された。

該クローンの遺伝子発現パターンを評価するために、1レーン当たり約2 µgの種々のヒト組織由来のポリA RNA (Clontech Labs, Palo Alto, CA) を含むナイロンノーザンブロットを、約600塩基対プローブ(クローン208641をNcoI及びNotIで消化し、Qiagen Gel Purification Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) を用いて600塩基対断片を分離して得たもの) で調べて、ARTの存在についてスクリーニングした。分離したこの600 bp断片を、ランダムプライム反応(RediPrime, Amersham) で標準法(RediVue, Amersham, Arlington Heights, IL) を用いて  $-^{32}\text{P}$ -dCTPで放射性標識した。取り込まれなかった放射能をサイズ排除クロマトグラフィー(QuickSpinカラム, Boehringer-Mannheim) にかけて排除した。ノーザンフィルターを、50%ホルムアミド、2% SDS、10×Denhardts、100 mg/ml サケ精子DNA及び5×SSPEを含む緩衝液中約42 で一晩ハイブリダイズさせた。次いで、フィルターを2×SSC、0.05% SDS中室温で約40分間、洗浄液を3回変えて洗浄し、次いで、0.1×SSC、0.1% SDS中約50 で30分間洗浄した。フィルターをホスホイメジャーカセット(phosphorimager cassette) 中に一晩入れてハイブリダイゼーションシグナルを検出した。ノーザンフィルターと600 bpのNcoI NotIプローブとのハイブリダイゼーションにより、図6に示されているように、ARTの顕著で相対的特異的な発現パターンが明らかになった。発現が最も豊富な部位は副腎皮質であり、次いで、副腎髄質、視床下部、視床下核、及び精巣であった。肺に弱いハイブリダイゼーションシグナルが検出された。ホスホイメジャーでハイブリダイゼーションの相対強度を定量し、副腎皮質に関して表すと、以下の値：副腎皮質、100；副腎髄質、46；視床下部、23；精巣、15；視床下核、11；及び肺、3.6が得られた。次いで、フィルターをアクチンプローブで調べて、RNAのローディングが等しく、RNAサイズマーカーの配置が正確であることを確認した。

サイズマーカーに関してノーザンブロットを調べると、脳組織と末梢組織との間で、ARTの転写体の長さにエキソンのスプライシングの違いに起因し得る有意な差があることが判明した。転写体のサイズは、脳組織では約0.8 kbであるが、末梢組織はそれより小さい約0.5 kbの転写体を有していた。これがコードエキソンの異なるスプライシング及び/又は翻訳されなかったエキソンを表しているのかを明らかにするために、視床下核のcDNAと副腎のcDNAとを下記のようにクローン化した。

標準的なファージライブラリーを用いて全長cDNAをクローン化しようとする初期の試みは失敗に終わったが、これは、該ライブラリーの作製中に排除される小さい転写体サイズに起因する可能性が極めて高かった。従ってPCRを用い、より高性能で技術的に難度の高いクローニング法を試みた。クローン208641に対応する全長ヒトcDNAクローンを得るために、副腎、視床下核及び肺由来のヒトポリA RNA (Clontech, Palo Alto, CA; それぞれカタログ番号 6571-1, 6581-1及び6524-1) を逆転写し、第2のcDNA鎖を合成し、Marathon cDNA増幅キット(Clontech, Palo Alto, CA) を用い、製造業者のプロトコルに従って、アダプタープライマーに連結した。最終cDNA生成物を連結されなかったアダプタープライマーから精製(PCR Clean-up kit, Qiagen, Chatsworth, CA) し、PCRを用いた後続RACE反応にテンプレートとして用いた。各cDNAについて、以下のプライマー：

10

20

30

40

**CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC (配列番号 1)****TAGCCCCGACCCTGACGTTGGC (配列番号 2)**

及び Advantage PCR キット成分 (Clontech, Palo Alto, CA) を用いて、PCR を実施した。最初の変性ステップ (94 で 3 分間) の後、94 で 15 秒間、次いで、72 で 2 分間の反応を 5 サイクル; 94 で 15 秒間、次いで 70 で 2 分間の反応を 5 サイクル; 及び 94 で 15 秒間、次いで 68 で 2 分間の反応を 25 サイクル行った。全ての反応は Perkin Elmer 2400 PCR 装置で行った。

各 PCR 反応混合物のアリコートのアガロースゲル上で電気泳動させ、約 600 塩基対で移動するバンドを切り出して、精製 (Gel Extraction kit, Qiagen, Chatsworth, CA) し、配列番号 2 のプライマー及び以下のプライマー:

**ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC (配列番号 3)**

を用いる後続 PCR のテンプレートとして用いた。PCR 条件は上記のものと同じであった。

この第 2 の PCR 反応のアリコートのアガロース上で電気泳動させ、約 600 塩基対で移動するバンドを切り出して、精製し、プラスミドにクローン化した (TA Cloning kit, Invitrogen, San Diego, CA)。次いで、細菌宿主細胞を該プラスミドで形質転換し、DNA を精製するために一晚増殖させた。次いで、該プラスミド DNA を Qiagen ミニプレッププロトコルを用いて細菌宿主細胞から分離し、EcoRI で消化、電気泳動させて、挿入体の存在及びサイズを確認した。種々のサイズの挿入体を含むクローンを種々の T7 及び M13 プライマーを用いて配列決定した。該クローンの配列決定により、予測アミノ酸 Leu (CTG) 又は Pro (CCG; 図 4 及び図 9 参照) に対応するコドン 135 の第 2 位に多型性が示された。得られた配列を用いて、どのクローンが ART cDNA を含む挿入体を有するかを決定し、ART cDNA の 5' 部分に対するオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。これら挿入体のいくつかを配列決定すると、視床下核及び副腎では、それぞれ 700 bp 及び 500 bp という大きなサイズの挿入体のみが ART 転写体を含んでいた。該挿入体はどちらも同じ読み取りフレーム (ORF) を含んでいたが、5' 非翻訳領域の量が異なっていた。この ORF は、3' 領域が 208641 由来の配列とマッチしていた。

3' RACE 反応では、5' RACE 生成物と約 180 bp 重複する前進鎖上のオリゴヌクレオチドを配列番号 1 と共に用いた。該反応により、3 種全ての組織から同じサイズのアンプリコン (約 300 bp) が得られた。このアンプリコン由来の配列は全 3 種の組織由来の配列と同一であり、また、クローン 208641 由来の配列ともマッチしていた。副腎と肺 (「末梢組織」) ART cDNA の配列は図 3 に示されている (配列番号 6)。

視床下核 RACE 反応由来の組み合わせ配列は図 2 に示されている (配列番号 5)。上述のように、副腎及び肺由来の配列は、5' 非翻訳領域の長さ以外は配列番号 5 と一致していた。該 cDNA 配列は、予測された翻訳開始部位由来のフレーム内終結コドン、ポリアダニル化シグナル、及びポリ A 末端を含んでいる。この ORF から予測されるタンパク質は、132 個のアミノ酸、シグナルペプチド配列及び 11 個のシステインを含んでおり、該配列は図 4 に示されている (配列番号 7)。シグナルペプチドは、最初の 20 個のアミノ酸からなり、成熟ポリペプチドは、第 21 アミノ酸 (Ala) から開始される。

**実施例 II: ヒト ART ゲノム DNA の同定**

ヒトゲノム DNA (Genome Systems Inc., St. Louis, MO から入手) 由来の DNA がついた高密度フィルターを、Rapid Hyb 緩衝液 (Amersham, Arlington Heights, IL; カタログ番号 RPN 163

10

20

30

40

50

6) 中約65 で約4時間、600bpの $-^{32}\text{P}$ -dCTPで標識したNcoI-NotI cDNAプローブ(実施例I参照)とハイブリダイズさせた。次いで、フィルターを、0.2%SDSを含む2×SSC中室温で30分間、次いで、0.2%SDSを含む0.2×SSC中65 で30分間洗浄した。次いで、フィルターを、Hyperfilm(Amersham)を備えたオートラジオグラフィーカセットに入れ、-80 で一晩置いた。次いで、フィルムを現像し、プローブにハイブリダイズしたP1クローンの位置を記録した。これらの陽性P1クローンを含む細菌株はGenome Systems Inc. から得、該株由来のDNAを分離した(Qiagen Miniprep System, Qiagen, Chatsworth, CA)。

DNAのアリコートにEcoRIで消化し、0.9%アガロースゲル上で電気泳動させ、約2~3kbで移動するバンドを切り出して、精製し、前もってEcoRIで消化しておいたプラスミド(Bluescript-KSI, Stratagene)にサブクローン化した。挿入体を含む細菌からDNAを分離し(Qiagen Miniprep System)、EcoRIで消化、電気泳動させ、ナイロンフィルター(Turboblotter, S&S, Keene, NH)に移し、UV架橋させた(Stratagene, La Jolla, CA)。次いで、これらのフィルターを上記のようにNcoI-NotIプローブとハイブリダイズさせて、ART配列を含むクローンを同定した。約2.3kbのEcoRI断片を含むクローンが、ARTプローブにハイブリダイズしていることが判明した。次いで、該クローン由来のDNAの配列決定を行った。該ARTゲノムDNAの核酸配列は図1に示されている(配列番号1)。このゲノムクローン由来の配列を副腎及び脳から得られたcDNA配列と比較すると、ARTコード配列が3つのエキソンに分断されていることが知見された。さらに、脳cDNAに存在する5 非翻訳配列がこれら3つのコードエキソンに対して5 末端側に位置する別のエキソンであることが判明した。従って、該ART遺伝子は、3つのコードエキソンと、可変的にスプライスされる非翻訳エキソンとからなるようである。

末梢組織のノーザンブロットで同定された小さいART転写体はこの非コードエキソンの欠失に由来すると考えられる。興味深いことには、マウスアグーティは、被毛の成長サイクルの種々の時期に異なる部位でスプライスされる非コードエキソンを用いることが知られている。

#### 実施例III: ARTペプチドの製造

標準固相PMOC保護化学を用い、ARTの第79~第132アミノ酸を含む合成ペプチドを製造した。該ペプチドの配列は図5に記載されている(配列番号8)。ARTペプチドを再生するために、約5.0mgの凍結乾燥粉末を25mlの20mM Tris-HCl及び4M 尿素(pH7.0)に溶解させた。この混合物を室温で一晩穏やかに攪拌した。攪拌後、試料を、3kDaのカットオフ膜を用い、Amicon(Beverly, MA)攪拌セル中で濃縮した。濃縮後の最終容量は約1mlであった。次いで、該試料を約15mlの滅菌1×D-PBS(Gibco/BRL, Grand Island, NY)で希釈し、次いで、約1mlの最終容量まで再濃縮した。攪拌セルを約2mlのD-PBSで2回リンスし、この4ml溶液を前記試料に加えた。約5mlとなった該試料溶液をさらにAmicon Centricon 3装置中で約0.5mlの最終容量(約10mg/mlに相当する)に濃縮した。次いで、試料をCostar(Cambridge, MA)0.22µm Spinexフィルター装置中で滅菌濾過し、4 で貯蔵した。

該ペプチド試料を、以下の実施例Vに記載のようにラットに投与した。

#### 実施例IV: マウスARTゲノムDNAのクローニング

600bpの $-^{32}\text{P}$ -dCTPで標識したNcoI-NotI cDNAプローブ(実施例I参照)を用い、RapidHyb緩衝液(Amersham, Arlington Heights, IL; カタログ番号 RPN 1636)中約65 で約4時間、マウス肝臓組織のゲノムライブラリー(Stratagene, La Jolla, CA)をマウスARTゲノムDNAについてスクリーニングした。次いで、フィルターを、0.

10

20

30

40

50

2 % S D S を含む 2 × S S C 中室温で 3 0 分間、次いで、0 . 2 % S D S を含む 0 . 2 × S S C 中 6 5 ° で 3 0 分間洗浄した。フィルターを、Hyperfilm (Amersham, Arlington Heights, IL) を備えたオートラジオグラフィーカセットに入れ、- 8 0 ° C で一晩置いた。次いで、フィルムを現像し、1 個のクローンがプローブに結合していることを確認した。

m - A R T g と称されるこのクローンを標準法を用いてブランク精製し、細菌を溶解し、次いで、Qiagen (Chatsworth, CA) Maxi prep カラムを用いて DNA を分離した。精製 DNA を Xba I で消化し、約 2 . 8 k b 断片がヒト A R T c DNA プロブとハイブリダイズしていることを見出した。この 2 . 8 k b 断片をベクター pBlueScript (Stratagene, La Jolla, CA) にサブクローン化し、配列決定した。該配列のコード領域は図 7 に記載されている。この遺伝子のスプライス供与 / 受容部位は、ヒト A R T ゲノム DNA におけるものと類似であることが知見されたが、これは、マウス A R T 遺伝子も 3 つのコードエキソン ( 2、3 及び 4 ) と、1 つの非コードエキソン ( エキソン 1 ) を有していることを示している。マウスの予測アミノ酸配列は図 8 に示されている。該配列はヒト A R T ポリペプチド配列と約 8 1 % 一致している。

#### 実施例 V : A R T で治療したラットの採食挙動

体重 3 0 0 ~ 5 0 0 g の Long - Evans 雄ラットの脳に側脳室を標的とする 2 2 ゲージのカニューレを慢性的に埋没した。該カニューレの立体空間的位置はおおよそ : 0 . 8 mm 前方 / 後方 ; 1 . 4 mm 内側 / 外側 ; 及び 3 . 5 mm 背側 / 腹側であった。動物に注射する用意ができるまで、3 . 5 mm、2 8 ゲージのスチレットを埋没したカニューレ内に入れておいた。カニューレの先端から約 1 mm 突き出した 2 8 ゲージの注射器で A R T ペプチド又は対照溶液を投与した。

A R T ペプチドを P B S ( p H 約 7 . 0 ) に溶解させ、約 2 µ l の容量中約 0 . 0 7 5 ~ 約 7 . 5 n m o l の範囲の用量で側脳室に注射した。対照は、P B S と、約 7 . 5 n m o l の変性 A R T であった。粉碎したげっ歯動物の食べ物、糖及び練乳 ( 4 5 % : 2 8 % : 2 7 % ) の混合物を入れた、前もって重量測定しておいた皿から採食測定を行った。ラットには、この混合物と共に、ラットの通常の食べ物を注射の約 2 4 時間前に与えた。注射の約 1 時間半前に、ラットの通常の食べ物を取り去ったが、ラットには甘味を付けた混合物は継続して摂らせた。注射は、午前 8 時又は午後 8 時半に行った。注射してから 9 0 分、4 時間、8 時間、1 2 時間及び 2 5 時間後に、皿の重量を計って食物の摂取を評価した。1 グループ当たり 1 0 ~ 1 2 匹のラットを用いた。

結果が図 1 0 に示されている。該図に見られるように、折りたたみ A R T を摂取したラットは対照と比べてその食物摂取が増大した。さらに、注射した A R T の量とラットが摂取した食物の量には相関関係がある。

〔配列表〕

配列番号 : 1

配列の長さ : 2 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 オリゴヌクレオチド

配列 :

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC

配列番号 : 2

配列の長さ : 2 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：他の核酸 オリゴヌクレオチド

配列：

**TAGCCCCGAC CCTGACGTTG GC**

22

配列番号：3

配列の長さ：2 3

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 オリゴヌクレオチド

10

配列：

**ACTCACTATA GGGCTCGAGC GGC**

23

配列番号：4

配列の長さ：2 3 7 1

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA ( g e n o m i c )

配列：

**GAATTCTTGG AAGCACAGGA AACAAATGC CACATAGGGG TTGAGTAAGC ATCTCTGGGG**

60

20

**CCACAAATTA AATTAAGCTT TCAGGGCCGC CTGCCTTGTT ATTGCTAATG GTTCTAGCCC**

120

**TGCTCAGCTC CTAGGTCCCT GTCCTGTGGA AATTTGTGGA CCCTGGGCAC CCTCTCTTGC**

180

**TCCCAAATTT TAATCGGCTC CTGGAAACCT CACCCCAAAT TGGAGATAGG CACTCCTCTT**

240



GTAGAACAAA AGGCTCAGGT TCAGGGAGTG AGGGCCTGAA CTGTGCCCCC ACCCTCCAGG	300	
AAGGGTCCTT CACGGCCTGG CTGCAGGGAT CAGTCACGTG TGGCCCTTCA TTAGGCCCTG	360	
CCATATAAGC CAAGGGCACG GGGTGGCCGG GAACTCTCTA GGCAAGAATC CCGGAGGCAG	420	
AGGTGAGTCC TCAGGTTGGG CAGGGACTCC TCCTCTCTGT GGGGTCTCTA TCTGGGCACC	480	
TAGAGGGGAC TCCAAGGATA AGGAGGGACT AAGTGGTACA TCTTCCTGCT GAGCCAGGCC	540	
ATGCTGACCG CAGCGGTGCT GAGCTGTGCC CTGCTGCTGG CACTGCCTGC CACGCGAGGA	600	10
GCCCAGATGG GCTTGGCCCC CATGGAGGGC ATCAGAAGGC CTGACCAGGC CCTGCTCCCA	660	
GAGCTCCCAG GTCAGTGTGA GCAAGGGTGG GACTGGGCGG GGCCTGAATA CCCTCTGGCC	720	
ACAAATAGTC TCCCCTGGCA TAAACCTCTT TTCTCCCTTC CCAAACCCTC CCCTGGGAGG	780	
TGGGTGCTTT GTGCATGGGG GTTCCTGCCC TCACATCCTC TGCCCCAGGC CTGGGCCTGC	840	
GGGCCCCACT GAAGAAGACA ACTGCAGAAC AGGCAGAAGA GGATCTGTTG CAGGAGGCTC	900	
AGGCCTTGGC AGAGGTAACT GCTCAGGGAA AAGGGTAAGG TGGTGGCCCT TGGGAGGGGG	960	20
CATTGGGTAT TAGCTCCTCT CCCAGCTCC AAATCCCTC ACCAGCGACG AACTACCGA	1020	
CCACCCCTTC CCATGCTCCA CTGCCATCCT GCACAGGTTG GGACAGGTAA GATCCCTGGA	1080	
TCTGTCTTTA GAGGCCTGTG CTGGTTCCCC ACCCCTGCAG GTACTAGACC TGCAGGACCG	1140	
CGAGCCCCGC TCCTCACGTC GCTGCGTAAG GCTGCATGAG TCCTGCCTGG GACAGCAGGT	1200	
GCCTTGCTGT GACCCATGTG CCACGTGCTA CTGCCGCTTC TTCAATGCCT TCTGCTACTG	1260	
CCGCAAGCTG GGTACTGCCA TGAATCCCTG CAGCCGCACC TAGCTGGCCA ACGTCAGGGT	1320	30
CGGGGCTAGG GTAGGGGCAA GGAACTCGA ATAAAGGATG GGACCAACCC CAAGGCTGTG	1380	
GTTATTTCAA ACGTGGCCGT CAAAGGAGGG AGGGTTCATG GAGGGGGTGG GAGTGTACCC	1440	
AAGCCAAGAA ACCACACATA CTCTTATCCC AGGGCCTGGG CTACCCTATC ATAGGAGGCA	1500	
CATACACGGG CGCTTTTAGG GGTCTGGTG CCCCTGGGAA AAATAGAGAA GAGCCGCACT	1560	
CCAGCTTTTCG AAAATCTTGT ACAGCAAGTG CGGGGAACGC AGGACGCAGC GTGGCACAGG	1620	
GGCTATCACT CCTGGCTAAC AAATAAGCCT TAGGCTCCAG GGCTTGCTGC TACTTCCACG	1680	
CAAAGCCTGC CCCTCATCCT GTTACCAGAG GGAAGGCCAG GAGTGTGCGT GTTTCAGGTC	1740	40
CTTAGCGTTT CGAACAAAGA ATTGAACAAA ACCCAGAAAG TAACAAACGA ATGACACACA	1800	
GGAAGGAAGC AGACAGCTGG GATTTGTAA AGCGAGAAAG CACTACGCAG GGTGGGAGTG	1860	

GGCCTGAGCA AGAGGCTGAA GGGGCTCAGT TACAAAGTTT TCCGGGTTTT AAGTACTCCT	1920
TTTGCGGTCC CTGTCCGTTA CCCCTTATCT GGATGAAGGG TTTGGTCCAT GGCTAATTAA	1980
TCCATTTATG CCTGAGGTTG CAATCTTTTT GAATTTTTGC AATCAGACCT TGGCCATGAC	2040
CTTGAGCAGT AGGATATAAA TAACTCCCAT ATGCTTAGCG TTCCAATAAT GGAACACAAG	2100
GCATAAATGG GGCTAAGGTG AATTGGCGCC CTATGCAGAT GAAGGGATGG CCCGTGCTTG	2160
GCCCCAGCC AATCCAAGGC ACTCTCCCTT TCAACTGAGA CGTGGTGGAA GGGGGAGGGT	2220
TGTGGGGACA GTGGCCTTTG ATCCTTTGTT ACTTGGACAT GGGGAGATGG GGTTTTTCTT	2280
TTTGGTTTAG CTTTAGTAAG CTCGCCTTAG TTGGCCTCCG GTTCCCTGCC CCCAGACCTT	2340
GGTGTTTTCC CTTGATTCAG CTTCAGAATT C	2371

10

配列番号 : 5

配列の長さ : 8 3 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列 :

GGGCCCTCTA GATGCATGCT CGAGCGGCCG CCAGTGTGAT GGATATCTGC AGAATTCCGGC	60
TTGGTCCCTG TCCTGTGGAA ATTTGTGGAC CCTGGGCACC CTCTCTTGCT CCCAAATTTT	120
AATCGGCTCC TGGAAACCTC ACCCCAAATT GGAGATAGGC ACTCCTCTTG TAGAACAAAA	180
GGCTCAGGTT CAGGGAGTGA GGGCCTGAAC TGTGCCCCCA CCCTCCAGGA AGGGTCCTTC	240
ACGGCCTGGC TGCAGGGATC AGTCACGTGT GGCCCTTCAT TAGGCCCTGC CATATAAGCC	300
AAAGGCACGG GGTGGCCGGG AACTCTCTAG GCAAGAATCC CGGAGGCAGA GGCCATGCTG	360
ACCGCAGCGG TGCTGAGCTG TGCCCTGCTG CTGGCACTGC CTGCCACGCG AGGAGCCCAG	420
ATGGGCTTGG CCCCCATGGA GGGCATCAGA AGGCCTGACC AGGCCCTGCT CCCAGAGCTC	480
CCAGGCCTGG GCCTGCGGGC CCCACTGAAG AAGACAATG CAGAACAGGC AGAAGAGGAT	540
CTGTTGCAGG AGGCTCAGGC CTTGGCAGAG GTACTAGACC TGCAGGACCG CGAGCCCCGC	600
TCCTCACGTC GCTGCGTAAG GCTGCATGAG TCCTGCCTGG GACAGCAGGT GCCTTGCTGT	660
GACCCATGTG CCACGTGCTA CTGCCGCTTC TTCAATGCCT TCTGCTACTG CCGCAAGCTG	720
GGTACTGCCA TGAATCCCTG CAGCCGCACC TAGCTGGCCA ACGTCAGGGT CGGGGCTAGG	780
GTAGGGGCAA GGAAACTCGA ATAAAGGATG GGACCAACAA AAAAAAAAAA	830

40

配列番号 : 6

配列の長さ : 4 7 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

50

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列：

GCCATGCTGA CCGCAGCGGT GCTGAGCTGT GCCCTGCTGC TGGCACTGCC TGCCACGCGA	60
GGAGCCCAGA TGGGCTTGGC CCCCATGGAG GGCATCAGAA GGCCTGACCA GGCCCTGCTC	120
CCAGAGCTCC CAGGCCTGGG CCTGCGGGCC CCACTGAAGA AGACAACTGC AGAACAGGCA	180
GAAGAGGATC TGTTGCAGGA GGCTCAGGCC TTGGCAGAGG TACTAGACCT GCAGGACCGC	240
GAGCCCCGCT CCTCACGTCG CTGCGTAAGG CTGCATGAGT CCTGCCTGGG ACAGCAGGTG	300
CCTTGCTGTG ACCCATGTGC CACGTGCTAC TGCCGCTTCT TCAATGCCTT CTGCTACTGC	360
CGCAAGCTGG GTACTGCCAT GAATCCCTGC AGCCGCACCT AGCTGGCCAA CGTCAGGGTC	420
GGGGCTAGGG TAGGGGCAAG GAAACTCGAA TAAAGGATGG GACCAACAAA AAAAAAAAAA	479

配列番号：7

配列の長さ：1 3 2

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Met	Leu	Thr	Ala	Ala	Val	Leu	Ser	Cys	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Pro
1				5					10					15	

Ala	Thr	Arg	Gly	Ala	Gln	Met	Gly	Leu	Ala	Pro	Met	Glu	Gly	Ile	Arg
		20					25						30		

Arg	Pro	Asp	Gln	Ala	Leu	Leu	Pro	Glu	Leu	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg
	35						40					45			

Ala	Pro	Leu	Lys	Lys	Thr	Thr	Ala	Glu	Gln	Ala	Glu	Glu	Asp	Leu	Leu
	50					55					60				

Gln	Glu	Ala	Gln	Ala	Leu	Ala	Glu	Val	Leu	Asp	Leu	Gln	Asp	Arg	Glu
65				70					75					80	

Pro	Arg	Ser	Ser	Arg	Arg	Cys	Val	Arg	Leu	His	Glu	Ser	Cys	Leu	Gly
			85					90						95	

Gln	Gln	Val	Pro	Cys	Cys	Asp	Pro	Cys	Ala	Thr	Cys	Tyr	Cys	Arg	Phe
		100						105					110		

Phe	Asn	Ala	Phe	Cys	Tyr	Cys	Arg	Lys	Leu	Gly	Thr	Ala	Met	Asn	Pro
	115						120					125			

Cys	Ser	Arg	Thr
	130		

配列番号：8

配列の長さ：5 4

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Arg Glu Pro Arg Ser Ser Arg Arg Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys  
1 5 10 15

Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys Cys Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys  
20 25 30

Arg Phe Phe Asn Ala Phe Cys Tyr Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Met  
35 40 45

Asn Pro Cys Ser Arg Thr  
50

配列番号：9

配列の長さ：7 3 4

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (genomic)

配列：

ATGCTGACTG CAATGTTGCT GAGTTGTGTT CTGCTGTTGG CACTGCCTCC CACACTGGGG	60	
GTCCAGATGG GCGTGGCTCC ACTGAAGGGC ATCAGAAGGC CTGACCAGGC TCTGTTCCCA	120	20
GAGTTCACAG GTGAGTATGG TCAGGTTGGG GATATGTGGG GCAACGACCA TTGCTGGCCA	180	
CAGACCTGCC CGCCCAGGCT TAGACCTCCT TCCCCAATCC CAATCCCAAC CTAGGGAGGT	240	
GGGTACTTGG TGCATGGTGG GTGTGGCCCT CACATCTTCT GCCCCAGGTC TAAGTCTGAA	300	
TGGCCTCAAG AAGACAACTG CAGACCGAGC AGAAGAAGTT CTGCTGCAGA AGGCAGAAGC	360	
TTTGGCGGAG GTAACATCAT AGGGAAAGGG ATAAAGTAGA AGGTAGGGCG CATCAGATAC	420	
CATCATCTCT CCCCACCTCC GGATTACCCA ACCTGGGCAG AACTGCAGCC CCTCCCTGAC	480	30
CTCAGTCCAC TGCCACCCTA CTGGGGTCGG GGTTTGAGAG TTTCTGAAC CTTATTCCCC	540	
TACGAATGCA GGTGCTAGAT CCACAGAACC GCGAGTCTCG TTCTCCGCGT CGCTGTGTAA	600	
GGCTGCACGA GTCCTGCTTG GGACAGCAGG TACCTTGCTG CGACCCGTGC GCTACGTGCT	660	
ACTGCCGCTT CTTCAATGCC TTTTGCTACT GCCGCAAGCT GGGTACGGCC ACGAACCTCT	720	
GTAGTCGCAC CTAG	734	

配列番号：10

配列の長さ：1 3 1

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

10

30

40

Met Leu Thr Ala Met Leu Leu Ser Cys Val Leu Leu Leu Ala Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Pro Thr Leu Gly Val Gln Met Gly Val Ala Pro Leu Lys Gly Ile Arg  
 20 25 30  
 Arg Pro Asp Gln Ala Leu Phe Pro Glu Phe Pro Gly Leu Ser Leu Asn  
 35 40 45  
 Gly Leu Lys Lys Thr Thr Ala Asp Arg Ala Glu Glu Val Leu Leu Gln  
 50 55 60  
 Lys Ala Glu Ala Leu Ala Glu Val Leu Asp Pro Gln Asn Arg Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Arg Ser Pro Arg Arg Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln  
 85 90 95  
 Gln Val Pro Cys Cys Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Phe Phe  
 100 105 110  
 Asn Ala Phe Cys Tyr Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Thr Asn Leu Cys  
 115 120 125  
 Ser Arg Thr  
 130

10

20

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 1 3 2

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

```

Met Leu Thr Ala Ala Val Leu Ser Cys Ala Leu Leu Leu Ala Leu Pro
1          5          10          15
Ala Thr Arg Gly Ala Gln Met Gly Leu Ala Pro Met Glu Gly Ile Arg
20          25          30
Arg Pro Asp Gln Ala Leu Leu Pro Glu Leu Pro Gly Pro Gly Leu Arg
35          40          45
Ala Pro Leu Lys Lys Thr Thr Ala Glu Gln Ala Glu Glu Asp Leu Leu
50          55          60
Gln Glu Ala Gln Ala Leu Ala Glu Val Leu Asp Leu Gln Asp Arg Glu
65          70          75          80
Pro Arg Ser Ser Arg Arg Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly
85          90          95
Gln Gln Val Pro Cys Cys Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Phe
100          105          110
Phe Asn Ala Phe Cys Tyr Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Met Asn Pro
115          120          125
Cys Ser Arg Thr
130

```

10

20

【 図 1 A 】

**FIG.1A**

GAATTCCTGG	AAGCACAGGA	AACAACATGC	CACATAGGGG	TTGAGTAAGC	ATCTCTGGGG	60
CCACAATTTA	AATTTAAGCTT	TCAGGGGCCG	CTGCCTTGGT	ATTGCTAATG	GTTCTAGCCC	120
TGCTCAAGCTC	CTAGGTCCTC	GTCTCTGTGA	AATTTGTGGA	COCTGGGCAC	CCCTCTCTGC	180
TCCCAAAATT	TAATCGGCTC	CTGGAACCT	CACCCAAAT	TGGAGATAGG	CACCTCCTTT	240
GTAGAACAAA	AGGCTCAGGT	TCAGGAGGTG	AGGCGCTGAA	CTGTGCCCCC	ACCTTCACGG	300
AAGGTCCTTT	CACGGCTCTG	CTCAGGGAGT	GAGTCACGTG	TGGCCCTTCA	TTAGGCCCTG	360
CATATAAGAC	CAAGGGCAGG	GGTGTGGCGG	GAACCTCTCA	GGCAAGAAATC	CCGGAGGCAG	420
AGGTGAGTCC	TAGGCTTGGG	CAGGAGATCC	TCTCTCTGT	GGGGTCTCTA	TCTGGGCACC	480
TAGAGGGGAC	TCCAAGGATA	AGAGGGAGAT	AAGTGTGATC	TCTTCTGTCT	GAGCCAGGCC	540
ATGCTGACCG	CAGCGGTGCT	GAGCTGTGCC	CTGCTGCTGG	CATCTGCTGC	GACGCCAGGA	600
GCCCAGATGG	GCTTGGCCCC	CATGGAGGGC	ATCAGAAGGC	CTGACCAAGC	CCTGCTCCCA	660
GAGCTCCACG	GTCAAGTGTG	GCAAGGGTGG	GACTGGGCGG	GGCCTGAATA	CCCTCTGGCC	720
ACAAATAGTC	TCCCCTGGCA	TAAACCCCTT	TTCCTCCCTT	CCAAACCCCT	CCCTGGGAGG	780
TGGGTGCTTT	GTGCATGGGG	GTCTCTGCCC	TCACATCCTC	TGCCCCAGGC	CTGGGCTTGC	840
GGGCCCCACT	GAAGAAGACA	ACTGCAGAAC	AGGCAGAAGA	GGATCTGTGT	CAGGAGGCTC	900
AGGCTTGGAC	AGAGTAACT	CTCAGGGGAA	AAGGTTAAGG	TGGTGGCCCT	TGGGAGGGGG	960
CATCTGGGTA	TAGCTCTCT	CCCCAGCTTC	AACATCCTCT	ACCAGCGACG	ACATCTACCA	1020
CCACCCCTTC	CCATGCTCCA	CTGCATCTCT	GCACAGCTGC	GGACAGGTTA	GACCTCTGGA	1080
TCTGTCTTTA	GAGGCTCTGT	CTGGTTCCCC	ACCCCTGCAG	GTACTAGACC	TGCAGGACCG	1140
CGAGCCCCGC	TCTTCACGTC	GCTGCGTAGT	GCTGCATGAG	TCTTGCCTGG	GACAGCAGGT	1200
GCTTGTCTGT	GACCATGTGT	CCACGTGCTA	CTGCCCGTTC	TTCAATGCCT	TCTGTACTGT	1260
CCGCAAGCTG	GGTACTGCCA	TGAATTCCTG	CAGCCGCACC	TAGCTGGCCA	ACGTCAAGGT	1320
CGGGGCTAGG	GTAGGGGGCA	GAAAACTCGA	ATAAAGGATG	GGACCAACCC	CAAGGCTGTG	1380
GTTATTTCGA	ACGTGGCCGT	CAAAAGGCGT	AGGGTTCATG	GAGGGGGTGG	GAGTGTCAAC	1440
AGGCCAAGAA	ACCACACAGA	CTCTTATCCC	AGGGCTCTGG	CTACCCCTTA	ATAGGGAGCA	1500
CATACACGGG	CGCTTTTAGG	GGTCTGTGTG	CCCTTGGGAA	AAATAGAGAA	GACCGCAGCT	1560
CCAGCTTTTCG	AAAATCTTGT	ACAGCAAGTG	CGGGGAAGCG	AGGACGACG	GTGGCACAGG	1620

【 図 1 B 】

GGCTATCACT	CCTGGCTTAAC	AAATAAGCCT	TAGGCTCCAG	GGCTTGCTGG	TACTTCCACG	1680
CAAAAGCCTGC	CCCTCATCCT	GTTTACCAGAG	GGAAGCCAG	GAGTGTCGCT	TGTTCAAGTTC	1740
CTTAGCGGTTT	CGAACAAAGA	ATTGAACAAA	ACCCAGAAAG	TAACAACGA	ATGACACACA	1800
GGAAGGAAGC	AGACAGCTGG	GATTTGTTTAA	ACGAGAAAG	CACTACGCA	GGTGGGNGTG	1860
GGCCTGAGCA	AGAGGCTGAA	GGGGCTCAGT	TACAAAGTTT	TCCGGGTTTT	AAGTACTCCT	1920
TTTTCGGGTCC	CTGTCCGTTA	CCCTTTATCT	GGATGAAGGG	TTTGGTCCAT	GGCTAATTAA	1980
TCCATTTATG	CCTGAGGTTG	CAATCTTTTT	GAATTTTTGC	AATCAGACCT	TGGCCATGAC	2040
CTTAGGACAGT	AGGATATAAA	TAACCTCCAT	ATGCTTAGCG	TTCCATTAAT	GGAACACAAG	2100
GGCATAAATAG	GGCTAAGGTG	AATTGGGCC	CTATGCAGAT	GAAAGGATGG	CCCGTGCTTG	2160
GGCCCCGACCC	AATCCAAGGC	ACTCTCCCTT	TCAACTGAGA	CGTGGTGGA	GGGGGAGGT	2220
GTGTGGGGACA	GTGGCCTTTG	ATCCCTTTGTT	ACTTGGACAT	GGGAGATGG	GGTTTTTCTT	2280
TTTTTGTTTATG	CTTTAGTAAAG	CTCGCCTTAG	TTGGCCTCCG	GTTTCCCTGCC	CCCAGACCTT	2340
GGGTGTTTTTCC	CTTGATTCAG	CTTCAGAATT	C			2371

FIG.4

【 図 4 】

Met Leu Thr Ala Ala Val Leu Ser Cys Ala Leu Leu Leu Ala Leu Pro 15  
 1 5  
 Ala Thr Arg Gly Ala Gln Met Gly Leu Ala Pro Met Glu Gly Ile Arg 30  
 20 25  
 Arg Pro Asp Gln Ala Leu Leu Pro Glu Leu Pro Gly Leu Gly Leu Arg 45  
 35 40  
 Ala Pro Leu Lys Lys Thr Thr Ala Glu Gln Ala Glu Glu Asp Leu Leu 60  
 50 55  
 Gln Glu Ala Gln Ala Leu Ala Glu Val Leu Asp Leu Gln Asp Arg Glu 80  
 65 70 75  
 Pro Arg Ser Ser Arg Arg Cys Val Arg Leu Leu His Glu Ser Cys Leu Gly 95  
 85 90  
 Gln Gln Val Pro Cys Cys Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Phe 110  
 100 105  
 Phe Asn Ala Phe Cys Tyr Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Met Asn Pro 125  
 115 120  
 Cys Ser Arg Thr 130

FIG.5

【 図 5 】

Arg Glu Pro Arg Ser Ser Arg Arg Cys Val Arg Leu Leu His Glu Ser Cys 15  
 1 5  
 Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys Cys Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys 30  
 20 25  
 Arg Phe Phe Asn Ala Phe Cys Tyr Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Met 45  
 35 40  
 Asn Pro Cys Ser Arg Thr 50

FIG.2

【 図 2 】

GGGCCCTCTA GATCATGTCT CGAGCGCCG CCACTGTGAT GGATATCTGC AGAATCGGC 60 N  
 TTGCTCCCTG TCCTTGTGGAA ATTGTGGAC CCTGGGCACC CTCCTCTGCT CCCAAATTTT 120  
 AATGGGCTCC TGGAAACCTC ACCCAAAATT GGAGATAGGC ACTCCTCTTG TAGAACAAAA 180  
 GGCTCAGGTT CAGGGAGTGA GGGCCTGAAC TGTGCCCCCA CCTCCAGGA AGGGTCCTTC 240  
 ACGGCTTGGC TGCAGGATC AGTCACGTGT GGCCTTTCAT TAGGCCCTGC CATATAAGCC 300  
 AAAGGCACGG GTTGGCCGGG AACTCTCTAG GCAAGATCC CGGAGGCAGA GGCCATCTCG 360  
 ACCGACGGG TGTGTAGCTG TGGCCTTGCTG CTGGCACTGC CTGCCACGG AGGAGCCAG 420  
 ATGGGCTTGG CCCCCATGGA GGGCATCAGA AGGCTTGACC AGGCCCTGCT CCCAGAGCTC 480  
 CCAGGCTTGG GCCTGGGGC CCCACTGAAG AAGACAACATG CAGAACAGGC AGAAGAGGAT 540  
 CTGTTGCAGG AGGCTCAGGC CTTGGCAGAG GTACTAGACC TGCAGGACCG CGAGCCCGCG 600  
 TCCTCACGTC GCTGGCTAAG GCTGTGATGAG TCCTGCTTGG GACAGCAGGT GCCTTGTCTGT 660  
 GAGCCATGTG CCACGTGCTA CTGCCGCTTC TTCAATGCCT TCTGCTACTG CCGCAAGCTG 720  
 GGTACTGCCA TGAATCCTG CAGCCGACC TAGCTGGCA AGTCAGGAA GCCGAATTCC 780  
 AGCACACTGG CGGCCGTTAC TAGTGGATCC 810

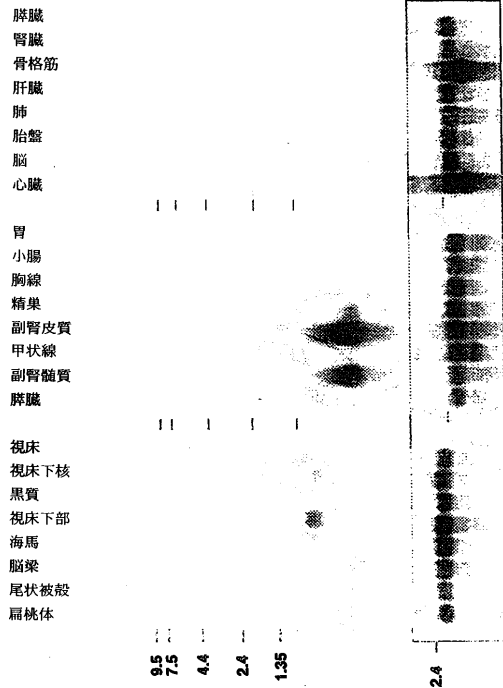
FIG.3

【 図 3 】

GCCATGCTGA CCGCAGCGGT GCTGAGCTGT GCCCTGTCTG TGGCACTGCC TGCCACGCGA 60 U  
 GGAGCCCGA TGGGCTTGGC CCCATGGAG GGCATCAGAA GGCCTGACCA GGCCCTGCTC 120  
 CCAGAGCTCC CAGGCTTGGG CTTGCGGGCC CCACTGAAGA AGACAACATGC AGAACAGGCA 180  
 GAAGAGGATC TGTTCAGGA GGCTCAGGCC TTGGCAGAGG TACTAGACCT GCAGGACCGC 240  
 GAGCCCGGCT CTTCACTGCTG CTGCGTAAGG CTGCATGAGT CCTGCCCTGG ACAGCAGGTG 300  
 CTTTGTCTGG ACCCATGTGC CAGTGTCTAC TGCCGCTTCT TCAATGCTTT CTGCTACTGC 360  
 CGCAGCTGG GTACTGCCAT GAATCCCTGC AGCCGACCT AGCTGGGCAA CGTCAGGAAG 420  
 CCGAATTCCA GCACACTGG GGGCGTTACT AGTGGATCC 459

【図6】

FIG.6



【図7】

FIG.7

60  
120  
180  
240  
300  
360  
420  
480  
540  
600  
660  
720  
734

ATGCTGACTG CAATGTTGCT GAGTTGTTGTT CTGCTGTTGG CACTGCCTCC CACACTGGGG  
GTCCAGATCG GCGTGGCTCC ACTGAAGGGC ATCAGAAGGC CTGACCAGGC TCTGTTCCCA  
GAGTTCCACG GTGAGTATGG TCAGGTTGGG GATATGTTGG GCAACGACCA TTGCTGGCCA  
CAGACCTGCC CGCCCAGGCT TAGACCTCCT TCCCAATCC CAATCCCAAC CTAGGGAGGT  
GGGTACTTGG TGCATGGTGG GTGTGGCCCT CACATCTTCT GCCCCAGGTC TAAGTCTGAA  
TGGCCTCAAG AAGACAACTG CAGACCGAGC AGAAGAATTT CTGCTGCAGA AGGCAGAAGC  
TTTGGCGGAG GTAACTCATTT AGGAAAGGG ATAAAGTAGA AGGTAGGGCG CATCAGATAC  
CATCATCTCT CCCACTTCC GGATTACCCA ACCTGGCAG AACTGCAGCC CTTCCCTGAC  
CTCAGTCCAC TGCCACCCTA CTGGGGTGGG GGTTCGAGAG TTTCTGTGAC CTTATTCCCC  
TACGAATGCA GGTGCTAGAT CCACAGAACC GCGAGTCTCG TTCTCCGCGT CGCTGTGTAA  
GGCTGCACGA GTCTGCTTGG GGACAGCAGG TACCTTGCTG CGACCGGTGC GCTACGTGCT  
ACTGCCGCTT CTTCAATGCC TTTTCTTACT GCCCAAGCT GGGTACGGCC ACGAACCTCT  
GTAGTCCGAC CTAG

【図8】

FIG.8

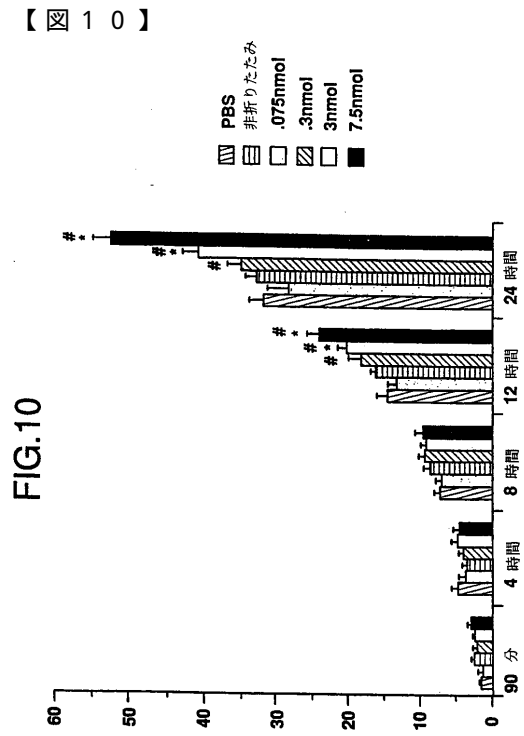
Met Leu Thr Ala Met Leu Ser Cys Val Leu Leu Leu Ala Leu Pro 15  
1 5 10  
Pro Thr Leu Gly Val Gln Met Gly Val Ala Pro Leu Lys Gly Ile Arg 30  
20 25  
Arg Pro Asp Gln Ala Leu Phe Pro Glu Phe Pro Gly Leu Ser Leu Asn 45  
35 40  
Gly Leu Lys Lys Thr Thr Ala Asp Arg Ala Glu Glu Val Leu Leu Gln 60  
50 55  
Lys Ala Glu Ala Leu Ala Glu Val Leu Asp Pro Gln Asn Arg Glu Ser 80  
65 70 75  
Arg Ser Pro Arg Arg Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln 95  
85 90  
Gln Val Pro Cys Cys Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Phe Phe 110  
100 105  
Asn Ala Phe Cys Tyr Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Thr Asn Leu Cys 125  
115 120  
Ser Arg Thr 130

【図9】

FIG.9

Met Leu Thr Ala Ala Val Leu Ser Cys Ala Leu Leu Leu Ala Leu Pro 15  
1 5 10  
Ala Thr Arg Gly Ala Gln Met Gly Leu Ala Pro Met Glu Gly Ile Arg 30  
20 25  
Arg Pro Asp Gln Ala Leu Leu Pro Glu Leu Pro Gly Pro Gly Leu Arg 45  
35 40  
Ala Pro Leu Lys Lys Thr Thr Ala Glu Gln Ala Glu Glu Asp Leu Leu 60  
50 55  
Gln Glu Ala Gln Ala Leu Ala Glu Val Leu Asp Leu Gln Asp Arg Glu 80  
65 70 75  
Pro Arg Ser Ser Arg Arg Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly 95  
85 90  
Gln Gln Val Pro Cys Cys Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Phe 110  
100 105  
Phe Asn Ala Phe Cys Tyr Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Met Asn Pro 125  
115 120  
Cys Ser Arg Thr 130





---

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/19</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>1/19</b>	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>5/00</b>	<b>A</b>
<b>C 1 2 P</b>	<b>21/02</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 P</b>	<b>21/02</b>	<b>C</b>

(72)発明者 スターク, ケビン・リー  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 1 3 6 2、サウザンド・オークス、エマーソン・ストリート  
 ・ 7 7 7

(72)発明者 ルーシー, ローランド  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 1 3 2 0、ニューバリー・パーク、サン・マルコス・コート  
 ・ 3 9 7 9

審査官 山中 隆幸

(56)参考文献 Gene Dev , 1 9 9 7 年, vol.11, p.593-602  
 Proc Natl Acad Sci USA , 1 9 9 4 年, vol.91, p.9760-9764

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
 C12N 1/00 - 15/00  
 C07K 14/47  
 BIOSIS/WPI (DIALOG)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
 SwissProt/PIR/GeneSeq  
 PubMed