

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3549899号
(P3549899)

(45) 発行日 平成16年8月4日(2004.8.4)

(24) 登録日 平成16年4月30日(2004.4.30)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 1 2 N 9/12

C 1 2 N 9/12

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/48

C 1 2 Q 1/48

Z

G O 1 N 33/15

G O 1 N 33/15

Z

請求項の数 2 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-507372
 (86) (22) 出願日 平成10年7月1日(1998.7.1)
 (65) 公表番号 特表2001-510346(P2001-510346A)
 (43) 公表日 平成13年7月31日(2001.7.31)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/013782
 (87) 国際公開番号 W01999/001541
 (87) 国際公開日 平成11年1月14日(1999.1.14)
 審査請求日 平成12年11月16日(2000.11.16)
 (31) 優先権主張番号 08/887,115
 (32) 優先日 平成9年7月1日(1997.7.1)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 08/890,854
 (32) 優先日 平成9年7月10日(1997.7.10)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500127966
 トゥラリック インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サン フランシスコ, ベテ
 ランス プールバード 1120
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 ロス, マイク
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, コーポ
 レイト ドライブ 2, トゥラリック イ
 ンコーポレイテッド内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IKK- α タンパク質、核酸及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号:4で示されるアミノ酸配列を有する単離IKK- α ポリペプチドを含んでなり、NIK
 と相互作用する薬剤をスクリーニングするための薬剤。

【請求項2】

IKK- α ポリペプチドのNIKに対する相互作用を変調する薬剤のスクリーニング方法におい
 て、

配列番号:4で示されるアミノ酸配列を有する単離IKK- α ポリペプチド、前記NIK、及び候
 補薬剤を含む混合物を、該薬剤が存在しない場合に前記ポリペプチドが基準親和性をもっ
 て前記NIKに結合する条件下でインキュベートし、

前記NIKに対する前記ポリペプチドの結合親和性を検出して薬剤偏向親和性を決定する
 工程を含んでなり、

薬剤偏向親和性と基準親和性の間の差が、前記NIKに対する前記ポリペプチドの結合を前
 記薬剤が変調することを示す方法。

【発明の詳細な説明】

緒言

発明の分野

この発明の分野は転写因子の活性化に関与するタンパク質である。

背景

サイトカイン類は、潜伏転写因子の活性等を改変することにより遺伝子発現における変化

をトリガーする (HillとTreisman,1995)。核因子 κB (NF - κB) は如何にそのような外部刺激が活性な転写因子に転換されるかの顕著な例である (Vermaら,1995)。NF - κB 系は、数多くの免疫及び炎症性応答遺伝子並びに重要なウィルス遺伝子の発現を制御する関連転写因子のRelファミリーのメンバーのホモ及びヘテロダイマーからなる (LenardoとBaltimore,1989;BaeuerleとHenkel,1994)。NF - κB 転写因子の活性はその細胞下局性化により調節される (Vermaら,1995)。大抵の細胞型において、NF - κB は50kDaと65kDaのサブユニットからなるヘテロダイマーとして存在する。このヘテロダイマーは抑制タンパク質のI κB ファミリーのメンバーであるI $\kappa B \alpha$ と結合して細胞質に隔絶される (Finc oとBaldwin,1995;ThanosとManiatis,1995;Vermaら,1995)。I $\kappa B \alpha$ はNF - κB の核局在化シグナルをマスクし、それによってNF - κB の核トランスロケーションを防ぐ。核中に転位置し同族DNA配列に結合する活性な転写因子へのNF - κB の転換には、26sプロテアソームでのI $\kappa B \alpha$ のリン酸化と続くユビキチン依存性分解が必要となる。I $\kappa B \alpha$ のシグナル誘導リン酸化はセリン32と36で起こる。これらのセリンの一方又は両方の突然変異により、I $\kappa B \alpha$ はユビキチン結合とタンパク質分解性分解に対して耐性にする (Chenら,1995)。

多面的サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF) 及びインターロイキン - 1 (IL - 1) はI κB リン酸化と続くNF - κB 活性化の生理的誘導物質である (Osbornら,1989;Begら,1993)。TNF及びIL - 1は細胞表面レセプターの異なるファミリーを介してNF - κB 活性化を導くシグナル伝達カスケードを開始させるが (Smithら,1994;Dinarello,1996)、両方の経路は、シグナルトランスデューサーとしてアダプタータンパク質のTNFレセプター関連因子 (TRAF) ファミリーのメンバーを利用する (Rotheら,1995;Hsuら,1996;Caoら,1996b)。TRAFタンパク質は元来は、75kDaのTNFレセプター (TNFR2)、CD40、CD30、及びリンホトキシン - β レセプターを含むTNFレセプターファミリーの幾つかのメンバーの細胞質ドメインに直接随伴することが見出された (Rotheら,1994;Huら,1994;Chengら,1995;Mosialosら,1995;SongとDonner,1995;Satoら,1995;Leeら,1996;Gedrichら,1996;Ansieauら,1996)。また、TRAFタンパク質はアダプタータンパク質TRADDにより55kDaのTNFレセプター (TNFR1) に間接的に補充される (Hsuら,1996)。TNFによるNF - κB の活性化にはTRAF2が必要となる (Rotheら,1995;Hsuら,1996)。TRAF5もまたTNFレセプターファミリーのメンバーによるNF - κB 活性化に関係していた (Nakanoら,1996)。これに対して、TRAF6はIL - 1によりNF - κB 活性化に関与する (Caoら,1996b)。IL - 1処理の際、TRAF6は、IL - 1レセプター複合体に結合するセリン - スレオニンキナーゼであるIRAKに付随する (Caoら,1996a)。

NF - κB - 誘導キナーゼ (NIK) はTRAF2 - 相互作用タンパク質として同定されたMAPキナーゼキナーゼキナーゼ (MAP3K) ファミリーのメンバーである (Malininら,1997)。NIKは過剰発現されたときNF - κB を活性化し、そのTRAF2 - 相互作用C末端ドメインを含む (NIK₍₆₂₄₋₉₄₇₎) 又はそのキナーゼドメインに2つの重要なリシン残基を欠く (NIK_(KK429-430AA)) NIKのキナーゼ不活性突然変異体が、TNF - 、IL - 1 - 、及びTRAF2 - 誘導NF - κB 活性化を抑制するドミナントネガティブ阻害剤として挙動する (Malininら,1997)。最近、NIKは、TRAF5及びTRAF6を含むTRAFファミリーの更なるメンバーと結合することが見出された。NIKの触媒的に不活性な突然変異体もまたTRAF5 - 及びTRAF6 - 誘発NF - κB 活性化を抑制し、よってTRAFの下流のTNF及びIL - 1によりトリガーされるNF - κB シグナル伝達カスケードにおける共通のメディエータとしての統一概念をNIKに提供する。

ここで、我々は、NIK - 相互作用タンパク質として新規なヒトキナーゼI κB キナーゼであるIKK - α を開示する。IKK - α は未知の機能のセリン - スレオニンキナーゼをコードすると推論された過去に同定されたオープンリーディングフレームの概念的翻訳物 (配列番号:5) と配列類似性を有する (「保存されたヘリックス・ループ・ヘリックス偏在性キナーゼ (Conserved Helix - loop - helix Ubiquitous Kinase)」又はCHUK,ConnellyとMarcu 1995;Mockら,1995)。IKK - α の触媒的に不活性な突然変異体は、TNF及びIL - 1刺激により並びにTRAF及びNIK過剰発現により誘発されるNF - κB 活性化を抑制することが示され;一過性に発現したIKK - α は内在性I $\kappa B \alpha$ 複合体に随伴することが示され;そしてI

10

20

30

40

50

IKK - α が I κ B α をセリン32及び36上でリン酸化することが示される。

発明の概要

本発明は、IKK - α ポリペプチド、関連する核酸、及びIKK - α - 特異的構造及び活性及びIKK - α 機能、特にI κ B キナーゼ活性を有するそのポリペプチドドメインに関する方法及び組成物を提供する。IKK - α ポリペプチドは、NF κ B 活性化を調節することができ、よって細胞機能の重要な調節因子を提供する。該ポリペプチドは、主題のIKK - α ポリペプチドコード核酸由来の形質転換宿主細胞から組換え的に産生されても哺乳動物細胞から精製されてもよい。本発明は、開示されたIKK - α 遺伝子と特異的にハイブリダイズ可能な単離IKK - α ハイブリダイゼーションプローブとプライマー、特異的抗体のようなIKK - α - 特異的結合薬剤、及び主題組成物を製造し、診断法（例えば、IKK - α 転写物に対する遺伝子ハイブリダイゼーションスクリーン）、治療法（例えばTNFシグナル伝達を阻害するIKK - α キナーゼ阻害剤）及び生物薬剤工業（例えば免疫原、他の転写調節因子を単離するための試薬、薬理学的リード薬剤のために化学ライブラリをスクリーニングするための試薬等々）に使用する方法を提供する。

10

発明の詳細な説明

ヒトIKK - α ポリペプチドをコードしている天然cDNAの核酸配列は配列番号:3として示され、概念的な全長翻訳物は配列番号:4として示される。本発明のIKK - α ポリペプチドは配列番号:3の不完全翻訳物、特に配列番号:3の残基1～638を含み、その翻訳物及び配列番号:4の欠失変異体はヒトIKK - α - 特異的アミノ酸配列、結合特異性又は機能を有し、Cys30、Glu543、Leu604、Thr679、Ser680、Pro684、Thr686及びSer687の少なくとも一つを含む。好ましい翻訳物/欠失変異体は、配列番号:4の6つの残基Cys30、Glu543、Leu604、Thr679、Ser680、Pro684、Thr686又はSer687含有ドメインを含み、該残基に直ぐ隣り合う少なくとも8、より好ましくは少なくとも約12、最も好ましくは少なくとも20の連続残基の配列を含んでなるもので、該残基は、上記連続残基内に好ましくはあり（例えば表Iを参照されたい）；この変異体がhIKK - α 特異的エピトープ及び免疫原を提供する。

20

表1. IKK - α 結合特異性を有するIKK - α ポリペプチドの例

hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基1 - 30）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基686 - 699）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基22 - 31）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基312 - 345）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基599 - 608）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基419 - 444）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基601 - 681）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基495 - 503）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基604 - 679）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基565 - 590）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基670 - 687）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基610 - 627）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基679 - 687）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基627 - 638）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基680 - 690）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基715 - 740）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基684 - 695）hIKK - α Δ 1（配列番号:4、残基737 - 745）

30

主題ドメインは、IKK - α ドメイン特異的活性又は機能、例えばIKK - α - 特異的キナーゼ又はキナーゼ抑制活性、NIK - 結合又は結合抑制活性、I κ B - 結合又は抑制活性、NF κ B 活性化又は抑制活性又は抗体結合性を提供する。好ましいドメインはI κ B のセリン32と36の少なくとも一方、好ましくは両方をリン酸化させる（Verma, I.M.ら（1995））。本明細書において、I κ B のセリン32とセリン36とは、コンセンサス配列DSGL/IXSM/Lの一部である2つのセリン残基（例えばI κ B α のser32と36、I κ B β のser19と23、及びメチオニンの使用に応じてI κ B ϵ のser157と161あるいは18と22）を集合的に指す。

40

IKK - α - 特異的活性又は機能は、簡便なインビトロ、細胞ベース、又はインビボアッセイ：例えば動物でのインビトロ結合アッセイ、細胞培養アッセイ（例えば遺伝子療法、遺伝子組換え等々）等々により決定することができる。結合アッセイは、結合標的とのIKK - α ポリペプチドの分子相互作用が評価されるあらゆるアッセイを包含する。結合標的は、例えばIKK - α 基質のような天然の細胞内結合標的、IKK - α 調節タンパク質あるいはIKK - α 活性又はその局在化を直接変調するその他の制御因子；あるいは抗体のような特異的免疫タンパク質、又は以下に記載するようなスクリーニングアッセイにおいて同定されるもののようなIKK - α 特異的薬剤のような非天然結合標的でもよい。IKK - α - 結合特異

50

性は、キナーゼ活性又は結合平衡定数（通常少なくとも約 10^7M^{-1} 、好ましくは少なくとも約 10^8M^{-1} 、より好ましくは少なくとも約 10^9M^{-1} ）により、IKK- α -発現細胞におけるネガティブ変異体として機能し、異種性宿主（例えばげっ歯類又はウサギ）中でIKK- α 特異的抗体を誘発する等々の主題タンパク質の能力により、検定することができる。とにかく、主題IKK- α ポリペプチドのIKK- α 結合特異性はCornellyとMarcu（1995）のマウス及びヒトCHUK配列並びにIKK- β （配列番号:2）を必ず区別する。

本発明に係わるIKK- α ポリペプチドは単離されるか純粹である：「単離」ポリペプチドは、天然の状態では付随している物質の少なくとも幾らかを伴っておらず、この量は、与えられた試料中の全ポリペプチドの好ましくは少なくとも約0.5%、より好ましくは少なくとも約5%を構成し、純粹なポリペプチドは与えられた試料中の全ポリペプチドの少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約99%を構成する。特定の実施態様では、IKK- α ポリペプチドは、IKK- β から単離され、及び/又はIKK複合体から単離されたMKP-1沈降性複合体から単離される。IKK- α ポリペプチドとポリペプチドドメインは合成されても、組換え技術により産生されても、あるいは哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞から精製されてもよい。非常に広範な分子及び生化学的方法が主題組成物の生化学合成、分子発現及び精製に利用でき、例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual（分子クローニング、実験室マニュアル）（Sambrookら、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー）、Current Protocols in Molecular Biology（分子生物学における現在のプロトコール）（Ausubelら編、Greene Publ.Assoc., Wiley - Interscience, NY）あるいは当該分野でその他知られているものを参照されたい。

本発明は、IKKポリペプチド、好ましくはIKK- α ポリペプチドに特異的な結合薬剤で、基質、アゴニスト、アンタゴニスト、天然細胞内結合標的等々を含むもの、かかる薬剤を同定し調製する方法、及び診断法、治療法及び製薬開発におけるその用途を提供する。例えば、特異的結合薬剤は、様々な診断及び治療用途、特に疾病又は疾病予後に例えばNF- κ B活性化のような主題タンパク質を含む経路の不適切な利用に関与する場合に有用である。新規なIKK特異的結合薬剤には、IKK特異的レセプター、例えば特異的抗体のような体細胞性組換えポリペプチドレセプター又はT細胞抗原レセプター（例えばHarlowとLane（1988）Antibodies, A Laboratory Manual（抗体、実験室マニュアル）、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー）及び例えば一重、二重及び三重ハイブリッドスクリーニングのようなアッセイで同定されるその他の天然の結合薬剤、以下に記載するような化学ライブラリのスクリーニングで同定される非天然細胞内結合薬剤等々が包含される。特に興味深い薬剤はIKK機能、例えばIKK依存性転写活性化を変調する。例えばIKK I κ Bキナーゼ活性の広範な阻害剤を、I κ Bを含むシグナル伝達を調節するために使用しても良い。IKK I κ Bキナーゼ阻害剤の例には、セリン/スレオニンキナーゼ（例えばPKC）阻害剤の既知のクラス、例えばATPと基質結合の競合阻害剤、抗生物質、IKK誘導ペプチド阻害剤等々が含まれる。表IIおよびIIIを参照されたい。IKK特異性と活性は、プロテインキナーゼのパネルを使用する高収量キナーゼアッセイにおいて即座に定量される（引用文献と実施例を参照されたい）。

好適な阻害剤には、海生生物により生産されたスタウロsporin（Omura Sら, J Antibiot（Tokyo）1995 Jul;48（7）:535-48）のような天然化合物、及びEGFレセプタープロテインキナーゼをまた強力に阻害するPD153035のような合成化合物（Fry DWら Science 1994 Aug 19;265（5157）:1093-5）が含まれる。合成プロテインキナーゼ阻害剤のチロホスチンファミリーのメンバーもまた有用である；これらには純粹なATPコンピティターである化合物、純粹な基質コンピティターである化合物、及びATPと基質の両方と競合する混合コンピティターである化合物が含まれる（Levitzki AとGazit A, Science 1995 Mar 24;267（5205）:1782-8）。更なるIKK阻害剤には、哺乳動物細胞により内在的に生産されるペプチド系基質コンピティター、例えばPKI（プロテインキナーゼ阻害剤, Seasholtz AFら, Proc Natl Acad Sci USA 1995 Feb 28;92（5）:1734-8）、又はcdcキナーゼを阻害するタンパク質（Correa - Bordes J及びNurse P, Cell 1995 Dec 15;83（6）:1001-9）が含まれる。更なる小ペプチドベース基質競合性キナーゼ阻害剤とアロステリック阻害剤

10

20

30

40

50

(ATP又は基質競合と独立の抑制機構)は確立された方法(Hvalby OらProc Natl Acad Sci USA 1994 May 24;91(11):4761-5;Barja Pら,Cell Immunol 1994 Jan;153(1):28-38;Villar-Palasi C,Biochim Biophys Acta 1994 Dec 30;1224(3):384-8;Liu WZら,Biochemistry 1994 Aug 23;33(33):10120-6)により直ぐに産生される。

表 II. 選択された小分子 I K Kキナーゼ阻害剤

HA-100 ¹	Iso-H7 ¹²	A-3 ¹⁸
チェレリスレン ²	PKC19-31	HA1004 ^{19,20}
スタウロスポリン ^{3,4,5}	H-7 ^{13,3,14}	K-252a ^{16,5}
カルホスチンC ^{6,7,8,9}	H-89 ¹⁵	KT5823 ¹⁶
K-252b ¹⁰	KT5720 ¹⁶	ML-9 ²¹
PKC19-36 ¹¹	cAMP-depPKinhib ¹⁷	KT5926 ²²

10

引用文献

1. Hagiwara, M.ら Mol. Pharmacol. 32:7 (1987)
2. Herbert, J.M.ら Biochem Biophys Res Com 172:993 (1990)
3. Schachtele, C.ら Biochem Biophys Res Com 151:5542 (1988)
4. Tamaoki, T.ら Biochem Biophys Res Com 135:397 (1986)
5. Tischler, A.S.ら J. Neurochemistry 55:1159 (1990)
6. Bruns, R.F.ら Biochem Biophys Res Com 176:288 (1991)
7. Kobayashi, E.ら Biochem Biophys Res Com 159:548 (1989)
8. Tamaoki, T.ら Adv2nd Mass Phosphoprotein Res 24:497 (1990)
9. Tamaoki, T.ら Biotechnology 8:732 (1990)
10. Yasuzawa, T.J. Antibiotics 39:1972 (1986)
11. House, C.ら Science 238:1726 (1987)
12. Quick, J.ら Biochem Biophys Res Com 167:657 (1992)
13. Bouli, N.M.と Davis, M. Brain Res. 525:198 (1990)
14. Takahashi, I.ら J. Pharmacol. Exp. Ther. 255:1218 (1990)
15. Chijiwa, T.ら J. Biol. Chem. 265:5267 (1990)
16. Kase, H.ら Biochem Biophys Res Com 142:436 (1987)
17. Cheng, H.C.ら J. Biol. Chem. 261:989 (1986)
18. Inagaki, M.ら Mol. Pharmacol. 29:577 (1986)
19. Asano, T.と Hidaka, H. J. Pharmacol. Exp. Ther. 231:141 (1984)
20. Hidaka, H.ら Biochemistry 23:5036 (1984)
21. Nagatsu, T.ら Biochem Biophys Res Com 143:1045 (1987)
22. Nakanishi, S.ら Mol. Pharmacol. 37:482 (1990)

20

30

表 III. 選択されたペプチジル IKKキナーゼ阻害剤

hI κ B α , 残基 24-39, 32A1a	hIKK- α , Δ 5-203
hI κ B α , 残基 29-47, 36A1a	hIKK- α , Δ 1-178
hI κ B α , 残基 26-46, 32/36A1a	hIKK- α , Δ 368-756
hI κ B β , 残基 25-38, 32A1a	hIKK- α , Δ 460-748
hI κ B β , 残基 30-41, 36A1a	hIKK- α , Δ 1-289
hI κ B β , 残基 26-46, 32/36A1a	hIKK- α , Δ 12-219
hI κ B ϵ , 残基 24-40, 32A1a	hIKK- α , Δ 307-745
hI κ B ϵ , 残基 31-50, 36A1a	hIKK- α , Δ 319-644
hI κ B ϵ , 残基 27-44, 32/36A1a	

従って、本発明は、例えばセリン/スレオニンキナーゼ阻害剤に細胞を接触させることにより、IKKキナーゼ活性を変調する工程を含む細胞中に I κ B を含むシグナル伝達を変調する方法を提供する。細胞は培養中かインサイツ、すなわち天然宿主内に常在していてもよい。好適な阻害剤は哺乳動物宿主において経口的に活性である。診断用途に対しては、阻害剤又は他の IKK 結合剤は、例えば蛍光、放射性、化学発光、又は、結合薬剤に直接抱合されるか結合薬剤に特異的なプローブに抱合される他の容易に検出可能な分子でしばしば標識される。

開示した IKK - α ポリペプチドのアミノ酸配列は、選択された発現系に対して最適化された IKK - α ポリペプチドコード核酸を逆翻訳するために使用されるか (Holler ら (1993) Gene136,323 - 328; Martin ら (1995) Gene154,150 - 166)、天然の IKK - α コード核酸配列の単離に使用される変性オリゴヌクレオチドプライマー及びプローブを産生するために使用される (「GCG」ソフトウェア、ジェネティクス・コンピュータ・グループ・インク、マディソン WI)。IKK - α コード核酸配列は、IKK - α 発現ベクターに使用され、例えば発現及びスクリーニングのために組換え宿主細胞に、例えば IKK - α 変調細胞機能に關与する疾患に対する候補薬の効能等の機能性研究等々のための遺伝子組換え動物に導入される。

本発明はまた、配列番号:3のストランドの少なくとも12、好ましくは少なくとも24、より好ましくは少なくとも36、最も好ましくは少なくとも96の近接塩基、特に配列番号:2のヌクレオチド1 - 1913のもの、好ましくは塩基1 - 92、1811、1812、1992、1995、2034、2035、2039、2040、2055及び2060を含む IKK - α cDNA 特異的配列を有し、(配列番号:5)を含む第3核酸の存在下で配列番号:3の相補ストランドを含む第2核酸と特異的にハイブリダイズするのに十分な核酸ハイブリダイゼーションプローブ及び複製/増幅プライマーを提供する。特異的ハイブリダイゼーションを実証するには一般にストリンジェントな条件、例えば42 の温度で5xSSPE (0.18M NaCl、0.01M NaPO₄、pH7.7、0.001M EDTA) バッファー中に30%のホルムアミドを含むバッファー中でハイブリダイズし42 において0.2xSSPEで洗浄を行ったとき結合したまま残る条件、好ましくは42 の温度で5xSSPE中に50%のホルムアミドを含むバッファー中でハイブリダイズし42 において0.2xSSPEバッファーで洗浄を行ったとき結合したまま残る条件が必要となる。IKK - α 核酸はまた例えばBLAST X (Altschul ら (1990) Basic Local Alignment Search Tool, J Mol Biol 215,403 - 410) のような整合化アルゴリズムを使用して区別することもできる。

主題の核酸は、合成/非天然配列のものであり、及び/又は単離される、すなわちその天然の状態で付随している物質の少なくとも幾らかを伴っておらず、この量は、好ましくは与えられた画分中に存在する全核酸の少なくとも約0.5%、より好ましくは少なくとも約5%を構成し、通常は、天然染色体上に結合しているもの以外のヌクレオチド(群)に結

10

20

30

40

50

合した天然配列又は非天然配列を含んでなることを意味する組換え体である。配列番号3の核酸配列又はそのフラグメントを含んでなる組換え核酸は、そのような配列又はフラグメントを、天然染色体上に結合しているもの以外の配列が直ぐ隣に（すなわち、近接して）位置している末端か、天然染色体上に結合しているもの以外の配列が直ぐに隣に位置しているか末端にある10kb、好ましくは2kbよりも小さい負のフランキング領域が隣に位置している末端に含んでいる。核酸は通常はRNAもしくはDNAであるが、他の塩基又はヌクレオチド類似体を含んでなる核酸を使用して安定性を修正する等々もしばしば好適である。主題の核酸には、翻訳可能な転写物、ハイブリダイゼーションプローブ、PCRプライマー、診断用核酸等々としての使用；IKK- α 遺伝子及び遺伝子転写物の存在を検出し、更なるIKK- α 相同体及び構造類似体をコードする核酸を検出又は増幅するための使用を含む広範な応用範囲が見出される。診断法では、IKK- α ハイブリダイゼーションプローブが、臨床及び実験室試料中の野生型及び変異体IKK- α 対立遺伝子を同定する際に使用される。変異体対立遺伝子は、高処理臨床診断に対する対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド（ASO）プローブを産生するために使用される。治療法では、治療用IKK- α 核酸が活性なIKK- α の細胞発現もしくは細胞内濃度又は利用能を変調するために使用される。

本発明はIKK変調性細胞機能のレベルで活性な薬剤、化合物又は薬剤用のリード化合物を同定する効率的な方法を提供する。一般に、これらのスクリーニング法は、天然のIKK結合標的との相互作用を変調する化合物、特にIKK β 誘導基質、特にIKK β 及びNIK基質とのIKKリン酸化を変調する化合物に対するアッセイを含む。標識インビトロタンパク-タンパク結合アッセイ、免疫アッセイ、細胞ベースアッセイ等々を含む結合薬剤に対する広範なアッセイが提供される。該方法は、リード化合物に対しての化学ライブラリの自動でコスト性能の良い高処理スクリーニングに受け入れられる。同定された薬剤は動物及びヒト治療用に製薬工業で使用される；例えば薬剤を誘導体化し、インビトロ及びインビボアッセイで再スクリーニングして製薬開発のための活性を最適化し毒性を最小化することができる。

インビトロ結合アッセイでは、他のペプチド又はポリペプチド、例えば検出もしくは係留用のタグ等との融合産物の一部であってもよいIKKポリペプチドを含む成分の混合物を使用する。アッセイ混合物は、天然の細胞内IKK結合標的を含む。特定の実施態様では、結合標的はIKK β セリン32及び/又は36を含んでなる基質である。このような基質は、セリン32及び/又は36残基と、少なくとも5、好ましくは少なくとも10、より好ましくは少なくとも20の天然に生じる直ぐ隣りに位置する残基（例えば、セリン36ペプチドに対して、IKK β α 、 β もしくは ϵ 由来基質に対してそれぞれ残基26-46、22-42、又は12-32もしくは151-171の残基）を各側に含むIKK β α 、 β もしくは ϵ ペプチドを含んでなる。天然の全長結合標的を使用することもできるが、その部分がアッセイにおいて簡便に測定可能な主題IKKポリペプチドに対して結合親和性とアビディティをもたらす限り、かかる部分（例えばペプチド）を使用することがしばしば好ましい。アッセイ混合物はまた候補薬剤剤を含有する。候補薬剤剤には、典型的には有機化合物であるが、数多くの化学クラスが含まれ、好ましくは小さな有機化合物が含まれ、合成又は天然化合物のライブラリを含む広範な供給源から得られる。様々な他の試薬もまた混合物に含めても良い。これらには、（キナーゼアッセイに対する）ATP又はATP類似体、塩、バッファー、中性タンパク質、例えばアルブミン、洗浄剤、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗菌剤等々のような様々なその他の試薬を含有する。

得られた混合物は、候補の薬剤剤が存在しなかったらIKKポリペプチドが細胞結合標的、部分又は類似体に基準結合親和性をもって特異的に結合するような条件下でインキュベートされる。混合物成分を、要求された結合をもたらす任意の順序で添加することができ、最適な結合を容易にする任意の温度でインキュベーションを実施することができる。インキュベーション期間は同様に最適結合となるように選択されるが、迅速な高処理スクリーニングを容易にするように最小化される。

インキュベート後、IKKポリペプチドと一又は複数の結合標的の間の薬剤剤偏向結合が任意の簡便な方法で検出される。IKKキナーゼ活性に対しては、「結合」はIKK- α 基質のリン

10

20

30

40

50

酸化の変化により一般に検出される。この実施態様では、キナーゼ活性は標識リン酸塩の基質への移動により定量することができ、ここで、標識は、放射能、発光、光学もしくは電気密度等々のような直接的検出をもたらすものでも、あるいはエピトープタグ等々のような間接的検出をもたらすものでもよい。標識と他のアッセイ成分、例えば光学又は電子密度、放射線、非放射性エネルギー移動等々の性質に応じて、様々な方法を使用して標識を検出することができ、あるいは抗体抱合体等々で間接的に検出される。

薬剤の存在下での結合アフィニティーと比較して薬剤の非存在下における標的に対するIKKポリペプチドの結合アフィニティーの差は、薬剤がIKK結合標的に対するIKKポリペプチドの結合を変調することを示している。同様に、以下に記載される細胞ベースアッセイにおいて、薬剤の存在及び不存在下におけるIKK- α 依存性転写活性化の差は、薬剤がIKK機能を変調することを示している。本明細書において使用される差は、統計的に有意であり、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも90%の差を表す。

次の実験部分と実施例は例証のために提供するもので限定をなすものではない。

実験

IKK- α の同定

NIK媒介NF- κ B活性化のメカニズムを調べるために、我々は、酵母二重ハイブリッドタンパク質相互作用クローニングによりNIKに直接結合するタンパク質を同定した(FieldとSong,1989)。酵母転写因子GAL4のDNA結合ドメインに融合したNIKをコードする発現ベクターを産生した。このベクターはヒトB細胞cDNAライブラリの二重ハイブリッドスクリーニングにおいて餌として使用した。およそ600万の形質転換体から、his及びlacZレポーター遺伝子の活性化により測定して8つの陽性のクローンを得た。これらのクローンから、3つがTRAFファミリーのメンバーであるTRAF3をコード化し(Huら,1994;Chengら,1995;Mosialosら,1995;Satoら,1995)、一つがIKK- α と我々が呼ぶ新規なタンパク質をコード化した。酵母細胞への再形質転換によりNIKとIKK- α の間の相互作用が証明された。全長ヒトIKK- α クローンは、IKK- α の二重ハイブリッドクローンの5'末端から産生したプローブでジャーカットcDNAライブラリをスクリーニングすることにより単離した。IKK- α は、N末端セリン-スレオニンキナーゼ触媒作用ドメイン、C末端ヘリックス・ループ・ヘリックスドメイン及びヘリックス・ループ・ヘリックスとキナーゼドメインの間に並列したロイジンジッパー様両親媒性 α ヘリックスを含む。

ヒト細胞におけるIKK- α とNIKの相互作用

IKK- α のNIKとの相互作用は、哺乳動物細胞免疫共沈降アッセイにおいて確認された。N末端フラッグエピトープタグを含むヒトIKK- α をMycエピトープタグNIK又はHAエピトープタグTRAFタンパク質での293ヒト胚性腎臓細胞において一過性に同時発現させた。細胞溶解物をフラッグエピトープに対するモノクローナル抗体を使用して免疫沈降させ、共沈するNIK又はTRAFタンパク質を抗Myc又は抗HAMモノクローナル抗体での免疫プロット分析により検出した。このアッセイにおいて、IKK- α はNIKを共沈させることができ、酵母二重ハイブリッド分析によるIKK- α について検出した両タンパク質の相互作用を確認する。また、殆どのN末端キナーゼドメイン(IKK- α ₍₃₀₇₋₇₄₅₎)を欠く欠失変異体IKK- α タンパク質はNIKと結合することができ、IKK- α の α -ヘリックスC末端の半分がNIKとの相互作用を媒介することを示している。NIKに対して、IKK- α はTRAF2又はTRAF3の何れにも結合しなかった。しかしながら、NIKをIKK- α とTRAF2と共に同時発現させたとき、IKK- α でのTRAF2の強い共沈が検出され、IKK- α 、NIK及びTRAF2の間の三元複合体の形成を示している。

NF- κ B活性化に対するIKK- α 及びIKK- α 変異体の影響

NF- κ B活性化におけるIKK- α の可能な役割を調べるために、我々は、IKK- α の一過性過剰発現がNF- κ B依存性レポーター遺伝子を活性化させるかどうかを調べた。E-セレクチン-ルシフェラーゼレポーター作成物(SchindlerとBaichwal,1994)及びIKK- α 発現ベクターをHeLa細胞中に同時形質移入した。IKK- α 発現はレポーター遺伝子を用量依存的に活性化させ、ルシフェラーゼ活性の最大の誘導はベクター対照と比較して約6ないし7倍であった。同様な結果は293細胞において得られ、そこではIKK- α の過剰発現がお

10

20

30

40

50

よそ4倍のレポーター遺伝子活性を誘導した。TNF処理はレポーター遺伝子アッセイにおいて過剰発現されたIKK- α の弱いNF- κ B誘導活性を刺激しなかった。従って、IKK- α は過剰発現したときNK- κ Bの活性化を誘発する。

我々は次に293細胞中のレポーター遺伝子アッセイにおけるシグナル誘導NF- κ B活性化の際にNIKになお随伴するキナーゼ不活性IKK- α (307-745)の過剰発現の影響を決定した。IKK- α (307-745)の過剰発現はNIK (624-947)の過剰発現と同様なTNF-及びIL-1-誘導レポーター遺伝子活性化を阻止した。IKK- α (307-745)はTRAF2、TRAF6及びNIKの過剰発現により誘発されるNF- κ B依存性レポーター遺伝子活性を阻害したことがまた見出された。これらの結果を併せると、触媒的に不活性なIKK- α 突然変異体はTNF-、IL-1、TRAF-及びNIK-誘発NF- κ B活性化のドミナントネガティブな阻害剤である。これは、IKK- α がNIKの下流のTNF及びIL-1によるNF- κ B活性化の共通のメディエータとして機能することを示している。

括弧内の文献

- Ansieau, S. ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14053 - 14058.
- Baeuerle, P. A. と Henkel, T. (1994) Annu. Rev. Immunol. 12, 141 - 179.
- Beg, A. A. ら (1993) Mol. Cell. Biol. 13, 3301 - 3310.
- Cao, Z., Henzel, W. J., 及び Gao, X. (1996a) Science 271, 1128 - 1131.
- Cao, Z. ら (1996b) Nature 383, 443 - 446.
- Chen, Z. ら (1995) Genes Dev. 9, 1586 - 1597.
- Cheng, G. ら (1995) Science 267, 1494 - 1498.
- Connelly, M. A. と Marcu, K. B. (1995) Cell. Mol. Biol. Res. 41, 537 - 549.
- Dinarello, C. A. (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood 87, 2095 - 2147.
- Fields, S. と Song, O. - k. (1989) Nature 340, 245 - 246.
- Finco, T. S. と Baldwin, A. S. (1995) Immunity 3, 263 - 272.
- Gedrich, R. W. ら (1996) J. Biol. Chem. 271, 12852 - 12858.
- Hill, C. S. と Treisman, R. (1995) Cell 80, 199 - 211.
- Hsu, H., Shu, H. - B., Pan, M. - P., 及び Goeddel, D. V. (1996) Cell 84, 299 - 308.
- Hu, H. M. ら (1994) J. Biol. Chem. 269, 30069 - 30072.
- Lee, S. Y. ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9699 - 9703.
- Lenardo, M. と Baltimore, D. (1989) Cell 58, 227 - 229.
- Malinin, N. L. ら (1997) Nature 385, 540 - 544.
- Mock ら (1995) Genomics 27, 348 - 351.
- Mosialos, G. ら (1995) Cell 80, 389 - 399.
- Nakano, H. ら (1996) J. Biol. Chem. 271, 14661 - 14664.
- Osborn, L., Kunkel, S., 及び Nabel, G. J. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2336 - 2340.
- Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., 及び Goeddel, D. V. (1995) Science 269, 1424 - 1427.
- Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., 及び Goeddel, D. V. (1994) Cell 78, 681 - 692.
- Sato, T., Irie, S., 及び Reed, J. C. (1995) FEBS Lett. 358, 113 - 118.
- Schindler, U., と Baichwal, V. R. (1994) Mol. Cell. Biol. 14, 5820 - 5831.
- Smith, C. A., Farrah, T., 及び Goodwin, R. G. (1994) Cell 76, 959 - 962.
- Song, H. Y. と Donner, D. B. (1995) Biochem. J. 309, 825 - 829.
- Thanos, D., と Maniatis, T. (1995) Cell 80, 529 - 532.
- Verma, I. M. ら (1995) Genes Dev. 9, 2723 - 2735.

実施例

1. IKK- α - I κ B α リン酸化アッセイに対するプロトコール

A. 試薬:

- ニュートラライトアビジン: PBS中に20 μ g/ml。
- キナーゼ: PBSに20 μ g/mlで入れた 10^{-8} - 10^{-5} MのIKK- α (配列番号: 4)。
- 基質: PBSに40 μ g/mlで入れた 10^{-7} - 10^{-4} Mのビオチン化基質 (ヒトI κ B α の残基26 - 4

6からなる21残基ペプチド)。

- 阻害バッファー: PBS中に5% BSA、0.5% トウエン20; 室温で1時間。
- アッセイバッファー: 100mMのKCl、10mMのMgCl₂、1mMのMnCl₂、20mMのHEPES、pH7.4、0.25mMのEDTA、1%のグリセロール、0.5%のNP-40、50mMのBME、1mg/mlのBSA、プロテアーゼ阻害剤カクテル。
- [³²P] γ - ATPの10x保存液: 100 μCi [³²P] γ - ATPを伴う2x10⁻⁵Mの非放射性ATP。スクリーニングの間、4℃のマイクロ冷蔵庫に配置。
- プロテアーゼ阻害剤カクテル (1000X): 10mlのPBS中に10mgのトリプシン阻害剤 (BMB # 109894)、10mgのアプロチニン (BMB # 236624)、25mgのベンズアミジン (シグマ # B - 6506)、25mgのロイペプチン (BMB # 1017128)、10mgのAPMSF (BMB # 917575)、及び2mMのNaVO₃ (シグマ # S - 6508)。

B. アッセイプレートの調製:

- 4℃で一晩かけてウェル当り120 μlの保存Nアビジンでコーティング。
- 200 μlのPBSで2回洗浄。
- 150 μlの阻害バッファーで阻害。
- 200 μlのPBSで2回洗浄。

C. アッセイ:

- 40 μlのアッセイバッファー/ウェルを添加。
- 40 μlのビオチン化基質 (アッセイバッファー中に2 - 200pmol/40ul) を添加。
- 40 μlのキナーゼ (アッセイバッファー中に0.1 - 10pmol/40ul) を添加。
- 10 μlの化合物又は抽出物を添加。
- 10 μlの [³²P] γ - ATPの10x保存液を添加。
- 25℃で15分間振とう。
- 25℃で更に45分間インキュベート。
- 200 μlのPBSで4回洗浄することにより反応を停止。
- 150 μlのシンチレーションカクテルを添加。
- トップカウントをカウント。

D. (各プレート上にある) 全アッセイ用の対照:

a. 非特異的結合

b. 80% 阻害の非放射性ATP。

2. 高収量 IKK - α - NIK結合アッセイに対するプロトコール

A. 試薬:

- ニュートラライトアビジン: PBS中に20 μg/ml。
- 阻害バッファー: PBS中に5%のBSA、0.5%のトウエン20; 室温で1時間。
- アッセイバッファー: 100mMのHEPES、pH7.6、1mMのMgCl₂、1%のグリセロール、0.5%のNP-40、50mMのβ -メルカプトエタノール、1mg/mlのBSA、プロテアーゼ阻害剤のカクテル。
- ³²P IKK - α ポリペプチドの10xストック: 200,000 - 250,000cpmの標識 IKK - α (ベックマンカウンター) が補填された10⁻⁸ - 10⁻⁶Mの「非放射性」IKK - α。スクリーニングの間、4℃のマイクロ冷蔵庫に配置。
- プロテアーゼ阻害剤カクテル (1000X): 10mlのPBS中に10mgのトリプシン阻害剤 (BMB # 109894)、10mgのアプロチニン (BMB # 236624)、25mgのベンズアミジン (シグマ # B - 6506)、25mgのロイペプチン (BMB # 1017128)、10mgのAPMSF (BMB # 917575)、及び2mMのNaVO₃ (シグマ # S - 6508)。
- NIK: PBS中の10⁻⁷ - 10⁻⁵Mのビオチン化NIK

B. アッセイプレートの調製:

- 4℃で一晩かけてウェル当り120 μlの保存N - アビジンでコーティング。
- 200 μlのPBSで2回洗浄。
- 150 μlの阻害バッファーで阻害。
- 200 μlのPBSで2回洗浄。

10

20

30

40

50

C. アッセイ :

- 40 μ l のアッセイバッファー / ウェルを添加。
- 10 μ l の化合物又は抽出物を添加。
- 10 μ l の ^{33}P - IKK - α (20 - 25,000cpm/0.1 - 10pmol/ウェル = 10^{-9} - 10^{-7} M最終濃度) を添加。
- 25 で15分間振とう。
- 25 で更に45分間インキュベート。
- 40 μ Mのビオチン化NIK (アッセイバッファー中に0.1 - 10pmol/40ul) を添加。
- 室温で1時間インキュベート。
- 200 μ MのPBSで4回洗浄することにより反応を停止。
- 150 μ Mのシンチレーションカクテルを添加。
- トップカウントをカウント。

10

D. (各プレート上にある) 全アッセイ用の対照 :

a. 非特異的結合

b. 80%阻害の可溶性 (非ビオチン化NIK) 。

本明細書において引用した刊行物と特許出願の全てを、あたかもそれぞれ個々の刊行物又は特許出願が出典明示により特に個々に取り込まれることが示されているように、出典明示によりここに取り込む。前記の発明を理解を容易にするために例証と実施例によりある程度詳細に記載したが、この発明の教示に照らせば、添付の請求の範囲の精神又は範囲から逸脱しないで、ある変更と修正を行ってもよいことは当業者であれば容易に分かるであ

20

配列表

(1) 一般的情報 :

(i) 出願人:Rothe,Mike

Cao,Zhaodan

Régnier, Catherine

(ii) 発明の名称:IKK - α タンパク質、核酸及び方法

(iii) 配列の数:5

(iv) 通信宛先 :

30

(A) 宛先:SCIENCE & TECHNOLOGY LAW GROUP

(B) 通り:268 BUSH STREET,SUITE 3200

(C) 都市:SAN FRANCISCO

(D) 州:CALIFORNIA

(E) 国:米国

(F) ジップ:94104

(v) コンピューター読取可能形態 :

(A) 媒体の型:フロッピーディスク

(B) コンピューター:IBM PC コンパチブル

(C) 操作システム:PC - DOS/MS - DOS

40

(D) ソフトウェア:PatentIn Release # 1.0,Version # 1.30

(vi) 本出願のデータ :

(A) 出願番号 :

(B) 出願日 :

(C) 分類 :

(viii) 代理人情報

(A) 氏名:OSMAN,RICHARD A

(B) 登録番号:36,627

(C) 参照 / 書類番号:T97 - 006 - 1

(ix) 遠距離通信情報 :

50

- (A) 電話 : (415) 343 - 4341
 (B) テレファックス : (415) 341 - 4342
 (2) 配列番号 : 1
 (i) 配列の特徴 :
 (A) 配列の長さ : 2268塩基対
 (B) 配列の型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 二本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状
 (ii) 分子型 : cDNA
 (xi) 配列 :

ATGAGCTGGT CACCTTCCCT GACAACGCAG ACATGTGGGG CCTGGGAAAT GAAAGAGCGC 60
 CTTGGGACAG GGGGATTTGG AAATGTCATC CGATGGCACA ATCAGGAAAC AGGTGAGCAG 120
 ATTGCCATCA AGCAGTGCCG GCAGGAGCTC AGCCCCCGGA ACCGAGAGCG GTGGTGCCTG 180
 GAGATCCAGA TCATGAGAAG GCTGACCCAC CCCAATGTGG TGGCTGCCCG AGATGTCCCT 240
 GAGGGGATGC AGAACTTGGC GCCCAATGAC CTGCCCCTGC TGGCCATGGA GTACTGCCAA 300
 GGAGGAGATC TCCGGAAGTA CCTGAACCAG TTTGAGAAGT GCTGTGGTCT GCGGGAAGGT 360
 GCCATCCTCA CCTTGCTGAG TGACATTGCC TCTGCGCTTA GATACCTTCA TGAACAACAGA 420
 ATCATCCATC GGGATCTAAA GCCAGAAAAC ATCGTCCTGC AGCAAGGAGA ACAGAGGTTA 480
 ATACACAAAA TTATTGACCT AGGATATGCC AAGGAGCTGG ATCAGGGCAG TCTTTGCACA 540
 TCATTCGTGG GGACCCTGCA GTACCTGGCC CCAGAGCTAC TGGAGCAGCA GAAGTACACA 600
 GTGACCGTCG ACTACTGGAG CTTCCGGCACC CTGGCCTTTG AGTGCATCAC GGGCTTCCGG 660
 CCCTTCCTCC CCAACTGGCA GCCCGTGCAG TGGCATTCAA AAGTCCGGCA GAAGAGTGAG 720
 GTGGACATTG TTGTTAGCGA AGACTGAAT GGAACGGTGA AGTTTCAAG CTCTTTACCC 780
 TACCCCAATA ATCTTAACAG TGTCTGGCT GAGCGACTGG AGAAGTGGCT GCAACTGATG 840
 CTGATGTGGC ACCCCCGACA GAGGGGCACG GATCCCACGT ATGGGCCCAA TGGCTGCTTC 900
 AAGGCCCTGG ATGACATCTT AAACCTAAAG CTGGTTCATA TCTTGAACAT GGTACCGGGC 960
 ACCATCCACA CCTACCCTGT GACAGAGGAT GAGAGTCTGC AGAGCTTGAA GGCCAGAATC 1020
 CAACAGGACA CCGGCATCCC AGAGGAGGAC CAGGAGCTGC TGCAGGAAGC GGGCCTGGCG 1080
 TTGATCCCCG ATAAGCCTGC CACTCAGTGT ATTTAGACG GCAAGTTAAA TGAGGGCCAC 1140
 ACATTGGACA TGGATCTTGT TTTTCTCTTT GACAACAGTA AAATCACCTA TGAGACTCAG 1200
 ATCTCCCCAC GGCCCCAACC TGAAAGTGTG AGCTGTATCC TTCAAGAGCC CAAGAGGAAT 1260
 CTCGCTTCT TCCAGCTGAG GAAGGTGTGG GGCCAGGTCT GGCACAGCAT CCAGACCCTG 1320
 AAGGAAGATT GCAACCGGCT GCAGCAGGGA CAGCGAGCCG CCATGATGAA TCTCCTCCGA 1380
 AACAACAGCT GCCTCTCCAA AATGAAGAAT TCCATGGCTT CCATGTCTCA GCAGCTCAAG 1440
 GCCAAGTTGG ATTTCTTCAA AACCAGCATC CAGATTGACC TGGAGAAGTA CAGCGAGCAA 1500
 ACCGAGTTTG GGATCACATC AGATAAACTG CTGCTGGCCT GGAGGGAAAT GGAGCAGGCT 1560
 GTGGAGCTCT GTGGGCGGGA GAACGAAGTG AAACCTCTGG TAGAACGGAT GATGGCTCTG 1620
 CAGACCGACA TTGTGGACTT ACAGAGGAGC CCCATGGGCC GGAAGCAGGG GGAACGCTG 1680
 GACGACCTAG AGGAGCAAGC AAGGGAGCTG TACAGGAGAC TAAGGGAAAA ACCTCGAGAC 1740
 CAGCGAACTG AGGGTGACAG TCAGGAAATG GTACGGCTGC TGCTTCAGGC AATTGAGAGC 1800
 TTCGAGAAGA AAGTCCGAGT GATCTATACG CAGCTCAGTA AAACGTGGT TTGCAAGCAG 1860
 AAGGCGCTGG AACTGTTGCC CAAGGTGGAA GAGGTGGTGA GCTTAATGAA TGAGGATGAG 1920
 AAGACTGTTG TCCGGCTGCA GGAGAAGCGG CAGAAGGAGC TCTGGAATCT CCTGAAGATT 1980
 GCTTGTAGCA AGGTCCGTGG TCCTGTCAGT GGAAGCCCGG ATAGCATGAA TGCCTCTCGA 2040
 CTTAGCCAGC CTGGGCAGCT GATGTCTCAG CCCTCCACGG CCTCCAACAG CTTACCTGAG 2100
 CCAGCCAAGA AGAGTGAAGA ACTGGTGGCT GAAGCACATA ACCTCTGCAC CCTGCTAGAA 2160
 AATGCCATAC AGGACACTGT GAGGGAACAA GACCAGAGTT TCACGGCCCT AGACTGGAGC 2220
 TGGTTACAGA CGGAAGAAGA AGAGCACAGC TGCCTGGAGC AGGCCTCA 2268

- (2) 配列番号 : 2
 (i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ: 756 アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子型: ペプチド

(xi) 配列:

Met	Ser	Trp	Ser	Pro	Ser	Leu	Thr	Thr	Gln	Thr	Cys	Gly	Ala	Trp	Glu	
1				5					10					15		
Met	Lys	Glu	Arg	Leu	Gly	Thr	Gly	Gly	Phe	Gly	Asn	Val	Ile	Arg	Trp	
			20					25					30			
His	Asn	Gln	Glu	Thr	Gly	Glu	Gln	Ile	Ala	Ile	Lys	Gln	Cys	Arg	Gln	10
		35					40					45				
Glu	Leu	Ser	Pro	Arg	Asn	Arg	Glu	Arg	Trp	Cys	Leu	Glu	Ile	Gln	Ile	
	50					55				60						
Met	Arg	Arg	Leu	Thr	His	Pro	Asn	Val	Val	Ala	Ala	Arg	Asp	Val	Pro	
65					70				75					80		
Glu	Gly	Met	Gln	Asn	Leu	Ala	Pro	Asn	Asp	Leu	Pro	Leu	Leu	Ala	Met	
			85					90				95				
Glu	Tyr	Cys	Gln	Gly	Gly	Asp	Leu	Arg	Lys	Tyr	Leu	Asn	Gln	Phe	Glu	
		100					105				110					
Asn	Cys	Cys	Gly	Leu	Arg	Glu	Gly	Ala	Ile	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Asp	20
		115					120				125					
Ile	Ala	Ser	Ala	Leu	Arg	Tyr	Leu	His	Glu	Asn	Arg	Ile	Ile	His	Arg	
	130				135				140							
Asp	Leu	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Val	Leu	Gln	Gln	Gly	Glu	Gln	Arg	Leu	
145				150				155				160				
Ile	His	Lys	Ile	Ile	Asp	Leu	Gly	Tyr	Ala	Lys	Glu	Leu	Asp	Gln	Gly	
		165					170				175					
Ser	Leu	Cys	Thr	Ser	Phe	Val	Gly	Thr	Leu	Gln	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	
	180						185				190					
Leu	Leu	Glu	Gln	Gln	Lys	Tyr	Thr	Val	Thr	Val	Asp	Tyr	Trp	Ser	Phe	30
	195					200					205					
Gly	Thr	Leu	Ala	Phe	Glu	Cys	Ile	Thr	Gly	Phe	Arg	Pro	Phe	Leu	Pro	
	210					215				220						
Asn	Trp	Gln	Pro	Val	Gln	Trp	His	Ser	Lys	Val	Arg	Gln	Lys	Ser	Glu	

40

610 615 620
 Leu Leu Pro Lys Val Glu Glu Val Val Ser Leu Met Asn Glu Asp Glu
 625 630 635 640
 Lys Thr Val Val Arg Leu Gln Glu Lys Arg Gln Lys Glu Leu Trp Asn
 645 650 655
 Leu Leu Lys Ile Ala Cys Ser Lys Val Arg Gly Pro Val Ser Gly Ser
 660 665 670
 Pro Asp Ser Met Asn Ala Ser Arg Leu Ser Gln Pro Gly Gln Leu Met
 675 680 685
 Ser Gln Pro Ser Thr Ala Ser Asn Ser Leu Pro Glu Pro Ala Lys Lys
 690 695 700
 Ser Glu Glu Leu Val Ala Glu Ala His Asn Leu Cys Thr Leu Leu Glu
 705 710 715 720
 Asn Ala Ile Gln Asp Thr Val Arg Glu Gln Asp Gln Ser Phe Thr Ala
 725 730 735
 Leu Asp Trp Ser Trp Leu Gln Thr Glu Glu Glu Glu His Ser Cys Leu
 740 745 750
 Glu Gln Ala Ser
 755

10

(2) 配列番号:3

20

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ:2238塩基対

(B) 配列の型:核酸

(C) 鎖の数:二本鎖

(D) トポロジー:直鎖状

(ii) 分子型:cDNA

(xi) 配列:

ATGGAGCGGC CCCCAGGGCT GCGGCCGGGC GCGGGCGGGC CCTGGGAGAT GCGGGAGCGG	60	
CTGGGCACCG GCGGCTTCGG GAACGTCTGT CTGTACCAGC ATCGGGAAC TGTATCTCAA	120	
ATAGCAATTA AGTCTTGTCT CCTAGAGCTA AGTACCAAAA ACAGAGAACG ATGGTGCCAT	180	
GAAATCCAGA TTATGAAGAA GTTGAACCAT GCCAATGTTG TAAAGGCCTG TGTATCTCCT	240	
GAAGAATTGA ATATTTTGAT TCATGATGTG CCTCTTCTAG CAATGGAATA CTGTTCTGGA	300	
GGAGATCTCC GAAAGCTGCT CAACAAACCA GAAAATTGTT GTGGACTTAA AGAAAGCCAG	360	
ATACTTTCTT TACTAAGTGA TATAGGGTCT GGGATTCTGAT ATTTGCATGA AAACAAAATT	420	
ATACATCGAG ATCTAAAACC TGAACACATA GTTCTTCAGG ATGTTGGTGG AAAGATAATA	480	
CATAAAATAA TTGATCTGGG ATATGCCAAA GATGTTGATC AAGGAAGTCT GTGTACATCT	540	
TTTGTGGGAA CACTGCAGTA TCTGGCCCCA GAGCTCTTTG AGAATAAGCC TTACACAGCC	600	10
ACTGTTGATT ATTGGAGCTT TGGGACCATG GTATTGTAAT GTATTGCTGG ATATAGGCCCT	660	
TTTTTGCATC ATCTGCAGCC ATTTACCTGG CATGAGAAGA TTAAGAAGAA GGATCCAAAG	720	
TGTATATTTG CATGTGAAGA GATGTCAGGA GAAGTTCGGT TTAGTAGCCA TTTACCTCAA	780	
CCAAATAGCC TTTGTAGTTT AATAGTAGAA CCCATGGAAA ACTGGCTACA GTTGATGTTG	840	
AATTGGGACC CTCAGCAGAG AGGAGGACCT GTTGACCTTA CTTTGAAGCA GCCAAGATGT	900	
TTTGTATTAA TGGATCACAT TTTGAATTG AAGATAGTAC ACATCCTAAA TATGACTTCT	960	
GCAAAGATAA TTTCTTTTCT GTTACCACCT GATGAAAGTC TTCATTCACT ACAGTCTCGT	1020	
ATTGAGCGTG AAAGTGAAT AAATACTGGT TCTCAAGAAC TTCTTTCAGA GACAGGAATT	1080	
TCTCTGGATC CTCGGAAACC AGCCTCTCAA TGTGTTCTAG ATGGACTTAG AGGCTGTGAT	1140	
AGCTATATGG TTTATTTGTT TGATAAAAGT AAAACTGTAT ATGAAGGGCC ATTTGCTTCC	1200	20
AGAAGTTTAT CTGATTGTGT AAATTATATT GTACAGGACA GCAAATACA GCTTCCAATT	1260	
ATACAGCTGC GTAAAGTGTG GGCTGAAGCA GTGCACTATG TGTCTGGACT AAAAGAAGAC	1320	
TATAGCAGGC TCTTTCAGGG ACAAAGGCCA GCAATGTAA GTCTTCTTAG ATATAATGCT	1380	
AACTTAACAA AAATGAAGAA CACTTTGATC TCAGCATCAC ACAAAGTAA AGCTAAATTG	1440	
GAGTTTTTTC ACAAAGCAT TCAGCTTGAC TTGGAGAGAT ACAGCGAGCA GATGACGTAT	1500	
GGGATATCTT CAGAAAAAAT GCTAAAAGCA TGGAAAGAAA TGGAAAGAAA GGCCATCCAC	1560	
TATGCTGAGG TTGGTGTCTG TGGATACCTG GAGGATCAGA TTATGTCTTT GCATGCTGAA	1620	
ATCATGGAGC TACAGAAGAG CCCCTATGGA AGACGTCAGG GAGACTTGAT GGAATCTCTG	1680	
GAACAGCGTG CCATTGATCT ATATAAGCAG TTAACACACA GACCTTCAGA TCACTCCTAC	1740	
AGTGACAGCA CAGAGATGGT GAAATCATT GTGCACACTG TGCAGAGTCA GGACCGTGTG	1800	30
CTCAAGGAGC TGTTTGGTCA TTTGAGCAAG TTGTTGGGCT GTAAGCAGAA GATTATTGAT	1860	
CTACTCCCTA AGGTGGAAGT GGGCCTCAGT AATATCAAAG AAGCTGACAA TACTGTCATG	1920	
TTCATGCAGG GAAAAAGGCA GAAAGAAATA TGGCATCTCC TTAATAATTGC CTGTACACAG	1980	
AGTTCTGCCC GGTCCCTTGT AGGATCCAGT CTAGAAGGTG CAGTAACCCC TCAGACATCA	2040	
GCATGGCTGC CCCCAGCTTC AGCAGAACAT GATCATTCTC TGTCATGTGT GGTAACCTCT	2100	
CAAGATGGGG AGACTTCAGC ACAAATGATA GAAGAAAATT TGAAGTGCCT TGGCCATTTA	2160	
AGCACTATTA TTCATGAGGC AAATGAGGAA CAGGGCAATA GTATGATGAA TCTTGATTGG	2220	
AGTTGGTTAA CAGAATGA	2238	

(2) 配列番号 : 4

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 745 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子型 : ペプチド

(xi) 配列 :

Met Glu Arg Pro Pro Gly Leu Arg Pro Gly Ala Gly Gly Pro Trp Glu
1 5 10 15
Met Arg Glu Arg Leu Gly Thr Gly Gly Phe Gly Asn Val Cys Leu Tyr
20 25 30
Gln His Arg Glu Leu Asp Leu Lys Ile Ala Ile Lys Ser Cys Arg Leu
35 40 45
Glu Leu Ser Thr Lys Asn Arg Glu Arg Trp Cys His Glu Ile Gln Ile
50 55 60
Met Lys Lys Leu Asn His Ala Asn Val Val Lys Ala Cys Asp Val Pro
65 70 75 80
Glu Glu Leu Asn Ile Leu Ile His Asp Val Pro Leu Leu Ala Met Glu

	85		90		95
Tyr Cys Ser Gly Gly Asp Leu Arg Lys Leu Leu Asn Lys Pro Glu Asn					
	100		105		110
Cys Cys Gly Leu Lys Glu Ser Gln Ile Leu Ser Leu Leu Ser Asp Ile					
	115		120		125
Gly Ser Gly Ile Arg Tyr Leu His Glu Asn Lys Ile Ile His Arg Asp					
	130		135		140
Leu Lys Pro Glu Asn Ile Val Leu Gln Asp Val Gly Gly Lys Ile Ile					
	145		150		155
His Lys Ile Ile Asp Leu Gly Tyr Ala Lys Asp Val Asp Gln Gly Ser					
	165		170		175
Leu Cys Thr Ser Phe Val Gly Thr Leu Gln Tyr Leu Ala Pro Glu Leu					
	180		185		190
Phe Glu Asn Lys Pro Tyr Thr Ala Thr Val Asp Tyr Trp Ser Phe Gly					
	195		200		205
Thr Met Val Phe Glu Cys Ile Ala Gly Tyr Arg Pro Phe Leu His His					
	210		215		220
Leu Gln Pro Phe Thr Trp His Glu Lys Ile Lys Lys Lys Asp Pro Lys					
	225		230		235
Cys Ile Phe Ala Cys Glu Glu Met Ser Gly Glu Val Arg Phe Ser Ser					
	245		250		255
His Leu Pro Gln Pro Asn Ser Leu Cys Ser Leu Ile Val Glu Pro Met					
	260		265		270
Glu Asn Trp Leu Gln Leu Met Leu Asn Trp Asp Pro Gln Gln Arg Gly					
	275		280		285
Gly Pro Val Asp Leu Thr Leu Lys Gln Pro Arg Cys Phe Val Leu Met					
	290		295		300
Asp His Ile Leu Asn Leu Lys Ile Val His Ile Leu Asn Met Thr Ser					
	305		310		315
Ala Lys Ile Ile Ser Phe Leu Leu Pro Pro Asp Glu Ser Leu His Ser					
	325		330		335
Leu Gln Ser Arg Ile Glu Arg Glu Thr Gly Ile Asn Thr Gly Ser Gln					
	340		345		350
Glu Leu Leu Ser Glu Thr Gly Ile Ser Leu Asp Pro Arg Lys Pro Ala					
	355		360		365
Ser Gln Cys Val Leu Asp Gly Val Arg Gly Cys Asp Ser Tyr Met Val					
	370		375		380
Tyr Leu Phe Asp Lys Ser Lys Thr Val Tyr Glu Gly Pro Phe Ala Ser					
	385		390		395
Arg Ser Leu Ser Asp Cys Val Asn Tyr Ile Val Gln Asp Ser Lys Ile					
	405		410		415
Gln Leu Pro Ile Ile Gln Leu Arg Lys Val Trp Ala Glu Ala Val His					
	420		425		430
Tyr Val Ser Gly Leu Lys Glu Asp Tyr Ser Arg Leu Phe Gln Gly Gln					
	435		440		445
Arg Ala Ala Met Leu Ser Leu Leu Arg Tyr Asn Ala Asn Leu Thr Lys					
	450		455		460
Met Lys Asn Thr Leu Ile Ser Ala Ser Gln Gln Leu Lys Ala Lys Leu					

10

20

30

40

465	470	475	480	
Glu Phe Phe His Lys Ser Ile Gln Leu Asp Leu Glu Arg Tyr Ser Glu				
	485	490	495	
Gln Met Thr Tyr Gly Ile Ser Ser Glu Lys Met Leu Lys Ala Trp Lys				
	500	505	510	
Glu Met Glu Glu Lys Ala Ile His Tyr Ala Glu Val Gly Val Ile Gly				
	515	520	525	
Tyr Leu Glu Asp Gln Ile Met Ser Leu His Ala Glu Ile Met Glu Leu				
	530	535	540	
Gln Lys Ser Pro Tyr Gly Arg Arg Gln Gly Asp Leu Met Glu Ser Leu				10
545	550	555	560	
Glu Gln Arg Ala Ile Asp Leu Tyr Lys Gln Leu Lys His Arg Pro Ser				
	565	570	575	
Asp His Ser Tyr Ser Asp Ser Thr Glu Met Val Lys Ile Ile Val His				
	580	585	590	
Thr Val Gln Ser Gln Asp Arg Val Leu Lys Glu Leu Phe Gly His Leu				
	595	600	605	
Ser Lys Leu Leu Gly Cys Lys Gln Lys Ile Ile Asp Leu Leu Pro Lys				
	610	615	620	
Val Glu Val Ala Leu Ser Asn Ile Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Met				20
625	630	635	640	
Phe Met Gln Gly Lys Arg Gln Lys Glu Ile Trp His Leu Leu Lys Ile				
	645	650	655	
Ala Cys Thr Gln Ser Ser Ala Arg Ser Leu Val Gly Ser Ser Leu Glu				
	660	665	670	
Gly Ala Val Thr Pro Gln Thr Ser Ala Trp Leu Pro Pro Thr Ser Ala				
	675	680	685	
Glu His Asp His Ser Leu Ser Cys Val Val Thr Pro Gln Asp Gly Glu				
	690	695	700	
Thr Ser Ala Gln Met Ile Glu Glu Asn Leu Asn Cys Leu Gly His Leu				
705	710	715	720	30
Ser Thr Ile Ile His Glu Ala Asn Glu Glu Gln Gly Asn Ser Met Met				
	725	730	735	
Asn Leu Asp Trp Ser Trp Leu Thr Glu				
	740	745		

(2) 配列番号:5

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ:2146塩基対

(B) 配列の型:核酸

(C) 鎖の数:二本鎖

(D) トポロジー:直鎖状

(ii) 分子型:cDNA

(xi) 配列:

GTACCAGCAT	CGGGAACCTG	ATCTCAAAAT	AGCAATTAAG	TCTTGTCGCC	TAGAGCTAAG	60
TACCAAAAAC	AGAGAACGAT	GGTGCCATGA	AATCCAGATT	ATGAAGAAGT	TGAACCATGC	120
CAATGTTGTA	AAGGCCTGTG	ATGTTCTCTGA	AGAATTGAAT	ATTTTGATTG	ATGATGTGCC	180
TCTTCTAGCA	ATGGAATACT	GTTCTGGAGG	AGATCTCCGA	AAGCTGCTCA	ACAAACCAGA	240
AAATTGTTGT	GGACTTAAAG	AAAGCCAGAT	ACTTTCTTTA	CTAAGTGATA	TAGGGTCTGG	300
GATTCGATAT	TTGCATGAAA	ACAAAATTAT	ACATCGAGAT	CTAAAACCTG	AAAACATAGT	360
TCTTCAGGAT	GTTGGTGGAA	AGATAATACA	TAAAATAATT	GATCTGGGAT	ATGCCAAAGA	420
TGTTGATCAA	GGAAGTCTGT	GTACATCTTT	TGTGGGAACA	CTGCAGTATC	TGGCCCCAGA	480
GCTCTTTGAG	AATAAGCCTT	ACACAGCCAC	TGTTGATTAT	TGGAGCTTTG	GGACCATGGT	540
ATTTGAATGT	ATTGCTGGAT	ATAGGCCTTT	TTTGCATCAT	CTGCAGCCAT	TTACCTGGCA	600
TGAGAAGATT	AAGAAGAAGG	ATCCAAAGTG	TATATTTGCA	TGTGAAGAGA	TGTCAGGAGA	660
AGTTCGGTTT	AGTAGCCATT	TACCTCAACC	AAATAGCCTT	TGTAGTTTAA	TAGTAGAACC	720
CATGGAAAAC	TGGCTACAGT	TGATGTTGAA	TTGGGACCCT	CAGCAGAGAG	GAGGACCTGT	780
TGACCTTACT	TTGAAGCAGC	CAAGATGTTT	TGTATTAATG	GATCACATTT	TGAATTTGAA	840
GATAGTACAC	ATCCTAAATA	TGACTTCTGC	AAAGATAATT	TCTTTTCTGT	TACCACCTGA	900
TGAAAGTCTT	CATTCACTAC	AGTCTCGTAT	TGAGCGTGAA	ACTGGAATAA	ATACTGGTTC	960
TCAAGAACTT	CTTTCAGAGA	CAGGAATTTT	TCTGGATCCT	CGGAAACCAG	CCTCTCAATG	1020
TGTTCTAGAT	GGAGTTAGAG	GCTGTGATAG	CTATATGGTT	TATTTGTTTG	ATAAAAAGTAA	1080
AACTGTATAT	GAAGGGCCAT	TTGCTTCCAG	AAGTTTATCT	GATTGTGTAA	ATTATATTGT	1140
ACAGGACAGC	AAAATACAGC	TTCCAATTAT	ACAGCTGCGT	AAAGTGTGGG	CTGAAGCAGT	1200
GCACTATGTG	TCTGGACTAA	AAGAAGACTA	TAGCAGGCTC	TTTCAGGGAC	AAAGGGCAGC	1260
AATGTTAAGT	CTTCTTAGAT	ATAATGCTAA	CTTAACAAAA	ATGAAGAACA	CTTTGATCTC	1320
AGCATCACAA	CAACTGAAAG	CTAAATTGGA	GTTTTTTCAC	AAAAGCATTG	AGCTTGACTT	1380
GGAGAGATAC	AGCGAGCAGA	TGACGTATGG	GATATCTTCA	GAAAAAATGC	TAAAAGCATG	1440
GAAAGAAATG	GAAGAAAAGG	CCATCCACTA	TGCTGAGGTT	GGTGTCAATTG	GATACCTGGA	1500
GGATCAGATT	ATGTCTTTGC	ATGCTGAAAT	CATGGAGCTA	CAGAAGAGCC	CCTATGGAAG	1560
ACGTCAGGGA	GACTTGATGG	AATCTCTGGA	ACAGCGTGCC	ATTGATCTAT	ATAAGCAGTT	1620
AAAACACAGA	CCTTCAGATC	ACTCCTACAG	TGACAGCACA	GAGATGGTGA	AAATCATTGT	1680
GCACACTGTG	CAGAGTCAGG	ACCGTGTGCT	CAAGGAGCGT	TTTGGTCATT	TGAGCAAGTT	1740
GTTGGGCTGT	AAGCAGAAGA	TTATTGATCT	ACTCCCTAAG	GTGGAAGTGG	CCCTCAGTAA	1800
TATCAAAGAA	GCTGACAATA	CTGTCATGTT	CATGCAGGGA	AAAAGGCAGA	AAGAAATATG	1860
GCATCTCCTT	AAAATTGCCT	GTACACAGAG	TTCTGCCCCG	TCTCTTGTAG	GATCCAGTCT	1920
AGAAGGTGCA	GTAACCCCTC	AAGCATACGC	ATGGCTGGCC	CCCGACTTAG	CAGAACATGA	1980
TCATTCTCTG	TCATGTGTGG	TAACCTCTCA	AGATGGGGAG	ACTTCAGCAC	AAATGATAGA	2040
AGAAAATTTG	AACTGCCTTG	GCCATTTAAG	CACTATTATT	CATGAGGCAA	ATGAGGAACA	2100
GGGCAATAGT	ATGATGAATC	TTGATTGGAG	TTGGTTAACA	GAATGA		2146

10

20

30

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I
G 0 1 N 33/566 G 0 1 N 33/566

(72)発明者 カオ, ジャオダン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, コーポレイト ドラ
イブ 2, トゥラリック インコーポレイテッド内
(72)発明者 レニエ, キャサリン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, コーポレイト ドラ
イブ 2, トゥラリック インコーポレイテッド内

審査官 七條 里美

(56)参考文献 Cellular and Molecular Biology Research, 1995, Vol. 41, No. 6, p. 537-549
Cellular and Molecular Biology Research, 1995, Vol. 41, No. 6, p. 537-549

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B 名)

C12N 15/12
C12N 15/54
C12N 9/12
C12Q 1/02
C12Q 1/48
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/WPI (DIALOG)
PubMed