

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-502217

(P2013-502217A)

(43) 公表日 平成25年1月24日(2013.1.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-525639 (P2012-525639)	(71) 出願人	507290294
(86) (22) 出願日	平成22年8月17日 (2010. 8. 17)		ノックス テクノロジーズ インコーポレ
(85) 翻訳文提出日	平成24年3月23日 (2012. 3. 23)		イテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/045745		アメリカ合衆国, ペンシルベニア州,
(87) 国際公開番号	W02011/022387		モルバーン, レイナード ロード 5
(87) 国際公開日	平成23年2月24日 (2011. 2. 24)	(74) 代理人	100107456
(31) 優先権主張番号	61/234, 368		弁理士 池田 成人
(32) 優先日	平成21年8月17日 (2009. 8. 17)	(74) 代理人	100148596
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 和弘
		(74) 代理人	100123995
			弁理士 野田 雅一
		(72) 発明者	モレ, ディー, ジェイムズ
			アメリカ合衆国, インディアナ州, ウ
			エスト ラフェイエット, チェリー レ
			ーン 1 1 1 2
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 a r N O X タンパク質9回膜貫通型スーパーファミリー (TM9 S F) のクローニング及び発現、方法並びに利用

(57) 【要約】

加齢関連障害についての細胞表面及び循環マーカー (N A D H 酸化酵素の特定のアイソフォーム (a r N O X)) が記載される。組換え加齢関連 N A D H 酸化酵素アイソフォーム及びそれらのコード配列、並びに組織及び血液、血清、尿、唾液、汗及びその他の体液中の a r N O X アイソフォームの存在及び量を検出する方法が提供される。組換え a r N O X タンパク質は、モノクローナル及びポリクローナル抗体並びに加齢障害の診断及び治療用の免疫原性組成物の作製で使用するための抗原の調製において有用である。D N A 配列情報に基づく D N A プローブは、加齢障害の危険性がある個体を同定するため、及び治療的介入又は老化防止化粧品若しくは哺乳動物における加齢プロセスを遅らせることに利益をもたらすその他の製剤を開発するために用いることができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

可溶性加齢関連 N A D H 酸化酵素 (a r N O X) ポリペプチド又はその酵素活性断片をコードする部分を含む非天然組換え D N A 分子であって、前記部分が、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16 及び配列番号 17 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列、又は前記配列の 1 つとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含み、ハイブリダイズする前記配列が、a r N O X ファミリーのアイソフォームの加齢関連マーカータンパク質をコードする非天然組換え D N A 分子。

10

【請求項 2】

請求項 1 の組換え D N A 分子を含有するように形質転換又はトランスフェクションされた単離宿主細胞。

【請求項 3】

細菌細胞である、請求項 2 に記載の単離宿主細胞。

【請求項 4】

前記細菌細胞が、エシェリキア・コリ細胞である、請求項 3 に記載の単離宿主細胞。

【請求項 5】

真核細胞である、請求項 2 に記載の単離宿主細胞。

【請求項 6】

哺乳類細胞である、請求項 2 に記載の単離宿主細胞。

20

【請求項 7】

C O S 細胞である、請求項 6 に記載の単離宿主細胞。

【請求項 8】

酵母細胞である、請求項 5 に記載の単離宿主細胞。

【請求項 9】

宿主細胞で a r N O X 活性タンパク質又はポリペプチドを組換え生成する方法であって、

a . 前記宿主細胞において活性なプロモーターと、前記 a r N O X ポリペプチドのコード領域とを含むベクターに単離宿主細胞を感染させるか又は該ベクターで該宿主細胞を形質転換して、組換え宿主細胞を生成するステップであって、前記 a r N O X タンパク質又はポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16 又は配列番号 17 のアミノ酸配列により同定される 9 回膜貫通型スーパーファミリーメンバー 1 a、1 b、2、3 及び 4 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、前記プロモーターが、前記コード領域と作動可能に連結されているステップと、

30

b . 組換え宿主細胞を、前記 a r N O X タンパク質又はポリペプチドが発現される条件下で培養するステップとを含む方法。

【請求項 10】

40

哺乳動物における加齢の状態及び a r N O X アイソフォーム組成を決定する方法であって、

a . 生体試料を準備するステップと、

b . ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション又はプライマーと鋳型との完全な一致が必要とされるポリメラーゼ連鎖反応を用いて行われる、加齢と関連する 1 又は複数の a r N O X タンパク質をコードするリボ核酸分子の生体試料中での存在を検出するステップであって、ハイブリダイゼーションプローブ又はプライマーが、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7 及び配列番号 9 に示すヌクレオチド配列の少なくとも 15 連続ヌクレオチドから本質的になるステップと

を含み、

50

生体試料中のリボ核酸分子の存在が、a r N O X 発現を示す方法。

【請求項 1 1】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16 若しくは配列番号 17、又は配列番号 2 のアミノ酸 56 ~ 87、配列番号 2 のアミノ酸 548 ~ 568、配列番号 6 のアミノ酸 73 ~ 104、配列番号 8 のアミノ酸 55 ~ 88、配列番号 10 のアミノ酸 53 ~ 84 に示すアミノ酸配列を特徴とするタンパク質からなる群より選択される抗原と特異的に結合する抗体調製物。

【請求項 1 2】

哺乳動物における a r N O X アイソフォーム組成を決定する方法であって、
a . 哺乳動物からの生体試料を準備するステップと、
b . ステップ a) の生体試料を、少なくとも 1 つの a r N O X タンパク質に特異的な検出可能な抗体と、抗体と a r N O X タンパク質との結合を可能にする条件下で接触させるステップと、
c . 加齢関連障害と関連する少なくとも 1 つの a r N O X アイソフォームの生体試料中の存在を、a r N O X タンパク質に特異的な検出可能な抗体が結合した場合に検出するステップと
を含む方法。

10

【請求項 1 3】

哺乳動物における加齢関連障害の改善に効果的な免疫原性組成物であって、
配列番号 2、4、6、8、10、13、14、15、16 若しくは 17 に示す少なくとも 1 つの a r N O X タンパク質又はポリペプチド、或いは
配列番号 2 のアミノ酸 548 ~ 568、配列番号 2 のアミノ酸 56 ~ 87、配列番号 6 のアミノ酸 73 ~ 104、配列番号 8 のアミノ酸 55 ~ 88 若しくは配列番号 10 のアミノ酸 53 ~ 84 に示すアミノ酸配列を有するペプチド
を含む組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[関連出願の相互参照]

30

[0001]本出願は、本開示と矛盾しない範囲で本明細書に参照により組み込まれている、2009年8月17日にファイルされた米国特許仮出願第 61 / 234 , 368 号の利益を主張する。

【0002】

[背景]

[0002]本開示は、分子生物学及び生化学の分野に関し、特に N A D H 酸化酵素の加齢特異的アイソフォーム (a r N O X) による酸化ダメージを原因とする障害の予防又は治療に関し、加齢関連障害についての循環マーカー、その組み換え発現及び発現又は阻害剤についてのスクリーニングアッセイにも関する。

【0003】

40

[0003]細胞膜電子伝達の末端酸化酵素として機能して、細胞質ヒドロキノン還元酵素、細胞膜局在キノン及び N O X タンパク質を伴う電子伝達鎖を完了する、ヒドロキノン (N A D H) 酸化酵素活性 (N O X という) を有する細胞表面タンパク質が、本発明者らにより明らかにされた (K i s h i ら、1999、Biochem. Biophys. Acta 1412 : 66 ~ 77 及び M o r r e、1998、Plasma Membrane Redox Systems and their Role in Biological Stress and Disease、Klewer Academic Publishers、Dordrecht、The Netherlands、121 ~ 156 頁)。この系は、加齢のミトコンドリア理論の影響の合理的な基礎、並びに、加齢の過程におけるミトコンドリアの A T P 合成能力及びその他のエネルギー依存性プロセス

50

の減退を含む加齢に関連するミトコンドリア損傷の伝搬の合理的な基礎をもたらす (B o f f o l i ら、1996、B i o c h e m . B i o p h y s . A c t a 1226:73 ~ 82 ; L e n a z ら、1998、B i o F a c t o r s 8:195 ~ 204 ; d e G r e y、1997、B i o E s s a y s 19:161 ~ 166 ; 及び d e G r e y、1998、J . A n t i - A g i n g M e d . 1:53 ~ 66)。

【0004】

[0004]細胞膜NADH酸化酵素 (NOX又はENOX) は、ホルモン及び増殖因子に対して通常応答するヒドロキノン (NADH) 酸化酵素活性と、タンパク質ジスルフィド - チオール交換活性とを有するユニークな細胞表面タンパク質である。arNOX (又はENOX3) は、加齢細胞と関連する成長関連タンパク質のファミリーである。

10

【0005】

[0005]NADH酸化酵素の加齢関連アイソフォーム (arNOX) は、ENOXタンパク質のこのファミリーのメンバーである。arNOXの循環型は、特に65歳より後の個体のヒト血清及びリンパ球において著しく増加する。arNOXタンパク質は、アテローム発生及びその他の遠隔作用加齢現象を含む加齢に関連する変化に著しく寄与し得るスーパーオキシドラジカルを作製する能力を独特の特徴とする。加齢細胞及び血清におけるarNOXの活性は、以前に記載されている (M o r r e 及びM o r r e、2006、R e j u v e n a t i o n R e s . 9:231 ~ 236)。

【0006】

[0006]加齢は、フリーラジカルを伴う破壊的化学反应のレベルが増え続けることに起因し、該プロセスの主なメディエーターがミトコンドリアであることが提案されている (H a r m a n、1956、J . G e r o n t o l . 11:298 ~ 300 及びH a r m a n、1972、J . A m . G e r i a t r . S o c . 20:145 ~ 147)。この考えを支持する推論の中心は、全ての細胞内成分のうち、ミトコンドリアが、フリーラジカルの主要な供給源と、フリーラジカルダメージの主要な直接的な犠牲者との両方であるということである。結果として、ミトコンドリア機能の喪失が、加齢の根底にある細胞内変化の駆動力であり、より緩慢なタンパク質代謝回転のようなその他の酸化促進変化の原因になることがある。この理論は、間接的及び直接的な実験により広く支持されている。例えば、加齢の過程におけるATP合成能力の減退及びエネルギー依存性プロセスの減退が報告されている (S y r o v y 及びG u t m a n n、1997、E x p . G e r o n t o l . 12:31 ~ 35 ; S u g i y a m a ら、1993、B i o c h e m . M o l . B i o l . I n t l . 30:937 ~ 944 ; B o f f o l i ら、1996、B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a 1226:73 ~ 82 ; 並びにL e n a z ら、1998、B i o F a c t o r s 8:195 ~ 204)。

20

30

【0007】

[0007]arNOXの効果についてのこのモデルは、加齢の過程において、ミトコンドリアにおける増加した活性酸素種がミトコンドリアDNAに変異を引き起こし、ミトコンドリア成分にダメージを与えて、老齢化をもたらすという加齢のミトコンドリア理論と矛盾しない。加齢のミトコンドリア理論は、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の自発的体細胞変異の蓄積が、mtDNAによりコードされるポリペプチド鎖に誤りを導くと提案している (M a n c z a k M ら、2005、J . N e u r o c h e m . 92(3):494 ~ 504)。mtDNAによりコードされるポリペプチド鎖で生じるこれらの誤りは、確率論的であり、ミトコンドリア及び細胞分裂中に、無作為に伝えられる。これらの変化の結果は、酸化的リン酸化に欠陥をもたらす。呼吸鎖での欠陥は、元のダメージを増幅する酸化ストレスの増加と関連するようになることがある (O z a w a、1995、B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a 1271:177 ~ 189 ; 及びL e n a z、1998、B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a 1366:53 ~ 67)。この観点で、よって、変異ミトコンドリアDNAは、体内に非常に少量でしか存在しなくても、酸化ストレスの主な発生原因になり得る。

40

【0008】

50

[0008] m t D N A の体細胞変異の蓄積が酸化リン酸化の欠陥を導く場合、細胞膜酸化還元酵素 (P M O R) 系が、酸化されたピリジンヌクレオチドの再生により、ミトコンドリアに欠陥がある細胞の生存を増すと示唆されている (de Grey、1997、BioEssays 19:161~166; de Grey、1998、Anti-Aging Med. 1:53~66; Yoneda ら、1995、Biochem. Biophys. Res. Comm. 209:723~729; Schon ら、1996、Cellular Aging and Cell Death、Wiley and Sons、New York、19~34 頁; Ozawa ら、1997、Physiol. Rev. 77:425~464; 及び Lenaz、1998、BioFactors 8:195~204 頁)。しかし、それらの m t D N A の変化は、加齢に関連する他の形態の細胞及び組織の変化と関連しにくい。これらのうちで主要なものは、低密度リポタンパク質 (L D L) 酸化及びアテローム発生である (Steinberg、1997、J. Biol. Chem. 272:20963~20966)。

【0009】

[0009] m t D N A における損傷の蓄積と、低密度リポタンパク質 (L D L) における脂質の酸化及び付随する動脈の変化とを関連づけるモデルが、 ρ^0 細胞を用いて最初に提案された (Larm ら、1994、Biol. Chem. 269:30097~30100; Lawen ら、1994、Mol. Aspects. Med. 15:s13~s27; de Grey、1997、BioEssays 19:161~166; 並びに de Grey、1998、Anti-Aging Med. 1:53~66)。同様の研究が、形質転換された培養ヒト細胞を用いて行われた (Vaillant ら、1996、Bioenerg. Biomemb. 28:531~540)。

【0010】

[0010] 細胞膜酸化還元酵素 (P M O R) が過剰発現される状況の下で、電子は、N A D H から外部アクセプターに、確定された電子伝達鎖により輸送され、細胞表面にて活性酸素種 (R O S) が作製される。このような細胞表面で作製された R O S は、次いで、ミトコンドリアを起源とする加齢カスケードを、隣接細胞と低密度リポタンパク質のような循環血液成分との両方に伝搬することがある (Morre 及び Morre、2006、Rejuvenation Res. 9:231~236)。

【0011】

[0011] 加齢は、ヒトの健康にとって著しい脅威となり、加齢に関連する障害は著しい経済的及び社会的経費をもたらすので、加齢に関連する疾患の状態をアッセイするか又は該状態のモデル阻害剤となる効果的で経済的で技術的に単純な系、加齢に関連する酵素特異的マーカー及び抗体、並びに試薬、阻害剤及び活性化剤スクリーニング方法及び発現系に対する必要性が長く存在している。

【0012】

[概要]

[0012] 組換え膜結合タンパク質又は可溶性タンパク質としての組換え加齢関連 N A D H 酸化酵素のアイソフォーム (本明細書において a r N O X と称する)、それらのコード配列及びこれらの配列を含有してこれらのタンパク質を発現する単離宿主細胞を提供することが目的である。全長配列は、表 1 並びに配列番号 1、3、5、7 及び 9 に示す具体的な例示的ゲノムコード配列を有する。配列表は、対応するスプライシングされたコード配列についての情報を含む。全長タンパク質は、表 2 並びに配列番号 2、4、6、8 及び 10 に示すアミノ酸配列を有する。これらの具体的に例示した配列と同義のコード配列も、この目的に包含される。組換え a r N O X タンパク質のさらなる態様は、表 3 並びに配列番号 13~17 に示すような可溶性 (切断型) a r N O X についてのものである。これらの切断型タンパク質は、膜組み込み領域を規定する C 末端部分を欠く。所望により、組換え a r N O X タンパク質は、「タグ」領域をさらに含んで、タグ配列の発現後の精製を促進でき、タグ配列は当該技術において公知であり、ヘキサヒスチジン、鞭毛抗原 (F l a g)、グルタチオン合成酵素 (G S T)、ビオチン結合タンパク質 (A v i T a g) などを

10

20

30

40

50

含む。

【0013】

[0013]加齢細胞表面マーカーをコードし、該コード配列がストリンジェントな条件下で上記の具体的に例示した全長又は部分配列にハイブリダイズし、a r N O Xの酵素活性を有する配列も包含される。細胞表面a r N O Xは、年齢進行の特徴であり、細胞表面から切り落とされた場合、これは、加齢障害の非侵襲性マーカーとして体液中を循環する。組換えa r N O Xタンパク質、特に全長タンパク質の酵素活性部分は、加齢障害の診断及び治療用のポリクローナル及びモノクローナルの両方の抗体の作製に用いるための抗原の調製において有用である。

【0014】

[0014]哺乳動物において加齢関連a r N O Xを決定するための方法もさらに提供され、該方法は、生体試料中の1又は複数のa r N O Xアイソフォームの存在及び量を、酵素活性の測定、免疫学的検出法による特定のタンパク質の測定、又は関連する遺伝子の転写発現の測定により検出するステップを含む。

【0015】

[0015]本開示により、組換えa r N O Xアイソフォーム若しくは切断型a r N O Xアイソフォームタンパク質、又はa r N O Xアイソフォームアミノ酸配列に由来する配列の抗原性ペプチドを特に用いる抗体調製物の作製が可能になり、該抗体は、配列番号2、4、6、8、10若しくは13~17に示すアミノ酸配列を特徴とするタンパク質又は本明細書に示すペプチド配列からなる群より選択されるタンパク質と特異的に結合する。これらの抗体含有組成物は、患者からの血液、血清、唾液、汗又は組織（生体試料）中の1又は複数のa r N O Xタンパク質を検出して、a r N O X状態及び/又は治療介入に対する応答を確認することにおいて有用である。

【0016】

[0016]少なくとも1つの組換えa r N O Xアイソフォーム若しくは切断型a r N O Xアイソフォームタンパク質、又は表2に示すアミノ酸配列を特徴とするタンパク質からなる群より選択される抗体と特異的に結合するa r N O Xアイソフォームアミノ酸配列に由来する配列の抗原性ペプチドを含む免疫原性組成物。5つのa r N O Xアイソフォームのそれぞれに特異的な抗体を作製するために有用なペプチドは、以下のアミノ酸配列を有する：T M 9 S F 1 a及び/又はT M 9 S F 1 b、Q E T Y H Y Y Q L P V C C P E K I R H K S L S L G E V L D G D R、配列番号2のアミノ酸56~87；T M 9 S F 2、V L P Y E Y T A F D F C Q A S E G K R P S E N L G Q V L F G E R、配列番号6のアミノ酸73~104；T M 9 S F 3、Q E T Y K Y F S L P F C V G S K K S I S H Y H E T L G E A L Q G V E、配列番号8のアミノ酸55~88；並びにT M 9 S F 4、Q L P Y E Y Y S L P F C Q P S K I T Y K A E N L G E V L R G D R、配列番号10のアミノ酸53~84は、上記のような抗体を調製するために有用である。T M 9 S F 1 a（しかしT M 9 S F 1 bではない）の膜結合型に特異的な抗体は、配列番号2のアミノ酸548~568（L Y S V F Y Y A R R S N M S G A V Q T V E）に示す配列を有するペプチド抗原を用いて作製される。ペプチド抗体を有する免疫原性組成物は、典型的に、担体分子と結合したペプチドを含み、担体分子は、当該技術において公知の他のタンパク質のうちでキーホールリンペットヘモシアニンであってもよい。さらに、このような免疫原性組成物は、ヒト又は動物においてa r N O X酵素により行われる酸化反応のあるいくつかの有害な態様の重篤度を低減し、そのことによりそのような免疫原性組成物が投与された個体の健康及び幸福を改善するために用いることができる。

【0017】

[0017]組織並びに尿及び血清、汗、唾液又はその他の体液中のa r N O X及び切り落とされた（可溶性）a r N O Xに特異的な抗体は、DNA発現ライブラリーをスクリーニングするため、又は加齢関連障害若しくはそのような障害についての傾向を、ヒト若しくは動物からの試料中で検出又は診断するためのプローブとして有用である。望ましくは、抗体（又はa r N O Xを認識する抗体に特異的な二次抗体）は、共有結合又は非共有結合に

10

20

30

40

50

より、検出可能なシグナルを提供する物質をつなぐことにより標識される。適切な標識は、それらに限定されないが、放射性核種、酵素、基質、補因子、阻害剤、蛍光物質、化学発光物質、磁性粒子などを含む。このような標識の使用について記載する米国特許は、それらに限定されないが、米国特許第3,817,837号、第3,580,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号及び第4,366,241号を含む。診断及びスクリーニングアッセイに有用な抗体は、上記の全長タンパク質又は表2若しくは3に示すもののうちのアミノ酸配列に相当するタンパク質の全部又は一部に由来する配列のペプチド抗原を用いて調製できる。

【0018】

[0018] a r N O X タンパク質若しくは本明細書で上記のペプチドのようなその抗原性部分を含む免疫原性組成物及び／又はワクチンは、当該技術において知られる任意の手段により処方して投与できる。これらは、典型的には、溶液又は懸濁液のいずれかとしての注射剤として調製される。注射前に液体中に溶解又は懸濁するために適切な固体形態も調製できる。調製物は、例えば乳化してもよいが、又はリボソームに被包されたタンパク質（複数可）／ペプチド（複数可）であってもよい。有利には、このような免疫原性組成物は、免疫応答を刺激する少なくとも1つの成分、例えばアジュバントを含む。免疫原性組成物の投与は、ヒト若しくは実験動物において皮下、皮内、腹腔内、静脈内、筋内経路、又は実験動物の肉趾内へ、又は当該技術において知られるその他の経路によることができる。

【0019】

[0019] ノーザンブロット分析を用いて、a r N O X のコード配列（複数可）が、加齢障害の危険性がある個体において発現されていることを示すことができる。配列（複数可）を用いることができるので、発現の特異性の迅速なさらなる試験及び治療介入又は加齢化粧品若しくはその他の製剤のさらなる開発が可能になる。

【0020】

[0020] ヒト a r N O X、組換えヒト a r N O X タンパク質をコードするヌクレオチド配列、及び組換えヒト a r N O X を発現する組換え細胞は、加齢診断プロトコル、並びに新しい抗加齢薬物及び／又は栄養補助剤、薬用化粧品、薬用栄養素及び加齢防止又は遅延方策を同定するためのスクリーニングアッセイにおいて用いるための、組換え a r N O X タンパク質（複数可）又はその一部分の生成において用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】 [0021] T M - 9 タンパク質スーパーファミリーメンバーの膜結合の図である。N末端可溶性断片は、切断部位にてタンパク質切断され、細胞の外部環境又は細胞内小胞の内腔に放出される。

【図2】 [0022] アイソフォーム S F 2 の機能的 a r N O X モチーフとその位置を示す。可溶性酵素のアミノ酸配列について、配列番号6を参照されたい。

【図3】 [0023] フェリシトクロム c の低減により測定されるスーパーオキシドの産生だけを示す組換え可溶性 a r N O X アイソフォーム S F - 4 の a r N O X 活性を示す。最大値は、26分の間隔で離れている。

【図4】 [0024] 一般的な E N O X タンパク質に特徴的な、典型的な5ピークパターンの活性を示す組換え可溶性 a r N O X アイソフォーム S F - 4 の a r N O X 活性を示す。比活性の単位は、 μ モル／分／mgタンパク質であることに注意されたい。スーパーオキシド産生は、5最大値振動パターンのうちの最大値3で強くなる。

【図5】 [0025] 28歳の女性からのリンパ球における、8でのインキュベーションの第2日と第5及び6日での a r N O X 活性の誘導を示す。この期間内の5つ全ての a r N O X アイソフォームの際立った誘導に注意されたい。

【図6】 [0026] a r N O X 活性（上のパネル）及び a r N O X メッセンジャー R N A （下のパネル）の誘導の時間経過を示す。後者は、22歳及び73歳の個体からのリンパ球

10

20

30

40

50

を用いて得られた結果を比較する。

【図 7】[0027] 血清へのペプチド抗体の逐次的添加により得られた結果を示し、これは、特異的アイソフォーム S F 1 ~ S F 4 を用いて採血前に存在する特定の最大値の関連性の同定を示す。S F - 4 特異的抗体を加えた後に、a r N O X 活性が残存する証拠は観察されなかった。T M 9 S F 3 に特異的な抗体を加えた後に、1つのアイソフォームだけが残った。T M 9 S F 2 特異的抗体を加えた後に、2つのアイソフォームが残った、などである。

【図 8】[0028] a r N O X 特異的ペプチドを抗原として用いて調製された a r N O X 特異的抗体を用いる、皮膚、唾液及び血清中の E L I S A による a r N O X 検出及び相対的な量を示す。

【図 9】[0029] a r N O X 特異的抗体調製物を用いる E L I S A を用いて評価された、老齢の人及び若い人からの材料における a r N O X の相対的な量を示す。図 9 A は、皮膚切屑物における a r N O X についての結果を示し、図 9 B は、3 の異なる年齢の 4 名の個体から採取した血清試料中の相対的な量を示し、図 9 C は、老齢及び若い個体からの唾液試料における、全ての a r N O X アイソフォームに特異的な抗体の組み合わせを用いて行った E L I S A からの結果を示す。

【 0 0 2 2 】

[詳細な説明]

[0030] 本明細書で用いる場合、「障害」との用語は、不具合、疾患、病気、臨床状態又は病的状態のことをいう。

【 0 0 2 3 】

[0031] 本明細書で用いる場合、「活性酸素種」との用語は、フリーラジカル（例えばスーパーオキシド又はヒドロキシルラジカル）の形成をもたらす酸素の代謝又は自由電子の移動からの酸素誘導体のことをいう。

【 0 0 2 4 】

[0032] 本明細書で用いる場合、「抗酸化剤」との用語は、活性酸素種の活性を中和するか又は該活性種により行われた細胞へのダメージを阻害する化合物のことをいう。

【 0 0 2 5 】

[0033] 本明細書で用いる場合、「9 回膜貫通型スーパーファミリー」との用語は、まとめて a r N O X 又は a r N O X タンパク質としても知られる、本明細書の表 1 及び 2 に示すメンバー 1 a、1 b、2、3 及び 4 と配列類似性又は相同性を有する任意のそして全てのタンパク質のことをいう。

【 0 0 2 6 】

[0034] 本明細書で用いる場合、「単離宿主細胞」との用語は、細胞が、インタクトな多細胞生物の一部分でないことを意味する。

【 0 0 2 7 】

[0035] 9 回膜貫通型 (T M - 9) スーパーファミリーのタンパク質と、a r N O X 活性としてアッセイされたものとの関連は、サッカロミセス・セレビスエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) の酵母欠失及び過剰発現株の分析を用いて始まった。a r N O X 活性は、欠失ライブラリーにおいて同定され、それぞれの欠失を遺伝子 Y E r 1 1 3 C まで追跡し、次いで、対応するタンパク質を酵母過剰発現ライブラリーから特徴づけ、9 回膜貫通型スーパーファミリーのメンバーであることが決定された。酵母データベースにおける発現配列タグ (E S T) により、ヒトゲノムの相同性検索からヒト a r N O X が同定できた。ヒト a r N O X c D N A は、9 つの膜貫通ドメインに組織化される高度に疎水性の C 末端部分を有するポリペプチドをコードし、これは、ヒト遺伝子命名委員会により「T M 9 S F」(9 回膜貫通型タンパク質スーパーファミリー) と呼ばれる複数で広がるドメインタンパク質の新規なファミリーのメンバーと構造及び配列が非常に類似する。T M 9 S F ファミリーの主要なメンバーは、エンドソームにある 2 4 k D a タンパク質 (p 2 4 a) にプロセシングされる 7 0 k D a の前駆体である、サッカロミセス・セレビスエ E M P 7 0 遺伝子生成物である (S i n g e r - K r u g e r ら、1 9 9 3

10

20

30

40

50

、J. Biol. Chem. 268:14376~14386)。今日までに、ヒトTM9SFタンパク質の5つのサブタイプ(アイソフォーム)、すなわちTM9SF-I(hMP70; Chuluba de Tapiaら、1997、Gene 197:195~204)、TM9SF-Ib、TM9SF-2(p76; Schimmollerら、1998、Gene 216:311~318)、TM9SF-3及びD87444(これらは、互いに及び酵母p24a前駆体と30~40%のアミノ酸配列同一性を示す)(Sugasawaら、2000、Gene 273:229~237)が同定されている。全てのアイソフォームは、arNOX活性を示す。arNOX活性が、少なくとも5つの異なるタンパク質によりもたらされることは、驚くべき結果であった。

【0028】

[0036] p76及びその近縁種の水治療分析(Kyte及びDoolittle、1982、J. Mol. Biol. 157:105~132)により、これらのタンパク質が、固有の膜結合ドメインを共有することが明らかになった(Schimmollerら、1998、Gene 216:311~318)。これらは、シグナル配列に特徴的な短いN末端疎水性伸長と、その後のほぼ親水性のアミノ末端部分も含有し、該アミノ末端部分は、あるファミリーメンバーにおいて、アミノ酸残基300まで伸びる。これらのタンパク質の残りの部分は、非常に疎水性であり、9つの膜貫通ドメインを含有するので、1型トポロジを採用する一体型膜タンパク質になる。ポリペプチド転位は、それらのN末端疎水性シグナル配列により開始し、これらは、最終的に、移行停止配列により膜に係留される。

【0029】

[0037] EMP70遺伝子は、この24kDaのタンパク質をマイクロ配列決定により得られるN末端配列情報に基づいてクローニングされた(Singer-Krugerら、1993、J. Biol. Chem. 268:14376~14386; GenembaseデータベースエントリーX67316)。サッカロミセス・セレビシエゲノムの配列決定により、EMP70遺伝子が第XII染色体上にあることが明らかになった(GenBank受託番号U53880)。p76のcDNAは、663アミノ酸のタンパク質をコードし、推定質量は76kDaである(GenBank受託番号U81006)。

【0030】

[0038] タンパク質レベルにて、p76及びp24aタンパク質前駆体(EMP70)は、35%のアミノ酸配列同一性を有する。著しいことに、最も高いレベルの配列同一性は、これらのタンパク質のC末端の60%に局在化している。これとは対照的に、N末端ドメインは、より大きいアミノ酸配列多様性を示す。別のヒトホモログ(GenBank受託番号D87444)は、72kDaの推定質量を有し、p76と区別するためにヒトEMP70pと呼ぶ。

【0031】

[0039] TM-9タンパク質スーパーファミリーのメンバーの全ては、細胞膜を行ったり来たりする、特徴的な一連の9つの膜に広がる疎水性ヘリックスを有する細胞表面タンパク質(arNOXタンパク質と同様に)であることを特徴とする。膜貫通領域は、5つのアイソフォームのそれぞれにおいて高度に保存され、類似又は同一である。このようなアイソフォームが5つ知られている(1a、1b、2、3及び4; アイソフォーム1a及び1bは非常に類似している)。これらは、異なる遺伝子にコードされていると考えられる。これらは、スプライシングバリエーションではない。TM-9ファミリーメンバーは、エンドソームに存在することが知られている。

【0032】

[0040] 本発明者らは、細胞膜の外表面に露出されている顕著なTM9SFタンパク質のおよそ30kDaのN末端領域が、血液及びその他の体液(唾液、汗、尿)中に切り落とされることを発見した。これらは、血清及び血漿中に存在し、まとめてarNOXとして測定される。5つのアイソフォームの全ては、異なる比率であるが老化した個体の試料中に存在する。図1の矢印にてセリンプロテアーゼ切断部位が存在する。切り落とされた形

10

20

30

40

50

のそれぞれは、E N O Xタンパク質に必要とされる機能的モチーフを含有し、機能的モチーフは、a r N O Xファミリーに固有である。単離されたa r N O Xタンパク質の可溶性の配列と同様に、機能的モチーフを図2及び3に示す。各アイソフォーム中に必要な機能的モチーフが存在するにもかかわらず、異なるアイソフォーム間の配列同一性は、最小限である。アミノ酸配列からのこれらの同定、又はa r N O Xの可溶性の配列分析に対する同定は、当業者にとってさえ自明でなかった。

【0033】

[0041] c D N AがS F 4アイソフォームについて得られ、酵母での発現を試みた。全長タンパク質（配列番号9）の発現は、成功しなかった。しかし、T M 9 S F 4の可溶性断片のクローニングは成功し、クローニングされたタンパク質は、a r N O Xタンパク質のものと同一の機能的特徴を有した（図4及び5）。アイソフォームの可溶性の可溶性アミノ酸及びD N A配列を次いで用いて、各アイソフォームに対するペプチド抗体と、各アイソフォームに対するR N Aプローブとをそれぞれ調製した。抗体は、5つのアイソフォームをヒト血清及び唾液において系統的に同定して、T M - 9スーパーファミリーのタンパク質アイソフォームの既知の配列に対応させるために用い、D N A配列情報は、各アイソフォームについてのR T - P C Rプローブを作製して、ヒトリンパ球及びヒト皮膚外植片の両方におけるそれらの発現を証明した。これらのデータにより、T M 9スーパーファミリーのタンパク質が、ヒト血清、血漿及びその他の体液の5つの既知のa r N O Xアイソフォームの遺伝子的起源であることが確認される。

10

【0034】

[0042] a r N O Xについての現在のアッセイは、時間がかかり、不正確であり、26分の間隔で離れた最大活性の5つの異なるアイソフォームが明らかになるが、各最大値を特定のアイソフォームと関連付けない。これら及びその他の困難を防ぐために、本明細書に開示される情報を用いて、アイソフォーム特異的なa r N O XについてのE L I S Aベースのアッセイを開発した。ペプチド抗体を、各アイソフォームの可溶性タンパク質配列に対して、ウサギにおいて作製した。a r N O X供給源で96ウェルE L I S Aプレートの5つの反復するウェルのそれぞれを被覆し、適当な洗浄及びブロッキングの後に、アイソフォーム特異的抗体を1つずつ、又は目的が全a r N O Xを単純に測定することであれば混合物として、5つの反復ウェルのそれぞれに加えた。ペルオキシダーゼ結合二次抗体を、比色基質とともに加え、発生した色を、自動化プレートリーダーで決定した。吸光度の読み取りは、a r N O Xの量に対して直線的であり、本明細書に記載するようにして作製した組換え可溶性a r N O Xタンパク質を用いた標準曲線により定量した。E L I S Aプロトコルは標準的であり、独特ではない。しかし、a r N O Xアイソフォームに対する抗体を、a r N O X及びa r N O Xアイソフォームの定量の方法として用いることが新しく、新規であり、本明細書に含めて、これらの発見の有用性が自明でないことをさらに証明する。

20

30

【0035】

[0043] T M 9 S Fアイソフォームが、血清を含む体液中に均質に分布されていないことがさらに証明された。しかし、生体試料は、興味対象の対象哺乳動物、特にヒトからであり得、それらに限定されることなく、対象哺乳動物からの皮膚試料、唾液、血液、血清、尿、腹腔内液、組織試料又はその他の試料であり得る。

40

【0036】

[0044] 機能に著しく影響することなくa r N O Xタンパク質中に限定された数のアミノ酸置換が存在でき、例示されていないa r N O Xが、具体的に例示されたアミノ酸配列（複数可）からのある程度のアミノ酸配列相違を有し得ることを、当業者は認識している。このような天然に存在するバリエーションは、例えば、例示されたコード配列（又はヒトa r N O X配列と特異的にハイブリダイズできるその一部分）との、少なくとも約70%のヌクレオチド配列同一性、好ましくは約80%、より好ましくは約90%若しくは95~100%の配列同一性、又は上記の特定した範囲内の任意の整数を検出するために適当な条件下でのハイブリダイゼーションにより同定できる。好ましくは、コードされるa r N O

50

Xは、例示されたa r N O Xアミノ酸配列（複数可）と少なくとも約90%、又は90と100%の間の任意の整数のアミノ酸配列同一性を有する。例示されていない配列を調べる場合、特徴的なa r N O X活性及びサリシンのようなa r N O X特異的阻害剤に対するこれらの感受性を証明することにより、当業者は、機能的a r N O Xタンパク質が生成されていることを確認できる。

【0037】

[0045] a r N O Xタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、表1に示す核酸配列内のコード配列を含む核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離核酸分子も、本開示の範囲内である。本発明の具体的に例示されたa r N O Xコード配列と少なくとも85%のヌクレオチド配列同一性を有するDNA分子は、本明細書に示すプローブを用いる、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションにより同定される。ストリンジェントな条件は、例えば、65 と68 との間の温度にて水溶液（5 × SSC、5 × デンハルト溶液、1 % ドデシル硫酸ナトリウム）中、又は約42 にて50 % ホルムアミド溶液中でのハイブリダイゼーションと、0 . 2 × SSC、0 . 1 % ドデシル硫酸ナトリウム中で室温での洗浄を含む。本発明の具体的に例示するa r N O X配列は、当業者により容易に試験される。

【0038】

【表 1】

[0046] 表 1. arNOX 膜貫通型スーパーファミリー遺伝子、1 a、1 b、2、3 及び 4 をコードする遺伝子配列

9 回膜貫通型スーパーファミリー メンバー 1 アイソフォーム a (ホモサピエンス) (配列番号 1)
バージョン NP_006396.2 GI:21361315
DB ソース 参照配列: アクセッション NM_006405.5

```

1  ggccgcgcgtg cccatccgcg ggaggacccc cgcctcgcgc aagacggggc gggcaagccg
61  agcctcacgg ggtccccgga gctgggcccg gcctccagat ggagaaggcg caacggggag
121  ttcttgagta agccagagcg gtgtccagcg cgggtgtagc gcagccgcgc ctgtcaggcg
181  cagcaacggg caaccccgta gaagtcggtc ggcaggctct ctccaacccg ccgctaccgc
241  gccgctgtgg gagagacccc agcaggagcc caaaggcagc tacggggggc cgaaggccgc
301  tggcgccgcg tcggccagcc cttcccgcgc ggttccactg ccttaaggat gacagtctga
361  gggaaccctc gaagtgggag ctgccagtgg ttgccaatcc tgatactgtt gctgggcaca
421  ggccatgggc caggggtgga aggcgtgaca cactacaagg ccggcgaccc tgttattctg
481  tatgtcaaca aagtgggacc ctaccataac cctcaggaaa cttaccacta ctatcagctt
541  ccagtctgct gccctgagaa gatacgtcac aaaagcctta gcctgggtga agtgcctgat
601  ggggaccgaa tggtctgagtc tttgtatgag atccgctttc gggaaaacgt ggagaagaga
661  attctgtgcc acatgcagct cagttctgca caggtggagc agctgcgcca gccattgaa
721  gaactgtact actttgaatt tgtggtgat gacttgccaa tccggggcct tgtgggctac
781  atggaggaga gtggttttct gccacacagc cacaagatag gactctggac ccatttggac
841  ttccacctag aattccatgg agaccgaatt atatttgcca atgtttcagt gcgggacgtc
901  aagccccaca gcttgatggg gttacgacct gacgagttcc taggccttac ccacacttat
961  agcgtgcgct ggtctgagac ttcagtggag cgtcggagtg acaggcgccg tggtgacgat
1021  ggtgggtttc ttctcgaac actggaaatc cattggttgt ccatacctaa ctccatggtg
1081  cttgtgtttt tactgggtgg ttttgtggt gtcattctaa tgcgtgtgct tcggaatgac
1141  ctggtctggg acaacttaga tgaggagacc acctctgcag gttctggtga tgactttgac
1201  caggggtgaca atggtctgaa aattatccat acagatgtct tccgcttccc ccataaccgt
1261  ggtctgctct gtgctgtgct tggcgtgggt gccagttccc tggcccttgg cactggcatt
1321  attgtcatgg cactgctggg catgttcaat gtgcaccgtc atggggccat taactcagca
1381  gccatcttgt tgtatgccct gacctgtgct atctctgget acgtgtccag ccactcttac
1441  cggcagattg gaggcgagcg ttgggtgtgg aacatcattc tcaccaccag tctcttctct
1501  gtgcctttct tcctgacgtg gagtgtggtg aactcagtgc attgggacca tggttcgaca
1561  caggtctctgc cagccacaac catcctgtct cttctgacgg tttggtgct ggtgggcttt
1621  cccctcactg tcattggagg catctttggg aagaacaacg ccagccctct tgatgcaccc
1681  tgtcgcacca agaacatcgc cggggagatt ccaccccagc cctggtaaca gtctactgtc
1741  atccacatga ctggttgagg cttcctgctt ttcagtgcc a tctctgtgga gctgtactac
1801  atctttgcca cagtatggg tggggagcag tacactttgt acggcatcct cttctttgtc
1861  ttcgccatcc tgetgagtgt gggggcttgc atctccattg cactcaecta cttccagttg
1921  tctggggagg attaccgctg gtggtggcga tctgtgctga gtgttggtc caccggcctc
1981  ttcactcttc tctactcagt tttctattat gccggcgct ccaacatgtc tggggcagta
2041  cagacagtag agttcttcgg ctactcctta ctactgggt atgtcttctt cctcatgctg
2101  ggcaccatct ctttttttcc ttcctaaag ttcacccggt atatctatgt taacctcaag
2161  atggactgag ctttgtatgg cagaactatt gctgttctct ccctttcttc atgcoctgtt
2221  gaactctcct accagcttct cttctgattg actgaattgt gtgatggcat tgttgccctc
2281  ctttttgccc tttgggcatt cttcccag agaggcgct gaaattataa atctctatca
2341  cataaggatt atatatattga actttttaag ttgcctttag ttttggctct gatctttctt
2401  tttacaatta ccaaaataaa atttattaa aaaaaggaaa aaaaaaaaa

```

10

20

30

【 0 0 3 9 】

【表 2】

9回膜貫通型スーパーファミリー メンバー 1 アイソフォーム b (ホモサピエンス) (配列番号 3)

バージョン NP_001014842.1 GI:62460635

DBソース 参照配列: アクセション NM_001014842.1

```

1  ggccgcgctg ccgatacgccg ggaggacccc cgctcgcgcg aagacggggcg gggcaagccg
61 agcctcacgg ggtccccgga gctgggcccg gcctccagat ggagaaggcg caacggggag
121 ttcttgagta agccagagcg gtgtccagcg cgggttagcc gcagccgccg ctgtcaggcg
181 cagcaacggg caaccccgta gaagtcggtc ggcaggtoct ctccaacccg ccgctaccgc
241 gccgctgtgg gagagacccc agcaggagcc caaaggcagc tacggggggcg cgaaggccgc
301 tggcgccgcc tcggccagcc cttcccgcg cgttccactg ccttaaggat gacagtcgta
361 gggaaccctc gaagttggag ctgccagtgg ttgccaatcc tgatactgtt gctgggcaca
421 ggccatgggc caggggtgga aggcgtgaca cactacaagg ccggcgaccc tgttattctg
481 tatgtcaaca aagtgggacc ctaccataac cctcaggaaa cttaccacta ctatcagctt
541 ccagtctgct gccctgagaa gatacgtcac aaaagcctta gcctgggtga agtgctggat
601 ggggaccgaa tggctgagtc tttgtatgag atccgctttc gggaaaacgt ggagaagaga
661 attctgtgcc acatgcagct cagttctgca caggtggagc agctgcgcca ggccattgaa
721 gaactgtact actttgaatt tgtgtagat gacttgccaa tccggggcct tgtgggctac
781 atggaggaga gtggtttcct gccacacagc cacaagatag gactctggac ccatttggac
841 ttccacctag aattccatgg agaccgaatt atatttgcca atgtttcagt gcgggacgtc
901 aagccccaca gcttgatgg gttacgacct gacgagttcc taggccttac ccacacttat
961 agcgtgcgct ggtctgagac ttcagtggag cgtcggagtg acaggcgccg tggtgacgat
1021 ggtggtttct ttctcgaac actggaaatc cattggttgt ccatcatcaa ctccatggtg
1081 cttgtgtttt tactggtggg ttttgtggct gtcattctaa tgcgtgtgct tcggaatgac
1141 ctggctcggt acaacttaga tgaggagacc acctctgcag gttctggtga tgactttgac
1201 cagggtgaca atggctggaa aattatccat acagatgtct tccgcttccc ccataaccgt
1261 ggtctgctct gtgctgtgct tggcgtgggt gccagttcc tggcccttgg cactggcatt
1321 attgtcatgg cactgctggg catgttcaat gtgcaccgtc atggggccat taactcagca
1381 gccatcttgt tgtatgccct gacctgctgc atctctggct acgtgtccag ccacttctac
1441 cggcagattg gaggcgagcg ttgggtgtgg aacatcatte tcaccaccag tctcttctct
1501 gtgcctttct tctgacgtg gagtgtggtg aactcagtcg attgggcaa tgggtcgaca
1561 caggctctgc cagccacaac catcctgctg cttctgacgg tttggctgct ggtgggcttt
1621 cccctcactg tcattggagg catctttggg aagaacaacg ccagcccctt tgatgcaccc
1681 tgtcgacca agaacatgc ccgggagatt ccaccccagc cctggtacaa gtctactgtc
1741 atccacatga ctgttgagg cttcctgcoo ttcaggatcc ctccctttat tccatggcta
1801 ttactgtcag gttcctgacc tcaatttttc ctgtccctac tcatccagta ccctaacca
1861 acccgttgat cctggttca gtggtaccat tcagagatca ttaaatggtt cctcctatcc
1921 ccaagcagga ctgagcttga atgatatgag agtgtctcac ttataaagct ctccggagac
1981 atttccccct tcaccttct gggttctgac tttaatgcct atggacatca tgtggggttt
2041 aaagcccat tgatgacca tttactttgt tgaatacctc tttgtgccag gcaaagaata
2101 aagtggaata aaatggaaaa aaaa

```

10

20

30

【 0 0 4 0 】

【表 3】

9 回膜貫通型スーパーファミリー メンバー 2 (ホモサピエンス) (配列番号 5)

バージョン NP_004791.1 GI:4758874

DB ソース 参照配列: アクセション NM_004800.1

```

1  cgcaaccgga actagccttc tgggggcggg cttggtttat ctctggcggc cttgtagtgc
61  tctccgagac tccccacccc tccttccttc ttgacccctt aggtttgatt gccctttccc
121 cgaaacaact atcatgagcg cgaggtgccc ggtgttgctc ccacctcggg ggccgcggct
181 gttgctgctg tcgctgctcc tgctgggggc ggttcctggc ccgcgcggga gcggcgcttt
241 ctacctgccc ggccctgggc cgtcaactt ctgcgacgaa gaaaaaaga gcgaagagtgc
301 caaggccgaa atagaactat ttgtgaacag acttgattca gtggaatcag ttcttcctta
361 tgaatacaca gcgtttgatt ttggccaagc atcagaagga aagcgcccat ctgaaaatct
421 tggtcaggta ctattcgggg aaagaattga accttcacca tataagttta cgtttaataa
481 gaaggagacc tgtaagcttg tttgtacaaa aacataccat acagagaaaag ctgaagacaa
541 acaaaagtta gaattcttga aaaaaagcat gttattgaat tatcaacatc actggattgt
601 ggataatatg cctgtaacgt ggtgttacga tgttgaagat ggtcagaggt tctgtaatcc
661 tggatttcct attggctggt acattacaga taaaggccat gcaaaagatg cctgtgttat
721 tagttcagat ttccatgaaa gagatacatt ttacatcttc aacctgttg acatcaaaat
781 atactatcat gttgttgaaa ctgggtccat gggagcaaga ttagtggctg ctaaacttga
841 accgaaaagc ttcaaacata cccatataga taaaccagac tgctcagggc ccccatgga
901 cataagtaac aaggcttctg gggagataaa aattgcctat acttactctg ttagcttoga
961 ggaagatgat aagatcagat gggcgtctag atgggactat attctggagt ctatgcctca
1021 taccacatt cagtggttta gcattatgaa ttccttggtc attgttctct tcttatctgg
1081 aatggtagct atgattatgt tacggacact gcacaaagat attgctagat ataacagat
1141 ggactctacg gaagatgccc aggaagaatt tggctggaag cttgttcatg gtgatatatt
1201 ccgtcctcca agaaaaggga tgctgctatc agtctttcta ggatccggga cacagatttt
1261 aattatgacc tttgtgactc tatttttcgc ttgcttgga tttttgtcac ctgccaacgg
1321 aggagcgtg atgacgtgtg ctgtggtcct gtgggtgctg ctgggcaccc ctgcaggcta
1381 tgttgctgcc agattctata agtcctttgg aggtgagaag tggaaaacaa atgttttatt
1441 aacatcattt ctttgtcctg ggattgtatt tgctgacttc tttataatga atctgatcct
1501 ctggggagaa ggatcttcag cagctattcc ttttgggaca ctggttgcca tattggccct
1561 ttggttctgc atatctgtgc ctctgacgtt tattggtgca tactttggtt ttaagaagaa
1621 tgccattgaa caccagttc gaaccaatca gattccacgt cagattcctg aacagtcgtt
1681 ctacacgaag cccttgccct gtattatcat gggagggtat ttgccctttg gctgcatctt
1741 tataacaact ttcttcattc tgaatagtat ttggtcacac cagatgtatt acatgtttgg
1801 ctctctattt ctggtgttta tcattttggt tattacctgt tctgaagcaa ctatacttct
1861 ttgctatttc cacctatgtg cagaggatta tcattggcaa tggcgttcat tccttacgag
1921 tggctttact gcagtttatt tcttaatcta tgcagtacac tacttctttt caaaactgca
1981 gatcacggga acagcaagca caattctgta ctttggttat accatgataa tggttttgat
2041 ctctcttctt tttacaggaa caattggctt ctttgcatgc ttttggtttg ttacaaaaat
2101 atacagtgtg gtgaagggtg actgaagaag tccagtgtgt ccagttaaaa cagaaataaa
2161 ttaaaactct catcaacaaa gacctgtttt tgtgactgcc ttgagtttta tcagaattat
2221 tggcctagta atccttcaga aacaccgtaa ttctaaataa acctcttccc atacaccttt
2281 ccccataaag atctgtcttc aacactataa agcatttgta ttgtgatttg attaagtata
2341 tatttggttg ttctcaatga agagcaaatt taaatattat gtgcatttga a

```

10

20

30

【 0 0 4 1 】

【表 4】

遺伝子座 NP_064508 589 aa linear PRI 12-JUN-2008
 9回膜貫通型スーパーファミリー メンバー 3 (ホモサピエンス) (配列番号 7)
 バージョン NP_064508.3 GI:190194386
 DB ソース 参照配列: アクセション NM_020123.3

```

1 gaggaagagg ctgaggaggc gcggggggcg ggggaggctc aggagcgggc ggtgacggcg
61 acggcggcgg cagaggaggc agcggctggg cggggccccg tgcgtctgtc cgcgccccgt
121 ggatgcgaat cggccgcggc ggaggcggcg gcggcggagg aggcggcggc gggaggagga
181 gtcggtgagc cggctccggg ccggaggggc gcggaggatg aggcgcgtgc ctggcgctct
241 tggcgtggcg gcggccgcgc cgtctgtggt gctgctgctg ctgctgcccc ggaccggggc
301 ggacgagcac gaacacacgt atcaagataa agaggaaagt gtcttatgga tgaatactgt
361 tgggcccctac cataatcgtc aagaaacata taagtacttt tcacttccat tctgtgtggg
421 gtcaaaaaaa agtatcagtc attaccatga aactctggga gaagcacttc aagggttga
481 attggaattt agtggctctg atattaaatt taaagatgat gtgatgccag ccacttactg
541 tgaaattgat ttagataaag aaaagagaga tgcattttgt tatgccataa aaaatcatta
601 ctggtaccag atgtacatag atgatttacc aatatggggg attgttgggt aggctgatga
661 aaatggagaa gattactatc tttggacctt taaaaaactt gaaatagggt ttaatggaaa
721 tcgaattgtt gatgttaatc taactagtga aggaaagggt aaactgggtt caaatactaa
781 aatccagatg tcatattcag taaaaaggaa aaagtcagat gtgaaatttg aagatcgatt
841 tgacaataat cttgatccgt ctttttttca acatcggatt cattggtttt caattttcaa
901 ctcccttcag atgggtgatc tcttgggtgg cttagtttca atgattttta tgagaacatt
961 aagaaaagat tatgctcggt acagttaaaga ggaagaaatg gatgatatgg atagagacct
1021 aggagatgaa tatggatgga aacagggtgca tggagatgta tttagaccat caagtcaccc
1081 actgatattt tcctctctga ttggttctgg atgtcagata tttgctgtgt ctctcatcgt
1141 tattattgtt gcaatgatag aagatttata tactgagagg ggatcaatgc tcagtacagc
1201 catattttgt tatgctgcta cgtctccagt gaatggttat tttggaggaa gtctgtatgc
1261 tagacaagga ggaaggagat ggataaagca gatgtttatt ggggcattcc ttatccagc
1321 tatggtgtgt ggcactgcct tcttcatcaa tttcatagcc atttattacc atgcttcaag
1381 agccattcct tttggaacaa tggtgccgtt ttgttgcatc tgtttttttg ttattcttcc
1441 tctaaatcct gttggtacaa tacttggccg aaatctgtca ggtcagccca actttccttg
1501 tcgtgtcaat gctgtgcctc gtccataacc ggagaaaaaa tggttcatgg agcctgcggg
1561 tattgtttgc ctgggtggaa ttttaccctt tggttcaatc tttattgaaa tgtatttcat
1621 cttcacgtct ttctgggcat ataagatcta ttatgtctat ggcttcatga tgcgtgtgct
1681 ggttatccgt tgcattgtga ctgtctgtgt gactattgtg tgcacatatt ttctactaaa
1741 tgcagaagat taccgggtggc aatggacaag ttttctctct gctgcatcaa ctgcaatcta
1801 tgttttacatg tattcctttt actactattt tttcaaaaca aagatgtatg gcttatttca
1861 aacatcattt tactttggat atatggcggg attttagcaca gccttgggga taatgtgtgg
1921 agcgattggg tacatgggaa caagtgcctt tgtccgaaaa atctatacta atgtgaaaaa
1981 tgactagaga cccaagaaaa cctggaaact tggatcaatt tctttttcat aggggtggaa
2041 cttgcacagc aaaaacaaac aaacgcaaga agagatttgg gctttaacac actgggtact
2101 ttgtgggtct ctctttcgtc ggtggcttaa agtaacatct atttccattg atcctagggt
2161 cttcctgact gctttctcca actgttcaca gcaaatgctt ggattttatg cagtaggcat
2221 tactacagta catggctaatt cttcccaaaa actagctcat taaagatgaa atagaccagc
2281 tctcttcagt gaagaggaca aatagtttat ttaaagcatt tgttccaata aaataaatag
2341 agggaaactt ggatgctaaa attacatgaa taggaatctt cctggcactt agtgtttcta
2401 tgttattgaa aaatgatgtt ccagaaagat tacttttttc ctcttatttt tactgccatt
2461 gtcgacctat tgtgggacat ttttatatat tgaatctggg ttcttttttg actttttttt
2521 tttcccaatc caacagcatc ctttttttta aaagagagaa ttagaaaaata ttaaactcctg
2581 catgtaatat atctgtgtgc atcttagttg gaccaacttc ccatttattt atcttaaaac
2641 tatacagtta catcttaatt ccacccaag aagatacagt ttgaagacag aagtgtactc
2701 tctacaatgc aatttactgt acagttagaa agcaaagtgt taaatggaga agatacttgt
2761 ttttattaaa cattttgaga tttagataaa ctacatttta actgaatgtc taaagtgatt
2821 atcttttttc cccccaagtt agtcttaaat cttttgggtt tgaatgaagg ttttacataa
2881 gaaattatta aaaacaaggg ggggtggtaa taaatgtata taacattaaa taatgtaacg
2941 taggtgtaga ttcccaaatg catttgatg tacagatcga ctacagagta cttttttctt

```

10

20

30

40

【 0 0 4 2 】

【表 5】

3001	atgatgattg	gtgtagaaat	gtgtgatttg	gggtgggcttt	tacatcttgc	ctaccattgc
3061	atgaaacatt	ggggtttctt	caaaatgtgt	gtgtcatact	tcttttggga	gggggggtgt
3121	tttcttctgt	ttattttctg	agactcctac	aggagccaaa	tttgtaattt	agagacactt
3181	aattttgtta	atcctgtctg	ggacacttaa	gtaacatcta	aagcattatt	gcttttagaat
3241	gttcaaataa	aattttcctga	ccaaattgtt	ttgtggaaat	agatgtgttt	gcaatttgaa
3301	gatatctttc	tgtccagaag	gcaaaattac	cgaatgccat	ttttaaaagt	atgctataaa
3361	ctatgctact	ctcatcacag	ggacccgtat	tttaaaatct	ccagacttgc	ttacatctag
3421	attatccagc	acaatcataa	agtgaatgac	aaaccctttg	aatgaaattg	tggcacaaaa
3481	tctgttcagg	ttggtgtacc	gtgtaaagtg	gggatggggg	aaaagtgggt	aacgtactgt
3541	tggatcaaca	aataaagggt	acagttttgt	aagagaagtg	atltgaaatac	atlttttctgg
3601	aactattcat	aatatgaagt	tttcctagaa	ccactgagtt	tctagttaa	tagtttgcta
3661	tgcaaagac	cacctaaaac	aatactttat	attgttattt	ttagaaagac	tcaaaacacc
3721	tgtatttaaa	ccttaatatg	aaaatcatgc	aattaatagt	tacacaagat	gttttcatta
3781	caaaatatgt	acctatctat	tgatggactc	tacatcctat	attgtgacat	gtaagtcctt
3841	taaaagggtga	aaagtatgat	ttcttaccac	ttaagtatga	ttgatatgat	ccaacaaatt
3901	tgatcagaag	ctgtaggtaa	atcctcttct	gaagccaaaa	tggtatatta	aatataattt
3961	attggtactt	ccattttctc	ttccttctta	cttgccttta	agatcttata	aaaaagaaac
4021	taaaagttaa	tatttagttg	cctatatatt	gtaacctttt	aactatata	aaagtacttt
4081	tttggtttct	ttctcaccac	ttttattcaa	aagtactttt	aacataccaa	tacatagtct
4141	gtctgatggg	agtataaatt	ggacagtaag	gttttgtctt	aataaaatga	aatttgtttc
4201	tcatgatatg	aatcttgcag	gtaagatgta	gggtttattg	aaaatgtgtg	ggttaaatgc
4261	tttcagggtac	accaattctt	tctactaaat	tgagctctat	ttgaagttct	ttggaatctg
4321	tggtgaaaaa	taattttctg	atltccaaat	acattaagag	cattaaatga	atattaatca
4381	cctttaaagt	cttttagaaa	aggacttgta	ttggtttttg	gctgcataga	ggggttgaat
4441	aagtgtatgt	atgtgtgtgc	gtgtgtgtgt	gtcttcttaa	agaagatgta	attcacaat
4501	agtttagctc	cctagcgtc	agttgtagaa	tagaaaatag	aacattattc	aagttaattg
4561	aaagggtgagg	tttttatacc	cccactaatg	ctgtgtatct	gtctttcggt	tgttaacatt
4621	atltgcttaa	tttctttcaa	ctcacacttt	ggataatact	atcaaaaact	aaggctaaac
4681	atltccttgtg	tatctttaag	catgcttctc	ctgaaattta	actacattag	tagttgacat
4741	ttgtatacat	atatlctaat	acaagagtag	gataagggtg	aaatgtaatg	gcctgaggga
4801	tgggtgaagca	ttcttttagt	atlttttcatc	atgttgggct	cctagattgt	actgggggtg
4861	cccataaat	aaaccccata	ctcttagaat	tcattatatt	atgggtgat	ccgaacctag
4921	tgaatgggtat	gcttgggtgt	tttccattga	gagtggtatg	acctctttat	aaagttgggt
4981	gctgcaaaat	ccagttcttc	caaaagccac	tttatttagg	gtttattcac	aatgcatatc
5041	catttttggt	cagtgtttgt	ttcctaatat	ttattaacca	ccttatacca	aatgtcttgc
5101	aaagaaatgt	tattaaaacc	ttgaattttt	acaaatgtaa	aaaacaaaaa	gtgtattaat
5161	gtatttgttc	aggaaaagct	acataccgaa	gggcttttgt	atatgaattc	tgtgggtggg
5221	agaccattt	gtaatctata	tggcagttcc	atctgggttt	taagtttaga	tttcaccgtg
5281	tcttagtgct	tcattctatt	ggtttatttg	aacatgtaat	aaataggagt	agtgtatgat
5341	taaaacacaa	gtattcatta	atgttttata	tcttctacta	aattctatag	ttatgaaact
5401	atcaatcaag	gtgttatatt	tcagtcagaa	gtgaaaattt	atgaagagta	tttggaagtg
5461	tgtacagaaa	taaaactagac	ttacaggtag	gctagatcag	aacgttaaca	tatgaacctg
5521	cagaaatctg	gtaagactta	aattcagttg	gaggaataac	tctagttctc	tcctatgagc
5581	atlttcctaaa	agccatctga	tttggcattc	ttactggagc	tgcagacaga	aatctacaaa
5641	gacaaaagta	aacaaaatta	agttattatt	ccactgttag	gaatggaaat	aaacttgtga
5701	agtctgttta	ttttgaagta	ttggtgaact	aggcttgcta	attgataact	gcagcagttt
5761	gtgtttactc	cagttcatca	gcttaggtca	tttgaaagat	ataagagctt	aaggcaagaa
5821	agaaataaca	tggaaattcta	tttgaaaggac	aacagaacat	tcttggaaaa	gcagctccag
5881	ttggtttttc	aactgtcaaa	cttgaatgtg	taagtcccca	cagagcatgg	acagtcgggtg
5941	cagagttcca	aggaaacaat	tattgcctga	tgaccacttc	cattttgtat	acactctttg
6001	gttcgtatag	gccatattcc	aactggcttt	ttagtaatag	aaatccagta	tataatgtat
6061	caaatacaat	tgaggttcta	acctagtgtg	ttaatttatc	tgaatttggg	tttttaaaaa
6121	gtaataaaaa	gttaaattgta				

10

20

30

40

【 0 0 4 3 】

【表 6】

9 回膜貫通型スーパーファミリー メンバー 4 (ホモサピエンス) (配列番号 9)

バージョン NP_055557.2 GI:164519076

DB ソース 参照配列: アクセション NM_014742.3

```

1 agttttctgcc aggagctaata atgggttctct tagttacacc gttctctctctc ttcaacctaat
61 cagcgacctt acttttcccag accagactgt cgagcaggag ctaagactcc ttttcccctc
121 tgctgaccgc cactacagga gcggttgaag ccagacgacc acctgttgga gttaaactcc
181 gtaaccaggg agcaccactt ccgctgacgt cattacggcg acacgtggat ccaagatggc
241 gacggcgatg gattgggttg cgtggtcttt actgcttttc tccctgatgt gtgaaacaag
301 cgcttcttat gtgcctgggg tcgcgcctat caacttccac cagaacgata ccgtagaaat
361 caaggctgtg aagctcacca gctctcgaa ccagctacct tatgaatact attcactgcc
421 cttctgccag ccagcaaga taacctacaa ggcagagaat ctgggagagg tgctgagagg
481 ggaccggatt gtcaacaccc ctttccaggt tctcatgaac agcgagaaga agtgtgaagt
541 tctgtgcagc cagtccaaca agccagtgc cctgacagtg gagcagagcc gactcgtggc
601 cgagcggatc acagaagact actacgtcca cctcattgct gacaacctgc ctgtggccac
661 ccggctggag ctctactcca accgagacag cgatgacaag aagaaggaaa aagatgtgca
721 gtttgaacac ggctaccggc tcggcttcac agatgtcaac aagatctacc tgcacaacca
781 cctctcattc atcctttact atcatcgga ggacatggaa gaggaccagg agcacacgta
841 ccgtgtcgtc cgcttcgagg tgattcccca gagcatcagg ctggaggacc tcaaagcaga
901 tgagaagagt tcgtgcactc tgcctgaggg taccactcc tcgcccacag aaattgaccc
961 caccaaggag aatcagctgt acttcaccta ctctgtccac tgggaggaaa gtgatatcaa
1021 atgggcctct cgctgggaca cttacctgac catgagtgc gtccagatcc actggttttc
1081 tatcattaac tccgttggtg tggctctctt cctgtcaggt atcctgagca tgattatcat
1141 tcggaccctc cgggaaggaca ttgccaacta caacaaggag gatgacattg aagacaccat
1201 ggaggagtct ggggtggaagt tgggtcacgg cgacgtcttc agggccccc agtaccocat
1261 gatcctcagc tccctgctgg gctcaggcat tcagctgttc tgtatgatcc tcatcgtcac
1321 ctttgtagcc atgcttgga tgctgtcgcc ctccagccgg ggagctctca tgaccacagc
1381 ctgcttctc ttcatgttca tgggggtgtt tggcgattt tctgtggcc gtctgtaccg
1441 cactttaaaa ggccatcggt ggaagaaagg agccttctgt acggcaactc tgaacctggg
1501 tgtggttttt ggcatctgct tcgtattgaa ttgcttcatt tggggaaagc actcatcagg
1561 agcgggtgcc tttcccacca tgggtgctct gctgtgcatt tgggttcggg tctccctgcc
1621 cctcgtctac ttgggctact acttcggctt ccgaaagcag ccatatgaca acctgtgcg
1681 caccaaccag attcccggc agatcccga gcagcgggtg tacatgaacc gatttgtggg
1741 catcctcatg gctgggatct tgccttcgg cgccatgttc atcgagctct tcttcatctt
1801 cagtgcatac tgggagaatc agttctatta cctctttggc ttctgttcc ttgttttcat
1861 catcctggtg gtatcctggt cacaacatcg catcgtcatg gtgtacttcc agctgtgtgc
1921 agaggattac cgctgggtgt ggagaaattt ctagtctcc gggggctctg cattctacgt
1981 cctggtttat gccatctttt atttcgttaa caagctggac atcgtgaggt tcatccctc
2041 tctcctctac tttggctaca cggccctcat ggtcttgtcc ttctggctgc taacgggtac
2101 catcggtctc tatgcagcct acatgtttgt tcgcaagatc tatgctgctg tgaagataga
2161 ctgattggag tggaccacgg ccaagcttgc tccgtcctcg gacaggaagc caccctgcgt
2221 gggggaactg aggcacgcaa aataaaataa ctctgctcg tttggaatgt aactcctggc
2281 acagtgttcc tggatcctgg ggctgcgtgg ggggcgggag ggctgtaga taatcttgcg
2341 tttttcgtca tcttattcca gttctgtggg ggatgagttt ttttgtgggt tgctttttct
2401 tcagtgtctaa gaaagtctcc tccaacagga actctctgac ctgtttattc aggtgtattt
2461 ctgggttgga ttttttttct cttctttgtt ttaacaaatg gatccaggat ggataaatcc
2521 accgagataa gggttttggt cactgtctcc acctcagttc ctccaggctg ttggccaccc
2581 tatgactaac tggagagga cacgccagag cttcagtgc gtttccgagc ctctccctgc
2641 ccctcctcac cactgaggcc acgacaaagc acagctccag ctccgacagc acctcagtgc
2701 ccagccagcc tctgccagac ctctcttctc ctcttctccc cagcctctcc cagggtgcgc
2761 caaggcaggg tttccagcca ggctcgggg tcatcttttc accaggagca aaccacagtc
2821 ttagttgcta caagaaaatc cctggaagt actgggggac aggttcccca gacagcagga
2881 attgcccctg ttcagagcag ccggagtttg ctggaccaca aggaagaaga gaagagactt
2941 gcagtgaact gtttttgtgc caagaaaccc tggacctggg gccaagtatt tcccaagcca

```

10

20

30

40

【 0 0 4 4 】

【表 7】

```

3001 agcatccact tgtctgtgtc tgggaagga tggccaagga cgctaggggc cttacccctc
3061 aggatcactc cccagccctt tcctcaggag gtaccgctct ccaagggtgtg ctagcagtgg
3121 gccctgcca acttcaggca gaacaggag gccagagat tacagatccc ctctgttaag
3181 tggccaggca ttctctccct gccctctctg gcctctgggg tcatactcac ttcttttagcc
3241 agccccatcc cctccacccc acacctgagt tcttgctctc tccttttggg gacacccaaa
3301 aactgcttg tgagaaggaa gatggaaggt aagttctgtc gttctttccc caatccccag
3361 gaatggacaa gaagccaact tagaaagaag ggtctcacgt ggctggcctg gctcctccgt
3421 agaccctgt tcttttcaac ctctgccac ccgtgcatgt catcacaac atttgctctt
3481 aagttacaag agaccacatc caccaggga ttagggttca agtagcagct gctaaccctt
3541 gcaccagccc ttgtgggact cccaacacaa gacaaagctc aggatgctgg tgatgctagg
3601 aagatgtccc tcccctcact gcccacatt ctcccagtggt ctotaccage ctacccatc
3661 aaaccagtga atttctcaat cttgctcac agtgactgca gcgccaagcg gcatccacca
3721 agcatcaagt tggagaaaag ggaacccaag cagtagagag cgatattgga gtcttttggt
3781 cattcaaatc ttggattttt tttttccct aagagattct ctttttaggg ggaatgggaa
3841 acggacacct cataaagggt tcaaagatca tcaatttttc tgacttttta aatcattatc
3901 attattattt ttaattaaaa aaatgcctgt atgccttttt ttggtcggat tgtaaataaa
3961 tataccattg tcctactgaa aaaaaaaaaa aaaaaa

```

【 0 0 4 5 】

【表 8】

[0047] 表 2 a r N O X 9 回膜貫通型スーパーファミリータンパク質、1 a、1 b、2 3 及び 4 のタンパク質配列（ホモサピエンス）

9 回膜貫通型スーパーファミリー メンバー 1 アイソフォーム a （配列番号 2）

MTVVGNPRSWSCQWLPILILLGLTGHGPGVEGVTHYKAGDPVILYVNVKVGYPYHNPQETYHYHYYQLPVCCPEKTR
 HKSLSLGEVLDGDRMAESLYEIRFRENVEKRILCHMQLSSAQVEQLRQAIEELYEFEEVVDLPIRGFVGYME
 ESGFLPHSHKIGLWTHLDFHLEFHGDRIIFANVSVRDVKPHSLDGLRPDEFLGLTHYTSVRWSETSVERRSDR
 RRGDDGGFFPRTLEIHWLSIINSMVLVFLLVGVFVAVILMRVLRNDLARYNLDEETTSAGSGDDDFDQGDNGWKI
 IHTDVFRFPYPYRGLLCAVLGVGAQFLALGTGIIVMALLGMFNVHRHGAINSAAILLYALTCCISGYVSSHFYR
 QIGGFRWVWNIILTTSLFSVPFFLTWSVNSVHWANGSTQALPATITILLLLTVWLLVGFPLTVIGGIFGKNN
 SPFDAPCRTKNIAREIPPQWPYKSTVIHMTVGGFLPFSAISVELYYIFATVWGREQYTYLGYLFFVFALLSV
 GACISIALTYFQLSGEDYRWWRVSVLSVGSTGLFIFLYSVFYARRSNM
 SGAVQTVEFFGYSLLTGYVFFLMLGTISFFSSLKFIRYIYVNLKMD

10

9 回膜貫通型スーパーファミリー メンバー 1 アイソフォーム b （配列番号 4）

MTVVGNPRSWSCQWLPILILLGLTGHGPGVEGVTHYKAGDPVILYVNVKVGYPYHNPQETYHYHYYQLPVCCPEKIR
 HKSLSLGEVLDGDRMAESLYEIRFRENVEKRILCHMQLSSAQVEQLRQAIEELYEFEEVVDLPIRGFVGYME
 ESGFLPHSHKIGLWTHLDFHLEFHGDRIIFANVSVRDVKPHSLDGLRPDEFLGLTHYTSVRWSETSVERRSDR
 RRGDDGGFFPRTLEIHWLSIINSMVLVFLLVGVFVAVILMRVLRNDLARYNLDEETTSAGSGDDDFDQGDNGWKI
 IHTDVFRFPYPYRGLLCAVLGVGAQFLALGTGIIVMALLGMFNVHRHGAINSAAILLYALTCCISGYVSSHFYR
 QIGGERWVWNIILTTSLFSVPFFLTWSVNSVHWANGSTQALPATITILLLLTVWLLVGFPLTVIGGIFGKNN
 SPFDAPCRTKNIAREIPPQWPYKSTVIHMTVGGFLPFYRYPFIPWLLLSGS

20

9 回膜貫通型スーパーファミリー メンバー 2 （配列番号 6）

MSARLPVLSPPRWPRLLLLSLLLLGAVPGPRRSGAFYLPGLAPVNFCDDEEKKSECKAEIELFVNRLDSV
 ESVLPEYETAFFDFCQASEGKRPSNLGQVLFGERIEPSYKFTFNKKETCKLVCTKTYHTEKAEDKQKLE
 FLKKSMLLNYQHHWIVDNMPVWTWCYDVEDGQRFENPGFPIGCYITDKGHAKDACVISSDFHERDTFYIFN
 HVDIKIYYHVVE'TGSMGARLVAAKLEPKSFKHTHIDKPDSCGPPMDISNKASGEIKIAYTYSVSFEEDDKIRWAS
 RWDYILESMPTHIIQWFSIMNSLVIVLFLSGMVAMIMRLTLHKDIARYNQMDSTEDAQEEFGWKL VHGDIFRPPRK
 GMLLSVFLGSGTQILIMTFVTLFFACLGFLSPANRGALMTCVVWLVLGTPAGYVAARFYKSFSGGEKWKTNVLLT
 SFLCPGIVFADFFIMNLILWGEGSSAAIPFGTLVAILALWFCISVPLTFIGAYFGFKKNAIEHPVRTNQIPRQIPE
 QSFYTKPLPGIIMGGILPFGCIFIQLFFILNSIWSHQMYMFGFLVFIILVITCSEATILLCYFHLCAEDYHWQ
 WRSFLTSGFTAVYFLIYAVHYFFSKLQITGTASTILYFGYT MIMVLIEFLFTGTIGFFACFWFVTKIYSVVKVD

30

40

【 0 0 4 6 】

【表 9】

9回膜貫通型スーパーファミリー メンバー 3 (配列番号 8)

MRPLPGALGVAAAAALWLLLLLLPRTRADEHEHTYQDKKEEVVLMNNTVGPYHNRQETYKYFSLPFCVGSK
 KSISITYHETLGEALQGVELEFSGLDIKFKDDVMPATYCEIDLDEKRDADFVYAIKNHYWYQMYIDDLPIW
 GIVGEADENGEDYYLWTYKKLEIGFNGNRIVDVNLTSEGKVKLVNPTKIQMSYSVKWKKSDVKFEDRFDK
 YLDPSFFQHRIHNFISFNSFMMVIFLVGLVSMILMRTLKDYARYSKEEEMDDMDRDLGDEYGWKQVHGD
 VFRPSSHPLIFSSSLIGSGCQIFAVSLIVIIIVAMIEDLYTERGSMLSTAI FVYAATSPVNGYFGGSLYARQ
 GGRRWIKQMFIGAFLIPAMVCGTAAFFINFIAIYYHASRAIPFGTMVAVCCICFFVILPLNLVGTILGRNL
 SGQPNFPCRNAVPRPIPEKKWFMFPAVIVCLGGILPFGSIFIEMYFI FTSFWAYKIYYVYGFMMLVLVI
 LCIVTVCVTIVCTYFLLNAEDYRWQWTSFLSAASTAIYVYMYSFYYYFFKTKMYGLFQTSFYFGYMAVFS
 TALGIMCGAIGYMGTSAFVRKIYTNVKID

10

9回膜貫通型スーパーファミリー メンバー 4 (配列番号 10)

MATAMDWLPWSLLLFSLMCETSAFYVPGVAPINFHQNDPVEIKAVKLTSSRTQLPYEYYSLPFCQPSKIT
 YKAENLGEVLRGDRIVNTPFQVLMNSEKKCEVLCSQSNKPVTLTVEQSRLVAERITEDYYVHLIADNLPV
 ATRLELYSNRDSDDKKKEKDVQFEHGYRLGFTDVNKIYLHNHLSFILYYHREDMEEDQEHTYRVVRFEVI
 PQSIRLEDLKADEKSSCTLPEGTNSSPQEIDPTKENQLYFTYSVHWEESEDIKWASRWDTYLTMSDVQIHW
 FSIINSVVVVFFLSGILSMIIIRTLRKDIANYNKEDDIEDTMEESGWKLVHGDVFRPPQYPMILSSLLGS
 GIQLFCMILIVIFVAMLGMLSPSSRGALMTTACFLFMFMGVFGGFSAGRLYRTLKGHRWKKGAFCCTATLY
 PGVVFVGICFVLNCFIWGKHSSGAVPFPTMVALLCMWFGISLPLVYLGYYFGFRKQPYDNPVRTNQIPRQI.
 PEQRWYMNRFVGMILMAGILPFGAMFIELFFIFSAIWENQFYFLFGFLFLVFIIILVVSCSQISIVMVYFQL
 CAEDYRWWWRNFLVSGGSFAFYVLVYAI FYFVNKLDIVEFIPSLLYFGYTALMVLSFWLLTGTIGFYAAYM
 FVRKIYA AVKID

20

【 0 0 4 7 】

30

【表 10】

表3 ヒト可溶性a r N O X酵素のアミノ酸配列

9回膜貫通型スーパーファミリー メンバー1 a (ホモサピエンス) (配列番号13)

1 MTVVGNPRSW SCQWLPILIL LLGTGHGPGV EGVTHYKAGD PVILYVNKVG PYHNPQETYH
 61 YYQLPVCCPE KIRHKSLSLG EVLDGDRMAE SLYEIRFREN VEKRILCHMQ LSSAQVEQLR
 121 QAIEELYIFE FVVDLPIRG FVGMEESGF LPHSHKIGLW THLDFHLEFH GDRIIFANVS
 181 VRDVKPHSLD GLRPDEFLGL THTYSVRWSE TSVERRSDRR RGDDGGFFPR TLEIHWL

保存された CQ/CE

アデニンヌクレオチド結合部位 GXGXXG アミノ酸27～32

推定タンパク質ジスルフィド交換部位 CXXXL

推定銅部位 HYY 及び HSH

10

9回膜貫通型スーパーファミリー メンバー1 b (ホモサピエンス) (配列番号14)

1 MTVVGNPRSW SCQWLPILIL LLGTGHGPGV EGVTHYKAGD PVILYVNKVG PYHNPQETYH
 61 YYQLPVCCPE KIRHKSLSLG EVLDGDRMAE SLYEIRFREN VEKRILCHMQ LSSAQVEQLR
 121 QAIEELYIFE FVVDLPIRG FVGMEESGF LPHSHKIGLW THLDFHLEFH GDRIIFANVS
 181 VRDVKPHSLD GLRPDEFLGL THTYSVRWSE TSVERRSDRR RGDDGGFFPR TLEIHWL

保存された CQ/CE

アデニンヌクレオチド結合部位 GXGXXG アミノ酸27～32

推定タンパク質ジスルフィド交換部位 CXXXL

推定銅部位 HYY 及び HSH

20

9回膜貫通型スーパーファミリー メンバー2 (ホモサピエンス) (配列番号15)

1 MSARLPVLSP PRWPRLLLLS LLLLGAVPGP RRSGAFYLPG LAPVNFCDDEE KKSDECKAEI
 61 ELFVNRLDSV ESVLPEYETA FDFCQASEGK RPSENLGQVL FGERIEPSY KFTFNKKETC
 121 KLVCTKTYHT EKAEDKQKLE FLKKSMLLNY QHHWIVDNMP VTWCYDVEDG QRFNCNPGFPI
 181 GCYITDKGHA KDACVISSDF HERDTFYIFN HVDIKIYYHV VETGSMGARL VAAKLEPKSF
 241 KHTHIDKPDC

保存された CQ/CE

アデニンヌクレオチド結合部位 GXVXXG アミノ酸97～102

推定タンパク質ジスルフィド交換部位 CXXXC

推定銅部位 YQH 及び HTH

【0048】

30

40

【表 1 1】

9回膜貫通型スーパーファミリー メンバー3 (ホモサピエンス) (配列番号16)

1 MRPLPGALGV AAAAALWLLL LLLPRTRADE HEHTYQDKKE VVLWMNTVGP YHNRQETYYK
 61 FSLPFCVGS KSI~~SHY~~HETL GEALQGV~~LE~~ FSGLDIKFKD DVMPATYCEI DLDKEKRD~~AF~~
 121 VYAIKNHYWY QMYIDDLPIW GIVGEADENG EDYYLW~~TY~~KK LEIGFNGNRI VDVNLTSE~~GG~~
 181 VKLVPNTKI~~Q~~ MSYSVKW~~KKS~~ DVKFEDRFDK YLDPSFFQHR IHWFSIFNSF MMVIFLVGLV

推定銅部位 HTY 及び HYH

アデニンヌクレオチド結合部位 GXAXXG アミノ酸 81~86

保存された CQ/CE 及び CV

推定タンパク質ジスルフィド交換部位 CXXXL

10

9回膜貫通型スーパーファミリー メンバー4 (ホモサピエンス) (配列番号17)

1 MATAMDWLPW SLLLFSLMCE TSAFYVPGVA PINFHQNDPV EIKAVKLTSS RTQLPYEYYS
 61 LPFCQPSKIT YKAENLGEVL RGDRI~~VNT~~PF QVLMNSEKKC EVLCSQSNKP VTLTVEQ~~SRL~~
 121 VAERITEDYY VHLIADNLPV ATRLELYSNR DSDDKKKEKD VQFEHG~~YRLG~~ FTDVNKIY~~LH~~
 181 NHL~~SFI~~LYYH REDMEEDQEH TYRVV~~RFE~~VI PQSIRLEDLK ADEKSSCTLP EGTNSSPQEI
 241 DPTKENQLYF TY

20

保存された CQ/CE

アデニンヌクレオチド結合部位 GXVXXG (アミノ酸 77-82)

推定タンパク質ジスルフィド交換部位 CXXXC

推定銅部位 YVH 及び HGY

【実施例】

【0049】

実施例1. 可溶性 arNOXタンパク質9回膜貫通型スーパーファミリー (TM9SF) アイソフォーム4のクローニング及び発現

[0049] pET11bベクター及びBL21(DE3)コンピテント細胞を、Novagen (Madison, WI) から購入した。TM9SF4配列を有するプラスミドを、可溶性TM9SF4コード配列をpET11bベクター(NheI部位とBamHI部位の間)に挿入することにより調製した。TM9SF4配列を、全長cDNAからPCRにより増幅した。用いたプライマーは、5'-GATATACATATGGCTAGCATGGCGACGGCGATGGAT-3' (フォワード) (配列番号11) 及び5'-TTGTTAGCAGCCGGATCCTCAGTCTATCTTTCACAGC-3' (リバース) (配列番号12) であった。PCR生成物を、次いで、NheIとBamHIで二重に消化し、pET11bベクターにライゲーションした。

40

【0050】

[0050] ライゲーション生成物(pET11b-TM9SF4)のDNA配列を、DNA配列決定により確認した。次いで、pET11b-TM9SF4でBL21(DE3)コンピテント細胞を形質転換した。単一コロニーを採取し、5mlのLB+アンピシリン(LB/AMP)培地に接種した。1晩培養物(1ml)を100mlのLB/AMP培地に希釈した(1:100希釈)。細胞を、激しく振とうしながら(250rpm)37にて、0.4~0.6のOD₆₀₀まで成長させ、IPTG(0.5mM)を誘導のために加えた。培養物を、振とうしながら(250rpm)37での5時間のインキュベーションの後に回収した。約30kDaの可溶性TM9SF4の発現が、SDS-PAGE及び銀染色により確認された。形質転換細胞を、-80にて標準的なグリセロール貯蔵

50

溶液中で貯蔵した。

【0051】

[0051] T M 9 S F 4 の発現について、L B + A m p 寒天上で成長した単離コロニーからの少量の細胞を L B + A m p に接種し、8 時間成長させ、4 にて 1 晩貯蔵した。次いで、培養物を 6 , 0 0 0 r p m にて 6 分間遠心分離した。上清を捨て、細胞ペレットを 4 m l の L B + a m p 培地に再懸濁し、1 : 1 0 0 で L B / a m p 培地に接種し、8 時間成長させた。細胞培養培地には、I P T G を加えなかった。

【0052】

[0052] 細胞を、培養物 (4 0 0 m l) から、6 , 0 0 0 g にて 2 0 分間の遠心分離により採集した。細胞ペレットを 2 0 m M の T r i s - C l 、p H 8 . 0 (0 . 5 m M P M S F を加えた 0 . 3 m l の 5 0 m M P M S F 、6 0 μ l の 1 M 6 - アミノカブロン酸及び 6 0 μ l の 0 . 5 M ベンズアミジン H C l 、T r i s 緩衝液を加えることにより 3 0 m l の最終容量に調整) に再懸濁した。

10

【0053】

[0053] 細胞を、2 0 , 0 0 0 p s i のフレンチプレスに 3 回通すことにより破壊した。抽出物を 1 0 , 0 0 0 r p m にて 2 0 分間遠心分離した。上清を捨て、ペレット (封入体) を 2 0 m l の T r i s 緩衝液に再懸濁した。2 m l の 2 0 % T r i t o n X - 1 0 0 を各チューブに加え、試料の容量を T r i s 緩衝液で 4 0 m l に調整した。チューブを室温にて 1 時間より長く、振とうしながらインキュベートし、1 0 , 0 0 0 r p m にて 2 0 分間遠心分離した。上清を捨て、ペレットを、2 5 m l の T r i s 緩衝液に再懸濁し、遠心分離することにより T r i s 緩衝液で 2 回、及び 2 5 m l の純水で 1 回洗浄した。

20

【0054】

[0054] 封入体の可溶化を、次のようにして行った。ペレットを 2 0 m l の水及び 4 m l の 0 . 5 M C A P S 緩衝液、p H 1 1 (5 0 m M 最終濃度) に再懸濁し、4 0 μ l の 1 M D T T (1 m M 最終濃度) 及び 0 . 4 m l の 3 0 % ラウロイルサルコシナトリウム (0 . 3 % 最終濃度) を加えた。試料の容量を、水で 4 0 m l に調整した。試料を室温にて 1 7 時間インキュベートした。

【0055】

[0055] 組換え切断型 a r N O X のリフォールディングを、次のようにして行った。可溶化の後に、試料を 1 0 , 0 0 0 r p m にて 2 0 分間遠心分離し、上清を回収した。上清を、0 . 4 5 μ m ニトロセルロースフィルタを通して濾過した。濾液を 2 つの透析バッグ (3 5 0 0 M W C O 、平坦幅 4 5 m m 及び直径 2 9 m m 、S p e c t r a P o r) に注ぎ、冷却透析緩衝液 1 (2 5 m M T r i s - H C l 、p H 8 . 5 、1 m M システアミン、0 . 1 m M シスタミン、1 m M 6 - アミノカブロン酸及び 0 . 5 m M ベンズアミジン H C l) に対して 3 回交換して、冷却透析緩衝液 2 (2 5 m M T r i s - H C l 、p H 8 . 0 、1 m M 6 - アミノカブロン酸及び 0 . 5 m M ベンズアミジン H C l) に対して 1 回交換して、そして透析緩衝液 3 (5 0 m M T r i s - H C l 、p H 8 . 0 、1 m M 6 - アミノカブロン酸及び 0 . 5 m M ベンズアミジン H C l) に対して 1 回交換して透析した。透析は、各交換の後に少なくとも 1 7 時間であった。

30

【0056】

[0056] 透析の後に、P M S F を 0 . 5 m M の最終濃度まで加え、試料を 1 0 , 0 0 0 r p m にて 2 0 分間遠心分離した。上清を回収し、約 1 6 m l に、セントリプラス (C e n t r i p l u s) 濃縮器 (A m i c o n 、M W C O 1 0 , 0 0 0 ; 4 7 0 0 r p m 、2 8 0 0 × g) を用いて濃縮した。リフォールディングされた a r N O X を、マイクロ遠心チューブに 0 . 5 m l で分割し、- 8 0 で貯蔵した。

40

【0057】

実施例 2 . 組換え a r N O X の特徴決定

[0057] スーパーオキシドによるフェリシトクロム c の低減を、スーパーオキシド形成の標準的な指標として採用した (M a y o , L . A . 及び C u r n u t t e , J . 、1 9 9 0 、M e t h . E n z y m o l . 1 8 6 : 5 6 7 ~ 5 7 5 ; B u t l e r , J . ら、1 9

50

82、J. Biol. Chem. 257: 10747~10750)。この方法は、スーパーオキシドジスムターゼ阻害と組み合わせて、スーパーオキシド発生の測定として一般的に受け入れられている。アッセイは、PBSG緩衝液(8.06g NaCl、0.2g KCl、0.18g Na_2HPO_4 、0.13g CaCl_2 、0.1g MgCl_2 、1.35g グルコースを1000ml 脱イオン水に溶解し、pH7.4に調整し、濾過し、4℃にて貯蔵)中の150 μl のパフィーコート材料からなる。スーパーオキシドによるフェリシクロムcの低減を、540nmを参照とし、550nmの吸光度の増加としてモニターした(Butlerら、1982)。arNOX活性の特異性についてのさらなる対照として、60単位のスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)をアッセイの終わり近くに加えて、速度をベースラインに確実に戻した。速度は、SLMアミンコ(Aminco)DW-2000分光光度計を二重波長モードの操作で用いて決定した。

10

【0058】

[0058]速度は、SLMアミンコDW-2000分光光度計(Milton Roy, Rochester, NY)を二重波長モードの操作で、1.5分ごとに1分間の連続測定で用いて決定した。45分後に、試験化合物を加え、反応をさらに45分間継続した。45分後に、19.1 cm^{-1} のミリモル吸光係数を、低減されたフェリシクロムcについて用いた。試験化合物の結果を、TM9SF4を用いて行った実験について以下(表4)に示すが、図7の結果から、全てのarNOXアイソフォームが、以下に示す種々の化合物に対して同様の応答を有すると結論付けられる。抽出物は、そうでないと記載しない限り、水中の化合物で構成された。

20

【0059】

[0059]表4. 組換えarNOX(TM9SF4)の特性
シミリカラクトンドに対して26分の期間耐性
スーパーオキシドジスムターゼにより78%阻害
arNOX阻害剤セイボリーにより70%阻害
arNOX阻害剤没食子酸により80%阻害
3方阻害剤(ドルミン+シザンドラ+サリシン)により70%阻害

【0060】

[0060]本明細書で引用する参考文献は全て、それらが本開示と矛盾しない程度でその全体が参照により本明細書に組み込まれている。

30

【0061】

[0061]本明細書で言及する全ての特許及び出版物は、本発明が関する当該技術における当業者のレベルを示す。本明細書で引用する参考文献は、いくつかの場合においてそれらの出願日における技術水準を示すために、その全体が本明細書に参照により組み込まれ、この情報は、本明細書において、必要であれば採用して、従来技術における特定の実施形態を除く(例えば放棄する)ことができる。例えば、ある化合物が請求される場合、本明細書に開示される参考文献(特に参照された特許文献)に開示されるある化合物を含む、従来技術において既知の化合物は、請求項に含まれないことが意図されると理解される。

【0062】

[0062]マーカッシュグループ又はその他のグループ分けが本明細書で用いられる場合、群の全ての個別のメンバー、並びに群から可能な全ての組み合わせ及び副次的な組み合わせは、本開示に個別に含まれることが意図される。

40

【0063】

[0063]記載されるか又は例示される製剤又は成分の組み合わせは全て、そうでないと記載しない限り、本発明を行うために用いることができる。タンパク質又はコード配列又は遺伝子の具体的な名称は、例示であることを意図する。なぜなら、当業者は、同じ遺伝子又はタンパク質に別の名称を付けることができるからである。例えば、化合物が、タンパク質の特定のアイソフォームが特定されないように記載されている場合、その記載は、個別又は任意の組み合わせで記載される各アイソフォームを含むことを意図する。

【0064】

50

[0064]当業者は、具体的に例示されたもの以外のベクター、プロモーター、コード方法、出発材料、合成方法などを、過度の実験を行うことなく本発明を行うために採用できることを認識している。任意のこのような方法、ベクター、プロモーター、コード配列、合成方法などの当該分野において既知の機能的等価物は全て、本記載に含まれると意図される。

【 0 0 6 5 】

[0065]明細書中において範囲、例えば温度範囲、時間範囲、配列に関する範囲又は組成物の範囲が示される場合、全ての中間の範囲及び副次的な範囲並びに示されるこれらの範囲に含まれる全ての個別の値が、本明細書に含まれることが意図される。

【 0 0 6 6 】

[0066]本明細書で用いる場合、「含む (c o m p r i s i n g) 」は、「含む (i n c l u d i n g) 」、「含有する」又は「特徴とする」と同義であり、包括的又は制限がなく、追加の記載されていない要素又は方法ステップを排除しない。本明細書で用いる場合、「からなる」は、請求項の要素において明記されない任意の要素、ステップ又は成分を排除する。本明細書で用いる場合、「から本質的になる」は、請求項の基本的で新規な特徴に実質的に影響しない材料又はステップを排除しない。本明細書、特に組成物の成分の記載又はデバイスの要素の記載における「含む」との用語についてのいずれの記述も、記述された成分又は要素から本質的になり、そして該成分又は要素からなるこれらの組成物及び方法を包含すると理解される。本明細書に説明される本発明は、本明細書に具体的に開示されないいずれの1又は複数の要素、1又は複数の限定が存在せずに、適切に行うことができる。

【 0 0 6 7 】

[0067]採用された用語及び表現は、制限でなく記載の用語として用いられ、そのような用語及び表現の使用は、示され記載される特徴の任意の等価物又はその部分を除外することを意図しないが、請求される本発明の範囲内で種々の変形が可能であることが認識される。つまり、本発明は、好ましい実施形態により具体的に開示されているが、本明細書に開示される概念の任意選択の特徴、改変及び変動を、当業者が用いることができ、そのような改変及び変動は、添付の特許請求の範囲内であるとみなされると理解される。

【 0 0 6 8 】

[0068]本明細書で用いる場合、本開示のある態様は、単離核酸及び単離核酸の使用方法に関する。あるいくつかの実施形態において、本明細書で開示される核酸配列及びその選択された領域は、ハイブリダイゼーションプローブ又は増幅プライマーとして有用性を有する。これらの核酸は、例えば、組織試料の診断評価において用いることができる。あるいくつかの実施形態において、これらのプローブ及びプライマーは、オリゴヌクレオチド断片からなる。このような断片は、RNA又はDNA組織試料との特異的ハイブリダイゼーションをもたらすために十分な長さのものである。配列は、典型的には10～20ヌクレオチドであるが、より長くてもよい。より長い配列、例えば40、50、100、500及び全長までさの配列は、あるいくつかの実施形態のために好ましい。

【 0 0 6 9 】

[0069]開示される核酸配列から選択される配列からの約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、250、300、400、500、600、750、1000、1500、2000、2500又はそれより多いヌクレオチドの連続するストレッチを有する核酸分子が企図される。上記の配列に相補的な分子、及び高いストリンジェントの条件下でこれらの配列と結合する分子も企図される。これらのプローブは、サザン及びノーザンブロットングのような種々のハイブリダイゼーションの実施形態において有用である。

【 0 0 7 0 】

[0070] 14と100ヌクレオチドの間の長さのハイブリダイゼーションプローブの使用により、安定で選択的な二重分子の形成が可能になる。20塩基の長さを超えるストレッチに対する相補配列を有する分子が、ハイブリッドの安定性及び選択性を増加させ、そのことにより、得られる特定のハイブリッド分子の質及び程度を改善するために、通常、好ましい。20～30ヌクレオチド、又は所望によりさらにより長いストレッチを有する核酸分子を設計することが、通常、好まれる。このような断片は、例えば、化学的手段により又は選択された配列を組換え生成のための組換えベクターに導入することにより断片を直接合成することにより、容易に調製できる。

【0071】

[0071] よって、本明細書におけるヌクレオチド配列は、遺伝子若しくはRNAの相補的なストレッチと二重分子を選択的に形成するか、又は組織からのDNA若しくはRNAの増幅のためのプライマーを提供するそれらの能力について用いることができる。構想される用途に応じて、標的配列に対する種々の程度のプローブの選択性を達成するために、種々のハイブリダイゼーション条件を採用することを所望することがある。

【0072】

[0072] 高い選択性が要求される用途について、ハイブリッドを形成するために比較的ストリンジェントな条件を典型的に採用し、例えば、約0.02M～約0.10M NaClで約50～約70の温度によりもたらされるような、比較的低い塩及び/又は高い温度条件を選択する。このような高いストリンジェンシー条件は、プローブと鋳型又は標的鎖との間のミスマッチが存在するとすればそのミスマッチにほとんど耐えず、特異的遺伝子を単離するか、又は特異的mRNA転写産物を検出するために特に適切である。条件は、加えるホルムアミドの量を増加させることにより、よりストリンジェントにできることが一般的に認識されている。

【0073】

[0073] あるいくつかの用途について、より低いストリンジェンシーの条件が必要である。これらの条件下では、ハイブリダイゼーションは、プローブ及び標的鎖の配列が完全に相補的でなく、1又は複数の位置でミスマッチがあっても生じる。塩濃度を増加し、温度を減少させることにより、条件をより低いストリンジェンシーにできる。例えば、中程度のストリンジェンシーの条件は、約0.1～0.25M NaClで約37～約55の温度によりもたらされるが、低いストリンジェンシーの条件は、約0.15M～約0.9Mの塩で、約20～約55の範囲の温度によりもたらすことができる。よって、ハイブリダイゼーション条件は、容易に操作でき、よって、一般的に、所望の結果に応じて選択される方法である。

【0074】

[0074] その他の実施形態において、ハイブリダイゼーションは、例えば、50mM Tris-HCl (pH 8.3)、75mM KCl、3mM MgCl₂、10mMジチオトレイトールでおよそ20の温度の条件下で達成できる。用いるその他のハイブリダイゼーション条件は、およそ10mMのTris-HCl (pH 8.3)、50mM KCl、1.5μM MgCl₂でおよそ40～約72の範囲の温度を含み得る。

【0075】

[0075] あるいくつかの実施形態において、本明細書に記載される核酸配列を、ハイブリダイゼーションを決定するために、標識のような適切な手段と組み合わせて採用することが有利である。検出され得る蛍光、放射活性、酵素又はアビジン/ビオチンのようなその他のリガンドを含む広範囲の適当な指示物質が、当該技術において知られている。好ましい実施形態において、蛍光標識又はウレアーゼ、アルカリホスファターゼ又はペルオキシダーゼのような酵素タグを、放射活性又はその他の環境的に望ましくない試薬の代わりに採用することを所望することがある。酵素タグの場合、人の目又は分光光度測定的に可視の検出手段を提供して、相補核酸含有試料との特異的ハイブリダイゼーションを同定するために採用できる熱量的な指示基質が知られている。

【0076】

[0076]一般的に、本明細書に記載されるハイブリダイゼーションプローブは、対応する遺伝子の発現を検出するための、PCRのような溶液ハイブリダイゼーション、及び固相を採用する実施形態における試薬の両方として有用である。固相を含む実施形態において、試験DNA（又はRNA）は、選択されたマトリクス若しくは表面に吸着されるか又はそうでなければ付着される。このようにして固定された1本鎖核酸を、次いで、選択されたプローブとの所望の条件下でのハイブリダイゼーションに供する。選択された条件は、要求される特定の基準に基づく特定の状況に依存する（例えばG+C含量、標的核酸のタイプ、核酸の供給源、ハイブリダイゼーションプローブのサイズなどに依存する）。非特異的に結合したプローブ分子を除去するためのハイブリダイズした表面の洗浄の後に、ハイブリダイゼーションを、標識により検出するか又は定量する。

10

【0077】

[0077]本明細書に開示される方法は、開示される特定のプローブに限定されず、開示される配列にハイブリダイズ可能な核酸配列を少なくとも包含するか、又はこれらの配列の機能的配列類似体であることを特に意図する。例えば、部分配列を用いて、構造が関連する遺伝子又はそれが由来する全長ゲノム若しくはcDNAクローンを同定できる。当業者は、上記のプローブについての標的として用いることができるcDNA又はゲノムライブラリーを作製する方法をよく知っている（Sambrookら、1989）。

【0078】

[0078]本発明の核酸セグメントを、本明細書に開示されるプラスミドのようなベクターに組み込む用途について、これらのセグメントは、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、制限酵素部位、マルチクローニングサイト、その他のコードセグメントなどのようなその他のDNA配列と組み合わせて、それらの全体の長さが著しく変動することがある。ほぼどんな長さの核酸断片も用いてよく、全長は、好ましくは、調製の容易さと意図する組換えDNAプロトコールにおける使用とにより制限されることが企図される。

20

【0079】

[0079]特定の遺伝子をコードするDNAセグメントを、組換え宿主細胞に導入して、特定の構造又は調節タンパク質を発現するために採用することができる。代わりに、遺伝子工学の技術を用いることにより、選択された遺伝子の副次的な部分又は誘導体を採用できる。プロモーター領域のように調節領域を含有する上流の領域を単離して、その後、興味対象のコード配列に作動可能に連結した後に、選択された遺伝子の発現のために採用できる。

30

【0080】

[0080]発現生成物を作製する場合、核酸配列を、同じ生成物をコードする能力を保持したまま変動させることが可能である。同義のコード配列を提供するコドンチャートを参照することにより、当業者は、既知のアミノ酸配列のポリペプチド生成物をコードする任意の核酸を設計できる。

【0081】

[0081]プラスミド調製物及び複製手段は、当該技術において公知である。例えば米国特許第4,273,875号及び第4,567,146号を参照されたい。

【0082】

[0082]本発明の実施形態は、当該技術において公知の条件及び試薬を用いる、標的遺伝物質の少なくとも一部分の増幅を含む。

40

【0083】

[0083]本明細書におけるあるいくつかの実施形態は、微生物の遺伝物質の少なくとも一部分を増幅するための任意の方法を含む（例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リアルタイムPCR（RT-PCR）、NASBA（核酸配列ベースの増幅））。ある実施形態において、リアルタイムPCR（RT-PCR）を、対象の遺伝物質の少なくとも一部分を増幅し、対象の遺伝物質の増幅の結果を確認するために内部対照プラスミドを同時に増幅するために用いることができる。

【0084】

50

[0084] 本明細書における範囲は、微生物の遺伝物質の少なくとも一部分を増幅するための任意の方法（例えばポリメラーゼ連鎖反応、すなわちPCR、及び核酸配列ベースの増幅、すなわちNASBA）を含むが、例えば、本開示は、RT-PCR技術に関する実施形態に関する。

【0085】

[0085] 典型的に、PCR技術の作業条件を確認するために、陽性及び陰性の外部対象を、例えば増幅のための対照核酸配列を用いて反応条件を試験するための試料チューブと並行する反応において行う。いくつかの実施形態において、内部対照を用いて、RT-PCR反応の条件が特定の標的試料についての特定のチューブ内で働いているかを決定できる。代わりに、いくつかの実施形態において、内部対照を用いて、RT-PCR反応の条件が特定の標的試料について特定の時間で特定のチューブ内で働いているかを決定できる。

10

【0086】

[0086] 対象哺乳動物及び内部対照における遺伝物質のヌクレオチド配列を知ることにより、特異的プライマー配列を設計できる。本発明の一実施形態において、標的哺乳動物のゲノム物質の一部分を増幅するために用いたプライマー対のうちの少なくとも一方のプライマーは、内部対照プラスミドのような内部対照又は興味対象のその他の配列の遺伝物質の一部分を増幅するために用いるプライマー対のうちのプライマーの一方と共通である。一実施形態において、プライマーは、限定されないが、10～50オリゴヌクレオチド長又は約15～40オリゴヌクレオチド長又は約20～30オリゴヌクレオチド長である。適切なプライマー配列は、当業者が容易に合成できるか、又はBRL (New England Biolabs) などの供給業者から容易に入手可能である。PCRのような核酸配列増幅に必要なDNAポリメラーゼ及びヌクレオチドのようなその他の試薬も、商業的に入手可能である。

20

【0087】

[0087] PCR増幅生成物の存在又は非存在は、当業者に知られる技術のいずれを用いても検出できる。ある特定の実施形態において、本発明の方法は、PCR増幅生成物の存在又は非存在を、微生物の特定の遺伝物質とハイブリダイズするプローブを用いて検出することを含む。微生物の遺伝物質の異なる部分とハイブリダイズするPCRプライマー配列及びプローブヌクレオチド配列を設計することにより、本明細書に開示される方法の正確性及び/又は感度を増加できる。

30

【0088】

[0088] 放射活性及び蛍光標識プローブのような種々の標識プローブが利用可能であるが、ある特定の実施形態において、方法は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)標識プローブを、内部ハイブリダイゼーションプローブとして用いる。特定の実施形態において、内部ハイブリダイゼーションプローブは、PCR増幅生成物が形成されるにつれて生成物が検出され、そのことによりPCR後の処理時間を短縮するように、PCR反応混合物に含まれる。RocherライトサイクラーPCR装置(米国特許第6,174,670号)又はその他のリアルタイムPCR装置を、この実施形態において用いることができ、例えば米国特許第6,814,934号を参照されたい。いくつかの場合において、リアルタイムPCR増幅及び検出は、全アッセイ時間を著しく低減する。よって、本明細書の方法は、迅速及び/又は高度に正確な結果をもたらす、これらの結果は、内部対照により確認される。

40

【0089】

[0089] あるいくつかの実施形態において、DNA断片を、興味対象の細胞に、別のポリヌクレオチドセグメントを付着させ、そのことにより付着されたセグメントの複製及び/又は発現をもたらすレプリコンであるベクターを用いることにより導入できる。ベクターは、1又は複数の制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有することができ、該部位では、ベクターの本質的な生物学的機能を喪失することなく、決定できる様式でDNA配列を切断できる。ベクターは、プライマー部位(例えばPCRのため)、転写及び/又は翻訳の開始及び/又は調節部位、組換えシグナル、レプリコン、選択マーカーなどをさらにもたら

50

することができる。ベクターの例は、プラスミド、ファージ、コスミド、ファージミド、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC)、ヒト人工染色体 (HAC)、ウイルス、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクターのようなウイルスベースのベクター、並びに *in vitro* 若しくは宿主細胞において複製できるか又は複製されるか、或いは所望の DNA セグメントを宿主細胞内の所望の位置に運ぶことができるその他の DNA 配列を含む。ベクターは、例えば、ファージ、プラスミド、ウイルス又はレトロウイルスベクターであり得る。レトロウイルスベクターは、複製能力があるか又は複製能力がないことがある。後者の場合、ウイルス増殖は、通常、相補性宿主細胞でのみ生じる。

【0090】

[0090] ポリヌクレオチドを、宿主での増殖のために、選択マーカ含有するベクターにつないでよい。ベクターがウイルスである場合、ベクターを、適当なパッケージング株化細胞を用いて *in vitro* でパッケージングして、次いで宿主細胞に形質導入することができる。

10

【0091】

[0091] ポリヌクレオチド挿入断片は、いくつかを挙げるとファージラムダ PL プロモーター、大腸菌 (*E. coli*) *lac*、*trp*、*phoA* 及び *tac* プロモーター、SV40 初期及び後期プロモーター並びにレトロウイルス LTR のプロモーターのような適当なプロモーターと作動可能に連結できる。その他の適切なプロモーターは、当業者に知られている。発現コンストラクトは、転写開始、終結についての部位、及び転写された領域において、翻訳のためのリボソーム結合部位をさらに含有する。コンストラクトにより発現される転写産物のコード部分は、好ましくは、始めに翻訳開始コドンと、翻訳されるポリペプチドの最後の適当な位置に終結コドン (UAA、UGA 又は UAG) を含む。

20

【0092】

[0092] 記載するように、発現ベクターは、少なくとも 1 つの選択マーカを含むことができる。例示的なマーカは、それらに限定されないが、真核細胞培養についてジヒドロ葉酸還元酵素、G418、グルタミン合成酵素又はネオマイシン耐性、並びに大腸菌及びその他の細菌における培養についてテトラサイクリン、カナマイシン又はアンピシリン耐性遺伝子を含み得る。適当な宿主の代表例は、それらに限定されないが、大腸菌、放線菌及びサルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) 細胞のような細菌細胞；酵母細胞 (例えばサッカロミセス・セレビシエ又はピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) (ATCC 受託番号 201178)) のような真菌細胞；ショウジョウバエ S2 及びスポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) Sf9 細胞のような昆虫細胞；CHO、COS、293 及びボーズメラノーマ細胞のような動物細胞；並びに植物細胞を含む。適当な培養培地、形質転換技術並びに上記の宿主細胞についての細胞成長及び遺伝子発現の条件は、当該技術において知られている。

30

【0093】

[0093] あるいくつかの実施形態において、細菌について用いるベクターは、それらに限定されないが、QIAGEN, Inc. から入手可能な pQE70、pQE60 及び pQE-9；Stratagene Cloning Systems, Inc. から入手可能な pBluescript ベクター、ファージスクリプトベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A；並びに Pharmacia Biotech, Inc. から入手可能な ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 を含み得る。好ましい真核ベクターは、Stratagene から入手可能な pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1 及び pSG；並びに Pharmacia から入手可能な pSVK3、pBPV、pMSG 及び pSVL である。酵母系での使用のための好ましい発現ベクターは、それらに限定されないが、pYES2、pYD1、pTEF1/Zeo、pYES2/GS、pPICZ、pGAPZ、pGAPZalph、pPIC9、pPIC3.5、pHIL-D2、pHIL-S1、pPIC3.5K、pPIC9K 及び PA0815 (全て Invitrogen、Carlsbad

40

50

、C a l i f . から入手可能)を含む。その他の適切なベクターは、当該技術において容易に入手可能である。

【0094】

[0094]発現ベクターの構築のために用いられる組換えDNA技術は、既知で、当業者により通常用いられるものである。標準的な技術は、クローニング、DNAの単離、増幅及び精製のために用いられている。DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼを含む酵素反応は、製造者の推奨に従って行われる。これらの技術及びその他のものは、S a m b r o o k ら (1 9 8 9) に従って通常行われる。

【0095】

[0095]あるいくつかの実施形態において、単離宿主細胞は、本明細書に記載されるベクターコンストラクトを含有でき、及び/又は単離宿主細胞は、当該技術において既知の技術及び配列を用いて1又は複数の異種制御領域(例えばプロモーター及び/又はエンハンサー)と作動可能に連結された本明細書のヌクレオチド配列を含有できる。宿主細胞は、哺乳類細胞(例えばヒト由来細胞)のような高等真核細胞、又は酵母細胞のような下等真核細胞であり得るか、又は宿主細胞は、細菌細胞のような原核細胞であり得る。宿主株は、挿入された遺伝子配列の発現を調節するか、又は遺伝子生成物を所望の特定の様式で修飾してプロセッシングするように選択できる。あるいくつかのプロモーターからの発現は、ある特定の誘導物質の存在下で上昇し得る。つまり、遺伝子工学的に操作されたポリペプチドの発現は、制御できる。さらに、異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳時及び翻訳後プロセッシング及び修飾(例えばリン酸化、切断)について特徴及び特定の機構を有する。適当な株化細胞は、発現される外来タンパク質の所望の修飾及びプロセッシングを確実にするように選択できる。

10

20

【0096】

[0096]あるいくつかの実施形態は、内因性の遺伝物質(例えばコード配列)を欠失若しくは置き換えるか、及び/又は本明細書のポリヌクレオチドと作動可能に関連し、内因性ポリヌクレオチドを活性化、変更及び/又は増幅する遺伝物質(例えば異種ポリヌクレオチド配列)を含むように工学的に操作された、脊椎動物起源、特に哺乳類起源の初代、2次及び不死化宿主細胞も包含する。例えば、当該技術において既知の技術を用いて、異種制御領域(例えばプロモーター及び/又はエンハンサー)と内因性ポリヌクレオチド配列を、相同組換えにより作動可能に関連させることができる(例えば米国特許第5,641,670号;WO96/29411;WO94/12650;K o l l e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 86:8932~8935(1989);及びZ i j l s t r a ら、N a t u r e 342:435~438(1989)を参照されたい)。

30

【0097】

[0097]増幅のための鋳型として用いる核酸は、標準的な方法に従って、生体試料に含まれる細胞から単離できる(S a m b r o o k ら、1989)。核酸は、ゲノムDNA又は分画若しくは全細胞RNAであり得る。RNAを用いる場合、RNAを相補的cDNAに変換することが望ましいことがある。ある実施形態において、RNAは全細胞RNAであり、増幅のための鋳型として直接用いられる。

40

【0098】

[0098]特異的マーカーに相当する核酸と選択的にハイブリダイズするプライマーの対を、単離核酸と、選択的ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で接触させる。一旦ハイブリダイズすると、核酸:プライマー複合体を、鋳型依存的核酸合成を容易にする1又は複数の酵素と接触させる。「サイクル」とも呼ばれる複数の回の増幅を、十分な量の増幅生成物が生成されるまで行う。

【0099】

[0099]次に、増幅生成物を検出する。あるいくつかの用途において、検出は、視覚的手段により行うことができる。代わりに、検出は、化学発光、取り込まれた放射性標識若しくは蛍光標識の放射活性シンチレーション写真撮影法、又は電氣的若しくは熱的衝撃シグ

50

ナルを用いる系（中でもアフィマックス（A f f y m a x））さえによる生成物の間接的同定を含み得る。

【 0 1 0 0 】

[00100]本明細書で定義する場合、プライマーとの用語は、鋳型依存的プロセスで発生する核酸の合成を開始できる任意の核酸を包含することを意味する。典型的には、プライマーは、10～20塩基対のオリゴヌクレオチド長であるが、より長い配列を採用できる。プライマーは、二本鎖又は一本鎖の形で供給できるが、一本鎖の形が好ましい。

【 0 1 0 1 】

[00101]いくつかの鋳型依存的プロセスが、所定の鋳型試料中に存在するマーカー配列を増幅するために利用可能である。最もよく知られた増幅法の1つは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCRという）であり、これは、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号及び第4,800,159号並びにInnisら、1990に詳述されている。

10

【 0 1 0 2 】

[00102]逆転写酵素PCR増幅手順を行って、増幅されるmRNAの量を定量できる。RNAをcDNAに逆転写する方法は公知であり、Sambrookら、1989に記載されている。逆転写の代替法は、熱安定性DNAポリメラーゼを利用する。これらの方法は、WO90/07641に記載されている。ポリメラーゼ連鎖反応法は、当該技術において公知である。その他の増幅法は、欧州公開第320308号に開示されるLCR（リガーゼ連鎖反応）のようなPCRとともに当該技術において既知である。

20

【 0 1 0 3 】

[00103]制限エンドヌクレアーゼとリガーゼとを用いて制限部位の一方の鎖にヌクレオチド5'-[アルファ-チオ]-三リン酸を含有する標的分子の増幅を達成する等温増幅法も、本明細書における核酸の増幅に有用なことがある。鎖置換増幅（SDA）は、核酸の等温増幅を行う別の方法であり、これは、鎖置換及び合成、すなわちニクトランスレーションの複数のラウンドを含む。修復連鎖反応（RCR）と呼ばれる同様の方法は、増幅の標的にする領域にわたっていくつかのプロープをアニーリングすることと、4つの塩基のうち2つだけが存在するその後の修復反応とを含む。その他の2つの塩基は、容易な検出のためのビオチン化誘導体として付加され得る。同様のアプローチが、SDAで用いられる。標的特異的配列は、環状プロープ反応（CPR）でも検出できる。CPRでは、非特異的DNAの3'及び5'配列と特異的RNAの中間の配列とを有するプロープが、試料中に存在するDNAとハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションの際に、反応をRNAアーゼHで処理し、プロープの生成物が、消化の後に放出される特異な生成物として同定される。元の鋳型は、別の環状プロープにアニーリングして、反応が繰り返される。当該技術において既知のさらにその他の増幅法を、本明細書に記載される方法とともに用いることができる。

30

【 0 1 0 4 】

[00104]増幅の後に、特異的増幅が生じたかどうかを決定するために増幅生成物を、鋳型及び過剰のプライマーから分離することが望ましいことがある。増幅生成物は、標準的な方法を用いるアガロース、アガロース-アクリルアミド又はポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離できる。Sambrookら、1989を参照されたい。

40

【 0 1 0 5 】

[00105]代わりに、クロマトグラフィーの技術を採用して、増幅生成物又はその他の分子を分離できる。用いることができる多くの種類のクロマトグラフィー：吸着、分配、イオン交換及び分子ふるい、並びにカラム、ペーパー、薄層及びガスクロマトグラフィーを含む、当該技術において既知の、それらを用いるための多くの特化された技術が存在する。

【 0 1 0 6 】

[00106]増幅生成物は、マーカー配列の増幅を確認するために可視化できる。ある典型的な可視化方法は、臭化エチジウムでのゲルの染色と、UV光の下での可視化とを含む。

50

代わりに、増幅生成物に放射性標識又は蛍光標識ヌクレオチドが組み込まれて標識されているならば、増幅生成物を x 線フィルムに露光できるか、又は分離の後に適当な刺激スペクトルの下で可視化できる。

【0107】

[00107]可視化は、間接的に達成することができる。増幅生成物の分離の後に、標識された核酸プローブを、増幅マーカ配列と接触させる。プローブは、好ましくは、発色団とコンジュゲートされているが、放射性標識することができる。別の実施形態において、プローブは、抗体又はビオチンのような結合パートナーとコンジュゲートされ、結合対の他方のメンバーが検出可能な部分を有する。

【0108】

[00108]一般的に、本明細書において有用なベクターの構築における DNA 配列のクローニングのために用いられる原核生物は、それらに限定されないが、大腸菌 K12 株又は W3110 株のような任意のグラム陰性細菌を含み得る。用いることができるその他の微生物株は、シュドモナス・エルギノサ (*P. aeruginosa*) PAO1 株及び大腸菌 B 株を含み得る。これらの例は、限定するよりもむしろ、説明のためである。ライブラリーを構築するための細菌宿主のその他の例は、それらに限定されないが、エシェリキア (*Escherichia*)、シュドモナス (*Pseudomonas*)、サルモネラ (*Salmonella*)、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) 及びバチルス (*Bacillus*) を含む。

【0109】

[00109]一般的に、宿主細胞と適合する種に由来するプロモーター及び制御配列を含有するプラスミドベクターを、これらの宿主とともに用いる。ベクターは、通常、複製部位と、形質転換細胞において表現型による選択を可能にする 1 又は複数のマーカ配列とを有する。例えば、多くのグラム陰性細菌株において有用な PBBR1 レプリコン領域又は広範囲のグラム陰性宿主細菌において有用な任意のその他のレプリコン領域を、本発明において用いることができる。

【0110】

[00110]原核宿主とともに用いるために適切なプロモーターは、説明のために、 λ -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系を含む。その他の実施形態において、原核宿主細胞において用いられる発現ベクターは、任意の適切なプロモーターから発現できる特異的 mRNA 配列をコードする特異的遺伝子の効率的な翻訳のために必要な配列も含有できる。これは、プロモーターと、その後のリボソーム結合部位又は mRNA をコードする DNA と作動可能に連結されたシャイン・ダルガーノ (S.D.) 配列を組み込むことを必要とする。

【0111】

[00111]所望のコード配列及び制御配列を含有する適切なベクターの構築は、標準的なライゲーション技術を採用する。単離プラスミド又は DNA 断片を切断し、調整し、所望の形態に再びライゲーションして、要求されるプラスミドを形成する。

【0112】

[00112]構築されたプラスミドにおける正しい配列を確認するための分析のために、ライゲーション混合物を用いて、大腸菌 K12 のような細菌株を形質転換し、成功した形質転換体を、適切であればテトラサイクリンのような抗生物質耐性により選択する。形質転換体からのプラスミドを調製し、制限により分析し、及び / 又は配列決定する。

【0113】

[00113]単離宿主細胞を、発現ベクターで形質転換でき、プロモーターの誘導、形質転換体の選択又は遺伝子の増幅のために適当であるように改変された従来の栄養培地で培養できる。温度、pH などのような培養条件は、発現のために選択した宿主細胞とともに以前に用いたものであり、当業者に明らかである。

【0114】

[00114]形質転換とは、任意のコード配列が実際に発現されるかされないかによらず、

10

20

30

40

50

宿主細胞による発現ベクターの取り込みのことをいう。興味対象のDNA分子を単離宿主細胞に導入するための多くの方法、例えばCa塩及びエレクトロポレーションが当該技術において知られている。形質転換の成功は、ベクターの作動の任意の指標が宿主細胞内で生じる場合に、一般的に認識される。

【0115】

[00115] DNAの消化とは、DNA中のある配列でのみ作用する制限酵素でのDNAの触媒による切断のことをいう。本明細書で用いる種々の制限酵素が商業的に利用可能であり、それらの反応条件、補因子及びその他の要件は、当該技術において知られるとおりを用いた。

【0116】

[00116] 制限消化からの所定のDNA断片の回収又は単離とは、消化物を電気泳動によりポリアクリルアミド又はアガロースゲル上で分離すること、興味対象の断片を、既知の分子量のマーカーDNA断片のものに対してその移動度を比較することにより同定すること、所望の断片を含有するゲル区画を取り出すこと及びDNAをゲルから分離することを意味する。この手順は、一般的に知られている(Lawn, R.ら、Nucleic Acids Res. 9: 6103-6114 [1981] 及びGoeddel, D.ら、Nucleic Acids Res. 8: 4057 [1980])。

【0117】

[00117] 脱リン酸化とは、細菌アルカリホスファターゼ(BAP)での処理による末端5'リン酸の除去のことをいう。この手順は、DNA断片の2つの制限切断された末端が、「環化」又は閉鎖ループを形成して制限部位での別のDNA断片の挿入を妨げることを防ぐ。脱リン酸化のための手順及び試薬は、従来のものである(Maniatis, T.ら、Molecular Cloning、133~134、Cold Spring Harbor、[1982])。BAPを用いる反応は、50mM Tris中で68にて行って、酵素調製物中に存在し得るいずれのエキソヌクレアーゼの活性も抑制する。反応は、1時間行う。反応の後に、DNA断片をゲル精製する。

【0118】

[00118] ライゲーションとは、2つの二本鎖核酸断片間のホスホジエステル結合の形成のプロセスのことをいう(Maniatis, T.ら、1982、146)。そうでないと示さない限り、ライゲーションは、既知の緩衝液及び条件を用いて、10単位のT4 DNAリガーゼ(「リガーゼ」)をライゲーションするDNA断片のおよそ等モルの0.5 µgあたりに用いて達成できる。

【0119】

[00119] 充填又は平滑末端化とは、制限酵素で切断した核酸の付着末端における一本鎖の端を二本鎖に変換することをいう。このことにより、付着末端がなくなり、平滑末端が形成される。このプロセスは、1つだけ又はいくつかのその他の制限酵素により創出される端と付着性であり得る制限切断端を、任意の平滑切断制限エンドヌクレアーゼに適合する末端又はその他の充填された付着末端に変換するために用途が広いツールである。一実施形態において、平滑末端化は、2~20 µg付近の標的DNAを、10mM MgCl₂、1mMジチオトレイトール、50mM NaCl、10mM Tris(pH 7.5)緩衝液中で約37にて8単位のDNAポリメラーゼIのクレノー断片と250 µMの4つの各デオキシヌクレオチド三リン酸との存在下でインキュベートすることにより達成される。インキュベーションは、通常、30分後に、フェノール及びクロロホルム抽出とエタノール沈殿を用いて終結される。

【0120】

[00120] 本明細書において交換可能に用いられるように、「核酸分子(複数可)」、「オリゴヌクレオチド(複数可)」及び「ポリヌクレオチド(複数可)」との用語は、RNA若しくはDNA(一本鎖若しくは二本鎖、コード、相補又はアンチセンスのいずれも)、又は一本鎖若しくは二重鎖の形態のいずれかの1より多いヌクレオチドのRNA/DNAハイブリッド配列(上記の種のそれぞれが特に明記できるが)を含む。「ヌクレオチド

10

20

30

40

50

」との用語は、本明細書において、一本鎖若しくは二重鎖の形態の任意の長さのRNA、DNA又はRNA/DNAハイブリッド配列を含む分子を記載するための形容詞として用いる。より正確には、「ヌクレオチド配列」との表現は、核酸物質自体を包含し、よって、特定のDNA又はRNA分子を生化学的に特徴づける配列情報（例えば4つの塩基の文字から選択される文字の羅列）に限定されない。「ヌクレオチド」との用語は、本明細書において、個別のヌクレオチド又はヌクレオチドの種類のことをいい、プリン若しくはピリミジン、リボース若しくはデオキシリボース糖部分及びリン酸基、又はオリゴヌクレオチド若しくはポリヌクレオチド内のヌクレオチドの場合はホスホジエステル結合を含む、より大きい核酸分子中の分子又は個別の単位を意味する名詞としても用いられる。「ヌクレオチド」との用語は、本明細書において、(a)代替連結基、(b)プリンの類似形態、(c)ピリミジンの類似形態又は(d)類似糖のような少なくとも1つの修飾を含む「修飾ヌクレオチド」を包含するためにも用いられる。類似連結基、プリン、ピリミジン及び糖の例については、例えばW095/04064（その開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている）を参照されたい。本発明の好ましい修飾は、それらに限定されないが、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルグアノシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルグアノシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)ワイプトキソシン、シュードウラシル、グアノシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、5-メチル-2-チオウラシル、3-（3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル）ウラシル、及び2,6-ジアミノプリンを含む。本明細書のポリヌクレオチド配列は、合成、組換え、ex vivo作製又はそれらの組み合わせを含む任意の既知の方法により、及び当該技術において既知の任意の精製方法を利用することにより調製できる。メチレンメチルイミノ連結オリゴヌクレオチド及び混合主鎖化合物は、米国特許第5,378,825号；第5,386,023号；第5,489,677号；第5,602,240号；及び第5,610,289号に記載されるようにして調製できる。ホルムアセタール及びチオホルムアセタール連結オリゴヌクレオチドは、米国特許第5,264,562号及び第5,264,564号に記載されるようにして調製できる。エチレンオキシド連結オリゴヌクレオチドは、米国特許第5,223,618号に記載されるようにして調製できる。ホスフィネートオリゴヌクレオチドは、米国特許第5,508,270号に記載されるようにして調製できる。アルキルホスホネートオリゴヌクレオチドは、米国特許第4,469,863号に記載されるようにして調製できる。3'-デオキシ-3'-メチレンホスホネートオリゴヌクレオチドは、米国特許第5,610,289号又は第5,625,050号に記載されるようにして調製できる。ホスホラミダイトオリゴヌクレオチドは、米国特許第5,256,775号又は第5,366,878号に記載されるようにして調製できる。アルキルホスホチオエートオリゴヌクレオチドは、W094/17093及びW094/02499に記載されるようにして調製できる。3'-デオキシ-3'-アミノホスホラミデートオリゴヌクレオチドは、米国特許第5,476,925号に記載されるようにして調製できる。ホスホトリエステルオリゴヌクレオチドは、米国特許第5,023,243号に記載されるようにして調製できる。ボラノホスフェートオリゴヌクレオチドは、米国特許第5,130,302号及び第5,177,198号に記載されるようにして調製できる。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 1 】

[00121]「上流」との用語は、本明細書において、特定の参照点からポリヌクレオチドの5'端に向かう位置のことをいう。

【 0 1 2 2 】

[00122]「塩基対形成した」及び「ワトソンクリック塩基対形成した」との用語は、本明細書において交換可能に、チミン又はウラシル残基がアデニン残基と2つの水素結合により連結し、シトシンとグアニン残基が3つの水素結合により連結される、二重らせんDNAで見出されるような様式で、それらの配列が何であるかにより互いに水素結合できるヌクレオチドのことをいう。

【 0 1 2 3 】

[00123]「相補的な」又は「その相補鎖」との用語は、本明細書において、相補性領域の全体にわたって別の特定されたポリヌクレオチドとワトソンクリック塩基対を形成できるポリヌクレオチドの配列のことをいう。本発明の目的のために、第1ポリヌクレオチドは、第1ポリヌクレオチドにおける各塩基がその相補的塩基と対形成するならば、第2ポリヌクレオチドと相補的であるとみなされる。相補的塩基は、通常、AとT（又はAとU）又はCとGである。「相補鎖」とは、本明細書において、「相補的ポリヌクレオチド」、「相補的核酸」及び「相補的ヌクレオチド配列」と同義として用いられる。これらの用語は、それらの配列のみに基づくポリヌクレオチドの対について用いられ、2つのポリヌクレオチドが実際に結合する条件のいずれの特定の組についても用いない。そうでないと述べない限り、全ての相補的ポリヌクレオチドは、考慮するポリヌクレオチドの全長で完全に相補的である。

【 0 1 2 4 】

[00124]本明細書において交換可能に用いられる「ポリペプチド」及び「タンパク質」との用語は、ポリマーの長さに関係なく、アミノ酸のポリマーのことをいう。よって、ペプチド、オリゴペプチド及びタンパク質は、ポリペプチドの定義の中に含まれる。本明細書のポリペプチドの化学的及び発現後修飾は、具体的な実施形態に含まれ排除され得るが、この用語は、本明細書のポリペプチドの化学的若しくは発現後修飾を特定又は排除しない。よって、例えば、グリコシル基、アセチル基、リン酸基、脂質基などの共有結合による付着を含むポリペプチドの修飾は、ポリペプチドとの用語に明白に包含される。さらに、これらの修飾を有するポリペプチドは、本発明に含まれるか又は本発明から排除されるように個別の種として特定できる。上記の例に列挙したもののような天然又はその他の化学的修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖及びアミノ末端又はカルボキシ末端を含むポリペプチドのどこでも生じることができる。所定のポリペプチド中のいくつかの位置にて、同じ又は異なる程度で同じタイプの修飾が存在できることが認識される。また、所定のポリペプチドは、多くのタイプの修飾を含有できる。ポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として分岐してもよく、これらは、分岐を有するか又は有さない環状であってもよい。修飾は、当該技術において知られるように、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合による付着、ヘム部分の共有結合による付着、ヌクレオチド若しくはヌクレオチド誘導体の共有結合による付着、脂質若しくは脂質誘導体の共有結合による付着、ホスファチジルイノシトールの共有結合による付着、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合的架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPⅠアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、peg化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなトランスファーRNA媒介によるタンパク質へのアミノ酸の付加、及びユビキチン化を含む。アミノ酸の1又は複数の類似体を含むポリペプチド（例えば非天然アミノ酸、関係しない生物系においてのみ天然に存在するアミノ酸、哺乳類の系からの改変アミノ酸など）、置換された結合を有するポリペプチド、並びに天然に存在するものと天然に存在しないものの両方の、当該技術において既知のその他の修飾も、定義に含まれる。

10

20

30

40

50

本明細書で用いる場合、「組換えポリヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド構築物」との用語は、交換可能に、人工的に設計され、それらの最初の天然環境において連続ヌクレオチド配列として見出されない少なくとも2ヌクレオチド配列を含む、線状又は環状の、精製又は単離されたポリヌクレオチドのことをいうために用いられる。特に、これらの用語は、ポリヌクレオチド又はcDNAが、それが天然の環境では隣接していない「主鎖」核酸に隣接することを意味する。本発明による主鎖分子は、発現ベクターのような核酸、自己複製核酸、ウイルス、組み込み核酸及び興味対象の核酸挿入物を維持若しくは操作するために用いられるその他のベクター又は核酸を含む。

【0125】

[00125]本明細書で用いる場合、「作動可能に連結された」との用語は、機能的関係でのポリヌクレオチドエレメントの連結のことをいう。プロモーターのような調節配列と「作動可能に連結した」配列とは、該調節エレメントが、RNAポリメラーゼ開始及び興味対象の核酸の発現を制御するための核酸の関係において正しい位置及び方向にあることを意味する。例えば、プロモーター又はエンハンサーは、それがコード配列の転写に影響する場合は、コード配列と作動可能に連結されている。

【0126】

[00126]ある実施形態において、ポリヌクレオチドは、少なくとも15、30、50、100、125、500又は1000の連続ヌクレオチドである。別の実施形態において、ポリヌクレオチドは、300kb、200kb、100kb、50kb、10kb、7.5kb、5kb、2.5kb、2kb、1.5kb又は1kbと等しいか又はそれ未満の長さである。さらなる実施形態において、本明細書のポリヌクレオチドは、本明細書に開示されるコード配列の一部を含むが、任意のイントロンの全て又は一部分は含まない。別の実施形態において、コード配列を含むポリヌクレオチドは、ゲノムフランキンク遺伝子のコード配列を含有しない（すなわち、ゲノム中の興味対象の遺伝子の5'又は3'）。別の実施形態において、ポリヌクレオチドは、1000、500、250、100、75、50、25、20、15、10、5、4、3、2又は1より多い天然に存在するゲノムフランキンク遺伝子（複数可）を含有しない。

【0127】

[00127]検出可能なプローブとハイブリダイズできる核酸の存在を検出するために用いる手順は、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、ドットブロッティング、コロニーハイブリダイゼーション、及びブランクハイブリダイゼーションのように公知の技術を含む。いくつかの用途において、標識されたプローブとハイブリダイズできる核酸は、発現ベクター、配列決定ベクター又はin vitro転写ベクターのようなベクターにクローニングして、試料中のハイブリダイズする核酸の特徴決定及び発現を容易にすることができる。例えば、このような技術を用いて、本明細書に記載されるような検出可能なプローブとハイブリダイズできるゲノムライブラリー又はcDNAライブラリーにおける配列を単離してクローニングできる。

【0128】

[00128]あるいくつかの実施形態は、標識をプローブ、プライマー及び/又は標的核酸に組み込んで、検出ユニットによるその検出を容易にすることを含み得る。ラマンタグ、蛍光体、発色団、放射性同位体、酵素タグ、抗体、化学発光体、電気発光体、親和性標識などのようないくつかの異なる標識を用いることができる。当業者は、これら及び本明細書で言及しないその他の標識部分を、開示される発明において用いることができることを認識している。

【0129】

[00129]用いる蛍光標識は、それらに限定されないが、Alexa350、Alexa430、AMCA（7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸）、BODIPY（5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸）630/650、BODIPY650/665、BODIPY-FL（フルオレセイン）、BODIPY-R6G（6-カルボキシローダミン）、BODIPY-TMR（テトラメ

10

20

30

40

50

チルローダミン)、BODIPY-TRX(テキサスレッド-X)、カスケードブルー、Cy2(シアニン)、Cy3、Cy5、6-FAM(5-カルボキシフルオレセイン)、フルオレセイン、6-JOE(2'-7'-ジメトキシ-4'-5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン)、オレゴングリーン488、オレゴングリーン500、オレゴングリーン514、パシフィックブルー、ローダミングリーン、ローダミンレッド、ROX(6-カルボキシ-X-ローダミン)、TAMRA(N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン)、テトラメチルローダミン及びテキサスレッドを含み得る。蛍光及び発光標識は、Molecular Probes(Eugene, OR)のような標準的な商業的供給源から得ることができる。

【0130】

[00130]酵素標識の例は、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ又はペルオキシダーゼを含む。比色指示基質をこのような酵素とともに用いて、人の目又は分光光学的に可視の検出手段を得ることができる。用いる可能性がある放射性同位体は、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{32}P 及び ^{35}S を含む。

【0131】

[00131]あるいくつかの実施形態において、発現ベクターを用いて、TM9SF ar NOXアイソフォームの1又は複数の阻害剤をスクリーニングするための材料を調製する。発現は、適切なシグナルがベクター内に設けられていることを必要とでき、該ベクターは、宿主細胞での興味対象の遺伝子の発現を駆動するウイルス又は哺乳類供給源からのエンハンサー/プロモーターのような種々の調節エレメントを含む。二方向性宿主因子非依存性転写終結エレメントを、発現ベクターに組み込むことができ、転写、翻訳、RNA安定性又はタンパク質安定性のレベルを、当該技術において知られる標準的な技術を用いて決定できる。二方向性宿主因子非依存性転写終結配列の効果は、二方向性宿主因子非依存性転写終結配列を欠く対照発現ベクター、又は既知の効果の二方向性宿主因子非依存性転写終結配列を含有する発現ベクターとの比較により決定できる。

【0132】

[00132]あるいくつかの実施形態において、核酸コード配列の一部又は全体が転写され得る遺伝子生成物をコードする核酸を含有する発現コンストラクト又は発現ベクター、任意のタイプの遺伝子コンストラクトは、興味対象のコード配列が、プロモーターの転写制御と作動可能に連結され、該制御の下で発現されるように構築される。「プロモーター」とは、遺伝子の特異的転写を開始するために必要な細胞の合成装置又は導入された合成装置により認識されるDNA配列のことをいう。「転写制御の下で」との句は、プロモーターが、核酸との関係において正しい位置及び方向にあって、RNAポリメラーゼ開始及び興味対象の単離宿主細胞における遺伝子の発現を制御することを意味し得る。

【0133】

[00133]cDNA挿入物を採用する場合、典型的には、ポリアデニル化シグナルを含んで、遺伝子転写産物の正しいポリアデニル化を行うことができる。ターミネーターも、発現コンストラクトのエレメントとして構想される。これらのエレメントは、メッセージレベルを増進し、コンストラクトから他の配列に読み過ぎられることを最小限にし得る。

【0134】

[00134]あるいくつかの実施形態において、発現構築物又はベクターは、レポーター遺伝子を含み、その活性を検出又は測定して、二方向性宿主因子非依存性転写終結エレメント又はその他のエレメントの効果を決める。簡便には、レポーター遺伝子は、着色生成物、蛍光生成物又は発光生成物のような容易にアッセイされる生成物を生成する。GFP(緑色蛍光タンパク質)、CAT(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)、ルシフェラーゼ、GAL(-ガラクトシダーゼ)、GUS(-グルクロニダーゼ)をコードする遺伝子などのようなレポーター遺伝子の多くの例が利用可能である。採用される具体的なレポーター遺伝子は、それが発現でき、発現が検出できることを条件として、重要でない。レポーター遺伝子のさらなる例は、当該技術において公知であり、既知のもののいずれも、請求項に記載の方法の実施において用いることができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 5 】

[00135]クローニングについての一般的な参考文献は、当業者に容易に利用可能な他のものの中でも、Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982)、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel 1993、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, NYを含む。

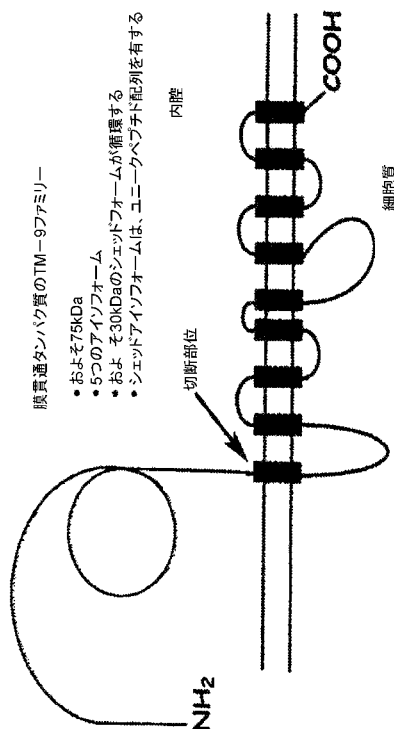
【 0 1 3 6 】

[00136]興味対象のarNOXタンパク質と特異的に反応するモノクローナル又はポリクローナル抗体は、当該技術において公知の方法により作製できる。当業者が容易に利用できる他のものの中でも、例えば、Harlow及びLane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories; Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice、第2版、Academic Press, New York; 及びAusubelら (1993) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience/Greene Publishing, New York、NYを参照されたい。

【 0 1 3 7 】

[00137]全般的に、本明細書で用いる用語及び句は、それらの当該技術において認識される意味を有し、これは、そうでないと定義しない限り、標準的な参考書、雑誌参考文献及び当業者に知られる状況で見出すことができる。

【 図 1 】



【 図 2 】

TM-9 SF4の機能的モチーフ

```

1  MATANDWLPWSLLIFSLMCTSAFTVPGVAPINTHQNDPVEIKAYKLTSSRTQLPYEYYS
61  LPFGPSKITTYKAENIGVYRGGRIVNTPTFQVLMNSEKKQVLCSSQSNKPVTLTVEQSRL
121  VAERITEDYTSNLIADNLPVATRLYLSPDSDDEKKKKQVVFHEHTRLGFTDVMKIYLH
181  NNLISFLYTHREDNEEDQENTVVRVFEVIPQSIRLEDLKADEKSSCTLPGTMSPPQEI
241  DPTKENQLYFTYSVRNEE

```

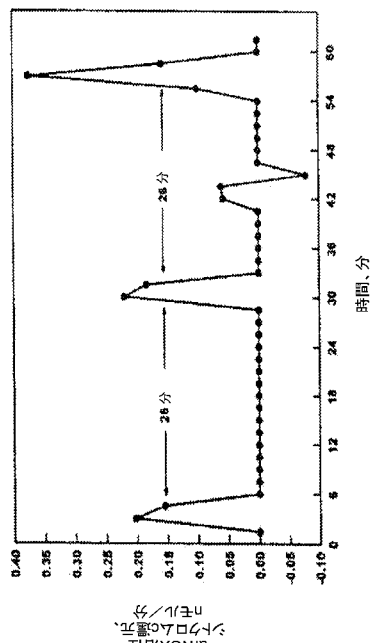
保存されたCQ/CE

アデニンヌクレオチド結合部位(GXVXXG)(アミノ酸77~82)

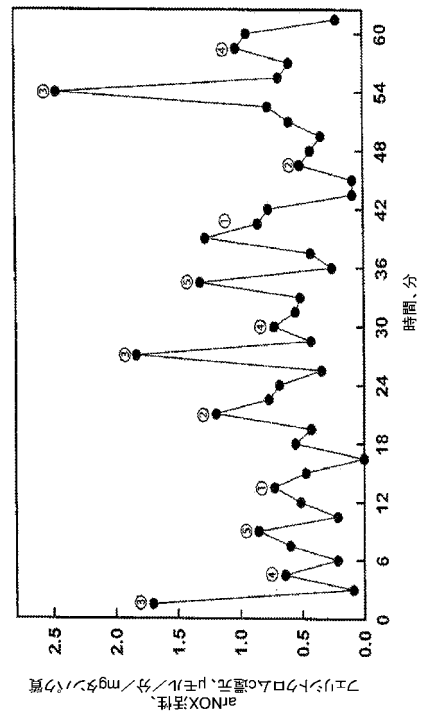
推定タンパク質ジスルフィド交換部位(CXXXC)

推定銅部位(VVH, HGY)

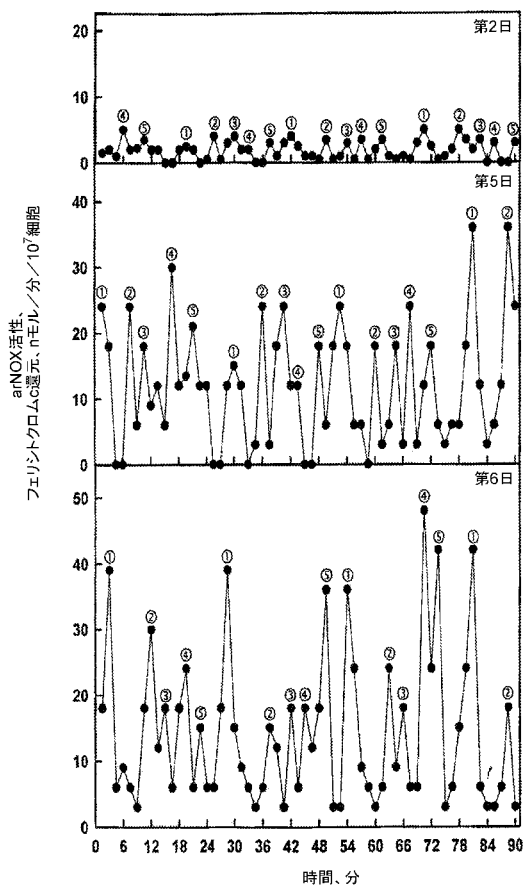
【図 3】



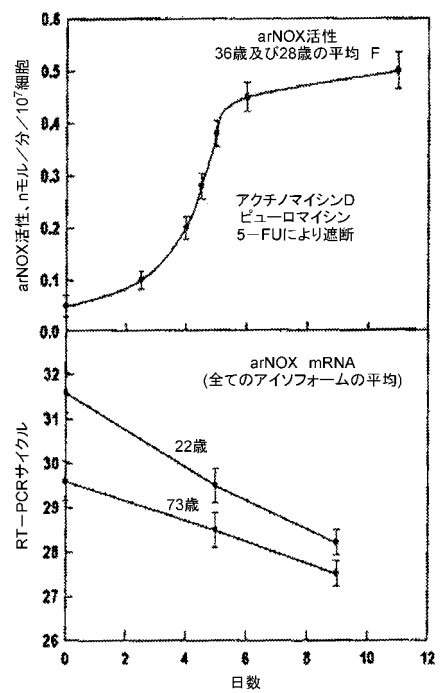
【図 4】



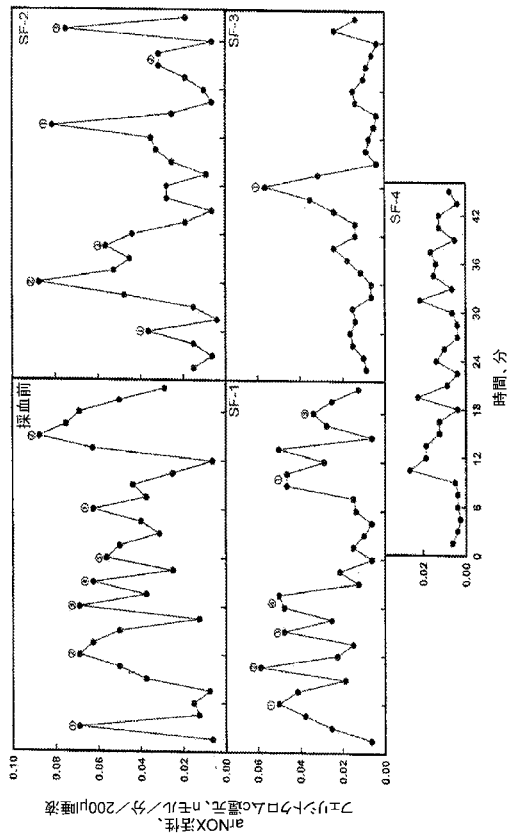
【図 5】



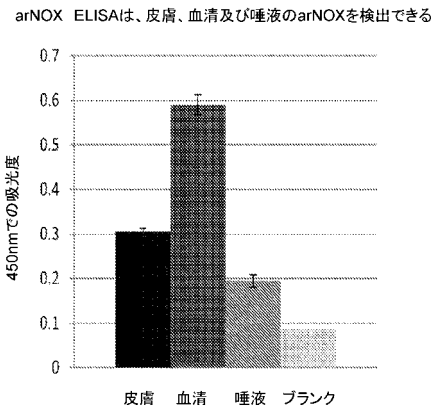
【図 6】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

図9B

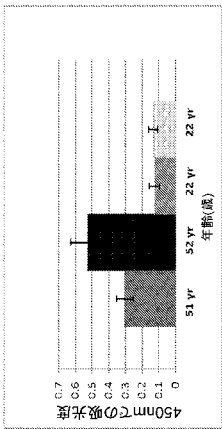


図9A

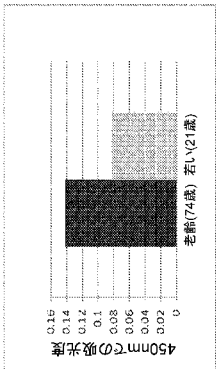
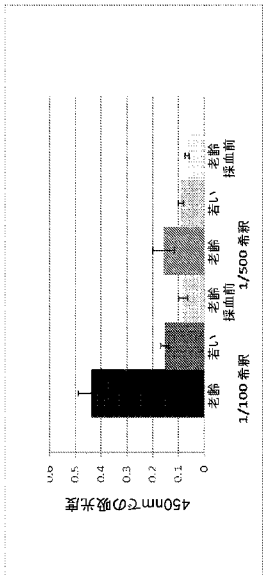


図 9C



【配列表】

2013502217000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 10/45745																					
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07H 21/00; C12P 21/00 (2010.01) USPC - 536/23.2; 435/71.2; 435/70.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																							
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C07H 21/00; C12P 21/00 (2010.01) USPC - 536/23.2; 435/71.2; 435/70.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched C12N 1/21; C12N 5/10 435/69.1 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST - DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; PLUR=YES; OP=ADJ; Google Scholar search terms: TM9, TM9s, TM-9, transmembrane 9, TM9sf4, TM9sf2, aging, damag\$, degener\$, mitochond\$, atherog\$, nadh, nadph, oxidase, nox, nox1, nox4, amox, cnox, ccnox, enox, eclonox, transgen\$, recombin\$, COS, cell,																							
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X ----- Y</td> <td>US 2003/0175787 A1 (HILLMAN et al.) 18 September 2003 (18.09.2003) para [0011]-[0013]; [0016]-[0018]; [0056]; [0079]-[0085]; [0203]; SEQ ID NO: 2.</td> <td>1-6, 8, 9, 11 ----- 7</td> </tr> <tr> <td>X ----- Y</td> <td>US 2007/0203083 A1 (MOOTHA et al.) 30 August 2007 (30.08.2007) para [0005]-[0007]; [0013]; [0032]; [0075]; [0090]; [0093]; [0114]-[0116]; [0151]; [0152]; [0185]; [0186]; [0240]; Table 12</td> <td>12 ----- 10, 13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2008/0241883 A1 (GION et al.) 02 October 2008 (02.10.2008) para [0011].</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2007/0154931 A1 (RADICH et al.) 05 July 2007 (05.07.2007) para [0119]; Table 8; SEQ ID NO: 2731.</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Schimmöeller et al., Characterization of a 76 kDa endosomal, multispanning membrane protein that is highly conserved throughout evolution. Gene 216:311-318 (1998) abstract; Fig. 1.</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Morre et al., Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. The Journal of Experimental Biology 203, 1513?1521 (2000).</td> <td>13</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X ----- Y	US 2003/0175787 A1 (HILLMAN et al.) 18 September 2003 (18.09.2003) para [0011]-[0013]; [0016]-[0018]; [0056]; [0079]-[0085]; [0203]; SEQ ID NO: 2.	1-6, 8, 9, 11 ----- 7	X ----- Y	US 2007/0203083 A1 (MOOTHA et al.) 30 August 2007 (30.08.2007) para [0005]-[0007]; [0013]; [0032]; [0075]; [0090]; [0093]; [0114]-[0116]; [0151]; [0152]; [0185]; [0186]; [0240]; Table 12	12 ----- 10, 13	Y	US 2008/0241883 A1 (GION et al.) 02 October 2008 (02.10.2008) para [0011].	7	Y	US 2007/0154931 A1 (RADICH et al.) 05 July 2007 (05.07.2007) para [0119]; Table 8; SEQ ID NO: 2731.	10	Y	Schimmöeller et al., Characterization of a 76 kDa endosomal, multispanning membrane protein that is highly conserved throughout evolution. Gene 216:311-318 (1998) abstract; Fig. 1.	13	A	Morre et al., Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. The Journal of Experimental Biology 203, 1513?1521 (2000).	13
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X ----- Y	US 2003/0175787 A1 (HILLMAN et al.) 18 September 2003 (18.09.2003) para [0011]-[0013]; [0016]-[0018]; [0056]; [0079]-[0085]; [0203]; SEQ ID NO: 2.	1-6, 8, 9, 11 ----- 7																					
X ----- Y	US 2007/0203083 A1 (MOOTHA et al.) 30 August 2007 (30.08.2007) para [0005]-[0007]; [0013]; [0032]; [0075]; [0090]; [0093]; [0114]-[0116]; [0151]; [0152]; [0185]; [0186]; [0240]; Table 12	12 ----- 10, 13																					
Y	US 2008/0241883 A1 (GION et al.) 02 October 2008 (02.10.2008) para [0011].	7																					
Y	US 2007/0154931 A1 (RADICH et al.) 05 July 2007 (05.07.2007) para [0119]; Table 8; SEQ ID NO: 2731.	10																					
Y	Schimmöeller et al., Characterization of a 76 kDa endosomal, multispanning membrane protein that is highly conserved throughout evolution. Gene 216:311-318 (1998) abstract; Fig. 1.	13																					
A	Morre et al., Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. The Journal of Experimental Biology 203, 1513?1521 (2000).	13																					
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																							
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																							
Date of the actual completion of the international search 06 December 2010 (06.12.2010)		Date of mailing of the international search report 15 DEC 2010																					
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																					

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 2	4 C 0 8 4
C 0 7 K	16/40	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	4 H 0 4 5
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/40	
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
G 0 1 N	33/573	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
C 1 2 N	9/04	(2006.01)	G 0 1 N	33/573 B	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 N	9/04 Z	
			C 1 2 P	21/02 C	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, S E, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, I L, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ , OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 タン, シャオユウ
アメリカ合衆国, インディアナ州, ウェスト ラフェイエット, シナバー ストリート 3
3 5 5

(72)発明者 ディック, サラ
アメリカ合衆国, インディアナ州, ヴァルパレーゾ, サウス 3 0 0 ウェスト 3 2 6

(72)発明者 メドウズ, クリスチャー
アメリカ合衆国, インディアナ州, ラフェイエット, ペラン アベニュー 6 3 1 1 / 2

(72)発明者 モレ, ドロシー エム.
アメリカ合衆国, インディアナ州, ウェスト ラフェイエット, チェリー レーン 1 1 1
2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA20 DA06 EA04 GA11 HA14
4B050 CC03 DD11 LL01 LL03
4B063 QA01 QQ08 QQ22 QR55 QS34
4B064 AG01 CA02 CA19 DA01 DA13
4B065 AA26X AA90X AA90Y AB01 AC20 BA02 CA28 CA44 CA46
4C084 BA01 BA08 BA18 BA19 BA23 NA14 ZB091 ZC371 ZC411
4H045 AA11 DA89 EA20 EA50 FA74