

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-167017

(P2012-167017A)

(43) 公開日 平成24年9月6日(2012.9.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47 Z N A	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 79 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-142232 (P2009-142232)
 (22) 出願日 平成21年6月15日 (2009.6.15)

(71) 出願人 510094724
 独立行政法人国立循環器病研究センター
 大阪府吹田市藤白台五丁目7番1号
 (71) 出願人 000002934
 武田薬品工業株式会社
 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
 (74) 上記1名の代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100095360
 弁理士 片山 英二
 (74) 代理人 100093676
 弁理士 小林 純子
 (72) 発明者 南祇 利実
 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目17番
 85号 武田薬品工業株式会社内
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチドおよびその用途

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】優れた抗菌剤、または優れた免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤などを提供する。

【解決手段】特定の配列で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩；該ペプチドまたはその塩を含有する抗菌剤；および該ペプチドまたはその塩および、他の特定の配列番号で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を用いることを特徴とする、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩。

【請求項 2】

請求項 1 記載のペプチドまたはその塩を含有する抗菌剤。

【請求項 3】

(a) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩および (b) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を用いることを特徴とする、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法。

10

【請求項 4】

(a) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩および (b) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を含有することを特徴とする、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤のスクリーニング用キット。

【請求項 5】

(a) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩および (b) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対するアンタゴニストのスクリーニング方法。

20

【請求項 6】

配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩を認識する抗体。

【請求項 7】

請求項 6 記載の抗体を含有してなる免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤。

30

【請求項 8】

請求項 6 記載の抗体と、被検液および標識化された配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、上記抗体に結合した上記標識化されたペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする、被検液中の配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の定量法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、MRGX2 のリガンドペプチド、抗菌剤、各種疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法、MRGX2 アンタゴニストのスクリーニング方法などに関する。

40

【背景技術】**【0002】**

生体のホメオスタシスの維持、生殖、個体の発達、代謝、成長、神経系、循環器系、免疫系、消化器系、代謝系の調節および感覚受容などの重要な機能調節は、様々なホルモンや神経伝達物質のような内在性因子あるいは光や匂いなどの感覚刺激をこれらに対して生体が備えている細胞膜に存在する特異的な受容体を介して細胞が受容し、それに応じた反応をすることによって行われている。このような機能調節によるホルモンや神経伝達物質の受容体の多くは guanine nucleotide-binding protein (以下、G 蛋白質と略称する場合がある) と共役しており、この G 蛋白質の活性化によって細胞内にシグナルを伝達して様

50

々な機能を発現させることを特徴とする。また、これらの受容体蛋白質は共通して7個の膜貫通領域を有する。これらのことからこうした受容体はG蛋白質共役型受容体あるいは7回膜貫通型受容体と総称される。このように生体機能の調節には様々なホルモンや神経伝達物質およびそれに対する受容体蛋白質が存在して相互作用し、重要な役割を果たしていることがわかっているが、未知の作用物質（ホルモンや神経伝達物質など）およびそれに対する受容体が存在するかどうかについてはいまだ不明なことが多い。

【0003】

このようなG蛋白質共役型受容体の一つに、MRGX2がある。ヒトMRGX2（ヒトMRGX2の塩基配列を配列番号：2に、アミノ酸配列を配列番号：3に示す。）は、GPCRx11、TGR12およびGPCR44などの別名が知られている。

10

【0004】

MRGX2は、多くのペプチドをリガンドとすることが報告されている（非特許文献1：European Journal of Pharmacology、519、191-193頁、2005年；非特許文献2：Biochemical and Biophysical Research Communications、349、1322-1328、2006年）。

【0005】

MRGX2は、コルチスタチン（cortistatin）、ソマトスタチン、BAM（bovine adrenal medulla peptide）13-22、 α メラニン細胞刺激ホルモン（ α MSH）、neuropeptide FF、ダイノルフィンA（dynorphin A）およびサブスタンスPによって活性化されること、MRGX2のアゴニストまたはアンタゴニストが、睡眠障害、疼痛、脳梗塞、記憶障害、糖尿病、癌、肥満症、心疾患、鬱病、性機能障害、尿路・膀胱疾患、感染症治療および消化器疾患などの治療薬となりうることなどが報告されている（特許文献1：WO03/073107号公報）。

20

【0006】

GPCRx11にangiopeptinが特異的に反応したことが報告されている（特許文献2：WO01/98330号公報）。

【0007】

MRGX2に、PAMP-12（proadrenomedullin N-terminal 20 peptideの9-20位）がアゴニスト作用を示したことが報告されている（非特許文献3：Biochem. Biophys. Res. Commun.、330巻、1146-1152頁、2005年）。

30

【0008】

MRGX2が、ヒト臍帯血由来肥満細胞において発現していること、IgEによって発現が変動することが報告されている（特許文献3：WO2005/028667号公報）。

。

【0009】

MRGX2またはそれをコードするポリヌクレオチドが、MRGX2のリガンドの決定、MRGX2に対する抗体の入手、MRGX2の発現系の構築および該発現系を用いた受容体結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニングなどに有用であることが報告されている（特許文献4：WO02/04641号公報）。

40

【0010】

さらに、ヒト肥満細胞の神経ペプチド（サブスタンスP、コルチスタチン、脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド、血管作動性腸管ペプチドまたはproadrenomedullin N-terminal 20 peptide）依存的脱顆粒にはMRGX2が関与していること、MRGX2に対するアンタゴニスト、抗体、アンチセンスヌクレオチド、siRNAなどが肥満細胞の脱顆粒抑制剤や、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患、循環器疾患などの予防・治療剤として有用であることが報告されている（

50

特許文献5：WO2006/118328号公報）。

【0011】

ここで、インスリン様増殖因子（IGF）は、培養系で細胞増殖を促進させる作用を示す因子であり、IGF-IおよびIGF-IIの2種類が知られている。IGF-IおよびIGF-IIは、両者とも血中ではその大部分が特異的な結合タンパク質（IGFBP）と結合して存在している。現在6種類のIGFBPが知られており、そのうちの 하나가IGFBP-5である。このIGFBP-5は、IGFと結合することによりIGF受容体を介したIGFの活性を阻害することが報告されている（非特許文献4：J. Clin. Invest.、100巻、10号、2596-2605頁、1997年11月）。また、IGFBP-5自身にも受容体があり、IGFBP-5が受容体を介してシグナルを伝えることが報告されている（非特許文献5：Journal of Endocrinology、172、423-440頁、2002年）。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】WO03/073107号公報

【特許文献2】WO01/98330号公報

【特許文献3】WO2005/028667号公報

【特許文献4】WO02/04641号公報

【特許文献5】WO2006/118328号公報

20

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】European Journal of Pharmacology、519、191-193頁、2005年

【非特許文献2】Biochemical and Biophysical Research Communications、349、1322-1328、2006年

【非特許文献3】Biochem. Biophys. Res. Commun.、330巻、1146-1152頁、2005年

【非特許文献4】J. Clin. Invest.、100巻、10号、2596-2605頁、1997年11月

30

【非特許文献5】Journal of Endocrinology、172、423-440頁、2002年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

上記状況において、優れた抗菌剤、または優れた免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤などが求められていた。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、配列番号：1で表されるアミノ酸配列からなるペプチドに抗菌作用があること、および配列番号：1で表されるアミノ酸配列からなるペプチドがMRGX2と結合するリガンドペプチドであること等を見出した。これらの知見に基づいて、本発明を完成するに至った。

40

すなわち、本発明は、以下に示すペプチド、抗菌剤、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法などを提供する。

【0016】

〔1〕 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩。

〔2〕 上記〔1〕記載のペプチドまたはその塩を含有する抗菌剤。

〔3〕 (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミ

50

ノ酸配列からなるペプチドまたはその塩および (b) 配列番号 : 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を用いることを特徴とする、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法。

〔 3 a 〕 (i) (a) 配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩と、 (b) 配列番号 : 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩とを、試験化合物の非存在下で接触させ、前記 (b) 配列番号 : 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する前記 (a) 配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の結合量を測定する工程、

10

(ii) (a) 配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩と、 (b) 配列番号 : 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩とを、試験化合物の存在下で接触させ、前記 (b) 配列番号 : 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する前記 (a) 配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の結合量を測定する工程、および

(iii) 工程 (i) と工程 (ii) との間で、前記 (b) 配列番号 : 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する前記 (a) 配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の結合量を比較する工程を含む、上記〔 3 〕記載の方法。

20

〔 3 b 〕 (i) (a) 配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩を、 (b) 配列番号 : 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を含有する細胞または該細胞の膜画分に試験化合物の非存在下で接触させ、前記 (b) 配列番号 : 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する前記 (a) 配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の結合量を測定する工程、

30

(ii) (a) 配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩を、 (b) 配列番号 : 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を含有する細胞または該細胞の膜画分に試験化合物の存在下で接触させ、前記 (b) 配列番号 : 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する前記 (a) 配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の結合量を測定する工程、および

(iii) 工程 (i) と工程 (ii) との間で、前記 (b) 配列番号 : 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する前記 (a) 配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の結合量を比較する工程を含む、上記〔 3 〕記載の方法。

40

〔 3 c 〕 工程 (ii) における結合量が工程 (i) における結合量よりも低い場合に、前記試験化合物を免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤として選択する、上記〔 3 a 〕または〔 3 b 〕記載の方法。

〔 3 d 〕 工程 (ii) における結合量が工程 (i) における結合量の 50 % 以下の場合に、前記試験化合物を免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤として選択する、上記〔 3 c 〕記載の方法。

〔 3 e 〕 (i) (a) 配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩と、 (b) 配列番号 : 3 で表されるアミノ

50

酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩とを、試験化合物の非存在下で接触させ、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質を介した細胞刺激活性を測定する工程、

(ii)(a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩と、(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩とを、試験化合物の存在下で接触させ、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質を介した細胞刺激活性を測定する工程、および

(iii)工程(i)と工程(ii)との間で、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を介した細胞刺激活性を比較する工程を含む、上記〔3〕記載の方法。

〔3f〕(i)(a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩を、(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を含有する細胞または該細胞の膜画分に、試験化合物の非存在下で接触させ、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質を介した細胞刺激活性を測定する工程、

(ii)(a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩を、(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を含有する細胞または該細胞の膜画分に、試験化合物の存在下で接触させ、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質を介した細胞刺激活性を測定する工程、および

(iii)工程(i)と工程(ii)との間で、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を介した細胞刺激活性を比較する工程を含む、上記〔3〕記載の方法。

〔4〕(a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩および(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を含有することを特徴とする、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤のスクリーニング用キット。

〔5〕(a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩および(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対するアンタゴニストのスクリーニング方法。

〔5a〕(i)(a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩と、(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩とを、試験化合物の非存在下で接触させ、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する前記(a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の結合量を測定する工程、

(ii)(a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩と、(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩とを、試験化合物の存在下で接触させ、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは

10

20

30

40

50

は実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する前記(a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の結合量を測定する工程、および

(iii) 工程(i)と工程(ii)との間で、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する前記(a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の結合量を比較する工程を含む、上記〔5〕記載の方法。

〔5b〕 (i) (a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩を、(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を含有する細胞または該細胞の膜画分に試験化合物の非存在下で接触させ、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する前記(a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の結合量を測定する工程、

(ii) (a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩を、(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を含有する細胞または該細胞の膜画分に試験化合物の存在下で接触させ、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する前記(a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の結合量を測定する工程、および

(iii) 工程(i)と工程(ii)との間で、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する前記(a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の結合量を比較する工程を含む、上記〔5〕記載の方法。

〔5c〕 工程(ii)における結合量が工程(i)における結合量よりも低い場合に、前記試験化合物を配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対するアンタゴニストとして選択する、上記〔5a〕または〔5b〕記載の方法。

〔5d〕 工程(ii)における結合量が工程(i)における結合量の50%以下の場合に、配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対するアンタゴニストとして選択する、上記〔5c〕記載の方法。

〔5e〕 (i) (a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩と、(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩とを、試験化合物の非存在下で接触させ、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質を介した細胞刺激活性を測定する工程、

(ii) (a)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩と、(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩とを、試験化合物の存在下で接触させ、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質を介した細胞刺激活性を測定する工程、および

(iii) 工程(i)と工程(ii)との間で、前記(b)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を介した細胞刺激活性を比較する工程を含む、上記〔5〕記載の方法。

10

20

30

40

50

〔 5 f 〕 (i) (a) 配列番号： 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩を、 (b) 配列番号： 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を含有する細胞または該細胞の膜画分に、試験化合物の非存在下で接触させ、前記 (b) 配列番号： 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質を介した細胞刺激活性を測定する工程、

(ii) (a) 配列番号： 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩を、 (b) 配列番号： 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を含有する細胞または該細胞の膜画分に、試験化合物の存在下で接触させ、前記 (b) 配列番号： 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質を介した細胞刺激活性を測定する工程、および

(iii) 工程 (i) と工程 (ii) との間で、前記 (b) 配列番号： 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を介した細胞刺激活性を比較する工程を含む、上記〔 5 〕記載の方法。

〔 6 〕 配列番号： 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩を認識する抗体。

〔 6 a 〕 配列番号： 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩を特異的に認識する上記〔 6 〕記載の抗体。

〔 6 b 〕 配列番号： 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である上記〔 6 〕または〔 6 a 〕記載の抗体。

〔 7 〕 上記〔 6 〕、〔 6 a 〕または〔 6 b 〕記載の抗体を含有してなる免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤。

〔 8 〕 上記〔 6 〕、〔 6 a 〕または〔 6 b 〕記載の抗体と、被検液および標識化された配列番号： 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、上記抗体に結合した上記標識化されたペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする、被検液中の配列番号： 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の定量法。

〔 9 〕 抗菌剤を製造するための、上記〔 1 〕記載のペプチドまたはその塩の使用。

〔 10 〕 上記〔 1 〕記載のペプチドまたはその塩の有効量を投与することを含む、病原性細菌により生ずる疾病の予防・治療方法。

〔 10 a 〕 病原性細菌により生ずる疾病が病原性細菌の気道感染または尿路感染である上記〔 10 a 〕記載の方法。

〔 11 〕 (a) 配列番号： 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩および (b) 配列番号： 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を含有することを特徴とする、配列番号： 3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対するアンタゴニストのスクリーニング用キット。

〔 12 〕 免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤を製造するための、上記〔 6 〕、〔 6 a 〕または〔 6 b 〕記載の抗体の使用。

〔 13 〕 上記〔 6 〕、〔 6 a 〕または〔 6 b 〕記載の抗体の有効量を投与することを含む、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療方法。

【発明の効果】

【 0017 】

本発明は、新規ペプチドを提供する。本発明の好ましい態様のペプチドは、抗菌剤として使用することができる。本発明の別の好ましい態様のペプチドは、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤のスクリーニングなどのために用いるこ

10

20

30

40

50

とができる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】ペプチドの精製スキームを示す図である。図1aからcはそれぞれIGFBP-5[193-214]-NH₂を含む画分のゲル濾過カラム(a)、陽イオン交換カラム(b)、逆相ナノLC(c)の溶出パターンを示す。太線(a、b)および矢印(c)はIGFBP-5[193-214]-NH₂を含む画分を示す。

図1aにおける分子量マーカーは以下のとおりである。1: BSA (66.5 kDa)、2: RNase A (13.5 kDa)、3: Neuropeptide Y (4.3 kDa)、4: Neurotensin (1.7 kDa)、5: Leu-enkephalin (0.6 kDa)

【図2】タンデム質量分析計によるペプチドの構造決定を示す図である。図2aはIGFBP-5[193-214]-NH₂を含むスポットのMS1、図2bはIGFBP-5[193-214]-NH₂のMS2を示す。

【図3】他の抗菌ペプチドとIGFBP-5[193-214]-NH₂の抗菌活性における協調作用を示す図である。図3aは横軸濃度のIGFBP-5[193-214]-NH₂存在下での細菌生存率を縦軸に示している(●)。また、IC₅₀の半分の濃度のβ-ディフェンシン-2(3.15 μM, ▲)、あるいはカテリシジン(0.3 μM, ■)共存下での細菌生存率を縦軸に示す。図3bは横軸濃度のβ-ディフェンシン-2存在下での細菌生存率を縦軸に示している(●)。また、IC₅₀の半分の濃度のIGFBP-5[193-214]-NH₂(0.45 μM, ▲)、あるいはカテリシジン(0.3 μM, ■)共存下での細菌生存率を縦軸に示す。図3cは横軸濃度のカテリシジン存在下での細菌生存率を縦軸に示している(●)。また、IC₅₀の半分の濃度のIGFBP-5[193-214]-NH₂(0.45 μM, ▲)、あるいはβ-ディフェンシン-2(3.15 μM, ■)共存下での細菌生存率を縦軸に示す。平均値(n = 3)および標準偏差で示す。

【図4】ラット組織中に存在するIGFBP-5[193-214]-NH₂の同定を示す図である。図4a、bはそれぞれ脳抽出物のゲル濾過カラム(a)および逆相HPLC(b)による免疫反応性IGFBP-5[193-214]-NH₂の解析結果を示す。図4b中の矢印は合成IGFBP-5[193-214]-NH₂の溶出位置を示す。図4cは免疫反応性IGFBP-5[193-214]-NH₂の質量分析計による解析結果を示す。

【図5】IGFBP-5[193-214]-NH₂のMRGX2に対するHeLa/SRE-LUCレポーター活性を測定した結果を示す図である。無刺激時の活性を1とした時のIGFBP-5[193-214]-NH₂、S1P、FBSの活性を縦軸に示す(T/C = Treatment / Control)。また、活性を、平均値(n = 4)および標準偏差で示す。

【図6】IGFBP-5[193-214]-NH₂とサブスタンスPのMRGX2特異的な細胞内カルシウム濃度上昇活性を測定した結果を示す図である。細胞内カルシウム濃度をFLIPRアッセイ系により測定し、A) IGFBP-5[193-214]-NH₂およびB) サブスタンスP添加後の細胞内カルシウム濃度の変化をカウントとして縦軸に示す(Δcount)。また、Δcountを、平均値(n = 3)および標準偏差で示す。

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下、「配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩」を「本発明のペプチド」と略記する場合がある。また、「配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩」を「本発明の受容体」と略記する場合がある。

【0020】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドは、ヒトまたは温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシまたはサルなど)の細胞(例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球または単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞も

しくは癌細胞など)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄または小脳)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸または小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節または骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞(例、MEL、M1、CTLL-2、HT-2、WEHI-3、HL-60、JOSK-1、K562、ML-1、MOLT-3、MOLT-4、MOLT-10、CCRF-CEM、TALL-1、Jurkat、CCRT-HS B-2、KE-37、SKW-3、HUT-78、HUT-102、H9、U937、THP-1、HEL、JK-1、CMK、KO-812、MEG-01、LAD 1またはLAD 2など)に由来するペプチドであってもよく、あるいは合成ペプチドであってもよい。

10

【0021】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

【0022】

特に、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1~5個(好ましくは1~3個、さらに好ましくは1~2個、より好ましくは、1個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1~5個(好ましくは1~3個、さらに好ましくは1~2個、より好ましくは、1個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1~5個(好ましくは1~3個、さらに好ましくは1~2個、より好ましくは、1個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1~5個(好ましくは1~3個、さらに好ましくは1~2個、より好ましくは、1個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) 上記(i)~(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

20

【0023】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドとしては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなり、かつ、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ましい。実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のペプチドの有する活性(例えば、後述の抗菌活性、本発明の受容体との結合活性、および本発明の受容体発現細胞に対する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTPγS結合活性などを促進する活性等))などがあげられる。実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に(例、生理化学的に、または薬理学的に)同質(例、約0.01~100倍、好ましくは約0.5~20倍、より好ましくは約0.5~2倍)であることを示す。抗菌活性、本発明の受容体との結合活性、および本発明の受容体発現細胞に対する細胞刺激活性などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができる。

30

40

【0024】

本発明のペプチドの具体例として、配列番号：1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号：4で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または配列番号：5で表されるアミノ酸配列からなるペプチドなどが挙げられる。

【0025】

本発明のペプチドに対する受容体としては、種々の受容体のうち、本発明のペプチドと結合活性を有し、本発明のペプチドにより該受容体発現細胞の細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTPγS結合活性などを促進する活性等)が観察され

50

るものなどがあげられる。具体的には、G蛋白質共役型受容体であるMRGX2（配列番号：3で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質）、または、MRGX2と実質的に同一のアミノ酸配列、即ち、配列番号：3で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質などがあげられる。配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例、MEL、M1、CTLL-2、HT-2、WEHI-3、HL-60、JOSK-1、K562、ML-1、MOLT-3、MOLT-4、MOLT-10、CCRF-CEM、TALL-1、Jurkat、CCRT-HSB-2、KE-37、SKW-3、HUT-78、HUT-102、H9、U937、THP-1、HEL、JK-1、CMK、KO-812、MEG-01、LAD 1、LAD 2など）に由来する蛋白質であってもよく、合成蛋白質であってもよい。

10

20

【0026】

配列番号：3で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：3で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。特に、配列番号：3で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii)配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii)配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(iv)配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、または(v)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質などが挙げられる。

30

【0027】

配列番号：3で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：3で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：3で表されるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド（例、本発明のペプチド、サブスタンスP、コルチスタチン、脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド、血管作動性腸管ペプチドまたはproadrenomedullin N-terminal 20 peptide）結合活性、シグナル情報伝達作用、または細胞刺激活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用または細胞刺激活性などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素

40

50

は異なってもよい。リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用、または細胞刺激活性などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができる。

【0028】

本発明のペプチドまたは受容体は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。C末端はカルボキシ（-COOH）、カルボキシレート（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキルもしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C₁₋₂アルキルなどのC₇₋₁₄アラルキルのほか、経口用エステルとして汎用されるピパロイルオキシメチルなどが用いられる。

【0029】

本発明のペプチドまたは受容体がC末端以外にカルボキシ（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシがアミド化またはエステル化されているものも、本発明のペプチドまたは受容体に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

【0030】

さらに、本発明のペプチドまたは受容体には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル、アセチルなどのC₁₋₆アルカノイルなどのC₁₋₆アシルなど）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル、アセチルなどのC₁₋₆アルカノイルなどのC₁₋₆アシルなど）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

【0031】

本発明のペプチドまたは受容体のうちの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

【0032】

本発明のペプチドまたは受容体は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAで形質転換された形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のポリペプチド合成法に準じて製造することもできる。例えば、Genomics、56巻、12-21頁、1999年、Biochim. Biophys. Acta、1446巻、57-70頁、1999年などに記載の方法またはこれに準じた方法により、製造することもできる。

【0033】

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から本発明のペプチドまたは受容体を製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

【0034】

本発明のペプチドまたは受容体の合成には、通常、市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメ

10

20

30

40

50

チルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4 - (2' , 4' - ジメトキシフェニル - ヒドロキシメチル) フェノキシ樹脂または 4 - (2' , 4' - ジメトキシフェニル - F m o c アミノエチル) フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 α - アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のペプチド、受容体、またはそのアミド体を取得する。

【 0 0 3 5 】

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、D C C、N , N' - ジイソプロピルカルボジイミドまたは N - エチル - N' - (3 - ジメチルアミノプロリル) カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤 (例、H O B t または H O O B t) とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物または H O B t エステルあるいは H O O B t エステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【 0 0 3 6 】

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N , N - ジメチルホルムアミド、N , N - ジメチルアセトアミド、N - メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 - 2 0 ~ 5 0 の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常 1 . 5 ~ 4 倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

【 0 0 3 7 】

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、B o c、t - ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4 - メトキシベンジルオキシカルボニル、C l - Z、B r - Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2 - ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイルまたは F m o c などが用いられる。

【 0 0 3 8 】

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化 (例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t - ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチルもしくは 2 - アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラキルエステル化 (例えば、ベンジルエステル、4 - ニトロベンジルエステル、4 - メトキシベンジルエステル、4 - クロロベンジルエステルもしくはベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t - ブトキシカルボニルヒドラジド化またはトリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

【 0 0 3 9 】

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級 (C₁₋₆) アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカ

10

20

30

40

50

ルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

【0040】

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、*Bz*1、*Cl*₂-*Bz*1、2-ニトロベンジル、*Br*-*Z*、*t*-ブチルなどが用いられる。

【0041】

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、*Tos*、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、*DNP*、ベンジルオキシメチル、*Bum*、*Boc*、*Trt*、*Fmoc*などが用いられる。

【0042】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、*HONB*、*N*-ヒドロキシスクシミド、*N*-ヒドロキシフタルイミド、*HOBT*）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

【0043】

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、*Pd*-黒あるいは*Pd*-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20 ~ 40 の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0044】

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

【0045】

本発明のペプチドまたは受容体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドまたは受容体のアミド体を得ることができる。

【0046】

本発明のペプチドまたは受容体のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、上記ペプチドまたは受容体のアミド体と同様にして、所望のペプチドまたは受容体のエステル体を得ることができる。

【0047】

本発明のペプチドまたは受容体は、自体公知のペプチドの合成法に従って、例えばポリ

10

20

30

40

50

ペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ポリペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のペプチドまたは受容体を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のポリペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(i)~(v)に記載された方法があげられる。

【0048】

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

(ii) Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年) 10

(iii) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(iv) 矢島治明 および 榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

(v) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

【0049】

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて本発明のペプチドまたは受容体を精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドまたは受容体が遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0050】

本発明のペプチドまたは受容体をコードするポリヌクレオチドとしては、本発明のペプチドまたは受容体をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。このうちDNAが好ましく、該DNAは、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

【0051】

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

【0052】

本発明のペプチドをコードするDNAとしては、例えば配列番号：6で表される塩基配列からなるDNA、または配列番号：6で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有するペプチドをコードするDNAなどであれば何れのものでもよい。

【0053】

配列番号：6で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：6で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0054】

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

【 0 0 5 5 】

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 、好ましくは約 60 ~ 65 の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65 の場合が最も好ましい。

【 0 0 5 6 】

より具体的には、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドをコードする DNA としては、配列番号：6 で表される塩基配列を含有する DNA などが用いられる。

【 0 0 5 7 】

本発明の受容体をコードする DNA としては、例えば配列番号：2 で表される塩基配列を含有する DNA、または配列番号：2 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する受容体をコードする DNA などであれば何れのものでもよい。

10

【 0 0 5 8 】

配列番号：2 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる DNA としては、例えば、配列番号：2 で表される塩基配列と約 70 % 以上、好ましくは約 80 % 以上、より好ましくは約 90 % 以上、さらに好ましくは約 95 % 以上の相同性を有する塩基配列を含有する DNA などが用いられる。

【 0 0 5 9 】

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

20

【 0 0 6 0 】

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 、好ましくは約 60 ~ 65 の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65 の場合が最も好ましい。

【 0 0 6 1 】

より具体的には、配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を含有する受容体をコードする DNA としては、配列番号：2 で表される塩基配列を含有する DNA などが用いられる。

30

【 0 0 6 2 】

本発明のペプチドまたは受容体をコードするポリヌクレオチド（例、DNA）は、自体公知の方法で標識化されていてもよい。標識物質としては、放射性同位元素、蛍光物質（例、フルオレセインなど）、発光物質、酵素、ビオチン、ランタニド元素などがあげられる。

【 0 0 6 3 】

本発明のペプチドまたは受容体を完全にコードする DNA のクローニングの手段としては、本発明のペプチドまたは受容体の部分塩基配列を有する合成 DNA プライマーを用いて自体公知の PCR 法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだ DNA を本発明のペプチドまたは受容体の一部あるいは全領域をコードする DNA 断片もしくは合成 DNA を用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

40

【 0 0 6 4 】

DNA の塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km（宝酒造（株））、MutanTM-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR 法、Gapped duplex 法、Kunkel 法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

50

【 0 0 6 5 】

クローン化されたペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

【 0 0 6 6 】

本発明のペプチドまたは受容体の発現ベクターは、例えば、(a)本発明のペプチドまたは受容体をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(b)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

10

【 0 0 6 7 】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neoなどが用いられる。

【 0 0 6 8 】

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、HIV・LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

20

【 0 0 6 9 】

これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

30

【 0 0 7 0 】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子[メソトレキセート(MTX)耐性]、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性)等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

40

【 0 0 7 1 】

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のペプチドまたは受容体のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MFα・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

50

【 0 0 7 2 】

このようにして構築された本発明のペプチドまたは受容体をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【 0 0 7 3 】

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

【 0 0 7 4 】

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K 1 2 ・ D H 1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160(1968)] , J M 1 0 3 [Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981)] , J A 2 2 1 [Journal of Molecular Biology, 120巻, 517(1978)] , H B 1 0 1 [Journal of Molecular Biology, 41巻, 459(1969)] , C 6 0 0 [Genetics, 39巻, 440(1954)] などが用いられる。 10

【 0 0 7 5 】

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) M I 1 1 4 [Gene, 24巻, 255(1983)] , 2 0 7 - 2 1 [Journal of Biochemistry, 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

【 0 0 7 6 】

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) A H 2 2 , A H 2 2 R⁻ , N A 8 7 - 1 1 A , D K D - 5 D , 2 0 B - 1 2 、 シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) N C Y C 1 9 1 3 , N C Y C 2 0 3 6 、 ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) K M 7 1 などが用いられる。 20

【 0 0 7 7 】

昆虫細胞としては、例えば、ウィルスが A c N P V の場合は、ヨトウガの幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell ; S f 細胞) 、 *Trichoplusia ni* の中腸由来の M G 1 細胞、 *Trichoplusia ni* の卵由来の High FiveTM 細胞、 *Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウィルスが B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞 ; B m N 細胞) などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711) 、 S f 2 1 細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、In Vivo, 13, 213 - 217, (1977)) などが用いられる。 30

【 0 0 7 8 】

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、Nature, 315巻, 592(1985)〕。 30

【 0 0 7 9 】

動物細胞としては、例えば、サル細胞 C O S - 7 (C O S 7) , V e r o , チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O 細胞と略記) , d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O (d h f r⁻) 細胞と略記) , マウス L 細胞, マウス A t T - 2 0 , マウスミエローム細胞, ラット G H 3 , ヒト F L 細胞などが用いられる。

【 0 0 8 0 】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69巻, 2110(1972) や Gene, 17巻, 107(1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。 40

【 0 0 8 1 】

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General Genetics, 168巻, 111(1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。

【 0 0 8 2 】

酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, 194巻, 182 - 187(1991) 、 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75巻, 1929(1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

【 0 0 8 3 】

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55(1988) な 50

どに記載の方法に従って行なうことができる。

【 0 0 8 4 】

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコール 263-267(1995) (秀潤社発行)、Virology, 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

【 0 0 8 5 】

このようにして、本発明のペプチドまたは受容体をコードする DNA を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

【 0 0 8 6 】

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、成長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5 ~ 8 が望ましい。

【 0 0 8 7 】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む M 9 培地 [Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β - インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

【 0 0 8 8 】

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 15 ~ 43 で約 3 ~ 24 時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

【 0 0 8 9 】

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

【 0 0 9 0 】

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77巻, 4505(1980)] や 0.5% カザミノ酸を含有する SD 培地 [Bitter, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81巻, 5330(1984)] があげられる。培地の pH は約 5 ~ 8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 20 ~ 35 で約 24 ~ 72 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【 0 0 9 1 】

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature, 195, 788(1962)) に非動化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 6.2 ~ 6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27 で約 3 ~ 5 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【 0 0 9 2 】

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5 ~ 20% の胎児牛血清を含む MEM 培地 [Science, 122巻, 501(1952)]、DMEM 培地 [Virology, 8巻, 396(1959)]、RPMI 1640 培地 [The Journal of the American Medical Association 199巻, 519(1967)]、199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pH は約 6 ~ 8 であるのが好ましい。培養は通常約 30 ~ 40 で約 15 ~ 60 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

10

20

30

40

50

【0093】

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外などに本発明のペプチドまたは受容体を生成せしめることができる。

【0094】

上記培養物から本発明のペプチドまたは受容体を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

【0095】

本発明のペプチドまたは受容体を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

10

【0096】

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

20

【0097】

かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

【0098】

なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

30

【0099】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、単に本発明の抗体と称する場合がある）は、本発明のペプチドを認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明のペプチドに対する抗体としては、例えば、本発明のペプチドを特異的に認識する抗体、および/または本発明のペプチドの活性を不活性化する中和抗体などが挙げられる。本発明のペプチドの活性としては、例えば、受容体結合活性、シグナル情報伝達作用または細胞刺激活性などの活性が挙げられる。

40

【0100】

本発明のペプチドに対する抗体は、本発明のペプチドを抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0101】

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば

50

、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

【 0 1 0 2 】

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (P E G) やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくは P E G が用いられる。

10

【 0 1 0 3 】

骨髓腫細胞としては、例えば、 N S - 1、 P 3 U 1、 S P 2 / 0、 A P - 1 などの温血動物の骨髓腫細胞があげられるが、 P 3 U 1 が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は 1 : 1 ~ 2 0 : 1 程度であり、 P E G (好ましくは P E G 1 0 0 0 ~ P E G 6 0 0 0) が 1 0 ~ 8 0 % 程度の濃度で添加され、 2 0 ~ 4 0 、好ましくは 3 0 ~ 3 7 で 1 ~ 1 0 分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【 0 1 0 4 】

20

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド (蛋白質) 抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテイン A を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテイン A を吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

【 0 1 0 5 】

30

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常 H A T (ヒボキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、 1 ~ 2 0 %、好ましくは 1 0 ~ 2 0 % の牛胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 培地、 1 ~ 1 0 % の牛胎児血清を含む G I T 培地 (和光純薬工業 (株)) あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地 (S F M - 1 0 1、日水製薬 (株)) などを用いることができる。培養温度は、通常 2 0 ~ 4 0 、好ましくは約 3 7 である。培養時間は、通常 5 日 ~ 3 週間、好ましくは 1 週間 ~ 2 週間である。培養は、通常 5 % 炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【 0 1 0 6 】

40

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体 (例、 D E A E) による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテイン A あるいはプロテイン G などの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

【 0 1 0 7 】

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原 (ポリペプチド抗原) 自体、あるいはそれとキャリアー蛋白

50

質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

【0108】

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

10

【0109】

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

【0110】

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

【0111】

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

20

【0112】

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0113】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド（例、DNA）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部からなるポリヌクレオチド（例、DNA）としては、該ポリヌクレオチドに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列からなり、該ポリヌクレオチドの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのポリヌクレオチド（アンチセンスポリヌクレオチド）であってもよい。

30

【0114】

具体的には、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA）（以下、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部からなるアンチセンスDNA（以下、これらのDNAをアンチセンスDNAと略記する場合がある）が挙げられ、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部からなり、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

40

【0115】

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

50

【0116】

具体的には、配列番号：6で表される塩基配列からなるDNAに相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。好ましくは例えば、配列番号：6で表される塩基配列からなるDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。

【0117】

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

【0118】

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

【0119】

本発明に従えば、本発明のペプチドの遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいはアミノ酸が決定された蛋白質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるポリヌクレオチド（核酸）は、本発明のペプチドの遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のペプチド関連RNAとの相互作用を介して本発明のペプチドの遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のペプチド関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のペプチド関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のペプチドの遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、蛋白質翻訳終止コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンδροーム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

【0120】

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、さらにDNA：RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、

10

20

30

40

50

電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレート化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

【0121】

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンスヌクレオチドは次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンスヌクレオチドをより安定なものにする、アンチセンスヌクレオチドの細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンスヌクレオチドの毒性をより小さなものにする。

【0122】

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

【0123】

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

【0124】

アンチセンスヌクレオチドの阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のペプチドの生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

【0125】

以下に、(i) 本発明のペプチド、(ii) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド（本発明のポリヌクレオチド）、(iii) 本発明のペプチドに対する抗体（本発明の抗体）、(iv) 本発明のペプチドのアンチセンスポリヌクレオチド（例、本発明のアンチ

センスDNA)などの用途を説明する。

【0126】

〔1〕各種疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法

本発明の受容体の機能・活性(例、肥満細胞の脱顆粒促進作用、エイコサノイド産生促進作用、サイトカイン産生促進作用、肥満細胞増殖促進作用、肥満細胞活性化促進作用など)を阻害する化合物またはその塩は、例えば、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤、肥満細胞活性化抑制剤(例、MAPK活性化抑制剤なども含む)などとして有用であり、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患(下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー(例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど)、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患(例、腎尿細管間質障害(繊維化)、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など)、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍(例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など)、胃炎、逆流性食道炎、NUD(Non Ulcer Dyspepsia)、胃MALTRリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患(例、慢性気管支炎、肺気腫)、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患(例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、PTCA後再狭窄など)、眼科疾患(例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど)、癌(例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カボジ肉腫、肥満細胞種など)、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、または子宮内膜増殖症などの予防・治療剤などとして、特に、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤などとして使用できる。

10

20

30

【0127】

肥満細胞の脱顆粒抑制剤として、好ましくは、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患、循環器疾患などの予防・治療剤が挙げられる。

【0128】

エイコサノイド産生抑制剤として、好ましくは、免疫疾患などの予防・治療剤が挙げられる。

【0129】

サイトカイン産生抑制剤として、好ましくは、免疫疾患などの予防・治療剤が挙げられる。

【0130】

肥満細胞増殖抑制剤として、好ましくは、泌尿器疾患などの予防・治療剤が挙げられる。

40

【0131】

肥満細胞活性化抑制剤(例、MAPK活性化抑制剤なども含む)として、好ましくは、消化器疾患などの予防・治療剤が挙げられる。

【0132】

本発明のペプチドと本発明の受容体を用いること、または本発明のペプチドと組換え型本発明の受容体の発現系を用いたりガンドレセプターアッセイ系を用いることにより、本発明の受容体と、本発明のペプチドとの結合性を变化させる化合物(例えば、ペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液または血漿など)またはその塩を効率よくスクリーニングすること

50

ができる。

【0133】

該化合物またはその塩には、(i)本発明の受容体を介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP産生抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP γ S結合活性、cAMP依存性プロテインキナーゼの活性化、cGMP依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、マイトジェン活性化蛋白質リン酸化酵素(MAPキナーゼ)(例、ERK1/2(p42/44 MAPキナーゼ)、p38 MAPK、JNK/SAPK、ERK5など)の活性化などを促進する活性などを有する化合物(アゴニスト)、(ii)上記細胞刺激活性を有しない化合物(アンタゴニスト)、(iii)本発明の受容体と本発明のペプチドとの結合力を促進する化合物、(iv)本発明の受容体と本発明のペプチドとの結合力を阻害する化合物などが含まれる。

10

【0134】

具体的には、(i)本発明の受容体に、本発明のペプチドを接触させた場合と(ii)本発明の受容体に、本発明のペプチドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なう。比較は、例えば、本発明の受容体に対する本発明のペプチドの結合量、細胞刺激活性などを測定して行う。

【0135】

本発明のスクリーニング方法としての具体例としては、例えば、

(a)本発明のペプチドを本発明の受容体に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体に接触させた場合における、本発明のペプチドの本発明の受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

20

(b)本発明のペプチドを、本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、本発明のペプチドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

(c)本発明の受容体が、本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体である上記(b)記載のスクリー

30

ニング方法、

(d)本発明のペプチドが、標識したペプチドである上記(a)~(c)のスクリーニング方法などのレセプター結合アッセイ系、

(e)本発明のペプチドを本発明の受容体に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(f)本発明のペプチドを本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

40

(g)本発明の受容体が、本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体である上記(f)のスクリーニング方法などの細胞刺激アッセイ系などが挙げられる。

【0136】

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

【0137】

本発明の受容体としては、ヒトや温血動物の臓器の膜画分などが好適に用いられる。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられる

50

ものとしては、組換え体を用いて大量発現させた本発明の受容体などが適している。

【0138】

本発明の受容体を製造するには、前述の本発明の受容体の製造方法などが用いられる。

【0139】

本発明のスクリーニング方法において、本発明の受容体を含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

【0140】

本発明の受容体を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

10

【0141】

本発明の受容体を含有する細胞としては、本発明の受容体を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。製造方法は前述と同様である。

【0142】

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter - Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明の受容体と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

20

【0143】

該本発明の受容体を含有する細胞や膜画分中の本発明の受容体の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

30

前記のレセプター結合アッセイ系や細胞刺激アッセイ系などのスクリーニング方法を実施するためには、例えば、本発明の受容体画分と、本発明のペプチド（例、標識した本発明のペプチド）などが用いられる。本発明の受容体画分としては、天然型の本発明の受容体画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型本発明の受容体画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識した本発明のペプチドとしては、例えば、放射性同位元素（例、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{33}\text{P}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ など）、蛍光物質（例、フルオレセインなど）、発光物質（例、ルミノールなど）、酵素（例、ペルオキシダーゼなど）またはランタニド元素などで標識された本発明のペプチドなどを用いることができる。

40

【0144】

具体的には、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物のスクリーニングを行うには、本発明の受容体を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス - 塩酸バッファーなどのペプチドと受容体との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王 - アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明の受容体の分解を抑える目的でPMSE、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を

50

添加することもできる。0.01 ~ 10 ml の該レセプター溶液に、一定量 (5000 ~ 50000 cpm) の標識した本発明のペプチドを添加し、同時に 10^{-10} ~ 10^{-7} M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識の本発明のペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は0 ~ 50分、望ましくは4 ~ 37分、20分 ~ 24時間、望ましくは30分 ~ 3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは γ - カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント (B_0) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント ($B_0 - \text{NSB}$) を100%とした時、特異的結合量 ($B - \text{NSB}$) が例えば50%以下になる試験化合物を本発明の受容体と本発明のペプチドとの結合性を低下させる化合物として選択することができる。

10

【0145】

さらに、表面プラズモンセンサー技術を利用することによって、本発明の受容体に結合する化合物をスクリーニングすることもできる。

【0146】

具体的には、ピアコア3000 (ピアコア社) のセンサーチップ表面に、本発明の受容体を固定化後、チップ表面にリン酸緩衝液 (PBS) などに溶解した試験化合物を流したときの表面プラズモンの変化を測定することにより、本発明の受容体に結合する試験化合物を選択する。例えば、表面プラズモンの変化の測定値が5レゾナンスユニット以上与える試験化合物を本発明の受容体に結合性を有する物質として選択する。

前記の細胞刺激アッセイ系のスクリーニング方法を実施するためには、本発明の受容体を介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cAMP 産生抑制、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTP γ S 結合活性、cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、cGMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、マイトジェン活性化蛋白質リン酸化酵素 (MAPキナーゼ) の活性化などを促進する活性または抑制する活性など) (例、ERK1/2 (p42/44 MAPキナーゼ)、p38 MAPK、JNK/SAPK、ERK5 など) を、自体公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明の受容体を含む細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質 (例えば、アラキドン酸など) の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行ってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

20

30

【0147】

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明の受容体を発現した細胞が必要である。本発明の受容体を発現した細胞としては、前述の本発明の受容体発現細胞株などが望ましい。

40

【0148】

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられる。

【0149】

上記細胞刺激アッセイ系のスクリーニング方法について、さらに具体的に以下 (1) ~ (13) に記載する。

【0150】

(1) 受容体発現細胞が受容体アゴニストによって刺激されると細胞内のG蛋白質が活性

50

化されてGTPが結合する。この現象は受容体発現細胞の膜画分においても観察される。通常、GTPは加水分解されてGDPへと変化するが、このとき反応液中にGTP γ Sを添加しておくと、GTP γ SはGTPと同様にG蛋白質に結合するが、加水分解されずにG蛋白質を含む細胞膜に結合した状態が維持される。標識したGTP γ Sを用いると細胞膜に残存した標識されたGTP γ Sを測定することにより、受容体アゴニストの受容体発現細胞刺激活性を測定することができる。

【0151】

この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

10

【0152】

この方法は、本発明の受容体を含む膜画分を用いて行う。本測定法において本発明の受容体膜画分へのGTP γ S結合促進活性を示す物質はアゴニストである。

【0153】

具体的には、標識したGTP γ Sの存在下、本発明のペプチドを本発明の受容体細胞膜画分に接触させた場合と本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体細胞膜画分に接触させた場合における、本発明の受容体細胞膜画分へのGTP γ S結合促進活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

【0154】

本方法において、本発明のペプチドによる本発明の受容体細胞膜画分へのGTP γ S結合促進活性を抑制する活性を示す試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

20

【0155】

一方、試験化合物のみを本発明の受容体細胞膜画分に接触させ、本発明の受容体細胞膜画分へのGTP γ S結合促進活性を測定することにより、アゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0156】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

公知の方法に従って調製した本発明の受容体を含む細胞膜画分を、膜希釈緩衝液（50mM Tris、5mM MgCl₂、150mM NaCl、1 μ M GDP、0.1% BSA；pH7.4）で希釈する。希釈率は、受容体の発現量により異なる。これをFalcon2053に0.2mlずつ分注し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を加え、さらに終濃度200pMとなるように[³⁵S]GTP γ Sを加える。25℃で1時間保温した後、氷冷した洗浄用緩衝液（50mM Tris、5mM MgCl₂、150mM NaCl、0.1% BSA、0.05% CHAPS；pH7.4）1.5mlを加えて、ガラス繊維ろ紙GF/Fでろ過する。65℃、30分保温して乾燥後、液体シンチレーションカウンターでろ紙に残った膜画分に結合した[³⁵S]GTP γ Sの放射活性を測定する。本発明のペプチドのみを加えた実験区の放射活性を100%、本発明のペプチドを加えなかった実験区の放射活性を0%とし、本発明のペプチドによるGTP γ S結合促進活性に対する試験化合物の影響を算出する。GTP γ S結合促進活性が例えば50%以下になる試験化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

30

40

【0157】

(2) 本発明の受容体発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、細胞内cAMPの産生が抑制される。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

【0158】

具体的には、細胞内cAMP量を増加させる物質の存在下、本発明のペプチドを本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、該細胞の細胞内cAMPの産生抑制活性を測定し、比較

50

することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。

【0159】

細胞内cAMP量を増加させる物質としては、例えば、フォルスコリン、カルシトニンなどが用いられる。

【0160】

本発明の受容体発現細胞内のcAMP産生量は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウシなどを免疫して得られた抗cAMP抗体と $[^{125}\text{I}]$ 標識cAMP(ともに市販品)を使用することによるRIA系、または抗cAMP抗体と標識cAMPとを組み合わせたEIA系で測定することができる。また、抗cAMP抗体を、protein Aまたは抗cAMP抗体産生に用いた動物のIgGなどに対する抗体などを使用して固定したシンチラントを含むビーズと $[^{125}\text{I}]$ 標識cAMPとを使用するSPA(Scintillation Proximity Assay)法による定量、化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティーホモジニアスアッセイ系であるAlphaScreen(PerkinElmer社)を応用した競合法cAMP検出キット(PerkinElmer社)による定量も可能である。

10

【0161】

本方法において、本発明のペプチドによる本発明の受容体発現細胞のcAMP産生抑制活性を阻害する活性を示す試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0162】

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させて、cAMP産生抑制活性を調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうことができる。

20

【0163】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞(例、CHO細胞などの動物細胞)を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)で洗浄する(以下、反応用バッファーと略記する)。その後、0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、20 μM の本発明のペプチドまたは20 μM の本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した2 μM フォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを、細胞に加え、37℃で24分間反応させる。100 μl の20%過塩素酸を加えて反応を停止させ、その後氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出する。抽出液中のcAMP量を、cAMP EIAキット(アマシャムファルマシアバイオテク)を用いて測定する。フォルスコリンの刺激によって産生されたcAMP量を100%とし、20 μM の本発明のペプチドの添加によって抑制されたcAMP量を0%として、本発明のペプチドによるcAMP産生抑制活性に対する試験化合物の影響を算出する。本発明のペプチドの活性を阻害して、cAMP産生活性が例えば50%以上になる試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

30

【0164】

また、本発明のペプチドの刺激により、細胞内cAMP量が増加する性質を示す本発明の受容体発現細胞を使用する場合、本発明のペプチドを本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、該細胞の細胞内cAMPの産生促進活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

40

【0165】

本方法において、本発明のペプチドによる本発明の受容体発現細胞のcAMP産生促進活性を阻害する活性を示す試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0166】

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させてcAMP産生促進活性を調べ

50

ることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうことができる。

【0167】

cAMP産生促進活性は、上記のスクリーニング法においてフォルスコリンを添加せずに本発明の受容体発現細胞（例、CHO細胞などの動物細胞）に本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加して産生されたcAMPを上記の方法で定量して測定する。

【0168】

(3) CRE-レポーター遺伝子ベクターを用いて、本発明のペプチドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

10

【0169】

CRE (cAMP response element) を含むDNAを、ベクターのレポーター遺伝子上流に挿入し、CRE-レポーター遺伝子ベクターを得る。CRE-レポーター遺伝子ベクターを導入した本発明の受容体発現細胞において、cAMPの上昇を伴う刺激は、CREを介したレポーター遺伝子発現と、それに引き続くレポーター遺伝子の遺伝子産物（蛋白質）の産生を誘導する。つまり、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定することにより、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入細胞内のcAMP量の変動を検出することができる。

【0170】

具体的には、細胞内cAMP量を増加させる物質の存在下、本発明のペプチドを、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。

20

【0171】

細胞内cAMP量を増加させる物質としては、例えば、フォルスコリン、カルシトニンなどが用いられる。

【0172】

ベクターとしては、例えば、ピッカジーン ベイシックベクター、ピッカジーン エンハンサーベクター（東洋インキ製造（株））などが用いられる。CREを含むDNAを、上記ベクターのレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトに挿入し、CRE-レポーター遺伝子ベクターとする。

30

【0173】

本方法において、本発明のペプチドによるレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性抑制を回復させる試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0174】

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させて、フォルスコリン刺激によって上昇した発光量の本発明のペプチドと同様な抑制を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0175】

40

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼを利用する例を用いて、このスクリーニング方法の具体例を以下に述べる。

【0176】

CRE-レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）を導入した本発明の受容体発現細胞を、24穴プレートに 5×10^3 cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハンスバッファー（pH7.4）で洗浄する（以下、反応用バッファーと略記する）。その後0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、100 μ Mの本発明のペプチドまたは100 μ Mの本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した2 μ M フォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを、細胞に加

50

え、37 で24分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。本発明のペプチド単独を添加した場合と、100 μ Mの本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した場合のルシフェラーゼによる発光量を測定して、比較する。

【0177】

本発明のペプチドは、フォルスコリン刺激に基づくルシフェラーゼによる発光量の増加を抑制する。該抑制を回復させる化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0178】

レポーター遺伝子として、例えば、アルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（chloramphenicol acetyltransferase）、 β -ガラクトシダーゼなどの遺伝子を用いてもよい。これらのレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性は、公知の方法に従い、または市販の測定キットを用いて測定する。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530を用いて、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kitを用いて、 β -ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-X Eを用いて測定する。

【0179】

（4）SRE-レポーター遺伝子ベクターを用いて、本発明のペプチドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

【0180】

SRE（serum response element）を含むDNAを、ベクターのレポーター遺伝子上流に挿入し、SRE-レポーター遺伝子ベクターを得る。SRE-レポーター遺伝子ベクターを導入した本発明の受容体発現細胞において、血清刺激によるMAPキナーゼ活性化などの増殖シグナルの活性化は、SREを介したレポーター遺伝子発現と、それに引き続くレポーター遺伝子の遺伝子産物（蛋白質）の産生を誘導する。つまり、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定することにより、SRE-レポーター遺伝子ベクター導入細胞内の増殖シグナルの活性化を検出することができる。

【0181】

具体的には、本発明のペプチドを、SRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、SRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。

【0182】

ベクターとしては、例えば、ピッカジーン バイシックベクター、ピッカジーン エンハンサーベクター（東洋インキ製造（株））などが用いられる。SREを含むDNAを、上記ベクターのレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトに挿入し、SRE-レポーター遺伝子ベクターとする。

【0183】

本方法において、本発明のペプチドによるレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性化を抑制させる試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0184】

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させて、本発明のペプチドと同様な発光量の上昇を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0185】

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼを利用する例を用いて、このスクリーニング

10

20

30

40

50

方法の具体例を以下に述べる。

【0186】

SRE-レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）を導入した本発明の受容体発現細胞を、24穴プレートに 5×10^3 cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハンクスバッファー（pH7.4）で洗浄する（以下、反応用バッファーと略記する）。その後0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、100 μ Mの本発明のペプチドまたは100 μ Mの本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した0.25mlの反応用バッファーを、細胞に加え、37℃で24分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。本発明のペプチド単独を添加した場合と、100 μ Mの本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した場合のルシフェラーゼによる発光量を測定して、比較する。

10

【0187】

本発明のペプチドは、ルシフェラーゼによる発光量を増加させる。該増加を抑制させる化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0188】

レポーター遺伝子として、例えば、アルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（chloramphenicol acetyltransferase）、 β -ガラクトシダーゼなどの遺伝子を用いてもよい。これらのレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性は、公知の方法に従い、または市販の測定キットを用いて測定する。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530を用いて、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kitを用いて、 β -ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-XEを用いて測定する。

20

【0189】

（5）本発明の受容体発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、アラキドン酸代謝物を細胞外に放出する。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

30

【0190】

あらかじめ、標識したアラキドン酸を、本発明の受容体発現細胞に取り込ませておくことによって、アラキドン酸代謝物放出活性を、細胞外に放出された標識されたアラキドン酸代謝物を測定することによって測定することができる。

【0191】

具体的には、本発明のペプチドを、標識したアラキドン酸を含有する本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、標識したアラキドン酸を含有する本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、アラキドン酸代謝物の放出活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

40

【0192】

本方法において、本発明のペプチドによるアラキドン酸代謝物放出活性を阻害する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0193】

また、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明の受容体発現細胞のアラキドン酸代謝物放出活性を公知の方法で調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうこともできる。

【0194】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

50

本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種し、24時間培養後、 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸を $0.25 \mu\text{Ci/well}$ となるよう添加し、16時間後、細胞を0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハンクスバッファー (pH7.4) (以下、反应用バッファーと略記する) で洗浄する。終濃度 $20 \mu\text{M}$ の本発明のペプチドまたは終濃度 $20 \mu\text{M}$ の本発明のペプチドおよび試験化合物を含む反应用バッファー $500 \mu\text{l}$ を、各wellに添加する。37℃で60分間インキュベートした後、反応液 $400 \mu\text{l}$ をシンチレーターに加え、反応液中に遊離した $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンターにより測定する。

【0195】

反应用バッファー $500 \mu\text{l}$ のみを添加した場合 (本発明のペプチド非添加・試験化合物非添加) の遊離 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量を0%、 $20 \mu\text{M}$ の本発明のペプチドを含む反应用バッファーを添加した場合 (試験化合物非添加) の遊離 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量を100%として、試験化合物を添加した場合の遊離 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量を算出する。

10

【0196】

アラキドン酸代謝物放出活性が、例えば50%以下になる試験化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0197】

(6) 本発明の受容体発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、細胞内のCa濃度が上昇する。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

20

【0198】

具体的には、本発明のペプチドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞内カルシウム濃度上昇活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。測定は公知の方法に従って行う。

【0199】

本方法において、本発明のペプチドによる細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

30

【0200】

一方、試験化合物のみの添加による蛍光強度の上昇を測定することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0201】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を、滅菌した顕微鏡用カバーガラス上に播き、2日後、培養液を、4mM Fura-2 AM (同仁化学研究所) を懸濁したHBSSに置換し、室温で2時間30分おく。HBSSで洗浄した後、キュベットにカバーガラスをセットし、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加し、励起波長340nmおよび380nmでの、505nmの蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。

40

【0202】

また、FLIPR (モレキュラーデバイス社製) を使って行ってもよい。本発明の受容体発現細胞懸濁液にFluo-3 AM (同仁化学研究所製) を添加し、細胞に取り込ませた後、上清を遠心により数度洗浄後、96穴プレートに細胞を播く。FLIPR装置にセットし、Fura-2の場合と同様に、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加し、蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。

【0203】

さらに、本発明の受容体発現細胞に、細胞内Caイオンの上昇によって発光するような蛋白質の遺伝子 (例、aequorinなど) を共発現させておき、細胞内Caイオン濃度の上昇によって、該遺伝子蛋白質 (例、aequorinなど) がCa結合型となり発光することを利用して、

50

本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることもできる。

【0204】

細胞内Caイオンの上昇によって発光するような蛋白質の遺伝子を共発現させた本発明の受容体発現細胞を、96穴プレートに播き、上記と同様に、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加し、蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。

【0205】

本発明のペプチドによる蛍光強度の上昇を、抑制する試験化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

10

【0206】

(7) 受容体を発現する細胞に、受容体アゴニストを添加すると、細胞内イノシトール三リン酸濃度は上昇する。本発明のペプチドの、本発明の受容体発現細胞における細胞内イノシトール三リン酸産生活性を利用することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

【0207】

具体的には、標識したイノシトールの存在下、本発明のペプチドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、イノシトール三リン酸産生活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。測定は公知の方法に従って行う。

20

【0208】

本方法において、イノシトール三リン酸産生活性を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0209】

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、イノシトール三リン酸産生上昇を測定することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0210】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播き、1日間培養する。その後、myo-[2-³H]inositol (2.5 μCi/well) を添加した培地で1日間培養し、細胞を放射活性を有するイノシトールを無添加の培地でよく洗浄する。本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加後、10%過塩素酸を加え、反応を止める。1.5M 水酸化カリウムおよび60mM HEPES溶液で中和し、0.5mlのAG1x8樹脂 (Bio-Rad) を詰めたカラムに通し、5mM 四ホウ酸ナトリウム (Na₂B₄O₇) および60mM ギ酸アンモニウムで洗浄した後、1M ギ酸アンモニウムおよび0.1M ギ酸で溶出した放射活性を、液体シンチレーションカウンターで測定する。本発明のペプチドを添加しない場合の放射活性を0%、本発明のペプチドを添加した場合の放射活性を100%とし、試験化合物の、本発明のペプチドと本発明の受容体の結合に対する影響を算出する。

30

【0211】

イノシトール三リン酸産生活性が、例えば50%以下になる試験化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

40

【0212】

(8) TRE-レポーター遺伝子ベクターを用いて、本発明のペプチドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

【0213】

TRE (TPA response element) を含むDNAを、ベクターのレポーター遺伝子上流に挿入し、TRE-レポーター遺伝子ベクターを得る。TRE-レポーター遺伝子ベクターを導入した本発明の受容体発現細胞において、細胞内カルシウム濃度の上昇を伴う刺激は、TREを介した

50

レポーター遺伝子発現と、それに引き続くレポーター遺伝子の遺伝子産物（蛋白質）の産生を誘導する。つまり、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定することにより、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入細胞内のカルシウム量の変動を検出することができる。

【0214】

具体的には、本発明のペプチドを、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。

【0215】

ベクターとしては、例えば、ピッカジーン ベイシックベクター、ピッカジーン エンハンサーベクター（東洋インキ製造（株））などが用いられる。TREを含むDNAを、上記ベクターのレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトに挿入し、TRE-レポーター遺伝子ベクターとする。

【0216】

本方法において、本発明のペプチドによるレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0217】

一方、試験化合物のみをTRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のペプチドと同様な発光量の増加を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0218】

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼを利用する例を用いて、このスクリーニング方法の具体例を以下に述べる。

TRE-レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）を導入した本発明の受容体発現細胞を、24穴プレートに 5×10^3 cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハンスバッファー（pH7.4）で洗浄した後、100 μ Mの本発明のペプチドまたは100 μ Mの本発明のペプチドおよび試験化合物を添加し、37℃で60分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。本発明のペプチドを添加した場合と、100 μ Mの本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した場合のルシフェラーゼによる発光量を測定して、比較する。

【0219】

本発明のペプチドによる細胞内カルシウムの上昇によって、ルシフェラーゼによる発光量が増加する。この増加を抑制する化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0220】

レポーター遺伝子として、例えば、アルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（chloramphenicol acetyltransferase）、 β -ガラクトシダーゼなどの遺伝子を用いてもよい。これらのレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性は、公知の方法に従い、または市販の測定キットを用いて測定する。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530を用いて、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kitを用いて、 β -ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-X Eを用いて測定する。

【0221】

（9）本発明の受容体発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、MAPキナーゼが活性化され、増殖する。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を

10

20

30

40

50

変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

【0222】

具体的には、本発明のペプチドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞増殖を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

【0223】

本発明の受容体発現細胞の増殖は、例えば、MAPキナーゼ活性、チミジン取り込み活性、ATP量、細胞数などを測定すればよい。

【0224】

具体例としては、MAPキナーゼ活性については、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に添加した後、細胞溶解液から抗MAPキナーゼ抗体を用いた免疫沈降によりMAPキナーゼ分画を得た後、公知の方法、例えば和光純薬製MAP Kinase Assay Kitおよび γ -[^{32}P]-ATPを使用してMAPキナーゼ活性を測定し、比較する。

【0225】

チミジン取り込み活性については、本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播種し、培養し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した後、放射活性により標識したチミジン（例、[methyl- ^3H]-チミジンなど）を加え、その後、細胞を溶解し、細胞内に取り込まれたチミジンの放射活性を、液体シンチレーションカウンターで計数することにより、チミジン取り込み活性を測定し、比較する。

【0226】

ATP量の測定については、本発明の受容体発現細胞を96穴プレートに播種し、培養し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した後、例えばCellTiter-Glo (Promega) を用いて細胞内のATP量を測定し、比較する。

【0227】

細胞数の測定については、本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播種し、培養し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した後、MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) を添加する。細胞内に取り込まれてMTTが変化したMTTホルマゼンを、塩酸にて酸性としたイソプロパノール水溶液で細胞を溶解した後、570nmの吸収によって測定し、比較する。

【0228】

本方法において、本発明の受容体発現細胞の増殖を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0229】

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のペプチドと同様な細胞増殖活性を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0230】

チミジン取り込み活性を利用するスクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに5000個/ウェル播き、1日間培養する。次に血清を含まない培地で2日間培養し、細胞を飢餓状態にする。本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を、細胞に添加して24時間培養した後、[methyl- ^3H]-チミジンをウェル当たり0.015MBq添加し、6時間培養する。細胞をPBSで洗った後、メタノールを添加して10分間放置する。次に5%トリクロロ酢酸を添加して15分間放置後、固定された細胞を蒸留水で4回洗う。0.3N水酸化ナトリウム溶液で細胞を溶解し、溶解液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。

【0231】

本発明のペプチドを添加した場合の放射活性の増加を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

10

20

30

40

50

【0232】

(10) 本発明の受容体発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、カリウムチャネルが活性化し、細胞内にあるKイオンが、細胞外に流出する。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

【0233】

Kイオンと同族元素であるRbイオン（ルビジウムイオン）は、Kイオンと区別無く、カリウムチャネルを通して細胞外に流出する。よって、本発明の受容体発現細胞に、放射活性同位体であるRb（ ^{86}Rb ）を取り込ませておいた後、本発明のペプチドの刺激によって流出する ^{86}Rb の流れ（流出活性）を測定することにより、本発明のペプチドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定する。

10

【0234】

具体的には、 ^{86}Rb の存在下、本発明のペプチドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、 ^{86}Rb の流出活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。

【0235】

本方法において、本発明のペプチド刺激による ^{86}Rb の流出活性の上昇を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

20

【0236】

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のペプチドと同様な ^{86}Rb の流出活性の上昇を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0237】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播き、2日間培養する。その後、 1mCi/ml の $^{86}\text{RbCl}$ を含む培地中で2時間保温する。細胞を培地でよく洗浄し、外液中の $^{86}\text{RbCl}$ を完全に除く。本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を細胞に添加し、30分後外液を回収し、 γ カウンターで放射活性を測定し、比較する。

30

【0238】

本発明のペプチド刺激による ^{86}Rb の流出活性の上昇を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0239】

(11) 本発明の受容体発現細胞が本発明のペプチドに反応し、細胞外のpHが変化する。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

【0240】

具体的には、本発明のペプチドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞外のpH変化を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。

40

【0241】

細胞外pH変化は、例えば、Cytosensor装置（モレキュラーデバイス社）を使用して測定する。

【0242】

本方法において、本発明のペプチドによる細胞外pH変化を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0243】

50

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のペプチドと同様な細胞外 pH 変化を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0244】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞をCytosensor装置用のカプセル内で終夜培養し、装置のチャンパーにセットして細胞外pHが安定するまで約2時間、0.1% BSAを含むRPMI1640培地（モレキュラーデバイス社製）を灌流させる。pHが安定した後、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を含む培地を細胞上に灌流させる。灌流によって生じた培地のpH変化を測定し、比較する。

10

【0245】

本発明のペプチドによる細胞外 pH 変化を抑制する化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0246】

(12) 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のhaploid α -mating type (MAT α) の性フェロモン受容体Ste2は、G蛋白質Gpa1と共役しており、性フェロモン α -mating factorに応答してMAPキナーゼを活性化し、これに引き続き、Far1 (cell-cycle arrest) および転写活性化因子Ste12が活性化される。Ste12は、種々の蛋白質（例えば、接合に關与するFUS1）の発現を誘導する。一方、制御因子Sst2は上記の過程に抑制的に機能する。この系において、受容体遺伝子を導入した酵母を作製し、受容体アゴニストの刺激により酵母細胞内のシグナル伝達系を活性化し、その結果生じる増殖などを指標として用いる、受容体アゴニストと受容体との反応の測定系の試みが行なわれている（Trends in Biotechnology, 15巻, 487-494頁, 1997年）。上記の受容体遺伝子導入酵母の系を利用して、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

20

【0247】

具体例を以下に示す。

MAT α 酵母のSte2およびGpa1をコードする遺伝子を除去し、代わりに、本発明の受容体遺伝子およびGpa1-Gai2融合蛋白質をコードする遺伝子を導入する。Far1をコードする遺伝子を除去してcell-cycle arrestが生じないようにし、また、Sst2をコードする遺伝子を除去して本発明のペプチドに対する応答の感度を向上させておく。さらに、FUS1にヒスチジン生合成遺伝子HIS3を結合したFUS1-HIS3遺伝子を導入する。この遺伝子組換え操作は、例えば、Molecular and Cellular Biology, 15巻, 6188-6195頁, 1995年に記載の方法において、ソマトスタチン受容体タイプ2 (SSTR2) 遺伝子を、本発明の受容体に置き換えて実施することができる。

30

【0248】

このように構築された形質変換酵母は、本発明のペプチドに高感度で反応し、その結果、MAPキナーゼの活性化が起き、ヒスチジン生合成酵素が合成されるようになり、ヒスチジン欠乏培地で生育可能になる。

【0249】

従って、上記の本発明の受容体発現酵母（Ste2遺伝子およびGpa1遺伝子が除去され、本発明の受容体遺伝子およびGpa1-Gai2融合蛋白質コード遺伝子が導入され、Far遺伝子およびSst2遺伝子が除去され、FUS1-HIS3遺伝子が導入されたMAT α 酵母）を、ヒスチジン欠乏培地で培養し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を接触させ、該酵母の生育を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

40

【0250】

本方法において、該酵母の生育を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0251】

50

一方、試験化合物のみを上記の本発明の受容体発現酵母に接触させ、本発明のペプチドと同様な酵母の生育を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0252】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

上記の本発明の受容体発現酵母を完全合成培地の液体培地で終夜培養し、その後、ヒスチジンを除去した溶解寒天培地に、 2×10^4 cell/mlの濃度になるように加える。ついで、 9×9 cmの角形シャーレに播く。寒天が固化した後、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物をしみこませた滅菌濾紙を寒天表面におき、30℃で3日間培養する。試験化合物の影響は、濾紙の周囲の酵母の生育を、本発明のペプチドのみをしみこませた滅菌濾紙を用いた場合と比較する。また、あらかじめ、ヒスチジンを除去した寒天培地に本発明のペプチドを添加しておき、滅菌濾紙に試験化合物のみをしみこませて酵母を培養し、シャーレ全面での酵母の生育が濾紙の周囲で影響を受けることを観察してもよい。

【0253】

酵母の生育を抑制する化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0254】

(13) 本発明の受容体遺伝子RNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、本発明のペプチドによって刺激すると細胞カルシウム濃度が上昇して、calcium-activated chloride currentが生じる。これは、膜電位の変化としてとらえることができる(Kイオン濃度勾配に変化がある場合も同様)。本発明のペプチドによって生じる本発明の受容体導入アフリカツメガエル卵母細胞における上記反応を利用して、本発明のペプチドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

【0255】

具体的には、本発明のペプチドを、本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させた場合における、細胞膜電位の変化を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。

【0256】

本方法において、細胞膜電位変化を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0257】

一方、試験化合物のみを本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させ、本発明のペプチドと同様な細胞膜電位変化を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0258】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

氷冷して動けなくなった雌のアフリカツメガエルから取り出した、卵母細胞塊を、MBS液(88mM NaCl, 1mM KCl, 0.41mM CaCl_2 , 0.33mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.82mM MgSO_4 , 2.4mM NaHCO_3 , 10mM HEPES; pH7.4)に溶かしたコラーゲナーゼ(0.5mg/ml)で卵塊がほぐれるまで19℃、1~6時間、150rpmで処理する。外液をMBS液に置換することで3度洗浄し、マイクロマニピュレーターで本発明の受容体遺伝子poly A付加cRNA(50ng/50nl)を卵母細胞にマイクロインジェクションする。

【0259】

本発明の受容体遺伝子mRNAは、組織や細胞から調製してもよく、プラスミドからin vitroで転写してもよい。本発明の受容体遺伝子mRNAをMBS液中で20℃で3日培養し、これをRinger液を流しているvoltage clamp装置のくぼみに置き、電位固定用ガラス微小電極および電位測定用ガラス微小電極を細胞内に刺入し、(-)極は細胞外に置く。電位が安定し

たら、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を含むRinger液を流して電位変化を記録する。試験化合物の影響は、本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞の細胞膜電位変化を、本発明のペプチドのみ含むRinger液を流した場合と比較することによって測定することができる。

【0260】

細胞膜電位変化を抑制する化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0261】

上記の系において、電位の変化量を増大させると、測定しやすくなるため、各種のG蛋白質遺伝子のpoly A付加RNAを導入してもよい。また、カルシウム存在下で発光を生じるような蛋白質（例、aequorinなど）の遺伝子のpoly A付加RNAを共インジェクションすることにより、膜電位変化ではなく発光量を測定することもできる。

【0262】

さらに、哺乳動物由来の肥満細胞を使用したスクリーニング方法について、以下に述べる。

哺乳動物（好ましくはヒト、チンパンジー、サルなど）由来の肥満細胞（肥満細胞株も含む）、好ましくは皮膚、膀胱、胃、小腸、肺などの由来の肥満細胞を用いて以下の方法などにより、例えば肥満細胞の脱顆粒抑制作用、エイコサノイド産生抑制作用、サイトカイン産生抑制作用、肥満細胞増殖抑制作用、肥満細胞活性化抑制作用などを有する化合物をスクリーニングすることができる。

【0263】

（1）試験化合物の存在下および非存在下、本発明のペプチドを肥満細胞に接触させ、細胞からRNAを調製し、サイトカイン（例、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13、TGF- β など）RNA量を（例、RT-PCR、Quantitative real-time-PCRなどにより）測定し、比較することにより、サイトカイン産生抑制剤（サイトカイン産生抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

【0264】

（2）試験化合物の存在下および非存在下、本発明のペプチドを肥満細胞に接触させ、培養上清中のサイトカイン（例、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13、TGF- β など）タンパク質量を（例、EIA、RIAなどにより）測定し、比較することにより、サイトカイン（例、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13、TGF- β など）産生抑制剤（サイトカイン産生抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

【0265】

（3）試験化合物の存在下および非存在下、本発明のペプチドを肥満細胞に接触させ、サイトカイン（例、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13、TGF- β など）産生細胞数を（例、ELISPOT法により）測定し、比較することにより、サイトカイン産生抑制剤（サイトカイン産生抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

【0266】

（4）試験化合物の存在下および非存在下、本発明の受容体をコードするポリヌクレオチドに対するsiRNAを含むsiRNAベクター（例、siRNAベクター、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド発現ベクターなど）を多数作製し、siRNAライブラリーを作製後、肥満細胞にトランスフェクションし、本発明のペプチドと接触させ、細胞におけるサイトカイン（例、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13、TGF- β など）の発現量（例、サイトカインRNA量、サイトカインタンパク質量など）を測定し、発現量の低下を誘導するsiRNAの塩基配列を調べることにより、サイトカイン産生抑制剤（サイトカイン産生抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。本発明のペプチドと接触させる際、例えば肥満細胞を能動または受動感作した場合は、抗IgE抗体、抗体特異的抗原などを、その他の場合は、NGF、Stem Cell Factor(SCF)、サイトカイン、レクチンなどを用いて共刺激してもよい。

【0267】

(5) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のペプチドを、放射標識したアラキドン酸を取り込ませた肥満細胞に接触させ、培養上清中の放射活性を測定し、比較することにより、エイコサノイド産生抑制作用（エイコサノイド産生抑制作用を有する化合物など）のある化合物をスクリーニングする。

【0268】

(6a) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のペプチドを肥満細胞に接触させ、培養上清中の顆粒含有物（例、ヒスタミン、セロトニン、 β -ヘキソサミニダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、トリプターゼ、キマーゼ、カルボキシペプチダーゼなど）量を測定し、比較することにより、脱顆粒抑制作用（脱顆粒抑制作用を有する化合物など）のある化合物をスクリーニングする。顆粒含有物の量は、公知の方法、例えばEIA、RIA、HPLC、酵素活性測定等で定量できる。あるいは、肥満細胞を視覚化し（例、ビデオ装置など）、脱顆粒した細胞を数えてもよい。

10

【0269】

(6b) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のペプチドを、放射標識した顆粒含有物を取り込ませた肥満細胞に接触させ、培養上清中の放射活性を測定し、比較することにより、脱顆粒抑制剤（脱顆粒抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

【0270】

(6c) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のペプチドを肥満細胞に接触させ、アネキシンVの肥満細胞への結合量を測定（例、FACSなど）し、比較することにより、脱顆粒抑制剤（脱顆粒抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

20

【0271】

(7) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のペプチドを肥満細胞に接触させ、細胞溶解液をポリアクリルアミドゲルで分離し、フィルターに転写後、MAPキナーゼ特異的な抗体および化学発光試薬を用いてイメージアナライザー等で検出し、発光の強度を比較することにより、肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む、肥満細胞活性化抑制作用を有する化合物）をスクリーニングする。

【0272】

(8) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のペプチドを肥満細胞（例、24穴プレートに播種後培養された肥満細胞）に接触させ、放射性同位元素で標識されたチミジン（例、[methyl- 3 H]-チミジンなど）を添加後、細胞を溶解し、細胞内に取り込まれたチミジンの放射活性を、液体シンチレーションカウンターで計数することにより、チミジン取り込み活性を測定し、比較することにより、肥満細胞増殖抑制剤（肥満細胞増殖抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

30

【0273】

(9) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のペプチドを肥満細胞（例、24穴プレートに播種後培養された肥満細胞）に接触させ、MTT（3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide）を添加後、細胞内に取り込まれてMTTが変化したMTTホルマザンを、塩酸にて酸性としたイソプロパノール水溶液で細胞を溶解した後、570nmの吸収によって測定して比較することにより、肥満細胞増殖抑制剤（肥満細胞増殖抑制作用を有する化合物）をスクリーニングする。

40

【0274】

本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤のスクリーニング用キット、または本発明の受容体に対するアンタゴニストのスクリーニング用キットは、本発明の受容体または本発明の受容体を含有する細胞もしくは細胞の膜画分、および本発明のペプチドを含有する。

【0275】

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

(i) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

50

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、または用時調製しても良い。

(ii) 本発明の受容体標品

本発明の受容体を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

(iii) 標識リガンド

[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³²P]、[³³P]、[³⁵S]などの放射性同位元素で標識した本発明のペプチドを適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを、4℃または-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μMに希釈する。

10

(iv) リガンド標準液

本発明のペプチドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1 mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

【0276】

2. 測定法

(i) 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の受容体を発現させた細胞を、測定用緩衝液1 mlで2回洗浄した後、490 μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

(ii) $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μl加えた後、標識した本発明のペプチドを5 μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3} Mの本発明のペプチドを5 μl加えておく。

20

(iii) 反応液を除去し、1 mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識された本発明のペプチドを0.2 N NaOH・1%SDSで溶解し、4 mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

(iv) 液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次式で求める。

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

30

B₀ : 最大結合量

【0277】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩は、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合を変化させる化合物あるいは本発明の受容体の活性を促進または阻害する化合物であり、具体的には、(i) 本発明の受容体を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩 (本発明の受容体アゴニスト)、(ii) 該刺激活性を有しない化合物 (本発明の受容体アンタゴニスト)、(iii) 本発明の受容体と本発明のペプチドとの結合力を促進する化合物、(iv) 本発明の受容体と本発明のペプチドとの結合力を阻害する化合物などである。該化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

40

【0278】

該化合物の塩としては、前記した本発明の受容体の塩と同様のものが用いられる。

【0279】

上記本発明の受容体アゴニストであるか、またはアンタゴニストであるかの評価方法は、例えば、以下の(i)または(ii)に従えばよい。

i) 前記(i) ~ (iii)のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる (特に、結合を阻害する) 化合物を得た後、該化合物が上記した本発明の受容体を介する細胞刺激活性を有してい

50

るか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニスト（アゴニスト）であり、該活性を有しない化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニスト（アンタゴニスト）である。

ii) (a) 試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させ、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニストである。

(b) 本発明のペプチドを本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。本発明の受容体を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニストである。

10

【0280】

本発明の受容体アンタゴニストは、本発明の受容体または本発明のペプチドが有する生理活性（例、肥満細胞の脱顆粒促進作用、エイコサノイド産生促進作用、サイトカイン産生促進作用、肥満細胞増殖促進作用、肥満細胞活性化作用など）を抑制することができるので、低毒性で安全な優れた肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤、肥満細胞活性化抑制作用剤などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、渗出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、パセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、PTCA後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カボジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症などの予防・治療剤などとして、特に、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤などとして使用できる。

20

30

【0281】

本発明の受容体と本発明のペプチドとの結合力を阻害する化合物は、本発明の受容体アンタゴニストと同様に用いられる。

40

【0282】

本発明の受容体と本発明のペプチドとの結合力を促進する化合物は、本発明の受容体アゴニストと同様に用いられる。

【0283】

また、本発明は、本発明のペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする本発明のペプチドの遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法なども提供する。

【0284】

具体的には、(i) 本発明のペプチドを産生する能力を有する細胞を培養した場合と (i

50

i) 本発明のペプチドを産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行い、本発明のペプチドの遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする。

【0285】

上記スクリーニング方法においては、例えば、(i)と(ii)の場合における、本発明のペプチドの遺伝子の発現量(具体的には、本発明のペプチド量または本発明のペプチドをコードするmRNA量など)を測定して、比較する。

【0286】

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

10

【0287】

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明ポリペプチドまたは本発明のペプチドを産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4~10(望ましくは、pH約6~8)のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のペプチドの活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

【0288】

本発明のペプチドを産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のペプチドをコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主(形質転換体)などが用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のペプチドを細胞膜上に発現させた形質転換体などが好ましく用いられる。

20

【0289】

本発明のペプチドの蛋白質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明の抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記ポリペプチドまたはペプチドを、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

本発明のペプチドの遺伝子の発現量は、公知の方法、例えば、ノーザンブロッティングやReverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)、リアルタイムPCR解析システム(ABI社製、TaqMan polymerase chain reaction)などの方法あるいはそれに準じる方法にしたがって測定することができる。

30

【0290】

例えば、上記(ii)の場合における本発明のペプチドの遺伝子の発現を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のペプチドの遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

【0291】

例えば、上記(ii)の場合における本発明のペプチドの遺伝子の発現を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のペプチドの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

40

【0292】

本発明のペプチドの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、本発明の受容体アンタゴニストと同様に用いられる。

【0293】

本発明のペプチドの遺伝子の発現を促進(発現量を増加)する化合物またはその塩は、本発明の受容体アゴニストと同様に用いられる。

【0294】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物

50

、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のペプチドと本発明のペプチドとの結合性を变化させる化合物、本発明のペプチドの活性または機能を促進または阻害する化合物、本発明のペプチドの遺伝子の発現を促進または阻害（発現量を増加または減少）する化合物などである。

【0295】

該化合物の塩としては、前記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬（予防・治療剤など）として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。

【0296】

該化合物またはその塩は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

【0297】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0298】

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D - ソルビトール、D - マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO - 50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、該化合物またはその塩を、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

【0299】

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

【0300】

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はある。

【0301】

例えば、間質性膀胱炎患者（体重 60 kg 当たり）に、一日につきアンタゴニストを約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg

10

20

30

40

50

g 経口投与する。非経口的に投与する場合、例えば、アンタゴニストを注射剤の形で間質性膀胱炎患者（60 kg 当たり）に投与する場合、一日につきアンタゴニストを約 0.01 ~ 30 mg、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

【0302】

〔2〕本発明のペプチドの定量

本発明のペプチドに対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のペプチドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

10

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のペプチドの定量法、および

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のペプチドの定量法を提供する。

【0303】

上記（ii）の定量法においては、一方の抗体が本発明のペプチドの N 端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のペプチドの C 端部に反応する抗体であることが望ましい。

20

【0304】

また、本発明のペプチドに対するモノクローナル抗体を用いて本発明のペプチドの定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。

【0305】

本発明の抗体を用いる本発明のペプチドの定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ポリペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

30

【0306】

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

40

【0307】

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ポリペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

【0308】

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ

50

(1次反応)、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ(2次反応)たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

【0309】

本発明のサンドイッチ法による本発明のペプチドの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のペプチドの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のペプチドのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

10

【0310】

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

【0311】

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

20

【0312】

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

30

【0313】

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0314】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

【0315】

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックブ

40

50

レス社発行)などを参照することができる。

【0316】

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のペプチドを感度良く定量することができる。

【0317】

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のペプチドの濃度を定量することによって、本発明のペプチドの濃度の増加が検出された場合、例えば、肥満細胞の脱顆粒促進作用、エイコサノイド産生促進作用、サイトカイン産生促進作用、肥満細胞増殖促進作用、肥満細胞活性化作用などが亢進し、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など）、泌尿器疾患（例、腎尿管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など）、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など）、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、PTCA後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カボジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、または子宮内膜増殖症などに、特に、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患などに将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

10

20

30

【0318】

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のペプチドを検出するために使用することができる。また、本発明のペプチドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のペプチドの検出、被検細胞内における本発明のペプチドの挙動の分析などのために使用することができる。

【0319】

〔3〕遺伝子診断薬

本発明のポリヌクレオチド（DNA）は、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトや温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明のペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

40

【0320】

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（Genomics, 第5巻, 874～879頁, 1989年, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第86巻, 2766～2770頁, 1989年）などにより実施することができる。

【0321】

例えば、本発明のペプチドの遺伝子の発現過多が検出された場合は、例えば、肥満細胞の脱顆粒抑制作用、エイコサノイド産生抑制作用、サイトカイン産生抑制作用、肥満細胞

50

増殖抑制作用、肥満細胞活性化抑制作用が亢進し、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、PTCA後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カボジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、または子宮内膜増殖症などに、特に、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患などに将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

10

20

【0322】

〔4〕アンチセンスポリヌクレオチド（例、DNA）を含有する医薬

本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）に相補的に結合し、該ポリヌクレオチド（例、DNA）の発現を抑制することができるアンチセンスポリヌクレオチド（例、アンチセンスDNA）は、例えば、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤、肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、PTCA後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カボジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、または子宮内膜増殖症などの予防・治療剤など、特に、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

30

40

【0323】

50

例えば、上記アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、アデノウィルスアソシエートドウィルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

【0324】

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

【0325】

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のペプチドをコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA〔本発明のペプチドに対するsiRNA (small (short) interfering RNA)、shRNA (small (short) hairpin RNA)、本発明のペプチドをコードするRNAの一部を含有するリボザイムなども、本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制することができ、生体内における本発明のペプチドまたは本発明のポリヌクレオチドの機能を抑制することができるので、例えば、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤、肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD (Non Ulcer Dyspepsia)、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、PTCA後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カボジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、または子宮内膜増殖症などの予防・治療剤など、特に、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

【0326】

二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

【0327】

リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のペプチドをコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明の本発明のペプチドをコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げられる。

上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチ

センスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

【0328】

〔5〕本発明の抗体を含有する医薬

本発明のペプチドに対する抗体（例、本発明のペプチドの活性を不活性化する中和抗体）は、例えば、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤、肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、PTCA後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カボジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

10

20

【0329】

本発明の抗体を含有する上記医薬は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトや温血動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の間質性膀胱炎患者の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

30

【0330】

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

40

【0331】

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

【0332】

50

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤（例、ポリソルベート 80、HCO-50（polyoxyethylene(50mol)adduct of hydrogenated castor oil））などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

10

【0333】

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5 ~ 500 mg、とりわけ注射剤では 5 ~ 100 mg、その他の剤形では 10 ~ 250 mg の上記抗体が含有されていることが好ましい。

【0334】

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

20

【0335】

〔6〕DNA 転移動物

本発明は、外来性の本発明のペプチドをコードする DNA（以下、本発明の外来性 DNA と略記する）またはその変異 DNA（本発明の外来性変異 DNA と略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

【0336】

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記 (1) 記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記 (2) 記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターなどを提供する。

30

【0337】

本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明の DNA 転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に 8 細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とする DNA を転移することによって作出することができる。また、該 DNA 転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性 DNA を転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明の DNA 転移動物を作成することもできる。

40

【0338】

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6 系統、DBA2 系統など、

50

交雑系として、B 6 C 3 F₁系統，B D F₁系統，B 6 D 2 F₁系統，B A L B / c 系統，I C R 系統など）またはラット（例えば、W i s t a r，S D など）などが好ましい。

【 0 3 3 9 】

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

【 0 3 4 0 】

本発明の外來性 D N A とは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明の D N A ではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明の D N A をいう。

【 0 3 4 1 】

本発明の変異 D N A としては、元の本発明の D N A の塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じた D N A などが用いられ、また、異常 D N A も含まれる。

【 0 3 4 2 】

該異常 D N A としては、異常な本発明のペプチドを発現させる D N A を意味し、例えば、正常な本発明のペプチドの機能を抑制するペプチドを発現させる D N A などが用いられる。

【 0 3 4 3 】

本発明の外來性 D N A は、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明の D N A を対象動物に転移させるにあたっては、該 D N A を動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した D N A コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒト D N A を転移させる場合、これと相同性が高い本発明の D N A を有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の D N A を発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒト D N A を結合した D N A コンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明の D N A を高発現する D N A 転移哺乳動物を作出することができる。

【 0 3 4 4 】

本発明のペプチドの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

【 0 3 4 5 】

上記の D N A 発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(i) ウィルス（例、シミアンウィルス、サイトメガロウィルス、モロニー白血病ウイルス、J C ウィルス、乳癌ウイルス、ポリオウィルスなど）に由来する D N A のプロモーター、(ii) 各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリン I I、ウロブラキン I I、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性蛋白質、グルタチオン S - トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β、ケラチン K 1，K 1 0 および K 1 4、コラーゲン I 型および I I 型、サイクリック A M P 依存蛋白質キナーゼ β I サブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般に T i e 2 と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン 3 リン酸化酵素（N a，K - A T P a s e）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネイン I および I I A、メタロプロティナーゼ 1 組織インヒビター、M H C クラス I 抗原（H - 2 L）、H - r a s、レニン、ドーパミン β - 水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（T P O）、ポリペプチド鎖延長因子 1 α（E F - 1 α）、β アクチン、α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖 1 および 2、ミエリン基礎蛋白質、チログロブリン、T h y - 1、免疫グロブリン、H 鎖可変部（V N P）、血清アミロイド P コンポーネント、ミオグロビン、トロポニン C、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリ

10

20

30

40

50

ン A、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子 1 α (EF-1 α) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

【0346】

上記ベクターは、DNA 転移哺乳動物において目的とするメッセンジャー RNA の転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各 DNA の配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスの SV40 ターミネターなどが用いられる。

【0347】

その他、目的とする外来性 DNA をさらに高発現させる目的で各 DNA のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核 DNA のイントロンの一部などをプロモーター領域の 5' 上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の 3' 下流に連結することも目的により可能である。

【0348】

正常な本発明のペプチドの翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来 DNA および市販の各種ゲノム DNA ライブラリーよりゲノム DNA の全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来 RNA より公知の方法により調製された相補 DNA を原料として取得することが出来る。また、外来性の異常 DNA は、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

【0349】

該翻訳領域は転移動物において発現しうる DNA コンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常の DNA 工学的手法により作製することができる。

【0350】

受精卵細胞段階における本発明の外来性 DNA の転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA 転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性 DNA が存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性 DNA を保持することを意味する。本発明の外来性 DNA を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性 DNA を有する。

本発明の外来性正常 DNA を転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性 DNA を安定に保持することを確認して、該 DNA 保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性 DNA の転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA 転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性 DNA が過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性 DNA を過剰に有することを意味する。本発明の外来性 DNA を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性 DNA を過剰に有する。

【0351】

導入 DNA を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該 DNA を過剰に有するように繁殖継代することができる。

【0352】

本発明の正常 DNA を有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常 DNA が高発現させられており、内在性の正常 DNA の機能を促進することにより最終的に本発明のペプチドの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例え

10

20

30

40

50

ば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のペプチドの機能亢進症や、本発明のペプチドが関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のペプチドの増加症状を有することから、例えば、肥満細胞の脱顆粒促進動物、エイコサノイド産生促進動物、サイトカイン産生促進動物、肥満細胞増殖促進動物、肥満細胞活性化動物〔例、MAPK活性化（促進）動物なども含む〕などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、PTCA後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カボジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、または子宮内膜増殖症などの予防・治療剤、特に、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤などのスクリーニング試験にも利用可能である。

【0353】

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

【0354】

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のペプチドの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のペプチドの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

【0355】

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のペプチドの機能不活性型不応症における本発明の異常ペプチドによる正常ペプチドの機能阻害

(dominant negative作用) を説明するモデルとなる。

【 0 3 5 6 】

また、本発明の外來異常 DNA を転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のペプチドの増加症状を有することから、本発明のペプチドの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

【 0 3 5 7 】

また、上記 2 種類の本発明の DNA 転移動物のその他の利用可能性として、例えば、
(i) 組織培養のための細胞源としての使用、
(ii) 本発明の DNA 転移動物の組織中の DNA もしくは RNA を直接分析するか、または DNA により発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明のペプチドにより特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、
(iii) DNA を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
(iv) 上記 (iii) 記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
(v) 本発明の変異ペプチドを単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

【 0 3 5 8 】

さらに、本発明の DNA 転移動物を用いて、本発明のペプチドの機能不活性型不応症などを含む、本発明のペプチドに関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のペプチドに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

【 0 3 5 9 】

また、本発明の DNA 転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、遊離した DNA 転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のペプチド産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のペプチドおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。

【 0 3 6 0 】

さらに、本発明の DNA 転移動物を用いて、本発明のペプチドの機能不活性型不応症を含む、本発明のペプチドに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明の DNA 転移動物または本発明の外來性 DNA 発現ベクターを用いて、本発明のペプチドが関連する疾患の DNA 治療法を検討、開発することが可能である。

【 0 3 6 1 】

〔 7 〕 抗菌剤

本発明は、配列番号： 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩を含有する抗菌剤（以下、本発明の抗菌剤という場合がある。）を提供する。本発明の好ましい態様のペプチドは、優れた抗菌力を有しており、よって、本発明の抗菌剤は、人および哺乳動物（例、マウス、ラット、ウサギ、犬、ネコ、牛、豚等）における病原性細菌により生ずる種々の疾病、たとえば気道感染または尿路感染の予防・治療のために使用されうる。

【 0 3 6 2 】

抗菌剤として本発明のペプチドを使用する場合に対象となる菌は、本発明のペプチドが抗菌活性を示す菌であれば特に限定されず、広範囲のグラム陽性菌およびグラム陰性菌がその対象となるが、例えば、ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ MRSA ）、大腸菌、シュードモナス属の菌、ミクロコッカス属の菌、ビキア属の菌などが挙げられる

。

【0363】

本発明のペプチドは公知のペニシリン剤またはセファロsporin剤と同様に注射剤、カプセル剤、錠剤または顆粒剤などとして経口または経口的に投与できる。投与量は、例えば、前記したような病原性細菌に感染した人および動物の体重1kgあたり本発明のペプチドとして通常0.5～80mg/日、より好ましくは2～40mg/日であり、通常1日2～3回に分割して投与される。本発明の抗菌剤は、本発明のペプチドの他に、通常、薬学的に許容しうる担体、希釈剤および増量剤など、例えば賦形剤（例えば、炭酸カルシウム、カオリン、炭酸水素ナトリウム、乳糖、D-マンニトール、澱粉類、結晶セルロース、タルク、グラニュー糖、多孔性物質など）、結合剤（例えば、デキストリン、ゴム類、アルファ化澱粉、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、プルランなど）、増粘剤（例えば、天然ガム類、セルロース誘導体、アクリル酸誘導体など）、崩壊剤（例えば、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、クロスボドン、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、部分アルファ化澱粉など）、溶剤（例えば、注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油など）、分散剤（例えば、ツイーン80、HCO60、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウムなど）、溶解補助剤（例えば、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなど）、懸濁化剤（例えば、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシメチルセルロースなど）、無痛化剤（例えば、ベンジルアルコールなど）、等張化剤（例えば、塩化ナトリウム、グリセリンなど）、緩衝剤（例えば、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩など）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、澱粉、安息香酸ナトリウムなど）、着色剤（例えば、タール色素、カラメル、三二酸化鉄、酸化チタン、リボフラビン類など）、矯味剤（例えば、甘味類、香料など）、安定剤（例えば、亜硫酸ナトリウム、アスコルビン酸など）および保存剤（例えば、パラベン類、ソルビン酸など）などの中から適宜、適量を用いて、常法に従って調製される。

前記薬学的に許容しうる担体、希釈剤、増量剤などを含んでもよい本発明の抗菌剤は、本発明のペプチドの有効量を含有する。本発明のペプチドの本発明の抗菌剤中の含有量は、通常、製剤全体の約0.1重量%～約100重量%である。

【0364】

また、本発明で用いられる製剤は、本発明のペプチド以外の医薬成分を含有していてもよく、これらの成分は抗菌剤としての目的が達成される限り特に限定されず、適宜適当な配合割合で含有させて合剤とすることが可能である。

【0365】

剤型の具体例としては、例えば錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、カプセル剤（マイクロカプセルを含む）、顆粒剤、細粒剤、散剤、点滴剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、注射剤、吸入剤、軟膏剤、座剤、トローチ剤、パップ剤、徐放剤などが用いられる。これらの製剤は常法（例えば、日本薬局方第12改正に記載の方法など）に従って調製される。特に、注射剤として用いられる場合の担体は、たとえば蒸留水、生理食塩水などが用いられ、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、錠剤として用いられる場合は、公知の薬理的に許容される賦形剤（たとえばデンプン、乳糖、白糖、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム等）、結合剤（たとえばデンプン、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、結晶セルロース等）、滑沢剤（たとえばステアリン酸マグネシウム、タルク等）、破壊剤（たとえばカルボキシメチルカルシウム、タルク等）と混合して用いられる。

【0366】

注射剤として用いられる場合の担体は、たとえば蒸留水、生理食塩水などが用いられ、

10

20

30

40

50

カプセル剤，粉剤，顆粒剤，錠剤として用いられる場合は、公知の薬理学的に許容される賦形剤（たとえばデンプン，乳糖，白糖，炭酸カルシウム，リン酸カルシウム等），結合剤（たとえばデンプン，アラビアゴム，カルボキシメチルセルロース，ヒドロキシプロピルセルロース，結晶セルロース等），滑沢剤（たとえばステアリン酸マグネシウム，タルク等），破壊剤（たとえばカルボキシメチルカルシウム，タルク等）と混合して用いられる。

【 0 3 6 7 】

本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

D N A	: デオキシリボ核酸	
c D N A	: 相補的デオキシリボ核酸	
A	: アデニン	
T	: チミン	
G	: グアニン	
C	: シトシン	
I	: イノシン	
R N A	: リボ核酸	
m R N A	: メッセンジャーリボ核酸	20
d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸	
d T T P	: デオキシチミジン三リン酸	
d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸	
d C T P	: デオキシシチジン三リン酸	
A T P	: アデノシン三リン酸	
E D T A	: エチレンジアミン四酢酸	
S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム	
B H A	: ベンズヒドリルアミン	
p M B H A	: p - メチルベンズヒドリルアミン	
T o s	: p - トルエンスルフォニル	30
B z l	: ベンジル	
B o m	: ベンジルオキシメチル	
B o c	: t - ブチルオキシカルボニル	
D C M	: ジクロロメタン	
H O B t	: 1 - ヒドロキシベンズトリアゾール	
D C C	: N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド	
T F A	: トリフルオロ酢酸	
D I E A	: ジイソプロピルエチルアミン	
G l y 又は G	: グリシン	
A l a 又は A	: アラニン	40
V a l 又は V	: バリン	
L e u 又は L	: ロイシン	
I l e 又は I	: イソロイシン	
S e r 又は S	: セリン	
T h r 又は T	: スレオニン	
C y s 又は C	: システイン	
M e t 又は M	: メチオニン	
G l u 又は E	: グルタミン酸	
A s p 又は D	: アスパラギン酸	
L y s 又は K	: リジン	50

20

30

40

50

あった。そこで、ヒト膵臓癌由来培養細胞株の培養上清より分泌される物質を、タンパク質やペプチドの分解を極力押さえた条件で収集し、ゲルろ過カラムによりペプチド画分とタンパク質画分の分離を行った。また、微量ペプチドまでを含めてできるだけ多数のペプチドを質量分析計で構造解析、同定するためには、ペプチド混合物をできるだけ広範に分離する必要があった。したがって、本実施例ではゲルろ過カラムによる分離後、さらに陽イオン交換カラム、逆相カラムでペプチドを十分に分離した後、タンデム質量分析計によって徹底的なペプチド構造解析を実施した。

【0372】

哺乳類の代表的な抗菌ペプチドである β -ディフェンシン-2やカテリシジンは、生理的条件下での電荷が+6と塩基性が高いことが知られている。この基準で今回同定されたペプチドを検索すると、IGFBP-5[193-214]-NH₂のみが該当したため、本ペプチドの抗菌活性を検討した。当該ペプチドはCysを2つ含み分子内S-S結合で環状構造を形成し、C末端がアミド化された特徴的な構造を有しており、インスリン様成長因子(IGF)と結合して活性を調節する分泌タンパク質、IGFBP-5に由来するペプチドであった。また、生理活性ペプチドにはC末端がアミド化されたペプチド、分子内S-S結合を有するものが多いため、構造的には生理活性ペプチドとして機能する可能性も示唆された。

10

【0373】

当該ペプチドの配列、並びに当該ペプチドを前駆体より切断、生成する配列、アミド化を生成する配列は、ヒト、ラット、マウス、ウシ、ブタで完全に保存されていた。

20

【0374】

ヒト、ラット、マウス、ウシ、ブタの当該ペプチドIGFBP-5[193-214]-NH₂のアミノ酸配列を以下に示す。

IGFBP-5[193-214]-NH₂ : AVYLPNCDRKGFYKRKQCKPSR-NH₂ (配列番号 : 1)

【0375】

(1) ペプチドの分離法

1. 膵臓癌由来培養細胞から分泌されたペプチドを含む培養上清を回収し、定法通りSep-Pak C18 (Waters)を用いて脱塩、抽出を行う。

【0376】

2. ペプチド画分とタンパク質画分を分離するために、ゲルろ過カラムにて分離する (図1a)。

30

カラム : TSK-gel G2000SWXL (21.5 x 300 mm) (東ソー)

溶媒 : 0.1% TFA/60% acetonitrile (TFA: trifluoroacetic acid)

流速 : 1.5 ml/min

ゲルろ過より得られたペプチド画分を5分画して、各画分を陽イオン交換カラムにて分離し、できるだけ多数のペプチドを同定する。

【0377】

3. ペプチド画分のイオン交換カラムによる精製、分離例として、IGFBP-5[193-214]-NH₂を含む分子量3,000-4,000のペプチド画分 (図1a, 太線部) の例を記載する。

分子量3,000-4,000のペプチド画分を凍結乾燥後、還元アルキル化し、陽イオン交換カラム

40

によって分離する (図1b)。

カラム : TSK-gel SP-2SW (1.0 x 50 mm) (東ソー)

溶媒 : A: 10 mMギ酸アンモニウム, pH 3.8 : acetonitrile = 9:1(vol/vol)

B: 1.0 Mギ酸アンモニウム, pH 3.8 : acetonitrile = 9:1(vol/vol)

溶出 : A→B 30 分リニアグラジエント

陽イオン交換カラムで分離されたペプチドは10個に分画する。

【0378】

4. イオン交換カラムによる精製、分離例として、IGFBP-5[193-214]-NH₂を含む1.0 Mギ酸アンモニウム, pH 3.8 : acetonitrile = 9:1で溶出される強陽イオンペプチド画分 (図1b, 太線) の例を記載する。溶出された画分は、逆相カートリッジで濃縮、脱塩後、以下

50

の溶媒Aに溶解し、逆相ナノLCカラムにて分離する (図1c)。

カラム: C18 PepMap (0.075 x 150 mm) (LC Packings, Holland)

溶媒: A: 0.1% TFA/5% acetonitrile

B: 0.1% TFA/95% acetonitrile

溶出: 5%Bで5分間溶出後、同濃度から60%Bまでの55 分間のリニアグラジエント

溶出時間10分から20秒毎に60分間、質量分析計のターゲットプレート上に溶出液を順次スポットする。同時にマトリックスもスポットする。

【0379】

5. ターゲットプレート上の試料を、質量分析計4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems)により構造解析を行う。 10

【0380】

(II) ペプチドの構造決定

質量分析計: 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer, Applied Biosystems, USA

Matrix: 50% saturated solution of alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (ナカライ) in 0.1% TFA/50% acetonitrile (7 mg/4 ml)

【0381】

質量分析計によるペプチド構造決定法

1. 逆相ナノLCの溶出液をProbot (LC Packings, Holland)で自動的に20秒毎にターゲットプレート上に溶出液を順次スポットする。同時に0.5 μ lのマトリックス溶液もスポットし、ペプチドとマトリックスとの共結晶を作る。 20

【0382】

2. 質量分析計のリフレクターモードでMS1を自動測定する。今回はその一例としてIGFBP-5[193-214]-NH₂のモノイソトピックマス(2770.4)が検出されたスポットのMS1を示す(図2a)。

【0383】

3. S/N 20以上のサンプルについてMS2(MS/MS)を測定する。今回はその一例としてIGFBP-5[193-214]-NH₂のMS2を示す(図2b)。

【0384】

4. マスコットによるデータベース検索により、ペプチド構造を同定する。 30

【0385】

[実施例 2]

IGFBP-5[193-214]-NH₂の抗菌活性測定

後述の実施例5で記載した合成法とIGFBP-5[193-214]-NH₂、IGFBP-5[193-215]の構造に従い調製した合成ペプチド(それぞれペプチド1、2)を用いて抗菌活性を測定した。同時に、ペプチド1のシステイン残基を還元アルキル化し(CAM化ペプチド1)、抗菌活性を測定した。

【0386】

陽性コントロールとしてヒト β -ディフェンシン-2(ペプチド研究所)、カテリシジン(L L-37)(Bachem)を用いた。 40

当該ペプチド(ペプチド1)は、グラム陽性菌(*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* 209P, *Staphylococcus epidermidis* K3)、グラム陰性菌 (*Escherichia coli* strain B, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* kp)、真菌 (*Pichia pastoris* GS115)に対し幅広く、かつ強力な抗菌活性を示した(表1)。

システイン残基が修飾されたペプチド(CAM化ペプチド1)やC末端がアミド化されていないペプチド(ペプチド2)の*M. luteus*、*S. epidermidis* K3、*P. pastoris* GS115に対する抗菌活性は、ペプチド1とほとんど変わらなかったため、これらの細菌や真菌に対する抗菌活性には、システイン残基の架橋やC末端のアミド化は重要ではない。

一方、CAM化ペプチド1やペプチド2の*S. aureus* 209P、*E. coli* K12、*E. coli* kpに対する抗菌活性は、ペプチド1に対して1/2から1/10に低下していたため、これらの細菌に対す 50

る抗菌活性には、システイン残基の架橋やC末端のアミド化は重要である。

また、E. coli Bに対する抗菌活性では、CAM化ペプチド1の活性はペプチド1とほとんど変わらなかったが、ペプチド2は活性が低下していたので、この細菌に対する抗菌活性は、システイン残基の架橋は重要でなく、C末端のアミド化が重要である。

【0387】

(I) 抗菌活性の評価法

1. 用いた細菌

・グラム陽性菌

Enterococcus hirae, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus 209P, Staphylococcus epidermidis K3, Staphylococcus saprophyticus KD

10

・グラム陰性細菌

Escherichia coli strain B, Escherichia coli K12, Escherichia coli kp

・真菌

Pichia pastoris GS115

【0388】

2. アラマブルーを用いた生菌の還元活性を指標とする抗菌活性測定法

・試薬：アラマブルー (alamarBlue, BioSource International)

バッファー：10 mM リン酸バッファー, pH 7.0

・方法

i) 2×10^4 colony forming unit (CFU)の細菌あるいは真菌とペプチドを50 μ lの反応系(n=3)で1時間反応させる (E. hirae, S. aureus 209P, S. epidermidis K3, E. coli strain B, E. coli K12, E. coli kplは37、M. luteus, S. saprophyticus KD, P. pastoris GS115は30)。陰性コントロールとしてペプチドなし溶液も作成、反応させる。

20

ii) 10%アラマブルーを加えた3%Tryptosoy Broth (培地)を反応液に加える。

E. hirae, S. aureus 209P, S. epidermidis K3, E. coli strain B, E. coli K12, E. coli kpは37、M. luteus, S. saprophyticus KD, P. pastoris GS115は30で生育させ、陰性コントロールの反応液が青色から赤色に変わったところ (S. aureus 209Pの場合4時間)で、570 nm、600 nmの吸光度 (A570, A600)を測定する。

iii) 還元状態のアラマブルーのモル吸光係数 $\epsilon_{570} = 155,677$ 、 $\epsilon_{600} = 14,652$

酸化状態のアラマブルーのモル吸光係数 $\epsilon_{570} = 80,586$ 、 $\epsilon_{600} = 117,216$

30

より下記計算式が成り立つ。

還元状態のアラマブルー濃度 (M) =

$(117,216 \times A_{570} - 80,586 \times A_{600}) / (155,677 \times 117,216 - 14,652 \times 80,586)$ 。

iv) 上記計算式より、コントロールを100%としてペプチドの還元活性を算出する。

サンプルの還元活性 (%) =

$(117,216 \times \text{サンプル}A_{570} - 80,586 \times \text{サンプル}A_{600})$

$\times 100 / (117,216 \times \text{コントロール}A_{570} - 80,586 \times \text{コントロール}A_{600})$

v) サンプルの還元活性(%)は生菌の数に比例する。すなわち、還元活性50% = 50%生育阻害濃度である。50%生育阻害濃度を IC_{50} として表記する (表1)。

【0389】

40

【表 1】

表 1. IGFBP-5[193-234]-NH₂ の抗菌活性

細菌	IC ₅₀ (μ M)				
	ペプチド 1	CAM 化ペプチド 1	ペプチド 2	β-Defensin-2	Cathelicidin
(Gram-positive bacteria)					
<i>E. hirae</i>	NI	NI	NI	2.4	0.3
<i>M. luteus</i>	0.5	0.7	0.8	0.7	0.3
<i>S. aureus</i> 209P	0.8	NI	NI	8.6	0.1
<i>S. epidermidis</i> K3	0.7	0.9	1.0	0.2	0.3
<i>S. saprophyticus</i> KD	NI	NI	NI	NI	0.6
(Gram-negative bacteria)					
<i>E. coli</i> B	8.8	7.6	NI	NI	0.5
<i>E. coli</i> K12	0.9	2.2	9.3	6.3	0.6
<i>E. coli</i> kp	4.2	NI	NI	6.1	1.1
(Fungi)					
<i>P. pastoris</i> GS115	1.3	1.5	1.7	2.6	2.5

NI; 10 μ M のペプチド濃度で 50%生育阻害なし。

【 0 3 9 0 】

3. プレート培地に生育するコロニー数を指標に抗菌活性測定法

・ 方法

- i) 1 × 10⁴ colony forming unit (CFU) の細菌あるいは真菌とペプチドを 100 μ l の反応系で 1 時間反応させる (*S. aureus* 209P, *E. coli* K12 は 37 、*P. pastoris* GS115 は 30)。
- ii) 10 mM リン酸バッファー 3.65 ml を反応液に加え、1/5 量 (0.75 ml) ずつ寒天培地 (10 cm ディッシュ) にプレーティングする (n=3)。
- iii) 一晚培養し (*S. aureus* 209P, *E. coli* K12 は 37 、*P. pastoris* GS115 は 30) 、コロニー数をカウントする。
- iv) 50% 生育阻害濃度を IC₅₀ として表記する (表 2)。

【 0 3 9 1 】

【表 2】

表 2 IGFBP-5[193-234]-NH₂ の抗菌活性

細菌	IC ₅₀ (μ M)		
	ペプチド 1	β-Defensin-2	Cathelicidin
(Gram-positive bacteria)			
<i>S. aureus</i> 209P	1.6	3.9	0.03
(Gram-negative bacteria)			
<i>E. coli</i> K12	1.1	NI (65%)	0.4
(Fungi)			
<i>P. pastoris</i> GS115	0.4	1.0	0.6

NI; 10 μ M のペプチド濃度で 50%生育阻害なし。括弧内の数字は 10 μ M での菌の生存率 (%)を示す。

【 0 3 9 2 】

[実施例 3]

他の抗菌ペプチドと IGFBP-5[193-214]-NH₂ の抗菌活性における協調作用

上述に記載した IGFBP-5[193-214]-NH₂ の合成ペプチド、ヒト β-ディフェンシン-2 (ペプ

チド研究所)、カテリシジン(LL-37)(Bachem)を用いて抗菌活性を測定した。抗菌活性は、実施例2(1)2.アラマブルーを用いた生菌の還元活性を指標とする抗菌活性測定法により求めた。

【0393】

IGFBP-5[193-214]-NH₂ペプチドはヒトβ-ディフェンシン-2、カテリシジン(LL-37)と協調的に働き、E. coli K12に対する抗菌活性を示した(図3)。

【0394】

(I) 抗菌活性の評価法

1. 用いた細菌

- ・グラム陰性細菌

10

Escherichia coli K12

2. アラマブルーを用いた生菌の還元活性を指標とする抗菌活性測定法

- ・試薬：アラマブルー (alamarBlue, BioSource International)

バッファー：10 mM リン酸バッファー, pH 7.0

- ・方法

i) 2×10^4 colony forming unit (CFU)の細菌あるいは真菌とペプチドを50 μlの反応系(n=3)で37℃、1時間反応させる。IC₅₀の半分の濃度のβ-ディフェンシン-2 (3.15 μM)、あるいはカテリシジン (0.3 μM)存在下で様々な濃度のIGFBP-5[193-214]-NH₂ペプチドの抗菌活性を測定した(図3a)。一方、IC₅₀の半分の濃度のIGFBP-5[193-214]-NH₂ペプチド (0.45 μM) あるいはカテリシジン (0.3 μM)存在下で様々な濃度のβ-ディフェンシン-2の抗菌活性を測定した(図3b)。また、IC₅₀の半分の濃度のIGFBP-5[193-214]-NH₂ペプチド (0.45 μM)、あるいはβ-ディフェンシン-2 (3.15 μM)存在下で様々な濃度のカテリシジンの抗菌活性を測定した(図3c)。陰性コントロールとしてペプチドなし溶液も作成、反応させる。

20

ii) 10%アラマブルーを加えた3%Tryptosoy Broth (培地)を反応液に加える。

37℃で生育させ、陰性コントロールの反応液が青色から赤色に変わったところで、570 nm、600 nmの吸光度 (A570, A600)を測定する。

iii) 還元活性の算出は実施例2の、2. iii)-iv)に従った。サンプルの還元活性(%)は生菌の数に比例する。すなわち、還元活性 = 細菌生存率である。それぞれのペプチド濃度における細菌生存率を求めた(図3)。

30

【0395】

[実施例4]

IGFBP-5[193-214]-NH₂の溶血活性測定

上述に記載したIGFBP-5[193-214]-NH₂の合成ペプチド(ペプチド1)、ヒトβ-ディフェンシン-2(ペプチド研究所)、カテリシジン(LL-37)(Bachem)を用いて、細胞傷害性を調べる目的でヒツジ赤血球に対する溶血活性を測定した。

【0396】

カテリシジンはヒツジ赤血球に対して溶血活性を示した(10 μMで4.1%)が、IGFBP-5[193-214]-NH₂(ペプチド1)、ヒトβ-ディフェンシン-2はほとんど溶血活性を示さなかった。

40

【0397】

(I) 溶血活性の測定法

溶血活性の測定

- ・用いた赤血球：ヒツジ脱繊維血(日本バイオテスト)
- ・バッファー：10 mM リン酸バッファー, pH 7.0, 0.15 M NaCl
- ・方法

i) ヒツジ脱繊維血をバッファーで3回洗浄後、2%になるようにバッファーで希釈する。

ii) 上記赤血球50 μlにバッファーで希釈したペプチド溶液(20 μM)50 μl加え、37℃、4時間反応させる。

iii) 3,000回転、5分遠心後、上清の546 nmの吸光度 (A546)を測定する。

50

iv) 純水で完全溶血させたときのA546を100%として、溶血活性を算出する(表3)。

【0398】

【表3】

表3 IGFBP-5[193-234]-NH₂の溶血活性

	ペプチド1	β -Defensin-2	Cathelicidin
溶血活性 (%)	0.2±0.1	0.6±0.3	4.1±1.0

数値は 10 μ M のペプチド濃度での溶血活性 (%) を示す (n=3, 平均±SD)。

10

【0399】

[実施例5]

ペプチド合成

以下の3種類のペプチドについて合成を行った。

ペプチド1 IGFBP-5[193-214]-NH₂: AVYLPNCDRKGFYKRKQCKPSR-NH₂ (配列番号: 1)

ペプチド2 IGFBP-5[193-215]: AVYLPNCDRKGFYKRKQCKPSRG (配列番号: 4)

ペプチド3 Y-IGFBP-5[193-214]-NH₂: YAVYLPNCDRKGFYKRKQCKPSR-NH₂ (配列番号: 5)

【0400】

ペプチド合成は、シグマ・ジェノシス社で実施した。

【0401】

- ・合成機: Abacus peptide synthesizer (製造会社名: Sigma-Genosys) ペプチド1
Syroil peptide synthesizer (製造会社名: MultiSynTech GmbH) ペプチド2、ペプチド3

【0402】

- ・樹脂: TentaGelS RAM (製造会社名: Rapp Polymer GmbH) ペプチド1
TentaGelS PHB (同上) ペプチド1
Fmoc-Gly-NovaSyn TGT (製造会社名: EMD Chemicals, Inc.) ペプチド2、ペプチド3
NovaSyn TGR resin (同上) ペプチド2、ペプチド3

【0403】

- ・保護アミノ酸: (製造会社名: EMD Chemicals, Inc.)
9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Alanine
N^α-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-N^γ-2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran
5-Sulfonyl-L-Arginine
9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Asparagine
9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Aspartic Acid β -t-Butyl Ester
9-Fluorenylmethoxycarbonyl-S-Trityl-L-Cysteine
9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Glutamine
9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Glycine
9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Leucine
N^α-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-N^ε-t-Butyloxycarbonyl-L-Lysine
9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Phenylalanine
9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Proline
9-Fluorenylmethoxycarbonyl-O-t-Butyl-L-Serine
9-Fluorenylmethoxycarbonyl-O-t-Butyl-L-Tyrosine
9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Valine

【0404】

- ・合成法: 通常のfmoc strategyに従い実施

【0405】

- ・脱保護:

50

クリベージカクテル

TFA: H₂O: DTT: triisopropylsilane = 94 : 2.5 : 2.5 : 1

【 0 4 0 6 】

・合成ペプチドの精製： 逆相高速液体クロマトグラフィーによる

カラム： Discovery HS C18 column, 10 micron, 250 x 21.2 mm, Sigma-Aldrich)

溶媒： A) 0.1% TFA, B) 0.1% TFA-acetonitrile, グラジエント溶出(時間などの条件は個々に変更)

流速： 15ml/min

合成品は一度上記条件で精製、酸化してS-S結合形成後、再度上記条件にて精製を実施

【 0 4 0 7 】

・合成ペプチドの品質管理

【 0 4 0 8 】

i) 逆相高速液体クロマトグラフィーによるペプチドの純度検定

装置： 東ソー 高圧グラジエントシステム

カラム： Supelco Discovery HS C18, 4.6 x 75 mm, particle 3 micron

溶媒： (A) 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water, (B) 0.1% TFA in acetonitrile

injectionの2min後から(B) 5% → 55% 8 min linear gradient elution

流速： 1.0 ml/min, 測定波長： 220 nm (東ソー, UV-8020)

UV吸収に基づく純度

ペプチド1： IGFBP-5[193-214]-NH ₂	97.7%
ペプチド2： IGFBP-5[193-215]	94.6%
ペプチド3： Y-IGFBP-5[193-214]-NH ₂	96.7%

【 0 4 0 9 】

ii) アミノ酸分析：

加水分解： PicoTag ワークステーション(Waters社)にて塩化水素蒸気で110C、22時間加水分解分析計： L-8500 amino acid analyzer (日立)

アミノ酸分析による純度検定の結果を以下の表4に示す。

【 0 4 1 0 】

10

20

【表 4】

表 4 アミノ酸分析による純度検定

	ペプチド 1		ペプチド 2		ペプチド 3	
	分析値	残基数	分析値	残基数	分析値	残基数
Asx	2.03	2	2.03	2	2.01	2
Thr	—	0	—	0	—	0
Ser	0.85	1	0.91	1	0.91	1
Glx	1.02	1	1.07	1	1.08	1
Pro	1.99	2	2.07	2	2.19	2
Gly	1.01	1	1.02	1	2.05	2
Ala	1.08	1	1.05	1	1.02	1
Val	0.95	1	1.12	1	1.09	1
Met	—	0	—	0	—	0
Ile	—	0	—	0	—	0
Leu	0.96	1	1.05	1	1.03	1
Tyr	1.75	2	3.09	3	1.77	2
Phe	1.10	1	1.07	1	1.11	1
Lys	4.07	4	4.10	4	4.13	4
His	—	0	—	0	—	0
Arg	3.03	3	2.96	3	3.05	3

10

20

【0411】

[実施例 6]

IGFBP-5[193-214]-NH₂の測定システム(ラジオイムノアッセイ)の作成

IGFBP-5[193-214]-NH₂のC末端に対する特異的抗体を作成した。具体的には、当該ペプチドとウシサイログロブリンを水溶性カルボジイミド(Water soluble carbodiimide, 以下WSC)の作用により結合させた。調製したコンジュゲートをウサギに免疫することにより得られた抗体を用いて、当該ペプチドを高感度、特異的に測定可能なシステムを作成した。当該ペプチドはラット、ヒトなどの動物種によらず一定の構造であるため、本測定システムは幅広い利用が可能と考えられる。

30

【0412】

(I) 抗体の作成法

1. 抗原の作成

i) サイログロブリン (Sigma, 6.7 mg)、合成IGFBP-5[193-214]-NH₂ (4 mg) をそれぞれ1 mlの生理食塩水に溶解する。

ii) サイログロブリン溶液にWSC (ペプチド研究所, 33.3.mg)を添加し、そこにペプチド溶液を添加する。

40

iii) 攪拌下に室温で3時間反応後、WSC (33.3.mg)を添加し室温でさらに3時間させる。さらに4 で一晩反応する。

iv) 試薬、未反応のペプチドを除去するため、4 で生理的食塩水に対して繰り返し透析を行う。

【0413】

2. ウサギの免疫

i) 上記抗原溶液の内、ペプチド0.02mg相当を含む抗原溶液0.5m Lを等量のフロイント完全アジュバントと混合、ミセル化して、ウサギ(New Zealand White, オス)の背部、皮下に免疫する。

ii) 3週間おきに免疫を行い、その10日後に採血を行う。

50

iii) 後述の¹²⁵Iで放射性標識したペプチド3 (YAVYLPNCDRKGFYKRKQCKPSR-NH₂; 配列番号: 5) を用いて抗血清力価を測定し、力価の上昇したウサギより抗血清を得る。

【0414】

(II) ラジオイムノアッセイシステムの作成法

i) トレーサーは当該ペプチドのN末端にチロシン残基を結合したペプチド3 (YAVYLPNCDRKGFYKRKQCKPSR-NH₂; 配列番号: 5) にラクトペルオキシダーゼ法により、放射性¹²⁵I (NaI) と過酸化水素を反応させて調製する。

ii) 反応混合物は逆相高速液体クロマトグラフィーで分離し、¹²⁵I が1分子N末端チロシン残基に導入されたペプチドを単離し、トレーサーとして使用する。

iii) 添加したトレーサーの30%程度が抗体と結合する濃度を設定し、その抗体濃度で当該ペプチドの濃度を1 fmol/tubeより1000 fmol/tubeまで変化させ、標準曲線を得る。

iv) 構造既知のペプチドの濃度を変化させて上記測定系で反応させ、結合の抑制を測定し、抗体の特異性を検討する。

【0415】

作成された抗血清は、最終希釈濃度210,000倍の高力価の抗体であり、標準曲線の中点は20 fmol/tubeであり、2 fmol/tubeから500 fmol/tubeの範囲で良好な濃度依存性が認められた。

【0416】

このラジオイムノアッセイ (RIA) において、既知の生理活性ペプチドであるヒトカルシトニン、サブスタンスK、[Arg⁸]パソプッレシン、アドレノメジュリン[22-52]、Leu-エンケファリン、アンジオテンシンIIは100 pmol/tubeでもトレーサーの結合を阻害せず、交差反応は全く認められなかった。当該ペプチドとC末端アミド構造を共有するPAMP-20は、中点が100 pmol/tubeで、その交差反応は当該ペプチドの約1/3,000であった。また、C末端アミド構造を取らずにIGFBP-5配列がそのまま1残基延長したペプチド2 (IGFBP-5[193-215]) は、中点が20 pmol/tubeで、その交差反応は当該ペプチドの約1/670であった。また、当該ペプチドを還元アルキル化したペプチドは、当該ペプチドと全く同様のトレーサーの結合阻害を示した。一方、当該ペプチドの前駆体であるIGFBP-5は、全く結合阻害を示さなかった。これらの結果より、作成した抗体はIGFBP-5[193-214]-NH₂の構造、特にC末端アミド構造と周辺1次構造を特異的に認識し、前駆体を認識しない良好な特性を有すると考えられる。

【0417】

以上より、作製したIGFBP-5[193-214]-NH₂のラジオイムノアッセイは、当該ペプチドに極めて特異性の高いものであり、当該ペプチド濃度を正確に測定できると考えられる。

【0418】

[実施例7]

ラットにおけるIGFBP-5[193-214]-NH₂様免疫活性の組織分布

SDラット (雌) の様々な組織よりペプチド画分の抽出を行い、濃縮後、前記実施例6で作成したIGFBP-5[193-214]-NH₂測定システムを用いて当該ペプチド免疫活性の組織分布を検討した。下垂体、脳組織で有意な免疫活性が観測された (表5)。一方末梢組織では全体に低い免疫活性しか検出されなかったが、小腸では有意な免疫活性が観測された。これらの結果より、当該ペプチドは脳神経系、下垂体、消化管などで機能を発揮すると推定された。

【0419】

(I) 組織からのペプチド抽出法

i) 雌SDラット (n=3) から表5の組織を摘出し、生理食塩水で洗浄後、秤量、細片化する。

ii) 予め加熱した10倍量の蒸留水入り試験管に組織片を加え、15分間90℃以上で加熱する。

iii) 氷冷後、終濃度1 Mになるように酢酸を加える。

iv) ホモジナイザー (ポリトロン) で組織片を破碎し、破碎液を遠心分離する (13,000 ×

10

20

30

40

50

g、15分、4)。

v) 上清の一部を Sep-Pak C₁₈カートリッジで濃縮、脱塩し、ペプチドを回収する。

【 0 4 2 0 】

(II) ラジオイムノアッセイシステムをもちいた組織中の免疫活性物質の測定法

実施例 6 (II)で作成したシステムで測定を行う。

i) ラジオイムノアッセイシステムにおける当該ペプチドの標準曲線から(I)で抽出した各組織抽出物に含まれる免疫活性物質の量を算出する。

ii) 組織湿重量1 g当たりの免疫活性物質の含量を換算する(表 5)。

iii) ラジオイムノアッセイのパッファー、手法は既報の通りである。

(T. Katafuchi, et al., J. Biol. Chem., 278, 12046-12054, 2003)

10

【 0 4 2 1 】

【表 5】

表 5 IGFBP-5[193-214]-NH ₂ 様免疫活性の組織分布	
組織	免疫活性量 (平均±SD) (pmol/g 湿重量)
中枢組織(脳)	
大脳皮質	1.88±0.32
小脳	1.49±0.23
中脳・視床	3.97±0.52
嗅球	1.96±1.00
海馬	1.43±0.20
線条体	1.19±0.58
視床下部	10.52±3.07
橋・延髄	1.88±0.08
末梢組織	
下垂体前葉	6.22±1.17
下垂体中後葉 ¹	15.42
心臓	0.32±0.03
肺	0.48±0.07
胃	0.52±0.09
小腸	1.45±0.29
膵臓	0.46±0.09
肝臓	0.50±0.08
腎臓	0.32±0.01
子宮	0.45±0.16

20

30

¹ 下垂体中後葉は 3 個体分を集めて測定。

40

【 0 4 2 2 】

[実施例 8]

ラット組織中に存在する IGFBP-5[193-214]-NH₂ の同定

実施例 7 で検出した IGFBP-5[193-214]-NH₂ 様免疫活性物質を同定するため、組織濃度が高く組織重量が得られる脳組織中の免疫活性物質を、逆相カートリッジで濃縮後、ゲルろ過、逆相カラムで分離した結果(図 4 a, b)、免疫活性物質が 2 種の分離系において、合成 IGFBP-5[193-214]-NH₂ と同じ挙動を示すことを確認した。さらにその免疫活性画分を免疫沈降し、質量分析を実施することにより、主たる免疫活性物質が IGFBP-5[193-214]-NH₂ 自身に由来することを確定した(図 4 c)。末梢組織で組織濃度が高く組織重量が得られる小腸組織中の免疫活性物質を、同様に逆相カートリッジで濃縮後、ゲルろ過で分離した結

50

果、合成 IGFBP-5[193-214]-NH₂と同じ挙動を示すことを確認した。さらにその免疫活性画分を免疫沈降し、質量分析を実施することにより、主たる免疫活性物質がIGFBP-5[193-214]-NH₂自身に由来することを確定した。これらの結果より、当該ペプチドがラット脳、腸などの組織内に実在し、機能すると推定された。

【 0 4 2 3 】

(I) カラムクロマトグラフィーによる免疫活性物質の生化学的解析法

1-1. 脳抽出物をゲルろ過カラムで分離し、各画分に含まれるIGFBP-5[193-214]-NH₂様免疫活性物質の量を実施例 6 (II)で作成したシステムをもちいて測定する(図 4 a)。

i) 全脳抽出物(15 g組織より抽出)をゲルろ過カラムで分離する。

カラム: Sephadex G-50 fine (GE Healthcare, 1.8 x 135 cm)

溶媒: 1 M 酢酸、流速: 7 ml/h、フラクション: 6 ml/tube

ii) 各画分の一部(1/42量)に含まれる免疫活性(IR-) IGFBP-5[193-214]-NH₂量を実施例 6 (II)で作成したシステムを用いて測定する。

免疫活性は4 kDより小さい画分で検出され、当該ペプチドの溶出位置と一致した。

【 0 4 2 4 】

1-2. ゲルろ過でIR-IGFBP-5[193-214]-NH₂量が多く検出された画分(図 4 a、太線)をさらに逆相高速液体クロマトグラフィーにて分離し、各画分に含まれる免疫活性物質の量を実施例 6 (II)で作成したラジオイムノアッセイシステムを用いて測定する(図 4 b)。

i) ゲルろ過でIR-IGFBP-5[193-214]-NH₂量が多く検出された画分(図 4 a、太線)の一部(1/8量)を逆相高速液体クロマトグラフィーで分離する。

カラム: Symmetry 300 5C18 (Waters, 4.6 x 250 mm)

溶媒: A: 0.1% TFA/10% acetonitrile

B: 0.1% TFA/60% acetonitrile

溶出: A→B 60 分リニアグラジエント。1分毎に60分間分取する(60本)。

ii) 各画分の一部(1/5量)に含まれる免疫活性量を前記実施例 6 (II)で作成したラジオイムノアッセイシステムを用いて測定する。

IR-IGFBP-5[193-214]-NH₂の最も高いピーク(図 4 b、矢印)は当該ペプチドの溶出位置と一致した。

【 0 4 2 5 】

2-1 小腸抽出物をゲルろ過カラムで分離し、各画分に含まれるIR-IGFBP-5[193-214]-NH₂量を実施例 6 (II)で作成したシステムをもちいて測定する。

i) 小腸抽出物(1.08 gより抽出)をゲルろ過カラムで分離する。

カラム: TSK-gel G2000SWXL (21.5 x 300 mm)

溶媒: 0.1% TFA/60% acetonitrile、流速: 1.5 ml/min、フラクション: 1.5 ml/tube

ii) 各画分の一部(1/5量)のIR-IGFBP-5[193-214]-NH₂量を実施例 6 (II)で作成したラジオイムノアッセイシステムを用いて測定する。

免疫活性量のピークは当該ペプチドの溶出位置と一致した。

【 0 4 2 6 】

(II) 質量分析計による免疫活性物質の同定法

1 逆相高速液体クロマトグラフィーで分離したIR-IGFBP-5[193-214]-NH₂の最も高いピーク(図 4 b、矢印)画分に含まれる脳由来免疫活性物質を、免疫沈降後、質量分析計を用いて分析、同定する。

1-1. 免疫活性物質の免疫沈降

i) 当該ペプチドの溶出位置と同じ画分(図 4 b、矢印)の1/2量を凍結乾燥する。

ii) 50 μl 10 mMリン酸バッファー, 0.15 M NaCl, pH 7.0, 0.1% Triton X-100に溶解する。

iii) 前記実施例 6 (I)で作成した抗血清(10倍希釈) 40 μlとProtein A Sepharose (GE Healthcare) 20 μlを混合する。

iv) 4 で一晩反応後、10 mMリン酸バッファー, 0.15 M NaCl, pH 7.0で4回洗浄する。

。

10

20

30

40

50

v) 蒸留水で1回洗浄後、1 %TFA 20 μ lで溶出する(室温2分)。

【0427】

1-2. 質量分析計による同定

質量分析計、マトリックスは前記実施例1(II)に記載したものを使用した。

i) 前記実施例8(II)1-1.v)の溶出液をZip-tip(Millipore)で脱塩処理する。

。

ii) 0.5 μ lのマトリックス溶液をスポットし、ペプチドとマトリックスとの共結晶を作る。

iii) 質量分析計でMS1を測定する(図4c)。

分子内S-S架橋、C末端アミド化された当該ペプチドの[M+H]⁺に相当する2654.4のピークが質量分析の結果得られた。

10

【0428】

2. ゲルろ過で分離した小腸由来IR-IGFBP-5[193-214]-NH₂の最も高いピーク画分の3/5量を、免疫沈降後、質量分析計を用いて分析、同定する。

方法は前項の1-1. 免疫活性物質の免疫沈降、および1-2. 質量分析計による同定に従う。

。

脳組織由来のIGFBP-5[193-214]-NH₂様免疫活性物質と同様に、分子内S-S架橋、C末端アミド化された当該ペプチドの[M+H]⁺に相当する2654.4のピークが質量分析の結果得られた。

【0429】

20

これらの結果より、当該ペプチド本体がラット脳、小腸などの組織内に存在することが確認された。

【0430】

[実施例9]

MRGX2発現HeLa細胞を用いたIGFBP-5[193-214]-NH₂のHeLa/SRE-LUCレポーター活性

HeLa細胞を384穴プレートに4 × 10³ cells/wellで播種し、24時間培養した。HeLa細胞へのトランスフェクトは以下に行った。SREにルシフェラーゼ遺伝子を連結させたSRE-LUC、G蛋白質(G_αOA、G_β1、G_γ2)およびMrgX2の発現プラスミドをPBSで240ng/ μ lに調整した。それぞれのプラスミドをSRE-LUC : G_αOA : G_β1 : G_γ2 : Mrgx2を9 : 1 : 1 : 1 : 1で混合させたものをプラスミドミックスとして用いた。1.6mlのOPTI-MEM培地にプラスミドミックス83.2 μ lを加え、Vortexによりよく攪拌し、プラスミドミックス液とした。別のチューブを用意し、1.6mlのOPTI-MEM培地に66.6 μ lのリポフェクタミン2000(Invitrogen)を加え、Vortexによりよく攪拌し、リポフェクタミン2000液とした。5分間室温に放置後、プラスミドミックス液とリポフェクタミン2000液を混合し、攪拌した。さらに20分間室温に放置後、この溶液をプレートに5 μ lずつ分注し、炭酸ガスインキュベーターで、37℃、5%CO₂にて培養した。18時間後、無血清DMEM培地で細胞を洗浄し、無血清DMEM培地で2時間培養した。無血清DMEM培地で細胞を洗浄し、0.05%CHAPSを含む無血清DMEM培地に希釈したサンプル溶液を添加し炭酸ガスインキュベーターで、37℃、5%CO₂にて培養した。4時間後、プレートを室温に戻し、培地を除き8 μ lのピッカジーンLT液を加え、遮光にて20分間室温に放置した。サンプルによるSRE活性はルシフェラーゼ活性をプレートリーダー(EnVision)で化学発光を測定することによって評価した。その結果、2 μ M以上のIGFBP-5[193-214]-NH₂はMrgX2に対するHeLa/SREレポーター活性を示した(図5)。

30

40

【0431】

尚、各サンプルは、次のように調製した。上記[実施例5]に記載の方法で合成したIGFBP-5[193-214]-NH₂およびS1P(和光純薬社製)はDMSOを用い1 mMに溶解した。1 mMのIGFBP-5[193-214]-NH₂溶液をDMSOで希釈し、5倍、25倍、125倍、625倍、3125倍、15625倍溶液を作成した。0.05%CHAPSを含む無血清DMEM培地に各濃度のIGFBP-5[193-214]-NH₂溶液は50倍に、S1P溶液は250倍に、FBS(Invitrogen社製)は25倍に希釈しサンプル溶液とした。

【0432】

50

[実施例 1 0]

MRGX2発現CHO細胞を用いたIGFBP-5[193-214]-NH₂の細胞内Ca²⁺濃度上昇活性

細胞内Ca²⁺放出促進活性はFLIPR（モレキュラーデバイス社）を用いて測定した。MRGX2発現CHO細胞を96穴プレートに3 x 10⁴ cells/wellで播種し、24時間培養した。2.5 mMプロベネシドと20 mM HEPESを含むハンクス氏液(pH 7.4)（以下、洗浄用バッファーと略す）10 mlに50 μg Fluo 3 - AM（DOJINDO）を添加し、ローディングバッファーを作成した。培養プレートの培養液を除き、ローディングバッファーを100 μl / well添加して気相37 °Cで60分間保温した。培養プレートのローディングバッファーを除き、洗浄用バッファーで洗浄してから、FLIPR内の所定の位置に設置した。試料にサンプルバッファー（洗浄用バッファーにBSAを2 mg / ml、CHAPSを1mg / ml添加したもの）を添加し、攪拌後、96穴サンプルプレートに移し替えた。このサンプルプレートもFLIPR内の所定の位置に設置し、測定を行なった。細胞内Ca²⁺放出促進活性は、試料添加によって惹起された蛍光強度の増加として計測した。本実験系において、IGFBP-5[193-214]-NH₂のEC₅₀値は1.7 μMであった（図6A）。一方、サブスタンスPのEC₅₀値は0.82 μMであったことから、IGFBP-5[193-214]-NH₂のMrgX2特異的な活性はサブスタンスP に比べて1 / 20程度であった（図6B）。

10

20

30

40

【 0 4 3 3 】

尚、試料は、次のように調製した。上記[実施例 5]に記載の方法で合成したIGFBP-5[193-214]-NH₂およびサブスタンスP（ペプチド研究所製）はDMSOを用い1 mMに溶解した。1 mMのIGFBP-5[193-214]-NH₂溶液とサブスタンスP溶液をDMSOで希釈し、それぞれ10倍、100倍、1000倍、10000倍溶液を作成した。各濃度のIGFBP-5[193-214]-NH₂溶液とサブスタンスP溶液はサンプルバッファーにそれぞれは33倍に希釈しサンプル溶液とした。

【 0 4 3 4 】

[実施例 1 1]

IGFBP - 5遺伝子の発現解析

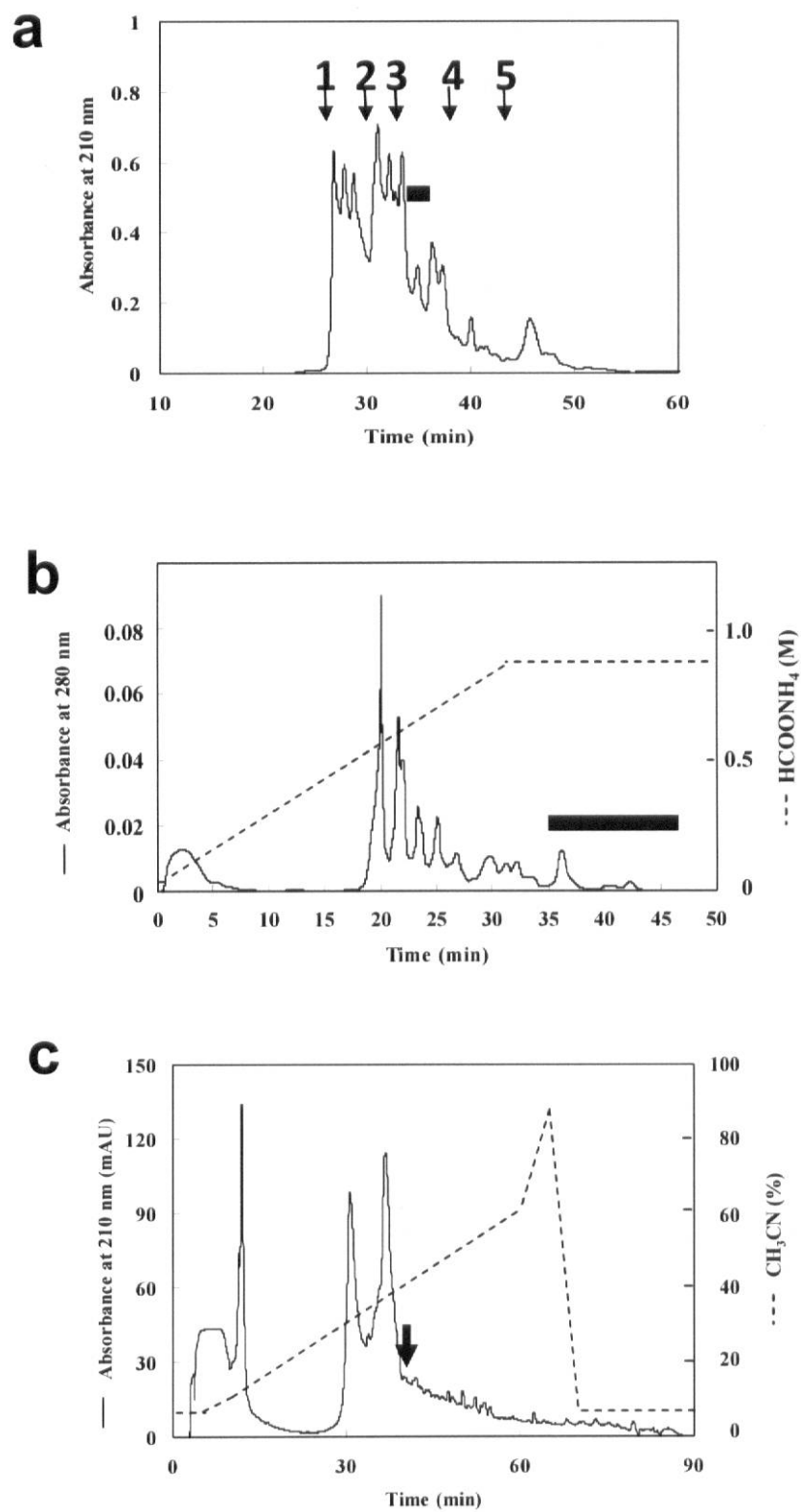
IGFBP - 5遺伝子の発現解析を、NCBI遺伝子発現データベースや東大の遺伝子発現データベースを利用して次のようにして行った。

NCBI遺伝子発現データベース（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>）や東大の遺伝子発現データベース（<http://www.isbm.org/database/index.html#>）上でIGFBP-5を検索し、臓器間、疾患、性差による発現の強度を解析した。

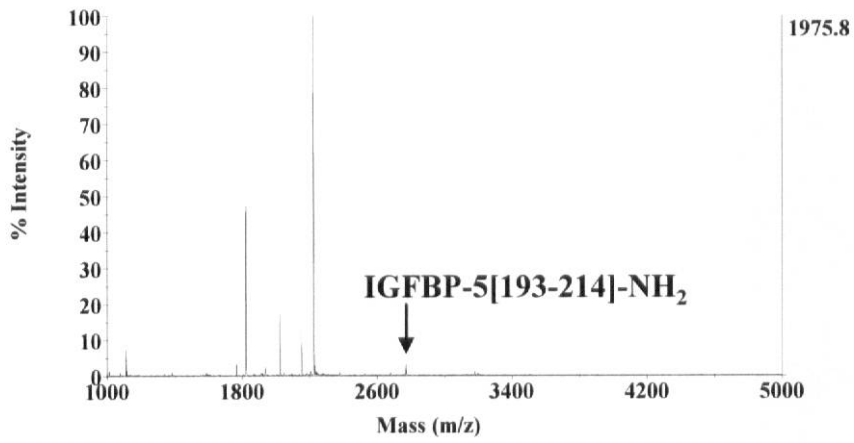
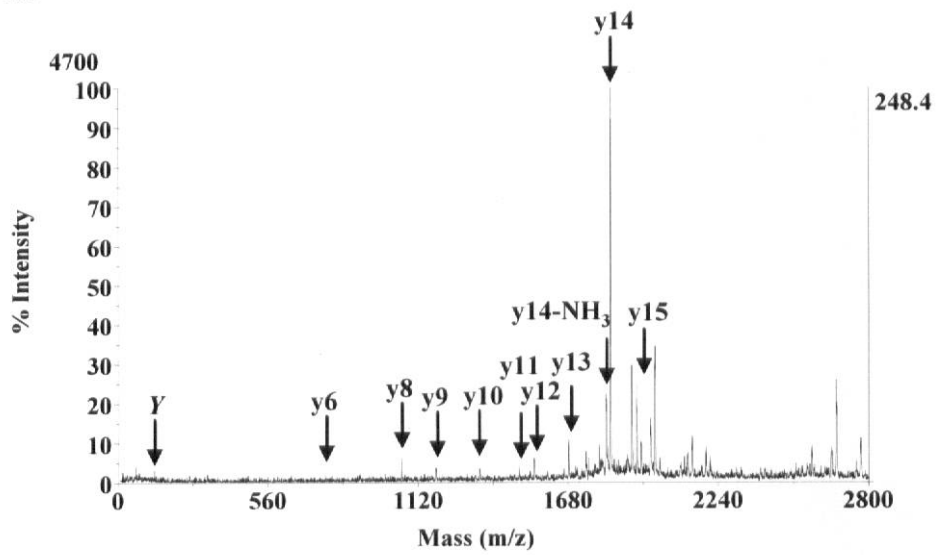
【 0 4 3 5 】

IGFBP - 5の部分ペプチドであるIGFBP-5[193-214]-NH₂がMRGX2特異的な活性を示したことからIGFBP - 5遺伝子の発現解析を行った。末梢組織においてIGFBP - 5遺伝子は卵巣、子宮、子宮筋層、子宮頸部、卵管、皮膚、骨格筋、腎臓、副腎、網膜などに発現が見られ、なかでも卵巣で最も高い発現が認められた。また中枢組織においてはほとんど発現は認められなかったが、神経節で一部発現が認められた。次に各組織について病理（腫瘍、炎症等）やドナー（病歴、薬剤投与等）別に解析を行ったところ、IGFBP-5遺伝子は腫瘍や炎症など細胞増殖が亢進していると予想されるサンプルにおいて著しい発現低下を示した。また動脈硬化サンプルにおいて正常サンプルの2倍程度の発現上昇が認められた。しかし、動脈サンプルは4サンプルずつと数が少ないため解釈に注意が必要である。なお、各組織のドナーの病歴や薬剤投与、非投与および男性、女性ではほとんど発現変動を示さなかった。

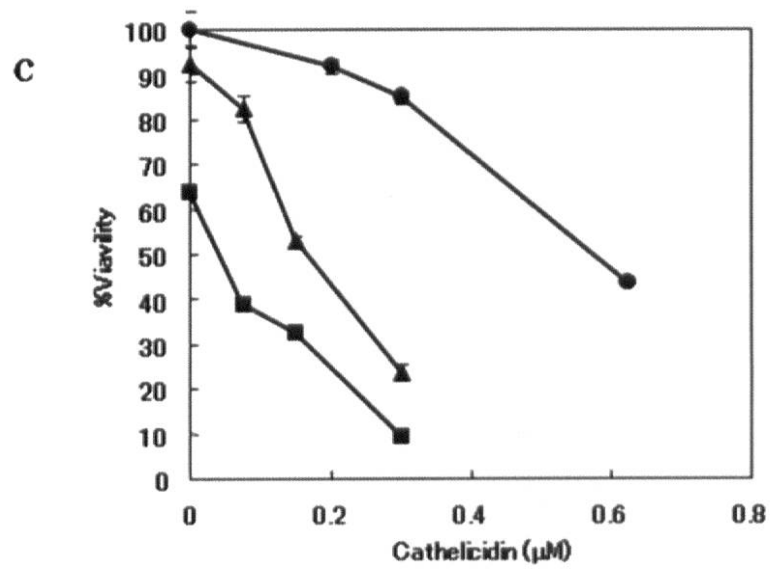
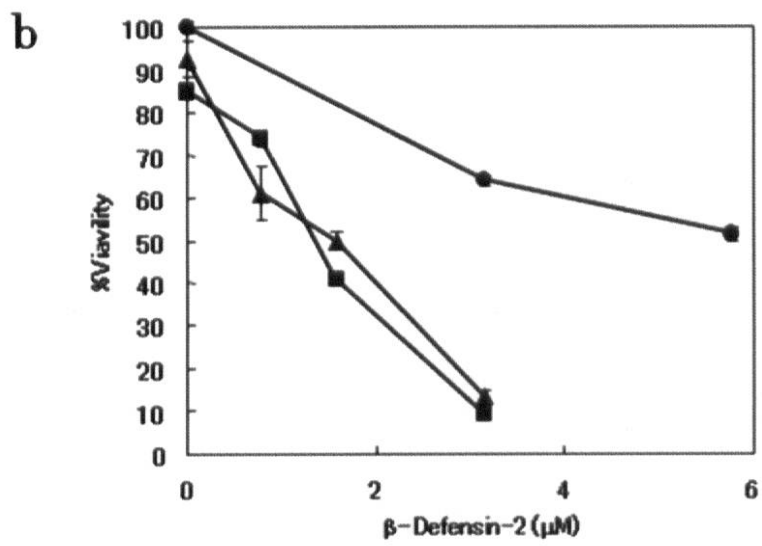
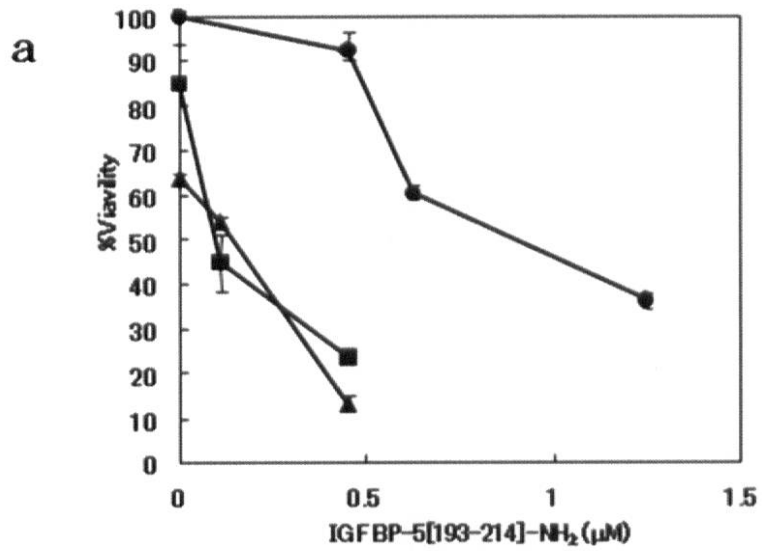
【図 1】



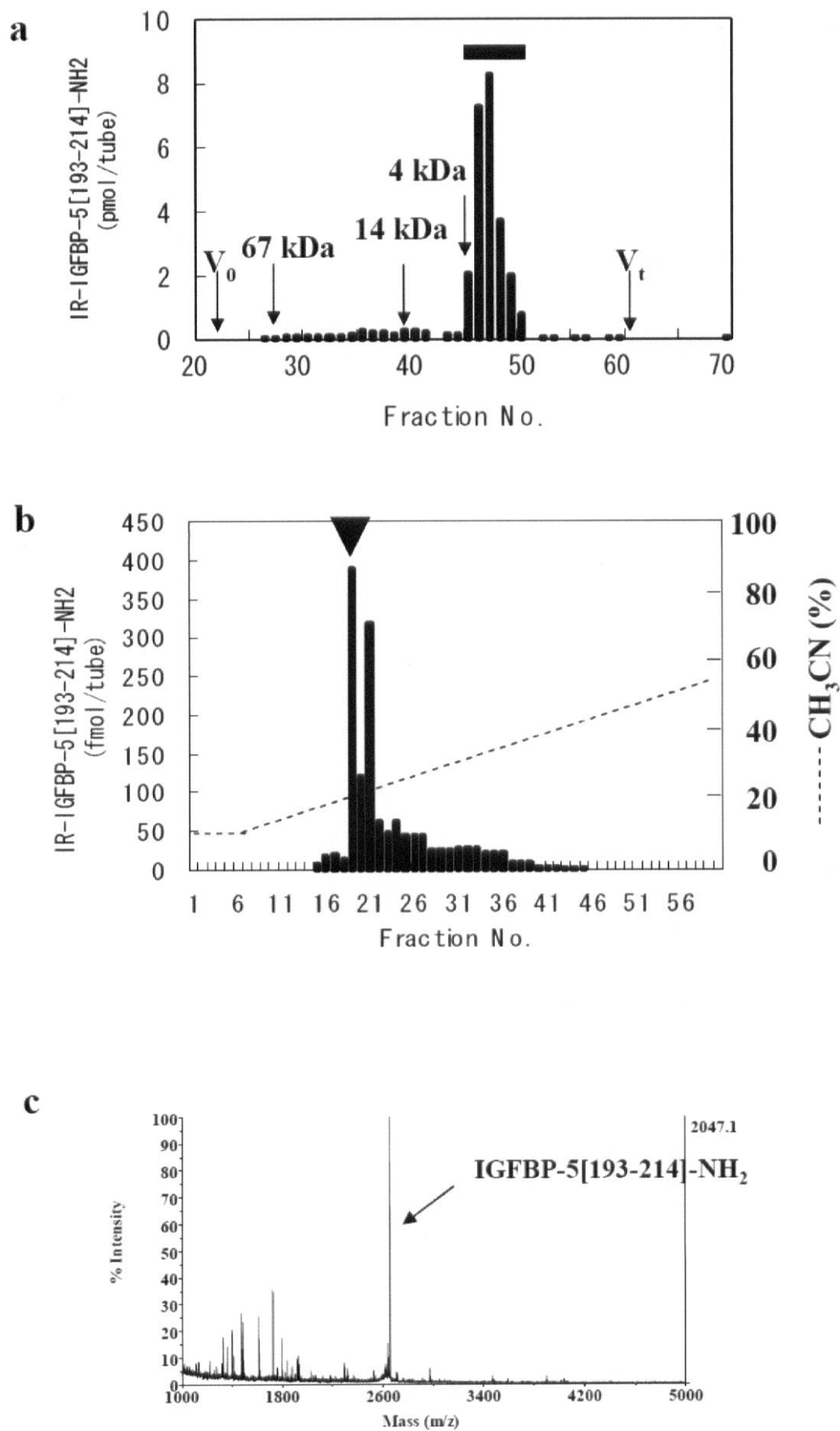
【 図 2 】

a**b**

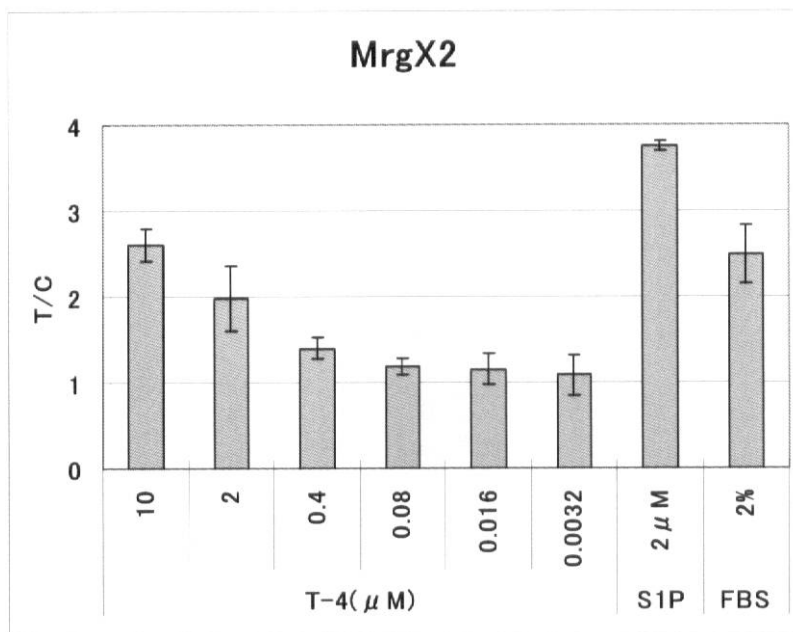
【 図 3 】



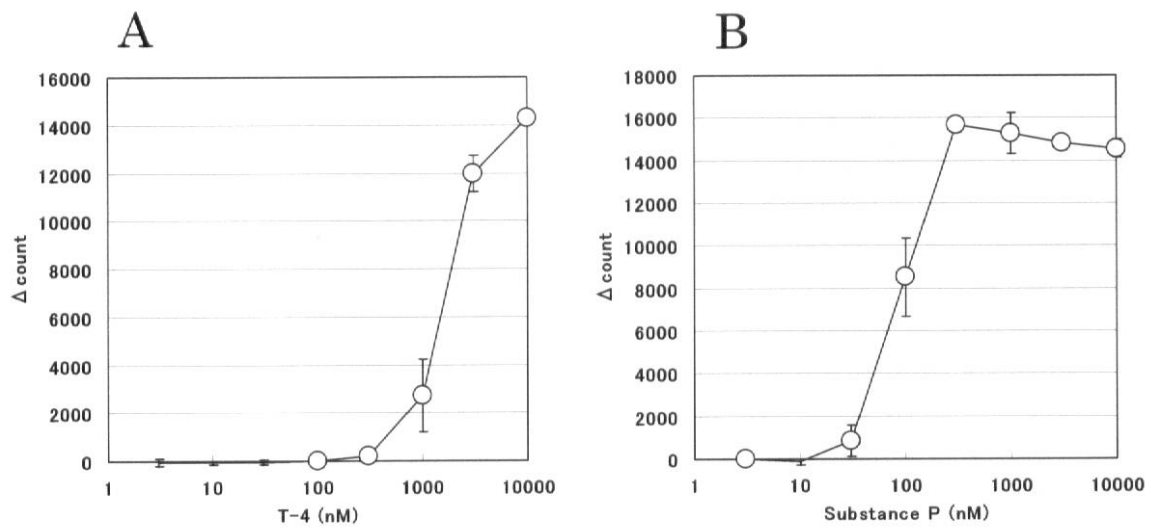
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 配列表 】

2012167017000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 P 13/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/00		
A 6 1 P 1/00	(2006.01)	A 6 1 P 13/00		
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/00		
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 P 11/00		
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D	
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z	
		A 6 1 K 37/02		

(72)発明者 尾崎 司
大阪府吹田市青山台 1 丁目 2、C 2 3 - 1 0 2

(72)発明者 佐々木 一樹
大阪府吹田市藤白台 5 丁目 7 - 1、B 1 - 3 0 3

(72)発明者 南野 直人
大阪府寝屋川市高宮あさひ丘 3 3 - 1 0

F ターム(参考) 2G045 DA36 FB03

4B063 QA18 QQ06 QQ08 QQ79 QR48 QR75 QR77 QX01
4C084 AA02 AA07 BA01 BA18 CA17 CA59 NA14 ZB352
4C085 AA13 AA14 CC32 DD62 DD88 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 CA42 DA75 EA22 EA29
EA50 FA10 FA58 FA71 GA22 GA23