

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 5 月 3 日 (03.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/31004 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/18, 14/47, G01N 33/50, 33/15, A61K 38/17

(74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07480

(22) 国際出願日: 2000 年 10 月 26 日 (26.10.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/305187
1999 年 10 月 27 日 (27.10.1999) JP
特願平 11/313453 1999 年 11 月 4 日 (04.11.1999) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 杉野 弘 (SUGINO, Hiroshi) [JP/JP]; 〒770-8041 徳島県徳島市上八万町西山1325番地 Tokushima (JP).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PROTEIN AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 新規蛋白質およびその用途

(57) Abstract: A protein which is expressed especially in the brain, has a PDZ domain and shows an affinity particularly for activin receptors and/or intracellular activin signal transducing molecules, peptide fragments thereof or salts thereof are useful in identifying a binding protein capable of binding to the above protein or a compound inhibiting or promoting the binding of a binding protein to the above-described protein, etc.

(57) 要約:

特に脳で発現し、PDZドメインを持ち、とりわけアクチビン受容体または (および) アクチビン細胞内情報伝達分子に親和性を有する本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩は、該蛋白質に対する結合能を有する結合蛋白質の決定や、本発明の蛋白質等と結合蛋白質との結合を阻害または促進する化合物のスクリーニングなどに有用である。



WO 01/31004 A1

明 細 書

新規蛋白質およびその用途

5 技術分野

本発明は、特定のアミノ酸配列を有する新規蛋白質、該蛋白質をコードするDNA領域を含有するDNA、該蛋白質の製造方法および該蛋白質ならびにDNAの用途に関する。

10 背景技術

従来、多数の生理活性物質が単離・同定され、その機能が解明されつつある。そのなかには、種々の臓器あるいは細胞で多様な活性を示すものもあることが知られている。種々の臓器あるいは細胞における多様な生理活性は、通常、該生理活性物質が結合する受容体を介して具現化しているが、その受容体に結合する生理活性物質の組み合わせがすべての臓器・細胞において同一なのか、あ

15 るいは各臓器・細胞に特異的なのかは、解明されていない例が多い。

生理活性蛋白質の中にはPDZドメインを持つものがあり、そのPDZドメインは比較的最近見いだされた蛋白質結合ドメインモジュールである。そのため、PDZドメインを持つ蛋白質の生体内での分布、機能、制御機構などはまだ多くが不明であるが、その蛋白質結合の機能を介して、細胞膜の裏打ち構造や細胞骨格のネットワーク形成、さらに細胞内表層に発達した細胞内シグナル伝達のネットワーク形成などに重要な役割を担っていると考えられる。神経系においては、神経伝達物質受容体やイオンチャネルなどの複合体形成に係わるなど、シナプス部位の蛋白質クラスターのアセンブリーに欠かせない。また、

20 最近、シナプス可塑性に伴い発現が調節されるPDZ蛋白質が見出され、PDZ蛋白質が受容体の再配置などを通じて可塑性に伴うシナプスの形態変化に係わっている可能性があり、発生段階の神経ネットワークの構築や生体の脳の高次機能にも関与していると考えられる。PDZドメインは既知のペプチド結

25

合ドメインとの共通点もあるが、明らかな特徴的な点も有している。PDZドメインは細菌から高等植物、動物にまで広く保存されたドメインであり、多くの場合、PDZドメインが認識するのは標的蛋白質の最もC末端の短いアミノ酸配列で、これらの標的蛋白質は膜貫通型受容体やチャンネルであることが多い。PDZドメインは同一蛋白質中に2から6回程度繰り返された形で見いだされることが多く、また、ほかのドメインモジュールとは異なり、そのいくつかはホモダイマーを形成する。これらは、PDZドメインがシナプスなどの細胞表面構造やタイトジャンクションなど、細胞間接着における蛋白質架橋ネットワークやマイクロドメインの形成などに係わるための重要な特徴である。

- 10 アクチピンは、初期胚の中胚葉誘導や神経誘導の制御、脳下垂体前葉からの卵胞刺激ホルモン（FSH）の分泌促進に関わる調節因子であり、TGF- β スーパーファミリーの一員である。TGF- β ファミリーの受容体には、セリン/スレオニンキナーゼ活性を有するI型とII型の2種類が存在する。リガンド刺激がII型によるI型の活性化を惹起し、活性化されたI型からアクチピン
- 15 細胞内情報伝達分子であるSmad等を介して情報伝達が行われる。アクチピン受容体II型にはIIA、IIBの2種類の遺伝子から選択的にスプライシングにより生産される多様な分子が存在し、I型の活性化以外に重要な役割を持つ可能性が考えられているが、未だ明らかとなっていない。また、従来、脳下垂体からの性腺刺激ホルモンの分泌調節は、生殖腺で生産されるステロイドホルモンが主であると考えられていたが、アクチピンおよびこれと相反する作用をもつインヒビンの発見により視床下部-脳下垂体-生殖器官系の新しいホルモン分泌調節機構として関心を集めている。アクチピンの生理活性の解析が進むにつれて、この系は、FSH分泌調節以外に血球系や生殖器官の細胞の分化誘導あるいは阻害活性、神経細胞生存維持活性などの多様な生理活性を有することが解ったが、その詳細な機構については未だ解明されていない点が多い。
- 25

本発明は、PDZドメインを持つ蛋白質および該蛋白質に対する結合能を有する受容体（例えば、アクチピン受容体）の生理活性の解明、およびアクチピン-アクチピン受容体系の組織での細胞分化阻害および神経栄養因子様活性

などの生理活性発現の詳細な分子機構等を解明する手段として、新規な該蛋白質の単離法ならびに検出法、該新規蛋白質遺伝子を含むDNA、該新規蛋白質遺伝子がコードする蛋白質の製造法、および該DNAならびに該蛋白質の用途を提供することを目的とする。

5

発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意研究を行った結果、配列番号：1で表されるマウスアクチビンIIA受容体蛋白質の細胞内領域をベイト（b a i t）とした酵母ツーハイブリッド（t w o - h y b r i d）法を用い、
10 マウス脳cDNAライブラリーより結合蛋白質の探索を行い、COS7細胞内でもアクチビンIIA受容体との結合が確認できるcDNAクローンを単離し、解析したところ、1個のPDZドメインをコードする領域を含む遺伝子であることを見いだした。この遺伝子にコードされる該蛋白質は、蛋白質-蛋白質相互作用ドメインを持つ蛋白質因子であり、そのドメインを介してアクチビン受容体の細胞内領域と結合するが、アクチビンのシグナル伝達を抑制しない
15 ことを見いだした。

さらに、本発明者らは、マウスの各種臓器からp o l y (A) ⁺ RNAを抽出し、配列番号：4に示すDNAをプローブとして用い、ノーザンハイブリダイゼーション法にて本発明の新規蛋白質の発現を調べたところ、心臓、脳、肝
20 臓、骨格筋、腎臓、精巣などの種々の臓器で広範囲にその発現が見られることを見いだした。このことから、該新規蛋白質は種々の臓器でのアクチビン-アクチビン受容体情報伝達系において重要な役割（例えば、アクチビン受容体の細胞膜上への運搬など）を果たすことが示唆され、アクチビン受容体の機能異常に関連する疾患の診断、治療等へ応用できることを見いだした。

25 本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

（1）配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア

ミノ酸配列を有する蛋白質またはその塩、

(2) 第(1)項記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、

(3) 第(1)項記載の蛋白質をコードするDNAを含有する組換えDNA、

(4) 配列番号: 3 で表される塩基配列またはそれとハイストリンジェントな
5 条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する第(3)項記載のDNA、

(5) 第(2)項記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有する組換えDNA、

(6) 第(3)項記載のDNAを含有する組換えベクター、

(7) 第(6)項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、

10 (8) 第(7)項記載の形質転換体を培養し、第(1)項記載の蛋白質を生成・蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする、第(1)項記載の蛋白質またはその塩の製造方法、

(9) 第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、

15 (10) 第(9)項記載の抗体に対して、第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有する被検液および標識化された第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を競合的に反応させることを特徴とする、第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量方法、

20 (11) 第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする、第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と結合する蛋白質の決定方法、

(12) 第(11)項記載の方法により得られる、第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と結合する蛋白質またはその
25 塩、

(13) 第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と、第(12)項記載の蛋白質またはその塩あるいはアクチビン受容体蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のス

クリーニング方法、

(14) ツーハイブリッド法を用いることを特徴とする、第(11)項記載の蛋白質の決定方法または第(13)項記載のスクリーニング方法、

5 (15) 第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする、第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と、第(12)項記載の蛋白質またはその塩あるいはアクチビン受容体蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

10 (16) 第(13)項記載のスクリーニング方法または第(15)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と、第(12)項記載の蛋白質またはその塩あるいはアクチビン受容体蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩、

15 (17) 第(12)項記載の蛋白質、第(16)項記載の化合物またはそれらの塩を含有してなる医薬、

(18) 第(12)項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に関連した神経細胞異常または脳疾患の予防・治療剤である第(17)項記載の医薬、

20 (19) 哺乳動物に対して第(12)項記載の蛋白質、第(16)項記載の化合物またはその塩を有効量投与することを特徴とする、第(12)項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に関連した神経細胞異常または脳疾患の予防・治療方法、および

25 (20) 第(12)項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に関連した神経細胞異常または脳疾患の予防・治療剤を製造するための第(12)項記載の蛋白質、第(16)項記載の化合物またはその塩の使用を提供する。

さらに、本発明は、

(21) 蛋白質がPDZドメインを有する蛋白質である第(1)項記載の蛋白

質、

(22) 蛋白質が心臓、脳、肝臓、骨格筋、腎臓、精巣、肺、脾臓で発現する蛋白質である第(21)項記載の蛋白質、

5 (23) 蛋白質がアクチビン受容体に対する結合能を有する蛋白質である第(22)項記載の蛋白質、

(24) 蛋白質がアクチビンのシグナル伝達を抑制しない蛋白質である第(23)項記載の蛋白質、

10 (25) 蛋白質が、配列番号：2で表されるアミノ酸配列、配列番号：2で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、2個以上10個以下)のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列、配列番号：2で表されるアミノ酸配列中に1または2個以上(好ましくは、2個以上10個以下)のアミノ酸配列が付加または挿入されたアミノ酸配列、あるいは配列番号：2で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、2個以上10個以下)のアミノ酸配列が他のアミノ酸と置換されたアミノ酸配列を含有する第(1)項記載の
15 蛋白質およびその塩、

(26) 酵母を用いる第(14)項記載のツーハイブリッド法、

(27) 標識した第(1)項記載の蛋白質またはその塩をアクチビン受容体に接触させた場合と、標識した第(1)項記載の蛋白質またはその塩および被験化合物をアクチビン受容体に接触させた場合における、標識した第(1)項記載
20 の蛋白質またはその塩のアクチビン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、第(1)項記載の蛋白質またはその塩とアクチビン受容体との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(28) 標識した第(1)項記載の蛋白質またはその塩を第(12)項記載の蛋白質またはその塩に接触させた場合と、標識した第(1)項記載の蛋白質またはその塩および被験化合物を、第(12)項記載の蛋白質またはその塩に接
25 触させた場合における、標識した第(1)項記載の蛋白質またはその塩の第(12)項記載の蛋白質またはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、第(1)項記載の蛋白質またはその塩と第(12)項記載の蛋白質

またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(29) アクチビン受容体を発現した細胞に第(1)項記載の蛋白質またはその塩を導入した場合と、アクチビン受容体を発現した細胞に第(1)項記載の蛋白質またはその塩および被験化合物を導入した場合における、第(1)項記載の蛋白質またはその塩の該細胞内におけるアクチビン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、第(1)項記載の蛋白質またはその塩とアクチビン受容体との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(30) 標識した第(1)項記載の蛋白質またはその塩をアクチビン受容体を発現した細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した第(1)項記載の蛋白質またはその塩および被験化合物をアクチビン受容体を発現した細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した第(1)項記載の蛋白質またはその塩の該細胞の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、標識した第(1)項記載の蛋白質またはその塩とアクチビン受容体との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(31) アクチビン受容体を発現した細胞に第(1)項記載の蛋白質またはその塩を導入した場合と、アクチビン受容体を発現した細胞に第(1)項記載の蛋白質またはその塩および被験化合物を導入した場合における、アクチビン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、第(1)項記載の蛋白質またはその塩とアクチビン受容体との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(32) 第(27)項～第(31)項のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られる化合物またはその塩、

(33) 第(32)項記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬組成物、および

(34) 第(12)項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に関連した神経細胞異常または脳疾患の予

防・治療剤である第（３３）項記載の医薬に関する。

さらに、本発明は、

（３５）外来性の第（３）項記載のDNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、

5 （３６）非ヒト哺乳動物がげっ歯類動物である第（３５）項記載の非ヒト哺乳動物、

（３７）げっ歯類動物がマウスである第（３６）項記載の非ヒト哺乳動物、

（３８）げっ歯類動物がラットである第（３６）項記載の非ヒト哺乳動物、および

10 （３９）外来性の第（３）項記載の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を提供する。

図面の簡単な説明

図１は、本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：２）を示す。

図２は、本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：２）を示し、図１の続きである。

発明を実施するための最良の形態

20 本発明の配列番号：２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、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、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（例えば、マクロファージ、
25 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、単球など）、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、もしくは間質細胞、またはこれらの細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは

はガン化細胞など] 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 (例えば、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、
大脳皮質、延髄、小脳など) 脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、
5 甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管 (例えば、大腸、小腸
など)、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
株など (特に脳) 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。

配列番号: 2 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
10 する蛋白質とは、配列番号: 2 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、最も好ましくは約 95%
以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質などが挙げられる。

本発明の配列番号: 2 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は、例えば、前記の配列番号: 2 で表されるアミノ酸配
15 列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号: 2 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一の生理活性を有する蛋白質などが好まし
い。

実質的に同一の生理活性としては、例えば、受容体親和性、シグナル情報伝
達能、臓器発現分布などの質的要素が挙げられる。実質的に同一とは、それら
20 の生理活性が生物学的または生理学的に同質であることを示す。したがって、
受容体親和性の強さなどの活性が同等 (例えば、約 0.1 ~ 20 倍、好ましく
は約 0.5 ~ 2 倍) であることが好ましいが、これらの活性の強弱、蛋白質の
分子量などの量的要素は異なってもよい。

例えば、受容体親和性の測定は、自体公知の方法に準じて行うことができる
25 が、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明の蛋白質としては、例えば、配列番号: 2 で表されるアミノ酸
配列中の 1 または 2 個以上 (好ましくは、1 から 10 個程度、より好ましくは
1 から 5 個程度、さらに好ましくは 1 から 3 個) のアミノ酸が欠失したアミノ

酸配列、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1から10個程度、より好ましくは1から5個程度、さらに好ましくは1から3個）のアミノ酸が付加または挿入されたアミノ酸配列、配列番号：2
5 度、より好ましくは1から5個程度、さらに好ましくは1から3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のいわゆるムテインも含まれる。

本明細書における蛋白質は、ペプチド表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。配列番号：2で表さ
10 れるアミノ酸配列を含有する蛋白質をはじめとする、本発明の蛋白質は、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であつてもよい。

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、
15 イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチル、 α -ナフチルメチルなどの C_{6-12} アリール- C_{1-2} アルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルエステルなどが用いられ
20 る。

本発明の蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。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。

25 さらに、本発明の蛋白質には、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン酸残基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上にある、例えば、OH、COO

H、 NH_2 、SHなどが適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明の蛋白質の具体例としては、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を
5 含有する蛋白質などが用いられる。

本発明の蛋白質の部分ペプチドとしては、前記した本発明の蛋白質の部分ペプチドであって、本発明の蛋白質が有する生理活性、例えば、受容体親和性、シグナル情報伝達能などの活性、臓器発現分布などを有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明の蛋白質の構成アミノ酸配列のうち20個
10 以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは80個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは120個以上のアミノ酸配列を有し、受容体親和性、シグナル情報伝達能などを有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは1から10個程度、さらに好ましくは1から3個）のアミノ酸が欠失
15 し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1から10個程度、より好ましくは1から5個程度、さらに好ましくは1から3個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1から10個程度、より好ましくは1から5個程度、さらに好ましくは1から3個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明の蛋白質と同様に、N
25 末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断されて生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基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ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、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、

5 リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。また、無機塩基（例えば、ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属、カルシウム、マグネシウムなどのアルカリ土類金属、アルミニウムまたはアンモニウムなど）との塩、有機塩基（例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2，6-ルチジン、エタノール

10 アミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N，N'-ジベンジルエチレンジアミンなど）との塩なども用いられる。

本発明の蛋白質またはその塩は、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方法によっても製造することもできるし、後述する該蛋白質を

15 コードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、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

20 組合せることにより単離精製することができる。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチル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-

25 (2'，4'-ジメトキシフェニルヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2'，4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂

などを挙げる事ができる。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、目的とする蛋白質の配列通りに、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蛋白質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、目的の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)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（例えば、HOBt、HOObt）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HOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行った後に樹脂に添加することができる。

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、蛋白質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。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃から50℃の範囲から適宜選択される。

活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5から4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチル

イミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

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

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、tert-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、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）、アラルキルエステル化、（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、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、tert-ブトキシカルボニルヒドラジド化、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。

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アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。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、tert-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、tert-ブチルなどが用いられる。

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。

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、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。
- 5 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、
- 10 一般に約-20℃から40℃の温度で行われるが、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補足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
- 15 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。
- 20 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。
- 蛋白質またはその部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した
- 25 後、アミノ基側にペプチド(蛋白質)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蛋白質(部分ペプチド)とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質(部分ペプチド)とを製造し、この両蛋白質(部分ペプチド)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蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質（部分ペプチド）を得ることができる。この粗蛋白質（部分ペプチド）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蛋白質（部分ペプチド）のアミド体を得ることができる。

蛋白質またはその部分ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシル末端アミノ酸の 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、蛋白質（部分ペプチド）のアミド体と同様にして、所望の蛋白質（部分ペプチド）のエステル体を得ることができる。

10 本発明の部分ペプチドまたはそれらの塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質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。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よい。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①から⑤に記載された方法が挙げられる。

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

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

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株）（1975年）

④矢島治明および榑原俊平、生化学実験講座1、タンパク質の化学IV、205、（1977年）

⑤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

また、反応後は通常の精製法、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、再結晶などを組合せて本発明の蛋白質ま

たはその部分ペプチドを単離精製することができる。上記方法で得られる該蛋白質またはその部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

5

本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、前述した本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、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ライブラリーより自体公知の方法により単離されたもの、合成DNAのいずれでもよい。

10

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画分または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）によって単離することもできる。

15

本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：3で表される塩基配列を含有するDNA、または②配列番号：3で表される塩基配列を有するDNA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DNAを有し、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と同質の生理活性、例えば、受容体親和性、シグナル情報伝達能などの活性、臓器発現分布などを有する蛋白質をコードするDNAであればいずれのものでもよい。

20

配列番号：3で表される塩基配列を有するDNA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：3で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約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。

25

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

例えば、モレキュラー・クローニング (M o l e c u l a r C l o n i n g)
2 n d (J. S a m b r o o k e t a l. , C o l d S p r i n g H a r
b o r L a b. P r e s s , 1 9 8 9) に記載の方法などに従って行うこと
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
5 載の方法に従って行うことができる。より好ましくは、ハイストリンジェント
な条件に従って行うことができる。

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 1 9 から 4
0 m M、好ましくは約 1 9 から 2 0 m Mで、温度が約 5 0 から 7 0 ℃、好まし
くは約 6 0 から 6 5 ℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 1 9 m Mで、
10 温度が約 6 5 ℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：2 のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードす
る DNA としては、配列番号：3 で表される塩基配列を有する DNA などが用
いられる。

本発明の部分ペプチドをコードする DNA としては、前述した本発明の部分
15 ペプチド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つ
てもよい。また、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 c DNA、前記した細胞・組織由来の c DNA ライブラリーより自
体公知の方法により単離されたもの、合成 DNA のいずれでもよい。

本発明の部分ペプチドをコードする DNA としては、例えば、①配列番号：
20 3 で表される塩基配列を含有する DNA、または②配列番号：3 で表される塩
基配列を有する DNA 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 DNA を有し、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と同質
の活性を有する蛋白質をコードする DNA の部分塩基配列を有する DNA な
どが用いられる。

25 ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記
と同様のものが用いられる。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチド(以下、本発明の蛋白質と略記する)
をコードする DNA のクローニングの手段としては、本発明の蛋白質の部分配

列をコードする塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて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、また、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ライブラリーより自体公知の方法により単離されたものを本発明の蛋白質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単離することができる。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うことができる。

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutantTM-super Express Km (宝酒造 (株))、MutantTM-K (宝酒造 (株)) などを用いて、ODA-LA PCR法、Gupped duplex法、Kunkel法など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うことができる。

クローン化された本発明の蛋白質をコードする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。

本発明の蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明の蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR3

25, 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、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどが挙げられる。これらのうち、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α 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、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SP01プロモーター、SP02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、pH05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には、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子[メソトレキセート(MTX)耐性]、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp^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と略称する場合がある、G418耐性)などが挙げられる。特に、CHO(dhfr⁻)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、目的遺伝子を含有する形質転換体をチミジンを

含まない培地によっても選択することができる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明の蛋白質のN末端側に付加することもできる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル配列、Omp A・シグナル配列などが、宿主が

5 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、メイティングファクター α ・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 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。

10 このようにして構築された本発明の蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、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。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*E s c h e r i*
15 *c h i a c o l i*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (*P r o*
c . N a t l . A c a d . S c i . U S A), 60巻, 160 (1968)], JM103 [ヌクレックアシズ・リサーチ, (*N u c l e i c A c i d*
s R e s e a r c h), 9巻, 309 (1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (*J o u r n a l o f M o l e c u*
20 *l a r B i o l o g y*)] , 120巻, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)], C600 [ジェネティックス (*G e n e t i c s*), 39巻, 440 (1954)] などが用いられる。

25 バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*B a c i l l u s S u b t i l i s*) MI114 [ジーン, 24巻, 255 (1983)], 207-221 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (*J o u r n a l o f B i o c h e m i s t r y*), 95巻, 87 (1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913、NCYC
5 2036、サッカロマイセス ピキア パストリス (*Saccharomyces picjia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh 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。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21
10 細胞 (以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィボ (*in vivo*), 13, 213-217, 1977) などが用いられる。

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

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Ver o, チャイニーズ
20 ハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (dhfr⁻ CHO細胞), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972) やジーン (*Gene*), 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行うことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネ

ラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) 168 巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行うことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194 巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 75 巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行うことができる。

10 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行うことができる。

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ル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52 巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行うことができる。

このようにして、蛋白質をコードする 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。

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
25 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挙げられる。また、酵母抽出物、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5 から 8 が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザ

ミノ酸を含むM9培地〔ミラー (M i l l e r) , ジャーナル・オブ・エクス
ペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (J o u r n a l o f
E x p e r i m e n t s i n M o l e c u l a r G e n e t i c s) , 4
31-433, C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y ,
5 N e w Y o r k 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、 3β -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。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15から43℃で約3から2
4時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

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

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 (B u r k h o l d e r) 最小培地〔B o s t i a n, K. L. ら、
プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス
15 ズ・オブ・ザ・ユーエスエー (P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S
A) , 77巻, 4505 (1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD
培地〔B i t t e r, G. A. らプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・
アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (P r o c. N
a t l. A c a d. S c i. U S A) , 81巻, 5330 (1984)〕が挙
20 げられる。培地のpHは約5から8に調整するのが好ましい。培養は通常約2
0℃から35℃で約24から72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

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、
G r a c e ' s I n s e c t M e d i u m (G r a c e, T. C. C., ネイチ
ャー (N a t u r e) , 195巻, 788 (1962)) に非動化した10%
25 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から6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3から5日間
行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

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から20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)〕, DMEM培地〔ウイルス学 (Virology), 8巻, 396 (1959)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)〕, 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)〕などが用いられる。pHは約6から8であるのが好ましい。培養は通常約30℃から40℃で約15から60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、本発明の蛋白質を培養培地中あるいは形質転換体中に生成せしめることができる。

上記培養物から本発明の蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行うことができる。

本発明の蛋白質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蛋白質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-100 (商品名) などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に蛋白質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。

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蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロ

マトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

- 5 かくして得られる蛋白質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。

- 10 なお、組換え体が産生する蛋白質を、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。

- 15 かくして生成する本発明の蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

- 20 本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩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。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質と略記する）に対する抗体は、本発明の蛋白質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

[モノクローナル抗体の作製]

- 25 (a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明の蛋白質は、温血動物に対して投与すること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から6週毎に1回ずつ、計2から10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

- 5 モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、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から5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化蛋白質と抗
- 10 血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。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 (PEG) やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。
- 15 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1から20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000からPEG6000）が10から80%程度の濃度で添加され、20から40℃、好ましくは30から37℃で
- 20 1から10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

- 抗蛋白質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、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（例えば、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
- 25 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、固相に結合した抗蛋白質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該蛋白質を加え、固相に結合した抗蛋白質モノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

抗蛋白質モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行うことができる。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よい。例えば、1から20%、好ましくは10から20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1から10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20から40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日から3週間、好ましくは1週間から2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行うことができる。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蛋白質抗体価の測定と同様にして測定できる。

15 (b) モノクローナル抗体の精製

抗蛋白質モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例えば、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（例えば、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの
20 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〕に従って行うことができる。

[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、それ自体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（蛋白質抗原）とキャリアー蛋白質との複合体を作り、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蛋白質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造できる。

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よくできれば、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、ヘモシアニンなどを重量比でハプテン
5 1 に対し、約 0.1 から 20、好ましくは約 1 から 5 の割合でカップルさせる方法が用いられる。

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

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 から 6 週毎に 1 回ずつ、計約 3 から 10 回程度行われ
15 る。

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。

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うこ
20 とができる。

本発明の蛋白質または部分ペプチドをコードする DNA または mRNA に実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンス DNA としては、本発明の蛋白質または部分ペプチドをコードする DNA または mRNA の塩基配列また
25 はその一部の塩基配列に実質的に相補的な塩基配列を有し、該蛋白質または部分ペプチドの発現を抑制し得る作用を有するオリゴヌクレオチドまたはその誘導体であれば、いずれのアンチセンス DNA であってもよい。

該DNAまたはmRNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、該DNAまたはmRNAに相補的な塩基配列（すなわち、該DNAまたはmRNAの相補鎖）の全塩基配列また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、さらに好ましくは約95%以上の相
5 同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAまたはmRNAの相補鎖の全塩基配列のうち、本発明の蛋白質などの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、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。こ
10 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。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質と略記する場合がある）、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコード
15 するDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明の蛋白質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）およびアンチセンスDNAは、①本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の決定方法、②組換え型蛋白質の発現系の構築、③two-hybrid法を用いた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、④構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較に基づいたドラッグデザインの実施、⑤遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成等における試薬として用いることができ、また、
20 ⑥遺伝子治療等の薬物として用いることができる。

特に、two-hybrid法を用いた本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の取得、さらに、本発明の蛋白質とアクチビン受容体または取得した他の受容
25 体を用いた結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的な情報伝達系の促進薬または阻害薬をスクリーニングすることができ、該促進薬または阻害薬を各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができ、以下により具体的に説明する。

(1) 本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の決定方法

本発明の蛋白質は、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明の蛋白質と相互作用する結合蛋白質をスクリー
5 ニングすることを特徴とする本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の決定方法を提供する。

具体的には、本発明の結合蛋白質の決定方法は、宿主細胞発現ベクター上に転写因子のDNA結合領域に本発明の蛋白質を融合させたベクターと被験蛋白質と転写活性化領域融合ライブラリーとを該転写因子結合領域をプロモーター上に保持しているレポーター遺伝子を持つ宿主細胞に導入し、2種の蛋白質の結合により上昇するレポーター遺伝子の発現量の変化により、該蛋白質と相互作用する蛋白質またはその塩を決定する方法である。

本発明の結合蛋白質決定方法においては、本発明の蛋白質と被験蛋白質との相互作用を特定のレポーター遺伝子の発現に変換することにより検出する t
15 w o - h y b r i d法を用いることを特徴とする。

本発明の結合蛋白質決定方法の具体的な説明を以下にする。

まず、結合蛋白質決定方法に用いる本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、本発明の配列番号：2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をコードする塩基配列またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、
20 温血動物(例、ヒトなど)のゲノムDNA、温血動物(例、ヒトなど)のゲノムDNAライブラリー、温血動物(例、ヒトなど)の組織・細胞由来のcDNA、温血動物(例、ヒトなど)の組織・細胞由来のcDNAライブラリーより自体公知の方法により単離されたDNA、合成または半合成DNAのいずれでもよい。
25 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、ファージミドなどのいずれであってよい。一方、組織・細胞よりmRNA画分を調製したものを用いて直接RT-PCR法によって単離することもでき、あるいは、部分的な塩基配列をそれぞれ化学的に合成し、それらを

連結させることによって製造することもできる。

スクリーニングする被験蛋白質ライブラリーとしては、市販の各種動物の種々臓器由来のcDNAライブラリー(Clonotech社製 MATCHMAKER cDNAなど)などが用いられる。

- 5 DNA結合領域と被験蛋白質の融合蛋白質を発現させるベクターとしては、pAS2-1、pGBT9、pKAD-09、pSD09、pEG202、pBTM116などが用いられる。

- 転写因子の活性化領域と蛋白質の融合蛋白質を発現させるベクターとしては、pGAD424、pACT2、pKT10Gal-VP、pJG4-5、
10 pVP16などが用いられる。

転写因子としては、GAL4、LexA、SRFなどが用いられる。

レポーター遺伝子としては、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子(LacZ)、ヒスチジン遺伝子(HIS3)、ルシフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチル転移酵素遺伝子などが用いられる。

- 15 宿主細胞としては、酵母(Saccharomyces cerevisiae)、大腸菌などが用いられ、その中でもCG-1945、Y190、Y187、HF7c、SFY526、L40、EGY48、HIS/L1、62L酵母株などが用いられる。

- 具体的には、該蛋白質に結合する蛋白質の決定方法は、まず該蛋白質をコードする塩基配列を含むDNA断片とプラスミド(例えば、pAS2-1)上のDNA結合領域をコードする塩基配列を含むDNA断片と同じ続き枠に結合したプラスミド、およびプラスミド(例えば、pACT2)上の転写因子(例えば、GAL4)の転写活性化領域をコードする塩基配列を含むDNA断片と結合し、融合蛋白質の形で発現されるcDNAライブラリーを、例えば、モレ
20 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作成することができる。

上記の2種のプラスミドを宿主細胞(例えば、サッカロミマイセス セレビ

シエ Y 1 9 0) に導入するには、これらで同時に形質転換してもよいし、または一方のプラスミドを先に導入した後に他方を逐次導入してもよく、例えば、メツソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194 巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 75 巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行うことができる。

形質転換体のレポーター遺伝子の発現、レポーター酵素の発色物質、蛍光物質の生成量あるいは発光量等に変換して検出できる。より具体的には、宿主細胞が酵母の場合、レポーター遺伝子の発現（例えば、 β -ガラクトシダーゼ活性）は、レプリカプレート法またはフィルター法を、好ましくはフィルター法を用いて青／白の呈色スクリーニングにより検出することができる。

フィルター法で呈色（例えば、青色）したコロニーは、例えば、ア・プラクチカル・アプローチ (A Practical Approach) (Bartel, P. L. et al., Oxford University Press, Oxford; 153-179, 1993a) などに記載の方法に従い処理されることにより、ポジティブクローンの単一コロニーを分離することができる。

分離した単一の形質転換体より、例えば、ジーン (Gene), 57 巻, 267 (1987)、バイオ・テクニクス (Bio Techniques), 14 巻, 552 (1993) などに記載の方法に従い、プラスミド DNA を回収し、その DNA の塩基配列の決定により、本発明の蛋白質に対する受容体を決定することができる。

また、市販のキット、例えば、MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid Systems (Clontech 社製) などを使用しても本発明の蛋白質に対する結合蛋白質を決定することができ、その場合は、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

(2) 本発明の蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記（１）の方法において、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質が明らかに
なれば、該結合蛋白質の発現部位および該結合蛋白質を介した本発明の蛋白質
が有する作用などを明らかにすることができる。これらの知見を基に、本発明
の蛋白質をコードするDNAは、該結合蛋白質を介した疾患の予防・治療剤と
5 して使用することができる。また、本発明の蛋白質はアクチビン受容体への結
合活性を示すことより、アクチビン受容体を介した疾患の予防・治療剤として
使用することができる。

例えば、本発明の蛋白質の遺伝子が心臓、脳、肝臓、骨格筋、腎臓、精巣、
肺、脾臓などに発現することから、これら臓器において、該結合蛋白質または
10 アクチビン受容体に関連した疾患を発症している患者がいる場合に（イ）本発
明の蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あ
るいは（ロ）これら臓器の細胞などに本発明の蛋白質をコードするDNAを挿
入し発現させた後に、該細胞を該患者の臓器に移植することなどによって、該
患者のこれら臓器における本発明の蛋白質の作用を十分に発揮させることが
15 できる。従って、本発明の蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発
明の蛋白質に対する結合蛋白質を介した疾患の予防・治療剤として使用す
ることができる。

本発明のDNAを上記治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるい
はレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシ
20 エーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に
従って実施することができる。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、本発明のDNAを生理学的
25 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
た範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、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しがって処方するとができる。注射用の水性液としては生理食塩水、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）、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）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80（商品名）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。該DNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 Kgとして）においては、一日につき約0.1から100 mg、好ましくは約1.0から50 mg、より好ましくは約1.0から20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、

症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（60 Kgとして）においては、一日につき約0.01から30 mg程度、好ましくは約0.1から20 mg程度、より好ましくは0.1から10 mg程度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
5 に換算した量を投与することができる。

（3）本発明の蛋白質とその結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物のスクリーニング方法

本発明の蛋白質またはその塩を用いるか、または組換え型結合蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いた蛋白質競合的結合アッセイ系を用いることによって本発明の蛋白質と結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物（例
10 えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。さらに、本発明の蛋白質をコードするDNAを導入した形質転換体での2種の蛋白質の相互作用によるレポーター遺伝子の発現系（two-hybrid法）を用いることによって
15 も、本発明の蛋白質と結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）との結合を阻害あるいは促進する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。

このような化合物には、結合蛋白質を介して細胞刺激活性（例えば、増殖促進、細胞内蛋白質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など）を有する
20 化合物（いわゆる本発明の蛋白質に対するアゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる本発明の蛋白質に対するアンタゴニスト）などが含まれる。

すなわち、本発明は、1）（i）本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に、本
25 発明の蛋白質またはその塩を接触させた場合と（ii）本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に、本発明の蛋白質またはその塩および被験化合物を接触させた場合との比較を行なうこと、または、2）（i）本発明の蛋白質および本発明の蛋白質に対する結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）をコードするDNA

を導入した形質転換体と (ii) 被験化合物を接触させた場合の該形質転換体との比較を行なうことを特徴とする、本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 5 本発明のスクリーニング方法においては、1) (i) 本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に、本発明の蛋白質またはその塩を接触させた場合と (ii) 本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に、本発明の蛋白質またはその塩および被験化合物を接触させた場合における、例えば、本発明の蛋白質の結合蛋白質に対する、該蛋白質またはその塩の結合量、細胞刺激活性などを測定して比較すること、または、2) (i) 本発明の蛋白質および本発明の蛋白質に対する結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）をコードするDNAを導入した形質転換体と (ii) 試験化合物を接触させた該形質転換体における、例えば、呈色度などによるレポーター遺伝子の発現の程度を比較することを特徴とする。
- 10

より具体的には、本発明は、

- 15 ①標識した本発明の蛋白質またはその塩を、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に接触させた場合と、標識した本発明の蛋白質またはその塩および被験化合物を本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に接触させた場合における、標識した本発明の蛋白質またはその塩の該結合蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、本発明の蛋白質またはその塩と該結合蛋白質との結合を
- 20 阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- 25 ②本発明の蛋白質に対する結合蛋白質が膜結合型の蛋白質（例えば、膜貫通型受容体、チャンネル等）の場合、標識した本発明の蛋白質またはその塩を、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質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、標識した本発明の蛋白質またはその塩および被験化合物を本発明の蛋白質に対する結合蛋白質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、標識した本発明の蛋白質またはその塩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、本発明の蛋白質またはその塩と該結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物また

はその塩のスクリーニング方法、

- ③標識した本発明の蛋白質またはその塩を、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）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内に発現した結合蛋白質に接触させた場合と、標識した本発明の蛋白質またはその塩および被験化合物を本発明の蛋白質に対する結合蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することにより細胞内に発現した結合蛋白質に接触させた場合における、標識した本発明の蛋白質またはその塩の該結合蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、本発明の蛋白質またはその塩と該結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、および
- ④本発明の蛋白質の遺伝子を発現せしめるプラスミドと本発明の蛋白質に対する結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）の遺伝子を発現せしめるプラスミドとを導入された宿主細胞と、該宿主細胞を被験化合物に接触させた場合における、該宿主細胞内での本発明の蛋白質および本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の相互作用により発現が制御されている遺伝子群の発現、あるいは生理学的反応（例えば、該結合蛋白質がアクチビン受容体の場合、F S Hの分泌等）を比較することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩と該結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 20 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。

- まず、本発明のスクリーニング方法に用いる結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）としては、該結合蛋白質またはそれらの塩を含有するものであれば何れのものであってもよいが、温血動物の臓器の抽出物が好適である。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ものとしては、遺伝子組換え技術を用いて大量発現させた結合蛋白質またはその塩が適している。

結合蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、例えば、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うこ

とができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではなく、例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。該結合蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキ
5 ュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒト・ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現した結合蛋白質の量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献
10 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、結合蛋白質またはその
15 塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した結合蛋白質またはその塩であってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質が膜結合蛋白質の場合、それを含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、結合蛋白質を含有する細胞を用いる
20 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。

結合蛋白質を含有する細胞としては、結合蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。

25 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 (Kinellmatica社製) のよる破碎、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挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500から3000rpm）で短時間（通常、約1から10分）遠心し、上清をさらに高速（15000から30000rpm）で通常30分から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、発現した結合蛋白質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。

該結合蛋白質を含有する細胞や膜画分中の結合蛋白質の量は、1細胞当たり 10^2 から 10^8 分子であるのが好ましく、 10^5 から 10^7 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど細胞抽出物あるいは膜画分当たりの本発明の蛋白質との結合活性（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。

本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害する化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、適当な結合蛋白質画分と、標識した本発明の蛋白質が必要である。該結合蛋白質画分としては、天然型の結合蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型結合蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、本発明の蛋白質に対する同等の結合活性などを示す。

標識した本発明の蛋白質としては、標識した本発明の蛋白質、標識した本発明の蛋白質アナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ など標識された本発明の蛋白質などを利用することができる。

具体的には、本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニングを行うには、まず、該結合蛋白質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緩衝液に懸濁することにより結合蛋白質標品を調製する。緩衝液には、pH4から10（望ましくはpH6から8）のリン酸緩衝液、トリスー塩酸緩衝液などの本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害しない緩衝液であればい

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-80（商品名）（花王-アトラス社製）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤を緩衝液に加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる結合蛋白質や本発明の蛋白質の分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01から10mlの該結合蛋白質溶液に、一定量（5000から500000cpm）の標識した本発明の蛋白質を添加し、同時に 10^{-4} から 10^{-10} 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蛋白質を加えた反応チューブも用意する。反応は0から50℃、望ましくは4から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同緩衝液で洗浄した後、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（B0）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B0-NSB）を100%とした時、特異的結合量（B-NSB）が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、特異的結合量（B-NSB）が例えば150%以上になる被験化合物を結合促進能力のある候補化合物として選択することができる。

本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物スクリーニングする前記の④の方法を実施するためには、本発明の蛋白質の遺伝子を発現せしめるプラスミドと本発明の蛋白質に対する結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）の遺伝子を発現せしめるプラスミドとを導入された宿主細胞内での、本発明の蛋白質および本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の相互作用により発現が制御されている遺伝子群の発現、あるいは生理学的反応（例えば、該結合蛋白質がアクチビン受容体の場合、FSHの分泌等）を公知の方法を用いて測定することができる。具体的には、宿主細胞が酵母の場合、まず、酵母細胞に本発明の蛋白質と転写制御因子のDNA結合領域とを融合させた蛋白質を発現せしめるプラスミドと本発明の蛋白質に

対する結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）と転写制御因子の活性化領域とを融合させた蛋白質を発現せしめるプラスミドとを導入した形質転換体を前述と同様の方法にて作製する。スクリーニングを行なうにあたっては、この形質転換体を 10^{-4} から 10^{-10} M の被験化合物を含む寒天培地上で 30°C で 2 から 4 日間培養する。寒天培地としては、トリプトファン／ロイシン／ヒスチジン欠損 SD 培地、トリプトファン／ロイシン欠損 SD 培地などが用いられる。その後、レポーター遺伝子の発現を β -ガラクトシダーゼ活性によるコロニーの呈色として検出するために、フィルター法などを用いて検出する。検出は、形質転換体が付着したフィルター上に、Z 緩衝液／X-gal (Clontech 社) で湿らせたワットマン #5 フィルターまたは VWR グレード 410 フィルターを置き、 30°C で 30 分から 8 時間保温した後、フィルター上のコロニーの呈色を、被験化合物を含まないコントロールとしての形質転換体との呈色の度合いを比較する。この時、コントロールと比して、より濃い呈色を示すコロニーの培養培地に加えた被験化合物を結合促進能力のある候補化合物として、また、より薄い呈色を示すコロニーの培養培地に加えた被験化合物を結合阻害能力のある候補化合物として選択することができる。また、レポーター遺伝子の発現を β -ガラクトシダーゼ活性として、基質の分解により生成する o -ニトロフェノール量を測定することにより定量することもできる。まず、形質転換体を 10^{-4} から 10^{-10} M の被験化合物を含む液体培地上で 30°C で 8 から 24 時間振盪培養する。液体培地としては、トリプトファン／ロイシン／ヒスチジン欠損 SD 培地、トリプトファン／ロイシン欠損 SD 培地などが用いられる。好ましくは一夜培養した後、培養液の一部を YPD 培地に植菌し、 OD_{600} が 0.5 から 1.0 となるように 30°C で 3 から 5 時間振盪培養する。その培養液の一部を遠心した残渣の Z 緩衝液／ β -メルカプトエタノール混合物中に o -ニトロフェニルガラクトシド溶液 (Sigma 社) を加え反応させる。反応は、 0 から 50°C で、3 分から 24 時間、望ましくは、 30°C で、30 分から 15 時間行い、黄色に着色した上清の 420 nm の吸光度 (OD_{420}) を測定する。 β -ガラクトシダーゼ活性は、得られた吸光度 (OD_{420})

20) より以下の計算式を用いて、ミラー単位 (Miller unit) として算出する。

被験化合物を培地に添加することにより、 β -ガラクトシダーゼ活性値が約10%以上、好ましくは約20%以上、より好ましくは約30%以上、最も好ましくは約50%以上増加した場合、該被験化合物を本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を促進する能力のある候補化合物として選択することができる。一方、被験化合物を培地に添加することにより、 β -ガラクトシダーゼ活性値が約10%以上、好ましくは約20%以上、より好ましくは約30%以上、最も好ましくは約50%以上低下した場合、該被験化合物を本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害する能力のある候補化合物として選択することができる。

レポーター遺伝子の発現活性を測定してスクリーニングを行なうには、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）をコードするDNAが必要である。本発明の蛋白質に対する結合蛋白質をコードするDNAとしては、該DNAを含有するDNAまたはそれら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DNAなどが望ましい。

被験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、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。

本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の蛋白質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質を含有する細胞、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質を含有する細胞の抽出画分、あるいは本発明の蛋白質と転写制御因子のDNA結合領域を融合させた蛋白質を発現せしめるプラスミドと本発明の蛋白質に対する結合蛋白質と転写制御因子の活性化領域を融合させた蛋白質を発現せしめるプラスミドとを導入した形質転換体を含有するものである。

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

①形質転換体

5 本発明の蛋白質と転写制御因子のDNA結合領域を融合した蛋白質を発現せしめるプラスミドとアクチビンIIA受容体蛋白質と転写制御因子の活性化領域を融合した蛋白質を発現せしめるプラスミドとを導入し、形質転換した酵母Y190株

②液体培養培地

トリプトファン／ロイシン／ヒスチジン欠損SD培地：酵母窒素源（Difco社）水溶液をオートクレーブで滅菌後、L-イソロイシン、L-バリン、L-アデニンヘミ硫酸塩、L-アルギニン塩酸塩、L-リジン塩酸塩、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-スレオニン、L-チロシン、L-ウラシルよりなるオートクレーブで滅菌し4℃で保存したドロップアウト溶液を加える。さらに、フィルターで濾過滅菌した40%デキストロース／ストック溶液（Sigma社）を加え、2%になるように調整し、4℃で保存するか、あるいは用時調製してもよい。

YPD培地：Difcoペプトンに酵母抽出物の水溶液をオートクレーブで滅菌後、フィルターで濾過滅菌した40%デキストロースを加え最終濃度を2%に調整し、4℃で保存するか、あるいは用時調製してもよい。

20 ③緩衝液

Z緩衝液： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、KCl、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を含み、pHを7付近に調整後、オートクレーブで滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製してもよい。

Z緩衝液／β-メルカプトエタノール：Z緩衝液100に対してβ-メルカプトエタノールを0.27の割合で加えたもの。

④β-ガラクトシダーゼの基質

25 o-ニトロフェニルガラクトシド溶液（Sigma社）をZ緩衝液に溶解し、4mg/mlの濃度に調整したもので用時調製する。

⑤反応停止液

4℃で保存した1M 炭酸ナトリウム溶液を用いるか、あるいは用時調製してもよい。

2. 測定法

- 5 ① 10^{-3} から 10^{-10} M の被験化合物溶液を $5\mu\text{l}$ 加えた 1ml のトリプトファン／ロイシン欠損SD培地で酵母形質転換体を 30°C で一夜振盪培養する。
- ② 培養液 0.4ml を 1.6ml のYPD培地中に加え、 OD_{600} が 0.5 から 1.0 となるように 30°C で3から5時間振盪培養する。
- ③ 0.3ml の培養液を 14000rpm で30秒間遠心し、残渣を 0.3ml
10 1 のZ緩衝液に懸濁し、再度遠心後、沈殿を 0.1ml のZ緩衝液に懸濁する。
- ④ 液体窒素にて一旦凍結後、 37°C で30秒から1分間かけて溶解する。 0.7ml のZ緩衝液／ β -メルカプトエタノール混液と 0.16ml のo-ニトロフェニルガラクトシド溶液を加え、 30°C で溶液が黄色になるまで保温し、この後 0.4ml の1M 炭酸ナトリウム溶液を加える。
- 15 ⑤ 14000rpm で10分間遠心し、その上清の 420nm における吸光度を測定し、 β -ガラクトシダーゼ活性をミラー単位 (Miller unit) として次の式〔数1〕で求める。

〔数1〕

$$\beta\text{-ガラクトシダーゼ活性} = 1000 \times \text{OD}_{420} / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

20 OD_{420} : 420nm における吸光度

t : 反応時間 (分)

V : 反応に用いた、形質転換体のZ緩衝液の懸濁液量×希釈倍率

- 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
- 25 れる化合物またはその塩は、本発明の蛋白質（なかでもPDZドメインを有し、心臓、脳、肝臓、骨格筋、腎臓、精巣、肺、脾臓で発現する蛋白質）と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）との結合を阻害する化合物または促進する化合物（以下、促進化合物）である。

本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）との結合を阻害する化合物には、①本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に結合することによって、本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害し、それ自体が結合蛋白質を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆるアゴニスト）、②本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に結合することによって、本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害するが、それ自体は結合蛋白質を介した細胞刺激活性を有しない化合物またはその塩（いわゆるアンタゴニスト）、③本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に結合することなく、本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害する化合物（以下、阻害化合物と略記）またはその塩などが含まれる。

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と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合性の有無は、上記した結合活性の測定法に従って確認することができる。

結合蛋白質を介した細胞刺激活性は、それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

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としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、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。

該アゴニストおよび促進化合物は、本発明の蛋白質が有する生理活性と同様の作用を有するか、あるいはその生理活性を増強する作用を有しているので、該蛋白質活性に応じて安全で低毒性な医薬組成物、特に心臓、脳、肝臓、骨格筋、腎臓、精巣、肺、脾臓などにおける、該結合蛋白質またはアクチビン受容体に関連した疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、てんかん症、ハンチントン舞踏症などの神経細胞異常または脳疾患など）の予防・治療薬の予防治療薬として有用である。

逆に、該アンタゴニストまたは阻害化合物は、本発明の蛋白質が有する生理

活性を抑制することができるので、該蛋白質活性を抑制する安全で低毒性な医薬組成物、特に心臓、脳、肝臓、骨格筋、腎臓、精巣、肺、脾臓における、該結合蛋白質またはアクチビン受容体に関連した疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、てんかん症、ハンチントン舞踏症などの神経細胞異常または脳疾患など）の予防治療薬として有用である。

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

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したがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえば

エタノール)、ポリアルコール(たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート 80 (TM)、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このよう

10 にして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど)に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60 Kgとして)においては、通常、一日につき約0.1

15 1から100 mg、好ましくは約1.0から50 mg、より好ましくは約1.0から20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形で通常成人(60 Kgとして)においては、通常、一日につき約0.01から30 mg程度、好ましくは約0.1から20 mg程度、より好ましくは約0.1

20 1から10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。ヒト以外の動物の場合も、60 Kgあたりに換算した時に同等となるような量を投与することができる。

(4) 本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

本発明の蛋白質抗体は、本発明の蛋白質等を特異的に認識することができる

25 ので、被検液中の本発明の蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の蛋白質等に反応する抗体と、被検液および標識化された本発明

の蛋白質等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蛋白質等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蛋白質等の定量法、

- (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蛋白質等の定量法において、一方の抗体が本発明の蛋白質等のN端部あるいはC端部を認識する抗体で、他方の抗体が配列番号：2のアミノ酸配列に反応する抗体であることを特徴とする、被検液中の本発明の蛋白質等の定量法を提供する。
- 10 本発明の蛋白質等を認識するモノクローナル抗体（以下、抗蛋白質抗体と称する場合がある）を用いて本発明の蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF（a b'）²、F a b'あるいはF a b画分を用いてもよい。
- 15 本発明の抗体を用いる本発明の蛋白質等の測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば本発明の蛋白質量）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。
- 20

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素としては、例えば $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、

25

ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用いることもできる。

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

サンドイッチ法においては不溶化した抗蛋白質抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した抗蛋白質抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明の蛋白質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。

本発明のサンドイッチ法による本発明の蛋白質等の測定法においては１次反応と２次反応に用いられる抗蛋白質抗体は本発明の蛋白質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明の蛋白質等のＣ端部あるいはＮ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくは配列番号：２で表されるアミノ酸配列を認識する抗体が用いられる。

本発明の蛋白質等に対する抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（Ｆ）と抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定

量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として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。

- 5 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。

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

- これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、
15 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蛋白質等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)「Methods in Enzymology」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書Vol. 20 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Selected Immunoassays (Part D))),
25

同書Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods (Part E))), 同書Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies (Part I))) (以上、アカデミックプレス社発行) など参照]。

以上のように、本発明の蛋白質等に対する抗体を用いることによって本発明の蛋白質等を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の蛋白質等に対する抗体を用いて本発明の蛋白質等の濃度を定量することによって、例えば、本発明の蛋白質等が関与する疾病の診断を行うことができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被験体中に存在する本発明の蛋白質等を検出するために使用することができる。また、本発明の蛋白質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各画分中の本発明の蛋白質等の検出、被験細胞内における本発明の蛋白質等の挙動の分析などのために使用することができる。

(5) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（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、チンパンジーなど）における本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードする遺伝子異常を検出することができるので、例えば、該DNAの突然変異あるいはmRNAの異常蓄積あるいは異常減少などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミックス(Genomics), 第5巻, 874~879頁(1989年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー(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。

(6) アンチセンスDNAを含有するDNA

- 5 本発明の蛋白質等をコードするDNAまたはmRNAに相補的に結合し、該mRNAの転写あるいは翻訳を抑制することができるアンチセンスDNAは、本発明の蛋白質等をコードする遺伝子の異常発現を抑制することができる。従って、該アンチセンスDNAは、例えば、本発明の蛋白質等をコードする遺伝子の異常発現に起因する疾病の予防・治療剤として使用することができる。
- 10 該アンチセンスDNAを上記の予防・治療剤として使用する場合、前記した本発明のDNAを含有する医薬と同様にして製造することができる。例えば、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従ってヒトまたは温血動物に投与することが
- 15 できる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂食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、遺伝子銃やマイク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。

- 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
- 20 使用することもできる。

(7) DNA転移動物の作製

- 本発明は、外来性の本発明の蛋白質をコードする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。
- 25 すなわち、本発明は、
- (i) 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、
 - (ii) 非ヒト哺乳動物がげっ歯類動物である第(i)記載の非ヒト哺乳動物、
 - (iii) げっ歯類動物がマウスである第(ii)記載の非ヒト哺乳動物、

(iv) げっ歯類動物がラットである第(ii)記載の非ヒト哺乳動物、および
(v) 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を提供するものである。

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、
5 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、DE
10 AE-デキストラン法、レトロウイルス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
胚芽細胞と自体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DN
15 A転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ラット、マウス、モルモット、ハムスタ
ー、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌなどが用いられる。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、繁殖が容易なげっ歯動物、とりわけマウス(例えば、純系として、C5
20 7BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、
B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など)またはラ
ット(例えば、Wister, SDなど)などが好ましい。

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挙げられる。

25 本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDN
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蛋白質をコード
するDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNA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DNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明の蛋白質を発現させる遺伝子を含有するDNAを意味し、例えば、正常な本発明の蛋白質の機能を抑制する蛋白質を
5 発現させる遺伝子を含有するDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNA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。本発明の蛋白質をコードするDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNA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DNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNA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DNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のDNAを結合したDNAコンストラクト（例えば、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
10 ジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

該コンストラクトを保持するベクターとしては、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、
20 大腸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。

上記DNA発現調節を行うプロモーターとしては、例えば、ウイルス（例えば、シミアヌイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するプロモーター、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）由来のものとしては、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、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、
25

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K1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP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
5 皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカ
リウムアデノシン3リン酸酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフ
ィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロテイナーゼ1組
織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、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、ポリペプチド鎖延長因子
10 1 α （EF-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、チオグロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、
H鎖可変部（VNP）、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が、好ましくは全身で高発現することが
15 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
などを用いることができる。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするmRNAの転写を
終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）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
20 ことができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが
用いられる。

その他、目的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'
25 下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明の蛋白質の翻訳領域は、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、ヒトなど）由来の肝臓、腎

臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来ゲノム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のすべ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、自体公知の方法で取得することができる。また、外来性の異常DNAは、本発明の蛋白質の変異を起因とする疾病を発症した上記の細胞または組織より得ることができる。また、上記の細胞または組織より得られた正常な蛋白質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。

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。

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できる。

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すべ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すべてに本発明の外来性DNAを過剰に有する。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D

NAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

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蛋白質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。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能亢進症や、本発明の蛋白質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、本発明の蛋白質の増加症状を有することから、本発明の蛋白質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

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できる。さらに、目的とする外来性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、通常の遺伝子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異常DNAが存在することは、作出動物の子孫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異常DNAを有することを意味する。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。

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蛋白質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、

本発明の蛋白質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うことが可能である。

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、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症における本発明の異常蛋白質による正常蛋白質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、本発明の蛋白質の増加症状を有することから、本発明の蛋白質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。

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、
10 例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA転移哺乳動物の組織中のmRNAを直接分析するか、発現した蛋白質組織を分析することによる、本発明の蛋白質により特異的に発現あるいは活性化する蛋白質との関連性についての解析、
- 15 ③上記①記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるあるいは抑制するような薬剤のスクリーニング、および
- ④本発明の変異蛋白質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症を含む、本発明の蛋白質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、
20 また、本発明の蛋白質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。

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うことが可能である。さらに、本発明の蛋白質産生細胞の特定化、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、本発明の蛋白質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症を含む、本発明の蛋白質に関連する疾患の治療薬の開発を行うために、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来性DNA発現ベクターを用いて、本発明の蛋白質が関連する疾患の遺伝子治療法を検討、開発することが可能である。

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

	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
15	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
20	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
25	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	EIA	: エンザイムイムノアッセイ
	Gly	: グリシン

	A l a	: アラニン
	V a l	: バリン
	L e u	: ロイシン
	I l e	: イソロイシン
5	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
10	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
15	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
20	p G l	: ピログルタミン酸
	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
25	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

T o s : p - トルエンシルホニル

- C H O : ホルミル
 B z l : ベンジル
 C l ₂ B z l : 2, 6-ジクロロベンジル
 B o m : ベンジルオキシメチル
 5 Z : ベンジルオキシカルボニル
 C l - Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル
 B r - Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
 B o c : t-ブトキシカルボニル
 D N P : ジニトロフェノール
 10 T r t : トリチル
 B u m : t-ブトキシメチル
 F m o c : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
 H O B t : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
 H O O B t : 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-
 15 1, 2, 3-ベンゾトリアジン
 H O N B : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボ
 ジイミド
 D C C : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

20 〔配列番号：1〕

t w o - h y b r i d法に用いる b a i t プラスミドとしてのアクチビン
IIA受容体蛋白質の細胞内ドメインをコードするDNAフラグメントの塩基
配列を示す。

〔配列番号：2〕

25 本発明の蛋白質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

本発明の配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする
cDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

ノーザンハイブリダイゼーションに用いるプローブとしてのDNAの塩基配列を示す。

後述の実施例1で得られた形質転換体エシャリヒア コリ (Escherichia coli) HB101/pACT2YA1は、平成11年11月1日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERM BP-6927として、平成11年10月14日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16325として寄託されている。

実施例

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれ
に限定されるものではない。なお、酵母を用いたtwo-hybrid法の操作
法は市販のキット (Clontech社製) に添付の説明書に記載されている
方法に、また、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クロー
ニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

15

実施例1 本発明の蛋白質をコードするcDNAのクローニング

(1) two-hybrid法によるアクチビンIIA受容体蛋白質と相互作用
する蛋白質のスクリーニング

以下の、cDNAライブラリーからアクチビンIIA受容体蛋白質と相互作用
する蛋白質のスクリーニングには、キットとしてMATCHMAKER™
Two-Hybrid System 2 (Cat. No. K1604-1: Clontech社) を用いた。

上記方法に従い、DNA結合用ベクターpAS2-1のEcoRI部位と
BamHI部位を適切な制限酵素で切断し、アルカリフォスファターゼ処理
した後精製した。その後、配列番号：1で表されるアクチビンIIA受容体蛋白質の細胞内ドメインをコードするDNAフラグメントをライゲーションし、目的とするGAL4 DNA結合ドメインとアクチビンIIA受容体細胞内ドメイン全体を融合蛋白質として発現するプラスミド (pAS-IIA) を得た。GA

25

L4転写活性化領域融合ライブラリープラスミドとしては、市販のマウス脳M
ATCHMAKER cDNA library (Clontech社)を用い
た。

酵母菌株Y190の単一コロニー（直径2から3mm）を20mlのトリプ
5 トファン欠損SD培地に植菌し、18時間30℃で振盪培養した。この培養液
の10mlを300mlのYPD培地にOD₆₀₀=0.2から0.3なるよう
に植え、30℃で3時間振盪培養した。培養液を滅菌した遠心管に移し、10
00×gで5分間室温で遠心した。上清を捨て、細胞を25mlの滅菌水に懸
濁し、再度、1000×gで5分間室温で遠心した。上清を捨て、細胞を1.
10 5mlのTE緩衝液（0.01M Tris-HCl, 1mM EDTA, pH
7.5）／0.1M酢酸リチウム溶液（pH 7.5）の混合液に懸濁して次
の形質転換に用いた。

先に作製した10μgのプラスミド（pAS-IIA）と2mgのニシン精巢
キャリアーDNA（Clontech社）に上記で作製した細胞懸濁液1ml
15 を加え、よく混合した。さらに、6mlのPEG（40%PEG 4000）
／TE緩衝液／0.1M酢酸リチウム溶液の混合液を加え、ボルテックスミキ
サーで混合した。30℃、200rpmで30分間振盪後、700μlのDM
SO（最終濃度10%）を加えて穏やかに攪拌した。その後、時々振りながら、
42℃で15分間加熱し、容器を氷冷後、1000×gで5分間遠心した。上
20 清を捨て、細胞を0.5mlのTE緩衝液に懸濁した。得られた細胞懸濁液1
00μlをトリプトファン欠損SD培地上にスプレッドし、30℃で4日間培
養し、前記プラスミドを安定に保持する株を得た。続いて、GAL4転写活性
化領域融合ライブラリープラスミドも同様の方法にて前記酵母株に導入した。
得られた形質転換体0.2mlをトリプトファン／ロイシン／ヒスチジン欠損
25 SD培地上にまき、30℃で8日間培養した後、His⁺コロニーをトリプト
ファン／ロイシン／ヒスチジン欠損寒天プレート上にストリークした。

シャーレに5mlのZ緩衝液（Na₂HPO₄・7H₂O, NaH₂PO₄・H
2O, KCl, MgSO₄・7H₂O, pH 7）／X-gal溶液（5-ブロ

- モ-4-クロロ-3インドリル- β -D-ガラクトシドの2%DMF溶液)/
 β -メルカプトエタノール混合液を入れ、滅菌したワットマン#5フィルター
を湿らせた。別のフィルターを前記形質転換体コロニーがある寒天プレート上
に置いた後、このフィルターを取り上げ、コロニー面を上にして液体窒素で凍
5 結させた。液体窒素中からフィルターを取り出し、室温で融解した後、先の湿
らせたフィルター上にコロニー面を上にして置いた。シャーレの蓋を閉めて3
0℃で1時間保温し、青くなった約100個のポジティブコロニーを分離した。
得られたそれぞれのポジティブクローンを3mlのロイシン欠損SD液体培
地に植え、2日間培養した後、この培養液を10000倍に希釈し、ロイシン
10 欠損SDプレートにまき、30℃で3日間保温した。20から30個のコロニー
を滅菌した楊枝で拾い、トリプトファン/ロイシン欠損SDプレートとロイ
シン欠損SDプレートにレプリカした。ここで、先のポジティブコロニーより
トリプトファン栄養要求性を示すコロニーを選択し、その β -ガラクトシダー
ゼ活性の検定を行い、さらに活性を示さない2個のコロニーを選択した。
- 15 得られた真のポジティブコロニーを2mlのYPD液体培地に植え、30℃
で一夜培養した。培養液を5秒間室温で遠心し、上清を捨てた後、0.2ml
の酵母溶解液(2%トリトンX-100, 1%SDS, 100mM NaCl,
10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA)を加え、懸
濁させた。0.2mlのフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(2
20 5:24:1)と酸で洗ったガラスビーズを加え、2分間ボルテックスミキサ
ーで攪拌した。14000rpmで5分間室温で遠心した後、分離した上清に
1/10量の3M酢酸ナトリウム溶液(pH 5.2)と2.5倍量のエタノ
ールを加えた。得られた沈殿物を70%エタノールで洗浄した後、20 μ lの
滅菌水に溶解した。このうちの1 μ lを大腸菌HB101株にエレクトロポレ
25 ーション法により導入した後、通常のミニプレップ法でプラスミドDNAを精
製し、目的とするcDNA(pACT2YA1)を得、その塩基配列を決定し
た。本発明の蛋白質の全長cDNAは888bpで、配列番号:2で表される
153個のアミノ酸からなるポリペプチド[図1および図2]をコードしてい

た。

配列番号：2で表されるアミノ酸からなるポリペプチドをコードする全長 cDNAを含むプラスミド pACT2YA1を大腸菌 HB101 に形質転換し、形質転換体：大腸菌 HB101 / pACT2YA1 を得た。

- 5 実施例2 マウスの各種臓器由来 poly (A) ⁺RNA を用いたノーザンハイブリダイゼーション法による発現の検出

配列番号：4で表されるDNAを、DIG-PCR プローブ合成キット (Boehringer 社) を用いジゴキシゲニンで標識し、プローブとして用いた。

- 10 また、Balb/c マウスより脳、肝臓、脾臓、肺、腎臓、心臓、精巣、骨格筋を摘出し、TRIzol 試薬 (GIBCO BRL 社) により total RNA を抽出した。その後、PolyAT tract mRNA Isolation System (Promega 社) を用いて、poly (A) ⁺RNA を精製した。

- 15 各 poly (A) ⁺RNA を 1 μ g ずつ用い、ホルマリンゲル法により 1% アガロースゲル電気泳動を行い、ブロッティング装置 (Amersham-Pharmacia 社) を用いたバキュームブロッティング法により、Hybond N (Amersham-Pharmacia 社) にプロットした。これを先に作製したプローブDNAの各 5 ng/ml を含むハイブリダイゼーシ

- 20 ョン緩衝液 (5 $\times$ SSC, 0.1% N-lauroyl sarcosine, 0.02% SDS, 0.5% blocking reagent (Boehringer 社), 100 μ g/ml サケ精巣DNA) にて、65 $^{\circ}$ C で一夜保温した。その後、0.1 $\times$ SSC および 0.1% SDS を用い、65 $^{\circ}$ C、20分

- 25 (Boehringer 社) を含む溶液 (0.1M Tris-HCl pH 7.5, 0.15M NaCl, 150mU/ml 抗体) 中で保持した後、0.1M Tris-HCl (pH 7.5)、0.15M NaCl および 0.1% Tween 20 を用い、15分で3回洗浄した。最後に、Lumi-Pho

s 530 (和光純薬工業社製) を基質とした化学発光を行い、X線フィルムに露光して検出した結果、本発明の蛋白質が心臓、脳、肝臓、骨格筋、腎臓、精巢などで多く発現していることが確認された。

5 産業上の利用可能性

- 本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質と略記する場合がある）、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明の蛋白質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）およびアンチセンスDNAは、①本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の決定、②抗体および血清の入手、③組換え型蛋白質の発現系の構築、④発現系を用いた結合アッセイ系およびtwo-hybrid法を用いた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、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較に基づいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成等における試薬として用いることができ、また、⑦遺伝子治療等の薬物として用いることができる。特に、本発明の蛋白質の構造・性質の解明は、これらの系に作用するユニークな医薬品の開発につながる。

請求の範囲

1. 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質またはその塩。
- 5 2. 請求項 1 記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。
3. 請求項 1 記載の蛋白質をコードする DNA を含有する組換え DNA。
4. 配列番号：3 で表される塩基配列またはそれ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する請求項 3 記載の DNA。
5. 請求項 2 記載の部分ペプチドをコードする DNA を含有する組換え DNA。
- 10 6. 請求項 3 記載の DNA を含有する組換えベクター。
7. 請求項 6 記載の組換えベクターを保持する形質転換体。
8. 請求項 7 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 記載の蛋白質を生成・蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項 1 記載の蛋白質またはその塩の製造方法。
- 15 9. 請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体。
10. 請求項 9 記載の抗体に対して、請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有する被検液および標識化された請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を競合的に反
- 20 応させることを特徴とする請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量方法。
11. 請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする、請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と結合する蛋白質の決定方法。
- 25 12. 請求項 11 記載の方法により得られる、請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と結合する蛋白質またはその塩。
13. 請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする、請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の部分ペ

プチドまたはそれらの塩と、請求項 1 2 記載の蛋白質またはその塩あるいはアクチビン受容体蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

1 4. ツー ハイブリッド(two-hybrid)法を用いることを特徴とする請求項 1 1 記載の蛋白質の決定方法または請求項 1 3 記載のスクリーニング方法。

1 5. 請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする、請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と、請求項 1 2 記載の蛋白質またはその塩あるいはアクチビン受容体蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

1 6. 請求項 1 3 記載のスクリーニング方法または請求項 1 5 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と、請求項 1 2 記載の蛋白質またはその塩あるいはアクチビン受容体蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩。

1 7. 請求項 1 2 記載の蛋白質、請求項 1 6 記載の化合物またはそれらの塩を含有してなる医薬。

1 8. 請求項 1 2 記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に関連した神経細胞異常または脳疾患の予防・治療剤である請求項 1 7 記載の医薬。

1 9. 哺乳動物に対して請求項 1 2 記載の蛋白質、請求項 1 6 記載の化合物またはその塩を有効量投与することを特徴とする、請求項 1 2 記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に関連した神経細胞異常または脳疾患の予防・治療方法。

2 0. 請求項 1 2 記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に関連した神経細胞異常または脳疾患の予防・治療剤を製造するための請求項 1 2 記載の蛋白質、請求項 1 6 記載の化合物または

その塩の使用。

1/2

☒ 1

AACTGTAAAGCTATGCTGGGAGGAGCGGGAGGCTTGATTACCTTCACCTGCTCTGG	60
CCACCCGCTGACCCGGGTTTCGGCCGGAGAGCAGTCAGAT ATG AAC GGA CGG GTG GAT	120
Met Asn Gly Arg Val Asp	6
TAT TTA GTC ACG GAG GAA GAG ATC AAC CTG ACG AGA GGA CCT TCG GGG CTG	171
Tyr Leu Val Thr Glu Glu Ile Asn Leu Thr Arg Gly Pro Ser Gly Leu	23
GGC TTC AAC ATC GTC GGT GGG ACA GAT CAA CAG TAT GTC TCC AAC GAC AGT	222
Gly Phe Asn Ile Val Gly Gly Thr Asp Gln Gln Tyr Val Ser Asn Asp Ser	40
GGC ATC TAC GTC AGC CGT ATC AAA GAG GAT GGG GCT GCG GCC CAG GAT GGG	273
Gly Ile Tyr Val Ser Arg Ile Lys Glu Asp Gly Ala Ala Ala Gln Asp Gly	57
CGG CTC CAG GAG GGT GAT AAG ATC CTC TCG GTA AAT GGC CAA GAT CTG AAG	324
Arg Leu Gln Glu Gly Asp Lys Ile Leu Ser Val Asn Gly Gln Asp Leu Lys	74
AAC CTG CTG CAC CAA GAT GCT GTA GAC CTC TTC CGT AAT GCG GGA TGT GCT	375
Asn Leu Leu His Gln Asp Ala Val Asp Leu Phe Arg Asn Ala Gly Cys Ala	91
GTG TCC CTG AGA GTA CAG CAC AGG TTG CTG GTT GTT GGA GGT TCT TTT GGT	426
Val Ser Leu Arg Val Gln His Arg Leu Leu Val Val Gly Gly Ser Phe Gly	108
CTT CGT GAA TTT TCA CAA ATC CGG TAC GAT GCT GTG ACA ATT AAG ATT GAT	477

2/2

☒ 2

Leu Arg Glu Phe Ser Gln Ile Arg Tyr Asp Ala Val Thr Ile Lys Ile Asp 125
CCT GAA TTG GAG AAA AAA TTG AAA GTG AAT AAA ATA ACT TTA GAG TCA GAG 528
Pro Glu Leu Glu Lys Lys Leu Lys Val Asn Lys Ile Thr Leu Glu Ser Glu 142
TAT GAG AGG CTG TTA TGT TTA TTG TGC AGA CAA TGATAATCCACCAGAG 577
Tyr Glu Arg Leu Leu Cys Leu Cys Arg Gln 153
AAGTATTGCCACAAGCAAGCCGTCCTCAAGTACAATCACAGACGCGACTTTACACAAGGAA 637
CAGAGAAATGAAGTCAGAGGGCACACAAAGGAACAGGGAGAAAGTCAGTTTCAGTTAATCA 697
TTTTTGATTTTGATAAGTTTTTCTGCAAGCACAAATTAGCTTTCAGAAATGGTAGAGAAGT 757
TAGATGTCCAGTTTAAATTAGCGGTGACCAACAACAGTAAAAACAGTTTATATAAAATTT 817
GTTTCCCACAAAAATAAACTATATATATAATAAAATGTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA 877
AAAAAAAAAAAA 888

SEQUENCE LISTING

<110>Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120>Novel Protein and Its Use

<130>2657W00P

<150>JP11-305187

<151>1999-10-27

<150>JP11-313453

<151>1999-11-04

<160>4

<210>1

<211>1442

<212>DNA

<213>Mouse

<400>1

```
AGACATCACA AGATGGCCTA CCCTCCTGTA CTTGTTCTTA CTCAAGACCC AGGACCACCC 60
CCACCTTCCC CATTACTAGG GTTGAAGCCA TTGCAGCTGT TAGAAGTGAA AGCAAGGGGA 120
AGATTTGGTT GTGTCTGGAA AGCCCAGTTG CTCAATGAAT ATGTGGCTGT CAAAATATTT 180
CCAATACAGG ACAAACAGTC CTGGCAGAAT GAATATGAAG TCTATAGTCT ACCTGGAATG 240
AAGCATGAGA ACATACTACA GTTCATTGGT GCAGAGAAAA GAGGCACCAG TGTGGATGTG 300
GACCTGTGGC TAATCACAGC ATTTTCATGAA AAGGGCTCAC TGTCAGACTT TCTTAAGGCT 360
AATGTGGTCT CTTGGAATGA ACTTTGTCAT ATTGCAGAAA CCATGGCTAG AGGATTGGCA 420
TATTTACATG AGGATATACC TGGCTTAAAA GATGGCCACA AGCCTGCAAT CTCTCACAGG 480
GACATCAAAA GTAAAAATGT GCTGTTGAAA AACAATCTGA CAGCTTGCAT TGCTGACTTT 540
GGGTTGGCCT TAAAGTTCGA GGCTGGCAAG TCTGCAGGTG ACACCCATGG GCAGGTTGGT 600
ACCCGGAGGT ATATGGCTCC AGAGGTGTTG GAGGGTGCTA TAACTTCCA AAGGGACGCA 660
TTTCTGAGGA TAGATATGTA CGCCATGGGA TTAGTCCTAT GGGAATTGGC TTCTCGTTGC 720
ACTGCTGCAG ATGGACCCGT AGATGAGTAC ATGTTACCAT TTGAGGAAGA AATTGGCCAG 780
CATCCATCTC TTGAAGATAT GCAGGAAGTT GTTGTGCATA AAAAAAGAG GCCTGTTTTA 840
AGAGATTATT GGCAGAAACA TGCAGGAATG GCAATGCTCT GTGAAACGAT AGAAGAATGT 900
```

TGGGATCATG ATGCAGAAGC CAGGTTATCA GCTGGATGTG TAGGTGAAAG AATTACTCAG 960
 ATGCAAAGAC TAACAAATAT CATTACTACA GAGGACATTG TAACAGTGGT CACAATGGTG 1020
 ACAAATGTTG ACTTTCCTCC CAAAGAATCT AGTCTATGAT GGTGGCACCG TCTGTACACA 1080
 CTGAGGACTG GGA CTCTGAA CTGGAGCTGC TAAGCTAAGG AAAGTGCTTA GTTGATTTTC 1140
 TGTGTGAAAT GAGTAGGATG CCTCCAGGAC ATGTACGCAA GCAGCCCCTT GTGGAAAGCA 1200
 TGGATCTGGG AGATGGATCT GGGAAACTTA CTGCATCGTC TGCAGCACAG ATATGAAGAG 1260
 GAGTCTAAGG GAAAAGCTGC AAAGTGTAAA GAACTTCTGA AAATGTACTC GAAGAATGTG 1320
 GCCCTCTCCA AATCAAGGAT CTTTGGACC TGGCTAATCA AGTATTTGCA AAAGTACAT 1380
 CAGATTTCTT AATGTCTGTC AGAAGACACT AATTCCTTAA ATGAAGTACT GCTATTTTTT 1440
 TT 1442

<210>2

<211>153

<212>PRT

<213>Mouse

<400>2

Met Asn Gly Arg Val Asp Tyr Leu Val Thr Glu Glu Glu Ile Asn Leu

1 5 10 15

Thr Arg Gly Pro Ser Gly Leu Gly Phe Asn Ile Val Gly Gly Thr Asp

20 25 30

Gln Gln Tyr Val Ser Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Val Ser Arg Ile Lys

35 40 45

Glu Asp Gly Ala Ala Ala Gln Asp Gly Arg Leu Gln Glu Gly Asp Lys

50 55 60

Ile Leu Ser Val Asn Gly Gln Asp Leu Lys Asn Leu Leu His Gln Asp

65 70 75 80

Ala Val Asp Leu Phe Arg Asn Ala Gly Cys Ala Val Ser Leu Arg Val

85 90 95

Gln His Arg Leu Leu Val Val Gly Gly Ser Phe Gly Leu Arg Glu Phe

100 105 110

Ser Gln Ile Arg Tyr Asp Ala Val Thr Ile Lys Ile Asp Pro Glu Leu

115

120

125

Glu Lys Lys Leu Lys Val Asn Lys Ile Thr Leu Glu Ser Glu Tyr Glu

130

135

140

Arg Leu Leu Cys Leu Leu Cys Arg Gln

145

150

153

<210>3

<211>459

<212>DNA

<213>Mouse

<400>3

```

ATGAACGGAC GGGTGGATTA TTTAGTCACG GAGGAAGAGA TCAACCTGAC GAGAGGACCT   60
TCGGGGCTGG GCTTCAACAT CGTCGGTGGG ACAGATCAAC AGTATGTCTC CAACGACAGT   120
GGCATCTACG TCAGCCGTAT CAAAGAGGAT GGGGCTGCGG CCCAGGATGG GCGGCTCCAG   180
GAGGGTGATA AGATCCTCTC GGTAAATGGC CAAGATCTGA AGAACCTGCT GCACCAAGAT   240
GCTGTAGACC TCTTCCGTAA TGCGGGATGT GCTGTGTCCC TGAGAGTACA GCACAGGTTG   300
CTGGTTGTTG GAGGTTCTTT TGGTCTTCGT GAATTTTCAC AAATCCGGTA CGATGCTGTG   360
ACAATTAAGA TTGATCCTGA ATTGGAGAAA AAATTGAAAG TGAATAAAAT AACTTTAGAG   420
TCAGAGTATG AGAGGCTGTT ATGTTTATTG TGCAGACAA                               459

```

<210>4

<211>888

<212>DNA

<213>Mouse

<400>4

```

AACTGTAAAA GCTATGCTGG GGAGGCAGCG CGGAGCTTGA TTCACCTTCA CCTGCTCTGG   60
CCACCCGCTG ACCCGGGGTT TCCGGCCGGA GAGCAGTCAG ATATGAACGG ACGGGTGGAT   120
TATTTAGTCA CGGAGGAAGA GATCAACCTG ACGAGAGGAC CTTCGGGGCT GGGCTTCAAC   180
ATCGTCGGTG GGACAGATCA ACAGTATGTC TCCAACGACA GTGGCATCTA CGTCAGCCGT   240
ATCAAAGAGG ATGGGGCTGC GGCCCAGGAT GGGCGGCTCC AGGAGGGTGA TAAGATCCTC   300

```

TCGGTAAATG GCCAAGATCT GAAGAACCTG CTGCACCAAG ATGCTGTAGA CCTCTTCCGT 360
AATGCGGGAT GTGCTGTGTC CCTGAGAGTA CAGCACAGGT TGCTGGTTGT TGGAGGTTCT 420
TTTGGTCTTC GTGAATTTTC ACAAATCCGG TACGATGCTG TGACAATTAA GATTGATCCT 480
GAATTGGAGA AAAAAATTGAA AGTGAATAAA ATAACCTTAG AGTCAGAGTA TGAGAGGCTG 540
TTATGTTTAT TGTGCAGACA ATGATAATCC ACCAGAGAAG TATTGCCACA AGCAAGCCGT 600
CCAAGTACAA TCACAGACAG CGACTTTACA CAAGGAACAG AGAATGAAGT CAGAGGGCAC 660
ACAAAGGAAC AGGGAGAAAAG TCAGTTTCAG TTAATCATTT TGATTTTGAT AAGTTTTTCC 720
TGCAAGCACA ATTAGCTTTC AGAAATGGTA GAGAAGTTAG ATGTCCAGTT TTAATTAGCG 780
GTGACCAACA ACAGTAAAAA ACAGTTTAT AAAATTTGTT. TCCCACAAAA ATAAACTATA 840
TATATAAAAA TGTTAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA 888

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18,
C07K14/47, G01N33/50, G01N33/15, A61K38/17

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18,
C07K14/47, G01N33/50, G01N33/15, A61K38/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
MEDLINE (STN),
EMBL/DBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	EP, 1033401, A2 (Genset), 06 September, 2000 (06.09.00) Claims; (Sequence Nos. 3623, 7700) on the sequence list in the CD-ROM attached to the Gazette & CA, 2296792, A1	1-9
X Y	EMBO J., Vol.18 [11] (June 1999) Y. Nemoto et al. "Recruitment of an alternatively spliced form of synaptojanin 2 to mitochondria by the interaction with the PDZ domain of a mitochondrial outer membrane protein," pp.2991-3006, Figs. 1 A, 1D	2, 5, 9, 10 11-18, 20
X Y	WO, 99/53051, A2 (Genset) 21 October, 1999 (21.10.99), Claims; sequence No. 769 & AU, 9930501, A	2, 5, 9 10-18, 20
X Y	WO, 98/40483, A2 (Human Genome Sci. Inc.) 17 September, 1998 (17.09.98), Claims; sequence Nos. 20, 60 & AU, 9865521, A & EP, 973892, A1	2, 5, 9 10-18, 20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 November, 2000 (28.11.00)

Date of mailing of the international search report
05 December, 2000 (05.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07480

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO, 99/25825, A2 (Genset), 27 May, 1999 (27.05.99) Claims; sequence Nos. 48,140,142 & AU, 9910491, A & EP, 1029045, A1	2,5,9 10-18,20
X Y	WO, 99/31326, A2 (Genset), 24 July, 1999 (24.07.99) Claims; sequence No. 135 & AU, 9915030, A & EP, 1037977, A1	2,5,9 10-18,20
Y	EP, 943684, A2 (Smithkline Beecham P.L.C.), 22 September, 1999 (22.09.99) & JP, 11-253183, A & CA, 2249661, A1	10-18,20
Y	EP, 937777, A2 (Smithkline Beecham P.L.C.), 25 August, 1999 (25.08.99), & JP, 11-253182, A & CA, 2249653, A1 & US, 6043054, A	10-18,20
Y	EP, 933425, A2 (Smithkline Beecham P.L.C.), 04 August, 1999 (04.08.99) & JP, 11-225778, A & CA, 2246001, A1	10-18,20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07480

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 19
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in claim 19 pertains to methods for prevention or treatment of diseases and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18,
C07K14/47, G01N33/50, G01N33/15, A61K38/17

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18,
C07K14/47, G01N33/50, G01N33/15, A61K38/17

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG),
MEDLINE (STN),
EMBL/DDBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	EP, 1033401, A2 (Genset) 6. 9月. 2000 (06. 09. 00) 特許請求の範囲, 公報添付CD-ROM記載の配列表 (配列番号 3623及び7700) 参照 &CA, 2296792, A1	1-9
X Y	EMBO J., Vol.18[11](1999-Jun) Y.Nemoto et al. "Recruitment of an alternatively spliced form of synaptojanin 2 to mitochondria by the interaction with the PDZ domain of a mitochondrial outer membrane protein" p. 2991-3006 第1図A及びD参照	2, 5, 9, 10 11-18, 20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
上條 肇

4B 9453



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
$\frac{X}{Y}$	WO, 99/53051, A2 (Genset) 21. 10月. 1999 (21. 10. 99) 特許請求の範囲、配列番号769参照 &AU, 9930501, A	$\frac{2, 5, 9}{10-18, 20}$
$\frac{X}{Y}$	WO, 98/40483, A2 (Human Genome Sci. Inc.) 17. 9月. 1998 (17. 09. 98) 特許請求の範囲、配列番号20及び60参照 &AU, 9865521, A &EP, 973892, A1	$\frac{2, 5, 9}{10-18, 20}$
$\frac{X}{Y}$	WO, 99/25825, A2 (Genset) 27. 5月. 1999 (27. 05. 99) 特許請求の範囲、配列番号48, 140, 142参照 &AU, 9910491, A &EP, 1029045, A1	$\frac{2, 5, 9}{10-18, 20}$
$\frac{X}{Y}$	WO, 99/31326, A2 (Genset) 24. 7月. 1999 (24. 07. 99) 特許請求の範囲、配列番号135参照 &AU, 9915030, A &EP, 1037977, A1	$\frac{2, 5, 9}{10-18, 20}$
Y	EP, 943684, A2 (Smithkline Beecham P.L.C.) 22. 9月. 1999 (22. 09. 99) &JP, 11-253183, A &CA, 2249661, A1	10-18, 20
Y	EP, 937777, A2 (Smithkline Beecham P.L.C.) 25. 8月. 1999 (25. 08. 99) &JP, 11-253182, A &CA, 2249653, A1 &US, 6043054, A	10-18, 20
Y	EP, 933425, A2 (Smithkline Beecham P.L.C.) 4. 8月. 1999 (04. 08. 99) &JP, 11-225778, A &CA, 2246001, A1	10-18, 20

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 19 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 19 に係る発明は疾患の予防・治療方法に該当するから、特許協力条約第 17 条(2)(a)(i) 及び特許協力条約に基づく規則 39.1(iv) の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。