

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3949162号

(P3949162)

(45) 発行日 平成19年7月25日(2007.7.25)

(24) 登録日 平成19年4月27日(2007.4.27)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 9/12 (2006.01)	C 1 2 N 9/12	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
C O 7 K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40	
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48	Z
請求項の数 13 (全 26 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願平8-512920	(73) 特許権者	390040420
(86) (22) 出願日	平成7年10月10日(1995.10.10)		マックス・プランク・ゲゼルシャフト・ツ
(65) 公表番号	特表平10-507354		ア・フェルデルング・デア・ヴィッセンシ
(43) 公表日	平成10年7月21日(1998.7.21)		ャフテン・エー・ファオ
(86) 国際出願番号	PCT/EP1995/003990		Max-Planck-Gesellsch
(87) 国際公開番号	W01996/012024		haft zur Foerderung
(87) 国際公開日	平成8年4月25日(1996.4.25)		der Wissenschaften
審査請求日	平成14年10月9日(2002.10.9)		e. V.
(31) 優先権主張番号	P4436696.5		ドイツ連邦共和国デー80539ミュン
(32) 優先日	平成6年10月13日(1994.10.13)		ヘン、ホーフガルテンシュトラッセ8番
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)	(74) 復代理人	100110593
(31) 優先権主張番号	P4445562.3		弁理士 杉本 博司
(32) 優先日	平成6年12月20日(1994.12.20)	(74) 代理人	100061815
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		弁理士 矢野 敏雄
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 新規の形のホスファチジルイノシトール-3-キナーゼのクローニング、発現及び特性決定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 配列番号4に示されたアミノ酸配列

又は

(b) 配列番号4に示されたアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する

(a) からなる配列の変異体を含むことを特徴とするホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項2】

ヒトから得られる、請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】

請求項1又は2記載のホスファチジルイノシトール-3-キナーゼをコードすることを特徴とする核酸。

【請求項4】

組換えDNA分子である、請求項3記載の核酸。

【請求項5】

(a) 配列番号3に示されたタンパク質をコードする配列、

(b) 遺伝子コードの縮重の範囲内で(a)からなる配列に該当する核酸配列又は

(c) 水性低塩緩衝剤中で55℃で洗浄することによる緊縮ハイブリダイゼーション条件下で、(a)及び/又は(b)からなる配列とハイブリッドする配列を含む、請求項3記載の核酸。

【請求項 6】

少なくとも 20 個のヌクレオチドの長さの、配列番号 3 で示された配列の断片を含有し、その際この断片は P I 3 K γ に対して特異的な核酸配列を含有する、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項記載の核酸。

【請求項 7】

請求項 3 から 6 までのいずれか 1 項記載の核酸の少なくとも 1 種のコピーを含有することを特徴とするベクター。

【請求項 8】

請求項 3 から 6 までのいずれか 1 項記載の核酸又は請求項 7 記載のベクターで形質転換されていることを特徴とする細胞。

10

【請求項 9】

抗体の製造のための免疫原としての請求項 1 又は 2 記載のタンパク質又はこのタンパク質の断片の使用。

【請求項 10】

P I 3 K γ 特異性であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のタンパク質に対する抗体。

【請求項 11】

配列番号 4 のアミノ酸 742-746 に示されたアミノ酸配列に相当するペプチド配列と結合する、請求項 10 記載の抗体。

【請求項 12】

該当する細胞中での請求項 1 又は 2 記載のタンパク質をコードする遺伝子の発現強度を測定することによる、細胞中のホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ活性を試験管内で測定する方法。

20

【請求項 13】

転写物水準及び／又はタンパク質水準に関する発現強度を測定する、請求項 12 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は新規のホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (P I 3 K γ)、これをコードする核酸、タンパク質と結合する抗体並びにこれらのタンパク質、核酸及び抗体の診断的及び治療的用途に関する。

30

ホスファチジルイノシトール-キナーゼは、特異的なホスホリパーゼの他に、膜脂質のホスファチジルイノシトール (P I) からの細胞内伝達物質の生成を触媒する酵素グループに属する。この酵素の活性は、細胞外のエフェクター、例えばホルモン、成長因子及び神経伝達物質により調節される。P I 依存性の伝達物質が重要な細胞機能、例えば細胞増殖、細胞内容物の分泌、飲食作用の経過、一定の細胞の指向性の運動、細胞骨格の制御された変化等のプロセスの調節に関与していることが推測される。P I-キナーゼ及びホスホリパーゼの生理学的意義に応じて、一連の疾患はこの酵素の機能の変化と関連している。多様な実験結果から、P I 3-キナーゼによる触媒反応の生成物の P I, -3, 4, 5-トリホスフェートは、次に挙げる生理的細胞機能の調節の際に重要な役割があると推測される：

40

— P I 3-キナーゼによる細胞増殖及び細胞分化の調節

マイトジェン、例えば成長因子及びサイトカインは、一般に分裂可能な細胞における P I 3-キナーゼ活性の刺激を引き起こす。細胞の腫瘍形成トランスフォーメーションも測定可能な P I 3-キナーゼ活性の数倍の上昇を伴う (Varticovski et al., Biochim. Biophys. Acta 1226, 1-11 (1994), Berggren et al., Cancer Research 53, 4297 - 4302 (1993), Soldi et al., Oncogene 9, 2253 - 2260 (1994))。P I 3-キナーゼの阻害剤は、PDGF により刺激された正常な結合組織細胞又は平滑筋細胞及びsrc-スーパーラトランスフォーメーションした (src-supratransformierten) 繊維芽細胞 (腫瘍細胞) の増殖を阻止することができる (Berggren et al., Cancer Research 53, 4297 - 4302 (1993), Vlahos et al., J. Biol. Chem. 269, 5241 - 5248 (1994))。ベルグレン他 (

50

Berggren et al.) は、エーテル脂質類似体の腫瘍抑制効果は、主に P I 3 - キナーゼに関する抑制作用に起因すると推定した。

神経細胞系統 P C 1 2 の分化は、P I 3 - キナーゼの阻害物質のウォルトマンニン (Wortmannin) により抑制される (Kimure et al., J. Biol. Chem. 269, 18961 - 18967 (1994))。この所見は、アルツハイマー患者の脳における P I 3 - キナーゼ活性の選択的損失が検出された臨床的試験でも同様に、神経組織の発達及び維持における酵素の本質的な機能を示唆している。

ー 細胞骨格に依存するプロセスの P I 3 - キナーゼによる調節

顕微鏡により見ることができる細胞の変化は、細胞骨格の関与のもとで頻繁に進行する。一連の結果は、このような現象が少なくとも部分的に P I 3 - キナーゼ及びその酵素による産生物 (P I 3, 4, 5, P₃, P I 3, 4 P₂ 及び P I 3 P) により部分的に調節されることが示される。インシュリン又は P D G F により誘導される表皮細胞の「膜の波打ち (membrane ruffling)」は、P I 3 - キナーゼ阻害剤のウォルトマンニンにより抑制することができる

10

(Kotani et

al., EMBO J. 13, 2313 - 2321 (1994), Wennström et al., Curr. Biol. 4, 385 - 393 (1994)

)。

20

好塩基性白血球は、ヒスタミン (炎症及びアレルギー症状の媒介物) を放出することができる。この分泌プロセスは細胞骨格の関与のもとに進行する。ヤノ他 (Yano et al., J. Biol. Chem. 268, 25846 - 25856 (1993)) は、抗体により誘導されたヒスタミン分泌が、再度 P I 3 - キナーゼ阻害剤のウォルトマンニンにより抑制することができる、つまり 3 - ホスホリル化されたホスホイノシチドにより明らかに調節されることを証明することができた。

ー P I 3 - キナーゼの細胞内輸送プロセスへの関与

酵母突然変異体の研究は、この有機体中の P I 3 - キナーゼ (Vps34) の形態が、酵母小胞 (Hefevacuole) の方向へのタンパク質の選択的分配に関与していることを示している (Schu et al., Science 260, 88 - 91 (1993))。同様のメカニズムは、場合により、細胞内部から形質膜までのグルコース輸送タンパク質 (GLUT 4) のインシュリンにより刺激されたトランスロケーションを基礎としている (Kanai et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 195, 762 - 768 (1993))。多様な器官中で重要なこの現象も、ウォルトマンニンにより阻害され、明らかに P I 3 - キナーゼの関与のもとに進行している。

30

ー 好中性顆粒球中の O₂⁻ 産生の阻害

貪食された外来細胞を死滅させるために、顆粒球はスーパーオキシドアニオン (O₂⁻) を産生する。この現象は化学誘引物質 f M L P により刺激される。f M L P により誘導された O₂⁻ 産生のウォルトマンニンによる遮断は、身体の免疫応答に対して重要な現象に関する P I 3 - キナーゼ種の調節機能を示唆している。

40

記載された結果は、重要な細胞機能の調節の際の P I 3 - キナーゼ及び 3 - ホスホリル化されたイノシトール脂質の中心的意味を示唆している。疑いもなく、重大な疾患形成は、前記の細胞機能の後天的又は遺伝的欠陥がもとになっている。例として次のものが挙げられる：ガン、動脈硬化症、免疫異常症、皮膚疾患 (例えば乾癬)、神経系の変質性疾患。P I 3 - キナーゼが前記の細胞機能の調節の際に不可欠な要素であるため、若干の疾患形成は比較的高い確率で P I 3 - キナーゼ種の機能不全に起因することができる。アルツハイマー疾患患者の脳中の P I 3 - キナーゼについての臨床的研究、アレルギー誘導物質のヒスタミンの産生の際の P I 3 - キナーゼの役割の発見、及び P I 3 - キナーゼを阻害するエーテル脂質の制ガン作用 (kanzerostatische Wirkung) がこの方向性を示唆している

50

。

細胞生物学の中心的関係、細胞内の信号伝達のメカニズム及び関与する伝達物質を解明しなければならない。この研究は、細胞機能に医学的意味で選択的に影響を及ぼすことが最終的目標である。

本願明細書は、新規の種類のパ I 3 キナーゼの同定、クローニング、発現及び特性決定を記載する。この新規の種類は、G-プロテイン-サブユニットにより活性化され、それにより今まで哺乳類の細胞からクローニングされた種のパ I 3 K α (Hiles et al., Cell 70 (1992) 419 - 429) 及びパ I 3 K β (Hu et al., J. Mol. Chell. Biol. 13, (1993), 7677 - 7688) 並びに酵母からのパ I 3 K-Vps34 (Schu et al., supra und Herman et al., Cell 64 (1991), 425 - 438) とは調節メカニズムの点で異なっている。10
一方で公知の酵素のパ I 3 K α 及びパ I 3 K β 並びに他方で本願発明による酵素のパ I 3 K γ の間の機能的な差異は、酵素の調節に関して重要なドメインにおける配列の差異に見出される。

本発明の対象は、従ってホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ活性を有するタンパク質であり、これは、

- a) 配列番号2に示されたアミノ酸配列、
- b) 配列番号4に示されたアミノ酸配列、又は
- c) (a)からの配列の変異体(Variant)を含有することを特徴とする。

有利に、本発明によるパ I 3 K γ はヒトから得られたタンパク質、つまり配列番号1及び配列番号2で示されるタンパク質、配列番号3及び配列番号4で示されるタンパク質又は20
これらの天然由来のヒト変異体である。

本発明の対象は、配列番号1及び2もしくは配列番号3及び4に示されたアミノ酸配列の部分を含む新規のタンパク質でもある。有利に、本発明は、配列番号1及び2に示されたアミノ酸配列又は配列番号3及び4に示されたアミノ酸配列を含有するパ I 3 K (これはこの配列の変異体をも含有していてもよい)に関する。「変異体」の概念は、本発明の範囲内で、1個のアミノ酸又は短いアミノ酸断片の置き換え、削除及び/又は挿入により配列番号1及び2もしくは配列番号3及び4に示されたアミノ酸配列とは異なる配列と解釈される。

この「変異体」の概念には、パ I 3 K γ の天然由来の対立遺伝子の変異並びに組換えDNA技術により得られ、その生物学的及び/又は免疫学的活性に関して、配列番号1及び230
に示されたタンパク質もしくは配列番号3及び4に示されたタンパク質と本質的に一致するタンパク質が該当する。

本発明によるタンパク質は、有利に、アミノ酸水準

(Aminosäureebene)

に関して、配列番号1及び2に示されたアミノ酸配列又は配列番号3及び4に示されたアミノ酸配列に対して少なくとも80%、特に有利に90%、最も有利に95%の相同を示すことにより優れている。

配列番号1及び2に示されたアミノ酸配列は、全パ I 3 K γ である。このタンパク質は1049個のアミノ酸から構成され、約120kDaの分子量を有する。配列番号3及び4に示されたアミノ酸配列は1050個のアミノ酸を有するパ I 3 K γ である。40

パ I 3 K γ のアミノ酸配列は、他の公知のパ I 3 K の配列に対して19~39%の相同、例えばヒトパ I 3 K α (36%の相同)、ヒトパ I 3 K β (33.5%の相同) 及び酵母からのパ I 3 K-Vps34 (27.7%)を示す。このグループの酵素における最も高い保存領域は、400C末端のアミノ酸残基であり、この残基は恐らくキナーゼドメインを含んでいる。このアミノ-末端領域において、パ I 3 K γ と他の酵素との間の明らかな相同はなく、このことから、この領域が調節サブユニット及び適応サブユニットのp85 α 及びp85 β に関するパ I 3 K α と β -酵素サブユニットとの結合に対して関与していることがわかる (Dhand et al., EMBO J. 13 (1994), 511 - 521)。

パ I 3 K γ は細胞中で、アンチペプチド-抗血清の使用下で、110kDaのタンパク質としてU937及びK562細胞の免疫沈降及びウエスタンブロット分析により検出され50

る。ノーザンブロット分析は、異なる組織種における 5.3 kb の長い mRNA を示した。

本発明のもう一つの対象は、本発明によるホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ又はその一部をコードする核酸である。この核酸は、例えばゲノム DNA、cDNA 又は RNA であることができる。組換え DNA 分子が有利である。

本発明のもう一つの対象は、

- a) 配列番号 1 で示されるコードする配列、
- b) 配列番号 3 で示されるタンパク質をコードする配列
- c) 遺伝コードの縮重 (Degeneration) の範囲内で (a) 又は (b) からなる配列に一致する核酸配列又は
- d) 緊縮ハイブリダイゼーション条件下で (a)、(b) 及び/又は (c) からなる配列とハイブリッドする配列を含有する核酸である。

緊縮ハイブリダイゼーション条件とは本発明の範囲内で、洗浄後に 55℃ で、有利に 62℃ で、特に有利に 68℃ で水性の低塩-緩衝剤 (例えば 0.2×SSC、0.1% SDS) 中でなおハイブリダイゼーションが生じることと解釈される (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual 参照)。

本発明は、配列番号 1 又は配列番号 3 に示された配列の少なくとも 20 個のヌクレオチドの長さの断片を含有する核酸にも関する。有利に、この断片は P I 3 K γ に対して特異的なヌクレオチド配列を有する。この核酸は、有利に 50 個までのヌクレオチドの長さの治療的に使用されるアンチセンス-核酸の製造のために適している。

本発明のもう一つの対象は、本発明による核酸又はその一部の少なくとも 1 つのコピーを含有するベクターである。このベクターは真核生物又は原核生物中で複製可能であることができる。これは宿主細胞のゲノム中へ組み込み可能なベクター、例えばバクテリオファージ-ラムダであるか、又は染色体外で存在するベクター (例えばプラスミド) であることができる。本発明によるベクターは、ベースベクター中への P I 3 K γ DNA のサブクロニングにより得ることができる。この種のベースベクター、特にタンパク質発現のために必要な要素を有するベクターは、当業者に周知である。

P I 3 K γ をコードする核酸のクローニングの場合、適当な宿主細胞中で発現する発現ベクターを製造することができ、その際、本発明によるタンパク質が生じる。有利な宿主細胞は、微生物、例えば E. coli 又は酵母、より高等な細胞 (例えば哺乳類の細胞又は昆虫の細胞) である。有利な発現ベクターは、例えば原核生物に対してプラスミド、バクテリオファージ、より高等な細胞に対して酵母ベクター又はウイルス性ベクター (例えば SV 40、ワクシニア (Vaccinia)、バキュロウイルス (Baculoviren)) である。P I 3 K γ をコードする核酸の発現に関して、特にサンプブルックほか、(Sambrook et al., (1989), supra) に挙げられた方法が参照される。

P I 3 K γ の発現のために適した系の特別な例は、デーヴィスほか (Davis et al., Biotechnology 11 (1993), 933 - 936) が記載した方法によるバキュロベクター (Baculovectoren) の使用下での Sf 9-昆虫細胞中での GST-融合タンパク質としての発現である。

本発明のもう一つの対象は、本発明による核酸又は本発明によるベクターで形質転換されている細胞である。この細胞は親核生物細胞でも、原核生物細胞でもであることができる。核酸を用いて細胞を形質転換させる方法は、一般的な先行技術であり、従ってここでは詳説しない。

同様に本発明のもう一つの対象は、抗体の製造のための免疫原としての P I 3 K γ タンパク質又はこのタンパク質の断片の使用である。この場合、抗体の製造は通常の方法で、完全 P I 3 K γ タンパク質又はその断片を用いて試験動物を免疫し、引き続き生じたポリクロナール抗血清の獲得により行われる。ケーラー及びミルシュタイン

(Köhler und Milstein)

の方法及びその継続発展方法により、試験動物の抗体産生細胞から、公知の方法で細胞融

10

20

30

40

50

合によりモノクローナル抗体を得ることができる。同様にヒトのモノクローナル抗体を製造することができる。

従って、本発明のもう一つの対象は、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ- γ に対して特異的であり、かつ他のホスファチジルイノシトール-3-キナーゼと交差反応を示さない、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ活性を有するタンパク質に対する抗体である。このような抗体は、例えば免疫原として P I 3 K γ -特異的ペプチド配列（例えば配列番号 1 及び 2 の 7 4 1 ~ 7 5 5 のアミノ酸から示されたアミノ酸配列もしくは配列番号 3 及び 4 の 7 4 2 ~ 7 5 6 のアミノ酸から示されるアミノ酸配列に相当する）の使用により得ることができる。

P I 3 キナーゼ γ 、これをコードする核酸及びこれと結合する抗体の調製は、このタンパク質のエフェクターについての適切な探索の必要性を生じさせる。この物質についての作用点は、配列番号 1 及び 2 もしくは配列番号 3 及び 4 の 1 ~ 7 0 0 の範囲内で示されたアミノ酸配列の酵素の調節ドメインである。タンパク質のこの領域に関して阻害的又は積極的に作用する物質は、P I 3 K γ により制御される細胞機能に選択的に影響を及ぼすことができる。従って、この物質は相当する疾病形成の治療の際に使用することができる。P I 3 K γ の欠如に起因する疾病形成は、P I 3 K γ をコードする核酸、及び、場合による活性化する G-タンパク質をコードする核酸と一緒に、ベクター、例えばウイルス性ベクターを用いて相応する目的組織へ導入する遺伝子治療を行うこともできる。

この結果は、P I 3 K γ -活性の変化と因果関係のある疾病の適切な診断の必要性を生じさせる。この試験は、DNA-水準、つまり遺伝子-水準もしくは転写物-水準を検出するために特異的な核酸プローブを用いるか、又はタンパク質水準の検出のために P I 3 K γ に対する抗体を用いて実施することができる。

従って、本発明は、活性成分として P I 3 K γ -タンパク質、これと結合する抗体又はそれをコードする核酸を、調剤学的に常用の助剤、担持剤、充填剤及び希釈剤と一緒に含有する調剤学的組成物にも関する。

本発明による調剤学的組成物は、細胞増殖、受容体が介在する信号伝達、細胞膜の構造、ヒスタミンの放出、神経細胞の分化、グルコース輸送及び抗脂肪分解に影響を及ぼすために使用することができる。さらに、アルツハイマー疾患の治療との関連で使用することもできる。

本発明は次の実施例、図面及び配列表により詳説される。

図 1 は特異的抗体を介したヒト血液細胞中の P I 3 K γ の検出を示す。

図 2 a は昆虫細胞中の P I 3 K γ の組換え発現を示す。

図 2 b は精製された組換え P I 3 K γ の酵素活性の検出を示す。

図 3 はタンパク質 p 8 5 α 及び p 8 5 β との P I 3 K γ の非相互作用を示す。

配列番号 1 は、P I 3 K γ をコードする遺伝子情報を含む核酸配列。

配列番号 2 は、P I 3 K γ のアミノ酸配列。

配列番号 3 は、もう一つの P I 3 K γ をコードする遺伝子情報を有する核酸配列。

配列番号 4 は、もう一つの P I 3 K γ のアミノ酸配列。

例 1

P I 3 K γ cDNA の単離

新規の P I 3 K をコードする cDNA 配列の単離のために、ヒト骨髓-cDNA-バンクを、複製連鎖反応 (PCR) の使用下で詳しく調査した。この場合、アミノ酸配列 K N G D D L R 及び H I D F G に相応する縮重したオリゴヌクレオチドプライマーが使用された。4 0 2 b p の長さの DNA 断片が得られた。この断片をサブクローニングし、配列決定した。

プローブとしてこの PCR 断片を使用しながら、多数のオーバーラップするクローンをヒト U 9 3 7 cDNA-バンクから単離した。最大のクローンは、1 0 4 9 個のアミノ酸を有するタンパク質をコードする (配列番号 2) 明らかなリーディングフレームを有する配列番号 1 に示された核酸配列を含む。P I 3 K γ として表されるこのタンパク質は約 1 2 0 k D a の分子量を有する。

10

20

30

40

50

cDNA-バンクから得られたもう一つのPI3K γ -配列は、配列番号3に示されており、1050個のアミノ酸を有するタンパク質（配列番号4）をコードする。

例2

プロテイン水準及び転写物水準PI3K γ の検出

PI3K γ に対するウサギのポリクロナール抗血清を、15個のアミノ酸の長さの配列NSQLPESFRVPYDPGのペプチド（配列番号2中の741～755のアミノ酸もしくは配列番号4中の742～756のアミノ酸に相当）を用いて免疫することにより製造した。この血清はタンパク質Aクロマトグラフィー及びアフィニティクロマトグラフィーによりアクチゲル（ステロゲン（Sterogene））と連結するペプチド抗原の使用下で精製した。

10

PI3K γ はU937及びK562細胞の免疫沈降及びウエスタンブロット分析により、この抗血清の使用下で検出することができた（図1）。免疫沈降及びウエスタンブロットはHiles et al. (Cell 70 (1992) 419 - 429) の方法により実施した。第2の抗体としてセイヨウワサビーペルオキシダーゼ（Meerrettich-Peroxidase）及び抗ウサギー抗血清（sigma, 1:2000希釈）からなる抱合体を使用した。結合したペルオキシダーゼは化学ルミネセンスにより可視化される。

ヒトの脾臓、腎臓、骨格筋、肝臓、肺、胎盤、脳及び心臓からなる組織のノーザンブロット分析は、それぞれ5.3kbの長さのmRNAの異なる濃度を示した。

例3

PI3K γ の組換え体の発現

20

PI3K γ をコードするDNAをベクターpAcG2T (Davis et al., Biotechnology 11 (1993), 933 - 936) 中でクローニングした。生じた組換え体のベクターpAcG2T-PI3K γ は、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）遺伝子と融合するコドン4からのPI3K γ -cDNAを含有している。Sf9-細胞はpAcG2T-PI3K γ 及び及び線状化されたバキュロウイルス-DNA (BaculoGold, Pharmingen) を同時導入 (cotransfizieren) した。個々の組換え体のバキュロウイルスGST-PI3K γ プラークは精製され、増幅された。組換え体のタンパク質の発現及び精製は、標準的方法 (Dhand et al., EMBO J. 13 (1994), 511 - 521) の使用下で実施した。図2aは組換え体のPI3K γ GST-融合タンパク質の発現又はGST単独の発現は、SDSポリアクリルアミドゲル上での分離により示された。この検出はクーマシーブルーを用いる染色により行

30

図2bは、精製された組換え体のPI3K γ の酵素活性の検出を示す。基質として、ホスファチジルイノシトール (PI, Spur1)、ホスファチジルイノシトール-4-ホスフェート (PI4-P, Spur2) 及びホスファチジルイノシトール-4, 5-ジホスフェート (PI4, 5-P2, Spur3) を使用した。この試験の実施は、主にStephens et al., (Cell 77 (1994), 83 - 93) の方法によるがコール酸塩なしで実施した。ホスファチジルエタノールアミン320 μ M、ホスファチジルコリン140 μ M、ホスファチジルセリン300 μ M、スフィンゴミエリン30 μ M及び基質320 μ Mを有する音波処理された脂質小胞30 μ lを、酵素10 μ l (0.1ng) に添加し、8分間氷上でインキュベートした。この試験は、20 μ MのATP10 μ lに10 μ Ci γ (32 P) ATP

40

を添加することにより開始し、室温で15分間インキュベートした。抽出された脂質を分離し、可視化した。3-ホスホリル化されたホスホイノシチドの同定は、脂質の脱アシルの後のアニオン交換-HPLCにより確認された (Auger et al., Cell 57 (1989), 167 - 175)。

例4

PI3K γ の調節

p85の調節サブユニット及び適応サブユニット (p85 α もしくはp85 β) と、PI3K γ との間の相互作用を検出するために、ヒトPI3K γ 及びウシPI3K α (Hiles

50

et al., supra) を例 3 に記載された方法により G S T 融合タンパク質として単独で又は p 8 5 α 又は p 8 5 β と一緒に S f 9 - 昆虫細胞中で発現させた。細胞の溶解及び遠心分離の後に、グルタチオン-セファロースを上澄みに添加し、G S T 融合タンパク質を結合させた。この粒子を洗浄し、S D S - P A G E 及びウエスタンブロットにより分析した。P I 3 K γ の検出は例 2 に記載したポリクロナールの抗ペプチド-抗体の使用下で行った。p 8 5 α、p 8 5 β 及びウシ P I 3 K α の検出のために、第 1 の抗体として特異的モノクロナールの抗体 (Dhand et al., supra)、及び第 2 の抗体としてセイヨウワサビーペルオキシダーゼ及び抗-マウス-抗体 (Dianova, 1:4000 希釈) の相応する混合物を使用した。

図 3 から、P I 3 K γ が P I 3 K α とは反対に、p 8 5 α 又は p 8 5 β サブユニットとは結合しないことが示される。従って、P I 3 K γ は P I 3 K γ の調節機構において異なっている。

P I 3 K γ と G-タンパク質との間の相互作用を証明するために、精製したヒト組換え P I 3 K γ 及びウシ P I 3 K α をトランスデュースン種 G_t β γ と一緒にインキュベートした。この場合、P I 3 K γ のキナーゼ活性の明らかな増強が見られた。この刺激は、G D P 結合 G_t α の添加により低減することができ、それによりこの相互作用の特異性が確認された。

それに対して、P I 3 K α の酵素活性は、G_t β γ の添加により刺激されなかった。酵素の同様の活性化は 20 μM の A l C l₃ 及び 10 mM の N a F の存在で G α の添加により確認された。活性化種として複合体 G α - G D P - A I F₄- が作用する。

活性測定は、例 3 に記載されたと同様に行った。キャンパス他 (Camps et al. (Nature 360 (1992) 684 - 686) の方法によるウシ網膜から精製された G_t-タンパク質は、酵素を添加する前に、脂質小胞と共に 5 分間 (G_t β γ) 又は 20 分間 (G_t β γ 及び G_t α - G D P) 氷上でインキュベートした。

組換え体の P I 3 K γ との結合試験は、調節タンパク質 R a s がその活性の G T P 結合形で酵素と会合することを示した。R a s は構成性の (konstitutiv) 活性バージョンの形で、細胞を発ガン性に形質転換させることができる。従って、細胞増殖の調節の際の P I 3 K γ の潜在的な重要性に対してさらに示唆される。

配列表

(1) 一般情報

(i) 出願人:

(A) 名称: マックス-プランク-ゲゼルシャフト ツール フェルデルング デル ヴィッセンシャフテン

(B) 住所: ホフガルテンシュトラッセ 2

(C) 都市: ミュンヘン

(E) 国: D E

(F) 郵便番号: 8 0 5 3 9

(i i) 発明の名称: 新規の形のホスファチジルイノシトール-3-キナーゼのクローニング、発現及び特性決定

(i i i) 配列の数: 4

(i v) コンピュータ読込可能形態:

(A) ディスクタイプ: フロッピーディスク

(B) コンピュータ: I B M P C 互換

(C) オペレーションシステム: P C - D O S / M S - D O S

(D) ソフトウェア: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) 配列番号: 1 の情報

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 4 1 3 4 塩基対

(B) 種類: 核酸

(C) 鎖の型: 二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(i i) 分子の種類：cDNA

(i v) 起源：

(A) 生物名：ホモサピエンス (Homo sapiens)

(i x) 特徴：

(A) 名称／記号：CDS

(B) 位置：423...3569

(x i) 配列の表示：配列番号：1

GAATTCGGCA CGAGCACTTC CTTCTCGGCT AGATTATCTG AAACGTGTGT CGGTTCTTGA	60	
GATGATACTA CCACCGAATG TCTGTGTTTC ATTGTCTAGT CCAACCTGTA TTGTGGATAT	120	10
CTACAACGTT CCGGCAATAG TTTTGCAGGT GCATCACATT TTTGTTTTTG TTTTGGGAGG	180	
AAAAGGGAGG GCACGGCAGC CAGGCTTCAT ATTCCTACAA GTGCATGCTT CAAGATTACT	240	
GTACTTACAG TGTTTCCAAC ATCTTCTCAT AAAAGGGGAA AGCTTCATAG CCTCAACCAT	300	
GAAGGAAACC AGTCGCATAG GGCATGGAGC TGGAGAACTA TAAACAGCCC GTGGTGCTGA	360	
GAGAGGACAA CTGCCGAAGG CGCCGGAGGA TGAAGCCGCG CAGTGCTGCC AGCCTGTCTCT	420	
CC ATG GAG CTC ATC CCC ATC GAG TTC GTG CTG CCC ACC AGC CAG CGC	467	
Met Glu Leu Ile Pro Ile Glu Phe Val Leu Pro Thr Ser Gln Arg		
1 5 10 15		
AAA TGC AAG AGC CCC GAA ACG GCG CTG CTG CAC GTG GCC GGC CAC GGC	515	20
Lys Cys Lys Ser Pro Glu Thr Ala Leu Leu His Val Ala Gly His Gly		
20 25 30		
AAC GTG GAG CAG ATG AAG GCC CAG GTG TGG CTG CGA GCG CTG GAG ACC	563	
Asn Val Glu Gln Met Lys Ala Gln Val Trp Leu Arg Ala Leu Glu Thr		
35 40 45		

AGC TGG CGC GGA CTT CTA CCA CCG GCT GGG ACC GCA TCA CTT CCT CCT	611	
Ser Trp Arg Gly Leu Leu Pro Pro Ala Gly Thr Ala Ser Leu Pro Pro		
50 55 60		
GCT CTA TCA GAA GAA GGG CAG TGG TAC GAG ATC TAC GAC AAG TAC CAG	659	
Ala Leu Ser Glu Glu Gly Gln Trp Tyr Glu Ile Tyr Asp Lys Tyr Gln		
65 70 75		
GTG GTG CAG ACT CTG GAC TGC CTG CGC TAC TGG AAG GCC ACG CAC CGG	707	
Val Val Gln Thr Leu Asp Cys Leu Arg Tyr Trp Lys Ala Thr His Arg		
80 85 90 95		
AGC CCG GGC CAG ATC CAC CTG GTG CAG CGG CAC CCG CCC TCC GAG GAG	755	
Ser Pro Gly Gln Ile His Leu Val Gln Arg His Pro Pro Ser Glu Glu		
100 105 110		
TCC CAA GCC TTC CAG CGG CAG CTC ACG GCG CTG ATT GGC TAT GAC GTC	803	
Ser Gln Ala Phe Gln Arg Gln Leu Thr Ala Leu Ile Gly Tyr Asp Val		
115 120 125		
ACT GAC GTC AGC AAC GTG CAC GAC GAT GAG CTG GAG TTC ACG CGC CGT	851	
Thr Asp Val Ser Asn Val His Asp Asp Glu Leu Glu Phe Thr Arg Arg		
130 135 140		
GGC TTG GTG ACC CCG CGC ATG GCG GAG GTG GCC AGC CGC GAC CCC AAG	899	
Gly Leu Val Thr Pro Arg Met Ala Glu Val Ala Ser Arg Asp Pro Lys		
145 150 155		
CTC TAC GCC ATG CAC CCG TGG GTG ACG TCC AAG CCC CTC CCG GAG TAC	947	
Leu Tyr Ala Met His Pro Trp Val Thr Ser Lys Pro Leu Pro Glu Tyr		
160 165 170 175		
CTG TGG AAG AAG ATT GCC AAC AAC TGC ATC TTC ATC GTC ATT CAC CGC	995	
Leu Trp Lys Lys Ile Ala Asn Asn Cys Ile Phe Ile Val Ile His Arg		
180 185 190		
AGC ACC ACC AGC CAG ACC ATT AAG GTC TCA CCC GAC GAC ACC CCC GGC	1043	
Ser Thr Thr Ser Gln Thr Ile Lys Val Ser Pro Asp Asp Thr Pro Gly		
195 200 205		
GCC ATC CTG CAG AGC TTC TTC ACC AAG ATG GCC AAG AAG AAA TCT CTG	1091	
Ala Ile Leu Gln Ser Phe Phe Thr Lys Met Ala Lys Lys Lys Ser Leu		
210 215 220		
ATG GAT ATT CCC GAA AGC CAA AGC GAA CAG GAT TTT GTG CTG CGC GTC	1139	
Met Asp Ile Pro Glu Ser Gln Ser Glu Gln Asp Phe Val Leu Arg Val		
225 230 235		
TGT GGC CGG GAT GAG TAC CTG GTG GGC GAA ACG CCC ATC AAA AAC TTC	1187	
Cys Gly Arg Asp Glu Tyr Leu Val Gly Glu Thr Pro Ile Lys Asn Phe		
240 245 250 255		
CAG TGG GTG AGG CAC TGC CTC AAG AAC GGA GAA GAG ATT CAC GTG GTA	1235	
Gln Trp Val Arg His Cys Leu Lys Asn Gly Glu Glu Ile His Val Val		
260 265 270		
CTG GAC ACG CCT CCA GAC CCG GCC CTA GAC GAG GTG AGG AAG GAA GAG	1283	
Leu Asp Thr Pro Pro Asp Pro Ala Leu Asp Glu Val Arg Lys Glu Glu		
275 280 285		
TGG CCG CTG GTG GAC GAC TGC ACG GGA GTC ACC GGC TAC CAT GAG CAG	1331	
Trp Pro Leu Val Asp Asp Cys Thr Gly Val Thr Gly Tyr His Glu Gln		
290 295 300		
CTT ACC ATC CAC GGC AAG GAC CAC GAG AGT GTG TTC ACC GTG TCC CTG	1379	
Leu Thr Ile His Gly Lys Asp His Glu Ser Val Phe Thr Val Ser Leu		
305 310 315		

10

20

30

40

TGG Trp 320	GAC Asp	TGC Cys	GAC Asp	CGC Arg	AAG Lys 325	TTC Phe	AGG Arg	GTC Val	AAG Lys 330	ATC Ile	AGA Arg	GGC Gly	ATT Ile	GAT Asp	ATC Ile 335	1427
CCC Pro	GTC Val	CTG Leu	CCT Pro	CGG Arg 340	AAC Asn	ACC Thr	GAC Asp	CTC Leu	ACA Thr 345	GTT Val	TTT Phe	GTA Val	GAG Glu	GCA Ala 350	AAC Asn	1475
ATC Ile	CAG Gln	CAT His	GGG Gly 355	CAA Gln	CAA Gln	GTC Val	CTT Leu	TGC Cys 360	CAA Gln	AGG Arg	AGA Arg	ACC Thr	AGC Ser 365	CCC Pro	AAA Lys	1523
CCC Pro	TTC Phe	ACA Thr 370	GAG Glu	GAG Glu	GTG Val	CTG Leu	TGG Trp 375	AAT Asn	GTG Val	TGG Trp	CTT Leu	GAG Glu 380	TTC Phe	AGT Ser	ATC Ile	1571
AAA Lys 385	ATC Ile	AAA Lys	GAC Asp	TTG Leu	CCC Pro	AAA Lys 390	GGG Gly	GCT Ala	CTA Leu	CTG Leu	AAC Asn 395	CTC Leu	CAG Gln	ATC Ile	TAC Tyr	1619
TGC Cys 400	GGT Gly	AAA Lys	GCT Ala	CCA Pro	GCA Ala 405	CTG Leu	TCC Ser	AGC Ser	AAG Lys	GCC Ala 410	TCT Ser	GCA Ala	GAG Glu	TCC Ser 415	CCC Pro	1667
AGT Ser	TCT Ser	GAG Glu	TCC Ser	AAG Lys 420	GGC Gly	AAA Lys	GTT Val	CGG Arg	CTT Leu 425	CTC Leu	TAT Tyr	TAT Tyr	GTG Val	AAC Asn 430	CTG Leu	1715
CTG Leu	CTG Leu	ATA Ile	GAC Asp 435	CAC His	CGT Arg	TTC Phe	CTC Leu	CTG Leu	CGC Arg	CGT Arg	GGA Gly	GAA Glu	TAC Tyr 445	GTC Val	CTC Leu	1763
CAC His	ATG Met	TGG Trp 450	CAG Gln	ATA Ile	TCT Ser	GGG Gly	AAG Lys 455	GGA Gly	GAA Glu	GAC Asp	CAA Gln	GGA Gly 460	AGC Ser	TTC Phe	AAT Asn	1811
GCT Ala 465	GAC Asp	AAA Lys	CTC Leu	ACG Thr	TCT Ser	GCA Ala 470	ACT Thr	AAC Asn	CCA Pro	GAC Asp	AAG Lys 475	GAG Glu	AAC Asn	TCA Ser	ATG Met	1859
TCC Ser 480	ATC Ile	TCC Ser	ATT Ile	CTT Leu	CTG Leu 485	GAC Asp	AAT Asn	TAC Tyr	TGC Cys	CAC His 490	CCG Pro	ATA Ile	GCC Ala	CTG Leu 495	CCT Pro	1907
AAG Lys	CAT His	CAG Gln	CCC Pro	ACC Thr 500	CCT Pro	GAC Asp	CCG Pro	GAA Glu	GGG Gly 505	GAC Asp	CGG Arg	GTT Val	CGA Arg	GCA Ala 510	GAA Glu	1955
ATG Met	CCC Pro	AAC Asn	CAG Gln 515	CTT Leu	CGC Arg	AAG Lys	CAA Gln	TTG Leu	GAG Glu	GCG Ala	ATC Ile	ATA Ile	GCC Ala 525	ACT Thr	GAT Asp	2003
CCA Pro	CTT Leu 530	AAC Asn	CCT Pro	CTC Leu	ACA Thr	GCA Ala 535	GAG Glu	GAC Asp	AAA Lys	GAA Glu	TTG Leu	CTC Leu 540	TGG Trp	CAT His	TTT Phe	2051
AGA Arg 545	TAC Tyr	GAA Glu	AGC Ser	CTT Leu	AAG Lys	CAC His 550	CCA Pro	AAA Lys	GCA Ala	TAT Tyr	CCT Pro	AAG Lys 555	CTA Leu	TTT Phe	AGT Ser	2099
TCA Ser 560	GTG Val	AAA Lys	TGG Trp	GGA Gly	CAG Gln 565	CAA Gln	GAA Glu	ATT Ile	GTG Val	GCC Ala 570	AAA Lys	ACA Thr	TAC Tyr	CAA Gln	TTG Leu 575	2147
TTG Leu	GCC Ala	AGA Arg	AGG Arg	GAA Glu	GTC Val	TGG Trp	GAT Asp	CAA Gln	AGT Ser	GCT Ala	TTG Leu	GAT Asp	GTT Val	GGG Gly	TTA Leu 590	2195

10

20

30

40

ACA	ATG	CAG	CTC	CTG	GAC	TGC	AAC	TTC	TCA	GAT	GAA	AAT	GTA	AGA	GCC	2243
Thr	Met	Gln	Leu	Leu	Asp	Cys	Asn	Phe	Ser	Asp	Glu	Asn	Val	Arg	Ala	
		595						600					605			
ATT	GCA	GTT	CAG	AAA	CTG	GAG	AGC	TTG	GAG	GAC	GAT	GAT	GTT	CTG	CAT	2291
Ile	Ala	Val	Gln	Lys	Leu	Glu	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Val	Leu	His	
		610					615					620				
TAC	CTT	CTA	CAA	TTG	GTC	CAG	GCT	GTG	AAA	TTT	GAA	CCA	TAC	CAT	GAT	2339
Tyr	Leu	Leu	Gln	Leu	Val	Gln	Ala	Val	Lys	Phe	Glu	Pro	Tyr	His	Asp	
	625					630					635					
AGC	GCC	CTT	GCC	AGA	TTT	CTG	CTG	AAG	CGT	GGT	TTA	AGA	AAC	AAA	AGA	2387
Ser	Ala	Leu	Ala	Arg	Phe	Leu	Leu	Lys	Arg	Gly	Leu	Arg	Asn	Lys	Arg	
	640				645					650					655	
ATT	GGT	CAC	TTT	TTG	TTT	TGG	TTC	TTG	AGA	AGT	GAG	ATA	GCC	CAG	TCC	2435
Ile	Gly	His	Phe	Leu	Phe	Trp	Phe	Leu	Arg	Ser	Glu	Ile	Ala	Gln	Ser	
				660					665					670		
AGA	CAC	TAT	CAG	CAG	AGG	TTC	GCT	GTG	ATT	CTG	GAA	GCC	TAT	CTG	AGG	2483
Arg	His	Tyr	Gln	Gln	Arg	Phe	Ala	Val	Ile	Leu	Glu	Ala	Tyr	Leu	Arg	
			675					680					685			
GGC	TGT	GGC	ACA	GCC	ATG	CTG	CAC	GAC	TTT	ACC	CAA	CAA	GTC	CAA	GTA	2531
Gly	Cys	Gly	Thr	Ala	Met	Leu	His	Asp	Phe	Thr	Gln	Gln	Val	Gln	Val	
		690					695					700				
ATC	GAG	ATG	TTA	CAA	AAA	GTC	ACC	CTT	GAT	ATT	AAA	TCG	CTC	TCT	GCT	2579
Ile	Glu	Met	Leu	Gln	Lys	Val	Thr	Leu	Asp	Ile	Lys	Ser	Leu	Ser	Ala	
	705					710					715					
GAA	AAG	TAT	GAC	GTC	AGT	TCC	CAA	GTT	ATT	TCA	CAA	CTT	AAA	CAA	AAG	2627
Glu	Lys	Tyr	Asp	Val	Ser	Ser	Gln	Val	Ile	Ser	Gln	Leu	Lys	Gln	Lys	
	720				725					730					735	
CTT	GAA	AAC	CTG	CAG	AAT	TCT	CAA	CTC	CCC	GAA	AGC	TTT	AGA	GTT	CCA	2675
Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Asn	Ser	Gln	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Arg	Val	Pro	
			740						745					750		
TAT	GAT	CCT	GGA	CTG	AAA	GCA	GGA	GCG	CTG	GCA	ATT	GAA	AAA	TGT	AAA	2723
Tyr	Asp	Pro	Gly	Leu	Lys	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Ile	Glu	Lys	Cys	Lys	
			755				760						765			
GTA	ATG	GCC	TCC	AAG	AAA	AAA	CCA	CTA	TGG	CTT	GAG	TTT	AAA	TGT	GCC	2771
Val	Met	Ala	Ser	Lys	Lys	Lys	Pro	Leu	Trp	Leu	Glu	Phe	Lys	Cys	Ala	
		770					775					780				
GAT	CCT	ACA	GCC	CTA	TCA	AAT	GAA	ACA	ATT	GGA	ATT	ATC	TTT	AAA	CAT	2819
Asp	Pro	Thr	Ala	Leu	Ser	Asn	Glu	Thr	Ile	Gly	Ile	Ile	Phe	Lys	His	
		785				790					795					
GGT	GAT	GAT	CTG	CGC	CAA	GAC	ATG	CTT	ATT	TTA	CAG	ATT	CTA	CGA	ATC	2867
Gly	Asp	Asp	Leu	Arg	Gln	Asp	Met	Leu	Ile	Leu	Gln	Ile	Leu	Arg	Ile	
	800				805					810					815	
ATG	GAG	TCT	ATT	TGG	GAG	ACT	GAA	TCT	TTG	GAT	CTA	TGC	CTC	CTG	CCA	2915
Met	Glu	Ser	Ile	Trp	Glu	Thr	Glu	Ser	Leu	Asp	Leu	Cys	Leu	Leu	Pro	
				820					825					830		
TAT	GGT	TGC	ATT	TCA	ACT	GGT	GAC	AAA	ATA	GGA	ATG	ATC	GAG	ATT	GTG	2963
Tyr	Gly	Cys	Ile	Ser	Thr	Gly	Asp	Lys	Ile	Gly	Met	Ile	Glu	Ile	Val	
			835					840					845			
AAA	GAC	GCC	ACG	ACA	ATT	GCC	AAA	ATT	CAG	CAA	AGC	ACA	GTG	GGC	AAC	3011
Lys	Asp	Ala	Thr	Thr	Ile	Ala	Lys	Ile	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Gly	Asn	
		850					855					860				

10

20

30

40

ACG GGA GCA TTT AAA GAT GAA GTC CTG AAT CAC TGG CTC AAA GAA AAA Thr Gly Ala Phe Lys Asp Glu Val Leu Asn His Trp Leu Lys Glu Lys 865 870 875	3059	
TCC CCT ACT GAA GAA AAG TTT CAG GCA GCA GTG GAG AGA TTT GTT TAT Ser Pro Thr Glu Glu Lys Phe Gln Ala Ala Val Glu Arg Phe Val Tyr 880 885 890 895	3107	
TCC TGT GCA GGC TAC TGT GTG GCA ACC TTT GTT CTT GGA ATA GGC GAC Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala Thr Phe Val Leu Gly Ile Gly Asp 900 905 910	3155	
AGA CAC AAT GAC AAT ATT ATG ATC ACC GAG ACA GGA AAC CTA TTT CAT Arg His Asn Asp Asn Ile Met Ile Thr Glu Thr Gly Asn Leu Phe His 915 920 925	3203	10
ATT GAC TTC GGG CAC ATT CTT GGG AAT TAC AAA AGT TTC CTG GGC ATT Ile Asp Phe Gly His Ile Leu Gly Asn Tyr Lys Ser Phe Leu Gly Ile 930 935 940	3251	
AAT AAA GAG AGA GTG CCA TTT GTG CTA ACC CCT GAC TTC CTC TTT GTG Asn Lys Glu Arg Val Pro Phe Val Leu Thr Pro Asp Phe Leu Phe Val 945 950 955	3299	
ATG GGA ACT TCT GGA AAG AAG ACA AGC CCA CAC TTC CAG AAA TTT CAG Met Gly Thr Ser Gly Lys Lys Thr Ser Pro His Phe Gln Lys Phe Gln 960 965 970 975	3347	
GAC ATC TGT GTT AAG GCT TAT CTA GCC CTT CGT CAT CAC ACA AAC CTA Asp Ile Cys Val Lys Ala Tyr Leu Ala Leu Arg His His Thr Asn Leu 980 985 990	3395	20
CTG ATC ATC CTG TTC TCC ATG ATG CTG ATG ACA GGA ATG CCC CAG TTA Leu Ile Ile Leu Phe Ser Met Met Leu Met Thr Gly Met Pro Gln Leu 995 1000 1005	3443	
ACA AGC AAA GAA GAC ATT GAA TAT ATC CGG GAT GCC CTC ACA GTG GGG Thr Ser Lys Glu Asp Ile Glu Tyr Ile Arg Asp Ala Leu Thr Val Gly 1010 1015 1020	3491	
AAA AAT GAG GAG GAT GCT AAA AAG TAT TTT CTT GAT CAG ATC GAA GTT Lys Asn Glu Glu Asp Ala Lys Lys Tyr Phe Leu Asp Gln Ile Glu Val 1025 1030 1035	3539	
TGG CAG AGA CAA AGG ATG GAC TGT GCA GTT TAATTGGTTT CTACATCTTG Trp Gln Arg Gln Arg Met Asp Cys Ala Val 1040 1045	3589	30
TTCTTGGCAT CAAACAAGGA GAGAAACATT CAGCCTAATA CTTTAGGCTA GAATCAAAAA	3649	
CAAGTTAGTG TTCTATGGTT TAAATTAGCA TAGCAATCAT CGAACTTGGA TTTCAAATGC	3709	
AATAGACATT GTGAAAGCTG GCATTTTCAGA AGTATAGCTC TTTTCCTACC TGAACCTCTC	3769	
CCTGGAGAAA AGATGTTGGC ATTGCTGATT GTTTGGTTAA GCAATGTCCA GTGCTAGGAT	3829	
TATTTGCAGG TTTGGTTTTT TCTCATTTGT CTGTGGCATT GGAGAATATT CTCGGTTTAA	3889	
ACAGACTAAT GACTTCCTTA TTGTCCCTGA TATTTTGACT ATCTTACTAT TGAGTGCTTC	3949	
TGGAAATTCT TTGGAATAAT TGATGACATC TATTTTCATC TGGGTTTAGT CTCAATTTTG	4009	40
GTTATCTTTG TGTTCCTCAA GCTCTTTAAA GAAAAAGATG TAATCGTTGT AACCTTTGTC	4069	
TCATTCCTTA AATGATGCTT CCAAACATCT CCTTAGTGTC TGCAGGTGTT AGTGGTGTGC	4129	
TAAAA	4134	

(2) 配列番号: 2 の情報

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 1049 塩基対

(B) 種類: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(i i) 分子の種類：タンパク質

(x i) 配列の表示：配列番号：2

Met Glu Leu Ile Pro Ile Glu Phe Val Leu Pro Thr Ser Gln Arg Lys
 1 5 10 15
 Cys Lys Ser Pro Glu Thr Ala Leu Leu His Val Ala Gly His Gly Asn
 20 25 30
 Val Glu Gln Met Lys Ala Gln Val Trp Leu Arg Ala Leu Glu Thr Ser
 35 40 45
 Trp Arg Gly Leu Leu Pro Pro Ala Gly Thr Ala Ser Leu Pro Pro Ala
 50 55 60
 Leu Ser Glu Glu Gly Gln Trp Tyr Glu Ile Tyr Asp Lys Tyr Gln Val
 65 70 75 80
 Val Gln Thr Leu Asp Cys Leu Arg Tyr Trp Lys Ala Thr His Arg Ser
 85 90 95
 Pro Gly Gln Ile His Leu Val Gln Arg His Pro Pro Ser Glu Glu Ser
 100 105 110
 Gln Ala Phe Gln Arg Gln Leu Thr Ala Leu Ile Gly Tyr Asp Val Thr
 115 120 125
 Asp Val Ser Asn Val His Asp Asp Glu Leu Glu Phe Thr Arg Arg Gly
 130 135 140
 Leu Val Thr Pro Arg Met Ala Glu Val Ala Ser Arg Asp Pro Lys Leu
 145 150 155 160
 Tyr Ala Met His Pro Trp Val Thr Ser Lys Pro Leu Pro Glu Tyr Leu
 165 170 175
 Trp Lys Lys Ile Ala Asn Asn Cys Ile Phe Ile Val Ile His Arg Ser
 180 185 190
 Thr Thr Ser Gln Thr Ile Lys Val Ser Pro Asp Asp Thr Pro Gly Ala
 195 200 205
 Ile Leu Gln Ser Phe Phe Thr Lys Met Ala Lys Lys Lys Ser Leu Met
 210 215 220
 Asp Ile Pro Glu Ser Gln Ser Glu Gln Asp Phe Val Leu Arg Val Cys
 225 230 235 240
 Gly Arg Asp Glu Tyr Leu Val Gly Glu Thr Pro Ile Lys Asn Phe Gln
 245 250 255
 Trp Val Arg His Cys Leu Lys Asn Gly Glu Glu Ile His Val Val Leu
 260 265 270
 Asp Thr Pro Pro Asp Pro Ala Leu Asp Glu Val Arg Lys Glu Glu Trp
 275 280 285
 Pro Leu Val Asp Asp Cys Thr Gly Val Thr Gly Tyr His Glu Gln Leu
 290 295 300

10

20

30

40

Thr Ile His Gly Lys Asp His Glu Ser Val Phe Thr Val Ser Leu Trp
 305 310 315 320
 Asp Cys Asp Arg Lys Phe Arg Val Lys Ile Arg Gly Ile Asp Ile Pro
 325 330 335
 Val Leu Pro Arg Asn Thr Asp Leu Thr Val Phe Val Glu Ala Asn Ile
 340 345 350
 Gln His Gly Gln Gln Val Leu Cys Gln Arg Arg Thr Ser Pro Lys Pro
 355 360 365
 Phe Thr Glu Glu Val Leu Trp Asn Val Trp Leu Glu Phe Ser Ile Lys
 370 375 380
 Ile Lys Asp Leu Pro Lys Gly Ala Leu Leu Asn Leu Gln Ile Tyr Cys
 385 390 395 400
 Gly Lys Ala Pro Ala Leu Ser Ser Lys Ala Ser Ala Glu Ser Pro Ser
 405 410 415
 Ser Glu Ser Lys Gly Lys Val Arg Leu Leu Tyr Tyr Val Asn Leu Leu
 420 425 430
 Leu Ile Asp His Arg Phe Leu Leu Arg Arg Gly Glu Tyr Val Leu His
 435 440 445
 Met Trp Gln Ile Ser Gly Lys Gly Glu Asp Gln Gly Ser Phe Asn Ala
 450 455 460
 Asp Lys Leu Thr Ser Ala Thr Asn Pro Asp Lys Glu Asn Ser Met Ser
 465 470 475 480
 Ile Ser Ile Leu Leu Asp Asn Tyr Cys His Pro Ile Ala Leu Pro Lys
 485 490 495
 His Gln Pro Thr Pro Asp Pro Glu Gly Asp Arg Val Arg Ala Glu Met
 500 505 510
 Pro Asn Gln Leu Arg Lys Gln Leu Glu Ala Ile Ile Ala Thr Asp Pro
 515 520 525
 Leu Asn Pro Leu Thr Ala Glu Asp Lys Glu Leu Leu Trp His Phe Arg
 530 535 540
 Tyr Glu Ser Leu Lys His Pro Lys Ala Tyr Pro Lys Leu Phe Ser Ser
 545 550 555 560
 Val Lys Trp Gly Gln Gln Glu Ile Val Ala Lys Thr Tyr Gln Leu Leu
 565 570 575
 Ala Arg Arg Glu Val Trp Asp Gln Ser Ala Leu Asp Val Gly Leu Thr
 580 585 590
 Met Gln Leu Leu Asp Cys Asn Phe Ser Asp Glu Asn Val Arg Ala Ile
 595 600 605
 Ala Val Gln Lys Leu Glu Ser Leu Glu Asp Asp Asp Val Leu His Tyr
 610 615 620
 Leu Leu Gln Leu Val Gln Ala Val Lys Phe Glu Pro Tyr His Asp Ser
 625 630 635 640
 Ala Leu Ala Arg Phe Leu Leu Lys Arg Gly Leu Arg Asn Lys Arg Ile
 645 650 655
 Gly His Phe Leu Phe Trp Phe Leu Arg Ser Glu Ile Ala Gln Ser Arg
 660 665 670

10

20

30

40

His Tyr Gln Gln Arg Phe Ala Val Ile Leu Glu Ala Tyr Leu Arg Gly
 675 680 685
 Cys Gly Thr Ala Met Leu His Asp Phe Thr Gln Gln Val Gln Val Ile
 690 695 700
 Glu Met Leu Gln Lys Val Thr Leu Asp Ile Lys Ser Leu Ser Ala Glu
 705 710 715 720
 Lys Tyr Asp Val Ser Ser Gln Val Ile Ser Gln Leu Lys Gln Lys Leu
 725 730 735
 Glu Asn Leu Gln Asn Ser Gln Leu Pro Glu Ser Phe Arg Val Pro Tyr
 740 745 750
 Asp Pro Gly Leu Lys Ala Gly Ala Leu Ala Ile Glu Lys Cys Lys Val
 755 760 765
 Met Ala Ser Lys Lys Lys Pro Leu Trp Leu Glu Phe Lys Cys Ala Asp
 770 775 780
 Pro Thr Ala Leu Ser Asn Glu Thr Ile Gly Ile Ile Phe Lys His Gly
 785 790 795 800
 Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met Leu Ile Leu Gln Ile Leu Arg Ile Met
 805 810 815
 Glu Ser Ile Trp Glu Thr Glu Ser Leu Asp Leu Cys Leu Leu Pro Tyr
 820 825 830
 Gly Cys Ile Ser Thr Gly Asp Lys Ile Gly Met Ile Glu Ile Val Lys
 835 840 845
 Asp Ala Thr Thr Ile Ala Lys Ile Gln Gln Ser Thr Val Gly Asn Thr
 850 855 860
 Gly Ala Phe Lys Asp Glu Val Leu Asn His Trp Leu Lys Glu Lys Ser
 865 870 875 880
 Pro Thr Glu Glu Lys Phe Gln Ala Ala Val Glu Arg Phe Val Tyr Ser
 885 890 895
 Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala Thr Phe Val Leu Gly Ile Gly Asp Arg
 900 905 910
 His Asn Asp Asn Ile Met Ile Thr Glu Thr Gly Asn Leu Phe His Ile
 915 920 925
 Asp Phe Gly His Ile Leu Gly Asn Tyr Lys Ser Phe Leu Gly Ile Asn
 930 935 940
 Lys Glu Arg Val Pro Phe Val Leu Thr Pro Asp Phe Leu Phe Val Met
 945 950 955 960
 Gly Thr Ser Gly Lys Lys Thr Ser Pro His Phe Gln Lys Phe Gln Asp
 965 970 975
 Ile Cys Val Lys Ala Tyr Leu Ala Leu Arg His His Thr Asn Leu Leu
 980 985 990
 Ile Ile Leu Phe Ser Met Met Leu Met Thr Gly Met Pro Gln Leu Thr
 995 1000 1005
 Ser Lys Glu Asp Ile Glu Tyr Ile Arg Asp Ala Leu Thr Val Gly Lys
 1010 1015 1020
 Asn Glu Glu Asp Ala Lys Lys Tyr Phe Leu Asp Gln Ile Glu Val Trp
 1025 1030 1035 1040
 Gln Arg Gln Arg Met Asp Cys Ala Val
 1045

(2) 配列番号：3 の情報

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：4 1 3 7 塩基対

10

20

30

40

50

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の型：二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(i i) 分子の種類：cDNA

(i v) 起源：

(A) 生物名：ホモサピエンス (Homo sapiens)

(i x) 特徴：

(A) 名称／記号：CDS

(B) 位置：4 2 3 . . 3 5 7 2

(x i) 配列の表示：配列番号：3

GAATTCGGCA CGAGCACTTC CTTCTCGGCT AGATTATCTG AAACGTGTGT CGGTTCTTGA 60
 GATGATACTA CCACCGAATG TCTGTGTTTC ATTGTCTAGT CCAACCTGTA TTGTGGATAT 120
 CTACAACGTT CCGGCAATAG TTTTGCAGGT GCATCACATT TTTGTTTTTG TTTTGGGAGG 180
 AAAAGGGAGG GCACGGCAGC CAGGCTTCAT ATTCCTACAA GTGCATGCTT CAAGATTACT 240
 GTACTTACAG TGTTTCCAAC ATCTTCTCAT AAAAGGGGAA AGCTTCATAG CCTCAACCAT 300
 GAAGGAAACC AGTCGCATAG GGCATGGAGC TGGAGAACTA TAAACAGCCC GTGGTGCTGA 360
 GAGAGGACAA CTGCCGAAGG CGCCGAGGGA TGAAGCCGCG CAGTGCTGCC AGCCTGTCCT 420
 CC ATG GAG CTC ATC CCC ATC GAG TTC GTG CTG CCC ACC AGC CAG CGC 467
 Met Glu Leu Ile Pro Ile Glu Phe Val Leu Pro Thr Ser Gln Arg 15
 1 5 10
 AAA TGC AAG AGC CCC GAA ACG GCG CTG CTG CAC GTG GCC GGC CAC GGC 515
 Lys Cys Lys Ser Pro Glu Thr Ala Leu Leu His Val Ala Gly His Gly 30
 20 25 30
 AAC GTG GAG CAG ATG AAG GCC CAG GTG TGG CTG CGA GCG CTG GAG ACC 563
 Asn Val Glu Gln Met Lys Ala Gln Val Trp Leu Arg Ala Leu Glu Thr 45
 35 40 45
 AGC GTG GCG GCG GAC TTC TAC CAC CGG CTG GGA CCG CAT CAC TTC CTC 611
 Ser Val Ala Ala Asp Phe Tyr His Arg Leu Gly Pro His His Phe Leu 60
 50 55 60
 CTG CTC TAT CAG AAG AAG GGG CAG TGG TAC GAG ATC TAC GAC AAG TAC 659
 Leu Leu Tyr Gln Lys Lys Gly Gln Trp Tyr Glu Ile Tyr Asp Lys Tyr 75
 65 70 75
 CAG GTG GTG CAG ACT CTG GAC TGC CTG CGC TAC TGG AAG GCC ACG CAC 707
 Gln Val Val Gln Thr Leu Asp Cys Leu Arg Tyr Trp Lys Ala Thr His 95
 80 85 90 95
 CGG AGC CCG GGC CAG ATC CAC CTG GTG CAG CGG CAC CCG CCC TCC GAG 755
 Arg Ser Pro Gly Gln Ile His Leu Val Gln Arg His Pro Pro Ser Glu 110
 100 105 110
 GAG TCC CAA GCC TTC CAG CGG CAG CTC ACG GCG CTG ATT GGC TAT GAC 803
 Glu Ser Gln Ala Phe Gln Arg Gln Leu Thr Ala Leu Ile Gly Tyr Asp 125
 115 120 125

10

20

30

40

GTC Val	ACT Thr	GAC Asp 130	GTC Val	AGC Ser	AAC Asn	GTG Val	CAC His 135	GAC Asp	GAT Asp	GAG Glu	CTG Leu	GAG Glu 140	TTC Phe	ACG Thr	CGC Arg	851
CGT Arg	GGC Gly 145	TTG Leu	GTG Val	ACC Thr	CCG Pro	CGC Arg 150	ATG Met	GCG Ala	GAG Glu	GTG Val	GCC Ala 155	AGC Ser	CGC Arg	GAC Asp	CCC Pro	899
AAG Lys 160	CTC Leu	TAC Tyr	GCC Ala	ATG Met	CAC His 165	CCG Pro	TGG Trp	GTG Val	ACG Thr	TCC Ser 170	AAG Lys	CCC Pro	CTC Leu	CCG Pro	GAG Glu 175	947
TAC Tyr	CTG Leu	TGG Trp	AAG Lys 180	AAG Lys	ATT Ile	GCC Ala	AAC Asn	AAC Asn	TGC Cys 185	ATC Ile	TTC Phe	ATC Ile	GTC Val	ATT Ile 190	CAC His	995
CGC Arg	AGC Ser	ACC Thr 195	ACC Thr	AGC Ser	CAG Gln	ACC Thr	ATT Ile	AAG Lys 200	GTC Val	TCA Ser	CCC Pro	GAC Asp	GAC Asp 205	ACC Thr	CCC Pro	1043
GGC Gly	GCC Ala	ATC Ile 210	CTG Leu	CAG Gln	AGC Ser	TTC Phe 215	TTC Phe	ACC Thr	AAG Lys	ATG Met	GCC Ala	AAG Lys 220	AAG Lys	AAA Lys	TCT Ser	1091
CTG Leu	ATG Met 225	GAT Asp	ATT Ile	CCC Pro	GAA Glu 230	AGC Ser	CAA Gln	AGC Ser	GAA Glu	CAG Gln	GAT Asp 235	TTT Phe	GTG Val	CTG Leu	CGC Arg	1139
GTC Val 240	TGT Cys	GGC Gly	CGG Arg	GAT Asp 245	GAG Glu	TAC Tyr	CTG Leu	GTG Val	GGC Gly	GAA Glu 250	ACG Thr	CCC Pro	ATC Ile	AAA Lys	AAC Asn 255	1187
TTC Phe	CAG Gln	TGG Trp	GTG Val 260	AGG Arg	CAC His	TGC Cys	CTC Leu	AAG Lys	AAC Asn 265	GGA Gly	GAA Glu	GAG Glu	ATT Ile 270	CAC His	GTG Val	1235
GTA Val	CTG Leu	GAC Asp 275	ACG Thr	CCT Pro	CCA Pro	GAC Asp	CCG Pro	GCC Ala 280	CTA Leu	GAC Asp	GAG Glu	GTG Val	AGG Arg 285	AAG Lys	GAA Glu	1283
GAG Glu	TGG Trp 290	CCG Pro	CTG Leu	GTG Val	GAC Asp	GAC Asp	TGC Cys 295	ACG Thr	GGA Gly	GTC Val	ACC Thr	GGC Gly 300	TAC Tyr	CAT His	GAG Glu	1331
CAG Gln 305	CTT Leu	ACC Thr	ATC Ile	CAC His	GGC Gly	AAG Lys 310	GAC Asp	CAC His	GAG Glu	AGT Ser	GTG Val 315	TTC Phe	ACC Thr	GTG Val	TCC Ser	1379
CTG Leu 320	TGG Trp	GAC Asp	TGC Cys	GAC Asp	CGC Arg 325	AAG Lys	TTC Phe	AGG Arg	GTC Val	AAG Lys 330	ATC Ile	AGA Arg	GGC Gly	ATT Ile	GAT Asp 335	1427
ATC Ile	CCC Pro	GTC Val	CTG Leu	CCT Pro 340	CGG Arg	AAC Asn	ACC Thr	GAC Asp	CTC Leu 345	ACA Thr	GTT Val	TTT Phe	GTA Val	GAG Glu 350	GCA Ala	1475
AAC Asn	ATC Ile	CAG Gln 355	CAT His	GGG Gly	CAA Gln	CAA Gln	GTC Val 360	CTT Leu	TGC Cys	CAA Gln	AGG Arg	AGA Arg	ACC Thr 365	AGC Ser	CCC Pro	1523
AAA Lys	CCC Pro	TTC Phe 370	ACA Thr	GAG Glu	GAG Glu	GTG Val 375	CTG Leu	TGG Trp	AAT Asn	GTG Val	TGG Trp	CTT Leu 380	GAG Glu	TTC Phe	AGT Ser	1571
ATC Ile 385	AAA Lys	ATC Ile	AAA Lys	GAC Asp	TTG Leu	CCC Pro 390	AAA Lys	GGG Gly	GCT Ala	CTA Leu	CTG Leu 395	AAC Asn	CTC Leu	CAG Gln	ATC Ile	1619
TAC Val	TGC Cys	GGT Trp	AAA Lys	GCT Asp	CCA Pro	GCA Ala	CTG Leu	TCC Asn	AGC Thr	AAG Ser	GCC Pro	TCT Leu	GCA Ala	GAG Glu	TCC Ser	1667

10

20

30

40

Tyr Cys Gly Lys Ala Pro Ala Leu Ser Ser Lys Ala Ser Ala Glu Ser	
400 405 410 415	
CCC AGT TCT GAG TCC AAG GGC AAA GTT CGG CTT CTC TAT TAT GTG AAC	1715
Pro Ser Ser Glu Ser Lys Gly Lys Val Arg Leu Leu Tyr Tyr Val Asn	
420 425 430	
CTG CTG CTG ATA GAC CAC CGT TTC CTC CTG CGC CGT GGA GAA TAC GTC	1763
Leu Leu Leu Ile Asp His Arg Phe Leu Leu Arg Arg Gly Glu Tyr Val	
435 440 445	
CTC CAC ATG TGG CAG ATA TCT GGG AAG GGA GAA GAC CAA GGA AGC TTC	1811
Leu His Met Trp Gln Ile Ser Lys Gly Glu Asp Gln Gly Ser Phe	
450 455 460	
AAT GCT GAC AAA CTC ACG TCT GCA ACT AAC CCA GAC AAG GAG AAC TCA	1859
Asn Ala Asp Lys Leu Thr Ser Ala Thr Asn Pro Asp Lys Glu Asn Ser	
465 470 475	
ATG TCC ATC TCC ATT CTT CTG GAC AAT TAC TGC CAC CCG ATA GCC CTG	1907
Met Ser Ile Ser Ile Leu Leu Asp Asn Tyr Cys His Pro Ile Ala Leu	
480 485 490 495	
CCT AAG CAT CAG CCC ACC CCT GAC CCG GAA GGG GAC CCG GTT CGA GCA	1955
Pro Lys His Gln Pro Thr Pro Asp Pro Glu Gly Asp Arg Val Arg Ala	
500 505 510	
GAA ATG CCC AAC CAG CTT CGC AAG CAA TTG GAG GCG ATC ATA GCC ACT	2003
Glu Met Pro Asn Gln Leu Arg Lys Gln Leu Glu Ala Ile Ile Ala Thr	
515 520 525	
GAT CCA CTT AAC CCT CTC ACA GCA GAG GAC AAA GAA TTG CTC TGG CAT	2051
Asp Pro Leu Asn Pro Leu Thr Ala Glu Asp Lys Glu Leu Leu Trp His	
530 535 540	
TTT AGA TAC GAA AGC CTT AAG CAC CCA AAA GCA TAT CCT AAG CTA TTT	2099
Phe Arg Tyr Glu Ser Leu Lys His Pro Lys Ala Tyr Pro Lys Leu Phe	
545 550 555	
AGT TCA GTG AAA TGG GGA CAG CAA GAA ATT GTG GCC AAA ACA TAC CAA	2147
Ser Ser Val Lys Trp Gly Gln Gln Glu Ile Val Ala Lys Thr Tyr Gln	
560 565 570 575	
TTG TTG GCC AGA AGG GAA GTC TGG GAT CAA AGT GCT TTG GAT GTT GGG	2195
Leu Leu Ala Arg Arg Glu Val Trp Asp Gln Ser Ala Leu Asp Val Gly	
580 585 590	
TTA ACA ATG CAG CTC CTG GAC TGC AAC TTC TCA GAT GAA AAT GTA AGA	2243
Leu Thr Met Gln Leu Leu Asp Cys Asn Phe Ser Asp Glu Asn Val Arg	
595 600 605	
GCC ATT GCA GTT CAG AAA CTG GAG AGC TTG GAG GAC GAT GAT GTT CTG	2291
Ala Ile Ala Val Gln Lys Leu Glu Ser Leu Glu Asp Asp Asp Val Leu	
610 615 620	
CAT TAC CTT CTA CAA TTG GTC CAG GCT GTG AAA TTT GAA CCA TAC CAT	2339
His Tyr Leu Leu Gln Leu Val Gln Ala Val Lys Phe Glu Pro Tyr His	
625 630 635	
GAT AGC GCC CTT GCC AGA TTT CTG CTG AAG CGT GGT TTA AGA AAC AAA	2387
Asp Ser Ala Leu Ala Arg Phe Leu Leu Lys Arg Gly Leu Arg Asn Lys	
640 645 650 655	
AGA ATT GGT CAC TTT TTG TTT TGG TTC TTG AGA AGT GAG ATA GCC CAG	2435
Arg Ile Gly His Phe Leu Phe Trp Phe Leu Arg Ser Glu Ile Ala Gln	
660 665 670	
TCC AGA CAC TAT CAG CAG AGG TTC GCT GTG ATT CTG GAA GCC TAT CTG	2483

10

20

30

40

Ser	Arg	His	Tyr	Gln	Gln	Arg	Phe	Ala	Val	Ile	Leu	Glu	Ala	Tyr	Leu		
			675					680					685				
AGG	GGC	TGT	GGC	ACA	GCC	ATG	CTG	CAC	GAC	TTT	ACC	CAA	CAA	GTC	CAA	2531	
Arg	Gly	Cys	Gly	Thr	Ala	Met	Leu	His	Asp	Phe	Thr	Gln	Gln	Val	Gln		
		690					695					700					
GTA	ATC	GAG	ATG	TTA	CAA	AAA	GTC	ACC	CTT	GAT	ATT	AAA	TCG	CTC	TCT	2579	
Val	Ile	Glu	Met	Leu	Gln	Lys	Val	Thr	Leu	Asp	Ile	Lys	Ser	Leu	Ser		
	705					710					715						
GCT	GAA	AAG	TAT	GAC	GTC	AGT	TCC	CAA	GTT	ATT	TCA	CAA	CTT	AAA	CAA	2627	
Ala	Glu	Lys	Tyr	Asp	Val	Ser	Ser	Gln	Val	Ile	Ser	Gln	Leu	Lys	Gln		
	720				725					730					735		
AAG	CTT	GAA	AAC	CTG	CAG	AAT	TCT	CAA	CTC	CCC	GAA	AGC	TTT	AGA	GTT	2675	
Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Asn	Ser	Gln	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Arg	Val		
			740						745					750			
CCA	TAT	GAT	CCT	GGA	CTG	AAA	GCA	GGA	GCG	CTG	GCA	ATT	GAA	AAA	TGT	2723	
Pro	Tyr	Asp	Pro	Gly	Leu	Lys	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Ile	Glu	Lys	Cys		
			755					760					765				
AAA	GTA	ATG	GCC	TCC	AAG	AAA	AAA	CCA	CTA	TGG	CTT	GAG	TTT	AAA	TGT	2771	
Lys	Val	Met	Ala	Ser	Lys	Lys	Lys	Pro	Leu	Trp	Leu	Glu	Phe	Lys	Cys		
	770					775						780					
GCC	GAT	CCT	ACA	GCC	CTA	TCA	AAT	GAA	ACA	ATT	GGA	ATT	ATC	TTT	AAA	2819	
Ala	Asp	Pro	Thr	Ala	Leu	Ser	Asn	Glu	Thr	Ile	Gly	Ile	Ile	Phe	Lys		
	785					790					795						
CAT	GGT	GAT	GAT	CTG	CGC	CAA	GAC	ATG	CTT	ATT	TTA	CAG	ATT	CTA	CGA	2867	
His	Gly	Asp	Asp	Leu	Arg	Gln	Asp	Met	Leu	Ile	Leu	Gln	Ile	Leu	Arg		
	800				805				810						815		
ATC	ATG	GAG	TCT	ATT	TGG	GAG	ACT	GAA	TCT	TTG	GAT	CTA	TGC	CTC	CTG	2915	
Ile	Met	Glu	Ser	Ile	Trp	Glu	Thr	Glu	Ser	Leu	Asp	Leu	Cys	Leu	Leu		
				820					825					830			
CCA	TAT	GGT	TGC	ATT	TCA	ACT	GGT	GAC	AAA	ATA	GGA	ATG	ATC	GAG	ATT	2963	
Pro	Tyr	Gly	Cys	Ile	Ser	Thr	Gly	Asp	Lys	Ile	Gly	Met	Ile	Glu	Ile		
			835					840					845				
GTG	AAA	GAC	GCC	ACG	ACA	ATT	GCC	AAA	ATT	CAG	CAA	AGC	ACA	GTG	GGC	3011	
Val	Lys	Asp	Ala	Thr	Thr	Ile	Ala	Lys	Ile	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Gly		
	850						855					860					
AAC	ACG	GGA	GCA	TTT	AAA	GAT	GAA	GTC	CTG	AAT	CAC	TGG	CTC	AAA	GAA	3059	
Asn	Thr	Gly	Ala	Phe	Lys	Asp	Glu	Val	Leu	Asn	His	Trp	Leu	Lys	Glu		
	865					870					875						
AAA	TCC	CCT	ACT	GAA	GAA	AAG	TTT	CAG	GCA	GCA	GTG	GAG	AGA	TTT	GTT	3107	
Lys	Ser	Pro	Thr	Glu	Glu	Lys	Phe	Gln	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Phe	Val		
	880				885					890					895		
TAT	TCC	TGT	GCA	GGC	TAC	TGT	GTG	GCA	ACC	TTT	GTT	CTT	GGA	ATA	GGC	3155	
Tyr	Ser	Cys	Ala	Gly	Tyr	Cys	Val	Ala	Thr	Phe	Val	Leu	Gly	Ile	Gly		
				900					905					910			
GAC	AGA	CAC	AAT	GAC	AAT	ATT	ATG	ATC	ACC	GAG	ACA	GGA	AAC	CTA	TTT	3203	
Asp	Arg	His	Asn	Asp	Asn	Ile	Met	Ile	Thr	Glu	Thr	Gly	Asn	Leu	Phe		
			915					920					925				
CAT	ATT	GAC	TTC	GGG	CAC	ATT	CTT	GGG	AAT	TAC	AAA	AGT	TTC	CTG	GGC	3251	
His	Ile	Asp	Phe	Gly	His	Ile	Leu	Gly	Asn	Tyr	Lys	Ser	Phe	Leu	Gly		
	930						935					940					
ATT	AAT	AAA	GAG	AGA	GTG	CCA	TTT	GTG	CTA	ACC	CCT	GAC	TTC	CTC	TTT	3299	

10

20

30

40

Ile	Asn	Lys	Glu	Arg	Val	Pro	Phe	Val	Leu	Thr	Pro	Asp	Phe	Leu	Phe		
945						950					955						
GTG	ATG	GGA	ACT	TCT	GGA	AAG	AAG	ACA	AGC	CCA	CAC	TTC	CAG	AAA	TTT	3347	
Val	Met	Gly	Thr	Ser	Gly	Lys	Lys	Thr	Ser	Pro	His	Phe	Gln	Lys	Phe		
960					965					970					975		
CAG	GAC	ATC	TGT	GTT	AAG	GCT	TAT	CTA	GCC	CTT	CGT	CAT	CAC	ACA	AAC	3395	
Gln	Asp	Ile	Cys	Val	Lys	Ala	Tyr	Leu	Ala	Leu	Arg	His	His	Thr	Asn		
				980					985						990		
CTA	CTG	ATC	ATC	CTG	TTC	TCC	ATG	ATG	CTG	ATG	ACA	GGA	ATG	CCC	CAG	3443	
Leu	Leu	Ile	Ile	Leu	Phe	Ser	Met	Met	Leu	Met	Thr	Gly	Met	Pro	Gln		
				995				1000						1005			
TTA	ACA	AGC	AAA	GAA	GAC	ATT	GAA	TAT	ATC	CGG	GAT	GCC	CTC	ACA	GTG	3491	
Leu	Thr	Ser	Lys	Glu	Asp	Ile	Glu	Tyr	Ile	Arg	Asp	Ala	Leu	Thr	Val		
		1010					1015						1020				
GGG	AAA	AAT	GAG	GAG	GAT	GCT	AAA	AAG	TAT	TTT	CTT	GAT	CAG	ATC	GAA	3539	
Gly	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Ala	Lys	Lys	Tyr	Phe	Leu	Asp	Gln	Ile	Glu		
		1025				1030							1035				
GTT	TGG	CAG	AGA	CAA	AGG	ATG	GAC	TGT	GCA	GTT	TAATTGGTTT	CTACATCTTG				3592	
Val	Trp	Gln	Arg	Gln	Arg	Met	Asp	Cys	Ala	Val							
1040					1045					1050							
TTCTTGGCAT	CAAACAAGGA	GAGAAACATT	CAGCCTAATA	CTTTAGGCTA	GAATCAAAAA											3652	
CAAGTTAGTG	TTCTATGGTT	TAAATTAGCA	TAGCAATCAT	CGAACTTGGG	TTTCAAATGC											3712	
AATAGACATT	GTGAAAGCTG	GCATTTCAGA	AGTATAGCTC	TTTTCTTACC	TGAACTCTTC											3772	
CCTGGAGAAA	AGATGTTGGC	ATTGCTGATT	GTTTGGTTAA	GCAATGTCCA	GTGCTAGGAT											3832	
TATTTGCAGG	TTTGGTTTTT	TCTCATTGT	CTGTGGCATT	GGAGAATATT	CTCGGTTTAA											3892	
ACAGACTAAT	GACTTCCTTA	TTGTCCCTGA	TATTTTGACT	ATCTTACTAT	TGAGTGCTTC											3952	
TGGAAATTCT	TTGGAATAAT	TGATGACATC	TATTTTCATC	TGGGTTT	AGT	CTCAATTTTG										4012	
GTTATCTTTG	TGTTCCCTCA	GCTCTTTAAA	GAAAAAGATG	TAATCGTTGT	AACCTTTGTC											4072	
TCATTCTTTA	AATGATGCTT	CCAAACATCT	CCTTAGTGTC	TGCAGGTGTT	AGTGGTGTGC											4132	
TAAAA																4137	

(2) 配列番号：4の情報

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：1050塩基対

(B) 種類：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：タンパク質

(xi) 配列の表示：配列番号：4

Met	Glu	Leu	Ile	Pro	Ile	Glu	Phe	Val	Leu	Pro	Thr	Ser	Gln	Arg	Lys		
1				5					10					15			
Cys	Lys	Ser	Pro	Glu	Thr	Ala	Leu	Leu	His	Val	Ala	Gly	His	Gly	Asn		
			20					25					30				
Val	Glu	Gln	Met	Lys	Ala	Gln	Val	Trp	Leu	Arg	Ala	Leu	Glu	Thr	Ser		
		35					40					45					

10

20

30

40

Val Ala Ala Asp Phe Tyr His Arg Leu Gly Pro His His Phe Leu Leu
 50 55 60
 Leu Tyr Gln Lys Lys Gly Gln Trp Tyr Glu Ile Tyr Asp Lys Tyr Gln
 65 70 75 80
 Val Val Gln Thr Leu Asp Cys Leu Arg Tyr Trp Lys Ala Thr His Arg
 85 90 95
 Ser Pro Gly Gln Ile His Leu Val Gln Arg His Pro Pro Ser Glu Glu
 100 105 110
 Ser Gln Ala Phe Gln Arg Gln Leu Thr Ala Leu Ile Gly Tyr Asp Val
 115 120 125
 Thr Asp Val Ser Asn Val His Asp Asp Glu Leu Glu Phe Thr Arg Arg
 130 135 140
 Gly Leu Val Thr Pro Arg Met Ala Glu Val Ala Ser Arg Asp Pro Lys
 145 150 155 160
 Leu Tyr Ala Met His Pro Trp Val Thr Ser Lys Pro Leu Pro Glu Tyr
 165 170 175
 Leu Trp Lys Lys Ile Ala Asn Asn Cys Ile Phe Ile Val Ile His Arg
 180 185 190
 Ser Thr Thr Ser Gln Thr Ile Lys Val Ser Pro Asp Asp Thr Pro Gly
 195 200 205
 Ala Ile Leu Gln Ser Phe Phe Thr Lys Met Ala Lys Lys Lys Ser Leu
 210 215 220
 Met Asp Ile Pro Glu Ser Gln Ser Glu Gln Asp Phe Val Leu Arg Val
 225 230 235 240
 Cys Gly Arg Asp Glu Tyr Leu Val Gly Glu Thr Pro Ile Lys Asn Phe
 245 250 255
 Gln Trp Val Arg His Cys Leu Lys Asn Gly Glu Glu Ile His Val Val
 260 265 270
 Leu Asp Thr Pro Pro Asp Pro Ala Leu Asp Glu Val Arg Lys Glu Glu
 275 280 285
 Trp Pro Leu Val Asp Asp Cys Thr Gly Val Thr Gly Tyr His Glu Gln
 290 295 300
 Leu Thr Ile His Gly Lys Asp His Glu Ser Val Phe Thr Val Ser Leu
 305 310 315 320
 Trp Asp Cys Asp Arg Lys Phe Arg Val Lys Ile Arg Gly Ile Asp Ile
 325 330 335
 Pro Val Leu Pro Arg Asn Thr Asp Leu Thr Val Phe Val Glu Ala Asn
 340 345 350
 Ile Gln His Gly Gln Gln Val Leu Cys Gln Arg Arg Thr Ser Pro Lys
 355 360 365
 Pro Phe Thr Glu Glu Val Leu Trp Asn Val Trp Leu Glu Phe Ser Ile
 370 375 380
 Lys Ile Lys Asp Leu Pro Lys Gly Ala Leu Leu Asn Leu Gln Ile Tyr
 385 390 395 400
 Cys Gly Lys Ala Pro Ala Leu Ser Ser Lys Ala Ser Ala Glu Ser Pro
 405 410 415

10

20

30

40

Ser Ser Glu Ser Lys Gly Lys Val Arg Leu Leu Tyr Tyr Val Asn Leu
 420 425 430
 Leu Leu Ile Asp His Arg Phe Leu Leu Arg Arg Gly Glu Tyr Val Leu
 435 440 445
 His Met Trp Gln Ile Ser Gly Lys Gly Glu Asp Gln Gly Ser Phe Asn
 450 455 460
 Ala Asp Lys Leu Thr Ser Ala Thr Asn Pro Asp Lys Glu Asn Ser Met
 465 470 475 480
 Ser Ile Ser Ile Leu Leu Asp Asn Tyr Cys His Pro Ile Ala Leu Pro
 485 490 495
 Lys His Gln Pro Thr Pro Asp Pro Glu Gly Asp Arg Val Arg Ala Glu
 500 505 510
 Met Pro Asn Gln Leu Arg Lys Gln Leu Glu Ala Ile Ile Ala Thr Asp
 515 520 525
 Pro Leu Asn Pro Leu Thr Ala Glu Asp Lys Glu Leu Leu Trp His Phe
 530 535 540
 Arg Tyr Glu Ser Leu Lys His Pro Lys Ala Tyr Pro Lys Leu Phe Ser
 545 550 555 560
 Ser Val Lys Trp Gly Gln Gln Glu Ile Val Ala Lys Thr Tyr Gln Leu
 565 570 575
 Leu Ala Arg Arg Glu Val Trp Asp Gln Ser Ala Leu Asp Val Gly Leu
 580 585 590
 Thr Met Gln Leu Leu Asp Cys Asn Phe Ser Asp Glu Asn Val Arg Ala
 595 600 605
 Ile Ala Val Gln Lys Leu Glu Ser Leu Glu Asp Asp Asp Val Leu His
 610 615 620
 Tyr Leu Leu Gln Leu Val Gln Ala Val Lys Phe Glu Pro Tyr His Asp
 625 630 635 640
 Ser Ala Leu Ala Arg Phe Leu Leu Lys Arg Gly Leu Arg Asn Lys Arg
 645 650 655
 Ile Gly His Phe Leu Phe Trp Phe Leu Arg Ser Glu Ile Ala Gln Ser
 660 665 670
 Arg His Tyr Gln Gln Arg Phe Ala Val Ile Leu Glu Ala Tyr Leu Arg
 675 680 685
 Gly Cys Gly Thr Ala Met Leu His Asp Phe Thr Gln Gln Val Gln Val
 690 695 700
 Ile Glu Met Leu Gln Lys Val Thr Leu Asp Ile Lys Ser Leu Ser Ala
 705 710 715 720
 Glu Lys Tyr Asp Val Ser Ser Gln Val Ile Ser Gln Leu Lys Gln Lys
 725 730 735
 Leu Glu Asn Leu Gln Asn Ser Gln Leu Pro Glu Ser Phe Arg Val Pro
 740 745 750
 Tyr Asp Pro Gly Leu Lys Ala Gly Ala Leu Ala Ile Glu Lys Cys Lys
 755 760 765
 Val Met Ala Ser Lys Lys Lys Pro Leu Trp Leu Glu Phe Lys Cys Ala
 770 775 780

10

20

30

40

Asp Pro Thr Ala Leu Ser Asn Glu Thr Ile Gly Ile Ile Phe Lys His
 785 790 795 800
 Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met Leu Ile Leu Gln Ile Leu Arg Ile
 805 810 815
 Met Glu Ser Ile Trp Glu Thr Glu Ser Leu Asp Leu Cys Leu Leu Pro
 820 825 830
 Tyr Gly Cys Ile Ser Thr Gly Asp Lys Ile Gly Met Ile Glu Ile Val
 835 840 845
 Lys Asp Ala Thr Thr Ile Ala Lys Ile Gln Gln Ser Thr Val Gly Asn
 850 855 860
 Thr Gly Ala Phe Lys Asp Glu Val Leu Asn His Trp Leu Lys Glu Lys
 865 870 875 880
 Ser Pro Thr Glu Glu Lys Phe Gln Ala Ala Val Glu Arg Phe Val Tyr
 885 890 895
 Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala Thr Phe Val Leu Gly Ile Gly Asp
 900 905 910
 Arg His Asn Asp Asn Ile Met Ile Thr Glu Thr Gly Asn Leu Phe His
 915 920 925
 Ile Asp Phe Gly His Ile Leu Gly Asn Tyr Lys Ser Phe Leu Gly Ile
 930 935 940
 Asn Lys Glu Arg Val Pro Phe Val Leu Thr Pro Asp Phe Leu Phe Val
 945 950 955 960
 Met Gly Thr Ser Gly Lys Lys Thr Ser Pro His Phe Gln Lys Phe Gln
 965 970 975
 Asp Ile Cys Val Lys Ala Tyr Leu Ala Leu Arg His His Thr Asn Leu
 980 985 990
 Leu Ile Ile Leu Phe Ser Met Met Leu Met Thr Gly Met Pro Gln Leu
 995 1000 1005
 Thr Ser Lys Glu Asp Ile Glu Tyr Ile Arg Asp Ala Leu Thr Val Gly
 1010 1015 1020
 Lys Asn Glu Glu Asp Ala Lys Lys Tyr Phe Leu Asp Gln Ile Glu Val
 1025 1030 1035 1040
 Trp Gln Arg Gln Arg Met Asp Cys Ala Val
 1045 1050

10

20

30

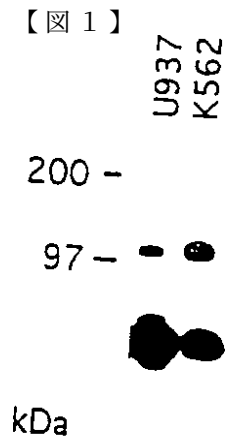


Abb. 1

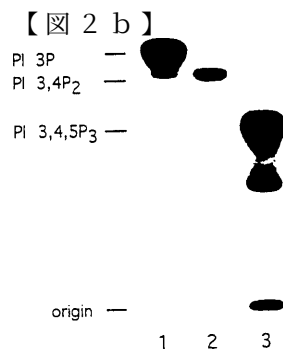


Abb. 2b

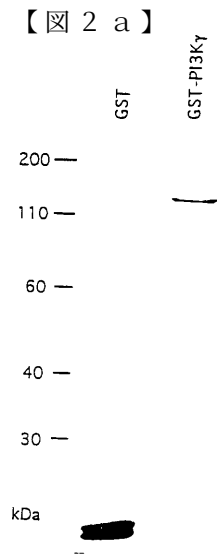


Abb. 2a

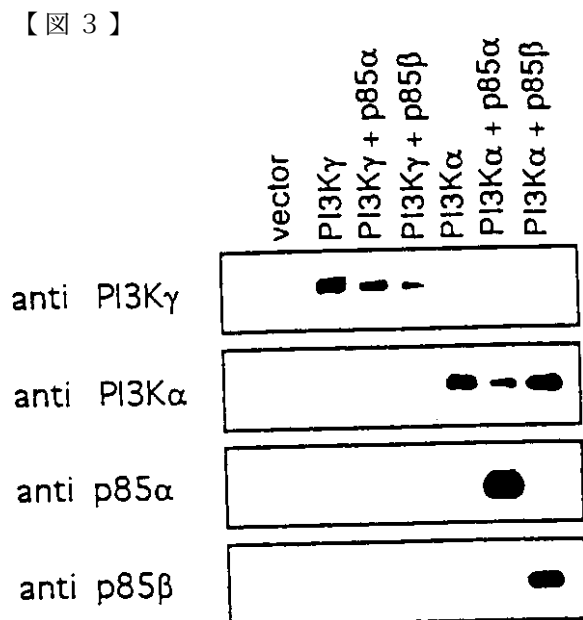


Abb. 3

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

G 0 1 N 33/573 (2006.01)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 K 38/45 (2006.01)
C 1 2 R 1/91 (2006.01)

F I

G 0 1 N 33/573 A
 C 1 2 P 21/08
 A 6 1 K 39/395 M
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 37/52
 C 1 2 N 5/00 B
 C 1 2 R 1:91
 C 1 2 N 9/12
 C 1 2 R 1:91

(74)代理人 100094798

弁理士 山崎 利臣

(74)代理人 100099483

弁理士 久野 琢也

(74)代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

(72)発明者 ボリスラフ ストヤノフ

ドイツ連邦共和国 D-0 7 7 7 8 ドルンドルフ ビュルゲルシェ シュトラーセ 9

(72)発明者 テーオドール ハンク

ドイツ連邦共和国 D-0 7 7 4 3 イエナ シュピッツヴァイデンヴェーク 1 1

(72)発明者 ラインハルト ヴェッツカー

ドイツ連邦共和国 D-0 7 7 4 7 イエナ リゼロッテ＝ヘルマン＝シュトラーセ 4 8

審査官 新留 豊

(56)参考文献 Cell, 1 9 9 4年 4月, 77, p.83-93

Mol. Cell. Biol., 1 9 9 3年, 13 [12], p.7677-7688

Cell, 1 9 9 2年, 70, p.419-429

J. Biol. Chem., 1 9 9 4年 6月, 269 [24], p.16525-16528

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 9/00 - 9/99

C07K 16/00 - 16/46

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/Geneseq

CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)