

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-81196

(P2004-81196A)

(43) 公開日 平成16年3月18日(2004.3.18)

(51) Int.Cl.⁷

C 12 N 15/09
A 61 K 31/7088
A 61 K 38/00
A 61 K 39/395
A 61 K 45/00

F 1

C 12 N 15/00
A 61 K 31/7088
A 61 K 39/395
A 61 K 45/00
A 61 K 48/00

Z N A A
N
N
A 61 K 45/00
A 61 K 48/00

テーマコード(参考)

2 G O 4 5
4 B O 2 4
4 B O 6 3
4 B O 6 4
4 B O 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 39 O L (全 123 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-57943 (P2003-57943)	(71) 出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22) 出願日	平成15年3月5日 (2003.3.5)	(74) 代理人	100114041 弁理士 高橋 秀一
(31) 優先権主張番号	特願2002-61133 (P2002-61133)	(74) 代理人	100106323 弁理士 関口 陽
(32) 優先日	平成14年3月6日 (2002.3.6)	(72) 発明者	中西 淳 茨城県つくば市花室1557-11
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	引地 由紀子 茨城県つくば市松代4丁目21番地2 シ ャレールつくば松代1号棟504号
(31) 優先権主張番号	特願2002-98852 (P2002-98852)	(72) 発明者	宇野 裕美子 茨城県つくば市松代3丁目12番地1 武 田松代レジデンス601号
(32) 優先日	平成14年4月1日 (2002.4.1)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2002-184883 (P2002-184883)		
(32) 優先日	平成14年6月25日 (2002.6.25)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規タンパク質およびそのDNA

(57) 【要約】

【課題】有機アニオン輸送活性を有する新規タンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物などの提供。

【解決手段】本発明のタンパク質は、例えば腎疾患、肝臓疾患、膵臓疾患、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患、消化器性疾患、脾臓疾患、癌、呼吸器疾患、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患、皮膚疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの診断マーカー等として有用であり、該タンパク質を用いるスクリーニング法により得られる該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物は、例えば、上記疾患などの予防・治療剤として使用することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号：1、配列番号：2 6 または配列番号：5 2 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。

【請求項 2】

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

【請求項 3】

配列番号：2 6 で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

【請求項 4】

配列番号：5 2 で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。 10

【請求項 5】

配列番号：5 2 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：5 4 で表わされるアミノ酸配列である請求項 1 記載のタンパク質またはその塩。

【請求項 6】

配列番号：5 4 で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

【請求項 7】

請求項 1 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項 8】

請求項 1 記載のタンパク質または請求項 7 記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。 20

【請求項 9】

D N A である請求項 8 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

配列番号：2、配列番号：2 7、配列番号：5 3 または配列番号：5 5 で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 11】

請求項 8 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 12】

請求項 11 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。 30

【請求項 13】

請求項 12 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 記載のタンパク質または請求項 7 記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 7 記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。

【請求項 14】

請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 7 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 15】

請求項 8 記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

【請求項 16】

請求項 8 記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。 40

【請求項 17】

請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 7 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

【請求項 18】

請求項 17 記載の抗体を含有してなる診断薬。

【請求項 19】

請求項 17 記載の抗体を含有してなる医薬。

【請求項 20】

請求項 8 記載のポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド。 50

【請求項 2 1】

請求項 2 0 記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。

【請求項 2 2】

請求項 2 0 記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

【請求項 2 3】

請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 7 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 7 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 2 4】

請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 7 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 7 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。 10

【請求項 2 5】

請求項 2 3 記載のスクリーニング方法または請求項 2 4 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 記載のタンパク質もしくは請求項 7 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 2 7】

請求項 8 記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項 1 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。 20

【請求項 2 8】

請求項 8 記載のポリヌクレオチドを含有してなる、請求項 1 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 2 9】

請求項 2 7 記載のスクリーニング方法または請求項 2 8 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 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。

【請求項 3 0】

請求項 2 9 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。 30

【請求項 3 1】

請求項 1 7 記載の抗体を用いることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質の定量方法。

【請求項 3 2】

請求項 3 1 記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質の機能が関連する疾患の診断法。

【請求項 3 3】

請求項 1 7 記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 3 4】

請求項 1 7 記載の抗体を含有してなる、請求項 1 記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。 40

【請求項 3 5】

請求項 3 3 記載のスクリーニング方法または請求項 3 4 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 記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。

【請求項 3 6】

請求項 3 5 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 3 7】

腎疾患の予防・治療剤である請求項 1 4 、請求項 1 5 、請求項 1 9 、請求項 2 2 、請求項 2 6 、請求項 3 0 または請求項 3 6 記載の医薬。 50

【請求項 3 8】

哺乳動物に対して、請求項 25、請求項 29 または請求項 35 記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする腎疾患の予防・治療方法。

【請求項 3 9】

腎疾患の予防・治療剤を製造するための請求項 25、請求項 29 または請求項 35 記載の化合物またはその塩の使用。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、新規な有機アニオントランスポーター (oatp / LST) タンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物などを提供する。 10

【0002】**【従来の技術】**

有機アニオントランスポーターであるoatp / LST 遺伝子群 (SLC21 ファミリー) はナトリウム非依存性のトランスポーターであり、生体内において血液脳関門を介した甲状腺ホルモン類の中樞神経系への取り込み、血液からの胆汁酸や薬物の肝臓への移行、プロスタグランジンやロイコトリエンなどの炎症性メディエーターの除去、異物の胆汁や尿中への排出などの生体の恒常性維持に欠かせない役割を果たしている事が知られている。現在までにoatp / LST 群はヒトでは13種類(例、SLC21A3、SLC21A6、SLC21A11、SLC21A12(非特許文献1 Biochemical and Biophysical Research Communications、273巻、251頁、2000年)など)、ラットでは10種類(例、Slc21a1、Slc21a5など)の報告があり、発現分布は脳特異的、肝臓特異的、広範囲に発現しているものの3種におよそ分類される。 20

【非特許文献1】

Biochemical and Biophysical Research Communications、273巻、251頁、2000年

【0003】**【発明が解決しようとする課題】**

有機アニオントランスポーターは、基質として胆汁酸のみならず、甲状腺ホルモンや抱合型ステロイドなどの生理活性物質を輸送する。これらの基質の多くは核内レセプターのリガンドであることから、有機アニオントランスポーターは核内レセプターのリガンドを細胞内に最初に取り込むという重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、その詳細なメカニズムはよく分かっていない。よって、これらのトランスポーターの役割を解明することが種々の疾患に対する治療薬開発につながると考えられる。 30

【0004】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、新規な有機アニオントランспорタータンパク質を見出した。該タンパク質を抑制する方法としては、例えば、有機アニオンの輸送を阻害したり、該タンパク質の転写を抑制して発現レベルを低下させることが考えられる。該タンパク質を賦活化する方法としては、例えば有機アニオンの輸送を促進したり、該タンパク質のプロモーターを活性化したり、mRNA を安定化することで発現レベルを亢進することが考えられる。 40

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。

【0005】

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1、配列番号：26 または配列番号：52 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、 50

- (2) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、
(3) 配列番号：26で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、
(4) 配列番号：52で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、
(5) 配列番号：52で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：54で表わされるアミノ酸配列である上記(1)記載のタンパク質またはその塩、
(6) 配列番号：54で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、
(7) 上記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、
(8) 上記(1)記載のタンパク質または上記(7)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
(9) DNAである上記(8)記載のポリヌクレオチド、
(10) 配列番号：2、配列番号：27、配列番号：53または配列番号：55で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド、
(11) 上記(8)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
(12) 上記(11)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、
(13) 上記(12)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のタンパク質または上記(7)記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、
(14) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、
(15) 上記(8)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
(16) 上記(8)記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、
(17) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
(18) 上記(17)記載の抗体を含有してなる診断薬、
(19) 上記(17)記載の抗体を含有してなる医薬、
(20) 上記(8)記載のポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド、
(21) 上記(20)記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、
(22) 上記(20)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
(23) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
(24) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
(25) 上記(23)記載のスクリーニング方法または上記(24)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、
(25a) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、
(26) 上記(25)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、
(26a) 上記(25a)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、
(27) 上記(8)記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
(28) 上記(8)記載のポリヌクレオチドを含有してなる、上記(1)記載のタンパク質またはその塩

ク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
 (29) 上記(27)記載のスクリーニング方法または上記(28)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

(29a) 上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩、
 (30) 上記(29)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(30a) 上記(29a)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(31) 上記(17)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(1)記載のタンパク質の定量方法、

(32) 上記(31)記載の定量方法を用いることを特徴とする上記(1)記載のタンパク質の機能が関連する疾患の診断法、 10

(33) 上記(17)記載の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(34) 上記(17)記載の抗体を含有してなる、上記(1)記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(35) 上記(33)記載のスクリーニング方法または上記(34)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

(35a) 上記(1)記載のタンパク質の発現を促進する化合物またはその塩、

(36) 上記(35)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、 20

(36a) 上記(35a)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(37) 腎疾患の予防・治療剤である上記(14)、(15)、(19)、(22)、
 (26)、(30)または(36)記載の医薬、

(37a) 腎疾患の予防・治療剤である上記(26a)、(30a)または(36a)記載の医薬、

(37b) 腎疾患が糖尿病性腎症である上記(37)または(37a)記載の医薬、

(37c) 甲状腺ホルモン関連疾患の予防・治療剤である上記(14)、(15)、(19)、(22)、(26)、(30)または(36)記載の医薬、

(37d) 甲状腺ホルモン関連疾患の予防・治療剤である上記(26a)、(30a)または(36a)記載の医薬、 30

(37e) 甲状腺ホルモン関連疾患が甲状腺ホルモン不応症である上記(37c)または(37d)記載の医薬、

(38) 哺乳動物に対して、上記(25)、(29)または(35)記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする腎疾患の予防・治療方法、

(39) 腎疾患の予防・治療剤を製造するための上記(25)、(29)または(35)記載の化合物またはその塩の使用などを提供する。

【0006】

【発明の実施の形態】

配列番号：1、配列番号：26または配列番号：52で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質と称することもある）は、ヒトや温血動物（例えは、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（例えは、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、臍臍細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ラングルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、纖維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、单球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えは、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髓、小脳）、脊髓、下垂体、胃、臍臍、腎臍、肝臍、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮 40

50

膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、頸下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巢、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

【0007】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約99%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：26で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約99%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：26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タンパク質としては、例えば、前記の配列番号：26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し、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：52で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：52で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約99%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：52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タンパク質としては、例えば、前記の配列番号：52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し、配列番号：52で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。配列番号：52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タンパク質としては、配列番号：54で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などが挙げられる。

実質的に同質の活性としては、例えば、有機アニオンの輸送活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、有機アニオンの輸送活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

有機アニオンとしては、例えばグルクロン酸、グルタチオン、コール酸などの胆汁酸、甲状腺ホルモンなどが挙げられる。

有機アニオンの輸送活性などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことができ、例えば、Biochemical and Biophysical Research Communications、第273巻、251頁、2000年に記載の方法またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

【0008】

また、本発明のタンパク質としては、例えば、(1)(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii)配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ま

10

20

30

40

50

しくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらには好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(i i i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(i v)配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、

(2)(i)配列番号：26で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(i i)配列番号：26で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(i i i)配列番号：26で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(i v)配列番号：26で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、

(3)(i)配列番号：52で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(i i)配列番号：52で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(i i i)配列番号：52で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(i v)配列番号：52で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置は、とくに限定されない。

【0009】

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、C末端がカルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COO⁻)、アミド(-CONH₂)またはエス

10

20

30

40

50

テル(- COOR)のいずれであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC₁~6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C₃~8シクロアルキル基、例えば、フェニル、-ナフチルなどのC₆~12アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁~2アルキル基もしくは-ナフチルメチルなどの-ナフチル-C₁~2アルキル基などのC₇~14アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明のタンパク質が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タンパク質に含まれる。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。10

さらに、本発明のタンパク質には、N末端のアミノ酸残基(例、メチオニン残基)のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁~6アルカノイルなどのC₁~6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末端のグルタミン残基がビログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁~6アルカノイル基などのC₁~6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タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：52で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：54で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。20

【0010】

本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明のタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

例えば、本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列のうち例えば10個以上、好ましくは20個以上、好ましくは50個以上、好ましくは70個以上、好ましくは100個以上、好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が欠失し、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1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が付加し、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1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が挿入され、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1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。30

本発明の部分ペプチドとしては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、例えば第340番目~370番目、第490番目~520番目のアミノ酸配列、配列番号：26で表されるアミノ酸配列において、例えば第335番目~365番目、第490番目~520番目のアミノ酸配列、配列番号：52で表されるアミノ酸配列において、例えば第335番目~365番目、第490番目~520番目のアミノ酸配列など含有するペプチドなどが好ましい。40

【0011】

また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端がカルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COO-)アミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)の何れであってもよい。

さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明のタンパク質と同様に、50

C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有しているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基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。

本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。たとえば、後述する本発明の抗体を調製する目的には、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において例えば、第340番目～370番目、第490番目～520のアミノ酸配列、配列番号：26で表されるアミノ酸配列において例えば、第335番目～365番目、第490番目～520番目のアミノ酸配列、配列番号：52で表されるアミノ酸配列において例えば、第335番目～365番目、第490番目～520番目のアミノ酸配列、配列番号：54で表されるアミノ酸配列において例えば、第335番目～365番目、第490番目～520番目のアミノ酸配列などを含有するペプチドが好ましい。

【0012】

本発明のタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属等）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、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、リンゴ酸、蔥酸、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。

本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードする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、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

【0013】

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク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-(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ことができる。このような樹脂を用い、-アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、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タンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは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、タンパク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リル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、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なった後に樹脂に添加することができる。

【0014】

10

20

30

40

50

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、タンパク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。反応温度はタンパク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-20～50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1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

10

20

【0015】

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、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。

20

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロヘキシル、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、t-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(C₁-₆)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

30

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、t-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。

40

【0016】

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

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20～40の温度で行なわれるが、酸処理においては

50

、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りガンド作動性カチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2，4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1-2-エタンジチオール、1，4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0017】

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。
10 タンパク質または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、カルボキシ末端アミノ酸の-NH₂-カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）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-NH₂-アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質または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タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。
20 この粗タンパク質または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タンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の-NH₂-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、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

【0018】

本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適當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つても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチド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(a)～(e)に記載された方法が挙げられる。
30

- (a) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- (b) Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- (c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- (d) 矢島治明 および 榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
- (e) 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・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられる部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適當な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0019】

本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のタンパク

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。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

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

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば(i)配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(i i)配列番号：25で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：25で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(i i i)配列番号：27で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：27で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(i v)配列番号：51で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：51で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(v)配列番号：53で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：53で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：52で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(v i)配列番号：80で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：80で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：52で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(v i i)配列番号：55で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：55で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：54で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(v i i i)配列番号：81で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：81で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：54で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

【0020】

配列番号：2または配列番号：25で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：25で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約99%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。配列番号：27または配列番号：51で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：27または配列番号：51で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約99%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。

10

20

30

40

50

配列番号：53または配列番号：80で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：53または配列番号：80で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約99%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。

配列番号：55または配列番号：81で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：55または配列番号：81で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約99%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。10

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

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

より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：25で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：27で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：51で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：52で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：53で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：80で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：54で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：55で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：81で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。30

【0021】

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド(例、DNA)としては、前述した本発明で用いられる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、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明で用いられる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：2または配列番号：25で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：2または配列番号：25で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を有するDNA、(2)配列番号：27で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：27で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を有するDNA、(3)配列番号：53で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：53で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を有するDNA、(4)配列番号：55で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：4050

55で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：53または配列番号：55で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

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。

【0022】

本発明のタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成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を本発明のタンパク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とのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、MutantTM-super Express Km（宝酒造（株））、MutantTM-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたタンパク質をコードする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、リンカーを附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附加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のタンパク質をコードする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。

【0023】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）、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、SRプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR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、PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

10

20

30

40

50

【0024】

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

10

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、-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、Mf・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、-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。

20

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードする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。

【0025】

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、例えば、エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）K12・DH1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160(1968)〕, JM103〔Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981)〕, JAZZ21〔Journal of Molecular Biology, 120巻, 517(1978)〕, HB101〔Journal of Molecular Biology, 41巻, 459(1969)〕, C600〔Genetics, 39巻, 440(1954)〕などが用いられる。

30

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス（Bacillus subtilis）MI114〔Gene, 24巻, 255(1983)〕, 207-21〔Journal of Biochemistry, 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、シズサッカロマイセス ポンベ（Schizosaccharomyces pombe）NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス（Pichia pastoris）KM71などが用いられる。

【0026】

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 Five TM細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmene 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。

40

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)〕。

50

動物細胞としては、例えば、サル細胞 C O S - 7 , V e r o , チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O 細胞と略記) , d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O (d h f r⁻) 細胞と略記) , マウスL細胞 , マウスA t T - 2 0 , マウスミエローマ細胞 , ラットG H 3 , ヒトF L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、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 6 9 卷 , 2 1 1 0 (1 9 7 2) や G e n e , 1 7 卷 , 1 0 7 (1 9 8 2) などに記載の方法に従って行なうことができる。

【 0 0 2 7 】

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 (M o l e c u l a r & G e n e r a l G e n e t i c s) , 1 6 8 卷 10 , 1 1 1 (1 9 7 9) などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , 1 9 4 卷 , 1 8 2 - 1 8 7 (1 9 9 1) 、 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 7 5 卷 , 1 9 2 9 (1 9 7 8) などに記載の方法に従って行なうことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、B i o / T e c h n o l o g y , 6 , 4 7 - 5 5 (1 9 8 8) などに記載の方法に従って行なうことができる。

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ール . 2 6 3 - 2 6 7 (1 9 9 5) (秀潤社発行) 、 V i r o l o g y , 5 2 卷 , 4 5 6 (1 9 7 3) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードするD N A 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、コーンスチーブ・リカーやペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のp H は約 5 ~ 8 が望ましい。

【 0 0 2 8 】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM 9 培地 [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 Genetics , 4 3 1 - 4 3 3 , C o l d S p r i n g Harbor Laboratory , New York 1 9 7 2] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 - 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 1 5 ~ 4 3 で約 3 ~ 2 4 時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 3 0 ~ 4 0 で約 6 ~ 2 4 時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

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、バークホールダー (B u r k h o l d e r) 最小培地 [B o s t i a n , K . L . ら、 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 7 7 卷 , 4 5 0 5 (1 9 8 0)] や 0 . 5 % カザミノ酸を含有するS D 培地 [B i t t e r , G . A . ら、 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 1 卷 , 5 3 3 0 (1 9 8 4)] が挙げられる。培地のp H は約 5 ~ 8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 2 0 ~ 3 5 で約 2 4 ~ 7 2 時間行ない、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 (N a t u r e , 1 9 5 , 7 8 8 (1 9 6 2)) に非動化した 1 0 % 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p H は約 6

30

40

50

. 2 ~ 6 . 4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27 で約 3 ~ 5 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5 ~ 20 % の胎児牛血清を含む MEM 培地 [Science , 122巻 , 501 (1952)] , DMEM 培地 [Virology , 8巻 , 396 (1959)] , RPMI 1640 培地 [The Journal of the American Medical Association 199巻 , 519 (1967)] , 199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine , 73巻 , 1 (1950)] などが用いられる。pH は約 6 ~ 8 であるのが好ましい。培養は通常約 30 ~ 40 で約 15 ~ 60 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。
10

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【 0029 】

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のタンパク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タンパク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^{T M} などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、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。
20

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タンパク質の精製は、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。
30

【 0030 】

かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、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。

なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白質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。蛋白質修飾酵素としては、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。

かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンプロットティングなどにより測定することができる。
40

【 0031 】

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそ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。

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔 モノクローナル抗体の作製 〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2~6週毎に1回ずつ、計2~10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄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、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔Nature, 256, 495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレンギリコール(PEG)やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

【0032】

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髄腫細胞が挙げられるが、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)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG(好ましくはPEG1000~PEG6000)が10~80%程度の濃度で添加され、20~40%好ましくは30~37%で1~10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。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT(ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地、1~10%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、日本製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20~40%好ましくは約37%である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0033】

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法(例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換法(例、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などの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法)に従って行なうことができる。

【0034】

[ポリクローナル抗体の作製]

10

20

30

40

50

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。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蛋白質とハプテンとの混合比は、キャリアー蛋白質に架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～2.0、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

10

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

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vantや不完全フロイントアジュvantを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

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

20

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

【0035】

本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、アンチセンスポリヌクレオチドの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある）の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明のDNAの塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチドであってもよいが、アンチセンスDNAが好ましい。

30

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相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の相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが好適である。

具体的には、配列番号：2、配列番号：27、配列番号：53または配列番号：55で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2、配列番号：27、配列番号：53または配列番号：55で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。

40

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

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

50

することができる。

【0036】

本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできる該遺伝子に対応するアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連RNAとの相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とタンパク質との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される（指令にある）タンパク質のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ペースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域または3'端ヘアピンループなどは、好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係については、目的核酸が対象領域とハイブリダイズすることができる場合は、その目的核酸は、当該対象領域のポリヌクレオチドに対して「アンチセンス」であるといふことができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、DNA:RNAハイブリッドであってもよく、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（例、ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターフケント化合物（例、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。このような修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されてたり、またはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、RNA、DNAまたは修飾された核酸（RN

10

20

30

40

50

A、DNA)である。修飾された核酸の具体例としては、核酸の硫黄誘導体、チオホスフエート誘導体、ポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものなどが挙げられる。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、以下のように設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンスポリヌクレオチドをより安定なものにする、アンチセンスポリヌクレオチドの細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、また、もし毒性があるような場合はアンチセンスポリヌクレオチドの毒性をより小さなものにする。このような修飾は、例えばPharm Tech Japan, 8巻, 247頁または395頁, 1992年、Anti sense Research and Applications, CRC Press, 1993年などで数多く報告されている。10

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができうる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質(例、ホスホリピド、コレステロールなど)などの疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体(例、コレステリルクロロホルメート、コール酸など)が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端または5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができうる。その他の基としては、核酸の3'端または5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。20

アンチセンスポリヌクレオチドの阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、または本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。

【0037】

以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩(以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある)、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えばDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)、および本発明のDNAのアンチセンスポリヌクレオチド(以下、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドと略記する場合がある)の用途を説明する。30

本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、例えば、有機アニオンの輸送活性を抑制することで、例えば、腎疾患(例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、肝臓疾患(例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など)、脾臓疾患(例、脾炎など)、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など)、消化器性疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など)、脾臓疾患(例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、肺臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など)、呼吸器疾患(例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患(例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)、皮膚疾患(例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など)、甲状腺ホルモン関連疾患(例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など)などの予防・治療剤として使用することができる。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。一方、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物もしくはその塩を含4050

有する医薬は、例えば、有機アニオンの輸送活性を促進することで、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、膵臓疾患（例、膵炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤として使用することができる。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

10

20

30

40

50

【0038】

〔1〕本発明のタンパク質が関与する各種疾患の予防・治療剤

本発明のタンパク質は、有機アニオンの輸送活性などを有し、生体内において血液脳関門を介した甲状腺ホルモン類の中樞神経系への取り込み、血液から胆汁酸または薬物の肝臓への移行、ブリスタグランジンまたはロイコトリエンなどの炎症メディエーターの除去、異物の胆汁または尿中への排出など、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。

したがって、本発明のタンパク質をコードするDNAに異常があつたり、欠損している場合あるいは本発明のタンパク質の発現量が減少している場合には、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、膵臓疾患（例、膵炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など）などの種々の疾患が発症する。

したがって、本発明のタンパク質および本発明のDNAは、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、膵臓疾患（例、膵炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などの医薬として使用することができる。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

例えば、生体内において本発明のタンパク質が減少あるいは欠損しているために、有機アニオンの輸送活性が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、(イ)本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質を発現させることによって、(ロ)細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のタンパク質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ)本発明のタンパク質を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の予防・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できる。本発明のDNAは、そのまで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。10

本発明のタンパク質を上記の予防・治療剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

【0039】

本発明のタンパク質は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。20

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、トランガント、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、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。30

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)などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例えば、エタノールなど)、ポリアルコール(例えば、プロピレンジコール、ポリエチレンジコールなど)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート80^{T M}、HCO-50など)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、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など)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレンジコールなど)、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。40

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

【0040】

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、温血動物(例えば、ヒト、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)に対して投与することができる。50

本発明のタンパク質の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、腎不全の治療目的で本発明のタンパク質等を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該タンパク質を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質の1回投与量は投与対象、対象疾患などによつても異なるが、例えば、腎不全の治療目的で本発明のタンパク質を注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

10

【0041】

〔2〕疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、（1）本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性（例えば、有機アニオンの輸送活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。より具体的には、例えば、

（2）（i）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の有機アニオンの輸送活性と（ii）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物の有機アニオンの輸送活性の比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

20

具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、（i）と（ii）の場合において、有機アニオンの輸送活性を蛍光色素で測定し、有機アニオンの輸送活性の指標として比較することを特徴とするものである。

【0042】

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

30

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の有機アニオンの輸送活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

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

40

【0043】

本発明のタンパク質の有機アニオンの輸送活性は、公知の方法、例えば、Biological and Biophysical Research Communications、第273巻、251頁、2000年に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従つて測定することができる。

例えば、上記（ii）の場合における有機アニオンの輸送活性を、上記（i）の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

また、例えば、上記（ii）の場合における有機アニオンの輸送活性を、上記（i）の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害（

50

または抑制)する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

また、本発明のタンパク質遺伝子のプロモーター下流に分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入し、上記の各種細胞に発現させ、該細胞に上記試験化合物を接触させた場合における酵素活性を賦活化または阻害する化合物またはその塩を探索することによって本発明のタンパク質の発現を促進または抑制(すなわち、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害)する化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

【0044】

本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。 10

本発明は、(3)本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩(以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある)のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

(4)(i)本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と(iii)本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行うことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。 20

上記スクリーニング方法においては、例えば、(i)と(iii)の場合における、本発明のタンパク質遺伝子の発現量(具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードするmRNA量)を測定して、比較する。

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

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4~10(望ましくは、pH約6~8)のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の有機アニオンの輸送活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。 30

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

本発明のタンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISAなどの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

本発明のタンパク質遺伝子の発現量は、公知の方法、例えば、ノーザンブロッティングやReverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)、リアルタイムPCR解析システム(ABI社製、TaqMan polymerase chain reaction)などの方法あるいはそれに準じる方法にしたがって測定することができる。 40

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

例えば、上記(iii)の場合における本発明のタンパク質遺伝子の発現を、上記(iii)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上 50

阻害する試験化合物を本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

さらに、本発明の抗体は、本発明のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、(5)本発明の抗体を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の発現(產生)を促進または阻害する化合物またはその塩(以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある)のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

(6)(v)本発明のタンパク質を產生する能力を有する細胞を培養した場合と(vi)本発明のタンパク質を產生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行うことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。
10

上記スクリーニング方法においては、例えば、本発明の抗体を用いて(v)と(vi)の場合における、本発明のタンパク質の発現量(具体的には、本発明のタンパク質量)を測定(例、本発明のタンパク質の発現を検出、本発明のタンパク質の発現量を定量等)して、比較する。

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

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を產生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4~10(望ましくは、pH約6~8)のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の有機アニオンの輸送活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。
20

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

本発明のタンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISAなどの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。
30

例えば、上記(vi)の場合における本発明のタンパク質の発現を、上記(v)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質の発現を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

例えば、上記(vi)の場合における本発明のタンパク質の発現を、上記(v)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

【0045】

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドを產生する能力を有する細胞を含有するものである。
40

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性(例、有機アニオンの輸送活性など)を促進または阻害する化合物またはその塩である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩は、例えば、腎疾患(例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質
50

性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、肝臓疾患(例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など)、膵臓疾患(例、膵炎など)、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など)、消化器性疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など)、脾臓疾患(例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など)、呼吸器疾患(例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患(例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)、皮膚疾患(例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など)、甲状腺ホルモン関連疾患(例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など)などの予防・治療剤などの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

また、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、腎疾患(例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、肝臓疾患(例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など)、膵臓疾患(例、膵炎など)、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など)、消化器性疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など)、脾臓疾患(例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など)、呼吸器疾患(例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患(例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)、皮膚疾患(例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など)、甲状腺ホルモン関連疾患(例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など)などの予防・治療剤などなどの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩は、例えば、腎疾患(例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、肝臓疾患(例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など)、膵臓疾患(例、膵炎など)、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など)、消化器性疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など)、脾臓疾患(例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など)、呼吸器疾患(例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患(例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)、皮膚疾患(例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など)、甲状腺ホルモン関連疾患(例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など)などの予防・治療剤などなどの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

また、本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、腎疾患(例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、肝臓疾患(例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など)、膵臓疾患(例、膵炎など)、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など)、消化器性疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など)、脾臓疾患(例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌

10

20

30

40

50

、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髓性白血病など)、呼吸器疾患(例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、骨髓炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患(例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)、皮膚疾患(例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など)、甲状腺ホルモン関連疾患(例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など)などの予防・治療剤などなどの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

本発明のタンパク質の発現を促進する化合物またはその塩は、例えば、腎疾患(例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、肝臓疾患(例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など)、膵臓疾患(例、膵炎など)、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など)、消化器性疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など)、脾臓疾患(例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髓性白血病など)、呼吸器疾患(例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、骨髓炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患(例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)、皮膚疾患(例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など)、甲状腺ホルモン関連疾患(例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など)などの予防・治療剤などなどの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

また、本発明のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、腎疾患(例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、肝臓疾患(例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など)、膵臓疾患(例、膵炎など)、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など)、消化器性疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など)、脾臓疾患(例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髓性白血病など)、呼吸器疾患(例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、骨髓炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患(例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)、皮膚疾患(例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など)、甲状腺ホルモン関連疾患(例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など)などの予防・治療剤などの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

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しては、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩、本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩、本発明のタンパク質の発現を促進する化合物またはその塩が好ましい。

【0046】

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予防・治療剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができます。

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

10

20

30

40

50

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、腎不全治療の目的で本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、腎不全治療の目的で本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mg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、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。10

【0047】

[3] 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明の抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、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ます。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質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タンパク質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タンパク質の定量法、および20

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

上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC端部に反応する抗体であることが望ましい。30

【0048】

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、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(ab')₂、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）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。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素（例、[¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]、[³²P]、[³³P]、[³⁵S]など）、蛍光物質（例、シアニン蛍光色素（例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャムバイオサイエンス社製）など）、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）、酵素（例、-ガラクトシダーゼ、-グルコシダーゼ、アルカリフィオスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素など）、発光物質（例、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなど）、ビオチン、ランタニド元素などが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。40

【0049】

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、また通常タンパク質あ50

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本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ(1次反応)、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ(2次反応)たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク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タンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0050】

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

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

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。

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。

【0051】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質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. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part

10

20

30

40

50

E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochromatographic Techniques (Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の減少が検出された場合、例えば、腎疾患(例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、肝臓疾患(例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など)、膵臓疾患(例、膵炎など)、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、消化器性疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など)、脾臓疾患(例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など)、呼吸器疾患(例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患(例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)、皮膚疾患(例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など)、甲状腺ホルモン関連疾患(例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など)などが発症している可能性が高いと診断することができる。反対に、例えば、本発明のタンパク質の濃度の上昇が検出された場合、例えば、腎疾患(例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、肝臓疾患(例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など)、膵臓疾患(例、膵炎など)、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、消化器性疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など)、脾臓疾患(例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など)、呼吸器疾患(例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患(例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)、皮膚疾患(例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など)、甲状腺ホルモン関連疾患(例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など)などが発症している可能性が高いと診断することができる。

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

【0052】

〔4〕遺伝子診断薬

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(例えは、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)における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えは、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えは、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(Genomics, 第5巻, 874~879頁(1989)、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 50

a , 第 8 6 卷 , 2 7 6 6 ~ 2 7 7 0 頁 (1 9 8 9)) などにより実施することができる。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現増加が検出された場合、例えば腎疾患(例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、肝臓疾患(例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など)、肺臓疾患(例、肺炎など)、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など)、消化器性疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など)、脾臓疾患(例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、肺臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など)、呼吸器疾患(例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患(例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)、皮膚疾患(例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など)、甲状腺ホルモン関連疾患(例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など)などである可能性が高いと診断することが出来る。反対に、発現低下が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、腎疾患(例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、肝臓疾患(例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など)、肺臓疾患(例、肺炎など)、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など)、消化器性疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など)、脾臓疾患(例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、肺臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など)、呼吸器疾患(例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患(例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)、皮膚疾患(例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など)、甲状腺ホルモン関連疾患(例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など)などである可能性が高いと診断することができる。

【0053】

[5] アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬および診断薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの機能(例、有機アニオンの輸送活性)を抑制することができるので、例えば、腎疾患(例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、肝臓疾患(例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など)、肺臓疾患(例、肺炎など)、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など)、消化器性疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など)、脾臓疾患(例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、肺臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など)、呼吸器疾患(例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患(例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)、皮膚疾患(例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など)、甲状腺ホルモン関連疾患(例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など)などの予防・治療剤などとして使用することができる。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、上記疾患の診断にも用いられる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合、公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

10

20

30

40

50

例えば、該アンチセンスポリヌクレオチドを用いる場合、該アンチセンスポリヌクレオチド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、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、腎不全の治療の目的で本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを腎臓に局所投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約0.1～100mg投与する。さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、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に診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

【0054】

さらに、本発明は、

(i) 本発明のタンパク質をコードするRNAの一部とそれに相補的なRNAを含有する二重鎖RNA、

(ii) 前記二重鎖RNAを含有してなる医薬、

(iii) 本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイム、

(iv) 前記リボザイムを含有してなる医薬、

(v) 前記リボザイムをコードする遺伝子(DNA)を含有する発現ベクターなども提供する。

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、二重鎖RNA、リボザイムなども、本発明のDNAから転写されるRNAを破壊またはその機能を抑制することができ、生体内における本発明のタンパク質または本発明で用いられるDNAの機能を抑制することができるので、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、胰臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などとして使用することができる。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、公知のリボザイムの配列の一部を本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に置換することによって製造することができる。本発明のタンパク質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得るコンセンサス配列NUX（式中、Nはすべての塩基を、XはG以外の塩基を示す）の近傍の配列などが挙げられる。

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

10

20

30

40

50

ンスボリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。また、前記(Ⅴ)の発現ベクターは、公知の遺伝子治療法などと同様に用い、上記予防・治療剤として使用する。

【0055】

[6] 本発明の抗体を含有する医薬

本発明のタンパク質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、腎疾患(例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、肝臓疾患(例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など)、胰臓疾患(例、胰炎など)、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など)、消化器性疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など)、脾臓疾患(例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、胰臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など)、呼吸器疾患(例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患(例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)、皮膚疾患(例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など)、甲状腺ホルモン関連疾患(例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など)などの予防・治療剤などとして使用することができる。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的(例、関節内投与)に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、糖尿病性腎症の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて增量してもよい。

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

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

【0056】

[7] 本発明のDNAを有する動物の作出

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードする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。

すなわち、本発明は、

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

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物(以下、本発明のDNA導入動物と略記する)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

10

20

30

40

50

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、D E A E - デキストラン法などにより目的とするDNAを導入することによって作出することができる。また、該DNA導入方法により、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を導入し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA導入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、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C 5 7 B L / 6 系統，D B A 2 系統など、交雑系として、B 6 C 3 F₁ 系統，B D F₁ 系統，B 6 D 2 F₁ 系統，B A L B / c 系統，I C R 系統など）またはラット（例えば、W i s t a r , S D など）などが好ましい。哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

【 0 0 5 7 】

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DNA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、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させる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DNAを対象動物に導入するにあたっては、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、本発明のヒトDNAを導入する場合、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、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA導入哺乳動物を作出することができる。

【 0 0 5 8 】

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

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(i)ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、J C ウィルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、(ii)各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリン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、筋クレアチニナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、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、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依存タンパク質キナーゼIサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリ fosfotransfase、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプター-チロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）

10

20

30

40

50

、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素(*N a , K - A T P a s e*)、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原(*H - 2 L*)、*H - r a s*、レニン、ドーパミン - 水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ(*T P O*)、ポリペプチド鎖延長因子1(*E F - 1*)、アクチン、およびミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、*T h y - 1* 、免疫グロブリン、H鎖可変部(*V N P*)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 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。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1(*E F - 1*)のプロモーター、ヒトおよびニワトリ アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA導入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。

【 0 0 5 9 】

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

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

該翻訳領域は導入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の導入は、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導入後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

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

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

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

【 0 0 6 0 】

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

10

20

30

40

50

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タンパク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導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク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なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを導入した哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク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出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

【0061】

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タンパク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導入動物を用いて、本発明のタンパク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を治療方法の検討を行な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、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害 (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を導入した哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質またはそ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導入動物のその他の利用可能性として、例えば、(i)組織培養のための細胞源としての使用、

(ii)本発明のDNA導入動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析する、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性についての解析、

(iii)DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

(iv)上記(iii)記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

(v)本発明の変異タンパク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導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク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導入動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA導入細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポト

10

20

30

40

50

ーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができる、本発明のタンパク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導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA導入動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

【0062】

10

〔8〕ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (2) 該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来の-lacZ-ガラクトシダーゼ遺伝子)を導入することにより不活性化された上記(1)記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である上記(1)記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記(1)記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである上記(4)記載の胚幹細胞、
- (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来の-lacZ-ガラクトシダーゼ遺伝子)を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる上記(6)記載の非ヒト哺乳動物、
- (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記(6)記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである上記(8)記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 上記(7)記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人为的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、あるいは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失することにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない(以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある)非ヒト哺乳動物の胚幹細胞(以下、ES細胞と略記する)をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0063】

30

本発明のDNAに人为的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞(以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する)の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ(-lacZ-ガラクトシダーゼ遺伝子)、cat(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子)を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のインtron部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列(例えば、polyA付加シグナルなど)を挿入し、完全なmRNAを合成

40

50

できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

【0064】

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活性化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知のEvansとKauffmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス（C57BL/6とDBA/2とのF₁）を用いて樹立したものなども良好に用いられる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を增幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

【0065】

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行なうことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO纖維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1~10000U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001~0.5%トリプシン/0.1~5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1~3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に

10

20

30

40

50

分化させることが可能であり〔M. J. Evans 及び M. H. Kauffman, ネイチャー(Nature)第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシードィングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーワエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.)第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。
10 該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0066】

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAに入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。
20

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。
30

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。
40

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活性DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活性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うる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1, ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活性DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得
50

る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病的モデルとなり得るので、これらの疾病的原因究明及び治療法の検討に有用である。

【0067】

[8a] 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有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。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

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

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病的症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

例えば、腎不全に対して予防・治療効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の血中クレアチニン量や、尿タンパク質量などを経時的に測定する。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して予防・治療効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

【0068】

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、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、リンゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

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、ヒトまたはその他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）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、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の腎不全の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合

10

20

30

40

50

物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の腎不全の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mg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、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

【0069】

〔8b〕本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。10

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるもののが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子(λ acZ)、可溶性アルカリリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

【0070】

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。20

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子(λ acZ)で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5'-プロモ-4'-クロロ-3'-インドリル- β -ガラクトピラノシド(X-gal)のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、 λ acZをコードするmRNAを検出してよい。30

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

【0071】

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸など)や塩基(例、アルカリ金属など)などの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、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、リンゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。40

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、腎疾患(例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、肝臓疾患(例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など)、膵臓疾患(例、膵炎など)、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾50

患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。
10

【0072】

また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を阻害し、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣囊腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチニン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。
20

上記化合物の中で好ましくは、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩である。
30

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

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、ヒトまたはその他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）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、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の腎不全患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の腎不全患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mg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、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。
40

【0073】

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の腎不全患者においては、一日につき該化
50

合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の腎不全患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mg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、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。10

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパク質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子導入動物）を作出すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

【0074】

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。20

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	
T	: チミン	
G	: グアニン	
C	: シトシン	30
RNA	: リボ核酸	
mRNA	: メッセンジャー・リボ核酸	
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	
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸	
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム	
Gly	: グリシン	40
Ala	: アラニン	
Val	: バリン	
Leu	: ロイシン	
Ile	: イソロイシン	
Ser	: セリン	
Thr	: スレオニン	
Cys	: システイン	
Met	: メチオニン	
Glu	: グルタミン酸	
Asp	: アスパラギン酸	50

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
 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
 p G l u : ピログルタミン酸

10

【0075】

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。

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
 T C : チアゾリジン - 4 (R) - カルボキサミド基
 T o s : p - トルエンスルフォニル
 C H O : ホルミル
 B z 1 : ベンジル
 C l₂ - B z 1 : 2, 6 - ジクロロベンジル
 B o m : ベンジルオキシメチル
 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 - プトキシカルボニル
 D N P : ジニトロフェニル
 T r t : トリチル
 B u m : t - プトキシメチル
 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 - 1 - 2, 3 - ベンゾトリアゾイン
 H O N B : 1 - ヒドロキシ - 5 - ノルボルネン - 2, 3 - ジカルボキシイミド
 D C C : N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド

20

30

【0076】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

実施例3で取得したヒトT C H 2 2 9タンパク質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：2]

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するヒトT C H 2 2 9タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：3]

実施例1、実施例2、実施例5、実施例6、実施例9および実施例10で用いられたプライマーA P 1の塩基配列を示す。

[配列番号：4]

実施例1、実施例3および実施例15で用いられたプライマーr r 1の塩基配列を示す。

[配列番号：5]

実施例1、実施例2、実施例5、実施例6、実施例9および実施例10で用いられたプライマーA P 2の塩基配列を示す。

40

50

[配列番号：6]

実施例1、実施例3および実施例15で用いられたプライマーrr2の塩基配列を示す。

[配列番号：7]

実施例1で用いられたプライマーrr3の塩基配列を示す。

[配列番号：8]

実施例1で用いられたプライマーrr4の塩基配列を示す。

[配列番号：9]

実施例2実施例3および実施例15で用いられたプライマーff1の塩基配列を示す。 10

[配列番号：10]

実施例2、実施例3および実施例15で用いられたプライマーff2の塩基配列を示す。

[配列番号：11]

実施例3で用いられたプライマーORFF1の塩基配列を示す。

[配列番号：12]

実施例3で用いられたプライマーORFR1の塩基配列を示す。

[配列番号：13]

実施例3で用いられたプライマーORFF2の塩基配列を示す。

[配列番号：14]

実施例3で用いられたプライマーORFR2の塩基配列を示す。

[配列番号：15]

実施例3および実施例7で用いられたプライマーM13Fの塩基配列を示す。 20

[配列番号：16]

実施例3および実施例7で用いられたプライマーM13Rの塩基配列を示す。

[配列番号：17]

実施例3および実施例15で用いられたプライマーA1の塩基配列を示す。

[配列番号：18]

実施例3および実施例15で用いられたプライマーB2の塩基配列を示す。

[配列番号：19]

実施例4、実施例16および実施例17で用いられたプライマーティアムの塩基配列を示す。
。

[配列番号：20]

実施例4、実施例16および実施例17で用いられたプライマーティアムRの塩基配列を示す。
。

[配列番号：21]

実施例4、実施例16および実施例17で用いられたTaqManプローブP1の塩基配列を示す。

[配列番号：22]

実施例1で得られた塩基配列を示す。

[配列番号：23]

実施例1で得られた塩基配列を示す。

[配列番号：24]

実施例2で得られた塩基配列を示す。

[配列番号：25]

実施例3で得られた塩基配列を示す。

[配列番号：26]

実施例7で取得したマウスTCH229タンパク質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：27]

配列番号：26で表されるアミノ酸配列を有するマウスTCH229タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：28]

実施例5および実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。 50

[配列番号：29]

実施例5および実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：30]

実施例5で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：31]

実施例5および実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：32]

実施例6および実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：33]

実施例6および実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：34]

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：35]

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：36]

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：37]

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：38]

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：39]

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：40]

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：41]

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：42]

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：43]

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：44]

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：45]

実施例8および実施例13で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：46]

実施例8および実施例13で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：47]

実施例8および実施例13で用いられたプローブの塩基配列を示す。

[配列番号：48]

実施例5で得られた塩基配列を示す。

[配列番号：49]

実施例5で得られた塩基配列を示す。

[配列番号：50]

実施例6で得られた塩基配列を示す。

[配列番号：51]

実施例7で得られた塩基配列を示す。

[配列番号：52]

実施例11で取得したラットT C H 2 2 9タンパク質No.1のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：53]

配列番号：52で表されるアミノ酸配列を有するラットT C H 2 2 9タンパク質No.1 50

10

20

30

40

50

をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：54]

実施例11で取得したラットTCH229タンパク質No.2のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：55]

配列番号：54で表されるアミノ酸配列を有するラットTCH229タンパク質No.2をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：56]

実施例9で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：57]

実施例9で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：58]

実施例9で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：59]

実施例9で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：60]

実施例10で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：61]

実施例10および実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：62]

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：63]

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：64]

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：65]

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：66]

実施例11および実施例15で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：67]

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：68]

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：69]

実施例11、実施例12、実施例14および実施例18で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：70]

実施例11、実施例12、実施例14および実施例18で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：71]

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：72]

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：73]

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：74]

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：75]

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：76]

実施例12、実施例14および実施例18で用いられたプローブの塩基配列を示す。

10

20

30

40

50

[配列番号：77]

実施例9で得られた塩基配列を示す。

[配列番号：78]

実施例9で得られた塩基配列を示す。

[配列番号：79]

実施例10で得られた塩基配列を示す。

[配列番号：80]

実施例11で得られた塩基配列を示す。

[配列番号：81]

実施例11で得られた塩基配列を示す。

[配列番号：82]

実施例15で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：83]

実施例15で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：84]

実施例15で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

【0077】

後述の実施例3で取得されたエシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)TOP10/pCR-BluntII-TCR229は、2002年3月27日から、日本国茨城県つくば市東1-1-1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7983として、2002年3月12日から、大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人 発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16767としてそれぞれ寄託されている。

後述の実施例7で取得されたエシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)TOP10/pCR2.1-mTCR229は、2002年6月13日から、日本国茨城県つくば市東1-1-1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8076として、2002年6月4日から、大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人 発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16800として寄託されている。

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、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。

【0078】

実施例1

ヒトTCR229タンパク質をコードするcDNAの5'上流端のクローニング5'RACE PCR クローニングによりヒトTCR229タンパク質をコードするcDNAの5'上流塩基配列を明らかにした。

2種のプライマードNA、プライマーアP1(配列番号：3)およびプライマーリリ1(配列番号：4)を用いて、ヒト腎臓Marathon-Ready cDNA(クロンテック社製)に対して、Advantage 2 DNA Polymerase(クロンテック社製)により、以下の条件で一次PCRを行った。

(1) 94 30秒間

(2) 94 10秒間 - 63 3分間を35サイクル

さらに、この一次PCRの産物を鑄型として、プライマーアP2(配列番号：5)とプライマーリリ2(配列番号：6)を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase(クロンテック社製)により以下の条件でnested PCRを行った。

(3) 94 30秒間

10

20

30

40

50

(4) 94 10秒間 - 63 3分間を30サイクル

上記nested PCR反応液 5 μlにPCR Product Pre-Sequencing Kit(ユーエスピ社製)中のExonuclease IとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1 μl加え、37・15分、85・15分の反応を行った。これをプライマー-AP2(配列番号：5)、プライマー-r2(配列番号：6)およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシークエンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、配列番号：22に示す塩基配列を得た。

配列番号：22に示す塩基配列をもとにプライマー-rr3(配列番号：7)およびプライマー-rr4(配列番号：8)を設計した。プライマー-AP1(配列番号：3)およびプライマー-rr3(配列番号：7)を用いて、ヒト腎臓Marathon-Ready cDNA(クロントック社製)に対して、Advantage 2 DNA Polymerase(クロントック社製)により、以下の条件で一次PCRを行った。

(5) 94 30秒間

(6) 94 10秒間 - 63 2分間を35サイクル

さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマー-AP2(配列番号：5)とプライマー-rr4(配列番号：8)を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase(クロントック社製)により以下の条件でnested PCRを行った。

(7) 94 30秒間

(8) 94 10秒間 - 63 2分間を30サイクル

上記nested PCR反応液 5 μlにPCR Product Pre-Sequencing Kit(ユーエスピ社製)中のExonuclease IとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1 μl加え、37・15分、85・15分の反応を行った。これをプライマー-AP2(配列番号：5)とプライマー-rr4(配列番号：8)およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシークエンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、配列番号：23に示す塩基配列を得た。

【0079】

実施例2

ヒトTCH229タンパク質をコードするcDNAの3'下流端のクローニング3'RACE PCR クローニングによりヒトTCH229タンパク質をコードするcDNAの3'下塩基配列を明らかにした。

2種のプライマー-DNA、プライマー-AP1(配列番号：3)およびプライマー-ff1(配列番号：9)を用いて、ヒト腎臓Marathon-Ready cDNA(クロントック社製)に対して、Advantage 2 DNA Polymerase(クロントック社製)により、以下の条件で一次PCRを行った。

(1) 94 30秒間

(2) 94 10秒間 - 63 3分間を35サイクル

さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマー-AP2(配列番号：5)とプライマー-ff2(配列番号：10)を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase(クロントック社製)により以下の条件でnested PCRを行った。

(3) 94 30秒間

(4) 94 10秒間 - 63 3分間を30サイクル

上記nested PCR反応液 5 μlにPCR Product Pre-Sequencing Kit(ユーエスピ社製)中のExonuclease IとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1 μl加え、37・15分、85・15分の反応を行った。これをプライマー-AP2(配列番号：5)とプライマー-ff2(配列番号：10)を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase(クロントック社製)により以下の条件でnested PCRを行った。

10

20

30

40

50

5・15分の反応を行った。これをプライマーAP2(配列番号：5)とプライマーフフ2(配列番号：10)およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシークエンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、配列番号：24に示す塩基配列を得た。

【0080】

実施例3

ヒトTCH229タンパク質をコードするcDNAのクローニング

2種のプライマーDNA、プライマーORFF1(配列番号：11)およびプライマーオRFR1(配列番号：12)を用いて、ヒト腎臓Marathon-Ready cDNA(クロントック社製)に対して、pfu turbo DNA Polymerase(ストラタジーン社製)により、以下の条件(1)～(3)で一次PCRを行った。

(1) 94 30秒間

(2) 94 10秒間 - 57 10秒間 - 72 2.5分間を35サイクル

(3) 72 5分間

さらに、この一次PCRの産物を鑄型として、プライマーORFF2(配列番号：13)とプライマーORFR2(配列番号：14)を用いて、pfu turbo DNA Polymerase(ストラタジーン社製)により以下の条件(4)～(6)でnested PCRを行った。

(4) 94 30秒間

(5) 94 10秒間 - 56 10秒間 - 72 2.5分間を30サイクル

(6) 72 5分間

上記nested PCR反応液をMin Elute Gel Extraction Kit(キアゲン社製)を用いて精製した。このDNAを、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit(インビトロジエン社製)のプロトコールに従ってPCR-Blunt II-TOPOベクターへクローニングした。これをエシエリヒアコリ(Escherichia coli)TOP10 competent cell(インビトロジエン社製)に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地で選択し、形質転換体を得た。個々のクローンをカナマイシンを含むLB培地で一晩培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit(キアゲン社製)を用いてプラスミドDNAを調製し、プラスミドクローンpCR-Blunt II-TCH229の2クローン#1、#2および#3を得た。これをプライマーDNA[プライマーM13F(配列番号：15)、プライマーM13R(配列番号：16)、プライマーORFF2(配列番号：13)、プライマーORFR2(配列番号：14)、プライマerr2(配列番号：6)、プライマーA1(配列番号：17)、プライマーB2(配列番号：18)、プライマff2(配列番号：10)、プライマerr1(配列番号：4)、プライマff1(配列番号：9)]およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシークエンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、取得した3クローンは同一のDNA断片を含んでおり2251個の塩基配列を有していた(配列番号：25)。断片には724個のアミノ酸配列(配列番号：1)がコードされており(配列番号：2)、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質を、ヒトTCH229タンパク質と命名した。該cDNA断片を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシエリヒア・コリ(Escherichia coli)TOP10/pCR-Blunt II-TCH229と命名した。

Blast P(Nucleic Acids Res. 第25巻、3389頁、1997年)を用いて公知のデータベースに対してホモロジー検索を行ったところ、該cDN

Aは有機アニオントランスポータに属する新規遺伝子であることが判明した(図1および図2)。図中、膜貫通領域をTM1~12で示した。ヒトで報告されている有機アニオントランスポータであるSLC21A12(Biochemical and Biophysical Research Communications、第273巻、251頁、2000年)とはアミノ酸レベルで41%の相同性を、またOATPP4(GenBank Accession No. NM_030958)とはアミノ酸レベルで36%の相同性を示し、該タンパク質は12回膜貫通型の構造を有すると推測された。

【0081】

実施例4

ヒトTCH229遺伝子産物の組織分布の解析

ヒトTCH229の配列から設計した2種のプライマー-DNA、プライマー-TMF(配列番号:19)およびプライマー-TMR(配列番号:20)と、TaqManプローブP1(配列番号:21)を用いて、ヒトの各組織のcDNAにおけるヒトTCH229の発現量をTaqMan PCRにより測定した。

反応はTaqMan Universal PCR Master Mix(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system(アプライドバイオシステムズ社製)にて最初502分間、さらに9510分間おいた後で、95で15秒、60で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

測定に用いたヒトの各組織のcDNAを表1に示す。

結果を図3および図4に示す。

ヒトTCH229遺伝子産物(mRNA)は、Human MTC panel IおよびMTC panel IIにおいては、腎臓で強い発現が見られ、肺、肝臓、脾臓で弱い発現が見られた。

Human digestive system MTC panelにおいては、肝臓で比較的強い発現が見られたが、胃から直腸まですべての部位では若干の発現しか見られなかった。

【表1】

cDNA (いずれもクロンテック社製)	組 織	
Human MTC panel I	心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、 腎臓、脾臓	30
Human MTC panel II	脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、 小腸、結腸、末梢血白血球	
Human digestive system	肝臓、食道、胃、十二指腸、空腸、	40
MTC panel	回腸、回盲部、盲腸、上行結腸、 横行結腸、下行結腸、直腸	

【0082】

実施例5

マウスTCH229タンパク質をコードするcDNAの5'上流端のクローニングPCRクローニングおよび5'RACE PCRクローニングによりマウスTCH229タンパク質をコードするcDNAの5'上流塩基配列を明らかにした。

2種のプライマー-DNA(プライマー-h243F(配列番号:28)およびプライマー-m

50

R 1 (配列番号：29)]を用いて、マウス腎臓Marathon-Ready cDNA (クロントック社製)に対して、Advantage 2 DNA Polymerase (クロントック社製)により、以下の条件でPCRを行った。

(1) 94 30秒間

(2) 94 10秒間 - 63 10秒間 - 68 2分間を35サイクル

(3) 68 3分間

上記PCR反応液5μlにPCR Product Pre-Sequencing Kit (ユーエスピ社製)中のExonuclease IとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1μl加え、37・15分、85・15分の反応を行った。これをプライマー-h243F (配列番号：28)、プライマーマR1 (配列番号：29)およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシークエンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、配列番号：48に示す塩基配列を得た。
10

配列番号：48を基にプライマーマrr5 (配列番号：30)およびプライマーマrr6 (配列番号：31)を設計した。2種のプライマー-DNA [プライマーアP1 (配列番号：3)およびプライマーマrr6 (配列番号：31)]を用いて、マウス腎臓Marathon-Ready cDNA (クロントック社製)に対して、Advantage 2 DNA Polymerase (クロントック社製)により、以下の条件で一次PCRを行った。
20

(1) 94 30秒間

(2) 94 10秒間 - 64 4分間を40サイクル

さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーアP2 (配列番号：5)とプライマーマrr5 (配列番号：30)を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase (クロントック社製)により以下の条件でnested PCRを行った。
。

(3) 94 30秒間

(4) 94 10秒間 - 64 3分間を35サイクル

上記nested PCR反応液5μlにPCR Product Pre-Sequencing Kit (ユーエスピ社製)中のExonuclease IとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1μl加え、37・15分、85・15分の反応を行った。これをプライマーマrr5 (配列番号：30)およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシークエンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、配列番号：49に示す塩基配列を得た。
30

【0083】

実施例6

マウスTCH229タンパク質をコードするcDNAの3'下流端のクローニング
3'RACE PCR クローニングによりマウスTCH229タンパク質をコードする
cDNAの3'上流塩基配列を明らかにした。
40

2種のプライマー-DNA [プライマーアP1 (配列番号：3)およびプライマーマF1 (配列番号：32)]を用いて、マウス腎臓Marathon-Ready cDNA (クロントック社製)に対して、Advantage 2 DNA Polymerase (クロントック社製)により、以下の条件で一次PCRを行った。

(1) 94 30秒間

(2) 94 10秒間 - 61 4分間を40サイクル

さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーアP2 (配列番号：5)とプライマーマff2 (配列番号：33)を用いて、Advantage 2 DNA Pol
50

ymerase (クロントック社製)により以下の条件でnested PCRを行った。

(3) 94 30秒間

(4) 94 10秒間 - 61 3分間を35サイクル

上記nested PCR反応液5μlにPCR Product Pre-Sequencing Kit (ユーエスピ社製)中のExonuclease IとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1μl加え、37・15分、85・15分の反応を行った。これをプライマー-mff2 (配列番号: 33) およびBig Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシークエンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、配列番号: 50に示す塩基配列を得た。
10

【0084】

実施例7

マウスTCH229タンパク質をコードするcDNAのクローニング

2種のプライマー-DNA [プライマー-mORFF (4) (配列番号: 34) およびプライマー-mORFR (2195) (配列番号: 35)]を用いて、マウス腎臓Marathon-Ready cDNA (クロントック社製)に対して、pfu turbo DNA Polymerase (ストラタジーン社製)により、以下の条件(1)~(3)で一次PCRを行った。
20

(1) 94 30秒間

(2) 94 10秒間 - 56 10秒間 - 72 2分間を35サイクル

(3) 72 5分間

さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマー-mORFF (atg) (配列番号: 36)とプライマー-mORFR (tga) (配列番号: 37)を用いて、pfu turbo DNA Polymerase (ストラタジーン社製)により以下の条件(4)~(6)でnested PCRを行った。
30

(4) 94 30秒間

(5) 94 10秒間 - 56 10秒間 - 72 2分間を30サイクル

(6) 72 5分間

上記nested PCR反応液10μlにAdvantage 2 DNA Polymerase (クロントック社製)を1.5μl加え、72、10分間の反応の後、Min Elute Gel Extraction Kit (キアゲン社製)を用いて精製した。このDNAを、TOPOTACloning Kit (インビトロジェン社製)のプロトコールに従ってPCR 2.1-TOPOTベクターへクローニングした。これをエシエリヒアコリ (Escherichia coli) TOP10 competent cell (インビトロジェン社製)に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地で選択し、形質転換体を得た。個々のクローンをカナマイシンを含むLB培地で一晩培養し、QIAwell 8 Plate mid Kit (キアゲン社製)を用いてプラスミドDNAを調製し、プラスミドクローンpCR 2.1-mTCH229の2クローン#1、#2および#3を得た。これをプライマー-DNA [プライマー-M13F (配列番号: 15)、プライマー-M13R (配列番号: 16)、プライマー-h243F (配列番号: 28)、プライマー-mR1 (配列番号: 29)、プライマー-h650F (配列番号: 38)、プライマー-h910F (配列番号: 39)、プライマー-mrr1 (配列番号: 40)、プライマー-mrr2 (配列番号: 41)、プライマー-mrr3 (配列番号: 42)、プライマー-F (45) (配列番号: 43)、プライマー-m521R (配列番号: 44)、プライマー-mF1 (配列番号: 32)、プライマー-mff2 (配列番号: 33)、プライマー-mrr6 (配列番号: 31)]およびBig Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、挿入されているcDNA 40

50

断片の塩基配列をDNAシークエンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、取得した3クローンは同一のDNA断片を含んでおり2169個の塩基配列を有していた(配列番号:51)。断片には722個のアミノ酸配列(配列番号:26)がコードされており(配列番号:27)、配列番号:26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質を、マウスTCH229タンパク質と命名した。

該cDNA断片を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)TOP10/pCR2.1-mTCH229と命名した。Blast P(Nucleic Acids Res. 第25巻、3389頁、1997年)を用いて公知データベースに対してホモロジー検索を行ったところ、該cDNAはマウスで報告されている有機アニオントランスポータであるマウスSLC21A11(Genbank:NP_076397)と塩基レベルで43.2%、アミノ酸レベルで37%の相同性を示した。またマウスTCH229は有機アニオントランスポータファミリーに属する新規遺伝子であるヒトTCH229と塩基レベルで83%、アミノ酸レベルで81%の相同性を示したことより、ヒトTCH229のマウスホモログであることが判明した(図5)。図中、膜貫通領域をTM1~12で、またファミリー間で高く保存されているアミノ酸箇所で*で示した。

【0085】

実施例8

マウスTCH229遺伝子産物の組織分布の解析

マウスTCH229の配列から設計した2種のプライマー-DNA、プライマー-mTMF(配列番号:45)およびプライマー-mTMR(配列番号:46)と、TaqManプローブmP1(配列番号:47)を用いて、マウスの各組織のcDNAにおけるマウスTCH229の発現量をTaqMan PCRにより測定した。

反応はTaqMan Universal PCR Master Mix(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system(アプライドバイオシステムズ社製)にて最初502分間、さらに9510分間おいた後で、95で15秒、60で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

結果を図6に示す。

マウスTCH229遺伝子産物(mRNA)は、mause MTC panel IおよびMTC panel IIにおいては、前立腺で強い発現が見られ、骨髄、目、肺、腎臓においても比較的高い発現が見られた。

【0086】

実施例9

ラットTCH229タンパク質をコードするcDNAの5'上流クローニングPCRクローニングおよび5'RACE PCR クローニングによりラットTCH229タンパク質をコードするcDNAの5'上流塩基配列を明らかにした。

マウスTCH229の配列(配列番号:51)を基に設計した2種のプライマー-DNA、プライマー-m163F(配列番号:56)およびプライマー-m2087R(配列番号:57)を用いて、ラット腎臓Marathon-Ready cDNA(クロンテック社製)に対して、Advantage 2 DNA Polymerase(クロンテック社製)により、以下の条件でPCRを行った。

(1) 94 30秒間

(2) 94 10秒間 - 60 10秒間 - 68 2.5分間を35サイクル

(3) 68 5分間

上記PCR反応液 5μlにPCR Product Pre-Sequencing Kit(ユーエスピ社製)中のExonuclease IとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1μl加え、37・15分、85・15分の反応を行った。これをプライマー-m163F(配列番号:56)、プライマー-m2087

10

20

30

40

50

R(配列番号:57)およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシークエンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、配列番号:77に示す塩基配列を得た。

配列番号77を基にプライマー-r229-rr1(配列番号:58)およびプライマー-r229-rr2(配列番号:59)を設計した。2種のプライマー-DNA、プライマー-AP1(配列番号:3)およびプライマー-r229-rr1(配列番号:58)を用いて、ラット腎臓Marathon-Ready cDNA(クロンテック社製)に対して、Advantage 2 DNA Polymerase(クロンテック社製)により、以下の条件で一次PCRを行った。
10

(1) 94 30秒間

(2) 94 10秒間 - 64 2分間を35サイクル

さらに、この一次PCRの産物を鑄型として、プライマー-AP2(配列番号:5)とプライマー-r229-rr2(配列番号:59)を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase(クロンテック社製)により以下の条件でnested PCRを行った。

(3) 94 30秒間

(4) 94 10秒間 - 64 2分間を35サイクル

上記nested PCR反応液5μlにPCR Product Pre-Sequencing Kit(ユーエスピ社製)中のExonuclease IとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1μl加え、37・15分、85・15分の反応を行った。これをプライマー-r229-rr2(配列番号:59)とBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシークエンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、配列番号:78に示す塩基配列を得た。
20

【0087】

実施例10
30

ラットTCH229タンパク質をコードするcDNAの3'下流端のクローニング3'RACE PCR クローニングによりラットTCH229タンパク質をコードするcDNAの3'下流塩基配列を明らかにした。

2種のプライマー-DNA、プライマー-AP1(配列番号:3)およびプライマー-rfff1(配列番号:60)を用いて、ラット腎臓Marathon-Ready cDNA(クロンテック社製)に対して、Advantage 2 DNA Polymerase(クロンテック社製)により、以下の条件で一次PCRを行った。

(1) 94 30秒間

(2) 94 10秒間 - 64 2分間を35サイクル

さらに、この一次PCRの産物を鑄型として、プライマー-AP2(配列番号:5)とプライマー-rfff3(配列番号:61)を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase(クロンテック社製)により以下の条件でnested PCRを行った。
40

(3) 94 30秒間

(4) 94 10秒間 - 64 2分間を30サイクル

上記nested PCR反応液5μlにPCR Product Pre-Sequencing Kit(ユーエスピ社製)中のExonuclease IとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1μl加え、37・15分、85・15分の反応を行った。これをプライマー-rfff3(配列番号:61)およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(アプラ
50

イドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシークエンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、配列番号:79に示す塩基配列を得た。

【0088】

実施例11

ラットTCH229タンパク質をコードするcDNAのクローニング

2種のプライマー-DNA、プライマー-rORFF1(配列番号:62)およびプライマerrORFR12(配列番号:63)を用いて、ラット腎臓Marathon-Ready cDNA(クロントック社製)に対して、pfuturbo DNA Polymerase(ストラタジーン社製)により、以下の条件(1)~(3)で一次PCRを行った。

(1) 94 30秒間

(2) 94 10秒間 - 56 10秒間 - 72 2.5分間を35サイクル

(3) 72 5分間

さらに、この一次PCRの産物を鑄型として、プライマー-rORFF(atg)(配列番号:64)とプライマー-rORFR(tga2)(配列番号:65)を用いて、pfuturbo DNA Polymerase(ストラタジーン社製)により以下の条件(4)~(6)でnested PCRを行った。

(4) 94 30秒間

(5) 94 10秒間 - 56 10秒間 - 72 2.5分間を30サイクル

(6) 72 5分間

上記nested PCR反応液10μlにAdvantage 2 DNA Polymerase(クロントック社製)を1.5μl加え、72、10分間の反応の後、Min Elute Gel Extraction Kit(キヤゲン社製)を用いて精製した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit(インビトロジェン社製)のプロトコールに従ってpCR II-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒアコリ(Escherichia coli)TOP10 competent cell(インビトロジェン社製)に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地で選択し、形質転換体を得た。個々のクローンをカナマイシンを含むLB培地で一晩培養し、QIAwelle 8 Plasmid Kit(キヤゲン社製)を用いてプラスミドDNAを調製し、プラスミドクローンpCR II-rTCH229の4クローン#1、#2、#3および#4を得た。これをプライマー-DNA[プライマー-T7(配列番号:66)、プライマー-SP6(配列番号:67)、プライマー-rORFF(atg)(配列番号:64)、プライマー-rORFR(tga2)(配列番号:65)、プライマー-rF1(配列番号:68)、プライマー-rTMR(配列番号:69)、プライマー-rTMF(配列番号:70)、プライマー-rff3(配列番号:61)、プライマー-rff2(配列番号:71)、プライマー-rR1(配列番号:72)、プライマー-r972F(配列番号:73)、プライマー-r1123F(配列番号:74)、プライマー-r1746R(配列番号:75)]およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシークエンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。

その結果、取得した4クローンは2種類のDNA断片(No.1およびNo.2)を含んでいた。No.1は2175個の塩基配列を有しており(配列番号:80)、断片には724個のアミノ酸配列(配列番号:52)がコードされており(配列番号:53)、配列番号:52で表されるアミノ酸配列を含有していた。No.2は2175個の塩基配列を有しており(配列番号:81)、断片には724個のアミノ酸配列(配列番号:54)がコードされており(配列番号:55)、配列番号:55で表されるアミノ酸配列を含有していた。それぞれのタンパク質を、ラットTCH229タンパク質No.1およびラットTCH229タンパク質No.2と命名した。該c

10

20

30

40

50

DNA断片を含むプラスミドを有する形質転換体をそれぞれ、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)TOP10/pCRII-rTCH229No.1およびエシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)TOP10/pCRII-rTCH229No.2と命名した。

ラットTCH229タンパク質No.1およびラットTCH229タンパク質No.2には、4箇所(配列番号:53で表される塩基配列の144番目、231番目、1252番目および1539番目)の塩基置換が認められた。4箇所のうちA144T(GluAsp)、C231A(SerArg)、A1252T(IlePhe)の3箇所は、それぞれ括弧内に示したアミノ酸置換を伴うものであったが、A1539Gはアミノ酸置換は無かった。これらの塩基置換は遺伝子多型(SNPs)に由来する可能性があると考えられる。10

Blast P(Nucleic Acids Res. 第25巻、3389頁、1997年)を用いて公知データベースに対してホモロジー検索を行ったところ、ラットTCH229No.1およびNo.2は、ラットで報告されている有機アニオントランスポータであるラットoatp-E(Endocrinology 第142巻(5)、2005頁、2001年)と塩基レベルで約50%、アミノ酸レベルで約41%の相同性を示した。またラットTCH229No.1およびNo.2は有機アニオントランスポータファミリーに属する新規遺伝子であるヒトTCH229と塩基レベルで約81.4%、アミノ酸レベルで約81.6%の相同性を示したことより、ヒトTCH229のラットホモログであることが判明した(図7および図8)。図中、膜貫通領域をTM1~12で示す。20

【0089】

実施例12

ラットTCH229遺伝子産物の組織分布の解析

ラットTCH229の配列から設計した2種のプライマー-DNA、プライマー-rTMRF(配列番号:70)およびプライマーラットTMR(配列番号:69)と、TaqManプローブrP1(配列番号:76)を用いて、ラットの各組織(脾臓、胸腺、精巣、小腸、胃、皮膚、心臓、脳、肺、筋肉、腎臓)のcDNAにおけるラットTCH229の発現量をTaqMan PCRにより測定した。

反応はTaqMan Universal PCR Master Mix(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system(アプライドバイオシステムズ社製)にて最初502分間、さらに9510分間おいた後で、95で15秒、60で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。結果を図9に示す。30

ラットTCH229遺伝子産物(mRNA)は、Multiple Choice cDNAs; RatKit IおよびRatKit II(オリジーン社製)においては、肺と腎臓で強い発現が見られ、皮膚、脳においても発現が見られた。

【0090】

実施例13

マウスTCH229遺伝子産物の7週齢BALB/cマウスにおける組織分布の解析

(1) 正常マウス各組織のcDNAの調製40

7週齢BALB/cマウスの各組織〔大脳、小脳、海馬、延髄、脊髄、坐骨神経、皮膚、骨格筋、眼球、心臓、肺、気管、脾臓、腎臓、肝臓、前胃、後胃、十二指腸、空回腸、盲腸、結腸、直腸、脾臓、胸腺、骨髄、卵巣、子宮、前立腺、精巣(卵巣および子宮は雌から、それ以外は雄から、各1~10匹分を採取)〕より、ISOGEN(ニッポンジン社製)、またはRNeasy Mini Kit(キヤゲン社製)を用いてtotal RNAを調製した。調製したtotal RNAに対してTaqMan Reverse Transcription Reagents(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。

(2) マウスTCH229遺伝子産物の組織分布の解析

実施例8で用いた2種のプライマー-DNA、プライマーラットTMRF(配列番号:45)およ50

びプライマー-m T M R (配列番号: 46)と、TaqManプローブm P 1 (配列番号: 47)を用いて、上記のマウス各組織のcDNAにおけるマウスTCH229の発現量(コピー数)をTaqMan PCRにより測定した。同じcDNAについてTaqMan rodent GAPDH control reagents(アプライドバイオシステムズ社製)を用いてrodent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)の発現量(コピー数)も測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system(アプライドバイオシステムズ社製)にて最初50 2分間、さらに95 10分間おいた後で、95 で15秒、60 で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。
結果を図10に示す。

マウスTCH229遺伝子産物(mRNA)は7週齢BALB/cマウスの各組織においては、前立腺、気管、腎臓、骨髄で若干の発現が見られ、肺で高い発現が見られた。

【0091】

実施例14

(1) 正常ラット各組織のcDNAの調製

12週齢Wistarラット雄の各組織(大脳、小脳、肝臓、腎臓、前立腺、心臓、肺、十二指腸、空回腸、結腸、皮膚、眼球)より、RNeasy Mini Kit(キヤゲン社製)を用いてtotal RNAを調製した。調製したtotal RNAに対してTaqMan Reverse Transcription Reagents(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。
20

(2) ラットTCH229遺伝子産物の組織分布の解析

実施例12で用いた2種のプライマー-DNA、プライマー-rTMF(配列番号: 70)およびプライマー-rTMF(配列番号: 69)と、TaqManプローブrP1(配列番号: 76)を用いて、上記のラット各組織のcDNAにおけるラットTCH229の発現量(コピー数)をTaqMan PCRにより測定した。同じcDNAについてTaqMan rodent GAPDH control reagents(アプライドバイオシステムズ社製)を用いてrodent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)の発現量(コピー数)も測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system(アプライドバイオシステムズ社製)にて最初50 2分間、さらに95 10分間おいた後で、95 で15秒、60 で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。
30

結果を図11に示す。

ラットTCH229遺伝子産物(mRNA)は12週齢Wistarラットの組織においては、腎臓、肺で高い発現が見られた。

【0092】

実施例15

ヒトTCH229発現ベクターの構築

ヒトTCH229(配列番号: 1)発現ベクターを、以下の方法により作成した。

実施例1により得られたプラスミド10ngを鑄型として、プライマー229OF2(配列番号: 82)およびプライマー229OR2(配列番号: 83)を用いて、pfuturbo DNA Polymerase(ストラタジーン社製)により以下の条件(1)~(3)でPCRを行った。5'末端側プライマー229OF2および3'末端側プライマー229OR2は、ベクターへのクローニングのために5'末端側にそれぞれEcoRVサイトおよびXhoIサイトを付加するように設計した。
40

(1) 94 30秒間

(2) 94 10秒間 - 55 10秒間 - 70 2.5分間を35サイクル

10

30

40

50

(3) 70 5分間

上記PCR反応液をゲル電気泳動後、主要バンドを精製した。これにより得られたPCR断片を、制限酵素EcoRVおよびXhoIを用いて、37で1時間保温することにより消化し、この反応液をゲル電気泳動後、精製した。これを、動物細胞発現ベクターであるpCDNA3.1(+)（インビトロジエン社製）のEcoRVサイトおよびXhoIサイトに、Takara ligation kit ver.2（タカラバイオ社製）を用いてライゲーションした。このライゲーション反応液をエタノール沈殿処理後、コンピーテント細胞である大腸菌(*Escherichia coli*)TOP10（インビトロジエン社製）に形質転換した。これにより得られた複数のコロニーからプラスミドを調製し、この塩基配列をプライマー-DNA〔プライマー-BGH RV（配列番号：84）、プライマー-T7（配列番号：66）、プライマー-229OF2（配列番号：82）、プライマー-229OR2（配列番号：83）、プライマー-rr2（配列番号：6）、プライマー-A1（配列番号：17）、プライマー-B2（配列番号：18）、プライマー-ff2（配列番号：10）、プライマー-rr1（配列番号：4）、プライマー-ff1（配列番号：9）〕]、およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、塩基配列をDNAシークエンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて確認した。このプラスミドを有する形質転換体を、*Escherichia coli* TOP10/pCDNA3.1(+) - TCH229と命名した。

10

20

30

40

50

【0093】

実施例16

ヒトTCH229発現CHO細胞株の作製および導入遺伝子発現量の測定

Escherichia coli TOP10/pCDNA3.1(+) - TCH229を培養し、この大腸菌体からEndoFree Plasmid Maxi Kit（キヤゲン社製）を用いてプラスミドDNAを調製した。このプラスミドDNAをFUGE NE 6 Transfection Reagent（ロシュ社製）を用いて添付のプロトコールに従ってCHO dhfr⁻細胞に導入した。2μgのプラスミドDNAとトランスクレクション試薬との混合液を、24時間前に 2×10^5 個のCHO dhfr⁻細胞を播種した直径6cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清（JRHバイオサイエンス社製）を含むMEM培地（インビトロジエン社製）で1日間培養した後培地に1.0mg/mlのジェネティシン（インビトロジエン社製）を添加し、その後さらにTCH229発現細胞を培養した。途中何回か培地交換を行い、約10日間後トリプシン処理により細胞をはがし、回収した細胞を1wellあたり0.5~1個で96well plateに播種し、その後約10日間1.0mg/mlのジェネティシンを含んだ培地中でTCH229発現細胞を選択した。1wellあたり1コロニーの増殖が見られたwellについて、増殖した細胞からRNeasy Mini KitまたはRNeasy 96 Kit（ともにキヤゲン社製）を用いてtotal RNAを調製した。調製したtotal RNAに対してTaqMan Reverse Transcription Reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。これについて、実施例4で用いた2種のプライマー-DNA、プライマー-TMF（配列番号：19）およびプライマー-TMR（配列番号：20）と、Taq ManプロープP1（配列番号：21）を用いて、ヒトTCH229の発現量をTaqMan PCRにより測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプライドバイオシステムズ社製）にて、最初502分間、さらに9510分間おいた後で、95で15秒、60で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。ヒトTCH229遺伝子高発現細胞株（モノクローナル）として、クローンNo.71を選択した。

【0094】

実施例 17

ヒト T C H 2 2 9 遺伝子の市販正常ヒト細胞における発現解析

(1) 正常ヒト細胞 c D N A の調製

正常ヒト細胞は C a m b r e x B i o S c i e n c e W a l k e r s v i l l 社製品を購入し、製品添付の使用説明書記載の方法に従って培養した。実験に使用した細胞を表2に示す。

【表2】

細胞名 (*はTNF- α ,IL-1 β ,IL-6刺激あり)	
1 脊髄静脈血管内皮細胞	10
2 大動脈血管内皮細胞	
3 冠状動脈血管内皮細胞	
4 大動脈平滑筋細胞	
5 冠状動脈平滑筋細胞	
6 子宮平滑筋細胞	
7 気管支平滑筋細胞	
8 骨格筋衛星細胞	
9 乳腺上皮細胞	
10 気管支上皮細胞 (RA添加)	20
11 気管支上皮細胞 (RA無添加)	
12 肺纖維芽細胞	
13 腎臓近位尿細管上皮細胞	
14 メサンギウム細胞	
15 腎臓皮質上皮細胞	
16 間葉系幹細胞	
17 膝関節軟骨細胞	
18 骨芽細胞	
19 皮膚微小血管内皮細胞 *	30
20 肺微小血管内皮細胞 *	
21 肺動脈血管内皮細胞 *	
22 細気管支上皮細胞 *	
23 腎上皮細胞 *	
24 前立腺間質細胞 *	
25 表皮角化細胞 *	

各細胞を 75 cm^2 培養フラスコにサブコンフルエントになるよう培養した。表中の * 印のついた細胞については、 TNF- α 、 IL-1 および IL-6 が各々最終濃度が $10 \text{ ng/m}\ell$ になるように加えた。 * 印が付されていない細胞については培養開始から 16 時間後に、 * 印が付された細胞については TNF- α 、 IL-1 および IL-6 の混合物を添加してから 8 時間後に、各細胞を、トリプシン - E D T A 処理により回収した。回収した細胞から、 I S O G E N (ニッポンジーン社製)、または R Ne a s y M i n i K i t (キアゲン社製)を用いて total RNA を調製した (いずれの場合も D N a s e 処理により混入 D N A を除去した)。調製した total RNA に対して T a q M a n R e v e r s e T r a n s c r i p t i o n R e a g e n t s (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて逆転写反応を行い c D N A を調製した。

(2) 種々の刺激を加えたヒト正常細胞 c D N A の調製

a) 腎臓近位尿細管上皮細胞 (R P T E C) および腎臓皮質上皮細胞 (H R C E) (いずれの場合も D N A s e 処理により混入 D N A を除去した)。

れも Cambrex Bioscience Walkersville 社製) をコラーゲン I コートした 24 well プレートに 1×10^5 個ずつ播種し、一晩培養後、トリヨードチロニン (T3) フリーのブレッドキット REGM (BIO WHITTAKER 社製) に置換し、更に 30 分培養した。

b) 刺激剤としては、TGF-1 (和光純薬社製)、TNF- (ジェンザイム社製)、IL-1 (ジェンザイム社製)、IL-6 (ジェンザイム社製) および PMA (和光純薬社製) を用いた。これら 5 種の刺激剤をそれぞれ、T3 フリーのブレッドキット REGM (BIO WHITTAKER 社製) で最終濃度が 10 ng / ml になるよう希釈した溶液を準備した。

c) 上記 a) の RPTEC および HRC E の培養上清を除去後、直ちに上記 b) で調製した溶液を、1 wellあたり 500 μl ずつ添加し、培養を行なった。コントロールとして、上記 5 種の刺激剤が溶けている溶媒の混合物を、T3 フリーのブレッドキット REGM (BIO WHITTAKER 社製) で刺激剤と同じ割合で希釈した溶液を準備し、RPTEC および HRC E に 1 wellあたり 500 μl ずつ添加し、培養を行なった。

d) 刺激剤添加後、0.5、1、2、4、6 および 8 時間後に、それぞれ細胞を回収し、RNasey Mini Kit (キアゲン社製) を用いて total RNA を調製した。調製した total RNA に対して TaqMan Reverse Transcription Reagents (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて逆転写反応を行い cDNA を調製した。

(3) ヒト TCH229 遺伝子の市販正常ヒト細胞における発現解析

実施例 4 で用いた 2 種のプライマー-DNA、プライマー-TMF (配列番号: 19) およびプライマー-TMR (配列番号: 20) と、TaqMan プローブ P1 (配列番号: 21) を用いて、上記の正常ヒト細胞および刺激剤で刺激した RPTEC および HRC E からそれぞれ調製した cDNA において、ヒト TCH229 の発現量 (コピー数) を TaqMan PCR により測定した。上記の正常ヒト細胞および刺激剤で刺激した RPTEC および HRC E からそれぞれ調製した cDNA について、Eukaryotic 18S rRNA Pre-Developed TaqMan Assay Reagents (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて ribosomal RNA (18S) の発現量 (コピー数)、または Human GAPD (GAPDH) (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量 (コピー数) も測定した。反応は、TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system (アプライドバイオシステムズ社製) にて最初 50 2 分間、さらに 95 10 分間おいた後で、95 で 15 秒、60 で 1 分を 1 反応サイクルとして 40 サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

ヒト正常細胞におけるヒト TCH229 の発現変動を図 12 に示す。表 2 において *印が付された細胞については TNF- 、 IL-1 および IL-6 (各々 10 ng / ml) で刺激したが、無刺激の場合と比較して発現変動はほとんど認められず、かつ発現もほとんど認められなかった。

刺激剤で刺激した RPTEC におけるヒト TCH229 の発現変動を図 13 に、刺激剤で刺激した HRC E におけるヒト TCH229 の発現変動を図 14 に示す。

ヒト TCH229 遺伝子産物 (mRNA) は腎臓近位尿細管上皮細胞で特異的な発現が見られ、腎臓皮質上皮細胞で若干の発現が見られた。また、RPTEC および HRC E を、TGF-1、TNF- 、 IL-1 または PMA で各々で刺激したときにコントロールと比較して、ヒト TCH229 の発現が培養時間依存的に減少することが確認できた。

【0095】

実施例 18

腎疾患モデル (Wistar Fatty, SHC, Zucker Fatty) ラット腎臓におけるラット TCH229 遺伝子産物の発現解析

10

20

30

40

50

疾患モデル動物として、Wistar Fatty ラット(WFラット)、Zucker Fatty ラット(ZFラット)、自然発症高コレステロール血症ラット(SHCラット)の3種類を用い、それぞれに対応する対照として、WFラットに対してはWistar Lean Rat(WLラット)、ZFラットに対してはZucker Lean Rat(ZLラット)、SHCラットに対してはSD Rat(SDラット)を使用した。

Wistar Fatty ラット(WFラット)は、腎機能低下症状に加え糖尿病に特徴的は症状を示すことから、糖尿病性腎症モデルとして(Frontiers in diabetes research, lessons from animal diabetes II, 535-541, 1988年)、Zucker Fatty ラット(ZFラット)は、WFラットと同様に腎機能低下と糖尿病の症状を合わせて呈することから、糖尿病性腎症モデルとして(Kidney international, 52巻, S218-S220頁, 1997年)、自然発症高コレステロール血症ラット(SHCラット)は、ヒト巣状糸球体硬化症と類似の症状を示すことから、巣状糸球体硬化症モデルとして(日本腎臓学界誌, 37巻, 91-99頁, 1995年)報告されている。

(1) 疾患モデル動物と対照動物と同じ条件で飼育し、WFラットおよびWLラットでは生後13週(発症前)、20週(発症後)、42週(進展期)および68週(腎機能低下期)に、SHCラットおよびSDラットでは生後6週(発症前)、12週(発症後)、20週(進展期)および26~30週(腎機能低下期)に、ZFラットおよびZLラットでは生後8週(発症前)および27週(発症後)に、以下のようにtotal RNAを抽出した。

WFラット群(各週齢n=5)、WLラット群(各週齢n=5)、SHCラット群(各週齢n=5)、SDラット群(各週齢n=5)、ZFラット群(各週齢n=9)、ZLラット群(各週齢n=9)の腎臓を、乳頭部を含む割断面で約100mgになるようにスライスし、ISOGENを用いて、添付のマニュアルに従い、total RNAを抽出した。さらにQIAGEN RNeasy Mini kit(キアゲン社製)およびRNAse-Free DNase set(キアゲン社製)を用いて、混入DNAを除去した。調製したtotal RNAに対してTaqMan Reverse Transcription Reagents(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。

【0096】

(2) 腎疾患モデルラット腎臓におけるラットTCH229遺伝子産物の発現解析実施例12で用いた2種のプライマー-DNA、プライマー-rTMF(配列番号:70)およびプライマー-rTMR(配列番号:69)と、TaqManプローブrP1(配列番号:76)を用いて、上記(1)で調製した腎疾患モデルラット腎臓cDNAにおけるラットTCH229の発現量(コピー数)をTaqMan PCRにより測定した。同じcDNAについてTaqMan rodent GAPDH control reagents(アプライドバイオシステムズ社製)を用いてrodent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)の発現量(コピー数)も測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system(アプライドバイオシステムズ社製)にて最初502分間、さらに9510分間おいた後で、95で15秒、60で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。WFラット群の結果を図15、SHCラット群の結果を図16に、ZFラット群の結果を図17にそれぞれ示す。

ラットTCH229は3種類すべての腎疾患モデルラット腎臓で、腎障害が発症した後にその発現が各対照群と比べて減少した。このことから、TCH229は腎症などの腎疾患に関与する可能性が考えられる。

10

20

30

40

50

【0097】

【発明の効果】

本発明のタンパク質、ポリヌクレオチドおよび抗体などは、例えば腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの診断マーカー等として有用である。該タンパク質、ポリヌクレオチドまたは抗体などを用いるスクリーニング法により得られる該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物は、該タンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物、該タンパク質の発現を促進または阻害する化合物などは、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などとして使用することができる。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

【0098】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 Takeda Chemical Industries, Ltd.

〈120〉 Novel Protein and its DNA

〈130〉 B03055

〈150〉 JP 2002-061133

〈151〉 2002-03-06

〈150〉 JP 2002-098852

10

〈151〉 2002-04-01

〈150〉 JP 2002-184883

〈151〉 2002-06-25

〈160〉 84

〈210〉 1

〈211〉 724

〈212〉 PRT

20

〈213〉 Human

〈400〉 1

Met Lys Ser Ala Lys Gly Ile Glu Asn Leu Ala Phe Val Pro Ser Ser

5 10 15

Pro Asp Ile Leu Arg Arg Leu Ser Ala Ser Pro Ser Gln Ile Glu Val

20 25 30

Ser Ala Leu Ser Ser Asp Pro Gln Arg Glu Asn Ser Gln Pro Gln Glu

35 40 45

Leu Gln Lys Pro Gln Glu Pro Gln Lys Ser Pro Glu Pro Ser Leu Pro

50 55 60

Ser Ala Pro Pro Asn Val Ser Glu Glu Lys Leu Arg Ser Leu Ser Leu

65 70 75 80

Ser Glu Phe Glu Glu Gly Ser Tyr Gly Trp Arg Asn Phe His Pro Gln

85 90 95

40

Cys Leu Gln Arg Cys Asn Thr Pro Gly Gly Phe Leu Leu His Tyr Cys

100	105	110	
Leu Leu Ala Val Thr Gln Gly Ile Val Val Asn Gly Leu Val Asn Ile			
115	120	125	
Ser Ile Ser Thr Val Glu Lys Arg Tyr Glu Met Lys Ser Ser Leu Thr			
130	135	140	
Gly Leu Ile Ser Ser Ser Tyr Asp Ile Ser Phe Cys Leu Leu Ser Leu			
145	150	155	10
Phe Val Ser Phe Phe Gly Glu Arg Gly His Lys Pro Arg Trp Leu Ala			
165	170	175	
Phe Ala Ala Phe Met Ile Gly Leu Gly Ala Leu Val Phe Ser Leu Pro			
180	185	190	
Gln Phe Phe Ser Gly Glu Tyr Lys Leu Gly Ser Leu Phe Glu Asp Thr			
195	200	205	
Cys Val Thr Thr Arg Asn Ser Thr Ser Cys Thr Ser Ser Thr Ser Ser			
210	215	220	
Leu Ser Asn Tyr Leu Tyr Val Phe Ile Leu Gly Gln Leu Leu Leu Gly			
225	230	235	20
Ala Gly Gly Thr Pro Leu Tyr Thr Leu Gly Thr Ala Phe Leu Asp Asp			
245	250	255	
Ser Val Pro Thr His Lys Ser Ser Leu Tyr Ile Gly Thr Gly Tyr Ala			
260	265	270	
Met Ser Ile Leu Gly Pro Ala Ile Gly Tyr Val Leu Gly Gly Gln Leu			
275	280	285	
Leu Thr Ile Tyr Ile Asp Val Ala Met Gly Glu Ser Thr Asp Val Thr			
290	295	300	
Glu Asp Asp Pro Arg Trp Leu Gly Ala Trp Trp Ile Gly Phe Leu Leu			
305	310	315	30
Ser Trp Ile Phe Ala Trp Ser Leu Ile Ile Pro Phe Ser Cys Phe Pro			
325	330	335	

Lys His Leu Pro Gly Thr Ala Glu Ile Gln Ala Gly Lys Thr Ser Gln
 340 345 350
 Ala His Gln Ser Asn Ser Asn Ala Asp Val Lys Phe Gly Lys Ser Ile
 355 360 365
 Lys Asp Phe Pro Ala Ala Leu Lys Asn Leu Met Lys Asn Ala Val Phe
 370 375 380
 Met Cys Leu Val Leu Ser Thr Ser Ser Glu Ala Leu Ile Thr Thr Gly
 385 390 395 400
 10 Phe Ala Thr Phe Leu Pro Lys Phe Ile Glu Asn Gln Phe Gly Leu Thr
 405 410 415
 Ser Ser Phe Ala Ala Thr Leu Gly Gly Ala Val Leu Ile Pro Gly Ala
 420 425 430
 Ala Leu Gly Gln Ile Leu Gly Gly Phe Leu Val Ser Lys Phe Arg Met
 435 440 445
 20 Thr Cys Lys Asn Thr Met Lys Phe Ala Leu Phe Thr Ser Gly Val Ala
 450 455 460
 Leu Thr Leu Ser Phe Val Phe Met Tyr Ala Lys Cys Glu Asn Glu Pro
 465 470 475 480
 Phe Ala Gly Val Ser Glu Ser Tyr Asn Gly Thr Gly Glu Leu Gly Asn
 485 490 495
 Leu Ile Ala Pro Cys Asn Ala Asn Cys Asn Cys Ser Arg Ser Tyr Tyr
 500 505 510
 30 Tyr Pro Val Cys Gly Asp Gly Val Gln Tyr Phe Ser Pro Cys Phe Ala
 515 520 525
 Gly Cys Ser Asn Pro Val Ala His Arg Lys Pro Lys Val Tyr Tyr Asn
 530 535 540
 Cys Ser Cys Ile Glu Arg Lys Thr Glu Ile Thr Ser Thr Ala Glu Thr
 545 550 555 560
 40 Phe Gly Phe Glu Ala Lys Ala Gly Lys Cys Glu Thr His Cys Ala Lys

565	570	575		
Leu Pro Ile Phe Leu Cys Ile Phe Phe Ile Val Ile Ile Phe Thr Phe				
580	585	590		
Met Ala Gly Thr Pro Ile Thr Val Ser Ile Leu Arg Cys Val Asn His				
595	600	605		
Arg Gln Arg Ser Leu Ala Leu Gly Ile Gln Phe Met Val Leu Arg Leu				
610	615	620	10	
Leu Gly Thr Ile Pro Gly Pro Ile Ile Phe Gly Phe Thr Ile Asp Ser				
625	630	635	640	
Thr Cys Ile Leu Trp Asp Ile Asn Asp Cys Gly Ile Lys Gly Ala Cys				
645	650	655		
Trp Ile Tyr Asp Asn Ile Lys Met Ala His Met Leu Val Ala Ile Ser				
660	665	670		
Val Thr Cys Lys Val Ile Thr Met Phe Phe Asn Gly Phe Ala Ile Phe				
675	680	685	20	
Leu Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Ala Thr Asp Val Ser Phe His Lys Glu				
690	695	700		
Asn Ala Val Val Thr Asn Val Leu Ala Glu Gln Asp Leu Asn Lys Ile				
705	710	715	720	
Val Lys Glu Gly				
				30
<210> 2				
<211> 2172				
<212> DNA				
<213> Human				
<400> 2				
atgaagagcg ccaaaggat tgagaacttg gcttttgtcc cctccagcccc agacatcctg				60
cgccgcgttgtt ctgcgtcgcc ctcccaaatac gaagtctctg ctttgtcctc tgaccccca				120
agagagaattt ctcagccaca ggagcttcag aagccccagg agccccagaa gtcacccgag				180

ccatctctgc cttagcccc tccaatgtc tccgaagaga agtccggtc actgtcgctg 240
 tccgagtttgc aggaggggtc ttacggctgg aggaacctcc atcccaatgc tctccagcgc 300
 tgcaacacac ctggaggctt tctgtttcac tactgcctct tggccgtcac gcaaggatt 360
 gtagttaatgc gcctagtaaa tattagcatt tccactgttg agaagcgta tgaaatgaag 420
 agttccctga ctggcctgtat ttcatcaagc tacgatattt cattctgttt gttgtctta 480
 ttgttatcat tctttggtga aagaggacat aagccgagat ggcttgcatt tgcaggcttt 540
 atgattggac tgggagcact tgtattctca ttgccacaat tttagtgg agaatataaa 600 10
 ttgggtctc ttttgaaga cacttgtta acaacaagga atagcaccag ttgtacatct 660
 tcaacttctt cacttctaa ctacttgtat gtcttcatct tggacaact attgctgggg 720
 gcaggagggaa ctcccttta tactctggaa acagccccc ttgatgattc tgtgccacaca 780
 cacaagtctt ctctctatat aggaaccggt tatgctatgt caatcttagg ccctgttatt 840
 ggctatgtat tgggaggaca actgctaacc atatacattt atgttgcattt gggagaaaagc 900
 actgtatgtca ctgaggatga tccgcgttgg ttggagctt ggtggattgg gtttcttcta 960
 tcattggatct ttgcttggtc tttataataa cctttttttt gctttccaaa acatttacca 1020 20
 ggtacagcag aaattcaagc tggaaaaact tcccaggctc atcagagtaa tagtaatgca 1080
 gatgtgaaat ttggaaaaag tattaaagat ttccagctg ctctaaagaa ttgtatgaag 1140
 aatgtgtct ttatgtgttt agtctatca acttcttcag aagccttaat tactactgga 1200
 ttgtctacat tttacctaa attatagaa aatcaattcg gattgacatc cagcttcgca 1260
 gctactcttgc gaggggctgt tttattccctt ggagctgctc tcggtaaat tttaggtggc 1320
 ttcccttgc ttttcaaaatttcag aatgacatgt aaaaacacaa tgaagtttgc actgttcaca 1380
 tctggagtttgc cacttacgct gagttttgtt tttatgtatgc ccaaattgtga aatgagcca 1440 30
 ttgtctggtg tatctgaatc atataatggg actggagaat tggaaaactt gatagccctt 1500
 tgtaatgcca attgtacttgc ttgcgttca tattattatc ctgtctgtgg agatggagtc 1560
 caatattttt ctccctgttt tgcaggctgt tcaaaccagg ttgcacacag gaagccaaag 1620
 gtatattaca actgttccttgc tatgtaaagg aaaacagaaaa taacatccac tgcagaaaact 1680
 ttgttttgc aagctaaagc tggaaaatgt gaaactcatt gtgcgaaaactt gcccattttc 1740
 ctgttgcattt tctttatgtt aattttttt acctttatgg ccgttactcc tataactgtg 1800
 tctatcctaa ggtgtgttaa tcacagacaa cggtccctag cttggaaat acaattttatg 1860 40
 gtccttcgtt tattaggaac aatcccttgc ccaattatat ttgttttcac aatagacagc 1920

acatgtattc tttgggatat aaatgattgt ggaattaaag gagcttgctg gatttatgt 1980
aacatcaaga tggcccatat gctagtagcc ataagtgtt aatgtaaaat tatcaccatg 2040
ttcttcataatg gatitgcaat ctttttgtat aaaccacac catcagccac agatgtgtca 2100
tttcataaaag agaatgcagt tgtactaat gtttagcag aacaggatct caacaaaata 2160
gtaaaaagaag gg 2172

10
<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 3
ccatccta atcgactcact ataggc 27 20

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer 30
<400> 4
aaacccaatc caccaagctc ccaacc 26

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 40
<220>

〈223〉 Primer

〈400〉 5

actcaactata gggctcgagc ggc

23

〈210〉 6

〈211〉 25

〈212〉 DNA

10

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 6

ccaatccacc aagctcccaa ccatac

25

〈210〉 7

20

〈211〉 28

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 7

gttcctccag ccgtaagacc cctccatca

28

30

〈210〉 8

〈211〉 25

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 8

40

cggagacatt gggagggct gaagg

25

⟨210⟩ 9

⟨211⟩ 28

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

10

⟨223⟩ Primer

⟨400⟩ 9

ttgggagctt ggtggattgg gtttcttc

28

⟨210⟩ 10

⟨211⟩ 29

⟨212⟩ DNA

20

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Primer

⟨400⟩ 10

gggactggag aattggaaaa ctgtatagc

29

⟨210⟩ 11

30

⟨211⟩ 20

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Primer

⟨400⟩ 11

cacgggggcg ctgtcacctg

20

40

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

atcgaggtaa attttccagg tgtaa

10

25

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 13

agggacctgg ctctgctgct ctg

20

23

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 14

aacagtcttc tctttccca ttca

25

<210> 15

40

<211> 16

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 15

gtaaaaacgac ggccag

16

10

〈210〉 16

〈211〉 17

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 16

cagggaaacag ctatgac

20

17

〈210〉 17

〈211〉 24

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 17

ctgggaacag cctttcttga tgat

30

24

〈210〉 18

〈211〉 24

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

40

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 18

cagcaagctc cttaattcc acaa

24

〈210〉 19

〈211〉 21

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 19

tgggaggaca actgctaacc a

21

20

〈210〉 20

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 20

30

atcgccgtac atcctcagtg

20

〈210〉 21

〈211〉 32

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Probe

40

<400> 21

cattgatgtt gctatggag aaagcactga tg 32

<210> 22

<211> 782

<212> DNA

<213> Human

10

<400> 22

aagtccacccg agccatctc gccttcagcc cctcccaatg tctccgaaga gaagctccgg 60

tcactgtcgc tgtccgagtt tgaggagggg tcttacggct ggaggaactt ccacatctcaa 120

tgtctccagc gctgcaacac acctggaggc tttctgcttc actactgcct cttggccgtc 180

acgcaaggta ttgttagttaa tggcctagta aatattagca ttccactgt tgagaagcgt 240

tatgaaatga agagttccct gactggccctg atttcatcaa gctacgataat ttcattctgt 300

ttgttgtctt tatttgtatc attcttttgtt gaaagaggac ataagccgag atggcttgca 360

tttgcagcct ttatgatgg actggagca ctgttattct cattgccaca attttttagt 420

ggagaatata aattggggtc tcttttggaa gacactgtg taacaacaag gaatagcacc 480

agttgtacat cttaaccttc ttcaacttct aactacttgt atgtttcat cttggaccaa 540

ctattgtgg gggcaggagg aactcccttt tataactgtt gaacagccctt tcttgtatgt 600

tctgtgccca cacacaagtc ttctcttat ataggaaccg gtatgttat gtcaatctta 660

ggccctgcta ttggctatgt attggagga caactgctaa ccatatacat tgatgttgct 720

atggagaaaa gcactgtatgt cactgaggat gatccgcgt ggttggagc ttggtgatt 780

gg 782

<210> 23

<211> 485

<212> DNA

<213> Human

20

<400> 23

ctaacgcccc cgctcagcgc tctgcgtcc agacagctgc gagctggagt aggaaggttc 60

40

aggccgtggc ggagagtgcg ctggaggctg gagggccagg aggcgggaag cttccgcac 120
 gggggcgctg tcaccgcct gtgggaggag ccagagaggg acctggctct gctgctctga 180
 agcaccggag tcgggagaac ccatccagac atgaagagcg ccaaaggat tgagaacttg 240
 gcttttgtcc cctccagccc agacatccctg cgccgcttgc ctgcgtcgcc ctcccaaatac 300
 gaagtctctg ctttgtccctc tgacccccaa agagagaatt cttagccaca ggagcttcag 360
 aagccccagg agccccagaa gtcaccagag ccatctctgc cttagcccc tcccaatgtc 420
 tccgaagaga agctccggtc actgtcgctg tccgagtttg aggaggggtc ttacggctgg 480
 aggaa 485

10

<210> 24

<211> 792

<212> DNA

<213> Human

<400> 24

20

gggactggag aattggaaaa cttgatagcc cttgtaatg ccaattgtaa ctgttcgcga 60
 tcataattatt atcctgtctg tggagatgga gtccaatatt ttctccctg ctttgcaggc 120
 tgttcaaacc cagttgcaca caggaagcca aaggtatatt acaactgttc ctgtattgaa 180
 aggaaaacag aaataacatc cactgcagaa acttttggtt ttgaagctaa agctggaaaa 240
 tgtgaaactc attgtgcgaa actgccata ttcccttgca tttctttat tgtaattatt 300
 ttaccttta tggccggtag tcctataact gtgtctatcc taaggtgtgt taatcacaga 360
 caacggtccc tagccttggg aatacaattt atggcccttc gattattagg aacaattcct 420
 ggaccaatta tattttggttt cacaatagac agcacaatgtt ttctttggga tataaatgt 480
 tgtgaaatta aaggagcttg ctggatttat gataacatca agatggccca tatgcttagta 540
 gccataagtg ttacttggtaa agttatcacc atgttcttca atggatttgc aatcttttg 600
 tataaaccac ctccatcagc cacagatgtt tcatttcata aagagaatgc agttgtgact 660
 aatgttttag cagaacagga tctcaacaaa atagaaaaag aagggtgaaa tggaaaaga 720
 gaagactgtt ttacacctgg aaaatttacc tcgatttta agaacacacaca ttgcctatggc 780
 aggattatct at 792

30

40

<210> 25

<211> 2251

<212> DNA

<213> Human

<400> 25

agggacctgg ctctgctgct ctgaagcacc ggagtcggga gaacccatcc agacatgaag	60	
agcgccaaag gtattgagaa ctggctttt gtcccccca gcccagacat cctgcgccgc	120	10
ttgtctgcgt cgccctccca aatcgaagtc tctgccttgt cctctgaccc ccaaagagag	180	
aattctcagc cacaggagct tcagaagccc caggagcccc agaagtcaacc cgagccatct	240	
ctgccttcag cccctccca tgctccgaa gagaagctcc ggtcaactgtc gctgtccgag	300	
tttgaggagg ggtcttacgg ctggaggaac ttccatcctc aatgtctcca gcgctgcaac	360	
acacctggag gctttctgct tcactactgc ctcttggccg tcacgcaagg tatttagtt	420	
aatggcctag taaaatattag catttccact gttgagaagc gttatgaaat gaagagttcc	480	
ctgactggcc tgatttcatc aagctacgt atttcattct gtttgttgc tttatttcta	540	20
tcattctttg gtgaaagagg acataagccg agatggcttg catttgcagc ctttatgatt	600	
ggactgggag cacttgtatt ctcatggca caattttca gtggagaata taaaattgggg	660	
tctcttttg aagacacttg tgtaacaaca aggaatagca ccagttgtac atcttcaact	720	
tcttcacttt ctaactactt gtatgtcttc atcttgggac aactattgct gggggcagga	780	
ggaactcctc ttataactct gggAACAGCC ttcttgcatttgc cacacacaag	840	
tcttctctct atataggaac cggttatgct atgtcaatct taggcctgct tattggctat	900	
gtattgggag gacaactgct aaccatatac attgatgttgc tcatggaga aagcactgtat	960	30
gtcactgagg atgatccgcg atggttggga gcttggtgga ttgggtttct tctatcatgg	1020	
atcttgcctt ggtctttat aatacctttt tcttgccttc caaaacattt accaggtaaa	1080	
gcagaaaattc aagctggaaa aacttcccag gctcatcaga gtaatagtaa tgcagatgtg	1140	
aaatttggaa aaagtatataa agatttcca gctgctctaa agaatttgat gaagaatgt	1200	
gtctttatgt gtttagttct atcaacttct tcagaaggct taattactac tggatttgc	1260	
acattttac ctaaattttt agaaaatcaa ttggatttgc catccagctt cgcagctact	1320	
cttggagggg ctgttttaat tccctggagct gctctcggtc aaattttagg tggcttcctt	1380	40
gtttcaaaat tcagaatgac atgtaaaaac acaatgaagt ttgcactgtt cacatctgga	1440	

gttgcactta cgctgagttt tttatattatg tatgccaaat gtaaaaatga gccatttgct	1500	
ggtgttatctg aatcatataa tgggactgga gaattggaa acttgatagc cccttgtaat	1560	
gccaattgtta actgttcgct atcatattat tatcctgtct gtggagatgg agtccaatat	1620	
ttttctccct gctttgcagg ctgttcaaac ccagttgcac acaggaagcc aaaggatat	1680	
tacaactgtt cctgtattga aaggaaaaca gaaataacat ccactgcaga aacttttgtt	1740	
tttgaagcta aagctggaaa atgtgaaact cattgtgcga aactgcccatttcccttgc	1800	
attttcttta ttgttaattat ttttaccttt atggccgtta ctccataac tgtgtctatc	1860	10
ctaaggtgtg ttaatcacag acaacggtcc ctagccctgg gaatacaatt tatggcctt	1920	
cgattatttag gaacaattcc tggaccaattt atatttggtt tcacaataga cagcacatgt	1980	
attctttggg atataaatga ttgtgaaattt aaaggagctt gctggattta tgataacatc	2040	
aagatggccc atatgctagt agccataagt gttacttgta aagttatcac catgttcttc	2100	
aatggatttg caatctttt gtataaacca cctccatcag ccacagatgt gtcatttcatt	2160	
aaagagaatg cagttgtgac taatgtttta gcagaacagg atctcaacaa aatagtaaaa	2220	
gaagggtgaa atgggaaaag agaagactgt t	2251	20

(210) 26

(211) 722

(212) PRT

(213) Mouse

(400) 26

Met Gln Gly Ser Lys Gly Ile Glu Asn Pro Ala Phe Val Pro Ser Ser

5 10 15

Pro Gly Thr Pro Arg Arg Ala Ser Ala Ser Pro Ser Gln Val Glu Val

20 25 30

Ser Ala Val Ala Ser Arg Asn Gln Asn Gly Gly Ser Gln Pro Arg Glu

35 40 45

Ser Glu Glu Pro Gln Lys Ser Thr Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ser Asn

50 55 60

Pro Pro Ala Ser Asp Glu Pro Pro Gly Ser Gln Leu Ser Glu Leu Glu

30

40

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

10

20

30

40

Trp Leu Gly Ala Trp Trp Ile Gly Phe Leu Leu Ala Trp Leu Phe Ala
 305 310 315 320
 Trp Ser Leu Ile Met Pro Phe Ser Cys Phe Pro Lys His Leu Pro Gly
 325 330 335
 Thr Ala Lys Ile Gln Ala Gly Lys Thr Ser Gln Thr His Gln Asn Asn
 340 345 350
 Ser Thr Ser Phe Gln His Thr Asp Glu Asn Phe Gly Lys Ser Ile Lys 10
 355 360 365
 Asp Phe Pro Thr Ala Val Lys Asn Leu Met Arg Asn Thr Val Phe Ile
 370 375 380
 Cys Leu Val Leu Ser Thr Thr Ser Glu Ala Leu Ile Thr Thr Gly Phe
 385 390 395 400
 Ala Thr Phe Leu Pro Lys Phe Ile Glu Asn Gln Phe Gly Leu Thr Ser
 405 410 415 20
 Ser Phe Ala Ala Thr Leu Gly Gly Ala Val Leu Ile Pro Gly Ala Ala
 420 425 430
 Leu Gly Gln Ile Leu Gly Gly Val Leu Val Ser Lys Phe Lys Met Lys
 435 440 445
 Cys Lys Asn Thr Met Lys Phe Ala Leu Cys Thr Ser Gly Val Ala Leu
 450 455 460
 Val Leu Ser Phe Val Phe Ile Tyr Ala Lys Cys Glu Asn Glu Pro Phe 30
 465 470 475 480
 Ala Gly Val Ser Glu Ser Tyr Asn Gly Thr Gly Glu Met Gly Asn Leu
 485 490 495
 Thr Ala Pro Cys Asn Ala Asn Cys Asn Cys Leu Arg Ser Tyr Tyr Tyr
 500 505 510
 Pro Leu Cys Gly Ser Asp Gly Ile Gln Tyr Phe Ser Pro Cys Phe Ala
 515 520 525 40
 Gly Cys Leu Asn Ser Val Ser Asn Arg Lys Pro Lys Val Tyr Tyr Asn

530	535	540	
Cys Ser Cys Ile Glu Arg Lys Ile Thr Ser Thr Ala Glu Ser Thr Asp			
545	550	555	560
Phe Glu Ala Lys Ala Gly Lys Cys Arg Thr Arg Cys Ser Asn Leu Pro			
565	570	575	
Ile Phe Leu Gly Ile Phe Phe Ile Thr Val Ile Phe Thr Phe Met Ala			
580	585	590	10
Gly Thr Pro Ile Thr Val Ser Ile Leu Arg Cys Val Asn His Arg His			
595	600	605	
Arg Ser Leu Ala Leu Gly Val Gln Phe Met Leu Leu Arg Leu Leu Gly			
610	615	620	
Thr Ile Pro Gly Pro Ile Ile Phe Gly Val Ile Ile Asp Ser Thr Cys			
625	630	635	640
Val Leu Trp Asp Val Asn Glu Cys Gly Ile Lys Gly Ala Cys Trp Ile			
645	650	655	20
Tyr Asp Asn Ile Lys Met Ala His Met Leu Val Ala Ile Ser Val Thr			
660	665	670	
Cys Lys Val Ile Thr Ile Phe Phe Asn Gly Leu Ala Ile Val Leu Tyr			
675	680	685	
Lys Pro Pro Pro Pro Gly Thr Glu Val Ser Phe Gln Ser Gln Asn Val			
690	695	700	30
Ile Val Ser Thr Ile Ser Val Glu Glu Asp Leu Asp Lys Ala Glu Asn			
705	710	715	720
Glu Gly			

<210> 27

<211> 2166

<212> DNA

<213> Mouse

40

<400> 27

atgcaggcgt ccaaaggaat agagaacccg gctttcgcc ctccagccc aggcacccca	60
cgcgtgcgt ctgcttcgcc ctcccaggcg gaggicctcg ctgtggccctc caggaatcg	120
aatgggggtt cgccgcctcg ggaatctgag gagcctcaga agtcaactga gccatccccg	180
ccttcgtcgat ccccccagc ttctgtcgag ccggccgggt cacagctaag cgagcttgag	240
gagggacctt gcgggtggag gggcttcac ccccgatgtc tccagcgctg caacacccca	300
caaggcttt tgcttcacta ctgtctctta gcccataacgc aaggtattgt agtaaacggc	360
ctggtaaaca ttagcatctc caccattgag aagcgttatg aaatgaaaag ctcactgaca	420
ggcctgatat catcgagcta cgacatctcc ttgttgtgt tatctctatt tgtgttttc	480
tttggggaga gaggacacaa acctcgctgg ctgccttgcatccttat gataggcctg	540
ggagcgctgg tgtttcctt accacacttc ttcaatggaa gatataact gggatccatt	600
tttgaagata cgtgttaac aaggaacagt accagatgtt catcttcaac ctccctgttt	660
tcttaactact tctatgtctt tgccctggaa caattgttgc tggggaccgg agggactccg	720
ctctacaccc tggggacacgc ctattattgt gactctgtgc ccacacacaa atcttcctc	780
tatataggta ttggctattc tatgtcaatc cttaggcctg ccattggata tgtgttggt	840
ggacagctgt tgacaatgtt cattgtatatt gctatggac aaagttcgga tctgactgag	900
gatgatcccc ggtggctggg ggcttggtgg attggattcc tttagcttg gctcttgct	960
tggctttga taatgcctt ctccgtttt cccaaggcatt taccagggac agcaaaaatt	1020
caagctggca aaacttccca gactcatcaa aataatagta ctcccttcca acatacggat	1080
aaaaattttt gaaaaagtat taaagatttt ccaactgctg taaagaattt gatgaggaat	1140
acagtctta tatgttttgt tctatcaact acttctgttgcattaaattac tacggattt	1200
gccacattti tacctaaatt tatagaaaat caatttggat tgacatcgag ctgtgcagcc	1260
actcttggag gggctgttt aattcctggaa gctgctcttgc tcaaatctt aggtgggttt	1320
cttggttcaa aattcaaaaat gaagtgtaaa aatacaatga agtttgcctt atgtacatct	1380
ggagtagcac ttgtgtcgag ttgtgtttt atttatgcaa aatgtgaaaa tgagccattt	1440
gctgggtgtt ctgaatcata taatggaaact ggagaaatgg ggaatttgac tgcacctgt	1500
aatgccaact gcaactgttt gcggccctac tattaccac tctgtggaaag tcatggaaatc	1560
cagtattttt ctccctgttt tgcaagggtgtt taaaactcgat ttcaaaacag gaaacccaag	1620
gtatattata attttccctg tatagaaagg aaaatcactt ctactgcaga aagtactgtat	1680

10

20

30

40

tttgaagcta aagctggaaa atgtagaact cggtgttcaa acttgcccat atttcttggc 1740
attttcttca ttacagtttat ctttaccttt atggcaggca ctccataac tgtgtctata 1800
ttaaggtgtg ttaatcacag acatcggtct ctagcattgg gagtgcagtt catgcttctt 1860
cgattgttag gtacaataacc tggccaatt atatttgtg tcataataga cagcacatgt 1920
gttctgtggg atgtcaatga atgtggaata aaaggagcat gtggattta tgataacatc 1980
aagatggcac atatgctggt agctataagt gttacttgta aagttatcac catatttttc 2040
aatggacttg cgattgttct ctataaacca ccgcggccag gaacagaggt atcatttcaa 2100
10 agtcagaatg tcatttgttc tactatttcg gtcgaagagg atctagacaa agcagaaaaat 2160
gaaggg 2166

<210> 28
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 20
<220>
<223> Primer
<400> 28
cgagctttag gagggacctt gcggg 25

<210> 29
<211> 23 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 29
atccaacatg ctccctttat tcc 23
40
<210> 30

〈211〉 25

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 30

aggcgagcca gcgagggttg tgtcc

25

10

〈210〉 31

〈211〉 25

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 31

gatgcaaagg cgagccagcg aggtt

25

20

〈210〉 32

〈211〉 24

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 32

aactgtttgc ggtcctacta ttac

24

30

〈210〉 33

〈211〉 29

〈212〉 DNA

40

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 33

ggatgtcaat gaatgtggaa taaaaggag

29

〈210〉 34

10

〈211〉 26

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 34

cctttcttga ccatgcaggg ctccaa

26

20

〈210〉 35

〈211〉 25

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

30

〈400〉 35

agccagttcc caaagcaatc tcctc

25

〈210〉 36

〈211〉 24

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

40

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 36

atgcaggcct ccaaaggaat agag

24

〈210〉 37

〈211〉 27

〈212〉 DNA

10

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 37

tcacccttca ttttctgctt tgtctag

27

〈210〉 38

20

〈211〉 25

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 38

cagtaccaga tggcatctt caacc

25

30

〈210〉 39

〈211〉 24

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 39

40

actgaggatg atccccggtg gctg

24

⟨210⟩ 40

⟨211⟩ 29

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

10

⟨223⟩ Primer

⟨400⟩ 40

tttattccac attcattgac atcccacag

29

⟨210⟩ 41

⟨211⟩ 30

⟨212⟩ DNA

20

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Primer

⟨400⟩ 41

gataactgt a tgaagaaaa tgccaagaaa

30

⟨210⟩ 42

30

⟨211⟩ 29

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Primer

⟨400⟩ 42

gcaatctcct cctccctttc acccttcat

29

40

〈210〉 43

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 43

cagcccaggc accccacgcc

10

20

〈210〉 44

〈211〉 22

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 44

aaggcgagcc agcgagggtt gt

20

22

〈210〉 45

〈211〉 21

〈212〉 DNA

30

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 45

gaagtcaact gagccatccc c

21

〈210〉 46

40

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 46

agctcgctta gctgtgaccc

20

10

〈210〉 47

〈211〉 26

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Probe

〈400〉 47

20

ttttcgaatc ccccagcttc tcatgt

26

〈210〉 48

〈211〉 1737

〈212〉 DNA

〈213〉 Mouse

〈400〉 48

30

cgagcttgag gagggacctt gcgggtggag gggctttcac cccagtgtc tccaggcgtg 60

caacaccccc caaggcttt tgcttcacta ctgtcttta gccctaacgc aaggtattgt 120

agtaaacggc ctggtaaaca ttagcatctc caccatgag aagcgttatg aaatgaaaag 180

ctcactgaca ggcctgatat catcgagcta cgacatctcc ttttgtgtgt tatctctatt 240

tgtgtcttc ttggggaga gaggacacaa acctcgctgg ctcgcctttg catcctttat 300

gataggcctg ggagcgctgg tgtttccctt accacacttc ttcatgtggaa gatatgaact 360

gggatccatt ttgaagata cgtgcttaac aaggaacagt accagatgtt catcttcaac 420

40

ctccctgctt tctaactact tctatgtctt tgtccctggaa caatgttgc tggggaccgg 480

agggactccg ctctacaccc tggggacagc ctttattgtat gactctgtgc ccacacacaa	540	
atcttccttc tatataggta ttggcttattc tatgtcaatc ctaggcccttg ccattggata	600	
tgtgttgggt ggacagctgt tgacaatgtat cattgtatatt gctatggac aaagttcgga	660	
tctgactgag gatgatcccc ggtggctggg ggcttggtgg attggattcc ttttagcttg	720	
gctctttgct tggctttga taatgccttt ctccctttt cccaaggcatt taccagggac	780	
agcaaaaatt caagctggca aaacttccca gactcatcaa aataatagta ctcccttcca	840	
acatacggat gaaaattttt gaaaaagtat taaagatttt ccaactgctg taaaagaattt	900	10
gatgaggaat acagtcttta tatgttttgt tctatcaact acttctgaag cattaattac	960	
tacgggattt gcccacattt tacctaaatt tatagaaaat caatttggat tgacatcgag	1020	
ctttcagcc actcttggag gggctgtttt aattccctgga gctgcttttg gtcaaatttt	1080	
aggtggtgtt ctgtttcaa aattcaaaat gaagtgaaa aatacatgtat agttgcctt	1140	
atgtacatct ggagtagcac ttgtgctgag ttttgtattt atttatgcaa aatgtaaaaa	1200	
tgagccattt gctggtgtgt ctgaatcata taatggaact ggagaaatgg ggaatttgac	1260	
tgcacccctgtt aatgccaact gcaactgtttt gcggtcctac tattacccac tctgtggaag	1320	
tgtatggaaatc cagtattttt ctccctgctt tgcagggtgtt ttaaactcag tttcaaacag	1380	
gaaacccaag gtatattata attgttccctg tatagaaaagg aaaatcaattt ctactgcaga	1440	
aagtactgtat ttgttgcata aagctggaaa atgtagaact cggtgttcaa acttgcctt	1500	
atttcttggc attttcttca ttacagttat ctttacctttt atggcaggca ctcctataac	1560	
tgtgtctata ttaagggtgtt ttaatcacag acatcggtct ctgcattgg gagtgcagtt	1620	
catgcttctt cgattgcttag gtacaatacc tgggccaattt atatttggtg tcataataga	1680	
cagcacatgtt gttctgtggg atgtcaatgtat atgtggaata aaaggagcat gttggat	1737	30

<210> 49

<211> 532

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 49

gaacctttct tgaccatgca gggctccaaa ggaatagaga acccggcttt cgtcccttcc	60	40
agcccaggca ccccacgccc tgcgctgtct tcgcctcccc aggtggaggt ctctgctgtg	120	

gcctccagga atcagaatgg gggttcgcat cctcggaat ctgaggagcc tcagaagtca	180	
actgagccat ccccgccttc ttcaaatccc ccagcttctg atgagccgccc ggggtcacag	240	
ctaagcgagc ttgaggaggg accttgcggg tggagggct ttccccca gtgtctccag	300	
cgtgcacaaca ccccccagg cttttgctt cactactgtc tcttagccct aacgcaaggt	360	
atttgtaa acggccttgtt aaacattagc atctccacca ttgagaagcg ttatgaaatg	420	
aaaagctcac tgacaggct gatatcatcg agctacgaca tctccttttg tgtgttatct	480	
ctatttgtt cttttttg ggagagagga cacaaacctc gctggctcgc ct	532	10

<210> 50

<211> 273

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 50

ggatgtcaat gaatgtggaa taaaaggagc atgttggatt tatgataaca tcaagatggc	60	20
acatatgctg gtagctataa gtgttacttg taaagtatc accatattct tcaatggact	120	
tgcgattgtt ctctataaac caccggcccc aggaacagag gtatcatttc aaagtcagaa	180	
tgtcattgtg tctactatTT cggtcgaaga ggatctagac aaagcagaaa atgaagggtg	240	
aaaaggagga ggagattgtt ttggaaactg gct	273	

<210> 51

<211> 2169

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 51

atgcagggtt ccaaaggaat agagaacccg gctttcgccc ctccagcccc aggccacccca	60	
cgccgtgcgt ctgtttcgcc ctcccagggtt gaggctctg ctgtggccctc caggaatcag	120	
aatgggggtt cgcagccctcg ggaatctgag gaggctcaga agtcaactga gccatccccg	180	
ccttcttcga atccccccagc ttctgtatgag ccggccgggtt cacagcttaag cgagctttag	240	40
gagggacctt gcggggggag gggcttccac ccccaagggtc tccagcgctg caacacccca	300	

caaggcttt tgcttcacta ctgtcttta gccctaaccgc aaggtattgt agtaaacggc 360
 ctggtaaaca ttagcatctc caccattgag aagcgttatg aaatgaaaag ctcactgaca 420
 ggcctgatat catcgagcta cgacatctcc ttttgtgt tatctctatt tgtgtcttc 480
 tttggggaga gaggacacaa acctcgctgg ctgcctttg catccttat gataggcctg 540
 ggagcgctgg tgtttccctt accacacttc ttcaigggaa gataatgaact gggatccatt 600
 tttgaagata cgtgcttaac aaggaacagt accagatgtt catcttcaac ctcccgtctt 660
 tctaactact tctatgtctt tgccctggga caattgttgc tggggaccgg aggactccg 720
 ctctacaccc tggggacagc ctttattgt gactctgtgc ccacacacaa atcttctctc 780
 tatataggta ttggctattc tatgtcaatc ctaggccctg ccattggata tgtgttggt 840
 ggacagctgt tgacaatgta cattgatatt gctatggac aaagttcgga tctgactgag 900
 gatgatcccc ggtggctggg ggcttggtgg attggattcc ttttagcttgc gctcttgct 960
 tggctttga taatgcctt ctccctttt cccaaggcatt taccagggac agcaaaaatt 1020
 caagctggca aaacttccca gactcatcaa aataaatgta ctcccttcca acatacggat 1080
 gaaaattttg gaaaaagtat taaagatttt ccaactgtg taaagaattt gatgaggaat 1140
 acagtcctta tatgttttagt tctatcaact acttctgaag cattaattac tacggattt 1200
 gcccacattt tacctaaatt tatagaaaat caatttggat tgacatcgag ctgtgcagcc 1260
 actcttggag gggctgtttt aattcctgga gctgctttg gtcaaatctt aggtgggttt 1320
 ctgtttcaa aattcaaaaat gaagtgtaaa aatacaatga agtttgcctt atgtacatct 1380
 ggagtagcac ttgtgctgag ttttgttattt atttatgcaa aatgtgaaaaa tgagccattt 1440
 gctgggtgtt ctgaatcata taatggaact ggagaaatgg ggaatttgac tgcaccttgt 1500
 aatgccaact gcaactgttt gcggccctac tattaccac tctgtggaag tgatggaatc 1560
 cagtattttt ctccctgttt tgcaggttgtt taaaactcag ttcaaaacag gaaacccaag 1620
 gtatattata attgttccctg tatagaaagg aaaatcactt ctactgcaga aagtactgat 1680
 tttgaagcta aagctggaaa atgtagaact cggtgtcaa acttgcctt atttcttggc 1740
 attttcttca ttacagttat cttaacccctt atggcaggca ctccctataac tgtgtctata 1800
 ttaaggtgtg ttaatcacag acatcggtct ctagcattgg gagtgcagtt catgcttctt 1860
 cgattgctag gtacaatacc tggccaatt atattttggtg tcataataga cagcacatgt 1920
 gttctgtggg atgtcaatga atgtggaata aaaggagcat gtggattta tgataacatc 1980
 aagatggcac atatgttgtt agctataagt gttactgtt aagttatcac catattctt 2040

aatggacttg cgattgtct ctataaacca ccgccccag gaacagaggatcattcaa 2100
 agtcagaatg tcattgtgc tactatttcg gtcgaagagg atctagacaa agcagaaaat 2160
 gaagggtga 2169

〈210〉 52

〈211〉 724

〈212〉 PRT 10

〈213〉 Rat

〈400〉 52

Met Gln Gly Ser Lys Gly Val Glu Asn Pro Ala Phe Val Pro Ser Ser
 5 10 15

Pro Asp Thr Pro Arg Arg Ala Ser Ala Ser Pro Ser Gln Val Glu Val
 20 25 30

Ser Ala Val Ala Ser Arg Asn Gln Asn Gly Gly Ser Gln Pro Arg Glu
 35 40 45

Ser Glu Asp Pro Gln Lys Ser Thr Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ser Thr
 50 55 60

Leu Pro Ala Ser Asp Glu Pro Pro Gly Ser Gln Leu Ser Glu Leu Glu
 65 70 75 80

Glu Gly Pro Cys Gly Trp Arg Asn Phe His Pro Gln Cys Leu Gln Arg
 85 90 95

Cys Asn Asn Pro Lys Gly Phe Leu Leu His Tyr Cys Leu Leu Ala Leu
 100 105 110

Thr Gln Gly Ile Val Val Asn Gly Leu Val Asn Ile Ser Ile Ser Thr
 115 120 125

Ile Glu Lys Arg Tyr Glu Met Lys Ser Ser Leu Thr Gly Leu Ile Ser
 130 135 140

Ser Ser Tyr Asp Ile Ser Phe Cys Val Leu Ser Leu Phe Val Ser Phe
 145 150 155 160

20

20

30

40

Phe Gly Glu Arg Gly His Lys Pro Arg Trp Leu Ala Phe Ala Ser Phe
 165 170 175
 Met Ile Gly Leu Gly Ala Leu Val Phe Ser Leu Pro His Phe Phe Ser
 180 185 190
 Gly Arg Tyr Glu Leu Gly Thr Ile Phe Glu Asp Thr Cys Leu Thr Arg
 195 200 205
 Asn Ser Thr Arg Cys Ala Ser Ser Thr Ser Leu Leu Ser Asn Tyr Phe
 210 215 220
 Tyr Val Phe Val Leu Gly Gln Leu Leu Gly Thr Gly Gly Thr Pro
 225 230 235 240
 Leu Tyr Thr Leu Gly Thr Ala Phe Ile Asp Asp Ser Val Pro Thr His
 245 250 255
 Lys Ser Ser Leu Tyr Ile Gly Ile Gly Tyr Ser Met Ser Ile Leu Gly
 260 265 270
 Pro Ala Ile Gly Tyr Val Leu Gly Gln Leu Leu Thr Met Tyr Ile
 275 280 285
 Asp Val Ala Met Gly Gln Ser Ser Asp Leu Thr Glu Asp Asp Pro Arg
 290 295 300
 Trp Leu Gly Ala Trp Trp Ile Gly Phe Leu Leu Ala Trp Leu Phe Ala
 305 310 315 320
 Trp Ser Leu Ile Met Pro Phe Ser Cys Phe Pro Lys His Leu Pro Gly
 325 330 335
 Thr Ala Lys Ile Gln Ala Gly Lys Thr Ser Gln Thr His Gln Asn Asn
 340 345 350
 Ser Thr Ser Phe Gln His Met Asp Glu Asn Phe Gly Lys Ser Ile Lys
 355 360 365
 Asp Phe Pro Thr Ala Val Lys Asn Leu Met Arg Asn Thr Val Phe Ile
 370 375 380
 Cys Leu Val Leu Ser Thr Thr Ser Glu Ala Leu Val Thr Thr Gly Phe

10

20

30

40

385	390	395	400	
Ala Thr Phe Leu Pro Lys Phe Ile Glu Asn Gln Phe Gly Leu Thr Ser				
405	410	415		
Ser Ile Ala Ala Thr Leu Gly Gly Ala Val Leu Ile Pro Gly Ala Ala				
420	425	430		
Leu Gly Gln Ile Leu Gly Gly Val Leu Val Ser Lys Phe Lys Met Lys				
435	440	445		10
Cys Lys Asn Thr Met Lys Phe Ala Leu Cys Thr Ser Gly Val Ala Leu				
450	455	460		
Met Leu Ser Phe Val Phe Ile Tyr Ala Lys Cys Glu Asn Gly Pro Phe				
465	470	475	480	
Ala Gly Val Ser Glu Ser Tyr Asn Gly Thr Gly Glu Met Gly Asn Leu				
485	490	495		
Thr Ala Pro Cys Asn Ala Asn Cys Asn Cys Leu Arg Ser Tyr Tyr Tyr				
500	505	510		20
Pro Leu Cys Gly Ser Asp Gly Val Gln Tyr Phe Ser Pro Cys Phe Ala				
515	520	525		
Gly Cys Leu Asn Ser Val Ser Asn Arg Lys Pro Lys Ala Tyr Tyr Asn				
530	535	540		
Cys Ser Cys Ile Glu Arg Lys Val Asp Ile Thr Ser Thr Ala Glu Ser				
545	550	555	560	
Pro Asp Phe Glu Ala Arg Ala Gly Lys Cys Lys Thr Gln Cys Ser Asn				
565	570	575		
Leu Pro Ile Phe Leu Gly Ile Phe Phe Ile Thr Val Ile Phe Thr Phe				
580	585	590		
Met Ala Gly Thr Pro Ile Thr Val Ser Ile Leu Arg Cys Val Asn His				
595	600	605		
Arg Gln Arg Ser Leu Ala Leu Gly Val Gln Phe Met Leu Leu Arg Leu				
610	615	620		40

Leu Gly Thr Ile Pro Gly Pro Ile Phe Gly Val Thr Ile Asp Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Val Leu Trp Asp Ile Asn Glu Cys Gly Thr Lys Gly Ala Cys
 645 650 655
 Trp Ile Tyr Asp Asn Ile Arg Met Ala His Met Leu Val Ala Ile Ser
 660 665 670
 Val Thr Cys Lys Val Ile Thr Ile Phe Phe Asn Gly Leu Ala Ile Val 10
 675 680 685
 Leu Tyr Lys Pro Pro Pro Pro Gly Thr Glu Val Ser Phe Gln Ser Gln
 690 695 700
 Asn Val Val Val Ser Thr Ile Thr Val Glu Glu Asp Leu Asn Lys Ile
 705 710 715 720
 Glu Asn Glu Gly

10

20

<210> 53

<211> 2172

<212> DNA

<213> Rat

<400> 53

atgcagggtt ccaagggagt cgagaacccg gcattcgccc ctccagccc agacacccca 60
 cgccgtgcgt ctgcgtcgcc ttccagggtg gaggctctg ctgtggcctc caggaatcag 120 30
 aatgggggtt cgcaacctcg ggaatctgaa gatccccaga agtcaactga gccatctcct 180
 ctttcttcga ctctcccagc ttctgtatgag ccggcggggt cacagctaag cgagcttgag 240
 gagggacctt gcgggtggag gaacttccac ccccaagggtc ttccatcgctg caacaacccc 300
 aaaggttttc tgcttcacta ctgtcttta gcccataacgc aaggtaattgt agtaaatggc 360
 ctagtaaata ttagcatttc caccatcgag aagcgctatg aaatgaagag ttccctgacc 420
 ggcctgatat catcgagcta cgacatctcc ttttgcgtgt tgtctctgtt tgtgttttc 480
 ttgggtgaga gaggacacaa acctcgctgg cttgcctttg catcctttat gatcgactg 540 40
 ggagcgctgg tttttcttt accacacttc ttcaatggga gatataact ggaaaccatt 600

ttcgaagata cctgcttaac aaggaacagc accagatgtg ctcttcaac ctctctgctt	660
tctaactact tctatgtctt tgccctggga caactgttgc tggggactgg aggaactccg	720
ctctacaccc tgggaacggc cttcattgtat gactctgtac ccacacacaa atcttctcta	780
tatatcggtt ttggcttattc tatgtcaatc ctaggcccag ccattggctt tgtgttgga	840
ggacagctgt tgacaatgtt cattgtatgtt gctatggac aaagttcaga tctgactgag	900
gatgatcccc ggtggttggg ggcttggtgg attggattcc tttagcttgc gctcttgct	960
tggtcttga taatgcctt ctccgtttt ccaaaggcatt taccagggac agcaaaaatt	1020
10 caagctggca aaacttccca gactcatcaa aataatagta ctcccttcca acatatggat	1080
gaaaattttt gaaaaagtat taaagatttt ccaactgctg tgaagaattt gatgaggaat	1140
acagtcctta tatgttttgt tctatcaact acttcgttgc cactagttac cacgggattt	1200
gccacgttt tacctaaatt tatagaaaat caatttggat tgacatcgag cattgcggca	1260
acacttggag gggctgttt aattcccttggaa gctgcttttgc tcaaatctt aggtgggttt	1320
cttggttcaa aattcaaaaat gaagtgtaaa aatacaatga agtttgcgtt atgtacatct	1380
ggagtagcac ttatgttgcgat ttttgttattt atttatgcaa aatgtgaaaa tggccattt	1440
20 gctgggtgtt ctgaatcata taatggaaaca ggagagatgg ggaatctgac tgcaccttgc	1500
aatgccaatt gcaattgttt gagatcctat tattaccac tctgttggaaatgatggagtc	1560
cagtattttt ctccctgctt tgcatgggtgtt ttaaactcag ttcaaacag gaaaccaaag	1620
gcatattata attgttcctt tattggaaagg aaagtgcaca tcacttctac tgcagaaagc	1680
cctgattttt aagcaagggc tggaaaatgt aaaactcagt gtcaaacctt gcccattttt	1740
ctcgccatct tcttcatcac tgcgtttttt acctttatgg caggtacccca cataactgttgc	1800
tccatattaa ggtgtgtcaa tcacagacag cgatctctag cactgggagt gcagttcatg	1860
cttcctcggt tggtaggcac gatacctggg ccaattatat ttggcgtcac aatagacagc	1920
acgtgtgttc tgcgttgcacat caatgaatgtt ggaacaaagg gggcggttgc gatctatgtat	1980
aacatcagga tggcgcatat gctgggtggct ataagtgttca ctgttaaagt catcaccata	2040
ttcttcatttgc gacttgcgtat agtctctat aaaccaccgc cccaggaac ggaggtatca	2100
tttcaaaatgc agaatgttgcgat tgcgttgcacg attacagtgg aggaggaccaacaaata	2160
gagaacgaag ga	2172

10

20

30

40

<211> 724

<212> PRT

<213> Rat

<400> 54

Met Gln Gly Ser Lys Gly Val Glu Asn Pro Ala Phe Val Pro Ser Ser

5 10 15

Pro Asp Thr Pro Arg Arg Ala Ser Ala Ser Pro Ser Gln Val Glu Val

10 20 25 30

Ser Ala Val Ala Ser Arg Asn Gln Asn Gly Gly Ser Gln Pro Arg Asp

35 40 45

Ser Glu Asp Pro Gln Lys Ser Thr Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ser Thr

50 55 60

Leu Pro Ala Ser Asp Glu Pro Pro Gly Ser Gln Leu Arg Glu Leu Glu

65 70 75 80

Glu Gly Pro Cys Gly Trp Arg Asn Phe His Pro Gln Cys Leu Gln Arg

85 90 95

Cys Asn Asn Pro Lys Gly Phe Leu Leu His Tyr Cys Leu Leu Ala Leu

100 105 110

Thr Gln Gly Ile Val Val Asn Gly Leu Val Asn Ile Ser Ile Ser Thr

115 120 125

Ile Glu Lys Arg Tyr Glu Met Lys Ser Ser Leu Thr Gly Leu Ile Ser

130 135 140

Ser Ser Tyr Asp Ile Ser Phe Cys Val Leu Ser Leu Phe Val Ser Phe

145 150 155 160

Phe Gly Glu Arg Gly His Lys Pro Arg Trp Leu Ala Phe Ala Ser Phe

165 170 175

Met Ile Gly Leu Gly Ala Leu Val Phe Ser Leu Pro His Phe Phe Ser

180 185 190

Gly Arg Tyr Glu Leu Gly Thr Ile Phe Glu Asp Thr Cys Leu Thr Arg

10

20

30

40

195	200	205	
Asn Ser Thr Arg Cys Ala Ser Ser Thr Ser Leu Leu Ser Asn Tyr Phe			
210	215	220	
Tyr Val Phe Val Leu Gly Gln Leu Leu Leu Gly Thr Gly Gly Thr Pro			
225	230	235	240
Leu Tyr Thr Leu Gly Thr Ala Phe Ile Asp Asp Ser Val Pro Thr His			
245	250	255	
Lys Ser Ser Leu Tyr Ile Gly Ile Gly Tyr Ser Met Ser Ile Leu Gly			
260	265	270	
Pro Ala Ile Gly Tyr Val Leu Gly Gly Gln Leu Leu Thr Met Tyr Ile			
275	280	285	
Asp Val Ala Met Gly Gln Ser Ser Asp Leu Thr Glu Asp Asp Pro Arg			
290	295	300	
Trp Leu Gly Ala Trp Trp Ile Gly Phe Leu Leu Ala Trp Leu Phe Ala			
305	310	315	320
Trp Ser Leu Ile Met Pro Phe Ser Cys Phe Pro Lys His Leu Pro Gly			
325	330	335	
Thr Ala Lys Ile Gln Ala Gly Lys Thr Ser Gln Thr His Gln Asn Asn			
340	345	350	
Ser Thr Ser Phe Gln His Met Asp Glu Asn Phe Gly Lys Ser Ile Lys			
355	360	365	
Asp Phe Pro Thr Ala Val Lys Asn Leu Met Arg Asn Thr Val Phe Ile			
370	375	380	
Cys Leu Val Leu Ser Thr Thr Ser Glu Ala Leu Val Thr Thr Gly Phe			
385	390	395	400
Ala Thr Phe Leu Pro Lys Phe Ile Glu Asn Gln Phe Gly Leu Thr Ser			
405	410	415	
Ser Phe Ala Ala Thr Leu Gly Gly Ala Val Leu Ile Pro Gly Ala Ala			
420	425	430	

10

20

30

40

Leu Gly Gln Ile Leu Gly Gly Val Leu Val Ser Lys Phe Lys Met Lys
 435 440 445
 Cys Lys Asn Thr Met Lys Phe Ala Leu Cys Thr Ser Gly Val Ala Leu
 450 455 460
 Met Leu Ser Phe Val Phe Ile Tyr Ala Lys Cys Glu Asn Gly Pro Phe
 465 470 475 480
 Ala Gly Val Ser Glu Ser Tyr Asn Gly Thr Gly Glu Met Gly Asn Leu
 485 490 495 10
 Thr Ala Pro Cys Asn Ala Asn Cys Asn Cys Leu Arg Ser Tyr Tyr Tyr
 500 505 510
 Pro Leu Cys Gly Ser Asp Gly Val Gln Tyr Phe Ser Pro Cys Phe Ala
 515 520 525
 Gly Cys Leu Asn Ser Val Ser Asn Arg Lys Pro Lys Ala Tyr Tyr Asn
 530 535 540 20
 Cys Ser Cys Ile Glu Arg Lys Val Asp Ile Thr Ser Thr Ala Glu Ser
 545 550 555 560
 Pro Asp Phe Glu Ala Arg Ala Gly Lys Cys Lys Thr Gln Cys Ser Asn
 565 570 575
 Leu Pro Ile Phe Leu Gly Ile Phe Phe Ile Thr Val Ile Phe Thr Phe
 580 585 590
 Met Ala Gly Thr Pro Ile Thr Val Ser Ile Leu Arg Cys Val Asn His
 595 600 605 30
 Arg Gln Arg Ser Leu Ala Leu Gly Val Gln Phe Met Leu Leu Arg Leu
 610 615 620
 Leu Gly Thr Ile Pro Gly Pro Ile Ile Phe Gly Val Thr Ile Asp Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Val Leu Trp Asp Ile Asn Glu Cys Gly Thr Lys Gly Ala Cys
 645 650 655 40
 Trp Ile Tyr Asp Asn Ile Arg Met Ala His Met Leu Val Ala Ile Ser

660	665	670
Val Thr Cys Lys Val Ile Thr Ile Phe Phe Asn Gly Leu Ala Ile Val		
675	680	685
Leu Tyr Lys Pro Pro Pro Pro Gly Thr Glu Val Ser Phe Gln Ser Gln		
690	695	700
Asn Val Val Val Ser Thr Ile Thr Val Glu Glu Asp Leu Asn Lys Ile		
705	710	715
Glu Asn Glu Gly		720

10

20

30

40

<210> 55

<211> 2172

<212> DNA

<213> Rat

<400> 55

atgcagggtt ccaagggagt cgagaacccg gcattcgcc ctccagcccc agacacccca	60
cgcgtgcgt ctgcgtcgcc ttcccagggtg gaggctctg ctgtggcctc caggaatcag	120
aatgggggtt cgcaacctcg ggattctgaa gatccccaga agtcaactga gccatctcct	180
ccttcctcga ctctcccagc ttctgtatgag ccggcggggt cacagctaag agagcttgag	240
gagggacctt gcgggtggag gaacttccac ccccaagggtc tttagcgctg caacaacccc	300
aaaggttttc tgcttcacta ctgtcttta gcccataacgc aaggtattgt agtaaatggc	360
ctagtaataa ttagcatttc caccatcgag aagcgctatg aaatgaagag ttccctgacc	420
ggcctgatat catcgagcta cgacatctcc ttttgcgtgt tgtctctgtt tgtgtctttc	480
tttggtgaga gaggacacaa acctcgctgg ttgcctttg catcctttat gatcgactg	540
ggagcgctgg tttttcttt accacacttc ttcaagtggga gatataact gggaaaccatt	600
ttcgaagata cctgccttaac aaggaacacgc accagatgtg ctcttcaac ctctctgttt	660
tctaaactact tctatgtctt tgtcttgga caactgttgc tggggactgg aggaactccg	720
ctctacaccc tgggaacggc ttcatgtat gactctgtac ccacacaccaa atctttctta	780
tatatcggtt ttggctattc tatgtcaatc ctaggcccag ccattggcta tgtgttgaa	840
ggacagctgt tgacaatgtt catgtatgtt gctatggac aaagttcaga tctgactgag	900

gatgatcccc ggtggttggg ggcttggtgg attggattcc ttttagcttgc gctcttgct	960	
tggctttga taatgcctt ctcctttt ccaaagcatt taccagggac agcaaaaatt	1020	
caagctggca aaacttccca gactcatcaa aataaatagta ctcccttcca acatatggat	1080	
aaaaattttg ggaaaagtat taaagatttt ccaactgctg tgaagaattt gatgaggaat	1140	
acagtcttta tatgttttagt tctatcaact acttctgaag cactagttac cacgggattt	1200	
gccacgtttt tacctaaatt tatagaaaat caatttggat tgacatcgag ctgtgcggca	1260	
acacttggag gggctgtttt aattcctgga gctgctttg gtcaaatctt aggtggtgtt	1320	10
cttggttcaa aattcaaaaat gaagtgtaaa aataacaatga agtttgcgtt atgtacatct	1380	
ggagtagcac ttatgctgag ttttgtattt atttatgcaa aatgtgaaaaa tggccattt	1440	
gctggtgtgt ctgaatcata taatggaaca ggagagatgg ggaatctgac tgcacccgtc	1500	
aatgccaatt gcaattgttt gagatcctat tattaccgc tctgtggaaag tgcaggagtc	1560	
cagtattttt ctccctgctt tgcaagggtgt ttaaaactcag ttcaaaacag gaaaccaaag	1620	
gcatattata attgttccgt tattgaaagg aaagtcgaca tcacttctac tgcagaaagc	1680	
cctgattttg aagcaagggc tggaaaatgt aaaactcagt gttcaaacct gcccattttt	1740	20
ctcgccatct tcttcatcac tggatgtttt acctttatgg caggtacccc cataactgtg	1800	
tccatattaa ggtgtgtcaa tcacagacag cgatctctag cactgggagt gcagttcatg	1860	
cttcttcgggt tgtaggcac gatacctggg ccaattatat ttggcgtcac aatagacagc	1920	
acgtgtgttc tgtggacat caatgaatgt ggaacaaagg gggcgtgttg gatctatgt	1980	
aacatcagga tggcgcatat gctggtggtc ataagtgtt ctgtaaaagt catcaccata	2040	
ttcttcattt gacttgcgtt agttctctat aaaccaccgc cccaggaac ggaggtatca	2100	
tttcaaagtc agaatgttagt tggtcgacg attacagtgg aggaggacct caacaaaata	2160	30
gagaacgaag ga	2172	

〈210〉 56

〈211〉 25

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

<400> 56

tcaactgagc catccccgcc ttctt

25

<210> 57

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Primer

<400> 57

tctgttcctg ggggcggtgtgg tttat

25

<210> 58

<211> 30

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 58

gacacaaaca gagacaacac gcaaaaaggag

30

30

<210> 59

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 59

acaaaacagag acaacacgca aaaggagatg

40

30

⟨210⟩ 60

⟨211⟩ 25

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Primer

10

⟨400⟩ 60

atcggactgg gagcgctgg tttt

25

⟨210⟩ 61

⟨211⟩ 30

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

20

⟨220⟩

⟨223⟩ Primer

⟨400⟩ 61

tattattacc cactctgtgg aagtgtatgga

30

⟨210⟩ 62

⟨211⟩ 26

30

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Primer

⟨400⟩ 62

ctttcttgac catgcagggt tccaaag

26

40

⟨210⟩ 63

〈211〉 26

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 63

atcctcttct ttctcatcct tcgttc

26

10

〈210〉 64

〈211〉 27

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 64

atgcagggtt ccaagggagt cgagaac

27

20

〈210〉 65

〈211〉 28

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

30

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 65

tcatccttcg ttctctattt tgttgagg

28

〈210〉 66

〈211〉 20

40

〈212〉 DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 66

taatacgact cactataggg

20

<210> 67

10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 67

catacgattt aggtgacact atag

24

20

<210> 68

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

30

<400> 68

atcgagaaggc gctatgaaat gaaga

25

<210> 69

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

〈223〉 Primer

〈400〉 69

agcgctccca gtccgatc

18

〈210〉 70

〈211〉 23

〈212〉 DNA

10

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 70

tttggtgaga gaggacacaa acc

23

〈210〉 71

20

〈211〉 28

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 71

ggactgggag cgctggtgtt ttctttac

28

30

〈210〉 72

〈211〉 21

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 72

40

cccagggtgt agagcggagt t	21
<210> 73	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	10
<223> Primer	
<400> 73	
tggtcgtttga taatgccttt ctcct	25
<210> 74	
<211> 25	
<212> DNA	20
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 74	
ctgctgtgaa gaatttgatg aggaa	25
<210> 75	30
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 75	
cagtgtgaa gaagatgccg agaaa	25
	40

<210> 76
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 76

cgctggcttg cctttgcata cttta

25

<210> 77
<211> 1931
<212> DNA
<213> Rat
<400> 77

tcaactgagc catctccccc ttcttcgact ctccccagctt ctgtatgagcc gccgggggtca 60
cagctaaggcg agcttggagga gggacccctgc ggggtggagga acttccaccc ccagtgtctt 120
cagcgctgca acaaccccaa aggtttctg cttcactact gtctcttagc cctaacgcaa 180
ggtattttag taaatggcct agtaaatatt agcattcca ccatcgagaa ggcgtatgaa 240
atgaagagtt ccctgaccgg cctgatatca tcgagctacg acatctcctt ttgcgttgt 300
tctctgtttg tgtctttctt tggtgagaga ggacacaaaac ctgcgtggct tgcccttgca 360
tcctttatga tcggactggg agcgctgggg tttctttac cacacttctt cagtggaga 420
tatgaactgg gaaccatttt cgaagatacc tgcttaacaa ggaacagcac cagatgtgct 480
tcttcaacct ctctgcttc taactacttc tatgtctttg tcctgggaca actgttgctg 540
gggactggag gaactccgct ctacaccctg ggaacggcct tcattgtga ctctgtaccc 600
acacacaaaat cttcttata tatcggtatt ggctattcta tgtcaatcct aggcccagcc 660
attggctatg ttttgggagg acagctgttg acaatgtaca ttgtatgtgc tatgggacaa 720
agttcagatc tgacttgagga tgatccccgg tggttggggg ctgggtggat tggattcctt 780
ttagcttggc tctttgccttg gtctttgata atgcctttctt cctgtttcc aaagcattta 840
ccagggacag caaaaattca agctggaaaaa acttcccaga ctcataaaaaa taatagtact 900

tccttccaac atatggatga aaattttggg aaaagtatta aagattttcc aactgctgtg 960
 aagaatttga tgaggaatac agtctttata tggtagttc tatcaactac ttctgaagca 1020
 ctagttacca cgggatttgc cacgtttta cctaaattta tagaaaatca atttgattg 1080
 acatcgagca ttgcggcaac acttggaggg gctgtttaa ttccctggagc tgctcttgg 1140
 caaatcttag gtggtgttct tggtaaaaa ttcaaaatga agttaaaaa tacaatgaag 1200
 ttgcgttat gtacatctgg agtagcacit atgctgagtt ttgtatttat ttatgaaaaa 1260
 tgtgaaaatg ggccatttgc tgggtgtct gaatcatata atggaacagg agagatgggg 1320 10
 aatctgactg caccttgc aa tgccatttgc aattgtttga gatccttata ttaccactc 1380
 tgtggaagtg atggagtcca gtattttct ccctgcttgc caggttggaa aaactcagtt 1440
 tcaaacagga aaccaaaggc atattataat tggccatgttta tggaaaggaa agtcgacatc 1500
 acttctactg cagaaagccc tgattttga gcaagggttg gaaaatgtaa aactcagtgt 1560
 tcaaacctgc ccataatttct cggcatcttc ttcatcaactg tgattttac ctatggca 1620
 ggtacccccca taactgtgtc catattaagg tgtgtcaatc acagacagcg atctctagca 1680
 ctgggagtgc agttcatgtct tcttcggtttgc ttaggcacga tacctgggcc aattatattt 1740 20
 ggcgtcacaa tagacagcac gtgtttctg tgggacatca atgaatgtgg aacaaagggg 1800
 gcgtgttggta tctatgataa catcaggatg ggcataatgc tggggctat aagtgttact 1860
 tgtaaagtca tcaccatatt ctcaatggc ctgcgatag ttctctataa accaccggcc 1920
 ccaggaacgg a 1931

<210> 78

<211> 484

<212> DNA

<213> Rat

<400> 78

ctttcttgac catgcagggc tccaaaggag tcgagaaccc ggcattcgcc ctttccagcc 60
 cagacacccc acgcccgtgcg tctgcgtcgc cttccaggt ggagggtctct gctgtggcc 120
 ccaggaatca gaatgggggt tcgcaaccctc gggaaatctga agatccccag aagtcaactg 180
 agccatctcc tccctcttcg actctccctag cttctgtatga ggcggccgggg tcacagctaa 240 40
 gcgagcttgc ggagggaccc tgcgggtggta ggaacttcca ccccccagtgt ctgcgtcgt 300

gcaacaaccc caaagggttt ctgcttact actgtctctt agccctaacg caaggtattg 360
tagtaaatgg cctagtaaat attagcattt ccaccatcg aagcgctat gaaatgaaga 420
gttccctgac cgccctgata tcatcgagct acgacatctc ctttgcgtg ttgtcttgt 480
ttgt 484

⟨210⟩ 79

⟨211⟩ 704

10

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Rat

〈400〉 79

tattattaa

tgtttaaact cagttcaaa caggaacca aaggcatatt ataattgttc ctgtattgaa	120
aggaaagtgc acatcacattc tactgcagaa agccctgatt ttgaagcaag ggctggaaaa	180
tgtaaaactc agtgtcaaa cctgcccata tttctcgcca tccttccat cactgtgatt	240
tttaccttta tgccaggtac cccataact gtgtccatat taaggtgtgt caatcacaga	300
cagcgatctc tagcaactggg agtgcagttc atgccttc ggttgtagg cacgatacc	360
gggccaatta tatttggcgt cacaatagac agcacgtgtg ttctgtggga catcaatgaa	420
tgtggAACAA agggggcggtg ttggatctat gataacatca ggatggcgca tatgctggtg	480
gctataagtgttacttgtaa agtcatcacc atattcttca atggacttgc gatagtttc	540
tataaaccac cgcccccagg aacggaggta tcatttcaaa gtcagaatgt agttgtgtcg	600
acgattacag tggaggagga cctcaacaaa atagagaacg aaggatgaga aagaagagga	660
tactgccttta gaaaagtggc tccttctgt cagaacaaac tgtg	704

(210) 80

〈211〉 2175

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Rat

〈400〉 80

20

30

40

atgcagggtt ccaagggagt cgagaaccccg gcatttcgtcc ctccccagcccc agacacccca 60

cgccgtgcgt ctgcgtcgcc ttcccaggig gaggctctg ctgtggcctc caggaatcat 120
aatgggggtt cgcaacctcg ggaatctgaa gatccccaga agtcaactga gccatctct 180
ccttcctcga ctctccacgc ttctgtatgag ccggccgggt cacagctaag cgagcttgag 240
gagggacctt gcgggiggag gaactccac ccccaagtgtc tttagcgctg caacaacccc 300
aaaggttttc tgcttcacta ctgtcttta gccctaaccgc aaggtaattgt agttaaatggc 360
ctagtaaata ttagcatttc caccatcgag aagcgctatg aaatgaagag ttccctgacc 420
ggccctgatat catcgagcta cgacatctcc ttttgcgtgt tgtctctgtt tgtgtctttc 480
tttggtgaga gaggacaccaa acctcgctgg ttgccttg catcctttat gatcgactg 540
ggagcgctgg tttttcttt accacacttc ttcaatggga gataatgaact gggaaaccatt 600
ttcgaagata cctgcttaac aaggaacagc accagatgtg ttcttcaac ctctctgttt 660
tctaactact tctatgtctt tgccctggga caactgttgcc tgggactgg aggaactccg 720
ctctacaccc tggAACGGC ttccattgtat gactctgtac ccacacaccaa atcttctcta 780
tatatcggtt ttggctattt tatgtcaatc cttagccccag ccattggcta tttgttgga 840
ggacagctgt tgacaatgta cattgtatgtt gctatggac aaagttcaga tctgactgag 900
gtatgtcccc ggtgggtggg ggcttgggtgg attggattcc tttagcttg gctctttgtt 960
tggctttga taatgccttt ctccctttt ccaaaggatt taccagggac agcaaaaattt 1020
caagctggca aaacttccca gactcatcaa aataatagta ttcccttcca acatatggat 1080
aaaaatttttggaaaaagtat taaagatttt ccaactgtgt tgaagaattt gatgaggaat 1140
acagtcttta tatgttttagt tctatcaact acttctgaag cactagttac cacgggattt 1200
gccacgttt tacctaaattt tatagaaaat caattttggat tgacatcgag cattgcggca 1260
acacttggag gggctgtttt aattccctgga gctgccttg gtcaaattttt aggtgggttt 1320
cttgcatttcaaaattt aattcaaaaat gaagtgtaaa aatacaatga agtttgcgtt atgtacatct 1380
ggagtagcac ttatgcgttag ttttgtttt atttatgcaaa aatgtaaaaa tggccattt 1440
gctgggtgtt ctgaatcata taatgaaaca ggagagatgg ggaatctgac tgcaccttgc 1500
aatgccaattt gcaattttt gagatcctat tattaccac tctgtggaaag tggatggatc 1560
cagttttttt ctccctgtttt tgcaatgtt taaaactcag ttccaaacag gaaacccaaag 1620
gcatattata attgttcctg tattgaaagg aaagtcgaca tcacttctac tgcagaaagc 1680
cctgattttg aagcaaggggc tggaaaatgt aaaactcaatgtt gttccaaaccc tgcacatctt 1740
ctcgccatct tcttcattcac tttgtttt acctttatgg caggtacccccc cataactgtg 1800

tccatattaa ggtgtgtcaa tcacagacag cgatctctag cactgggagt gcagttcatg 1860
 cttcttcggt tgtaggcac gatacctggg ccaattatat ttggcgac ac 1920
 acgtgtgttc tgtggacat caatgaatgt ggaacaaagg gggcgtgttg gatctatgat 1980
 aacatcagga tggcgcatat gctgggtggct ataagtgta ctgtaaaagt catcaccata 2040
 ttcttcaatg gacttgcgt agttcttat aaaccaccgc ccccaggaac ggaggatcatc 2100
 tttcaaagtc agaatgttgt tggtcgacg attacagtgg aggaggacct caacaaaata 2160
 gagaacgaag gatga 2175

10

<210> 81

<211> 2175

<212> DNA

<213> Rat

<400> 81

atgcagggtt ccaagggagt cgagaacccg gcattcgcc ctccagccc agacacccca 60
 cgccgtgcgt ctgcgtcgcc ttcccagggtg gaggctctg ctgtggcctc caggaatcag 120
 aatgggggtt cgcaacctcg ggattctgaa gatccccaga agtcaactga gccatctct 180
 ctttcttcga ctctcccagc ttctgtatgag ccggccgggt cacagctaag agagcttgag 240
 gagggacctt gcgggtggag gaacttccac ccccaagggtc tttagcgctg caacaacccc 300
 aaaggttttc tgcttcacta ctgtcttta gcccataacgc aaggtattgt agtaaatggc 360
 ctagtaaata ttagcatttc caccatcgag aagcgctatg aaatgaagag ttccctgacc 420
 ggcctgatat catcgagcta cgacatctcc ttttgcgtgt tgctctgtt tggtctttc 480
 ttgggtgaga gaggacacaa acctcgtgg ctgcctttg catcctttat gatcgactg 540
 ggagcgctgg tgttttctt accacacttc ttcaatggga gatataact gggaaaccatt 600
 ttcaagata cctgttaaac aaggaacacgc accagaatgtg ctcttcaac ctctctgttt 660
 tctaactact tctatgtctt tgccctggga caactgttgc tggggactgg aggaactccg 720
 ctctacaccc tgggaacggc ctgcattgt gactctgtac ccacacacaa atctttctta 780
 tatatcggtt ttggctattc tatgtcaatc ctaggcccag ccattggcta tggtgtggga 840
 ggacagctgt tgacaatgtt catgtatgtt gctatgggac aaagttcaga tctgactgag 900
 gatgatcccc ggtgggtggg ggcttgggtgg attggattcc ttttagcttg gctcttgct 960

20

30

40

tggctttga taatgcctt ctcgtttt ccaaaggcatt taccagggac agcaaaaatt	1020	
caagctggca aaacttccca gactcatcaa aataaatgta ctcccttcca acatatggat	1080	
gaaaattttg ggaaaagtat taaagatttt ccaactgctg tgaagaattt gatgaggaat	1140	
acagtcttta tatgttttgt tctatcaact acttctgaag cactagttac cacgggattt	1200	
gccacgttt tacctaaatt tatagaaaat caatttggat tgacatcgag ctgcggca	1260	
acacttggag gggctgttt aattcctgga gctgctttg gtcaaatctt aggtggtgtt	1320	
cttgcgttcaa aattcaaaaat gaagtgtaaa aatacaatga agtttgcgtt atgtacatct	1380	10
ggagtagcac ttatgctgag ttttgtatit atttatgcaa aatgtgaaaa tggccattt	1440	
gctggtgtgt ctgaatcata taatggaaca ggagagatgg ggaatctgac tgcaccttgc	1500	
aatgccaatt gcaattttt gagatcctat tattaccgc tctgtggaaag tgcaggatgc	1560	
cagtattttt ctccctgctt tgcagggtgt ttaaactcag ttcaaacag gaaaccaaag	1620	
gcatattata attgttcctg tattgaaagg aaagtgcaca tcacttctac tgcagaaagc	1680	
cctgattttt aagcaagggc tggaaaatgt aaaactcagt gttcaaacct gcccatattt	1740	
ctcgccatct tcttcatcac tgcgtttttt acctttatgg caggtacccc cataactgtg	1800	20
tccatattaa ggtgtgtcaa tcacagacag cgatctctag cactgggagt gcagttcatg	1860	
tttcttcggt tggtaggcac gatacctggg ccaattatat ttggcgtcac aatagacagc	1920	
acgtgttttc tgcgtggacat caatgaatgt ggaacaaagg gggcgtgttg gatctatgt	1980	
aacatcagga tggcgcatat gctggtggtataaagtgtta ctgttaaagt catcaccata	2040	
ttcttcatg gacttgcgtat agtctctat aaaccaccgc cccaggaac ggaggtatca	2100	
tttcaaagtc agaatgttagt tgcgtcgacg attacagtgg aggaggaccaacaaata	2160	
gagaacgaag gatga	2175	30

〈210〉 82

〈211〉 30

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer

〈400〉 82

atcgatatga agagcgccaa aggtatttag

30

<210> 83

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Primer

<400> 83

actagttcac ccttctttta ctatttgtt

30

<210> 84

<211> 18

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 84

tagaaggcac agtcgagg

18

【図面の簡単な説明】

30

【図1】ヒトTCH229、ヒトSLC21A12およびヒトOATPRP4のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH229はヒトTCH229のアミノ酸配列を、SLC21A12はヒトSLC21A12のアミノ酸配列を、OATPRP4はヒトOATPRP4のアミノ酸配列を、TM1～TM12は膜貫通領域を示す。　は、ヒトTCH229に一致するアミノ酸を示す。（図2へつづく）

【図2】ヒトTCH229、ヒトSLC21A12およびヒトOATPRP4のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH229はヒトTCH229のアミノ酸配列を、SLC21A12はヒトSLC21A12のアミノ酸配列を、OATPRP4はヒトOATPRP4のアミノ酸配列を、TM1～TM12は膜貫通領域を示す。　は、ヒトTCH229に一致するアミノ酸を示す。（図1のつづき）

【図3】ヒトTCH229遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1μl当たりのコピー数で表した。

40

【図4】ヒトTCH229遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1μl当たりのコピー数で表した。

【図5】ヒトTCH229およびマウスTCH229のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH229はヒトTCH229のアミノ酸配列を、mTCH229はマウスTCH229のアミノ酸配列を、膜貫通領域はTM1～12、ファミリー間で高く保存されているアミノ酸箇所は*で示した。　は、両者に一致するアミノ酸を示す。

【図6】マウスTCH229遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1μl当たりのコピー数で表した。

50

【図7】ヒトTCH229とラットTCH229No.1およびNo.2のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH229はヒトTCH229のアミノ酸配列を、rTCH229No.1はラットTCH229No.1のアミノ酸配列を、rTCH229No.2はラットTCH229No.2のアミノ酸配列を示す。TM1～TM12は膜貫通領域を示す。　は、3者に一致するアミノ酸を示す。(図8へつづく)

【図8】ヒトTCH229とラットTCH229No.1およびNo.2のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH229はヒトTCH229のアミノ酸配列を、rTCH229No.1はラットTCH229No.1のアミノ酸配列を、rTCH229No.2はラットTCH229No.2のアミノ酸配列を示す。TM1～TM12は膜貫通領域を示す。　は、3者に一致するアミノ酸を示す。(図7のつづき)

10

【図9】ラットTCH229遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1μl当たりのコピー数で表した。

【図10】マウスTCH229遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量は、cDNA溶液1μl当たりのマウスTCH229のコピー数を、等量の各組織cDNAにおけるrodent GAPDHのコピー数で割った値で表した。

【図11】ラットTCH229遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量は、相対的発現量を100倍した値で表した。

【図12】ヒト正常細胞におけるヒトTCH229の発現変動を表す図である。図中、縦軸は、ヒトTCH229遺伝子発現値のヒト18S発現値に対する相対的発現値を100000倍した値を示す。横軸は細胞名を示す。　はTNF-、IL-1およびIL-6(各々10ng/ml)刺激無し、　はTNF-、IL-1およびIL-6(各々10ng/ml)刺激有りを示す。

20

【図13】刺激剤で刺激したRPTECにおけるヒトTCH229の発現変動を表す図である。図中、縦軸は、ヒトTCH229遺伝子発現値のヒトGAPDH発現値に対する相対的発現値を100倍した値を示す。横軸は刺激剤での反応時間を示す。- - -はTGF-1、- - -はPMA、- - -はTNF-、-* -はIL-1、- - -はIL-6、- - -はコントロールを示す。

【図14】刺激剤で刺激したHRC-EにおけるヒトTCH229の発現変動を表す図である。図中、縦軸は、ヒトTCH229遺伝子発現値のヒトGAPDH発現値に対する相対的発現値を100倍した値を示す。横軸は刺激剤での反応時間を示す。- - -はTGF-1、- - -はPMA、- - -はTNF-、-* -はIL-1、- - -はIL-6、- - -はコントロールを示す。

30

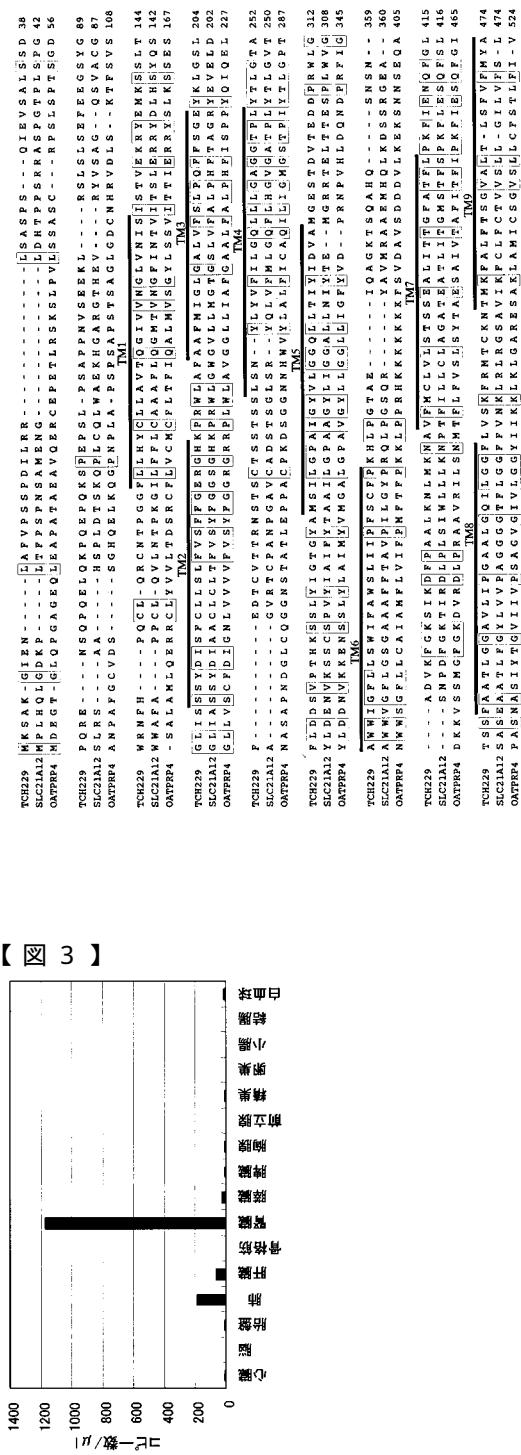
【図15】ラットTCH229遺伝子発現量を表す図である。図中、縦軸はラットTCH229遺伝子発現値のrodent GAPDH発現値に対する相対的発現値を10000倍した値を、横軸は腎臓を採取した週齢を示す。　は実験群(WFラット)、　は対照群(WLラット)の結果である。

【図16】ラットTCH229遺伝子発現量を表す図である。図中、縦軸はラットTCH229遺伝子発現値のrodent GAPDH発現値に対する相対的発現値を10000倍した値を、横軸は腎臓を採取した週齢を示す。　は実験群(SHCラット)、　は対照群(SDラット)の結果である。

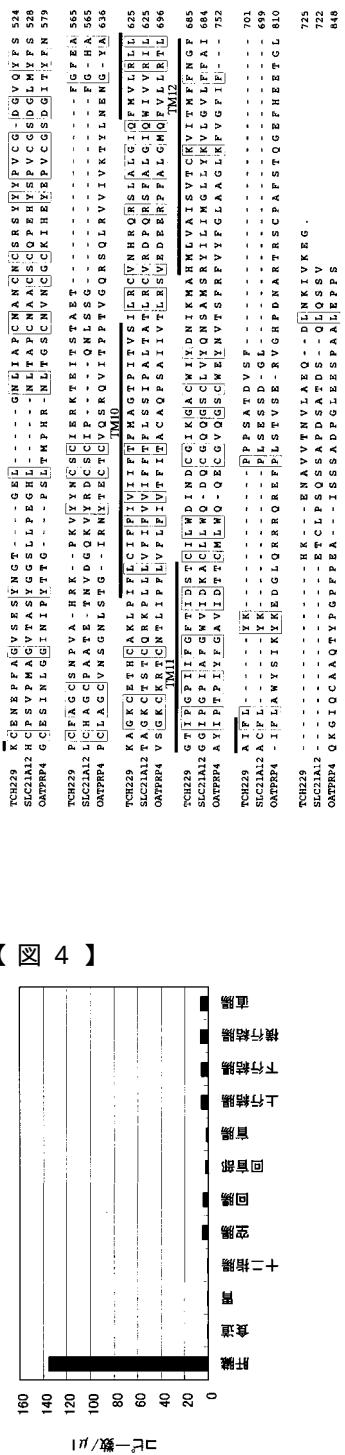
40

【図17】ラットTCH229遺伝子発現量を表す図である。図中、縦軸はラットTCH229遺伝子発現値のrodent GAPDH発現値に対する相対的発現値を10000倍した値を、横軸は腎臓を採取した週齢を示す。　は実験群(ZFラット)、　は対照群(ZLラット)の結果である。

【 図 1 】

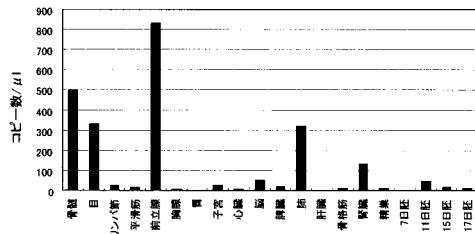


【 四 2 】



【 図 5 】

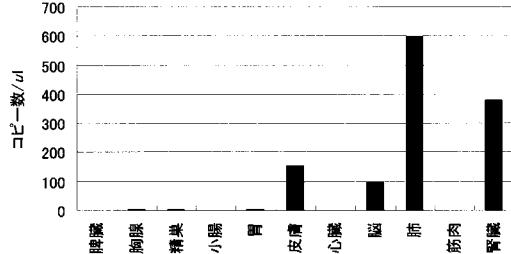
【 図 6 】



〔 図 8 〕

TCH229	G E L N G L I A P C N A N C N C [RS Y S Y Y Y F V C O - D G V Q O Y F S P C F A G C S N P V A S 535
TCH229Nn_1	G M H M G L T A P C N A N C N C [R S Y S Y Y Y P L C G S D G V Q Y S P C F A G C L N S V N S 535
TCH229Nn_2	G M H M G L T A P C N A N C N C [R S Y S Y Y Y P L C G S D G V Q Y S P C F A G C L N S V N S 535
TCH230	H R K P X P Y V N N G C S I E R K T I S T C P A B E F G K E A G A C R E P T G A K L P I P 580
TCH229Nn_1	N R K P X P K A Y Y N C S C I E R K V D I T S T A E S P D F V A R A O G X K T Q C S M H I P L R L P I P 580
TCH229Nn_2	N R K P X P K A Y Y N C S C I E R K V D I T S T A E S P D F V A R A O G X K T Q C S M H I P L R L P I P 580
TCH231	L C I F P F I V I P T F M A G T P I T V S I L R C V N H H Q R S S A L G Q F M V L R L L 625
TCH229Nn_1	L C I F P F I V I P T F M A G T P I T V S I L R C V N H H Q R S S A L G Q F M V L R L L 625
TCH229Nn_2	L C I F P F I V I P T F M A G T P I T V S I L R C V N H H Q R S S A L G Q F M V L R L L 625
TCH232	G T I P G P I I Z F G T I D T S C V L W D I N D C O T K G A C H I W Y D N R I M A H M L V A 670
TCH229Nn_1	G T I P G P I I Z F G T I D T S C V L W D I N D C O T K G A C H I W Y D N R I M A H M L V A 670
TCH229Nn_2	G T I P G P I I Z F G T I D T S C V L W D I N D C O T K G A C H I W Y D N R I M A H M L V A 670
TCH233	I S V T C R V I T P F F N G G A I F L Y K K P P P S A T D V F H K E N A V T N V N L A E 715
TCH229Nn_1	I S V T C R V I T P F F N G L A I V L Y K K P P P G T E V F Q G S Q N V V S T I T V E E 715
TCH229Nn_2	I S V T C R V I T P F F N G L A I V L Y K K P P P G T E V F Q G S Q N V V S T I T V E E 715
TCH229	D N W K I X K I N E G .
TCH229Nn_1	D N W K I X K I N E G .
TCH229Nn_2	D N W K I X K I N E G .

【 図 9 】



【 四 7 】

TCB229 [H] S K A G I E N [A] F V P S S P D I L R I L S A S P S O [E] V A L S A D S P Q R E N S O 45
TCB229N0_1 [M] O G S G K G V E N [P] A F V P S S P D T P R R A S A S P S Q V E V S A V A S K Q N G G S Q 45
TCB229N0_2 [M] O G S G K G V E N [P] A F V P S S P D T P R R A A S P S Q V E V S A V A S K Q N G G S Q 45

TCB229 [P] Q B Q Q P Q F P Q K G S P F C P S A P M V I E S E K R A L S E L S E S P E G Y Q W M 90
TCB229N0_1 [P] R D - - S E D P Q K G S P F C P S A P M V I E S E K R A L S E L S E S P E G Y Q W M 90
TCB229N0_2 [P] R D - - S E D P Q K G S P F C P S A P M V I E S E K R A L S E L S E S P E G Y Q W M 90

TCB229 [R] N H F P Q C L Q R C M [T] G F P H L N Y C H L A V T Q I V V G N L V N I S I T E R B 135
TCB229N0_1 R N F H P Q C L Q R C M N F K G L L H Y C L L A T Q I V V G N L V N I S I T E R B 135
TCB229N0_2 R N F H P Q C L Q R C M N F K G L L H Y C L L A T Q I V V G N L V N I S I T E R B 135

TCB229 [Y] E X M X H S S L T G L I S S Y D S I F C U L S P F C V L S P F V S F G R G R C H X P B W L A F S 180
TCB229N0_1 Y E X M X H S S L T G L I S S Y D S I F C U L S P F C V L S P F V S F G R G R C H X P B W L A F S 180
TCB229N0_2 Y E X M X H S S L T G L I S S Y D S I F C U L S P F C V L S P F V S F G R G R C H X P B W L A F S 180

TCB229 [M] I G L G A L V F S L P O F P S G E V K L G S L P F E D T C T W T R N S T [O] T S S T S S L 225
TCB229N0_1 M I G L G A L V F S L P H F P G R Y E L G T I F E D T C L T [N] R S T C A S S T S S L 225
TCB229N0_2 M I G L G A L V F S L P H F P G R Y E L G T I F E D T C L T [N] R S T C A S S T S S L 225

TCB229 [S] N Y V L V P I L Q G L L E G A G C P T Y L T C A F P D L D S V P T H K S S L V I G C T O 265
TCB229N0_1 S N Y V F V V F L Q G L L E G A G C P T Y L T C A F P D L D S V P T H K S S L V I G C T O 265
TCB229N0_2 S N Y V F V V F L Q G L L L G T C G P T Y L T C A F P D L D S V P T H K S S L V I G C T O 265

TCB229 [V] A M S L I G P A I G Y V G L Q G L L T [I] M D V A N G E S T D [T] V E D P R L W G A M W 315
TCB229N0_1 V A M S L I G P A I G Y V G L Q G L L T [I] M D V A N G E S T D [T] V E D P R L W G A M W 315
TCB229N0_2 V A M S L I G P A I G Y V G L Q G L L T [I] M D V A N G E S T D [T] V E D P R L W G A M W 315

TCB229 [I] G F L L I S W I I P F C S C P P F R N L P C T A E I Q A G T S T D Q H Q E S S N A 360
TCB229N0_1 I G F L L I S W I I P F C S C P P F R N L P C T A E I Q A G T S T D Q H Q E S S N A 360
TCB229N0_2 I G F L L I S W I I P F C S C P P F R N L P C T A E I Q A G T S T D Q H Q E S S N A 360

TCB229 [D] V F K S I X D F P [A] L K N L H I N A M V F C M V L L S T S E A L T Z T G F 400
TCB229N0_1 D V F K S I X D F P [A] L K N L H I N A M V F C M V L L S T S E A L T Z T G F 400
TCB229N0_2 D V F K S I X D F P [A] L K N L H I N A M V F C M V L L S T S E A L T Z T G F 400

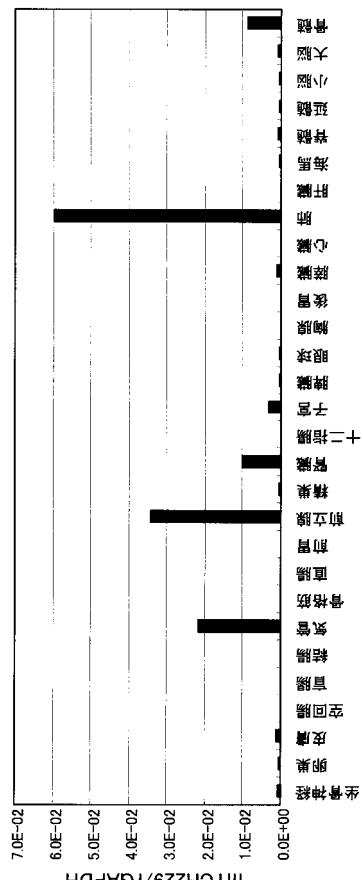
TCB229 [A] T F L P R I G H O P F O L T S P [A] T G L G A V I L A C Q G Z L P F V T P L S X P 445
TCB229N0_1 A T F L P R I G H O P F O L T S P [A] T G L G A V I L A C Q G Z L P F V T P L S X P 445
TCB229N0_2 A T F L P R I G H O P F O L T S P [A] T G L G A V I L A C Q G Z L P F V T P L S X P 445

TCB229 [R] N T C K N T H M F K P A L F [T] S G V A L T A L S Q F V P M Y A C K E N G P F A G V S E S Y N G F 490
TCB229N0_1 R N T C K N T H M F K P A L F [T] S G V A L T A L S Q F V P M Y A C K E N G P F A G V S E S Y N G F 490
TCB229N0_2 R N T C K N T H M F K P A L F [T] S G V A L T A L S Q F V P M Y A C K E N G P F A G V S E S Y N G F 490

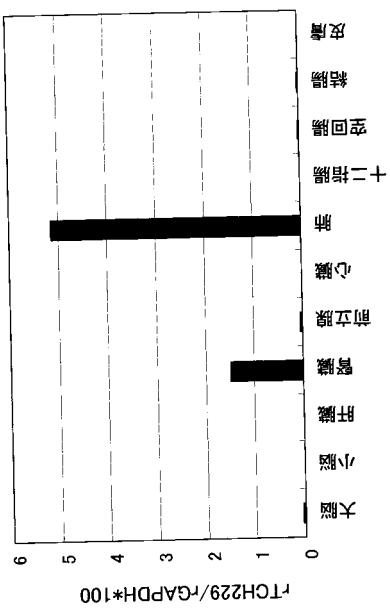
TCB229 [T] M Q P F F I E N O Q G F L T S S T A A T I G G A V A L I G Q C L G Q V L Y S X P 445
TCB229N0_1 T M Q P F F I E N O Q G F L T S S T A A T I G G A V A L I G Q C L G Q V L Y S X P 445
TCB229N0_2 T M Q P F F I E N O Q G F L T S S T A A T I G G A V A L I G Q C L G Q V L Y S X P 445

TCB229 [R] N T C K N T H M F K P A L F [T] S G V A L T A L S Q F V P M Y A C K E N G P F A G V S E S Y N G F 490
TCB229N0_1 R N T C K N T H M F K P A L F [T] S G V A L T A L S Q F V P M Y A C K E N G P F A G V S E S Y N G F 490
TCB229N0_2 R N T C K N T H M F K P A L F [T] S G V A L T A L S Q F V P M Y A C K E N G P F A G V S E S Y N G F 490

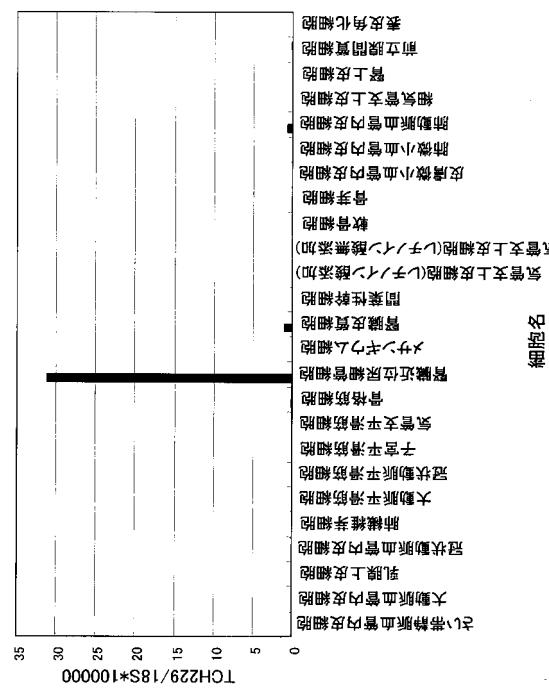
【 図 1 0 】



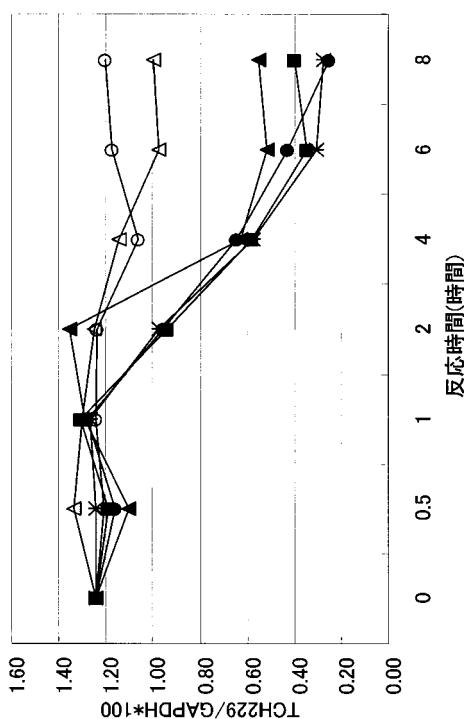
【図 1 1】



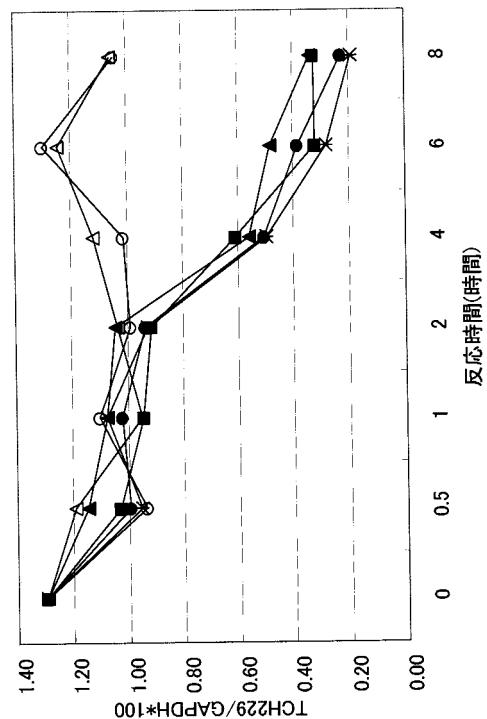
【 図 1 2 】



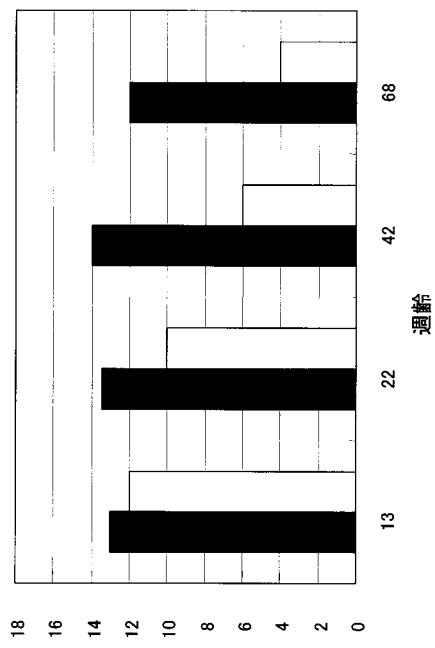
【 図 1 3 】



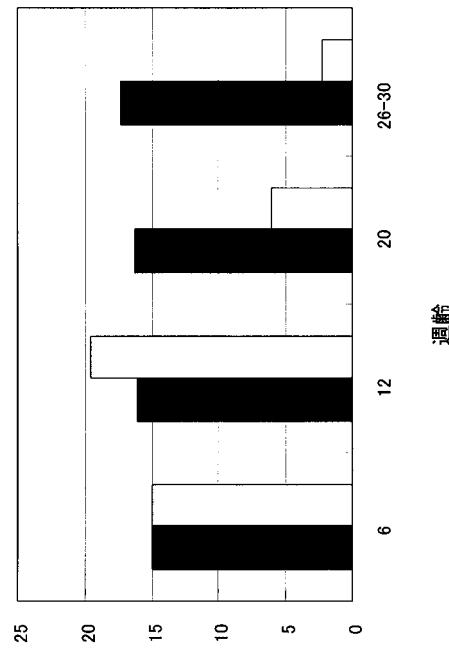
【 図 1 4 】



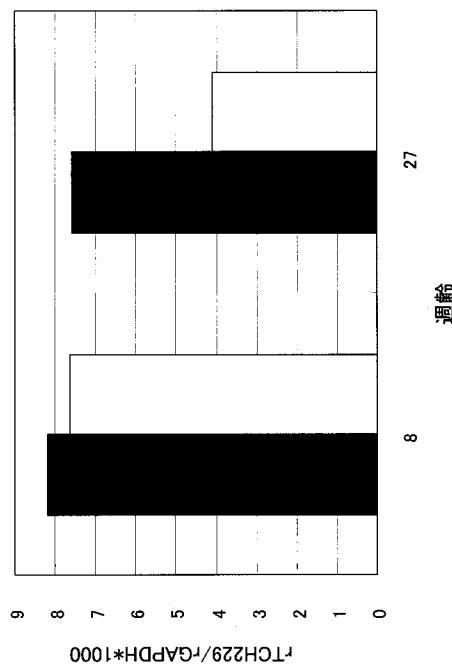
【図15】



【図16】



【図17】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 13/12	4 C 0 8 4
A 6 1 P 13/12	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	4 C 0 8 6
C 0 7 K 16/18	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
FB03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09 DA02 DA06 EA04 GA11 HA12
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ20 QR08 QR32 QR40 QR55 QR59 QR62
QR77 QR80 QS24 QS25 QS28 QS34 QX02
4B064 AG01 AG27 BA16 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA91X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA13 AA17 BA02 BA08 BA23 CA17 CA59 NA14
ZA81
4C085 AA14 BB11 DD21 EE01
4C086 AA01 EA16 NA14 ZA81
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA27 EA50
FA72 FA74 GA01 GA21 HA07