



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |           |                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 国際特許分類6<br/>C07K 14/47, C12N 15/12</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <p>A1</p> | <p>(11) 国際公開番号<br/>WO98/43997</p> <p>(43) 国際公開日<br/>1998年10月8日(08.10.98)</p>                                                                                                                                                                                      |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01371</p> <p>(22) 国際出願日 1998年3月27日(27.03.98)</p> <p>(30) 優先権データ<br/>特願平9/94845 1997年3月28日(28.03.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)<br/>参天製薬株式会社<br/>(SANTEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP]<br/>〒533-8651 大阪府大阪市東淀川区下新庄3丁目9番19号<br/>Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ)<br/>大久保公策(OKUBU, Kousaku)[JP/JP]<br/>〒562-0045 大阪府箕面市瀬川2-11-26 Osaka, (JP)<br/>栗山 洋(KURIYAMA, Hiroshi)[JP/JP]<br/>〒560-0004 大阪府豊中市少路2-2-28-811 Osaka, (JP)<br/>三田四郎(MITA, Shiro)[JP/JP]<br/>〒659-0014 兵庫県芦屋市翠ヶ丘町20-4 Hyogo, (JP)<br/>石田成弘(ISHIDA, Naruhiro)[JP/JP]<br/>〒630-0243 奈良県生駒市俣口町1200-4-503 Nara, (JP)</p> |           | <p>(74) 代理人<br/>弁理士 安富康男, 外(YASUTOMI, Yasuo et al.)<br/>〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目14番22号<br/>リクルート新大阪ビル4階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, CN, KR, NO, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類<br/>国際調査報告書</p> |
| <p>(54)Title: NOVEL POLYPEPTIDE HAVING WATER CHANNEL ACTIVITY AND DNA SEQUENCE</p> <p>(54)発明の名称 水チャンネル活性を有する新規ポリペプチド及び DNA 配列</p> <p>(57) Abstract<br/>A novel protein having a water channel activity and a novel DNA sequence encoding this protein. The above protein is a novel polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 in the Sequence Listing.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                  |           |                                                                                                                                                                                                                                                                   |

(57)要約

本発明は、新規な水チャンネル活性を有するタンパク質及び上記タンパク質をコードする新規なDNA配列を提供することを目的とする。

本発明は、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を含む水チャンネル活性を有する新規ポリペプチドである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

|    |              |    |           |    |                |    |            |
|----|--------------|----|-----------|----|----------------|----|------------|
| AL | アルバニア        | FI | フィンランド    | LR | リベリア           | SK | スロヴァキア     |
| AM | アルメニア        | FR | フランス      | LS | レソト            | SL | シエラ・レオネ    |
| AT | オーストリア       | GA | ガボン       | LT | リトアニア          | SN | セネガル       |
| AU | オーストラリア      | GB | 英国        | LU | ルクセンブルグ        | SZ | スワジランド     |
| AZ | アゼルバイジャン     | GD | グレナダ      | LV | ラトヴィア          | TD | チャード       |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GE | グルジア      | MC | モナコ            | TG | トーゴ        |
| BB | バルバドス        | GH | ガーナ       | MD | モルドヴァ          | TJ | タジキスタン     |
| BE | ベルギー         | GM | ガンビア      | MG | マダガスカル         | TM | トルクメニスタン   |
| BF | ブルキナ・ファソ     | GN | ギニア       | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TR | トルコ        |
| BG | ブルガリア        | GW | ギニア・ビサウ   |    | 共和国            | TT | トリニダード・トバゴ |
| BJ | ベナン          | GR | ギリシャ      | ML | マリ             | UA | ウクライナ      |
| BR | ブラジル         | HR | クロアチア     | MN | モンゴル           | UG | ウガンダ       |
| BY | ベラルーシ        | HU | ハンガリー     | MR | モーリタニア         | US | 米国         |
| CA | カナダ          | ID | インドネシア    | MW | マラウイ           | UZ | ウズベキスタン    |
| CF | 中央アフリカ       | IE | アイルランド    | MX | メキシコ           | VN | ヴェトナム      |
| CG | コンゴ          | IL | イスラエル     | NE | ニジェール          | YU | ユーゴスラビア    |
| CH | スイス          | IS | アイスランド    | NL | オランダ           | ZW | ジンバブエ      |
| CI | コートジボアール     | IT | イタリア      | NO | ノルウェー          |    |            |
| CM | カメルーン        | JP | 日本        | NZ | ニュージーランド       |    |            |
| CN | 中国           | KE | ケニア       | PL | ポーランド          |    |            |
| CU | キューバ         | KG | キルギスタン    | PT | ポルトガル          |    |            |
| CY | キプロス         | KP | 北朝鮮       | RO | ルーマニア          |    |            |
| CZ | チェコ          | KR | 韓国        | RU | ロシア            |    |            |
| DE | ドイツ          | KZ | カザフスタン    | SD | スーダン           |    |            |
| DK | デンマーク        | LC | セントルシア    | SE | スウェーデン         |    |            |
| EE | エストニア        | LI | リヒテンシュタイン | SG | シンガポール         |    |            |
| ES | スペイン         | LK | スリ・ランカ    | SI | スロヴェニア         |    |            |

## 明 細 書

## 水チャンネル活性を有する新規ポリペプチド及びDNA配列

## 技術分野

本発明は、ヒト脂肪組織由来の水チャンネル活性を有する新規ポリペプチド及びそれをコードするDNA配列に関する。

## 背景技術

細胞膜を介する水の透過は、通常は、細胞膜の主要構造である脂質2重層を拡散してゆっくりと行われる。しかしながら、近年、ある種の細胞において、細胞膜を通した早い水の移動が行われることが判明し、この現象には水を選択的に通す膜タンパク質の関与が想定された。その後、実際に各種のこのような膜タンパク質が単離され、このような膜タンパク質は、水チャンネルと称されている。本明細書中、上記水チャンネルがもつ細胞膜を通した水の選択的透過を行う機能を「水チャンネル活性」という。なお、上記水チャンネルは、水のみを選択的に透過させるものであってもよく、水のみならず、例えば、グリセロールや尿素等の低分子量の分子をも透過させるものであってもよい。

このような水チャンネル活性を有する膜タンパク質としては、アクアポリン（AQP）として知られている一群の膜タンパク質が単離されている。また、現在までに、幾つかのアクアポリンの遺伝子がクローニングされ、AQP1～5、FA-CHIP、AQP-γTIP等のアクアポリンが哺乳類、両生類、植物等から発見されている（例えば、佐々木成、「医学のあゆみ」、173巻、9号、1995年）。

アグレ（P. Agre）らは、SCIENCE誌（vol. 256、385～387頁、1992年）において、後にAQP1と称されることになるCHIP28のインビトロ転写RNAを注入されたアフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）卵母細胞が水透過性を上昇させることを報告している。バンオスト（B. A. van Oost）らは、SCIENCE誌（vol. 264、92～95頁、1994年）において、ヒトAQP2のアミノ酸配列を開示し、このものがバソプレシンに依存した尿の濃縮に関与することを示唆している。

石橋らは、Proc. Natl. Acad. Sci. USA誌（91巻、6269-6273頁、1994年）において、腎集合管由来のAQP3の遺伝子の塩基配列を開示し、コードされるアミノ酸配列を記載している。石橋らは、AQP3のcRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞の水透過性を測定して水チャンネル活性を確認している。石橋らは、このAQP3は、水のみならず、尿素やグリセロール等の非イオン性小分子をも輸送することを報告している。

ユング（J. S. Jung）らは、Proc. Natl. Acad. Sci. USA誌（91巻、13052-13056頁、1994年）において、AQP4を単離したことを報告している。このAQP4は、哺乳類の脳中に最も多量に存在し、水銀抵抗性を有することが知られている。レイナ（S. Raina）らは、J. Biol. Chem. 誌（270巻、1908-1912頁、1995年）において、ラットの唾液腺由来のAQP5のcDNAを調製し、その塩基配列及びコードするアミノ酸配列を開示している。レイナ（S. Raina）らは、NPA配列の存在を利用してcDNAのクローニングを行い、cRNAがアフリカツメガエル卵母細胞の水透過性を昂進することを観測してその機能を確認している。

上述のアクアポリンファミリーは、哺乳類の水代謝に関与しているものと考えられており、例えば、AQP2は、腎集合管管腔膜にのみ存在が確認されており、バソプレシン-尿濃縮系と深く関連していることが示されており、腎疾患との関連が認められている。従って、このような水チャンネル活性を有する膜タンパク質は、水と関連する疾患に対する新しい治療法の開発を検討するうえで重要である。

ところで、上述のアクアポリンファミリーは、腎、脳、胆、眼、腸、唾液腺、気管支等の各種器官にその発現部位を確認されているが、その他の器官や組織、特に、脂肪組織における水チャンネル活性を有する膜タンパク質の存在は報告されていない。

#### 発明の要約

上述の現状に鑑み、本発明は、水チャンネル活性を有する新規な膜タンパク質

及びこれをコードするDNA配列を提供することを目的とする。

本発明は、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を含む水チャンネル活性を有する新規ポリペプチドである。

本発明は、また、分子中に配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を含む水チャンネル活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列そのものである。

更に、本発明は、配列表の配列番号2に示すDNA配列である。

更にまた、本発明は、配列表の配列番号2に示す塩基配列のうち、塩基番号173～1198でコードされるアミノ酸配列を含む水チャンネル活性を有するポリペプチドでもある。

#### 発明の詳細な開示

以下、本発明を詳述する。

本発明のポリペプチドは、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を含む。このポリペプチドは、アスパラギン-プロリン-アラニンの3アミノ酸からなる配列をアミノ酸番号195～197に有している。しかし、従来知られているAQPに共通して見られるような、このアスパラギン-プロリン-アラニン配列が2度出現するという特徴は、本発明のポリペプチドにはみられない。上記ポリペプチドは、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞の水透過性を上昇させることから、水チャンネル活性を有するものであることを確認することができる。

上記ポリペプチドは、このポリペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に基づいて、*in vivo*又は*in vitro*に構成されたタンパク合成系により翻訳されて生成することができる。本発明のヌクレオチド配列は、上記ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする領域から実質的になり、必要に応じてプロモーター領域等のその他の領域を含んでいてもよい。遺伝情報に基づくタンパク合成は、遺伝子であるDNAの情報がRNAポリメラーゼによるDNAに依存するRNA合成の結果mRNAに転写される。そして、このmRNAが、tRNAを含むタンパク合成系でアミノ酸配列に翻訳される。従って、本発明

のヌクレオチド配列は、DNA配列のみならず、RNA配列をも含むものである。また、あるアミノ酸に対応するコドンは、通常、1つ又は複数存在することが知られているので、上記ヌクレオチド配列は唯一のものではなく、同一のアミノ酸をコードする同義の他のコドンで置換されているヌクレオチド配列であってもよいことは当然である。

上記ポリペプチドは、配列表の配列番号2に示すDNA配列が有する遺伝情報に基づいて形成することができる。上記ポリペプチドは、上記配列表の配列番号2に示す核酸塩基配列のうち、塩基番号173～1198でコードされている。上記配列表の配列番号2のDNA配列のうち、上記塩基番号以外の核酸塩基配列は、非コーディング領域である。このうち、塩基番号1234～1239には、AATAAAからなるポリアデニレションコンセンサス配列が存在する。なお、上記配列番号2に示すDNA配列の読み取り枠の他の可能性については、コードされるポリペプチドがいずれも極めて小さいので、水チャンネル機能を発揮することができないと考えられるので、排除することができる。

上記核酸塩基の全長配列は、GenBank中にもdbEST中にも該当する配列が存在しないことが本発明者らによって確認されている。

本発明のポリペプチドは、脂肪組織における水チャンネル活性を有するものである。脂肪組織は、生体の種々の部位に分布するが、本発明のポリペプチドは、その脂肪組織での水の移動をコントロールする作用を有し、種々の部位における脂肪組織の機能を正常に保つ効果が期待される。

#### 発明を実施するための最良の形態

上記配列番号2のDNA配列は、ヒト脂肪組織からクローニングして得られるcDNAの塩基配列に該当する。ヒト脂肪組織は、脂肪を貯蔵してエネルギー貯蔵をはかる組織である。この脂肪組織においては、各種のタンパク質が生成されていることが知られている。この脂肪組織において実際に発現している遺伝子、言い換えれば、この脂肪組織におけるmRNAの組成を忠実に写し取ることができるcDNAライブラリーとして、3'-directed DNAライブラリーが知られている。この3'-directed DNAライブラリーは、mRNA

のポリ（A）からその上流にある制限酵素認識部位であるMbo I 部位までの3'末端だけの決められた領域を含むものであって、PCR法による鋳型の調製に適している。従って、このライブラリーから、クローンを抽出し、それを用いてこの脂肪組織の完全なcDNAライブラリーから、アミノ酸のコード領域を含むより長い塩基配列を決定することにより、脂肪組織において実際に生成されているタンパク質に関する遺伝情報を得ることが可能となる。本発明の上記配列番号2のDNA配列は、このようにしてクローニングして見出されたものである。以下、上記cDNAをヒト脂肪組織からクローニングして得る方法を、詳細に説明する。

上記方法としては、例えば、Biochim. Biophys. Res. Commun., 221, 286-289 (1996) 等に記載されている方法等が知られている。これによれば、まず、脂肪組織から全RNAを分離し、必要に応じてポリ（A）RNAまで精製する。この精製には、市販の精製キットを使用することができ、例えば、オリゴ（dT）-セルロースと各種のバッファーとを組み合わせたファルマシア社製Quick prep mRNA purification kit等を好適に使用することができる。次に、2本鎖cDNAをpUC19系のベクタープライマーを用いて合成し、合成した2本鎖cDNAを制限酵素Mbo I（認識塩基配列：GATC）によって選択的に切断する。このとき、ベクター分子側のGATC配列は、dam<sup>+</sup>細菌中で複製することによってメチル化をうけてG<sup>m</sup>ATCとすることができるので、Mbo Iで切断されることはない。切断されたcDNAをE. coli リガーゼによって自己環状化することにより、ポリ（A）から、最も近いMbo I 部位までのcDNAのフラグメントを含むプラスミドが完成する。このプラスミドを大腸菌に入れて培養し、形質転換させた大腸菌のコロニーを選択する。次に、適当なPCRプライマーを使用して上記コロニー中のcDNAをPCR法により増幅する。

一方、pUC19系のベクタープライマーを用いて合成した全長の2本鎖cDNAをT4ポリメラーゼを用いて5'末端で切断し、T4リガーゼで環状化した後大腸菌に導入して形質転換させる。こうして形質転換させたコロニーから、上記3'-directed DNAライブラリーから上述の方法により得られた脂

肪組織に特異的な cDNA をラベル化したものをプローブとして用いてスクリーニングすることにより、所望のコロニーを得る。このコロニー中の挿入 cDNA を適当な PCR プライマーを使用して PCR 法により増幅する。増幅産物を精製してソニケーションした後、M13 フェージ中にサブクローニングする。

このようにしてクローニングされた cDNA は、例えば、プライマー色素を反応させ、精製したものを自動シーケンサー等を使用する等の方法により解析してその塩基配列を決定することができる。かくして、本発明の DNA 配列を得ることができる。

本発明のポリペプチドは、水チャンネル活性を有している。上記水チャンネル活性は、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞の水透過性の上昇をもたらすことを観察することにより確認することができる。アフリカツメガエル卵母細胞は、AQP ファミリーの遺伝子が発現していないことが知られており、これに注入した mRNA によって引き起こされる水透過性の上昇を容易に確認することができるので、水チャンネル活性の確認に広く使用されている。例えば、石橋らは、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 誌 (91 巻、6269-6273 頁 (1994 年)) において、AQP3 の cDNA を pSP64T 由来の BlueScript ベクターに挿入し、T7 RNA ポリメラーゼを使用して cRNA を合成し、この cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入した場合、注入後 48-62 時間のインキュベーションにより水の透過性が増加し、また、体積増加が生じたことを観察して、水チャンネル機能を確認している。

本発明の DNA 配列がコードするポリペプチドは、*in vitro* に構成された大腸菌のタンパク合成系によって合成したポリペプチドのアミノ酸配列を解析することにより確認することができる。この場合、新生化学実験講座 1 (東京化学同人発行) 22-24 頁記載の方法により、発現産物の N 末端と C 末端の配列を確認する方法を採用することができる。

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例にのみ限定されるものではない。

## 実施例 1

### DNAの塩基配列の決定

最近、発現している遺伝子の同定だけではなく、その発現頻度や発現量の検討が可能な、RNAのポリ(A)からその上流の制限酵素Mbo I部位までの3'末端だけの決められた領域を含む3'-directed DNAライブラリー(Nature Genet., 2, 173-179 (1992))を用いて、脂肪組織に特異的なコラーゲン様因子のDNAをクローニングしたことが報告されている(Biochim. Biophys. Res. Commun., 221, 286-289 (1996))。上記報告に記載された方法に準じ、脂肪組織に特異的な3'-directed DNAライブラリーを用いて、本発明のDNAの塩基配列を決定した。

### 方法

ヒト脂肪組織からQuick prep mRNA purification kitを用いて分離・精製したポリ(A)<sup>+</sup> RNAに逆転写酵素を加えた後、pUC19系のベクターであるpBluescriptを含むλZAPIIに組み込んで大腸菌に導入した。そこへ、脂肪組織に特異的な部分DNAをプローブとしてスクリーニングを行い、形質転換された大腸菌のコロニーを得た。次いで、2種のプライマー(SK: 5' CGCTCTAGAACTAGTGGATC3'、T7: 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC3')とともにPCR(Polymerase Chain Reaction; 95℃で30秒・50℃で30秒・70℃で60秒のサイクルを15サイクルした後、95℃で30秒・70℃で60秒のサイクルを15サイクル)を行い、ソニケーション処理をした後、M13にサブクローニングした。ここへプライマー色素を加え精製した後、自動シーケンサーでDNAの塩基配列を解析した。配列表の配列番号2に得られた塩基配列を示した。

## 実施例 2

### 水透過性についての検討

AQPファミリーの水透過性の検討については、AQPファミリーの遺伝子が発現していないことが知られているアフリカツメガエルの卵母細胞にRNAを導入した後、低張な培養液中における卵母細胞の表面積及び体積変化から水透過性を算出している報告が、AQP1 (Science, 256, 385-387 (1992)) 及びAQP3 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 6269-6273 (1994)) についてなされている。そこで、上記文献に記載された方法に準じて本発明のDNAでコードされる膜タンパクの水の透過性について検討した。

### 実験方法

実施例1でヒト脂肪組織から得られたRNA (10 ng) をマイクロインジェクションしたアフリカツメガエル卵母細胞を、等張な培養液 (約200 mOsm) 中、20℃で3日間培養した。この培養卵母細胞を低張な培養液 (約40 mOsm) 中へ移動した。移動20秒後及び40秒後に写真撮影を行い、画像解析装置を用いて卵母細胞の断面積及び体積を求めた。膜タンパクの水透過性は、下記の式により算出した。

$$\text{透過性 (cm/sec)} = [(V_{40} - V_{20}) / 20] / [(A_{20} \times 10^{-2} \times 4) \times 1.384]$$

式中、 $V_{20}$ は、20秒後の卵母細胞の体積 ( $\text{cm}^3$ ) を表し、 $V_{40}$ は、40秒後の卵母細胞の体積 ( $\text{cm}^3$ ) を表し、 $A_{20}$ は、20秒後の卵母細胞の断面積 ( $\text{mm}^2$ ) を表す。

結果を表1に示した。また、RNAのかわりに精製水をマイクロインジェクションしたときの水透過性も合わせて示した。

なお、上記卵母細胞中における本発明のポリペプチドの発現は、*in vitro*で合成した本発明のポリペプチドを用いて得た兔抗血清により、C末端領域における免疫測定方法により確認した。

表 1

|         | 水透過性 (cm/sec)            |
|---------|--------------------------|
| RNA非導入群 | 30.0 × 10 <sup>-4</sup>  |
| RNA導入群  | 292.5 × 10 <sup>-4</sup> |

表 1 から明らかなように、本発明の DNA 配列がコードするポリペプチドは、卵母細胞に注入後、明瞭な水透過性の上昇をもたらした。このことから、本発明のポリペプチドは、水チャンネル活性を有することが判明した。

#### 産業上の利用可能性

本発明は、新規な水チャンネル活性を有するタンパク質及び上記タンパク質をコードする新規な DNA 配列を提供することができる。上記タンパク質は、未だ水チャンネルの存在が報告されていないヒト脂肪組織中から見出されたものである。本発明により、上記組織が関与する水又は脂肪の代謝における疾患の新たな治療方法の開発が可能となる。

1 0

## [配列表]

配列番号 : 1

配列の長さ : 3 4 2

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Val Gln Ala Ser Gly His Arg Arg Ser Thr Arg Gly Ser Lys Met

5

10

15

Val Ser Trp Ser Val Ile Ala Lys Ile Gln Glu Ile Leu Gln Arg Lys

20

25

30

Met Val Arg Glu Phe Leu Ala Glu Phe Met Ser Thr Tyr Val Met Met

35

40

45

Val Phe Gly Leu Gly Ser Val Ala His Met Val Leu Asn Lys Lys Tyr

50

55

60

Gly Ser Tyr Leu Gly Val Asn Leu Gly Phe Gly Phe Gly Val Thr Met

65

70

75

80

Gly Val His Val Ala Gly Arg Ile Ser Gly Ala His Met Asn Ala Ala

85

90

95

Val Thr Phe Ala Asn Cys Ala Leu Gly Arg Val Pro Trp Arg Lys Phe

100

105

110

Pro Val Tyr Val Leu Gly Gln Phe Leu Gly Ser Phe Leu Ala Ala Ala

115

120

125

Thr Ile Tyr Ser Leu Phe Tyr Thr Ala Ile Leu His Phe Ser Gly Gly

130

135

140

Gln Leu Met Val Thr Gly Pro Val Ala Thr Ala Gly Ile Phe Ala Thr

145

150

155

160

1 1

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

1 2

配列番号 : 2

配列の長さ : 1 2 5 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ヒト

組織の種類 : 脂肪組織

配列の特徴

特徴を表す記号 : p e p t i d e

存在位置 : 1 7 3 . . 1 1 9 8

特徴を決定した方法 : E

配列

GGCTCTGGAC TGGGGACACA GGGATAGCTG AGCCCCAGCT GGGGGTGGAA GCTGAGCCAG 60  
 GGACAGTCAC GGAGGAACAA GATCAAGATG CGCTGTAAC T GAGAAGCCCC CAAGGCGGAG 120  
 GCTGAGAATC AGAGACATTT CAGCAGACAT CTACAAATCT GAAAGACAAA AC ATG GTT 178  
 Met Val

1

CAA GCA TCC GGG CAC AGG CGG TCC ACC CGT GGC TCC AAA ATG GTC TCC 226  
 Gln Ala Ser Gly His Arg Arg Ser Thr Arg Gly Ser Lys Met Val Ser

5

10

15

TGG TCC GTG ATA GCA AAG ATC CAG GAA ATA CTG CAG AGG AAG ATG GTG 274  
 Trp Ser Val Ile Ala Lys Ile Gln Glu Ile Leu Gln Arg Lys Met Val

20

25

30

CGA GAG TTC CTG GCC GAG TTC ATG AGC ACA TAT GTC ATG ATG GTA TTC 322  
 Arg Glu Phe Leu Ala Glu Phe Met Ser Thr Tyr Val Met Met Val Phe

35

40

45

50

1 3

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| GGC CTT GGT TCC GTG GCC CAT ATG GTT CTA AAT AAA AAA TAT GGG AGC | 370 |
| Gly Leu Gly Ser Val Ala His Met Val Leu Asn Lys Lys Tyr Gly Ser |     |
| 55 60 65                                                        |     |
| TAC CTT GGT GTC AAC TTG GGT TTT GGC TTC GGA GTC ACC ATG GGA GTG | 418 |
| Tyr Leu Gly Val Asn Leu Gly Phe Gly Phe Gly Val Thr Met Gly Val |     |
| 70 75 80                                                        |     |
| CAC GTG GCA GGC CGC ATC TCT GGA GCC CAC ATG AAC GCA GCT GTG ACC | 466 |
| His Val Ala Gly Arg Ile Ser Gly Ala His Met Asn Ala Ala Val Thr |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| TTT GCT AAC TGT GCG CTG GGC CGC GTG CCC TGG AGG AAG TTT CCG GTC | 514 |
| Phe Ala Asn Cys Ala Leu Gly Arg Val Pro Trp Arg Lys Phe Pro Val |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| TAT GTG CTG GGG CAG TTC CTG GGC TCC TTC CTG GCG GCT GCC ACC ATC | 562 |
| Tyr Val Leu Gly Gln Phe Leu Gly Ser Phe Leu Ala Ala Ala Thr Ile |     |
| 115 120 125 130                                                 |     |
| TAC AGT CTC TTC TAC ACG GCC ATT CTC CAC TTT TCG GGT GGA CAG CTG | 610 |
| Tyr Ser Leu Phe Tyr Thr Ala Ile Leu His Phe Ser Gly Gly Gln Leu |     |
| 135 140 145                                                     |     |
| ATG GTG ACC GGT CCC GTC GCT ACA GCT GGC ATT TTT GCC ACC TAC CTT | 658 |
| Met Val Thr Gly Pro Val Ala Thr Ala Gly Ile Phe Ala Thr Tyr Leu |     |
| 150 155 160                                                     |     |
| CCT GAT CAC ATG ACA TTG TGG CGG GGC TTC CTG AAT GAG GCG TGG CTG | 706 |
| Pro Asp His Met Thr Leu Trp Arg Gly Phe Leu Asn Glu Ala Trp Leu |     |
| 165 170 175                                                     |     |
| ACC GGG ATG CTC CAG CTG TGT CTC TTC GCC ATC ACG GAC CAG GAG AAC | 754 |
| Thr Gly Met Leu Gln Leu Cys Leu Phe Ala Thr Thr Asp Gln Glu Asn |     |
| 180 185 190                                                     |     |
| AAC CCA GCA CTG CCA GGA ACA GAG GCG CTG GTG ATA GGC ATC CTC GTG | 802 |
| Asn Pro Ala Leu Pro Gly Thr Glu Ala Leu Val Ile Gly Ile Leu Val |     |

1 4

|                                                                 |      |     |     |  |
|-----------------------------------------------------------------|------|-----|-----|--|
| 195                                                             | 200  | 205 | 210 |  |
| GTC ATC ATC GGG GTG TCC CTT GGC ATG AAC ACA GGA TAT GCC ATC AAC | 850  |     |     |  |
| Val Ile Ile Gly Val Ser Leu Gly Met Asn Thr Gly Tyr Ala Ile Asn |      |     |     |  |
| 215                                                             | 220  | 225 |     |  |
| CCG TCC CGG GAC CTG CCC CCC CGC ATC TTC ACC TTC ATT GCT GGT TGG | 898  |     |     |  |
| Pro Ser Arg Asp Leu Pro Pro Arg Ile Phe Thr Phe Ile Ala Gly Trp |      |     |     |  |
| 230                                                             | 235  | 240 |     |  |
| GGC AAA CAG GTC TTC AGC AAT GGG GAG AAC TGG TGG TGG GTG CCA GTG | 946  |     |     |  |
| Gly Lys Gln Val Phe Ser Asn Gly Glu Asn Trp Trp Trp Val Pro Val |      |     |     |  |
| 245                                                             | 250  | 255 |     |  |
| GTG GCA CCA CTT CTG GGT GCC TAT CTA GGT GGC ATC ATC TAC CTG GTC | 994  |     |     |  |
| Val Ala Pro Leu Leu Gly Ala Tyr Leu Gly Gly Ile Ile Tyr Leu Val |      |     |     |  |
| 260                                                             | 265  | 270 |     |  |
| TTC ATT GGC TCC ACC ATC CCA CGG GAG CCC CTG AAA TTG GAG GAT TCT | 1042 |     |     |  |
| Phe Ile Gly Ser Thr Ile Pro Arg Glu Pro Leu Lys Leu Glu Asp Ser |      |     |     |  |
| 275                                                             | 280  | 285 | 290 |  |
| GTG GCG TAT GAA GAC CAC GGG ATA ACC GTA TTG CCC AAG ATG GGA TCT | 1090 |     |     |  |
| Val Ala Tyr Glu Asp His Gly Ile Thr Val Leu Pro Lys Met Gly Ser |      |     |     |  |
| 295                                                             | 300  | 305 |     |  |
| CAT GAA CCC ACG ATC TCT CCC CTC ACC CCC GTC TCT GTG AGC CCT GCC | 1138 |     |     |  |
| His Glu Pro Thr Ile Ser Pro Leu Thr Pro Val Ser Val Ser Pro Ala |      |     |     |  |
| 310                                                             | 315  | 320 |     |  |
| AAC AGA TCT TCA GTC CAC CCT GCC CCA CCC TTA CAT GAA TCC ATG GCC | 1186 |     |     |  |
| Asn Arg Ser Ser Val His Pro Ala Pro Pro Leu His Glu Ser Met Ala |      |     |     |  |
| 325                                                             | 330  | 335 |     |  |
| CTA GAG CAC TTC TAAGCAGAGA TTATTTGTGA TCCCATCCAT TCCCAATAA      | 1238 |     |     |  |
| Leu Glu His Phe                                                 |      |     |     |  |
| 340                                                             |      |     |     |  |
| AGCAAGGCTT GTCCGACAAA                                           | 1258 |     |     |  |

## 請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列を含む水チャンネル活性を有する新規ポリペプチド。
2. 分子中に配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列を含む水チャンネル活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列。
3. 配列表の配列番号 2 に示す DNA 配列。
4. 配列表の配列番号 2 に示す塩基配列のうち、塩基番号 1 7 3 ～ 1 1 9 8 でコードされるアミノ酸配列を含む水チャンネル活性を有するポリペプチド。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl.<sup>6</sup> C07K14/47, C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl.<sup>6</sup> C07K14/47, C12N15/12

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DERWENT), WPI (DERWENT), GenBank/EMBL (geneseq)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                       | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| P, X      | Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 241, No. 1 (1997, December) H. Kuriyama et al., "Molecular Cloning and Expression of a Novel Human Aquaporin from Adipose Tissue with Glycerol Permeability", p.53-58               | 1-4                   |
| P, Y      | J. Biol. Chem., Vol. 272, No. 33 (1997, August) K. Ishibashi et al., "Cloning and Functional Expression of a New Water Channel Abundantly Expressed in the Testis Permeable to Water, Glycerol, and Urea", p.20782-20786 | 1-4                   |

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

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> | <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Date of the actual completion of the international search  
July 13, 1998 (13. 07. 98)

Date of mailing of the international search report  
July 21, 1998 (21. 07. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C 07 K 14/47, C 12 N 15/12

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C 07 K 14/47, C 12 N 15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

BIOSIS (DERWENT), WPI (DERWENT), GenBank/EMBL (gene seq)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                        | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| P, X            | Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 241, No. 1 (1997. 12月)<br>H. Kuriyama et al.; "Molecular Cloning and Expression of a Novel Human Aquaporin from Adipose Tissue with Glycerol Permeability", p. 53-58                | 1-4              |
| P, Y            | J. Biol. Chem., Vol. 272, No. 33 (1997. 8月) K. Ishibashi et al.;<br>"Cloning and Functional Expression of a New Water Channel Abundantly Expressed in the Testis Permeable to Water, Glycerol, and Urea", p. 20782-20786 | 1-4              |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 07. 98

国際調査報告の発送日

21.07.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子

4 B

9 4 5 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3449