

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4249927号
(P4249927)

(45) 発行日 平成21年4月8日 (2009.4.8)

(24) 登録日 平成21年1月23日 (2009.1.23)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 K 67/027 (2006.01)

A O 1 K 67/027

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

A 6 1 P 25/28

請求項の数 32 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-558090 (P2001-558090)

(73) 特許権者 502279799

(86) (22) 出願日 平成13年2月14日 (2001.2.14)

岩坪 威

(86) 国際出願番号 PCT/JP2001/001014

東京都文京区本駒込4丁目39-2-40
1

(87) 国際公開番号 W02001/058943

(74) 代理人 100062144

(87) 国際公開日 平成13年8月16日 (2001.8.16)

弁理士 青山 稔

審査請求日 平成16年5月18日 (2004.5.18)

(74) 代理人 100081422

(31) 優先権主張番号 PCT/JP00/00788

弁理士 田中 光雄

(32) 優先日 平成12年2月14日 (2000.2.14)

(73) 特許権者 506137147

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ
ジメント株式会社

微生物の受託番号 FERM BP-7437

東京都文京区小石川四丁目6番10号

微生物の受託番号 FERM BP-7438

(74) 代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コラーゲン様新規蛋白 C L A C およびその前駆体、ならびにそれらをコードする遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列表の配列番号：1 に記載のヌクレオチド 8 6 8 からヌクレオチド
2 4 9 3 までの塩基配列からなる C L A C D N A。

【請求項 2】

配列表の配列番号：2 に記載のアミノ酸 1 1 3 からアミノ酸 6 5 4 までのアミノ酸配列
からなる C L A C。

【請求項 3】

請求項 1 記載の D N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションし、かつ
以下の特性 (a) および (b) を有する蛋白をコードする D N A：

(a) アルツハイマー病老人斑アミロイド成分中に蓄積する、

(b) A β 凝集を促進する機能を有する。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の D N A がコードする蛋白。

【請求項 5】

配列表の配列番号：1 に記載のヌクレオチド 5 3 2 からヌクレオチド
2 4 9 3 までの塩基配列からなる C L A C - P D N A。

【請求項 6】

配列表の配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる C L A C - P。

【請求項 7】

10

20

請求項5記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションし、かつ細胞表面においてAβに結合する蛋白をコードするDNA。

【請求項8】

請求項7に記載のDNAがコードする蛋白。

【請求項9】

配列表の配列番号：2のアミノ酸配列のアミノ酸番号141～146または589～597において1もしくはそれ以上のアミノ酸が欠失もしくは置換されている請求項8記載の蛋白。

【請求項10】

請求項1または3に記載のDNAを含有する発現ベクター。

10

【請求項11】

請求項10に記載のベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項12】

請求項11に記載の形質転換体を、請求項10記載の発現ベクターの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、組み換え蛋白の製造方法。

【請求項13】

請求項5または7に記載のDNAを含有する発現ベクター。

【請求項14】

請求項13に記載のベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項15】

20

請求項14記載の形質転換体を、請求項13記載の発現ベクターの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、組み換え蛋白の製造方法。

【請求項16】

経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-7438として寄託されている形質転換体。

【請求項17】

請求項16に記載の形質転換体中に含まれるCLACP遺伝子。

【請求項18】

請求項16に記載の形質転換体を、その中に含まれるCLACP遺伝子を含有するベクターが発現可能な条件下で培養することを特徴とする、組み換え蛋白の製造方法。

30

【請求項19】

請求項2または4に記載の蛋白に特異的に結合する抗体。

【請求項20】

経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-7437として寄託されているハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体9D2である請求項19記載の抗体。

【請求項21】

請求項2または4に記載の蛋白を用いることを特徴とする、CLACの活性阻害剤のスクリーニング方法。

【請求項22】

40

請求項19記載の抗体を用いることを特徴とするCLACの検出方法。

【請求項23】

該抗体が経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-7437として寄託されているハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体9D2である請求項22記載の方法。

【請求項24】

経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-7437として寄託されているハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体9D2を用いるCLACの精製方法。

【請求項25】

50

請求項6、8または9に記載の蛋白に特異的に結合する抗体。

【請求項26】

経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-7437として寄託されているハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体9D2である請求項25記載の抗体。

【請求項27】

請求項6、8または9に記載の蛋白を用いることを特徴とする、CLACPの活性阻害剤のスクリーニング方法。

【請求項28】

請求項25記載の抗体を用いることを特徴とするCLACPの検出方法。

10

【請求項29】

該抗体が経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-7437として寄託されているハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体9D2である請求項28記載の方法。

【請求項30】

経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-7437として寄託されているハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体9D2を用いるCLACPの精製方法。

【請求項31】

検知可能に標識された経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-7437として寄託されているハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体9D2を構成成分とするアルツハイマー病診断用キット。

20

【請求項32】

請求項1、3、5または7のいずれかに記載DNAを人為的に染色体中に導入するか、あるいは染色体から欠損させたヒトを除くトランスジェニック動物。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、アルツハイマー病患者の脳に老人斑を形成して蓄積するアミロイド物質中に存在するヒト型のコラーゲン様新規蛋白（以下、CLACと称する）およびCLAC前駆体（以下、CLACPと称する）、ならびにそれらをコードする遺伝子に関する。さらに本発明は、マウス型CLACPのcDNA配列およびアミノ酸配列にも関する。また本発明は、これらを応用して、アミロイド蛋白の蓄積促進機序を阻害することによる治療法および細胞障害を抑制することによる治療法、ならびにアルツハイマー病の診断法の開発にも関する。

30

背景技術

アルツハイマー病は、神経細胞変性・脱落とともに、老人斑の形成および神経原線維変化の出現を特徴とする痴呆性神経変性疾患である。最も特徴的な老人斑はβアミロイド前駆体蛋白質（β-amyloid precursor protein、以下、βAPPと略すこともある）に由来するアミロイドβペプチド（以下、Aβと略すこともある）を主成分として（Biochem Biophys Res Commun 122, 1131（1984））、アポリポ蛋白E（Brain Res 541, 163（1984））や補体成分C1q（Acta Neuropathol 57, 239（1982））などの生体成分が沈着したものである。Aβはそれ自体が凝集性を有するが、前記の非Aβアミロイド成分、すなわちアポリポ蛋白E（Nature 372, 92（1994））やC1q（J Neurosci Res 46, 58（1996））の作用によりアミロイド線維の形成が促進される。アミノ酸40～42個からなるAβは、神経細胞を含め種々の細胞から分泌されており、通常の濃度では顕著な毒性を細胞に与えることはない。しかし、高濃度になるとAβは凝集し、神経細胞に対して毒性を示すようになる（Science 250, 279（1990））。この際に細胞表面に存在し、凝集したAβの受容体として作用する分子としてはRAGE（Nature 382, 685（19

40

50

96)) やスカベンジャー受容体A (Nature 382, 716 (1996)) などが知られている。アルツハイマー病の神経細胞障害過程には、アミロイドの凝集と蓄積、細胞に対する毒性が極めて重要視されており、両過程の阻害はアルツハイマー病の治療法として有効と考えられる。

A β のアミロイドとしての蓄積はアルツハイマー病にきわめて特徴的ではあるが、A β の蓄積のみでは神経細胞に対する毒性の発揮、アルツハイマー病の発症には不十分であることが明らかになりつつある(J. Neurosci. 17, 7053 (1997))。一方でアポリポ蛋白Eのように、A β と結合し、老人斑アミロイド蓄積過程を促進する蛋白質の遺伝的多型性が、アルツハイマー病発症の危険因子として作用する例(Science 261, 921 (1993))からも推察されるように、老人斑アミロイド中の未知蛋白成分がアミロイドの蓄積性および神経細胞障害性に重大な影響を与えている可能性が注目されてきたが、その成分の同定は未だなされてこなかった。

10

発明の開示

かかる状況に鑑みて、本発明者らは、アルツハイマー病患者脳から抽出したアミロイド画分に対するマウスモノクローナル抗体を作成した結果、意外なことに、これらのモノクローナル抗体の中から、老人斑アミロイドを選択的に染色し、生化学的に50ないし100キロダルトンの新規蛋白を認識する抗体を見いだした。

さらに本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに鋭意研究を進めた結果、アルツハイマー病老人斑アミロイド成分中に存在する、新規なヒト・コラーゲン様アルツハイマーアミロイド構成蛋白CLAC (collagen-like Alzheimer amyloid plaque component)を見だし、その全構造ならびにその前駆体CLAC-P (CLAC precursor protein)をコードする新規遺伝子のクローニングに成功し、本発明を完成するに至った。さらに本発明者らは、マウス型のCLAC-PのcDNA配列を決定し、アミノ酸配列を推定した。

20

すなわち、本発明は、

(1) 配列表の配列番号：1に記載のヌクレオチド868からヌクレオチド2493までの塩基配列からなるCLAC DNA、

(2) 配列表の配列番号：2に記載のアミノ酸113からアミノ酸654までのアミノ酸配列からなるCLAC、

(3) 上記(2)に記載の蛋白において1もしくは複数のアミノ酸が挿入、欠失もしくは置換されており、かつ以下の特性(a)および(b)を有する蛋白をコードするDNA：

30

(a) アルツハイマー病老人斑アミロイド成分中に蓄積する、

(b) A β 凝集を促進する機能を有する、

(4) 上記(1) 記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションし、かつ以下の特性(a)および(b)を有する蛋白をコードするDNA：

(a) アルツハイマー病老人斑アミロイド成分中に蓄積する、

(b) A β 凝集を促進する機能を有する、

(5) 上記(3) または(4) のいずれかに記載のDNAがコードする蛋白、

(6) 配列表の配列番号：1に記載のヌクレオチド532からヌクレオチド2493までの塩基配列からなるCLAC-P DNA、

40

(7) 配列表の配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるCLAC-P、

(8) 上記(7)に記載のCLAC-Pにおいて1もしくは複数のアミノ酸が挿入、欠失もしくは置換されており、かつ細胞表面においてA β 受容体として機能する蛋白をコードするDNA、

(9) 上記(6) 記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションし、かつ細胞表面においてA β 受容体として機能する蛋白をコードするDNA、

(10) 上記(8) または(9) のいずれかに記載のDNAがコードする蛋白、

(11) 配列表の配列番号：2のアミノ酸配列のアミノ酸番号141～146または589～597において1もしくはそれ以上のアミノ酸が欠失もしくは置換されている上記(10) 記載の蛋白、

50

(12) 上記(1)、(3)または(4)のいずれかに記載のDNAを含有する発現ベクター、

(13) 上記(12)に記載のベクターによって形質転換された形質転換体、

(14) 上記(13)に記載の形質転換体を、上記(12)に記載の発現ベクターの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、組み換え蛋白の製造方法、

(15) 上記(6)、(8)または(9)のいずれかに記載のDNAを含有する発現ベクター、

(16) 上記(15)に記載のベクターによって形質転換された形質転換体、

(17) 上記(16)に記載の形質転換体を、上記(15)に記載の発現ベクターの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、組み換え蛋白の製造方法、

(18) 経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に受託番号FERMBP-7438として寄託されている形質転換体、

(19) 上記(18)に記載の形質転換体中に含まれるCLACP遺伝子、

(20) 上記(18)に記載の形質転換体を、その中に含まれるCLACP遺伝子を含有するベクターが発現可能な条件下で培養することを特徴とする、組み換え蛋白の製造方法、

(21) 上記(2)または(5)に記載の蛋白に特異的に結合する抗体、

(22) モノクローナル抗体9D2である上記(21)に記載の抗体、

(23) 上記(2)または(5)に記載の蛋白を用いることを特徴とする、CLACの活性阻害剤のスクリーニング方法、

(24) 上記(23)のスクリーニング方法により得られる、CLACの活性阻害剤、

(25) 上記(21)に記載の抗体を用いることを特徴とするCLACの検出方法、

(26) 上記(21)に記載の抗体または上記(24)に記載のCLACの活性阻害剤を用いることを特徴とする、アルツハイマー病の治療、進行遅延または予防方法、

(27) 該抗体がモノクローナル抗体9D2である上記(25)記載の方法、

(28) 該抗体がモノクローナル抗体9D2である上記(26)記載の方法、

(29) モノクローナル抗体9D2を用いるCLACの精製方法、

(30) 上記(7)、(10)または(11)に記載の蛋白に特異的に結合する抗体、

(31) モノクローナル抗体9D2である上記(30)記載の抗体、

(32) 上記(7)、(10)または(11)に記載の蛋白を用いることを特徴とする、CLACPの活性阻害剤のスクリーニング方法、

(33) 上記(32)のスクリーニング方法により得られる、CLACPの活性阻害剤、

(34) 上記(30)記載の抗体を用いることを特徴とするCLACPの検出方法、

(35) 上記(30)記載の抗体または上記(33)記載のCLACPの活性阻害剤を用いることを特徴とする、アルツハイマー病の治療、進行遅延または予防方法、

(36) 該抗体がモノクローナル抗体9D2である上記(34)記載の方法、

(37) 該抗体がモノクローナル抗体9D2である上記(35)記載の方法、

(38) モノクローナル抗体9D2を用いるCLACPの精製方法、

(39) 検知可能に標識されたモノクローナル抗体9D2を構成成分とするアルツハイマー病診断用キット、ならびに

(40) 上記(1)、(3)、(4)、(6)、(8)または(9)のいずれかに記載のDNAを人為的に染色体中に導入するか、あるいはいずれかを染色体から欠損させたトランスジェニック動物、に関する。

発明の詳細な説明

本発明の第1の態様は、配列表の配列番号：1に記載のヌクレオチド868からヌクレオチド2493までの塩基配列からなるDNAであって、CLACをコードするDNAである。

本発明の第2の態様は、配列番号：2に記載のアミノ酸113からアミノ酸654までのアミノ酸配列を有するCLACである。

10

20

30

40

50

本発明の新規アミロイド分子C L A CおよびC L A C－Pは、実施例2に詳述するように、抗体との特異的相互作用を利用して検出することができ、その部分アミノ酸配列、c D N A配列およびアミノ酸配列を決定することができる。以下に、これらの手順につき簡単に説明する。

C L A CおよびC L A C－Pは、例えば、以下の方法により検出することができる。

アルツハイマー病患者脳よりシヨ糖密度勾配遠心法、尿素抽出法等の公知の方法により不溶性画分として粗精製した老人斑アミロイド成分を、例えば、B A L B－Cマウスに免疫して抗体、好ましくはモノクローナル抗体を得る。得られた抗体を用いて、下記(i)または(ii)のいずれかの方法により検出することができる。

(i) アルツハイマー病患者大脳皮質を24時間10%ホルマリンにて固定後作成した組織切片の免疫学的化学染色によりアミロイド斑として検出、あるいは(ii) アルツハイマー病患者大脳皮質をトリス緩衝液、ドデシル硫酸ナトリウム溶液で抽出後の沈殿物を70%ギ酸で溶解したアミロイド画分のS D S電気泳動・ウェスタンブロット解析により、50ないし100キロダルトンのポリペプチドとして検出。

使用する抗体としては、実施例1にて詳述するモノクローナル抗体9D2が好ましい。

本発明のC L A Cの部分アミノ酸配列は、例えば、以下の工程(イ)～(ホ)を含む方法により決定することができる。

(イ) アルツハイマー病患者大脳皮質をトリス緩衝液、ドデシル硫酸ナトリウム(以下、S D Sという)溶液で抽出後の沈殿物を70%ギ酸で溶解したアミロイド成分を逆相高性能液体クロマトグラフィー(以下、H P L Cという)にて分画、A βペプチドと分離し、

(ロ) ゲル濾過カラムにて50および100キロダルトンのポリペプチドをそれぞれ単離し、

(ハ) 蛋白分解酵素、例えば、リシルエンドペプチダーゼ、A s p－N、トリプシン等により限定分解を加え、

(ニ) 逆相H P L Cによりペプチド断片を分離し、

(ホ) アミノ酸配列分析装置によりペプチドのアミノ酸配列を決定する。

C L A C蛋白質の前駆体、すなわちC L A C－Pのc D N A核酸配列は、例えば、以下工程(イ)、(ロ)を含む方法にて得ることができる。

(イ) 上述のごとく得られたC L A Cの部分アミノ酸配列、例えばG l y G l u G l n G l y A s p G l n G l y P r o A r g M e t V a l P h e P r o L y s I l e A s n H i s G l y P h e L e u S e r A l a A s p G l n G l n L e u I l e L y s 配列番号：11)の一部をコードする核酸配列に対応する合成オリゴヌクレオチド混和物(d e g e n e r a t e p r i m e r)をプライマーとして、ヒト脳由来の相補DNA(c D N A)ライブラリーからポリメラーゼ・チェーン・リアクション(p o l y m e r a s e c h a i n r e a c t i o n ; P C R)法を用いて、C L A C蛋白の一部をコードするc D N Aをクローニングし、

(ロ) (イ)で得られた核酸配列を鋳型として、P C R法を用いた「r a p i d a m p l i f i c a t i o n o f c D N A e n d s」法(当業者に公知)を反復して施行する。

またC L A C－Pの全予想アミノ酸配列は、上記核酸配列を常法に従ってアミノ酸に翻訳することにより得ることができる。

かくして得られたヒトC L A C－Pのc D N A配列を配列表の配列番号：1に示す。この配列は654個のアミノ酸からなるC L A C－PをコードするO R F(オープンリーディングフレーム)を有し(ヌクレオチド532～2493)、その654個のアミノ酸からなるC L A C－P蛋白の全予想アミノ酸配列を配列表の配列番号：2に示す。

また、マウスもしくはラット脳由来c D N Aライブラリーを用いて、上記ヒトC L A C－Pの核酸配列から適切に選択した核酸配列に相当するオリゴヌクレオチドを化学合成し、それをプライマーとしてP C R法を施行することにより、マウスもしくはラットのC L A C－P c D N Aおよびそれらのアミノ酸配列を得ることもできる。

本発明のCLACは、(a)アルツハイマー病老人斑アミロイド成分中に蓄積し、かつ(b)A β 凝集を促進する機能を有する。

本発明のCLACのA β 凝集を促進する機能を種々の方法により評価することができるが、例えば、次の方法(イ)または(ロ)により評価することができる。

(イ)合成A β (1-42) ペプチド [アミロイド β ペプチドのN末端から1番目~42番目のアミノ酸からなることを意味する] 115 μ Mと適量の精製CLACを混和し、室温で0~5日インキュベーションする。反応液を15,000xg、15分遠心し、沈殿物を10 μ lのPBS液に懸濁する。チオフラビンTを適量加え、蛍光光度計で分析する。 λ_{ex} は440nm、 λ_{em} は482nmで行う。得られた測定値を、精製CLACを加えないA β (1-42) ペプチドのみを同様にインキュベーションした場合の値と比較する。あるいは、

(ロ) ヒトCLAC-P遺伝子を過剰発現したトランスジェニックマウスとアルツハイマー変異型 β APP遺伝子を過剰発現したトランスジェニックマウスを交配して生まれたマウスの脳の β アミロイド斑がアルツハイマー変異型 β APP遺伝子のみを過剰発現したトランスジェニックマウス脳のそれよりも増加していることを免疫組織化学もしくは生化学的に確認することにより、あるいはマウスCLAC-P遺伝子をノックアウトしたマウスにアルツハイマー変異型 β APP遺伝子を過剰発現したトランスジェニックマウスの脳の β アミロイド斑が、アルツハイマー変異型 β APP遺伝子を過剰発現したトランスジェニックマウスのそれよりも減少していることを免疫組織化学もしくは生化学的に確認する。本発明の第3の態様は、CLACのアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が挿入、欠失もしくは置換された、いわゆるCLAC変種蛋白であって、(a)アルツハイマー病老人斑アミロイド成分中に蓄積し、かつ(b)A β 凝集を促進する機能を有するCLAC変種蛋白をコードするDNAである。

ここで、1もしくは複数のアミノ酸の挿入、欠失もしくは置換は、人為的に生じたものであってもよく、自然発生的に生じたものであってもよい。例えば、部位特異的突然変異誘発(M. J. Zoller et al., Methods in Enzymology, 100, 468 (1983))あるいはPCR法(Molecular Cloning 2nd Ed. Ch. 15, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))等の公知の方法により遺伝子工学的に行うことができる。また、かかるアミノ酸の挿入、欠失もしくは置換は生体内で生じるものであってもよく、スプライスバリエント、対立遺伝子による変種等も本発明のCLAC変種蛋白に包含される。さらに、上記機能(a)および(b)を有するCLACの部分ペプチドも本発明のCLAC変種蛋白に包含される。また、1または複数のアミノ酸において、化学的修飾(人為的であっても自然発生的であってもよい)がなされたものも、本発明のCLAC変種蛋白に包含される。かかる化学修飾としては、例えば、アセチル化、アミド化、アシル化、糖鎖付加、リン酸化、硫酸化、脂質付加、ハロゲン化、塩の形成等がある。さらに、天然のL-型の20種以外のアミノ酸(D-型、人工アミノ酸等)がCLAC変種蛋白中に存在していてもよい。かかるCLAC変種蛋白をコードするDNA配列の、元のCLACをコードするDNA配列(本発明の第1の態様)に対する相溶性は、少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%である。

ここに、相溶性とは、2つのDNAまたはポリペプチドのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列間の一致の度合いをパーセントで表現したものをいう。今日では、相溶性の検索にはコンピュータープログラムが使用されており、Smith-Watermanアルゴリズム、FASTAまたはBLASTプログラム等が使用されている。

また、本発明の第4の態様は、配列番号: 1に記載のヌクレオチド868からヌクレオチド2493までの塩基配列からなるCLAC DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションし、(a)アルツハイマー病老人斑アミロイド成分中に蓄積し、かつ(b)A β 凝集を促進する機能を有する蛋白をコードするDNAである。ここに、ストリンジェントな条件とは、例えば、塩基配列間に少なくとも90%以上の相溶性がある場合

10

20

30

40

50

にのみハイブリダイゼーションが起こるような条件を意味し、例えば、50%ホルムアミド、5xSSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハーツ溶液、10%硫酸デキストラン、および20μg/mlの変性し、剪断されたサケ精子DNAを含有する溶液中、42℃で一晩インキュベーションし、ついで、0.1xSSC中65℃で洗浄を行う条件が挙げられる。ハイブリダイゼーションおよび洗浄については周知の手法で行うことができ、Molecular Cloning 2nd Ed. Ch. 11, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等に示されている。

本発明の第5の態様は、

(i) 配列番号：2に記載のアミノ酸113からアミノ酸654までのアミノ酸配列からなるCLAC蛋白において1もしくは複数のアミノ酸が挿入、欠失もしくは置換された、いわゆるCLAC変種蛋白であって、(a)アルツハイマー病老人斑アミロイド成分中に蓄積し、かつ(b)Aβ凝集を促進する機能を有するCLAC変種蛋白をコードするDNA；あるいは

(ii) 配列番号：1に記載のヌクレオチド868からヌクレオチド2493までの塩基配列からなるCLAC DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションし、(a)アルツハイマー病老人斑アミロイド成分中に蓄積し、かつ(b)Aβ凝集を促進する機能を有する蛋白をコードするDNA

のいずれかによりコードされる蛋白である。かかる蛋白としては、CLAC変種蛋白またはCLACに対して高いアミノ酸配列相同性を有する蛋白であって、上記(a)、(b)の機能を有するものが挙げられる。例えば、上記のCLAC変種蛋白や、CLACの部分ペプチド、ラットやマウスのCLAC等が具体例として挙げられる。

本明細書において、第2の態様のCLACならびに第5の態様のCLAC変種蛋白をまとめて、「CLAC」と称することがある。

本発明の第6の態様は、配列表の配列番号：1に記載のヌクレオチド532からヌクレオチド2493までの塩基配列からなるCLAC-P DNAである。

本発明の第7の態様は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるCLAC-Pである。

本発明のCLAC-Pは細胞表面においてAβ受容体として機能する。

本発明のCLAC-Pの細胞表面におけるβアミロイド受容体としての機能を種々の方法により評価することができるが、例えば、次の方法により評価することができる。

CLAC-Pを恒常的に発現したHEK293細胞およびコントロール細胞をコンフルエントな状態まで培養し、予め60分間試験管内でインキュベーションした10mM Aβ(1-42)を加え、60分間インキュベーションする。回収した細胞を、SDSサンプルバッファーを加えて超音波破碎により可溶化し、SDSポリアクリルアミド電気泳動により蛋白を分解し、抗Aβ抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い、細胞に結合したAβ量を検出することができる。

CLAC-Pを介して細胞に結合したAβの細胞毒性については、次の方法により評価することができる。例えば、NGFにより神経細胞に分化誘導したPC12細胞に、リポフェクション法によりCLAC-Pを一過性に発現させ、予め1時間インキュベーションしたAβ(1-42)を加え、1時間インキュベーションする。その後、細胞を10%ホルマリンで固定し、TUNEL染色性により、アポトーシスによる細胞死過程を示す細胞核を染色し、陽性細胞の比率をCLAC-Pを発現しないPC12細胞と比較する。あるいは、各ウェルに臭化3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェノールテトラゾリウム(MTT)試薬を加え、生存細胞に取り込まれたMTT試薬の量を吸光度計により測定し、比較してもよい。

本発明の第8の態様は、CLAC-Pの1個もしくは複数のアミノ酸が挿入、欠失もしくは置換されており、かつ細胞表面においてAβ受容体として機能する蛋白、いわゆるCLAC-P変種蛋白をコードするDNAである。

ここで、1もしくは複数のアミノ酸の挿入、欠失もしくは置換は、人為的に生じたもので

10

20

30

40

50

あってもよく、自然発生的に生じたものであってもよい。例えば、部位特異的突然変異誘発 (M. J. Zoller et al., Methods in Enzymology, 100, 468 (1983)) あるいはPCR法 (Molecular Cloning 2nd Ed. Ch. 15, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) 等の公知の方法により遺伝子工学的に行うことができる。また、かかるアミノ酸の挿入、欠失もしくは置換は生体内で生じるものであってもよく、スプライスバリエント、対立遺伝子による変種等も本発明のCLACP変種蛋白に包含される。さらに、細胞表面においてA β 受容体として機能するCLACPの部分ペプチドも本発明のCLACP変種蛋白に包含される。また、1または複数のアミノ酸において、化学的修飾 (人為的であっても自然発生的であってもよい) がなされたもの

10

も、本発明のCLACP変種蛋白に包含される。かかる化学修飾としては、例えば、アセチル化、アミド化、アシル化、糖鎖付加、リン酸化、硫酸化、脂質付加、ハロゲン化、塩の形成等がある。さらに、天然のL-型の20種以外のアミノ酸 (D-型、人工アミノ酸等) がCLACP変種蛋白中に存在していてもよい。かかるCLACP変種蛋白をコードするDNA配列の、元のCLACPをコードするDNA配列 (本発明の第6の態様) に対する相同性は、少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%である。

また、本発明の第9の態様は、配列番号: 1に記載のヌクレオチド532からヌクレオチド2493までの塩基配列からなるCLACP DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションし、細胞表面においてA β 受容体として機能する蛋白をコードするDNAである。

20

本発明の第10の態様は、

(i) CLACPの1個もしくは複数のアミノ酸が挿入、欠失もしくは置換されており、かつ細胞表面においてA β 受容体として機能する蛋白、いわゆるCLACP変種蛋白をコードするDNA; あるいは

(ii) 配列番号: 1に記載のヌクレオチド532からヌクレオチド2493までの塩基配列からなるCLACP DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションし、細胞表面においてA β 受容体として機能する蛋白をコードするDNAのいずれかによりコードされる蛋白である。かかる蛋白は、CLACP変種蛋白またはCLACPに対して高いアミノ酸配列相同性を有する蛋白であって、細胞表面においてA β 受容体として機能するものである。例えば、上記のCLACP変種蛋白や、CLACPの部分ペプチド、ラットやマウスのCLACP等が具体例として挙げられる。

30

さらに本発明の第11の態様は本発明のCLACPのスプライスバリエントである。本発明のCLACPのスプライスバリエントとしては、例えば、配列番号: 2のアミノ酸番号141~146において1個もしくは6個のアミノ酸が欠失もしくは置換されたもの、あるいは配列番号: 2のアミノ酸番号589~597において1個もしくは9個のアミノ酸が欠失もしくは置換されたもの、上記のアミノ酸の欠失または置換が同時に起っているものが挙げられる。かかる多様性は選択的スプライシングによる複数種のメッセンジャーRNA形成によるものと考えられる。

本明細書において、第7の態様のCLACP、第10の態様のCLACP変種蛋白ならびに第11の態様のCLACPのスプライスバリエントをまとめて、「CLACP」と称することがある。

40

本発明の第12の態様は、本発明の第1、第3または第4のいずれかの態様のDNAを含有する発現ベクターである。本発明の第13の態様は、該発現ベクターにより形質転換された形質転換体である。本発明の第14の態様は、該形質転換体を、該発現ベクターの発現可能条件下で培養することの特徴とする、組み換え蛋白の製造方法である。このようにして製造された組み換え蛋白も本発明に包含される。かかる組み換え蛋白は、本発明のCLACPであるか、あるいは (a) アルツハイマー病老人斑アミロイド成分中に蓄積し、かつ (b) A β 凝集を促進する機能を有するCLACP変種蛋白である。

本発明の第15の態様は、本発明の第6、第8または第9のいずれかの態様のDNAを含

50

有する発現ベクターである。本発明の第16の態様は、該発現ベクターにより形質転換された形質転換体である。本発明の第17の態様は、該形質転換体を、該発現ベクターの発現可能条件下で培養することを特徴とする、組み換え蛋白の製造方法である。このようにして製造された組み換え蛋白も本発明に包含される。かかる組み換え蛋白は、本発明のCLACPであるか、あるいは細胞表面においてA β 受容体として機能するCLACP変種蛋白である。これらの態様に関連した態様において、本発明は、CLACPをコードする遺伝子を含むベクターを入れたHEK293細胞形質転換体（経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に受託番号FERMBP-7438として寄託されている）に関する。したがって本発明は、上記寄託株中に含まれるCLACP遺伝子にも関する。さらなる態様において、該寄託形質転換株を、その中に含まれるCLACP遺伝子を含有するベクターが発現可能な条件下で培養することを特徴とする組み換え蛋白の製造方法にも関する。このようにして製造された組み換え蛋白も本発明に包含される。かかる組み換え法による蛋白の製造は当業者に公知の方法、例えばMolecular Cloning 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載された方法により行うことができるが、以下に典型例を示す。

上記DNAを組み込むのに適したベクターとしては、例えば大腸菌由来のpBR322 (Gene, 2, 95 (1977))、pBR325 (Gene, 4, 121 (1978))、pUC12 (Gene, 19, 259 (1982))、pUC13 (Gene, 19, 259 (1982))、pUC118、pUC119 (Methods in Enzymology, 153, 3 (1987))、枯草菌由来のpUB110 (Biochemical and Biophysical Research Communication, 112, 678 (1983))等が挙げられる。その他のものであっても、宿主内で複製保持されるものであれば、いずれをも用いることができる。

プラスミドに上記DNAを組み込む方法としては、例えば、Molecular Cloning p. 239, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982)等に記載の方法がある。

このようにして得られたプラスミドは、適当な宿主、例えばエシェリシア (Escherichia) 属菌、バチルス (Bacillus) 属菌等に導入する。

上記エシェリシア属菌の例としては、エシェリシア・コリ (Escherichia coli) K12 DH1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 160 (1986))、M103 (Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981))、JA221 (Journal of Molecular Biology, 120, 517 (1978))、HB101 (Journal of Molecular Biology, 41, 459 (1969))、C600 (Genetics, 39, 440 (1954))等が挙げられる。

形質転換する方法としては、例えば、Molecular Cloning p. 249, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982)に記載の塩化カルシウム法あるいは塩化カルシウム／塩化ルビジウム法等が挙げられる。

このようにして得られた形質転換体の中から自体公知の方法、例えばコロニーハイブリダイゼーション法 (Gene, 10, 63 (1980))およびDNA塩基配列決定法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 560 (1977); Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981))等を用い、所望クローンを選出する。

このようにして、クローン化された本発明の組み換え蛋白の遺伝子を含むDNAを有するベクターを保持する微生物が得られる。

次に、該微生物からプラスミドを単離する。

該単離法としては、アルカリ法 (H. C. Birnboim et al., Nucleic Acids Research, 1, 1513 (1979))等が挙げられる。

10

20

30

40

50

上記のごとくクローン化された本発明の組み換え蛋白の遺伝子を含む組み換えDNAを有するプラスミドは、そのまま、あるいは所望により制限酵素で切り出して利用することができる。

クローン化された本発明の組み換え蛋白の遺伝子を、発現に適したベクター（ベクター）中のプロモーターの下流に連結して発現型ベクターを得ることができる。発現型ベクターにて形質転換される宿主としては動物細胞が好ましく、好ましいベクターとしては、動物細胞発現用プラスミド（例えば、p c D N A I、p d K C R - d h f r等）が挙げられる。また、本発明の組み換え蛋白の生成に適したものであれば、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞ならびにそれらに適したベクターでも使用可能であり、これらは当業者によく知られている。

10

該遺伝子はその5'末端に翻訳開始コドンとしてのATG（所望により適当なシグナルペプチドをコードする塩基配列）を有し、また3'末端には翻訳開始コドンとしてのTAA、TGAまたはATAG（好ましくはTGA）を有していてもよい。さらに該遺伝子を発現させるにはその上流にプロモーターを接続する。

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。

宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター等が挙げられ、とりわけSV40のプロモーターが好ましい。

動物細胞としては、例えばサル細胞COS-7、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、諸種動物の神経芽細胞腫、グリア芽細胞腫、線維芽細胞等が挙げられるが、本発明の組み換え蛋白の発現ならびに分泌量が多い細胞が好ましく、中でもヒト胎児性腎線維芽細胞293が好ましく用いられる。

20

動物細胞を形質転換するには、例えば、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法に従って行われる。

このようにして本発明の組み換え蛋白をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

宿主がエシェリシア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、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、無機質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、コーンステープ・リカー、コンスターチ、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、成長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約6～8が好ましい。

30

エシェリシア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地（Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)）が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば3β-インドアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

40

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

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

宿主が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MEM培地（Science, 122, 501 (1952)）、DMEM培地（Virology, 8, 396 (1959)）、RPMI 1640培地（The Journal of American Medical Association, 199, 519 (1967)）、199培地（Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 731 (1950)）などが挙げられる。

50

これらに約5～20%の胎児牛血清を添加してもよい。pHは約6～8であることが好ましい。培養は通常約30～40℃、必要に応じて通気や攪拌を加える。

上述のような本発明のCLACPまたはCLACの遺伝子を組み込んだ誘導発現ベクターは、大腸菌などの細菌に導入してベクターの大量調製、あるいは種々の細胞における本発明の組み換え蛋白の調製に使用できるほか、後述するトランスジェニック動物の作成にも利用することができる。

上述のごとく、CLACPは、その断片型であるCLACの前駆体であり、配列番号：2で示されるアミノ酸配列を有する。

CLACPの、その断片型CLACへのプロセッシングは、配列番号：2のアミノ酸配列の112番目のアミノ酸Argと113番目のアミノ酸Gluとの間で起こる開裂による。したがって、配列番号：2の113番目のアミノ酸Gluから654番目のアミノ酸LysまでがCLACのアミノ酸配列である。また、通常は、CLACの第1番目のアミノ酸Gluは環化してピログルタミン酸残基となっている。

CLACPからCLACへの転換は生体内に存在するプロセッシング酵素の作用による。かかるプロセッシング酵素は本発明に包含される。かかるプロセッシング酵素は、例えば以下の(イ)～(ホ)のいずれかのようにして同定することができる。

(イ) CLACPを発現する培養細胞が分泌あるいは産生するCLACにつき、細胞培養液もしくは細胞周囲に産生された細胞外マトリックスを回収し、アミノ酸配列解析に供し、CLACPと比較して切断部位を決定すること、あるいは

(ロ) CLACPを発現する細胞に既知の蛋白分解酵素阻害剤を添加し、培養液もしくは細胞外マトリックスに出現するCLAC蛋白の量の減少を指標とする、

(ハ) CLACP遺伝子に公知の蛋白分解酵素による切断に必須とされるアミノ酸に変異をもたらす核酸配列変異を導入し、培養細胞に発現させ、培養液もしくは細胞外マトリックスに出現するCLAC蛋白の量の減少を指標とする、

(ニ) CLACPを発現する培養細胞に公知の蛋白分解酵素をコードするcDNAをさらに導入し、培養液もしくは細胞外マトリックスに出現するCLAC蛋白の量の増加を指標とする、

(ホ) 公知の蛋白分解酵素を欠損する培養細胞にCLACPをコードするcDNAを発現させ、培養細胞に発現させ、培養液もしくは細胞外マトリックスに出現するCLAC蛋白の量の減少を指標とする。

上記の方法により同定されるプロセッシング酵素としては、furin変換酵素等があるが、これ以外のプロセッシング酵素を同定することも可能である。

上記の蛋白分解酵素阻害剤としては、フリン(furin)の競合阻害剤であるデカノイル-RVKR-クロロメチルケトンおよび類似の化合物が挙げられるが、CLACPを発現する培養細胞は、CLACを多量に産生・分泌するため、CLACの産生ないし分泌を阻害する物質を効率よく高感度にスクリーニングすることができる。かかる阻害剤のスクリーニング法としては、例えば、被検物質を含有する培地中で、本発明の形質転換細胞を培養し、CLACの産生ないし分泌の阻害を検出または定量することにより行うことができる。該スクリーニング法においては、CLACに特異的な抗体を用いるウェスタンブロッティング法などの方法を適宜利用して、被検物質による細胞からのCLACの産生ないし分泌の変化を検出し、定量することができる。

具体的には、例えば、本発明の形質転換細胞をマルチプレートに蒔き、血清を含むDMEM培地で細胞がコンフルエントになるまで培養する。その細胞を無血清培地(0.5%ウシ血清アルブミン含有DMEM)で洗浄後、同培地に被検物質を添加し、一定時間(例えば24時間)培養する。その培養上清もしくはマルチプレート上に付着した細胞外マトリックスに含まれるCLAC量をウェスタンブロッティング法により定量し、被検物質非添加群に対するCLAC量の割合およびCLACの産生・分泌促進低下作用を惹起する濃度で被検物質のCLAC産生・分泌阻害作用を評価する。

本発明の形質転換細胞は継代培養でき、大量のCLACPおよびCLACを産生ないし分泌できるので、再現良く、かつ高感度にスクリーニングに用いることができる。したが

10

20

30

40

50

って、本発明の形質転換細胞を用いると、CLACの産生ないし分泌を阻害する物質のスクリーニングを有利に行うことができる。また、常にクローン化された安定な細胞を多量に得ることができるので、スクリーニングの安定性と効率の点で有用である。このようなスクリーニングにより同定されるCLACの産生ないし分泌を阻害する物質は本発明に含まれる。

CLACは、培養細胞を用いて、例えば、次の(イ)、(ロ)または(ハ)に記載したような方法で大量発現し、精製することができるが、これら以外の方法を用いてもよい。

(イ) CLAC-Pを恒常発現するHEK293(ATCC CRL-1573)細胞を10%FBSを含むDMEM培地中で3日間培養し、細胞がセミコンフルエントの状態になったら、FBSを除いたDMEM培地中で48時間培養し、培養液を回収する。培養液を50mM Tris-HCl (pH 8.6) に対し一晩、4℃で透析し、その後25,000xg、30分遠心分離する。沈殿物を0.1M酢酸に溶解させ、DEAEカラムにアプライする。溶出は0Mから0.1Mおきに1Mまで順に濃度を変えたNaClで行う。全画分を0.1M酢酸に対し透析し、例えば、特異抗体9D2を用いたイムノブロットィングで確認し、陽性画分を精製CLAC画分として用いる(一般的操作についてはFichard et al., J. Biol. Chem., 272, 30083 (1997) 参照)。

(ロ) CLAC-Pを恒常発現するHEK293細胞を10%FBSを含むDMEM培地中で3日間培養し、細胞がセミコンフルエントの状態になったら、FBSを抜いたDMEM培地中で48時間培養し、培養液を回収する。培養液を50mM Tris-HCl (pH 8.6) に対して一晩、4℃で透析し、その後250,000xgで30分遠心分離する。沈殿物を0.15M酢酸に溶解させる。さらに2M尿素を含んだ20mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 7.2) (PB/U液) に対して一晩透析後、250,000xgで30分遠心分離し、上清をヘパリンカラムにアプライする。溶出は0Mから0.1Mおきに1Mまで順に濃度を変えたNaClで行う。全画分をPB/Uに対し透析し、特異抗体9D2を用いたイムノブロットィングで確認し、陽性画分を精製CLAC画分として用いる(一般的操作についてはMizuno et al., J. Biol. Chem., 120, 934 (1996) 参照)。

あるいは(ハ) あらかじめCLAC特異抗体(例えば、9D2) (1mg/ml) をアフィゲル10 (Bio-Rad) などのNHS活性型担体に結合させ、抗体カラムを作製する。CLAC-Pを恒常発現するHEK293細胞を10%FBSを含むDMEM培地中で3日間培養する。細胞がセミコンフルエントの状態になったら、FBSを抜いたDMEM培地中で48時間培養し、培養液を回収する。培養液に対し、50%飽和硫酸で蛋白を沈殿させる。IPバッファー(0.5% SDS、0.5% NP-40を含んだTSI液[50mM Tris (Gibco BRL), 150mM NaCl (関東化学), 0.5mM DIFP (和光純薬), 0.5mM PMSF (Boehringer Mannheim), 1mM EGTA (和光純薬), 1μg/ml アンチパイン (Sigma), 1μg/ml ロイペプチン (和光純薬), 1μg/ml ペプスタチン (Sigma), 1μg/ml TLCK (Sigma)]) に溶解させ、0.45μmフィルターに通し、上記抗体カラムにアプライする。溶出は0.1% Triton X-100を含む0.2Mグリシン-HCl (pH 2.6) で行う。溶出画分を精製CLACとして用いる(一般的操作についてはHirako et al., J. Biol. Chem., 273, 9711 (1998) 参照)。

したがって、本発明のさらなる態様は、モノクローナル抗体9D2を用いるCLACの精製方法である。

なお、モノクローナル抗体9D2を産生するハイブリドーマは、経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-7437として寄託されている。

本発明のさらなる態様は、本発明のCLAC-PまたはCLACに特異的に結合する抗体である。

C L A C - PならびにC L A Cに対する特異的抗体は、例えば、以下の方法により得ることができる。

C L A CならびにC L A C - Pのアミノ酸配列に基づき、

NC-1: Glu Pro Arg Ser Glu Asp Pro Thr Pro Ala Glu Gln His Cys (配列番号: 2のアミノ酸14~27) (配列番号: 3)

NC2-1: Gly Cys Asn His Gly Phe Leu Ser Ala Asp Gln Gln Leu Ile Lys (配列番号: 2のアミノ酸171~183、アミノ酸171の前にG l yおよびC y sを付加) (配列番号: 4)

10

NC2-2: Cys Lys Gly Glu Gln Gly Asp Gln Gly Pro Arg Met Val Phe Xaa Lys (配列番号: 2のアミノ酸155~169、アミノ酸155の前にC y sを付加) (Xaaはヒドロキシプロリンを意味する) (配列番号: 5)

NC3: Asp Tyr Asn Gly Asn Leu His Glu Ala Leu Gln Arg Ile Thr Cys (配列番号: 2のアミノ酸430~443、アミノ酸443の後にC y sを付加) (配列番号: 6)

20

NC4: Leu Gly Pro Asp Gly Leu Pro Met Pro Gly Cys Trp Gln Lys (配列番号: 2のアミノ酸641~654) (配列番号: 7)

等のペプチドを合成し、ついで、K L H (K e y h o l e L i m p e t H e m o c y a n i n) と結合させたこれらのペプチドを抗原としてウサギに免疫し、得られた血清の抗原ペプチドに対する反応性をE L I S A法により評価しつつ抗血清を得る。抗血清は抗原ペプチドを結合したアフィゲルに結合させ、特異抗体のみをアフィニティ精製することもできる。

本発明の第11態様のC L A C - Pのスプライスバリエーションに関しても、上記のように利用することができる。

30

本発明のC L A C - PまたはC L A Cに特異的に結合する抗体としては、ポリクローナル、モノクローナルいずれであってもいいが、モノクローナル抗体が好ましく、上記9D2モノクローナル抗体が特に好ましい。

かかる抗体の中にはC L A CまたはC L A C - Pに特異的に結合する。また、それらの作用機能を阻害するものも存在する。したがって、本発明のさらなる態様は、かかる抗体を用いたC L A CまたはC L A C - Pの検出方法である。この検出方法をアルツハイマー病の診断に使用してもよく、これらの抗体を当業者公知の標識、例えば、放射性標識（例えば、 ^{99}Tc ）または蛍光標識、酵素標識等で標識することができ、生きた動物に注入してイメージをスキャンすることにより、あるいは生検または剖検試料中のC L A CまたはC L A C - P蛋白との結合を検知し定量することができる。

40

よって、本発明のさらにもう1つの態様は、検出可能に標識したC L A CまたはC L A C - Pに対する特異的抗体を構成成分とするアルツハイマー病診断用キットである。生きたヒトに直接キット成分を注入し、イメージをスキャンするものであってもよく、生検試料または剖検試料にキット成分を作用させるものであってもよい。抗体としてはモノクローナル抗体9D2が好ましい。標識としては、放射性標識（例えば、 ^{99}Tc 等）、蛍光標識、酵素標識等があり使用方法、用途、部位等に応じて選択される。かかる標識は当業者によく知られている。本発明の診断キットは、各成分を別個の容器に入れたものであってもよく、いくつかの成分をまとめて数個の容器に入れたものであってもよい。一般的には、適切な説明書をキットに添付する。

50

また、本発明のもう1つの態様は、CLACまたはCLAC-Pの作用機能を阻害する活性阻害剤のスクリーニング法である。かかる活性阻害剤は、結果としてA β の蓄積を阻害する等の効果を有するので、アルツハイマー病の治療薬として使用することができる。かかる活性阻害剤は、例えば、次の(イ)(ロ)または(ハ)に記載したような方法を用いてスクリーニングすることができる。

(イ) CLACと β アミロイドの結合或いはそれに起因するアミロイド凝集促進に影響を与える物質については、合成A β (1-42) ペプチドと適量の精製CLACに加えて被検物質を混和し、室温で0~5日インキュベートし、チオフラビンTによる蛍光を発するアミロイド線維の形成の抑制を評価する。或いは、ヒトCLAC-P遺伝子を過剰発現したトランスジェニックマウスとアルツハイマー変異型 β APP遺伝子を過剰発現したトランスジェニックマウスを交配して産まれたマウス、もしくはアルツハイマー変異型 β APP遺伝子を過剰発現したトランスジェニックマウスに被検物質を経口的、もしくは経静脈的、もしくは経脳室的に投与し、脳の β アミロイド斑が被検物質を投与しないマウスに比して減少することを免疫組織化学的もしくは生化学的に評価する。

10

(ロ) CLAC-Pを介した β アミロイドの細胞への結合を抑制する物質については、CLAC-Pを恒常的に発現したHEK293細胞及びコントロール細胞を培養し、予め60分間試験管内でインキュベートした10 μ MのA β (1-42) と被検物質を加え、さらに60分間インキュベートし、回収した細胞に結合したA β 量を検出することにより評価する。

(ハ) CLAC-Pを介して細胞に結合したA β の細胞毒性を抑制する物質については、例えば、NGFにより神経細胞に分化誘導したPC12細胞に、リポフェクション法によりCLAC-Pを一過性に発現させ、予め1時間インキュベートしたA β (1-42) ならびに被検物質を加え、その後細胞をTUNEL染色してアポトーシスの抑制を評価する、或いはMTT試薬により生存細胞の増加を評価する。

20

したがって、本発明のさらなる態様は、CLACまたはCLAC-Pを用いることを特徴とする、かかる活性阻害剤のスクリーニング方法である。

かかる活性阻害剤としては、CLACまたはCLAC-Pに対するアンタゴニスト、CLACまたはCLAC-Pに類似した構造を有するポリペプチド、あるいは他の低分子化合物等がある。

また、本発明のCLACまたはCLAC-Pに特異的に結合する抗体にはCLACまたはCLAC-Pの作用効果を阻害するものもあり、これらの抗体は結果として脳中のA β 蓄積を抑制し、アルツハイマー病を治療、進行遅延または予防することができる。

30

したがって、本発明のさらにもう1つの態様は、かかる活性阻害剤またはかかる抗体を投与することを特徴とするアルツハイマー病の治療、進行遅延または予防方法である。かかる活性阻害剤またはかかる抗体をそのまま、あるいは精製水もしくは生理食塩水のごとき適当な担体とともに投与することができ、その投与経路としては、経静脈的、経脳脊髄腔経路等があるが、経静脈的経路が好ましい。または、その投与量は通常1 μ g~100mg/キログラム体重であるが、投与経路、処置すべき疾病の重さ、患者の状態等により適宜増減される。

上記方法に適した抗体はモノクローナル抗体9D2である。

40

さらにCLACまたはCLAC-P自体の産生を抑制することによりアルツハイマー病の治療効果を発揮する物質も本発明に包含される。かかる物質のスクリーニング方法としては、例えば、次の方法がある。

CLACもしくはCLAC-Pの産生の低下を介して治療効果を発揮する物質については、被検物質を含有する培地中で、本発明の形質転換細胞を培養し、CLACの産生ないし分泌の阻害を検出又は定量することにより行いうる。該スクリーニング法においては、CLACに特異的な抗体を用いるウェスタンブロッティング法などの方法を適宜利用して、被検物質による細胞からのCLACの産生ないし分泌の変化を検出し、定量することができる。

具体的には、例えば、本発明の形質転換細胞をマルチプレートに蒔き、血清を含むDME

50

M培地で細胞がコンフルエントになるまで培養する。その細胞を無血清培地（0.5%ウシ血清アルブミン含有DMEM）で洗浄後、同培地に被検物質を添加し、一定時間（例えば24時間）培養する。その培養上清もしくはマルチプレート上に付着した細胞外マトリックスに含まれるCLAC量をウェスタンブロッティング法による定量し、被検物質非添加群に対するCLAC量の割合およびCLACの産生・分泌低下作用を惹起する濃度で被検物質のCLAC産生・分泌阻害作用を評価する。このようなスクリーニング方法も本発明に包含される。

さらに、上記のような、CLAC-PおよびCLACと相互作用し、生理学的に有用なペプチド性分子については、例えば、以下の工程（イ）、（ロ）または（ハ）のいずれかを含む方法により取得・同定することができる。

（イ）ヒトCLAC-PとDNA結合蛋白の融合遺伝子、ならびにヒト脳由来cDNAに転写活性化蛋白を融合させた遺伝子ライブラリーを、two hybrid法を利用して酵母細胞に発現し、陽性反応を示す遺伝子を取得する。

（ロ）ヒトCLAC-PあるいはCLACリコンビナント蛋白を結合したカラムにヒト脳抽出物を通し、結合した蛋白を溶出してアミノ酸配列解析を行う。

（ハ）ヒトCLAC-P抗体を固定したカラムにヒト脳抽出物を通し、ヒトCLAC-PあるいはCLACとともにカラムに結合する蛋白を溶出してアミノ酸配列解析を行う。

かかるペプチド性分子もまた、アルツハイマー病の治療、進行遅延または予防に有用である。したがって、かかるペプチド性分子ならびにその取得・同定方法も、本発明に包含される。

CLAC-P及びCLACの分泌、産生に影響を与える蛋白も、本発明の治療、進行遅延または予防方法において有用である。かかる蛋白は、例えば、CLAC-Pを発現する培養細胞にヒトcDNAライブラリーを発現し、限界希釈法によって単一cDNAを発現したクローンを選択し、その細胞クローンから分泌されるCLAC量の変化をウェスタンブロット法により評価した後、導入された遺伝子を同定することにより同定することができる。したがって、かかる蛋白ならびにその同定方法も本発明に包含される。

本発明のさらにもう1つの態様は、本発明のCLAC DNAまたはCLAC-P DNAのいずれかを人為的に染色体中に導入するか、あるいはいずれかを染色体から欠損させたトランスジェニック動物である。トランスジェニック動物とは、遺伝子組み換えにより外来遺伝子を導入された動物であって、通常の交雑育種では不可能な形質を持った動物をいう。トランスジェニック動物の製造方法は、当業者によく知られており、一般的には、導入したいDNAを含む遺伝子をクローン化し、発現を所望する時期に所望臓器で特異的に発現するプロモーターを該遺伝子に連結し、これを受精卵に導入し、ついで、借腹に移植する工程を含む方法により製造される。発現調節配列を適宜選択あるいは変異させることにより、本発明のCLACまたはCLAC-Pの発現を人為的に調節されたトランスジェニック動物を得ることができる。また、正常な遺伝子の機能を破壊したノックアウト動物もトランスジェニック動物に含まれる。かかるトランスジェニック動物は、本発明のCLACまたはCLAC-Pの機能または発現調節、それらが関与する疾病の発症機構の解明、医薬品の開発・スクリーニング等に利用価値がある。好ましくは、かかるトランスジェニック動物はヒト以外のものである。

ヒト以外のCLAC-PおよびCLACをクローニングすることもできる。例えば、所望の動物のcDNAライブラリーを用いて、本質的には上記の方法と同様にして遺伝子増幅を行うことにより、所望の動物のCLAC-PおよびCLAC遺伝子をクローニングし、そのアミノ酸配列を推定することができる（マウスのCLAC-P遺伝子のクローニングについては本明細書の実施例7参照）。

実施例

以下に実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1：モノクローナル抗体9D2の作製

（1）老人斑アミロイドの部分精製

アルツハイマー脳大脳皮質より灰白質を切り出し、1Mしょ糖（関東化学）を含んだTSI液[50mM Tris (Gibco BRL), 150mM NaCl (関東化学), 0.5mM DIFP (和光純薬), 0.5mM PMSF (Boehringer Mannheim), 1mM EGTA (和光純薬), 1μg/ml アンチパイン (Sigma), 1μg/ml ロイペプチン (和光純薬), 1μg/ml ペプスタチン (Sigma), 1μg/ml TLCK (Sigma)] 中でポッターエルベジウム型ホモジナイザー (Matsushita Electric Industrial) でホモジナイズし、遠心機 (日立工機) で4℃、30分、260,000xgで遠心分離した。

得られた沈殿物を1Mしょ糖を加えたTSI液に懸濁し、しょ糖密度勾配法 [Am. J. Pathol., 148 1517 (1996)] により分画して1.5Mしょ糖/2.2Mしょ糖界面を集めた。

10

得られた界面をDNase I (和光純薬) で37℃、3時間処理し1% Triton-X 100及び、5M尿素 (nacalai tesque) を含んだTSI液中に懸濁させ、毛細血管を除去し [J. Neurochem., 58 1953 (1992)]、遠心機で4℃、30分、100,000xgで遠心分離した。

得られた沈殿物を老人斑アミロイド画分とする。

(2) 抗体の作製

老人斑アミロイド画分を1% SDSを含んだ50mM Tris液中に懸濁し、フロイント完全アジュバント (Sigma) でエマルジョン化し、マウス (BALB-C、7週齢、オス) 足底に免疫した [J. Exp. Med., 169 1693 (1989)]。免疫後25日目に下肢リンパ節を摘出しRPMI培地中でリンパ球を取り出し、電気融合法により、マウス骨髄腫由来のミエローマ細胞PAI株と融合させ、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマをHAT培地に懸濁し、96穴プレート (Greiner) に分注し10日間培養した。

20

(3) モノクローナル抗体のスクリーニング

ハイブリドーマを培養したウエルから培養上清を回収し、老人斑アミロイド画分を塗抹したスメア標本上で、アミロイドを陽性に染色する抗体を選択した [Am. J. Pathol., 148 1517 (1996)]。

288個のハイブリドーマクローンから、最も陽性の結果を示したモノクローナル抗体9D2を選択した。モノクローナル抗体のアイソタイプはMouse antibody isotype kit (アマシャム) によりIgG1と確認した。9D2抗体を最も多く産生するハイブリドーマをハイブリドーマ9D2と命名して、茨城県つくば市東1丁目1番3号の経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に寄託し、2001年1月30日に受託番号FERM BP-7437を付与された。

30

偶然にも、かかる抗体は、性質等が明らかにされていない、アルツハイマー病脳由来の未知蛋白 (本発明において、CLAC-PおよびCLACと命名) に特異的に強く結合することがわかった。特に、モノクローナル抗体9D2は、CLAC-PおよびCLACへの特異的結合が強力である。さらにモノクローナル抗体9D2は、CLAC-Pのアミノ酸番号113のGluがピログルタミン酸化されたペプチド断片Xaa Ala Pro Ser Glu Cys (配列番号: 29) と強く反応するという特徴を有する。

40

これらの未知蛋白遺伝子 (CLAC-PおよびCLAC) のクローニング、配列決定等について実施例2で説明する。

実施例2: ヒトCLAC-P遺伝子のクローニング

アルツハイマー脳大脳皮質より20gの灰白質を切り出し、TSI液中でポッターエルベジウム型ホモジナイザーを用いてホモジナイズし、遠心機で4℃、20分、260,000xgで遠心分離した。得られた沈殿物を1Mしょ糖を含んだTSI液中でホモジナイザーを用いてホモジナイズし、遠心機で4℃、20分、260,000xgで遠心分離した。得られた沈殿物を0.32Mのしょ糖を含んだTSI液中に懸濁し、毛細血管を除去し、遠心機で4℃、20分、260,000xgで遠心分離した。得られた沈殿物を2%の

50

SDS (nacalai tesque社) を含んだTSI 液中でホモジナイザーを用いてホモジナイズし、遠心機で4℃、20分、260,000xgで遠心分離した。得られた沈殿物を70%ギ酸(和光純薬社)中で超音波破碎機(Branson社)により破碎し、遠心機で4℃、20分、260,000xgで遠心分離した。得られた上清を凍結乾燥機(Tomy社)で乾固後6Mグアニジン塩酸(nacalai tesque社)水溶液に懸濁し、遠心機で4℃、20分、260,000xgで遠心分離した。得られた上清に対し100分の1倍容の70%ギ酸を加え逆相HPLC(high-performance liquid chromatography, Hewlett-Packard社)で、Aquapore RP300カラム(2.1×30mm, Applied Biosystems社)を用いて分画した[J. Biol. Chem., 267 17047 (1992)]。

10

モノクローナル抗体9D2に対し陽性を示す画分をSDS-PAGE(SDS polyacrylamide gel electrophoresis)を用いたイムノブロッティング法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 2025 (1997)]により選んだところ、アセトニトリル(和光純薬)濃度約30%の画分であった。9D2陽性画分を凍結乾燥機で乾固後6Mグアニジン塩酸水溶液に懸濁して還元カルボキシメチル化法[J. Biol. Chem., 238 622 (1963)]で還元し、ゲル濾過HPLCでTSKgel SuperSW3000カラム(4.6×600mm, Tosoh)を用いて分画した。イムノブロッティング法で9D2抗体が強く反応した分子量約35kDaの画分をリシルエンドペプチダーゼであるAPI(achromobacter lyticus protease I)または、Asp-N(Boehringer Mannheim社)で消化[J. Biol. Chem., 267 17047 (1992)]した。消化物を逆相HPLCでSuperspher Select Bカラム(2.1×125mm, Merck社)を用いて分画しペプチドマップを得た。

20

ペプチドマップで得られた画分をTOF(time of flight)型質量分析機(Bruker-Franzen Analytik社)及びアミノ酸配列解析機(Applied Biosystems社)で解析し[J. Biol. Chem., 274 7368 (1999)]、質量分析機による分子量と一致する部分アミノ酸配列を選び出した。

30

以下に得られた配列をアミノ末端側から示す。

消化酵素APIにより

Ile Asn His Gly Phe Leu Ser Ala Asp Gln Gln Leu Ile Lys (配列番号: 8)

Gly Glu Gln Gly Asp Gln Gly Hyp Arg Met Val Phe Pro Lys (配列番号: 9)

が得られた(Hypはヒドロキシプロリンを意味する)。

消化酵素Asp-Nにより

Asp Gln Gly Pro Arg Met Val Phe Pro Lys Ile Asn His Gly Phe Leu Ser Ala

(配列番号: 10)

40

が得られた。

結果、9D2抗原の部分アミノ酸として、次の28アミノ酸が得られた。

Gly Glu Gln Gly Asp Gln Gly Pro Arg Met Val Phe Pro Lys Ile Asn His Gly

Phe Leu Ser Ala Asp Gln Gln Leu Ile Lys (配列番号: 11)

この配列をもとに縮重プライマーを用いたPCR(polymerase chain reaction)法による9D2抗原部分cDNAクローニングを行った。用いたプライマーは次のように設計した。

5'-aar ggi gar car ggi gay car ggi cc-3' (配列番号: 12)

5'-agc tgc tgr tci gcd gav agr aab cc-3' (配列番号: 13)

5'-agc tgc tgr tci gcr ctv agr aab cc-3' (配列番号: 14)

ただし i はイノシン、r は a もしくは g を、y は c もしくは t を、d は a, g もしくは t を、v は a, g もしくは c を表す。

Human brain Marathon-Ready cDNA Library (CLONTECH社) を鋳型として LA Taq (宝酒造) により PCR 機 (宝酒造) で 95℃、30 秒間熱変性、58℃、30 秒間アニーリング、72℃、1 分間 DNA 合成を 40 回繰り返し、80 bp の cDNA フラグメントを増幅させた。pBluescript II KS+ (Stratagene 社) にこのフラグメントをサブクローニングし、Thermo sequencing kit (アマシャム社) により自動シーケンサー (Li-COR 社) で塩基配列を確認した。

その配列を元に PCR を用いた RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法を繰り返すことにより CLAC-P の ORF (オープンリーディングフレーム) を含む CLAC-P DNA のクローニングに成功した。用いた特異プライマーを以下に示す。

5'-tag ctg ctg gtc ggc gct gag gaa gcc a-3' (配列番号: 15)

5'-aag ggg gaa cag ggg gac cag ggg ccg a-3' (配列番号: 16)

5'-tcg gaa aca cca tcc tcg gcc cct ggt c-3' (配列番号: 17)

5'-cat ggc ttc ctc agc gcc gac cag cag c-3' (配列番号: 18)

5'-cgc cgc ctg att aag ggt gac caa gga c-3' (配列番号: 19)

5'-aag agg gcc acc tgg gga cac agg gaa a-3' (配列番号: 20)

5'-acc ctt ggg gcc gtt ctc tcc agc gtc t-3' (配列番号: 21)

5'-cac ctt gtt ctc cag gtt ctc cct tag g-3' (配列番号: 22)

5'-gaa tac cag gac cta agg gag aac ctg g-3' (配列番号: 23)

5'-ggc ccc aag ggt gac aca ggc gaa aag g-3' (配列番号: 24)

5'-ccc tcc ttt ccc tgc gtg ctt ctt cag c-3' (配列番号: 25)

5'-tct cgg ctt cgc ttc cca ccc tot aca c-3' (配列番号: 26)

5'-gga gat tct gga atg ccg ggt cca cag g-3' (配列番号: 27)

5'-ctt cta tca tag gcc cac cag gcc cac c-3' (配列番号: 28)

Human brain Marathon-Ready cDNA Library (CLONTECH社) を鋳型として LA Taq (宝酒造) により PCR 機 (宝酒造) で 95℃、30 秒間熱変性、58℃、1 分間アニーリング、72℃、5 分間 DNA 合成を 35 回繰り返し、その後反応液にさらに nested プライマーを加え 95℃、30 秒間熱変性 60℃、1 分間アニーリング、72℃、5 分間 DNA 合成を 30 回繰り返してフラグメントを増幅させた。得られたフラグメントを pBluescript II KS+ にサブクローニングし、Thermo sequencing kit により自動シーケンサーで塩基配列を確認した。

その結果新規蛋白 CLAC-P の cDNA を得ることに成功した (配列番号: 1)。これより ORF のアミノ酸配列を推定した (配列番号: 2)。これらの DNA 配列およびアミノ酸配列を図 1 に示す。

CLAC-P の cDNA は全長 654 アミノ酸をコードする ORF を含む (図 1、配列番

10

20

30

40

50

号：1および配列番号：2参照）。CLAC-Pはアミノ末端を細胞質側、カルボキシ末端を細胞外側に持つタイプII型の新規な1回膜貫通蛋白であり、細胞外領域に3回のコラーゲン様Gly-Xaa₁-Xaa₂（Gはグリシンを意味し、Xaa₁、Xaa₂は任意のアミノ酸を意味する）繰り返し配列を有している。RT-PCR法を用いて各種ヒト組織におけるmRNA発現を調べたところ、脳と精巣に特異的な発現が認められた。予想されるアミノ酸配列をもとに作製したペプチド抗体は、アルツハイマー病の脳において老人斑を染色し、得られたcDNAに由来する蛋白断片が老人斑アミロイドに蓄積していることが確認された。

実施例3：ヒトCLAC-P恒常発現形質転換細胞を用いたCLAC-Pのアミロイドβペプチド受容体機能の検定

10

CLAC-P遺伝子を組み込んだプラスミドDNAを以下のようにして調製した。すなわち、CLAC-Pの5'UTR領域の-40位にHindIIIで切断され、3'UTR領域の最初の停止コドンより+100位の所にBamHIで切断されうる配列になるようにCLAC-P遺伝子を改良し、CMVプロモーターを持つpCDNA3.1/Hygro(+)(invitrogen)のマルチクローニングサイト中のHindIII-BamHI領域に組み込んだ。

HEK293細胞を6ウェルプレート(Nunc)に3.0~5.0x10⁵個/ウェルの密度で蒔き、24時間培養した。次に、1ウェルあたり溶液A：1μgプラスミドDNA/100μl Opti-MEM(Gibco BRL)、溶液B：10μl LipofectAMINE(Gibco BRL)/100μl Opti-MEMを作製し、溶液Aと溶液Bを混合し、室温で30分間インキュベーションした後に、この混合物に800μlのOpti-MEMを加えて1mlとした(DNA-リポフェクタミン複合体)。細胞からDMEMを取り除き、Opti-MEMで1回洗浄後、各ウェルに1mlのDNA-リポフェクタミン複合体を加え6時間培養した。続いて1mlの20% FBSを含んだDMEMを加え、さらに24時間培養し、DMEMに培地を交換後さらに24時間培養した。次に各ウェルの細胞を10cmディッシュに蒔き直し、ヒグロマイシン(和光純薬)133μg/mlを含むDMEM中で選択培養した。10~14日間選択培養を行った後、増殖してきた細胞を、目的のプラスミドを導入したポリクローン細胞株として取得した。ポリクローン細胞株はさらに限界希釈法によりクローニングし、モノクローン細胞株を15株取得した。取得したモノクローン細胞株はCLAC-P蛋白特異抗体を用いたイムノブロットングにより発現を解析し、最も発現の高い3株を選んで、9D2-1、9D2-2、9D2-11と命名し、以後の実験に使用した。なお、HEK293細胞ヒトCLAC-P恒常発現形質転換細胞9D2-1株は茨城県つくば市東1丁目1番3号の経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に寄託され、2001年1月30日に受託番号FERM BP-7438を与えられた。

20

30

予めポリ-L-リジン(Sigma、10μg/ml)をコートしたカバーガラス(Matsumi)を10cmディッシュ上に並べ、その上に細胞を蒔き、培養、遺伝子導入後、カバーガラスを回収した。カバーガラスをPBS液で2回洗浄後、4%パラホルムアルデヒド(TAAB)を含んだPBS液で室温、30分間固定した。さらにPBS液で2回洗浄後、0.5% Triton X-100、0.3% BSA(ウシ血清アルブミン、Sigma)を含んだPBS液で室温、30分間パーメアビリゼーション(permeabilization)とブロックングを行った。溶液を取り除き、0.3% BSAを含んだPBS液で抗体を1000倍に希釈して加え、室温で2時間反応させた。PBS液で3回洗浄、さらに0.3% BSAを含んだPBS液で二次抗体としてFITC結合抗ウサギ抗体(Jackson)を希釈して加え、遮光し室温で1時間反応させた。PBS液で3回洗浄後、封入剤を用いて封入し、蛍光顕微鏡(AX-80、オリンパス製)で観察した。図2左パネル(A)に示すように、CLAC-P細胞膜系、ことに小胞体、ゴルジ装置ならびに細胞表面膜に分布していた。

40

10cmディッシュで培養したモノクローンCLAC-P恒常発現HEK293株をTS液で洗浄後、TSI液中でセルスクレイパーを用いて回収した。細胞をポリトロンホモジ

50

ナイザー（日立工機）で破碎後、遠心機で4℃、1,000xg、7分間遠心分離した。その上清を回収し、遠心機で4℃、2,000xg、30分間遠心分離した。この沈殿物を膜性画分とした。上清をさらに超遠心機で4℃、10,000xg、60分間遠心分離した。この沈殿物をマイクロソーム画分として、上清を細胞質画分として回収し、解析に用いた。図2右パネル（B）に示すように、CLAC-P発現細胞の膜性画分に特異的に80キロダルトンの全長CLAC-P蛋白の発現が検出された。

ヒトCLAC-P恒常発現HEK293細胞とpcDNA3.1ベクターのみを恒常発現した対照細胞を10cm dishで培養し、コンフルエントになったところで予め37℃で60分インキュベートした10μM Aβ（1-42）（Bachem）を加え、インキュベートした。一定時間後、Aβを含む培養上清を除き、PBSで3回洗浄した後、細胞をスクレイパーで回収し、微量遠心機（TOMY）で7,000rpm、5分遠心して細胞を沈降させ、サンプルバッファーを加えて超音波処理して可溶化し、BCA protein assay kit（Pierce）を用いて蛋白量を定量した。

上記の細胞抽出液を各サンプルが一定蛋白量となるように調整し、最終濃度1%となるよう2-メルカプトエタノール（nacalai tesque）を加え、10分間熱処理した。15%のTris-Tricineゲルを用いたSDS-PAGEにより蛋白を分離し、3時間150mAの条件で、ニトロセルロースメンブレン（Hybond-ECL、Amersham）に転写した。転写したメンブレンはPBS中で10分間熱処理を加えた後、1%スキムミルク（Difco）-PBSで室温で30分間ブロッキングし、同様のブロッキング液で希釈した各種抗体と室温2時間又は4℃一晩反応させた。PBS-T（Tween20を0.1%含むPBS）で10分間3回の洗浄を行い、続いて同様のブロッキング液で希釈した二次抗体（抗マウスまたは抗ウサギIg、セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合全抗体（Amersham））と室温で1時間反応させた。PBS-Tで10分間3回の洗浄後、ECLkit（Amersham）を用いてHyperfilm-ECL（Amersham）に感光させ、Aβの結合を検出した。ヒトCLAC-Pを発現した細胞は、細胞由来蛋白1mg当たり30ngのAβ（1-42）を結合したが、ベクターのみを発現した細胞では6ngであった。即ちAβ（1-42）の結合は5倍に増加しており、細胞表面に発現したヒトCLAC-PがAβを結合する受容体として働くことが示された。

実施例4：ヒトアルツハイマー脳アミロイド由来CLACのアミノ酸配列解析ならびに9D2抗体との反応性

実施例2の（1）の方法により精製したヒトアルツハイマー脳由来のCLACをアミノ酸配列解析に供すると、アミノ末端がブロックされており、解読不能であった。そこでCLAC-Pのアミノ酸番号113～118に相当し、第113アミノ酸のGluをピログルタミン酸（Xaa）に置換したペプチドXaa-Ala-Pro-Ser-Glu-Cys（配列番号：29）を合成し、Cysを介してKLHと結合した後、これを抗原として抗体を作製した（以下、該抗体をPyroGと称する）。PyroG抗体は、文献の記載（Neuron, 14:457（1995））から推定できるように、合成ペプチドのKLH結合側と反対側のアミノ末端切断端構造を特異的に認識した。すなわち、PyroG抗体は実施例3の方法で培養細胞に発現させて取得した全長リコンビナントCLAC-P蛋白とはSDS-PAGEを用いたイムノブロッティング法にて反応しなかったが、Xaa-Ala-Pro-Ser-Glu-Cysペプチドをマイクロウェルプレートに固着させ（EMBO J., 11:2895（1992）の方法に準じて行った）、PyroG抗体を1次抗体として間接ペルオキシダーゼ法で酵素抗体反応法（ELISA）を施行すると陽性反応を呈し、また上記方法でヒトアルツハイマー脳より得たCLACとイムノブロッティング法で陽性に反応した。さらに9D2抗体とアルツハイマー脳由来CLACのイムノブロッティング法による陽性反応、およびアルツハイマー脳組織標本の老人斑との免疫組織化学による染色性は、上記ペプチドXaa-Ala-Pro-Ser-Glu-Cysを予め9D2抗体に混和し、抗体活性を吸収することにより（Neuron, 13:45（1994）の方法に準じて行った）消失した。これらの事実から、アルツハイ

マー脳アミロイド由来CLACはCLAC-Pの第113アミノ酸より始まり、当該第113アミノ酸はピログルタミン酸化されていること、9D2抗体はかかる修飾を受けたCLAC蛋白を認識することが示された。

実施例5：CLACと β アミロイド(A β)の試験管内結合実験

CLACとA β の試験管内結合実験についてはWebsterらの方法(Am. J. Pathol., 150, 1531(1997))に従った。

実施例3で得られたヒトCLAC-P恒常発現形質転換細胞(9D2-1株)を10% FBS、ヒグロマイシンを含むDMEM培地中で4日間選択培養し、その培養上清を回収した。予め37℃で1日放置しておいた0.1mg/mlの合成A β 1-42(Bachem)を50 μ lずつ96穴マイクロウェルプレート(Greiner)に固着させ、デシケーターで乾固させた。続いてブロッキング液として1%ゼラチン(和光純薬)を含んだPBS-Tで1時間ブロッキング後、PBS-Tで10分間3回の洗浄を行い、回収した培養上清をアプライした。同様に実施例3で用いた対照HEK293細胞の培養上清もアプライした。1時間室温で反応後PBS-Tで10分間5回洗浄し、同様のブロッキング液で5000倍に希釈した抗CLAC抗体と室温で1時間反応させた。PBS-Tで10分間5回洗浄後、同様のブロッキング液で5000倍に希釈した二次抗体(抗ウサギIg、セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合全抗体(Amersham))と室温で1時間反応させた。PBS-Tで10分間5回洗浄後、TMB発色試薬(Kirkgaard & Perry Laboratories)で発色させた。

10回の試行の結果、CLACを分泌しているCLAC-P恒常発現形質転換細胞の培養上清は分泌していない対照HEK293細胞の培養上清よりも約500倍強く発色し、有意に($p < 0.0001$)CLACはA β と試験管内で結合していることが示された。

実施例6：CLACがA β の凝集に及ぼす影響の検討

実施例3で得られたヒトCLAC-P恒常発現形質転換細胞(9D2-1株)をヒグロマイシン、10%FBSを含むDMEM培地中で3日間選択培養し、セミコンフルエントな状態からFBSを含まないDMEM培地中で4日間培養し、その培養上清を回収した。培養上清を2000xgで遠心後上清をDEAEカラム(Whatman)にアプライし、素通り画分をさらにヘパリンカラム(Amersham)にアプライする。2M尿素(Nacalai Tesque)を含んだPBS液(PB-U液)でカラムを十分に洗浄後、1MNaClを含んだPB-U液で溶出し、溶出液をPBS液に対し透析する。このようにして得られた溶液を粗精製CLACとし、比較として対照HEK293細胞からも同様にして得ておく。

A β の凝集実験についてはLeVineの定法に従う(Methods in Enzymology, 309, 274)。

上記で得られた粗精製CLACあるいは、HEK293細胞から得られた溶液を3.6 μ M合成A β 1-42(Bachem)にそれぞれ100 μ lずつ加え、0.22 μ mのフィルターを通した後37℃で1日反応させる。反応液に3 μ MチオフラビンTを含んだ10mMグリシン-NaOH溶液(pH=8.5)を400 μ l加え、蛍光光度計(Hitachi F-2000)で測定する。蛍光は442nmで励起し、496nmの蛍光を測定した。

18回の試行の結果、粗精製CLACは、対照HEK293細胞から得られた溶液よりも約60倍A β を凝集させるという結果が得られ、これは有意($p < 0.0001$)であった。

実施例7：マウスCLAC-P cDNAのクローニング

mouse brain Marathon-Ready cDNA Library (CLONTECH)を鋳型とし、PCR(Polymerase chain reaction)法によりマウスCLAC-P cDNAのクローニングを行った。ヒトCLAC-P cDNA配列をもとに以下にあげるプライマーを作製した。

5'-GGG ATC AAG GAG CCA CTA AGA TCA TAG A-3' プライマー：1（配列番号：30）

5'-GGG CCT ATG ATA GAA GGA CCC TGT GGA C-3' プライマー：2（配列番号：31）

5'-CTA CAA CGG CAA CCT CCA CGA AGC CTT-3' プライマー：3（配列番号：32）

5'-TCT CCC TTT ATC CCC GGA AGT C-3' プライマー：4（配列番号：33）

プライマー1、2を用い、Premix Taq（宝酒造）によりPCR機（宝酒造）で95℃、45秒間熱変性、42℃、45秒間アニーリング、72℃、3分間DNA合成を40サイクル繰り返し、約330bpのcDNAフラグメントを増幅させた。次にこの反応液を鋳型として1：50となるようにPremix Taqに加え、プライマー2、3を用いて95℃、45秒間熱変性、51℃、45秒間アニーリング、72℃、3分間DNA合成を35サイクル繰り返すnested PCRを行った。その結果約300bpのフラグメントを得た。このフラグメントを精製し、TAクローニング法によりpBluescript II KS+（Stratagene）にサブクローニングし、自動シーケンサー（Li-COR）により塩基配列を確認した（配列番号：50）。 10

また、ヒトCLAC-P cDNAをもとに検索した結果、GenBankより約70bpのadult mouse testis由来のヒトCLAC-Pに相同性の高い配列を見出した（AV264752、配列番号：51）。この配列と、先に得られた配列をもとに新たに次のプライマーを合成した。 20

5'-CGA ATA TAT GGC TAA AAT AAG AAC GGT C-3' プライマー：5（配列番号：34）

5'-CTG GCA AAC CGG TGT CTC CTT TCT CTC-3' プライマー：6（配列番号：35）

5'-ACG GTC AGG GAG GCA CCT TTA GAG TGC A-3' プライマー：7（配列番号：36） 30

5'-CTC TCC TTT TAC TCC ATT GGC ACC CGG C-3' プライマー：8（配列番号：37）

5'-ACG GTC AGG GAG GAA GCT TTA GAG TGC A-3' プライマー：9（配列番号：38）

5'-TCA ACT CCG GGG ATC CCT GGA GAG CCT T-3' プライマー：10（配列番号：39） 40

まずプライマー5、6を用いて95℃、45秒間熱変性、55℃、45秒間アニーリング、72℃、3分間DNA合成を38サイクル繰り返し、この反応液を鋳型とし、プライマー7、8を用いて同条件にてnested PCRを行い、約1200bpのフラグメントを増幅させた。フラグメントを精製し、ダイプライマーとして合成したプライマー4を用いて自動シーケンサーにより塩基配列を得た。この塩基配列をもとに次のプライマーを作製した。

5'-GGG ACC ATT TTC TCG AGC ATC TCC CTT T-3'
号：40)

プライマー：11 (配列番

5'-AAA ATG GTC CCA AAG GTG ATA CAG GAG-3'
号：41)

プライマー：12 (配列番

プライマー5、6によりPCRを行った反応液を鋳型としてプライマー9、11を用いて95℃、45秒間熱変性、56℃、45秒間アニーリング、72℃、3分間DNA合成を38サイクル繰り返した。約560bpのフラグメントを増幅させ、Xho I-Hind III消化した断片としてpBluescript II KS+にサブクローニングし、塩基配列を確認した (配列番号：52)。また、プライマー5、6によりPCRを行った反応液を鋳型としてプライマー10、12を用いて95℃、45秒間熱変性、56℃、45秒間アニーリング、72℃、3分間DNA合成を38サイクル繰り返した。約550bpのフラグメントを増幅させ、TAクローニング法によりpBluescript II KS+にサブクローニングし、塩基配列を確認した (配列番号：53)。

10

次にこれらの配列をもとにRACE (rapid amplification of cDNA ends) 法を行った。用いたプライマーを以下に示す。

5'-TGC ACT CTA AAG GTG CCT CCC TGA CCG T-3'
号：42)

プライマー：13 (配列番

20

5'-GAC CGT TCT TAT TTT AGC CAT ATA TTC G-3'
号：43)

プライマー：14 (配列番

5'-TGG TAA CCT CCA TGA GGC CTT ACA GAG A-3'
号：44)

プライマー：15 (配列番

5'-GAG AGA AAG GAG ACA CCG GTT TGC CAG-3'
号：45)

プライマー：16 (配列番

30

5'-GGC TGG ATG CTC CTT GCC AAT TGG GA-3'
号：45)

プライマー：17 (配列番

5'-TGG GAC CTG ATG GGT TAC CTA TGC CTG-3'
号：46)

プライマー：18 (配列番

mouse brain Marathon-Ready cDNA Library (CLONTECH) を鋳型とし、95℃、45秒間熱変性、59℃、45秒間アニーリング、72℃、5分間DNA合成を繰り返し、その反応液を鋳型に95℃、45秒間熱変性、60℃、45秒間アニーリング、72℃、5分間DNA合成を繰り返し、nested PCRを行い、フラグメントを増幅させた。これをTAクローニング法によりpBluescript II KS+にサブクローニングし、塩基配列を確認した (配列番号：54、55、56)。

40

これらのDNA断片の配列からマウスCLACP cDNA配列を決定した (図3および配列番号：48)。このcDNA配列よりORFのアミノ酸配列を推定した (図4および配列番号：49)。マウスCLACP cDNAは全長666アミノ酸をコードしており、ヒトCLACP cDNAとの相同性は約83%、アミノ酸では約90%であった。分子構造は基本的にヒトCLACPと同様で、II型の一回膜貫通蛋白であり、細胞外領域に3カ所のコラーゲン様繰り返し配列を有していた。また、コラーゲン様配列内にalternative splicingを受ける配列も見出した (図4、配列番号

50

： 49 中の下線部）。

産業上の利用の可能性

本発明において得られた新規コラーゲン様蛋白 C L A C は、アルツハイマー病患者脳老人斑アミロイドに蓄積し、その主成分である β アミロイドの凝集を促進し、C L A C の前駆体である C L A C - P は膜貫通蛋白として細胞膜表面に分布し、 β アミロイドを細胞表面に結合する受容体として作用するため、アルツハイマー病の進行に関与しており、その予防、進行遅延、治療に用いることができる。

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO: 5

Xaa is hydroxyproline.

SEQ ID NO: 9

Xaa is hydroxyproline.

SEQ ID NO: 12

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

r is g or a. i is inosine. y is t or c.

SEQ ID NO: 13

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

r is g or a. i is inosine. v is a, g or c. d is a, g or t.

SEQ ID NO: 14

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

r is g or a. i is inosine. v is a, g or c.

SEQ ID NO: 15

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

SEQ ID NO: 16

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

SEQ ID NO: 17

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

SEQ ID NO: 18

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

SEQ ID NO: 19

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

SEQ ID NO: 20

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

SEQ ID NO: 21

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

10

20

30

40

SEQ ID NO: 22

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

SEQ ID NO: 23

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

SEQ ID NO: 24

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

10

SEQ ID NO: 25

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

SEQ ID NO: 26

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

SEQ ID NO: 27

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

20

SEQ ID NO: 28

Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA fragment.

SEQ ID NO: 29

Xaa is pyroglutamic acid.

SEQ ID NO: 30

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 31

30

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 32

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 33

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 34

40

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 35

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 36

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 37

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 38

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 39

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 40

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 41

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 42

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 43

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 44

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 45

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 46

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

SEQ ID NO: 47

Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P DNA fragment.

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

<110> Takeshi Iwatsubo,

Tadafumi Hashimoto,

BF Research Institute, Inc.

<120> Novel collagen-like protein, its precursor, and genes encoding them.

10

<130> 662339

<160> 56

<210> 1

20

<211> 2076

<212> DNA

<213> human

<400> 1

```

cgcgcacttc ggccttcgca gtagcattgg ttccctgggt ttatttcgtt ttccctctctc   60
ttctccacct tagtcgccc ttctcgctg cgctgtagcg tgctctcaca gcctttttgc   120
cttgaactga atgcaggtgg gaaacaggtc ggctgcccga aagacaccga gtaggtagaa   180
ataaggcaaa ctacagagg cgcaacaggt ccggtcctcc gtggccaggg cgagccgcgg   240
ccccgcgtgg cgctcggcc gttgcctcgc gacctgagc ggccactgtt ggggcctcgc   300
aaagaggtgt cggctctctg ggagtcggaa gagctgtctg ggtgggtttc gtcttgcttt   360
ttaccccacc gccaccagc ccccgacgg aggggtgcttt tcaattccag ctgggaggag   420
agaagaaagc ggggatggtg cagcctgcg ggtctggacg ctgagcaagg caggggatta   480
tttgaggtgt agagggtggg aagcgaagcc gagacggccg accccgccac gatgctgctg   540
aagaagcacg cagggaaagg agggggccgg gagcccagat ccgaggaccc gacctgtgcc   600
gaacagcatt gttcccgac catgcccccg tgtgccgtcc tggcggccct cctgtcagtg   660

```

30

40

gtggccgtgg tgtcttgccgt gtacctgggt gtgaaaacca acgacctcca ggcgaggatc 720
 gccgtctctg aatccgccaa aggggcccccc tccattcatc tgctgcctga taccctggat 780
 cacctcaaga ctatgggtgca agagaaagtg gagcgacttc tggctcagaa atcctatgaa 840
 catatggcta aaataagaat cgcaagagaa gcaccttcag aatgtaactg cccagcaggc 900
 cctccaggga aacgaggtaa gagaggccga agaggagaat ctggctcctcc tggacagcct 960
 ggtcctcagg gccctcctgg tccaaaaggc gataaggag aacaaggatga tcagggacct 1020
 aggatgggtgt ttctataaat caatcatggg tttctctctg ctgatcagca gctcattaaa 1080
 cgccgcctga ttaagggtga ccaaggacag gcagggcctc caggaccccc tggeectcca 1140
 ggcccaagag ggccacctgg ggacacaggg aaagatggcc cccgtggaat gccaggagta 1200
 cccggtgaac caggaaagcc aggagaacaa ggcttgatgg gtcctctagg gcctccggga 1260
 caaaagggtt ctattggagc acctggaatt ccagggatga atgggcaaaa gggtagagcc 1320
 gggttgcctg gagcagtagg acagaatgga ataccaggac ctaagggaga acctggagaa 1380
 caaggtgaaa agggagacgc tggagagaac ggccccaagg gtgacacagg cgaaaagggt 1440
 gacctggat catctgctgc aggaattaag ggagaacctg gggaatctgg tegtccaggg 1500
 caaaagggtg aaccagggtt tcttgggctt cctggacttc cggggataaa gggagaacca 1560
 ggtttcattg gtcctcaagg agaaccaggc ttaccagggtt taccaggaac aaaagggtgaa 1620
 cggggggaag cagggcctcc tggaagaggt gagcgagggg aacctggagc ccccggaacca 1680
 aaggggaaac aaggtgaatc aggaactaga ggcccaaagg ggtcaaaggg ggatcgtgga 1740
 gaaaaagggg actctggagc tcagggacca aggggtccac ctggtcaaaa aggggatcaa 1800
 ggagccacta agatcataga ctacaacggc aacctccacg aagccttaca gaggattacc 1860
 accttaactg tcacgggtcc ccttggaact cctggacctc aaggactaca agggccaaag 1920
 ggagagcagg gatctccagg aatcccagga atggatggag agcagggact caaaggctca 1980
 aaggagagaca tgggggaacc aggtatgaca ggtgaaaaag gaggaattgg acttcttgga 2040
 ttaccgggag ccaatggaat gaaaggagaa aaaggagatt ctggaatgcc ggttcacag 2100
 ggtccttcta tcataggccc accaggccca ccaggteccc atggcccaacc tggccccatg 2160
 ggacctcatg gacttctgga accaaagggt acagatggtc ctatgggacc ccatggccct 2220
 gcaggtccca aaggagaaag aggtgaaaaa ggagctatgg gagagcctgg accaagaggg 2280
 ccctatgggc tgcttgggaa agatggagag cctggctctg atggcttccc tgggtccacg 2340
 ggtgagaagg gtgatctagg agaaaaggga gaaaagggat tccgtggcgt taagggggaa 2400

10

20

30

40

aaaggggagc caggccagcc tggcctggat gggctggatg ccccttgcca attggggcca 2460
 gatggccttac ccatgcctgg ctgttgga aagtgatgaa tctaaccctt caagcatgaa 2520
 gttgtgtata taagggtcca tttttaatat ttatagttga aaactgaatt gcagatttta 2580
 caagtctgag atatgtttac atagggc 2607

<210> 2

<211> 654

10

<212> PRT

<213> human

<400> 2

Met Leu Leu Lys Lys His Ala Gly Lys Gly Gly Gly Arg Glu Pro Arg
 1 5 10 15
 Ser Glu Asp Pro Thr Pro Ala Glu Gln His Cys Ser Arg Thr Met Pro
 20 25 30
 Pro Cys Ala Val Leu Ala Ala Leu Leu Ser Val Val Ala Val Val Ser
 35 40 45
 Cys Leu Tyr Leu Gly Val Lys Thr Asn Asp Leu Gln Ala Arg Ile Ala
 50 55 60
 Ala Leu Glu Ser Ala Lys Gly Ala Pro Ser Ile His Leu Leu Pro Asp
 65 70 75 80
 Thr Leu Asp His Leu Lys Thr Met Val Gln Glu Lys Val Glu Arg Leu
 85 90 95
 Leu Ala Gln Lys Ser Tyr Glu His Met Ala Lys Ile Arg Ile Ala Arg
 100 105 110
 Glu Ala Pro Ser Glu Cys Asn Cys Pro Ala Gly Pro Pro Gly Lys Arg
 115 120 125
 Gly Lys Arg Gly Arg Arg Gly Glu Ser Gly Pro Pro Gly Gln Pro Gly
 130 135 140

20

30

40

Pro	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Asp	Lys	Gly	Glu	Gln	Gly	Asp				
145					150					155					160				
Gln	Gly	Pro	Arg	Met	Val	Phe	Pro	Lys	Ile	Asn	His	Gly	Phe	Leu	Ser				
				165					170					175					
Ala	Asp	Gln	Gln	Leu	Ile	Lys	Arg	Arg	Leu	Ile	Lys	Gly	Asp	Gln	Gly				
				180					185					190					
Gln	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly	Pro				10
			195					200						205					
Pro	Gly	Asp	Thr	Gly	Lys	Asp	Gly	Pro	Arg	Gly	Met	Pro	Gly	Val	Pro				
			210					215						220					
Gly	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Gly	Glu	Gln	Gly	Leu	Met	Gly	Pro	Leu	Gly				
225				230						235				240					
Pro	Pro	Gly	Gln	Lys	Gly	Ser	Ile	Gly	Ala	Pro	Gly	Ile	Pro	Gly	Met				20
				245					250					255					
Asn	Gly	Gln	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Ala	Val	Gly	Gln	Asn				
				260					265					270					
Gly	Ile	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Glu	Gln	Gly	Glu	Lys	Gly				
				275					280					285					
Asp	Ala	Gly	Glu	Asn	Gly	Pro	Lys	Gly	Asp	Thr	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp				
				290					295					300					30
Pro	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Gly	Ile	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Glu	Ser	Gly				
305				310						315				320					
Arg	Pro	Gly	Gln	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Leu				
				325					330					335					
Pro	Gly	Ile	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Phe	Ile	Gly	Pro	Gln	Gly	Glu	Pro				
				340					345					350					40
Gly	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Thr	Lys	Gly	Glu	Arg	Gly	Glu	Ala	Gly				
				355					360					365					
Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Glu	Arg	Gly	Glu	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Lys				

370	375	380	
Gly Lys Gln Gly Glu Ser Gly Thr Arg Gly Pro Lys Gly Ser Lys Gly			
385	390	395	400
Asp Arg Gly Glu Lys Gly Asp Ser Gly Ala Gln Gly Pro Arg Gly Pro			
	405	410	415
Pro Gly Gln Lys Gly Asp Gln Gly Ala Thr Lys Ile Ile Asp Tyr Asn			
	420	425	430
Gly Asn Leu His Glu Ala Leu Gln Arg Ile Thr Thr Leu Thr Val Thr			10
	435	440	445
Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu Gln Gly Pro Lys Gly			
	450	455	460
Glu Gln Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly Met Asp Gly Glu Gln Gly Leu			
465	470	475	480
Lys Gly Ser Lys Gly Asp Met Gly Asp Pro Gly Met Thr Gly Glu Lys			20
	485	490	495
Gly Gly Ile Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Ala Asn Gly Met Lys Gly			
	500	505	510
Glu Lys Gly Asp Ser Gly Met Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ser Ile Ile			
	515	520	525
Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro His Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly			30
	530	535	540
Pro His Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Thr Asp Gly Pro Met Gly Pro			
545	550	555	560
His Gly Pro Ala Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Glu Lys Gly Ala Met			
	565	570	575
Gly Glu Pro Gly Pro Arg Gly Pro Tyr Gly Leu Pro Gly Lys Asp Gly			40
	580	585	590
Glu Pro Gly Leu Asp Gly Phe Pro Gly Pro Arg Gly Glu Lys Gly Asp			
	595	600	605

Leu Gly Glu Lys Gly Glu Lys Gly Phe Arg Gly Val Lys Gly Glu Lys

610

615

620

Gly Glu Pro Gly Gln Pro Gly Leu Asp Gly Leu Asp Ala Pro Cys Gln

625

630

635

640

Leu Gly Pro Asp Gly Leu Pro Met Pro Gly Cys Trp Gln Lys

645

650

10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> human

<400> 3

20

Glu Pro Arg Ser Glu Asp Pro Thr Pro Ala Glu Gln His Cys

1

5

10

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

30

<220>

<223>

<400> 4

Gly Cys Asn His Gly Phe Leu Ser Ala Asp Gln Gln Leu Ile Lys

40

1

5

10

15

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Xaa is hydroxyproline.

10

<400> 5

Cys Lys Gly Glu Gln Gly Asp Gln Gly Pro Arg Met Val Phe Xaa Lys

1

5

10

15

<210> 6

<211> 15

20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223>

<400> 6

30

Asp Tyr Asn Gly Asn Leu His Glu Ala Leu Gln Arg Ile Thr Cys

1

5

10

15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

40

<213> human

<400> 7

Leu Gly Pro Asp Gly Leu Pro Met Pro Gly Cys Trp Gln Lys

1 5 10 15

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> human 10

<400> 8

Ile Asn His Gly Phe Leu Ser Ala Asp Gln Gln Leu Ile Lys

1 5 10

<210> 9

20

<211> 14

<212> PRT

<213> human

<220>

<223> Xaa is hydroxyproline.

30

<400> 9

Gly Glu Gln Gly Asp Gln Gly Xaa Arg Met Val Phe Pro Lys

1 5 10

<210> 10

<211> 18

40

<212> PRT

<213> human

<400> 10

Asp Gln Gly Pro Arg Met Val Phe Pro Lys Ile Asn His Gly Phe Leu Ser Ala

1

5

10

15

<210> 11

<211> 28

<212> PRT

10

<213> human

<400> 11

Gly Glu Gln Gly Asp Gln Gly Pro Arg Met Val Phe Pro Lys Ile Asn

1

5

10

15

His Gly Phe Leu Ser Ala Asp Gln Gln Leu Ile Lys

20

20

25

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

30

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA
 fragment. r is g or a. i is inosine. y is t, u or c.

<400> 12

aarggigarc arggigayca rggicc 26

40

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA
fragment

r is g or a. i is inosine. v is a, g or c. d is a, g or t.

10

<400> 13

agctgctgrt cigcdgavag raabcc 26

<210> 14

<211> 26

20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA
fragment

r is g or a. i is inosine. v is a, g or c.

30

<400> 14

agctgctgrt cigcrctvag raabcc 26

<210> 15

<211> 28

40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA
fragment

<400> 15

tagctgctgg tcggcgctga ggaagcca 28

10

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

20

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA
fragment

<400> 16

aagggggaac agggggacca ggggccga

30

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

40

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA
fragment

<400> 17

tcggaaacac catcctcggc ccctggtc 28

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA
fragment

<400> 18

catggcttcc tcagcgccga ccagcagc 28

20

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

30

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA
fragment

<400> 19

cgccgcctga ttaagggtga ccaaggac 28

40

<210> 20

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA
fragment

10

<400> 20

aagagggccca cctggggaca caggga aa 28

<210> 21

<211> 28

<212> DNA

20

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA
fragment

<400> 21

30

acccttgggg ccgttctctc cagcgtct 28

<210> 22

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

40

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA

fragment

<400> 22

caccttggtc tccaggttct cccttagg 28

<210> 23

<211> 28

10

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA

fragment

20

<400> 23

gaataccagg acctaaggga gaacctgg 28

<210> 24

<211> 28

<212> DNA

30

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA

fragment

40

<400> 24

ggccccaagggtgacacaggcgaaaagg 28

<210> 25

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA
fragment

10

<400> 25

ccctcctttc cctgcgtgct tcttcage 28

<210> 26

20

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA
fragment

30

<400> 26

tctcggttc gcttccacc ctctacac 28

<210> 27

<211> 28

40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA
fragment

<400> 27

ggagattctg gaatgcoggg tccacagg 28

10

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

20

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify human CLAC-P cDNA
fragment

<400> 28

cttctatcat aggcccacca ggcccacc 28

<210> 29

30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Xaa is pyroglutamic acid.

40

<400> 29

Xaa Ala Pro Ser Glu Cys

1

5

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

<400> 30

gggatcaagg agccactaag atcataga 28

20

<210> 31

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

30

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

<400> 31

gggcctatga tagaaggacc ctgtggac 28

40

<210> 32

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

<400> 32

10

ctacaacggc aacctccacg aagcctt 27

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

20

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

<400> 33

tctcccttta tccccggaag tc 22

30

<210> 34

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

40

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

<400> 34

cgaatatatg gctaaaataa gaacggtc 28

<210> 35

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

<400> 35

ctggcaaacc ggtgtctcct ttctctc 27

20

<210> 36

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

30

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

<400> 36

acggtcaggg aggcaccttt agagtgca 28

40

<210> 37

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

10

<400> 37

ctctcctttt actccattgg cacccggc 28

<210> 38

<211> 28

20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

30

<400> 38

acggtcaggg aggaagcttt agagtgca 28

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

40

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

<400> 39

tcaactccgg ggatccctgg agagcctt 28

<210> 40

10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

20

<400> 40

gggaccattt tctcgagcat cteccctt 28

<210> 41

<211> 27

30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

40

<400> 41

aaaatggtcc caaaggtgat acaggag 27

<210> 42

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

10

<400> 42

tgcactctaa aggtgcctcc ctgaccgt 28

<210> 43

20

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

30

<400> 43

gaccgttctt attttagcca tatattcg 28

<210> 44

<211> 28

40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

<400> 44

tggtaacctc catgaggcct tacagaga 28

10

<210> 45

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

20

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

<400> 45

gagagaaagg agacaccggt ttgccag 27

<210> 46

30

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

40

<400> 46

ggctggatgc tccttgccaa ttggga 26

<210> 47

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse CLAC-P cDNA
fragment

<400> 47

tgggacctga tgggttacct atgcctg 27

20

<210> 48

<211> 2298

<212> DNA

<213> mouse

30

<400> 48

cccggcgcca cacagtcccc ggccggaggg tgcttttcac tcctagctgg aaggggagaa 60
agaatctgga ggacggtcgg tccacgcctg ctgatccgga cgccgagcca cgcgaggtc 120
catctctaag cccgggctcc gactctacca actagtgttg cagccgcagg gactgaactt 180
tggaggaacc gacccttcct ctcatctaa gattactgga ggagatagaa ggtggaaggc 240
gtagcggagg ccagegacce cgccacaatg ttggtgaaga agcttgcagg gaaaggaggg 300
ggacgagagt ctggatcaga agatccgcgc cccttgggac agcgttgtgc cggcaccatg 360
ccctcgtgca cggccctggc gaccctcttg tcagtgggtg ctgtggcttt ctgtttttat 420
cttgggggtga aaaccaacga cctccaggcg aggattgttg ctcttgaatc tgctaaaggg 480

40

accccttctt tccatccgct gtctgacacc gtggatgagc tgaaggcaat gggtcaggag 540
 aaagtggagc gtctcttggc tcagaaatcc tacgaatata tggctaaaat aagaacggtc 600
 agggaggcac ctttagagtg caactgccca gcaggctcctc cagggaacg agggaagaga 660
 ggccgaagag gagaatctgg tcttcttggc cagcctggc ctcaggggccc tcttgggtcca 720
 aaaggtgata agggagaaca aggtgatcag ggacctcgga tgggtgtttcc taaaatcaat 780
 cacggctttc tctctgtga tcagcagctc attaaacgcc ggctgattaa ggggtgaccaa 840
 ggacaggcag ggctccagg acctccagge cctcctggc caagaggccc acctggggac 900
 acaggaaagg acggcccccg aggaatgcc ggagtacctg gtgaaccagg aaaaccagga 960
 gaacaaggct tgatgggacc tctggggcct ccaggacaaa agggttccat tggagcacct 1020
 gggaccccag gcatggatgg gcaaaagggt gagcctggat cacctggagc agccgggcag 1080
 agtggactac caggacctaa gggagaacct ggaaaagaag gagaaaagg agatgctgga 1140
 gaaaatggc ccaaaggta tacaggagaa aagggtgacc ctggatcatc tgctgcagga 1200
 attaaggag aacctggaga atctggccgc ccggggcaga aggtgaacc agggctgcct 1260
 gggctgcctg gacttccggg aataaaggga gaaccaggct tcatttgtcc tcaaggagaa 1320
 ccagggttac cagggtacc aggaacaaaa ggtgatcgtg gggaggcggg gcctcctgga 1380
 agaggtgaac gaggagatcc tggagccccg ggccaaaagg ggaagcaagg tgaatcagga 1440
 gctagaggcc cgaagggtc aaagggtgat cgtggagaca aaggagactc tggcgctctg 1500
 ggaccacggg gtccacctg acaaaagggt gatccaggag ccacagagat catagactac 1560
 aatggcaacc tccatgagge cttacagaga attaccacct taactgtcac gggccccct 1620
 ggacctcctg gacctcaagg actacaagg ccaaagggtg agcaaggctc tccaggaatc 1680
 ccggagttg atggagaaca gggactcaaa ggtccaagg gagacatggg ggaccaggt 1740
 gtgccagggtg aaaaaggagg actgggaact cctggattgc cgggtgcca tggagtaaaa 1800
 ggagagaaag gagacacgg tttgccaggt cctcaggggc cttctatcat agggccacca 1860
 ggccctccag gtcccatatg ccacctggc ccatggggc ccatggact tcttgacca 1920
 aaggagcat ctggcttaga cggaaagcca ggatcccggt gtgcagatgg tcttatagga 1980
 cccacggcc ctgcaggacc caaaggagaa agaggagaga aaggagctat gggagagcct 2040
 ggaccagag ggccctatg gctgcctggc aaagatggag aacctggtct tgatggttc 2100
 cctggctcctc gaggcagaa ggggtgacct ggagaaaagg gagaaaagg attccgtggc 2160
 gttaaggggg aaaaggggga gccaggccag cctggcctgg atgggtgga tgctccttg 2220

10

20

30

40

caattgggac ctgatgggtt acctatgcct ggctgctggc aaaagtgatg aatctaacct 2280
 tccgagcatg aagttgtg 2298

<210> 49

<211> 666

<212> PRT

<213> mouse

10

<400> 49

Met Leu Val Lys Lys Leu Ala Gly Lys Gly Gly Gly Arg Glu Ser Gly
 1 5 10 15
 Ser Glu Asp Pro Arg Pro Leu Gly Gln Arg Cys Ala Gly Thr Met Pro
 20 25 30
 Ser Cys Thr Ala Leu Ala Thr Leu Leu Ser Val Val Ala Val Ala Phe
 35 40 45
 Cys Phe Tyr Leu Gly Val Lys Thr Asn Asp Leu Gln Ala Arg Ile Val
 50 55 60
 Ala Leu Glu Ser Ala Lys Gly Thr Pro Ser Phe His Pro Leu Ser Asp
 65 70 75 80
 Thr Val Asp Glu Leu Lys Ala Met Val Gln Glu Lys Val Glu Arg Leu
 85 90 95
 Leu Ala Gln Lys Ser Tyr Glu Tyr Met Ala Lys Ile Arg Thr Val Arg
 100 105 110
 Glu Ala Pro Leu Glu Cys Asn Cys Pro Ala Gly Pro Pro Gly Lys Arg
 115 120 125
 Gly Lys Arg Gly Arg Arg Gly Glu Ser Gly Pro Pro Gly Gln Pro Gly
 130 135 140
 Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Asp Lys Gly Glu Gln Gly Asp
 145 150 155 160

20

30

40

Gln Gly Pro Arg Met Val Phe Pro Lys Ile Asn His Gly Phe Leu Ser	
165	170
Ala Asp Gln Gln Leu Ile Lys Arg Arg Leu Ile Lys Gly Asp Gln Gly	
180	185
Gln Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Pro	
195	200
Pro Gly Asp Thr Gly Lys Asp Gly Pro Arg Gly Met Pro Gly Val Pro	10
210	215
Gly Glu Pro Gly Lys Pro Gly Glu Gln Gly Leu Met Gly Pro Leu Gly	
225	230
Pro Pro Gly Gln Lys Gly Ser Ile Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Met	
245	250
Asp Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Ser Pro Gly Ala Ala Gly Gln Ser	20
260	265
Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Lys Glu Gly Glu Lys Gly	
275	280
Asp Ala Gly Glu Asn Gly Pro Lys Gly Asp Thr Gly Glu Lys Gly Asp	
290	295
Pro Gly Ser Ser Ala Ala Gly Ile Lys Gly Glu Pro Gly Glu Ser Gly	
305	310
Arg Pro Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Leu	30
325	330
Pro Gly Ile Lys Gly Glu Pro Gly Phe Ile Gly Pro Gln Gly Glu Pro	
340	345
Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Thr Lys Gly Asp Arg Gly Glu Ala Gly	
355	360
Pro Pro Gly Arg Gly Glu Arg Gly Asp Pro Gly Ala Pro Gly Pro Lys	40
370	375
Gly Lys Gln Gly Glu Ser Gly Ala Arg Gly Pro Lys Gly Ser Lys Gly	
	380

385	390	395	400	
Asp Arg Gly Asp Lys Gly Asp Ser Gly Ala Leu Gly Pro Arg Gly Pro				
	405	410	415	
Pro Gly Gln Lys Gly Asp Pro Gly Ala Thr Glu Ile Ile Asp Tyr Asn				
	420	425	430	
Gly Asn Leu His Glu Ala Leu Gln Arg Ile Thr Thr Leu Thr Val Thr				
	435	440	445	10
Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu Gln Gly Pro Lys Gly				
	450	455	460	
Glu Gln Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly Val Asp Gly Glu Gln Gly Leu				
465	470	475	480	
Lys Gly Ser Lys Gly Asp Met Gly Asp Pro Gly Val Pro Gly Glu Lys				
	485	490	495	20
Gly Gly Leu Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Ala Asn Gly Val Lys Gly				
	500	505	510	
Glu Lys Gly Asp Thr Gly Leu Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ser Ile Ile				
	515	520	525	
Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro His Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly				
	530	535	540	
Pro His Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Ala Ser Gly Leu Asp Gly Lys				30
545	550	555	560	
Pro Gly Ser Arg Gly Ala Asp Gly Pro Ile Gly Pro His Gly Pro Ala				
	565	570	575	
Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Glu Lys Gly Ala Met Gly Glu Pro Gly				
	580	585	590	
Pro Arg Gly Pro Tyr Gly Leu Pro Gly Lys Asp Gly Glu Pro Gly Leu				40
	595	600	605	
Asp Gly Phe Pro Gly Pro Arg Gly Glu Lys Gly Asp Leu Gly Glu Lys				
	610	615	620	

Gly Glu Lys Gly Phe Arg Gly Val Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly

625 630 635 640

Gln Pro Gly Leu Asp Gly Leu Asp Ala Pro Cys Gln Leu Gly Pro Asp

645 650 655

Gly Leu Pro Met Pro Gly Cys Trp Gln Lys

660 665

10

<210> 50

<211> 245

<212> DNA

<213> mouse

<400> 50

20

acagagaatt accaccttaa ctgtcacggg cccccctgga cctcctggac ctcaaggact 60
acaagggccca aagggtgagc aaggctctcc aggaatcccc ggagttgatg gagaacaggg 120
actcaaaggc tccaaggag acatggggga cccaggtgtg ccaggtgaaa aaggaggact 180
gggacttcct ggattgccgg gtgccaatgg agtaaaagga gagaaaggag acacoggttt 240
gccag 245

<210> 51

30

<211> 73

<212> DNA

<213> mouse

<400> 51

agaaatccta cgaatatatg gctaaaataa gaacggtcag ggaggcacct ttagagtgc 60
actgccagc agg 73

40

<210> 52

<211> 502

<212> DNA

<213> mouse

<400> 52

```

actgcccagc aggtcctcca gggaaacgag ggaagagagg ccgaagagga gaatctggtc 60
ctcctgggtca gcctgggtcct cagggccctc ctggtcctaaa aggtgataag ggagaacaag 120
gtgatcaggg acctcggtatg gtgtttccta aaatcaatca cggctttctc tctgctgac 180
agcagctcat taaacgccgg ctgattaagg gtgaccaagg acaggcaggg cctccaggac 240
ctccaggccc tcctgggtcca agaggccccc ctggggacac aggaaaggac ggcccccgag 300
gaatgccagg agtacctggg gaaccaggaa aaccaggaga acaaggcttg atgggacctc 360
tggggcctcc aggacaaaag ggttcattg gagcacctgg gaccccaggc atggatgggc 420
aaaagggtga gcctggatca cctggagcag ccgggcagag tggactacca ggacctagg 480
gagaacctgg aaaagaagga ga 502

```

<210> 53

<211> 495

<212> DNA

<213> mouse

<400> 53

```

aaaagggtga ccctggatca tctgctgcag gaattaaggg agaacctgga gaatctggcc 60
gcccggggca gaagggtgaa ccagggtctc ctgggtctgc tggacttcg ggaataaagg 120
gagaaccagg cttcattggt cctcaaggag aaccagggtt accagggcta ccaggaacaa 180
aagtgatcg tggggaggcg gggcctcctg gaagaggtga acgaggagat cctggagccc 240
cggggccaaa ggggaagcaa ggtgaatcag gagctagagg cccgaagggg tcaaagggtg 300
atcgtggaga caaaggagac tctggcgctc tgggaccacg ggttcacct ggacaaaagg 360
gggatccagg agccacagag atcatagact acaatggcaa cctccatgag gccttacaga 420
gaattaccac cttaactgtc acgggcccc ctggacctcc tggacctcaa ggactacaag 480

```

ggccaaaggg tgagc

495

<210> 54

<211> 572

<212> DNA

<213> mouse

10

<400> 54

cccggcgcca cacagtcccc ggccggaggg tgcttttcac tcctagctgg aaggggagaa 60
agaatctgga ggacggtcgg tccacgcctg ctgatccgga cgcgagcca cgcgcaggtc 120
catctetaag ccggggctcc gactctacca actagttgtg cagccgcagg gactgaactt 180
tggaggaacc gacccttctt ctcatctaa gattactgga ggagatagaa ggtggaaggc 240
gtagcggagg ccagcgaccc cgccacaatg ttggatgaaga agcttgcagg gaaaggaggg 300
ggacgagagt ctggatcaga agatccgcgc cccttgggac agcgttgtgc cggcaccatg 360
ccctcgtgca cgcccttggc gaccctcttg tcagtgggtg ctgtggcttt ctgtttttat 420
cttggggtga aaaccaacga cctccaggcg aggattgttg ctcttgaatc tgctaaaggg 480
accccttctt tccatccgct gcttgacacc gtggatgagc tgaaggcaat ggttcaggag 540
aaagtggagc gtctcttggc tcagaaatcc ta 572

20

<210> 55

30

<211> 427

<212> DNA

<213> mouse

<400> 55

gtcctcaggg gccttctatc ataggeccac caggccctcc aggtcccat ggccacctg 60
gtcccatggg gcccatgga ctctctggac caaagggagc atctggctta gacggaaagc 120
caggatcccg gggtgcagat ggtcctatag gacccacgg ccctgcagga cccaaaggag 180
aaagaggaga gaaaggagct atgggagagc ctggaccagc agggccctat gggctgcctg 240

40

gcaaagatgg agaacctggt cttgatggct tccctgggtcc tcgaggcgag aagggtgacc 300
tgggagaaaa gggagaaaag ggattccgtg gcgttaaggg ggaaaagggg gagccaggcc 360
agcctggcct ggatgggctg galgctcctt gccaatggg acctgatggg ttacctatgc 420
ctggctg 427

<210> 56

<211> 47

10

<212> DNA

<213> mouse

<400> 56

gctgctggca aaagtgatga atctaacctt ccgagcatga agttgtg 47

【図面の簡単な説明】

20

図1 Aおよび図1 B C L A C - P の c D N A の塩基配列および対応推定アミノ酸配列を示す図である。

図2 C L A C - P を発現した H E K 2 9 3 細胞の 9 D 2 免疫染色像（左パネル A）ならびに C L A C - P を発現した H E K 2 9 3 細胞膜画分のウェスタンブロット（右パネル B）である。

図3 マウス C L A C - P の c D N A の塩基配列を示す図である。

図4 マウス C L A C - P の推定アミノ酸配列を示す図である。

【図 1 A】

図 1 A

CGCGGACTTGGGCTTGGGAGTAGCATTGGTCTCTGGGTTATTTCGTTTCTCTCTCTC 60
TTCTGCACCTTAGTGGCCCTTTGGCGTGGCGGTAGCGTCTCTCAGAGCCTTTTGG 120
CTTGAGCTGAATCAGGTGGGAAACAGCTGGCGTCCGAAAGACACCGATAGCTAGAA 180
ATAAGCAAACTCAGAGGCGCAACAGCTCCGCTCTCTGGCGAGGCGCAAGCGGG 240
CCCGCGCTGGCGCTCGGCGTGGCTCGGACCTCGAGCGCTGAGCGGCGCACTGTTGGGCGCTCG 300
AAAGAGGTGCTGGCTCTCGGAGTGGGAGAGTGTCTGGTGGGTTTGTCTTGGCTT 360
TTACCCACCGCCACCGAGTCCCGCGGAGGAGGTCTTTTCACTTCCAGTGGGAGAG 420
AGAAGAAAGCGGGATGGTGCACGCTCGGGGTCTGGACGCTGAGCAAGCGAGGGGATTA 480
TTTGGGTGTAGAGGTGGGAAGCGAAGCGGAGCGGCGACCGCGCACGATGCTGCTG 540
M L L
AAGAAGCAGCAGGGAAGAGGAGGCGGGAGCGGAGATCCGAGGACCGGACCGCTGCC 600
K K H A G K G G G R E P R S E D P T P A
GAACAGCATTGTTCCGAGACCATGGCGGTGTGGCTCTGGCGGCGCTCTGTCAGTG 660
E Q H C S R T M P P C A V L A A L L S V
GTGGCGGTGGTGTCTGCTGATGCTGGTGTGAAAACACGAGCTCCAGCGGAGGATC 720
V A V V S C L Y L S V K T N D L Q A R I
GCCGCTCTGGAATCGGCAAGGCGCGCTCAATCTGCTGGCTGATACCGTGAT 780
A A L E S A K G A P S I H L L P D T L D
CACCTCAAGACTATGGTCAAGAGAAAGTGGAGCGACTTCTGGCTCAGAAATCCTATGAA 840
H L K T M V Q E K V E R L L A Q K S Y E
CATATGGCTAAATAGAAATCGAAGAGAACCTTCAGAAATGAATCGCCAGCAGCG 900
H M A K I R I A R E A P S E C N C P A G
CCTCCAGGGAACGAGGTAAGAGGCGGCAAGAGGAGATCTGGTCTCTCTGAGAGCT 960
P P G K R G K R G R R G E S G P P G Q P
CGTCTCTCAGCGCCCTCTGGTGTCAAAAGGCGATAAGGAGAACAGGTGATCAGGAGCT 1020
G P Q G P P G P K G D K G E Q G D Q G P
AGGATGGTGTTCCTAAATCAATCATGGTTCCTCTGCTGATCAGAGCTGATTA 1080
R M V F P K I N H G F L S A D Q Q L I K
CGCGGCTGATTAGGCTACCAAGGACAGGCGCTCGAGCGCCCTGGCGCTCA 1140
R R L I K G D Q G Q P G P P G P P G P
GGCCCAAGAGGCGCCACCTGGGACACAGGGAATGGCGCCCTGGAATGCCAGGAGTA 1200
G P R G P P G D T G K D G P R G M P G V
CCCGTGAACAGGAAAGCCAGAGAACAGGCTTATGGTCTCTAGGCGCTCCGGGA 1260
P G E P G K P G E Q G L M G P L G P P G
CAAAAGGGTTCTATTGGACACCTGGAATCCAGGATGAATGGCAAAAGGCTGAGGCC 1320
Q K G S I G A P G I P G M N G Q K G E P
GGGTGCTCGAGCAGTAGGACAGATGGAATCAGGACCTAAGGAGAACCTGGAGAA 1380
G L P G A G Q N G I P G P K G E P G E
CAAGGTGAAGGAGACGCTGGAGAGACCGCCCAAGGCTGACACAGCGCAAAAGGT 1440
Q G E K G D A G E N G P K G D T G E K G
GACCTGGATCATCTGCTGAGGAAATAGGAGAACCTGGGAACTCTGCTGCTCAGGG 1500
D P G S S A A G I K G E P G E S G R P G

【図 1 B】

図 1 B

CAAAAGGGTGAACAGGGCTTCTGGGCTTCTGGACTTCCGGGATAAAGGGAGAACCA 1560
Q K G E P G L P G L P G L P G I K G E P
GGTTTCATTGGTCTCAAGGAGAACAGGCTTACCAGGTTTACCGAGAACAAAGGTGAA 1620
G F I G P Q G E P G L P G L P G T K G E
CGGGGGAGGAGGAGGCGCTCTGGAAGAGGTGAGGAGGGGAACTGGAGCCCGGAGCA 1680
R G E A G P P G R G E R G E P G A P G P
AAGGGGAACAAGGTGAATCAGGAAGTACAGGCGCAAGGGGTCAAAGGGGATCGTGA 1740
K G K Q G E S G T R G P K G S K G D R G
GAAAAAGGGACTTGGAGCTCAGGACCAAGGGGTCCACCTGGTCAAAAAGGGATCAA 1800
E K G D S G A Q G P R G P P G Q K G D Q
GGAGCCACTAAGATCATAGACTACAAAGGCAACCTCCAGGAAGCTTACAGAGATTACC 1860
G A T K I I D Y N G N L H E A L Q R I T
ACCTTAACTGTACGGGTCCCGCTGGACCTCTGGACCTCAAGGACTACAAGGGCAAG 1920
T L T V T G P P G P P G P Q G L Q G P K
GGAGGACAGGATCTCAGGAATCCAGGAATGATGAGAGAGGAGTCAAGGCTCA 1980
G E Q G S P G I P G M D G E Q G L K G S
AAGGAGACATGGGGACCCAGGTATGACAGGTGAAAAGGAGGATTTGGACTTCTGGA 2040
K G D M G D P G M T G E K G G I G L P G
TTACCGGAGCCAATGGAATGAAGGAGAAAAGGAGATTCTGGAATGCCGGTCCACAG 2100
L P G A N G M K G E K G D S C M P G P Q
GGTCTTCTATCATAGGCGCACAGGCGCACAGTCCCATGGCCACCTGGCGCCATG 2160
G P S I I G P P G P P G P H G P G P M
GGACCTCATGACTTCTGGACCAAGGGTACAGATGCTTATGGAGCCCATGGCCCT 2220
G P H G L P G P K G T D G P M G P H G P
GAGGTCCCAAGGAGAAAGGTGAAAAGGAGGTGGGAGAGCTGGACCAAGG 2280
A G P K G E R G E K G A M G E P G P R G
CCCTATGGGCTGCTCGGAAGATCGAGGCTTGGTCTTATGCTTCCCTGGTGCACGG 2340
P Y G L P G K D G E P G L D G F P G P R
GGTGAGAAGGTGATCTAGGAGAAAAGGAGAAAAGGCTTCCGTTGCTTAAAGGGGAG 2400
G E K G D L G E K G E K G F R G V K G E
AAAGGGAGGAGGAGGCTGGCTGGATGGCTGGATGCCCTTGGCAATTGGGCGCA 2460
K G E P G Q P G L D G L D A P C Q L G P
GATGGCTTACCATGCTGGCTTGGGAAAGTATGATGATCTAACCTTTCAGAGTAA 2520
D G L P M P G C W Q K *
GTTGTGTATATAAGGCTCAATTTTAAATATTATAGTTGAAAACCTGAATTCGAGATTTTA 2580
CAAGTCTGAGATATGTTTACATAGGGC 2607

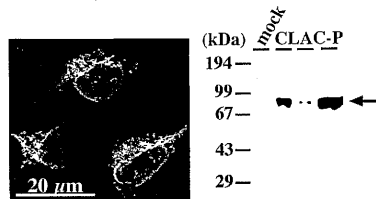
— Kozak 配列

□ オルタナティブプライシングを受けると予想される配列

【図 2】

図 2

CLAC-P を恒常的に発現した HEK293 細胞



HEK293細胞に恒常発現したCLAC-P

A CLAC-Pを発現したHEK293細胞の免疫染色像

B CLAC-Pを発現したHEK293細胞膜画分のウェスタンプロット

【図 3】

図 3

配列番号: 4 8

CCCCGGCCACACAGTCCCCGGCGGAGGGTGTCTTTTCACTCCTAGCTGGAAGGGGAGA 1
AAGAATCTGGAGGACGGTCCGTCCACGCTGCTGATCCGGACGCGGAGCCACGCGCAGG 2
TCCATCTCTAAGCCCGGGCTCCGACTCTACCAACTAGTGTGACGCCGACGGGACTGAA 3
CTTTGGAGGAACCGACCTTCTCTCTATTCTAAGATTACTGGAGGAGATAGAAGGTGGA 4
AGGCGTAGCGGAGGCGGACGACCCCGCCACAATTTGGTGAAGAAGCTTGCAGGGGAAAG 5
GAGGGGACGAGAGTCTGGATCAGAGATCCGCGCCCTTGGGACAGCGTTGTGCCCGG 6
ACCATGGCTCCGTGACGCGCCCTGGCGACCTCTTGTAGTGGTGTGCTGGTGGCTTTCTG 7
TTTTTATCTTTGGGTGAAAACCAACGACCTCCAGGCGAGGATTGTGCTCTTGAATCTG 8
CTAAGGGGACCCCTTCTTCCATCCGCTGTCTGACACCGTGGATGAGCTGAAGGCAATG 9
GTTTCAGGAGAAAGTGGAGCTCTCTTGGCTCAGAAATCTACGAATATATGGCTAAAT 10
AAGAACGCTCAGGAGGCGACCTTTAGAGTGCAACTGCCAGCAGGTCTCCAGGGGAAC 11
GAGGGAAGAGAGGCGGAAGAGGAGAAATCTGGTCCCTCTGGTCAGGCTGGTCTCAGGGC 12
CTCTCTGGTCCAAAAGGTGATAAGGGAGAACAGGTGATCAGGACCTCGGATGGTGT 13
TCTTAAATCAATCAGGCTTCTCTCTGCTGATCAGCAGCTCATTAACGCGCGGTGA 14
TTAAGGTTGACCAAGGACAGGCGGCTCCAGGACCTCCAGGCTCTCTGTGCTCAGAA 15
GGCCACCTGGGACACAGGAAGGAGGACGCGCCCGAGGAATGCCAGGAGTACCTGGTGA 16
ACCAAGGAAACAGGAGAAACAGGCTTGTAGGAGCTCTGGGCTCCAGGACCAAGAGG 17
GTTCCATTGGAGCAGCTGGGACCCAGGCAATGGATGGGCAAAAGGTGAGCTGGATCA 18
CTTGAGCAGCGGGCAGAGTGGACTACCAAGGACCTAAGGAGAACCTGGAAAAGAGG 19
AGAAAAGGAGATGCTGGAGAAAATGGTCCCAAGGTGATACAGGAGAAAAGGTCACCT 20
CTGGATCATCTGCTGAGGAATTAAGGAGAACCTGGAGAAATCTGGCCCGCCGGGCGAG 21
AAGGGTGAACAGGCTGCTGGGCTGCTGACTTCCGGGAATAAAGGAGAACAGG 22
GTTTCAGGAGACATGGGAGGACAGGCTGTCAGGTTGAAAAGGAGGACTGGGACT 23
CTTGATTGCGGGTCCCAAGGAGAACAGGTTTACAGGGCTACCAAGAACAAAGGTGATC 24
GTGGGAGGCGGGGCTCTTGAAGAGGTGAACAGGAGATCTTGGAGCCCGGGGCCA 25
AAGGGGAAGCAAGGTGAATCAGGAGCTAGAGGCGCGAAGGGTCAAGGGTGATCTGG 26
AGACAAGGAGACTCTGGCGCTCTGGGACACGCGGCTCCACTGGACAAAAGGGGATC 27
CAGGAGCCACAGAGATCATAGACTACATGGCACTCCATGAGGCTTACAGAGAAAT 28
ACCACCTTAAGTGTACGGGCCCCCTGGACCTCTGGACCTCAAGGACTACAGGGGCC 29
AAAGGGTGAGCAAGGCTCTCAGGAATCCCGGAGTTGATGGAGAACAGGACTCAAG 30
GCTCCAGGGAGACATGGGAGGACAGGCTGTCAGGTTGAAAAGGAGGACTGGGACT 31
CTGTGATTGCGGGTCCCAAGTGAAGTAAAGGAGAGAAAGGAGACACCGTTTGGCAGG 32
TCCTCAGGGGCTTCTATCATAGGCCCCAGGCGCTCCAGGTCCCCATGGCCACCTG 33
GTCCATGGGGCCCCATGGACTTCTGGACCAAAAGGAGCATCTGGCTTAGCGGAAAG 34
CCAGGATCCCGGGTGCAGATGGTCTTATAGGACCCACGCGCTGCAGGACCCAAAG 35
AGAAAGGAGAGAAAGAGCTATGGAGAGCTGGACCCAGAGGGGCTTATGGGCTGC 36
CTGGCAAAGATGGAGAACCTGGTCTTGTAGTGGCTTCCCTGGTCTCGAGGCGAGAGGG 37
GACCTGGGAGAAAAGGAGAGAAAGGATTCCTGGCGTTAAGGGGAAAAGGGGAGCC 38
AGGCCAGCTGGCTGGATGGGCTGGATGCTCTTGCCTTGGCAATTGGGAGCTGATGGGTTAC 39
CTATGCTGGCTGCTGGCAAAAGTATGAATCTAACCTTCCAGCATGAAGTTGTG 40

【図 4】

図 4

配列番号：49

MLVKKLAGKGGGREGSGEDPRPLGQRCAGTMPSCALATLLSVVAVAFCFYLGVKTNL
LQARIVALESAGTSPSFHPLSDTVDELKAMVQEKVERLLAQKSYEMAKIRTVREAPL
ECNCPAGPPGKRGRGRGESGPPGQPGPQGPFGPKGDKGEQDQGPRMVFPKINHGF
LSADQQLIKRRLIKGDQGAAGPPGPPGPGPRGPPGDTGKDGPRGMPGVPGEPGKPGE
QGLMGPLGPPGQKGSIGAPGTFGMDGQKGEFGSPGAAGQSGLPGPKEFGKEGEGKDA
GENGPKGDTGEKDPGSSAAGIKGEPGESGRPGQKGEPGLPGLPGLPGIKKEPGFIGP
QGEFGLPGLPGTKGDRGEAGPPGRGERGDPGAPGPKKGQGESGARGPKGSKGDRGDKG
DSGALGPRGPPGQKGDPGATEIIDIYNGNLHEALQRITTLTVTGPPGPPGQGLQGPKG
EQGSPGIPGVDGEQGLKGSKGMGDPGVFGEKGGGLPGLPGANGVKGEKDTGLPGP
QGPSIIGPPGPPGPHGPPGPMGPHGLPGFKGASGLDGKPSRGADGPIGPHGPAGFKG
ERGEKGAMGEPGPRGPYGLPGKDGEPLDGFPGPRGEKGLGEKGEKGFGRGVKGEKGE
PGQFGLDGLDAPCQLGPDGLPMPGCWQK

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 0 7 K</i>	<i>1/22</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 1/22
<i>C 0 7 K</i>	<i>14/705</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 14/705
<i>C 0 7 K</i>	<i>14/78</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 14/78
<i>C 0 7 K</i>	<i>16/18</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 16/18
<i>C 0 7 K</i>	<i>16/28</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 16/28
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/15</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 1/15
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/19</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 1/19
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 1/21
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i> 21/02 C
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/15</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> 33/15 Z
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/50</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> 33/50 Z
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> 33/53 D
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/577</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> 33/577 B
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i> 21/08

- (74)代理人 100084146
弁理士 山崎 宏
- (74)代理人 100116311
弁理士 元山 忠行
- (74)代理人 100122301
弁理士 富田 憲史
- (72)発明者 岩坪 威
東京都文京区本駒込4丁目39-2-401
- (72)発明者 橋本 唯史
東京都文京区白山1丁目22-9-402
- (72)発明者 永井 康雄
大阪府箕面市新稲1丁目11-29

審査官 左海 匡子

- (56)参考文献 J Neurosci. 1998 May 1;18(9):3261-72.
J Biol Chem. 1992 Jul 25;267(21):14998-5004
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 May 13;94(10):5296-301

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
- C12N 15/00-90
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
Science Direct
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)
JST7580(JDreamII)
医学・薬学予稿集全文データベース
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq