

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第4271735号
(P4271735)

(45) 発行日 平成21年6月3日(2009.6.3)

(24) 登録日 平成21年3月6日(2009.3.6)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 25 (全 85 頁)

(21) 出願番号	特願平10-543635	(73) 特許権者	メルク アンド カンパニー, インコーポ レイティド
(86) (22) 出願日	平成10年4月15日(1998.4.15)		アメリカ合衆国, ニュージャージー 08 889-0100, ホワイトハウス ステ ーション, ビー. オー. ボックス 100 , ワン メルク ドライブ
(65) 公表番号	特表2002-501376(P2002-501376A)		
(43) 公表日	平成14年1月15日(2002.1.15)	(74) 代理人	弁理士 青木 篤
(86) 国際出願番号	PCT/GB1998/001102		
(87) 国際公開番号	W01998/046743	(74) 代理人	弁理士 石田 敬
(87) 国際公開日	平成10年10月22日(1998.10.22)		
審査請求日	平成17年4月8日(2005.4.8)	(74) 代理人	弁理士 福本 積
(31) 優先権主張番号	60/043,553		
(32) 優先日	平成9年4月15日(1997.4.15)	(74) 代理人	弁理士 古賀 哲次
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/048,740		
(32) 優先日	平成9年6月5日(1997.6.5)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規のLDL-レセプター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEQ ID NO: 4 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子。

【請求項2】

前記ポリペプチドがSEQ ID NO: 3 に示すアミノ酸配列を含む、請求項1記載の核酸分子。

【請求項3】

前記コード配列がSEQ ID NO: 1 に示すものである、請求項2記載の核酸分子。

【請求項4】

SEQ ID NO: 4 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし、0.25M Na₂HPO₄、pH7.2、6 .5%SDS、10%デキストランスルフェート中、65、一夜のハイブリダイゼーション及び0 .1×SSC、0.1%SDS中、60での洗浄を含んで成るストリンジェント条件下で請求項3記載の核酸とハイブリダイズする単離された核酸分子。

【請求項5】

前記ポリペプチドがSEQ ID NO:25、SEQ ID NO:29及びSEQ ID NO:42に示すものから選ばれるポリペプチドのアミノ酸配列を含む、請求項1又は2記載の核酸分子。

【請求項6】

SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33及びSEQ ID NO:41に示すヌクレオチド配列から選ばれるコード配列を含む、請求項5記載の核酸分子。

【請求項7】

前記コード配列が、SEQ ID NO:23に示す配列を有する分子内に含まれるSEQ ID NO:24に示

すものである、請求項 6 記載の核酸分子。

【請求項 8】

SEQ ID NO: 4 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項 9】

SEQ ID NO: 3 に示すアミノ酸配列を含む請求項 8 記載のポリペプチド。

【請求項 10】

前記ポリペプチドが SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 29 及び SEQ ID NO: 42 に示すものから選ばれるポリペプチドのアミノ酸配列を含む、請求項 8 又は 9 記載のポリペプチド。

【請求項 11】

SYFHLFPPPPSPCTDSS (SEQ ID NO: 403) ,
VDGRQNIKRAKDDGT (SEQ ID NO: 404) ,
EVLFTTGLIRPVALVVDN (SEQ ID NO: 405) 及び
IQGHLDVFMDILVFHS (SEQ ID NO: 406)

から選ばれるアミノ酸配列を有する請求項 9 又は 10 記載のポリペプチドのフラグメント。

【請求項 12】

SEQ ID NO: 3 に示すアミノ酸配列のアミノ酸残基 25 ~ 1385 の LRP5 細胞外ドメインのアミノ酸配列を含む、請求項 9 又は 10 記載のポリペプチドのフラグメント。

【請求項 13】

SEQ ID NO: 3 に示すアミノ酸配列のアミノ酸残基 1409 ~ 1615 の LRP5 細胞質ドメインを含む、請求項 9 又は 10 記載のポリペプチドのフラグメント。

【請求項 14】

請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの製造方法であって、それをコードする核酸からの当該ポリペプチドの発現を含む組換え方法。

【請求項 15】

前記ポリペプチドの単離及び / 又は精製を更に含む、請求項 14 記載の組換え方法。

【請求項 16】

前記ポリペプチドを少なくとも一種の追加成分を含む組成物へと処方することを更に含む、請求項 14 又は 15 記載の組換え方法。

【請求項 17】

請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項記載のポリペプチド及び薬理学的に許容される賦形剤を含む組成物。

【請求項 18】

請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項記載のフラグメントの製造方法であって、それをコードする核酸からの当該フラグメントの発現を含む方法。

【請求項 19】

前記ポリペプチドの単離及び / 又は精製を更に含む、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

前記ポリペプチドを少なくとも一種の追加の成分を含む組成物に処方することを更に含む、請求項 18 又は 19 記載の方法。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の核酸分子と薬理学的に許容される賦形剤とを含む組成物。

【請求項 22】

請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項記載のポリペプチドに特異的な抗体。

【請求項 23】

SYFHLFPPPPSPCTDSS (SEQ ID NO: 403) ,
VDGRQNIKRAKDDGT (SEQ ID NO: 404) ,
EVLFTTGLIRPVALVVDN (SEQ ID NO: 405) 及び
IQGHLDVFMDILVFHS (SEQ ID NO: 406)

10

20

30

40

50

から選ばれるアミノ酸配列に結合する請求項22記載の抗体。

【請求項 2 4】

請求項22又は23記載の抗体及び薬理学的に許容される賦形剤を含む組成物。

【請求項 2 5】

LRP5活性のモジュレーターをスクリーニングする方法であって、ここで当該活性は(1)LRP5ポリペプチドのLDL結合及びその取り込み、並びに(2)トリグリセリド及びリポタンパク質レベルのLRP5ポリペプチドの調節からなる群から選ばれ、当該方法は：

- a) SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.403, SEQ ID NO.404, SEQ ID NO.405又はSEQ ID NO.406に示すアミノ酸配列を含んでなる組換えLRP5ポリペプチドを用意し；
- b) 前記LRP5ポリペプチド及び試験物質を接触させ；そして
- c) 前記試験物質により前記LRP5ポリペプチドの活性を試験し；そして
- d) 前記試験物質による前記LRP5ポリペプチドの活性を試験物質抜きでの前記LRP5ポリペプチドの活性と比較し、ここで当該活性の差は前記試験物質がLRP5活性を調節することを示唆する；

工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明はLDL - レセプターファミリーの構成員であることを特徴とし、且つ1型糖尿病としても知られるインスリン依存性真性糖尿病(「IDDM」)に対する感受性に関与するいくつかの対立形質の指標となる遺伝子の同定に関連し、且つそれを基礎とする核酸、ポリペ

プチド、オリゴヌクレオチドプローブおよびプライマー、診断又は予後の方法、並びにその他の方法に関する。
より詳しくは、本発明はここではじめて明らかにされ、且つLDLレセプターファミリーの構成員として同定されたコードポリペプチドの特徴に基づく、本発明者が「LDL - レセプター関連タンパク質 - 5 (LRP5)」と命名した遺伝子のクローニング及び特性決定を基礎とする。更に、LRP5がIDDM感受性遺伝子IDDM 4であるとの示唆を供する実験的証拠を本明細書に含ませる。

発明の背景

グルコースホメオスタシスの調節不全である糖尿病は人口の約6%に影響を及ぼしている。ヨーロッパ系人口の0.4%までに影響を及ぼしている最も深刻な形態、1型糖尿病はインスリン産生性の膵臓の細胞の自己免疫崩壊により発症し、その発症ピーク年齢は12才である。細胞崩壊は不可逆的であり、そして注射によるインスリン代替にかかわらず、患者は早期死亡、腎不全及び盲目を患う(Bach, 1994; Tisch and McDevitt, 1996)。従って、遺伝的研究の主たる狙いは1型糖尿病にかかり易い遺伝子の同定及び病気のメカニズムを理解し、且つ細胞の総合的崩壊及びその病気を予測及び予防するためにこの情報を利用することにある。

1型糖尿病の遺伝の態様は単純なメンデルパターンには従わず、そして感受性ゲノタイプと病気の発症との一致は、一卵性双子の30~70%の一致により示される通り、100%をはるかに下まわる(Matsuda and Kazuya, 1994; Kyvikら、1995)。糖尿病は協奏作用し合ういくつかの遺伝子又はポリジーンにより発症し、そのことは個々の遺伝子の同定及び単離を極めて困難なものとする。

主要IDDM座は染色体6p21上の主要組織適合性複合体(MHC)によりコードされる(IDDM 1)。この遺伝子座での家族性分類度 $s = 2.5$ であり、ここで $s =$ 期待P〔同祖的(IBD)座にあるゼロ対立形質の共有〕/実測P〔ゼロ対立形質IBDの共有〕であり(Risch 1987; Todd, 1994)、そして染色体11p15上の第2座IDDM 2、インスリンミニサテライトでは $s = 1.25$ である(Bellら、1984; Thomsonら、1989; Owerbachら、1990; Julierら、1991; Bainら、1992; Spielmanら、1993; Daviesら、1994; Bennettら、1995)。これらの座は機能的候補としてのその状況に基づき小ケースコントロール連合研究によりまず検出され、それは更なるケースコントロール、連合及び連鎖研究によりその後確認された。

しかしながら、これら2つの座は家族内で観察される全ての病気分類を司ることはできず

10

20

30

40

50

($s = 15$)、それは患者の兄弟の危険率と集団有病率との比(6% / 0.4%)から推定される(Risch, 1990)。我々は、病気遺伝子に連結したマーカーが冒されている兄弟において過剰の対立形質共有同祖性を示すであるという事実を利用し、1型糖尿病に対する感受性を引き起こすその他の遺伝子座の同定を期待して位置決定クローニング戦略を開始した(Penrose, 1953; Risch, 1990; Holmans, 1993)。

96組の英国人兄弟家計における289のマイクロサテライトマーカーを利用する連鎖についての一次ゲノム幅スキャンは更に18の遺伝子座に対する連鎖の証拠を示した(Daviesら、1994)。これらの遺伝子座のうちの2つの連鎖の確認は更に2組の家族群(102組の英国人家族及び84組の米国人家族)、即ち染色体11q13上のIDDM 4 (MLS 1.3, $P = 0.003$, FGF 3)及び染色体6 q上のIDDM 5 (MLS 1.8, ESR)の分析により達成された。IDDM 4において最も有意義な連鎖はHLAにおいて1又は0の対立形質IBDを共有する家族のサブセットにおいて得られた($MLS = 2.8$; $P = 0.001$; $s = 1.2$)(Daviesら、1994)。この連鎖は251組の冒された兄弟を利用し、全ての兄弟において $P = 0.0008$ を得たHashimotoら(1994)によっても観察された。これらの結果を組合せると、596組の家族により、IDDM 4の実体的な裏付けが供された($P = 1.5 \times 10^{-6}$)(Todd and Farrall, 1996, Luoら、1996)。

発明の簡単な説明

本発明ははじめてLDL - レセプターファミリーの新規の構成員をコードする遺伝子をここで開示し、それらを「LRP5」と称する(以前は「LRP - 3」)。更に、遺伝子がIDDM感受性遺伝子座IDDM 4であることを示す証拠、その同定単離が主たる科学的突破である。

ここ10年、集団において比較的稀である単一遺伝子又はモノ遺伝子病に関する多くの遺伝子は家族間内での連鎖分析により位置決めされ、そして遺伝子の同定を可能にするよう十分に小さい領域にまで局在化された。後者のサブ局在化及び微細なマッピングは単一遺伝子の稀な病気において実施でき、なぜなら家族間内での組換は何ら疑いなく最小間隔の境界を規定するからである。対照的に、一般的な病気、例えば糖尿病又はぜん息においては、病的突然変異の存在は常に病気の発症と一致するわけではない：一般的な障害の病気感受性突然変異は病気の発症のおそれを供し、そしてこのおそれは通常100%をはるかに下まわる。従って、一般的な病気における感受性遺伝子を家族間内での組換事象を利用して局在化することは、数万組の家族が遺伝子座の微細なマッピングのために得られない限り、できないものである。このサイズの収集は現実的でないため、研究者は連合マッピングの利用を考え、それはその家族が由来する集団の歴史の際の歴史的組換事象を頼りとする

。連合マッピングは稀な単一遺伝子形質の多数の例において利用され、そして特に遺伝的に隔離された集団、例えばフィンランドにおいて病的突然変異をマッピングするために利用されている。にもかかわらず、連合マッピングは直接的な連鎖マッピングとは根本的に相違し、なぜなら2種類のマーカー又はマーカーと病的突然変異との間での連合度が染色体の物理的距離に比例したとしても、この関係はマーカーの対立形質頻度、集団の歴史及び年齢なら並びに病的遺伝子座にある突然変異の数に依存することを理由に予測できないからである。稀で高度に浸透性な単一遺伝子病にとって、通常、集団の中の一つの始祖染色体が研究の対象とすることで、生存家族間内での標準組換事象により規定できるほどに小さい間隔に位置決めすることが比較的可能となる。一的主要始祖染色体があるモノ遺伝子病におけるこの方法の解像度は確実に2 cM未満であり、そして一定の例においては、その解像度は100kbのDNAにまで下がる(Hastbackaら(1994) Cell 78, 1-20)。

協奏して作用する多数の遺伝子又はポリジーンにより発症する1型糖尿病のような一般的な病気においては、病的対立形質の集団頻度は非常に高く、おそらくは50%を超えることがあり、そして複数の始祖染色体があるようであり、その全てが危険性を供するが、病気の発症を100%確実とするわけではない。連合マッピングは予測できないパラメーターに依存し、そして始祖染色体の数は複数であり、そして一般に一般集団においてよくあるため、ポリジーンを微細にマッピングする作業は現在争点の一つとなっており、そして多くは連鎖及び連合マッピングの併合を用いる系統的な遺伝子アプローチの全ての可能性に疑いを抱いている。最近、Risch and Marakandisが複雑な病気における連合マッピングの可

能性のいくつかの数学的背景を供しているが (Science 273 1516-1517, 1996)、彼らは多数の始祖染色体の効果は考慮に入れていない。

このような不確実性の結果、ゲノタイピングのためには、極端に大規模な数の糖尿病家族を、特定領域に広がる大量のマーカーと共に必要とし、複数のピークを有しうる連鎖不均衡曲線が供される。問題は、どのピークが病因学的突然変異を示しているか、及びどのようにして我々はこれを確立できるかにある。我々の知るところ、図3, 4, 19及び20に示すこの連鎖不均衡及びハプロタイプ連合マップは全ての遺伝子座についての全ての複雑なポリジーン病についての最初のものである。この種の曲線は十分に確立されたIDDM 1 / MHC座についてさえも論文でいまままでに発表されていない。これとの関連で、ここに記載の研究は全体的に新規であり、そしてポリジーン遺伝子学への研究の最先端にある。

10

【図面の簡単な説明】

図1は染色体11q13上のIDDM 4のおよその位置決めを示す。HLA 1 : 0のサブグループにおける最大傾向IBDの多点連鎖マップは150組の家族において共有されている。FGF3及びDIIS 1883での2.3のMLS ($\chi^2 = 1.19$) が得られた (Daviesら (1994) Nature 371 : 130-36)。

図2は染色体11q13上のDIIS987 - ガラニン領域の物理マップを示す。その間隔をpacs, bacs及びコスミドの中にクローニングし、そして各マーカー間の物理距離を決定するために一連の制限酵素を利用して制限マッピングした。

図3はIDDM 4領域での一点連鎖不均衡曲線を示す。1289組の家族をTDTにより分析し、ピークはH0570POLYAにあった : $P = 0.001$ 。x軸 : 物理距離をkbで表示 ; y軸 : TDT χ^2 統計 (tdf)。



20

図4は4集団 (英国、米国、サルジニア及びノルウェー) 由来の1289組の家族による三点回連鎖不均衡曲線を示す。各多形性においての対立形質頻度の変動効果を最小にするため、TDTデータを3つの連なるマーカーにおいて取得し、そして3つの平均として表示する。x軸 : 物理距離をkbで表示 ; y軸 : TDT χ^2 統計。

図5 (a) はLPR5アイソフォーム 1 cDNAのDNA配列を示す (SEQ ID NO:1)。

図5 (b) はLPR5 cDNAの中に存在する最長オープンリーディングフレームのDNA配列を示す (SEQ ID NO:2)。

図5 (c) は図5のオープンリーディングフレームのアミノ酸配列翻訳 (標準の1文字コード) である (SEQ ID NO:3)。

図5 (d) は図5 (b) に含まれているオープンリーディングフレーム (SEQ ID NO:2) によりコードされるLPR5アイソフォーム 1のモチーフ (SEQ ID NO:3) である。記号 : 下線付き残基 1 ~ 24はタンパク質の輸送及び切断のためのシグナルを含み、 はイントロン / エキソン境界の位置を示し、 はレセプターの提案細胞外部分の推定N連結グリコシル化部位を示す。EGF結合モチーフは灰白色で影付けをし、LDL - レセプターリガンドモチーフには濃いめの灰色で影付けをした。スパーサー領域はYWTDモチーフに対して高度な類似性を有する下線付きの4個のアミノ酸により表示する。推定トランスメンブラン横断ドメインには濃い線分で下線付けした。細胞質ドメインにおいて影付けした領域 (1409から最後) はエンドサイトシスに關与しうる。

30

図5 (e) は成熟LPR5タンパク質のアミノ酸配列である (SEQ ID NO:4)。

図5 (f) は上部線分上 (SEQ ID NO:5) のヒトアイソフォーム 1 cDNA配列の5'末端 (図5 (a) (SEQ ID NO:1)) の最初の432個のヌクレオチドのヌクレオチド配列と下部線分上 (SEQ ID NO:6) のマウスLrp5 cDNA配列の5'末端 (図16 (a) (SEQ ID NO:35)) の最初の493個のヌクレオチドとの対比を示す。この対比はGCGアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, Madison, WI) を用いて実施した。

40

図5 (g) はヒトLRP5アイソフォーム 1の最初の550個のアミノ酸 (SEQ ID NO:7) とマウスLrp5の最初の533個のアミノ酸 (SEQ ID NO:8) とのGCGアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, Madison, WI) を利用する対比を示す。

図6 (a) はLRP5モチーフのアミノ酸配列を示す (SEQ ID NO:9~22)。プログラムCross match (ワシントン大学のPhil Green博士から入手) を用いてLRP1の中に存在するモチーフとLRP5アミノ酸配列との対比を行った。各LRP5モチーフについての最良の対合を示す。

50

各モチーフに関し、最上線分はLRP5アイソフォーム 1 アミノ酸配列であり、中央線分は 2 つのモチーフ間で同一なアミノ酸であり、最下線分は最良対合LRP1モチーフのアミノ酸配列である。特に注目すべきなのはEGF - 前駆体及びLDL - レセプターリガンド結合モチーフの双方の目印である保存システイン (c) 残基である (SEQ ID NO:9 ~ 22)。

図 6 (b) はLDL - レセプター及びLRP5のモチーフ構造を示す。LDL - レセプターリガンド結合モチーフは灰白色枠で示し、EGF様モチーフは濃灰色枠で示す。推定トランスメンブランドメインは黒色枠で示す。

図 7 はLRP5遺伝子構造を示す。ゲノムDNAの連続断片のDNA配列は濃い線分で示し、そして表示のスケールに従う。マーカーDIIS1917 (UT5620)、H0570POLYA, L3001CA, DIIS1337 及びDIIS970の位置を表示する。エキソンは小さな黒色枠で示し、その番号又はアルファベット名を下に示し、エキソンのサイズはスケール通りではない。

図 8 は様々なLRP5遺伝子アイソフォームを示す。LRP5遺伝子の択一的にスプライスされた 5' 末端を、択一的にスプライスされた形態各々のアイソフォーム番号と共に表示する。灰白色の矢印は翻訳の開始を示し、それはアイソフォーム 1 ではエキソン 6 にあり、アイソフォーム 3 のエキソン 1 の上流にあることがあり、そしてアイソフォーム 2, 4, 5 及び 6 のエキソン 6 にある。22のコアエキソン (A ~ V) は枠で示す。

図 9 はコンティング57のSNPマップである。多形性はBAC 14 - 1 - 15のDNA配列とコスミド E0 864及びB0 7185との対比により同定した。対応の表 6 は、多形性の部位を含むPCRアンプリコン、単一ヌクレオチド多形性 (SNP) の種類、その位置及び任意的に変更している制限部位を示す。線分は多形性の相対位置及びそれを検出するために用いたアンプリコンと共に連続ゲノムDNAを示す。大きくて細長い三角形は推定エキソン部位を示す。マーカーH0570POLYAを示す。

図10はコンティング58のSNPマップを示す。多形性はBAC 14 - 1 - 15のDNA配列とコスミドB0 7185との対比により同定した。対応の表 6 は多形性部位を含むPCRアンプリコン、単一ヌクレオチド多形性 (SNP) の種類、その位置及び任意的に変更されている制限部位を示す。線分は連続ゲノムDNAを、多形性の相対位置及びそれを検出するために用いたアンプリコンと共に示す。線分の最先端にある大きくて細長い三角形はLRP5のエキソン A を示す。

図11 (a) はアイソフォーム 2 cDNAのDNA配列を示す (SEQ ID NO:23)。

図11 (b) はアイソフォーム 2 の最長オープンリーディングフレームを示す (更にはアイソフォーム 4, 5, 6) (SEQ ID NO:24)。

図11 (c) は図12 (b) のオープンリーディングフレームによりコードされるアイソフォーム 2 のアミノ酸配列を示す (更には、アイソフォーム 4, 5, 6) (SEQ ID NO:25)。

図12 (a) はアイソフォーム 3 cDNAのDNA配列を示す (SEQ ID NO:26)。

図12 (b) はGRAILにより得られた配列及びアイソフォーム 3 の推定伸長部を示す (SEQ ID NO:27)。

図12 (c) はアイソフォーム 3 の推定オープンリーディングフレームを示す (SEQ ID NO:28)。

図12 (d) はアイソフォーム 3 のアミノ酸配列を示す (SEQ ID NO:29)。

図12 (e) はアイソフォーム 3 のGRAIL推定プロモーター配列を示す (SEQ ID NO:30)。

図13はアイソフォーム 2 をコードするオープンリーディングフレーム (図11 (b)) を含むアイソフォーム 4 cDNAのDNA配列を示す (SEQ ID NO:31)。

図14はアイソフォーム 2 をコードするオープンリーディングフレーム (図11 (b)) を含むcDNAアイソフォーム 5 の中に存在するDNA配列を示す (SEQ ID NO:32)。

図15はアイソフォーム 2 をコードするオープンリーディングフレーム (図11 (b)) を含むアイソフォーム 6 のDNA配列を示す (SEQ ID NO:33)。

図15 (b) はアイソフォーム 6 と一体化したGRAIL推定プロモーター配列を示す (SEQ ID NO:34)。

図16 (a) はマウスLrp5 cDNAの一部のDNA配列を示す (SEQ ID NO:35)。

図16 (b) はマウスクロンの 5' 伸長部のDNA配列を示す (SEQ ID NO:36)。

図16 (c) はマウスLrp5のオープンリーディングフレームの一部のDNA配列を示す (SEQ ID NO:37)。

D NO:37)。

図16(d)はマウスLrp5の一部をコードするオープンリーディングフレームのアミノ酸配列を示す(SEQ ID NO:8)。

図17(a)はエキソンA~VのDNA配列を示す(SEQ ID NO:38)。

図17(b)は図17(a)の中に含まれているオープンリーディングフレームによりコードされるアミノ酸配列を示す(SEQ ID NO:39)。

図18(a)は全長マウスLrp5 cDNAのヌクレオチド配列を示す(SEQ ID NO:40)。

図18(b)はマウスLrp5 cDNAの中に存在する最長オープンリーディングフレームについてのヌクレオチド配列を示す(SEQ ID NO:41)。

図18(c)は図18(b)中のオープンリーディングフレームのアミノ酸配列翻訳(1文字コード)を示す(SEQ ID NO:42)。

図18(d)はヒトLRP5タンパク質アミノ酸配列とマウスLrp5タンパク質プログラムとのGC GアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, Madison, WI)を利用するアラインメントを示す(SEQ ID NO:3, 42)。

図18(e)は成熟ヒトLRP5タンパク質のアミノ酸配列と成熟マウスLRP5プログラムとのGC GアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, Madison, WI)を利用するアラインメントを示す(SEQ ID NO:43, 44)。

図19はIDDM 4領域間でのハプロタイプの模式図を示す。3種類のハプロタイプを示す。ハプロタイプAはIDDMに対して防御性であり、一方ハプロタイプB及びCはIDDMに対して感受性/非防御性である。

図20はIDDM 4領域間での単一ヌクレオチド多形性(SNP)ハプロタイプの模式図を示す。ハプロタイプAは防御性であり、一方ハプロタイプB, C, D及びEは感受性/非防御性である。4通りの感受性ハプロタイプについて同祖的(IBD)である25kbの最小領域を示す。SNPの表示、例えば57-3は表6並びに図9及び10に示す。

LRP5遺伝子構造

同定された遺伝子はA~Vと命名する22のエキソンを含み、それは成熟LRP5タンパク質のほとんどをコードする。この22のエキソンはLRP5遺伝子転写体の4961個のヌクレオチドを占め(図5(a))(SEQ ID NO:1)、そして約110kbのゲノムDNAの中に位置する。これらのエキソンを含むゲノムDNAは遺伝子マーカーL3001CAの下流から始まり、そして遺伝子マーカーDIIS1137, 141ca 5及びDIIS970を含む(図7)。LRP5転写体のいくつかの5'末端が同定された。特に注目すべきなのはプラスマ膜を横断するタンパク質輸送のためのシグナルペプチド配列(分泌リーダーペプチド)をコードする5'末端を有するアイソフォーム1である。以下に論ずる通り、LRP5タンパク質は大きな細胞外ドメインを含むようであり、従ってこのタンパク質はシグナル配列を有するものと期待される。エキソン6と称するシグナル配列をコードするエキソンは遺伝子マーカーH0570POYLA付近にある。このエキソンはエキソンAの35kb上流にあり、それ故LRP5遺伝子を含んで成るゲノムDNAを少なくとも160kb伸長する。

5'末満の択一的なスプライシングにより生ずるLRP5遺伝子のいくつかの追加のアイソフォームがPCRにより同定された(図8)。これらの追加のアイソフォームの機能的な関連性は明確でない。これらのLRP5転写体のうちの2つは遺伝子マーカーDIIS1917(UT5620)の上流に位置し、且つLRP5遺伝子を約180kbのゲノムDNAにまで広げるエキソン1を含む。アイソフォーム3と称する転写体はエキソンAへと直接スプライシングされる。リーディングフレームは5'末端で解放となっており、それ故エキソン1の上流のエキソンの中に存在する追加のコード情報について潜在的である。他方、この領域に結合したオープンリーディングフレームの全てを含むようにエキソン1をセントロメア伸長することはアイソフォーム3についてのオープンリーディングフレームを生み出す。

エキソン1を含む第二の転写体はエキソン5も含み、それは遺伝子マーカーH0570POYLA付近に位置する。このアイソフォーム、アイソフォーム2についてのオープンリーディングフレームはエキソン13で始まり、それ故最初の100個のアミノ酸における任意の推定分泌リーダーペプチドを欠くトランケーションLRP5タンパク質をコードする。3つの更なる転

10

20

30

40

50

写体があり、各々はエキソンBで始まるオープンリーディングフレームと、遺伝子マーカ-L3001CA付近の5'末端を有する。

LRP5の発現プロフィール

ノーザンブロット分析はLRP5遺伝子の主要mRNA転写体が約5~5.5kbであり、そして肝臓、脾臓、前立腺及び胎盤の中で最も高度に発現されることを示す。発現は骨格筋、腎臓、脾臓、胸腺、卵巣、肺、小腸及び結腸でも検出される。5kbより大きい及び小さいささいなバンドが検出され、そして拮一的なスプライシング事象又は近縁なファミリー構成員を表わしうる。

LRP5はLDL-レセプターファミリーの構成員

IDDM 4 遺伝子座において同定された遺伝子Lrp5はLDL-レセプターファミリーの構成員である。このタンパク質のファミリーはいくつかの異なる特性、リガンド結合に關与するシステインリッチモチーフを含む大きな細胞外ドメイン、単一のトランスメンブラン横断ドメイン及び「NPXY」(SEQ ID NO:45)内在化モチーフを有する(Krieger and Herzog (1994) Ann. Rev. Biochem. 63:601-637)。このファミリーの構成員の機能的な役割はレセプター媒介エンドサイト-シスのメカニズムによるそのリガンドの浄化にある。これはこのファミリーの最も高度に特性決定された構成員LDL-レセプターにより例示され、それは血漿からのLDLコレステロールの浄化を司る(Goldsteinら、(1985) Ann. Rev. Cell Biol. 1:1-39)。

LRP5はアルファ-2-マクログロブリンレセプターとしても知られるLDL-レセプター関連タンパク質(LRP)に最も近縁する。アイソフォーム1のオープンリーディングフレーム(ORF)の翻訳はLRP5タンパク質を生み出す。LRP5タンパク質とヒトLRP1とのアルゴリズムGAP(Genetics Computer Group, Madison, WI)を利用する対比はヒトLRP1タンパク質のアミノ酸1236~2934の領域に対して55%の総合的アミノ酸類似性及び34%の同一性を示した。このORFのDNAはGAPにより示される通り、LRP1コードDNAと45%同一である。若干低いが有意なレベルの類似性が、LRP2及びgp330とも呼ばれるメガリンレセプター(Saitoら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:9725-9729)並びにドロソフィラ・ビテロゲニン(Drosophilla vitellogenin)レセプター(Schonbaumら(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92:1485-1489)との間でも認められる。類似性は、LDL-レセプター(Suedhofら、(1985) Science 228:815-822)及びVLDLレセプター(Okaら(1994) Genomics 20:298-300)等のLDL-レセプターファミリーのその他の構成員との間でも観察される。LRP5におけるEGF様モチーフの存在に基づき、類似性はLDL-レセプターファミリーの構成員ではないEGF前駆体及びニドゲン前駆体との間でも観察される。

LRP5の特性及びモチーフ

LRP5のN末端部分はシグナル配列切断部位についての潜在性を有するようである。シグナル配列はプラスマ膜を横断輸送されるタンパク質において往々にして見い出せる(von Heijne (1994) Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23:167-192)。更に、LDL-レセプターファミリーのその他の構成員はタンパク質輸送のためのシグナル配列を含む。

シグナル配列切断部位の存在はヒトLRP5と我々が得たマウスcDNA配列との対比によりまず同定される。我々が得た1711ヌクレオチドの最初のマウス部分cDNA配列(図16(a)(SEQ ID NO:35))はヒトLRP5 cDNAに対して約1500ヌクレオチド部分にわたり87%同一性であり、それ故ヒトLRP5のマウスオルソログ(Lrp5)のようである。マウスcDNAのこのクロニング部分は533個のアミノ酸をコードするオープンリーディングフレームを含む(図16(c)(SEQ ID NO:37))。開始コドンは-3(プリン)及び+4(Gヌクレオチド)位置の双方において効率的な翻訳のための共通ヌクレオチドを有する(Kozak, M. 1996, Mammalian Genome 7:563-574)。マウスLrp5のこの部分の500個のアミノ酸(図5(g)及び図16(d)(SEQ ID NO:8))はヒトLRP5と96%同一性であり、これがLrp5のマウスオルソログである仮説を更に裏付けする。

有意義なことに、マウスcDNAの最初の200個のヌクレオチドは以下に論ずるアイソフォーム2~6の中に存在する5'伸長部とほとんど類似性がない。対照的に、この配列はアイソフォーム1の5'末端を含んで成るエキソン6のヒト配列と75%同一である。かくして

10

20

30

40

50

、タンパク質輸送のためのシグナルペプチドをコードするアイソフォーム 1 はLRP5の最も生物学的に関連する形態を示す。

重要なことに、ヒトLRP5及びマウスLrp5オープンリーディングフレームの双方はタンパク質輸送のための真核系シグナル配列として作用する潜在能力を有するペプチドをコードする (von Heijne 1994 Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struc. 23:167-192)。GCG分析パッケージ (Genetics Computer Group, Madison WI) 中のSigCleaveプログラムを利用することにより決定されるシグナル配列についての最高点はヒトLRP5の残基25及びマウスLrp5の残基29で始まる成熟ペプチドを構築する (図5 (d) 及び (g))。利用できる更なる部位はアミノ酸残基22, 23, 23, 26, 27, 28, 30又は32で始まるヒトLRP5の成熟ペプチドを供する。マウスLrp5の追加の切断部位はアミノ酸残基31, 32, 33又は38で始まる成熟ペプチドをもたらす (図5 (g) (SEQ ID NO:8))。成熟ヒトLRP5タンパク質は図5 (e) (SEQ ID NO:4) に示す。

LRP5のその他の択一的なアイソフォームはコードタンパク質のN末端付近のシグナル配列を欠いている。これらの追加のアイソフォームの機能的関連性は知られておらず、しかしながらシグナル配列を欠くいくつかの輸送タンパク質があり、そしてシグナルペプチドとは独立のメカニズムにより輸送される (Higgins, C.F. (1992) Ann. Rev. Cell Biol. 8:67-113)。かくして、これらのアイソフォームの推定細胞外ドメインはプラスマ膜を横断移動することが可能である。

LDL - レセプターファミリーの構成員の細胞外ドメインは約40個のアミノ酸領域内に6個のシステイン残基を含む多数のモチーフを含む (Krieger and Herz (1994) Ann. Rec. Biochem. 63:601-637)。このようなシステインリッチモチーフのいくつかのクラスはシステイン残基の間隔及びモチーフ内のその他の保存アミノ酸の種類に基づいて規定される。このLDL - レセプターリガンド結合 (クラスA) モチーフは高度に保存されたSDE配列を含むモチーフのC末端部分の中の酸性残基のクラスターにより区別される。リガンド結合におけるこの酸性残基の重要性は突然変異誘発研究により実証される (Russellら (1989) J. Biol. Chem. 264:21682-21688)。3つのLDL - レセプターリガンド結合モチーフがLRP5タンパク質の中に見い出せる (図6 (a) (SEQ ID NO:9~22))。EGF様 (クラスB) モチーフはLDL - レセプターリガンド結合モチーフの中に存在する酸性残基のクラスターを欠く。更に、システイン残基の間隔は、LDL - レセプターリガンド結合モチーフと比べ、EGF様モチーフ間において相違する。LRP5タンパク質は4つのEGF前駆体 (B. 2) モチーフを含み、それは第一と第二システイン残基との間にNGGCSモチーフの特性を有する (図6 (a) (SEQ ID NO:9~22))。

LDLレセプターファミリーの構成員のサイズ及び細胞外ドメイン内のシステインリッチ反復配列の数は大幅に変動する。LRP1は4544個のアミノ酸の大型タンパク質であり、そして31個のLDL - レセプターリガンド結合モチーフ (クラスA) 及び22のEGF様モチーフ (クラスB) を含む (Herzら、(1988) EMBO 7:4119-4127)。同様にメガリンレセプターLRP2は4660個のアミノ酸のタンパク質であり、そして36のLDL - レセプターリガンド結合モチーフ及び17のEGF様モチーフから成る (Saitoら、(1994) PNAS 91:9725-9729)。対照的に、LDLレセプターは7つのLDL - リガンド結合モチーフ及び3つのEGF様モチーフを含む879個のアミノ酸の比較的小さなタンパク質である。この成熟LRP5タンパク質の推定サイズ1591アミノ酸はLRP1とLDLレセプターとの中間体である。前述の通り、LRP5タンパク質は4つのEGF様モチーフ及び3つのLDL - リガンド結合モチーフを含む。LRP1及びLRP2において極めて顕著な多重モチーフユニットはこれらのタンパク質の多重リボタンパク質及びタンパク質リガンドに結合する能力を担うものと考えられる (Krieger and Herz (1994) Ann. Rec. Biochem. 63:601-637)。

LDL - レセプターリガンド結合及びEGF様モチーフの互いとの配置はLDLレセプターLRP1及びLRP2の双方において類似する。これらのタンパク質の各々において、多重LDL - リガンド結合モチーフを一緒にグループとなり、それに少なくとも一のEGF様モチーフが後続する (Herzら (1988) EMBO 7:4119-4127, 1988)。対照的に、LRP5タンパク質において、EGF様モチーフは3つのLDL - リガンド結合モチーフの群を先行する (図6 (b))。LRP5

10

20

30

40

50

に固有な追加の特性はLRP5におけるLDL - リガンド結合モチーフに推定トランスメンブ
ランドメインが続くことにある。これらのモチーフの異なる配置はLDL - レセプター関連タ
ンパク質ファミリー内の新たなサブファミリーの構成員としてLRP5を規定しうる。
LRP5はタンパク質のN末端においてのタンパク質輸送のためのシグナルペプチドを有する
。シグナルペプチド切断はEGF前駆体スパーサードメインのアミノ酸31 - 297で始まる成熟
LRP5タンパク質を生み出す(アミノ酸残基の番号はLRP5前駆体を基礎とする)。EGF前駆
体スパーサードメインは5つの約50個のアミノ酸の反復配列から成り、それぞれ特徴的な
配列モチーフTyr-Trp-Thr-Asp (YWTD) (SEQ ID NO:46)を含む。アミノ酸339 - 602, 643
- 903及び944 - 1214の3つの追加のスパーサードメインがある。各スパーサードメインに
はアミノ酸297 - 338 (egf1), 603 - 642 (egf2), 904 - 943 (egf3) 及び1215 - 1255 (eg
f4) のEGF反復配列が続く。これらEGF反復配列は6つの保存システイン残基を含み、そし
て特徴としてAsn-Gly-Gly-Cys (NGGC) (SEQ ID NO:47) モチーフを有するB . 2クラス
に入る(Herzら、1988, EMBO J. 7 : 4119-27) (図6 (a) (SEQ ID NO:9~22))。EGF
前駆体スパーサードメイン及びEGF反復配列として規定される単独ユニットはLRP5の中で
4回反復している。最後のEGF反復配列はアミノ酸1257 - 1295 (Idlr1)、1296 - 1333 (I
dlr2) 及び1334 - 1372 (Idlr3) の3つの連続LDLR反復配列に隣接する。このようなLDL
R反復配列は保存システイン残基並びにモチーフSer-Asp-Glu (SDE) を特徴として有する
(図6 (a) (SEQ ID NO:9~22))。LDLR反復配列を1386 - 1408の23個のアミノ酸の推
定トランスメンブラン横断ドメインから隔離する13個のアミノ酸がある。LRP5の推定の細
胞外ドメインはアミノ酸残基93, 138, 446, 499, 705及び878にN連結グリコシル化のため
の6つの潜在部位を有する(図5 (d) (SEQ ID NO:3))。
LRP5の細胞内ドメインは207個のアミノ酸から成り、それはこのファミリーのほとんどの
構成員よりも長い、LRP2とはサイズが似ている(Saitoら(1994)PNAS 91 : 9725-9727
)。それはLDL - レセプターファミリーとの類似性は示さなく、またどのその他の既知の
タンパク質とも似ていない。LRP5のサイトプラズマドメインは16%のプロリン及び15%の
セリン残基から成る(図5 (d) (SEQ ID NO:3))。LDL - レセプターファミリーのほと
んどの構成員は、被覆ピットによるエンドサイト - シスに参与するサイトプラズマドメイ
ン内の保存NPXYモチーフを含む(Chenら(1990)J. Biol. Chem. 265 : 3116-3123)。突
然変異誘発研究はエンドサイト - シス過程の成分による認識のための臨界残基がチロシン
残基であることを示した(Davisら、(1987)Cell 45 : 15-24)。チロシン残基のフェニ
ルアラニン又はトリプトファンによる置換は寛容され、かくしてこの残基についての最小
要件は芳香族アミノ酸であるようである(Davisら(1987)Cell 45 : 15-24)。構造的研
究はNP残基の臨界機能が芳香族残基を供するベーターターンの供与にあることを示唆する
(Bansal and Gierasch (1991) Cell 67 : 1195-1201)。
LRP5のサイトプラズマドメインはNPXYモチーフを含まないが、推定のターン領域に属する
いくつかの芳香族残基がLRP5サイトプラズマドメインの中にあり(図5 (d) (SEQ ID N
O:3))、それ故エンドサイト - シスの促進に参与しうる。特に、配列VPLY (SEQ ID NO:4
8) モチーフの中にあるチロシン1473はプロリン及びチロシンを共通モチーフと比べ適正
な位置において有する。NPXYモチーフはいくつかのタンパク質におけるエンドサイト - シ
スに参与するが、それは絶対的要件ではなく、なぜならNPXYモチーフを欠くタンパク質、
例えばトランスフェリンレセプターの如き被覆ピットによるエンドサイト - シスを受ける
タンパク質が存在するからである(Chenら(1990)J. Biol. Chem. 265 : 3116-3123)。
いずれにせよ、我々はこのタンパク質の一次機能がそのリガンドのレセプター媒介エンド
サイト - シスであると期待する。

LRP5の潜在的役割

LDL - レセプターファミリーの構成員の多重リガンドに結合する能力はLRP5が1又は複数の
リガンドに結合するように機能しうることを示唆する。更に、このファミリーのその他の
構成員と似たようにして、一旦結合すると、LRP5レセプター・リガンド複合体はエンド
サイト - シスされ、細胞外環境からのリガンドの浄化をもたらす。LRP5リガンドの種類は
脂質、タンパク質、タンパク質複合体又はリボタンパク質であってよく、そして様々な機

10

20

30

40

50

能を保有しうる。LDL - レセプターファミリーの最も近縁な構成員LRP1の生理学的機能は未確定であるが、それは多数の生化学的活性を保有する。LRP1はアルファ-2マクログロブリンと結合する。アルファ-2マクログロブリンは様々なプロティナーゼ、例えばトリプシン、キモトリプシン、膵臓エラスターゼ及び血漿カリクレインの「おとり」リガンドを含む血漿複合体である (Jensen (1989) J. Biol. Chem. 266 : 11539-11542)。このプロティナーゼが一旦結合し、そして「おとり」を酵素的に切断すると、アルファ-2マクログロブリンはコンホメーション変化を受け、そしてプロティナーゼを「捕獲」する。プロティナーゼ：アルファ-2マクログロブリン複合体はLRPにより迅速に浄化される。このメカニズムは様々な生物学的機能、例えば抗原プロセッシング及びプロティナーゼ分泌を媒介する潜在能力を有するプロティナーゼを排除する (Stricklandら (1990) J. Biol. Chem. 265 : 17401-17404)。この機能の重要性はLrp1ノックアウトマウスの胎児期死亡により証明される (Zeeら (1994) Genomics 23 : 256-259)。

抗原提示は、病気感受性を供与するMHCハプロタイプの枢軸的役割により証明される通り、IDDMの発症における重要な要素である (Tisch and McDivitt (1996) Cell 85 : 291-297)。LRP1による分析により、LRP5は抗原提示において機能することがあり、この場合この遺伝子内の多形性は1型糖尿病患者の自己免疫性の展開に影響を及ぼしうる。

アルファ-2マクログロブリン複合体はサイトカイン及び成長因子、例えばベータインターロイキン-1、インターロイキン2、インターロイキン6、ベータ形質転換成長因子及び繊維芽細胞成長因子にも結合する (Moestrup and Gliemann (1991) J. Biol. Chem. 266 : 14011-14017)。かくして、アルファ-2マクログロブリンレセプターはサイトカイン及び成長因子の浄化に機能する能力を有する。免疫及び炎症反応を媒介するサイトカインの機能は十分に確立されている。例えば、インターロイキン-2遺伝子は1型糖尿病の動物モデル (Dennyら (1977) Diabetes 46 : 695-700) である非肥満性糖尿病マウスにおけるIdd3遺伝子座の強力な候補遺伝子である。もしLRP5がアルファ-2マクログロブリン又は関連の複合体に結合するならば、それはサイトカイン浄化を媒介することにより免疫応答において機能し得る。例えば、IDDMの標的組織である膵臓の中で発現するLRP5は病気において進行する炎症性浸潤 (インスリン炎) からのサイトカインの浄化において機能しうる。LRP5がサイトカインを浄化する能力を低下させるLRP5における多形性は個体のIDDMを発症する感受性を高める。更に、サイトカインを浄化するLRP5の能力を強める多形性を有する個体はIDDMの発症から保護されうる。逆に、一定のサイトカインはその他のサイトカインと対向し、それ故LRP5による所定の有益なサイトカインの除去は病気感受性を供与し得、その結果LRP5活性を弱める多形性は病気の発症からの予防を供与し得る。

遊離脂肪酸 (FFA) の増加は動物のインスリン分泌を低下させることが示されている (Bodenら (1997) Diabetes 46 : 3-10)。更に、LDL - レセプターのリガンドであるApoEは酸化防止活性に結びつき (Miyata and Smith (1996) Nature Genet. 14 : 55-61)、そして酸化的損傷は1型糖尿病における膵臓細胞崩壊における中心的な病理メカニズムである (Bac (1994) Endocrin. Rev. 15 : 516-542)。かくして、LRP5がApoE及び関連のリポタンパク質に結合する能力の改変は膵臓細胞における酸化的損傷に対する感受性に影響を及ぼしうる。LRP5の形態の - 細胞へのトランスフェクションは自己免疫及び移植における免疫系による損傷に対する細胞の抵抗を助長しうる。

FFAの存在下でのキロミクロン残渣に結合してエンドサイト-シスする脂質分解刺激型レセプター (LSR) と称する薬理因子が発表されている (Mannら (1995) Biochemistry 34 : 10421-10431)。LRP5遺伝子産物の一つの考えられる役割は、それがこの活性を司ることにある。

LRPファミリーのその他の構成員はメガリン及びgp330としても知られるLRP2であり、このタンパク質はラットの腎臓の自己免疫疾患であるHeymann腎臓に關与する (Saitoら (1994) PNAS 91 : 9725-9729)。Heymann腎炎は糸球体腎炎のモデルであり、そしてHeymann腎炎抗原としても知られるアルファ-2マクログロブリンレセプター関連タンパク質に対する自己抗体の展開を特徴とする。Heymann腎炎抗原はLRP2に結合する (Stricklandら (1991) J. Biol. Chem. 266 : 13364-13369)。LRP2はこの病気においてこの病原性タンパク質の浄

10

20

30

40

50

化により機能しうる。似たような状況において、LRP5の機能が、IDDM患者がそれに対する自己抗体を生産した膵臓の中のタンパク質に結合して浄化しうることでありうる。他方、LRP5自体はIDDM患者の自己抗原でありうる。

LRP1は一定の細菌毒素 (Krieger and Herz (1994) *Ann. Rev. Biochem.* 63 : 601-637) 及びヒトリノウイルス (Hoferら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 : 1839-42) にとってのレセプターとして同定されている。ウイルス感染症はIDDMに対する個体の感受性を改変することが可能である (Epstein (1994) *N. Eng. J. Med.* 331 : 1428-1436)。もし所定のウイルスが細胞への侵入の態様としてLRP5を利用するならば、LRP5における多形性は個体の1型糖尿病に対する感受性を改変しうる。

LRP5の改変はその他の病気の病原性に関与しうる。LRP1はリポタンパク質、例えばapoE及びC-アポリポタンパク質に結合する。リポタンパク質、例えばapoE及びapoBのLDLレセプターによる浄化がその主たる役割であり、LDLレセプターの突然変異は高コレステロール血症を招く (Chenら、(1990) *J. Biol. Chem.* 265 : 3116-3123)。従って、当該タンパク質のリポタンパク質を排除する能力を低下させるLRP5の突然変異はコレステロールの高揚をもたらしうる。LRP5の変異は深刻な死因である糖尿病における巨大血管合併症の発症にかかり易くしうる。2型糖尿病において、膵臓病はアミロイドの沈着を特徴とする。アミロイド沈着は膵臓細胞の機能を低下しうる。LRP5は半島アミロイドの代謝において機能でき、そして2型糖尿病及び1型糖尿病に対する感受性に影響を及ぼす。アルツハイマー病におけるApoEの役割はタンパク質、例えばLRP1、そして可能としてはLRP5がこの病気の病原に寄与する潜在能力を有することを示唆する。

骨粗しょう症 - 偽膠腫症候群の発症に関与する遺伝子における多形性はLRP5をコードする遺伝子を含む染色体11の3-cM領域へとマッピングされている (Gongら (1996) *Am. J. Hum. Genet.* 59 : 146-151)。この病気の病理メカニズムはわかっていないが、硝子体網膜における異常血管成長を有する患者の調節機能に関与するものと信じられている。繊維芽細胞増殖因子、即ち脈管形成の媒介因子の浄化におけるLRP5の潜在的機能及びこの遺伝子の染色体位置はそれがこの病気に一役買っているものと示唆しうる。この提唱の機能は糖尿病における網膜障害の発症にも結びつきうる。

LRP5遺伝子における多形性

LRP5遺伝子のエキソンは多形性についてスキャンニングされている。IDDM患者において同定されたLRP5におけるアミノ酸を変化させる複数の多形性がある (表5)。特に注目されるのはCからTの変換であり、それは3つの保存LDLレセプターリガンド結合モチーフの一つにおいてAlaコドンを変化させる。上記の多形性に加えて、CからTへの変換がAsn⁷⁰⁹についてのコドンにて同定され (コードアミノ酸には影響なく)、そして3つの多形性がエキソンに隣接するイントロン配列において同定された。更なるセットの多形性が実験的に誘導されたcDNA配列とゲノムDNA配列との対比により同定された (表5)。このような多形性の一部は、IDDMとのその関連性を決定するため、多数のIDDM患者及びコントロール個体において分析されるであろう。

多数の (約30の) 単一ヌクレオチド多形性 (SNP) が重複BACのゲノムDNA配列及び遺伝子マーカーポリAを囲むコスミドクローンにおいて同定された。このような多形性を含む連続ゲノム配列はコンティング57 (図9) (それはエキソン1及び5を遺伝子マーカーポリA及びDIIS1917 (UT5620) と共に含む) 並びにコンティング58 (図10) (それは遺伝子マーカーL3001ca及びエキソンAの一部を含む) と称する。

追加の実験的証拠

1型糖尿病に関与する同祖的な領域がLRP5遺伝子の5'部分において同定された。SNP及びマイクロサテライトマーカーからのデータを組合せることにより、我々は感受性ハプロタイプにおける同祖的領域を同定し、その最小領域はLRP5の推定調節領域及び第一エキソンを含む25kbから成る。これはLRP5が糖尿病のおそれの遺伝子である遺伝子的証拠を強化する。従って、LRP5に影響を及ぼす治療は1型糖尿病の予防及び治療において有用でありうる。

マウスにおけるLRP5の過剰発現はLRP5がリポタンパク質の代謝に影響を及ぼす証拠を供す

る。LRP5によるトリグリセリドの調節の統計学的に有意な証拠が得られた。かくして、LRP5に影響を及ぼす治療は心臓血管病及び血清トリグリセリドが上昇する症状の処置において有用でありうる。

血清コレステロールが正常値より高いときにLRP5がそれを降下させる示唆的証拠が得られた。LRP5が超低密度リポタンパク質粒子と相互作用し、そして血清中のそのレベルを降下させる能力についての証拠もある。従って、LRP-5に影響を及ぼす治療は心臓血管病及び血清コレステロールが上昇する症状の処置において有用でありうる。

生化学的研究はLRP5が低密度リポタンパク質 (LDL) 粒子の取り込みにおいて機能する能力を有することを示唆する。かくして、LRP5に影響を及ぼす治療はLDLレベルが上昇する心臓血管病の処置において有用でありうる。

10

マウスにおけるLRP5の過剰発現は血清アルカリホスファターゼの低下の統計学的に有意な証拠を供する。血清アルカリホスファターゼの低下はLRP5が免疫反応の調節において機能することを一致する。これはLRP5が1型糖尿病の病原性に関与する証拠を供する。従って、LRP5に影響を及ぼす治療は自己免疫疾患の処置において有用でありうる。

LRP5の細胞局在はそれが特定のサブタイプ、即ちファゴサイト - シスマクロファージ、成熟組織マクロファージにおいて発現されることを示唆する。論文からの証拠はこのクラスのマクロファージが自己免疫疾患に関与することを示唆し、自己免疫疾患及び1型糖尿病におけるLRP5の機能を裏付けする。従って、LRP5に影響を及ぼす治療は自己免疫疾患の処置において有用でありうる。

ヒト及びマウスLRP5の双方についての全長cDNAが得られた。LRP5に対して特異的な抗体が開発された。これらの試薬はLRP5の生物学的機能を更に分析するための手段を供する。LRP5の実際の作用態様並びにIDDM及びその他の病気への関与に関係なく、本明細書に記載の実験研究は本発明の観点及び態様を開示する実際の用途を確立及び裏付けする。

20

本発明の一の観点に従うと、図5(c)(SEQ ID NO:3)、図5(d)(SEQ ID NO:3)又は図5(e)(SEQ ID NO:4)に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する核酸分子を提供する。図5(c)(SEQ ID NO:3)のアミノ酸配列は図5(e)(SEQ ID NO:4)のそれ及びシグナル配列を含む。

このコード配列は図5(a)(SEQ ID NO:1)又は図5(b)(SEQ ID NO:2)に含まれているものであってよく、又は示している配列の突然変異体、変異体、誘導体もしくは対立形質でありうる。この配列は示しているものとは、1又は複数のヌクレオチドの付加、挿入、欠失及び置換のうちの一つ又は複数の変化により相違しうる。ヌクレオチド配列の変更は遺伝子コードによる決定に従い、タンパク質レベルでのアミノ酸変化をもたらさうか、又はもたらさないことがある。

30

かくして、本発明に係る核酸は図5(a)(SEQ ID NO:1)又は図5(b)(SEQ ID NO:2)に示す配列とは異なる配列を含みうるが、同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることがある。図5(c)(SEQ ID NO:3)に示すアミノ酸配列は1615個の残基から成る。

他方、このコードポリペプチドは図5(c)(SEQ ID NO:3)に示すアミノ酸配列とは1又は複数のアミノ酸残基により相違するアミノ酸配列を含んで成りうる。図5(c)(SEQ ID NO:3)に示す配列のアミノ酸配列突然変異体、変異体、誘導体又は対立形質であるポリペプチドをコードする核酸を本発明により更に提供する。かかるポリペプチドは以下に論述する。かかるポリペプチドをコードする核酸はヌクレオチド配列及び/又はコードアミノ酸レベルにおいて、図5(a)(SEQ ID NO:1)に示すコード配列及び/又は図5(c)(SEQ ID NO:3)に示すアミノ酸配列と約60%超の相同性、約70%超の相同性、約80%超の相同性、約90%超の相同性、又は約95%超の相同性を示しうる。アミノ酸「相同性」に関して、これは類似性(アミノ酸類似性の確立された原理に従い、例えばアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, Madison, WI)を利用する決定に従い)又は同一性を意味すると理解されうであろう。GAPはNeedleman and Wunschアルゴリズムを利用し、2つの完全配列をアライニングし、対合の数を最大にし、そしてギャップの数を最小にする。一般に、デフォルトパラメーターを使用し、ギャップ構築ペナルティーは12、そし

40

50

てギャップ伸長ペナルティーは4とする。本明細書における「相同性」なる用語の使用は、例えば適当な条件下で組換するほどに十分に類似であることのみを2本のヌクレオチド配列に要する「相同組換」の如き用語の標準的使用を確保するため、対比する配列間の任意の必然的な進化的関係を包含しない。本発明に係る核酸によりコードされうる本発明に係るポリペプチドの更なる論述は以下にする。

本発明はストリンジェント条件下で本明細書に開示する任意の1又は複数の特異的な配列とハイブリダイズする核酸にまで及ぶ。適当な条件には、例えば、約80~90%同一である配列の検出のため、例えばヒトプローブによるマウスLRP5の検出のため、又はその逆のため、0.25 Mの Na_2HPO_4 、pH7.2、6.5%のSDS、10%の硫酸デキストランの中での42 で一夜のハイブリダイゼーション、0.1×のSSC、0.1%のSDSの中での55 での最終洗浄である。約90%超同一である配列の検出のためには、適当な条件には0.25 Mの Na_2HPO_4 、pH7.2、6.5%のSDS、10%の硫酸デキストランの中での65 で一夜のハイブリダイゼーション、及び0.1×のSSC、0.1%のSDSの中での60 での最終洗浄が挙げられる。

コード配列は図5(a)(アイソフォーム1)(SEQ ID NO:1)又は図5(b)(SEQ ID NO:2)に示す配列を有する核酸分子内に含まれることがあり、そしてアイソフォーム1の全長ポリペプチド(図5(c)(SEQ ID NO:3))をコードしうる。これらの配列の突然変異体、変異体、誘導体及び対立形質は先の段落及び以下の開示に記載のものと似た意味で本発明の範囲に含まれる。

様々な観点及び態様において本発明により更に検出されるのは図17(b)(SEQ ID NO:39)に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子である。この配列は図5(e)(SEQ ID NO:4)に示すアミノ酸配列の実体的部分を構成する。図17(b)(SEQ ID NO:39)に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸は図17(b)(SEQ ID NO:39)に示すコード配列、又は本発明の観点及び態様についての本明細書に記載のものと似たような観点での対立形質、変異体、突然変異体もしくは誘導体に示すコード配列を含みうる。

本発明の様々な観点に従うと、LRP5ポリペプチド及び遺伝子の様々なアイソフォームも提供する。図5の遺伝子はアイソフォーム1として知られる。本発明に含まれるのは図11(c)に示すポリペプチド(アイソフォーム2)(SEQ ID NO:25)のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する核酸分子である。このコード配列は図11(b)(SEQ ID NO:24)に示すもの(これは図11(a)に示す配列(アイソフォーム2)(SEQ ID NO:23)又は図12(a)に示す配列(アイソフォーム3)(SEQ ID NO:26)を有する分子の中に含まれうる)、図13(アイソフォーム4)(SEQ ID NO:31)、図14(アイソフォーム5)(SEQ ID NO:32)及び図15(アイソフォーム6)(SEQ ID NO:33)でありうる。これらの配列の突然変異体、誘導体、変異体及び対立形質も開示の通り、本発明により提供する。

本発明に係る更なる核酸分子には図5(a)(SEQ ID NO:1)、図12(b)(SEQ ID NO:27)、図12(e)(SEQ ID NO:30)、図15(b)(SEQ ID NO:34)、図16(a)(SEQ ID NO:35)及び図16(b)(SEQ ID NO:36)のいずれかのヌクレオチド配列、並びに図5(a)(SEQ ID NO:1)、図11(b)(SEQ ID NO:24)、図12(c)(SEQ ID NO:28)又は図16(c)(SEQ ID NO:37)によりコードされるアミノ酸をコードする核酸を、これらの配列の突然変異体、対立形質、変異体及び誘導体と共に含む。更に含まれるのは図18(c)(SEQ ID NO:42)のアミノ酸配列をコードする核酸分子、特に図18(b)(SEQ ID NO:41)に示すコード配列を含むものである。

本発明に係る特定の対立形質は表5又は表6に示す変異を有する配列を有する。1又は複数のこれらの配列はIDDM又はその他の病気に対する感受性に関係しうる。IDDM又はその他の病気に関係する本発明に係る配列における変化は本発明の態様に従って好適でありうる。スクリーニング、例えば診断又は予後目的のための関与を以下に説明する。

一般に、本発明に係る核酸は単離体として、単離及び/又は精製形態で、又は天然に一体化した物質を含まず又は実質的に含まず、例えばヒトゲノム中のその遺伝子に隣接する核酸を含まず又は実質的に含まずに提供されるが、ただし発現のために1又は複数の調節配

10

20

30

40

50

列は可能としてはそれから除かれる。核酸は完全又は部分合成したものでよく、そしてゲノムDNA、cDNA又はRNAが含まれうる。ここに示すコード配列はDNA配列である。本発明に係る核酸がRNAを含むなら、示している配列についての言及はUがTを置換するRNA均等物についての言及を包括する。

核酸は複製ベクターの一部として供与してよく、そしてまた本発明は上記の核酸を含むベクター、特に任意の発現ベクターであってそれからコードポリペプチドが適当な条件下で発現されるもの、及び任意のかかるベクター又は核酸を含む宿主細胞を提供する。ここでいう発現ベクターは注目のポリペプチドをコードする核酸及びポリペプチドの発現のための適当な調節配列を、in vitro発現系、例えば網状赤血球リゼート、又はin vivo系、例えば真核細胞、例えばCOS又はCHO細胞、又は原核細胞、例えばE. コリ (E. coli) の中で含む核酸分子である。これは以下に更に説明する。

本発明に従って提供される核酸配列は試験サンプル中の注目の(且つ本発明に係る)核酸を同定するために有用である。本発明は注目の核酸を得る方法を提供し、この方法は図5(a), 11(a), 11(b), 12(a), 12(b), 12(c), 12(e), 13, 14, 15, 15(b), 16(a), 16(b)及び16(c)のいずれかに示す配列又は相補性配列を有するプローブの標的核酸に対するハイブリダイゼーションを含む。ハイブリダイゼーションには一般に有効なハイブリダイゼーションの同定及びそのプローブにハイブリダイズした核酸の単離が続き、それは1又は複数のPCR工程が含まれうる。通常、これらの図のいずれかに示す完全配列を有するプローブを使用する必要はないであろう。短めのフラグメント、特に保存モチーフをコードする配列(図5(c, d)及び図6(a)(SEQ ID NO:9~22))を有するフラグメントを使用してよい。

本発明に係る核酸はいずれかの図に示す核酸配列の1又は複数のフラグメント、特に比較的稀な配列のフラグメントとハイブリダイズするように、コドン用法又は統計学的分析を基礎にデザインした1又は複数のオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーを利用して得ることが可能である。いずれかの図に示す核酸配列のフラグメントにハイブリダイズするようにデザインしたプライマーは、標的核酸のクローニングされたクローニングベクター中の配列にハイブリダイズするようにデザインされた1又は複数のオリゴヌクレオチドと一緒に利用するか、又はライブラリー中のcDNAがオリゴヌクレオチドリンカーにライゲーションされており、そしてPCRを示している配列とハイブリダイズするプライマー及びこのオリゴヌクレオチドリンカーとハイブリダイズするプライマーを用いて実施するいわゆる「RACE」(cDNA末端の迅速増幅)に利用してよい。

かかるオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマー、並びに全長配列(及び突然変異体、対立形質、変異体及び誘導体)は対立形質、突然変異体及び変異体の存在について核酸を含む試験サンプルをスクリーニングする、以下に詳細の診断及び/又は予後用途においても有用である。

1又は複数の細胞(例えばヒト)から単離及び/又は精製した核酸又は細胞から単離及び/又は精製した核酸に由来するライブラリー(例えば細胞から単離したmRNAから誘導したcDNAライブラリー)を選択ハイブリダイゼーションのための条件下でプロービングする及び/又は特定の核酸増幅反応、例えばポリメラーゼ連鎖反応にかける(例えば、「PCR protocols; A Guide to Methods and Applications」Innisら編、1990, Academic Press, New York, Mullisら、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263(1987), Ehrlich(編)PCR technology, Stockton Press, NY, 1989及びEhrlichら、Science, 252: 1643-1650(1991)を参照のこと)。PCRは鋳型核酸の変性(二本鎖なら)、プライマーの標的へのアニーリング及び重合の段階を含んで成る。増幅反応においてプロービングした又は鋳型として使用した核酸はゲノムDNA、cDNA又はRNAであってよい。その他の特異的な核酸増幅技術には標準の置換活性化、QBレプリカーゼシステム、修復連鎖反応、リガーゼ連鎖反応及びライゲーション活性化転写が含まれる。便宜上、及び一般に好適とされるため、PCRなる語はその他の核酸増幅技術が当業者により適用される場合に本明細書において利用する。何らかのことわりのない限り、PCRについての言及は当業界における任意の適当な核酸増幅反応の利用を包括するものと解すべきである。

10

20

30

40

50

クローニングの場合において、全長コード配列を構築するために1又は複数の遺伝子フラグメントをライゲーションする必要がある。また、全長コード核酸分子が得られない場合、全長分子の一部を代表する小さな分子が全長クローンを得るために利用される。インサートは部分cDNAクローンから調製してよく、そしてcDNAライブラリーをスクリーニングするために利用される。単離した全長クローンを発現ベクターの中にサブクローニングし、そして活性を例えばリポータープラスミドを有する適当な宿主細胞への形質導入によりアッセイできる。

方法は標的核酸に対する1又は複数(例えば2本)のプローブ又はプライマーのハイブリダイゼーションを含みうる。核酸が二本鎖DNAのとき、ハイブリダイゼーションには一般に一本鎖DNAを生成する変性が先行する。ハイブリダイゼーションはPCR手順の一部であってよく、又はPCRを包含しないプロービング手順の一部であってよい。例示手順はPCRと低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションとの組合せであろう。当業者にとって有用な多くのものから選定したスクリーニング手順を有効なハイブリダイゼーション事象及び単離されたハイブリダイズした核酸を同定するために用いる。

標的核酸(例えばDNA)に対するプローブの結合は当業者の処理において任意の様々な技術を利用して測定できる。例えば、プローブは放射能、蛍光又は酵素ラベルされてよい。プローブラベリングを利用しないその他の方法は制限フラグメント長多形性の検査、PCRを利用する増幅、RNase切断及び対立形質特異的オリゴヌクレオチドプロービングを含む。プロービングは標準のサザンブロッティング技術は利用しなくてよい。例えば、DNAを細胞から抽出し、そして様々な制限酵素で消化してよい。次いで制限フラグメントをアガロースゲル上での電気泳動により分離し、次いで変性させ、そしてニトロセルロースフィルターに転写する。ラベルしたプローブをフィルター上のDNAフラグメントにハイブリダイズさせ、そして結合を決定してよい。プロービング用のDNAが細胞からのRNA調製品から調製し得る。

予備実験は低ストリンジェンシー条件下で様々なプローブを制限酵素で消化したDNAのサザンブロットにハイブリダイゼーションさせることにより実施してよい。適当な条件は、大量のハイブリダイゼーションフラグメントが得られ、しかもバックグラウンドハイブリダイゼーションが低いときに達成されるであろう。このような条件を利用し、核酸ライブラリー、例えば発現配列の代表であるcDNAライブラリーを探索してよい。当業者はオリゴヌクレオチド長及び塩基組成、温度等の如き要因を考慮して、選択ハイブリダイゼーションのための所望のストリンジェンシーの適当な条件を採用することが十分に可能である。アミノ酸配列情報を基礎に、遺伝子コードの縮重、並びに適宜、候補核酸が由来する生物のコード用法を考慮に入れ、オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーをデザインすることができうる。核酸増幅において利用するオリゴヌクレオチドは約10個以下のコドン(例えば、6、7又は8個)を有してよく、即ち長さ約30以下のヌクレオチドである(例えば18、21又は24)。汎用の特異的プライマーは長さにおいて14ヌクレオチド以上、しかしながら18~20である必要はない。当業者はPCRの如きプロセスを利用するためのプライマーのデザインにおいて熟知している。オリゴヌクレオチドプライマーを合成するための様々な技術、例えばホスホトリエステル及びホスホジエステル合成法が当業界において公知である。

プローブ又はPCRプライマーのデザインにおいて利用するのに適当な好適なアミノ酸配列はLRP5の中に存在するモチーフをコードする(完全、実質的又は部分的に)保存された配列を含みうる(図5(d))。

本発明の更なる観点は本発明に係る核酸を提示する任意の図面に示すヌクレオチド配列又は相補配列、特に核酸を獲得及び/又はスクリーニングする方法において利用するためのもののオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドフラグメントを提供する。いくつかの好適なオリゴヌクレオチドは表2(SEQ ID NO:49~54)、表4(SEQ ID NO:83~317)、表7、表8(SEQ ID NO:318~333)もしくは表9に示す配列(SEQ ID NO:49~74, 334~402)、又は1もしくは複数個のヌクレオチドの追加、置換、挿入もしくは欠失により示しているいずれかの配列と相違するが、好ましくは本発明に係る核酸と選択的にハイブリダイ

10

20

30

40

50

ズする能力の喪失していない。即ち、所定のいずれかの配列とのオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド類似度が十分に高い配列を有する。

いくつかの好適な態様において、示している任意の配列のフラグメント又はIDDMもしくはその他の病気に対する感受性に関わる任意の対立形質である本発明に係るオリゴヌクレオチドは長さが少なくとも約10ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約15ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約20ヌクレオチドである。かかるフラグメント自体個別に本発明の観点を代表する。フラグメント及びその他のオリゴヌクレオチドは論じたプライマー又はプローブとして利用し得るが、IDDM又はその他の病気感受性を示唆する配列の試験サンプルの中での存在の決定に関する方法においても構築されうる（例えばPCRにより）。

10

診断及び／又は予後との関係、例えばIDDM又はその他の病気に対する感受性を決定するうえでの核酸の利用を包括する方法、並びにIDDM又はその他の病気感受性を示唆する配列の存在を決定するのに関連するその他の方法を以下に論ずる。

本発明に係るオリゴヌクレオチドの更なる態様は本明細書に記載の核酸に基づくアンチ・センスオリゴヌクレオチド配列である。アンチ・センスオリゴヌクレオチドは核酸、プレ-mRNA又は成熟がmRNAの相補性配列にハイブリダイズし、所定のDNA配列によりコードされるポリペプチド（天然ポリペプチド又はその突然変異形態のいずれか）の生産を妨害し、その結果その発現を抑制又は一緒に阻止するようにデザインされうる。アンチ・センス技術はコード配列、遺伝子のコントロール配列、例えば5'隣接配列を標的とし、これによりアンチセンスオリゴヌクレオチドはコントロール配列を妨害しうるように利用することができる。アンチ・センスオリゴヌクレオチドはDNAもしくはRNAであってよく、そして長さ約14~23ヌクレオチド、特に約15~18ヌクレオチドであってよい。アンチセンス配列の構築及びその利用はPeyman and Ulman, Chemical Reviews, 90:543-584 (1990) 及びCrooke, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:329-376 (1992) に記載されている。

20

本発明に係る核酸は遺伝子治療、例えばIDDM又はその他の病気の予防又は治療（完全又は部分的）を狙いとする個体の処置において利用し得る。これは病気の1又は複数の症状を緩和しうる。これは以下に論ずる。

本発明に係る核酸、例えば全長コード配列又はオリゴヌクレオチドプローブもしくはプライマーはキットの一部として、例えば内容物が外部環境から保護されている適当な容器、例えばバイアルの中で供与されうる。このキットは核酸の例えばPCR及び／又は試験サンプル中の注目の核酸の存在を決定するための方法における使用のための仕様書を含んでよい。核酸がPCRにおける利用を意図するキットは反応のために必要とされる1又は複数のその他の試薬、例えばポリメラーゼ、ヌクレオシド、バッファー溶液等を含みうる。核酸はラベルしてよい。注目の核酸の有無を決定するうえで利用するキットは当該方法の実施のための1又は複数の物品及び／又は試薬、例えば試験サンプル自体を用意するための手段、例えば細胞を頬腔から取り除くためのスワブ、又は血液サンプルを抜き取るためのシリンジ（かかる部材は一般に滅菌されている）を含みうる。

30

更なる観点に従うと、本発明はLRP5遺伝子プロモーターを含む核酸分子を提供する。

別の観点において、本発明はプロモーターを含む核酸分子を提供し、このプロモーターは図12(e) (SEQ ID NO:30) 又は図15(b) に示すヌクレオチドの配列を含む。このプロモーターは遺伝子発現を促進させるのに足りる図12(e) (SEQ ID NO:30) 又は図15(b) (SEQ ID NO:34) に示す配列の1又は複数のフラグメントを含んで成りうる。このプロモーターはヒト染色体内のLRP5遺伝子の5'側のヌクレオチド配列、又はその他の種、例えばマウスにおける均等配列を含んで成る又は本質的にそれから成る。

40

当該図面に開示の任意の配列はゲノムLRP5遺伝子を含むゲノムライブラリーからのプロモーターの同定及び単離において利用するためのプローブを構築するのに利用されうる。かかるプロービングのための技術及び条件は当業界において公知であり、そして本明細書において論じる。組織及び／又は発育調節を司る最小要素又はモチーフを見つけるため、制限酵素又はヌクレアーゼを核酸分子の消化のために用い、次いで適当なアッセイ（例えばリポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼを用い）で必要な配列を決定する。本発明の好

50

適な方法はプロモーター活性のために必要な図12(e) (SEQ ID NO:30) 又は図15(b) (SEQ ID NO:34) に示す最小ヌクレオチド配列を有する核酸単離体を提供する。

前述の通り、プロモーターは発現の発育及び/又は組織特異的調節コントロールを供与する1又は複数の配列モチーフ又は要素を含んで成りうる。その他の調節配列、例えば適当な発現系における突然変異もしくは消化アッセイにより、又は例えばオンラインデータベースをサーチングするためにコンピューターを用いての有用な情報との配列対比により同定される配列を含ませてよい。

「プロモーター」とは、下流に作用可能式に連結されたDNAの転写が開始されうる(即ち、二本鎖DNAのセンス鎖上で3'方向)ヌクレオチド配列を意味する。

「作用可能式に連結」とは、適当に配置され、そして転写がプロモーターから開始するように配向されて同じ核酸分子の一部として連結されていることを意味する。プロモーターに作用可能式に連結されたDNAはプロモーターの「転写開始調節下」にある。

本発明はここに提供するプロモーター配列のヌクレオチド付加、挿入、置換又は欠失により対立形質、突然変異体、変異体又は誘導体であるヌクレオチド配列を有するプロモーターに及ぶ。提供する配列との配列相同性の好適なレベルは本発明に係るコード核酸及びポリペプチドについての上記のものと類似していることがある。ヌクレオチド配列に改変を設けるための核酸の系統的又はランダム突然変異誘発は当業者に公知の任意の技術を利用して実施することができうる。本発明に係るプロモーター配列への1又は複数の改変はプロモーター活性を増強もしくは低下させることがあり、又はプロモーター活性を調節する物質の効果の程度を増強もしくは低下させることがある。

「プロモーター活性」は転写を開始する能力を意味するために用いている。プロモーター活性のレベルは例えばこのプロモーターからの転写により生成されるmRNAの量の評価により、又はこのプロモーターからの転写により生成されるmRNAの翻訳により生成されるタンパク質生成物の量の評価により定量可能である。発現系の中に存在する特異的なmRNAの量は例えばmRNAにハイブリダイズでき、且つラベルされた、又はポリメラーゼ連鎖反応の如き特異的な増幅反応において利用し得る特異的なオリゴヌクレオチドを利用して決定し得る。リポーター遺伝子の利用はタンパク質の生成を参照することによるプロモーター活性の決定を助長する。

本発明により更に提供するのは異種遺伝子、例えばコード配列に作用可能式に連結されたLRP5プロモーター領域又はプロモーター転写できるそのフラグメント、突然変異体、対立形質、誘導体もしくは変異体を含んで成る核酸構築体である。「異種」又は「外生」遺伝子は一般にLRP5の改変形態ではない。一般に、この遺伝子は、発現を経て検出でき、そして好ましくは定量できうるペプチド又はポリペプチド生成物へと翻訳されうるmRNAへと転写されうる。コード生成物が発現を経てアッセイされうる遺伝子を「リポーター遺伝子」、即ち、プロモーター活性に基づく「リポートする」遺伝子という。

リポーター遺伝子は好ましくは検出可能なシグナル、好ましくは目で検出可能なシグナル、例えば有色生成物を生成する反応を触媒する酵素をコードする。 - ガラクトシダーゼ及びルシフェラーゼ等、多くの例が知られる。 - ガラクトシダーゼ活性は基質に基づく青色の発色によりアッセイでき、このアッセイは目によるか、又は吸収を測定するスペクトル光度計の利用による。例えばルシフェラーゼ活性の結果生成される蛍光は光度計を利用して定量できうる。例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼを利用しながら放射能アッセイを利用してよく、それは非放射能アッセイにおいても利用されうる。リポーター遺伝子からの発現に由来する遺伝子生成物の存在及び/又は量はその生成物に結合できる分子、例えば抗体又はそのフラグメントを利用して決定できうる。結合分子は任意の標準技術を利用して直接又は間接的にラベルできうる。

当業者は可能なりポーター遺伝子の多重度及び遺伝子活性を決定するために利用し得るアッセイ技術に十分に気がつくものである。任意の適当なりポーター/アッセイを利用してよく、そして本発明にとって特定の選択は必要でなく、又は制限はないことが理解される。

プロモーター(本明細書に開示)及び異種遺伝子(リポーター)を含んで成る核酸構築体

10

20

30

40

50

はプロモーターの活性を調節できる物質についてのスクリーニングにおいて採用し得る。治療目的のため、例えばIDDM又はその他の病気の処置のため、プロモーターの発現を上昇調節できる物質が期待される。プロモーターの活性を調節する物質の能力についてのスクリーニング方法は、本明細書に開示する核酸構築体を含む発現系、例えば宿主細胞を試験又は候補物質と接触させ、そして異種遺伝子の発現を決定することを含んで成りうる。試験物質の存在下での発現のレベルを試験物質の非存在下での発現のレベルと比較することができる。試験物質の存在下での発現における相違は遺伝子発現を調節する物質の能力を示唆する。本明細書に開示するプロモーターに連結されていない別の遺伝子の発現と比較した異種遺伝子の発現の上昇はプロモーターの調節のためのこの物質の特異性を示唆する。

10

プロモーター構築体はゲノムの中に組込まれたリポーター構築体を含む安定な細胞系を作り出すため、前述の任意の技術を利用して細胞系の中に導入してよい。これらの細胞を増殖させ、そして試験化合物を様々な時間インキュベーションする。細胞を96穴プレートの中で増殖させ、大量の化合物の分析を促進する。次いで細胞を洗い、そしてリポーター遺伝子発現を分析する。いくつかのリポーター、例えばルシフェラーゼに関しては、細胞を溶解させてから分析する。

かくして、本発明はプロモーター活性の調節因子として核酸分子を利用して同定した物質のみならず、本明細書における開示に従い、かかる物質を含んで成る薬理組成物、医薬品、薬剤又はその組成物、例えばIDDM又はその他の病気の処置（これは予防処置を含みうる）におけるLRP5発現を増強するための患者へのかかる組成物の投与を含んで成る方法、例えばIDDM又はその他の病気の処置におけるLRP5発現を増強するための投与用組成物の製造におけるかかる物質の利用、並びにかかる物質と薬理学的に許容される賦形剤、ビヒクル又は担体及び任意にその他の成分とを混合することを含んで成る薬理組成物の製造の方法等の様々な観点に及ぶ。

20

本発明の更なる観点は図5(c)(SEQ ID NO:3)に示すアミノ酸配列であって、単離及び/又は精製形態にあり、それが天然で一体化している物質、例えばその他のポリペプチド又は例えば図5(c)(SEQ ID NO:3)に示すアミノ酸配列以外のヒトポリペプチドを含まない又は実質的に含まず、又は（例えば原核細胞における発現により生成されるなら）天然のグリコシル化を欠く、例えば非グリコシル化のものを提供する。本発明に係る更なるポリペプチドは図11(c)(SEQ ID NO:25)に示すポリペプチドにおいて示すもの、

30

12(d)に示すもの、及び図16(d)(SEQ ID NO:8)に示す部分ポリペプチドから選ばれるアミノ酸配列を有する。アミノ酸配列変異体、対立形質、誘導体又は変異体であるポリペプチドも本発明により提供する。変異体、対立形質、誘導体又は突然変異体であるポリペプチドは当該図面に示すものとは1又は複数のアミノ酸の付加、置換、欠失及び挿入のうちの1又は複数により相違する。好適なかかるポリペプチドはLRP5機能、即ち、下記の特性のうちの1又は複数を有する：配列を当該図面に示すポリペプチドと反応性な抗体との免疫学的交差反応性；そのアミノ酸配列を当該図面に示しているポリペプチドを有するポリペプチドの共有（例えば2種類のポリペプチド間の免疫学的交差反応により決定）；その配列を当該図面に示しているポリペプチドに対して生起させた抗体により阻害される生物活性；血清トリグリセリドを降下させる能力；血清コレステロールを降下させる能力；超低密度リポタンパク質粒子と相互作用する及び/又はその血清レベルを降下させる能力；血清アルカリホスファターゼレベルに影響を及ぼす能力。配列の変更はLRP5タンパク質の性質及び/又は活性レベル及び/又は安定性を変更しうる。

40

当該図面に示すアミノ酸配列のアミノ酸配列変異体、対立形質、誘導体又は突然変異体であるポリペプチドは示している配列と約35%超、約40%超、約50%超、約60%超、約70%超、約80%超、約90%超又は約95%超の配列同一性を共有する。この配列は関連の図面に示すアミノ酸配列と約60%超の類似性、約70%超の類似性、約80%超の類似性、又は約90%超の類似性を共有しうる。アミノ酸類似性は一般に前述のアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, Madison, WI) 又はAltschulら (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10のTB

50

LASTNプログラムを参照して規定される。類似性は「保存変更」、即ち、一の疎水性残基、例えばイソロイシン、バリン、ロイシン又はメチオニンの別の残基による置換、一の極性残基の別のものによる置換、例えばアルギニンのリジン、グルタミン酸のアスパラギン酸、又はグルタミンのアスパラギンによる置換を可能にする。特定のアミノ酸配列変異体は当該図面に示すものとは1個のアミノ酸、2, 3, 4, 5~10, 10~20, 20~30, 30~50, 50~100, 100~150又は150個超のアミノ酸の挿入、付加、置換又は欠失により相違しうる。

配列対比は本明細書に示す関連配列の全長にわたって行ってよく、又はより好ましくは約20, 25, 30, 33, 40, 50, 67, 133, 167, 200, 233, 267, 300, 333, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600以上の連続配列、又はより多くのアミノ酸もしくはヌクレオチドトリプレットにわたって行ってよく、ケース毎に関連のアミノ酸配列又はヌクレオチド配列と対比させる。

本発明は更に本発明のポリペプチドの活性部分、フラグメント、誘導体及び機能性擬似体も含む。ポリペプチドの「活性部分」は当該全長ポリペプチドよりは短いが、生物活性、例えばリガンドに対する結合、エンドサイトーシスへの関与から選ばれる生物活性を保持するペプチドを意味する。かくして、LRP5ポリペプチドの活性部分は、一の態様において、トランスメンブランドメイン、及びエンドサイトーシスに関与するサイトプラズマテールの部分を含む。かかる活性フラグメントは、例えば別のリガンドに対する結合部分を含む融合タンパク質の一部として含まれうる。別の態様において、LDLとEGFモチーフとの組合せを分子の中に含ませ、異なる結合特異性を分子に授けることができる。

ポリペプチドの「フラグメント」は一般に少なくとも約5個の連続アミノ酸、往々にして少なくとも約7個の連続アミノ酸、典型的には少なくとも約9個の連続アミノ酸、より好ましくは少なくとも約13個の連続アミノ酸、そしてより好ましくは少なくとも約20~30又はそれより多くの連続アミノ酸のアミノ酸残基鎖を意味する。LRP5ポリペプチド配列のフラグメントはアミノ酸配列の一部に対する抗体を生起させるために有用な抗原決定基又はエピトープを含みうる。ポリペプチド内のペプチドモチーフを発見及び精製するためにアラニンスキャンが一般に利用され、これは各残基のアミノ酸アラニンによる順番通りの系統的置換、それに生物活性の評価が続く。

LRP5の好適なフラグメントは下記のアミノ酸配列のいずれかを有するものが含まれる：

SYFHLFPPPPSPCTDSS

VDGRQNIKRAKDDGT

EVLFTTGLIRPVALVVDN

IQGHLDFVMDILVFHS,

これは例えば抗体を生起又は単離するために利用されうる。変異及び誘導ペプチド、これらの配列のいずれかとは1又は複数個のアミノ酸の付加、挿入、欠失又は置換により異なるアミノ酸配列を有するペプチドも本発明により提供されるが、但し一般にこの変異体又は誘導ペプチドはその配列を示すペプチドのいずれかと結合する抗体又はその他の特異的結合性構成員と結合することを条件とする。示しているペプチドの変異体又は突然変異体であるペプチドは特異的結合性構成員、例えば抗体又はその抗原結合性フラグメントに対する結合について表示のペプチドと競合しうる。

ポリペプチドの「誘導体」又はそのフラグメントは当該タンパク質のアミノ酸配列を、例えばそのタンパク質をコードする核酸の操作により又はそのタンパク質自体の改変により変えることによって修飾されたポリペプチドを含む。天然アミノ酸配列のかかる誘導体は1又は複数個のアミノ酸の挿入、付加、欠失又は置換のうちの一つ又は複数を包括し得、それは野生型ポリペプチドの生物活性の品質が基本的に変わっていないことがある。本発明の範囲に更に包括されるのは提供するLRP5ポリペプチドの活性フラグメントの機能性擬似体である（対立形質、突然変異体、誘導体及び変異体を含む）。「機能性擬似体」なる語は関連のアミノ酸配列の活性部分を含まないことのある物質を意味し、そしておそらくは完全なペプチドではなく、しかしながら天然のLRP5ポリペプチドの生物活性を定性的観

点で保持するものである。候補擬似体のデザイン及びスクリーニングを以下に詳細する。本発明の好適な態様の代表的なアミノ酸配列変異体の配列を表5及び表6に示す。試験サンプル中の1又は複数のこれらの配列の存在についてのスクリーニングは、例えば後述の通りIDDM又はその他の病気感受性を決定するうえでの診断及び/又は予後用途を有する。本明細書にその配列情報を供するポリペプチドのその他のフラグメントを、例えば機能性ドメインとの関連で、本発明の観点として提供する。一のかかる機能性ドメインは推定細胞外ドメインであり、従って本発明に係るポリペプチドフラグメントは、そのアミノ酸配列を図5(e)(SEQ ID NO:4)又は図5(c)(SEQ ID NO:3)に示すポリペプチドの細胞外ドメインを含みうる。これは図5(c)(SEQ ID NO:3)の前駆体配列のアミノ酸1385にまで及ぶ。その他の有用なLRP5ドメインは細胞質ドメインであり、図5(d)(SEQ ID NO:3)にその207個のアミノ酸を示す。これはタンパク質をエンドサイト-シス経路を経るよう

10

に照準付けするの

に利用されうる。

本発明に係るポリペプチドは例えばコード核酸からの発現(これについては以下参照)による生産後に単離及び/又は精製されうる(例えば抗体を利用して)。かくして、ポリペプチドはそれが天然に一体化している夾雑物(もしそれが天然ポリペプチドなら)を含まない又は実質的に含まないで提供されうる。ポリペプチドはその他のポリペプチドを含まない又は実質的に含まないで提供されうる。本発明に係るポリペプチドは化学合成により完全に又は部分的に作製されうる。単離及び/又は精製されたポリペプチドは組成物の処方において利用してよく、その組成物は少なくとも一種の更なる成分を含んでよく、例えば薬理学的に許容される賦形剤、ビヒクル又は担体を含む薬理組成物である。本発明に係るポリペプチドを含む組成物は後述の通り予防及び/又は治療的処置において利用でき

20

うる。

本発明に係るポリペプチド、ペプチドフラグメント、対立形質、突然変異体、誘導体又は変異体は特異的な抗体を得るうえでの免疫原等として利用されうる。抗体は診断スクリーニング及び治療的観点でのポリペプチド及びペプチドの精製及びその他の操作において有用である。これを以下に論ずる。

本発明に係るポリペプチドは、その活性又は機能、例えばリガンドに対する結合、エンドサイト-シスにおける関与、細胞内区画から細胞表層への移動、細胞表層から細胞内区画への移動に影響を及ぼす又は調節する分子のスクリーニングにおいて利用されうる。かかる分子はLRP5のリガンド結合性部分、LRP5の細胞質部分、又はLRP5を含む小胞の細胞表層を中心とする移動に関与するような1又は複数のアクセサリ分子と相互作用し得、そして治療的(可能としては予防的)観点において有用でありうる。

30

新たな薬剤の同定に結びつく薬理研究は、最先化合物が見つかる前又は見つかった後でさえも、非常に大量の数の候補物質のスクリーニングを包括しうることが周知である。これは薬理研究を非常に高額且つ時間のかかるものとする一つの要因である。IDDM又はその他の病気を処置又は予防するうえで潜在的に有用な物質をスクリーニングするためのかかる手段は本発明に係るポリペプチドにより提供される。ポリペプチドの調節因子として同定された物質はIDDM及びその他の病気に対する戦闘力の進歩を示し、なぜならこれらはin vivo用途のための治療方法のデザイン及び調査の基礎を担うからである。更に、これらは本明細書において論ずるLRP5の機能的用途により、数多くの症状、例えば自己免疫疾患、例えば糸球体腎炎、エンドサイト-シス及び/又は抗原提示の崩壊の関与する病気及び障害、サイトカイン浄化及び/又は炎症の関与する病気及び障害、ウィルス感染症、病原性細菌毒素汚染、遊離脂肪酸の上昇又は高コレステロール血症、2型糖尿病、骨粗しょう症及びアルツハイマー病のいずれかにおいて有用でありうる。本明細書に記載の通り、LRP5、そのフラグメント及び本発明に係る核酸はこのような病気及び障害のいずれかを打倒するうえでも有用でありうる。

40

ポリペプチドの活性を調節する物質のスクリーニングのための方法は、1又は複数の試験物質を当該ポリペプチドと適当な反応媒体の中で接触させ、処置ポリペプチドの活性を試験し、そしてその活性を1又は複数の試験物質で処理していない同等の反応媒体中の当該ポリペプチドの活性と比較することを含みうる。処理及び未処理ポリペプチド間の活性の

50

差は関連の 1 又は複数の試験物質の調節作用の指標となる。

組合せライブラリー技術 (Schultz, JS (1996) Biotechnol. Prog. 12:729-743) は、ポリペプチドの活性を調節する能力に関して潜在的に膨大な数の異なる物質を試験する有効な方法を提供する。活性の調節のためにスクリーニングされる前に、またはそれと同様に、被験物質は、例えば酵母菌ツーハイブリッド系でポリペプチドと相互作用する能力に関してスクリーニングされ得る (これはポリペプチドと被験物質の両方がコード化核酸から酵母菌中で発現され得ることを必要とする)。これは、ポリペプチドの活性を調節する実際の能力に関して物質を試験する前の粗スクリーンとして用いられる。

ポリペプチド活性を調節するかまたはそれに影響を及ぼす物質の同定後、物質はさらに検査され得る。さらに、それは薬物、製剤組成物または医薬品のような組成物の調製に、即ち製造または処方において製造されおよび / または用いられる。これらは個体に投与され得る。

10

したがって、本発明は、本明細書中に開示したことと合致して、ポリペプチド活性のモジュレーターとして同定される物質に対してだけでなく、このような物質を包含する製剤組成物、薬物、医薬品またはその他の組成物、例えば IDDM またはその他の疾患を治療する (予防的治療を含み得る) ためのこのような組成物の患者への投与を包含する方法、例えば IDDM またはその他の疾患を治療するために投与するための組成物の製造におけるこのような物質の使用、そしてこのような物質を製薬上許容可能な賦形剤、ビヒクルまたは担体、および任意にその他の成分と混ぜ合わせることを包含する製剤組成物の製造方法に対する種々の局面にわたる。

20

ペプチドまたはプロモーター機能のモジュレーターとして用いる同定された物質は、天然のペプチドまたは非ペプチドであり得る。非ペプチド「小分子」は、しばしば、多数の *in vivo* 製薬用途のために選ばれる。したがって、本物質の擬似物質または擬物質 (特にペプチドである場合には) は、製薬的使用のために設計され得る。既知の製薬的活性化化合物に対する擬似物質の設計は、「先行」化合物を基礎にした製剤の開発への既知のアプローチである。これは、活性化化合物が合成するのが難しいかまたは経費が掛かる場合に、あるいはそれが特定の投与方法に適していない、例えばペプチドが、消化管中のプロテアーゼにより迅速に分解される傾向があるので、経口組成物用の活性剤としては十分に適しているわけではない場合に、望ましい。擬似物質の設計、合成および試験を用いて、標的特性に関して多数の分子の無作為スクリーニングをせずに済ませ得る。

30

所定の標的特性を有する化合物からの擬似物質の設計に一般に採用されるいくつかの工程がある。第一に、標的特性を確定する場合に決定的および / または重要である化合物の特定の部分が確定される。ペプチドの場合には、これはペプチド中のアミノ酸残基を系統的に変えることにより、例えば各残基を順次置換することによりなされ得る。化合物の活性領域を構成するこれらの部分または残基は、その「薬物団」として知られている。

薬物団が見出されれば、一連の供給源、例えば分光器的技術、X 線回析データおよび NMR からのデータを用いて、その物理的特性、例えば化学量論、結合、サイズおよび / または電荷により、その構造はモデル化される。コンピューター分析、類似点マッピング (これは、原子間の結合というよりむしろ、薬物団の電荷および / または容積を模する) およびその他の技術がこのモデリング法に用い得る。

40

このアプローチの変法では、配位子およびその結合相手の三次元構造が模される。これは、配位子および / または結合相手が結合における配座を変えて、モデルにこれを考慮した擬似物質の設計を可能にする場合に特に有用であり得る。

次に、薬物団に擬似する化学基がその上にグラフトされ得る鑄型分子が選択される。鑄型分子およびそこにグラフトされる化学基は、擬似物質が容易に合成され、薬理学的に許容可能であると考えられ、そして *in vivo* で分解せず、その一方で先行化合物の生物学的活性を保持するように選択されるのが便利である。このアプローチにより見出される単数または複数の擬似物質は次に、それらが標的特性を有するか否か、またはどの程度それらがそれを示すかを見るためにスクリーニングされ得る。さらなる最適化または修飾がなされて、*in vivo* または臨床検査用の 1 つ又はそれ以上の最終擬似物質に達し得る。

50

本明細書中に開示したようなスクリーニング方法を用いて得るLRP5ポリペプチドまたはプロモーター活性を調節する能力を有すると同定された物質の擬似物質は、本発明の範囲内に含まれる。ポリペプチド、ペプチドまたは本発明のポリペプチドの活性を調節し得る物質は、例えば外部環境からその内容物を保護する適切な容器中に密封されて、キット中に提供され得る。このようなキットは、使用説明書を含有し得る。

本発明のポリペプチドの便利な製造方法は、発現系中で核酸を用いることにより、それをコードする核酸を発現することである。したがって、本発明はポリペプチド（開示されるような）の製造方法であって、ポリペプチドをコードする核酸（一般的に本発明の核酸）からの発現を含む方法も包含する。これは、ポリペプチドの発現を引き起こすかまたは可能にする適切な条件下で、このようなベクターを含有する培養中で宿主細胞を増殖させることにより成し遂げるのが便利である。ポリペプチドは、網状赤血球溶解産物のようなin vitro系でも発現され得る。

種々の異なる宿主細胞中でのポリペプチドのクローニングおよび発現のための系は周知である。適切な宿主細胞としては、細菌、真核細胞、例えば哺乳類および酵母菌、ならびにバキュロウイルス系が挙げられる。異種ポリペプチドの発現のための当業界で利用可能な哺乳類細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、ハムスター新生仔腎細胞、COS細胞およびその他多数が挙げられる。一般的な好ましい細菌宿主は、大腸菌である。適切な配列、例えばプロモーター配列、ターミネーター断片、ポリアダニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子および適切な場合にはその他の配列を含有する適切なベクターが選択または構築され得る。ベクターは、プラスミド、ウイルス、適切な場合には例えば「ファージ」またはファージミドであり得る。さらに詳しくは、例えば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照していただきたい。例えば核酸構築物の調製、突然変異誘発、シーケンシング、細胞へのDNAの導入および遺伝子発現における核酸の操作、ならびにタンパク質の分析のための多数の既知の技術およびプロトコルは、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. Eds., John Wiley & Sons, 1992に詳細に記載されている。

したがって、本発明のさらなる局面は、本明細書中に開示したような核酸を含有する宿主細胞を提供する。本発明の核酸は、宿主細胞のゲノム（例えば染色体）に統合され得る。統合は、標準技法にしたがって、ゲノムとの組換えを促す配列の含入により促進され得る。核酸は、細胞ないの染色体外ベクター上に存在し得る。

さらに別の局面は、核酸を宿主細胞に導入することを含む方法を提供する。（特にin vitro導入に関して）一般的に「形質転換」と呼ばれ得るがしかしこれに限定されない導入は、任意の利用可能な技術を用い得る。真核細胞に関しては、適切な技術としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、リポソーム介在性トランスフェクション、およびレトロウイルスまたはその他のウイルス、例えばワクシニア、または昆虫細胞に関してはバキュロウイルスを用いる形質導入が挙げられる。細菌細胞に関しては、適切な技術としては、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーションおよびバクテリオファージを用いるトランスフェクションが挙げられる。

抗生物質耐性または感受性遺伝子のようなマーカー遺伝子は、当業界で周知のように、当該核酸を含有するクローンを同定する場合に用い得る。

導入後は、コード化ポリペプチドが産生されるように、遺伝子の発現のための条件下で、例えば宿主細胞（実際に形質転換され得るが、しかし形質転換細胞の子孫であると考えられるほうが多い）を培養することにより核酸からの発現が引き起こされるかまたは可能になる。適切なシグナルリーダーペプチドと結合してポリペプチドが発現されると、それは細胞から培地中に分泌され得る。発現による産生後、ポリペプチドは宿主細胞および/または培地から単離および/または精製されて、臨機応変に、その後、例えば1つ又はそれ以上の付加的成分を含み得る組成物、例えば1つ又はそれ以上の製薬上許容可能な賦形剤、ビヒクルまたは担体（例えば下記参照）を含む製剤組成物の処方において、望ましい場

10

20

30

40

50

合には用い得る。

核酸の導入は、下記のように、遺伝子療法の方法により、in vivoで起こり得る。例えば細胞または細胞の先祖への核酸の導入、および/または細胞または祖先に内因性の遺伝子変化（導入または変化は、in vivoまたはex vivoで起こり得る）の結果として、本発明の核酸を含有する宿主細胞は、動物、特にヒトまたは非ヒトであり得る哺乳類、例えばウサギ、モルモット、ラット、マウスまたはその他の齧歯類、ネコ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシまたはウマであるか、あるいは鳥類、例えば鶏である生物体内に（例えば体細胞中に）包含され得る。このような細胞を包含する遺伝的修飾またはトランスジェニックな動物またはトリも、本発明のさらなる局面として提供される。

したがって、種々のさらに別の局面において、本発明は、そのゲノム内にヒトLRP5導入遺伝子を有する非ヒト動物を提供する。導入遺伝子は、本明細書中で同定されたアイソフォームのいずれか、あるいは開示されるようなその突然変異体、誘導体、対立形質または変異体の配列を有し得る。好ましい実施態様では、異種ヒトLRP5配列は内因性動物配列を置換する。その他の好ましい実施態様では、ヒトLRP5配列の1つ又はそれ以上のコピーが動物ゲノムに付加される。

好ましくは、動物は齧歯類であり、最も好ましくはマウスまたはラットである。

これは治療目的を有し得る（遺伝子療法は以下で考察される）。突然変異体、生物体の細胞内の対立形質または変異体配列の存在は、特に相同内因性配列の代わりである場合には、LRP5遺伝子、あるいはin vitroでコード化ポリペプチドおよび/またはプロモーターの活性を調節するか、そうでなければ治療的効力を有することが示されている物質の役割を試験するかおよび/または研究する場合のモデルとして生物を用いることを可能にし得る。LRP5欠損に関する動物モデルは、動物生殖細胞系中への突然変異の導入のための標準技術を用いて構築し得る。このアプローチの一例では、マウスを用いて、LRP5遺伝子内に挿入突然変異を保有するベクターが胚幹細胞中にトランスフェクトし得る。選択可能なマーカー、例えば抗生物質耐性遺伝子、例えばneoRを、突然変異体遺伝子が内因性野生型相同体にとって代わったクローンの選択を促すために含有し得る。このようなクローンは、サザンブロットハイブリダイゼーションにより同定されるかまたはさらに検査し得る。次に、クローンを展開し、細胞をマウス未分化胚芽細胞段階の胚中に注入する。注入細胞がマウスの発生に寄与したマウスを、サザンブロットイングにより同定し得る。これらのキメラマウスを次に交配して、生殖細胞系における突然変異のコピーを1つ保有するマウスを産生し得る。これらのヘテロ接合体突然変異動物を次に交配して、ホモ接合的に遺伝子の突然変異を保有するマウスを産生し得る。ヘLRP5遺伝子におけるヘテロ接合突然変異を有するマウスは、IDDMまたはその他の疾患を発症する危険性のある生殖細胞系における突然変異化した遺伝子のコピー1つを有するヒト個体に適したモデルであり得る。

動物モデルは、本明細書の別の箇所で考察される種々の疾患のいずれかにも有用である。導入遺伝子によりコードされるポリペプチドの産生に有用なものの変わりに、またはそれと同様に、宿主細胞は、大量の核酸を精製するために当該核酸に取って代わるための核酸工場として用い得る。当該核酸の多数のコピーは、周知のように、増幅可能遺伝子、例えばジヒドロフォレートレダクターゼ(DHFR)に結合される場合に、細胞内に製造され得る。当該核酸で形質転換された、または核酸が導入された宿主細胞に由来するものを、適切な条件下で、例えば発酵器中で培養し、培養から採取して、核酸を精製するためのプロセッシングを施し得る。精製後、核酸あるいは1つ又はそれ以上のその断片を、所望により、例えば本明細書中の別の箇所で考察されるように、診断または予後検定において用い得る。

新規のLRP-5ポリペプチドアイソフォーム、ならびに突然変異体、対立形質、変異体および誘導体の提示は、最初の間は、これらの分子を特異的に結合し得る抗体の産生を可能にする。

したがって、本発明のさらに別の局面は、その配列が本明細書中の図で示されるポリペプチドと特異的に結合し得る抗体を提供する。このような抗体は、それが結合し得るポリペ

10

20

30

40

50

プチドとそれが全くまたは実質的に全く結合親和性を有さない（例えば、約 1000x より低い結合親和性）その他のヒトポリペプチドとの間で区別され得る存在であるという意味で特異的であり得る。特異的抗体は、多の分子上には存在しないかまたは許容可能でない分子上のエピトープを結合する。本発明の抗体は、野生型ポリペプチドに対して特異的であり得る。本発明の抗体は、下記で考察されるような診断および予後方法に有用であるように、その分子と野生型ポリペプチドとの間のような特定の突然変異体、変異体、対立形質または誘導体ポリペプチドに対して特異的であり得る。抗体は、例えばコード核酸からの組換え体発現による産生後にそれらが結合する単数または複数のポリペプチドを精製する場合にも有用である。

本発明の好ましい抗体は、その他のポリペプチドおよび／または血清無含有成分を結合し得るような夾雑物を含有しない存在であるという意味で、単離され得る。ポリクローナル抗体が本発明の範囲内であるけれども、モノクローナル抗体はいくつかの目的には好ましい。

抗体は、当業界において標準である技術を用いて得られる。抗体産生方法としては、タンパク質またはその断片による哺乳類（例えばマウス、ラット、ウマ、ヤギ、ヒツジまたはサル）の免疫感作が挙げられる。抗体は、当業界で既知の種々の技法のいずれかを用いて免疫感作動物から得られ、好ましくは、抗体の当該抗原との結合を用いてスクリーニングし得る。例えば、ウエスタンブロッティング法または免疫沈降法を用い得る（Armitage et al., 1992, Nature 357:80-82）。動物からの抗体および／または抗体産生細胞の単離は、動物の屠殺工程を伴い得る。

動物をペプチドで免疫感作することに代わるものまたは補うものとして、タンパク質に特異的な抗体が、例えばそれらの表面上に機能性免疫グロブリン結合ドメインを示すラムダバクテリオファージまたは糸状バクテリオファージを用いて、発現化イムノグロブリン可変ドメインの組換え的産生ライブラリーから得られ得る（例えば、WO 92/01047 参照）。ライブラリーは、いずれのタンパク質（または断片）でも免疫感作されていない生物体から得られる配列から構築される自然のものであり得るか、あるいは当該抗原に曝露された生物体から得られる配列を用いて構築されたものであり得る。

動物を免疫感作する場合におよび／または抗 L R P 5 抗体を単離する場合に用いるのに適したペプチドとしては、以下のアミノ酸配列のいずれかが挙げられる：

S Y F H L F P P P S P C T D S S (SEQ ID NO:403)

V D G R Q N I K R A K D D G T (SEQ ID NO:404)

E V L F T T G L I R P V A L V V D N (SEQ ID NO:405)

I Q G H L D F V M D I L V F H S (SEQ ID NO:406)。

本発明の抗体は、多数の方法で修飾され得る。実際、「抗体」という用語は、必要な特異性を伴う結合ドメインを有するあらゆる結合物質を網羅するものと解釈されるべきである。したがって、本発明は、抗体の抗体断片、誘導体、機能的等価物および相同物、例えばその形状が抗原またはエピトープを結合し得る抗体の形状を模する単数または複数の合成分子を網羅する。

抗原またはその他の結合相手を結合し得る抗体断片の例は、V L、V H、C 1 および C H 1 ドメインから成る F a b 断片；V H および C H 1 ドメインから成る F d 断片；抗体の単一腕の V L および V H ドメインから成る F v 断片；V H ドメインから成る d A b 断片；単離 C D R 領域および F (a b ') 2 断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結される 2 つの F a b 断片を含む二価断片である。一本鎖 F v 断片も含まれる。

本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、遺伝子突然変異またはその他の変化を蒙り得る。モノクローナル抗体は組換え D N A 技術の技法を施されて、その他の抗体または元の抗体の特異性を保持するキメラ分子を産生し得る、ということは、さらに、当業者に理解される。このような技法は、イムノグロブリン可変領域または定常部に対する抗体の相補性決定領域 (C D R)、異なるイムノグロブリンの定常部 + 枠組み構造領域をコードする D N A の導入を包含し得る（例えば、欧州特許出願第 1 8 4 1 8 7 号、英国特許出願第 2 1 8 8 6 3 8 号、または欧州特許出願第 0 2 3 9 4 0 0 号参照）。キメラ

10

20

30

40

50

抗体のクローニングおよび発現は、欧州特許出願第 0 1 2 0 6 9 4 号および欧州特許出願第 0 1 2 5 0 2 3 号に記載されている。

所望の結合特性を有する抗体を産生し得るハイブリドーマは、抗体（抗体断片を含む）をコードし、それらを発現し得る核酸を含有する真核または原核生物の宿主細胞と同様に、本発明の範囲内である。本発明は、抗体が産生され、そして好ましくは分泌される条件下で抗体を産生し得る細胞を増殖することを包含する抗体の産生方法も提供する。

試料における抗体の反応性は、適切な手段により確定し得る。個々のレポーター分子によるタグ付は 1 つの可能性である。レポーター分子は、直接または間接的に検出可能な、好ましくは測定可能なシグナルを生成し得る。レポーター分子の連鎖は、直接的であるかまたは例えばペプチド結合を介して間接的、共有的であるか、あるいは非共有的であり得る。ペプチド結合を介しての連鎖は抗体およびレポーター分子をコードする遺伝子融合の組換え発現の結果として存在し得る。

有望な一方式は、分光的に単離される吸光または発光特性を有する各抗体の個々の蛍光色素、リンまたはレーザー染料との共有結合によるものである。適切な蛍光色素としては、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリンおよびテキサスレッドが挙げられる。適切な色原体染料には、ジアミノベンジジンが含まれる。

その他のレポーターとしては、視覚的に観察され、電子工学的に検出され、またはその他の方法で記録される検出可能なシグナルを直接または間接的に生じ得る、着色性、磁性または常磁性の、そして生物学的または化学的に活性な作用物質であるラテックスビーズのような高分子コロイド粒子または粒状物質が挙げられる。これらの分子は、例えば色を発色または変色する、あるいは電気的特性の変化を生じる反応を触媒する酵素であり得る。エネルギー状態間の電子遷移が特徴的スペクトル吸光または発光を生じるように、それらは分子的に励起可能である。それらは、バイオセンサーと一緒に用いられる化学的実体を含み得る。ピオチン / アビジンまたはピオチン / ストレプトアビジンおよびアルカリ性ホスファターゼ検出系が用いられる。

結合の確定方式は本発明の特徴の一つではなく、当業者は彼等の好みおよび一般的知識によって適切な方式を選択し得る。本発明の抗体の特定の実施態様としては、少なくとも 10^{-7} M の親和性で、以下のペプチドの 1 つに結合および / または特異的に結合し得る抗体が挙げられる：

S Y F H L F P P P S P C T D S S (SEQ ID NO:403)

V D G R Q N I K R A K D D G T (SEQ ID NO:404)

E V L F T T G L I R P V A L V V D N (SEQ ID NO:405)

I Q G H L D F V M D I L V F H S (SEQ ID NO:406)。

本発明の抗体は、例えば、考察されたような細胞または細胞溶解物を含有する被験試料中のポリペプチドの存在に関してスクリーニングするのに用い得るし、そして、例えばそのためのコード核酸からの発現によるポリペプチドの産生後に本発明のポリペプチドを精製および / または単離するのに用い得る。抗体は、それらが結合し、したがってポリペプチドが個体における有害作用を有する場合には治療的状況（予防を含み得る）で有用であり得る。

抗体は、例えば被験試料中の特定の物質の存在を確定する場合に抗体を用いるための仕様書を含み得るキットで提供され得る。標識分子、緩衝液、溶出液などのような、1 つ又はそれ以上のその他の試薬が含まれ得る。試薬は、外部環境からそれらを保護する容器、例えば密封容器内に提供され得る。

L R P 5 遺伝子の同定、ならびに I D D M およびその他の疾患とのその関連は、本発明の局面のための方向を固めて、I D D M またはその他の疾患と特異的に関連した変異体形態の遺伝子、特に対立遺伝子または変異体の被験試料中の存在または非存在を確立するための、前記で開示し、考察したような物質および方法の使用を提供する。これは、I D D M またはその他の疾患に対する個体の疾病素質を診断するためのものである。それは、I D D M 4 遺伝子と関連しているような疾患を有する患者の I D D M を診断するためのものである。

これは、適切な治療的および／または予防的処置の計画立案を可能にし、最も有益であると思われるものを標的にすることにより治療の合理化を可能にする。

変異体形態の遺伝子は、（表5または表6に示したような）遺伝子機能を崩壊し得るまたはし得ない、野生型配列と比較した場合の1つ又はそれ以上のヌクレオチドの1つ又はそれ以上の挿入、欠失、置換および／または付加を含有し得る。核酸レベルでの差は、コード化ポリペプチドのアミノ酸配列の差に必ずしも反映されない。しかしながら、遺伝子における突然変異またはその他の差は、フレームシフトまたは停止コドンを生じ得るし、これは（もしあれば）産生されるポリペプチドの性質、あるいはコード化ポリペプチドに対する点突然変異または大きい突然変異的变化、例えば1つ又はそれ以上のアミノ酸またはペプチド中の領域の挿入、欠失、置換および／または付加に重なる影響を及ぼし得る。プロモーター配列またはその他の調節領域における突然変異は、遺伝子からの発現を防止または低減し、あるいはmRNA転写体のプロセッシングまたは安定性に影響し得る。例えば、配列変化は、mRNAの代替的スプライシングに影響を及ぼし得る。考察したように、代替的スプライシングに起因する種々のLRP5アイソフォームは、本発明により提供される。

10

特定の核酸配列、例えば表5または表6に示した変化を含めた本明細書中の任意の図面に示した配列、あるいはその突然変異体、変異体または対立形質の被験試料中の存在または非存在を確定するための種々の方法が存在する。

試験は、ゲノムDNA、cDNAおよび／またはmRNAを含有する調製物に関して実施し得る。cDNAまたはmRNAの試験は、イントロン配列の非存在により核酸の複雑度が低減されるという利点を有するが、しかし調製物の製造に余分の時間と労力を有するという不利益を生じ得る。RNAは、RNAアーゼの広範な出現のために、DNAより操作がより難しい。被験試料中の核酸をシーケンシングし、その配列が本明細書中の図面のいずれかに示した配列と比較して、差が存在するか否かを確定し得る。その場合、差を（例えば、表5または表6に示したような）既知の感受性対立遺伝子と比較して、被験核酸が1つ又はそれ以上の所定の変異を含有するか否かを確定し得るし、あるいはIDD Mまたはその他の疾患との関連に関して差が検査され得る。

20

被験試料中の全核酸、あるいは全LRP5遺伝子をさえシーケンシングすることは一般的に時間または労力効率的であるため、1つ又はそれ以上のプライマー対を用いたPCRのような特定の増幅反応を用いて、核酸中の当該領域、例えばLRP5遺伝子、あるいはIDD Mまたはその他の疾患感受性に関連した多型性が起こる特定の領域を増幅し得る。次に増幅核酸を前記のようにシーケンシングし、および／または他のいずれかの方法で試験して、特定の特徴の存在または非存在を確定し得る。試験用核酸は、細胞から取り出した核酸から、または制限酵素消化および電気泳動のような種々のその他の技法を用いてライブラリ中で調製し得る。

30

核酸は、変異体または対立遺伝子特異性プローブを用いてスクリーニングし得る。このようなプローブは、配列中で、LRP5遺伝子の領域、あるいはIDD Mまたはその他の疾患感受性に関連することが知られている配列変化を含有するその補体に対応する。適切なストリンジェンシー条件下で、核酸を試験するためのこのようなプローブの特異的ハイブリダイゼーションは、被験核酸中の配列変化の存在を示す。有効なスクリーニングのために、1つより多いプローブを同一被験試料に関して用い得る。

40

対立形質または変異体特異的オリゴヌクレオチドを同様にPCRに用いて、被験試料中に存在する場合には特定の配列を特異的に増幅し得る。PCRバンドが遺伝子変異体を含有するか否かの査定は、当業者には浴知られている多数の方法で実施し得る。PCR生成物は、例えば変性ポリアクリルアミドDNAシーケンシングゲル上で、選定中の遺伝子変異体に結びつけられる特異的バンドを伴う多型性を示し得る方法で処理し得る。

配列変異体／突然変異に関してDNA断片をスクリーニングするために、SSCPヘテロ二重型分析を用い得る。それは一般的に、遺伝子の放射能標識化100～300bp断片を増幅し、これらの生成物を希釈して、95℃で変性することを包含する。断片を、DNAが一本鎖形態を保持するように、氷上で急冷する。これらの一本鎖断片をアクリルアミ

50

ドベースのゲルを通して移動させる。配列組成の差は、一本鎖分子にこのゲルマトリックス中で異なる配座を採用させて、それらの動きを野生型断片とは異なるようにし、したがってX線フィルムにゲルを曝露した場合に対照断片に対して分析される断片での突然変異の検出を可能にする。移動性/配座の変化を示す断片をゲルから直ちに切り出して、突然変異に関して直ちにシーケンシングし得る。

PCR生成物のシーケンシングは、イソプロパノールによる沈降、TagFS+染料ターミネーターシーケンシングキットを用いた再懸濁およびシーケンシングを包含し得る。延長生成物をABI377DNAシーケンサー上で電気泳動処理して、シーケンスナビゲーターソフトウェアを用いてデータを分析し得る。

さらに考え得るシーケンシングアプローチは、コンセンサスKozak開始配列およびT7 RNAポリメラーゼプロモーターを含有するプライマーで断片が増幅されるPTT検定を用いる。これらの余分の配列を、それらが分析されている断片の元のコード配列とともに枠内に存在するように、5'プライマーに組み入れられる。これらのPCR生成物を共役転写/翻訳系に導入する。この反応は、断片からのRNAの産生およびこのRNAのタンパク質断片への翻訳を可能にする。対照からのPCR生成物は、分析中の断片のサイズに対して野生型サイズのタンパク質生成物を作る。分析されるPCR生成物がフレームシフトまたはナンセンス突然変異を有する場合、検定は、対照に対して切頭型タンパク質を生じる。切頭型生成物のサイズは突然変異の位置に関連し、この患者からの遺伝子の相対的領域をシーケンシングして切頭型突然変異を同定し得る。

被験試料中の変異体配列の存在を探すための代替物または補体は、例えば適切な特異的オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを用いて、正常配列の存在を探すためである。オリゴヌクレオチドプローブおよびプライマーの使用は、前記により詳細に考察されている。

本発明の実施態様の対立遺伝子または変異体特異的オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーは、表4 (SEQ ID NO:83~317)、表7 (SEQ ID NO:240~317)または表8 (SEQ ID NO:318~333)に示したものから選択し得る。

プローブおよび被験核酸間のハイブリダイゼーションとその後の不適正の検出によるアプローチを用い得る。適切な条件(温度、pH等)下で、オリゴヌクレオチドプローブを、全く相補的であるというわけではない配列とハイブリダイズする。2つの分子間の塩基対合の程度は、不適正であってもそれらがアニーリングするのに十分である。2つのアニーリング核酸分子間の不適正の存在を検出するための種々のアプローチが当業界で周知である。

例えば、RNAアーゼAは、不適正の部位で切断する。切断は、関連の単数または複数のプローブがアニーリングされた被験核酸を電気泳動処理し、そして全長プローブ/被験ハイブリッドより小さい分子(即ちより高い電気泳動移動性を有する分子)を探すことにより、検出し得る。

したがって、IDDMまたはその他の疾患感受性に関連した突然変異が起きることが知られている正常LRP5遺伝子(センスまたはアンチセンス鎖)の領域の配列(例えば、表5および表6参照)を有するオリゴヌクレオチドプローブをアニーリングして、核酸、および確定された不適正の存在または非存在を試験し得る。不適正の存在の検出は、IDDMまたはその他の疾患感受性に関連した突然変異の被験核酸中での存在を示し得る。他方、IDDMまたはその他の疾患感受性に関連した突然変異を含めた遺伝子の領域の配列を有するオリゴヌクレオチドプローブをアニーリングして、核酸、および確定された不適正の存在または非存在を試験し得る。不適正の存在は、被験試料中の核酸が正常配列を有することを示し得る(不適正の非存在は、被験核酸が突然変異を有することを示す)。どちらの場合に、遺伝子の異なる領域に対する一群のプローブを用い得る。

核酸分子中の配列の差の存在は、例えば、1つ又はそれ以上の制限酵素を用いて核酸の試料を切断した場合に生成される制限パターンを、例えば表5または表6に示した変化を含有するような本明細書中の図面に示した正常遺伝子、あるいは変異体または対立遺伝子を含有する試料を同一の単数または複数の酵素で消化して得られるパターンと比較するDN

10

20

30

40

50

Aフィンガープリント法のような制限酵素消化の手段により検出し得る。

プロモーターまたはその他の調節配列中の病変の存在または非存在は、転写によるmRNA産生のレベル、またはmRNAからの転写による翻訳によるポリペプチド産生のレベルを確定することによっても査定し得る。プロモーター活性の確定は、前記に考察されている。

核酸の被験試料は、例えば細胞あるいは生物組織または流体、尿、唾液、糞、頬スワブ、生検または好ましくは血液から核酸を抽出することにより、もしくは羊膜、胎盤または胎児それ自体からの出生前試験のために提供される。

本明細書中の図面のいずれかに示したアミノ酸配列、あるいはそのアミノ酸配列突然変異体、変異体または対立遺伝子を有するポリペプチドのような特定のポリペプチドの被験試料中の存在または非存在を確定するための種々の方法がある。

試料は、本明細書中の図面に示したポリペプチドの1つ又はそれ以上の特定の突然変異体の特異的な抗体（または抗体の混合物）のような特異的結合成分に対する結合相手の存在に関して試験され得る。試料は、本明細書中の図面に示したポリペプチドに特異的な抗体（または抗体の混合物）のような特異的結合成分に対する結合相手の存在に関して試験され得る。このような場合、試料は、例えば考察されたようなレポーター系を用いて結合が確定される前に、特異的結合のための適切な条件下で、特異的結合成分、例えば抗体と接触させることにより試験され得る。抗体のパネルを用いる場合、各々の結合が確定され得るように、各抗体に関して異なるレポーター標識が用いられる。

抗体のような特異的結合成分を用いて、被験試料からその欠五黄相手ポリペプチドを単離および/または精製して、ポリペプチドの配列および/または生物学的分析を可能にし、その配列が本明細書中に開示されたポリペプチドの配列および/または特性をそれが有するか、あるいはそれが突然変異体または変異体形態であるかを確定し得る。アミノ酸配列は、自動シーケンシング機を用いる業界ではルーチンである。

1つ又はそれ以上のポリペプチドを含有する被験試料は、例えば組織または細胞、例えば唾液、糞、または好ましくは血液からの粗製または一部精製細胞または細胞溶解物調製物として、あるいは羊膜、胎盤または胎児それ自体から出生前試験のために提供され得る。個体に与えられるものがポリペプチドであろうと、抗体、ペプチド、核酸分子、小分子、または本発明の製薬上有用なその他の化合物であろうと、投与は、好ましくは「予防的有効量」または「治療的有效量」（場合次第で、予防は治療と考えられ得る）であって、これは個体に利益を示すのに十分である。投与される実際量、ならびに投与の速度および経時的経過は、治療されているものの性質および重症度による。治療の処方箋、例えば投与量の決定等は、開業医およびその他の医師が責任を負う。

組成物は、治療条件によって、単独でまたはその他の治療と組合せて、同時にまたは順次問うよされ得る。

本発明の、そして本発明にしたがって用いるための製剤組成物は、活性成分の他に、製薬上許容可能な賦形剤、担体、緩衝剤、安定剤または当業者に周知のその他の物質を含み得る。このような物質は非毒性でなければならず、そして活性成分の効力を妨害すべきでない。担体またはその他の物質の的確な性質は投与経路によっており、これは経口投与、あるいは例えば皮内、皮下または静脈内注射による投与であり得る。

経口投与のための製剤組成物は、錠剤、カプセル、粉末または液体形態であり得る。錠剤は、固体担体、例えばゼラチンまたはアジュバントを含み得る。液体製剤組成物は、一般に、液体担体、例えば水、石油、動物または植物油、鉱油あるいは合成油を含む。生理的食塩溶液、デキストロースまたはその他の糖類溶液、あるいはグリコール、例えばエチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールが含まれ得る。

静脈内、皮膚または皮下注射、あるいは罹患部位での注射のためには、活性成分は、発熱物質無含有で、適切なpH、等張性および安定性を有する非経口的に許容可能な水性溶液の形態である。関連当業者は、例えば等張ビヒクルを用いて適切な溶液、例えば塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、または乳酸化リンガー注射液を調製し得る。防腐剤、安定剤、緩衝剤、酸化防止剤および/またはその他の添加剤を、必要な場合は、含入し得る

10

20

30

40

50

。

標的化療法を用いて、抗体または細胞特異的配位子のような標的系の使用により、一定の種類細胞により特異的に活性成分を供給し得る。標的化は、以下の種々の理由から望ましい：例えば、薬剤が許容可能でないほど有毒である場合、あるいはそうでなければ非常に高い投与量を要する場合、そうでなければ標的細胞を入れることができない場合。

薬剤を直接投与する代わりに、それは、細胞に導入されたコード遺伝子からの発現により標的細胞中で、例えばウイルスベクター中で産生され得る（下記参照）。ベクターは、治療される特定の細胞に対して標的化され得るか、またはそれは標的細胞により多少選択的にスイッチオンされる調節素子を含み得る。ウイルスベクターは、特異的結合分子、例えば糖、糖脂質またはタンパク質、例えば抗体またはその結合断片を用いて標的化され得る。核酸は、ポリリシンを介してタンパク質配位子（例えば抗体またはその結合断片）に連結することにより標的化され、配位子は標的細胞の表面上に存在する受容体に特異的である。

10

薬剤は、治療される細胞中で産生されるかまたはそれに対して標的化される活性化剤による活性形態への転換のために、前駆体形態で投与され得る。この型のアプローチは、時として ADEPT または VDEPT として知られている：前者は細胞特異的抗体との結合により細胞に対して活性化剤を標的化することを包含し、一方後者はウイルスベクター中でのコード DNA からの発現によりベクター中での活性化剤、例えば酵素を産生することを包含する（例えば欧州特許出願第 4 1 5 7 3 1 号および WO 9 0 / 0 7 9 3 6 参照）。

例えば真正生物学的活性 LRP5 ポリペプチドまたはその機能的断片をコードする本発明の核酸は、活性ポリペプチドを合成できない、またはそれを正常レベルで合成できない患者を治療するための遺伝子療法の方法に用い、それにより IDDM および / または 1 つ又はそれ以上のその他の疾患の 1 つ又はそれ以上の症状を治療しおよび / または予防する目的で野生型により提供される効果を提供し得る。

20

ウイルスベクターのようなベクターは、広範な種々の異なる標的細胞中に遺伝子を導入するために用いられてきた。典型的には、ベクターは、望ましいポリペプチドの発現からの有用な治療的または予防的効果を提供するのに十分な割合の細胞でトランスフェクションが起こり得るように、標的細胞に曝露される。トランスフェクト化核酸は、標的細胞の各々のゲノム中に恒久的に組み入れられて、長期持続性効果を提供し得るし、あるいは治療は定期的に反復されねばならない。

30

種々のベクターは、ウイルスベクターおよびプラスミドベクターとともに、当業界で公知である（例えば米国特許第 5, 2 5 2, 4 7 9 号および WO 9 3 / 0 7 2 8 2 参照）。特に、多数のウイルス、例えばアデノウイルス、パポウイルス、例えば SV40、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、例えば HSV および EBV、ならびにレトロウイルス、例えばテナガザル白血病ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ベネズエラ脳脊髄炎ウイルス、モロニーネズミ白血病ウイルス、そしてネズミ乳腺癌ウイルスが遺伝子導入ベクターとして用いられてきた。従来技術における多数の遺伝子療法プロトコールは、無能化ネズミレトロウイルスを用いた。

無能化ウイルスベクターは、汗腺性ウイルス粒子の産生に必要な遺伝子が発現されるヘルパー細胞株中で産生される。ヘルパー細胞株は、一般に、ウイルスゲノムを包装し、核酸を含有しないビリオンを産生するメカニズムにより認識される配列を欠いている。無傷パッケージングシグナルを供給される遺伝子またはその他の配列（例えば LRP5 ペペまたはその断片をコードする）とともに含有するウイルスベクターは、ヘルパー細胞内で感染性ビリオン粒子中に包装され、これは次に遺伝子供給のために用いられる。

40

細胞中に核酸を導入するその他の既知の方法としては、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム同時沈降、機械的技法、例えばマイクロインジェクション、リポソームにより媒介される導入、ならびに直接 DNA 摂取および受容体介在性 DNA 導入が挙げられる。リポソームは、細胞への供給のために RNA、DNA およびビリオンを封入し得る。pH、イオン強度および二価陽イオンのような因子が存在することにより、リポソームの組成物が特定の細胞または組織の標的に向くように作り上げられる。リポソームはリン脂質を

50

含み、そして脂質およびステロイドを含み得るし、このような成分の各々の組成は変えられる。リボソームの標的化は、特異的結合対成員、例えば抗体またはその結合断片、糖または糖脂質を用いてもなし遂げ得る。

ポリペプチドをコードする核酸またはその活性部分を用いる遺伝子療法の目的は、野生型ポリペプチドのレベルが存在しないか低減化量でしか存在しない細胞中での核酸の発現生成物の量を増大することである。このような処置は、IDD M 4 感受性対立遺伝子を、したがって疾病に対する疾病素質を有することがスクリーニングまたは試験により知られている個体の治療において特に、治療的または予防的であり得る。

同様の技法は、遺伝子発現のアンチセンス調節に、例えば突然変異体形態の遺伝子が発現される細胞に対するアンチセンス核酸分子の標的化に用いられ、その目的は突然変異体遺伝子生成物の産生を低減することである。遺伝子の特異的ダウンレギュレーションへのその他のアプローチは周知であり、その例としては、例えば特定の核酸配列を切断するよう意図されたりボザイムの使用が挙げられる。リボザイムは核酸分子、実際には、限定配列で一本鎖RNA、例えばmRNAを特異的に切断するRNAであり、それらの特異性は工学処理され得る。ハンマーヘッドリボザイムは、それらが約11~18塩基長の塩基配列を認識し、したがって約4塩基長の配列を認識するテトラヒメナ型のリボザイムより大きい特異性を有するために好ましいが、しかし後者の型のリボザイムはある種の環境では有用である。リボザイムの使用に関する参考文献としては、Marschall, et al. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1994, 14(5):523; Hasselhoff, *Nature* 334:585 (1988) およびCech, J. *Amer. Med. Assn.*, 260:3030 (1988) が挙げられる。

前記ですでに説明済みの添付の図面ならびに実験例を参照しながら、本発明の局面をここで説明するが、例はそれらに限定されない。さらなる局面および実施態様は、当業者には明らかである。本明細書中に言及した文献はすべて、参照により本明細書中に含まれる。

実施例 1

LRP5のクローニング

前記のように、IDD M 疾病素質に関する18の考え得る遺伝子座のうちの2つに対する連鎖の確証を、2組の家族(102の英国家族および84の米国家族)、即ち染色体11q13上のIDD M 4 (MLS 1.3、FGF3で $P=0.01$)と染色体6q上のIDD M 5 (MLS 1.8、ESRで $P=0.003$)の分析により成し遂げた。IDD M 4 では、最も有意の連鎖は、HLAで1または0個の対立形質IBDを共有する家族の小集団で得られた($MLS=2.8$; $P=0.0002$; $1s=1.2$) (Davies et al., 1994)。この連鎖は、Hashimoto等(1994)も251の同胞対を用いて得ており、全同胞対で $P=0.0008$ であった。これらの結果を併合すると、596家族で、IDD M 4 に関する実質的支持が示されている($P=1.5 \times 10^{-6}$) (Todd and Farrall, 1996; Luo et al., 1996)。

FGF3領域におけるその他のマーカーを用いた多点分析は、FGF3およびD11S1883で2.3のMLSを生じ($1s=1.19$)、そしてマーカーD11S903およびD11S527に側面を接する27cM領域に対する間隔を描いた(図1)。

多点連鎖分析は、数千の多様な家族を利用できない限り、小領域に遺伝子を局限できない。代わりに、疾患遺伝子を含有する間隔を2cM未満または2M塩基に狭め得る希少単一遺伝子疾患に関して関連マッピングを用いた。しかし、この方法は予測可能性が低く、共通疾患に関するポリジーン的位置を定めるために従来用いられなかった。連合マッピングを用いてIDD M 2 / INS ポリジーン的位置をつきとめたが、しかしこれは機能的に候補となりそうな多型/遺伝子の選択により、非常に小さい領域($<30\text{ kb}$)に制限された。IDD M 4 領域を2cM未満に描くために、連鎖不均衡(LD)または連合試験を実施した。理論では、始祖突然変異に非常に近い特定の対立形質の連合は、その始祖から下降した集団で検出される。伝達不均衡試験(TDT, Spielman et al., 1993)は、親からのマーカー遺伝子座から影響を受けた子への対立形質の伝達の50%からの偏差を査定することにより、連合を測定する。連合の検出は、いくつかの始祖染色体の存在が連合を検出するパワーを低減する可能性を低減するために、できるだけ均質であるべき試験され

る各集団の祖先の系統によっている。

I D D M 4 連鎖間隔 L D にまたがるマーカーの分析は、5 5 4 家族における D 1 1 S 1 9 1 7 (U T 5 6 2 0) で検出された ($P = 0 . 0 1$)。約 5 0 0 k b を包含するこの領域の物理的地図は、p a c、b a c およびコスミドコンテイングを構築することにより成し遂げられた (図 2)。アガロースにより分解され、サザンブロット処理された制限酵素消化クローンでのマーカーのハイブリダイゼーションにより、その領域を物理的にマッピングした。4 つの異なる集団 (英国、米国、サルジニアおよびノルウェー) からの 1 2 8 9 家族内で、さらなるマイクロサテライト (とともに発表済み。マイクロサテライト奪回によりクローンから単離されたもの) を分析した。L D グラフを構築した。ピークは H 0 5 7 0 P O L Y A で、 $P = 0 . 0 0 1$ であり、マーカー D 1 1 S 9 8 7 および 1 8 0 1 8 A C と側面を接した (図 3)。多形マーカーで検出される L D は、対立形質頻度の影響を受け、突然変異が 1 型糖尿病に対する感受性を生じようとして、L D における対立形質が防御性または中性染色体上のものと同じの対立形質である染色体上に生じる。分析されているマーカーが感受性および防御性遺伝子型を有する L D における同一対立形質を有する場合、これらは単一点分析により検出されないままで、互いに効果を相殺し、疾病遺伝子座を有する L D に関する証拠をほとんどまたは全く示さない。これから生じる本方法の予測不可能性は、前記ですでに述べている。

各マーカーを用いて得られる情報を最大にするために、3 点回転 L D 曲線を、I D D M 4 マーカーを用いて作製した (図 4)。この場合、伝達パーセンテージ (% T) は、マーカーおよびその 2 つのすぐ側面のマーカーから算出し、それらから平均を出して、変動対立形質頻度の作用を最小にした。これは H 0 5 7 0 P O L Y A でピークを生じ、 $P = 0 . 0 4$ であったが、このことは、I D D M 4 突然変異が間隔 E 0 8 6 4 C A ~ D 1 1 S 1 3 3 7 (7 5 k b) にあると思われることを示す。

1 型糖尿病との関連を示すこの 7 5 k b 間隔の同定により、疾患関連ハプロタイプを同定した。これらは、糖尿病突然変異または突然変異 I D D M 4 が生じた元の始祖染色体に由来する。1 型糖尿病に対する感受性を引き起こす突然変異を同定するために、単一ヌクレオチド多形性 (S N P) およびハプロタイプを基礎にした厳密な連鎖不均衡曲線を構築する。S N P は、マイクロサテライト分析から同定された特異的ハプロタイプを有する個体をシーケンシングすることにより同定する：1 型糖尿病に感受性のホモ接合型、1 型糖尿病に防御性のホモ接合型、および対照。これらの S N P のうちの 1 つは病理性突然変異 I D D M 4 であり、あるいは原発性疾患遺伝子座と非常に強い連鎖不均衡性であり、したがって厳密な極性のピークに存在し得る。クロスマッチ分析は、この方法による I D D M 2 突然変異の位置限局化により示されるように、S N P 候補の数をさらに低減する (Bennett et al., 1995; Bennett and Todd, 1996)。これは、候補 S N P 対立形質の連合または伝達が異なるハプロタイプバックグラウンドで試験され得るように、主要感受性または防御性ハプロタイプからの対立形質の異なる整列を有する別個のハプロタイプまたは始祖染色体の同定を必要とする。遺伝子機能または調節に及ぼす作用に関して、突然変異候補を査定し得る。

異なる集団において、異なる I D D M 4 突然変異が同一遺伝子に生じた可能性がある。I D D M 4 に関する、そして同一遺伝子に群集する突然変異候補を同定するために異なる集団からの数名の無関係な個体からのいくつかの推定上の始祖染色体または疾患関連ハプロタイプを、我々はシーケンシングする。

D N A 突然変異または多形性に関する広範な調査を実施するために、全領域および関連領域と側面を接する領域をシーケンシングした (7 5 k b コア領域および 1 2 5 k b の側面に位置する D N A)。D N A 配列は、遺伝子同定を促し、c D N A 選択のような遺伝子同定または D N A シーケンシングおよび相同マウスゲノム D N A の比較分析による遺伝子同定のその他の方法と相補的である。

この領域内の考え得るコード配列を同定したい場合には、種々の戦略：シーケンシング、推定エキソンおよびプロモーターのコンピューター予測、ならびに c D N A 選択を用いて、この間隔内の全遺伝子を同定する可能性を増大しようとした。

ショットガンシーケンシングのためのライブラリの構築

コスミド、BAC（細菌人工染色体）、またはPAC（P1人工染色体）から、DNAを調製した。ベクターを含有する細胞を、適切な抗生物質を補充したLuria-Bertani（LB）寒天平板上に画線した。単一コロニーを用いて、適切な抗生物質を補充し、37℃で一夜増殖させた200mlのLB培地に接種した。遠心分離により細胞をペレット化し、QIAGEN（Chatsworth, CA）Tip 500 Maxi プラスミド/コスミド精製プロトコールに以下の修正を加えて、プラスミドDNAを調製した：100mlの培養からの細胞を各Tip 500 カラム用に用い、溶離緩衝液のNaCl濃度を0.25Mから1.7Mに増大し、溶離緩衝液を65℃に加熱した。

精製BACおよびPAC DNAをNotI制限エンドヌクレアーゼで消化した後、BioRad CHEF マッパーシステム（Richmond, CA）を用いて、パルスフィールドゲル電気泳動処理を施した。消化DNAを、0.5×トリスホウ酸塩EDTA（10×ストック溶液、Fisher, Pittsburg, PA）を用いて調製した1%低融解温度アガロース（BioRad, Richmond, CA）ゲル中で一夜電気泳動処理した。時間および電圧の切り換えのために、CHEF マッパー自動計算デフォルト値設定を用いた。電気泳動処理後、ゲルを臭化エチジウム（Sigma, St. Louis, MO）で染色し、紫外線トランスイルミネーターで可視化した。挿入バンド（単数または複数）をゲルから切り取った。メーカーの使用説明書にしたがってアガラーゼ（New England Biolabs, Beverly MA）消化によりゲルスライスから、DNAを溶離した。DNAおよび消化アガロースを含有する溶液を2mlの容量中の50mMのトリスpH8.0、15mMのMgCl₂および25%グリセロールに移して、AERO-MISTネビュライザー（CIS-US, Bedford, MA）に入れた。ネビュライザーを窒素ガス供給源に取り付形質転換、DNAを、10psiで30秒間、無作為に剪断した。剪断DNAをエタノール沈降させて、TE（10mMのトリス、1mMのEDTA）中に再懸濁させた。緑豆ヌクレアーゼ（Promega, Madison, WI）を用いて30℃で30分間処理し、その後フェノール/クロロホルム抽出し、40μMのdNTPの存在下で、16℃でマルチコア緩衝液（Promega, Madison, WI）中のT4 DNAポリメラーゼ（GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD）で処理して、末端を平滑にした。DNA断片のサブクロニングを促進するために、BstXIアダプター（Invitrogen, Carlsbad, CA）を、T4 DNAリガーゼ（Promega, Madison, WI）を用いて14℃で一夜、断片に結紮した。メーカーの使用説明書にしたがって、cDNAサイジングカラム（GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD）を用いたカラムクロマトグラフィーにより、アダプターおよび500bp未満のDNA断片を除去した。1kbより大きいDNAを含有する分画をプールし、エタノール沈降により濃縮した。BstXIアダプターを含有するDNA断片を、pcDNAII（Invitrogen, Carlsbad, CA）からのBstXI部位をpBlueScript（Stratagene, La Jolla, CA）のBssHIIIIIII部位にサブクロニングすることにより構築されたpSHOTIIIIIIのBstXI部位に結紮した。BstXI制限エンドヌクレアーゼで消化してpSHOTIIIIIIを調製し、アガロースゲル電気泳動で精製した。以下のPrep-A-Gene（BioRad, Richmond, CA）プロトコールにより、アガロースからゲル精製ベクターDNAを抽出した。ベクターのそれ自体との結紮を低減するために、消化ベクターを仔ウシ腸ホスファターゼ（GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD）で処理した。DNA断片とクローニングベクターとの結紮反応物を、超コンピーチントXL-2Blue細胞（Stratagene, La Jolla, CA）中で形質転換して、100μg/mlのアンピシリンを補充したLB寒天平板上に載せた。個々のコロニーを、アンピシリンを補充した100μl/ウエルのLBブロスを含む96ウエルプレート中に摘み入れて、37℃で一夜増殖させた。約25μlの滅菌グリセロールを各ウエルに付加し、培養を-80℃で保存した。

プラスミドDNAの調製

手動で、または96ウエルからの5mlのブロスを含む96本の試験管に接種するようプログラムされたTecan Genesisi RSP 150ロボット（Tecan AG, Hombrechtikon, Switzerland）を用いて、100μg/mlのアンピシリンを補充した5mlのLBブロスを接種するために、グリセロールストックを用いた。培養を、曝気を提供するために振盪しな

10

20

30

40

50

から37℃で一夜増殖させた。細菌細胞を遠心分離によりペレット化し、上清をデカントして、細胞ペレットを-20℃で保存した。Qiawell Ultraプロトコールにしたがって、QIAGEN Bio Robot 9600 (QIAGEN, Chatsworth, CA) を用いて、プラスミドDNAを調製した。挿入物の頻度およびサイズを試験するために、プラスミドDNAを制限エンドヌクレアーゼPvuIIで消化した。制限エンドヌクレアーゼ生成物のサイズをアガロースゲル電気泳動により検査した結果、平均挿入物サイズは1~2 kbであった。

ショットガンクローンのDNA配列分析

AmpliTag DNAポリメラーゼ、FSを用いるABI PRISM染料ターミネーターサイクルシーケンシング即時反応キット (Perkin Elmer, Norwalk, CT) を用いて、DNA配列分析を実施した。DNA配列分析は、M13前方および逆プライマーを用いて実施した。Perkin-Elmer 9600での増幅後、延長生成物を精製し、ABI PRISM 377自動シーケンサー (Perkin Elmer, Norwalk, CT) で分析した。検査されるDNA 1 kb当たり約12~15のシーケンシング反応を実施し、例えば100 kbのPAC挿入物に対して1500反応を実施した。

DNA配列のアッセンブリー

DNA配列アッセンブリーのために、Phred/Phrapを用いた。このプログラムはPhil Green博士により開発され、ワシントン大学 (Seattle, WA) から認可された。Phred/Phrapは以下のプログラムから成る：塩基呼出のためのPhred、配列アッセンブリーのためのPhrap、配列比較のためのクロスマッチ、データの可視化のためのConsedおよびPhrapview、ならびにそれぞれの配列をスクリーニングするためのRepeatmasker。クロスマッチによりベクターおよび大腸菌DNA配列を同定し、DNA配列アッセンブリー工程から除去した。DNA配列アッセンブリーは、デフォルトPhrapパラメーターを用いるSun Enterprise 4000サーバーランニングSolaris 2.51オペレーティングシステム (Sun Microsystems Inc., Mountain View, CA) 上に存在した。ConsedおよびPhrapviewを用いて、配列アッセンブリーをさらに分析した。

アッセンブリー化DNA配列の生物情報分析

アッセンブリー化DNA配列が当該領域の5~6倍の適用範囲に近づいたときに、プログラムGRAIL (ApoCom, Oak Ridge) のエキソンおよびプロモーター予測能力を用いて遺伝子同定に役立てた。ApoCom GRAILは、Lockheed Martin Energy Research CorporationおよびApoCom Client Tool for Genomics (ACTG) TMによりApoCom Inc. に認可されたDepartment of Energy開発GRAIL Gene Characterization Softwareの商業バージョンである。

アッセンブリーの種々の段階のDNA配列を、デフォルトパラメーターに関してBLAST算法 (S.F. Altschul, et al., (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410) を用いて、GenBankデータベース (主体) 中のDNA配列に対して問いただした。DNAの大型連続配列を調べる場合、哺乳類のそれぞれの要素のデータベースとのクロスマッチによる同定後、それぞれの要素を遮蔽した。BLAST分析後、Guochun Xie博士 (Merck Research Lab) が著した分析者プログラムにより結果を収集した。分析者は、 10^{-6} より大きいP値の類似性を有する各々のDNA配列に関するデータベースから、以下の情報を提供した；配列の注釈名、それが得られたデータベース、類似性の領域の長さおよびパーセント同一性、ならびに疑問物と主体との類似性の所在。

BLAST分析は、我々が得たDNA配列とデータベース中に存在する多数のヒトEST配列との間の100 bpより大きい長さに亘る高度の類似性 (90~100%同一) を同定した。これらのヒトEST配列は、受入番号：R73322、R50627、F07016で表される群に集まった。概して、各EST集団は単一遺伝子を表すと推測される。424のヌクレオチドのR73322集団中のDNA配列は、LDL受容体関連タンパク質 (GenBank受入番号X13916) およびLDL受容体族のいくつかのその他の成員をコードする遺伝子に対するより低い、しかし有意の程度のDNA配列類似性を有した。したがって、EST R73322と高度に類似した配列はLDL受容体族の成員をコー

10

20

30

40

50

ドすると結論された。

各 E S T 集団の成員を、プログラムSequencher (Perkin Elmer, Norwalk CT) を用いて組み立てた。データベースから抽出される E S T 配列データの精度を増大するために、ショットガンシーケンシングから得られるゲノム D N A 配列からの関連クロマトグラムトレースファイルをアッセンブリーに含めた。修正 E S T 配列を、B L A S T および B L A S T X により再分析した。受入番号 R 5 0 6 2 7 で表される E S T 集団 3 に関して、編集した E S T アッセンブリーの分析は、この集団が L D L 受容体族の成員に類似することを明示した。この結果は、これら 2 つの E S T 集団が同一遺伝子の成分であるという可能性を示唆した。

実験的に得られた c D N A 配列を、プログラムSequencher (Perkin Elmer, Norwalk CT) を用いて組み立てた。ゲノム D N A 配列および c D N A 配列を、エキソンの所在の迅速且つ高感度の検出を可能にするプログラムCrossmatchを用いて比較した。次に、プログラムGeneWorks (Intelligenetics Inc., Campbell CA) を用いることによりゲノムおよび c D N A 配列を手動で比較して、イントロン/エキソン境界の同定を成し遂げた。

ノーザンブロット分析

プライマー 2 5 6 F および 6 2 2 R (表 2) を用いて、胎児脳 c D N A ライブラリーからの 3 6 6 b p の P C R 生成物を増幅した。この生成物をアガロースゲル上で精製し、D N A を抽出して、p C R 2 . 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中でサブクロニングした。3 6 6 b p プローブを、5 0 ~ 1 0 0 u C i の 3 0 0 0 C i / m m o l [32 P] d C T P (DuPont/NEN, Boston, MA) の存在下で、Amersham Rediprimeキット (Arlington Heights, IL) を用いた無作為プライミングにより標識した。非混入ヌクレオチドを、ProbeQuant G-50回転カラム (Pharmacia/Biotech, Piscataway, NJ) を用いて除去した。迅速ハイブリダイゼーション緩衝液 (Clontech, Palo Alto, CA) 中の 1×10^6 c p m / m l より高い濃度の放射能標識化プローブを、ヒト多組織ノーザン I および I I (Clontech, Palo Alto, CA) とともに、6 5 ° で一夜インキュベートした。ブロットを 2 x S S C、0 . 1 % S D S (2 0 x S S C および 2 0 % S D S ストック溶液 (Fisher, Pittsburgh, PA) から調製) 中で、室温で 2 回の 1 5 分インキュベーション、そしてその後の室温で 1 x S S C、0 . 1 % S D S 中での 2 回の 1 5 分インキュベーション、ならびに 6 0 ° で 0 . 1 x S S C、0 . 1 % S D S 中での 2 回の 3 0 分インキュベーションにより、ブロットを洗浄した。ブロットのオートラジオグラフィ処理を実施して、放射能標識化プローブと特異的にハイブリダイズしたバンドを可視化した。

プローブは、胎盤、肝臓、脾臓および前立腺で最も高度に発現される約 5 ~ 5 . 5 k b の m R N A 転写体とハイブリダイズした。それは、肺、骨格筋、腎臓、脾臓、胸腺、卵巣、小腸および結腸では中間レベルで発現される。メッセージは、脳、精巣および白血球では低レベルで発現される。転写体が高度に発現される組織、例えば肝臓および脾臓では、7 k b および 1 . 3 k b の付加的バンドが観察される。

全長 c D N A の単離

P C R ベースの技法を用いて、E S T に高度に類似した領域およびエキソン予測ソフトウェア (G R A I L) により同定される領域を延長した。用いた一技法は、低減複雑度 c D N A 分析 (R C C A) と呼ばれる c D N A 末端の迅速増幅 (R A C E) に関する変法であり、同様の手法は、Munroe et al. (1995) PNAE 92:2209-2213 および Wilfinger et al. (1997) BioTechniques 22:481-486 により報告されている。この技術は、約 2 0 , 0 0 0 c D N A クローンのプールである P C R 鋳型によっており、これは鋳型の複雑度を低減し、より長い P C R 延長の可能性を増大する。c D N A を延長するために用いられた第二の技法は、遺伝子の一部である可能性を有するゲノム配列、例えば E S T に非常によく似た配列と、G R A I L により同定される配列で同定される領域間の P C R である。これらの P C R 反応は、SuperScript選択系 (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) を用いて約 5 u g の m R N A (Clontech, Palo Alto, CA) から調製される c D N A で実施された。一次鎖 c D N A 合成は、反応当たり 1 u g のオリゴ (d T) ₁₂₋₁₈ プライマーおよび 2 5 u g の無作為ヘキサマーを用いて下準備された。二次鎖 c D N A 合成は、メーカーの使用説明書にし

10

20

30

40

50

たがって実施した。

E S T 集団 1 に関連した付加的エキソンの同定

プライマー 2 5 6 F および 6 2 2 R を用いて 3 6 6 b p P C R 生成物を増幅することにより、ウエル当たり 2 0 , 0 0 0 クローンの 9 6 ウエルのヒト胎児脳プラスミドライブラリを走査した。反応ミックスは、4 u l のプラスミド DNA (0 . 2 n g / m l)、1 0 m M のトリス - H C l、p H 8 . 3、5 0 m M の K C l、1 0 % スクロース、2 . 5 m M の M g C l₂、0 . 1 % テトラジン、2 0 0 m M の d N T P、1 0 0 n g の各プライマー、および 0 . 1 u l の Tag Gold (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) で構成された。総反応容量 1 1 u l を 9 5 ° で 1 2 分間、その後、9 5 ° で 3 0 秒間、6 0 ° で 3 0 秒間および 7 2 ° で 3 0 秒間のサイクルを 3 2 回、インキュベートした。約 2 0 ウエルが、P C R 分析により正しい 3 6 6 b p 断片を含有することが判明した。5 ' および 3 ' R A C E を、その後、ベクター特異的プライマーおよび遺伝子特異的プライマーを用いて、プラスミド c D N A ライブラリーを含有するいくつかの陽性ウエルで実施した。挿入物の配向が分からないため、ベクター特異的プライマー、P B S 5 4 3 R および P B S 8 7 3 F をともに、遺伝子特異的プライマー 1 1 7 F および 5 1 8 R と組合せて用いた。P C R 増幅条件は、1 x TaKaRa 緩衝液 L A、2 . 5 m M の M g C l₂、5 0 0 m M の d N T P、0 . 2 u l の TaKaRa L A タッグポリメラーゼ (PanVera, Madison WI)、1 0 0 u g の各プライマー、および 5 u l のプラスミドライブラリー (0 . 2 n g / m l) で構成された。総反応容量 2 0 m l で、熱サイクル条件を以下に示す：9 2 ° で 3 0 秒、その後 9 2 ° で 3 0 秒、6 0 ° で 1 分間、そして 6 8 ° で 1 0 分間。初期 P C R 増幅後、入れ子式ベクタープライマー P B S 5 7 8 R および P B S 8 3 8 F、ならびに種々の遺伝子特異的プライマー (2 5 6 F、3 4 3 F、6 2 3 R および 6 5 7 R) を用いて、入れ子式または半入れ子式 P C R 反応を実施した。標準プロトコールを用いて、Q I A G E N、Q I A q u i c k P C R 精製回転カラムを用いて、非混入化 d N T P およびプライマーから、P C R 生成物を分離し、3 0 u l の水中に再懸濁した。入れ子式および半入れ子式 P C R に関する増幅条件は初期 P C R 増幅と同一であったが、但し、3 u l の精製 P C R 断片を鋳型として用い、循環条件は 2 0 回だけであった。この P C R 増幅から得られた生成物を 1 % アガロースゲル上で分析し、切り取った断片を、Q I A G E N、Q I A q u i c k 回転カラムを用いて精製し、A B I 染料ターミネーターシーケンシングキットを用いてシーケンシングした。標準プロトコールにしたがって、A B I 3 7 7 シーケンサーで生成物を分析した。

E S T 集団 1 ~ 3 のつながり

前記のように、各 E S T 集団は単一遺伝子を表し、あるいは E S T 集団は同一遺伝子の一部分であり得る、と考えられる。これら 2 つの可能性を区別するために、プライマーは、E S T 受入番号 F 0 7 0 1 6 (集団 2、2 7 2 ヌクレオチドを含有) および R 5 0 6 2 7 (集団 3、1 1 7 7 ヌクレオチドを含有) で表される領域における 2 つの多くの E S T 集団に対して指示された。P C R 反応において、集団 1 (1 1 7 F および 4 9 9 F) からのプライマーを E S T 集団 3 (4 0 3 4 R) と対にした。メーカーにより供給された反応緩衝液中の TaKaRa LA Tag ポリメラーゼ (Panvera, Madison, WI) を用いて、0 . 3 2 m M の d N T P、プライマーおよび約 3 0 n g のリンパ節 c D N A を付加して、5 0 u l の反応を実施した。P C R 生成物を、9 4 ° で 3 0 秒、6 0 ° で 3 0 秒、そして 7 2 ° で 4 分間の周期を 3 5 回繰り返して増幅した。生成物を 1 % アガロースゲル上で電気泳動処理して、2 . 5 および 3 k b のバンドを切り取り、p C R 2 . 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中でサブクロニングして、D N A 配列分析のためにプラスミド DNA を調製した。

E S T 集団 1 (6 3 8 F) および E S T 集団 3 (4 1 7 3 R) においてプライマーにより精製された前記の一次反応物を、E S T 集団 1 (6 3 8 F) および E S T 集団 2 (3 5 5 6 R) からのプライマーとの反応のための鋳型として利用した。この半入れ子式 P C R 反応は、前段落に記載した TaKaRa LA Tag ポリメラーゼを用いて実施した。約 2 k b の生成物を生成し、D N A 配列分析のためにサブクロニングした。これらの P C R 生成物の D N A 配列結果ののアッセムブリは、E S T 集団 1 ~ 3 が同一遺伝子の一部であり、この遺伝子により産生される m R N A 転写体中で、互いに対するそれらの配向を確定されるこ

とを示した。

P C R 反応は、E S T 集団 2 と 3 の間でも実施された。5 0 6 1 R (集団 3) と組合せて、プライマー 2 5 1 9 F、3 0 1 1 F または 3 1 5 4 F (集団 2) とともに、TaKaRa LA Tag ポリメラーゼ (Panvera, Madison, WI) を用いた肝臓 c D N A からの増幅を、9 5 で 3 0 秒、6 0 で 6 0 秒、7 2 で 3 分間の周期を 3 5 回、実行した。P C R 生成物をゲル精製し、サブクローニングして、D N A 配列を確定した。これらの P C R 生成物すべての末端の D N A 配列分析はほとんどの c D N A 配列をもたらしたが、しかしながら、両鎖の完全 D N A 配列を提供するために、オリゴヌクレオチドプライマーを設計し、D N A シーケンシングのために用いた (図 5 (a) (SEQ ID NO:1))。

5 ' 末端の延長

R C C A 分析を用いて、前記のような内部遺伝子特異的プライマーを用いることにより 5 ' を延長した多数のクローンを得た。いくつかのクローン延長が単離されたが、しかしながら分析したクローンのほとんどがエキソン A 内で停止した。あるクローンはエキソン A の 5 ' 末端を過ぎて延長されたが、しかしその配列はゲノム D N A と連続しており、一団の証拠はエキソン A の 5 ' 末端でイントロン / エキソン境界を示すために、この延長は非プロセッシング化イントロン配列の結果であると考えられる。二次クローン h 1 0 は、この点を過ぎて延長したが、しかしゲノム D N A 配列とは異なった。これは、元の胎児脳 c D N A ライブラリーに存在したキメラクローンを表すと結論づけられた。

アイソフォーム 1 の 5 ' 末端の同定

前記のように、R C C A 実験からの結果は、エキソン A の 5 ' 末端で終結する多数の別々のクローンを生じた。これは、ヒト L R P 5 遺伝子が逆転写酵素が転写の難しさを有する領域を含有することを示唆した。この問題を回避するためには、D N A 配列内容物の微妙な差がある領域を転写する酵素の能力を変え得るため、L R P 5 のマウスオルトログを単離することを決定した。マウス遺伝子の 5 ' 部分を単離する可能性を増大するために、前記の、そしてエキソン A および B に由来する 3 6 6 ヌクレオチドのヒトプローブを用いた。

Clontech (Palo Alto, CA) から購入したマウス肝臓 m R N A から、c D N A ライブラリーを構築した。メーカーの使用説明書にしたがって、SuperScript Choice 系 (Gibco/BRL Gaithersburg, MD) をもちいて c D N A を調製した。リン酸化 B s t X I アダプター (Invitrogen, San Diego, CA) を約 2 u g のマウス肝臓 c D N A に結紮した。結紮ミックスを希釈し、c D N A サイジングカラム (Gibco/BRL Gaithersburg, MD) 上でサイズ分別した。カラムからの小滴を収集し、カラムからの溶離容量を、ショットガンライブラリーの構築に関して前記したように確定した。B s t X I リンカーによるサイズ分別化 c D N A を、前記のようにベクター p S H O T I I に結紮し、制限エンドヌクレアーゼ B s t X I で切断して、ゲル精製し、そして仔ウシ腸ホスファターゼ (Gibco/BRL Gaithersburg, MD) を用いて脱リン酸化した。約 1 0 ~ 2 0 n g の c D N A および約 1 0 0 n g のベクターを含有する結紮物を 1 4 で一夜インキュベートした。結紮物を超コンピートント X L - 2 B l u e 細胞 (Stratagene, La Jolla, CA) 中で形質転換した。形質転換細胞を、1 0 0 u g / m l のアンピシリン (Sigma, St. Louis, MO) を補充した Luria プロス寒天平板上で、約 3 0 , 0 0 0 コロニー / 平板の密度で、2 0 個の 1 3 3 m m コロニー / プラークスクリーンフィルター (Dupont/NEN, Boston, MA) に広げた。コロニーを一夜増殖させた後、レプリカを 2 つのフィルター上で 2 回、平板化した。レプリカフィルターを、コロニーが目に見えるようになるまで 3 7 で数時間増殖させて、確立された手法 (Maniatis, Fritsch and Sambrook, 1982) にしたがってコロニーの in-situ ハイブリダイゼーションのために加工処理した。Stratalinker (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて D N A をフィルタに架橋させた。5 0 % ホルムアミドを含有する 1 x ハイブリダイゼーション緩衝液 (Gibco/BRL Gaithersburg, MD) 中の 1 , 0 0 0 , 0 0 0 c p m / m l より大きい値のプローブを用いて、4 2 で一夜、フィルタをハイブリダイズした。プライマー 5 1 2 F および 8 7 8 R を用いて、ヒト L R P 5 c D N A に由来する P C R 生成物からプローブを生成した。このプローブを、5 0 ~ 1 0 0 u C i の 3 0 0 0 C i / m m o l [³²

10

20

30

40

50

P J d C T P (DuPont/NEN, Boston, MA) の存在下で、Amersham Rediprimeキット (Arlington Heights, IL) を用いて無作為プライミング標識し、ProbeQuant G-50回転カラム (Pharmacia/Biotech, Piscataway, NJ) を用いて精製した。フィルターを $0.1 \times 55 \text{ cm}$ 、 $0.1 \mu\text{m}$ S D S を用いて 42°C で洗浄した。オートラジオグラフィ処理後、ハイブリダイゼーション陽性コロニーを含有する個々の領域をマスターフィルターから切り取って、 0.5 ml の Luria ブロス + 20% グリセロール中に入れた。各陽性物を約 $50 \sim 200$ コロニー / 100 mm プレートの密度で再平板化して、前記のようにハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。単一コロニーを単離し、DNA 配列分析のためにプラスミド DNA を調製した。

3つのコロニーをマウス cDNA ライブラリーから単離した。このクローンのアッセンブリ化配列 (図 16 (a) (SEQ ID NO:35)) は、ヒト LRP5 遺伝子と高度の類似性 (約 1700 ヌクレオチド部分にわたって、 87% 同一) を有し、したがって LRP5 のマウスオルトログを表すと考えられる。我々が初期に得たマウス LRP5 の部分の 500 個のアミノ酸 (図 16 (d) (SEQ ID NO:8)) は、ヒト LRP5 と 96% 同一である。有意には、これらのクローンのうちの 2 つがエキソン A に対応する領域の $5'$ である配列を有し、クローン 19a は付加的 200 bp を含有し、クローン 9a は付加的 180 bp を含有した (図 16 (b) (SEQ ID NO:36))。付加的 200 bp は、 $\text{bp } 112$ で開始する開放読み取り枠を含有する (図 16 (c) (SEQ ID NO:37))。開始コドンは、 -3 (プリン) および $+4$ (G ヌクレオチド) の両方での翻訳の有効な開始のためのコンセンサスヌクレオチドを有する (Kozak, M. 1996, Mamalian Genome 7:563-574)。この開放読み取り枠は、タンパク質輸送のための真核細胞シグナル配列として作用する能力を有するペプチドをコードする (von Heijne, 1994, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23:167-192)。GCC 分析パッケージ (Genetics Computer Group, Madison WI) において SigCleave プログラムを用いて確定した場合のシグナル配列に関する最高スコアは、アイソフォーム 1 の残基 29 で開始する成熟ペプチドを生成する。利用され得る付加的部位は、アミノ酸残基 31 (エキソン A によりコードされる一次アミノ酸) またはアミノ酸残基 32 、 33 または 38 で開始する成熟ペプチドを産生する。

全長マウス Lrp3 cDNA の分子クローニング

核酸ハイブリダイゼーションにより単離されたマウス cDNA クローンは、 1.7 kb の長さの Lrp3 cDNA の $5'$ 末端を含有する (図 16 (a) (SEQ ID NO:35))。これは、ヒト cDNA 配列と比較した場合、全長 cDNA の約 3 分の 1 を占める。マウス Lrp3 cDNA の残りは、PCR を用いて単離され、マウス肝臓 cDNA からの生成物を増幅した。PCR プライマー (表 9 (SEQ ID NO:49 ~ 74, 334 ~ 402)) は、マウス Lrp3 遺伝子を含有するマウスゲノムクローン BAC 53 - d - 8 および 131 - p - 15 の配列スキミングにより同定される DNA 配列を基礎にして設計した。11q13 とシテニーであるマウス染色体 19 に対する FISH 分析により、BAC 53 - d - 8 をマッピングした。これらのクローンの配列スキミングは、ヒト LRP5 のコード領域ならびに $3'$ 非翻訳領域に対応する DNA 配列を同定した。この戦略は、 1614 アミノ酸 (図 18 (c) (SEQ ID NO:40)) のタンパク質をコードする 4842 ヌクレオチド (図 18 (b) (SEQ ID NO:41)) の開放読み取り枠を含有する 5059 ヌクレオチド (図 18 (a) (SEQ ID NO:42)) のマウス cDNA 配列の確定をもたらした。推定上の ATG は、翻訳の開始のために有望な配列状況で存在する (Kozak, M. 1996, Mamalian Genome 7:563-574)。

ヒトおよびマウス LRP5 の比較

ヒトおよびマウス LRP5 の cDNA 配列は、 87% の同一性を示す。ヒト LRP5 cDNA の開放読み取り枠は、マウス Lrp3 によりコードされる 1614 アミノ酸タンパク質 (SEQ ID NO:42) と 94% 同一である 1615 アミノ酸のタンパク質をコードする (図 18 (d) (SEQ ID NO:3))。長さの差は、マウス Lrp3 シグナルペプチド配列中の 1 個のアミノ酸の欠失によるものである。シグナルペプチド配列は高度に保存されず、ヒトとマウスとの間の同一性は 50% 未満である。推定上のシグナル配列切断部位の所在

10

20

30

40

50

は、ヒトではアミノ酸残基 25、マウスではアミノ酸残基 29 である。これらの部位での切断は、それぞれ 1591 および 1586 アミノ酸の成熟ヒトおよびマウスタンパク質をもたらす、これらは 95% 同一である (図 18 (e)) (SEQ ID NO:43, 44)。高度の全配列類似性は、同定配列が LRP5 遺伝子のオルトログであることを強く主張する。この仮説は、ゲノムサザン実験の結果によりさらに支持される (データは示されていない)。

アイソフォーム 1 に関するヒトシグナルペプチドエキソンの同定

シグナルペプチドをコードするヒトエキソンを、PCR により肝臓 cDNA から単離した。前方プライマー 1F (SEQ ID NO:51) (表 9) を、Tag Gold (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) を用い、3、5 または 7% DMSO を補充した PCR 反応において、以下の逆プライマー: 218R、265R、318R および 361R (SEQ ID NO:50, 52, 53, 54) の 1 つと組合せて用いた。生成物を、95 で 30 秒、58 で 30 秒、72 で 1 分間の周期 40 回で、増幅した。生成物をアガロースゲル上で分析し、予測サイズのバンドを含有する反応物のいくつかを、DNA 配列分析のために選択し、pCR2.1 (Invitrogen, San Diego, CA) 中にサブクローニングした。

エキソン 2 (エキソン A としても知られている) の 139ヌクレオチド上流の得られた DNA 配列は、翻訳の有効な開始のための状況で存在する ATG: -3 位置のアデニン (A) 残基および +4 位置のグアニン (G) 残基を含有する (Kozak, M. 1996, Mammalian Genome 7:563-574)。

この ATG に関する開放読み取り枠は、1615 アミノ酸残基のポリペプチド (図 5 (c)) (SEQ ID NO:3) をコードする 4854ヌクレオチド (図 5 (b)) (SEQ ID NO:2) の間存続する。

イニシエーター ATG コドンの後ろの配列は、タンパク質輸送のためのシグナルとして作用する能力を有するペプチドをコードする。GC G 分析パッケージ (Genetics Computer Group, Madison WI) において SigCleave プログラムにより示されるシグナル配列 (15.3) に関する最高スコアは、アミノ酸残基 25 で開始する成熟ペプチド (図 5 (d, e)) を生成する。成熟 LRP5 タンパク質を産生するために利用され得る付加的推定切断部位は、残基 23、24、26、27、28、30 および 32 (エキソン A によりコードされる一次アミノ酸) に関して予測される。

シグナルペプチドエキソンを含有し、それと側面を接するゲノム DNA 配列の確定

シグナルペプチドをコードする cDNA 配列と同一のゲノム DNA 配列を含有する領域は、コンティグ 57 および 58 として知られている連続ゲノム DNA 配列の 2 つのストレッチ間のギャップに存在した。このギャップを閉じるために、ワシントン大学 (Seattle, WA) の Phil Green 博士から認可されたプログラム Phrapview による分析にしたがって、このギャップにかかるよう確定されたショットガンライブラリーから、4 つのクローンを選択した。これらのクローンの直接 DNA シーケンシングは、うまくいかなかった。即ち、高 GC 含量は、周期シーケンシングの効率を有意に低減した。この問題を回避するために、7-デアザ-dGTP (Pharmacia, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を組み入れることにより、PCR 生成物を生成した。これらの反応のための条件は、Klentaq Advantage-GC ポリメラーゼキット (Clontech, Palo Alto, CA) の修正で構成された。200 μM の 7-デアザ-dGTP との反応ミックスを補充することにより、標準反応プロトコルを修正した。挿入物を、M13 前方および逆プライマーを用いて、92 で 30 秒、60 で 1 分間、68 で 5 分間の周期を 32 回で増幅した。生成物を Qiaquick ゲル抽出キット (Qiagen Inc., Santa Clara, CA) を用いてゲル精製し、前記と同様にシーケンシングした。その結果生じた配列のアセンブリーはギャップを閉鎖し、約 78,000 bp のゲノム DNA の連続配列を生成した。

アイソフォーム 2 および 3 の延長

ソフトウェアパッケージ GRAIL (前記) は、ゲノム DNA 配列からエキソンおよびプロモーター配列を予測する。GRAIL により同定される一領域は、元々 G1 と呼ばれ、その後エキソン 1 と命名された、エキソン A の起始の約 55 kb 上流にあるエキソンであ

10

20

30

40

50

る(図12(c))(SEQ ID NO:28))。G1 1f~3fと呼ばれる3つのプライマーは、この配列を基礎にして設計された。このエキソンは、GRAILも、エキソン配列のすぐ上流のプロモーターを予測するため(図12(e))、特に興味深かった。さらに、G1における開放読み取り枠は、真核生物シグナル配列の特徴を有するペプチドをコードした。

G1予測エキソンがLRP5遺伝子の一部であるか否かを確定するために、TaqaraRNA PCRキット(Panvera, Madison WI)を用いて、逆転写酵素(RT)PCRを実施した。ヒト肝臓mRNA(50ng)を、10ulの逆転写酵素反応のための鋳型として用いた。LRP5特異的プライマー(622R、361Rまたは318R)のうちの1つを用いた逆転写酵素反応を、60℃で30分間、その後99℃で5分間インキュベートした後、試料を氷上に置いた。表2に示した前方プライマー(G1 1f、2fまたは3f)のうちの1つをPCR増幅のための試薬とともに付加し、反応物を、94℃で30秒、60℃で30秒、72℃で2分間の周期を30回で、増幅した。この一次PCR反応物を次に水中で1:2に希釈し、1ulの反応物を、入れ子式プライマーを用いた二次20ul反応物に用いた。2回目の増幅のための反応条件は、94℃で30秒、60℃で30秒、72℃で2分間の周期を30回であった。生成物をアガロースゲル上で分離して、切り取った。精製断片をpCR2.1(Invitrogen, San Diego, CA)中にサブクローニングし、プラスミドDNAを調製して、DNA配列を確定した。

これらの生成物のDNA配列は、G1(エキソン1)がLRP5転写体の少なくとも一部に存在することを示した。2つの異なるアイソフォームを同定した。本実験で同定された最初のアイソフォーム2(図11(a))(SEQ ID NO:23))は、エキソン1、その後、我々がエキソン5という名称を与えたエキソンで構成された。このスプライス変異体は、エキソンBヌクレオチド402(図11(a))で開始する開放読み取り枠を有し、この位置でのイニシエーターメチオニンは、翻訳開始のためのコンセンサス配列と一致しない(Kozak, M. 1996, Mamalian Genome 7:563-574)。第二の考え得るイニシエーターメチオニンはヌクレオチド453に存在し、このコドンは翻訳開始脳有効な開始に関する状況で存在する(Kozak, M. 1996, Mamalian Genome 7:563-574)。アイソフォーム2に関する最長の潜在的開放読み取り枠(図11(c))は、アミノ酸153に真核生物シグナル配列を含有するスプライス変異体をコードする。このスプライス変異体により生成される成熟ペプチドは最初の5つのスペーサードメインおよび一次EGF様モチーフの一部を欠いている。

第二のアイソフォーム(アイソフォーム3)は、エキソン1と、その後のエキソンAから成る(図12(a))。エキソン1がアイソフォーム2の最初のエキソンであるか否かは分からない。しがしながら、G1の上流のGRAIL予測プロモーターの位置は、エキソン1が最初のエキソンである可能性を示唆する。さらに、GRAILにより仮定された5'イントロン/エキソン境界を過ぎてのギル開放読み取り枠が存在する(図12(b))。したがって、この延長開放読み取り枠がLRP5転写体に組み入れられる可能性を、我々は調べた。その結果生じた開放読み取り枠(図12(c))は、1639アミノ酸タンパク質(図12(d))をコードする。イニシエーターメチオニンコドンは、有効な翻訳に重要であると考えられるいずれのコンセンサスヌクレオチドも含有しない(Kozak, M. 1996, Mamalian Genome 7:563-574)。予測タンパク質は予測真核生物シグナル配列を最初の100アミノ酸内に含有しない。あるいは、イニシエーターメチオニンコドンおよび/または潜在的シグナル配列を提供するエキソン1の上流の付加的エキソンが存在し得る。

1rp5の5'末端のRACE延長:アイソフォーム4および5

RACEは、cDNA末端の分析のための確立されたプロトコルである。Clontech(Palo Alto, CA)から購入したMarathonRACE鋳型を用いて、この手法を実施した。これは、胎児脳および乳房組織からのClontech"Marathon" cDNAを用いて、使用説明書にしたがって実施した。2つの「入れ子式」PCR増幅を、Gibco-BRL(Gaithersburg, MD)からのELONGASE長PCR酵素ミックス&緩衝液を用いて実施した。

Marathonプライマー

AP1 : CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC (SEQ ID NO:407)

AP2 : ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC (SEQ ID NO:408)

第1回PCRは、2 u lのMarathon胎盤cDNA鋳型と、各々10 p m o lのプライマーL 2 1 7およびAP 1を用いた。熱循環は：9 4 で3 0秒、6 8 で6分間の周期を5回；9 4 で3 0秒、6 4 で3 0秒、6 8 で4分間の周期を5回；9 4 で3 0秒、6 2 で3 0秒、6 8 で4分間の周期を3 0回であった。この反応物の1 / 2 0希釈液からの1 u lをDNA鋳型として二次PCR反応に付加した。このPCR反応は、入れ子式プライマーL 1 2 0およびAP 2を用いる点で、一次PCR反応と異なった。約1 6 0 0 b pおよび3 0 0 b pの2つの生成物が観察され、p C R 2 . 1 (Invitorgen, San Diego, CA)中にクローニングした。これらのクローンのDNA配列は、それらがエキソンAの配列のスプライシングにより生成されたことを示した。より大きい1 . 6 k b断片(図1 3 (SEQ ID NO:31))は、エキソンAの上流の約4 3 6 5ヌクレオチドの領域を同定し、1 5 5 5塩基対に関してゲノムDNAと連続しているように見えた。3 0 0 b p断片により同定される配列は、エキソンAの上流の約5 6 4 8ヌクレオチドであった(図1 4 (SEQ ID NO:32))。この配列は、A l u反復との類似性を有した。3 0 0 b p断片により同定される領域は、1 . 6 k b断片により同定される領域の内部であった。4および5と呼ばれるこれらのアイソフォームに関する開放読み取り枠は、アイソフォーム2に関して前記したのと同じである(図1 1 (b))。

アイソフォーム6の延長

G R A I L (前記)分析を用いて、遺伝子に関して考え得るプロモーター領域を予測した。プライマーは、G R A I Lにより限定されるアイソフォーム6プロモーター配列(図1 5 (b))に設計され、エキソンAから約4 k b中心である。この領域は、G R A I Lプロモーター-1 (G p - 1)と呼ばれた。

PCRプライマーG p 1 f (表2) (SEQ ID NO:78)を、メーカー(Perkin Elmer, Norwalk, CT)により供給された反応緩衝液中のポリメラーゼT a q G o l dを用いてプライマー5 7 4 rおよび5 9 9 rとともに、PCR反応に用いた。反応条件は、9 5 で1 2分、その後、9 5 で3 0秒、6 0 で3 0秒、7 2 で1分3 0秒の周期を3 5回で、約1 0 n gの肝臓cDNA / 反応物2 0 u lを用いた。一次反応物を水で2 0倍に希釈し、プライマーG p 1 fを4 7 4 rまたは5 2 1 rと組合せて用いて、第2回目のPCRを実行した。生成物を2 %アガロースゲル上で分析し、約2 2 0 ~ 4 0 0 b pのバンドをp C R 2 . 1 (Invitorgen, San Diego, CA)中にサブクローニングし、DNA配列分析により分析したアイソフォーム4中に存在する開放読み取り枠は、前記でアイソフォーム2に関して記載したのと同じである(図1 1 (b))。

マイクロサテライト奪回

各クローンを制限し、特異的バブルリンカー上で結紮して、各クローンから小ベクターライブラリを作製した(Munroe, D.J. et al., (1994) Genomics 19, 506)。リンカーに特異的なプライマー(N o t 1 - A)と反復モチーフ(A C) 1 1 N (ここで、NはAではない)との間で、6 5 のアニーリング温度で、PCRを実施した。PCR生成物をゲル精製し、前記のようなA B I P R I S M染料ターミネーターサイクルシーケンシングキットを用いてシーケンシングした。この配列から、プライマーを設計し、これをN o t 1 - AプライマーとともにPCRに用いた。これもシーケンシングし、プライマーが反復モチーフと側面を接するように二次PCRプライマーを設計して(表8) (SEQ ID NO: 318~333)、遺伝子型化に用いた。

突然変異走査

単一ヌクレオチド多型(SNP)を、シーケンシングスキニングアプローチを用いて1型糖尿病患者において同定した(表5)。

プライマーを設計して、当該の特異的領域(即ち、L R P 5エキソン、以前に同定された

10

20

30

40

50

S N PまたはG R A I L予測エキソンを含む領域)を含む約500~800bpの長さのゲノム断片を特異的に増幅した。蛍光染料プライマーシーケンシングを促すために、前方および逆プライマー対を、それぞれM13 Universalプライマー(5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') (SEQ ID NO:409)および修飾M13逆プライマー(5'-GCTATGACCATGATTACGCC-3') (SEQ ID NO:410)に対応する配列で尾端を付けた。前記のようにプライマー組を用いて賛成されたPCR生成物を、Perkin-Elmerの10xPCR緩衝液、200mMのdNTP、0.5u1のTaq Gold(Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA)、50ngの患者DNAおよび20pmol/mlの前方および逆プライマーから成る50u1の反応物中で増幅した。循環条件は、95で12分間; 95で30秒、57で30秒および68で2分間の周期を35回、その後72で6分間延長し、4を保持した。

10

これらの反応により単一DNA断片が産生するように、条件を最適化した。PCR生成物を次に、Qiagenロボット(Qiagen Inc., Santa Clarita, CA)上でQiaQuickストリップまたはQiaQuick 96ウエルプレートを用いてシーケンシングのために精製した。この精製工程は、非混入プライマーおよびヌクレオチドを除去する。

直接BODIPY染料プライマーサイクルシーケンシングは、PCR生成物を分析するために用いられる方法であった(Metzker et al., (1996) Science 271, 1420-1422)。Tecanロボット(Tecan, Research Triangle Park, NC)は、標準染料プライマーシーケンシングプロトコル(ABI Dye Primer Cycle Sequencing with AmpliTaq DNA Polymerase FS, Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA)を用いてシーケンシング反応を実施した。反応は、以下の循環条件を用いて、DNAエンジン熱循環器(M.J. Research Inc., Watertown, MA)で実施した: 95で4秒、55で10秒、および70で60秒の周期を15回; その後、95で4秒および70で60秒の周期を15回。循環後、試料をプールし、沈降させて、ドライダウンした。試料を3u1の充填緩衝液中に再懸濁し、2mlをABI 377自動DNAシーケンサー上を移動させた。

20

S N Pが一旦同定されると、スキャニング技法を用いて、1型糖尿病族の疾病と遺伝子との連合の確定に役立てるためのマーカーとしてのそれらの情報性を評価する。我々は制限断片長多型(RFLP)を用いて、制限エンドヌクレアーゼ部位を変L S N Pを査定している。さらに、強制RFLP PCR(Li and Hood (1995) Genomics 26, 199-206; Hallassos et al., (1989) Nuc. Acids Res. 17, 2437-2448; Wu et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2757-2760)を用いて、制限エンドヌクレアーゼ部位を変えないS N Pを評価している。蛍光ベースのCleavase(CFLP)(Life Technologies, Gaithersburg, MD)およびResolvase(Avitech Diagnostics, Malven, PA)検定を開発することにより、遺伝子座の大型領域を走査することも試みている。

30

I D D M 4でのハプロタイプ分析

ハプロタイプマッピング(または同一性家系マッピング)を連合マッピングとともに用いて、始祖集団における同一性家系(I B D)の領域を同定した。この場合、始祖集団中の罹患個体(のうちのものは)は突然変異だけでなく、疾病遺伝子座周囲の非常に大きいゲノムハプロタイプ(したがってDNAの同一片)をも共有する。組換え体ハプロタイプを利用して、突然変異を含有する領域を描き得る。これらの方法を用いて、劣性形質障害: ウィルソン病、バッテン病、ヒルシュスプルング病および遺伝性ヘモクロマトーシスの遺伝子がマッピングされてきた(Tanzi, R. et al., (1993) Nature Genet 5, 344-350; The International Batten Disease Consortium. (1995) Cell 82, 949-957; Puffenberger, E., et al., (1994) Hum Mol Genet 3, 1217-1225; およびFeder, J., et al., (1996) Nature Genet 13, 399-408)。同様に、1型糖尿病では、I D D M 1に関して、特定のコーカサス人とアフリカ人オリジンのハプロタイプとの間の比較M H Cハプロタイプマッピングが、この障害に対する感受性遺伝子座としてH L A - D Q A 1およびH L A - D Q B 1の療法を同定した(Todd, J. et al. (1989) Nature 338, 587-589; およびTodd, J. et al. (1987) Nature 329, 599-604)。

40

染色体11q13では、しばしば予期したよりも多くが伝達され、したがって病因遺伝子

50

座に高感受性対立遺伝子を含有するハプロタイプ間のIBDの領域を同定するために、ハプロタイプ分析は、連合分析と一緒に着手された。これに対比して、防御性ハプロタイプは、しばしば予期したよりも少なく伝達され、病因遺伝子座に異なる（防御的）対立形質を含有する。対立形質の予測伝達の偏差に関する証拠は、2つの多型マーカーD11S1917およびH0570POLYAを用いて示された。英国、米国、ノルウェー、サルジニア、ルーマニア、フィンランド、イタリアおよびデンマークからの2042の1型糖尿病家族では、D11S1917-H0570POLYAハプロタイプ3-2の罹患子孫への伝達は陰性（46%）で、罹患および非罹患伝達間の不均質性の 2×2 検定では、 $X^2 = 23$ 、 $df = 1$ 、 $p < 1.5 \times 10^{-6}$ で、これは防御性ハプロタイプであるという良好な証拠を提供した。これに対比して、2-3ハプロタイプは非罹患子孫より罹患子孫により多く伝達され（%T = 51.3； 2×2 偶発性検定； $X^2 = 5.5$ 、 $df = 1$ 、 $p < 0.02$ ）、このことは、これが高感受性（またはおそらくは中性の）染色体であったことを示す。1型糖尿病に罹りやすいと思われるさらに別のまれなハプロタイプが同定されている（D11S1917-H0570POLYA、3-3、罹患%T = 62.4、 2×2 偶発性検定、罹患対非罹患； $\chi^2 = 6.7$ 、 $df = 1$ 、 $p < 0.009$ ）。したがって、この領域における関連の分析は、非罹患子孫と比較した場合に罹患子孫に有意に低く伝達されるときは、1型糖尿病に対して防御性の対立形質を含有するハプロタイプに関する証拠と、1型糖尿病に及ぼす中性または高感受性作用を有する2つの非防御性ハプロタイプに関する証拠を生じた。このハプロタイプ分析を広げて14の側面を接するマイクロサテライトマーカー、255ca5、D11S987、255ca6、255ca3、D11S1296、E0864CA、TAA、L3001CA、D11S1337、14LCA5、D11S4178、D11S970、14LCA1、18018、ならびに単一クレオチド多形性（SNP）58-1、エキソンE（イントロン性、8bpのエキソン6の3'）およびエキソンR（Ala¹³³⁰、エキソン18）（図19）は、糖尿病個体におけるこの間隔内の高度保存性ハプロタイプを明示した。別個の防御性ハプロタイプ（A）（D11S1917-H0570POLYAでの3-2ハプロタイプを包含する）、ならびに別個の高感受性ハプロタイプ（B）（D11S1917-H0570POLYAでの2-3ハプロタイプを包含する）も同定されている。高感受性ハプロタイプは、マーカーD11S1337の3'である防御性ハプロタイプを有するIBDであり、これは、1型糖尿病にある役割を演じる病因変異体が同一領域内に存在せず、LRP-5遺伝子のエキソンEの5'に局在することを示す。防御性ハプロタイプと高感受性ハプロタイプとの間のIBDであるこの領域は、罹患子孫への伝達への偏差が検出されなかったので、着手中の関連分析を防止する。極高感受性ハプロタイプ（C）（D11S1917-H0570POLYAで3-3）も同定され得る。その領域で付加的マーカーを用いるハプロタイプ分析は、この極高感受性ハプロタイプがUT5620と14L15CAとの間の高感受性ハプロタイプと同一であり、おそらくは病因変異体はUT5620とエキソンEとの間（約100kb）に局在することを明示する。したがって、高感受性および極高感受性ハプロタイプは1型糖尿病に及ぼす高感受性作用を付与する1つの対立形質（または別々の複数の対立形質）を保有し得るが、一方防御性ハプロタイプはIDDMに対して防御性である対立形質を含有する。LRP5遺伝子の5'領域はこの間隔内に存在し、LRP5i電子およびエキソン1~6の5'調節領域を包含する。

イタリア人およびサルジニア人のハプロタイプの分析から、さらに別の2つの高感受性ハプロタイプが明らかになった。イタリア人家族のハプロタイプ1-3のD11S1917-H0570POLYAでは、63%T、 2×2 罹患対非罹患 $p = 0.03$ （ハプロタイプD）であった。サルジニア人家族のハプロタイプ1-2のH0570POLYA-L3001では、58%T、 2×2 罹患対非罹患 $p = 0.05$ （ハプロタイプE）であった。

前記の5つのハプロタイプを含有する試料を、IBDの領域を調べるために、IDDM4領域からのSNPを用いて遺伝子型分類した（図B）。これらのSNPは、UT5620および14L15CA間の高感受性ハプロタイプBおよびCの間のIBDの領域を確認し

10

20

30

40

50

た。それは、マーカー D 1 1 S 1 3 3 7 の 3 ' の防御性および感受性ハプロタイプ A および B 間の I B D の領域も確証したが、但し、病理性変異体は、この領域では含まれない。SNP 分析は、U T 5 6 2 0 および T A A 間、防御性ハプロタイプ A (2 5 k b 領域) とは異なる感受性ハプロタイプ B、C、D および E 間の I B D の潜在的領域も明らかにした。マーカー H 0 5 7 0 P O L Y A はこの間隔内に存在し、他の感受性ハプロタイプと比較して、ハプロタイプ E においては同一でない。これは、おそらくは、この多形での突然変異によるものであるか、あるいはそれはこの領域内の境界を描き、病理性変異体はこのマーカーの 5 ' または 3 ' である。この間隔内での付加的 SNP のさらなる分析が必要である。

したがって、I D D M 4 領域内でのハプロタイプマッピングは、L R P 5 遺伝子の 5 ' 領域における 1 0 0 k b の感受性ハプロタイプ B および C 間の I B D の領域を同定した。SNP ハプロタイプマッピングは、この遺伝子；推定プロモーター、およびマウスシニエー領域と相同性の領域 (表 1 2)、ならびに L R P 5 のエキソン 1 に関して考え得る調節配列を含む L R P 5 の 5 ' 領域を包含する 2 5 k b 間隔におそらくはこれをさらに描いた。

L R P 5 を含有するアデノウイルスベクターの構築

全長ヒト L R P 5 遺伝子を、ヒトサイトメガロウイルス極初期プロモーターおよびウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルを含有するアデノウイルストランスファクター p d e l E l s p 1 A - C M V - b G H P A 中でクローニングして、p d e h l r p 3 を作製した。このベクターを用いて、5 ' I T R に向けられる字するの E 1 領域中に挿入される L R P 5 遺伝子を含有するアデノウイルスを構築した。この長さの c D N A を収容するために、E 3 領域は、p B H G 1 0 に関して記載された (Bett et al., 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. 91:8802-8806) ように、ウイルスから完全に欠失された。同一戦略を用いて、全長マウス L r p 5 遺伝子を含有するアデノウイルスベクターを構築した。

H i s タグおよび翻訳停止シグナルが推定上のトランスメンブラン横断メインに取って代わるマウス L r p 5 の可溶性バージョンを構築した (表 9 に列挙したプライマー) (SE Q I D N O : 49 ~ 74 , 334 ~ 402)。これは、当然、L R P 5 の細胞外ドメインの分泌をもたらす。L r p 5 の推定配位子結合ドメインの生化学的特性を促進する。同様に、ヒト L R P 5 の可溶性バージョンは、表 9 に示したプライマー (SE Q I D N O : 49 ~ 74 , 334 ~ 402) を用いて構築し得る。細胞外ドメインは、前駆体 (未熟) タンパク質配列のアミノ酸 1 3 8 5 に移動する。

L R P 5 リガンドの同定

L R P 5 は L D L を結合し、そして保有する能力を示す (下記参照) が、しかしこの活性は高レベルではない。したがって、L R P 5 は付加的配位子 (単数または複数) を結合する能力を有すると思われる。L R P 5 配位子を同定するために、ヒト L R P 5 の最初の 1 3 9 9 アミノ酸から成る細胞外ドメイン、またはマウス L r p 5 の対応する領域を精製する。多数の発現系が用いられるが、これらの例としては、ショウジョウバエ S 2 細胞、酵母菌および大腸菌におけるプラスミドベースの系、ならびに哺乳類細胞および S F 9 昆虫細胞におけるウイルスベースの系が挙げられる。ヒスチジンタグを用いて、ニッケルカラム (Novagen, Madison WI) 上で L R P 5 を精製する。種々の樹脂をカラムクロマトグラフィーに用いて、可溶性 L R P 5 をさらに濃厚化し得る。L R P 5 は固体支持体、例えばニッケルカラムに取り付けられる。血清分画、尿分画または組織抽出物からの分画からの配位子を含有する溶液を、L R P 5 カラム上で分別する。イミジゾールを用いて、ニッケルカラムから配位子を溶離する。L R P 5 に結合した配位子 (単数または複数) の性質を、ゲル電気泳動、アミノ酸配列、アミノ酸組成、ガスクロマトグラフィーおよび質量分光光度計で特性化する。

精製 L R P 5 を B i a C o r e 2 0 0 0 (BiaCore, Uppsala Sweden) チップに取り付け、物質転換、L R P 5 と結合する配位子が被験溶液中に存在するか否かを決定する。L R P 5 に対する配位子が同定されれば、L R P 5 チップを用いて L R P 5 配位子相互作用の動力学が特性化される。

LRP5の可溶性バージョンを含有するアデノウイルスベクターを用いて動物を感染させ、配位子/LRP5複合体の血清または肝臓抽出物からの単離は、ヒスチジntagおよびLRP5のこの部分に対して向けられる抗体の使用により促される。

LRP5ウイルスによる動物の治療

広範囲の種が、導入遺伝子を保有するアデノウイルスベクターで治療され得る。マウスは、多数の遺伝子変更系統、即ちノックアウトマウス、トランスジェニックマウスおよび近交系マウスが利用可能であるために、実験を実施するのに好ましい種である。しかしながら、適切な場合には、より大きい動物、例えばラットまたはウサギを用い得る。1型糖尿病の発症を修飾するLRP5の能力を試験するための好ましい動物モデルは、非肥満性糖尿病(NOD)マウスである。リポタンパク質代謝におけるLRP5に関する潜在的役割の実験のための好ましい動物モデルは、LDL受容体族の成員、例えばLDL受容体(LDLR)が分解された、あるいはリポタンパク質代謝に関与する遺伝子、例えばApo-Eが破壊されたマウスである。

アデノウイルスは、 1×10^9 ブランク形成単位をマウスの尾静脈に注入することにより投与する。従来の研究に基づいて、この形態の治療は、相対的に高頻度で肝細胞の感染を引き起こす。3つの異なるアデノウイルス処置物を調製した：1)挿入物を含有しないアデノウイルス(陰性対照)、2)ヒトLDLRを含有するアデノウイルス(陽性対照)および3)ヒトLRP5を含有するアデノウイルス。これらのウイルスの各々を用いて、5匹のC57野生型と5匹のC57LDLRノックアウトマウスを感染させた。ウイルスの注入の8日前に、前処理採血して、処置前の血清化学値を検査した。動物にウイルスを注入した。ウイルス投与後5日目に、二回目の採血をして、リポタンパク質分別のために血清を採集するため、動物を安楽死させた。さらに、in-situ分析、免疫組織化学および組織病理学所見のために組織を採取した。

実験中は、動物は標準明/暗周期に保持し、通常の餌を与えた。血清採取前は動物を絶食させた。ある種の実験条件では、動物に高脂肪食を与えるのが望ましいこともある。

標準臨床血清化学検定を実施して、血清トリグリセリド、総コレステロール、アルカリ性ホスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、尿素窒素、およびクレアチニン値を確定した。血液検査を実施して、循環白血球、好中球、%リンパ球、単球および好酸球、赤血球、血小板、ヘモグロビンならびに%ヘマトクリットのレベルを調べた。

血清リポタンパク質を、Superose 6 FPLCサイジングカラムを用いて、Gerdes等(Clin. Chim. Acta 205:1-9 (1992))が記載した手法を多少変更して、分別してサイズ別に分類し、Gerdesの手法から得られた最も有意の差異は、カラムを1つだけ用いた値であった。カラム分画を収集し、コレステロールおよびトリグリセリドに関して分析した。「曲線下面積」を、各リポタンパク質種に関して算出した。密度で限定された等級の各々に対応する近似ピーク分画は、VLDLに関しては、分画24、LDLに関しては分画36そしてHDLに関しては分画51である。

LRP5過剰発現は血清トリグリセリドおよびリポタンパク質に影響を及ぼす血清化学データの統計分析は、対照ウイルスに対して、ウイルスを含有するLRP5で処置した動物におけるトリグリセリドレベルでは、30%の低減(P値=0.025)が認められた(表10)。トリグリセリドにおけるこの低減は、野生型およびKOマウスの療法で、同様のレベルで起きた。比較すると、LDLRウイルスは血清トリグリセリドを、対照ウイルスに対して約55%低減した。この結果は、LRP5が血清トリグリセリドレベルを調節する能力を有することを示す。

血清リポタンパク質プロファイルは、VLDL粒子種が、LRP5ウイルスで処置した野生型マウスにおいて低減されたことを示した。分析した試料の数は統計分析に十分ではなかったが、しかしこの結果は血清トリグリセリドで観察された低減と一致する。これらの結果は、LRP5が脂質の豊富な粒子と結合しそして内在化して、血清トリグリセリドおよびVLDL粒子の低減を引き起こす能力を有することを示唆する。したがって、LRP5による、あるいはLRP5の発現を増大する、またはLRP5の生物学的活性を贈さい

10

20

30

40

50

する治療薬による処置は、トリグリセリド値を増大する疾患、例えば2型糖尿病および肥満症の患者において脂質が豊富な粒子およびトリグリセリドを低減するのに有用である。統計的有意は認められなかったけれども、LDL受容体の崩壊（ノックアウト）のために高レベルの血清コレステロール（約220mg/dL）を有するマウスにおけるLRP5処置の結果としての血清コレステロールレベルの低減傾向（28%、 $p = 0.073$ ）が観察された（表10）。LRP5処置が血清コレステロールを上昇する逆傾向（30%、 $p = 0.08$ ）は、相対的に低レベルの血清コレステロール（約70mg/dL）を有する野生型マウスにおいては観察されなかった。これらのデータ組での小処置群（ $n = 4$ ）はこれらの解釈を制限し、このことはさらなる実験が必要であることを示している。しかし、それでもこれらの結果は、コレステロールが上昇した状態では、LRP5の活性の増大が血清コレステロール値を低減し得る、ということを示す。したがって、LRP5による、あるいはLRP5の発現またはLRP5の生物学的活性を増大する治療薬を用いた処置は、高コレステロール血症患者のコレステロールを低減するのに有用である。

LRP5過剰発現は血清アルカリ性ホスファターゼレベルに影響を及ぼし得る胆管閉塞の結果、血清アルカリ性ホスファターゼレベルは劇的に、例えば20倍に増大し得る（Jaffe, M.S.およびMcVan, B., 1997, Davis' s laboratory and diagnostic test handbook, pub. F.A. Davis Philadelphia, PA）。しかしながら、3倍増までの低レベルのアルカリ性ホスファターゼは、肝臓における感染性作用因子、例えばアデノウイルスに反応して起こる炎症反応に起因する。対照ウイルスで処置した動物では、アルカリ性ホスファターゼの約2倍の増加が認められた。これに対比して、LRP5ウイルスで処置した動物のアルカリ性ホスファターゼレベルでは、わずかの増大しか認められなかった。対照に対して、アルカリ性ホスファターゼレベルは、LRP5処置動物では49%低減した（ p 値 = 0.001）（表10）。

アルカリ性ホスファターゼレベルの増大は、アデノウイルス感染レベルの結果であり、したがってLRP5ウイルスで処置した動物における低減に対して考え得る説明は、単に、この処置群における低ウイルスによるということであり得る。ウイルス感染レベルの指標は、肝臓酵素であるアスパラギンアミノトランスフェラーゼとアラニンアミノトランスフェラーゼが血清中に出現することである。これらの酵素は通常は細胞の細胞質中に見出され、細胞損傷が起これば血清中で増大する（Jaffe, M.S.およびMcVan, B., 1997, Davis' s laboratory and diagnostic test handbook, pub. F.A. Davis Philadelphia, PA）。

したがって、これらの酵素は、アデノウイルス感染の結果である毒性レベルに関するマーカーとして役立つ。これらの酵素は、感染前は通常は低レベルで、ウイルスを摂取していない動物中に存在する。重要なことは、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼおよびアラニンアミノトランスフェラーゼのレベルはLRP5ウイルスを投与された動物では高いことであり、このことは、これらの動物が対照ウイルスを投与された動物より多くの細胞損傷を有し、したがってより広範な感染を有することを示している（表11）。したがって、アルカリ性ホスファターゼレベルの低減は単に低LRP5ウイルスが投与されたためであるとは考えられない。第二に考え得る説明は、LRP5がアデノウイルス感染に起因する炎症反応の性質を修正するというものである。炎症反応を調節する場合に考え得るLRP5の役割は、遺伝子データと一致し、このことはこの遺伝子が1型糖尿病の発症に対する危険性に関連があることを示している。慢性インスリン炎または炎症は1型糖尿病の臨床的開始の前駆症状であり、したがってLRP5処置、あるいはLRP5の転写を増大する治療薬による処置は、1型糖尿病の防止に有用であり得る。1型糖尿病は自己免疫疾患であり、したがってLRP5による、あるいはLRP5の発現またはLRP5の生物学的活性を増大する治療薬による処置は、その他の自己免疫疾患の治療に有用であり得る。

細胞系でのLRP5の発現

異種プロモーターの制御下でのLRP5の過剰発現は、LRP5を含有するアデノウイルスによる感染、あるいはLRP5を含有するプラスミドベクターによるトランスフェクションによって成し遂げ得る。プラスミドベクターによるトランスフェクションは、導入遺

10

20

30

40

50

伝子の一過性のまたは安定した発現をもたらす得る。

内因性LDL受容体は、LDL受容体族の他の成員によるLDLの取込みを検出する能力を低減する。LDL受容体の非存在下でのリポタンパク質取込みを調べるために、家族性高コレステロール血症(FH)ヒト患者からの一次細胞株を用いた。これらのFH細胞株は、いかなる内因性LDL受容体も欠いている。FH繊維芽細胞を、500ブランク形成単位/細胞のMOIで、37で24時間感染させた。感染後、細胞を40 μ g/mlの¹²⁵I-LDLとともに37でインキュベートした。4時間後、細胞を洗浄し、LDLの取込みを測定した。LDL取込みレベルの適度(約60%)の増大が観察された。比較すると、LDL受容体を含有するアデノウイルスによるFH細胞の感染は、LDL取込みの20倍の増大をもたらした($p < 0.0001$, $n = 3$)。LRP5により媒介されるこの適度レベルの活性が統計的に有意であつ多価否かを確定するために、24の個々のウェルをLRP5ウイルスに感染させて、分析した。この実験の統計的分析は、LDL取込みの増大が高度に有意であったことを示した($p < 0.0001$)。したがって、LRP5はLDL取込みを媒介し得る。しかしながら、LDL受容体に対して、適度レベルの活性を基礎にして、LRP5の一次活性はLDLの取込みを媒介するためであるとは思えない。

10

LDL受容体またはLDL受容体族のその他の成員を欠いた別の細胞株が存在する。PEA-13細胞株(ATCC 2216-CRL)は、LRP1受容体を欠く。LDL受容体を欠いた突然変異体CHO細胞は、KingsleyとKrieger(Proceedings National Academy Sciences USA (1984) 81:5454)により記載されている。ld1A7として知られているこの細胞株は、組換えLRP5を発現する安定トランスフェクタント細胞株の作製に特に有用である。

20

抗LRP5抗体

ウエスタンブロット分析

ヒトLRP5 MAPペプチド:

SYFHLFP P P P S P C T D S S (SEQ ID NO:403)

VDGRQN I K R A K D D G T (SEQ ID NO:404)

EVLFTTGLIRPV ALVVDN (SEQ ID NO:405)

IQGHLDFVMD ILVFHS (SEQ ID NO:406)

で免疫感作したウサギで調製した抗血清を、ウエスタンブロット分析により評価した。

30

COS細胞を、ヒトLRP5 cDNAを含有するアデノウイルスで感染させた。感染後3日目に、プロテアーゼ阻害剤PMSE (100 μ g/ml)、アプロチニン(2 μ g/ml)およびペプスタチンA(1 μ g/ml)を含有するリン酸緩衝化生理食塩水(Gibco/BRL Gathersburg, MD)中に掻き取るにより、細胞を採集した。低速回転により細胞をペレット化し、プロテアーゼ阻害剤を含有するリン酸緩衝化生理食塩水中に再懸濁して、Dounce均質化により溶解した。1000rpmの低速回転で、Beckman J-9ローター中で5分間回転して、核を除去した。上清を収集し、100,000xgの高速で3時間、遠心分離して、膜をペレット化した。膜をSDS-試料緩衝液(Novex, San Diego CA)中に再懸濁した。

10%トリス-グリシンアクリルアミドゲル(Novex, San Diego CA)上で電気泳動処理して、膜タンパク質を分別した。分別タンパク質を、メーカーの使用説明書にしたがって、PVD F紙(Novex, San Diego CA)に移した。標準ウエスタンブロット分析を膜上で実施したが、一次抗体は粗製抗血清の1:200希釈液であり、二次抗体は抗ウサギIgG HRP複合体(Amersham, Arlington Heights, IL)の1:3000希釈液であった。ECL試薬(Amersham, Arlington Heights, IL)を用いて、血清中に存在する抗体により認識されるタンパク質を可視化した。

40

ペプチドSYFHLFP P P P S P C T D S S (SEQ ID NO:403)で免疫感作したウサギからの血清により、約170~180kDのバンドを検出した。このバンドは、ヒトLRP5を含有するアデノウイルスに感染させた細胞において検出されただけで、対照ウイルスに感染させた細胞中には存在しなかった。さらに、この170kDバンドの検出は、0

50

、1 ug/ml のペプチドSYFHLFP PPPSPCTDSS (SEQ ID NO:403) を含有するが、0.1 ug/ml のペプチドVDGRQNIKR AKDDGT (SEQ ID NO:404) は含有しない血清の1:500希釈液を予備吸着させることにより遮断された。したがって、ペプチドSYFHLFP PPPSPCTDSS (SEQ ID NO:403) に対して向けられる抗体により検出される約170 kDのこのタンパク質バンドは、ヒトLRP5である。成熟ヒトLRP5タンパク質の予測サイズは、176 kDである。

ペプチドSYFHLFP PPPSPCTDSS (SEQ ID NO:403) で免疫感作したウサギからの抗血清を、MAPペプチドSYFHLFP PPPSPCTDSS (SEQ ID NO:403) を共有結合させたAffigel 10カラム (BioRad, Hercules CA) を用いてアフィニティー精製した。これは、LRP5に対してより大きい特異性を有する抗血清を生じた。

ペプチドIQGHLDFVMDILVFHS (SEQ ID NO:406) で免疫感作したウサギからの抗血清は、ウイルスを含有するLRP5に感染させた細胞中には存在するが、対照ウイルスに感染させた細胞中には存在しないヤク170 kDのバンドを検出し得る。この抗体は、LRP5の推定上の細胞外ドメイン中に存在するペプチドを認識し、したがってLRP5の可溶性バージョンの検出に有用である。しかしながら、ペプチドSYFHLFP PPPSPCTDSS (SEQ ID NO:403) で免疫感作したウサギからの抗血清に対して、この抗血清を用いた場合には、より大きいバックグラウンドが観察される。

LRP5は組織マクロファージ中で発現される

LRP5ペプチドSYFHLFP PPPSPCTDSS (SEQ ID NO:403) に対する粗製およびアフィニティー精製抗血清を、ヒト肝臓における免疫細胞化学試験に用いた。抗体は、肝臓中のタッフアー細胞と呼ばれる、LRP5に対して陽性に、そして成熟組織食細胞を認識するマーカーRFD7 (Harlan Bioproducts, Indianapolis IN) に対して陽性に、そしてMHCクラスIIマーカーであるRFD1 (Harlan Bioproducts, Indianapolis IN) に対しては陰性に染色される組織マクロファージを認識した。この染色パターン(RFD1 - RFD7+)は、マクロファージの亜集団、エフェクター食細胞を同定する。この種のマクロファージは、自己免疫疾患に関するモデルにおける疾患である実験的自己免疫神経炎の進行に関与していた(Jung, S. et al., 1993, J Neurol Sci 119:195-202)。食細胞組織マクロファージにおける発現は、免疫応答の炎症性成分を調節する場合のLRP3に関する役割を支持する。この結果は、LRP5ウイルスで処置した動物におけるアルカリ性ホスファターゼレベルで観察された差ならびに遺伝子データに基づいて提案された役割と一致し、このことはLRP5が糖尿病の危険性を有する遺伝子であることを示す。

LRP5遺伝子の付加的保存領域の確定

マウスBACクローン131-p-15および53-d-8から調製されたショットガンライブラリーの高スループットDNAシーケンシングを用いて、マウスおよびヒト間に保存されるLRP5遺伝子の領域を同定した。この領域を同定するために、非アッセムブリ化配列またはアッセムブリ化コンティグであるマウスゲノムDNAを、ヒトゲノムDNAのアッセムブリに対して比較した。比較はBLAST算法を用いて実行し、カットオフは80%であった。この分析はLRP5遺伝子の大多数のエキシソンの同定を成し、遺伝子の他の位置の保存配列の多数のパッチを同定した(表12)。

推定ATGの上流4.3 kbおよび168 bpに位置するヒトおよびマウス間に保存された配列が存在する。これらの配列は、mRNA転写体またはプロモーター素子の5'非翻訳配列を表し得る。

36 kbの推定上の最初のイントロン内に、ある程度のDNA配列保存を示す12のパッチが存在する。これらの領域、例えば41707-41903のいくつかは、非常に広範で、LRP5遺伝子のエキソンに関して観察されるものと同様に、高度の配列保存を有する。これらの領域は転写されるとは思われなため、これらの保存領域は、LRP5遺伝子の転写またはLRP5 mRNA転写体のプロセッシングを調節する場合にある役割を演じると思われる。それらの役割の的確な性質に無関係に、これらの新規に同定された領域は、配列多型がLRP5の生物学的活性に影響を及ぼし得る領域を示す。

L R P 5 の最初の 2 つのエキソンを含有する B A C クローン 1 3 1 - p - 1 5 を、広範に、即ち約 6 x 適用範囲でシーケンシングした。B A C クローン 5 3 - d - 8 は、エキソン D からエキソン V までの配列適用範囲を含有するが、しかしながらこのクローンの配列適用範囲は約 1 x に過ぎなかった（スキムシーケンシング）。マウス B A C 5 3 - d - 8 のスキムシーケンシングにより、76% のエキソンが検出されたが、しかしながらいくつかの場合には、エキソンの一部分だけがマウス配列データ中に存在した。エキソンの他に、ヒト配列によるある程度の配列保存を示した B A C 5 3 - d - 8 配列中には 3 つのパッチが認められた（表 1 2）。これらはすべて、エキソン D と E の間の大型の 20 kb イントロンに局在した。これらの配列は、この大型イントロンのプロセッシングに重要な領域を表し、したがってこれらの配列における多型は、L R P 5 の発現レベルに影響を及ぼし得る。

10

代替的スプライシング化 L R P 5 m R N A 転写体の相対的豊富さの確定

いくつかの技法を用いて、L R P 5 の異なる代替的スプライシング化アイソフォームの相対的豊富さを確定し得る。

特定の転写体から得られるプローブのノーザンブロット分析を用いて、特定の転写体の豊富さを調べる。より高感度の技法、例えば R N アーゼ防御検定を実施する。市販キット（Ambion, Inc., Austin TX）からの試薬を用いて、プローブを調製する。[] 3 2 P - U T P で放射能標識したプローブとハイブリダイズする転写体の相対的豊富さを、元のそして変性アクリルアミドゲル（Novex Inc., San Diego, CA）により分析する。確立された手法（Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Press, NY）にしたがって、転写体の 5' 部分から得られる逆プライマーを用いて、プライマー延長検定を実施する。

20

L R P 5 遺伝子のその他の種同族体の単離

ヒト L R P 5 配列から設計された P C R プライマーを用いて、当該種の c D N A から得られた遺伝子の一部を用いて c D N A ライブラリーをスクリーニングすることにより、異なる種、例えばラット、イヌからの L R P 5 遺伝子を単離する。低コドン縮重を有するアミノ酸、例えば M e t および T r p をコードする領域を選択することにより、32 ~ 128 倍縮重を示す 17 - 20ヌクレオチドのプライマーを設計して、縮重 P C R を実施する。これらのプライマーを選択する場合、タンパク質中に保存される領域、例えば図 6 b に示したモチーフに対して選択が示される。P C R 生成物を D N A 配列分析により分析して、ヒト L R P 5 に対するそれらの類似性を確認する。正しい生成物を用いて、高ストリンジエンシーでのコロニーまたはブランクハイブリダイゼーションにより、c D N A ライブラリーをスクリーニングする。あるいは、ヒト L R P 5 遺伝子から直接得られるプローブを利用して、低ストリンジエンシーでのハイブリダイゼーションにより、L R P 5 の c D N A 配列を、異なる種から単離する。c D N A ライブラリーを、前記のように生成する。

30

参考文献

- 1 . Bach, J.-F (1994) . Endocrine. Rev. 15 : 516-542.
- 2 . Bain, S., ら (1992) . Diabetes 41 : 91A.
- 3 . Bell, G.I., ら (1984) . Diabetes 33:176-83.
- 4 . Bennett, S.T., ら (1995) . Nature Genet. 9 : 284-292.
- 5 . Bennett, S.T. and Todd, J.A (1996) . Annu. Rev. Genet. 30 : 343-370.
- 6 . Buckler, A. ら (1991) . P.N.A.S USA 88 : 4005-4009.
- 7 . Davies, J.L., ら (1994) . Nature 371 : 130-136.
- 8 . Doria, A., ら (1996) . Diabetologia 39 : 594-599.
- 9 . Hashimoto, L., ら (1994) . Nature 371 : 161-164.
- 10 . Holmans, P. (1993) . Am. J. Hum. Genet. 52 : 362-374.
- 11 . Julier, C., ら (1991a) . Nature 354 : 155-159.
- 12 . Kennedy, G.C., ら (1995) . Nature Genet. 9 : 293-298.
- 13 . Kyvik, K.O., ら (1995) . Brit. Med. J. 311 : 913-917.
- 14 . Lucassen, A., ら (1993) . Nature Genet. 4 : 305-310.

40

50

15. Lucassen, A., ら (1995). Hum. Mol. Genet. 4 : 501-506。
16. Luo, D.-F., ら (1996). Hum. Mol. Genet. 5 : 693-698。
17. Matsuda, A. and Kuzuya, T. (1994). Diab. Res. Clin. Pract. 24 : Suppl., S63-S67。
18. Risch (1987). Am. J. Hum. Genet. 40 : 1-14。
19. Owerbach, D., ら (1990). Diabetes 39 : 1504-1509。
20. Parimoo, S., ら (1991). P.N.A.S USA 88 : 9623-9627。
21. Penrose, L.S. (1953). Acta. Genet. Stat. Med. 4 : 257-265。
22. Risch, S.S. (1990). Diabetes 39 : 1315-19。
23. Spielman, R., ら (1993). Am. J. Hum. Genet. 52 : 506-516。
24. Thomson, G., ら (1989). Genet. Epidemiol. 6 : 155-160。
25. Tisch, R. and McDevitt, H.O. (1996). Cell 85 : 291-297。
26. Todd, J.A. (1994). Diabetic Med. 11 : 6-16。
27. Todd, J.A., ら (1987). Nature 329 : 599-604。
28. Todd, J.A. and Farrall, M. (1996). Hum. Mol. Genet. 5 : 1443-1448。
29. Todd, J.A., ら (1989). Nature 338 : 587-589。
30. Vafiadis, P., ら (1996). J. Autoimmunity 9 : 397-403。

表 1

英国、米国、ノルウェー国及びサルジニア国由来の2582組の家族におけるD11S1917 (UT5620) -H0570POLYAにおけるハプロタイプ分析。感受性、防御性及び中性対立形質を各多形において同定し、そして組換えハプロタイプの糖尿病子孫への伝搬を計算した (t = 伝搬、nt = 非伝搬)。ハプロタイプ 332-104 の有意な伝搬 (P = 0.05) 及びハプロタイプ 328-103 の有意な非伝搬 (P = 0.03) が検出された。

	D11S1917 (UT5620)	H0570POLYA	t	nt	P
	328	104	539	474	
防御性	332	103	427	521	0.002
感受性	332	104	60	33	0.005
防御性	328	104	16	31	0.03

表2 LRP5 cDNA を得るためのPCR プライマー

LRP5 cDNA 内に位置するプライマー：

プライマーは図5 (a) のヌクレオチド1で始まって番号付けした。

1F (mucx 1f)： ATGGAGCCCGAGTGAGC	(SEQ ID NO:49)
218R (27R)： ATGGTGGACTCCAGCTTGAC	(SEQ ID NO:50)
256F (1F)： TTCCAGTTTCCAAGGGAG	(SEQ ID NO:51)
265R (26R)： AAAACTGGAAGTCCACTGCG	(SEQ ID NO:52)
318R (4R)： GGTCTGCTTGATGGCCTC	(SEQ ID NO:53)
343F (2F)： GTGCAGAACGTGGTCATCT	(SEQ ID NO:54)

RCCAのベクタープライマー

361R (21R): GTGCAGAACGTGGTCATCT	(SEQ ID NO:54)
622R (2R): AGTCCACAATGATCTTCCGG	(SEQ ID NO:55)
638F (4F): CCAATGGACTGACCATCGAC	(SEQ ID NO:56)
657R (1R): GTCGATGGTCAGTCCATTGG	(SEQ ID NO:57)
956R (22R): TTGTCCTCCTCACAGCGAG	(SEQ ID NO:58)
1713F (21F): GGACTTCATCTACTGGACTG	(SEQ ID NO:59)
1481R (23R): CAGTCTGTCCAGTACATGAG	(SEQ ID NO:60)
1981F (22F): GCCTTCTTGGTCTTCACCAG	(SEQ ID NO:61)
2261F (23F): GGACCAACAGAATCGAAGTG	(SEQ ID NO:62)
2484R (5R): GTCAATGGTGAGGTCGT	(SEQ ID NO:63)
2519F (5F): ACACCAACATGATCGAGTCG	(SEQ ID NO:64)
3011F (24F): ACAAGTTCATCTACTGGGTG	(SEQ ID NO:65)
3154F (25F): CGGACACTGTTCTGGACGTG	(SEQ ID NO:66)
3173R (25R): CACGTCCAGAACAGTGTCCG	(SEQ ID NO:67)
3556R (3R): TCCAGTAGAGATGCTTGCCA	(SEQ ID NO:68)

10

RCCAのベクタープライマー

3577F (3F): ATCGAGCGTGTGGAGAAGAC	(SEQ ID NO:69)
4094F (30F): TCCTCATCAAACAGCAGTGC	(SEQ ID NO:70)
4173R (6R): CGGCTTGGTGATTTACAC	(SEQ ID NO:71)
4687F (6F): GTGTGTGACAGCGACTACAGC	(SEQ ID NO:72)
4707R (30R): GCTGTAGTCGCTGTACACAC	(SEQ ID NO:73)
5061R (7R): GTACAAAGTTCTCCCAGCCC	(SEQ ID NO:74)

20

GRAIL により同定したPCR プライマー

G1 1F: TCTTCTCCAGAGGATGCAGC	(SEQ ID NO:75)
G1 2F: TTCGTCTTGAACCTCCCAGC	(SEQ ID NO:76)
G1 3F: TCTTCTTCTCCAGAGGATGCA	(SEQ ID NO:77)
Gp1 1F: AGGCTGGTCTCAAACCTCCTG	(SEQ ID NO:78)
PBS.543R: GGGGATGTGCTGCAAGGCGA	(SEQ ID NO:79)
PBS.578R: CCAGGGTTTCCCAGTCACGAC	(SEQ ID NO:80)
PBS.838F: TTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAAC	(SEQ ID NO:81)
PBS.873F: CCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCC	(SEQ ID NO:82)

30

40

表3 ヒトLRP5のイントロン-エキソン構成

3' アセプター 配列		エキソンサイズ		5' ドナー配列		イントロン数と	
イントロン	エキソン	エキソン数	(bp)	エキソン	イントロン	サイズ (bp)	
ccgggtcaac/ATGGAG (SEQ ID NO: 411)	Ex 1 (G)	(91)	CCGCGG/gtaggtgggc	1 (35051)		(SEQ ID NO: 412)	10
tgccccacag/CCTCGC (SEQ ID NO: 413)	Ex 2 (A)	(391)	TCACGG/gtaaaccctg	2 (9408)		(SEQ ID NO: 414)	
cccgtcacag/GTACAT (SEQ ID NO: 415)	Ex 3 (B)	(198)	GTTCCG/gtaggtaccc	3 (6980)		(SEQ ID NO: 416)	
ctgactgcag/GCAGAA (SEQ ID NO: 417)	Ex 4 (C)	(197)	CTTTCT/gtgagtgcg	4 (1640)		(SEQ ID NO: 418)	
gttttcccag/TCCACA (SEQ ID NO: 419)	Ex 5 (D)	(132)	AGGCAG/gtgaggcgg	5 (20823)		(SEQ ID NO: 420)	
gtctccacag/GAGCCG (SEQ ID NO: 421)	Ex 6 (E)	(397)	GATGGG/gtaagacggg	6 (3213)		(SEQ ID NO: 422)	
tcttctccag/CCTCAT (SEQ ID NO: 423)	Ex 7 (F)	(172)	ATCGAG/gtgaggctcc	7 (13445)		(SEQ ID NO: 424)	
cgtcctgcag/GTGATC (SEQ ID NO: 425)	Ex 8 (G)	(217)	TCGTCG/gtgagtccgg	8 (2826)		(SEQ ID NO: 426)	
tcgcttccag/GAACCA (SEQ ID NO: 427)	Ex 9 (H)	(290)	CTGAAG/gtagcgtggg	9 (5000+)		(SEQ ID NO: 428)	
ctgctgccag/ACCATC (SEQ ID NO: 429)	Ex 10 (I)	(227)	CAAGGG/gtaagtgttt	10 (1295)		(SEQ ID NO: 430)	20
tgcttccag/CTACAT (SEQ ID NO: 431)	Ex 11 (J)	(185)	TGCTGG/gtgagggccg	11 (2068)		(SEQ ID NO: 432)	
gttcatgcag/GTCAGG (SEQ ID NO: 433)	Ex 12 (K)	(324)	GCAGCC/gtaagtgcct	12 (2005)		(SEQ ID NO: 434)	
cctcctctag/CGCCCA (SEQ ID NO: 435)	Ex 13 (L)	(200)	ACCCAG/gcagggtccc	13 (6963)		(SEQ ID NO: 436)	
tgtcttacag/CCCTTT (SEQ ID NO: 437)	Ex 14 (M)	(209)	GCGAGG/gtaggaggcc	14 (1405)		(SEQ ID NO: 438)	
cctcccgag/GTACCT (SEQ ID NO: 439)	Ex 15 (N)	(191)	TGTCAG/gtaaggggccc	15 (686)		(SEQ ID NO: 440)	
ctgcttgcag/GGGCCA (SEQ ID NO: 441)	Ex 16 (O)	(210)	AGTTCT/gtacgtgggg	16 (3894)		(SEQ ID NO: 442)	
gtctttgcag/CAGCCC (SEQ ID NO: 443)	Ex 17 (P)	(126)	GTGGAG/gtaggtgtga	17 (3903)		(SEQ ID NO: 444)	
cctccccag/AGCCGC (SEQ ID NO: 445)	Ex 18 (Q)	(237)	GTGACG/gtgaggccct	18 (3042)		(SEQ ID NO: 446)	
tcccttgcag/CCATCT (SEQ ID NO: 447)	Ex 19 (R)	(111)	TGTGTG/gtgagccagc	19 (1448)		(SEQ ID NO: 448)	30
tctctggcag/AAATCA (SEQ ID NO: 449)	Ex 20 (S)	(237)	TCACAG/gtaaggagcc	20 (1095)		(SEQ ID NO: 450)	
tccctgccag/GCATCG (SEQ ID NO: 451)	Ex 21 (T)	(140)	CCGCCG/gtgagggggc	21 (6514)		(SEQ ID NO: 452)	
ctctcctcag/ATCCTG (SEQ ID NO: 453)	Ex 22 (U)	(98)	GTACAG/gtaggacatc	22 (2275)		(SEQ ID NO: 454)	
tccctttcag/GCCCTA (SEQ ID NO: 455)	Ex 23 (V)	(>262)		23 (19985)			

表 4

LRP-5 エキソンプライマー

(SEQ ID NO: 83)	E1x1 1f	CAGGGTTTCATCCTTTGTGG
(SEQ ID NO: 84)	E1x1 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTCAGGGTTTCATCCTTTGTGG
(SEQ ID NO: 85)	E1x1 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCAGGGTTTCATCCTTTGTGG
(SEQ ID NO: 86)	E1x1 1r	TGACGGGAAGAGTTCCTCAG
(SEQ ID NO: 87)	E1x1 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCTGACGGGAAGAGTTCCTCAG
(SEQ ID NO: 88)	E1x5 1f	TCTGCTCTTCTGAACTGCC
(SEQ ID NO: 89)	E1x5 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTTCTGCTCTTCTGAACTGCC
(SEQ ID NO: 90)	E1x5 1r	TTGAGTCCTTCAACAAGCCC
(SEQ ID NO: 91)	E1x5 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCTTGAGTCCTTCAACAAGCCC
(SEQ ID NO: 92)	E1x6 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTTTCCCACTCATAGAGGCTC
(SEQ ID NO: 93)	E1x6 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGCTCCCAACTCGCCAAGT
(SEQ ID NO: 94)	E1x6a 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTGGTCAACATGGAGGCAGC
(SEQ ID NO: 95)	E1x6a 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCAGGTGTCAGTCCGCTTG
(SEQ ID NO: 96)	E1x6b 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTGCAGAGAAGTTCTGAGC
(SEQ ID NO: 97)	E1x6b 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCACTTGCCAGCCATACTC
(SEQ ID NO: 98)	E1x6c 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTCAAGCAAGCCTCTTGCTACC
(SEQ ID NO: 99)	E1x6c 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCACTGCAATGAGGTGAAAGGC
(SEQ ID NO: 100)	E1x6d 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTCAGGTGAGAACAAGTGTCCG
(SEQ ID NO: 101)	E1x6d 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGCTGCCCTCCATGTTGACC
(SEQ ID NO: 102)	E1x6e 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTTGTGCCTGGGTGAGATTCT
(SEQ ID NO: 103)	E1x6e 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCTGTGGAGCCTCTATGAGTGG
(SEQ ID NO: 104)	E1x6f 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTGGGTGACAGGTGGCAGTAG
(SEQ ID NO: 105)	E1x6f 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGGAAGGAAGGACACTTGAGC
(SEQ ID NO: 106)	E1x6g 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTCTGCTGTTGTTTGAACCC
(SEQ ID NO: 107)	E1x6g 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCAATGGGAAGCCAGGCTAG
(SEQ ID NO: 108)	E1xA 1f	ATCTTGCTGGCTTAGCCAGT
(SEQ ID NO: 109)	E1xA 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTATCTTGCTGGCTTAGCCAGT
(SEQ ID NO: 110)	E1xA 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCATCTTGCTGGCTTAGCCAGT
(SEQ ID NO: 111)	E1xA 1r	GCTCATGAAATTCGAGAGAG
(SEQ ID NO: 112)	E1xA 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGCTCATGCAAATTCGAGAGAG
(SEQ ID NO: 113)	E1xB 1f	CCTGTTGGTTATTTCCGATGG
(SEQ ID NO: 114)	E1xB 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTCCTGTTGGTTATTTCCGATGG
(SEQ ID NO: 115)	E1xB 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGTTGGTTATTTCCGATGG
(SEQ ID NO: 116)	E1xB 1r	CCTGAGTTAAGAAGGAACGCC
(SEQ ID NO: 117)	E1xB 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGAGTTAAGAAGGAACGCC
(SEQ ID NO: 118)	E1xC 1f	AATTGGGTGAGCAGCAATG
(SEQ ID NO: 119)	E1xC 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCAATTGGGTGAGCAGCAATG
(SEQ ID NO: 120)	E1xC 2f	AATTGGGTGAGCAGCAATG
(SEQ ID NO: 121)	E1xC 2fU	TGTAAAACGACGGCCAGTAATTGGGTGAGCAGCAATG
(SEQ ID NO: 119)	E1xC 2fR	GCTATGACCATGATTACGCCAATTGGGTGAGCAGCAATG
(SEQ ID NO: 122)	E1xC 1r	TTGGATCGCTAGAGATTGGG
(SEQ ID NO: 123)	E1xC 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGGATCGCTAGAGATTGGG
(SEQ ID NO: 124)	E1xC 2r	GCACCCTAATTGGCACTCA
(SEQ ID NO: 125)	E1xC 2rR	GCTATGACCATGATTACGCCCGACCCTAATTGGCACTCA
(SEQ ID NO: 126)	E1xD 1f	TGACGGTCCTCTTCTGGAAC
(SEQ ID NO: 127)	E1xD 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGACGGTCCTCTTCTGGAAC
(SEQ ID NO: 128)	E1xD 2f	CGAGGCAGGATGTGACTCAT
(SEQ ID NO: 129)	E1xD 2fU	TGTAAAACGACGGCCAGTCGAGGCAGGATGTGACTCAT
(SEQ ID NO: 130)	E1xD 2fR	GCTATGACCATGATTACGCCCGAGGCAGGATGTGACTCAT
(SEQ ID NO: 131)	E1xD 1r	AGTGGATCATTTTGAACGG
(SEQ ID NO: 132)	E1xD 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCAGTGGATCATTTTGAACGG
(SEQ ID NO: 133)	E1xD 2r	CCAACTCAGCTTCCCAGTA
(SEQ ID NO: 134)	E1xD 2rR	GCTATGACCATGATTACGCCCAACTCAGCTTCCCAGTA
(SEQ ID NO: 135)	E1xE 1f	TGGCTGAGTATTTCCCTTGC
(SEQ ID NO: 136)	E1xE 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTTGGCTGAGTATTTCCCTTGC
(SEQ ID NO: 137)	E1xE 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGGCTGAGTATTTCCCTTGC

10

20

30

40

表 4 - 続き

(SEQ ID NO: 138)	E1xE 1r	TTAACAAGCCCTCCTCCG	
(SEQ ID NO: 139)	E1xE 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCTTTAACAAGCCCTCCTCCG	
(SEQ ID NO: 140)	E1xF 1f	CAACGCCAGCATCTACTGA	
(SEQ ID NO: 141)	E1xF 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTCAACGCCAGCATCTACTGA	
(SEQ ID NO: 142)	E1xF 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCAACGCCAGCATCTCTACTGA	
(SEQ ID NO: 143)	E1xF 1r	CAATAGCAGAGCACAGGCA	
(SEQ ID NO: 144)	E1xF 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCAATAGCAGAGCACAGGCA	
(SEQ ID NO: 145)	E1xG 1f	TGAAGTTGCTGCTCTTGGG	
(SEQ ID NO: 146)	E1xG 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTTGAAGTTGCTGCTCTTGGG	
(SEQ ID NO: 147)	E1xG 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGAAGTTGCTGCTCTTGGG	
(SEQ ID NO: 148)	E1xG 1r	CACTTCCTCCTCATGCAAGTC	10
(SEQ ID NO: 149)	E1xG 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCACTTCCTCCTCATGCAAGTC	
(SEQ ID NO: 150)	E1xH 1f	AGACTGGAGCCTCTGTGTTCCG	
(SEQ ID NO: 151)	E1xH 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTAGACTGGAGCCTCTGTGTTCCG	
(SEQ ID NO: 152)	E1xH 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCAGACTGGAGCCTCTGTGTTCCG	
(SEQ ID NO: 153)	E1xH 1r	TGTGTGTCTACCGGACTTGC	
(SEQ ID NO: 154)	E1xH 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGTGTGTCTACCGGACTTGC	
(SEQ ID NO: 155)	E1xH 2r	GAACAGAGGCAAGGTTTTCCC	
(SEQ ID NO: 156)	E1xH 2rR	GCTATGACCATGATTACGCCGAACAGAGGCAAGGTTTTCCC	
(SEQ ID NO: 157)	E1xI 1f	AGAATCGCTTGAACCCAGG	
(SEQ ID NO: 158)	E1xI 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCAGAATCGCTTGAACCCAGG	
(SEQ ID NO: 159)	E1xI 2f	GCTGGTTTCCTAAAATGTGGC	
(SEQ ID NO: 160)	E1xI 2fU	TGTAAAACGACGGCCAGTGCTGGTTTCCTAAAATGTGGC	
(SEQ ID NO: 161)	E1xI 2fR	GCTATGACCATGATTACGCCGCTGGTTTCCTAAAATGTGGC	20
(SEQ ID NO: 162)	E1xI 1r	CATACGAGGTGAACACAAGGAC	
(SEQ ID NO: 163)	E1xI 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCATACGAGGTGAACACAAGGAC	
(SEQ ID NO: 164)	E1xJ 1f	TGAAGAGGTGGGGACAGTTG	
(SEQ ID NO: 165)	E1xJ 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGAAGAGGTGGGGACAGTTG	
(SEQ ID NO: 166)	E1xJ 2f	CTTGTGCCTTCCAGCTACATC	
(SEQ ID NO: 167)	E1xJ 2fU	TGTAAAACGACGGCCAGTCTTGTGCCTTCCAGCTACATC	
(SEQ ID NO: 168)	E1xJ 2fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTTGTGCCTTCCAGCTACATC	
(SEQ ID NO: 169)	E1xJ 1r	AGTCCTGGCACAGGGATTAG	
(SEQ ID NO: 170)	E1xJ 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCAGTCCTGGCACAGGGATTAG	
(SEQ ID NO: 171)	E1xJ 2r	ATAACTGCAGCAAAGGCACC	
(SEQ ID NO: 172)	E1xJ 2rR	GCTATGACCATGATTACGCCATAACTGCAGCAAAGGCACC	
(SEQ ID NO: 173)	E1xK 1f	GCTTCAGTGGATCTTGCTGG	
(SEQ ID NO: 174)	E1xK 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTGCTTCAGTGGATCTTGCTGG	30
(SEQ ID NO: 175)	E1xK 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCGCTTCAGTGGATCTTGCTGG	
(SEQ ID NO: 176)	E1xK 1r	TGTGCAGTGCACAACCTACC	
(SEQ ID NO: 177)	E1xK 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGTGCAGTGCACAACCTACC	
(SEQ ID NO: 178)	E1xL 1f	GTTGTGCGAGTGGCGTGCTAT	
(SEQ ID NO: 179)	E1xL 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTGTTGTGCGAGTGGCGTGCTAT	
(SEQ ID NO: 180)	E1xL 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCGTTGTGCGAGTGGCGTGCTAT	
(SEQ ID NO: 181)	E1xL 1r	AAAAGTCCTGTGGGGTCTGA	
(SEQ ID NO: 182)	E1xL 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCAAAAGTCCTGTGGGGTCTGA	
(SEQ ID NO: 183)	E1xM 1f	AGAAGTGTGGCCTCTGCTGT	
(SEQ ID NO: 184)	E1xM 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTAGAAGTGTGGCCTCTGCTGT	
(SEQ ID NO: 185)	E1xM 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCAGAAGTGTGGCCTCTGCTGT	
(SEQ ID NO: 186)	E1xM 1r	GTGAAAGAGCCTGTGTTTGCT	
(SEQ ID NO: 187)	E1xM 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGTGAAAGAGCCTGTGTTTGCT	40
(SEQ ID NO: 188)	E1xN 1f	AGACCCTGCTTCCAAATAAGC	
(SEQ ID NO: 189)	E1xN 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTAGACCCTGCTTCCAAATAAGC	
(SEQ ID NO: 190)	E1xN 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCAGACCCTGCTTCCAAATAAGC	
(SEQ ID NO: 191)	E1xN 1r	ACTCATTTTCTGCCTGCC	
(SEQ ID NO: 192)	E1xN 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCACTCATTTTCTGCCTCTGCC	
(SEQ ID NO: 193)	E1xO 1f	TGGCAGTCCTGTCAACCTCT	

表4-続き

(SEQ ID NO: 194)	E1xO 1fU	TGTAACACGACGGCCAGTTGGCAGTCCTGTCAACCTCT
(SEQ ID NO: 195)	E1xO 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCTGGCAGTCCTGTCAACCTCT
(SEQ ID NO: 196)	E1xO 1r	CACACAGGATCTTGCACTGG
(SEQ ID NO: 197)	E1xO 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCACACAGGATCTTGCACTGG
(SEQ ID NO: 198)	E1xP 1f	AGGGCCAGTTCTCATGAGTT
(SEQ ID NO: 199)	E1xP 1fU	TGTAACACGACGGCCAGTAGGGCCAGTTCTCATGAGTT
(SEQ ID NO: 200)	E1xP 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCAGGGCCAGTTCTCATGAGTT
(SEQ ID NO: 201)	E1xP 1r	GGGCAAAGGAAGACACAATC
(SEQ ID NO: 202)	E1xP 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGGGCAAAGGAAGACACAATC
(SEQ ID NO: 203)	E1xQ 1f	CAACTTCTGCTTTGAAGCCC
(SEQ ID NO: 204)	E1xQ 1fU	TGTAACACGACGGCCAGTCAACTTCTGCTTTGAAGCCC
(SEQ ID NO: 205)	E1xQ 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCAACTTCTGCTTTAAGCCC
(SEQ ID NO: 206)	E1xQ 1r	GACAGACTTGGCAATCTCCC
(SEQ ID NO: 207)	E1xQ 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGACAGACTTGGCAATCTCCC
(SEQ ID NO: 208)	E1xR 1f	TCTGCTCTCTGTTGGAGTCC
(SEQ ID NO: 209)	E1xR 1fU	TGTAACACGACGGCCAGTTCTGCTCTCTGTTGGAGTCC
(SEQ ID NO: 210)	E1xR 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCTCTGCTCTCTGTTGGAGTCC
(SEQ ID NO: 211)	E1xR 1r	CCCTAACTCCACGTTCTCTG
(SEQ ID NO: 212)	E1xR 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCCCTAACTCCACGTTCTCTG
(SEQ ID NO: 213)	E1xS 1f	GGGTTAATGTTGGCCACATC
(SEQ ID NO: 214)	E1xS 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCGGGTTAATGTTGGCCACATC
(SEQ ID NO: 215)	E1xS 2f	TTGGCAGGGATGTGTTGAG
(SEQ ID NO: 216)	E1xS 2fU	TGTAACACGACGGCCAGTTTGGCAGGGATGTGTTGAG
(SEQ ID NO: 217)	E1xS 2fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTTGGCAGGGATGTGTTGAG
(SEQ ID NO: 218)	E1xS 1r	GTCTGCCACATGTGCAAGAG
(SEQ ID NO: 219)	E1xS 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGTCTGCCACATGTGCAAGAG
(SEQ ID NO: 220)	E1xT 1f	TGGTCTGAGTCTCGTGGGTA
(SEQ ID NO: 221)	E1xT 1fU	TGTAACACGACGGCCAGTTGGTCTGAGTCTCGTGGGTA
(SEQ ID NO: 222)	E1xT 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGGTCTGAGTCTCGTGGGTA
(SEQ ID NO: 223)	E1xT 1r	GAGGTGGATTTGGGTGAGATT
(SEQ ID NO: 224)	E1xT 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGAGGTGGATTGGGTGAGATT
(SEQ ID NO: 225)	E1xU 1f	AGCCCTCTCTGCAAGGAAAG
(SEQ ID NO: 226)	E1xU 1fU	TGTAACACGACGGCCAGTAGCCCTCTCTGCAAGGAAAG
(SEQ ID NO: 227)	E1xU 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCAGCCCTCTCTGCAAGGAAAG
(SEQ ID NO: 228)	E1xU 1r	CAGAACGTGGAGTTCTGCTG
(SEQ ID NO: 229)	E1xU 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCAGAACGTGGAGTTCTGCTG
(SEQ ID NO: 230)	E1xV 1f	TACCGAATCCCACTCCTCTG
(SEQ ID NO: 231)	E1xV 1fU	TGTAACACGACGGCCAGTTACCGAATCCCACTCCTCTG
(SEQ ID NO: 232)	E1xV 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTACCGAATCCCACTCCTCTG
(SEQ ID NO: 233)	E1xV 2f	CATGGTAGAGGTGGGACCAT
(SEQ ID NO: 234)	E1xV 2fU	TGTAACACGACGGCCAGTCATGGTAGAGGTGGGACCAT
(SEQ ID NO: 235)	E1xV 2fR	GCTATGACCATGATTACGCCCATGGTAGAGGTGGGACCAT
(SEQ ID NO: 236)	E1xV 1r	GATATCCACCTCTGCCAAG
(SEQ ID NO: 237)	E1xV 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGATATCCACCTCTGCCAAG
(SEQ ID NO: 238)	E1xV 2r	TTACAGGGGCACAGAGAAGC
(SEQ ID NO: 239)	E1xV 2rR	GCTATGACCATGATTACGCCTTACAGGGGCACAGAGAAGC

SNP プライマー

(SEQ ID NO: 240)	57-1 1f	GCAACAGAGCAAGACCCTGT
(SEQ ID NO: 241)	57-1 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCGCAACAGAGCAAGACCCTGT
(SEQ ID NO: 242)	57-1 1r	AAATTAGCCAGGCATGGTG
(SEQ ID NO: 243)	57-1 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCAAATTAGCCAGGCATGGTG
(SEQ ID NO: 244)	57-1 1fU	TGTAACACGACGGCCAGTGCAACAGAGCAAGACCCTGT
(SEQ ID NO: 245)	57-2 1f	CCTGCAGAAGGAAACCTGAC
(SEQ ID NO: 246)	57-2 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGCAGAAGGAAACCTGAC
(SEQ ID NO: 247)	57-2 1r	CTGCATCTTTGCCACCATG
(SEQ ID NO: 248)	57-2 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGCATCTTTGCCACCATG
(SEQ ID NO: 249)	57-2 1fU	TGTAACACGACGGCCAGTCCTGCAGAAGGAAACCTGAC

10

20

30

40

表 4 - 続き

(SEQ ID NO: 250)	57-3 1f	TTCCCAGGAGGCAAGTTATG
(SEQ ID NO: 251)	57-3 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCTTCCCAGGAGGCAAGTTATG
(SEQ ID NO: 252)	57-3 1r	TGGGCTTAGGTGATCCTCAC
(SEQ ID NO: 253)	57-3 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCTGGGCTTAGGTGATCCTCAC
(SEQ ID NO: 254)	57-3 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTTTCCCAGGAGGCAAGTTATG
(SEQ ID NO: 255)	57-4 1f	ACCAAGCCCAACTAATCAGC
(SEQ ID NO: 256)	57-4 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCACCAAGCCCAACTAATCAGC
(SEQ ID NO: 257)	57-4 1r	ATGCCGTGTAATCCCAGCACT
(SEQ ID NO: 258)	57-4 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCATGCCTGTAATCCCAGCACT
(SEQ ID NO: 259)	57-4 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTACCAAGCCCAACTAATCAGC
(SEQ ID NO: 260)	57-5 1f	ACTGCAAGCCCTCTCTGAAC
(SEQ ID NO: 261)	57-5 1r	CGAAGACTGCGAACAGACA
(SEQ ID NO: 262)	58-1 1f	CTAGTGCCGTGCAGAATGAG
(SEQ ID NO: 263)	58-1 1r	GGCCACTGCAATGAGATACA
(SEQ ID NO: 264)	58-2 1f	GAGAAACAGTTCCAGGGTGG
(SEQ ID NO: 265)	58-2 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCGAGAAACAGTTCCAGGGTGG
(SEQ ID NO: 266)	58-2 1r	AAACTGAGGCTGGGAGAGGT
(SEQ ID NO: 267)	58-2 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCAAACTGAGGCTGGGAGAGGT
(SEQ ID NO: 268)	58-3 1f	TGTTCTTCTCACAGGGAGG
(SEQ ID NO: 269)	58-3 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCTGTTCTTCTCACAGGGAGG
(SEQ ID NO: 270)	58-3 1r	TCCCCAAATCTGTCCAGTTC
(SEQ ID NO: 271)	58-3 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCTCCCCAAATCTGTCCAGTTC
(SEQ ID NO: 272)	58-4 1f	CATACCTGGAGGGATGCTTG
(SEQ ID NO: 273)	58-4 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCATACCTGGAGGGATGCTTG
(SEQ ID NO: 274)	58-4 1r	TAGGTTGCTGTGTGGCTTCA
(SEQ ID NO: 275)	58-4 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCTAGGTTGCTGTGTGGCTTCA
(SEQ ID NO: 276)	58-5 1f	CTTCTGACAAAGCAGAGGCC
(SEQ ID NO: 277)	58-5 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTTCTGACAAAGCAGAGGCC
(SEQ ID NO: 278)	58-5 1r	GCTGTTAGGGTTACCATCGC
(SEQ ID NO: 279)	58-5 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGCTGTTAGGGTTACCATCGC
(SEQ ID NO: 280)	58-6 1f	CCACAGGGTGATATGCTGTC
(SEQ ID NO: 281)	58-6 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCCACAGGGTGATATGCTGTC
(SEQ ID NO: 282)	58-6 1r	CGCCTGGCTACTTTGGTACT
(SEQ ID NO: 283)	58-6 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCGCCTGGCTACTTTGGTACT
(SEQ ID NO: 284)	58-7 1f	CCAAATGAACCTGGGCAAC
(SEQ ID NO: 285)	58-7 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCCAAATGAACCTGGGCAAC
(SEQ ID NO: 286)	58-7 1r	GTCTTGGCTCACTGCAACCT
(SEQ ID NO: 287)	58-7 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGCTTGGCTCACTGCAACCT
(SEQ ID NO: 288)	58-8 1f	GCCAAGACTGTGCTACTGCA
(SEQ ID NO: 289)	58-8 1r	CAGGGAGCAGATCTTACCCA
(SEQ ID NO: 290)	58-9 1f	TGGGATTAAGTGGGAGGGG
(SEQ ID NO: 291)	58-9 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCTGGGATTAAGTGGGAGGGG
(SEQ ID NO: 292)	58-9 1r	TGCTGCTGTCTCCATCTCTG
(SEQ ID NO: 293)	58-9 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCTGCTGCTGTCTCCATCTCTG
(SEQ ID NO: 294)	58-10 1f	ACAGACCAGCAGTGAAACCTG
(SEQ ID NO: 295)	58-10 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCACAGACCAGCAGTGAAACCTG
(SEQ ID NO: 296)	58-10 1r	GTTCACTGCAACCTCTGCCT
(SEQ ID NO: 297)	58-10 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGTTCACTGCAACCTCTGCCT
(SEQ ID NO: 298)	58-11 1f	GTTCTCGTAGATGCTTGCAAG
(SEQ ID NO: 299)	58-11 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCGTTCTCGTAGATGCTTGCAAG
(SEQ ID NO: 300)	58-11 1r	GAGGCAGGAGGATCACTTGA
(SEQ ID NO: 301)	58-11 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGAGGCAGGAGGATCACTTGA
(SEQ ID NO: 302)	58-12 1f	TGAGCTGAGATCACACCGCT
(SEQ ID NO: 303)	58-12 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCTGAGCTGAGATCACACCGCT
(SEQ ID NO: 304)	58-12 1r	AGTTGACACTTTGCTGGCCT
(SEQ ID NO: 305)	58-12 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCAGTTGACACTTTGCTGGCCT

10

20

30

40

表4-続き

(SEQ ID NO: 306)	58-13 1f	CTCTGCATGGCTTAGGGACA
(SEQ ID NO: 307)	58-13 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTCTGCATGGCTTAGGGACA
(SEQ ID NO: 308)	58-13 1r	GGCTGCTCTCTGCATTCTCT
(SEQ ID NO: 309)	58-13 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGGCTGCTCTCTGCATTCTCT
(SEQ ID NO: 310)	58-14 1f	CTGGCTTTAGCTTGCATTTCC
(SEQ ID NO: 311)	58-14 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGGCTTTAGCTTGCATTTCC
(SEQ ID NO: 312)	58-14 1r	TGCCTCAGTTTTCTCACCTGT
(SEQ ID NO: 313)	58-14 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGCCTCAGTTTTCTCACCTGT
(SEQ ID NO: 314)	58-15 1f	CAAACAGCCACTGAGCATGT
(SEQ ID NO: 315)	58-15 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCAAACAGCCACTGAGCATGT
(SEQ ID NO: 316)	58-15 1r	TCCTCCTGTAGATGCCCAAG
(SEQ ID NO: 317)	58-15 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCTCCTCCTGTAGATGCCCAAG

10

表5

LRP-5 エキソン SNPs

エキソン	多形性	アミノ酸変化	位 置
エキソンE	G~A	イントロン	エキソンEの10bp 3' 側
エキソンE	C~T	なし	Phe ³³¹ , エキソンE
エキソンF	G~A	イントロン	エキソンFの50bp 5' 側
エキソンG	C~T	なし	Phe ⁵¹⁸ , エキソンG
エキソンI	C~T	なし	Asn ⁷⁰⁹ , エキソンI
エキソンP	C~T	イントロン	エキソンPの82bp 5' 側
エキソンN	C~T	なし	Asp ¹⁰⁶⁸ , エキソンN
エキソンN	A~G	なし	Val ¹⁰⁸⁸ , エキソンN
エキソンQ	C~T	Ala ¹²⁹⁹ ~Val	Ala ¹²⁹⁹ , エキソンQ
エキソンU	T~C	Val ¹⁴⁹⁴ ~Ala	Val ¹⁴⁹⁴ , エキソンU

20

30

表 6

IDDM 4 遺伝子座において同定されたSNP 分析のためのPCR フラグメント及び有用なRFLP部位のリスト

PCR 生成物	SNP	位置	酵素	
コンティグ57				
57-1	a/t	13363	なし	10
57-1	a/g	13484	Bst XI	
57-2	a/g	14490	なし	20
57-2	a/g	14885	なし	
57-3	c/g	18776	Mae II	
57-3	t/c	18901	Msp I	
57-3	a/g	19313	Afl I	
57-4	22T/25T	20800	なし	
57-5	g/a	23713	Msp I	
コンティグ58				
58-15	c/t	3015	なし	

58-14	g/c	3897	Pf1 MI	
58-13	c/g	5574	Eco NI	
58-12	t/g	6051	なし	
58-11	a/g	8168	なし	
58-10	a/g	8797	なし	
58-9	g/t	9445	なし	10
58-9	c/t	9718	なし	
58-8	インサート T	10926	Pst I	
58-7	t/a	11449	Bst XI	
58-7	t/c	11468	なし	
58-6	t/c	11878	なし	
58-6	g/a	12057	なし	20
58-6	a/g	12180	Hga I	
58-5	c/t	14073	なし	
58-4	a/g	15044	Mae II	
58-4	t/c	15354	なし	
58-3	インサート G	16325	なし	
58-2	g/a	17662	なし	
58-1	g/t	18439	Bgl II	30

表7

SNP プライマー		
(SEQ ID NO: 240)	57-1 1f	GCAACAGAGCAAGACCCTGT
(SEQ ID NO: 241)	57-1 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCGCAACAGAGCAAGACCCTGT
(SEQ ID NO: 242)	57-1 1r	AAATTAGCCAGGCATGGTG
(SEQ ID NO: 243)	57-1 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCAAATTAGCCAGGCATGGTG
(SEQ ID NO: 244)	57-1 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTGCAACAGAGCAAGACCCTGT
(SEQ ID NO: 245)	57-2 1f	CCTGCAGAAGGAAACCTGAC
(SEQ ID NO: 246)	57-2 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGCAGGAAGGAAACCTGAC
(SEQ ID NO: 247)	57-2 1r	CTGCATCTTTGCCACCATG
(SEQ ID NO: 248)	57-2 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGCATCTTTGCCACCATG
(SEQ ID NO: 249)	57-2 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTCTGCAGAAGGAAACCTGAC
(SEQ ID NO: 250)	57-3 1f	TTCCCAGGAGGCAAGTTATG
(SEQ ID NO: 251)	57-3 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTTCCCAGGAGGCAAGTTATG
(SEQ ID NO: 252)	57-3 1r	TGGGCTTAGGTGATCCTCAC
(SEQ ID NO: 253)	57-3 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGGGCTTAGGTGATCCTCAC
(SEQ ID NO: 254)	57-3 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTTTCCCAGGAGGCAAGTTATG
(SEQ ID NO: 255)	57-4 1f	ACCAAGCCCAACTAATCAGC
(SEQ ID NO: 256)	57-4 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCACCAAGCCCAACTAATCAGC
(SEQ ID NO: 257)	57-4 1r	ATGCCTGTAATCCCAGCACT
(SEQ ID NO: 258)	57-4 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCATGCCTGTAATCCCAGCACT
(SEQ ID NO: 259)	57-4 1fU	TGTAAAACGACGGCCAGTACCAAGCCCAACTAATCAGC
(SEQ ID NO: 260)	57-5 1f	ACTGCAAGCCCTCTCTGAAC
(SEQ ID NO: 261)	57-5 1r	CGAAGACTGCGAAACAGACA
(SEQ ID NO: 262)	58-1 1f	CTAGTGCCGTGCAGATGAG
(SEQ ID NO: 263)	58-1 1r	GGCCACTGCAATGAGATACA
(SEQ ID NO: 264)	58-2 1f	GAGAAACAGTTCCAGGGTGG
(SEQ ID NO: 265)	58-2 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCGAGAAACAGTTCCAGGGTGG
(SEQ ID NO: 266)	58-2 1r	AAACTGAGGCTGGGAGAGGT
(SEQ ID NO: 267)	58-2 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCAAACTGAGGCTGGGAGAGGT
(SEQ ID NO: 268)	58-3 1f	TGTTCTTCTCACAGGGAGG
(SEQ ID NO: 269)	58-3 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGTTCTTCTCACAGGGAGG
(SEQ ID NO: 270)	58-3 1r	TCCCCAAATCTGTCCAGTTC
(SEQ ID NO: 271)	58-3 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCTCCCCAAATCTGTCCAGTTC
(SEQ ID NO: 272)	58-4 1f	CATACCTGGAGGGATGCTTG
(SEQ ID NO: 273)	58-4 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCATACCTGGAGGGATGCTTG
(SEQ ID NO: 274)	58-4 1r	TAGGTTGCTGTGTGGCTTCA
(SEQ ID NO: 275)	58-4 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCTAGGTTGCTGTGTGGCTTCA
(SEQ ID NO: 276)	58-5 1f	CTTCTGACAAAGCAGAGGCC
(SEQ ID NO: 277)	58-5 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTTCTGACAAAGCAGAGGCC
(SEQ ID NO: 278)	58-5 1r	GCTGTTAGGGTTACCATCGC
(SEQ ID NO: 279)	58-5 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGCTGTTAGGGTTACCATCGC
(SEQ ID NO: 280)	58-6 1f	CCACAGGGTGATATGCTGTC
(SEQ ID NO: 281)	58-6 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCCACAGGGTGATATGCTGTC
(SEQ ID NO: 282)	58-6 1r	CGCCTGGCTACTTTGGTACT
(SEQ ID NO: 283)	58-6 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCCGCCTGGCTACTTTGGTACT

10

20

30

表7-続き

SNP プライマー

(SEQ ID NO: 284)	58-7 1f	CCAAATGAACCTGGGCAAC	
(SEQ ID NO: 285)	58-7 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCCAAATGAACCTGGGCAAC	
(SEQ ID NO: 286)	58-7 1r	GTCTTGGCTCACTGCAACCT	
(SEQ ID NO: 287)	58-7 1rR	GCTATGACCATGATTACGCGTCTTGGCTCACTGCAACCT	
(SEQ ID NO: 288)	58-8 1f	GCCAAGACTGTGCTACTGCA	
(SEQ ID NO: 289)	58-8 1r	CAGGGAGCAGATCTTACCCA	10
(SEQ ID NO: 290)	58-9 1f	TGGGATTAAGTAGGGAGGGG	
(SEQ ID NO: 291)	58-9 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCTGGGATTAAGTAGGGAGGGG	
(SEQ ID NO: 292)	58-9 1r	TGCTGCTGTCTCCATCTCTG	
(SEQ ID NO: 293)	58-9 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCTGCTGCTGTCTCCATCTCTG	
(SEQ ID NO: 294)	58-10 1f	ACAGACCAGCAGTGAAACCTG	
(SEQ ID NO: 295)	58-10 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCACAGACCAGCAGTGAAACCTG	
(SEQ ID NO: 296)	58-10 1r	GTTCACTGCAACCTCTGCCT	
(SEQ ID NO: 297)	58-10 1rR	GCTATGACCATGATTACGCGTTCACTGCAACCTCTGCCT	
(SEQ ID NO: 298)	58-11 1f	GTTCTCGTAGATGCTTGCAGG	
(SEQ ID NO: 299)	58-11 1fR	GCTATGACCATGATTACGCGTTCTCGTAGATGCTTGCAGG	20
(SEQ ID NO: 300)	58-11 1r	GAGGCAGGAGGATCACTTGA	
(SEQ ID NO: 301)	58-11 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGAGGCAGGAGGATCACTTGA	
(SEQ ID NO: 302)	58-12 1f	TGAGCTGAGATCACACCGCT	
(SEQ ID NO: 303)	58-12 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCTGAGCTGAGATCACACCGCT	
(SEQ ID NO: 304)	58-12 1r	AGTTGACACTTTGCTGGCCT	
(SEQ ID NO: 305)	58-12 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCAGTTGACACTTTGCTGGCCT	
(SEQ ID NO: 306)	58-13 1f	CTCTGCATGGCTTAGGGACA	
(SEQ ID NO: 307)	58-13 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTCTGCATGGCTTAGGGACA	
(SEQ ID NO: 308)	58-13 1r	GGCTGCTCTCTGCATTCTCT	
(SEQ ID NO: 309)	58-13 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCGGCTGCTCTCTGCATTCTCT	
(SEQ ID NO: 310)	58-14 1f	CTGGCTTTAGCTTGCATTTC	30
(SEQ ID NO: 311)	58-14 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCTGGCTTTAGCTTGCATTTC	
(SEQ ID NO: 312)	58-14 1r	TGCCTCAGTTTTCTCACCTGT	
(SEQ ID NO: 313)	58-14 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCTGCCTCAGTTTTCTCACCTGT	
(SEQ ID NO: 314)	58-15 1f	CAACAGCCACTGAGCATGT	
(SEQ ID NO: 315)	58-15 1fR	GCTATGACCATGATTACGCCCAAACAGCCACTGAGCATGT	
(SEQ ID NO: 316)	58-15 1r	TCCTCCTGTAGATGCCCAAG	
(SEQ ID NO: 317)	58-15 1rR	GCTATGACCATGATTACGCCTCCTCCTGTAGATGCCCAAG	

表 8

染色体11q13 上のIDDM 4 領域のゲノタイピング及び制限マッピングのためのマイクロサテライトレスキューによりデザインしたプライマー。その他の使用したプライマーは公開され、且つゲノムデータベースの中にある。

255CA3F	GCCGAGAATTGTCATCTTAACT	(SEQ ID NO: 318)	10
255CA3R	GGATTGAAAGCTGCAAACCTACA	(SEQ ID NO: 319)	
255CA5F	GGAGCCACCACATCCAGTTA	(SEQ ID NO: 320)	
255CA5R	TGGAGGGATTGCTTGAGG	(SEQ ID NO: 321)	
255CA6F	AGGTGTACACCACCATGCCT	(SEQ ID NO: 322)	
255CA6R	TGGTGCCAATTATTGCTGC	(SEQ ID NO: 323)	
14LCA5F	AGATCTTATACACATGTGCGCG	(SEQ ID NO: 324)	
14LCA5R	AGGTGACATCACTTACAGCGG	(SEQ ID NO: 325)	
L15CA1F	ATTACCCAGGCATGGTGC	(SEQ ID NO: 326)	
L18CA1R	CAGGCACTTCTTCCAGGTCT	(SEQ ID NO: 327)	
18018ACF	AGGGTTACACTGGAGTTTGC	(SEQ ID NO: 328)	
18018ACR	AAACCTTCAATGTGTTTCATTAAAAC	(SEQ ID NO: 329)	
E0864CAF	TCAACTTTATTGGGGGTTTA	(SEQ ID NO: 330)	20
E0864CAR	AAGGTAAAAGTCCAAAATGG	(SEQ ID NO: 331)	
H0570POLYAF	GGACAGTCAGTTATTGAAATG	(SEQ ID NO: 332)	
H0560POLYAR	TTTCCTCTCTGGGAGTCTCT	(SEQ ID NO: 333)	

E0864CA はコスミドE0864 から得た。

H0570POLYAはコスミドH0570 から得た。

255CA5, 255CA3及び255CA6はPAC255_m_19 から得た。

14LCA5及びL15CA1はBAC 14_1_15 から得た。

18018AC はPAC 18_o_18 から得た。

30

表9 LRP-3 cDNAを得るためのプライマー

A.) ヒトLRP-3 cDNA内にあるプライマー:

プライマーは図17 (a) のヌクレオチド1で始まって番号付けした。

IF (muex 1f)	(SEQ ID NO: 49)	
ATGGAGCCCGAGTGAGC		
200f	(SEQ ID NO: 334)	
TCAAGCTGGAGTCCACCATC		
218R (27R)	(SEQ ID NO: 50)	
ATGGTGGACTCCAGCTTGAC		
256F (1F)	(SEQ ID NO: 51)	10
TTCCAGTTTCCAAGGGAG		
265R (26R)	(SEQ ID NO: 52)	
AAAACTGGAAGTCCACTGCG		
318R (4R)	(SEQ ID NO: 53)	
GGTCTGCTTGATGGCCTC		
343F (2F)	(SEQ ID NO: 54)	
GTGCAGAACGTGGTCATCT		
361R (21R)	(SEQ ID NO: 54)	
GTGCAGAACGTGGTCATCT		
622R (2R)	(SEQ ID NO: 55)	
AGTCCACAATGATCTTCCGG		
638F (4F)	(SEQ ID NO: 56)	20
CCAATGGACTGACCATCGAC		
657R (1R)	(SEQ ID NO: 57)	
GTCGATGGTCAGTCCATTGG		
936f	(SEQ ID NO: 335)	
CACTCGCTGTGAGGAGGAC		
956R (22R)	(SEQ ID NO: 58)	
TTGTCCCTCCTCACAGCGAG		
1040f (51f)	(SEQ ID NO: 336)	
ACAACGGCAGGACGTGTAAG		
1174f (40f)	(SEQ ID NO: 337)	
ATTGCCATCGACTACGACC		
1277f (52f)	(SEQ ID NO: 338)	
TGGTCAACACCGAGATCAAC		
1333f	(SEQ ID NO: 339)	30
AACCTCTACTGGACCGACAC		
1462f (41f)	(SEQ ID NO: 340)	
CTCATGTACTGGACAGACT		
1481R (23R)	(SEQ ID NO: 60)	
CAGTCTGTCCAGTACATGAG		
1607f (50f)	(SEQ ID NO: 341)	
GAGACGCCAAGACAGACAAG		
1713F (21F)	(SEQ ID NO: 59)	
GGACTTCATCTACTGGACTG		
1732r (40r)	(SEQ ID NO: 342)	
CAGTCCAGTAGATGAAGTCC		
1904r (k275r)	(SEQ ID NO: 343)	
GTGAAGAAGCACAGGTGGCT		
1960r	(SEQ ID NO: 344)	40
TCATGTCACTCAGCAGCTCC		
1981F (22F)	(SEQ ID NO: 61)	
GCCTTCTTGGTCTTCACCAG		
2261F (23F)	(SEQ ID NO: 62)	
GGACCAACAGAATCGAAGTG		
2484R (5R)	(SEQ ID NO: 63)	
GTCAATGGTGAGGTCGT		

LRP-3 cDNAを得るためのプライマー

[illegible]

表9－続き

LRP-3 cDNAを得るためのプライマー	
445r(mulrp3 4r)	(SEQ ID NO: 359)
GCCATCAGGTGACACGAG	
536f(MucD 11F)	(SEQ ID NO: 360)
AAGGTTCTCTTCTGGCAGGAC	
619r(MucD 12R)	(SEQ ID NO: 361)
CCAGTCAGTCCAGTACATG	
714f(museq 1f)	(SEQ ID NO: 362)
TCGACCTGGAGGAACAGAAG	
752f(mulrpAb 1f)	(SEQ ID NO: 363)
AAGCTCAGCTTCATCCACCG	
765r(MucD 8R)	(SEQ ID NO: 364)
ATGAAGCTGAGCTTGGCATC	
915f(MucD 12F)	(SEQ ID NO: 365)
AGCAGAGGAAGGAGATCCTTAG	
957r(MucD 9R)	(SEQ ID NO: 366)
TCCATGGGTGAGTACAGAGC	
1105r(museq 1r)	(SEQ ID NO: 367)
ATTGTCCTGCAACTGCACAC	
1232f(MucD 13F)	(SEQ ID NO: 368)
GCCATTGCCATTGACTACG	
1254r(MucD 10R)	(SEQ ID NO: 369)
GGATCGTAGTCAATGGCAATG	
1425f(MucD 14F)	(SEQ ID NO: 370)
GAATTGAGGTGACTCGCCTC	
1433r(MucD 18R)	(SEQ ID NO: 371)
CCTCAATTCTGTAGTGCCTG	
1501f(muxt 4f)	(SEQ ID NO: 372)
TGTGTTGCACCCTGTGATG	
1579r(MucD 11R)	(SEQ ID NO: 373)
ATCTAGGTTGGCGCATTTCG	
1610r(MucD 13R)	(SEQ ID NO: 374)
AGGTGTTTACCAGGACATG	
1710r(mulrpAb 1r)	(SEQ ID NO: 375)
GCGAGCTCCCGTCTATGTTGATCACCTCG	
1868f(MucD 3f)	(SEQ ID NO: 376)
GACCTGATGGGACTCAAAGC	
2062r(MucD 2r)	(SEQ ID NO: 377)
GCTGGTGAATACCAGGAAGG	
2103f(MucD 4f)	(SEQ ID NO: 378)
ACGATGTGGCTATCCCACTC	
2422r(MucD 14R)	(SEQ ID NO: 379)
AGTAGGATCCAGAGCCAGAG	
2619f(MucD 5f)	(SEQ ID NO: 380)
AGCGCATGGTGATAGCTGAC	
2718r(MucD 3r)	(SEQ ID NO: 381)
CGTTCAATGCTATGCAGGTTT	
2892f(MucD 15F)	(SEQ ID NO: 382)
GTGCTTCACACTACACGCTG	
2959f(MucD 6f)	(SEQ ID NO: 383)
CAGCCAGAAATTTGCCATC	
3218r(MucD 4r)	(SEQ ID NO: 384)
TCCGGCTGTAGATGTCAATG	
3237f(MucD 7f)	(SEQ ID NO: 385)
AGGCCACCAACACTATCAATG	

表9ー続き

LRP-3 cDNAを得るためのプライマー	
3348r(MucD 52R) TACCCTCGCTCAGCATTGAC	(SEQ ID NO: 386)
3554f(MucD 8f) CTGGAAGATGCCAACATCG	(SEQ ID NO: 387)
3684r(MucD 5r) TGAACCCCTAGTCCGCTTGTC	(SEQ ID NO: 388)
3848f(MucD 18F) CTGCAGAACCTGCTGACTTG	(SEQ ID NO: 389)
3973f(MucD 19F) CCAGAGTGATGAAGAAGGCTG	(SEQ ID NO: 390)
3981r(MucD 15R) TCACTCTGGTCAGCACACTC	(SEQ ID NO: 391)
4079f(MucD 16F) CAGGATCGCTCTGATGAAGC	(SEQ ID NO: 392)
4105r(MucD 53R) GCAGTTAGCTTCATCAGAGCG	(SEQ ID NO: 393)
4234f(MucD 9f) ACCCCTCTGATGACATCCCAG	(SEQ ID NO: 394)
4270r(MucD 16R) AATGGCACTGCTGTGGGC	(SEQ ID NO: 395)
4497r(MucD 6r) AGGCTCATGGAGCTCATCAC	(SEQ ID NO: 396)
4589r(MucD 54R) ATAGTGTGGCCTTTGTGCTG	(SEQ ID NO: 397)
4703f(MucD 17F) GTCATTGAGGTATGGCACC	(SEQ ID NO: 398)
4799r(MucD 17R) GGTAGTATTTGCTGCTCTTCC	(SEQ ID NO: 399)
5114r(MucD 1r) GC Xba I AAAGTTTCCCAGCCCTGCC	(SEQ ID NO: 400)
可溶性/アデノプライマー 3554f(Msolf) CTGGAAGATGCCAACATCG	(SEQ ID NO: 401)
4264r(MH1SR) GCTCTAGACTAGTGATGGTGATGGTGACTGCTGTGGGCTGGGATGTCATC	(SEQ ID NO: 402)
AGAGGGTGG	

表10 LRP3処置対コントロールの血清化学対比のまとめ

変因子	マウスタイプ	処 置 (%diff±SE)	p-値 (処置)
トリグリセリド	WT+K0	-30±14	0.025
アリカリ	WT+K0	-49±15	0.001
ホスファターゼ#			
総コレステロール	K0のみ	-28±15	0.073
総コレステロール	WTのみ	30±13	0.080
AST#	WT+K0	8±66	0.912
ALT#	WT+K0	-34±51	0.431
BUN	WT+K0	-19±15	0.195

#コントロールについて統計学的に有意に高い基底値。

表11: ノックアウト及び野生型マウスのプールの血液化学変因子のまとめ

変因子	処置 グループ	動物 タイプ	n	基底値 (平均±%CV)	処置後 (平均±%CV) t	変動	%変動 (95%CI)	P-値 (%chg)
trigly(mg/dL)	コントロール	プー	10	86±13%	186±35%	100	115% (61, 189)	<0.001
trigly(mg/dL)	LDL	プー	9	92±31%	81±55%	-12	-13% (-35, 17)	0.321
trigly(mg/dL)	LRP3	プー	8	99±24%	128±36%	29	30% (-10, 86)	0.133
alkphos(U/L)	コントロール	プー	10	190±19%	374±30%	184	97% (68, 130)	<0.001
alkphos(U/L)	LDL	プー	9	162±12%	193±29%	31	19% (-1, 43)	0.061
alkphos(U/L)	LRP3	プー	8	154±13%	146±35%	-8	-5% (-24, 19)	0.604
totchol(mg/dL)	コントロール	プー	10	116±69%	176±86%	60	51% (21, 89)	0.002
totchol(mg/dL)	LDL	プー	9	124±58%	87±68%	-37	-30% (-41, -17)	0.001
totchol(mg/dL)	LRP3	プー	8	127±62%	166±57%	39	30% (9, 56)	0.009
AST(U/L)	コントロール	プー	9	41±22%	821±69%	780	1894% (1142, 3101)	<0.001
AST(U/L)	LDL	プー	8	41±25%	362±61%	320	772% (369, 1520)	<0.001
AST(U/L)	LRP3	プー	8	33±21%	989±129%	955	2888% (953, 8380)	<0.001
ALT(U/L)	コントロール	プー	10	33±15%	624±59%	591	1798% (1203, 2665)	<0.001
ALT(U/L)	LDL	プー	8	32±36%	331±42%	299	938% (447, 1872)	<0.001
ALT(U/L)	LRP3	プー	8	25±35%	1020±157%	994	3944% (861, 16921)	<0.001
BUN(U/L)	コントロール	プー	8	29±12%	23±11%	-5	-19% (-29, -7)	0.008
BUN(U/L)	LDL	プー	9	28±19%	25±14%	-3	-12% (-22, 1)	0.062
BUN(U/L)	LRP3	プー	8	28±12%	19±41%	-9	-31% (-53, 2)	0.058

平均は幾何学的平均で示す。

p 値は 2- サイド対合 t- 検定に由来する。

表12 ヒト及びマウスLRP-3 間での配列類似性の領域

ヒト配列の位置 ヌクレオチド長 %同一性 BLAST評点 エキソン名

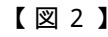
コンティグ31

20235-20271	37	86	140		
24410-24432	23	86	88		
24464-24667	204	82	168, 223	6	
24904-24995	52	82	179		
25489-25596	108	81	360		10
26027-26078	52	80	170		
26192-26261	70	84	251		
26385-26486	102	87	393		
28952-28993	42	85	156		
41707-41903	197	90	823		
42827-42898	66	81	222		
43468-43585	117	85	316		
50188-50333	146	86	550		
54455-54494	40	80	128		
54718-54750	33	87	129		
59713-60123	411	87	1587	A	
78536-78680	145	80	473	D	20
87496-87548	53	88	211		
87598-87717	120	84	429		
90772-90819	48	85	177		
99457-99795	339	83	1182	E	
103094-103281	188	83	661	F	
116659 -116954	296	81	985	G	
119754-120089	336	83	1167	H	

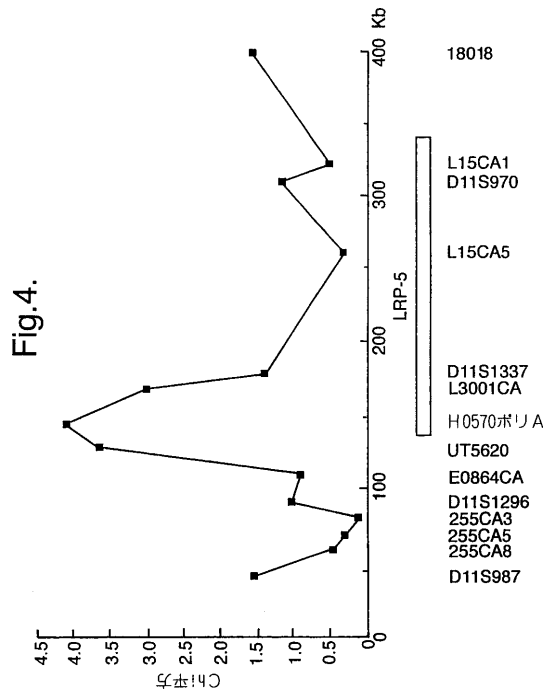
コンティグ30

8920-9256	337	89	1026	K	30
11238-11353	116	84	*418	L	
18394-18648	255	80	825	M	
20020-20224	205	84	746	N	
20926-21153	228	83	807	O	
24955-25155	201	82	672	P	
29126-19288	163	74	*437	Q	
33874-34033	160	85	*593	S	
35205-35340	136	86	509	T	
41911-41911	55	80	*176	U	
44629-44681	53	73	*249	V	40

Fig. 1.



【 図 4 】



[illegible]

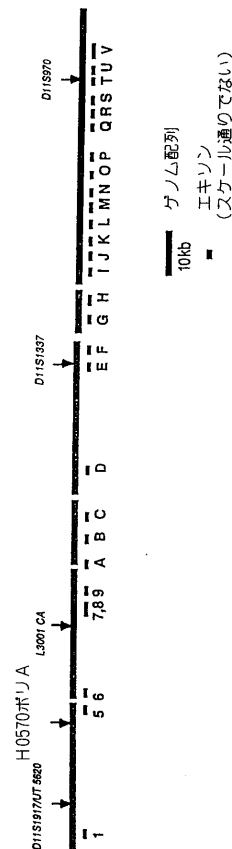
ACACCAACATGATCGAGTCGTCCAACATGCTGGGTGAGGAGCGGGTCGTGATTG
CCGACGATCTCCCGACCCCGTCGGGTCTGACCGAGTCACAGCGATTATTACTG
CGAGAGCTGGAAITCTGCACAGCATGTAGCGGGCCGACAGCAAGTACGCGCCGG
AACCAGCCACCTTATCCAGGCCCACTGGAGCTCTGATGGAGCATCTGTGTTGTG
CACTCTCCCGCAGGATGGCCATAAGTACTGTATGCACAAACACGGCGAGTGT
GGGACAGTGTGCCCTTGCCATCCCGCGCGGCCACCGCTCGGGCTCGGCTCAAC
TACACCTTGAACCGGACGACGCCCACTCAGCGGCCCAACCACTCTTGCTGT
TTACAGCAGAAATCTGCCATCGATCGGATGTATCCCGGACGACGACAGCCCC
GATCTCATCTCGCCCTGCATGGAGCTGAGGAACGTCAAAGCCATCGCATATGAC
CCACTTGGACAAAGTTATCTACTGGTGGATGGCGGCCAGAACATACGCGAGCC
AAGGACAGCGGGACCCAGCCCTTGTGTTTGACTCTCTTGAGCCAAAGCCAAAC
CCAGACAGGACGCCCAACGACCTTTCATGACATGCATCTACAGCCGACATGCTT
TGAGAGTGTGCAGAGGCCAAATACCATCAACGCTCAACAGGCTGAGGCGGGAAGC
CATGGGGTGGTCTCGCTGGGGACGCGCAACAGCCAGGGCCATCTGCTGTCA
ACGCGGAGACGAGGTTACTGTATTCAACCAACTACAGCTAGCGGCGACCGGA
ATTGAACGCGGACCGCTTGGACGCGCACGCGCGAGTCTCTTACCACCGCG
CTCATCCGCGCTGTGCCCTGTGTGTGATGACAAACACAGCTGGGCAAGTGTGTCGG
GTGGACGCGGACCTTGAGCGCAATTGAGAGCTGTGACTCTCAGGGGCCAACCG
CCTGACCCCTGGAGGACGCAACATCGTGCAGCCCTCTGGGCTGACCATCTGGG
CAAGCATCTCTATCTGAGTCGACCGCCAGCAGGAGATGATGAGGCTGTGGAGA
GACCACCGGGGACAGCGGACTCGCATCAGGAGGTGTGCGCCACCTCATCTGG
CATCTCATCGATGTCGAGGAAGTCAAGCTGGAGGATTTTCAGCCCAACATGTGC
CCGTGACAATTGGTGGTGCTCCCACTATGTAATTGCAAGGGTGTGGGACACC
ACGGTGCTCATCGCCAGTCCACTCGTGCCTGCAAGAACCTGTCGACCTGTGG
AGGCGGCCCACTGCTCTCCCGGACAGTTTGTGATGTGCCACGGGAGATCGA
CTGTATTCCCGGGGCTCGGCGCTGTGACCGGCTTTCCGAGTGCATGACCCAG
CGACGAGGAGGGCTGCCCTGTGTGTCGCGGCCCAATGTCCTCTCGCGCGGG
TCAGTGTGTGGACTCGCGCTCGCTGCGACGGCGAGGCAGACTGTACGAGCCG
CTCAGACGAGCGGACTGTGACGCCATCTGCTCGCCCAACCAAGTCTCCGTGTGC
GAGCGCGCAGTGTGTCTCATCAACACAGCAAGTGCAGTCTTCCCGCACTGTAT
CGACGGCTCGGAGAGCTCATGTGTGAAATACCAAGCGCGCTCTACAGCAGCAGC
CGCGCCACAGGACTGCCATCGGGCCGCTCATTTGGCATCTCTCTCTCTTC
GTCAATGGGTGTGTCTATTTTGTGTGCGACGGCGTGTGTGGCAGCGTATGGC
GGGGCACACGGGCGCTTCCGACAGGATGTGACGGGGACCGGACAGTGTGCC
CTCAATTTCATAGCCCGGGCGGTTCGACAGTGGCCCTTCAAGGACATCGCA
TCGGGAAATTCATGATGAGTCTCGTGAGCGCTGTGGGGGCCCGGGCGGGT
GCCCTCTACGACCGGAACCAAGTCAAGGGGCCCTCGTCCAGCACTGTCTGTCAG
CACGAAGGCCAGCTGTACCCCGGATCTGAAACCGCGCGCTCCCGCGGCCAC
GGACCCTCCCTGTACAACATGGACATGTTCTACTCTTCAAACATCTCGGCCAC
TGTGAGACGCTACAGGCCCTACATATTCGAGGAATGGCGCGCCCCAGCAGCCG
CTGACGACCGACGCTGTGTGACAGGCATCAACGGCCAGCGCTGGAAGGCCA
GCAAGTACTACCTGGAATTGAACCTCGGACTCAGACCCCTATCCACCCCAACCA
CGCCCAACGAGCACTGTTGTGCGCGGAGGACAGCTGCCCGCTCGCCCTGCCCA
CCGAGAGGAGCTACTTCATCTCTTCGCCGCCCTCTCGTCCCGCTGACAGGA
CTCATCT

Figure 5g

Figure 6(a)

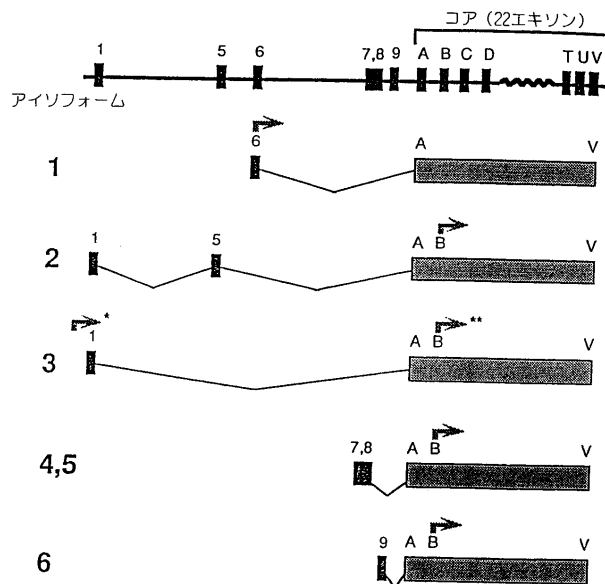
Figure 6(b)

Figure 7



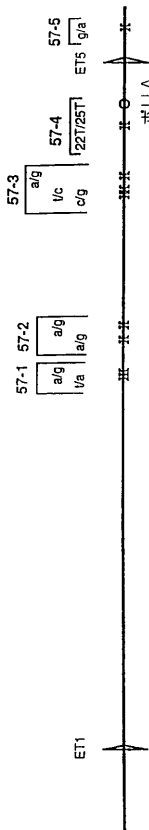
【図 8】

Figure 8



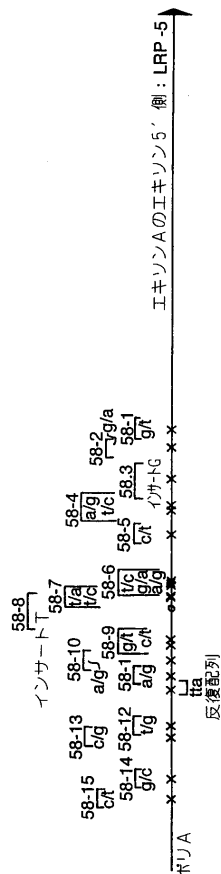
【図 9】

Figure 9



【図 10】

Fig.10.



【図 11 (a)】

Figure 11(a)

GAGAGGACACCGCATTTCTTCTTCTCCAGAGGATGCAGCAGCAAGGCGCCATC
 TTGAAACAGAGACCAAAACCAACCAAGCAWTTTGTCTTGAACCTGCCAGGC
 TCCACAACCTAATATAAACCCCATGAGGGCAGAGGCGTTTCAGCCTGACTCCAG
 CCTGGCAAAAGCTGTACAAATCTGGAGGAACACACACGTTTCAAGGCACTCA
 GTTCTGTGAGCCTCGCCCTCTGCTATTTCGAACCCCGGAGCGTACGGCTGT
 GTGGAGCGCGGCGGAGTCAAGCTGGAGTCCACATGCTGTGTCAGCGGCTGGGA
 GGATGCGGCGCGCAGTGGACTTCCAGTTTTCGAAGGAGCGCTGTACTGGACAG
 ACGTGAGCGAGGAGGCCATCAAGCAGACCTACCTGAACAGACGCGGCGCGC
 CGTGACGAACGTTGCTATCTCCGCTGTCTCTCCGACGCGCTGCTGCGAC
 TGGGTGGGCAAGAAGCTGTACTGGACGAGCTCAGAGACCAACCCGATCGAGG
 TGCCCAACCTCAATGGCAGATCCCGGAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACCTTGAC
 CAGCCGAGGGCCATCCCTTGGACCCCGCTCAAGGCTACATGTACTGGACAGA
 CTGGGTGAGACGCGCGGATTTGAGCGGCGAGGATGGATGGCAGCAACCGGA
 AGATCATTTGTGAGCTCGGACATTTACTGGCCCAATGGAGCTGACCATCGACCT
 GGAGGAGCAGAAAGCTCTACTGGGCTGACGCCAAGCTCAGCTTTCATCCACCGTG
 CCAACCTGGACGGCTGTCTCCGCGAGAGGTGTGTGAGGGCAGCGCTGACGAC
 CCCTTGGCCCTGACGCTCTCCGGGACACTCTGTACTGGACAGACTGGCAGACC
 CGCTCCATCCATGCTGCAACAAGCGCACTGGGGGGAAGAGGAAGGAGATCC
 TGAGTGCCCTTACTTACCCATGGACATCCAGGTGTGTGAGCCAGGAGCGGCGAG
 CCTTTCTTCCACACTCGCTGTGAGGAGGACAAATGGCGGCTGCTCCACCTGTGC
 CTGCTGTCCCAAGCGAGCCTTTCTACACATGGCGCTGCCCAAGGCTGTGAG
 CTGCAGGACAACCGGACGAGCGTAAAGGCGAGGCGGAGGAGGTGTGTGCTGC
 TGGCCCGCGGAGCGGACCTAAGGAGGATCTGCTGGACACCGCGGACTTTACCG
 ACATCGTGTGAGGAGGAGGACATCCCGGACGCGCTTGCATGAGTACGAC
 CCGCTAGAGGGCTATGTCTACTGGACAGATGACGAGGTGCGGCGCATCCGAG
 GCGCTACTGGACGCGCTGTGGGGCGCAGACGCTGGTCAACACCGAGATCAAG
 ACCCGGATGGCATCGGCTGTGAGTGGGTGGCGGAAACCTTACTGGACGAGC
 ACGGCGACCGGACCGCATCGAGGTGAGCGGCTCAACGCGACCTCCCGCAAGAT
 CCTGTGTGTGGAGGAGCTGGACGAGCGCGGAGCGCATCGCACTGCAACCGGTGAT
 GGGCCTCATGTACTGGACAGACTGGGGAGAGAACCCTAAATCGAGTGTGGCC
 AACTTGGATGGGACGAGCGGCGTGTGTGCTGCTCAATGCTCCCTCGGCTGGCC
 AACGCGCTGGCCCTGGACCTGCGAGGAGGGAAGCTTACTGGGGAGAGCGCA
 AGCCAGACCGGAGCGGAGTCAATTTGACCAAGTGGCGGAGCTGATGGGGCTCAA
 GCTGTGAATGTGGCAAGGTGTGTGGAACCAACCGGTGTGCGGACAGGAACG
 GGGGTGACGCAACCTGTGCTTTCACACCCACGCAACCGGTGTGCGGTGCC
 CATCGGCTGGAGCTGTGTGAGTGACATGAAGACCTGACATCGTGTGAGGCGCT

【 図 1 1 (c) 】

Figure 11(c)

MYWTDWGETPRIERAGMDGSTRKIJVDSDIYWPNGLTIDLEEKLYWADAK
LSFIHRANLDGSRQKVVEGSLTHPFAITLSDGDTLYWTDWQTRSIHACNKRT
GGKRKEILSALYSMPDIQVLSQERQPPFHTRCEEDNGGCSHLCLSPSEPFYTCA
CPTGVQLQDNQRTCKAGAEVLLARRTDLRRISLDTDPDFTDIVLQVDDIRHA
IAIDYDPLEGYVYWTDDDEVRAIRRAYLDGSGAQTLVNTENDPDGIAVDWV
ARNLYWTDGTDRIEVTRLNGTSRKILVSEDLDEPRALALHPVMGLMYWTD
WGENPKIECANLDGQERRVLVNASLWPNGLALDLQEGKL YWGDATKTDKIE
VINVDGTRKRTLLLEDKLPHPFGFTLLGDFTYWTDWQRRSIERVHKVKSARDVI
IDQLPDLMLGLKAVNVAKVVGTPNCAADRNGGCSHLCHFFPHATRCGCPGLEL
LSDMKTCIVPEAFVFTSRAAIHRISLETNNNDVAIPLTGVEASALDFDVS
NNHIYWTDVSLKTISRAFMMNGSSVEHVVEFLDYPEGMAVDWMGKNLYW
ADTGTNRJEVARLDGQFRQVLVWRDLNPNRSLALDPTKGYTYWTEWGGKPR
IVRAFMDGTNMTLVKVGGRANDLTIDYADQRLYWTDLDNMISSNMLG
QERVVIADDLPHFPGLTQSYDYTYWTDWNLHSIERADKTSGRNRTLQGHLD
VMDILVFHSSRDGLNDCMHNNNGCQGLCLAIPEGHRCGCASHYTLDPSSRNC
SPPTTFLFSQKSAISRMIPDDQHSPLDILPLHGLRNVKAIDYDPLDKFYWV
DGRQNIKRAKDDGTQPFVLTSLSQGNPDRQPHDLSDIYSRITLFWTCEATNTI
NVHRLSGEAMGVVLRGDRDKPRAIVVNAERG YLYFTNMQDRAAKIERAAL
DGTEREVLFVTTGLIRPVLVDNTLGLFWVDADLKRIESCDLSGANRLTLE
DANIVQPLGLTLGKHL YWIDRQQQMIERVEKTTGDKRTJQGRVAHLTGIIH
AVEEVSLEFSAHPCARDNGGCSHICAKGDGTPRCSFVHLVLLQNLTCGE
PPTCSPDQFACATGEIDCPGAWRCDFPECDQSDDEEGCPVCSAAQFCARGQ
CYDLRLRCDGEADCQDRDEADCDAICLPNQFRCASGQCVLKQCCDFPDIDG
SDELMCEITKPPSDDSPAHSASIGPVIGLILSLFVMGGVYFVQCRVVCQRYAG
ANGPFPHEHYVSQTPHVPPLNFIAPGSGHQHPTGIA CGKSMMSVSLMGGHLD
VPL YDRNHVVTGASSSSTSKATL YPPLNPPSPATDPSLYNMDMFYSSNP
ATVRYRYPYIIRGMAPPPTPCSTDVCDSDYASRWKASKYYLDLNSDSDPYP
PPPTPHSQYLSAEDSCPPSPATERSYFHLPPPPSPCTDSS

【 図 1 2 (a) 】

Figure 12(a)

TAAATGGCTTGGCAAAGGGAGTTTCATTCTTTTAGCGCTTCCATCTTCTGCA
GTGAGAGGACACCGCATTCTTCTTCCAGAGGATGCAGCAGCAAGGCGCCA
TCTTGAAACAGAGACCAAAACCAACAGCAACTTCGTCTTGAACTTCCCGAC
CTCCACAACCTCTCGCGCTCTCTGCTATTTGCCAACCGCGGGACGTACGGCTG
GTGGACCGCGCGGAGTCAAGCTGGAGTCCACCATCGTGGTCAGCGGCTGGA
GGATCGCGCGGAGTGGACTTCCAGTTTCCAAAGGGAGCCGTGTACTGGACAG
ACGTGAGCGAGGAGGCCATCAAGCAGACCTACCTGAAACAGACCGGGCGCGC
CGTGACAGAACGTGGTTCATCTCGCGCTGGTCTCTCCGACCGGCTCGCTGGAC
TGGGTGGGCAAGAAAGCTGTACTGGACGGACTCAGAGACCAACCGCATCGAGG
TGCCCAACCTCAATGGCACAATCCCGGAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACCTTGAC
CAGCCGAGGGCCATCGCTTGGACCCCGCTCAGGGGTACATGTACTGGACAGA
CTGGGTGAGACGCGCGGATTTAGCGGGCAGGGATGGATGGCAGCAACCGGA
AGATCATTTGGTGGACTCGGACATTTACTGGCCCAATGGACTGACCATCGACCT
GGAGGACGAGCAAGCTCTACTGGGCTGAGCGCAAGCTCAGCTTCATCCACCGTG
CCAACTCGAAGCGCTCTGTTCCGCGCAGAAAGGTGGTGGAGGGCAGCTGACGAC
CCCTTCGCGCTGAGCGCTCTCGCGGACACTCTGTACTGGACAGACTGGCAGACC
CGCTCCATCCATCGCTGCAACAAGCGCACTGGGGGGAAGAGGAAGGAGATCC
TGAGTGGCTCTACTCAACCATGGACATCCAGGTGCTGAGCCAGGAGCGCGCAG
CCTTCTTCCACACTCGCTGTGAGGAGGACAATGGCGGCTGCTCCACCTGTGCT
CTGCTGTCCCAAGCGAGCCTTCTACACATGGCGCTGCCCCACCGGTGTGACG
CTGCGAGGACAAACCGCAGGACGTGTAAAGGCGAGGACCGGAGGAGTGTGCTGC
TGCGCGCGGAGCGGACCTACGAGGAGTCTGCTGGGACAGCGCGGACTTAAAG
ACATCGTGTGCTGAGGTGGACGACATCCGCGACCGCATTTGCCATCGACTACGAC
CGCTAGAGGGCTATGTCTACTGGACAGATGACGAGGTGCGGGCCATCCGCGAG
GGCGTAACTGGACCGGTCTGGGGCGCAGACGCTGGTGAACACCGGAGTCAAGC
ACCGGATGGCATCGCGCTGACTGGGTGGCGGAAACCTCTACTGGAACCGAC
AGGCGCAACCGGACCGCATCGAGGTGACGCGCTCAACCGCACTCCCGCAAGAT
CCTGTGTGGGAGGACCTGGACGAGCCCGAGCCATCGACTGTCACCGCGGTGAT
GGCGCTCATGTACTGGACAGACTGGGGAGAGAACCTTAAATTCGAGTGTGGC
AACTTGGATGGGACGAGGCGGCTGTGTGCTGCTCAATGCTCCCTCGGGTGGCC
AAGCGCTGGCGCTGGACCTGCGAGGAGGGGAAGCTCTACTGGGAGACGCCA
AGACAGACAAGATCGAGGTGATCAATGTGTGAGGACGAAGAGCGCGGACCT
CTCTGTGAGGACAAGCTCCCGCACATTTTCGGGTTCACGCTGTGGGGGACTTC
ATCTACTGGACTGACTGGCAGCGCGCAGCATCGAGCGGTGTCACAAAGGTCA
AGGCGACCGGAGCGTCACTATGACCACTGCGCGACCTGATGGGGCTCAA
GCTGTGAATGTGGCAAGCTGCTCGGAACCAACCGGTGTGCGGACAGGAACG
GGGGGTGACGACCTGTGCTTCTTACACCCCAACCGGCTGTGGCTGTGGCTGCC
CATCGGCTGGAGCTGCTGAGTGACATGAAGACCTGCACTGTGCTGAGGCTCT
TCTTGGTCTTACCAGCAGAGCGCGCATCCACAGGATCTCCCTCGAGACCAAT

Figure 12(a), Ctd.

AACAAACGACGTGGCCATCCGCTCAGGGCGTCAAGGAGCGCTCAGCGCTGGA
CTTTGATGTGTCCAAACACACATCTACTGGACAGACGTGACGCTGAAGAAC
ATCAGCGCGCGCTTCAATGAACGGGAGCTCGGTGGACAGCTGGTGGAGTTTGG
CCTTGACTACCCCGAGGGCATGCGCTTGAAGTGGGCAAGAACCTCTACT
GGCGCGACACTGGGACCAACAGAAATCGAAGTGGCGCGGCTGGAGGGCAGTT
CCGGCAAGTCTGTGTGGAGGGACTTGGACAAACCGAGGTGCGTGGCGCTGG
ATCCACCAAGGGCTACATCTACTGGACCGAGTGGGGCGGCAAGCGGAGGAT
CGTGGCGGCTTCAATGGACGGGACCAACTGCATGACGCTGGTGGCAAGGTGG
GCGGGGCCAACGACCTACCAATTGACTAAGCTGACCGCGCTCTACTGGACCG
ACCTGGACACCAACATGATCGAGTCTGCAACATGTCTGGGTCAAGGAGCGGT
CGTGATTTGGCGACGATCTCCCGCACCGCTTCTGCTGACGCACTACAGCGATT
ATATCTACTGGACAGACTGGAATCTGTCACAGCATTGAGCGGGCGGACAAGA
CTAGCGGGCGGAACCGCACCTCTATCCAGGGCCACTGGACTTGTGATGGAC
ATCTGGTGTGTCCACTCTCCCGCCAGGATGGCGCTCAATGACTGTATGCAACA
CAACCGGGCAGTGTGGGACGCTGTGCTTGGCATCCCGCGCGGCAACCGCTGCGC
TGGGCTCACACACTACACCTTGAACCCCGCAGCGGCAACTGCAACCGCGCCACC
ACCTTCTGTGCTTACGCCAGAAATCTGCCATCAGTCCGATGATCCCGGACGA
CCAGCACAGCGCGGATCTCATCTCTGCCCTGCATGGACTGAGGAACGTCAAAG
CCATCGACTATGACCCACTGGACAAGTTCACTACTGGGTGGATGGGGCGCA
GAACATCAAGGAGGACCAAGGACGAGCGGACCCAGCCCTTGTGTTGACCTCT
CTGAGGCCAAGGCCAAAAACAGACAGGACGCCCCACGACCTCAGCATCGACA
TCTACAGCGGACGACTGTCTGGACGTGCGAGGCGCAACCAATACCATCAACGTC
CACAGGCTGAGCGGGGAAGCCATGGGGGTGGTGTGCTGCTGGGGAACCGGACA
GCCCCAGGGCCATGCTGCTCAACCGGAGGAGGAGGTACCTGTACTTCAACAA
TGCAGGACCGGCGACCAAGATCGAAGCGGACGCGCTGGACGGCAACGAGCGC
GAGGTCTCTTCAACACCGGCTCACTCGCGCTGTGGCGCTGGTGGTAGACAACT
ACACTGGGCAAGCTGTCTGGGTGGACCGGACCTGAAAGCGCATTTGAGAGCT
GTGAOCTGTACAGGGGCCAACCGCTGACCTGGAGGACGCGCAACATGTGACAG
CCTTGGGCTGACCATCTCTTGGCAAGCATCTCTACTGGATCGACCGGACGACG
CAGATGATCGAGCGGTGGGAGAAGACACCGGGGACAGCGGACTCGCATCC
AGGGCGCTGTGCGCCACTCACTGGCATCCATGCAATGGAGGAAGTCAAGCTG
GAGGATGCTCAGCCCAACCAATGTGGCGGTGACAAATGGTGTGCTGTCCACAT
CTGTATTGCAAGGGTGTATGGGACCAACCGGTGCTCATGCCAGTCCACCTCG
TGCTCTGCAAGAACCTGTGACCTGTGGAGAGCGCGCCACTGTGCTCCCGGACC
AGTTTGCATGTGCCACAGGGGAGATCGACTGTATCCCGGGGCGCTGGCGCTGT
GACGCTTTCGCGAGTGGCATGACAGAGCGGAGGAGGGCTGCGCGGTGTG
CTCGCGCGCGAGTTTCCCTGCGCGCGGGCTCAGTGTGTGACCTGCGCTGCGCT
GCGACGGCGAGGACAGTGTGACGACCGCTCAGAGGCGGACTGTGACCGCC
ATCTGCTGCGCAACCACTTCCGCTGTGCGAGCGCGGACGTGTGCTCATCAA
ACAGCAGTGGCAGCTCTTCCCGCACTGTATCGAGCGGCTCCGACGAGCTCATGT
GTGAATACCAAGCGCGCTCAGACGACGCGCGGCCACAGCAGTGCCTATC

Figure 12(a), Ctd.

GGGCGCGTCAATGGCATCATCTCTCTCTCTCTGCTATGGGTGGTGTCTATTT
GTGTGCCAGCGGTGGTGTGCCAGCGCTATGCGGGGGCCACCGGCGCTTCCCGC
ACGAGTATGTTCAGCGGGAACCGGACGCTGCGCTCAATTTTCATAGCGCGGGG
GTTCACGATGGCGCTTTCACAGGCATCGCATGCGGAAAGTCCATGATGAGC
TCCGTGAGCTGATGGGGGGCGGGCGGGGTGCGCTCTACGACCGGAAACAC
GTCCAGGGGCGCTGTCAGCAGCTGTGTCAGCAGCAAGGCGGACGCTGTACCG
CGGATCTGAAACCGCGCGCTTCCCGGCCACGGAACCGCTTCTGACACATGG
ACATGTCTACTCTTCAACCATTCGCGGCACTGCGAGACCGGTACAGGCGCTAC
ATCATTCAGGAATGGCGCGCGGCGGCTGCGAGCAGCGGACCGAGCTGTGTGA
CAGCGACTACAGCGCGGCGCGCTGGAAGGGCGAGCAAGTACTACCTGGAATTG
AACTCGGACTCAGAACCCCTATCCACCGGCAACCGCGGCAACGAGCACTACCTG
TGGCGGAGGACAGCTGCGCGCGCTGCGCGGCAACCGAGAGGAGCTACTTCCAT
CTCTTCCCGCGCGCTGCTGCGCGCTGCAACGAGCTCATCTGACCTGGCGGGGCA
CTCTGGCTTCTCTGTGCGCGCTGTAAATAGTTTAAATATGAACAAAGAAAA
AAATATATTTTATGATTTTAAAAATAAATATATATTTGGGATTTTAAAA
ACATGAGAAATGTGAACCTGTGATGGGGTGGGCAAGGCTGGGAGAACTTTGT
ACAGTGAACAAATATTTATAAATTAATTTGTAAAAACAG

【 図 1 2 (b) 】

Figure 12(b)

TAAATGGCTTGGCAAAGGGAGTTTCATTCTTTTAGCGCTTCCATCTTCTGCA
GTGAGAGGACACCGCATTCTTCTTCCAGAGGATGCAGCAGCAAGGCGCC
ATCTTGAAACAGAGACCAAAACCAACAGCAACTTCGTCTTGAACTTCCCA
GCTCCACAAC

【 図 12 (c) 】

Figure 12(c)

ATGGCTTGGCAAAGGGAGTTTCATTTCCTTTTAGCGCTTCCATCTTCTGCAGTGA
GAGGACACCCGATTTCTTCTTCCAGAGGATGCAGCAGCAAGGCGCCATCTTG
AAACCAAGAGACCAAAACCAACAGCAACTTCGTCTTGAATCTCCAGCCTCCA
CAACTCTCGCGCTCTCTGCTATTTCGCAACCGCGGGACGTACGGCTGGTGA
CGCGCGGAGTCAAGCTGGAGTCCACCATCGTGGTCAGCGGCTGGAGGATG
CGCGCGCAGTGGACTTCAGITTTTCCAAGGAGCGGTGTAATGACAGACGTG
AGCGAGGAGGCCATCAAGCAGACCTAOCCTGAACAGACCGGGGCGCGGTGC
AGAACGTGGTCACTCCGGCTGGTCTTCCGAGCGGCTCGGCTGGAGTGGGT
GGGCAAGAACTGTACTGGACGGAATCAGAGAACCAACCGCATGGAGGTGGC
AACTCTCAATGGCAGATCCCGGAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACCTTGACAGCC
GAGGGCCATCGCCTTGGACCCCGCTCAGGGGTACATGTACTGGACAGACTGGG
GTGAGACGCGCGGATTGAGCGGGCAGGGATGGATGGCAGCAACCGGAAGAT
CATTTGTGGACTCGGACATTTACTGGCCCAATGGACTGACCATCGACCTGGAG
GAGCAGAAGCTCTGAGCTGACGCAAGCTCAGCTTCATCCACCGTGGCCAA
CCTGGAACGGCTCGTTCCGGCAGAAAGGTGGTGGAGGGGACGCTGACGACCCCT
CGCCCTGACGCTCTCCGGGACACTCTGTACTGGACAGACTGGCAGACCGGCTC
CATCCATGCCTGCAACAAAGCGCATGGGGGGAAGAGGAAAGGAGATCTCTGAG
TGCCCTCTACTCAACCATGGACATCCAGGTGCTGAGCCAGGAGCGGCGAGCCTT
TCTTCCACACTCGCTGTGAGGAGGACAATGGCGGCTGCTCCACCTGTGCTGCTG
TGTCCCAAGCGAGGCTTTCTACACATGCGCTGCGCCACGGGTGTGCAAGCTGC
AGGACAACGGCAGGAGCTGTAAAGGACAGGAGCGGAGGAGGTGCTGCTGCTGGC
CGCGCGGACGGAACCTACGGAGGATCTGCTGGACAGCGCGGACTTACGGACA
TCGTGCTCAGGTGGACGACATCCGGCAGCCATTTGCCATCGACTACGACCCGC
TAGAGGGCTATGTCTACTGGACAGATGACGAGGTGCGGGCCATCCGACGGGC
GTACCTGGACGGGCTTGGGGGCGCAGACGCTGGTCAACACCGGATGCAACGACC
CGATGGCATCGCGTGGAGTGGGTGGCGGAAACCTCTACTGGACCGACAGCG
GGCAGGACCGCATCGAGGTGACGCGCTCAACGCGACCTCCCGCAAGATCCT
GGTGTGGGAGGACCTGGACGAGCGCGGAGCCATGGCACTGCAACCGGTGTGAGGG
CCTCATGTACTGGACAGACTGGGGAGAGAACCCATAAAATCGAGTGTGCCAA
CTTGGATGGGACGGAGCGCGGTGTGCTGTCAATGCTCCTCGGGTGGCGCAA
CGGCTTGGCGCTGGACCTGACAGGAGGGGAAGCTCTACTGGGGAGACGCCAAGA
CAGACAAGATCGAGGTGATCAATGTTGATGGGACGAAAGAGCGGACCCCTCC
TGGAGGACAAGCTCCCGCACATTTTTCGGGTTCACGCTGCTGGGGGACTTCACT
TACTGGACTGACGCGCGCGCAGCATCGAGCGGCTGCAACAAGGTCAAGG
CCAGCGGAGACTCATCTTGAACAGCTGCGCGACCTGATGGGCTCAAGCT
GTGAATGTGGCAAGGTGCTGGGAACCAACCGGTGTGCGGACAGGAAAGCGGG
GGTGCAGCAACCTGCTCTTCAACCCACGCAACCGGTGTGGCTGCGCCCA
TCGGCTGGAGCTGCTGAGTGACATGAAGACCTGCATCGTCTGAGGCGCTTC
TTGGTCTTACCAGCAGAGCGCCATCCACAGGATCTCCCTCGAGACCAATA

Figure 12(C), Ctd.

GGGCGCGTCATTGGCATCATCTCTCTCTCTCTGTCATGGGTGGTGTCTATTTT
GTGTGCCAGCGGTGGTGTGCCAGCGCTATGCGGGGGCCAAACCGGCGCTTCCCGC
ACGAGTATGTACAGCGGGAACCGGACGTGCGCTCAATTTTCATAGCGCGGGG
GTTCACGAGCATGGCGCTTTCACAGGATCGCATGCGGAAAGTCCATGATGAGC
TCCGTGAGCCTGATGGGGGGCGGGGGCGGGGTGCGCCTTACGACCGGAACAC
GTACAGCGGGCTGCTCCAGCAGCTGTTCAGCAACGAGGCGACGCTGTACCGG
CGATCTGGAACCGCGCGCTCCCGGCGCAACGCAACCGCTCTGTACAACATGG
ACATGTTTCTACTTTCACAACTTCCGGCCACTGCGAGACCGTACAGGCGCTAC
ATCATTCGAGGAATGGCGCCCCGAGCGCGCTGCGACACGAGCGTGTGTGA
CAGCGACTACAGCGCGCAGCGCTGGAAGGCCAGCAAGTACTACCTGGATTG
AACTGGGACTCAGACCCCTATCCACCCCGCCACCGCCACAGCGAGTACCTG
TCGGGGGAGGACAGCTGCGCGCGCTGCGCGCGCACCGAGAGGAGCTACTTCCAT
CTCTTCCCGCGCGCTCGTCCCGTGCACGGAATCATCC

Figure 12(c), Ctd.

ACAACGACGTGGCCATCCCGCTCAGCGGGCTCAAGGAGGCGCTCAGCCCTGGAC
TTTGATGTGTGCCAAACCAACATCTACTGGACAGAGCTCAGCCTGAAGACC
ATCAGCGCGCTTCTATGAACGGGAGCTCGGTGGAGACGCTGGAGGTGGTGG
CCTTGACTACCCCGAGGGCATGGCGGTGACTGGATGGGCAAGAACCTCTACT
GGCGCGACACTGGGACCAACAGAAATGGAAGTGGCGGGCTGGACGGGCACTT
CCGGCAAGTCTCGTGTGGAGGGACTTGGACAAACCGGAGGTGCTGGCGCTGG
ATCCCAACCAAGGGCTACATCTACTGGACCGAGTGGGGCGGCAAGCGAGGAT
CTGGCGGGGCTTTCATGGACGGGACCAACTGCATGACGCTGGTGGACAAAGGTGG
GCGGGGCCAACGACCTCACCATTTGACTAOGCTGACAGCGGCTCTACTGGACCG
ACCTGGACACCAACATGATOGAGTGGTCAACATGCTGGGTGAGGAGCGGGT
CGTGATTGCGGACGATCTCCCGCACCGGTTCGGTCTGAGCGAGTACAGGATT
ATATCTACTGGACAGACTGGAATCTGCACAGCATTTAGCGGGCGGCAAGA
CTAGCGGGCGGAAACCGCACCTTATCCAGGGCCACCTGGACTTGTGATGGAC
ATCCTGGTGTTCACCTCTCCCGCCAGGATGGGCTCAATGACTGTATGCACAA
CAACGGGCGAGTGGGCGAGCTGTGCTTGCACATCCCGGGCGGCAACCGCTGGCGG
TGCGGCTCACACTACACCTGGACCGGCGGCAACTGACGCGCGCGCCAC
ACCTCTTGTGCTTTCAGCCAGAAATCTGCCATCAGTGGATGATCCCGGAGCA
CCAGCACAGCCCGGATCTCATCTCTCCCGCTGCATGGACTGAGGAACGTCAAAG
CATCGACTATGACCCACTGGACAAAGTTCACTACTGGGTGGATGGGCGGCA
GAACATCAAGCGAGCCAAAGGACGACGCGGACCCAGCCCTTTGTTTGGACTCT
CTGAGCCAGGCGCAAAACCCAGACAGGCAAGCCCGGACGACTCAGCATGGACA
TCTACAGCGGACACTGTTCTGGACGTGCGAGGGCCAAATACCATCAACGTC
CACAGGCTGAGCGGGGAAGCCATGGGGGTGGTGTGCTGGGGACCGCGGACAA
GCCAGGGGCGCATGCTGCTAACCGCGGAGCGAGGTACCTGTACTTCAACCA
TGCAGGACCGGGCAGCCAAAGATCGAACCGCGGAGCGCTGAGCGGCAACGAGCGC
GAGTCTCTTTCACCAACCGGCTCTATCCCGCTTGGCGCTGTGGTGTGAGACA
ACACTGGGCAAGCTGTTCTGGGTGGACCGGACCTGAAGCGCATTTGAGAGCT
GTGACTGTACAGGGGCGCAACCGCTGACCTTGGAGGACGCGCAACATCGTGAC
CCTCTGGGCGTGAACATCTCTTGGCAAGCATCTCTGAGTGGACCGCGGACGAG
CAGATGATCGAGCGTGTGGAGAAGACACCGGGGACAGCGGACTCGCATCC
AGGGCGGTGTGCGCCACCTCACTGGCATCCATGAGTGGAGGAAGTCCAGCTG
GAGGAGTCTCAGCCCAACCATGTGCGCGTGCACAAATGGTGGCTGCTCCACAT
CTGTATGTGCAAGGGTGTGAGGACCAACCGGTGCTCATGCGGCTGCGGCTG
TCTCTCTGACAGAACCTGCTGACCTGTGGAGAGCGCGGCACTGCGCGGCGC
AGTTTGCATGTGCCACAGGGGAGATCGACTGTATCCCGGGGCGCTGGCGCTGT
GACGCGCTTTCGGAGTGGCATGACACGAGCGGACGAGGAGGCTGCGCGCTGTG
CTCGCGCGGCGCAGTTCCCGTGGCGCGGGGCTGAGTGTGAGCTGCGCGCTGCGCT
GGAGCGGCGGAGGACACTGTGACGAGCGCTCAGACGAGCGGCGACTGTGAGCGC
ATCTCGCTGCGCAACCACTTCCCGTGTGCGAGCGCGGCGAGTGTGCTCTCA
ACAGAGTGTGCGACTCTCTTCCCGCTGTATTCGACGCGCTCGACGAGCTCATGT
GTGAAATCAACCAAGCGCGCTCAGACGACAGCGCGGCCACAGCAGTGCATC

【 図 12 (d) 】

Figure 12(d)

MAWQREFIPFSASIFCSERTPHSSPEDAAARRHLETRDQTNQRLRLPSLH
NSSPLLLFANRRDVRVLDAGGVKLESTTVVSGLEDAAAVDFQFSKGAVYWT
DVSEAIKQTYLNTQGAQVQNVVISGLVSPDGLACDWVGKLYWTDSETRN
IEVANLNGTSRKLVLFWQDLDPRAIALDPAHYMYWTDWGETPRIERAGM
DGSTRKIIVDSIDYWPNGLTIDLEEQLYWADAKLSFIHRANLDSGRFQKVVE
GSLTHPFAITLSGDTLYWTDWQTRSIHACNKRGGKRLKILSALYSPMDIQV
LSQERQPFHTRCEEDNGGCSHLCLSPSEPFYTCAPTGVQLQDNGRMTCKAGA
EEVLLARRTDLRRISLDTPDFDVLQVDIRHALADYDPLEGYVYWTDDE
VRAIRAYLDGSGAQTLYNTEINDPDGIAVDWVARNLYWTDGTDRIEVTR
LNGTSRKLVSIEDLDEPRALALHPVMGLMYWTDWGENPKIECANLDQERR
VLVNASLWPNGLALDLQEGKLYWGDATDKIEVINVDGTKRRTLLEDKLP
HIFGFTLLGDFYWTDWQRRSIEVHKVKASRDVIDQLPDLMLKAVNVV
KVVGTPNCAADRNGGCSHLCHFTPHATRGCPIGLELLSDMKTCIVPEAFVFT
SRAAIHRISLETNNNDVAIPLTGVKEASALDFDVSNHHIYWTDVSLKTISRA
FMNGSSVEHVVEGLDYPEGMAVDWMGNLYWADTGTNRIEVARLDGQFR
QVLVWRDLNPRSLALDPTKGYTYWTEWGGKPRVAFRMDGTNCMTLVK
VGRANDLTIDYADQRLYWTDLTNMISSNMLGQERVVIADLPHFGLTQ
YSDITYWTDWNLHSIERADKTSGRNRTLIQGHLDVFMVILVHSSRDQGLND
CMHNNGCGQLCLAIPEGHRCGASHYTLDPSSRNCSPPTFLFLSQKSAISR
MPDDQHPDLILPLHGLRNKVAIDYDPLDKFTYVWDGRQNIKRAKDDGTQPF
VLTSLSQGNPDRQPHDLSIDYSTRFLFWTCEATNTNINHRLSGEAMGVVLR
GDRDKPRATVNAERGYLEFTNMQDRAAKIERAALDGTREVLFTTGLIRPV
ALVVNDTLKGLFWVDADLKRIESCDLSGANRLTLEDANIVQPLGLTILGKHL
YWDROQQMIERVEKTTGDKRTRIQGRVAHLTGIHAAVEEVSLEEPSAHPCAR
DNCGCSHICAKGDGTPRCSCPVHLVLLQNLTCGEPPTCSPPQFACATGEIDCI
PGAWRCDGFPBCDDQDEEGCPVCSAAQFPARGQCVDLRLRCDGEADQDRS
DEADCDALCLPNQRCASGQVLKQCCDSFPDCIDGDELMECTKPPSDDSPA
HSSAIGPVGILSLFMGGVYFVVCQRVVCQRVYAGANGPFPEHYVSGTPHVP
LNFIAPGSGHQHPTGIACGKSMSSVSLMGRGGVPLVDRNHVTVGSSSSS
SSTKATLYPPLNPPSPATDPSLYNMDMFYSSNIPATARPYRPIIRGMAP
PTTPCSTDVDCSDYSASRWKASKYYLDLNSDSDPYPPPTPHSQYLSAEDSCP
PSPATERSYFHLPPPPSPCTDSS

【 図 12 (e) 】

Figure 12(e)

TATAAATGGCTTGGCAAAGGGAGTTTCATTCTTTTAGCGCTTCCATCTTCT
CGAGTGAGAGGACACCGCATCTTCTTCTCCAGAGGATG

【 図 1 3 】

Figure 13

TAAGAGTATAAAGGGCTCTGAGACAAAAAGGTTGAGAACCAGTGTCTT
 AAAGCTTGATGTTTCTCAGGGTTTCATCTCTTGTGGATTAATGCCATTATA
 AAATGGCTTGGCAAAGGGAGTTCATCTCTTATGCGCTTCCATCTTCTGACG
 TGAGAGGACACCGCATCTCTTCTTCCAGAGGATGACGACGCAAGGCGCAT
 CTTGAAACAGAGACCAAAACCAACAGCACTTGTCTTGAACCTTCCAGCC
 TCCAACTCAGCAGTCTGTGACGACCCCTGTGAGCAGAGCCGAGCCTGGCC
 GCTCTGTCTATTGCAACCCCGGGAGCTAGCGCTGTGACGCGCGGGAGT
 CAAGCTGGAGTCCACCATCTGTGTCAGCGGCTGAGGATGCGCGCGCAGTGG
 ACTTCCAGTCTTCCAAAGGGAGCCGTGTACTGGACAGACGTGAGCGAGGAGC
 CATCAAGCAGACCTACCTGAACAGACGCGGGCGCGCGTGCAGAACTGGTTC
 ATCTCGGCTGTCTCTCCGAGCGCTCGCTGCGACTGGGTGGGCAAGAAG
 CTGTACTGGAGCTCAGAGACCAACCGCATCGAGGTGGCCAACTCAATG
 GCACATCCCGGAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACCTTGACAGCGCAGGCGCATC
 GCCTTGGACCCGCTCACGGGTACATGTACTGGACAGACTGGGTGAGACGCG
 CCGGATTGAGCGGCGAGGATGATGGCAGCACCAGGAAGATCAATTGGAC
 TCGGACATTTACTGGCCCAATGAGACTGACCATCGACCTGGAGGAGCAGAAGC
 TCTACTGGGCTGACGCCAAGCTCAGCTTCACTCCACCGTGCACACTGGAGCG
 CGTTCCGCGCAGAGGTGTGGAGGGCAGCTGACGACCCCTTCCGCTGACCG
 TCTCCGGGACACTCTGTACTGACAGACTGGCAGACCCGCTCCATCCATGCT
 GCAACAAGCGCACTGGGGGAAGAGGAAGGAGATCTGAGTGGCTCTACTCT
 ACCCATGGACATCCAGGTGCTGAGCCAGGAGCGGACGCTTCTTCCACACTC
 GCTGTGAGGAGGACAATGGCGGCTGCTCCACCTGTGCTGCTGTCCCAAGCG
 AGCCTTCTACACATGCGCTGCCCCAGGGTGTGACGCTGCAGGACAACGGC
 AGGACGTGTAAAGCAGGAGCGAGGAGGTGCTGCTGCTGGCCGGCGGACGGA
 CCTACGGAGGATCTCGCTGGACACCGCGGACTTTACCGACATGCTGCTGAGG
 TGGACGACATCCGCGACCGCATTTGCCATCGACTGACGCGCTAGAGGGCTAT
 GTCTACTGGACAGTACGAGGTGGCGGCACTCCGAGGCGTACCTGGACGG
 GTCTGGGGCGCAGACCTGTGTAACACCGAGATCAACGACCCGATGACATCG
 CGGTGAGCTGGGTGGCGGAAACCTCTACTGGAACGACACGGGCGAGGACCGC
 ATCGAGGTGACCGGCTCAACCGGCACTCCCGCAAGATCTGTGTGCGAGGA
 CCTGGACGAGCCCGAGCATCGCACTGCAACCCGTGATGGGCTCATGTACTG
 GACAGACTGGGGAGAGAACCTAAATCGAGGTGTGCAACTTGGATGGGCA
 GGAGCGCGTGTGTGCTCAATGCTCTCGGTGGCCAAACCGGCTGGGCTG
 GACCTGACAGGAGGGAGCTCTACTGGGGAGACGCCAAGACAGACAAGATC
 GAGGTGATCAATGTTGATGGGAGCAAGAGGCGGACCTCTCTGAGGACAAG
 CTCCGCGACATTTTGGGTTACCGCTGCTGGGGACTTCACTACTGAGTAC
 TGGCAGCGCGCAGCATCGAGCGGGTGCACAAGGTCAAGGCGAGCGGAGCGT
 CATCATGACAGCTGCGCGACCTGAGTGGGGCTCAAGCTGTGAATGTGGC
 AAGGTGCTGGAAACCAACCGGTGTGCGGACAGGAACGGGGGTGACGCCACC

Figure 13. ctd.

CAGTTCGGGTGTGCGAGCGGCCAGTGTGCTCTCATAAACAGCAGTGGACTC
 CTTCGCCGACTGTATCGACGGCTCCGACGAGCTCATGTGTGAAATCAACAGC
 CGCCTCAGACGACAGCCCGGCCACAGCAGTGCATCGGCGCGCTCATTGGCA
 TCATCTCTCTCTCTCTGTCATGGGTGTGTCTATTTTGTGTGCCAGCGCGTGG
 TGTGCGAGCGCTATGCGGGGGCCAAACGGGCGCTTCCGCAAGATATGTACGCG
 GGAACCGCGCAGTGGCGCTCAATTTTCAATAGCCCGGGCGGTTCACGATGGCC
 CTTCACAGGCATCGCATGCGGAAAGTCCATGATGAGCTCGGTGAGCGCTGATG
 GGGGGCGGGCGGGGTGCGCTCTACGACCGGAACCAAGCTCACAGGGCGCTCG
 TCCAGCAGCTGTGTCAGCAGCAAGGOCACGCTGTACCGCGGATCTGAAACCG
 CCGCGCTCCCGGGCCACGGAACCGCTTCCGTGTAACATGGACATGTTTACTCT
 TCAACACATTCGCGGCACTGCGAGACCGTACAGGCGCTACATCATTCGAGGAA
 TGGCGCCCGGACGAGCGCTGACGACCGAGCTGTGTGACAGCGACTCAGCG
 CCAGCGCGTGAAGGGCAGCAAGTACTACCTGGATTTGAACCTGGACTCAGAG
 CCGCTACCTGGACCGGCTTGGGGCGCAGACGCTGTGTAACAGGAGGACAG
 CTGCGCGCTGCGCGGCCACCGAGAGGAGTACTTCCATCTCTTCCGCGCGCTC
 CGTCCCGCTGACCGGACTACTCTGACCTGGCGGGCCACTGCGCTTCTCTGT
 GCCCTGTAAATAGTTTAAATATGAACAAAGAAAAAATATATTTTA
 TGATTTAAAAAATAAATATAATTGGGATTTAAAAACATGAGAAATGT
 GAACATGATGGGTGGGCGAGGCTGGGAGAACTTGTACAGTGGAAACAA
 TATTTATAAATTAATTTGTAAACAG

Figure 13. ctd

TGTGCTTCTTACACCCCAACGCAACCGGTGTGCTGCCCATCGGCTGGAGCT
 GCTGAGTGACATGAAGACCTGCATCGTGCCTGAGGCTCTTGTGCTTCAACCA
 CAGAGCGCGCATCCACAGGATCTCCCTCGAGACCAATAACAAACGAGCTGGC
 CATCCCGCTCACGGGGCTCAAGGAGGCTCAGGCTGACCTTGTATGTGTGCA
 ACAACCATCTACTGAGACAGCTCAGCCTGAAGACCATCAAGCGCGCTT
 CATGAACGGGAGCTCGGTGGAGCAGCTGGTGGAGTTTGGCTTGACTACCCCG
 AGGGCATGGCGCTGACTGGATGGGCAAGAACCTCTACTGGGCGGACACTGG
 GACCAACAGAAATCGAAGTGGCGCGCTGGAGCGGCGAGTTCGCGCAAGTCTC
 GTGTGGAGGAGTGGACAAACCGAGGTGCTGGCGCTGGATCCACCAAGGG
 CTACATCTACTGACCGAGTGGGGCGGCAAGCGGAGGATGTTGGGCGCTTCA
 TGGACGGGACCAACTGCATGACGCTGGTGACAAAGTGGGCGCGGCGCAACGA
 CCTCACCATTTGACTACGCTGACCGCGCTCTACTGGACCGACCTGGACACCA
 ACATGATCGAGTGTGCAACATGCTGGGTGAGGAGCGGCTGTGATTGGCGA
 CGATCTCCCGCACCGCTTGGGTGACGCGATACAGCGATTATATCTACTGGA
 CAGACTGGAATCTGCACAGCATTTGAGCGGGCGGCAAGACTAGCGCGCGGAA
 CCGCACCCCTATCCAGGGCGACCTGGACTTGTGATGGACATGCTGTGTGTCCA
 CTCTCCCGCGCAGGATGGCTCAATGACTGTATGCACAAACAGCGGCGAGTGTG
 GCGAGCTGTGCTTGGCATCCCGCGGCGCAACCGCTGCGGCTGCGCTCACACTA
 CACCTTGGACCCCGACGACCGCGCACTGACGCGCGCGCAACCTCTTCTGCTTTC
 AGCGAGAAATCTGCCATCAGTGGATGATCCCGGACGACCGACAGACCGCGG
 ATCTCATCTCTGCGCTGCAATGGACTGAGGAAACGTCAGGCAACGCTATGTA
 CCGACTGGACAAAGTTTCTACTTGGGTGGATGGGCGCGCAACATCAAGCGA
 GCCAAGGACGACGGGACCGCGCTTGTGTTTGGACCTCTCTGAGCGCAAGGCGA
 AAACCCGACAGCAGGCGCGGCGACCTGACATCGACATCTACAGCGCGGACA
 CTGTTCTGGACGCTGCGAGCGGCAACCAATACCATCAACGTCACAGGCTGACCG
 GGAAGCGATGGGGGTGGTGTGCTGGGGAGCGGCAAGGCCAGCGGCTATCG
 TGTCAACCGGAGCGAGGGTACTGTACTTCAACCAACATGACAGGACCGGGC
 AGCGAAGATGGAACCGCGCAGCGCTGGACGGCAGCGAGCGGCTGCTTCA
 CAACCGGCTCATCGCGCTGTGGCGCTGGTGTATGACAAACACATGCGGCAAGC
 TGTCTGGGTGGACCGGACCTGAAGCGCATTTGAGAGCTGTGACCTGTTCAGGG
 GCGCAACCGCTGACCTGGAGGAGCGCAACATCGTGCAGCTCTGGGCTGACG
 ATCTTGGCAAGCATCTCTACTGGATGCGACCGCGCAGCAGTGTATCGAGC
 GTGTGGAGGAAGACCGCGGCGCAAGCGGACTCGCATCCAGGCGGCTGTGCGC
 CAGCTGACTGGCATTCATGCACTGAGTGGAGGAAGTCAAGCTGAGGAGTTTCTCAG
 CCGACCATGTGCGCGTGACAATGTTGGCTGTCTCCACATCTGTATTGCCAAG
 GGTGTGGGACACCGGCTGCTCATGCGCGTCCAGCTGCTGCTCTGTGACGAA
 CTGTGATGCTGTGGAGAGCGCGCAACCTGCGCGCGGAGGAGCTTGTGCTGTGCC
 ACAGGGGAGATGAGTGTATCCCGGGCGCTGGCGCTGTGACGCGCTTCCCGAG
 TGGATGACAGAGCGAGGAGGCGCTGCGCGCTGCGCTGCGAGCGGAGCGAG
 CCGTCCGCGCGGGTCACTGTGTGAGCTTGGCTGCGCTGCGCGCGCGGAGCT
 ACTGTGACGACCGCTCAGACGAGGCGGACTGTGACCGCATCTGCTGCGCAAC

【 図 1 4 】

Figure 14

GGCTGGTCTTGAACCTCTGGCGTGAATGATCTCTCTCTCGGAAAGTGTCTG
 GGATTTATAGCTTGGCGCTCTGCTATTTGCCAACCGCGGGAGCTACCGCTGG
 TGGACCGCGCGGAGTCAAGCTGAGTCCACCATCGTGTGACGCGCTGGAG
 GATGCGCGCGCAGTGGACTTCCAGTTTTCGAAGGAGCGCGTGTGACTGACAG
 ACGGAGCGAGGAGGOCATCAAGCAGACCTACCTGAACAGACCGGGGCGCGC
 GTGCAGAAAGTGGTCTCTCGCGCTGGTCTCTCCGAGCGGCTGCGCTGGAGT
 GGGTGGGCAAGAACTGTACTGGACGGACTCAGAGACCAACCGGAGTCCAGGT
 GGCGAACCTCAATGGCACAATCCCGGAAGGTGTCTTCTGCGAGGACCTTGACC
 AGCGAGGGCCATGCGCTTGGACCGCGCTCACGGGTACATGTACTGGACAGAC
 TGGGTGTGAGACCGCGGATTGAGCGGGCGAGGATGGATGGGACGACCGGGA
 AGATCATTTGTGACTCGGACATTTACTGGCGCAATGGACTGACCATTCGACCT
 GAGTGTGACGAGAGCTCTACTGGCTGACGCGCAAGCTGAGGAGGAGGCTGTG
 CCAACCTGGACCGCTGTTCCCGCAGAAAGTGTGTGAGGGCAGCGTGAACGAC
 CCGCTTGGCGCTGAGCGCTTCCGGGGACACTTGTACTGACAGACTGGCAGACC
 CGCTCCATCCATGCTGCAACAAAGGCGCACTGGGGGGAAGAGGAGGAGATCC
 TGAGTGCCTCTACTCAACCATGGACATCCAGGTGTGAGCGGAGGCGGCGAG
 CTTTCTTCCACATCGCTGTGAGGAGGACATGGCGGCTGCTCCACCTGTGCG
 CTGCTGTCCCAAGCGAGCCTTCTACACATGCGCTGCGCCACGGGTGTGCGAG
 CTGCAGGACAAACCGGAGGAGCTGTAAGGCGAGGAGCGGAGGAGTGTGCTGCG
 TGGCGCGCGGAGCGGACCTACGGAGGATCTGCTGGACACCGCGGACTTTAOCG
 ACATGCTGCTGAGGTGGACGACATCCCGCAGCGCATTTGCCATGACTACGAC
 CGCTAGAGGGCTATGTCTACTGGACAGATGACGAGGTGGGGGCAATCCGAG
 GGCGTACCTTGGACGGGTCTGGGGCGCAGACGCTGTGTAACACGAGATCAACG
 ACCCGGATGGCATCGCGGTGACTGGGTGGCGCGGAAACCTCTACTGCGGCGAC
 ACGGGCAGCGGACCGCATCGAGGTGACGCGCTCAACGCGACCTCCGCAAGAT
 CCGTGTGTGGAGGAGCTGACGAGCGCGGAGCGCATGCACTGCAACCGGTGAT
 GGGCTCTATGTACTGGACAGACTGGGGAGAGAACCTAAATTCGAGTGTGCGC
 AACTTGGATGGGAGGAGCGCGGCTGTGCTGTCAATGCTGCTGCTGCGGTGGCC
 AACGGCTGGCGCTGGACCTGCGAGGAGGGAAGCTCTACTGGGAGAGCGCA
 AGACAGACAAGATCGAGTGTATCAATGTTGATGGGACGAGAGGCGGAGCC
 CTCTGGAGGACAAGCTCCCGCACATTTTGGGTTCAOGCTGCTGGGGGAGCTTC
 ATCTACTGGACTGACTGCGACGCGCGCAGCATCGAGCGGCTGCAACAGGTCA
 AGGCGACCGGAGCGTCACTATTGACAGCTGCGCGCATGAGTGGGCTGCAAA
 GCTGTGAATGTGGCAAGGTGCTGCGAACAACCGGTGTGCGGACAGGAACG
 GGGGTGTGAGCGACCTGTGCTTCTCACACCGCACCGCAACCGGTGTGCTGCGC
 CATGGCT
 GGAGCTGTGAGTGACATGAAGACCTGCATCGTGGCTGAGGCTCTTGTGCT
 TCACGAGCAGAGCGCGCATCCACAGGATCTCCCTCGAGACCAATAACACGA
 CGTGGCCATCCCGCTCACGGCGCTCAAGGAGGCTCAGCGGACTTGTGATGT

Figure 14, ctd.

GTCCAAACACCATCTACTGGACAGACGTGACGCTGAAGACCATCAGCCG
GCCTTCATGAACGGGAGCTCGGTGGAGCAGCTGGTGGAGTTTGGCCCTGACTA
CCCGAGGGCATGGCCGCTTGAATGAGTGGGCAAGAACTCTACTGGGCGGACA
CTGGGACCAACAGAAATCGAAGTGGCGCGGCTGGACGGGAGTTCCGGCAAGT
CCTCGTGTGGAGGGACTTGGACAACCGAGGTGCGTGGCCCTGGATTCCACCA
AGGGCTACATCTACTGGACGAGTGGGGGGCAAGCCGAGGATGTTGGGGCC
TTTATGGAACGGGACCAATGCAATGA
CGCTGGTGGACAAGGTGGCGGGGCAACGAACCTCAACATTGACTAGCTGAC
CAGCGGCTCTACTGGACCGACCTGGACACCAACATGATCGAGTGGTCCAA
TGCTGGGTGAGGAGCGGTGCTGATTGCCAGCATCTCCGCAACCGTTGGTCT
TGACGCAATACAGCGATTATATCTACTGGACAGACTGGAATCTGCAACGA
TTGAGCGGGCGGACAAGACTAGCGGCGGAAACCGCAACCTTCAACAGGGGAC
CTGGACTTGGTATGGACATCTGCTGTTCCACTCTCCCGCAGGATGGGCTC
AATGACTGTATGCAACAACCGGGCAGTGTGGGACGCTGTGCTTGGCATCC
CCGGGGGCAACCGCTGGGCTGGGCTCAGACTACACCTGGACCCGAGCAGCG
CAACTGCAACCGGCGGCAACCTCTTCTGCTGTTACGCAAGAACTTGCATCA
GTGGATGATCCGGACGACAGCAGCAGCCGATCTCATCTGCGGCTGCAATG
GACTGAGGAACCTCAAGACCATCGACTATGACCACTGGAACATTCATCT
ACTGGTGGATGGGGCGGCAACATCAAGCGAGGCAAGGACGAGGCGGCA
GCCCTTTGTTTTGACCTCTCTGAGCAAGGCGCAAAACCGAGCAGGCAAGCC
ACGACCTCAGCATCGACATCTACAGCGGACACTGTTCTGGACGTGCGAGGCG
ACCAATACCATCAACGTCCACAGGCTGAGCGGGGAAGCCATGGGGGTGGTGC
TGCGTGGGACCGGCAAGCCAGGCGCATCGTCTGCAACCGGAGCGAGGG
TACCTGTACTTCAACCAATGACAGACCGGCGCAAGATCGAACGCGCAG
CCCTGGACGGCAACCGAGCGGAGTCTCTTCAACCAACCGGCTCATCCGCGCTGT
GGCCCTGGTGTAGACAACACACTGGGCAAGCTGTTCTGGTGGAGCG
GGACCTGAAGCGCATGAGAGCTGTGACCTGTGAGGGGCAACCGCTGACCC
TGGAGGACGCCAATCGTTCAGGCTCTGGGCTGACCATCTTGGCAAGCAT
CTCTACTGATCGACCGGACGACGATGATCGAGCGTGTGGAGAAGACCA
CCGGGACAAGGGAGCTGCACTCCAGGCGGCTGTGCCCACTCACTGGCATCC
ATGCACTGGAGGAAGTCAAGCTGGAGGAGTTCAGCCCAACCATGTGCCGT
GACAATGGTGGCTGCTCCACATCTGATTGCAAGGGTGTGGGACCAAC
GGTGTCTATGCGCAGTCCACTGCTGCTGCGAGAACCTGCTGACCTGTGGAG
AGCGGCCCACTGCTCCCGGACCATTTGCAATGTCACAGGGGAGATCGACT
GTATCCCGGGGCTGGGCTGTGACGGCTTTCCGAGTGGATGACAGAGCG
ACGAGGAGGGCTGCCCGGTGTGCTGCCCGGCGAGTTCCCTGCGCGGGGTCA
GTGTGTGGACCTGCGCTGCGTGGCAGCGGAGGACAGCTGTGAGGACGCTC
AGACGAGGGGAGTGTGACGCGCATCTGCTGCCAACCAAGTTCCGGTGTGGCA
GCGGCGAGTGTGCTCATCAACAGCAGTGGGACTCTTCCCGAGTGTATC
GACGGCTCCGAGGAGCTATGTGAAATCAACAGCGGCTCAGACGACA
GCGCGGCCACAGCAGTGCATCGGGCGGCTCATTTGGCATCATCTCTCTCT

Figure 14, ctd.

CGTCATGGGTGGTGTCTATTTTGTGTGCCAGCGCGTGGTGTGCCAGCGTATGC
GGGGGCAACGGGCGCTTCCCGCAGAGTATGTGAGCGGGACCGGCACTGCG
CCTCAATTTCATAGCCCGGGCGGTTCCAGCATGGCCCGCTTCAAGGCACTCC
ATGCGGAAAGTCCATGATGAGCTCCGTGAGCCTGATGGGGGGCGGGGGGG
TGCCCTCTACGACCGGAACCAAGTCAACGGGCGCTCCAGCAGCTCGTCA
GCAAGAGGCCAGCTGTACCGGCGATCTGAAACCGGCGGCGCTCCCGGCGC
GGACCCCTCCCTGTACCAACATGACATGTTCTACTCTTCAAACTTCCGGGCA
CTGTGAGACCGTACAGGCGCTACATCATTCGAGGAATGGCGCGCGGAGACG
CCCTGCAGCACCGAGTGTGTGACAGGACTACAGCGCGAGCGCTGGAAGGC
CAGCAAGTACTACCTGGATTGAACTCGGACTCAGACCCCTATCCACCCCGC
CCACGCGCCACAGCGAGTACCTGTGCGGGAGGAGGAGTCCCGCGCTCGCGCG
CAGCGAGAGGAGTACTTCCATCTCTTCCCGCGCGCTCGGTCCCGCTGCAAGGAC
TCATCTGACCTCGCGCGGCGGCACTCTGGCTTCTCTGTGCGCTGTAAATAGTT
TTAAATATGAACAAAGAAAAAATATAATTTATGATTTAAATAATAA
ATATAATTGGGATTTTAAAAACATGAGAAATGTGAACCTGTGATGGGGT
GGCAGCGCTGGGAGAACTTTGTACAGTGGAAACAAATTTATAAACTTAA
TTTTGTAAAAACG

【 図 15 (a) 】

Figure 15(a)

AGGCTGGTCTCAAACTCTGCGCTTAAAGTGAATCTGCGCGCTCGGCTCCAA
GTGCTGAGATGACAGGTGTGAGCCACCGTGCOCGGCCCAAGAACTCTTAATT
CCACTGAAACTTGCOCGCTTAAGCAGGTCCCGAGTCTCCCTCCCTAGTCCCT
GGTCCACCATCTCTGCTTCTGCTTCAATGAAATTTGCTACCCCTCGCGCTCT
GCTATTTGCCAACCGCGGACGTAACGGCTGGTGGACGCGCGGAGTCAAGC
TGGAGTCCACCATCGTGGTTCAGCGGCTGGAGGATGCGGCGCGAGTGGACTTC
AGTTTTTCCAAGGGAGCCGTGTACTGGACAGACGTTGAGCGAGGAGGCCATCA
AGCAGACCTACCTGAACAGCAGCGGGGCGCGCTGACAGAACCTGTGCTATCTCC
GGCTCTGCTCTCCGAGCGGCTCGCTGCGACTGGGTGGGCAAGAACTGTATC
TGGACGGACTCAGAGACCAACCGCATCGAGGTGGCCAACTCAATGGCACAT
CCCGGAAAGGTGCTCTCTGCGAGGACCTTGAACAGCGGAGGGCCATCGCTTGG
AOCOCCTCAGCGGAGTACATGTACTGGACAGACTGGGGTGGAGCGCGCGGAT
GAGCGGCGAGGATGATGAGCAGCAGCGGAGAGATCAATTTGGAGTGGGACA
TTTACTGGCCCAATGGACTGACCATCGACCTGGAGGAGCAGAACTCTACTG
GGCTGACCGCAAGCTCAGCTTCACTCAACCGTGCACAACTGGACGGCTGTTCGG
CGAGAGGTGGTGGAGGGCAGCCTGACGCAACCCCTTCCGCTGACGCTCTCCGG
GGACACTCTGTACTGGACAGACTGGCAGACCGGCTCCATCCATGCTGCAACA
AGCGCACTGGGGGAAGAGGAAGGAGATCTGAGTGGCTCTACTACCCAT
GGACATCCAGGTGCTGAGCCAGGAGGCGAGCCCTTCTTCCACACTGCTGTG
AGGAGGACAATGGCGGCTGCTCCCACTGTGCTGCTGCTCCCAAGCGAGCCTT
TCTACACATGGCGCTGCGCCACGGGTGTGACGCTGCGAGGACAACGGCAGGAG
TGTAAGGCAAGGAGCGGAGGAGTGTGCTGCTGCGCGCGGCGAGCGAAGTACG
GAGGATCTGCTGGACAGCGCGGACTTTACCGACATCGTGTGAGGTGGAGC
ACATCCGGCAGGCCATTTCCATCGACTACGACCGCTAGAGGGCTATGCTACT
TGGACAGATGACGAGGTGCGGGCCATCCGAGGGGCTACCTGGACGGGCTCTGG
GGCGCAGACGCTGTGTAACACCGAGATCAACGACCGGATGGCATCGCGGTG
ACTGGGTGGCGGAAACCTCTACTGGAACGACAGCGGCAAGGACCGCATCGAG
GTGAGCGGCTCAACGGCACTCCCGCAAGATCTGGTGTGGAGGAGCTTGA
CGAGCGCGGAGGCAATGCACTGCAACCGGCTGATGGGCTCATGTACTGGACAG
ACTGGGAGAGAACTGAAATCGAGTGTGCAACTTGGATGGGCGAGGAGC
GGGTGTGCTGTCAATGCTCCCTGGGTGGCCAAACCGGCTGGCGCTGGACCT
GCAGGAGGGGAAAGCTCTACTGGGAGAGCGCAAGACAGAGAAATGAGGT
GATCAATTTGTGAGGAGCAAGAGGGGCGGACCTCTGGAGGCAAGCTCCCG
CACATTTTGGGGTTCAGCGTCTGCGGGGAGTCTATCTACTGAGTCACTGGCA
GGCGCGCAGCATCGAGCGGCTGCAACAGGTCAAGCGGAGCGGAGCTATCA
TTGACCGAGCTGCCGAGCTGATGGGGCTCAAGCTGTGAAATGGGCCAAGGT
GTGCGGAAACCAACCGTGTGCGGACAGGAAACGGGGGTGCAACCGACCTGTGCT
CTTCAACCCCAACCGGCTGTGGCTGCGGCTGCGGCTGGAGCTGCTGAG
TGACATGAAGACCTGCATCGTGTGCTGAGGCGCTTCTGTGCTTCAACGACGAG

Figure 15(a), ctd.

CCGCCATCCACAGGATCTCCCTGAGACCAATAACAACGACGTGGCCATCCCG
CTCACGGGGCTCAAGGAGGCTCAGCCCTGGACTTTGATGTGTCCAAACAAACCA
CATCTACTGGACAGACGTCAGCCTGAAGACCATCAGCCGCGCTTCAAGAAC
GGGAGCTCGGTGGAGCAGTGTGTGAGTTTGGCTTGAATCCCGAGGGCAT
GGCGGTGACTGGATGGGCAAGAACTCTACTGGGCGGACACTGGGAACCAAC
AGAAATCGAAGTGGCGCGGCTGGACGGGAGTTCGGCAAGTCTCGTGTGGAG
GACTTGGACAAACCGAGGTGCGTGGGCTGGATCCCAACAGGGGCTACATCT
ACTGGAACCGAGTGGGGCGGCAAGCGGAGGCTGTGCGGGCTTCACTGCGCGG
ACCAACTGCATGACGCTGTGGACAAGGTGGGCGGGCCAAACGACCTCACA
TTGACTACGCTGACGAGCGCTCTACTGGACCGACTGGACACCAACATGATC
GAGTGTGCAACATGCTGGGTGAGGAGCGGGTGTGATTGCGAGCATCTCC
GCACCGCTTCCGTGTGACGAGTACAGCATATATCTACTGGACAGACTGG
AATCTGCACAGACTTGAAGCGGCGCAAGACTGACCGGCGGAAACCGCACCC
TCTACAGGGCCACTGGACTTGTGATGGACATCTGGTGTTCCTCTCTCC
GCCAGGATGGCTCAATGACTGTATGCAACAACAGGGGAGTGTGGGCGAGCT
GTGCTTGTGCAATCCCGGCGGCAACCGCTGCGGCTGCGGCTCAGACTACACCTG
GACCCAGCAGCGCAACTGACGCGCGCCACCACTTCTGTGCTGTGAGCGAG
AAATCTGCCATCAGTGGATGATCCCGGACGACGACGAGCGCGGATCTCA
TCTTCCCGCTGCATGGAAGTGAAGCAAGCTCAAGCCATCGACTATGACCCACTG
GACAAGTTCACTACTGGGTGGATGGGCGGCAAGCAATCAAGCGAGGCAAG
GACGACGGGAGCCAGCCCTTTGTTTTGACTCTTCCGAGCCAAAGGCCAAACCC
AGACAGGACCGCCACGACCTCAGCATCGACATCTACAGCGGACACTGTCTCT
GGACGTGCGAGGCGCAACATACCACTCAAGCTCCACAGGCTGAGCGGGGAAGC
CATGGGGGTGGTGTGCTGCTGGGACCGGCAAGCGGAGGCGGCACTGCTGTCA
ACGCGGAGCGGAGGTACTGTACTTCAACCAACATGACGAGCGGGGAGGCCAA
GATCGAAGCGGAGCGCTGGAGCGGCAAGCGGAGGCTCTTCAACCAACCG
CCTCATCCCGCTGTGGCGCTGGTGTGAGACAACACTGGGCAAGCTGTCTGT
GGTGGACGCGGACCTGAAGCGCATTTGAGAGCTGTGACCTGTGAGGGGCAACC
GCTGACCTTGGAGGACGCCAATCGTGTGAGCGCTTGGGCTGAGCCATCTTGT
GCAAGCATCTCTACTGATGACCGGCGCAGCAGATGATGAGCGGTGTGGA
GAAGACCAACGGGGACAAGCGGAGTGCATCCAGGGCGGTGTGGCCACCTCA
CTGGCATCCATGCACTGGAGGAGTTCAGCTGGAGGAGTTCAGCGCCACCA
TGTGGCGGTGACAATGGTGGCTGTCCCACTGTGATTTGCAAGGGTGTGAGG
GACACCAAGGTGCTATGCGGAGTCCACTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CTGTGGAGAGCGGCGCACTGCTCCCGGAGCAGTTTGTGATGTGACAGGGGA
GATCGACTGTATCCCGGGGCGTGGCGCTGTGACGGCTTTCCGAGTGGATGAG
CAGAGCGGAGGAGGAGGCGCTGGCGCTGTGACGGCTTTCCGAGTGGATGAG
CGGGGTGAGTGTGTGACCTGGCGCTGGCTGCGAGCGGCGGAGGAGACTGTGAG
GACCGCTCAGAGGCGGAGTGTGACGCAATCTGCTGCTGCCAACCAAGCTTCCG
TGTGGGAGCGGCGAGTGTGCTCTCAACCAACGAGCAGGCTCTTCCCGCA
CTGTATCGACGGCTCCGAGGCTCATGTGTGAAATCAACAGCGCGCTCAG

Figure 15(a), ctd.

ACGACAGCCCGGCCACAGCAGTGGCATCGGGCCCGTCATTGGCATCATCTCT
CTCTCTTGGTCAATGGGTGGTGTCTATTTTGTGTGCCAGCGCGTGGTGTGCCAGC
GCTATGCGGGGCCAAACGGGCCCTTCCCGCAGAGTATGTACGGGGACCCCGC
ACGTGCCCTCAATTTTACATAGCCCGGGGGGTTCCAGCATGGCCCTTACAG
GCATCGCATGGGAAAGTCCATGATGAGCTCCGTGAGCCTGATGGGGGGCGG
GGGGGGGTGCCCTCTACGACCGGAACACGTCACAGGGGCTCGTCCAGCAGC
TGGTCCAGCAGAAAGGCCAGCTGTACCCGGGATCCTGAAACCCGGGCCCTCC
CGGCCACGGACCCCTCCCTGTACAACATGGACATGTTCTACTCTTCAACATT
CCGGCCACTGGGAGACCGTACAGGCCCTACATCATTCGAGGAATGGGCGCC
GACGACGCCCTGCAGCACCGACGTGTGTGACAGCGACTACAGCGCCAGCGCT
GGAAAGGCCAGCAAGTACTACCTGGATTGAACTCGGACTCAGACCCCTATCC
ACCCCAACCCAGCCCGACAGCCAGTAACTGTGGCGGAGGACAGCTGCCCGCC
TGGCCCGCACCGGAGAGGAGCTACTTCCATCTCTTCCCGCCCTCCGTCCCGCTG
CAGGACTCTCTGACCTCGGCGGGGCACTCTGGCTTCTGTGTGCCCTGTAA
ATAGTTTAAATATGAACAAAGAAAAAATATATTTTATGATTTAA
AAATAAATATAATTGGGATTTTAAAAACATGAGAAATGTGAACCTGTGA
TGGGTGGGAGGCTGGGAGAACCTTTGTACAGTGAACAAATATTTATA
AACTTAATTTTGTAAACAG

【 図 15 (b) 】

Figure 15(b)

CAATGTCCAGTTCGGCTGCAAGTTATAACATCCCATTTTGTATTTCTTTTA
TTTTTCTCTTTTCTTTTGTAGATGGAGTCTCGCTCTGTACCCAGGCTGGAGT
GCAATGGG

【 図 16 (a) 】

Figure 16(a)

CGCGCGGCGCGGAGGCGGGAGCAAGAGGCGCGGGAGCGCGAGGATCCACCG
CGCGCGCGCGCGCATGGAGCGCGAGTGAGCGCGCGCGCTCCCGCGCGCGCGGAC
GACATGGAAACGGCGCGGACCGGGCGCGCTCCCGCGCGCGCGCGCGCTGCTGC
TGCTGGTGTGTACTGACAGCTTGGTCCCGCGCGCGCGCTCACCGCTCTGTGT
TGCCAAACCGCGGATGTGCGGCTAGTGGATGCCGGCGGAGTGAAGCTGGAGT
CCACCATTTGGCCAGTGGCGTGGAGGATGACGCTGCTGTAGACTTCCAGTT
TCCAAGGGTGTGTGTACTGGACAGATGTGAGCGAGGAGGCCATCAAAACAG
ACCTACCTGAACCCAGACTGGAGGTGCTGCACAGAACATTGTATCTCGGGCC
TGCTGTCACTGATGGCTGGCGCTGTGACTGGGTGGCAAGAGCTGTACTGG
ACGGACTCGGAGACCAACCGCATTGAGGTTGCCAACCTCAATGGGACGTCCCG
TAAGGTTCTCTTCTGGCAGGACCTGGACCGCAAGGCCATTGCCCTGGATC
CTGCACATGGGTACATGTACTGGACTGACTGGGGGGAAGCACCCCGGATCGA
CGGGCAGGGATGGATGGCAGTACCCGGAAGATCATTTGTAGACTCCGACATT
TACTGGCCCAATGGGCTGACCATCGACCTGGAGGAACAGAAAGCTGTACTGG
CCGATGCCAAGCTCAGCTTTCATCCAGCTGCCAACCTGGACCGGCTCTTCCGC
AGAAAGGTGGTGGAGGGCAGCTCACTCAACCTTTTGGCTGACACTCTCTGG
GACACACTCTACTGGACAGACTGGCAGACCGCTCCATCCAGCGCTGCAACA
AGTGGACAGGGGAGCAGAGGAAGGAGATCCTTAGTGTCTGTACTCAACCA
TGGACATCCAACTGTGAGCCAGGAGCGGCGAGCTCCCTTCCACACCATGCG
GAGGAGGACAAACGGTGGCTGTTCACCTGTGGCTGTCTCCCGAGGGAGCCT
TTTACTCTCTGTGCTGCCCGACTGTGTGCACTGTGAGGACAAATGGCAAGAC
GTGCAAGACAGGGGCTGAGGAAGTGTCTGTGGCTGGGAGGACAGACCTG
AGGAGGATCTCTCTGGACACCCCTGACTTCACAGACATAGTGTCTCAGGTGG
GGGACATCCGGCATGCCATTGCCATTGACTACGATCCCTGGAGGGCTACGTG
TACTGGACCGGATGATGAGGTGGGGCTATCCGACGGGCTACCTAGATGGCTC
AGGTGGCAGACACTTGTGAACACTGAGATCAATGACCCCGATGGCATTGCT
GTGGACTGGGTCCCGGAACTCTACTGGACAGATACAGGCACTGACAGAA
TTGAGGTGACTCGGCTCAACCGCACTCCCGAAAGATCCTGGTATCTGAGGAC
CTGGACGAAACCGGAGCCATTGTGTGCAACCTGTGATGGGCTCATGTACTG
GACAGACTGGGGGAGAACCCCAAAATCGAAATGGCCCAACCTAGATGGGAG
AGATCGGCATGTCTGTGTAACACCTCCCTTGGGTGGCCCAATGGACTGGCC
TGGACCTCGAGGAGGGCAAGCTGTACTGGGGGATGCCAAAACCTGATAAAA
TCGAGGTGATCAACATAGACGGG

【 図 16 (b) 】

Figure 16(b)

GCGCGCGCGCGGAGGCGGGAGCAAGAGGCGCGGGAGCGCGAGGATCCACCG
CGCGCGCGCGCGCATGGAGCGCGAGTGAGCGCGCGCGCTCCCGCGCGCGGAC
GACATGGAAACGGCGCGGACCGGGCGCGCTCCCGCGCGCGCGCGCGCTGCTGC
TGCTGGTGTGTACTGACAGCTTGGTCCCGCGCGG

【 図 16 (d) 】

Figure 16(d)

【 図 16 (c) 】

Figure 16(c)

ATGGAAACGGGCGGACCCGGGCCCTCCCGCGCGCGCGCGCGCTGCTGCTGT
GGTGTGTACTGACAGCTTGGTCCCGCGCGCGGCTCACCGCTCTGTGTTTGGC
AAACCGCGGATGTGGGCTAGTGGATGCCCGCGGAGTGAACCTGGAGTCCAC
CATTTGTGCCAGTGGCTGGAGGATGCAAGTGTGAGCGAGGAGGCCATCAACAGACCT
ACCTGAACAGACTGGAGGTGTGACAGAACATTGTATCTCGGGCTCGT
GTCACTGTAGGCTGGCTGTGACTGGGTGGCAAGAGCTGTACTGGACGG
ACTCCGAGACCAACCGCATTGAGGTGTGCAACCTCAATGGGACGTCCCGTAA
GGTTCTCTTGTGGCAGGACCTGGACCGCAAGGCCATTGCCCTGGATCCTGC
ACATGGGTACATGTACTGGAGTGTGAGGGGGAAGGACCCCGGATCGAGCGG
GCAGGGATGGAATGGAGTACCCGGAAGATCATTTGTAGACTCCGACATTAC
TGGCCCAATGGGCTGACCATCGACCTGGAGGAACAGAAAGCTGTACTGGGCGG
ATGCCAAGCTCAGCTTCACTCCACCGTGCACCTGGACGGCTCTTCCGCGAG
AAGGTGGTGGAGGGCAGCTCACTCAACCTTTTGGCTGACACTCTCTGGGA
CACACTTACTGGACAGACTGGCAGACCCGCTCCATCCACGCTGCAACAGT
GGACAGGGGAGCAGAGGAAGGAGATCCTTAGTGTCTGTACTCAACCATGG
ACATCCAAAGTGTGAGCCAGGAGCGGACGCTCCCTTCCACACACCATGGAG
GAGGACAAACGCTGGCTGTCCCACTGTGCTGTCTCCCGAGGGAGCTTTC
TACTCTGTGCTGCCCACTGGTGTGCACTGTGAGGACAAATGGCAAGACGTG
CAAGACAGGGGCTGAGGAAGTGTGCTGTGCTGGCTGGAGGACAGACCTGAGG
AGGATCTCTCTGGACACCCCTGACTTCACAGACATAGTGTGACAGGTGGGCG
ACATCCGGCATGCCATTGCCATTGACTACGATCCCTGGAGGGCTACGTGTAC
TGGACCGATGATGAGGTGGGCTATCCGAGGGCGTACCTAGATGGCTCAGG
TGCGCAGACACTTGTGAACACTGAGATCAATGACCCCGATGGCATTGTGTG
GACTGGGTGGCGGAACTCTACTGGACAGATACAGGCACTGACAGAATTG
AGGTGACTCGGCTCAACGGCACTCCCGAAAGATCCTGTTATCTGAGGACCTG
GACGAACCGGAGCCATTGTGTGCAACCTGTGATGGGCTCATGTACTGGAG
AGACTGGGGGAGAACCCCAAAATCGAAATGGCCAACTAGATGGGAGAG
ATCGCATGTCTGGTGAACACCTCCCTTGGGTGGCCAACTGGACTGGCCCTGG
ACCTGAGGAGGGCAAGCTGTACTGGGGGATGCCAAAACCTGATAAAATCG
AGGTGATCAACATAGACGGG

METAPTRAPPPPPPLLLLVLVYCSLVPAASPLLLFANRRDVRVLDAGGVK
LESTIVASGLEDAAAVDFQFSKGAVVYWDVSEEAIKQTYLNTGGAAQNV
SGLVSPDGLACDWVGKLYWTDSETRNRIEVANLNGTSRKLFWQDLDPRA
IALDPAHGYMYWTDWGEAPRIERAGMDGSTRKIIVSDIYWPNGLTIDLEE
QKLYWADAKLSFIHRANLDGSFRQKVVEGSLTHPFALTLSDTLYWTDWQT
RSIHACNKWTGEQRKEILSALYSPMDIQVLSQERQPPFHTPCEDNGGCSHLCL
LSPREFFYSACPTGVQLQDNGKTCKTGABEVLALLARRTDLRRISLTDPTDI
VLQVGDIRHAIADYDPLEGYVYWTDDEVRAIRRAYLDGSGAQTLVNTEND
PDGIAVDWVARNLYWTDGTDRIVTRLNNGTSRKLVSIEDLDEPRAIVLHP
VMGLMYWTDWGENPKIECANLDGRDRHVLVNTSLGWPNGLALDLQEGKLY
WGDAKTDKIEVINIDG

【 図 17 (a) 】

Figure 17(a)

CCTGCGCGCTCTGCTATTGTCACACCGCGGGGACGTACGGCTGGTGGACGCGCG
CGGAGTCAAGCTGGAGTCCACCATGTTGGTTCAGCGGCTGGAGGATGCGCGCG
CAGTGGACATTCAGTTTTCACAAAGGGAGCGCTGTACTGGACAGACGTGGAGCGA
GGAGGCCATCAAGCAGACACTACCTGAACCAAGCGGGGCGCGCTGCAGAAC
GTGGTCACTTCGCGCTGGTCTCTCCGAGCGCTCGCTGGAGTGGTGGGCA
AGAAGCTGTACTGGACGGACTCAGAGACCAACCGCATCGAGGTGGCCAACT
CAATGGACACATCCCGGAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACCTTGACCAAGCGAGGG
CCATCGCTCTGGACCGCGCTCAGCGGTACATGTACTGGACAGACTGGGTGGAG
ACGCGCGGATTGGAGCGGCGAGGATGGATGGCAGCACCGCGGAAGATCATTTG
TGGACTCGGACATTTACTGGCCCAATGGACTGACCATCGAACCTGGAGGAGCA
GAAGCTCTACTGGGCTGACGCCAAGCTCAGCTTATCCACCGTGCCAACTGG
ACGGCTCGTTCCGCGCAGAGGTGGTGGAGGGCAGCGTGAACGCAACCTCGGCC
TGACGCTCTCCGCGGACACTGTGTACTGGACAGACTGGCAGACCGCTCCATCC
ATGCTTGCAACAGCGCACTGGGGGGAAGAGGAAAGGAGATCTGAGTGGCCCT
CTACTCAACCATTAAGACATCCAGGTCTGAGCGAGGAGCGGACCGCTTCTTCTCC
ACACTCGCTGTGAGGAGGACAAATGGCGCTGCTCCACCTGTGCTGCTGTGTC
CAAGCGAGCTTCTTACACATGCGCTGCGCCACGGGTGTGACGTGCGAGGAC
AACCGCAGGACGTGTAAAGCAGGAGCGGAGGAGGTGCTGCTGCTGGCGCGCG
GACGGACCTACCGAGGATCTCGCTGGACACGCGGACCTTTACCGACATCGTGC
TGCACGTGGACGACATCCAGCGCCATTGCCATCGACTACGACCGCGCTAGAG
GGCTATGTCTACTGGACAGATGACGAGGTGGCGGCATCCGACGGCGTACTCT
GGACGGGTCTGGGGCGCAGACGCTGGTCAACACCGAGATCAACGACCGCGATG
CGATCGCGGTGCGACTGGGTGGCGGAAACCTTACTTGGACCGACACGCGGCAAG
GACCGCATCGAGGTGACGCGCTCAACCGGCACTCCCGCAGAGATCTGTGTGTG
GAGGACCTGGAGAGCGCGGAGGCCATCGCATGCAACCGGTGATGGGCTCATGT
TACTGGACAGACTGGGGAGAGAACCTTAAATCGAGTGTGCAACTTGGAT
GGGACAGGCGCGGTGTGCTGGTCAATGCTGCTGGGTGGCGGCAACCGGCTG
GCGTGGACCTCGAGGAGGGGAGGCTTACTTGGGAGAGCGGCAAGACAGCAGCA
AGATCGAGGTGATCAATGTGTGATGGAGCGAAGAGGCGGACCGCTCTGGAGG
ACAAGCTCCGACATTTTCGGGTTCACGCTGCTGGGGGACTTCACTACTG
ACTGACTGGCAGCGCGCAGCATGGAGCGGTGCAACAGGTCAAGGCCAGCGG
GGACGTCTATTTGACAGCTGCGCGACCTGATGGGGCTCAAGGCTTGTGAAT
GTGGCAAGGTGCGGAGCAACCAACCGGTGTGGGACAGGAACGGGGGTGCA
GCCACTGTGCTTCTTACACCGCAGCAACCGGTGTGGCTGCCCATCGGCT
GGAGCTGCTGAGTGACATGAAGACCTGACATCGTGGCTGAGGCGCTTCTGTGCT
TCAACGAGCAGCGCGGACATCCACAGGATCTCCCTCGAGACCAATACAGCA
CGTGCCATCCCGCTCAGCGGCTCAGGAGGCGCTCAGCGCTGGACTTTGATGT
GTCCAAACCACTCTACTCTGACAGAGCTCAGCTCAGCTGAAGACCATCAGCGC
GCTTCTATGAACGGGAGCTCGGTGGAGCAGCTGGTGGAGATTTGGCTTGACTA
CCCCGAGGGCAGTGGCGGTGACTGGATGGGCAAGAACCTTACTTGGCGGAC

Figure 17(a) Continued

TGATGGGGGCGCGGGCGGGGTGCCCTTACGACCGGAACACGTCACGGG
CCTGCTCCAGCAGCTGCTCCAGCAGGAAGGCCACGCTGTACCGCGCATCTCGA
ACCGCGCGCTCTCCCGGCAACGGAACCTCTCTGTACAACTGGACATGTCT
ACTCTTCAACCACTTCGCGCACTGTGAGACCGGTACAGGCCCTACATCATCTG
AGGAATGGGCGCGCGGACCGCTCGACGACCGGACCGGATGTGTGACAGGACT
ACAGCGCGACCGCTGGAAGGCGAGCACTACTCTGATTTGAATCGGCA
CTCAGACCGCTATCCACCGCCACCGCAGCGCCACAGCGAGTACCTGTGGGGA
GGACAGCTGCGCGGCTGCGCGGCGCAGGAGGAGCTACTTCCATCTCTTCCG
CGCGCTCGGCTCGCGGCTGACAGGACTCTGCTGCTGGCGCGGCGCTGCTGCT
CTCTGCTGCGCGCTGTAAATAGTTTAAATATGAACAAAGAAAAAATATA
TTTTATGATTTAAAAAATAAATAAATATGGAATTTTAAAAACATGAGA
AATGTGAACCTGTGATGGGTGGGCGGGGTGGGAGAACCTTGTACAGTGA
ACAAATATTTATAAATTAATTTGTAAACAG

【 図 17 (b) 】

Figure 17(b)

SPLLLFANRRDVRVLDAGGVKLESTV
VSGLEDAAAVDFQSKGAVYWTVDVSEAAIKOTYLNQTGAAVQNVVISGLVSPDGLAC
DWVGKLYWTDSETNRIEVANLNGTSRKVLEFWQDLDPQRAILDPAHGYMYWTDW
GETPRIERAGMDGSTRKIIWDSYIWPNGLTIDLEBQKLYWADAKLSFHANRLDGSFR
QKVVGSLTHPPALTLSDGTLYWTDWQTRSIHACNKRGTGKRKEILSALYSPMDIQVLS
QERQPFHTRCEDNNGGSHLCLLSPSEPFYTCAPTGVQLQDNGRTCKAGAAEVLIL
ARRDRLRISLDTPDFDVLQVDDIRHAIADYDPLEGYVYWTDEVRAIRRAYLDGS
GAQTLVNTIENDPDGIAVWVWVARNLYWTDGTDRIEVRLNGTSRKILVSEDLDEPRAI
ALHPVLMGYWTDWGNPNKIECANLDDQERRVLVNASLGWPNGLALDLQEBKLYW
GDAKTDKIEVINVDGTRKRLLEDLKHIFGFTLLGDPIFYWTDWQRRSIEHVHKVKSAR
VDIIDLQDLMLGLKAVNVAKVYGNTPNCPADRNGGSHLCLFFTHPATRCGPIGLIESD
MKTICVPEAFVFTSRAIHRISLETNNNDVAIPLTVKEASALDFVSNNHLYWTDVSL
KTSIRAFMNGSSVEHVFEGLDYPBGMAVDWMGKNLYWADTGTNRNIEVRLDQGRF
QVLYWVRDLNDRSLALDPTKGYIYWEWGGKPRIVRAFMDGTNCMLVDKVGAND
LTDIADQRLYWTDLTDMNMISSNMLGQERVVLIADDLPHPRGLTYQSDYVYWDWNL
HSIERADKTSGRNRTLQIHLDFVMDILVFHSSRQDGLNDCMHNNQCGQLCLAIPEG
HRCCASHYLTDPSSRNSPPTTFLFSQKSAISRMIPDQHSPLDILPHGLRNLNKADY
LTDKFIYVWDRGNKIRAKDTPFPVLTSLSQGNPDROPHDLSDIYSTRILFWTCE
ATNTINVHRLSGEAMGVLRDGRDKPRAIVNAERGYLYFTNMQDRAAKIERAALDG
TEREVLFTGLRFPVLDLTKLFLPWVADLKRIESCDLSGANRLTLEDANIVQPLG
LTLGKHLVWIDRQQMIERVEKTDGKRLTRIQRVAILTGHIAVEEVSELEFSAHPCA
RDNGGCHICIAKWDGTPRCSPVHLVLLQNLTLTCEPPTCSPDQFACATGIEIDCIPA
WRCDGFPBCDDQSDDEEGCPVCSAAQFPFCARGQVCDEILRLRCDGEADCDQRSEADCD
AICLPNQFRCAAGCVLIRQCDSPFDIDGSDDELMEICTPPSDSDPAHSSAIGPVIIGIL
SLFVMGYYVFCQVRVQVRYAGANGFPFHEYVSGTPHVLNFIAPGSGHQGPTGIAC
GKSMSSSVLMDGRGGVPLVDRNHVYTGASSSSSTKATLYPPLNPPSPATDPSLYN
MDMFYSNNIPATVRYRYPYIRGMAPPPTTCSPTDVCDSYASRWKASKYYLDLNSDS
PYPPPPPHSQYLSAEDSCPPSPATERSYFHLFPFPPSPCTDSS

Figure 17(a) Continued

CTGGGACCAACAGAATCGAAGTGGCGCGCTGGACGGGCGAGTTCGGCAAGT
CCTGCTGTGGAGGGACTTGGACAAACCGAGGTGCTGGCCCTGGATGCCACCA
ATGCTGTACATCTACTGGACCGGAGTGGGCGCGGCAAGCGGAGGATCGTGGGGGCT
TTGCTGGAGCGGACCAACTGCACTGAGCGTGGTGGACAAAGTGGCGGCGGCA
ACGACCTCACTTACTGACTAGCTGACCAAGCGCTCTACTGGACCGGACCTGGAC
ACCAACATGATCGAGTGTGCAACATGCTGGGTGACGAGCGGGTGTGATGT
CCGACGATCTCCCGCAACCGTGTGGTCTGACGCACTACAGCGATTATATCTAC
TGGACAGACTGGAACTGTCACAGCATTGGAGCGGCGGCAAGACTAGCGGCG
GGAACCGCACCGCTCATCCAGGGCCACTGGACTTGTGTATGGACATCTGTGT
TTCCACTCTCCCGCCAGGATGGCTCAATGACTGTATGCAACAACACGGGCA
GTGTGGGCGAGTGTGCTGTGCAATCCCGCGGCGGCAACCGCTGGCGCTGGCGCTCA
CACTACAACCTGGACCGGACGCGGCAACTGACGCGCGGCGGCAACCGCTTCTGT
CTGTTCAGCGCAAAATCTGCCATCAGTGGATGTATCCCGGACGACCGGACCA
GCCCGGATCTCATCTCTGCGCTGCACTGGACTGAGGAACGCTCAAGGCCATCGAC
TATGACCACTGGACAAGTTCTACTTACTGGGTGATGGCGGCGGCAACATCA
AGCGAGCCAAAGGACGAGCGGACCGGCGCTTGTGTGTGACTCTCTGAGGCCAA
GGCCAAAACCCGACAGCGGACCGGCAACTGACGATCGACATCTACAGCG
GGACACTGTCTTGGACGTGCGAGGCGCAACATACCATCAACGTCCACAGGCT
GAGCGGGGAGGCCATGGGGGTGTGTGCTGCTGGGAGCGCGGCAACGCGGCGG
CCATCTGCTCAACCGCGGAGCGAGGATCTGTACTTCAACCAAGCTCAGGA
CGGGCAGCGCAAGATCGAACCGGCGAGCGCTGGACGGCAACGAGCGGAGGTCC
TCTTCAACACCGGCTCATCCGCTGTGGCGCTGTGGTGTAGACAACACTGAG
GCAAGCTGTCTTGGGTGGACGGGACTTGAAGGCACTTGAGACGATGTGACCTG
TCAGGGGCGCAACCGCTGACCTGGAGGACGCGCAACATCTGTGACGCTCTGGGC
CTGACCATCTTGGCAAGCATCTCTACTGGATGACCGCGGACGACGAGATGA
TCGAGCGTGTGGAGAAGACACCGGGGACAGCGGACTTGCATCCAGGGCGG
TGTGCCCACTCTACTGGCATCCATGCACTGGAGGAAGTGCAGCTGGAGGAGT
TCTCAGCGCAACCATGTGCGCGTGAACAATGGTGGCTGTCTCCACATCTGTATTTG
CAAGGGTGTGAGGACACCAAGTGTCTATGCCAGTCCGCTGCTGCTGCTCTGCT
AGAACTGTGACTCTGTGGAGCGCGGCAACTGCTTCCCGGACGAGTTTGCAT
GTGCCACAGGGAGATCGACTGTATCCCGGGGCTGGCGCTGTGAGCGCTTTC
CGAGTGTGGATGACGAGCGGAGGAGGAGGCGTGGCGGTGTGCTGGCGCGGCG
AGTTCCTCTGGCGGGGGTCACTGTGTGGAGCTGCGCTGCGCTGGCGGCGGGA
GGCAGACTGTGACGAGCGGCTCAGAGGAGGCGGACTGTGACGCGCATCTGCGTGC
CCAACAGTTCGGGTGTGCGAGGCGGCGAGTGTGCTCTCAACACAGCAGTGC
GACTCTTCCCGGACTGTATCGAGCGGCTCCGACGAGCTCATGTGTGAATCAAC
CAAGCGCGCTCAGACGACGCGCGGCGGCGGACGAGGATGCCATCGGGCGGCTAC
TGGCATCATCTCTCTCTCTTGTGTCATGGGTGTGTGCTATTTTGTGCGGAGCG
CGTGTGTGCGACGCGCTATGCGGGGGGCAACGGGCGCTTCCCGCAGGATATGT
CAGCGGGACCGCGCAGTGTGCGCTCAATTTATAGCCCGCGGGGTTCACGAC
TGGCGCTTCAACGCGCATCGCATCGGGAAGTCCATGATGAGGCTCGGTGAGCG

【 図 18 (a) 】

Figure 18(a)

GCGCGCGCGCGCGGAGCGGGAGCAAGAGGCGCGGGGAGCGCGAGGATCCACCGCGCGG
CGCGCGCGCATGGAGCGCGAGTGGAGCGCGCGCGCTCCGCGCGCGCGGACGACATGGAAAC
GGGCGCGACCGCGCGCGCGCTCCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCTGCTGCTGTGATCTG
CAGCTTGGTCCCGCGCGCGCGCTCAGCGCTCCTGTGTGTGTGGCAACCGCGGAGATGTGG
GCTAGTGGATGCGCGCGGAGTGAAGTGGAGTCCACATTTGGCGGAGTGGCTGAGGAGCA
TGCAGCTGTCTAGACTTCCAGTCTTCAAGGGTGTGCTGTATGGAAGAGATGTGAGGCA
GGAGGCCATCAACAGACCTACTGAAACAGACTGGAGCTGTGACAGCAACATTTGTCT
CTCGGGCTCGTGTCACTGATGGCGCTGGCTGTGACTGGGTGGCAAGAGCTGTACTG
GACGGAATCCGAGACCAACCGCATTTAGGTTGGCAACCTCAATGGGAGCGTCCCGTAAAGT
TCTCTTCCGAGGACCTGGACACGCAAGGGCCATTTGCCCTGGATCTGACATGGGTA
CATGTACTGGAGTACTTGGGGGGAAGCACCGCGGATCGAGCGGCGAGGATGGATGGCAG
TACCCGGAAGATCAATTGAGACTTCGACATTTACTGGCCCAATGGGCTGACCATCGACCT
GGAGGAACAGGAAGCTGTACTGGGCGGATGCAAGCTCAGCTTCACTCCACCGTGCACACT
GGAGCGCTCCTTCGGGAGAAAGGTGGTGGAGGCGAGCTCAGCTCACTCTTGTGCGTGCAC
ACTCTCTGGGAGCACTCTACTGGACAGACTGGCAGACCGGCTCCATCTCCAGCGCTGCA
CAAGTGGACAGGGGAGCAGAGGAAGGAGTCTTGTGTCTGTACTCAACCATGGACAT
CCAAGTGTGAGGCGAGGAGCGGACGCTCCTTCCACACACCATGGAGGAGGACCAAG
TGGCTGTTCACCTGTGCTGCTGTCCCGAGGGAGGCTTTTACTCTCTGCTGCTGCCC
CATGTGTGTGAGTGTGAGGACAAATGGCAAGAGCTGCAAGACAGGGGCTGAGGAAGTGTCT
GCTGCTGGCTCGGAGGACAGACTGAGGAGGATCTCTCTGACACCGCTGACTTCAACAG
CATAGTGTGCTGAGGTGGGCGACATCCGCGATGGCATTTGCCATTTGACATCGATCCCTGGA
GGGCTACGTGTACTGGACCGATGATGAGGTGGCGGCTATCCGAGGGCGTACTAGATGG
CTCAGGTGGCGGACACTTGTGAACACTGAGATCAATGACCGGATGGGATGCTGTGGA
CTGGGTGCGCGGCAACCTTACTTGGACAGATACAGGCACTGACAGAAATGAGGTGACTCG
CTCAACCGGCACTCCGAAAGATCTGTTATCTGAGGACCTGGACGAAACCGGAGCCAT
TGTGTGCAACCTGTGATGGGCTCATGTACTGGACAGACTGGGGGAGAACCCCAAAAT
CGAATGCGCCCAACCTAGATGGGAGAGATCGGCGATGCTGCTGTGAAACACTCCCTTGGGT
GCCCAATGGAATGCGCGCTGAGCTGACGAGGCGGCAAGCTGTATGGGGGATGCAAAAC
TGATAAAATCGAGGTGATCAACATAGACGGGACAAAGCGGAGAACCTGCTTGGAGGACAA
GCTCCACACATTTTGGGTTCACACTGCTGGGGGACTTCACTACTTGGACCGGATGGCA
GAGACGCGAGTATTGAAAGGGTCCCAAGGTCAAGGCGGACCGGAGTGTCTATCATTTGATCA
ACTCCCGGACTGATGGGACTCAAGCGCGTGAATGTGGCGCAAGTGTGCGAACTCAACCC
ATGTGGGCTGCGCCATTTGGCTGGAGCTGTGAGTGAATGAAGACTGCAATTAATCCCGGA
GGCTCTCGGTATTACACGAGCAGGACCACTGACAGGATCTCCCTGGAGACTCAACAC
AAGCATGTGGCTATCCCACTCAGGGGTGTCAAAGAGGCTCTGCACTGGAGCTTGTATGTG
TCCAAACATCATCTACTGGAATGATGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTG
AATGGGAGCTCAGTGGAGCAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTG
CATGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTG
GCGCGCGGCTGAGTGGGAGTTCGCGGAGGTGCTGTGTGTGTGAGAGACTGTGACAAACCGG
CTCTGCTGCTGAGTCTTCAAAAGGCTACATCTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTG
AGGATGTGTGCGGCGCTTACATGGATGGGACCAATGTATGACACTGTGTGACAGTGTGAGTGTG
GGCGGCGGCAACCGCTCACCATTGATTTAGTGCAGCACTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTG
ACCAACATGATGTGATCTTCAACATGCTGGGTGAGGAGGCGATGTGTGATGTGAGTGTGAGTGTG
GCTCCCTACCGGTTTGGCGTACTCAATATAGCGATTACATCTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTG
CTGCAATGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTG
CACCTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTG

Figure 18(a) Continued

GACTGCGTGACAGCAATGGCCAGTGTGGGCGAGTGTGCTCGCCATCCCCGGAGGCCAC
CGCTGTGGCTGTGCTTACACTACAGCTGGAGCCCAAGCAGCCGCACTGACAGCCCGCC
TCCACCTTCTTGTGCTGTTCAGCCAGAAATTGCCATCAGCCGGATGATCCCGGATGACAG
CTCAGCCCGGACCTTGTCTACCCCTTTCATGGGCTGAGGAACGTTCAAAGCCATCAACTAT
GACCCGCTGGACCAAGTTTATCTACTGGGTGGACGGGCGCAGAACATCAAGAGGGCCAAAG
GACGACGTCAGCCAGCCCTCCATGCTGACCTCTCCAGCCAAAGCCTGAGCCGACAGACA
GAGCCACACGACCTCAGACCTTGACATCTACAGCCGGACACTGTTCTGGACCTGTGAGGCG
ACCAACACTATCAATGTCCACCGGCTGGATGGGATGCCATGGGATGGTGTCTCGAGGG
GACCGTGACAAAGCCAGGGCCATTGCTGTCAATGCTGAGCGAGGTTACATGTACTTTTACC
AACATGACAGGACCTGCTGCCAAGATCGAGCGAGCCCTCCCTGGATGGCAGAGCGGGAG
GTCCTCTTCCACACAGGCTCATCCGCTCCGCTGGCCCTTGTGGTGGACAAATGCTCTGGGCC
AAGCTCTTCTGGGTGGATGCCAGCTTAAAGGGAATCGAAAGCTGTGACCTCTCTGGGGCC
AACCCTGACCTTGGAAAGATGCCAACTCGTACAGCCAGTAGGTCTGACAGTGTCTGGGCC
AGGACCTCTACTGATCGACCGCCAGCAGCAGATGATCGAGCGGCTGGAGAAAGCAACT
GGGACAAAGCGGACTAGGGTTTCAGGGCCGTGTCAACCACTGACAGGCACTCCATGCCGTG
GAGGAAGTCAGCCTGGAGGAGTTCTCAGCCCATCTTGTGCGCCGAGACAATGGCGGCTG
TCCCACTCTGTATCGCAAGGGTATGGAACACCGCGCTGCTCGTCCCTGTCCACCTG
GTGCTCTCGCAGAACTGCTGACTTGTGGTGGGCTCTTACCTGCTCCCTGTACAGTTT
GCATGTACCACTGGTGAGATCGACTGCACTCCCGGAGCTGGCGCTGTGACGGTCTCCCT
GAGTGTCTGACGAGTGTGAAGAAGCTGCCCAAGTGTCTCCGCTCTCAGTCTCCCT
TGCGCTCGAGGCCAGTGTGTGGACCTGCGGTTACGCTGCGACGGTGAGGGCGATGCCAG
GATCGCTCTGATGAAGTAACTCGCGATGCTGTCTGTCTGCCCAATCAGTTCCGCTGACCA
CGCGCCAGTGTCTCTCATCAAGCAACAGCTGACTCTTCCCGACTGTGCTGATGGGT
CTGATGAGCTCATGTGTGAATCAACAGCCACCTCTGATGACATCCAGCCCAAGCA
GTGCCATTTGGGGCCGTCAATGGTATCATCTCTCCCTCTTGTGATGGGCGGGGTCTACT
TTGTCTGCCAGCGTGTATGTGCGAGCGCTACACAGGGGCGAGTGGGCCCTTTCCCAAG
AGTATGTGTGGAGCCCTCATGTGGCTCTCAACTTATAGCCCCAGGTGGCTCAGCAG
ACGGTCTCTTCCAGGACCTCCGCTGACGAAAGTCCGCTGATGAGCTCCATGAGCCTGGTGG
GGGGCGCGGAGCGTGGCCCTCATGACCGGAATCAGCTCAGTGGGCGCTCAGTCCAGCA
GCTCGTCCAGCAAAAGGCCACACTATATCCGCGGATCCTGAACCCACCCCGCTCCCGG
CCACAGCCCTCTCTCTCAACAGCTGAGAGTGTATTTATCTTCAAGCATCCCGGCCACCG
CTAGACCATCAGGCGCTTACGTCATTCGAGGTATGGCACCCCAACCAACCGCTGACGCA
CAGATGTGTGTGACAGTGTACAGCATCAGTCTGCTGGAAGAGCAGCAAAATCACTACCTGG
ACTTGAATTCGAGCTCAGACCCCTACCCCGCCCGCCACCCCAACAGCGAGTACCTAT
CTGACAGGAGCAGCTGCCACCTCAGCAGCGACTGAGAGGAGTATCTGCCACTCTTCC
CGCCCCACCGCTCCCTTTCAGCGGACTGCTGCTGACCTCGGCGCTCCACCGGCTTAA
GCCTCTCTTAAATATTTTAAATATGAACAAAGGAAAAATATATTTATGATTTTAA
ATAAATAATATTTGGGTTTAAACAAGTGAGAAATGTGAGCGGTGAAGGGTGGGCGAGG
CTGGGAACTTTTCTAG

Figure 18(b) Continued

GCCCCCTCCACCTTCTTGTGTCAGCCAGAAATTGCCATCAGCCGGATGATCCCC
ATGACAGCTCCAGCCCGGACCTTGTCTACCCCTTCATGGGCTGAGGAAGCTCAAAGCCA
TCAACTATGACCCCTCGACCAAGTTTCACTCTACTGGGTGACGGGCGCAGAACATCAAGA
GGGCAAGGACGAGCGTACAGCCAGCCCTCCATGCTGACCTCTCCAGCCAAAGCCTGAGCC
CAGACAGACAGCCACAGCCTCAGCATTTGACATCTACAGCCGGACACTGTTCTGGAACCT
GTGAGGCCACCAACATCAATGTCCACCGGCTGGATGGGATGCCATGGGAGTGGTGT
TTGAGGGGACGCTGACAGCCAAAGGGCCATTGCTGTCAATGCTGAGCGAGGGTACATGT
ACTTTACCAACATGTCAGGACCATGCTGCCAAGATCGAGCGAGCCTCCCTGGATGGCAGAG
AGCGGGAGGTCTCTTCAACCAAGCCCTCAGCTCGTCCCGTGGCCCTTGTGGTGGACAAGT
CTCTGGGCAAGCTCTTCTGGGTGGATGCCAGCTTAAAGCGAATCGAAAGCTGTGACCTCT
CTGGGGCCAAACCGCTGACCTTGGAAAGATGCCAATCGTACAGCCAGTAGGTCTGACAG
TGCTGGGCGAGCCTCTACTGGATGACCGCCAGCAGCAGATGATCGAGCGGCTGGAGAG
AGACCACTGGGACAGCGGAGTAGGGTTTCAGGGCCGTGTCAACCACTGACAGGCACTCC
ATGCGCTGGAGGAAGTCAGCTGGAGGAGTTCTCAGCCCATCTTGTGCCCGAGACAATG
GCGGCTGCTCCCACTGTGTATCGCCAAAGGGTGTGGAACACCGCGCTGCTCGTGCCCTG
TCCACCTGTGTCTCTGCAAGACCTGTGACTTGTGGTGGAGCTCTTACTGCTGCTCCCTG
ATCAGTTTGTGATGACCACTGTGTGAGATGCACTGCACTCCCGGAGCTGGCGCTGTGAGC
GCTTCCCTGAGTGTGTCGACCGAGTGTGATGAAGAAGGCTGCCAGTGTGCTCCGCTCTCT
AGTTCCCTCGCTCGAGCCAGTGTGTGCACTGCGGTTACGCTGCGACGGTGGAGCGG
ACTGCCAGATCGCTCTGATGAAGCTAATCGCATGCTGTCTGTCTGCCAATCAGTTTCC
GGTGACACAGCGGCGAGTGTCTCTCATCAAGCAACAGTGTGACTCTTCCCGGACTGTC
CTGATGGGTCTGATGACTCATGTGTGAATCAACAGCCACCTCTGATGACATCCCAAG
CCACAGCAGATGCTTGGGCGGCTGATGGTATCATCTCTCTCTCTCTCTGTCATGGCGGG
GCTCTACTTGTGTCGCGAGTGTGATGTGCCAGCGCTACACAGGGGCGAGTGGGCGCTT
TCCCAACAGCGTCTCTTCCAGGACCTCCGTCGACGAGTCCGTCGATGAGCTCCATGAG
CTGCTGGGGGGGCGGCGAGCTGCCCTCTATGACCGGAATCAGCTCAGTGGGCGCTCT
ATCCAGCAGCTGTCGACGCAAAAGGCCACACTATATCCGCGGATCCTGAACCCACCCCG
GTCCCGGCCACAGACCCCTCTCTTCAACAGCTGGAGCTGTTTATTTCTTCAAGCATCC
GGCCACCGCTAGACCATACAGGCCCTACGTCATTCGAGGTATGGCACCCCAACCAACCC
GTGACGACAGATGTGTGTGACAGTGTACAGCATCAGTCTGCTGGAAGAGCAGCAATA
CTACCTGAGCTTGAATTCGAGCTCAGACCCCTACCCCGCCCGCCACCCCAACAGCA
GTACCTATCTGACAGGACAGCTGCCACCTCACCAGCACTGAGGAGGAGTACTGCCA
CCTCTTCCCGCCCGCCAGCTCCCGCTGACGAGCTGCTCTGTA

【 18 (b) 】

Figure 18(b)

ATGGAAACGGCGCGACCCCGGCCCCCTCCGCGCGCGCGCGCGCTGTGCTGTGCTG
CTGTACTGACGCTTGGTCCCGCGCGCGCTCAGCGCTCTGTGTTTGGCCAAACCGCGG
GATGTGCGGCTAGTGGATGCGCGCGGAGTGAACTGAGTCCACCATTTGGCCAGTGGC
CTGGAGGATGACGCTGTGTAGACTTCCAGTTTCCCAAGGGTGTGTGTACTGGACAGAT
GTGAGCGAGGAGGCGCATCAACAGACCTTACCTGAAACAGACTGGAGCTGTGACAGCA
ATTGTCTCTCGGCGCTGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CTGTACTGGACGGACTCCGAGACCAACCGCATTTGAGGTTTGGCAACTCTCAATGGGACCTCC
CGTAAGGTTCTCTTCTGCGAGGACCTTGGACAGCCAAAGGGGATTTGCCCTGGATCTCCGCA
ATCGACCTGGAGGAAACAGAACTGTACTGGGCGGATGCGAAGCTCAGCTTCTACCCAGCT
GCCAATCTGACGCGCTCTTCCGCGAGAAAGTGGTGGAGGCGAGCTCCTACTCACCTTTT
GCTCTGACATCTCTTGGGACACACTCTACTGGACAGACTGGGAGCCCGCTCCATCCAC
GCTTGCAACAAAGTGGACAGGGGAGCAGAGGAGGAGATCCTTAGTGCTCTGTACTCAGCC
ATGGAACATCAAGTGTGAGCGAGGAGCGGCGCTCCCTTCCACACACCATGCGAGGAG
GACAAACGTTGGTGTCTCCACCTGTGCTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GCTGCGCCCATCTGTGTGAGTTGCGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAG
GAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TTCACAGACATAGTGTGCTGAGTGGGCGACATCCGCGATGCCATTGCCATTGACTGACAT
CCCTTGGAGGCGTACTGTACTGGACCGATGATGAGGTGCGGCGTATCCGCGAGGCGTATC
CTAGATGCTCAGGTGCGCAGACACTTGTGAACACTGAGATCAATGACCCGATGGCATCT
GCTGTGAGTGTGGTCCCGGAACTCTACTGGACAGATCAGGCACTGACAGAAATTTGAG
GTGACTCGCTCAACGCGCACTTCCGAAAGATCTGTGATCTGAGGACCTGGACGAAACCG
CGAGCCATTTGTGTGACCTCTGTAGTGGGCTCATGTACTGGACAGACTGGGGGAGAAC
GCCAAATCTGAAATGCGCAACTCTAGATGGGAGAGTGGGATGTCTGGTGAAACACTTCC
TTTGGGTGGCCCAATGAGTGGGCTTGGACCTCGAGGAGGCGAAGCTGTACTGGGGGAT
GCCAAATCTGATAAAATCGAGGTGATCAACATAGACGCGGACCAAGCGGAGGCTGCTT
GAGGACAAGCTCCACACATTTTGGGTTTCACTGCTGGGAGGCTTCTACTGCTGAGC
GATGGACAGAGCGCAGTATTGAAAGGTTCCAAAGGTCAGGAGCGAGCTGGGATGTTCATC
ATTGATCAACTCCCGACCTGATGGGACTCAAAGGCTGGAATGTGGCCAGAGTTTGTGCGA
ACCAACCCATGTGCGGATGGAAATGGAGGGTGGAGCGACTCTGTGCTTCTTCCACCAAGT
GCCACAGGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
ATCCCGGAGGCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CTTGAATTCGAGCTCAGACCCCTACCCCGCCCGCCACCCCAACAGCGAGTACCTAT
CTGACAGGAGCAGCTGCCACCTCAGCAGCGACTGAGAGGAGTATCTGCCACTCTTCC
CGCCCCACCGCTCCCTTTCAGCGGACTGCTGCTGACCTCGGCGCTCCACCGGCTTAA
GCCTCTCTTAAATATTTTAAATATGAACAAAGGAAAAATATATTTATGATTTTAA
ATAAATAATATTTGGGTTTAAACAAGTGAGAAATGTGAGCGGTGAAGGGTGGGCGAGG
CTGGGAACTTTTCTAG

【 18 (c) 】

Figure 18(c)

1	METAPTRAPP	PPPPPLLLLV	LYCSLVFAAA	SPLLLFAANRR	DVRLVDAGGV
51	KLESTIVASG	LEDAAAVDFQ	FSKGAVYVTD	VSEBAIKQTY	LNQGTAAQON
101	IVTISGLVSP	GLACDWNVKK	LYWTDSETNR	IEVANLNGTS	RKVLFWQDLD
151	OPRAIALDPA	HGYMYWTDWG	EAPRIERAGM	DGSTRKIIIVD	SDIYWPNGLT
201	IDLEEQKLYW	ADAKLSFIHR	ANLDGSRFQK	VVEGSLTHFP	ALTLSDGDTLY
251	WTDWQTRSIH	ACNKTWGEQR	KEILSALYSP	MDIQVLQSER	QPPFHTPCBE
301	DNGGCSHLCL	LSPREFFYSC	ACPTGVQLQD	NGKTCCKTGA	EVLLLARRTD
351	LRRIISLDTPD	FTDIVLQVGD	IRHAIAIDYD	PLEGYVYVTD	DEVRAIRRAY
401	LDGSGAQTLV	NTEINDPDGI	AVDWARNLYR	WTDGTDRIE	VTRLNGTSRK
451	ILVSEDLDEP	RAIVLHPVMG	LMYWDWGEN	PKIECANLDG	RDRHVLVNTS
501	LGWPNGLALD	LQBGKLYWGD	AKTDKIEVIN	IDGTRKRTLL	BDKLPHPFGF
551	TLLGDFIYWT	DWQRRISEV	HKVKASRDVI	IDQLPDLMLG	KAVNVAKVVG
601	TNPCADNGG	CSHLCPFTPR	ATKCGCPGL	ELLSDMKTCI	IPEALVFTS
651	RATIHRIISLE	TNNNDVAIPL	TGVKEASALD	FDVSNNNHIY	TDVSLKTIISR
701	AFMNGSSVEH	VIEFGLDYPE	GMAVDWMGKN	LYWADTGTNR	IEVARLDGGF
751	RQVLVVRDL	NPRSLALDPT	KGYIYWTBWG	GKPRIVRAFM	DGTNMTLVLD
801	KVGRANDLTI	DYADQRLYWT	DLDTNMIESS	NMLGQERMIY	DDTLPPYFGL
851	TOYSDYIYWT	DWNLSHIERA	DKTSGRNRTL	IQGHLDVMD	ILVPHSSRDQ
901	GLNDCVHSNG	QCGQLCLAI	GGHRCGCASH	YTLDPSSRNC	SPPSFTLLFS
951	QKPAISRMI	DDQLSPDLVL	PLHGLRNKVA	INYPDLKPI	YVWDGRONIK
1001	RAKDDGTQPS	MLTSPSQSL	PDQPHDL	DIYSRTLFW	CEATNTINHV
1051	LRDGDAMGV	LRGDRDKPRA	IAVNAERGMY	YFTNMQDHAA	KIERASLDGT
1101	EREVLFTTGL	TRPVALVVDN	ALGKLFVWDA	DLKRIESCDD	GANRLTLTD
1151	ANIVQPVGLT	VLGRHLVWID	RQQMIERVE	KTTGDKRTRV	QGRVTHLTGI
1201	HAVEEVSLEE	FSAHPCARDN	GGCSHICIAK	GGGTFRCSCP	VHLVLLQNL
1251	TCGEPTTCS	DQFACTTGEI	DCIPGAWRCD	GFPECADQSD	EEGCPVCSAS
1301	QFPCARGQCV	DLRLRCDGEA	DCQDRSDEAN	CDAVCLPNQF	RCTSGCGVLT
1351	KQCCDSFPDC	ADGSBELMCE	INKPPSDDIP	AHSSAIFGPI	GIILSLFVWG
1401	GVYFVQQRVM	CQRYTGASGP	FPHEVVGAP	HYPLNFIAPG	GSQHGPPPGI
1451	PCSKSVMSM	SLVGGRRSVP	LYDRNHVTGA	SSSSSSSTKA	LTYPPLNPF
1501	PSPATDPSLY	NVDVFYSSGI	PATARPYPY	VRGMARPFT	PCSTDVCDSD
1551	YSISRWKSK	YYDLNLSDD	PYPPTPHS	QYLSAEDSCP	PSPGTERSYC
1601	HLFPFPPSPC	TDSS			

【 18 (d) 】

Figure 18(d)

```

1  METAPTRAPPPPPPLLLLLVYCSL.VPAAASPLLLFANRRDVRLVDAGG 49
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1  MEAAPPPPPWPLLLLLLLLLLALGCGPAPAAASPLLLFANRRDVRLVDAGG 50
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
50 VKLESTIVASGLEDAAAVDFQFSKGAVYWTDVSEEAIKQTYLNQTGAAG 99
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
51 VKLESTIVVSGLEDAAAVDFQFSKGAVYWTDVSEEAIKQTYLNQTGAAG 100
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
100 NIVISGLVSPDGLACDWGKKLYWTDSETNRIEVANLNGTSRKVLFWQDL 149
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
101 NVVISGLVSPDGLACDWGKKLYWTDSETNRIEVANLNGTSRKVLFWQDL 150
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
150 DQFRAIALDPAHGYMYWTDWGEAPRIERAGMDGSTRKIIIVSDIYWPNG 199
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
151 DQFRAIALDPAHGYMYWTDWGEAPRIERAGMDGSTRKIIIVSDIYWPNG 200
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
200 TIDLEEQLYADAKLSFIHRANLDSFRQKVVEGSLTHPFALTSGDTL 249
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
201 TIDLEEQLYADAKLSFIHRANLDSFRQKVVEGSLTHPFALTSGDTL 250
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
250 YWTDWQTRSIHACNKWTGEORKEILSALYSPMDIQVLSQERQPPFHTPC 299
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
251 YWTDWQTRSIHACNKRTGGKRKEILSALYSPMDIQVLSQERQPPFHTPC 300
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
300 EDNGGCSHLCLLSPREFFYSCACPTGVQLQDNGKCTKGAEVLLARRT 349
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
301 EDNGGCSHLCLLSPSEFFYTCACPTGVQLQDNGKCTKGAEVLLARRT 350
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
350 DLRRISLTDPTDFDIVLQVGDIRHAIAIDYDPLEGYVYWTDEVRARRA 399
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
351 DLRRISLTDPTDFDIVLQVDDIRHAIAIDYDPLEGYVYWTDEVRARRA 400
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
400 YLDGSGAQTIVNTEINDPDGIADWVARNLYWTDGTDRIEVTRLNGTSR 449
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
401 YLDGSGAQTIVNTEINDPDGIADWVARNLYWTDGTDRIEVTRLNGTSR 450
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
450 KILVSEDLDEPRAIVLHPVGMGLMYWTDWGENPKIECANLDGRDRHVLNT 499
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
451 KILVSEDLDEPRAIALHPVGMGLMYWTDWGENPKIECANLDGQERRVLNA 500
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
500 SLGWPNGLALDLQEGKLYWGDAKTDKIEVINIDGTRKRTLLEDKLPHIFG 549
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
501 SLGWPNGLALDLQEGKLYWGDAKTDKIEVINVDGTRKRTLLEDKLPHIFG 550
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
550 FTLLGDFIYWTWQRRSIERVHKVKASRDVIIDQLPDLMLGKAVNVAKV 599
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
551 FTLLGDFIYWTWQRRSIERVHKVKASRDVIIDQLPDLMLGKAVNVAKV 600

```

Figure 18(d) Continued

```

1200 IHAEEVSELEFSAHPCARDNGGCSHICIAKGDGTPRCSCPVLVLLQNL 1249
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1201 IHAEEVSELEFSAHPCARDNGGCSHICIAKGDGTPRCSCPVLVLLQNL 1250
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1250 LTCGEPPTCSPPDQFACTGIDCIPGAWRCDGFECAQDSDEEGCPVCSA 1299
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1251 LTCGEPPTCSPPDQFACATGIDCIPGAWRCDGFECAQDSDEEGCPVCSA 1300
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1300 SQFPCARGQCVDLRLRCDGEADCDRSDEADCAICLPNQFRCSGQCVL 1349
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1301 AQFPCARGQCVDLRLRCDGEADCDRSDEADCAICLPNQFRCSGQCVL 1350
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1350 IKQQCDSFPDCAIDGSELMCEITKPPSDDSPAHSSAIGPVIGIILSLFVM 1399
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1351 IKQQCDSFPDCAIDGSELMCEITKPPSDDSPAHSSAIGPVIGIILSLFVM 1400
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1400 GGVYFVQVRVMQRYTGASGPFPHYEVGGAPHVPLNFIAFGGSQHGPFTG 1449
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1401 GGVYFVQVRVMQRYTGASGPFPHYEVVSGTGHVPLNFIAFGGSQHGPFTG 1450
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1450 IPCSKVMSMSVSLMGGRGVPLYDRNHVTGASSSSSSSTKATLYPILNP 1499
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1451 IACGKSMSSVSLMGGRGVPLYDRNHVTGASSSSSSSTKATLYPILNP 1500
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1500 PPSPATDPSLYNVDFYSSGIPATAPYRYPYVIRGMAPPPTPCSTDVCD 1549
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1501 PPSPATDPSLYNMDFYSSNIPATVPRYPYVIRGMAPPPTPCSTDVCD 1550
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1550 DYSISRKWSKYYLDLNSDSDPYPPPTPHSQYLSAEDSCPPSPGTERSY 1599
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1551 DYSASRWKASKYYLDLNSDSDPYPPPTPHSQYLSAEDSCPPSPATERSY 1600
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1600 CHLFPPPPSPCTDSS 1614
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1601 FHLFPPPPSPCTDSS 1615

```

Figure 18(d) Continued

```

600 GTNPCADNGGCSHLCFPTPRATKCGCPIGLELLSDMKTCIIPBAFLVPT 649
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
601 GTNPCADNRGGCSHLCFPTPHATRCGCPIGLELLSDMKTCIIPBAFLVPT 650
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
650 SRATIHRISETNNNDVAIPLTGVKEASALDFVSNNNHIYWTDVSLKTIS 699
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
651 SRAAIHRISETNNNDVAIPLTGVKEASALDFVSNNNHIYWTDVSLKTIS 700
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
700 RAFMNGSSVEHVIEFGLDYPEGMAVDWMGKNLYWADTGTNRIEVARLDGQ 749
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
701 RAFMNGSSVEHVIEFGLDYPEGMAVDWMGKNLYWADTGTNRIEVARLDGQ 750
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
750 FRQVLVWRDLNDRSLALDPTKGYIYWTWEGGKPRIVRAFMDGTNCMTLV 799
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
751 FRQVLVWRDLNDRSLALDPTKGYIYWTWEGGKPRIVRAFMDGTNCMTLV 800
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
800 DKVGRANDLTIDYADQRLYWTDLDTNMISSNMLGQERMVIADLLPYPF 849
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
801 DKVGRANDLTIDYADQRLYWTDLDTNMISSNMLGQERVVIADLLPHPF 850
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
850 LTQYSDIYIYWDNLHSIERADKTSGRNRTLQGHLDVMDILVFHSSRQ 899
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
851 LTQYSDIYIYWDNLHSIERADKTSGRNRTLQGHLDVMDILVFHSSRQ 900
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
900 DGLNDCVHSNGQCGQLCLAIPEGHRGCGASHYTLDPSSRNCSPPTFLF 949
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
901 DGLNDCMHNNQCGQLCLAIPEGHRGCGASHYTLDPSSRNCSPPTFLF 950
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
950 SQKFAISRMIPDDQLSPDLVLEHLGNVKAINDYPLDKFIYWDGQRNI 999
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
951 SQKSAISRMIPDDQHSPLILPLHLGNVKAINDYPLDKFIYWDGQRNI 1000
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1000 KRAKDDGTQPSMLTSPSQSLSPDRQPHDLSIDIYSRTLFWTCEATNTINV 1049
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1001 KRAKDDGTQPFVLTSLSQGQNPDRQPHDLSIDIYSRTLFWTCEATNTINV 1050
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1050 HRLDGDAMGVVLRGDRDKPRAIVNAERGMYFTNMQDHAAKIERASLDG 1099
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1051 HRLSGEAMGVVLRGDRDKPRAIVNAERGMYFTNMQDRAAKIERASLDG 1100
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1100 TEREVLFTTGLIRPVALVVDNALGKLFVWDADLKRIESCDSGANRLTLE 1149
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1101 TEREVLFTTGLIRPVALVVDNLGKLFVWDADLKRIESCDSGANRLTLE 1150
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1150 DANIVQPVGLTVLGRHLYWIDRQQQMIERVEKTTGDKRTRVQGRVTHLTG 1199
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1151 DANIVQPLGLTILGKHLWIDRQQQMIERVEKTTGDKRTRIQGRVAHLTG 1200

```

【 18 (e) 】

Figure 18(e)

```

25 CPAPAAASPLLLFANRRDVRLVDAGGVKLESTIVVSGLEDAAAVDFQFSK 74
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
29 . . . . .AASPLLLFANRRDVRLVDAGGVKLESTIVVSGLEDAAAVDFQFSK 73
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
75 GAVYWTDVSEEAIKQTYLNQTGAQVQNVVISGLVSPDGLACDWGKKLYW 124
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
74 GAVYWTDVSEEAIKQTYLNQTGAQAQNVVISGLVSPDGLACDWGKKLYW 123
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
125 TSETNRIEVANLNGTSRKVLFWQDLQDQRAIALDPAHGYMYWTDWGETP 174
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
124 TSETNRIEVANLNGTSRKVLFWQDLQDQRAIALDPAHGYMYWTDWGEAP 173
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
175 RIERAGMDGSTRKIIIVSDIYWPNGLTIDLEEQLYADAKLSFIHRANL 224
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
174 RIERAGMDGSTRKIIIVSDIYWPNGLTIDLEEQLYADAKLSFIHRANL 223
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
225 DGSFRQKVVEGSLTHPFALTSGDTLYWTDWQTRSIHACNKRTGGKRKEI 274
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
224 DGSFRQKVVEGSLTHPFALTSGDTLYWTDWQTRSIHACNKWTGEORKEI 273
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
275 LSALYSPMDIQVLSQERQPPFHTRCEEDNGGCSHLCLLSPSEFFYTAC 324
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
274 LSALYSPMDIQVLSQERQPPFHTRCEEDNGGCSHLCLLSPREFFYTAC 323
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
325 TGVQLQDNGRTCKAGAEVLLARRTDLRRISLTDPTDFDIVLQVDDIRH 374
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
324 TGVQLQDNGRTCKAGAEVLLARRTDLRRISLTDPTDFDIVLQVDDIRH 373
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
375 AIAIDYDPLEGYVYWTDEVRAIRRAYLDGSGAQTIVNTEINDPDGIAVD 424
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
374 AIAIDYDPLEGYVYWTDEVRAIRRAYLDGSGAQTIVNTEINDPDGIAVD 423
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
425 WVARNLYWTDGTDRIEVTRLNGTSRKILVSEDLDEPRAIALHPVGMGLMY 474
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
424 WVARNLYWTDGTDRIEVTRLNGTSRKILVSEDLDEPRAIALHPVGMGLMY 473
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
475 WTDWGENPKIECANLDGQERRVLNASLGPWPNGLALDLQEGKLYWGDAKT 524
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
474 WTDWGENPKIECANLDGRDRHVLNVTSLGPWPNGLALDLQEGKLYWGDAKT 523
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
525 DKIEVINVDGTRKRTLLEDKLPHIFGFTLLGDFIYWTWQRRSIERVHKV 574
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
524 DKIEVINVDGTRKRTLLEDKLPHIFGFTLLGDFIYWTWQRRSIERVHKV 573
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
575 KASRDVIIDQLPDLMLGKAVNVAKVVGTPNPCADNRGGCSHLCFPTPHAT 624
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
574 KASRDVIIDQLPDLMLGKAVNVAKVVGTPNPCADNRGGCSHLCFPTPRATK 623

```

Figure 18(e) Continued

```

625 CGCPFGLLELLSDMKTCIVPEAFVLTSTRAAIHRISLETNNNDVAIPLTGV 674
624 CGCPFGLLELLSDMKTCIIPVAFVLTSTRATIHRISETNNNDVAIPLTGV 673
675 KEASALDFDVSNNHIYWDVSLKTIISRAFMNGSSVEHVVEFLDYPEGMA 724
674 KEASALDFDVSNNHIYWDVSLKTIISRAFMNGSSVEHVIEFGLDYPEGMA 723
725 VDWMGKNLYWADTGTNRIEVARLDGQFRQVLVWRDLNPRSLALDPTKGY 774
724 VDWMGKNLYWADTGTNRIEVARLDGQFRQVLVWRDLNPRSLALDPTKGY 773
775 IYWTEWGGKPRIVRAFMDGTNCMTLVKVGANDLTIDYADQRLYWTDL 824
774 IYWTEWGGKPRIVRAFMDGTNCMTLVKVGANDLTIDYADQRLYWTDL 823
825 TNMIESSNMLGQERVVIADLPHPFGLTQYSDIYWTWNLSIERADKT 874
824 TNMIESSNMLGQERMVIADLPHYFGLTQYSDIYWTWNLSIERADKT 873
875 SGRNRTLQGHLDVMDILVFHSSRDGLNDCMHNNQCQGLCLAIPEGH 924
874 SGRNRTLQGHLDVMDILVFHSSRDGLNDCVHSNQCQGLCLAIPEGH 923
925 RCGCASHYTLDPSSRNCSPPTTFLFSQKSAISRMIPDDOHSPLILPLH 974
924 RCGCASHYTLDPSSRNCSPPTTFLFSQKFAISRMIPDDQLSPDLVPLH 973
975 GLRNVKAIDYDPLDKFIYWDGQRNKRKADGTQPFVLTSLSQGQNPDR 1024
974 GLRNVKAINYDPLDKFIYWDGQRNKRKADGTQPSMLTSPSQSLSPDR 1023
1025 QPHDLSIDIYSRTLFWTCEATNTINVHRLSGEAMGVVLRGDRDKPRAIV 1074
1024 QPHDLSIDIYSRTLFWTCEATNTINVHRLDGDAMGVVLRGDRDKPRAIV 1073
1075 NAERGILYFTNMODRAAKIERAALDGTREVLFTTGLIRPVALLVDNTLG 1124
1074 NAERGIMYFTNMODHAAKIERASLDGTREVLFTTGLIRPVALLVDNALG 1123
1125 KLPWVDADLKRIESCDLSGANRLTLEDANIVQPLGLTILGHLYWIDRQ 1174
1124 KLPWVDADLKRIESCDLSGANRLTLEDANIVQPVGLTVLGRHLYWIDRQ 1173
1175 QMIERVEKTTGDKRTRIQGRVAHLTGIHAVEEVSLEEFSAHPCARDNGGC 1224
1174 QMIERVEKTTGDKRTRVQGRVTHLTGIHAVEEVSLEEFSAHPCARDNGGC 1223

```

Figure 18(e) Continued

```

1225 SHICIAKGDGTPRCSCPVLVLLQNLITCGEPPTCSPDQFACATGEIDCI 1274
1224 SHICIAKGDGTPRCSCPVLVLLQNLITCGEPPTCSPDQFACTTGEIDCI 1273
1275 PGAWRCDFPECDQSDDEEGCPVCSAAQFPFCARGQCVDLRLRCDGEADCO 1324
1274 PGAWRCDFPECDQSDDEEGCPVCSAQFPFCARGQCVDLRLRCDGEADCO 1323
1325 DRSEADCDACILPNQFRASCAGQCVLIKQDCSFPDCIDGSDLMCEITK 1374
1324 DRSEANCDACILPNQFRCTSGQCVLIKQDCSFPDCADGSDLMCEINK 1373
1375 PPSDDSPAHSAAIGPVIGIILSLFVMGGVYFVCQVVCQRYAGANGPPPH 1424
1374 PPSDDIPAHSAAIGPVIGIILSLFVMGGVYFVCQVVCQRYTASGPPPH 1423
1425 EYVSGTPHVPLNFIAPGGSQHGPFTGIACGKSMSSSVSLMGGRGVPLYD 1474
1424 EYVGGAPHVPLNFIAPGGSQHGPFTGIPCSKSMSSSVSLMGGRGVPLYD 1473
1475 RNHVTGASSSSSSSTKATLYPILNPPSPATDPSLYNMDMFYSSNIPAT 1524
1474 RNHVTGASSSSSSSTKATLYPILNPPSPATDPSLYNVDFYSSGIPAT 1523
1525 VRPYRPIYIRGMAPPTTPCSTDVCDSDYSASRWKASKYYLDLNSDSDPYP 1574
1524 ARPYRPIYIRGMAPPTTPCSTDVCDSDYSISRWKASKYYLDLNSDSDPYP 1573
1575 PPPTPHSQYLSAEDSCPPSPATERSYFHLFPFPPSPCTDSS 1615
1574 PPPTPHSQYLSAEDSCPPSPGTERSCHLFPFPPSPCTDSS 1614

```

【図 19】

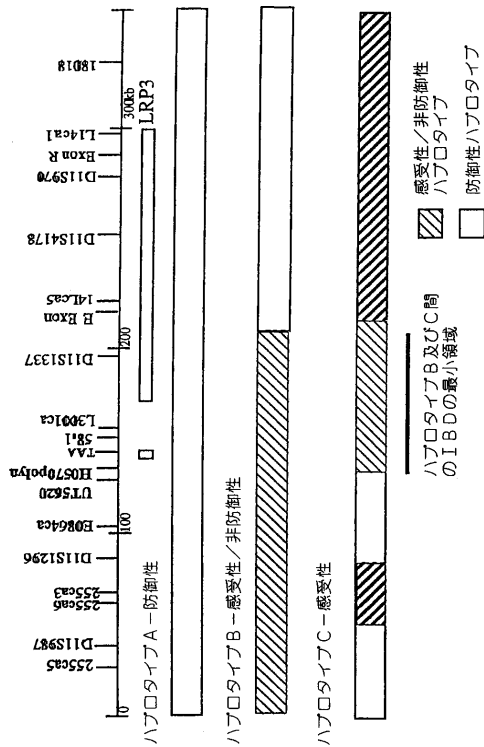


Figure 19

【図 20】

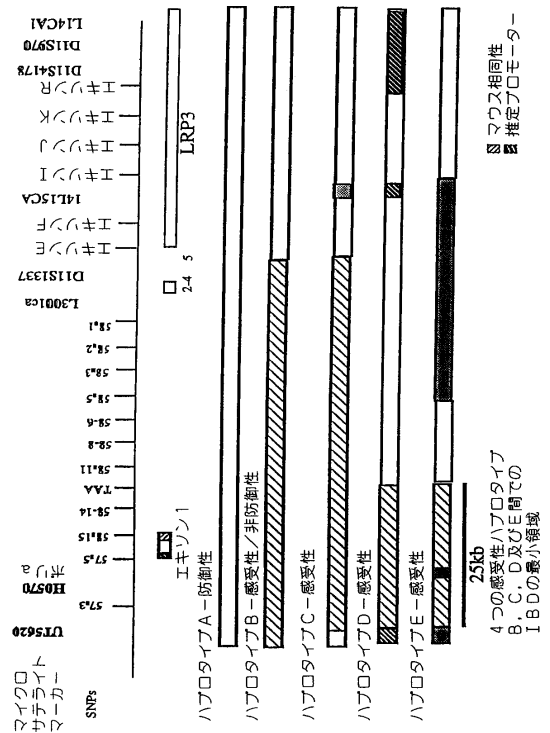


Figure 20

フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 渡邊 陽一

(74)代理人

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 トッド, ジョン アンドリュー

イギリス国, オクソン オーエックス 5 3 エージェイ, タックレー, ローシャム ロード 6 4

(72)発明者 ヘス, ジョン ウィルフレッド

アメリカ合衆国, ペンシルバニア 1 9 4 4 6, ランズデール, コンスティテューション ロード 5 6 6

(72)発明者 カスキー, チャールズ トーマス

アメリカ合衆国, テキサス 6 6 0 0 5, ヒューストン, ベルモント 6 4 0 2

(72)発明者 コックス, ロジャー デビッド

イギリス国, オクソン オーエックス 1 6 0 ディーダブリュ, バンバリー, パーク ロード 7, ピース コテージズ

(72)発明者 ジャーホールド, デビッド

アメリカ合衆国, ペンシルバニア 1 9 4 4 6, ランズデール, トランキリティ レーン 7 3 0

(72)発明者 ハモンド, ホーリー

アメリカ合衆国, ペンシルバニア 1 8 9 6 9, テルフォード, メルピンス ロード 6 2 1

(72)発明者 ヘイ, パトリシア

アメリカ合衆国, ペンシルバニア 1 9 4 4 6, ランズデール, ブルームフィールド サークル 1 1 3 3

(72)発明者 川口 義彦

大阪府吹田市山田西 3 3 3 B 2 0 6

(72)発明者 メリマン, トニー レイモンド

イギリス国, オックスフォード オーエックス 3 0 アールダブリュ, マーストン, クロムウェル クローズ 1 6 エー

(72)発明者 メツカー, マイケル リー

アメリカ合衆国, ペンシルバニア 1 9 4 4 6, ランズデール, エンキャンブメント ロード 7 4 0 0

(72)発明者 中川 雄介

イギリス国, オックスフォード オーエックス 3 7 ピーキュー, ヘッディングトン, ラティマー ロード, ラティマー グランジ 1 7

(72)発明者 フィリップス, マイケル シーン

アメリカ合衆国, ペンシルバニア 1 9 4 4 6, ランズデール, ポップラー コート 6 0 8

(72)発明者 トゥエルズ, レベッカ クリスティーナ ジョーン

イギリス国, オクソン オーエックス 9 3 エイチユー, テイム, パーク ストリート 7 5

審査官 福間 信子

(56)参考文献 国際公開第 9 5 / 0 2 7 0 6 1 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00 - 90

CA/BIOSIS/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed