

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4232423号  
(P4232423)

(45) 発行日 平成21年3月4日(2009.3.4)

(24) 登録日 平成20年12月19日(2008.12.19)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00	A
C 07 K 16/40	(2006.01)	C 07 K 16/40	
C 12 N 1/15	(2006.01)	C 12 N 1/15	
C 12 N 1/19	(2006.01)	C 12 N 1/19	

請求項の数 15 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-283631 (P2002-283631)
(22) 出願日	平成14年9月27日 (2002.9.27)
(65) 公開番号	特開2003-199588 (P2003-199588A)
(43) 公開日	平成15年7月15日 (2003.7.15)
審査請求日	平成17年9月22日 (2005.9.22)
(31) 優先権主張番号	特願2001-301800 (P2001-301800)
(32) 優先日	平成13年9月28日 (2001.9.28)
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)

(73) 特許権者	307010166 第一三共株式会社 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号
(73) 特許権者	596175810 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所 千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7
(74) 代理人	100088904 弁理士 庄司 隆
(72) 発明者	小原 收 千葉県木更津市矢那1532番3号 財団法人かずさディー・エヌ ・エー研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規ユビキチン特異プロテアーゼ

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記(1)乃至(3)からなる群から選択されるポリペプチド:

- (1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド;、  
 (2) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含有し、かつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド;  
 および  
 (3) 前記(1)または(2)のポリペプチドにおいてアミノ酸配列中1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、または挿入を有し、かつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド。

10

## 【請求項 2】

請求項1に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

## 【請求項 3】

配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

## 【請求項 4】

下記(1)乃至(3)からなる群から選択される一つのポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下ハイブリダイゼーションし、かつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド:

(1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド;

20

(2) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含有し、かつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；  
および

(3) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド。

**【請求項5】**

請求項2乃至4のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

**【請求項6】**

組換えベクターが発現組換えベクターである請求項5に記載の組換えベクター。

**【請求項7】**

請求項5または請求項6に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体。 10

**【請求項8】**

請求項1に記載のポリペプチドの製造方法であって、請求項6に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体を培養する工程、または請求項5若しくは請求項6に記載の組換えベクターを利用した無細胞蛋白質合成手段を含む方法。

**【請求項9】**

請求項1に記載のポリペプチドを免疫学的に認識する抗体。

**【請求項10】**

下記の工程(i)または(ii)を含んでなる、請求項1に記載のポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害するまたは増強する化合物の同定方法。

(i) 請求項1記載のポリペプチドとその基質を共遺伝子発現させる系に、被検化合物を加える工程；および、脱ユビキチン化活性を測定する工程。 20

(ii) 請求項2乃至4のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクターを導入されてなる形質転換体と被検化合物とを接触させる工程；および、脱ユビキチン化活性を測定する工程。

**【請求項11】**

請求項1に記載のポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害するまたは増強する化合物の同定方法であって、被検化合物と該ポリペプチドとの相互作用を可能にする条件下で、該ポリペプチドと被検化合物とを接触させ、次いで、被検化合物と該ポリペプチドとの相互作用により生じるシグナルの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物が該ポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害または促進するかどうかを決定することを特徴とする方法。 30

**【請求項12】**

下記の工程(i)または(ii)を含んでなる、請求項11に記載の方法。

(i) 請求項1記載のポリペプチドとその基質を共遺伝子発現させる系に、被検化合物を加える工程；および、脱ユビキチン化活性を測定する工程。

(ii) 請求項2乃至4のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクターを導入されてなる形質転換体と被検化合物とを接触させる工程；および、脱ユビキチン化活性を測定する工程。

**【請求項13】**

請求項1に記載のポリペプチド、または請求項2乃至4のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを定量的あるいは定性的に測定する方法であって、下記工程(1)または(2)を含む方法。 40

(1) 該ポリペプチドとその基質とを用い、該ポリペプチドの脱ユビキチン化作用を、基質からのユビキチンの解離を検出することにより測定する工程。

(2) 該ポリヌクレオチドとその基質とを共発現させた遺伝子共発現系を用い、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの脱ユビキチン化作用を、該ポリペプチドによる基質からのユビキチンの解離を検出することにより測定する工程。

**【請求項14】**

請求項1に記載のポリペプチド、または請求項2乃至4のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを定量的あるいは定性的に測定する方法であって、下記いずれかの方法により該

ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドを測定することを含む方法：ラジオイムノアッセイ、競争結合アッセイ、ウェスタンプロット分析、およびELISAアッセイ、並びにPCR、RT-PCR、RNアーゼ保護、ノーザンプロッティング、およびハイブリダイゼーション法。

【請求項 15】

請求項1に記載のポリペプチド、請求項2乃至4のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項5または請求項6に記載の組換えベクター、請求項7に記載の形質転換体、および請求項9に記載の抗体のうちの少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

【産業上の利用分野】

本発明は、脱ユビキチン化活性を有する新規なプロテアーゼ（以下、USPと略称することもある）およびそれをコードする遺伝子に関するものである。さらに詳しくは、新規USPのアミノ酸配列の全部または一部を有するポリペプチドまたはペプチド、該ポリペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖であるポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該ポリペプチドまたは該ペプチドに対する抗体、該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物、該ポリペプチドの拮抗剤、これらの1種以上を含む医薬組成物、該ポリペプチドまたは該ペプチドの製造方法、該ポリペプチドまたは該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物の同定方法、該ポリペプチドまたは該ペプチドまたは該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドの測定方法、並びに該同定方法または該測定方法に使用する試薬キットに関する。

20

【0002】

【従来の技術】

ユビキチン（以下Ubと略称することもある）は76個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖であり、そのアミノ酸配列は酵母からヒトまで高度に保存されている。Ubの生体内での役割は様々であり、発癌（非特許文献1～4）、細胞周期（非特許文献5～7）、ウイルス感染（非特許文献8）、および神経変性疾患（非特許文献9～11）等の多くの生体反応に関与している。

30

【0003】

Ubの最も重要な機能は、26Sプロテアソームでの蛋白分解におけるシグナルとしての働きである。ユビキチン活性化酵素（E1）、ユビキチン結合酵素（E2）およびユビキチンリガーゼ（E3）といった一連のユビキチン化酵素によって、Ubは標的蛋白質にイソペプチド結合し、ポリユビキチン鎖を形成する。そのポリユビキチン鎖が分解シグナルとしてプロテアソームに認識されることにより、ユビキチン化された蛋白質は分解される。

【0004】

一方、ユビキチン化された蛋白質からUbが解離する脱ユビキチン化反応を触媒する脱ユビキチン化酵素（DUB）の存在が報告されている。DUBは、その構造から大きく2つのファミリーに分類されている（非特許文献12～14）。1つはユビキチンC末端ヒドロラーゼ（Ubiquitin C-terminal hydrolase）（UCH）と呼ばれるもので、分子量20kDaから30kDaのものが多く、異種間で一次構造が保存されている。UCHは主にUbのC末端に低分子が結合している場合にUbを解離する。もう一つはユビキチン特異プロテアーゼ（Ubiquitin specific protease）（USP、UBP、あるいはUCH\_タイプII）と呼ばれるもので、その分子量は40kDaから150kDaと様々であり、異種間でのアミノ酸配列の共通性が少ない。USPはその活性ドメインとしてシステイン（Cys）ドメイン（Cys\_box）、ヒスチジン（His）ドメイン（His\_box）およびアスパラギン酸（Asp）ドメインを持ち、Cysドメイン内に存在するシステイン残基を活性部位とするシステインプロテアーゼである。また、USPのN末端側配列が基質認識に関与すると

40

50

いう報告（非特許文献 15）がある。U S P は U b の C 末端に高分子が結合している場合に U b を解離する。

【0005】

U S P の生体内での機能は大きく 3 つに分けることができる。その 1 は、リボゾーム蛋白融合ユビキチンやペプチド結合型ポリユビキチン鎖といった前駆体 U b から U b を生成する機能である。これには U S P の 1 つである U b - C E P 5 2 等が関与している。その 2 は、イソペプチド結合をしたユビキチン化蛋白質から U b を解離する機能であり、蛋白質のユビキチン化を抑制することにより蛋白質の分解を抑制する。その 3 は、プロテアーゼにより分解された後のイソペプチド結合型ポリユビキチン鎖を解体する機能であり、例えば、U S P 5 として知られているイソペプチダーゼ T がこの機能を有している（非特許文献 16）。 10

【0006】

U b および U S P 等から構成されるユビキチンシステムの機能の 1 つは、生体内で生じた異常蛋白質の除去、および転写因子やシグナル伝達因子等の分解による量的調節等であり（非特許文献 17）、U S P の機能障害はこのシステムの異常をきたす。U S P の異常と発癌や神経変性疾患との関連が示唆されている（非特許文献 17～19）。例えば、アルツハイマー病やパーキンソン病で観察される蛋白質凝集体の多くが抗ユビキチン抗体に反応することが報告されている（非特許文献 17）。また、U S P は染色体構造の維持にも関与しており、ユビキチン化されたヒストンの脱ユビキチン化が染色体凝集に重要であることが知られているし（非特許文献 20）、U S P ファミリーの 1 つである U S P 1 6 が H 2 A を脱ユビキチン化することが報告されている（非特許文献 21）。さらに、ユビキチン経路が筋萎縮症と関連していることについても報告されている（非特許文献 22）。 20

【0007】

【非特許文献 1】

「フェブス レターズ (F E B S L e t t e r s )」, 1997 年, 第 420 卷, p. 25 -

【非特許文献 2】

「オントコジーン (Oncogene)」, 1993 年, 第 8 卷, p. 2307 -

【非特許文献 3】

「オントコジーン (Oncogene)」, 1995 年, 第 10 卷, p. 2179 -

30

【非特許文献 4】

「ネイチャー (Nature)」, 1993 年, 第 366 卷, p. 313 -

【非特許文献 5】

「アニュアル レビュー オブ バイオケミストリー (Annual Review of Biochemistry)」, 1998 年, 第 67 卷, p. 425 -

【非特許文献 6】

「プロシーディング オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ (Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」, 1996 年, 第 93 卷, p. 3275 -

40

【非特許文献 7】

「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」, 1997 年, 第 272 卷, p. 51 -

【非特許文献 8】

「エンボ ジャーナル (EMBO Journal)」, 1997 年, 第 16 卷, p. 1519 -

【非特許文献 9】

「トレンドス イン ニューロサイエンシズ (Trends In Neuroscience)」, 1998 年, 第 21 卷, p. 516 -

50

## 【非特許文献 10】

「ネイチャー (Nature)」, 1998年, 第395巻, p. 451 - 452

## 【非特許文献 11】

「ネイチャー ジェネティクス (Nature Genetics)」, 1998年, 第23巻, p. 47 -

## 【非特許文献 12】

「バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチコミュニケーションズ (Biochemical And Biophysical Research Communications)」, 1999年, 第266巻, p. 633 -

## 【非特許文献 13】

「ファセブ ジャーナル (FASEB Journal)」, 1997年, 第11巻, p. 1245 -

10

## 【非特許文献 14】

「クリティカル レビューズ イン バイオケミストリー アンド モレキュラー バイオロジー (Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology)」, 1998年, 第33巻, p. 337 -

## 【非特許文献 15】

「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal Of Biological Chemistry)」, 2001年, 第276巻, p. 20357 - 20363

20

## 【非特許文献 16】

「バイオケミストリー (Biochemistry)」, 1995年, 第34巻, p. 14535 -

## 【非特許文献 17】

鈴木俊顯, 志村秀樹, 服部信孝, 「ユビキチンと神経変性疾患」, 「実験医学」, 2000年, 第18巻, p. 1478 - 1482

## 【非特許文献 18】

鈴木俊顯, 「脱ユビキチン化酵素の多彩な作用」, 「実験医学」, 2001年, 第19巻, p. 193 -

## 【非特許文献 19】

30

阿南正, 中尾光善, 「ユビキチン病の分子機構」, 「蛋白質・核酸・酵素」, 1999年, 第44巻, p. 776 -

## 【非特許文献 20】

「バイオエッセイズ (BioEssays)」, 1992年, 第14巻, p. 9 -

## 【非特許文献 21】

「プロシーディング オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ (Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America)」, 1999年, 第96巻, p. 2828 -

40

## 【非特許文献 22】

「カレント オピニオン イン クリニカル ニュートリション アンド メタボリック ケア (Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic care)」, 2001年, 第4巻, p. 183 - 190

## 【非特許文献 23】

「かずさDNA研究所DNA配列解析分析情報データベース, ヒュージ (HUGE)」, インターネット<http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage>

## 【0008】

50

**【発明が解決しようとする課題】**

生体内には多くのU S Pが存在しており、それぞれ異なる基質特異性や生理機能を有していると考えられる。従って、U S Pの異常に起因する疾患、例えば発癌や神経変性疾患等の解明、並びにそれらの防止、治療および診断を可能とする上では、数多くの新たなU S Pを発見し利用することが必要である。

**【0009】**

本発明が解決しようとする課題の一つは、新規なU S Pを見いだし、生体内における該U S Pの制御を可能にすることである。より具体的には、新規な特性をもつU S Pを提供することであり、それに伴い有用性がある新規U S P由来のポリペプチドまたはペプチド、これらをコードするポリヌクレオチド、および該ポリペプチドまたは該ペプチドに対する抗体を提供することである。さらに、新規U S Pの発現および/またはその生理活性の阻害剤、拮抗剤または促進剤等の同定を行うことであり、同定された化合物を提供することである。また、上記ポリペプチドまたは上記ペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記抗体、および上記化合物を利用した医薬組成物、並びに上記ポリペプチドまたは上記ペプチドまたは上記ポリヌクレオチドの測定方法を提供することである。さらにまた、上記ポリヌクレオチドを用いた遺伝子工学手法による新規U S P由来のポリペプチドまたはペプチドの製造法を提供することである。

10

**【0010】**

**【課題を解決するための手段】**

上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、新規特性を有するU S P遺伝子およびその蛋白質を得ることに成功した。より具体的には、かずさDNA研究所ヒト長鎖cDNA解析情報データベースから、新規プロテアーゼ候補遺伝子としてcDNAクローニングを抽出し、大腸菌を用いた遺伝子発現系で発現させて該遺伝子がコードする蛋白質を得た。さらに、得られた蛋白質が脱ユビキチン化活性を示すこと、またN末端側第1番目から第521番目の連続する521個のアミノ酸残基を欠失した当該蛋白質は脱ユビキチン化活性を示さないことを確認し、本発明を完成した。

20

**【0011】**

すなわち、本発明は、

(1) 下記の群より選ばれるポリペプチド；

- 1 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- 2 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含有するポリペプチド、

30

3 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有し、かつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド、および

4 前記1から3のいずれか1のポリペプチドにおいてアミノ酸配列中1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、または挿入といった変異を有し、かつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド、

(2) 下記の群より選ばれるポリペプチドであって、脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド；

40

1 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

2 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含有するポリペプチド、

3 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド、

および

4 前記1から3のいずれか1のポリペプチドにおいてアミノ酸配列中1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、または挿入といった変異を有するポリペプチド、

(3) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも約5個の連続するアミノ酸配列を有するペプチド、

50

(4) 下記の群より選ばれるポリペプチド；

(a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチド、

(b) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有し、かつ前記(1)または前記(2)のポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチド、および

(c) 前記(a)または前記(b)のポリペプチドにおいて、アミノ酸配列中1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、または挿入といった変異を有し、かつ前記(1)または前記(2)のポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチド、

(5) 下記の群より選ばれるポリペプチドであって、前記(1)または前記(2)のポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチド；

(a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチド、

(b) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド、

および

(c) 前記(a)または前記(b)のポリペプチドにおいて、アミノ酸配列中1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、または挿入といった変異を有するポリペプチド、

(6) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも約5個の連続するアミノ酸配列を有し、かつ前記(1)または前記(2)のポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害するペプチド、

(7) 前記(1)若しくは前記(2)のポリペプチド、または前記(3)のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、

(8) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖、

(9) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖の少なくとも約15個の連続する塩基配列からなるポリヌクレオチド、(10)前記(7)から前記(9)のいずれかのポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリングエントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド、

(11) 前記(4)若しくは前記(5)のポリペプチド、または前記(6)のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、

(12) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖、

(13) 前記(7)から前記(12)のいずれかのポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

(14) 組換えベクターが発現組換えベクターである前記(13)の組換えベクター、

(15) 前記(13)または前記(14)の組換えベクターを導入されてなる形質転換体、

(16) 前記(1)、前記(2)、前記(4)若しくは前記(5)のポリペプチド、または前記(3)若しくは前記(6)のペプチドの製造方法であって、前記(14)の組換えベクターを導入されてなる形質転換体を培養する工程、または前記(13)若しくは前記(14)の組換えベクターを利用した無細胞蛋白質合成手段を含む方法、

10

20

30

40

50

(17) 前記(1)、前記(2)、前記(4)若しくは前記(5)のポリペプチド、または前記(3)若しくは前記(6)のペプチドを免疫学的に認識する抗体、

(18) 脱ユビキチン化活性を阻害する前記(17)の抗体、

(19) 前記(1)若しくは前記(2)のポリペプチドと相互作用してその生理活性を阻害する若しくは増強する化合物、および/または前記(7)若しくは前記(8)のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害する若しくは促進する化合物の同定方法であって、前記(1)、前記(2)、前記(4)若しくは前記(5)のポリペプチド、前記(3)若しくは前記(6)のペプチド、前記(7)から前記(12)のいずれかのポリヌクレオチド、前記(13)若しくは前記(14)の組換えベクター、前記(15)の形質転換体、および前記(17)若しくは前記(18)の抗体のうちの少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする方法、

(20) 前記(1)若しくは前記(2)のポリペプチドと相互作用してその生理活性を阻害する若しくは増強する化合物、および/または前記(7)若しくは前記(8)のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害する若しくは促進する化合物の同定方法であって、化合物と該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドとの相互作用を可能にする条件下で、該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと化合物とを接触させ、次いで、化合物と該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、化合物が該ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用して、該ポリペプチドの生理活性または該ポリヌクレオチドの発現を阻害または促進するかどうかを決定する方法、

(21) 前記(19)または前記(20)の方法で同定された化合物、

(22) 前記(1)若しくは前記(2)のポリペプチドと相互作用して脱ユビキチン化活性を阻害する若しくは増強する化合物、または前記(7)若しくは前記(8)のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害する若しくは促進する化合物、

(23) 前記(4)若しくは前記(5)のポリペプチドおよび/または前記(6)のペプチドからなる、前記(1)若しくは前記(2)のポリペプチドの拮抗剤、

(24) 前記(1)、前記(2)、前記(4)または前記(5)のポリペプチド、前記(3)または前記(6)のペプチド、前記(7)から前記(12)のいずれかのポリヌクレオチド、前記(13)または前記(14)の組換えベクター、前記(15)の形質転換体、前記(17)または前記(18)の抗体、前記(21)または前記(22)の化合物、および前記(23)の拮抗剤のうちの少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする医薬組成物、

(25) 前記(1)、前記(2)、前記(4)または前記(5)のポリペプチド、前記(3)または前記(6)のペプチド、前記(7)から前記(12)のいずれかのポリヌクレオチド、前記(13)または前記(14)の組換えベクター、前記(15)の形質転換体、前記(17)または前記(18)の抗体、前記(21)または前記(22)の化合物、および前記(23)の拮抗剤のうちの少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする神経変性疾患の防止剤および/または治療剤、

(26) 前記神経変性疾患がアルツハイマー病および/またはパーキンソン病である前記(25)の神経変性疾患の防止剤および/または治療剤、

(27) 前記(1)、前記(2)、前記(4)または前記(5)のポリペプチド、前記(3)または前記(6)のペプチド、前記(7)から前記(12)のいずれかのポリヌクレオチド、前記(13)または前記(14)の組換えベクター、前記(15)の形質転換体、前記(17)または前記(18)の抗体、前記(21)または前記(22)の化合物、および前記(23)の拮抗剤のうちの少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする筋萎縮症の防止剤および/または治療剤、

(28) 前記(1)、前記(2)、前記(4)または前記(5)のポリペプチド、または前記(7)、前記(8)、前記(11)若しくは前記(12)のポリヌクレオチドを定量的あるいは定性的に測定する方法、

(29) 前記(1)、前記(2)、前記(4)または前記(5)のポリペプチド、前記(

10

20

30

40

50

3) または前記(6)のペプチド、前記(7)から前記(12)のいずれかのポリヌクレオチド、前記(13)または前記(14)の組換えベクター、前記(15)の形質転換体、前記(17)または前記(18)の抗体、および前記(23)の拮抗剤のうちの少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キット、からなる。

#### 【0012】

##### 【発明の実施の形態】

(新規U S P)

本発明において提供するヒトU S Pは、ヒト脳由来長鎖c D N Aライブラリーから、プロテアーゼモチーフを有する遺伝子として選出したc D N Aクローンb f 0 4 2 7 4がコードする蛋白質である。当該U S Pは、上記遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを導入した大腸菌で発現させて得た。当該U S Pは既知U S Pとそのアミノ酸配列において、相同性の高いC y sドメインおよびH i sドメインを保有することを除いて、殆ど相同性を有さない新規U S Pである。当該U S P遺伝子は7 7 4 4塩基からなり(配列表の配列番号2)、そのオープンリーディングフレーム(open reading frame)(O R F)全長は4 6 7 1塩基、該遺伝子の遺伝子産物は1 5 5 6アミノ酸残基からなる(配列番号1)。以下、この遺伝子を新規U S P遺伝子、該遺伝子の遺伝子産物を新規U S Pと呼ぶ。新規U S P遺伝子のC末端側5 6 1 8塩基および新規U S PのC末端側9 7 7アミノ酸残基は、それぞれK I A A 1 0 5 7(GenBankアクセスション番号: A B 0 2 8 9 8 0)の遺伝子およびその遺伝子産物と共に通である。

#### 【0013】

新規U S P遺伝子は、遺伝子共発現系で人工基質と共に発現させたとき、該人工基質に作用して脱ユビキチン化活性を示した。一方、新規U S PのN末端から5 2 1アミノ酸残基欠失させたもの(K I A A 1 0 5 7 - 1)と人工基質とをインビトロまたは遺伝子共発現系において反応させたときには、脱ユビキチン化活性は観察されなかった。K I A A 1 0 5 7 - 1はK I A A 1 0 5 7を含むものである。K I A A 1 0 5 7は、その塩基配列、コードするアミノ酸配列、およびU S Pの特徴であるC y sドメインおよびH i sドメインを有することが既に公開されていた(非特許文献23)。しかし、K I A A 1 0 5 7として公開されているアミノ酸配列を含むK I A A 1 0 5 7 - 1は脱ユビキチン化活性を示さなかった。すなわち、本発明において新規U S Pを単離・同定することにより、初めて新規U S Pが脱ユビキチン化活性を有することを確認でき、酵素活性を有する蛋白質を取得できた。さらに、新規U S Pには基質選択性があり、人工基質を用いた検討において、アルギニンを介して蛋白質に結合したU bに選択的に作用することを明らかにした。既知U S Pの中で、このようなU bに選択的に作用するものは知られていない。また、K I A A 1 0 5 7 c D N Aが脳、骨格筋、および心臓等で、特に骨格筋で強く発現していることが公開されていることから、新規U S P遺伝子も脳および骨格筋等で同様に発現していると考えられる。

#### 【0014】

(ポリペプチドまたはペプチド)

本発明に係るポリペプチドは、新規U S P遺伝子の遺伝子産物であり、該遺伝子を大腸菌等の細胞で発現させて得られたポリペプチドである。ここで、ポリペプチドとは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドのうち、蛋白質等の長鎖ペプチドを意味し、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称する短鎖ペプチドを単にペプチドという。本明細書においてはアミノ酸を3文字表記または1文字表記することもある。

#### 【0015】

本発明に係るポリペプチドの1態様は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。別の1態様は、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含有するポリペプチドである。

#### 【0016】

また別の1態様は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと、

10

20

30

40

50

アミノ酸配列上で約 70 %以上、好ましくは約 80 %以上、より好ましくは約 90 %以上、さらに好ましくは約 95 %以上の相同性を有するポリペプチドである。より好ましくは、配列表の配列番号 1 に記載のポリペプチドと同等の活性、例えば脱ユビキチン化活性を有するポリペプチドである。脱ユビキチン化活性は、例えば後述する実施例に示したように、ヒトユビキチンの C 末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) をアルギニン、イソロイシン、メチオニン、またはプロリンを介して結合させたものを基質として用い、該基質からユビキチンを解離させ得るか否かを、ユビキチン解離後の GST を抗 GST 抗体によるイムノプロッティング法等の公知の方法で検出することにより測定できる。さらに好ましくは、アルギニンを介して Ub が結合した基質に選択的に作用して脱ユビキチン化活性を示すポリペプチドである。アミノ酸配列の相同性を決定する技術は、自体公知であり、例えばアミノ酸配列を直接決定する方法、cDNA の塩基配列を決定後これにコードされるアミノ酸配列を推定する方法等が利用できる。なお、ヒト以外の動物種の相同遺伝子産物も当然本発明の範囲に包含される。

#### 【0017】

さらに、このように特定されたポリペプチドを基にして、脱ユビキチン化活性を指標にすることにより、1 個以上、例えば 1 個乃至 100 個、好ましくは 1 個乃至 30 個、より好ましくは 1 個乃至 20 個、さらに好ましくは 1 個乃至 10 個、特に好ましくは 1 個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、あるいは挿入といった変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドも提供される。変異を有するペプチドまたはポリペプチドは天然に存在するものであってよく、あるいは変異を導入したものであってもよい。欠失、置換、付加、挿入等の変異を導入する手段は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法、またはポリメラーゼ連鎖増幅法 (PCR) を単独または適宜組み合わせて、例えばサムブルック等編、「モレキュラークローニング アラボラトリーマニュアル」、第 2 版、コールドスプリングハーバー・ラボラトリープレス、1989 年、村松正實編、「ラボマニュアル遺伝子工学」、丸善株式会社、1988 年、エールリッヒ編、「ピーシーアール (PCR) テクノロジー」、「DNA 増幅の原理と応用」、ストックトンプレス、1989 年等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えばウルマー (Ulmer) の技術（「サイエンス (Science)」、1983 年、第 219 卷、p. 666-）を利用することができる。

#### 【0018】

上記のような変異の導入において、当該ポリペプチドの基本的な性質（物性、生理活性、または免疫学的活性等）を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸等）の間での相互置換は容易に想定される。さらに、これらのペプチドは、その構成アミノ基またはカルボキシル基等を修飾する等、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

#### 【0019】

このように、新規 USP が有する生理活性と同等の活性、例えば同等の脱ユビキチン化活性を有するポリペプチドが、本発明において提供できる。それら以外にも、活性の強度または基質特異性を変更したポリペプチドが提供できる。

#### 【0020】

さらに、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドも本発明の範囲に包含される。当該部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドは、その最小単位として 5 個以上のアミノ酸、好ましくは 8 個以上のアミノ酸、より好ましくは 12 個以上、さらに好ましくは 15 個以上の連続するアミノ酸からなるものである。例えば、新規 USP が有する生理活性の最小活性単位（領域またはドメイン）からなるポリペプチドまたはペプチドも本発明において提供される。上記部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドは、新規 USP または新規 USP と同等の生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を有する上記ポリペプチドの活性を調節する物質

10

20

30

40

50

として、あるいは当該生理活性を調節する物質の同定等に使用する試薬として有用である。

#### 【0021】

具体的には例えば、上記部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドは、新規U S Pまたは新規U S Pと同等の生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を有する上記ポリペプチドの拮抗物質として使用できる。例えば、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個のアミノ酸残基からなるポリペプチド（配列表の配列番号3）は、この部位を欠失させると配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの脱ユビキチン化活性が消失すること、またユビキチン特異プロテアーゼ（U B P）のN末端側配列が基質認識に関与するという報告（非特許文献15）があることから、新規U S Pの基質認識に関与していると考えられる。基質認識部位を有しているが酵素活性部位を持たないこのようなポリペプチドは、それが由來した酵素の拮抗剤として用いることができる。従つて、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、新規U S Pまたは新規U S Pと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの拮抗剤として、それらの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性の阻害に使用できる。10

#### 【0022】

新規U S Pまたは新規U S Pと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチドは、配列表の配列番号3に記載のポリペプチドに限定されず、これらポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害できるポリペプチドであればよく、例えば、配列表の配列番号3に記載のポリペプチドとアミノ酸配列上で約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有し、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは該ポリペプチドと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害できるポリペプチドが挙げられる。さらには、例えば配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを基にして、脱ユビキチン化活性の阻害能を指標にすることにより、1個以上、例えば1個乃至100個、好ましくは1個乃至30個、より好ましくは1個乃至20個、さらに好ましくは1個乃至10個、特に好ましくは1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、あるいは挿入といった変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドも提供できる。欠失、置換、付加、あるいは挿入は上記同様の手段が使用できる。20

#### 【0023】

またさらに、新規U S Pまたは新規U S Pと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチドの部分ペプチドであって、当該生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害するペプチドも本発明の範囲に含まれる。

#### 【0024】

新規U S Pまたは新規U S Pと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチドまたはペプチドは、脱ユビキチン化活性を測定する実験系において、脱ユビキチン化活性の阻害を検討することにより得られる。該実験系としては、例えば後述する実施例に示したように、ヒトユビキチンのC末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（G S T）をアルギニン、イソロイシン、メチオニン、またはプロリンを介して結合させたものを基質として用い、該基質からユビキチンを解離させ得るか否かを、ユビキチン解離後のG S Tを抗G S T抗体によるイムノブロッティング法等の公知の方法で検出する実験系を使用できる。40

#### 【0025】

また、上記部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドのうち免疫学的に認識され得るペプチドは、例えばエピトープペプチドであれば、後述するように新規U S Pに特異的な抗体を作製するための抗原として単独でまたはキャリア（例えば、キーホールリンペットヘモシアニンまたは卵白アルブミン）と結合して使用できる。50

## 【0026】

本発明の範囲には、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドに、別種の蛋白質または物質、例えばキャリア等を結合したものも包含される。例えば、本発明に係るポリペプチド等の検出または精製を容易にするために、あるいは別の機能を付加するために、そのN末端側やC末端側に別種の蛋白質またはペプチド、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、ルシフェラーゼ、GFP、-ガラクトシダーゼ、IgG等の免疫グロブリンFc断片、His-tag、Myc-tag、またはFlag-tag等が、直接的にまたはリンカーペプチド等を介して間接的に遺伝子工学的手法等を用いて付加されたものであってもよい。

## 【0027】

10

## (ポリヌクレオチド)

本発明は、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖を提供する。例えば、本発明に係るポリヌクレオチドは、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖である。好ましくは、配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖である。さらに本発明に係る配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその相補鎖、好ましくは配列表の配列番号4に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖も本発明の範囲に含まれる。

## 【0028】

20

さらに本発明は、上記ポリヌクレオチドまたはその相補鎖、好ましくは配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖の対応する領域にストリングエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。ハイブリダイゼーションの条件は、例えばサムブルック等編、「モレキュラークローニング アラボラトリーマニュアル」、第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリー・プレス、1989年等に従うことができる。これらのポリヌクレオチドは目的のポリヌクレオチド、好ましくは配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖にハイブリダイゼーションするものであれば必ずしも相補的配列でなくとも良い。

## 【0029】

30

また本発明に係るポリヌクレオチドは、上記ポリヌクレオチドの指定された塩基配列領域に対応する連続する10個以上のヌクレオチド、好ましくは15個以上、より好ましくは20個以上の配列からなるポリヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチドまたはそれらの相補鎖を包含する。

## 【0030】

これらのポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、本発明に係るポリペプチド等の製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸に関する試薬または標準品としても利用できる。例えば、新規U.S.Pをコードする核酸、例えばその遺伝子またはmRNAの検出のためのプローブまたはプライマーとして、あるいは遺伝子発現を調節するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド等として利用できる。その意味で、本発明に係るポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは翻訳領域のみでなく、非翻訳領域に対応するものも包含する。ここで、新規U.S.Pまたは該U.S.Pと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの選別は、例えば公知の蛋白質発現系を利用して発現蛋白質の確認を行い、その生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を指標にして行うことができる。公知の蛋白質発現系としては、例えば、胚芽または家兎網状赤血球等由來のリボソーム系の技術を利用した無細胞蛋白質発現系(「ネイチャー(Nature)」、1957年、第179巻、p.160-161)を例示できる。

40

## 【0031】

## (組換えベクター)

上記ポリヌクレオチドを適当なベクターDNAに組み込むことにより、組換えベクターが得られる。用いるベクターDNAは、宿主の種類および使用目的により適宜選択される。

50

ベクターDNAは、天然に存在するものを抽出したもののほか、増殖に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落しているものでもよい。例えば、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス、SV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス等のウイルス由来のベクター、並びにそれらを組み合わせたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター、例えばコスマドおよびファージミド等が挙げられる。また、目的により発現ベクターやクローニングベクター等を用いることができる。

## 【0032】

10

組換えベクターは、目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等、とを構成要素とし、これらを自体公知の方法により組み合わせて作製される。前記ベクターDNAに本発明に係るポリヌクレオチドを組み込む方法は、自体公知の方法を適用できる。例えば、適当な制限酵素を選択、処理してDNAを特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターとして用いるDNAと混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。あるいは、目的のポリヌクレオチドに適当なリンクーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所望の組換えベクターが得られる。

## 【0033】

20

## (形質転換体)

上記ポリヌクレオチドが組み込まれたベクターDNAを、自体公知の宿主に自体公知の方法で導入することにより形質転換体が得られる。宿主としては、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、または動物細胞等が例示できる。遺伝子の導入を行う場合、より好ましい系としては遺伝子の安定性を考慮するならば染色体内へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系を使用できる。ベクターDNAの宿主細胞への導入は、例えば、サムブルック等編、「モレキュラークローニング ア ラボラトリーマニュアル」、第2版、コールド\_スプリング\_ハーバー\_ラボラトリー\_プレス、1989年等に記載されている標準的な方法により行うことができる。具体的には、リン酸カルシウムトランسفェクション、DEAE-デキストラント媒介トランسفェクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランسفェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープ負荷(scrape loading)、バリスティック導入(ballistic introduction)、および感染等が挙げられる。

30

## 【0034】

また、形質転換体に導入するベクターDNAとして発現ベクターを使用すれば、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを提供可能である。上記ポリヌクレオチドが組み込まれた発現ベクターDNAを導入した形質転換体は、各宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養される。培養は、形質転換体により発現される本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの作用、例えば少なくとも脱ユビキチン化活性等、あるいは宿主内で産生されたまたは宿主外に産生された該ポリペプチドまたは該ペプチドの量を指標にして行ってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチ培養を行ってもよい。

40

## 【0035】

## (ポリペプチドまたはペプチドの製造)

本発明に係るポリペプチドまたはペプチドは、上記ベクターまたは形質転換体を利用して上記のように遺伝子工学的技術で製造可能である。また、通常のペプチド化学において知られる方法でも製造できる。例えば、「ペプチド合成」、丸善株式会社、1975年や「ペプチド シンテシス(Peptide Synthesis)」、インターライエンス(InterScience)、ニューヨーク(New York)、1996年に記載の方法が例示できるが、無論既知の方法が広く利用可能である。

## 【0036】

50

本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの精製および回収は、その生理活性、例えば少なくとも脱ユビキチン化活性を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を組み合わせるか、溶解度差に基づく硫安、アルコール等の分画手段によって精製回収できる。好ましくは、回収しようとするポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列の情報に基づき、これらに特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を作製し、該抗体を用いて特異的に吸着回収する方法を使用する。

#### 【0037】

##### (抗体)

抗体は、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドを抗原として用いて作製する。抗原は、上記ポリペプチドまたは上記ペプチド、あるいはそれらの断片でもよく、少なくとも8個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも12個、さらに好ましくは15個以上のアミノ酸で構成される。新規USPに特異的な抗体を作製するためには、USPファミリー間の保存領域以外の新規USPに固有なアミノ酸配列からなる領域を用いることが好ましい。抗原として用いるポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列は、必ずしもポリペプチドまたはペプチド、例えば配列表の配列番号1若しくは配列番号3に記載のアミノ酸配列または該配列中の連続するアミノ酸配列からなる部分配列と相同である必要はなく、蛋白質の立体構造上の外部への露出部位が好ましく、露出部位のアミノ酸配列が一次構造上で不連続であっても、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であればよい。抗体は、免疫学的に新規USPまたはその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを、結合または認識する限り特に限定されない。この結合または認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定される。

#### 【0038】

抗体を産生するためには、自体公知の抗体作製法を利用できる。例えば、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを、アジュバントの存在下または非存在下に、単独でまたは担体に結合して動物に投与し、体液性応答および/または細胞性応答等の免疫誘導を行うことにより得られる。担体は、それ自体が宿主に対して有害な作用を及ぼさずかつ抗原性を増強せしめるものであれば特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)等が例示される。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、Ribi(MPL)、Ribi(TDM)、Ribi(MPL+TDM)、百日咳ワクチン(Bordetella pertussis vaccine)、ムラミルジペプチド(MDP)、アルミニウムアジュバント(ALUM)、およびこれらの組み合わせが例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。

#### 【0039】

ポリクローナル抗体は、上記免疫手段を施された動物の血清から自体公知の抗体回収法によって取得される。好ましい手段として免疫アフィニティクロマトグラフィー法により得られる。

#### 【0040】

モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞(例えば、脾臓またはリンパ節由来のリンパ球)を回収し、自体公知の永久増殖性細胞(例えば、P3-X63-Ag8株等のミエローマ株)への形質転換手段を導入することによって行われる。例えば、抗体産生細胞と永久増殖性細胞とを自体公知の方法で融合させてハイブリドーマを作製してこれをクローン化し、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドを特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

#### 【0041】

かくして得られた上記ポリペプチドまたは上記ペプチドを認識して結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドの、精製用抗体、試薬、または標識マーカー等として利用できる。例えば、上記ポリペプチドまたは上

10

20

30

40

50

記ペプチドを認識して結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のうち、直接本発明に係る新規 U S P に結合してその脱ユビキチン化活性を阻害する抗体は、 U S P の異常に起因する各種疾患の解明、防止および / または治療に有用である。

#### 【 0 0 4 2 】

(スクリーニング)

本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、本発明に係るポリヌクレオチドまたはその相補鎖、該ポリヌクレオチドまたはその相補鎖を組み込んだベクター、該ベクターを導入してなる形質転換体、これらを用いる蛋白質発現系、並びに該ポリペプチドまたは該ペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独または複数を組み合わせることによって、新規 U S P または該 U S P と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの活性阻害剤または活性増強剤の同定に有効な方法を提供する。また、これらは、新規 U S P または該 U S P と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現阻害剤または発現促進剤の同定に有効な方法を提供する。該方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。本発明の同定方法によれば、例えば、新規 U S P または該 U S P と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質合成系を利用した遺伝子レベルでの発現調整剤の選別、抗体を利用した抗体認識物質の選別等が可能である。10

#### 【 0 0 4 3 】

例えば、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを用いて、被検化合物とこれらポリペプチドまたはペプチドとの間の相互作用を可能にする条件を選択し、該条件下でこれらポリペプチドまたはペプチドと該化合物とを接触させて、その相互作用により生じるシグナルの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、新規 U S P または該 U S P と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を増強する化合物または阻害する化合物を同定可能である。20

#### 【 0 0 4 4 】

また、新規 U S P または該 U S P と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと被検化合物との間の相互作用を可能にする条件を選択し、該条件下で該ポリヌクレオチドと該化合物とを接触させて、その相互作用により生じるシグナルの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、該ポリヌクレオチドに結合する化合物を同定可能である30

#### 【 0 0 4 5 】

さらにまた、本発明に係る形質転換体を用いて、被検化合物または上記同定された化合物とを適当な条件下で接触させ、本発明に係る新規 U S P または該 U S P と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの発現の有無または変化を検出することにより、これらポリペプチドの発現を阻害する化合物または促進する化合物を同定可能である。これらポリペプチドの発現の有無または変化の検出は、簡便には、発現されるポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を指標にして実施できる。脱ユビキチン化活性の測定は、例えば人工基質 U b - R - G S T の分解により生じる G S T の測定により可能である。このような同定方法においては、これらポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害する化合物または増強する化合物も同定できる。あるいは、新規 U S P の発現の有無または変化を検出するために、検出のためのシグナルまたはマーカーを使用する自体公知の系を導入し、このシグナルまたはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出してよい。ここでシグナルとは、そのもの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものを探し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものを探す。シグナルとしてはルシフェラーゼやグリーン蛍光蛋白質 ( G F P ) 等、マーカーとしては、レポーター遺伝子、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 ( C A T ) 遺伝子等、または検出用のタグ、例えば 6 × H i s タグ等、公知のものが利用できる。これらのシグナルまたはマーカーを組み込んだベクターを作製し、該ベクターを宿主細胞に導入して形質転換体を作製すればよい。これらのシグナルまたはマーカーの検出方法は、当業者には周知のものである。4050

## 【0046】

具体的には、例えば、後述する実施例に準じて、新規U S Pと基質とを例えば大腸菌で共遺伝子発現させて該U S Pの脱ユビキチン化活性を測定する実験系において、ここに被検化合物を加えることにより、該U S Pの発現または生理活性を阻害する、促進する、または増強する化合物を同定できる。この実験系は、同定方法の1つを説明するものであり、本発明に係る化合物の同定方法はこれに限定されない。

## 【0047】

## (化合物)

上記方法により同定された化合物は、新規U S Pまたは該U S Pと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの活性、例えば脱ユビキチン化活性の阻害剤、拮抗剤、または増強剤の候補化合物として利用可能である。また、遺伝子レベルでの新規U S Pまたは該U S Pと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの発現に関する阻害剤または促進剤の候補化合物としても利用可能である。これらの候補化合物は、新規U S Pまたは該U S Pと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの発現や生理活性、例えば脱ユビキチン化活性の増加、減少または欠失等に起因する各種病的状態の防止効果および/または治療効果を期待できる。後述するように、U S Pと神経変性疾患や筋萎縮症との関連が報告されていることから(非特許文献22)、これらの疾患の防止剤および/または治療剤として使用できる。

10

## 【0048】

## (医薬組成物)

20

かくして選別された候補化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮してさらに選別することにより、医薬組成物として調製可能である。また本発明に係る新規U S Pおよびその由来物からなるポリペプチドまたはペプチド、本発明に係るポリヌクレオチドまたはその相補鎖、該ポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含むベクター、並びに新規U S Pおよびその由来物からなるポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体を新規U S Pまたは該U S Pと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの発現や生理活性、例えば脱ユビキチン化活性の増加、減少または欠失等に起因する各種病的状態の防止および/または治療に使用できる。すなわち本発明は、これらを単独または複数組み合わせて使用することにより、これらのうち少なくとも1つを含有する医薬組成物を提供する。なお、製剤化に当たっては、自体公知のポリペプチド、ペプチド、蛋白質、ポリヌクレオチド、抗体等各対象に応じた製剤化手段を導入すればよい。

30

## 【0049】

本発明に係る新規U S Pまたは該U S Pと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの発現および/またはその生理活性の減少や欠失等に起因する異常な状態の治療には、1つの方法として当該U S P自体または当該U S Pと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの生理活性を増強する化合物(増強剤)および/または当該U S Pをコードする遺伝子の発現を促進する治療上有効量の化合物(促進剤)を医薬上許容される担体とともに投与し、そのことにより異常な状態を改善することを特徴とする方法が挙げられる。あるいは、遺伝子治療を用いて、対象中の細胞内で新規U S Pまたは該U S Pと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの活性を生成させてもよい。上記ポリヌクレオチドを利用した遺伝子治療は、公知の方法が利用できるが、例えば、上記のごとく本発明に係るポリヌクレオチドを組み入れた複製欠損レトロウイルスベクターを作製して遺伝子治療に利用すればよい。また、例えば、蛋白質をコードしているD N AまたはR N Aを用いて、例えばレトロウイルスプラスミドベクターを用いることによりエクスピボ(ex vivo)において対象由来の細胞を処理し、次いで、細胞を対象に導入することもできる。

40

## 【0050】

本発明に係る新規U S Pまたは該U S Pと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの発現および/またはその生理活性が過剰な場合、有効量の上記阻害剤化合物を医薬上許容される担体とともに対象に投与して新規U S Pまたは該U S Pと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの生理活性を阻害し、そのことにより異常な状態を改善することもできる

50

。例えば新規 U S P の部分ポリペプチドまたはペプチドであって新規 U S P の生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害するものを、新規 U S P の拮抗剤として使用できる。具体的には、例えば配列表の配列番号 3 に記載のポリペプチドを医薬上許容される担体とともに対象に投与することにより、新規 U S P の生理活性を阻害できる。あるいは、新規 U S P の部分ポリペプチドまたはペプチドであって新規 U S P の生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害するもの、例えば配列番号 3 に記載のポリペプチドを、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて遺伝子治療により、上記のように対象中の細胞内で生成なさしめてもよい。これにより新規 U S P または新規 U S P と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの発現および / またはその生理活性の過剰に起因する疾患を防止および / または治療できる。該拮抗剤は、上記医薬組成物の一成分として使用することもできる。

10

#### 【 0 0 5 1 】

さらに、発現ブロック法を用いて内在性の新規 U S P または該 U S P と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドをコードしている遺伝子の発現を阻害してもよい。細胞内で生成させた、あるいは別個に投与された当該遺伝子のアンチセンス配列を使用して当該遺伝子の発現を阻害できる。これらのオリゴヌクレオチドは、上記本発明に係るポリヌクレオチドを基にして設計し合成できる。当該オリゴヌクレオチドはそれ自体投与ができる、あるいは関連オリゴマーをインピボで発現させることもできる。

#### 【 0 0 5 2 】

投与形態は、全身投与であっても局所投与であってもよい。全身投与の好ましい一態様は、注射、例えば静脈注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。投与の別の態様は、腸溶処方またはカプセル処方がうまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩、フシジン酸、または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜または経皮投与を用いることもできる。局所的な投与のときは、膏薬、パスタ、ゲル等の形態を利用できる。

20

#### 【 0 0 5 3 】

必要な用量範囲は、新規 U S P およびその由来物からなるポリペプチドまたはペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、該ポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含むベクター、新規 U S P およびその由来物からなるポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体、上記化合物、上記拮抗剤、および上記医薬組成物の有効性、投与経路、処方の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重 1 k gあたり 0 . 1 乃至 1 0 0 μ g の範囲である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

30

#### 【 0 0 5 4 】

製剤化にあたっては、例えばペプチド、蛋白質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、抗体、化合物等各対象の物性に応じた公知の製剤化手段を導入すればよい。具体的には、例えば散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、リポソーム製剤、脂肪乳剤、シクロデキストリン等の包接体等の製剤化方法が利用できる。

#### 【 0 0 5 5 】

40

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュークロース、マンニトール等の賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダ等の崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体が用いられる。

#### 【 0 0 5 6 】

懸濁剤は、水、シュークロース、ソルビトール、フラクトース等の糖類、P E G 等のグリコール類、油類を使用して製造できる。

#### 【 0 0 5 7 】

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物からな

50

る担体を用いて調製可能である。

【0058】

リポソーム化は、例えばリン脂質を有機溶媒（クロロホルム等）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノール等）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振とう、超音波処理および遠心処理した後、上清をろ過処理して回収することにより行い得る。

【0059】

脂肪乳剤化は、例えば当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油等の植物油、MCT等）、乳化剤（リン脂質等）等を混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型等）を用いて、乳化・均質化処理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類（例えばブドウ糖、ソルビトール、果糖等）が例示される。

【0060】

シクロデキストリン包接化は、例えば当該物質を溶媒（エタノール等）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水等に加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿をろ過し、滅菌乾燥することにより行い得る。この際、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 型）を選択すればよい。

【0061】

USPの発現や生理活性の増加、減少、または欠失等の機能障害は、USPが係るユビキチンシステムの異常をきたし、ひいては病的状態を引き起こす。例えば、USPの異常と発癌や神経変性疾患との関連が示唆されている（非特許文献17～19）。USPは染色体構造の維持にも関与しており、ユビキチン化されたヒストンの脱ユビキチン化が染色体凝集に重要であることが知られている（非特許文献20）し、USPファミリーの1つであるUSP16がH2Aを脱ユビキチン化することが報告されている（非特許文献21）。また、アルツハイマー病やパーキンソン病で観察される蛋白質凝集体の多くが抗ユビキチン抗体に反応することからも（非特許文献17）、神経変性疾患とUSPの機能異常の関係が示唆される。また、ユビキチン経路が筋萎縮症と関連していることについても報告されている（非特許文献22）。上記本発明に係るUSPは、脳および骨格筋、特に骨格筋での発現が比較的高く、当該USPが神経変性疾患や筋萎縮症と関連している可能性が高い。従って、本発明は、USPの関与する生体機能の解明、例えば発癌プロセスの解明、神経変性疾患、例えばアルツハイマー病やパーキンソン病等の解明、および筋萎縮症の解明、並びにそれらの防止剤および/または治療剤の開発、およびそれらの診断手段として用いる測定法の開発を可能とするものであり、非常に有用である。

【0062】

（診断のための測定方法および試薬）

本発明に係る新規USPおよびその由来物からなるポリペプチドまたはペプチド、本発明に係るポリヌクレオチドおよびその相補鎖、並びに当該USPおよびその由来物からなるポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体は、診断マーカーや試薬等として、本発明に係る新規USPおよびその由来物であるポリペプチド、またはこれらをコードするポリヌクレオチドを定量的にまたは定性的に測定する方法に使用できる。また本発明は、これらのうちの1種またはそれ以上を充填した、1個またはそれ以上の容器を含むなる試薬キットも提供する。当該試薬キットは、上記同定方法および上記測定方法に使用できる。製剤化にあたっては、自体公知のポリペプチドまたはペプチド、蛋白質、ポリヌクレオチド、または抗体等それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。上記測定方法によれば、新規USPの発現や活性の増加、減少または欠失等が関連する各種病的状態診断が可能になる。

【0063】

本発明に係る新規USPおよびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドの発現ま

10

20

30

40

50

たは生理活性の異常に起因する疾患の診断手段は、例えば当該U S Pをコードしている核酸との相互作用や反応性を利用して、相応する核酸の存在量を決定すること、および／または当該U S Pについて個体中の生体内分布を決定すること、および／または当該U S Pの存在、個体由来の試料中の存在量を決定することによって行われる。詳しくは、新規U S Pを診断マーカーとして検定するのである。試料中の当該U S Pの検出またはその存在量の決定に用いることができる測定法は当業者に周知である。このような測定法には、ラジオイムニアッセイ、競争結合アッセイ、ウェスタンプロット分析、およびE L I S Aアッセイ等がある。また、本発明に係る新規U S Pをコードするポリヌクレオチドの検出法および定量法としては、例えば増幅、P C R、R T P C R、R Nアーゼ保護、ノーザンプロッティング、およびその他のハイブリダイゼーション法を用いてR N Aレベルで測定することができる。

#### 【0064】

測定される試料として、個体由来の細胞、例えば血液、尿、唾液、髄液、組織生検または剖検材料等を挙げることができる。また、測定される核酸は、上記各試料から自体公知の核酸調製法により得られる。核酸は、ゲノムD N Aを検出に直接使用してもよく、あるいは分析前にP C Rまたはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅してもよい。R N Aまたはc D N Aを同様に用いてもよい。正常遺伝子型との比較において、増幅生成物のサイズ変化により欠失および挿入を検出することができる。増幅D N Aを標識した上記U S PをコードするD N Aにハイブリダイゼーションさせることにより点突然変異を同定することができる。

#### 【0065】

上記測定により本発明に係るU S Pおよび該U S PをコードするD N Aの変異、減少、または増加を検出することにより、当該U S Pの異常に起因する疾患、例えば、癌あるいは神経変性疾患等、例えばアルツハイマー病やパーキンソン病等の診断が可能になる。

#### 【0066】

##### 【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

##### 【実施例1】

###### (新規U S P遺伝子の単離・同定)

本発明に係るU S P遺伝子は、かずさD N A研究所のヒト長鎖c D N A解析情報データベースから、バイオインフォーマティクス(b i o i n f o r m a t i c s)により、新規プロテアーゼ候補遺伝子として抽出した。本遺伝子の3'末端領域の塩基配列はc D N AクローンK I A A 1 0 5 7(G e n B a n k アクセッション番号:A B 0 2 8 9 8 0)と共通の配列であった。c D N AクローンK I A A 1 0 5 7は、977個のアミノ酸をコードする領域を含む5618b pを含有するクローンであり、U S Pに特徴的なモチーフであるC y sドメイン(C y s - b o x)(G - [L I V M F Y] - x(1, 3) - [A G C] - [N A S M] - x - C - [F Y W] - [L I V M F C] - [N S T] - [S A C V] - x - [L I V M S] - Q)とH i sドメイン(H i s - b o x)(Y - x - L - x - [S A G] - [L I V M F T] - x(2) - H - x - G - x(4, 5) - G - H - Y)およびアスパラギン酸(A s p)ドメインを有する。本発明に係る遺伝子は、C y sドメイン内において既知の当該ドメイン配列と一致していないアミノ酸残基が1つ存在する。

#### 【0067】

c D N AクローンK I A A 1 0 5 7はそのO R F内の5'末端領域が欠失してクローニングされていると推定されたため、K I A A 1 0 5 7の塩基配列を基に、さらに上記データベースを検索した。その結果、K I A A 1 0 5 7の塩基配列を含むc D N Aクローンb f 0 4 2 7 4を見い出した。

#### 【0068】

b f 0 4 2 7 4は7744b pからなるc D N Aである。その塩基配列の第389位～第391位に存在する最初のA T Gは、その直前にコザックのコンセンサス配列を持つこと

10

20

30

40

50

から、翻訳開始コドンと予測された。すなわち、b f 0 4 2 7 4 は、1 5 5 6 個のアミノ酸残基からなるポリペプチドをコードする翻訳領域（C D S）をその塩基配列の第3 8 9位～第5 0 5 9位に含む。b f 0 4 2 7 4 の塩基配列を配列表の配列番号2に、b f 0 4 2 7 4 がコードするアミノ酸配列を配列番号1に記載した。K I A A 1 0 5 7 はb f 0 4 2 7 4 の塩基配列のうち第2 1 2 4位から第7 7 4 1位までの塩基配列に相当し、K I A A 1 0 5 7 の推定アミノ酸配列は、b f 0 4 2 7 4 がコードするアミノ酸配列の第5 8 0番目から第1 5 5 6番目のアミノ酸配列に相当する。C y s - b o x およびH i s - b o x は、b f 0 4 2 7 4 がコードするアミノ酸配列の第6 2 6番目～第6 4 1番目および第8 9 0番目～第9 0 7番目のアミノ酸配列に存在する。

【0 0 6 9】

10

【実施例2】

(新規U S Pの発現)

実施例1で単離・同定した新規U S Pをコードするc D N Aクローンb f 0 4 2 7 4 発現プラスミドをゲイトウェイ<sup>TM</sup>—クローニング—テクノロジー（L i f e T e c h n o l o g i e s社）を用いて作製した。まず、b f 0 4 2 7 4 クローン（p B C S K<sup>+</sup>のH i n d I I I - S a c I 部位に挿入）を鋳型として、アドバンテージ-H F 2 \_ P C Rキット（C l o n t e c h社）あるいはE x p a n d \_ h i g h - f i d e l i t y \_ P C R \_ s y s t e m（R o c h e社）を用いて推定C D S領域（配列番号2に記載の塩基配列の第3 8 9位～第5 0 5 9位）を2段階P C Rで増幅した後、B Pクロナーゼエンザイム（B P c l o n a s e e n z y m e）を用いた組換え反応によりエントリーベクター（p D O N R 2 0 1）に挿入し、p D O N R - b f 0 4 2 7 4 を作製した。なお、プライマーは、1段階目のP C R用にb f 0 4 2 7 4 - A t t B（配列番号5）とP r D O N R 1 0 5 7 (-)（配列番号6）とを、2段階目のP C R用にA t t B 1 アダプタープライマー（配列番号7）と上記P r - D O N R 1 0 5 7 (-)とを使用した。次に、p D O N R - b f 0 4 2 7 4 とN - 末端H i s - タグ付加蛋白質（N - t e r m i n a l H i s - t a g g e d p r o t e i n）発現用ベクターであるp D E S T 1 7とを用いて、L Rクロナーゼエンザイムによる組換え反応によりH i s - タグ付加b f 0 4 2 7 4 発現プラスミド（p H i s - 0 4 2 7 4）を作製した。発現プラスミドは、N a C 1により発現誘導が可能なE . c o l i B L 2 1 - S I（L i f e T e c h n o l o g i e s社）に導入した。C D Sの塩基配列が正しく挿入されていることは、シーケンスを行なって確認した。シーケンス反応はビッグダイ\_ターミネーター\_サイクル\_シーケンシング\_F S \_レディ\_リアクション\_キット（B i g D y e T e r m i n a t o r C y c l e S e q u e n c i n g F S R e a d y R e a c t i o n K i t（P E b i o s y s t e m s社）を用い、泳動および解析はA B I P R I S M 3 1 0 を用いて実施した。

【0 0 7 0】

上記作製した発現プラスミドを用いて大腸菌でb f 0 4 2 7 4 の発現誘導を行った。L B O N / A m p 培地（5 0 m g / m l のアンピシリンを含み、N a C 1を含まないL B 培地）に1 / 1 0量の大腸菌前培養液を接種し、3 7にてO D<sub>600</sub>が約1 . 0 前後になるまで培養後、N a C 1を終濃度0 . 3 M になるように添加した。さらに約4 ~ 5時間培養後、菌体を回収した。菌体をリン酸緩衝生理食塩水（P B S）に懸濁した後に超音波処理し、遠心処理により上清を回収して抽出液とした。該抽出液を1 0 % S D S - P A G Eにより分離後、抗H i s - タグ抗体（P e n t a - H i s<sup>TM</sup>抗体、Q I A G E N社）を用いてイムノプロッティングを行った。その結果、推定アミノ酸配列から予測される分子量と同じ分子量の蛋白質（1 8 6 . 8 k D a）を検出した。発現蛋白質はその多くが不溶性画分に認められ、可溶性画分への分布は少量であった。なお、検出にはE C Lウエスタンプロッティング検出キット（w e s t e r n b l o t t i n g d e t e c t i o n k i t）（A m e r s h a m p h a r m a c i a b i o t e c h社）を使用した。

【0 0 7 1】

40

【実施例3】

50

( b f 0 4 2 7 4 の脱ユビキチン化活性 )

b f 0 4 2 7 4 がコードする蛋白質について、基質との共発現系で、その脱ユビキチン化活性を検討した。この実験系は、酵素発現用プラスミドが有する p B R 3 2 2 系の o r i とコンパティビリティを示す p 1 5 A の o r i を有する基質発現用プラスミドを使用することにより、酵素と基質を同一菌体内で共発現させるものである(「アーチーブス オブ バイオケミストリー アンド バイオフィジックス (Archives of Biochemistry And Biophysics)」, 2000年, 第379巻, p. 198 - )。

#### 【 0 0 7 2 】

まず、共発現用の各種基質発現プラスミドを構築した。基質は、ヒトユビキチンの C 末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を結合させた人工基質 U b - GST を用いた。p T V 1 1 8 N / U b - GST を鑄型として U b - GST コード領域を PCR により増幅させた後、ゲートウェイ™-クローニング\_テクノロジーを用いて大腸菌発現用ベクター、p D E S T 1 4 に挿入し、p D E S T 1 4 U b - GST を作製した。次に、p D E S T 1 4 U b - GST から T 7 プロモーターおよび U b - GST コード領域を含む領域を S p h I および H i n d I I I 处理により切り出し、p 1 5 A 由来の o r i を持つ p A C Y C 1 8 4 (ニッポンジーン社) の S p h I - H i n d I I I 間に組み込み、p A C U b - M - GST を作製した。これを共発現用 U b - M - GST 発現プラスミドとした。次に、p A C U b - M - GST を S a l I および H i n d I I I で処理し、T 7 プロモーターおよび U b - GST コード領域を含む領域を p B l u e s c r i p t I I S K (-) (Stratagene 社) の S a l I - H i n d I I I 間に組み込み、p B S U b G S T を作製した。さらに、p B S U b G S T を鑄型として、クイックチェンジ サイト-ディレクティド\_ミュータジェネシス\_キット (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit) (Stratagene 社) を用いて GST の N 末端のアミノ酸に対応するコドンを A T G (メチオニン: M) から、C C G (プロリン: P)、A T C (イソロイシン: I)、または C G T (アルギニン: R) に変換した p B S U b - P - GST、p B S U b - I - GST、または p B S U b - R - GST を作製した。コドンの変換は、シーケンシングにより確認した。以下、U b - M - G S T、U b - R - G S T、U b - P - G S T、および U b - I - G S T を総称するときは、U b - X - G S T という。次に、各 p B S U b - X - G S T を H i n d I I I および S p h I で処理し、T 7 プロモーターおよび U b - X - G S T コード領域を含む領域を p A C Y C 1 8 4 の H i n d I I I - S p h I 間に組み込み、各共発現用 U b - X - G S T 発現プラスミド、p A C U b - X - G S T を作製した。作製した 4 種類の p A C U b - X - G S T は E . c o l i B L 2 1 - S I に導入し、塩化カルシウム法によりコンピテンントセル化した。

#### 【 0 0 7 3 】

各 p A C U b - X - G S T をそれぞれ保持する E . c o l i B L 2 1 - S I コンピテントセルに、実施例 2 で作製したプラスミド p H i s - 0 4 2 7 4 を遺伝子導入した。このとき、一部のコンピテントセルには、p H i s - 0 4 2 7 4 の代わりに、陽性コントロールとして既知ユビキチン特異プロテアーゼ 15 (以下、U S P 1 5 と略称する) c D N A (K I A A 0 5 2 9 クローン) を鑄型として実施例 2 に記載の方法で作製した H i s - タグ付加 U S P 1 5 発現プラスミド (p H i s - U S P 1 5)、または陰性コントロールとして H i s - タグ付加ルシフェラーゼ (L u c) 発現プラスミド (p H i s - L u c) をそれぞれ遺伝子導入した。該遺伝子導入されたコンピテントセルを、5 0 m g / m l アンピシリンおよび 3 4 m g / m l クロラムフェニコールを含む L B O N (N a C l を含まない L B 培地) プレート上にて培養し、各種共発現株を選択して得た。なお、p H i s - U S P 1 5 の作製において、K I A A 0 5 2 9 は U S P 1 5 の N 末端 3 アミノ酸残基 (M A E) が欠失していたため、ベイカーらの方法に従い(「ゲノミクス (Genomics)」, 1999 年, 第 59巻, p. 264 - )、この 3 アミノ酸残基に対応するコドンをプライマー内に設計し、完全な C D S とした。また、p H i s - L u c は、p G L 3 - L u

10

20

30

40

50

cベクター( Promega社)を鑄型として、実施例2と同様にゲートウェイ<sup>TM</sup>クローニング\_テクノロジーを用いて作製した。

#### 【0074】

上記各種共発現株を50mg/mlアンピシリンおよび34mg/mlクロラムフェニコールを含むLBON培地でOD<sub>600</sub>が約0.5~1.2になるまで37にて培養後、NaClを終濃度0.3Mになるように添加した。さらに約4または5時間培養後、菌体を回収した。該菌体を培養液の1/10量の50mM Tris-HCl, pH7.6/5mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)/1mM デチオスレイトール(DTT)に懸濁後、超音波処理により破壊し、遠心処理により上清を回収して大腸菌抽出液を調製した。該抽出液を15%SDS-PAGEにより分離し、1次抗体として抗GST抗体(Amersham pharmacia biotech社)、2次抗体としてホースラディッシュパーオキシダーゼ(HRP)標識抗ヤギ抗体(Alpha diagnostic international社)を用いてイムノプロッティングを行い、Ub-X-GSTおよび遊離したGSTを検出した。なお、検出はECLウエスタンプロッティング検出キットを使用した。  
10

#### 【0075】

その結果、図1に示すように、プラスミドpHis-04274とUb-R-GSTとを共発現させた大腸菌から調製した抽出液では、Ub-R-GST以外に、Ub-R-GSTからUbが加水分解されて生じたGSTが検出された。しかし、Ub-M-GST、Ub-P-GST、またはUb-I-GSTとの共発現系では、GSTが検出されなかった。一方、陽性コントロールであるUSP15を、bf04274の代わりに基質と共に発現させたときには上記4種類の基質のいずれに対しても脱ユビキチン化活性が認められたが、陰性コントロールであるルシフェラーゼでは認められなかった。  
20

#### 【0076】

このようにプラスミドpHis-04274により発現された蛋白質は、Ubがアルギニン(R)残基を介して蛋白質に結合している人工基質に対して基質選択性を示した。既知USPについて同様に基質選択性を検討したが、Ub-R-GSTに対する基質選択性を示すものは、本発明に係る新規USPのみであった。Ub-GSTは、Ubが蛋白質(GST)とペプチド結合していることから、前駆体Ubモデルと考えられる。bf-04274がコードする蛋白質は、Ub-GSTを基質としてUbを解離するため、生体内において前駆体UbからのUb生成に関与している可能性がある。  
30

#### 【0077】

#### 【実施例4】

##### (bf-04274がコードする蛋白質の酵素活性部位の特定)

USPはシステインプロテアーゼの1つであり、Cys-box内に存在するシステイン残基が活性部位であると考えられている。そこで、bf04274がコードする蛋白質の推定活性残基である第634番目のシステイン(C)をセリン(S)に置換した変異体(bf04274<sup>C634S</sup>)を作製した。まず、第634番目のシステインをクイックチエンジ\_サイト-ディレクティド\_ミュータジェネシス\_キットを用いてセリンに置換した。使用したプライマーは、第634番目のシステインのコドンであるTGTがセリンのコドンであるTCTに置換するように設計した(配列番号8)。変異の導入をシーケンシングにて確認し、His-タグ付加bf04274<sup>C634S</sup>発現プラスミド、pHis-04274Mutを得た。シーケンス反応はCys-S-アーモシーケナーゼ\_ダイ\_サーミネーター\_キット(Thermo Sequenase Dye Terminator Kit)を用い、泳動および解析はロング\_リード\_タワー(Long Read Tower)(いずれもAmersham pharmacia biotech社)を用いて実施した。  
40

#### 【0078】

pHis-04274Mut、実施例2または実施例3で作製したpHis-04274、pHis-USP15、あるいはpHis-Lucをそれぞれ、実施例3と同様にpA  
50

C U b - R - G S T と共に大腸菌で共発現させた。その結果、図 2 に示すように、b f 0 4 2 7 4 を発現させたときに認められた U b - R - G S T に対する脱ユビキチン化活性が、b f 0 4 2 7 4 C 6 3 4 Sにおいては消失していることが判明した。すなわち、b f 0 4 2 7 4 がコードする蛋白質は、第 6 3 4 番目のシステイン残基を活性部位とするシステムプロテアーゼであることが確認された。

#### 【0079】

#### 【実施例 5】

( K I A A 1 0 5 7 - 1 がコードする遺伝子産物の脱ユビキチン化活性の検討 ) b f 0 4 2 7 4 の N 末端側を 5 2 1 アミノ酸残基 ( 配列番号 3 ) 欠失させたポリペプチドをコードする K I A A 1 0 5 7 - 1 を含むプラスミドを実施例 2 と同様の方法で作製し、実施例 3 と同様の方法で基質と共に大腸菌で共発現させてその脱ユビキチン化活性を検討した。その結果、K I A A 1 0 5 7 - 1 は、U S P ファミリーの特徴である C y s - B o x および H i s - B o x を保有しているが、4 種類の人工基質それぞれとの共発現系において、脱ユビキチン化活性を示さなかった ( 図 3 ) 。

以上の結果から、b f 0 4 2 7 4 がコードする蛋白質の N 末端側には、文献 ( 非特許文献 15 ) に記載された U S P と同様に、基質の認識に関する部位が存在すると考えられる。

#### 【0080】

#### 【発明の効果】

かずさ D N A 研究所のヒト長鎖 c D N A 解析情報データベースから、バイオインフォーマティクス ( b i o i n f o r m a t i c s ) により、新規プロテアーゼ候補遺伝子として b f 0 4 2 7 4 を抽出し、本遺伝子の遺伝子産物がユビキチン化蛋白質を脱ユビキチン化するユビキチン特異プロテアーゼ ( U S P ) の 1 つであることを見い出した。さらに、本発明に係る U S P は、N 末端から 5 2 1 アミノ酸残基を欠失させると脱ユビキチン化活性が消失することを見い出した。

本発明は、U S P の関与する生体機能の解明、例えば、発癌プロセスの解明、筋萎縮症、および神経変性疾患、例えばアルツハイマー病やパーキンソン病等の解明、並びにそれらの防止、治療、および診断を可能にするものであり、非常に有用である。

#### 【0081】

#### 【配列表フリーテキスト】

配列番号 5 : プライマーとして用いるために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 6 : プライマーとして用いるために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 7 : プライマーとして用いるために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 8 : プライマーとして用いるために設計されたオリゴヌクレオチド。

#### 【0082】

#### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

〈110〉 DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.  
KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE

〈120〉 A Novel ubiquitin specific protease

10

〈130〉 NP02-1095

〈140〉

〈141〉

〈150〉 JP P2001-301800

20

〈151〉 2001-09-28

〈160〉 8

〈170〉 PatentIn Ver. 2.1

30

〈210〉 1

〈211〉 1556

〈212〉 PRT

〈213〉 Homo sapiens

〈400〉 1

Met Glu Gln Glu Lys Ser Leu Pro Gly Val Val Met Ala Leu Val Cys

40

1

5

10

15

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

245	250	255	
Thr Met Glu Val Ser Asp Phe Thr Ser Thr Val Ala Cys Phe Met Arg			
260	265	270	
Leu Ser Trp Ala Ala Ala Gly Arg Leu Asp Leu Val Gly Ser Ser			
275	280	285	
Gln Pro Ile Lys Glu Ser Asn Ser Leu Cys Pro Ala Gly Ile Arg Asn			
290	295	300	10
Arg Leu Ser Ser Ser Gly Ser Asn Cys Ser Ser Gly Ser Glu Gly Glu			
305	310	315	320
Pro Val Ala Leu His Ala Gly Ile Cys Val Arg Gln Gln Ser Val Ser			
325	330	335	
Thr Lys Asp Ser Leu Ile Ala Gly Glu Ala Leu Ser Leu Leu Val Thr			
340	345	350	
Cys Leu Gln Leu Arg Ser Gln Gln Leu Ala Ser Phe Tyr Asn Leu Pro			20
355	360	365	
Cys Val Ala Asp Phe Ile Ile Asp Ile Leu Leu Gly Ser Pro Ser Ala			
370	375	380	
Glu Ile Arg Arg Val Ala Cys Asp Gln Leu Tyr Thr Leu Ser Gln Thr			
385	390	395	400
Asp Thr Ser Ala His Pro Asp Val Gln Lys Pro Asn Gln Phe Leu Leu			
405	410	415	30
Gly Val Ile Leu Thr Ala Gln Leu Pro Leu Trp Ser Pro Thr Ser Ile			
420	425	430	
Met Arg Gly Val Asn Gln Arg Leu Leu Ser Gln Cys Met Glu Tyr Phe			
435	440	445	
Asp Leu Arg Cys Gln Leu Leu Asp Asp Leu Thr Thr Ser Glu Met Glu			
450	455	460	
Gln Leu Arg Ile Ser Pro Ala Thr Met Leu Glu Asp Glu Ile Thr Trp			40
465	470	475	480

Leu Asp Asn Phe Glu Pro Asn Arg Thr Ala Glu Cys Glu Thr Ser Glu			
485	490	495	
Ala Asp Asn Ile Leu Leu Ala Gly His Leu Arg Leu Ile Lys Thr Leu			
500	505	510	
Leu Ser Leu Cys Gly Ala Glu Lys Glu Met Leu Gly Ser Ser Leu Ile			
515	520	525	
Lys Pro Leu Leu Asp Asp Phe Leu Phe Arg Ala Ser Arg Ile Ile Leu			10
530	535	540	
Asn Ser His Ser Pro Ala Gly Ser Ala Ala Ile Ser Gln Gln Asp Phe			
545	550	555	560
His Pro Lys Cys Ser Thr Ala Asn Ser Arg Leu Ala Ala Tyr Glu Val			
565	570	575	
Leu Val Met Leu Ala Asp Ser Ser Pro Ser Asn Leu Gln Ile Ile Ile			
580	585	590	20
Lys Glu Leu Leu Ser Met His His Gln Pro Asp Pro Ala Leu Thr Lys			
595	600	605	
Glu Phe Asp Tyr Leu Pro Pro Val Asp Ser Arg Ser Ser Gly Phe			
610	615	620	
Val Gly Leu Arg Asn Gly Gly Ala Thr Cys Tyr Met Asn Ala Val Phe			
625	630	635	640
Gln Gln Leu Tyr Met Gln Pro Gly Leu Pro Glu Ser Leu Leu Ser Val			
645	650	655	30
Asp Asp Asp Thr Asp Asn Pro Asp Asp Ser Val Phe Tyr Gln Val Gln			
660	665	670	
Ser Leu Phe Gly His Leu Met Glu Ser Lys Leu Gln Tyr Tyr Val Pro			
675	680	685	
Glu Asn Phe Trp Lys Ile Phe Lys Met Trp Asn Lys Glu Leu Tyr Val			
690	695	700	40
Arg Glu Gln Gln Asp Ala Tyr Glu Phe Phe Thr Ser Leu Ile Asp Gln			

705	710	715	720	
Met Asp Glu Tyr Leu Lys Lys Met Gly Arg Asp Gln Ile Phe Lys Asn				
725	730	735		
Thr Phe Gln Gly Ile Tyr Ser Asp Gln Lys Ile Cys Lys Asp Cys Pro				
740	745	750		
His Arg Tyr Glu Arg Glu Glu Ala Phe Met Ala Leu Asn Leu Gly Val				
755	760	765		10
Thr Ser Cys Gln Ser Leu Glu Ile Ser Leu Asp Gln Phe Val Arg Gly				
770	775	780		
Glu Val Leu Glu Gly Ser Asn Ala Tyr Tyr Cys Glu Lys Cys Lys Glu				
785	790	795	800	
Lys Arg Ile Thr Val Lys Arg Thr Cys Ile Lys Ser Leu Pro Ser Val				
805	810	815		
Leu Val Ile His Leu Met Arg Phe Gly Phe Asp Trp Glu Ser Gly Arg				
820	825	830		20
Ser Ile Lys Tyr Asp Glu Gln Ile Arg Phe Pro Trp Met Leu Asn Met				
835	840	845		
Glu Pro Tyr Thr Val Ser Gly Met Ala Arg Gln Asp Ser Ser Ser Glu				
850	855	860		
Val Gly Glu Asn Gly Arg Ser Val Asp Gln Gly Gly Gly Ser Pro				
865	870	875	880	30
Arg Lys Lys Val Ala Leu Thr Glu Asn Tyr Glu Leu Val Gly Val Ile				
885	890	895		
Val His Ser Gly Gln Ala His Ala Gly His Tyr Tyr Ser Phe Ile Lys				
900	905	910		
Asp Arg Arg Gly Cys Gly Lys Trp Tyr Lys Phe Asn Asp Thr				
915	920	925		
Val Ile Glu Glu Phe Asp Leu Asn Asp Glu Thr Leu Glu Tyr Glu Cys				
930	935	940		40

Phe Gly Gly Glu Tyr Arg Pro Lys Val Tyr Asp Gln Thr Asn Pro Tyr  
 945 950 955 960  
 Thr Asp Val Arg Arg Tyr Trp Asn Ala Tyr Met Leu Phe Tyr Gln  
 965 970 975  
 Arg Val Ser Asp Gln Asn Ser Pro Val Leu Pro Lys Lys Ser Arg Val  
 980 985 990  
 Ser Val Val Arg Gln Glu Ala Glu Asp Leu Ser Leu Ser Ala Pro Ser  
 995 1000 1005  
 Ser Pro Glu Ile Ser Pro Gln Ser Ser Pro Arg Pro His Arg Pro Asn  
 1010 1015 1020  
 Asn Asp Arg Leu Ser Ile Leu Thr Lys Leu Val Lys Lys Gly Glu Lys  
 1025 1030 1035 1040  
 Lys Gly Leu Phe Val Glu Lys Met Pro Ala Arg Ile Tyr Gln Met Val  
 1045 1050 1055  
 Arg Asp Glu Asn Leu Lys Phe Met Lys Asn Arg Asp Val Tyr Ser Ser  
 1060 1065 1070  
 Asp Tyr Phe Ser Phe Val Leu Ser Leu Ala Ser Leu Asn Ala Thr Lys  
 1075 1080 1085  
 Leu Lys His Pro Tyr Tyr Pro Cys Met Ala Lys Val Ser Leu Gln Leu  
 1090 1095 1100  
 Ala Ile Gln Phe Leu Phe Gln Thr Tyr Leu Arg Thr Lys Lys Lys Leu  
 1105 1110 1115 1120  
 Arg Val Asp Thr Glu Glu Trp Ile Ala Thr Ile Glu Ala Leu Leu Ser  
 1125 1130 1135  
 Lys Ser Phe Asp Ala Cys Gln Trp Leu Val Glu Tyr Phe Ile Ser Ser  
 1140 1145 1150  
 Glu Gly Arg Glu Leu Ile Lys Ile Phe Leu Leu Glu Cys Asn Val Arg  
 1155 1160 1165  
 Glu Val Arg Val Ala Val Ala Thr Ile Leu Glu Lys Thr Leu Asp Ser

1170	1175	1180	
Ala Leu Phe Tyr Gln Asp Lys Leu Lys Ser Leu His Gln Leu Leu Glu			
1185	1190	1195	1200
Val Leu Leu Ala Leu Leu Asp Lys Asp Val Pro Glu Asn Cys Lys Asn			
1205	1210	1215	
Cys Ala Gln Tyr Phe Phe Leu Phe Asn Thr Phe Val Gln Lys Gln Gly			
1220	1225	1230	10
Ile Arg Ala Gly Asp Leu Leu Leu Arg His Ser Ala Leu Arg His Met			
1235	1240	1245	
Ile Ser Phe Leu Leu Gly Ala Ser Arg Gln Asn Asn Gln Ile Arg Arg			
1250	1255	1260	
Trp Ser Ser Ala Gln Ala Arg Glu Phe Gly Asn Leu His Asn Thr Val			
1265	1270	1275	1280
Ala Leu Leu Val Leu His Ser Asp Val Ser Ser Gln Arg Asn Val Ala			
1285	1290	1295	
Pro Gly Ile Phe Lys Gln Arg Pro Pro Ile Ser Ile Ala Pro Ser Ser			
1300	1305	1310	
Pro Leu Leu Pro Leu His Glu Glu Val Glu Ala Leu Leu Phe Met Ser			
1315	1320	1325	
Glu Gly Lys Pro Tyr Leu Leu Glu Val Met Phe Ala Leu Arg Glu Leu			
1330	1335	1340	
Thr Gly Ser Leu Leu Ala Leu Ile Glu Met Val Val Tyr Cys Cys Phe			
1345	1350	1355	1360
Cys Asn Glu His Phe Ser Phe Thr Met Leu His Phe Ile Lys Asn Gln			
1365	1370	1375	
Leu Glu Thr Ala Pro Pro His Glu Leu Lys Asn Thr Phe Gln Leu Leu			
1380	1385	1390	
His Glu Ile Leu Val Ile Glu Asp Pro Ile Gln Ala Glu Arg Val Lys			
1395	1400	1405	40

Phe Val Phe Glu Thr Glu Asn Gly Leu Leu Ala Leu Met His His Ser  
 1410 1415 1420

Asn His Val Asp Ser Ser Arg Cys Tyr Gln Cys Val Lys Phe Leu Val  
 1425 1430 1435 1440

Thr Leu Ala Gln Lys Cys Pro Ala Ala Lys Glu Tyr Phe Lys Glu Asn  
 1445 1450 1455

Ser His His Trp Ser Trp Ala Val Gln Trp Leu Gln Lys Lys Met Ser 10  
 1460 1465 1470

Glu His Tyr Trp Thr Pro Gln Ser Asn Val Ser Asn Glu Thr Ser Thr  
 1475 1480 1485

Gly Lys Thr Phe Gln Arg Thr Ile Ser Ala Gln Asp Thr Leu Ala Tyr  
 1490 1495 1500

Ala Thr Ala Leu Leu Asn Glu Lys Glu Gln Ser Gly Ser Ser Asn Gly  
 1505 1510 1515 1520 20

Ser Glu Ser Ser Pro Ala Asn Glu Asn Gly Asp Arg His Leu Gln Gln  
 1525 1530 1535

Gly Ser Glu Ser Pro Met Met Ile Gly Glu Leu Arg Ser Asp Leu Asp  
 1540 1545 1550

Asp Val Asp Pro  
 1555

30

**<210> 2**  
**<211> 7744**  
**<212> DNA**  
**<213> Homo sapiens**

**<220>** 40  
**<221> CDS**

$\langle 222 \rangle \langle 389 \rangle \dots \langle 5059 \rangle$

$\langle 400 \rangle \ 2$

gatcaactata gaggattttt actctgttcc acgaaactatt ctacacctatg gtgcctcatt 60

tcatggacat ctttaaccc ttaatgttac ctatgagtct accaaagata ctttcactgt 120

10

cgaggctcac agtaatgaaa ccatagggag tgtccggtgg aaaatagcca agcagttgtg 180

ctctccgttg gataatatac agatatttac aaatgatagc ctgctgacag tgaataaaga 240

tcaaaagcta ctccaccaac tggcctttc tgatgaacaa atccttacag tgaagacttc 300

tggcagtggg accccatctg ggagttcagc agattttca accagctcca gcagcagcag 360

20

cagtgggtt tttagttttt catatgcc atg gag cag gag aaa tcc ctc cct 412

Met Glu Gln Glu Lys Ser Leu Pro

1

5

ggg gta gtg atg gct ctc gta tgt aac gta ttt gac atg ctt tat cag 460

Gly Val Val Met Ala Leu Val Cys Asn Val Phe Asp Met Leu Tyr Gln

30

10

15

20

ctc gcc aat ctg gaa gag cca agg ata act cta cga gta cgg aag ctt 508

Leu Ala Asn Leu Glu Glu Pro Arg Ile Thr Leu Arg Val Arg Lys Leu

25

30

35

40

ctg ctc ttg ata ccc act gat cca gcc att cag gaa gcc ctt gat caa 556

Leu Leu Leu Ile Pro Thr Asp Pro Ala Ile Gln Glu Ala Leu Asp Gln

40

45

50

55

ctt gat tct tta gga aga aag aaa aca ttg ctg tct gaa tca agt tct 604

Leu Asp Ser Leu Gly Arg Lys Lys Thr Leu Leu Ser Glu Ser Ser Ser

60

65

70

cag tcc tca aaa tct cca tcc ctg tca tca aag caa cag cac cag cca 652

Gln Ser Ser Lys Ser Pro Ser Leu Ser Ser Lys Gln Gln His Gln Pro

75

80

85

agt gcc agt tca att tta gaa agt ctg ttt cga tct ttt gcc ccg gga 700

Ser Ala Ser Ser Ile Leu Glu Ser Leu Phe Arg Ser Phe Ala Pro Gly

90

95

100

20

atg tct acc ttc aga gtg ctc tac aac tta gaa gtt cta agc tcc aaa 748

Met Ser Thr Phe Arg Val Leu Tyr Asn Leu Glu Val Leu Ser Ser Lys

105

110

115

120

ctc atg cca aca gct gat gat gac atg gcc aga agc tgt gcc aaa tcc 796

Leu Met Pro Thr Ala Asp Asp Asp Met Ala Arg Ser Cys Ala Lys Ser

125

130

135

30

ttc tgt gaa aac ttc ctc aaa gct ggc ggt ttg agt ttg gtt gta aat 844

Phe Cys Glu Asn Phe Leu Lys Ala Gly Gly Leu Ser Leu Val Val Asn

140

145

150

gtc atg cag aga gac tcc atc cca tca gaa gta gac tat gaa aca agg 892

Val Met Gln Arg Asp Ser Ile Pro Ser Glu Val Asp Tyr Glu Thr Arg

155

160

165

40

cag ggt gtt tat tcc atc tgt cta cag ctt gca aga ttt tta ctt gtc 940  
 Gln Gly Val Tyr Ser Ile Cys Leu Gln Leu Ala Arg Phe Leu Leu Val  
 170 175 180

gga caa aca atg ccc acg tta tta gat gaa gac ctc acc aaa gat ggt 988  
 Gly Gln Thr Met Pro Thr Leu Leu Asp Glu Asp Leu Thr Lys Asp Gly 10  
 185 190 195 200

ata gaa gca ctt tct tcc cgc cca ttc cga aat gtc agc cgg cag aca 1036  
 Ile Glu Ala Leu Ser Ser Arg Pro Phe Arg Asn Val Ser Arg Gln Thr  
 205 210 215

agc aga cag atg tcc tta tgt ggt acc cca gaa aag tca tcc tac cga 1084 20  
 Ser Arg Gln Met Ser Leu Cys Gly Thr Pro Glu Lys Ser Ser Tyr Arg  
 220 225 230

cag ttg tcc gtg tct gat agg tct tct att agg gtt gag gaa atc atc 1132  
 Gln Leu Ser Val Ser Asp Arg Ser Ser Ile Arg Val Glu Glu Ile Ile  
 235 240 245

30

cct gct gct cga gtt gca ata caa aca atg gaa gta agt gat ttc act 1180  
 Pro Ala Ala Arg Val Ala Ile Gln Thr Met Glu Val Ser Asp Phe Thr  
 250 255 260

tct act gtg gct tgc ttc atg aga ttg tca tgg gct gcg gct gca gga 1228  
 Ser Thr Val Ala Cys Phe Met Arg Leu Ser Trp Ala Ala Ala Gly  
 265 270 275 280

40

cg~~g~~ ctt gat ctt gtt ggg agt agc cag cca att aaa gaa agt aat tcc 1276  
 Arg Leu Asp Leu Val Gly Ser Ser Gln Pro Ile Lys Glu Ser Asn Ser  
 285 290 295

ctg tgt cct gct gga att cga aac aga ctc agc agt tca gga agc aat 1324  
 Leu Cys Pro Ala Gly Ile Arg Asn Arg Leu Ser Ser Ser Gly Ser Asn  
 300 305 310 10

tgc agc tct gga agt gaa gga gaa cca gta gcc ctg cat gcg gga atc 1372  
 Cys Ser Ser Gly Ser Glu Gly Glu Pro Val Ala Leu His Ala Gly Ile  
 315 320 325

tgt gtt cga caa cag tct gta tcc acc aaa gac tcg ctg att gcg gga 1420  
 Cys Val Arg Gln Gln Ser Val Ser Thr Lys Asp Ser Leu Ile Ala Gly  
 330 335 340 20

gag gct ttg tct ctt gtt acg tgc cta cag ctt cg~~g~~ agc cag caa 1468  
 Glu Ala Leu Ser Leu Leu Val Thr Cys Leu Gln Leu Arg Ser Gln Gln  
 345 350 355 360

ctg gca tct ttc tat aac ttg ccc tgt gtt gct gat ttc atc att gat 1516 30  
 Leu Ala Ser Phe Tyr Asn Leu Pro Cys Val Ala Asp Phe Ile Ile Asp  
 365 370 375

att ctg ctc gga tca cca agt gct gag att cgc cg~~g~~ gtt gcc tgt gat 1564  
 Ile Leu Leu Gly Ser Pro Ser Ala Glu Ile Arg Arg Val Ala Cys Asp  
 380 385 390 40

cag ctg tac act ctt agt cag aca gac aca tca gc~~g~~ cat cca gat gtg 1612

Gln Leu Tyr Thr Leu Ser Gln Thr Asp Thr Ser Ala His Pro Asp Val

395

400

405

cag aag cca aat cag ttt ctt cta ggc gta atc ctc acg gct cag ctg 1660

Gln Lys Pro Asn Gln Phe Leu Leu Gly Val Ile Leu Thr Ala Gln Leu

410

415

420

10

cct ctc tgg tct cca act agt att atg aga gga gtc aat cag aga ctg 1708

Pro Leu Trp Ser Pro Thr Ser Ile Met Arg Gly Val Asn Gln Arg Leu

425

430

435

440

tta tct cag tgt atg gag tat ttt gat ttg aga tgc cag tta tta gat 1756

Leu Ser Gln Cys Met Glu Tyr Phe Asp Leu Arg Cys Gln Leu Leu Asp

445

450

455

20

gat ctg aca act tca gaa atg gag cag tta agg atc agc cca gct acg 1804

Asp Leu Thr Thr Ser Glu Met Glu Gln Leu Arg Ile Ser Pro Ala Thr

460

465

470

atg ctt gaa gat gag att act tgg ctg gat aac ttt gaa cct aat cgt 1852

Met Leu Glu Asp Glu Ile Thr Trp Leu Asp Asn Phe Glu Pro Asn Arg

475

480

485

30

aca gct gaa tgt gag acc agt gaa gcg gac aac atc tta ctg gca ggg 1900

Thr Ala Glu Cys Glu Thr Ser Glu Ala Asp Asn Ile Leu Leu Ala Gly

490

495

500

cac tta cgc ctc atc aag acc ctt ctt tca ctc tgt ggg gca gaa aag 1948

His Leu Arg Leu Ile Lys Thr Leu Leu Ser Leu Cys Gly Ala Glu Lys

40

505	510	515	520	
gaa atg ctt ggt tca tca ctc att aaa cca ttg tta gat gac ttc ctt				1996
Glu Met Leu Gly Ser Ser Leu Ile Lys Pro Leu Leu Asp Asp Phe Leu				
525	530	535		
ttc cga gct tct aga att att tta aat agt cat tct cca gct ggc agt				2044
Phe Arg Ala Ser Arg Ile Ile Leu Asn Ser His Ser Pro Ala Gly Ser				
540	545	550		
gcc gcc atc agt caa cag gac ttt cat cca aag tgt agt aca gcg aat				2092
Ala Ala Ile Ser Gln Gln Asp Phe His Pro Lys Cys Ser Thr Ala Asn				
555	560	565		
				20
agc cga ttg gca gcc tat gaa gtc ctt gtg atg ttg gct gat agt tca				2140
Ser Arg Leu Ala Ala Tyr Glu Val Leu Val Met Leu Ala Asp Ser Ser				
570	575	580		
cct tca aat ctt caa att att ata aaa gaa ctg ctt tct atg cat cac				2188
Pro Ser Asn Leu Gln Ile Ile Ile Lys Glu Leu Leu Ser Met His His				
585	590	595	600	
				30
cag cct gac cct gct ctt acc aag gag ttt gat tac ctt ccc cca gtg				2236
Gln Pro Asp Pro Ala Leu Thr Lys Glu Phe Asp Tyr Leu Pro Pro Val				
605	610	615		
gat agc agg tcc agt tca ggg ttt gtg ggg ctg aga aat ggt ggt gca				2284
Asp Ser Arg Ser Ser Gly Phe Val Gly Leu Arg Asn Gly Gly Ala				
620	625	630		
				40

act tgt tat atg aat gca gtc ttc cag cag ctg tat atg caa cct ggg 2332  
 Thr Cys Tyr Met Asn Ala Val Phe Gln Gln Leu Tyr Met Gln Pro Gly  
 635 640 645

ctc cct gag tca tta ctt tca gtg gat gat gac aca gac aat cca gat 2380  
 Leu Pro Glu Ser Leu Leu Ser Val Asp Asp Asp Thr Asp Asn Pro Asp 10  
 650 655 660

gat agc gtg ttt tac caa gtg cag tct ctc ttt gga cat tta atg gaa 2428  
 Asp Ser Val Phe Tyr Gln Val Gln Ser Leu Phe Gly His Leu Met Glu  
 665 670 675 680

agc aag ctg cag tac tat gta cct gag aat ttt tgg aag att ttc aag 2476 20  
 Ser Lys Leu Gln Tyr Tyr Val Pro Glu Asn Phe Trp Lys Ile Phe Lys  
 685 690 695

atg tgg aat aaa gaa ctt tat gtg aga gaa cag cag gat gca tat gaa 2524  
 Met Trp Asn Lys Glu Leu Tyr Val Arg Glu Gln Gln Asp Ala Tyr Glu  
 700 705 710

30

ttc ttt act agt ctc att gat cag atg gat gaa tac ctc aag aaa atg 2572  
 Phe Phe Thr Ser Leu Ile Asp Gln Met Asp Glu Tyr Leu Lys Lys Met  
 715 720 725

ggg aga gac caa att ttt aag aat aca ttt cag ggc atc tac tct gat 2620  
 Gly Arg Asp Gln Ile Phe Lys Asn Thr Phe Gln Gly Ile Tyr Ser Asp  
 730 735 740

40

cag aag atc tgt aaa gac tgt cct cac aga tat gag cgt gaa gaa gct 2668  
 Gln Lys Ile Cys Lys Asp Cys Pro His Arg Tyr Glu Arg Glu Glu Ala  
 745 750 755 760

ttc atg gct ctc aat cta gga gtg act tct tgt cag agt ttg gaa att 2716  
 Phe Met Ala Leu Asn Leu Gly Val Thr Ser Cys Gln Ser Leu Glu Ile  
 765 770 775

10

tct ttg gac caa ttt gtt aga gga gaa gtt cta gaa gga agt aat gcg 2764  
 Ser Leu Asp Gln Phe Val Arg Gly Glu Val Leu Glu Gly Ser Asn Ala  
 780 785 790

tac tac tgt gaa aag tgt aaa gaa aag aga ata aca gtg aaa agg acc 2812  
 Tyr Tyr Cys Glu Lys Cys Lys Glu Lys Arg Ile Thr Val Lys Arg Thr  
 795 800 805

20

tgt att aaa tct tta cct agc gtc ttg gta att cac cta atg aga ttt 2860  
 Cys Ile Lys Ser Leu Pro Ser Val Leu Val Ile His Leu Met Arg Phe  
 810 815 820

ggg ttt gac tgg gaa agc gga cgc tcc att aaa tat gat gaa caa ata 2908  
 Gly Phe Asp Trp Glu Ser Gly Arg Ser Ile Lys Tyr Asp Glu Gln Ile  
 825 830 835 840

30

agg ttt ccc tgg atg cta aac atg gag cct tac aca gtt tca gga atg 2956  
 Arg Phe Pro Trp Met Leu Asn Met Glu Pro Tyr Thr Val Ser Gly Met  
 845 850 855

40

gct cgc caa gat tct tct gaa gtt ggg gaa aat ggg cga agt gtg 3004

Ala Arg Gln Asp Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Asn Gly Arg Ser Val  
 860 865 870

gat cag ggc ggt gga gga tcc cca cga aaa aag gtt gcc ctc aca gaa 3052  
 Asp Gln Gly Gly Gly Ser Pro Arg Lys Lys Val Ala Leu Thr Glu  
 875 880 885

10

aac tat gaa ctt gtc ggt gtc atc gta cac agt ggg cag gca cac gca 3100  
 Asn Tyr Glu Leu Val Gly Val Ile Val His Ser Gly Gln Ala His Ala  
 890 895 900

ggc cac tac tat tcc ttc att aag gac agg cga ggg tgt gga aaa gga 3148  
 Gly His Tyr Tyr Ser Phe Ile Lys Asp Arg Arg Gly Cys Gly Lys Gly  
 905 910 915 920

20

aag tgg tat aaa ttt aat gac aca gtt ata gaa gaa ttt gac cta aat 3196  
 Lys Trp Tyr Lys Phe Asn Asp Thr Val Ile Glu Glu Phe Asp Leu Asn  
 925 930 935

gac gag acc ctg gag tat gaa tgc ttt gga gga gaa tat aga cca aaa 3244  
 Asp Glu Thr Leu Glu Tyr Glu Cys Phe Gly Gly Glu Tyr Arg Pro Lys  
 940 945 950

30

gtt tat gat caa aca aac cca tac act gat gtg cgc cga aga tac tgg 3292  
 Val Tyr Asp Gln Thr Asn Pro Tyr Thr Asp Val Arg Arg Arg Tyr Trp  
 955 960 965

aat gcc tat atg ctt ttc tac caa agg gtg tct gat cag aac tcc cca 3340  
 Asn Ala Tyr Met Leu Phe Tyr Gln Arg Val Ser Asp Gln Asn Ser Pro

40

970

975

980

gta tta cca aag aaa agt cga gtc agc gtt gta cgg cag gaa gct gag 3388

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

985 990 995 1000

gat ctc tct ctg tca gct cca tct tca cca gaa att tca cct cag tca 3436

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

1005

1010

1015

tcc cct cgg ccc cat agg ccg aac aat gac cgg ctg tct att ctt acc 3484

Ser Pro Arg Pro His Arg Pro Asn Asn Asp Arg Leu Ser Ile Leu Thr

1020

1025

1030

20

aag ctg gtt aaa aaa ggc gag aag aaa gga ctg ttt gtg gag aaa atg 3532

Lys Leu Val Lys Lys Gly Glu Lys Lys Gly Leu Phe Val Glu Lys Met

1035

1040

1045

cct gct cga ata tac cag atg gtg aga gat gag aac ctc aag ttt atg 3580

Pro Ala Arg Ile Tyr Gln Met Val Arg Asp Glu Asn Leu Lys Phe Met

1050

1055

1060

30

aag aat aga gat gta tac agt agt gat tat ttc agt ttt gtt ttg tct 3628

Lys Asn Arg Asp Val Tyr Ser Ser Asp Tyr Phe Ser Phe Val Leu Ser

1065 1070 1075 1080

tta gct tca ttg aat gct act aaa tta aag cat cca tat tat cct tgc 3676

Leu Ala Ser Leu Asn Ala Thr Lys Leu Lys His Pro Tyr Tyr Pro Cys

1085

1090

1095

40

atg gca aag gtg agc tta cag ctt gct att caa ttc ctt ttt caa act 3724  
 Met Ala Lys Val Ser Leu Gln Leu Ala Ile Gln Phe Leu Phe Gln Thr  
 1100 1105 1110

tat cta cgg aca aag aag aaa ctc agg gtt gat act gaa gaa tgg att 3772  
 Tyr Leu Arg Thr Lys Lys Leu Arg Val Asp Thr Glu Glu Trp Ile 10  
 1115 1120 1125

gct acc att gaa gca ttg ctt tca aaa agt ttt gat gct tgt cag tgg 3820  
 Ala Thr Ile Glu Ala Leu Leu Ser Lys Ser Phe Asp Ala Cys Gln Trp  
 1130 1135 1140

tta gtt gaa tat ttt att agt tct gaa gga cga gaa ttg ata aag att 3868 20  
 Leu Val Glu Tyr Phe Ile Ser Ser Glu Gly Arg Glu Leu Ile Lys Ile  
 1145 1150 1155 1160

ttc tta ctg gag tgc aat gtg aga gaa gta cga gtt gct gtg gcc acc 3916  
 Phe Leu Leu Glu Cys Asn Val Arg Glu Val Arg Val Ala Val Ala Thr  
 1165 1170 1175

att ctg gag aaa acc cta gac agt gcc ttg ttt tat cag gat aag tta 3964  
 Ile Leu Glu Lys Thr Leu Asp Ser Ala Leu Phe Tyr Gln Asp Lys Leu  
 1180 1185 1190

aaa agc ctt cat cag tta ctg gag gta cta ctt gct ctg ttg gac aaa 4012  
 Lys Ser Leu His Gln Leu Leu Glu Val Leu Leu Ala Leu Leu Asp Lys  
 1195 1200 1205

gac gtc cca gaa aat tgt aaa aac tgt gct cag tac ttt ttc ctg ttc 4060  
 Asp Val Pro Glu Asn Cys Lys Asn Cys Ala Gln Tyr Phe Phe Leu Phe  
 1210 1215 1220

aac act ttt gta caa aag caa gga att agg gct gga gat ctt ctt ctg 4108  
 Asn Thr Phe Val Gln Lys Gln Gly Ile Arg Ala Gly Asp Leu Leu Leu  
 1225 1230 1235 1240 10

agg cat tca gct ctg cgg cac atg atc agc ttc ctc cta ggg gcc agt 4156  
 Arg His Ser Ala Leu Arg His Met Ile Ser Phe Leu Leu Gly Ala Ser  
 1245 1250 1255

cgg caa aac aat cag ata cgt cga tgg agt tca gca caa gca cga gaa 4204  
 Arg Gln Asn Asn Gln Ile Arg Arg Trp Ser Ser Ala Gln Ala Arg Glu  
 1260 1265 1270 20

ttt ggg aat ctt cac aat aca gtg gcg tta ctt gtt ttg cat tca gat 4252  
 Phe Gly Asn Leu His Asn Thr Val Ala Leu Leu Val Leu His Ser Asp  
 1275 1280 1285

gtc tca tcc caa agg aat gtt gct cct ggc ata ttt aag caa cga cca 4300 30  
 Val Ser Ser Gln Arg Asn Val Ala Pro Gly Ile Phe Lys Gln Arg Pro  
 1290 1295 1300

ccc att agc att gct ccc tca agc cct ctg ttg ccc ctc cat gag gag 4348  
 Pro Ile Ser Ile Ala Pro Ser Ser Pro Leu Leu Pro Leu His Glu Glu  
 1305 1310 1315 1320 40

gta gaa gcc ttg ttg ttc atg tct gaa ggg aaa cct tac ctg tta gag 4396

Val Glu Ala Leu Leu Phe Met Ser Glu Gly Lys Pro Tyr Leu Leu Glu

1325

1330

1335

gta atg ttt gct ttg cgg gag ctg aca ggc tcg ctc ttg gca ctc att 4444

Val Met Phe Ala Leu Arg Glu Leu Thr Gly Ser Leu Leu Ala Leu Ile

1340

1345

1350

10

gag atg gta gtg tac tgc tgt ttc tgt aat gag cat ttt tcc ttc aca 4492

Glu Met Val Val Tyr Cys Cys Phe Cys Asn Glu His Phe Ser Phe Thr

1355

1360

1365

atg ctg cat ttc att aag aac caa cta gaa acg gct cca cct cat gag 4540

Met Leu His Phe Ile Lys Asn Gln Leu Glu Thr Ala Pro Pro His Glu

1370

1375

1380

20

tta aag aat acg ttc caa cta ctt cat gaa ata ttg gtt att gaa gat 4588

Leu Lys Asn Thr Phe Gln Leu Leu His Glu Ile Leu Val Ile Glu Asp

1385

1390

1395

1400

cct ata caa gca gag cga gtc aaa ttt gtg ttt gag aca gaa aat gga 4636

Pro Ile Gln Ala Glu Arg Val Lys Phe Val Phe Glu Thr Glu Asn Gly

1405

1410

1415

30

tta cta gct ttg atg cac cac agt aat cat gtg gac agt agt cgc tgc 4684

Leu Leu Ala Leu Met His His Ser Asn His Val Asp Ser Ser Arg Cys

1420

1425

1430

tac cag tgt gtc aaa ttt ctt gtc act ctt gct caa aag tgt cct gca 4732

Tyr Gln Cys Val Lys Phe Leu Val Thr Leu Ala Gln Lys Cys Pro Ala

40

1435

1440

1445

gct aag gag tac ttc aag gag aat tcc cac cac tgg agc tgg gct gtg 4780  
 Ala Lys Glu Tyr Phe Lys Glu Asn Ser His His Trp Ser Trp Ala Val

1450

1455

1460

cag tgg cta cag aag aag atg tca gaa cat tac tgg aca cca cag agt 4828 10  
 Gln Trp Leu Gln Lys Lys Met Ser Glu His Tyr Trp Thr Pro Gln Ser  
 1465 1470 1475 1480

aat gtc tct aat gaa aca tca act gga aaa acc ttt cag cga acc att 4876  
 Asn Val Ser Asn Glu Thr Ser Thr Gly Lys Thr Phe Gln Arg Thr Ile

1485

1490

1495

20

tca gct cag gac acg tta gcg tat gcc aca gct ttg ttg aat gaa aaa 4924  
 Ser Ala Gln Asp Thr Leu Ala Tyr Ala Thr Ala Leu Leu Asn Glu Lys

1500

1505

1510

gag caa tca gga agc agt aat ggg tcg gag agt agt cct gcc aat gag 4972  
 Glu Gln Ser Gly Ser Ser Asn Gly Ser Glu Ser Ser Pro Ala Asn Glu

1515

1520

1525

30

aac gga gac agg cat cta cag cag ggt tca gaa tct ccc atg atg att 5020  
 Asn Gly Asp Arg His Leu Gln Gln Gly Ser Glu Ser Pro Met Met Ile

1530

1535

1540

ggt gag ttg aga agt gac ctt gat gat gtt gat ccc tag aggaacatgc 5069  
 Gly Glu Leu Arg Ser Asp Leu Asp Asp Val Asp Pro

1545

1550

1555

40

ccagcctgag aggagtcaag acacaatact ggatgctcg cacttcttg gaatcagaat 5129

ctcgAACCT ttggaaagagc ctggagatg gactggaaa gctgtgtga cttgggcgga 5189

tctgttattt ctcaaggaaa gcattttaa gccactagaa ggtttggag ctgtttggca 5249

10

gtgggagaac tccggcatgt ggatcagctg tccgggagc gtggtctata tgtggattca 5309

catttcgtg gagatttcg gaaatagagc cagttggcaga cttttttttt acacgaacat 5369

acaagagtg acaataagct gttgtttct ctacgtatgt acaaaaagaaa ttccttttgt 5429

tttatattt taagaaaaag caagctgtttt tagatatgt gggggcaaatttttaatctt 5489

20

gcagtaatat taaacaggaa tatccaattt aaaatgtatgt aaagatgtaa taaaattccct 5549

ttcatttgcataat taagtcaatt tacacagacc ttgttatattt atatgtctcc 5609

ctatttgcataat agaatttcag atgggtcttag atgagaaccc tatgcataag ctggatctt 5669

30

gatgaaaggta taccaggatc aggtcaaaaa attggaaat actaagctct tgaagatattt 5729

tttctgtat aatttagatttggaaaagagccaa ttgttttttttgcgtgttctt ccagaagttac 5789

agggtgcatt atttgcacatc aattacttaa agaagttatgt agttttcccc caaacagattt 5849

ttaaaaaacag caaaataaaaa gcacttttaag atataattttt actgagtttta acttcacaga 5909

40

attatcttt taatgcttgg agacatattg aataaactgt agtcttaat catgttatct 5969

gcaatcgitt gcitttgctt aaaacataat tactgaaacc ctggatttg gttgtatatg 6029

aagtttaacta tttagtttgg tacacactgc ttgtgagttt catagttatt gtaatgcaga 6089

gaaggaattt gagaatttgtt tcctcccaa catgactaat taacactgaa aagtcagtca 6149

10

aggtaaga ttatatttcc cagaaataaa tataaagcaa ttgaataacc atccatttag 6209

tcttatttcc aaagtatagc accattact cattatacc agtcccctt tatggtgtgg 6269

gggagaggtt tacacccaca tatticatat atatttgtt cattttgtt ttgaattgc 6329

20

tcacattttc ggccctgttt tgcccttagt tacaggtctt gccttatttt catctcacca 6389

tgcacagaac tagggagcct taggaagtgc caggtttca ctgtcagatt tgccaagtca 6449

cagaggcgca gccagccctg aagtgcctgt ctggctgctg tggcatgtg tggcatgtg 6509

gccaggcaga tggcatctca ttactgtgct ctgcctatgg cccagtcctt tcattctctg 6569

30

gcagtgaggg ttctgtgct gtcagacttc attgttattc tgtgacttgc tggaggttgg 6629

cagtggcctt tgtcaaacac actgagaaga tggaagggcc agcacttaag agcagaactg 6689

tacccttaga gaaacggaca gaggcgagtg gcaaacttca gacggttcca atggcttgc 6749

40

agtttgaat gtgatgttctt accattggtt ttgagttacgt gaatacttcc tgcctactg 6809

tttccccac cctattctca ctttcctcc gcccacatcc tcaccaagag attgtgtggg 6869

acatgacctt gaaatgcgtgg cgatgatcca cactggata tcatgcgtgg cgactgcact 6929

ctcaggagcc caaaaatcagg agtgaardttg ccacitctag tcccttatt tcctatggaa 6989

10

acaacgcctt ccgcacccct agcacctgcc gtcctcactg taaaggttca tcaggatcgt 7049

ccaccgtgtt tattatacgc tttagatcat gtgtttata ttgttgttgc aatgaccatc 7109

gttttcaattt tgctggtaac cacttgatgtt ctgacagcta cagtcaatga acctgtgtat 7169

gactttttttt aatgtgttac aacagtgtaca gttatgacag gcttacccttggaaagttgt 7229

20

catttttact gccaattttt tggatgaaga ttttttata aaccttcaa aatggtctgc 7289

aaacagagca ggaattgcac aattaactca ataatgcgtt gtgttctcaa gaagctccct 7349

tagtgaggcc gatcttaaga tggccgattc tgcccggttga aggcatccctggaaagaaaa 7409

30

caagcatccc agcgggcattc tcaccacgac ttctccttggaa gtcctcacac ggtcaactgac 7469

aactacagtc agtttttagga actagagtgc cgtatcatca gacttacccttgcctgcccc 7529

accttcccttgc ttaacatcga ggtgtgttca gttaccccttcttggaa caagcagact 7589

ggaattttcc tctgttaccccttggata aaatcttggaa tataaaatttt caaaaggaag 7649

40

tagatacact aggaaagaac ctttaattcta aatttggttc atgtgtggca aagtcttag 7709

cttctaagag tataaaataa atttttcaaa aacag 7744

**<210> 3**

**<211> 521**

10

**<212> PRT**

**<213> Homo sapiens**

**<400> 3**

Met Glu Gln Glu Lys Ser Leu Pro Gly Val Val Met Ala Leu Val Cys

1

5

10

15

20

Asn Val Phe Asp Met Leu Tyr Gln Leu Ala Asn Leu Glu Glu Pro Arg

20

25

30

Ile Thr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Leu Ile Pro Thr Asp Pro

35

40

45

Ala Ile Gln Glu Ala Leu Asp Gln Leu Asp Ser Leu Gly Arg Lys Lys

50

55

60

30

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

65

70

75

80

Ser Ser Lys Gln Gln His Gln Pro Ser Ala Ser Ser Ile Leu Glu Ser

85

90

95

40

Leu Phe Arg Ser Phe Ala Pro Gly Met Ser Thr Phe Arg Val Leu Tyr  
100 105 110

Asn Leu Glu Val Leu Ser Ser Lys Leu Met Pro Thr Ala Asp Asp Asp  
115 120 125

Met Ala Arg Ser Cys Ala Lys Ser Phe Cys Glu Asn Phe Leu Lys Ala 10  
130 135 140

Gly Gly Leu Ser Leu Val Val Asn Val Met Gln Arg Asp Ser Ile Pro  
145 150 155 160

Ser Glu Val Asp Tyr Glu Thr Arg Gln Gly Val Tyr Ser Ile Cys Leu 20  
165 170 175

Gln Leu Ala Arg Phe Leu Leu Val Gly Gln Thr Met Pro Thr Leu Leu  
180 185 190

Asp Glu Asp Leu Thr Lys Asp Gly Ile Glu Ala Leu Ser Ser Arg Pro  
195 200 205

30  
Phe Arg Asn Val Ser Arg Gln Thr Ser Arg Gln Met Ser Leu Cys Gly  
210 215 220

Thr Pro Glu Lys Ser Ser Tyr Arg Gln Leu Ser Val Ser Asp Arg Ser  
225 230 235 240

40  
Ser Ile Arg Val Glu Glu Ile Ile Pro Ala Ala Arg Val Ala Ile Gln  
245 250 255

Thr Met Glu Val Ser Asp Phe Thr Ser Thr Val Ala Cys Phe Met Arg  
260 265 270

Leu Ser Trp Ala Ala Ala Gly Arg Leu Asp Leu Val Gly Ser Ser  
275 280 285

10

Gln Pro Ile Lys Glu Ser Asn Ser Leu Cys Pro Ala Gly Ile Arg Asn  
290 295 300

Arg Leu Ser Ser Ser Gly Ser Asn Cys Ser Ser Gly Ser Glu Gly Glu  
305 310 315 320

Pro Val Ala Leu His Ala Gly Ile Cys Val Arg Gln Gln Ser Val Ser  
325 330 335

20

Thr Lys Asp Ser Leu Ile Ala Gly Glu Ala Leu Ser Leu Leu Val Thr  
340 345 350

Cys Leu Gln Leu Arg Ser Gln Gln Leu Ala Ser Phe Tyr Asn Leu Pro  
355 360 365

30

Cys Val Ala Asp Phe Ile Ile Asp Ile Leu Leu Gly Ser Pro Ser Ala  
370 375 380

Glu Ile Arg Arg Val Ala Cys Asp Gln Leu Tyr Thr Leu Ser Gln Thr  
385 390 395 400

40

Asp Thr Ser Ala His Pro Asp Val Gln Lys Pro Asn Gln Phe Leu Leu

405

410

415

Gly Val Ile Leu Thr Ala Gln Leu Pro Leu Trp Ser Pro Thr Ser Ile

420

425

430

Met Arg Gly Val Asn Gln Arg Leu Leu Ser Gln Cys Met Glu Tyr Phe

435

440

445

10

Asp Leu Arg Cys Gln Leu Leu Asp Asp Leu Thr Thr Ser Glu Met Glu

450

455

460

Gln Leu Arg Ile Ser Pro Ala Thr Met Leu Glu Asp Glu Ile Thr Trp

465

470

475

480

20

Leu Asp Asn Phe Glu Pro Asn Arg Thr Ala Glu Cys Glu Thr Ser Glu

485

490

495

Ala Asp Asn Ile Leu Leu Ala Gly His Leu Arg Leu Ile Lys Thr Leu

500

505

510

Leu Ser Leu Cys Gly Ala Glu Lys Glu

515

520

30

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1563

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

40

⟨220⟩

⟨221⟩ CDS

⟨222⟩ (1)..(1563)

⟨400⟩ 4

atg gag cag gag aaa tcc ctc cct ggt gta gtg atg gct ctc gta tgt	48	
Met Glu Gln Glu Lys Ser Leu Pro Gly Val Val Met Ala Leu Val Cys		10
1	5	10
		15

aac gta ttt gac atg ctt tat cag ctc gcc aat ctg gaa gag cca agg	96	
Asn Val Phe Asp Met Leu Tyr Gln Leu Ala Asn Leu Glu Glu Pro Arg		
20	25	30

ata act cta cga gta cgg aag ctt ctg ctc ttg ata ccc act gat cca	144	
Ile Thr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Leu Ile Pro Thr Asp Pro		20
35	40	45

gcc att cag gaa gcc ctt gat caa ctt gat tct tta gga aga aag aaa	192	
Ala Ile Gln Glu Ala Leu Asp Gln Leu Asp Ser Leu Gly Arg Lys Lys		
50	55	60

30

aca ttg ctg tct gaa tca agt tct cag tcc tca aaa tct cca tcc ctg	240	
Thr Leu Leu Ser Glu Ser Ser Ser Gln Ser Ser Lys Ser Pro Ser Leu		
65	70	75
		80

tca tca aag caa cag cac cag cca agt gcc agt tca att tta gaa agt	288	
Ser Ser Lys Gln Gln His Gln Pro Ser Ala Ser Ser Ile Leu Glu Ser		
85	90	95

40

ctg ttt cga tct ttt gcc ccg gga atg tct acc ttc aga gtg ctc tac 336  
 Leu Phe Arg Ser Phe Ala Pro Gly Met Ser Thr Phe Arg Val Leu Tyr  
 100 105 110

aac tta gaa gtt cta agc tcc aaa ctc atg cca aca gct gat gat gac 384  
 Asn Leu Glu Val Leu Ser Ser Lys Leu Met Pro Thr Ala Asp Asp Asp  
 115 120 125

atg gcc aga agc tgt gcc aaa tcc ttc tgt gaa aac ttc ctc aaa gct 432  
 Met Ala Arg Ser Cys Ala Lys Ser Phe Cys Glu Asn Phe Leu Lys Ala  
 130 135 140

ggc ggt ttg agt ttg gtt gta aat gtc atg cag aga gac tcc atc cca 480  
 Gly Gly Leu Ser Leu Val Val Asn Val Met Gln Arg Asp Ser Ile Pro  
 145 150 155 160

tca gaa gta gac tat gaa aca agg cag ggt gtt tat tcc atc tgt cta 528  
 Ser Glu Val Asp Tyr Glu Thr Arg Gln Gly Val Tyr Ser Ile Cys Leu  
 165 170 175

cag ctt gca aga ttt tta ctt gtc gga caa aca atg ccc acg tta tta 576  
 Gln Leu Ala Arg Phe Leu Leu Val Gly Gln Thr Met Pro Thr Leu Leu  
 180 185 190

gat gaa gac ctc acc aaa gat ggt ata gaa gca ctt tct tcc cgc cca 624  
 Asp Glu Asp Leu Thr Lys Asp Gly Ile Glu Ala Leu Ser Ser Arg Pro  
 195 200 205

ttc cga aat gtc agc cgg cag aca agc aga cag atg tcc tta tgt ggt 672

20

30

40

Phe Arg Asn Val Ser Arg Gln Thr Ser Arg Gln Met Ser Leu Cys Gly

210 215 220

acc cca gaa aag tca tcc tac cga cag ttg tcc gtg tct gat agg tct 720

Thr Pro Glu Lys Ser Ser Tyr Arg Gln Leu Ser Val Ser Asp Arg Ser

225 230 235 240

10

tct att agg gtt gag gaa atc atc cct gct gct cga gtt gca ata caa 768

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

245 250 255

aca atg gaa gta agt gat ttc act tct act gtg gct tgc ttc atg aga 816

Thr Met Glu Val Ser Asp Phe Thr Ser Thr Val Ala Cys Phe Met Arg

260 265 270

20

ttg tca tgg gct gcg gct gca gga cgg ctt gat ctt gtt ggg agt agc 864

Leu Ser Trp Ala Ala Ala Gly Arg Leu Asp Leu Val Gly Ser Ser

275 280 285

cag cca att aaa gaa agt aat tcc ctg tgt cct gct gga att cga aac 912

Gln Pro Ile Lys Glu Ser Asn Ser Leu Cys Pro Ala Gly Ile Arg Asn

290 295 300

30

aga ctc agc agt tca gga agc aat tgc agc tct gga agt gaa gga gaa 960

Arg Leu Ser Ser Gly Ser Asn Cys Ser Ser Gly Ser Glu Gly Glu

305 310 315 320

cca gta gcc ctg cat gcg gga atc tgt gtt cga caa cag tct gta tcc 1008

Pro Val Ala Leu His Ala Gly Ile Cys Val Arg Gln Gln Ser Val Ser

40

325

330

335

acc aaa gac tcg ctg att gcg gga gag gct ttg tct ctt ctt gtt acg 1056

Thr Lys Asp Ser Leu Ile Ala Gly Glu Ala Leu Ser Leu Leu Val Thr

340

345

350

tgc cta cag ctt cg<sup>g</sup> agc cag caa ctg gca tct ttc tat aac ttg ccc 1104

Cys Leu Gln Leu Arg Ser Gln Gln Leu Ala Ser Phe Tyr Asn Leu Pro

355

360

365

tgt gtt gct gat ttc atc att gat att ctg ctc gga tca cca agt gct 1152

Cys Val Ala Asp Phe Ile Ile Asp Ile Leu Leu Gly Ser Pro Ser Ala

370

375

380

20

gag att cgc cg<sup>g</sup> gtt gcc tgt gat cag ctg tac act ctt agt cag aca 1200

Glu Ile Arg Arg Val Ala Cys Asp Gln Leu Tyr Thr Leu Ser Gln Thr

385

390

395

400

gac aca tca gcg cat cca gat gtg cag aag cca aat cag ttt ctt cta 1248

Asp Thr Ser Ala His Pro Asp Val Gln Lys Pro Asn Gln Phe Leu Leu

405

410

415

30

ggc gta atc ctc acg gct cag ctg cct ctc tgg tct cca act agt att 1296

Gly Val Ile Leu Thr Ala Gln Leu Pro Leu Trp Ser Pro Thr Ser Ile

420

425

430

atg aga gga gtc aat cag aga ctg tta tct cag tgt atg gag tat ttt 1344

Met Arg Gly Val Asn Gln Arg Leu Leu Ser Gln Cys Met Glu Tyr Phe

435

440

445

40

gat ttg aga tgc cag tta tta gat gat ctg aca act tca gaa atg gag 1392  
 Asp Leu Arg Cys Gln Leu Leu Asp Asp Leu Thr Thr Ser Glu Met Glu  
 450 455 460

cag tta agg atc agc cca gct acg atg ctt gaa gat gag att act tgg 1440  
 Gln Leu Arg Ile Ser Pro Ala Thr Met Leu Glu Asp Glu Ile Thr Trp 10  
 465 470 475 480

ctg gat aac ttt gaa cct aat cgt aca gct gaa tgt gag acc agt gaa 1488  
 Leu Asp Asn Phe Glu Pro Asn Arg Thr Ala Glu Cys Glu Thr Ser Glu  
 485 490 495

gcg gac aac atc tta ctg gca ggg cac tta cgc ctc atc aag acc ctt 1536 20  
 Ala Asp Asn Ile Leu Leu Ala Gly His Leu Arg Leu Ile Lys Thr Leu  
 500 505 510

ctt tca ctc tgt ggg gca gaa aag gaa 1563  
 Leu Ser Leu Cys Gly Ala Glu Lys Glu  
 515 520

30

**<210>** 5

**<211>** 32

**<212>** DNA

**<213>** Artificial Sequence

40

**<220>**

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide for using as a primer

〈400〉 5

aaaaagcagg ctatgccatg gagcaggaga aa 32

10

〈210〉 6

〈211〉 52

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide for using as a primer

20

〈400〉 6

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt ctagggatca acatcatcaa gg 52

30

〈210〉 7

〈211〉 27

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide for using as a primer

40

〈400〉 7

gggacaagg t tgtacaaaaa agcaggc

27

〈210〉 8

〈211〉 36

〈212〉 DNA

10

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide for using as a primer

〈400〉 8

ggtgttgcaa cttcttatat gaatgcagtc tttag

36

20

【図面の簡単な説明】

【図1】 b f 0 4 2 7 4 の脱ユビキチン化活性が、 b f 0 4 2 7 4 と人工基質 ( U b - R - G S T 、 U b - M - G S T 、 U b - I - G S T 、 または U b - P - G S T ) とを共に大腸菌で発現させた共発現系で認められたことを示す図である。図中、 U S P 1 5 およびルシフェラーゼは、それぞれ脱ユビキチン化活性の陽性コントロールおよび陰性コントロールである。レーン左側の数値は分子量を示す。

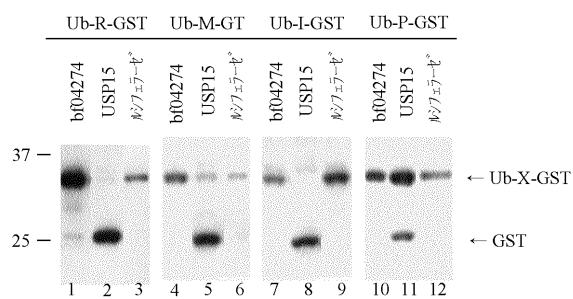
【図2】 b f 0 4 2 7 4 の推定酵素活性部位である、 N 末端から第 6 3 4 番目のシステイン ( C ) 残基をセリン ( S ) 残基に置換すると ( b f 0 4 2 7 4 C 6 3 4 S ) 、その脱ユビキチン化活性が消失したことを示す図である。図中、 U S P 1 5 およびルシフェラーゼは、それぞれ脱ユビキチン化活性の陽性コントロールおよび陰性コントロールである。レーン左側の数値は分子量を示す。

【図3】 b f 0 4 2 7 4 の N 末端から 5 2 1 アミノ酸残基を欠失させた K I A A 1 0 5 7 - 1 の脱ユビキチン化活性が、 K I A A 1 0 5 7 - 1 と人工基質 ( U b - R - G S T 、 U b - M - G S T 、 U b - I - G S T 、 または U b - P - G S T ) とを共に大腸菌で発現させた共発現系で認められたことを示す図である。図中、 U S P 1 5 およびルシフェラーゼは、それぞれ脱ユビキチン化活性の陽性コントロールおよび陰性コントロールである。レーン左側の数値は分子量を示す。

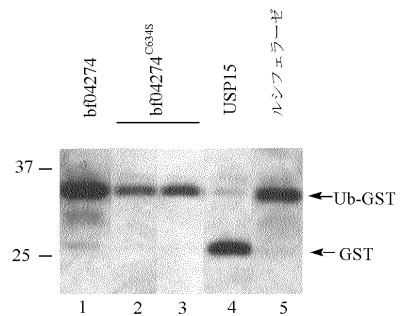
30

40

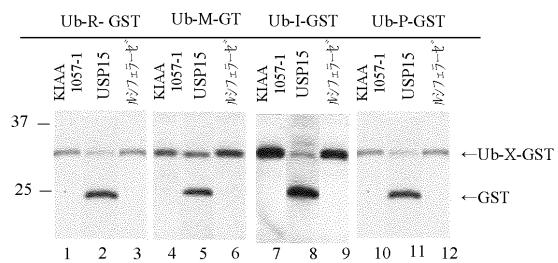
【図1】



【図2】



【図3】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 9/50 (2006.01)	C 1 2 N 9/50	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z

(72)発明者 長瀬 隆弘

千葉県木更津市矢那1532番3号  
内

財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

(72)発明者 大石 道夫

千葉県木更津市矢那1532番3号  
内

財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

(72)発明者 横田 博

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号  
内

第一製薬株式会社 東京研究開発センター

(72)発明者 下村 知栄子

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号  
内

第一製薬株式会社 東京研究開発センター

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 國際公開第01/053312 (WO , A1 )

Homo sapiens mRNA for KIAA1057 protein, partial cds. [online]. 1999-AUG-04 uploaded. N CBI Entrez Nucleotide, ACCESSION No.AB028980 (GI:5689450) [Retrieved on 2008-JUL-09]. Retrieved from the internet:<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?5689450:OLD11:55078>>

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00-15/90  
UniProt/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq